

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE CIENCIAS

Departamento de Química Analítica

Grupo de investigación FQM-297 “Control Analítico, Ambiental, Bioquímico y Alimentario”



TESIS DOCTORAL
DETERMINACIÓN DE CONTAMINANTES
EN LUGARES REMOTOS
Y OTROS PROBLEMAS ANALÍTICOS

Presentada por:

Paulina Karem Contreras Gutiérrez

para optar al grado de

Doctor en Química

Granada, 2012



Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Paulina Karem Contreras Gutiérrez
D.L.: GR 494-2013
ISBN: 978-84-9028-377-6

Esta tesis doctoral ha sido realizada con la ayuda de una beca predoctoral concedida por la Agencia Española de Cooperación Internacional para el Desarrollo, dentro del Programa Becas MAEC-AECID del Ministerio de Asuntos Exteriores y de Cooperación y a la financiación con cargo a fondos del grupo de investigación FQM-297 “Control Analítico, Ambiental, Bioquímico y Alimentario”, procedentes de diferentes proyectos, contratos y subvenciones de la Administración Central y Autonómica y del Plan Propio de Investigación de la UGR.



**DETERMINACIÓN DE CONTAMINANTES EN LUGARES REMOTOS
Y OTROS PROBLEMAS ANALÍTICOS**

por

Paulina Karem Contreras Gutiérrez

Visado en Granada a Julio de 2012

Fdo: Prof. Dr. D. Alberto Fernández Gutiérrez
Catedrático del Departamento de Química Analítica
Facultad de Ciencias. Universidad de Granada

Fdo: Dr. D. Antonio Segura Carretero
Catedrático del Departamento de Química Analítica
Facultad de Ciencias. Universidad de Granada

Fdo: Dr. D. Jorge Fernando Fernández Sánchez
Profesor Titular del Departamento de Química Analítica
Facultad de Ciencias. Universidad de Granada

Trabajo presentado para optar al grado de Doctor en Química.

Fdo: Paulina Karem Contreras Gutiérrez





El Prof. Dr. D. ALBERTO FERNÁNDEZ GUTIÉRREZ, Catedrático del Departamento de Química Analítica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada, y Director del grupo de investigación FQM-297 “Control Analítico, Ambiental, Bioquímico y Alimentario” y del Centro de Investigación y Desarrollo del Alimento Funcional (CIDAF).

CERTIFICA:

Que el trabajo que se presenta en esta tesis doctoral bajo el título: “**DETERMINACIÓN DE CONTAMINANTES EN LUGARES REMOTOS Y DE OTROS PROBLEMAS ANALÍTICOS**”, ha sido realizado bajo mi dirección, la del Dr. D. Antonio Segura Carretero y la del Dr. D. Jorge Fernando Fernández Sánchez, en los laboratorios que el grupo FQM-297 tiene en el Departamento de Química Analítica y también, parcialmente, en los laboratorios del Instituto de Diagnóstico Ambiental y Estudios del Agua (IDAEA) del CSIC-Barcelona, la Facultad de Ciencias del Mar y Ambientales (CASEM) de Cádiz y del Centro de Investigación y Desarrollo del Alimento Funcional (CIDAF), reuniendo todos los requisitos legales, académicos y científicos para hacer que la doctoranda Dña. Paulina Karem Contreras Gutiérrez pueda optar al grado de doctor en Química.

Y para que así conste, expido y firmo el presente certificado en Granada, septiembre de 2012.

Dr. D. Alberto Fernández Gutiérrez



AGRADECIMIENTOS



ÍNDICE



OBJETO	1
INTRODUCCIÓN	9
1. La Química Analítica como Ciencia actual	9
2. Soluciones de la Química Analítica en las Ciencias ambientales	9
2.1. <i>Contaminantes orgánicos persistentes (COPs)</i>	11
2.1.1. Los compuestos organoclorados (OC).....	14
2.1.1.1 DDT y análogos (DDT, DDD, DDE).....	15
2.1.1.2. Hexaclorociclohexano (HCH).....	16
2.1.1.3. Ciclodienos y compuestos similares.....	17
2.1.2. Policlorobifenilos (PCBs).....	18
2.1.3. Polibrominados difenileteres (BDEs).....	20
2.2. <i>Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs)</i>	21
2.3. <i>Trazas de metales</i>	23
3. Soluciones de la Química Analítica en el campo alimentario	24
3.1. <i>Alimentación-Salud</i>	24
3.2. <i>Alimentos funcionales</i>	26
3.3. <i>Compuestos bioactivos</i>	27
3.3.1. Compuestos polifenólicos.....	29
3.3.1.1. Ácidos fenólicos.....	30
3.3.1.2. Flavonoides.....	30
3.3.1.3. Taninos.....	31
3.3.1.4. Otros compuestos.....	31
3.3.2. Terpenos.....	32
3.3.3. Compuestos nitrogenados.....	33
3.3.4. Compuestos azufrados.....	33
4. Técnicas Separativas	34
4.1. <i>Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)</i>	34
4.1.1. Tipos de cromatografía líquida.....	36
4.1.1.1. Cromatografía de partición o reparto.....	37
4.1.1.2. Optimización de la metodología.....	38
4.2. <i>Cromatografía de gases (GC)</i>	40
4.2.1. Tipos de cromatografía de gases.....	42
4.2.1.1. La cromatografía gas-sólido.....	42
4.2.1.2. La cromatografía gas-líquido.....	42
4.3. <i>Electroforesis Capilar (CE)</i>	42
4.3.1. Tipos de Electroforesis Capilar.....	46
4.3.1.1. Electroforesis capilar en zona.....	47
5. Sistemas de Detección Analítica	51



5.1. Espectrometría de masas	52
5.1.1. Procedimientos de ionización a vacío	55
5.1.1.1. Ionización por impacto electrónico (EI)	55
5.1.1.2. Ionización química positiva (NCI)	55
5.1.2. Procedimiento de ionización a presión atmosférica	56
5.1.2.1. Ionización por electrospray (ESI)	56
5.2. Principales analizadores	57
5.2.1. Analizadores de tiempo de vuelo	58
5.2.2. Analizadores cuadrupolo	60
5.2.3. Analizadores de trampa de iones	62
5.3. Espectrometría de Masas de Plasma Acoplado (ICP-MS)	64
6. Sensores	65
6.1. Sensores Químicos	66
6.1.1. Componentes de un sensor químico	68
6.1.2. Diseño de un sensor químico	69
6.1.3. Clasificación de los sensores químicos	70
6.2. Sensores Ópticos	71
6.2.1. Generalidades de los sensores ópticos	71
6.2.2. Ventajas e inconvenientes de los sensores ópticos	73
6.2.3. Clasificación de los sensores ópticos	76
6.2.4. Sensores tipo célula de flujo: Optosensores	78
6.2.5. Sensores tipo sonda: Óptodos	79
6.2.6. Sensores de luminiscencia molecular	83
6.2.7. Mecanismos de reconocimiento óptico	85
Capítulo I	87
I.1. Generalidades de la Antártida	91
I.2. Antecedentes de contaminación en la Antártida	93
<i>I.2.1. Contaminación y transporte a larga distancia</i>	<i>94</i>
I.3. Análisis de la problemática en un marco regulado	96
<i>I.3.1. Tratado antártico</i>	<i>96</i>
<i>I.3.2. Protocolo de Protección del Medio Ambiente</i>	<i>96</i>
I.4. Consideraciones generales para la investigación en la Antártida	98
<i>I.4.1 Comité Polar</i>	<i>98</i>
I.4.1.1 Componentes del Comité polar español	98
I.4.1.2. Infraestructura para la investigación Antártida del CPE	100
I.5. Consideraciones generales para el estudio de contaminación en aguas dulces en la Antártida ...	102
<i>I.5.1 Caracterización del agua dulce in situ</i>	<i>103</i>
I.5.1.1 Equipos	104

I.5.1.2. Resultados y discusión.....	104
I.6. Determinación de COPs en aguas Antártida mediante la GC-MS	107
I.6.1. Materiales y Reactivos	107
I.6.2 Equipos	107
I.6.3. Metodología	107
I.6.4. Análisis y cuantificación de COPs	120
I.6.5. Resultados y discusión.....	124
I.7. Determinación de HAPs en aguas Antártida mediante la GC-EI-MS	129
I.7.1. Materiales-Equipo	129
I.7.2. Metodología	130
I.7.3. Discusiones y resultados	135
I.8. Determinación de trazas de metales mediante ICP-MS	135
I.8.1. Materiales	135
I.8.2. Equipos.....	135
I.8.3. Metodología	135
I.8.4. Resultados y discusiones	139
Capítulo II	145
II.1. Generalidades del dióxido de carbono	149
II.1.1. Estructura molecular	149
II.1.2 Nomenclatura e historia.....	149
II.1.3. Propiedades físico-químicas del CO ₂	150
II.1.4 Aplicaciones.....	150
II.1.5 Reacciones más importantes en las que está involucrado el CO ₂	152
II.1.6 Toxicología del CO ₂	152
II.2. Métodos analíticos de determinación de CO₂.....	153
II.2.1 Métodos químicos o clásicos.....	153
II.2.2 Métodos fisicoquímicos.....	153
II.2.2.1. Métodos electroquímicos	153
II.2.2.2. Métodos espectrométricos	154
II.2.2.3. Métodos cromatográficos	155
II.3 Sensores desarrollados para CO₂	155
II.3.1. Sensores electroquímicos de CO ₂	156
II.3.2 Sensores ópticos de CO ₂	156
II.3.2.1. Sensores ópticos húmedos.....	156
II.3.2.2. Sensores secos	157



II.4. Establecimiento de las condiciones experimentales óptimas para el desarrollo de la nueva fase sensora.....	159
<i>II.4.1. Mecanismo de acción implicado en la detección de CO₂</i>	<i>160</i>
II.5. Materiales y Métodos.....	160
<i>II.5.1. Reactivos</i>	<i>160</i>
<i>II.5.2. Equipos.....</i>	<i>160</i>
II.6. Resultados y discusión.....	162
<i>II.6.1. Determinación de las características espectroscópicas en fase gaseosa</i>	<i>162</i>
II.6.1.1. Optimización de la composición de la fase sensora	163
II.6.1.2. Efecto del flujo total sobre la determinación de CO ₂	164
II.6.1.3. Efecto del porcentaje de humedad sobre la determinación de CO ₂	165
II.6.1.4. Estudio de interferentes y reproducibilidad de la fase sensora de CO ₂	165
<i>II.6.2. Aplicabilidad de la fase sensora en la determinación de CO₂ disuelto.....</i>	<i>167</i>
II.6.2.1. Características espectroscópicas en fase acuosa	168
II.6.2.2. Estudio de reproducibilidad de la fase sensora de CO ₂ disuelto.....	168
<i>II.6.3. Características analíticas de la fase sensora desarrollada.....</i>	<i>170</i>
<i>II.6.4. Estudio de estabilidad de la fase sensora.....</i>	<i>172</i>
II.7. Desarrollo de optosensor de fibra óptica.....	177
<i>II.7.1 Diseño del transductor óptico</i>	<i>178</i>
<i>II.7.2 Mecanismo de funcionamiento.....</i>	<i>180</i>
<i>II.7.3 Características espectroscópicas.....</i>	<i>181</i>
<i>II.7.4 Caracterización analítica del optosensor</i>	<i>181</i>
Capítulo III.....	185
III.1. Introducción	189
III.2. Calidad del agua	189
III.3. Problemática de la determinación de la calidad del agua a nivel mundial	191
III.4. Problemática de la calidad del agua en Bolivia	193
III.5. Normativa de aguas.....	197
III.6. Parámetros utilizados en la determinación de calidad de agua.	197
<i>III.6.1 Evaluación fisicoquímica</i>	<i>198</i>
<i>III.6.2 Evaluación microbiológica</i>	<i>200</i>
<i>III.6.3. Inspección Sanitaria básica</i>	<i>201</i>

III.7. Materiales y métodos.....	202
<i>III.7.1 Aspectos económicos</i>	202
<i>III.7.2 Parámetros a determinar.....</i>	202
<i>III.7.3 Establecimiento de los laboratorios</i>	205
III.7.3.1 Infraestructura	205
III.7.3.2. Mobiliario	206
III.7.3.3. Material informático	207
III.7.3.4 Instrumentación	208
III.7.3.5 Material fungible y reactivos.....	212
III.7.3.6 Protocolos de análisis.....	215
III.7.3.7 Material de consulta	215
<i>III.7.4 Formación del personal.....</i>	216
Capítulo IV.....	219
IV.1. Generalidades especies <i>Allium</i> sp.....	223
<i>IV.1.1 Generalidades de la cebolla</i>	223
<i>IV.1.2 Generalidades de la cebolleta.....</i>	225
IV.2. Composición nutricional de la cebolla y cebolleta	225
IV.3. Propiedades funcionales descritas en variedades <i>Allium</i>.....	227
IV. 4. Metodologías analíticas aplicadas al estudio de metabolitos en <i>Allium</i>	228
IV.5. Análisis del perfil metabólico las tres variedades <i>Allium</i>	232
<i>IV.5.1. Materiales y métodos</i>	232
IV.5.1.1. Muestra.....	232
IV.5.1.2. Reactivos	233
<i>IV.5.2. Técnica analítica utilizada para la caracterización</i>	233
IV.5.2.1. Condiciones HPLC.....	233
IV.5.2.2. Condiciones sistema de ionización	233
IV.5.2.3. Condiciones del microTOF	234
IV.5.2.4. Análisis de datos	234
<i>IV.5.3. Preparación de los extractos.....</i>	234
<i>IV.5.4 Resultados y discusión</i>	236
IV.5.4.1. Determinación de la dilución de trabajo del extracto	236
<i>IV.5.5. Análisis de muestras</i>	239
Capítulo V.....	262
V.1. Generalidades del aguacate (<i>Persea americana</i>)	266
<i>V.1.1. El fruto</i>	266



V.2. Importancia económica del aguacate	269
<i>V.2.1. Niveles de producción</i>	<i>269</i>
V.3. Composición nutricional.....	270
V.4. Propiedades funcionales	270
V.5. Análisis de metabolitos de aguacate. Estudios realizados	272
V.6 Materiales Y Métodos	274
<i>V.6.1. Reactivos.....</i>	<i>274</i>
<i>V.6.2. Muestras</i>	<i>275</i>
<i>V.6.3. Preparación del extracto.....</i>	<i>275</i>
<i>V.6.4. Análisis mediante CE-ESI-IT MS.....</i>	<i>276</i>
V.6.4.1. Instrumentación utilizada	276
V.6.4.2. Condiciones CE-ESI-IT MS.....	277
V.7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	278
<i>V.7.1. Estudios preliminares.....</i>	<i>278</i>
<i>V.7.2. Optimización exhaustiva de las variables CE y MS (Full Scan y MRM).....</i>	<i>280</i>
<i>V.7.3. Optimización de la separación.....</i>	<i>284</i>
<i>V.7.4. Determinación de parámetros analíticos (en Full Scan y MRM)</i>	<i>291</i>
<i>V. 7.5. Evolución del perfil metabólico</i>	<i>293</i>
CONCLUSIONES	307

OBJETO



OBJETO

El objeto de la presente Tesis Doctoral fue plantear y tratar de resolver una serie de problemas analíticos que permitieran a la doctoranda conseguir una adecuada formación en el manejo de distintas técnicas instrumentales actuales, así como en el diseño de experiencias y el tratamiento de muestras y resultados.

Algunos de los problemas elegidos, además de por su interés en sí, lo fueron por ser solución importante y útil en su país de origen, Bolivia y en el Sur del continente americano. Otros, porque las metodologías empleadas podrían ser igualmente aplicables en su Universidad cuando se produzca su retorno y la futura disponibilidad instrumental en la misma lo permita.

Debido a que el grupo FQM 297 donde se ha realizado la presente tesis doctoral sigue varias líneas de investigación destinadas al “Control analítico, ambiental, bioquímico y alimentario” y también al hecho de que al comienzo de esta tesis el grupo estaba involucrado en diversos proyectos y contratos de investigación, los objetivos planteados fueron:

1) Viajar a la Antártida con el fin de realizar mediciones en muestras de agua “in situ” y obtener muestras de las mismas para su posterior estudio en el laboratorio y la caracterización de metales y la búsqueda de compuestos orgánicos persistentes.

2) Dentro de la línea de sensores, desarrollar fases sensoras que permitan la detección de dióxido de carbono a partir de nuevos materiales que ofrezcan la posibilidad de desarrollar nuevas aplicaciones.

3) En las líneas de investigación que emplean plataformas separativas, caracterizar y cuantificar analitos de interés en matrices vegetales

Así, los objetivos concretos que se pretenden perseguir en la presente tesis pueden dividirse en dos grupos. Un primer grupo, destinado a generar información útil en el campo ambiental, que incluye:

- Manifestar la utilidad de las fases sensoras para la caracterización de la matriz agua, “in situ”, en lugares remotos (Antártida) y la potencialidad de ICP-MS para caracterizar metales en agua.
- Mostrar la potencialidad de las técnicas separativas acopladas a distintos sistemas de detección (mediante distintos sistemas de ionización) que



permitan la detección de analitos inorgánicos (metales) y orgánicos (compuestos orgánicos persistentes) que pudiesen estar presentes en lugares remotos.

- Desarrollar una fase sensora sensible a dióxido de carbono.

El segundo grupo de objetivos concretos correspondientes al campo alimentario serían:

- Mostrar la potencialidad del uso de las técnicas acopladas para la caracterización metabólica de tres variedades de cebolla cultivadas en una misma zona (Andalucía).
- Desarrollar un método que muestre la potencialidad de la técnica electroforesis capilar acoplada a una trampa de iones mediante el sistema de ionización ESI para la determinación de metabolitos en aguacate.

RESUMEN



RESUMEN

En esta memoria se reúnen los resultados obtenidos durante la realización de la tesis doctoral titulada “Determinación de contaminantes en lugares remotos y otros problemas analíticos”, desarrollada dentro del grupo de investigación FQM-297 “Control Analítico, Ambiental, Bioquímico y Alimentario”. Cada capítulo comienza con una breve introducción que incluye información acerca de la matriz estudiada y la técnica analítica empleada para su determinación, seguida de la parte experimental, discusión y resultados. Debido a los problemas que aborda, se han conformado dos bloques, uno primero destinado al control ambiental y uno segundo al control alimentario.

Dentro del primer bloque, el primer capítulo hace referencia al estudio de contaminantes en un lugar remoto como es la Antártida, habiéndose elegido y propuesto como nueva y potencial matriz de estudio para esta zona el agua dulce. Para ello, en una primera instancia se caracterizó esta matriz con medidas básicas “in situ” durante la campaña antártica y, en una segunda instancia, ya en España, y mediante colaboraciones realizadas con la Universidad de Cádiz y el Instituto del agua perteneciente al CSIC de Barcelona, se determinó el contenido de metales y la presencia de contaminantes orgánicos persistentes, respectivamente.

En el segundo capítulo, se ha desarrollado y caracterizado una fase sensora útil para la detección de dióxido de carbono (CO_2) en ambientes gaseosos y acuosos, en base a nuevos materiales desarrollados dentro del grupo de investigación; específicamente el copolímero lineal NP1X, el cual es insoluble en agua, sensible al pH y fluorescente, características utilizadas para su aplicación en la detección de CO_2 .

El tercer capítulo y cerrando la línea de investigación destinada al control ambiental, se resume un proyecto desarrollado en Bolivia titulado “Importancia de la implementación de laboratorios básicos de control aguas en centros de formación”. Este proyecto ha permitido implementar en Bolivia, en la Facultad de Bioquímica y Farmacia de la Universidad Mayor de San Simón, un laboratorio básico de control de aguas, que permitirá a través de la formación del estudiantado de esta institución, el desarrollo de estudios de control de calidad de aguas.

En el segundo bloque, el cuarto capítulo que se enmarca en este caso en la línea de investigación que tiene que ver con técnicas separativas acopladas a distintos sistemas de detección para el control alimentario. Así se muestra la caracterización metabólica de tres variedades de cebolla producidas en la zona de Andalucía. En este estudio se logró determinar un gran número de compuestos pertenecientes a diversas familias de metabolitos, como son: ácidos fenólicos, azúcares, cumarinas, lignanos y flavonoides.



Algunos descritos ya por otros autores pero también hubo un gran número de compuestos no descritos, que fueron detectados, gracias a la potencialidad de la técnica analítica aplicada.

Finalmente, en el quinto capítulo se describe un nuevo método basado en el uso de la de Electroforesis capilar en zona **CZE** acoplado a una trampa de iones masas **IT-MS** para determinación de metabolitos en aguacate (*Persea americana Mill*) con el objetivo de estudiar la evolución metabólica de dicha fruta utilizando dos aproximaciones metodológicas diferentes.

INTRODUCCIÓN



INTRODUCCIÓN

1. La Química Analítica como Ciencia actual

La Química Analítica es, hoy en día, una Ciencia muy actual, que se ha constituido en un eje motor del desarrollo de la mayoría de las Ciencias experimentales y que es útil en la solución de los problemas de laboratorio a los que debe enfrentarse el científico, que cada vez son mayores y quizás más complejos y que deben ser afrontados con el fin de lograr información. Estos problemas son entre otros: rango de analitos muy amplio, matrices muy complejas y desconocidas y concentraciones de analitos muy pequeñas.¹

Para este fin, la Química Analítica ha desarrollado diferentes técnicas y metodologías y que están provistas de alta sensibilidad, una alta selectividad, que son rápidas, automatizables y en la medida de lo posible sencillas. Además, como cada medida que se realiza conlleva cierto grado de incertidumbre es conveniente hacer uso herramientas estadísticas que tienen cada vez más relevancia, ya que ayudan a manejar la gran cantidad de información que se genera.

Todo esto ha hecho que la Química Analítica actual sea considerada como una Ciencia de la medida y caracterización,² una Ciencia racional que desempeña un efecto clave para promover, entender y resolver problemas químicos relacionados al ambiente y la vida³, proporcionando información que permite, en muchos casos, tomar decisiones de importancia social en muchas áreas; algunos de estos problemas se tratarán con detalle en esta Memoria.

2. Soluciones de la Química Analítica en las Ciencias ambientales

En el campo ambiental la Química Analítica juega un papel fundamental, pues por medio de sus diferentes técnicas y metodologías permite realizar medidas que indican la presencia o ausencia de contaminación a través del seguimiento y determinación de los

¹ Baeza Juan J. La Química Analítica y su metodología [en línea]. octubre de 1997 [ref. de 2010-08-2]. Disponible en Web: <http://www.uv.es/baeza/metodo.html>],

² Erkang Wang. Future Trends in Analytical Chemistry-Conferences » 1st AACN Symposium. 2009. September 26, Sapporo, Japan.

³ Pimentel, G. C. 1994. Oportunidades en la química: presente y futuro. McGraw-Hill / Interamericana De Mexico. ISBN 9789701006115



niveles de contaminantes. Por tanto, no sólo se encarga de medir o determinar la concentración de especies contaminantes nocivas, sino que además debe determinar la concentración de los constituyentes químicos naturales en el ambiente de forma exacta, para que se puedan aplicar modelos de predicción que permitan evitar desastres. Dicho de otro modo, la Química Analítica ambiental no sólo incluye el estudio y evolución de estos compuestos químicos, sino también de los procesos y metodologías de remediación.⁴

Actualmente se dispone de esquemas de screening que permiten determinar la presencia de contaminantes teniendo en cuenta la naturaleza de la muestra y las posibles técnicas que permitan detectarlos; un ejemplo de ellos se muestra en la siguiente figura 1.

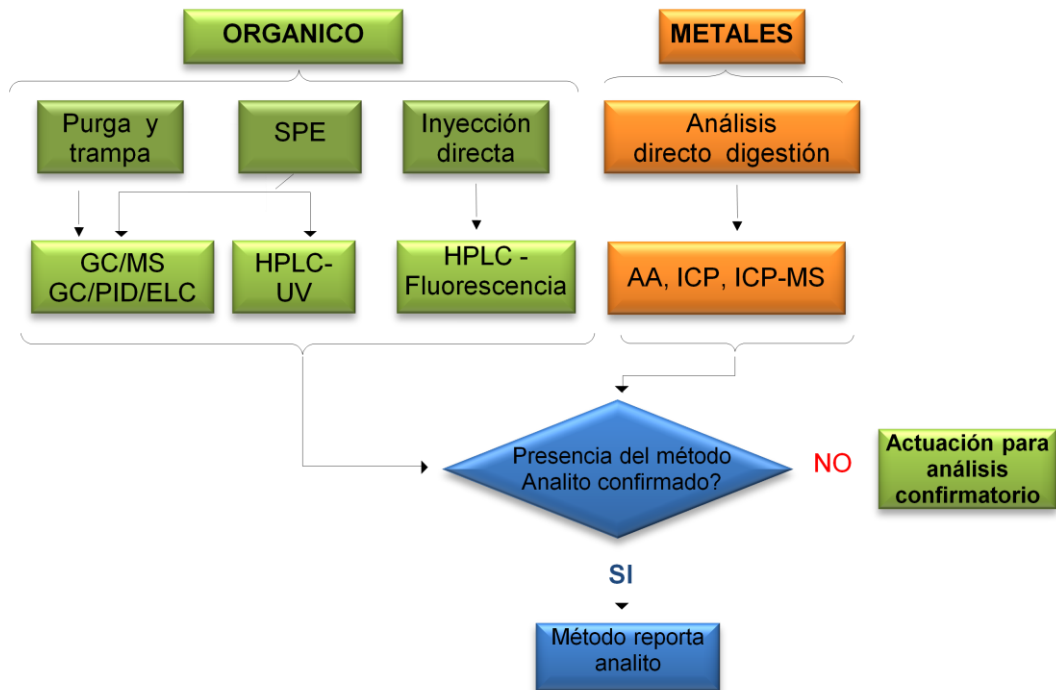


Fig.1. Screening de laboratorio para contaminantes químicos.

Las principales familias implicadas en el binomio Química Analítica-Ciencias Ambientales que se estudiarán en la presente memoria son: los Contaminantes Orgánicos Persistentes **COPs** y los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos **HAPs**, y trazas de metales; de las cuales a continuación se harán unas breves consideraciones respecto a sus propiedades y analitos a estudiar.

⁴ Colin, B. 2004. Química Ambiental. Editorial reverté S.A. Barcelona. 622 p.

2.1. Contaminantes orgánicos persistentes (COPs)

Los COPs o POCs (del inglés *Persistent Organic Compounds*), son compuestos que deben su nombre a su naturaleza orgánica. Son una clase de contaminantes químicos altamente peligrosos que se reconocen como una seria amenaza global para la salud humana y los ecosistemas. Tienen origen antropogénico y natural, pues son sustancias químicas que han sido producidas y liberadas en el medio ambiente de manera intencional mediante un uso indiscriminado (plaguicidas y o productos químicos industriales), o de forma accidental⁵ como subproductos no deseados de procesos industriales,⁶ combustiones y procesos naturales (como incendios forestales o procesos volcánicos). Muchos de ellos son aún desconocidos, ignorándose los efectos perjudiciales para la salud pública.⁷

Según el Protocolo de contaminantes orgánicos persistentes (**Convenio de Estocolmo**)⁸ las características principales de estos compuestos son:

Elevada persistencia, que se debe a que son resistentes a la degradación fotolítica, química y biológica⁹, propiedad que les permite mantener sus características químicas y funcionales a través del tiempo pese a su transporte.

Naturaleza lipofílica, que hace que presenten escasa solubilidad en el agua y alta solubilidad en medios grasos (liposolubilidad), lo que facilita su ingreso a la cadena alimentaria, pues permite que sean bioacumulados en los tejidos adiposos de los organismos vivos y asciendan en la cadena alimentaria, donde manifiestan su bioacumulación.

Elevada toxicidad, pues estos compuestos producen efectos negativos sobre la salud y el ambiente. Así, la exposición crónica a concentraciones bajas en un período de tiempo

⁵ OMS. Cuarto estudio coordinado por la OMS sobre contaminantes orgánicos persistentes en la leche materna, en colaboración con el Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA). Revisado el 1 de octubre de 2007

⁶ <http://www.greenpeace.org/argentina/contaminacion/contaminantes-persistentes>

⁷ Stockholm Convention Secretariat. 2010. Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants POPs, as amended in 2009. Disponible de: <http://www.chm.pops.int/Convention/ConventionText/tabid/2232/Default.aspx> [Acceso en: Diciembre 2.2011;modificado en: Diciembre 2012].

⁸ Protocolo de Contaminantes Orgánicos Persistentes firmado el 24 de junio de 1998 en Dinamarca

⁹ Ritter L, Solomon KR, Forget J, Stemeroff M, O'Leary C. 1995. A review of the persistent organic pollutants: DDT, aldrin, dieldrin, endrin, chlordane, heptachlor, hexachlorobenzene, mirex, toxaphene, polychlorinated biphenyls, dioxin and furans. Geneva: International Programme on Chemical Safety.



largo sería causante de afecciones como, por ejemplo, el cloroacné y la hiperpigmentación, y de alteraciones endocrinas,¹⁰ inmunes, nerviosas, del sistema reproductor¹¹ e incluso cáncer.

Facilidad de transporte a largas distancias, que puede ser atmosférico y transfronterizo¹², pues manifiestan su amplia distribución en el planeta, incluso en lugares donde nunca se han utilizado o se han producido, como son las regiones árticas y como se observa en la figura 2.^{13,14,15}

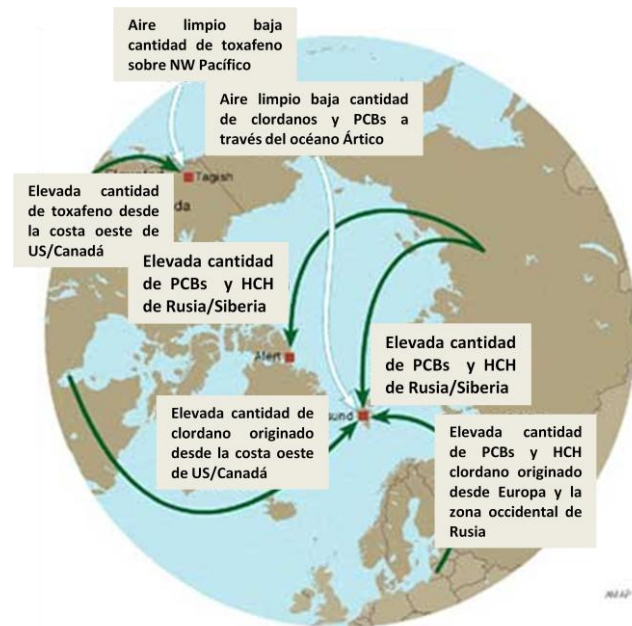


Fig. 2. Distribución Global de COPs en el Ártico. Fuente: AMAP.

¹⁰Ver Colborn, Theo, et al. 2000. *Nuestro Futuro Robado*, Ecospaña Editorial, Madrid, 1997 y Krinsky, Sheldon, *Hormonal Chaos. The scientific and Social Origins of the Environmental Endocrine Hypothesis*, Jhon Hopkins University Press, Baltimore y Londres.

¹¹"Reproductive and Developmental Effects of Pesticides", en Gina Solomon, *Pesticides and Human Health. A Resource for Health Care Professionals*, California, Physicians for Social Responsibility, 2000, pp.39-44.

¹² Directiva 96/59/CE del Consejo, de 16 de septiembre de 1996, relativa a la eliminación de los policlorobifenilos y de los policloroterfenilos (PCB/PCT).

¹³ OMS. Cuarto estudio coordinado por la OMS sobre contaminantes orgánicos persistentes en la leche materna, en colaboración con el Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA). Revisado el 1 de octubre de 2007

¹⁴ Atlas E, Giam C.S., 1981. Global transport of organic pollutants: ambient concentrations in the remote marine atmosphere, *Science* 211, pp. 163–165.

¹⁵ Rice DA. 2004. Consequences of Exposure from Persistent Organic Pollutants (POPs): Session X Summary and Research Needs. *NeuroToxicol*; 25(4): 521-523.

Estos hechos justificaron el crear un tratado mundial para controlar los COPs de manera efectiva. Así, el **Programa de Naciones Unidas para el Medio Ambiente PNUMA** propició el desarrollo y la puesta en marcha del **Convenio de Estocolmo** sobre COPs (en mayo de 1995),¹⁶ cuya función es proteger la salud humana y ambiental. Para ello elaboraron una lista inicial de 12 COPs para los que se establecen medidas de control que eliminan su producción o uso (a nivel industrial o agrícola) o que reducen su liberación (como subproductos involuntarios)¹⁷ (UNEP 2001). El convenio además, contiene disposiciones para incluir en la lista otras sustancias químicas tóxicas con propiedades similares para su control y eliminación, como aconteció con la inclusión de los hexaclorocicloxanos (**HCH**) en la misma.

Con el mismo fin se creó **el Convenio de Róterdam** sobre Consentimiento Fundamentado Previo (CFP), el cual establece una lista de sustancias compuesta por plaguicidas y otros productos químicos peligrosos objeto de comercio internacional, con el fin de crear responsabilidad compartida respecto a la importación de estos productos a países en desarrollo, donde el gobierno receptor puede rechazar o no la importación¹⁸. Ambos convenios entraron en vigencia en 2004.

Otro convenio que hace frente a estos compuestos es el **Convenio de Basilea** sobre el Control de Movimientos Transfronterizos de los Desechos Peligrosos y su Eliminación. Al igual que los otros convenios tiene como fin proteger la salud y el medio ambiente contra los efectos adversos resultantes de la generación, manejo, los movimientos transfronterizos y la eliminación de desechos peligrosos y otros. Este convenio entró en vigor en 1992.

Finalmente la **Convención sobre contaminantes transfronteriza a larga distancia del aire (LRTAP)**, mediante el Protocolo sobre POCs busca reducir gradualmente e impedir la contaminación atmosférica, controlando, reduciendo o eliminando las descargas de estos. Este entró en vigor el 23 de octubre de 2003.

A continuación pasaremos a describir las familias de los compuestos bajo estudio en la presente memoria que fueron: los pesticidas organoclorados (**OCs**), los compuestos bifenilos policlorados (**PCBs**), bifenildifenil esterés (**BDEs**), los hidrocarburos aromáticos policíclicos (**HAPS**) y metales.

¹⁶ Decisión 2006/507/CE del Consejo, de 14 de octubre de 2004, relativa a la celebración, en nombre de la Comunidad Europea, del Convenio de Estocolmo sobre contaminantes orgánicos persistentes.

¹⁷ Convenio de Estocolmo.

¹⁸ Convenio de Róterdam.



2.1.1. Los compuestos organoclorados (OC)

Los compuestos organoclorados, más conocidos por su acrónimo en *inglés* (*organochlorine compounds, OC*), son compuestos químicos orgánicos que contienen en su molécula uno o más enlaces covalentes con átomos de cloro.¹⁹

Los OC son raros en la naturaleza, por lo que su origen es meramente antropogénico. Se desarrollarán para hacer frente a problemas derivados del desarrollo industrial y ante la demanda de productos químicos con actividad biocida contra plagas, por lo que su uso intensivo se inició en los años 30 y duró hasta los años 70. Debido a su toxicidad y bioacumulación fueron retirados y algunos prohibidos, por lo que son principalmente de interés histórico.²⁰ Sin embargo, siguen presentes debido a su lenta biodegradación sin pérdida notoria de su actividad²¹ y a su actual uso en los países del tercer mundo como es el caso del (DDT).

El destino de estos pesticidas en el ambiente depende de procesos de retención (adsorción, absorción), de transformación (degradación), de transporte (que depende de la volatilización, lixiviación, flujo superficial) y las interacciones de estos procesos. Así, muchos estudios han detectado estos compuestos en aguas superficiales y subterráneas en Europa y Estados Unidos²²; y en lugares lejanos como zonas subantárticas a los que han podido acceder por corrientes marinas²³, aéreas o migración de animales intoxicados.

La mayor parte de los OC son sustancias cancerígenas y causan efectos sobre el sistema inmunológico, reproductor y nervioso, además de muchas otras afecciones. Sus efectos fisiológicos, a menudo, tardan en aparecer o son indirectos, es decir, aunque la exposición a corto plazo pueda parecer no peligrosa, a largo plazo, sí lo es¹⁹.

¹⁹Beatriz Padilla Vivas, Fernando V. Díez Sanz y Salvador Ordóñez García. Tratamiento de efluentes acuosos contaminados con compuestos organoclorados. Ingeniería del agua VOL. 12, Nº 4 Diciembre 2005. p. 361

²⁰ George Ware W. y Whitacre David M. 2004. Introducción a los Insecticidas The Pesticide Book, 6th ed*. Publicado por MeisterPro Information Resources Una división de Meister Media WorldwideWilloughby, Ohio

²¹ SPADOTTO, C.A. 2002. Comportamento e Destino Ambiental de Herbicidas. Comité de Meio Ambiente, Sociedade Brasileira da Ciência das Plantas Daninhas.. [online] Disponível: <http://www.cnpma.embrapa.br/herbicidas/> [Acessado em dd/mm/aaaa].

²² Cuevas M. A. 1998. Jornadas sobre la contaminación de las aguas subterráneas: un problema pendiente. Valencia.

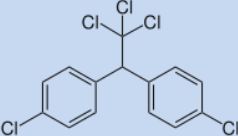
²³ Beatriz Padilla Vivas, Fernando V. Díez Sanz y Salvador Ordóñez García. 2005. Tratamiento de efluentes acuosos contaminados con compuestos orgánoclorados. Ingeniería del Agua. Vol. 12, Nº 4.

Los OC pueden ser divididos en cinco grupos²⁴: 1) DDT y análogos; 2) HCH; 3) ciclodienos y compuestos similares; 4) toxafeno y compuestos relacionados; y 5) Estructuras tipo mirex y clordecone. En nuestro caso se han estudiado los compuestos pertenecientes a las familias 1, 2 y 3 por lo que se mencionarán brevemente las mismas.

2.1.1.1 DDT y análogos (DDT, DDD, DDE)

El DDT fue uno de los primeros insecticidas de 2ª generación en crearse. Sus propiedades fisicoquímicas se resumen en la tabla 1.

Tabla 1. Propiedades físico-químicas del DDT

 <p>DDT</p>	
Fórmula molecular	C ₁₄ H ₉ Cl ₅
Masa molecular	354.49 g/mol
Densidad	0.99 g/cm ³
Punto de fusión	109 °C
Solubilidad	Casi insoluble 0.00012ppm
Tensión de vapor	1,5 10 ⁻⁷ mm de Hg a 20°C

El DDT (2,2-bis-(p-clorofenil)-1,1,1-tricloroetano) fue sintetizado en 1874 por Zeidler, pero sus propiedades insecticidas fueron manifiestas por el químico suizo Müller, quien descubrió su alta actividad biocida con insectos y su baja toxicidad en humanos, recibiendo en 1948 el Premio Nobel. Pero años más tarde se fueron descubriendo problemas asociados a su uso, por lo que alcanzó su auge en 1970. Fue a partir de entonces cuando su uso se fue prohibiendo cada vez más, descendiendo así su producción. La OMS ha estimado que hasta 1971, más de 1 billón de personas se han salvado del riesgo de contraer malaria por el uso del DDT. (Gold *et al.* (1981)).

El DDT empleado en las formulaciones de plaguicidas no corresponde a un producto puro, sino a una mezcla de isómeros (77% de p,p'-DDT; 14,9% o,p'-DDT; 0,3% p,p'-DDD; 0,1% o,p'-DDD; 4% p,p'-DDE; 0,1% o,p'-DDE y 3,5% de compuestos no identificados)²⁵ entre

²⁴ Smith, AG. 1991. "Handbook of Pesticide Toxicology". Academia Press, Inc., pp 731-868.

²⁵ Matsumura, F. 1985. "Toxicology of Pesticides", 2ª edición, Plenum Press, New York.



los cuales el más abundante y activo es el p,p'-DDT. Le siguen en cantidades más o menos considerables el isómero o,p'-DDT y el p,p'-DDD.

El DDD (siglas del dicloro difenil dicloroetano) es un metabolito del DDT.

El p,p'-DDE es un producto resultado de la degradación del DDT en los sistemas biológicos. Por hidroclicación del DDT se forma DDE. Esta reacción tiene lugar principalmente en los seres vivos catalizada por el enzima deshidroclorinasa.

Desde entonces se fueron haciendo pruebas de sustitución de algunos grupos funcionales para lograr sustitutos que generen compuestos, menos persistentes, algo menos activos, pero bastante útiles como lo fue el DDT. Como es el caso del metoxicloro (análogo del DDT) y el HCH.

2.1.1.2. Hexaclorociclohexano (HCH)

El HCH (hexaclorociclohexano) o hexacloruro de benceno (BCH) son términos utilizados para designar el 1,2,3,4,5,6-hexaclorociclohexano. Se sintetizó por primera vez por Michael Faraday en 1825 y Van der Linden demostró la existencia de cuatro de los estereoisómeros del HCH (α , β , γ y δ); más tarde Dupire y Raucourt 1943 y Slade 1945 describieron las propiedades insecticidas del HCH, siendo Slade quien descubrió que el isómero γ tiene mayor efecto insecticida²⁶. Desde entonces se han utilizado como insecticidas por más de 50 años.²⁷

Los HCHs son sustancias de síntesis química (compuestos polihalogenados, derivados de hidrocarburos alicíclicos) que presentan ocho formas o isómeros,^{28,29,30} de los cuales cuatro son de importancia comercial (γ -HCH, α -HCH, β -HCH y δ -HCH).

²⁶ Metcalf, R.L., 1955. . Organic insecticides, their chemistry and mode of action Interscience, New York.

²⁷ AMAP. AMAP Assessment 2002: Persistent Organic Pollutants in the Arctic. Arctic Monitoring and Assessment Programme; Oslo, Norway, 2004; xvi + 310 pp.

²⁸ Kutz et al., F.W. Kutz, P.H. Wood and D.P. 1991. Bottimore, Organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in human adipose tissue, Rev. Environ. Contam. Toxicol. 120, pp. 1–82.

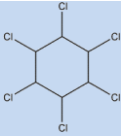
²⁹ Hayes WJ Jr & Laws ER Jr 1991. Handbook of Pesticide Toxicology, 3 vol. Academic Press Inc., San Diego, CA, USA

³⁰ Iwata, H.; Tanabe, S.; Sakai, N.; Tatsukawa, R. 1993. Distribution of persistent organochlorines in the oceanic air and seawater and the role of ocean on their global transport and fate. Environ. Sci. Technol., 27, 1080-1098.

Los HCHs son compuesto tóxicos que afectan el sistema nervioso central. Se ha demostrado que según el isómero difiere cualitativa y cuantitativamente la actividad biológica. Los isómeros alfa y gamma son estimulantes del sistema nervioso central en cambio beta y delta son depresores. En una mezcla de estos isómeros, uno de los componentes pueden contrarrestar el efecto de otro elemento y el efecto final puede depender de la composición.³¹ También afecta el corazón y el hígado³² y son cancerígenos. Las propiedades de estos compuestos se resumen en la tabla 2.

Tabla 2. Características físico-químicas de los HCHs

Fuente: Chemical and Physical Information

	
Estado	Sólido cristalino a temperatura ambiente.
Densidad:	1.87 g/cm ³ a 20 °C
Solubilidad en agua	Baja
Solubilidad	Alta aceites y solventes orgánicos
Coefficiente de partición	log Kow 3.72-3.78
Punto de ebullición	Alto 288 °C a 760 mmHg (γ y α HCH),
Conductividad térmica	Baja, constante dieléctrica baja
Presión de vapor	4.2x10 ⁻⁵ mmHg-3.6x10 ⁻⁷ at 20 °C.
Estabilidad	Son altamente estables en condiciones normales

2.1.1.3. Ciclodienos y compuestos similares

Esta familia agrupa a tres grupos de plaguicidas que se caracterizan por tener una estructura química similar, que consiste fundamentalmente en un anillo cíclico, con doble enlace y puente metilénico, el cual puede estar unido o no a otro anillo u otros grupos. Estos tres grupos son: 1) Derivados de dimetanonaftaleno: aldrin, dieldrin, isodrin y endrin; 2) Derivados del indano: clordano y heptacloro; y 3) Derivados del biciclohepteno: telodrin, endosulfán, ciclodan y bromodan.

³¹ Gosselin R.E., Smith R.P., Hodge H.C. 1984. Clinical Toxicology of Commercial Products, 5th ed, Williams and Wilkins, Baltimore, MD, USA.

³² Ryan RP, Terry CE (eds). 1997. Toxicology Desk Reference, 4th edition, Volumes 1-3, Taylor & Francis, Washington, DC, 1455p.



En este caso nos referiremos sólo a un compuesto perteneciente al tercer grupo de esta familia, es decir a el *endosulfan* ya que es el representante más importante del grupo. Este compuesto es una mezcla de 2 isómeros, alfa (70%) y beta (30%). Es un pesticida muy usado en el control de insectos en alimentos, cultivos no alimentarios y como protector de la madera.

Cuando se aplica, las partículas en aerosol pueden viajar a largas distancias por el aire. Normalmente el endosulfán se elimina en unas pocas semanas, pero también puede ocurrir que se una fuertemente a las partículas sólidas, con lo que tarda años en destruirse del todo. Debido a que no se disuelve bien en agua se observa más su presencia en muestras que contengan partículas de sólidos disueltas o en los sedimentos.

2.1.2. Policlorobifenilos (PCBs)

Los policlorobifenilos (**PCBs**), son también conocidos como bifenilos policlorados, askareles o PCDs. Los PCBs son productos que no se presentan de manera natural en el medio ambiente. Se sintetizaron a escala de laboratorio en 1881 por Schmitt-Schulz en Alemania. Su producción comercial se inició en 1950 estimándose una producción de 1,5 millones de toneladas en todo el mundo^{33,34}. Son hidrocarburos aromáticos clorados, cuya fórmula general es $C_{12}H_{10-n}Cl_n$, y están constituidos por 209 congéneres divididos en diez familias según la sustitución de cloros, como se puede observar en la tabla 3.

Sus propiedades habían hecho de estos compuestos, compuestos ideales para la elaboración de una amplia gama de productos industriales y de consumo, pero son estas mismas cualidades las que hoy en día hacen que los PCBs sean compuestos peligrosos para el ambiente, especialmente por su resistencia extrema a la ruptura química y biológica a través de procesos naturales. De hecho, muchos científicos estiman que el 70 por ciento de todos los PCBs fabricados todavía está en uso o en el medio ambiente.

³³ Ivanov V. and E. Sandell. 1992. Characterization of Polychlorinated Biphenyl Isomers in Sovol and Trichlorodiphenyl Formulations by High-Resolution Gas Chromatography with Electron Capture Detection and High-Resolution Gas Chromatography - Mass Spectrometry Techniques. Environ. Sci. Technol. 26, 2012-2017.

³⁴ Rantanen J. 1992. Industrial and Environmental Emergencies; Lessons Learned. Organohalogen Compounds **10**, 291-294

Tabla 3. Estructura general de los PCBs: fórmula molecular, nombre, número de isómeros, masa molecular, porcentaje de cloro e isómeros identificados.

Fuente: a) Heidelore Fiedler,³⁵ y b) Ritter et al., 1995)³⁶

Fórmula Molecular (a)	Familia de PCBs (a)	Masa Molecular (a)	% de Cloro (a)	Número de Isómeros (a)	Solubilidad en agua g/l (b)	log Kow (b)
C ₁₂ H ₉ Cl	Mono	188.65	18.79	3	1.21-5.5	4.3-4.6
C ₁₂ H ₈ Cl ₂	Di	233.10	31.77	12	0.06-2.0	4.9-5.3
C ₁₂ H ₇ Cl ₃	Tri	257.54	41.30	23	0.0015-0.04	5.5-5.9
C ₁₂ H ₆ Cl ₄	Tetra	291.99	48.65	41	0.0043-0.010	5.6-6.5
C ₁₂ H ₅ Cl ₅	Penta	326.43	54.30	39	0.004-0.02	6.2-6.5
C ₁₂ H ₄ Cl ₆	Hexa	360.88	58.93	31	0.0004-0.0007	6.7-7.3
C ₁₂ H ₃ Cl ₇	Hepta	395.32	62.77	18	0.00005-0	6.7-7.0
C ₁₂ H ₂ Cl ₈	Octa	429.77	65.98	11	0.0002-0.0003	7.1
C ₁₂ HCl ₉	Nona	464.21	68.73	3	0.00018-0.0012	7.2-8.26
C ₁₂ Cl ₁₀	Deca	498.66	71.10	1	0.0000001-0	8.26

Su resistencia inusual y su tendencia a permanecer y acumularse en organismos vivos, genera la presencia de PCBs en el ambiente y una amplia dispersión, pues se han podido detectar en casi todos los lugares a lo largo del planeta (atmósfera interior y exterior, aguas superficiales y subterráneas, suelos y alimentos)³⁷ con sus consecuentes efectos^{38, 39}.

Las características principales de los PCB se resumen en la tabla 4.

³⁵ Heidelore Fiedler Persistent Organic Pollutants (The Handbook of Environmental Chemistry / Anthropogenic Compounds) Springer DEU ISBN:97835404372842003. Pg. 444

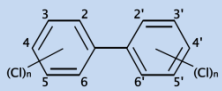
³⁶ PNUMA. Manual de Chile sobre el manejo de Bifenilos Policlorados (PCBs, askareles). Julio 2004.

³⁷ http://www.medioambiente.cu/cops/conceptos_bifenilos_policlorados.asp

³⁸ Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente. Transformadores y condensadores con PCB: desde la gestión hasta la reclasificación y eliminación Primera edición. Mayo de 2002 Pg. 9.

³⁹ Negoita T. G., Covaci A., A. G. and Schepens P. 2003. J. Environ. Monit., 5, 281-286-286



Tabla 4. Características Físicoquímicas de los PCBs


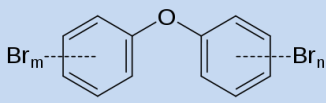
Estado	Líquido a temperatura ambiente
Densidad:	1.182-1.566 kg / l
Solubilidad en agua	Baja
Solubilidad en aceites y solventes orgánicos	Alta
Coefficiente de partición	log Kow, 4.46-8.18
Punto de ebullición	Alto 170-380 ° C no explosivos
Conductividad eléctrica	Baja, constante dieléctrica baja
Conductividad térmica	Muy alta
Presión de vapor	Baja (semivolátiles). Forman vapores pesados con el aire
Resistencia térmica	Pirorresistentes. Producen dibenzofuranos a 570-700 °C. No cristalizan a bajas temperaturas forman resinas sólidas

2.1.3. Polibrominados difenileteres (BDEs)

Los BDEs son sustancias químicas medioambientalmente persistentes, especialmente los congéneres menos bromados. Llamados también retardadores de llama, son sustancias químicas utilizadas como aditivos en plásticos, espumas, tejidos y otros materiales. Son importantes para la seguridad al ser productos químicos ignífugos. Actualmente la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (***Environmental Protection Agency-EPA***) está trabajando con la industria, grupos ambientales y de salud pública, agencias federales y gobiernos estatales, para investigar y entender los riesgos potenciales para la salud planteados por los **BDEs**.

Se estima que existen alrededor de 209 congéneres de BDEs repartidos en 10 familias, que se clasifican en función del número de sustitución de bromos que posea la molécula. Las principales propiedades físicas de estos compuestos se resumen en la tabla 5.

Tabla 5. Características físico-químicas de los BDEs

 BDEs estructura básica	
Estado	Líquido a temperatura ambiente
Densidad:	1.182-1.566 kg / l
Solubilidad en agua	Baja
Solubilidad en aceites y solventes orgánicos	Alta
Coefficiente de partición	log Kow, 4,46-8.18
Punto de ebullición	Alto 170-380 ° C no explosivos
Conductividad eléctrica	Baja constante dieléctrica baja
Conductividad térmica	Baja
Presión de vapor	Baja (semivolátiles) forman vapores pesados con el aire
Resistencia térmica	Son piroresistentes
Resistencia química	Son altamente resistentes

La actividad de los mismos depende de su estructura y del número de sustituciones que posea. Así, por ejemplo, el uso frecuente como retardantes de llama hace que su uso sea amplio (en espumas de muebles (pentaBDE), plásticos para muebles de televisión, electrónica de consumo, aislamiento de cables, recubrimientos para volver cortinas y tapicería (decaBDE), y plásticos para los ordenadores personales y pequeños electrodomésticos (octaBDE)⁴⁰.

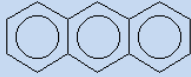
2.2. Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs)

Los HAPs constituyen una familia de más de 100 compuestos orgánicos diferentes formados por dos o más anillos bencénicos y, en algunos casos, un anillo pentagonal, con o sin sustituyentes sobre sus átomos de carbono e hidrógeno que les confiere gran estabilidad y, por tanto persistencia. Sus características se resumen en la tabla 6.

⁴⁰ <http://www.epa.gov/oppt/pbde/>



Tabla 6. Características físico-químicas de los HAPs



Estructura química Naftaleno

Parámetro	Característica
Estado	A temperatura ambiente están en estado sólido
Solubilidad en agua	Baja
Solubilidad en aceites y solventes orgánicos	Alta
Coficiente de partición	Valores elevados de log Kow
Punto de ebullición	Alto
Conductividad térmica	Baja
Presión de vapor	Baja
Estabilidad	Altamente estables

Constituyen un grupo de COPs prioritarios que han recibido una especial atención, pues muchos de ellos poseen propiedades carcinogénico-mutagénicos y por ser responsables de contaminación en matrices ambientales⁴¹. A nivel mundial existen estudios que revelan su presencia en aire, agua⁴² y suelos, entre otros⁴³.

Sus fuentes son naturales y antropogénicas, en un inicio eran compuestos naturales presentes en el medio ambiente como producto de incendios forestales o actividades volcánicas. Sin embargo, el crecimiento industrial supuso un aumento de gran número de contaminantes en el entorno natural. Esto se debe a que son producidos por combustiones incompletas, procesos de alta temperatura y pirolíticos.

Algunos de los HAPs son de fabricación específica, como el naftaleno empleado como insecticida, pero su producción está siendo sustituida por los compuestos clorados. Según la

⁴¹ Curtosi A.; Pelletier E.; L. Vodopivec C.; MacCormack W. P. 2007. Polycyclic aromatic hydrocarbons in soil and surface marine sediment near Jubany Station (Antarctica). Role of permafrost as a low-permeability barrier. *Science of the Total Environment*, 383(1-3), 193-204.

⁴² Baum, E.J. 1978. Ocurrente and Surveillance of Polycyclic aromatic Hydrocarbons. *Polycyclic Hydrocarbons and cancer*, Vol. 1, eds H.V. Gelboin and P.O.P. Ts'ó. New York. Academic Press. 45-70

⁴³ Método Analítico para detectar hidrocarburos aromáticos policíclicos en agua potable. *Ciencia UANL/Vol. IV*, Nº 4, Oct-Dic 2001.

nueva normativa de agua de la Unión Europea el Benzo[a]pireno ha sido elegido como uno de los indicadores más importantes de presencia de HAPs en agua.

Los HAPs pueden incorporarse al organismo por ingestión, inhalación o absorción dérmica y son reconocidos por su toxicidad y carcinogenicidad. Debido a su difícil degradación (especialmente para los más pesados) puede decirse que son contaminantes ubicuos; la forma más habitual de eliminarlos de un suelo es mediante degradación microbiana. Sin embargo, también pueden sufrir procesos de fotooxidación y oxidación química que contribuyen a su degradación. Si bien puede existir bioacumulación en plantas, los animales metabolizan los HAPs. Los mismos, se hallan asociados a partículas en aerosoles y, de esta manera, pueden ser aerotransportados a largas distancias por la acción de los vientos, llegando a la superficie terrestre a través de la lluvia y alcanzando aguas superficiales y subterráneas.

2.3. Trazas de metales

El otro gran grupo de sustancias a tener en cuenta lo constituyen los metales, fundamentalmente los metales pesados como Tl, Pb, Cd y Hg además de Cr, Co, Cu, Mo, Ni, Pb, Sn, Ti, V o Zn. También se incluyen otros elementos como Ag, As, Ba, Be, B, Sb, Se, Te, Al y U. Entre sus propiedades más características se pueden citar las siguientes: la mayoría de ellos no tienen una función biológica conocida y se solubilizan fácilmente en medio ácido.

La peligrosidad de los metales pesados es mayor al no ser química ni biológicamente degradables. Una vez emitidos, pueden permanecer en el ambiente durante cientos de años. Además, su concentración en los seres vivos aumenta a medida que son ingeridos por otros, por lo que la ingesta de plantas o animales contaminados puede provocar síntomas de intoxicación. De hecho, la toxicidad de estos metales ha quedado documentada a lo largo de la historia: los médicos griegos y romanos ya diagnosticaban síntomas de envenenamientos agudos por plomo mucho antes de que la toxicología se convirtiera en Ciencia.



3. Soluciones de la Química Analítica en el campo alimentario

Otro campo importante en el que la Química Analítica ha aportado mucho actualmente es el relativo a la alimentación, que tan estrechamente unida está al campo de la vida y al de la salud. Está demostrado que algunos compuestos minoritarios presentes en muchos vegetales y frutos aportan importantes beneficios para la salud de tal forma que un consumo equilibrado de los mismos, podrían tener un efecto positivo en quien lo consuma. El estudio de estos compuestos denominados bioactivos es importante, siendo la Química Analítica la Ciencia que permite aportar gran parte de las soluciones para su caracterización y cuantificación.

3.1. Alimentación-Salud

Cada día son más las evidencias que muestran que la relación entre dieta y salud va mucho más allá de anular o reducir las enfermedades de origen nutricional, sino que se halla asociada a la baja incidencia de otras enfermedades. La buena dieta no sólo proporciona los nutrientes adecuados para satisfacer las necesidades metabólicas, sino que también contribuye con sustancias que poseen actividad que dan lugar a la mejora de la salud humana afectando de manera positiva las funciones cognitivas, inmunitarias, capacidad de trabajo y rendimiento físico.

Esta estrecha relación positiva entre dieta y salud no resulta ser nueva, pues ya hace más de 2500 años que el médico griego Hipócrates lo manifestaba con su frase "*Que la comida sea tu medicina y la medicina sea tu alimento*" (Siglo IV a d.C.)⁴⁴. Una de las evidencias claras de esta relación son los diversos estudios realizados, que muestran con datos científicos y epidemiológicos⁴⁵ que el consumo de una dieta equilibrada como la dieta mediterránea (DM), da lugar a una menor incidencia de enfermedades no transmisibles (ENT)⁴⁶, principal causa de muerte (60% aprox. tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo), que

⁴⁴ Wildman REC. 2001. Nutraceuticals: a brief review of historical and teleological aspects, in Handbook of Nutraceuticals and Functional Foods, ed. by Wildman REC. CRC Press, New York, pp. 1–12.

⁴⁵ Menotti A, Keys A, Aravanis C, Blackburn H, Dontas A, Fidanza F, et al. 1989. Seven Countries Study. First 20-year mortality data in 12 cohorts of six countries. Ann. Med. 21(3), 175-9

⁴⁶ Brownson R, Smith C, Jorge N, Dean C, Deprima L. 1992. Controlling cardiovascular disease: the role of the local health department. Am J Public Health.

incluye enfermedades antiinflamatorias, cardiovasculares⁴⁷, neurodegenerativas⁴⁸, cáncer y diabetes⁴⁹.

La influencia positiva de la DM sobre la salud, se debería a que la amplia variedad de alimentos que la componen (frutas, verduras, legumbres, frutos secos, cereales, aceite de oliva y vino),⁵⁰ contendrían y suministrarían una mezcla óptima de metabolitos que cuentan con bioactividad. Así lo sugieren estudios epidemiológicos, realizados *in vitro*, *in vivo* y ensayos clínicos, que han demostrado que algunos de estos alimentos poseen efecto antiinflamatorio, antitumoral, antiaterosclerótico, antimutagénico, anticancerígeno, antibacteriano, antiviral en una mayor o menor medida^{51,52}.

Por esta razón uno de los objetivos claves de la investigación hoy en día, es el estudio de los alimentos mediante una caracterización de sus componentes mayoritarios y minoritarios, así como de los metabolitos de los mismos para luego buscar establecer el tipo, modo, número y mecanismos bioquímicos por los que estos componentes afectan las funciones fisiológicas de un individuo^{53,54}. Para ello se trabaja mucho sobre observaciones e hipótesis a través de ensayos clínicos y protocolos adecuados para cada caso.^{55,56} Actualmente los

⁴⁷ Hertog MGL. 1995. Flavonoid intake and long term risk of coronary heart disease and cancer in the 7 countries study. Arch Intern Med 155:1184–1195.

⁴⁸ Middleton E, Kandaswami C and Theoharides TC. 2000. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. Pharmacol Rev 52:673–751

⁴⁹ WHO, World Health Organization Study Group. 1990. Nutrition and the prevention of chronic diseases, R S 797: 30-39.

⁵⁰ Kaur, C., Kapoor, H. 2001. Antioxidants in fruits and vegetables the millennium's health. J. Food Sci. Tech. 36:703-725

⁵¹ Poulson, H.E., Prieme, H., Loft, S. 1998. Role of oxidative DNA damage in cancer initiation and promotion. European Journal of Cancer Prevention 7 (1), 9–16.

⁵² Clere, N., S. Faure, et al. 2011. "Anticancer properties of Flavonoids: Roles in various stages of carcinogenesis." Cardiovascular and Hematological Agents in Medicinal Chemistry 9(2):62-77.

⁵³ Brown M.L. 1990. Present Knowledge in Nutrition. 6th Ed. Intl. Life Sciences Institute, Washington.

⁵⁴ Cámara, M. 2002. "Importancia del consumo de frutas y hortalizas y su incidencia en la salud". En: Aspectos relativos a la calidad de frutas y hortalizas frescas. Monografía I. Fundación Sabor y Salud.

⁵⁵ Childs, N.M. 1997. "Foods that enhance health- Time to validate and Pursue" J. Nutraceuticals, Functional & Medical Foods. 1(1): 1-5.

⁵⁶ Lampe, J.W. 1999. "Health effects of vegetables and fruits: assesing the mechanisms of action in human experiments studies" Amer. J. Clin. Nutr. 70, 475s-90s.



alimentos que refieren propiedades positivas sobre la salud se han denominado alimentos funcionales (AF).

3.2. Alimentos funcionales

El concepto de AF nació a principios de los años 80 en Japón, y fue impulsado por el gobierno de este país (a través de su Ministerio de Salud bajo una reglamentación), el cual dentro de sus políticas de salud ante un gasto en los sistemas de salud elevado, promovió el proyecto de desarrollo de alimentos que además de proveer nutrientes, contuvieran otros compuestos que desempeñasen una función favorable y específica en la salud de sus consumidores; para ello científicos japoneses estudiaron las relaciones entre nutrición, satisfacción sensorial, enriquecimiento y modulación de sistemas fisiológicos. Esto dio lugar a los “alimentos para uso específico en la salud” del inglés (Foods for specified health uses o FOSHU) los cuales deberían de cumplir tres requisitos básicos:

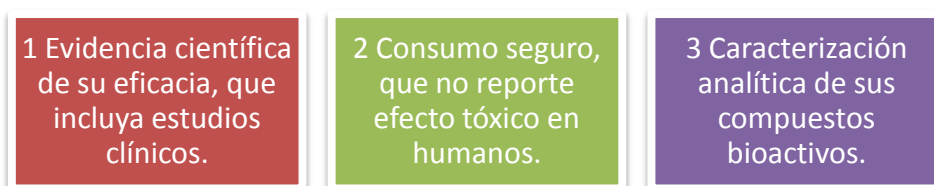


Fig. 3. Propiedades a cumplir para alimentos FOSHU

En el 2001, esta reglamentación se amplió a los complementos alimenticios (cápsulas, perlas y comprimidos). También, estableció una nueva legislación acerca de los “alimentos con alegaciones sanitarias” (Foods with health claims), los cuales incluyen a FOSHU y los nuevos “alimentos con alegaciones nutricionales” (Foods with nutrient function claims FNFC) que incluyen los diecisiete ingredientes (doce vitaminas y cinco minerales, entre ellas hierro y calcio). Desde entonces este concepto se ha expandido a nivel global y ha sido ligeramente modificado según el país de aplicación.

Así, en Estados Unidos el Consejo de Nutrición y Alimentación de la Academia de Ciencias de los Estados Unidos los define como “alimentos modificados o de diseño” que contienen uno o más ingredientes con acción que incrementen el bienestar del individuo⁵⁷.

⁵⁷American Dietetic Association. Position of the American Dietetic Association. Functional foods. J Amer Diet Assoc 1999; 99: 1278-1285.

En Europa su legislación fue promovida por la Sección Europea del International Life Sciences Institute (ILSI) bajo el proyecto Functional Food Science in Europe (FUFOSE) que los define como: “alimentos que contienen un componente, nutriente o no nutriente, con efecto selectivo sobre una o varias funciones del organismo, con efecto añadido por encima de su valor nutricional y cuyos efectos positivos justifican que pueda reivindicarse su carácter funcional o incluso saludable”.^{58,59}

Así, en resumen, se puede decir que a medida que crecen las demostraciones de interrelación entre los alimentos y la salud, los alimentos funcionales se definen como aquellos “capaces de promover la salud más allá de su capacidad de nutrir”.

3.3. Compuestos bioactivos

Se denominan como *compuestos bioactivos* a los compuestos nutrientes y no nutrientes, que cuentan con actividad biológica dentro del organismo, que se traduce en bienestar para el individuo y menor riesgo de padecer determinadas enfermedades, y son los que le confieren al alimento el carácter funcional.

Estos compuestos también fueron llamados en algún tiempo *fitoquímicos* por su origen vegetal y *quimiopreventores* por su actividad preventiva. La principal fuente de estos compuestos son las frutas y vegetales y, en menor medida, algunos cereales.⁶⁰ Se ha recogido en bibliografía también que pueden ser producidos por algunas especies fúngicas y bacterias.

Los compuestos bioactivos se sintetizan a partir de los metabolitos primarios (proteínas, carbohidratos, lípidos, ácidos grasos y algunos ácidos carboxílicos), componentes químicos vitales para el funcionamiento normal de los organismos que cumplen funciones esenciales como fotosíntesis, respiración, transporte de solutos, translocación y síntesis de proteínas, asimilación de nutrientes y diferenciación de tejidos en las plantas. Los compuestos sintetizados se denominan metabolitos secundarios, esta distinción es sólo funcional, pues no hay una división precisa entre metabolismo primario y secundario^{61,62} (ver figura 4).

⁵⁸ Milner, JA. 2000. Functional foods: the US perspective. Am J Clin Nutr; 71:1654S- 1659S

⁵⁹ Araya L, H. c. and M. Lutz R 2003. "Alimentos funcionales y saludables." Rev. chil. nutr 2003, 30: 8-14.

⁶⁰ Martínez-Valverde, I., Periego, M., Ros, G. 2000. Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. Arch Latinoamer Nutr. 50:5-18

⁶¹ Harborne 1982



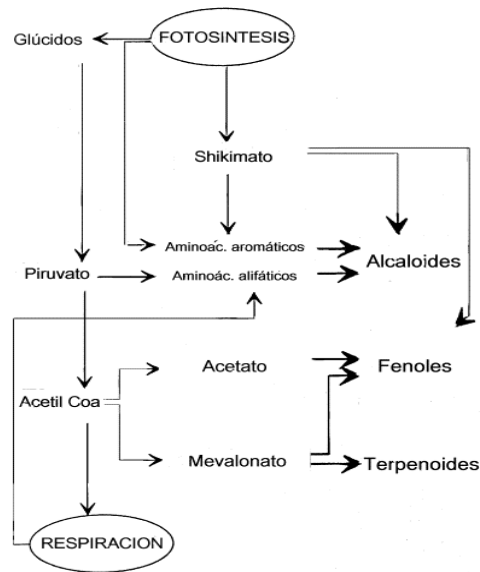


Fig. 4. La siguiente figura muestra la relación metabolismo primario y secundario y las vías por las cuales se producen los metabolitos secundarios.

Fuente: "Secondary Metabolites and Plant Defense"

Cabe mencionar que no todos los metabolitos secundarios poseen bioactividad pero una gran mayoría de ellos sí, los cuales a diferencia de sus predecesores no cumplen funciones específicas, por lo que son considerados no esenciales en la planta,⁶² a excepción de clorofilas y reguladores del crecimiento (hormonas vegetales).

Los metabolitos secundarios tienen, por lo general, un bajo peso molecular, y son producidos como familias de compuestos relacionados a momentos particulares del ciclo de vida, (fase específica de diferenciación morfológica) y suelen ser genotípicamente específicas para un grupo de especie, familia e incluso variedad, por lo que pueden utilizarse en Botánica sistemática y en la identificación de productos. Su presencia y concentración es función de diversos factores como son los: climatológicos, agronómicos, tecnológicos o culinarios y otros.

Teniendo en cuenta el origen biosintético de los metabolitos secundarios en matrices vegetales, estos se dividen en cuatro grandes grupos: 1) polifenoles, 2) terpenos y

⁶²Taiz, Lincoln y Eduardo Zeiger. 2006. "Secondary Metabolites and Plant Defense". En: Plant Physiology, Fourth Edition. Sinauer Associates, Inc. Capítulo 13.

esteroides, 3) glicósidos y 4) sustancias nitrogenadas⁶³. Vamos a describir brevemente estos grupos.

3.3.1. Compuestos polifenólicos

Es el grupo más amplio de metabolitos secundarios (8000 compuestos aproximadamente), que se sintetizan a partir de los hidratos de carbono a través de la vía del ácido shikímico y del metabolismo de fenilpropanoides^{64, 65}. Se caracterizan por tener, al menos, un anillo aromático con uno o más grupos hidroxilo unido a su estructura por lo que puede variar desde moléculas simples, como los ácidos fenólicos, hasta moléculas poliméricas de elevada masa molecular, como los taninos.⁶³

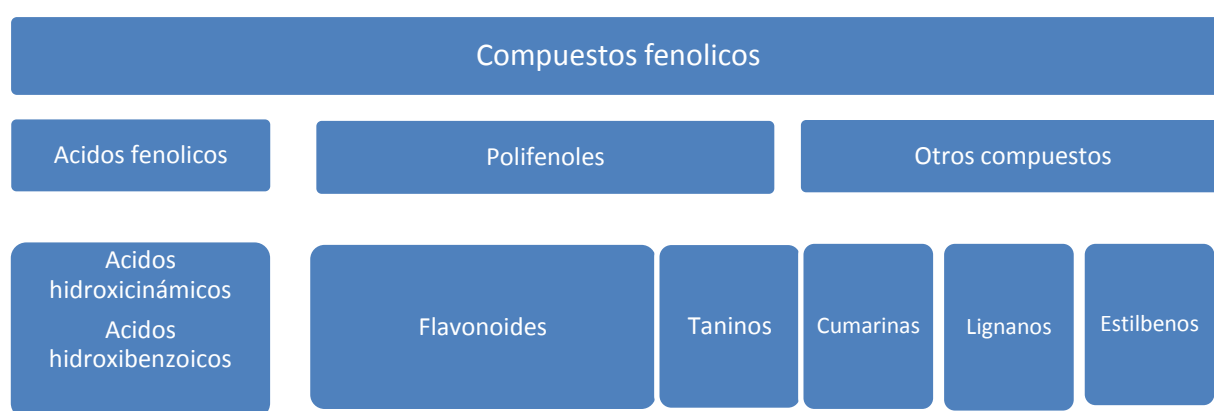


Fig. 5. Clasificación de compuestos polifenólicos. Fuente: Devanand L Luthria.

De todas estas familias son de particular importancia por su efecto probado en la salud⁶⁶ los flavonoides, taninos y los ácidos fenólicos⁶⁷.

A continuación se describirá brevemente cada familia:

⁶³Crozier A., Clifford M.N. and Ashihara H. 2006. Plant secondary Metabolites – Occurrence, structures and role in the human Diet. Ed. Blackwell Publishing Ltd. Uxford UK.

⁶⁴RobardsK., PrenzlerP.D., TuckerG., Swatsitang P., and GloverW. 1999. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. Food Chem, 66. pp. 401–436.

⁶⁵ RobardsK. 2003. Strategies for the determination of bioactive phenols in plants, fruits and vegetables. J. Chromatogr. A, 1000. pp. 657–691.

⁶⁶Harborne JB and Williams CA. 2000. Advances in flavonoid research since 1992 Pytochemistry 55, 481-504.

⁶⁷Rice-Evans CA, Miller NJ and Paganga G. 1996. Structure–antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. Free Radical Biol Med 20:933–956.



3.3.1.1. Ácidos fenólicos

Este grupo a su vez está compuesto por fenoles sencillos y ácidos fenólicos.

Fenoles Sencillos. Son un grupo de compuestos poco abundantes, que suelen estar en forma de heterósidos, son inestables pues se hidrolizan fácilmente, son solubles en agua y disolventes polares. Tienen efecto antimicrobiano, antiséptico y antioxidante.

Ácidos fenólicos. Son compuestos orgánicos con un radical carboxílico y un grupo hidroxilo fenólico, que pueden ser derivados del ácido benzoico y cinámico (ácidos hidrobenzoicos e hidroxicinámicos, respectivamente). Tienen carácter ácido, son inestables, producen oxidaciones en medio alcalinos e isomerizaciones en medios alcalino o ácidos y son solubles en disolventes orgánicos polares, (agua o mezclas hidroalcohólicas). Son esenciales para el crecimiento y la reproducción de las plantas, y se producen como respuesta a la defensa de patógenos. Muestran actividad antioxidante y serían los responsables de bajar el colesterol.

3.3.1.2. Flavonoides

Los flavonoides son un grupo amplio de compuestos fenólicos que se sintetizan a partir de fenilalanina y malonil-CoA, comparten estructura química básica denominada núcleo flavan y según un patrón de sustituciones se pueden clasificar en: flavonas, flavanonas, flavonoles, flavanoles y antocianidinas.

Una característica de estos compuestos es que son hidrosolubles y que pueden presentarse como agliconas o compuestos glucosados. A continuación se describirá cada subclase brevemente:

Flavonas. Son pigmentos amarillos presentes en flores o en la piel de frutos un ejemplo de las mismas son: tricetin, apigenina y luteolina.

Flavonoles. Son sustancias incoloras o amarillos y se encuentran en las flores y frutos. Los más importantes son: quercetina, miricetina, y kaempferol.

Flavanonas. Son precursores de otros flavonoides más complejos, pero se encuentran como tales en altas concentraciones en los cítricos.

Isoflavonas. Son compuestos químicos que corresponden al grupo de fitoestrógenos de las plantas. Tienen una estructura semejante a la hormona estrogénica de los mamíferos 17- β -estradiol, y poseen doble actividad (actuando a la vez como estrogénicas y antiestrogénicas).

Flavanoles. Son compuestos que contienen un núcleo aromático característico y ampliamente distribuido en las plantas superiores, a menudo como un pigmento.

Antocianinas. Químicamente son derivados de agliconas, glicosilados, polihidroxiados y polimetoxilados unidos al grupo 2-fenilbenzopirilio⁶⁸. Son pigmentos naturales (de color rojo azul y púrpura) presentes en frutas, plantas y verduras; son compuestos de potente efecto antioxidante por lo que pueden ser beneficiosos para la salud. Muestran efectos preventivos contra el cáncer. Su análisis resulta dificultoso, pues son sensibles a pH alcalinos, temperatura y luz, por procesos de.

3.3.1.3. Taninos

Los taninos se subdividen en taninos hidrolizados y no hidrolizados.

Taninos hidrolizables. Son compuestos de elevado peso molecular (500-20000 Daltons Da). Se encuentran especialmente en especies como sorgo y maíz (leguminosas). Son llamados también gálicos o pirogálicos y como su nombre indica son compuestos que se hidrolizan con facilidad tanto en ácidos como en álcalis, se producen generalmente durante procesos patológicos de la planta⁶⁹.

Taninos no hidrolizables o proantocianidinas. Conocidos también como no hidrolizables (pues se hidrolizan con dificultad). Por efecto del calor y ácidos minerales dan lugar a la formación de polímeros de alto peso molecular (flobáfenos). Este tipo de taninos se producen en el metabolismo normal de los vegetales por lo que se consideran fisiológicos; se encuentran ampliamente repartidos en el reino vegetal. Las propiedades más interesantes de los taninos se deben a su capacidad de combinarse con diversas sustancias formando complejos.

3.3.1.4. Otros compuestos

Entre los compuestos de este apartado en general se describen:

⁶⁸ Petersson EV, Puerta A, Bergquist J, Turner C. 2008. Analysis of anthocyanins in red onion using capillary electrophoresis-time of flight-mass spectrometry. *Electrophoresis*, 29(12):2723-2730.

⁶⁹ Nguyen Kim Lin, Preston T.R., Dinh Van Binh and Nguyen Duy Ly. 2003. Effects of tree foliages compared with grasses on growth and intestinal nematode infestation in confined goats. *Livestock Research for Rural Development* **15 (6)**.



Cumarinas. Son un grupo muy amplio de principios activos fenólicos que se encuentran en plantas medicinales y tienen en común una estructura química de (2H-1-benzopireno-2-ona), denominada cumarina. Sobre esta estructura, que se origina biosintéticamente por lactonización del ácido cumarínico (2-hidroxi-cinámico), se disponen sustituyentes de distinta naturaleza química, lo que da lugar a distintos tipos de cumarinas: sencillas y complejas. Poseen efectos sobre el sistema vascular (tanto a nivel arterial como venoso) y muestran además propiedades fotosensibilizantes, por lo que son utilizadas en dermatología.

Estilbenos. Son polifenoles naturales que incluyen derivados hidroxi- y metoxi- del estilbeno simple, así como sus formas glicósido y polímeros. Se producen en la planta en presencia de agentes patogénicos (mohos, insectos).

Lignanós. Son compuestos de naturaleza fenólica que se originan por la condensación de fenilpropanoides; el número de estas unidades y la forma de unión entre ellas determinan la existencia de diferentes tipos de lignanos (lignanós propiamente dichos, neolignanós, etc.). Su estudio revela que tienen efecto hepatoprotector.

3.3.2. Terpenos

Son compuestos generalmente lipófilos, que incluyen a:

Carotenoides. Son sustancias no volátiles pigmentadas (licopeno, β -caroteno, criptoxantina, etc.) responsables de los colores amarillos y anaranjados de muchas hortalizas y frutas. Son también, precursores de la vitamina A y otras sustancias terpenoides que aportan aromas característicos en, el té negro por ejemplo, frambuesa o tomate. Poseen actividad antioxidante.

Terpenos. Son sustancias volátiles que forman parte de las esencias de los cítricos (limoneno, etc.). Existen otros terpenos que tienen importancia en el sabor de las frutas y hortalizas, como: las lactonas sesquiterpénicas que confieren el sabor amargo de las escarolas (lactucopicrina), los triterpenos amargos de los cítricos (limonoides) y las sustancias responsables del sabor amargo de los pepinos (cucurbitacinas).

3.3.3. Compuestos nitrogenados

Esta familia está compuesta por:

Aminoácidos. Son moléculas orgánicas con un grupo amino (NH_2) y un grupo carboxilo (COOH). Los aminoácidos más frecuentes y de mayor interés son aquellos que forman parte de las proteínas.

Alcaloides. Son metabolitos secundarios que poseen un nitrógeno heterocíclico. Proceden del metabolismo de aminoácidos; si proceden de otra vía, se definen como pseudoalcaloides. Son compuestos biológicamente muy activos, pudiendo dar lugar a problemas de toxicidad, aun en cantidades muy bajas, por lo que su uso es limitado y controlado.⁷⁰

3.3.4. Compuestos azufrados

Glucosinolatos. Son compuestos glicosídicos que, al ser hidrolizados por la enzima mirosinasa, liberan una serie de productos entre los que se encuentran: **los isotiocianatos**, que son sustancias volátiles y biológicamente activas y que son responsables del sabor amargo y, algunas veces, picante.

Saponinas. Están ampliamente distribuidas en el reino vegetal, encontrándose en una gran cantidad de plantas. Las saponinas son glicósidos en los cuales varias unidades de monosacáridos se enlazan mediante un enlace glicosídico a núcleo esteroideal hidrofóbico denominado aglicona que puede ser triterpénico o esteroideal y, en función de esto, las saponinas se clasifican en saponinas triterpénicas y saponinas esteroidales, respectivamente. Poseen un amplio espectro de diversidad biológica, habiéndose atribuido propiedades anticancerígenas⁷¹, antiinflamatorias, estimulantes del sistema inmune, antimicóticas⁷², antitrombóticas⁷³ e hipocolesterolémicas⁷⁴.

⁷⁰ Azcón-Bieto, J y Talón, M. 2000. Fundamentos de Fisiología Vegetal. Mc Graw Hill Interamericana de España SAU. ISBN 84-486-0258-7.

⁷¹ Sung, M. K.; Kendall, C. W. C.; Rao, A. V. 1995. Effect of saponins and Gypsophila saponin on morphology of colon carcinoma cells in culture. Food Chem. Toxicol. 33, 357-366.

⁷² Zamilpa, A.; Tortoriello, J.; Navarro, V.; Delgado, G.; Alvarez, L. 2002. Five New Steroidal Saponins from Solanum chrysotrichum Leaves and Their Antimycotic Activity. J. Nat. Prod, 65, 1815-1819.

⁷³ Zhang, J.; Meng, Z.; Zhang, M.; Ma, D.; Xu, S.; Kodama, H. 1999. Effect of six steroidal saponins isolated from Anemarrhenae rhizoma on platelet aggregation and hemolysis in human blood. Clin.Chim.Acta. 289, 79-88.



También se pueden mencionar por su importancia los selenocompuestos (Se-metil selenocisteína y selenocisteína γ -glutamil-Se-metilo), en los que se ha detectado actividad contra el cáncer.

Todas estas sustancias, o sus productos de degradación, son responsables del sabor y olor característico de diversas hortalizas y sufren transformaciones químicas durante su cocción y la digestión en el tracto gastrointestinal humano, que dan lugar a la liberación de metabolitos responsables de su actividad biológica. Para varios compuestos aún no queda bien determinado su papel fisiológico o su función en el metabolismo de la planta. Se ha propuesto que, en algunos casos, son el resultado de un proceso evolutivo vegetal que confiere mayor resistencia a las especies vegetales que los presentan; actualmente se ha confirmado un papel ecológico importante^{75,76}.

4. Técnicas Separativas

Estas se dividen en dos grandes grupos las técnicas separativas cromatográficas y las técnicas separativas no cromatográficas.

4.1. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

La cromatografía fue introducida en 1970 por Mikhail Tswett y engloba a un conjunto de técnicas variadas, pero que todas ellas tienen como objetivo principal separar los componentes contenidos en las muestras en base a las propiedades físico-químicas de los distintos componentes buscando las diferencias entre ellos que dé lugar a su separación.

Las técnicas cromatográficas son variadas y se han clasificado de diferentes formas; una de ellas las divide en técnicas cromatográficas continuas y discontinuas, entre las técnicas discontinuas se usa la cromatografía en capa fina (TLC del inglés Thin Layer Chromatography), que se sigue utilizando, debido a que es una herramienta simple, rápida, versátil y útil para separación de analitos contenidos en una muestra permitiendo el fraccionamiento de los mismos.

⁷⁴Sauvaire, Y.; Ribes, G.; Baccou, J. C.; Loubatier'es-Mariani, M. M. 1991. Implication of steroid saponins and saponinins in the hypocholesterolemic effect of fenugreek. *Lipids*, 26, 191-197.

⁷⁵Harborne, J. B. 1989. Recent advances in chemical ecology. *Natural Products Reports* 6: 85-108.

⁷⁶Maldonado, R. 1985. Los productos en las plantas. Vol. I. Centro de Investigación en Química Aplicada. Coahuila. México.

Entre las técnicas cromatográficas continuas destaca la Cromatografía Líquida de altas prestaciones (HPLC del inglés High Performance Liquid Chromatography) como método de elección para el análisis cualitativo y cuantitativo de compuestos de interés.

En esta técnica, la fase estacionaria es un sólido poroso, que se encuentra por lo general, en forma particulada, o como una fina capa de sustancia líquida ligada a un soporte sólido, contenido en el interior de un tubo habitualmente metálico que da lugar a la columna cromatográfica. La fase móvil es un líquido, ya sea un disolvente o una mezcla de disolventes, a veces con un pH modificado mediante adición de ácidos, bases o soluciones reguladoras.

Un sistema de HPLC está formado por: a) depósitos para las fases móviles, b) sistema de bombeo para proporcionar presión a la fase móvil, c) sistema de inyección de muestras, d) columna cromatográfica (a veces precedida por una precolumna), e) horno termostaticado f) detector y g) sistema de adquisición de datos. Los cuales se pueden observar en la siguiente figura 6.

En una separación utilizando HPLC, la fase móvil es impulsada por la bomba que transporta una banda de muestra a través de la columna cromatográfica. La inyección se realiza normalmente a través de una válvula de seis vías que permite introducir en el flujo del disolvente, la muestra contenida en un aro o loop de volumen calibrado. Una vez en la columna los analitos interaccionan con la fase estacionaria de tal forma que aquellos que sean más afines con la fase móvil serán menos retenidos por la fase estacionaria y eluirán antes, mientras que aquellos que tengan más afinidad por la fase estacionaria avanzarán más lentamente a través de la columna y eluirán, por tanto, más tarde. La fase móvil puede ser un disolvente puro o una mezcla de disolventes. Cuando se trata de una mezcla, puede programarse la bomba para que tome disolventes de diferentes botellas en una proporción determinada y realice la mezcla en una cámara de mezclado. Cuando durante toda la separación se utiliza el mismo solvente, se denomina isocrática, sin embargo, es normal realizar un gradiente de composición del disolvente a lo largo del análisis cromatográfico para mejorar la eficacia y acortar la duración del proceso.



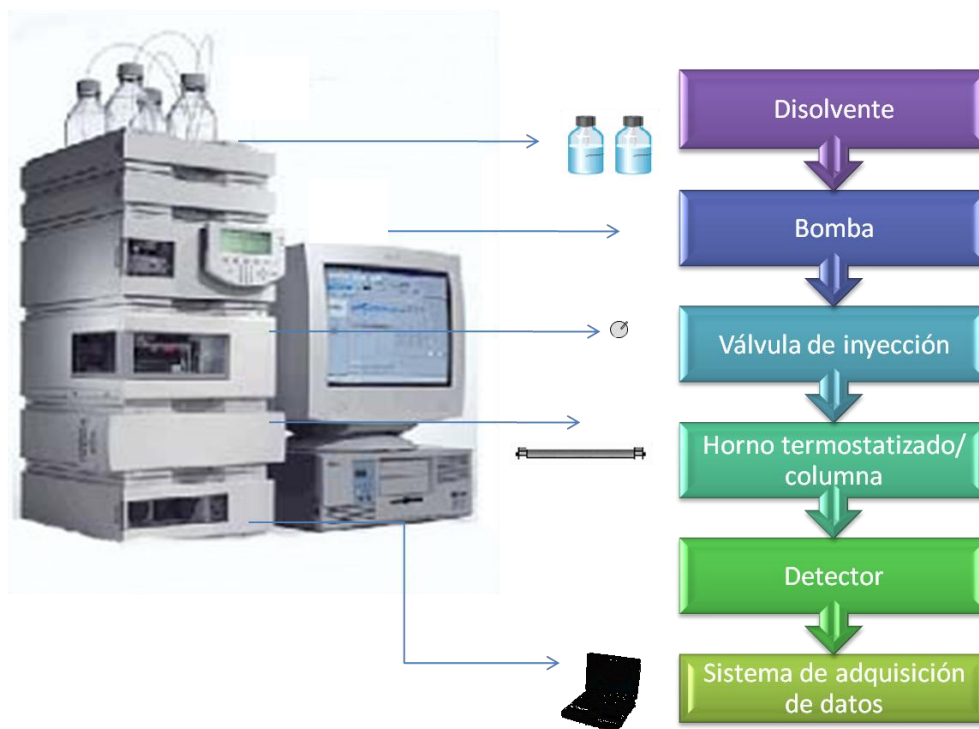


Fig. 6. Componentes básicos de HPLC.

Una vez eluido cada compuesto debe ser detectado. Para ello, se colocan a la salida de la columna cromatográfica uno o varios detectores que proporcionarán una respuesta al paso de los analitos (absorbancia, emisión fluorescente, conductividad...). El procesado de esta señal produce el cromatograma, en el que se representa la respuesta obtenida por el detector frente al tiempo. La intensidad de cada pico será directamente proporcional al factor de respuesta y a la concentración del analito correspondiente en la muestra.

4.1.1. Tipos de cromatografía líquida

Según la naturaleza de la fase estacionaria y del tipo de fenómeno físico que permita la separación, existen diferentes tipos de cromatografía líquida⁷⁷ que se resumen en la siguiente tabla.

⁷⁷ SkoogD.A, LearyJ.J. 1996. "Cromatografía de líquidos de alta resolución" en "Análisis instrumental". Ed. McGraw-Hill/Interamericana de España, S. A. Madrid. Pp 730-777.

Tabla 7.Tipos de Cromatografía líquida

Tipos de cromatografía	Fase estacionaria activa
Partición	Líquido retenido por un sólido soporte
Adsorción	Sólido con propiedades superficiales
Cambio iónico	Sólido con propiedades cambiadoras de iones
Afinidad	Sólido con propiedades de retención bioespecíficas
Exclusión por tamaños	Sólido con porosidad controlada

El conocimiento de la estructura molecular de los componentes de la muestra puede ser muy útil en la selección de una metodología concreta de cromatografía líquida. En general, podemos decir que la cromatografía de partición o reparto se aplica a compuestos polares no iónicos; la cromatografía de adsorción separa especies no polares, isómeros e hidrocarburos alifáticos; la cromatografía de intercambio iónico permite analizar compuestos iónicos de peso molecular bajo; los analitos de peso molecular superior a 10.000 uma se separan mediante cromatografía de filtración sobre gel (de exclusión).

4.1.1.1. Cromatografía de partición o reparto

La cromatografía de partición o de reparto es el tipo de cromatografía de líquidos más ampliamente utilizado y la que se ha empleado para desarrollar el trabajo experimental que se incluye en esta memoria en el capítulo 4.

El fundamento de este tipo de cromatografía es el reparto o la distribución de los solutos entre una fase móvil líquida y otra estacionaria inmiscible soportada sobre un sólido inerte; es decir, la causa de la discriminación entre los solutos se encuentra, de manera genérica, en las diferencias de solubilidad. Considerando las polaridades relativas de las fases móviles y estacionarias, se distinguen dos tipos de cromatografía:

a) Cromatografía en fase normal (HPLC). La fase estacionaria es polar, mientras que la elución se lleva a cabo con disolventes no polares, como etil éter, cloroformo o *n*-hexano.

b) Cromatografía en fase inversa (RP-HPLC). La fase estacionaria es no polar, tratándose normalmente de hidrocarburos tales como C₈ (n-octilo) o C₁₈ (n-octadecilo) y la elución se lleva a cabo con una fase móvil de polaridad elevada, como disoluciones acuosas conteniendo metanol, acetonitrilo o tetrahidrofurano.



La cromatografía de líquidos en fase inversa es el modo de HPLC más empleado en la actualidad, ya que una gran mayoría de muestras de interés en diversos ámbitos tienen naturaleza hidrofílica. En esta modalidad de fase inversa, el tiempo de retención es mayor para las moléculas de naturaleza apolar, mientras que las moléculas de carácter polar eluyen más rápidamente.

4.1.2. Optimización de la metodología

Cuando se pretende poner a punto un método cromatográfico, se persigue una buena resolución, precisión, altura de pico, tiempo de análisis reducido, trabajando a una presión adecuada y consumiendo la menor cantidad de disolvente posible.

La selección de la *fase estacionaria* (columna cromatográfica) y de la *fase móvil*, para la separación de una mezcla determinada, es muy importante, ya que los componentes de la muestra interactúan con ambas fases. Normalmente se elige en primer lugar una fase estacionaria adecuada de una manera general y, seguidamente, se selecciona la fase móvil empíricamente, después de realizar una serie de ensayos. Ésta debe tener una composición tal que sea compatible con la fase estacionaria, que disuelva los componentes a analizar y que permita una buena separación. Luego se optimizan las condiciones de flujo del disolvente, tiempo de separación, cantidad de muestra a inyectar y, se determinarán la/s longitud/es de onda de detección que resulten más idóneas.

En fase reversa se utilizan fundamentalmente dos tipos de fases estacionarias (C-18 y C-8) como ya se mencionó en secciones precedentes, estando formadas por grupos no polares unidos a la sílice. Además del tipo de fase estacionaria habrá que seleccionar la longitud de la columna, su diámetro y el tamaño de partícula más adecuado.

El *diámetro interno* de la columna de HPLC a utilizar es un aspecto crítico que determina la cantidad de muestra con la que se puede trabajar y que también influye en su sensibilidad. Las más utilizadas son las de diámetro interno entre 2-5 mm denominadas columnas de rango analítico. Las columnas de diámetro interno más grande (>10 mm) se utilizan normalmente para el aislamiento y purificación de compuestos, y se denominan columnas semipreparativas.

En cuanto al *tamaño de partícula* puede ser muy variado, siendo las de 5 µm de diámetro las que tradicionalmente se han usado. Partículas más pequeñas ofrecen una mayor superficie y una mejor separación, consiguiendo una mejor eficacia y resolución. Sin embargo, con instrumentos de HPLC convencionales, no se pueden usar partículas de tamaño mucho menor de 5 µm, ya que se produciría un gran aumento de presión, no tolerado por los equipos. Es de hecho, bastante improbable trabajar con columnas rellenas

con fases estacionarias de menos de 3 μm de diámetro de partícula⁷⁸ en instrumentos convencionales. Los aparatos más modernos de HPLC incorporan mejoras para poder trabajar a presiones más altas y, por lo tanto, poder utilizar partículas de tamaño más pequeño en las columnas ($< 2\mu\text{m}$)⁷⁹. Así destacan los equipos denominados RRLC (Rapid Resolution Liquid Chromatography)⁸⁰ que trabaja con valores de hasta 600 bares.

En cuanto a la fase móvil se pueden aprovechar las variaciones tanto de su fuerza retención (eluyente), como de su naturaleza (selectividad) de una forma dinámica, modificándolas en el tiempo durante la propia elución. Debido a que un sólo disolvente no resulta en ocasiones adecuado para una determinada separación, pueden utilizarse mezclas binarias o ternarias para potenciar la fuerza eluyente. Con ello se consigue aumentar la eficacia de la separación. Los disolventes que se van a combinar deben ser miscibles a cualquier concentración. Otra modificación de la fase móvil que puede afectar a la retención del compuesto es, por ejemplo, la adición de sales inorgánicas, que provoca un aumento lineal en la tensión superficial, y como la entropía de la interfase compuesto-disolvente está controlada precisamente por la tensión superficial, se produce un aumento del tiempo de retención.

Otros parámetros que habrán de optimizarse relacionados con la fase móvil son por ejemplo: pH, el flujo y la temperatura⁸¹. El pH de la fase móvil afectará la retención si la estructura de las moléculas del soluto resulta afectada. Típicamente, las especies que pueden presentarse en forma protonada y desprotonada en el intervalo de pH de trabajo usual en RP-HPLC serán afectadas, puesto que ambas formas, manifestarán diferente retención. A efectos prácticos, si se quiere utilizar el pH como un parámetro capaz de alterar sustancialmente la separación, tendrá que ajustarse el pH de la fase móvil de modo que su valor esté comprendido entre el $\text{pK}_a \pm 1$ de la especie o especies de interés. Para controlar el valor del pH que puede afectar a la retención del compuesto muchos métodos utilizan una solución reguladora. Estos tampones controlan el pH, pero también neutralizan la carga

⁷⁸ Eeltink S., Decrop W. M. C., G. P. Rozing, P. J. Schoenmakers, W. T. Kok. 2004. "Comparison of the efficiency of microparticulate and monolithic capillary columns". *J. Sep. Sci.* 27 (17-18) 1431-1440.

⁷⁹ Cunliffe J.M., Adams-Hall S.B., T.D. Maloney. "Evaluation and comparison of very high pressure liquid chromatography systems for the separation and validation of pharmaceutical compounds" *J. Sep. Sci.* 30 (8) 1214-1223.

⁸⁰ Yoshida T., Majors R.E. 2006. "High-speed analyses using rapid resolution liquid chromatography on 1.8- μm porous particles" *J. Sep. Sci.* 29.2421-2432.

⁸¹ Rubinson K.A., Rubinson J.F. 2000. "Cromatografía líquida" en "Análisis Instrumental". Ed. Pearson Education S. A. Madrid. Pp 636-676



o cualquier resto de silica de la fase estacionaria que haya quedado expuesta y actúan como contraiones que neutralizan la carga del compuesto.

El flujo y la temperatura afectan a la retención relativa de los diferentes compuestos de una mezcla y, por lo tanto, a su resolución. Aumentando el flujo, se reducen los tiempos de análisis y se suele mejorar la resolución, pero se produce un aumento de presión. Para disminuir la presión se aumenta la temperatura, ya que a temperaturas elevadas la viscosidad del disolvente disminuye, dando lugar a que el eluyente fluya más rápidamente. No necesariamente se suelen modificar simultáneamente ambos parámetros para conseguir separaciones adecuadas. Se deben optimizar trabajando en el rango de valores de presión indicados por el fabricante, para tener el máximo tiempo de vida de la columna. No es necesario el control estricto de la temperatura de la columna, pero las separaciones resultan más reproducibles cuando la temperatura se mantiene constante.

Debido a que se utilizan altas presiones, se debe evitar la presencia de partículas que puedan obstruir los conductos y la formación de burbujas que puedan deteriorar el relleno de las columnas y que produzcan inestabilidad en la señal del detector. Para evitar las obstrucciones, los disolventes y las muestras a inyectar se filtran con membranas de 0,45 a 0,22 μm . Para evitar la formación de burbujas, los equipos de HPLC cuentan con desgasificadores de disolvente por vacío o por burbujeo con He y, en el caso de no contar con los mismos, se deben desgasificar los disolventes por medio de ultrasonidos antes de utilizarlos como fase móvil.

4.2. Cromatografía de gases (GC)

En la cromatografía de gases (GC) se utiliza como fase móvil un gas portador inerte, que eluye los componentes de una mezcla a través de una columna que contiene una fase estacionaria inmovilizada. La forma más usual de hacer cromatografía de gases es utilizando como fase estacionaria un líquido que recubre la pared interna de una columna o un soporte sólido, lo que recibe el nombre de *cromatografía gas-líquido (CGL)*. Existe otro tipo de cromatografía de gases menos utilizada, denominada *cromatografía gas-sólido (CGS)* donde el analito se adsorbe directamente sobre las partículas sólidas de la fase estacionaria⁸². El gas portador es un gas inerte generalmente helio, nitrógeno o argón de elevada pureza, con un caudal conocido y controlado.

⁸² Rubinson K.A., Rubinson J.F. 2000. "Cromatografía de gases y cromatografía de fluidos supercríticos" en "Análisis Instrumental". Ed. Pearson Education S. A. Madrid. Pp 680-701.

La fase móvil no interacciona con el analito y su única misión es la de transportar la muestra. Las columnas pueden ser *de relleno*, en las que la fase estacionaria líquida está retenida sobre un sólido inerte (soporte) contenido en el *capilar*, en las que la fase estacionaria se fija sobre las paredes interiores del capilar. En la inmensa mayoría de los análisis se utilizan columnas capilares, largas y estrechas, hechas de sílice fundida (SiO_2) y recubiertas de poliimida como soporte y como protección frente a la humedad atmosférica y una posible rotura de la columna. Los diámetros internos típicos son de 0.1-0.53 mm y las longitudes típicas de 15 a 100m.

Las partes esenciales de un cromatógrafo de gases son⁸³ (ver figura 7): a) fuente de gas portador (botella a presión), b) sistema de regulación de caudales (válvula reguladora y manómetro), c) bloque de inyección de muestras, d) columna termostatazada conteniendo la fase estacionaria, e) detector termostatazado con amplificador de señal y registro gráfico.

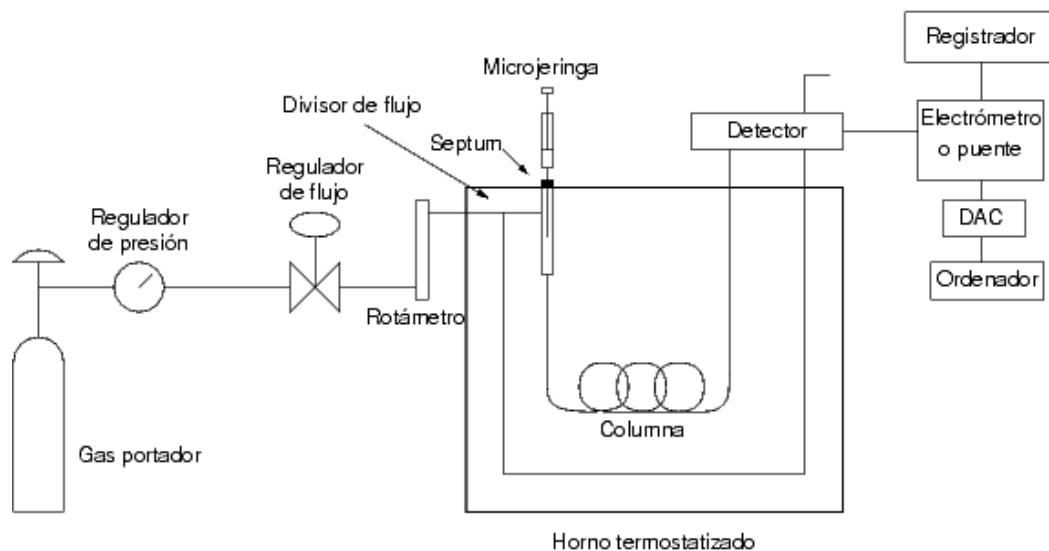


Fig. 7. Diagrama de un cromatógrafo de gases

Principios de funcionamiento

La muestra de un líquido volátil o de un gas se inyecta, a través de un septum, en la cámara de inyección donde se vaporiza y se arrastra hasta cabeza de columna. La temperatura inicial de la columna se fija a 40°C por debajo del punto de ebullición del disolvente, que condensa, por tanto, en la cabeza de la columna. Como los solutos van

⁸³ Loro Ferrer J.F. 2001. "Cromatografía de gases" en "Manual de Cromatografía". Ed. Dirección General de Universidades e Investigación. Consejería de Educación, Cultura y Deporte. Gobierno de Canarias. Pp 107-156.



quedando atrapados lentamente en la porción de disolvente condensado, forman una estrecha banda al principio de la columna. Los analitos, en forma gaseosa, se hacen pasar a través de la columna, arrastrados por el gas portador, y por equilibrios sucesivos entre fase móvil y estacionaria, cada componente se desplaza por la columna a velocidades diferentes. La columna debe estar suficientemente caliente a fin de que los analitos alcancen una presión de vapor suficiente para que se eluyan en un tiempo razonable. Finalmente, los analitos después de separados llegan al detector cuya respuesta aparece en la pantalla de un ordenador o un registrador en forma de cromatograma. El detector se mantiene a una temperatura más alta que la columna, de forma que los analitos se encuentran en forma gaseosa.

4.2.1. Tipos de cromatografía de gases

Como se ha mencionado ya existen dos tipos de cromatografía de gases⁸⁴:

4.2.1.1. La cromatografía gas-sólido

Tiene una fase estacionaria sólida en la cual se produce la retención de los analitos debido a la adsorción física sobre la superficie del sólido. Esta modalidad cromatográfica ha tenido una aplicación limitada debido a la tendencia de los compuestos a formar colas y a la retención semipermanente de gases activos sobre la fase estacionaria.

4.2.1.2. La cromatografía gas-líquido

Que ha sido empleada en la parte del trabajo experimental incluido en esta memoria se basa en la distribución del analito entre una fase móvil gaseosa y una fase estacionaria líquida inmovilizada sobre la superficie de un sólido inerte (soporte) o en las paredes interiores de la columna, si ésta es capilar. Este tipo de cromatografía de gases es la más utilizada.

4.3. Electroforesis Capilar (CE)

La electroforesis capilar (CE) es una herramienta de separación, que creó grandes expectativas cuando se introducción en la química analíticalas cuales luego fueron reduciéndose por la baja reproducibilidad que ofrecía sin embargo en los últimos años ha vuelto a recobrar gran importancia por la versatilidad que presenta, separando aminoácidos,

⁸⁴ Skoog D.A., Leary J.J. 1996. "Cromatografía de gases" en "Análisis instrumental". Ed. McGraw-Hill/Interamericana de España, S. A. Madrid. Pp 704-729.

ácidos orgánicos, iones inorgánicos, carbohidratos, esteroides, tioles, contaminantes alimenticios, material genético y algunos fármacos.

Las sustancias a analizar se separan en función de su diferente movilidad, en sentido y velocidad, bajo la acción de un campo eléctrico en el interior de un tubo capilar lleno de una disolución reguladora^{85,86}. El tubo capilar normalmente es de sílice fundida recubierto por una capa polimérica para su protección, y con unas dimensiones que oscilan entre 10-100 cm de longitud y 25-100 μm de diámetro interno.

Las principales características de la CE son:

1. Elevada rapidez de análisis.
2. Altas eficacias, de 10^5 - 10^6 platos teóricos por metro de columna.
3. Requerimiento de pequeños volúmenes de muestra (nanolitros) y reactivos.
4. Gran variedad de aplicaciones.
5. Facilidad de automatización.

Los componentes básicos de un equipo de CE son un generador de alto voltaje, viales fuente de destino y muestra, capilar (normalmente de sílice fundida recubierto de poliimida), sistema de termostatación, sistema de inyección de la muestra, sistema de detección y sistema de registro.

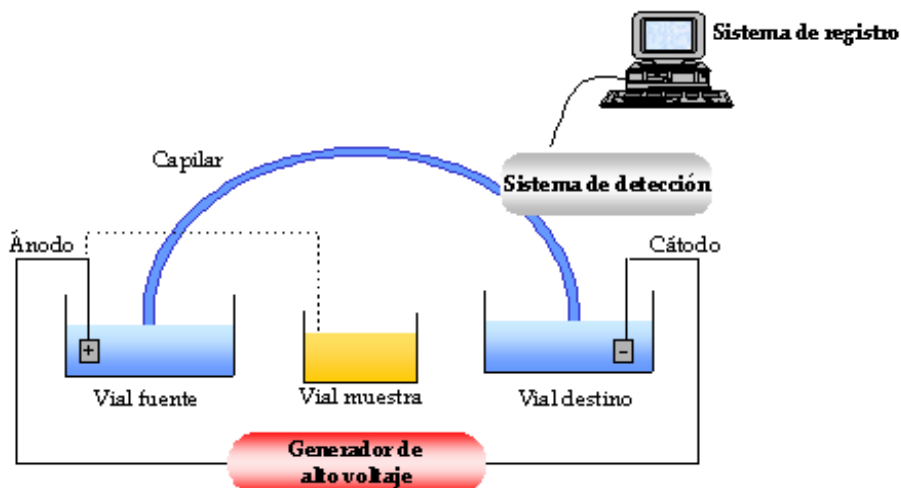


Fig.8. Esquema básico de un equipo de electroforesis capilar (CE)

⁸⁵ Li. S. F. Y.1996. "Capillary Electrophoresis: principles, practice and applications. Elsevier, Amsterdam.

⁸⁶ Grossman P.D., Colburn J.C. 1992. "Capillary Electrophoresis. Theory and Practice" Academic Press, San Diego.



Principios de funcionamiento

Los extremos del capilar se colocan en dos viales rellenos de disolución reguladora que contienen cada uno de ellos un electrodo, ambos conectados a una fuente de alto voltaje (generalmente de hasta 30kV). La muestra se inyecta dentro del capilar a través de un vial que sustituye temporalmente el vial inicial aplicando un potencial eléctrico (inyección electrocinética) o una presión externa (inyección hidrodinámica) durante unos segundos. Después se vuelve a reemplazar el vial de muestra por el inicial, conteniendo la disolución reguladora, y se aplica un potencial eléctrico a lo largo del capilar que produce la separación. Los analitos pueden ser detectados directa o indirectamente con detección óptica (UV-visible, fluorimétrica, fosforimétrica, quimioluminiscente o infrarroja) a través de la ventana del capilar que habitualmente se encuentra cerca del extremo opuesto a donde se hizo la inyección (normalmente cerca del cátodo cuando se trabaja en polaridad normal) -detección on-column-, o al final del capilar mediante el uso de otros sistemas de detección como la espectrometría de masas o las técnicas electroquímicas que dan lugar a la detección off- o post-columna. Donde la migración de las especies químicas dentro del capilar se rige por dos fenómenos, que se dan simultáneamente como son: la electromigración y electroósmosis^{87,89}.

La **electromigración** consiste en el movimiento neto de las especies cargadas que forman la muestra a través de la disolución reguladora dentro del capilar, bajo la influencia del campo eléctrico. Cada analito tiende a migrar hacia su polo correspondiente (cationes al cátodo, aniones al ánodo) a distinta velocidad. A esta velocidad se le denomina velocidad electroforética y se calcula por la siguiente expresión:

$$v = \mu_e E$$

donde v es la velocidad de migración de cada ion ($m s^{-1}$), μ_e es la movilidad electroforética ($m^2 V^{-1} s^{-1}$) y E es el campo eléctrico aplicado ($V m^{-1}$). La intensidad del campo eléctrico es función del voltaje aplicado dividido por la longitud total del capilar. La movilidad electroforética es un factor que indica cómo de rápido se mueve un ión o soluto a través de la disolución de separación. Es una expresión del balance de fuerzas que actúan sobre cada

⁸⁷ Oda R.P., Landers J.P. 1997. "Introduction to Capillary Electrophoresis" en "Handbook of Capillary Electrophoresis". Ed. J. P. Landers. CRC Press. Pp 1-49.

⁸⁸ Marina M.L., Ríos A., Valcárcel M. 2005. "Fundamentals of Capillary Electrophoresis" en "Analysis and Detection by Capillary Electrophoresis". Ed. M. L. Marina, A. Ríos, M. Valcárcel. Elsevier. Pp 1-28.

⁸⁹ Cruces Blanco C. 1998. "Electroforesis capilar". Ed. Universidad de Almería, Servicio Publicaciones Almería.

ión individual; la fuerza del campo eléctrico actúa a favor del movimiento y las fuerzas de fricción y rozamiento, en contra. Puesto que estas fuerzas son constantes durante la electroforesis, la movilidad electroforética es una constante para un ión dado bajo unas condiciones dadas. La ecuación que describe la movilidad electroforética es:

$$\mu_e = \frac{q}{6\pi\eta r}$$

donde q es la carga del ión, η es la viscosidad de la disolución y r es el radio de la partícula o ión en disolución. La carga del ión, q , es estable para los iones totalmente disociados, como son ácidos fuertes o pequeños iones, pero puede estar afectada por cambios de pH en el caso de ácidos o bases débiles. De la ecuación anterior se puede ver que las diferencias en las movilidades electroforéticas serán causadas por las diferencias en la relación entre la carga y el tamaño de ión. Las moléculas pequeñas de gran carga se moverán más rápido a través del capilar que las moléculas con menor carga. Con esta expresión se deduce también que las moléculas neutras, al ser $q=0$, tendrán una movilidad electroforética igual a cero.

La **electroósmosis** es un fenómeno que se produce siempre que se aplica un campo eléctrico a un sistema líquido (como es el medio electroforético) que esté en contacto directo con una superficie cargada (como es el interior del capilar de sílice fundida). La pared interna del capilar tiene grupos silanoles que, en contacto con el soluciónreguladora de separación, se ionizan. El grado de ionización se controla principalmente mediante el pH del electrolito de separación (aparecen cargas negativas con disoluciones de pH superior a 2.5-3). De este modo, la pared cargada negativamente del tubo de sílice atrae a los iones con carga positiva del soluciónreguladora y bajo la acción del campo eléctrico estas cargas positivas se desplazan hacia el cátodo y arrastran con ellas el agua de solvatación asociada. El movimiento global del soluciónreguladora en el interior del capilar, llamado flujo electrosmótico (EOF), viene determinado por su respectiva velocidad electrosmótica, v_{eo} :

$$v_{eo} = \mu_{eo} E$$

μ_{eo} es la movilidad electrosmótica definida como:

$$\mu_{eo} = \frac{\epsilon\zeta}{4\pi\eta}$$



donde ε es la constante dieléctrica del solución reguladora, η su viscosidad y ζ (llamado potencial zeta) el potencial que se genera aproximadamente entre la superficie del capilar y el solución reguladora. El EOF va a afectar a todas las sustancias en el interior del capilar del mismo modo, ya que se trata de una propiedad del sistema capilar-solución reguladora.

Al existir los dos fenómenos de migración (electromigración y electroósmosis), la velocidad de migración de un soluto está relacionada con una combinación de la movilidad electroforética y electroosmótica:

$$v = (\mu_{eo} \pm \mu_e)E$$

El tiempo de migración de la sustancia cargada vendrá dado por la expresión:

$$t_m = \frac{L}{(\mu_{eo} \pm \mu_e)E}$$

donde L es la longitud del capilar hasta el punto de detección.

Un esquema de la existencia de estos dos fenómenos sobre el movimiento neto de las especies contenidas en una muestra se representa en la figura 9.

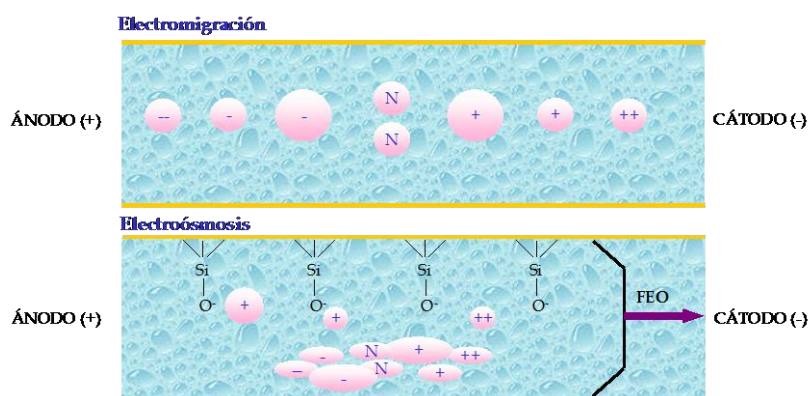


Fig. 9. Representación de los fenómenos de electromigración y electroósmosis.

4.3.1. Tipos de Electroforesis Capilar

La CE es una técnica muy versátil, y muy variada que a diferencia de la cromatografía líquida donde el cambio de un modo a otro suele requerir el cambio de columna y fase móvil, en electroforesis capilar suele implicar únicamente el cambio de la composición de la

disolución reguladora empleada. Los tipos de CE más comunes junto con el principio de separación de cada uno de ellos se resumen en la tabla 8⁹¹.

Tabla 8. Relación de tipos de con su mecanismos de separación empleados.

Modo de separación	Acrónimo	Principio de separación
Electroforesis capilar en zona	CZE	Carga/tamaño
Cromatografía capilar electrocinética micelar	MEKC	Interacción hidrofóbica/iónica con micelas del surfactante
Electroforesis capilar quiral	CCE	Formación de complejos estereo-específicos
Electroforesis capilar por afinidad	CAE	Interacciones moleculares entre ligando y analito "objetivo"
Cromatografía capilar electrocinética micelar con microemulsiones	MEEKC	Mecanismos electroforéticos y reparto cromatográfico
Electroforesis capilar en gel	CGE	Tamaño molecular
Isoelectroenfoque capilar	CIEF	Punto isoelectrónico
Isotacoforesis capilar	CITP	Capacidad de migración entre tampones de distinta naturaleza
Electrocromatografía capilar	CEC	Movilidad en una solución libre y retención cromatográfica

4.3.1.1. Electroforesis capilar en zona

Es el tipo de electroforesis más versátil y simple de los modos en CE, fue la primera modalidad que se desarrolló, siendo pioneros los trabajos de Jorgenson y Luckas^{92,93}

El mecanismo de separación se basa en las diferencias de carga/masa de las diferentes sustancias que componen la muestra al aplicar un campo eléctrico que implica distintas movilidades electroforéticas. Tiene la limitación de ser útil sólo para la separación de especies cargadas, no permitiendo separar las neutras.

Puesto que las muestras son introducidas normalmente desde el ánodo y el detector se encuentra al lado del cátodo, el orden de elución determinado por la relación

⁹¹ Fernández GutiérrezA., Segura CarreteroA., Carrasco PancorboA. 2005. "Fundamentos teóricos y modos de separación" en "Electroforesis capilar: Aproximación según la técnica de detección". Ed. Univ. Granada. Pp 11-54.

⁹² JorgensonJ. W., LuckacsK. D. 1981. "Zone Electrophoresis in open-tubular glass-capillaries". Anal Chem. 53 1298-1302.

⁹³ Jorgenson J. W., Luckacs K. D. 1983. "Capillary Zone Electrophoresis". Science 222. 266-272.



carga/tamaño de los analitos, corresponde a: cationes, sustancias neutras y aniones (ver figura 10).

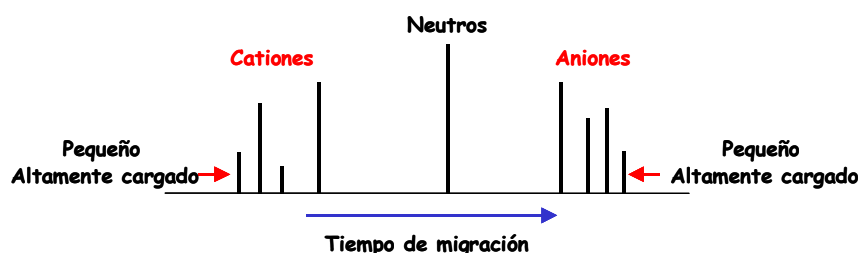


Fig. 10. Representación de un electroferograma por CZE indicando el orden de elución.

Este orden de elución se debe a que los cationes se mueven a través del capilar en la misma dirección que el EOF, por lo que sus velocidades de migración serán más rápidas que el propio EOF. Las moléculas neutras, que se mueven a través del capilar empujadas sólo por el EOF, eluyen después de los cationes, pero sin separarse. Los aniones, finalmente, al poseer carga negativa, tenderán a moverse hacia el ánodo en sentido opuesto al EOF, pero generalmente éste es mayor que las velocidades electroforéticas de los aniones, por lo que los aniones se desplazan hacia el cátodo eluyendo en último lugar.

El modo de electroforesis capilar en zona ha sido el que se ha utilizado en la presente memoria en el capítulo 5.

Condiciones a optimizar

Las variables más importantes a optimizar en el desarrollo de un método de electroforesis capilar se pueden dividir en dos grupos.⁹⁴⁻⁹⁶

⁹⁴ Arce- JiménezL., Segura-CarreteroA., Cortacero-RamírezS. 2005.“Aspectos prácticos para el desarrollo de metodologías analíticas mediante electroforesis capilar” en “Electroforesis capilar: aproximación según la técnica de detección”. Ed. Univ. Granada. Pp 126-155.

⁹⁵ McLaughlinG.M., WestonA., HauffeK.D. 1996.“Capillary electrophoresis methods development and sensitivity enhancement strategies for the separation of industrial and environmental chemicals”. J. Chromatogr. A 744 123-134.

⁹⁶ DolníkV. 1996.“Selectivity, differential mobility and resolution as parameters to optimize capillary electrophoretic separation”. J. Chromatogr. A 744 115-121.

Variables instrumentales

- Selección del capilar
- Voltaje
- Temperatura
- Tiempo de inyección

Variable químicas del medio electroforético

- pH
- Capacidad reguladora
- Fuerza iónica
- Presencia de aditivos

Variables instrumentales

Selección del capilar: dimensiones y acondicionamiento

La elección del capilar resulta muy importante; así, la longitud del capilar se relaciona con la resolución de picos que se quiera obtener y el tiempo de separación, y el diámetro del capilar influyen en la sensibilidad. Cuanto más largo sea un capilar, mayor es el tiempo de análisis y mayor la separación o resolución entre picos, y cuanto más grande sea el diámetro, mayor será la sensibilidad. Se recomienda utilizar capilares con diámetros entre 50-75 μm , ya que diámetros mayores pueden dar lugar a problemas de calentamiento interno. También es importante optimizar el ciclo de lavado del capilar para obtener buena reproducibilidad.

Voltaje

Tanto la velocidad electroforética como la electroosmótica son directamente proporcionales al campo eléctrico. Un voltaje elevado proporciona mayor rapidez y por lo tanto, tiempos de migración más cortos, pero se pueden producir pérdidas en la resolución y eficacia de los picos, ya que la generación de un calor excesivo dentro del capilar a altos voltajes, contribuye significativamente a la dispersión de los analitos y, por ende, al solapamiento de los picos. El voltaje límite que se puede emplear en la práctica es de 30 kV (en la mayor parte de los instrumentos de CE comerciales) para que no se produzcan efectos de calentamiento del capilar que se conocen con el nombre de efecto térmico o efecto Joule.

Temperatura

El control de la temperatura es siempre importante para evitar el efecto Joule. Además, los cambios en la temperatura afectan a la movilidad de los analitos y al EOF, e incluso pueden afectar al pH de la disolución reguladora. El intervalo de temperatura permitido está comprendido normalmente entre 10 y 50°C. El uso de temperaturas altas en CE disminuye el tiempo de análisis y mejora la forma de los picos, debido a la disminución de la viscosidad, pero también se pierde resolución en especial cuando se trata de analitos muy semejantes o de un número elevado de ellos.



Tipo y tiempo de inyección

La muestra se puede introducir en el capilar usando la modalidad hidrostática o hidrodinámica (gravedad, presión o vacío) y la electrocinética. La inyección hidrodinámica es la modalidad más comúnmente usada.

El tiempo de inyección es habitualmente la última variable experimental a optimizar en un método. Se usará mayor o menor tiempo en función de la sensibilidad que se quiera conseguir (mayor tiempo de inyección, mayor sensibilidad) sin empeorar la separación entre los analitos bajo estudio. En general, se deben inyectar volúmenes pequeños que puedan ser detectados, pero que den lugar a las mejores eficacias.

Variables químicas del medio electroforético

Las características de la disolución de separación (pH, capacidad reguladora, fuerza iónica, presencia de aditivos, etc.) juegan un papel más que decisivo en la separación electroforética que los parámetros instrumentales.

pH

Es una variable de gran repercusión en la selectividad de los métodos electroforéticos, pues influye en el grado de ionización de especies ácidas o básicas débiles, y por tanto, en sus movilidades electroforéticas. En general, para la separación de solutos catiónicos se debe trabajar a un pH de una o más unidades por debajo de su pK_b y para solutos aniónicos por encima de su pK_a . Además, teóricamente a medida que aumenta el pH, aumenta la movilidad electroosmótica y por tanto, disminuyen los tiempos de migración. El aumento de la movilidad electroosmótica se debe a que elevados valores de pH producen más disociación de los grupos silanoles Si-OH a Si-O⁻ dentro de las paredes del capilar y también porque se produce un aumento del potencial zeta.

Capacidad reguladora y composición

Ésta debe ser alta sin un aumento excesivo de la conductividad en una zona lo más amplia posible de pH, para que se obtenga buena reproducibilidad y una baja fuerza iónica para minimizar el efecto Joule. La elección es generalmente empírica y suele recurrirse a la información proveniente de los métodos previamente optimizados.

Fuerza iónica

Tiene una influencia decisiva en las movilidades electroforéticas y electroosmóticas. Normalmente, al aumentar la concentración de la disolución de separación (fuerza iónica),

se mejora la resolución de los analitos y su forma de pico. Sin embargo, se genera más calor dentro del capilar y es necesario un buen sistema para regular la temperatura (por ejemplo uso de capilares de pequeño diámetro).

Presencia de aditivos

Los aditivos añadidos a las disoluciones solución reguladora son de vital importancia para mejorar la separación electroforética. El empleo de ligandos como ciclodextrinas [⁹⁷] y poliéteres macrocíclicos permite un notable incremento de la selectividad, mientras que la adición de sales neutras, anfolitos, alquilaminas y polímeros neutros consiguen reducir (o controlar) el EOF y la adsorción de proteínas a la pared del capilar. La adición de disolventes orgánicos (acetonitrilo, alcoholes, etc.) y alcoholes de mayor peso molecular (glicerina, propanol...) puede modificar la polaridad y viscosidad de la disolución de separación, cambiando las movilidades electroforéticas y electroosmóticas de los analitos. Además, pueden usarse para potenciar la solubilidad de analitos hidrofóbicos. También pueden adicionarse sustancias poliméricas solubles (metilcelulosa e hidroxipropilmetilcelulosa) para reducir el potencial zeta de la pared interna del capilar, y por tanto minimizar el efecto de la electroósmosis y reducir significativamente los fenómenos indeseables de la adsorción.

5. Sistemas de Detección Analítica

Los sistemas de detección que se utilizan acoplados a los sistemas de separación tal y como su nombre indica tienen como principal objetivo el asegurar que los analitos previamente separados serán detectados adecuadamente. Entre los requisitos que deben cumplir podemos mencionar los siguientes:

- Tener una buena sensibilidad.
- Proporcionar límites de detección bajos.
- Presentar una determinada selectividad a una serie de analitos (o a uno determinado) evitando así posibles interferencias en la señal por parte de otras sustancias presentes en la muestra.
- Respuesta rápida ante un cambio en la concentración de analito.
- La presencia del detector no debe perjudicar a la eficacia de la separación.
- Proporcionar señales fiables: reproducibles y estables en el tiempo.

⁹⁷ Rodríguez M.R.A., Caramao E.B., Arce L., Ríos A., Valcárcel M. 2001. "Use of cyclodextrins for the separation of monoterpene isomers by micellar electrokinetic capillary chromatography" J. Microcol. 293-299.



- Idealmente, la señal debe ser nula en ausencia de analito.
- Proporcionar cambios en su señal en el margen más amplio posible de concentración o masas del analito, es decir que presente un amplio intervalo lineal.

Son varios los detectores que se pueden acoplar a las técnicas de separación descritas y, se podrían clasificar en tres categorías: técnicas ópticas, electroquímicas y otras, donde se incluiría la espectrometría de masas.

5.1. Espectrometría de masas

En el trabajo experimental que se recoge en la presente memoria, se ha empleado la detección por espectrofotometría de masas acoplada a HPLC y GC en sus distintas modalidades, con distintos sistemas de ionización y con distintos analizadores así también se ha trabajado con la espectrometría de masas (MS) independiente como ICP-MS. Por ende a a continuación se ha tenido a bien realizar una descripción más detallada de los mencionados sistemas de detección en los próximos apartados.

La espectrometría de masas (MS) es una técnica que se basa en ionizar moléculas gaseosas, acelerarlas en un campo eléctrico, y luego separarlas de acuerdo con su relación masa-carga. El proceso de ionización, a veces, suministra suficiente energía para que las moléculas se rompan en diversos fragmentos. La corriente total de todos los iones generados se registra en un intervalo amplio seleccionado de masas. El cromatograma que representa la corriente iónica total frente al tiempo de migración se denomina TIC (Total Ion Current o Total Ion Chromatogram).

La MS es probablemente, de entre todas las herramientas analíticas al alcance del científico, la de aplicación más general. Cada vez con más frecuencia, se utiliza no sólo en investigación, sino también en análisis de rutina de los procesos industriales, en control de calidad, etc.

Sus principales cualidades son:

- ✓ -Capacidad de dar una posible identificación, ya que proporciona un espectro característico de cada molécula.
- ✓ Cuantitativa, pues permite medir la concentración de las sustancias.
- ✓ Buena sensibilidad: habitualmente se detectan concentraciones del orden de ppm o ppb.
- ✓ Universal y específica, pues permite hacer análisis en modo full o scan.

- ✓ Proporciona información estructural sobre la molécula analizada.
- ✓ Suministra información isotópica.
- ✓ Es una técnica rápida: se puede realizar un espectro en décimas de segundo, por lo que puede monitorizarse para obtener información en tiempo real sobre la composición de una mezcla de compuestos o extracto de una muestra ambiental o alimentaria.

Se puede utilizar directamente sin necesidad de poner delante una técnica separativa (experimentos de infusión directa)⁹⁸, sin embargo, la combinación de una técnica de separación de alta eficacia con la espectrometría de masas como sistema de detección, da lugar a una herramienta muy útil en el análisis de muestras complejas^{99,100}.

Los analitos que previamente han sido separados mediante GC, HPLC o CE son introducidos por infusión directa en la fuente de ionización donde se evaporan, se ionizan y se aceleran. Los iones acelerados pasan a uno de los numerosos tipos posibles que hay de analizadores de masas donde se separan, de modo que diferentes tipos de iones llegan al detector a diferentes tiempos. Esta pequeña corriente de iones se amplifica y da la señal de salida que se registra y procesa a través de un sistema informático. La versatilidad de la espectrometría de masas se debe en parte al amplio abanico de posibilidades de cada una de las tres secciones de un espectrómetro de masas: fuente de ionización, analizador y detector. El resultado que se obtenga de un espectrómetro de masas, depende notablemente de cuáles sean la interfase (o fuente de ionización) y el analizador utilizados.

El mayor problema que surge a la hora de acoplar las diferentes técnicas separativas con la espectrometría de masas está relacionado con la forma de introducir la mezcla en la fuente de ionización. Para ello se han descrito diversos tipos de interfases donde se produce la evaporación y/o ionización de las moléculas¹⁰¹. Como característica general a todas ellas

⁹⁸ Lerma-García M.J, Ramis-Ramos G, Herrero-Martínez J.M, Simo-Alfonso E.F. 2008. "Classification of vegetable oils according to their botanical origin using profiles established by direct infusion mass spectrometry" 22 973-978.

⁹⁹ IbanezE, CifuentesA. 2001. "New analytical techniques in food science". Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 41413-450.

¹⁰⁰ HaoC.Y, ZhaoX. M., YangP. 2007. "GC-MS and HPLC-MS analysis of bioactive pharmaceuticals and personal-care products in environmental matrices" Trac-Trends in Anal. Chem. 26 569-580.

¹⁰¹ Gelpi, E., 2002. "Interfaces for coupled liquid-phase separation/mass spectrometry techniques. An update on recent developments" J. Mass Spectrom., 37, 241.



podemos señalar que una ionización exitosa requiere que una cierta energía sea transferida al analito.

Los sistemas de ionización se suelen clasificar atendiendo al grado de fragmentación que provoquen en la estructura del compuesto a estudiar. Técnicas de ionización fuertes, como impacto electrónico (EI) y otras más suaves entre las que se pueden encontrar electrospray (ESI), ionización química a presión atmosférica (APCI), fotoionización a presión atmosférica (APPI), ionización química (CI), bombardeo atómico (FAB), desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI), etc. En el siguiente esquema se clasifican algunas de las interfases de uso más extendido considerando el rango de analitos y peso molecular de los mismos que pueden analizar.

A pesar de la variedad de interfases desarrolladas para estos acoplamientos, la más utilizada es la interfase ESI. Esta interfase además de permitir la transferencia directa de los compuestos desde el capilar de separación hasta el espectrómetro de masas, permite un análisis eficaz de compuestos polares, lábiles, y/o de compuestos con un alto peso molecular (normalmente hasta 100000 Da). Por otro lado, es fácil de implementar, es sensible y puede usarse en un amplio intervalo de aplicaciones. Como en la presente memoria se emplearon varias interfases se explicará brevemente el fundamento de cada una de ellas con algo más de detalle las cuales se mencionan según al grupo al que pertenecen.

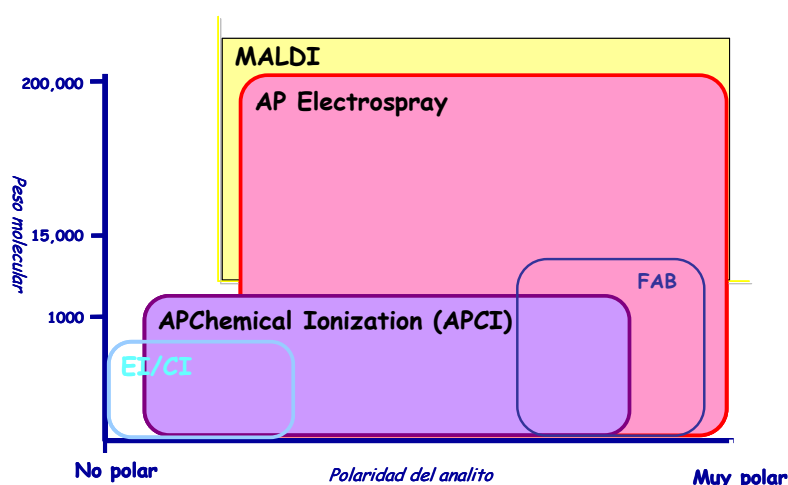
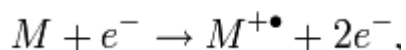


Fig.11. Rango al que trabajan los sistemas de ionización más comunes.

5.1.1. Procedimientos de ionización a vacío

5.1.1.1. Ionización por impacto electrónico (EI)

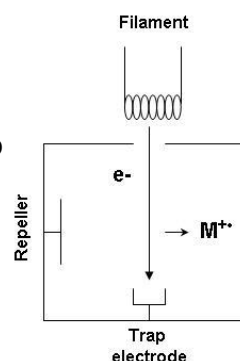
Antes conocida como ionización por impacto de electrones, es un método de ionización en el que los electrones energéticos interactúan con los átomos o moléculas en fase gaseosa para producir iones. A continuación se describe el proceso de ionización electrónica:



Donde M es la molécula de analito que se está ionizado

e^{-} es el electrón

y M^{+} es el ion resultante.



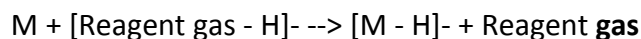
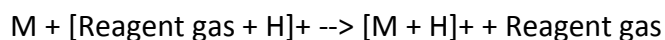
Así, las moléculas gaseosas entran en la fuente de ionización y son bombardeadas por electrones emitidos por un filamento calentado (generalmente tungsteno) con una energía cinética de 70 electronvoltios. Esta energía es suficiente para ionizar las moléculas ($M + e^{-}$ a $M^{+} + 2e^{-}$) y para romperlas en fragmentos más pequeños. El ión M^{+} tiene una relación m/z correspondiente a la masa molecular del analito y se llama ión molecular. Dependiendo de su estructura y de la cantidad de energía absorbida, este ión puede atravesar el analizador intacto o fragmentarse generando iones más pequeños. Este proceso de fragmentación tiene lugar en la mayoría de los casos, donde el ion molecular M^{+} puede ser poco abundante e incluso no estar presente. Una fragmentación muy intensa de moléculas grandes crea dificultades para interpretar el espectro de masas. También se pueden generar iones negativos.

5.1.1.2. Ionización química positiva (NCI)

La ionización química está dirigida a potenciar la abundancia del ión molecular en aquellas sustancias en las que su presencia en el espectro de EI es escasa o no aparece. La ionización química utiliza un gas ionizable (gas reactante) como el metano, isobutano, amoníaco, etc., como paso intermedio del proceso de ionización de los analitos. Como la relación de gas presente a muestra es muy elevada, la ionización se producirá preferente sobre aquel y posteriormente, debido a la alta presión, a partir de reacciones ion-molécula



se consigue la ionización de la muestra mediante reacciones de transferencia protónica o reacciones de adición. Se obtiene así una abundante cantidad de iones (M+H)⁺.



5.1.2. Procedimiento de ionización a presión atmosférica

5.1.2.1. Ionización por electrospray (ESI)

Esta técnica de ionización revolucionó el campo de los acoplamientos entre técnicas analíticas de separación que trabajan en fase líquida y la espectrometría de masas. En ocasiones no se considera el ESI como un procedimiento de ionización en sí, ya que no produce iones, sino más bien la transferencia de estos desde una fase líquida a una fase gaseosa; sin embargo, de lo que no hay duda es de que tiene el potencial suficiente para, a través de colisiones ión-molécula, producir cambios en la naturaleza y cargas de los iones en fase gas.

En el proceso de formación del electrospray, el cual se lleva a cabo a presión atmosférica, intervienen diversos mecanismos al mismo tiempo. La muestra con la ayuda de un gas nebulizador, se carga y dispersa simultáneamente. El disolvente se va evaporando (desolvatación) de las microgotas formadas y éstas van aumentando su densidad de carga eléctrica. Como consecuencia, las gotas se encogen y los iones que se encuentran en la superficie se ven forzados a aproximarse entre sí debido al campo electrostático que se aplica entre la salida del capilar y la entrada al equipo MS ($\pm 2-5$ kV). En cierto momento, la repulsión de los iones se hace mayor que la tensión de la superficie que mantiene unidas las gotas en forma esférica, y las pequeñas gotas se rompen (el punto donde se pronostica que las gotas se romperán se llama límite de Rayleigh, pero la ruptura se suele producir un poco antes de que se alcance dicho punto). Debido a fuerzas de repulsión coulombica aumenta la tensión superficial de las microgotas y éstas acaban “explotando” (“explosiones de Coulomb”), formándose así una serie de pequeñas gotas cargadas que seguirán sufriendo procesos de evaporación y explosión sucesivos hasta que finalmente se forman iones cargados desnudos que pasan a fase gaseosa con una o más cargas y son atraídos hacia la entrada del espectrómetro de masas como consecuencia del voltaje aplicado^{102,103}.

¹⁰²Severs J.C., Smith R.D. 1997. “Electrospray ionization mass spectrometry”. R.B. Cole (Ed.). John Wiley & Sons, New York.

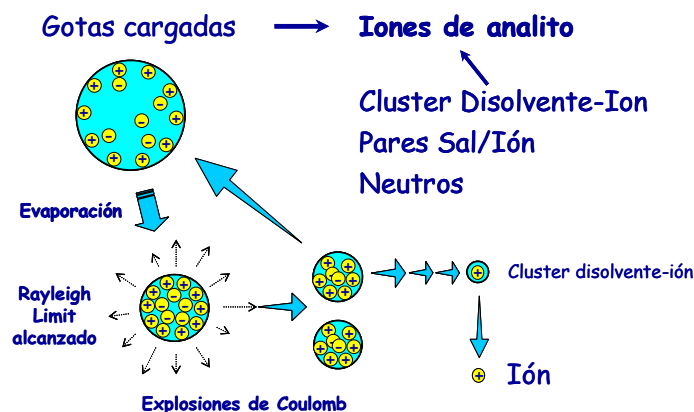


Fig. 12. Esquema donde se explica el proceso de formación del electrospray.

La ionización se puede llevar a cabo en el modo positivo o negativo. En el modo positivo, se podrán formar iones múltiplemente protonados $[M+nH]^{n+}$ donde n es el número de protones cargados positivamente en la molécula. Del mismo modo, es posible también la formación de aductos con iones sodio, litio, potasio, amonio, etc. En el modo negativo, se observa normalmente la desprotonación de las moléculas, pudiéndose formar también iones múltiplemente desprotonados $[M-nH]^{n-}$.

5.2. Principales analizadores

Una vez que en la interfase se ha llevado a cabo la transferencia de los iones desde la fase líquida a la fase gaseosa y la ionización, los iones son dirigidos hacia el analizador de masas. Los analizadores de masas permiten la separación, fragmentación, detección y cuantificación de los analitos en estudio con un grado de sensibilidad y selectividad muy elevado, proporcionando información sobre su masa molecular. En lo que concierne al analizador de masas, el analista puede encontrar disponibles numerosas opciones, entre las que podemos señalar como más comunes: cuadrupolos (Q), trampas de iones (IT), triples cuadrupolos (QQQ), tiempos de vuelo (TOF), transformada de fourier-resonancia de ión ciclotrónica (FT-ICR), orbitrap (OT), acoplamientos entre varios de los mencionados, etc. Todos ellos se distinguen en la exactitud que ofrecen al determinar la masa molecular de los analitos (error entre la masa exacta determinada y el valor teórico), la capacidad o incapacidad para determinar distribuciones isotópicas (True isotopic pattern), el poder hacer MS^n (de gran utilidad para determinar estructuras químicas), la velocidad de scan, el rango

¹⁰³. Martin Smith R 1999. "Instrumentation" en "Understanding Mass Spectra. A basic approach". Ed. K. L. Busch. John Wiley & Sons, Inc. 1-40.



de masas en el que pueden medir, y la resolución (el valor de la masas dividido entre la diferencia de masa Δm entre dos iones muy próximos).

En el trabajo desarrollado en esta tesis se ha utilizado la espectrometría de masas y TOF acoplada a CE y HPLC respectivamente.

Como ya se ha indicado con anterioridad existen diferentes tipos de analizadores, pero los utilizados en el trabajo experimental de esta memoria fueron la trampa de iones (TI) y el tiempo de vuelo (TOF), el cuadrupolo acoplado al tiempo de vuelo (Q-TOF). Estos analizadores, tal y como mencionábamos antes, difieren en cómo los fragmentos de un compuesto se separan de acuerdo a su relación masa/carga y también en la velocidad al adquirir datos, el límite de detección, la resolución, la capacidad de hacer análisis MS/MS y la calidad del espectro de masas que se obtiene.

5.2.1. Analizadores de tiempo de vuelo

El analizador de tiempo de vuelo (TOF) discrimina según la distinta velocidad que adquieren los iones en el interior del analizador en función de su relación m/z^{104} . Está basado en el principio de que todos los iones generados en la fuente de ionización tienen la misma energía cinética, por lo que su velocidad es inversamente proporcional al cuadrado de su masa. Se aplica un voltaje determinado para acelerar los iones, lanzándolos a un tubo de alto vacío con una energía cinética constante. Los iones que tienen la misma energía cinética pero diferentes valores de m/z adquieren distinta velocidad de forma que no todos llegarán al extremo contrario a la vez; es decir, se diferencian los iones basándose en la distinta velocidad que adquieren en el interior del analizador en función de su relación m/z . Los iones de mayor m/z “volarán” a menor velocidad que los de menor m/z . La resolución entre los iones de diferente m/z será mejor cuanto mayor sea longitud del tubo (habrá una mayor separación de los iones en el tiempo) y cuanto menor sea la dispersión en energías de los iones formados en la fuente.

El siguiente esquema nos muestra las partes que posee el MicroTOF empleado para llevar a cabo parte del desarrollo experimental de la presente memoria.

¹⁰⁴ Rubinson K. A., Rubinson J. F. 2000. “Espectrometría de masas” en “Análisis Instrumental”. Ed. Pearson Education S. A. Madrid. Pp 522-577.

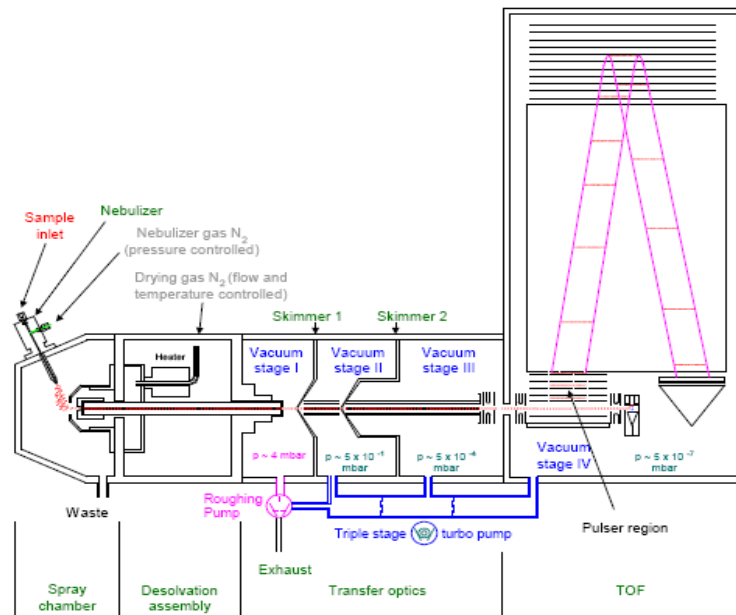


Fig. 13. Esquema detallado de las partes de las que consta un ESI-MicroTOF.

Por orden, vamos encontrando la cámara de formación del spray (spray chamber), la unidad de desolvatación (desolvation unit), la zona de “guía y convergencia” de iones (ion guide and beam focusing), la zona de aceleración ortogonal (orthogonal acceleration), el detector de referencia, el camino o tubo de vuelo (flight path), el reflector (reflector) y el detector (detector). Cuatro de los compartimentos han de estar sometidos a alto vacío.

La muestra entra en la cámara de nebulización, donde tiene lugar la formación del electrospray. Los iones formados atraviesan la unidad de desolvatación, que separa las zonas a presión atmosférica de la primera zona a alto vacío, y que consta de un calentador del gas de secado y un capilar de cristal. Se llega a través de ella a la zona de transmisión o transferencia óptica que consta de tres módulos que están a alto vacío, separados entre sí por varios skimmers. El primero de ellos (stage I) es el único que está conectado a una bomba externa rotatoria; mientras que los tres módulos (stages I, II y III) están conectados a una bomba turbo molecular que posee distintos niveles de vacío. Están separados entre sí por varios skimmers. Los dos hexapolos son los que transfieren los iones hasta la zona de alto vacío, mientras que las lentes (1-5) enfocan o dirigen dichos iones.

La zona de aceleración ortogonal contiene dos de las últimas lentes mencionadas anteriormente (lentes 4 y 5) y acelera los iones hacia el tubo de vuelo aplicando un campo eléctrico intermitente.



En función de su masa, los iones se introducen en mayor o menor medida en el reflector. Detrás del mismo hay zonas de tensión que repelen los iones que le llegan; lógicamente, los iones pequeños serán repelidos con más facilidad.

El detector es un detector de impacto electrónico que consiste en una serie de placas a alto voltaje que convierten el impacto de los iones en señales eléctricas. En el detector hay millones de poros muy pequeños que están internamente recubiertos con una capa semiconductor; cada uno de ellos trabaja como un multiplicador de electrones independiente. También hay un detector de referencia.

Este analizador de tiempo de vuelo (TOF) es rápido y sensible, permite la determinación de masas exactas empleando TIP (True Isotopic Pattern) para el análisis en dos dimensiones, y da óptimos resultados en un rango muy amplio sin requerir tediosos procesos rutinarios de re-calibración. Es decir, aporta una mayor fiabilidad de los resultados aplicando un método analítico casi bidimensional: combinando la determinación de masas exactas con el análisis de la distribución isotópica. Una de sus principales ventajas es que estos proporcionan una resolución elevada, lo que permite obtener valores de masa molecular muy exactos; además permiten obtener espectros de masas con una transmisión iónica eficaz y proporcionan ciclos muy rápidos

Algunas de sus especificaciones más notables son:

El rango de masas que puede analizar en modo estándar es 50-3000 m/z .

Resolución: 10000 (en modo normal (MicroTOF)) y 15000 en modo MicroTOF.

Exactitud: 3 ppm con calibración interna y 5 ppm con calibración externa.

5.2.2. Analizadores cuadrupolo

Los espectrómetros de masa con analizadores cuadrupolares son normalmente más compactos, menos caros y más robustos que los de sector magnético. También ofrecen la ventaja de emplear tiempos de barrido bajos (esto es, < 100 ms), lo que es particularmente útil para realizar barridos de picos cromatográficos a tiempo real. Los analizadores de cuadrupolo han sido durante mucho tiempo los de utilización más frecuente. Hoy en día la información generada por cuadrupolo es habitualmente completada con aquella que se obtenga de IT y TOF.

Un cuadrupolo es parecido a un filtro de banda estrecha variable, ya que en unas determinadas condiciones de operación transmite sólo iones de un pequeño intervalo de relaciones m/z . Todos los otros iones son neutralizados y eliminados como moléculas sin

carga. Variando las señales eléctricas de un cuadrupolo es posible variar el intervalo de valores m/z transmitidos, haciendo así posible el barrido espectral.

Debido a que los cuadrupolos funcionan por eliminación selectiva de iones, se llaman a menudo filtros de masas, en vez de analizadores de masas.

La Figura 14 muestra un diagrama simplificado de un espectrómetro de masas de cuadrupolo. La parte más importante del instrumento es el conjunto de cuatro barras cilíndricas de metal que sirven de electrodos del filtro de masas. Los iones de la fuente son acelerados por un potencial de 5 a 15 V e introducidos en el espacio entre las barras.

Las barras opuestas se conectan eléctricamente, un par al polo positivo de una fuente variable de corriente continua y el otro par a la terminal negativa. Además, se aplican a cada par de barras potenciales variables de corriente alterna de radiofrecuencia, que están desfasados 180 grados. Las barras cilíndricas son normalmente de 6 mm de diámetro y raramente tienen más de 15 cm de longitud. Están sujetas rígidamente sobre soportes cerámicos construidos con precisión que proporcionan una buena estabilidad mecánica aunque cambie la temperatura. Para entender la capacidad de filtración de un cuadrupolo, es necesario considerar el efecto de los potenciales de corriente continua y de corriente alterna sobre la trayectoria de los iones cuando pasan a través del canal entre las barras. Las ecuaciones diferenciales que se necesitan para describir el comportamiento de los iones de distinta masa en un cuadrupolo son complejas y difíciles de tratar analíticamente y están fuera del alcance de este texto. Por ello debe bastar entender que para que un ion atraviese el cuadrupolo hasta el detector, debe tener una trayectoria estable en los dos planos formados por cada par de electrodos opuesto. El ión debe ser suficientemente pesado para no ser eliminado por el filtro de paso de masa elevada en uno de los planos y suficientemente ligero para no ser eliminado por el filtro de masa baja en el otro plano. El cuadrupolo total transmite una banda de iones que tienen un intervalo limitado de valores de m/z . El centro de esta banda puede variarse ajustando los potenciales de corriente alterna y continua.



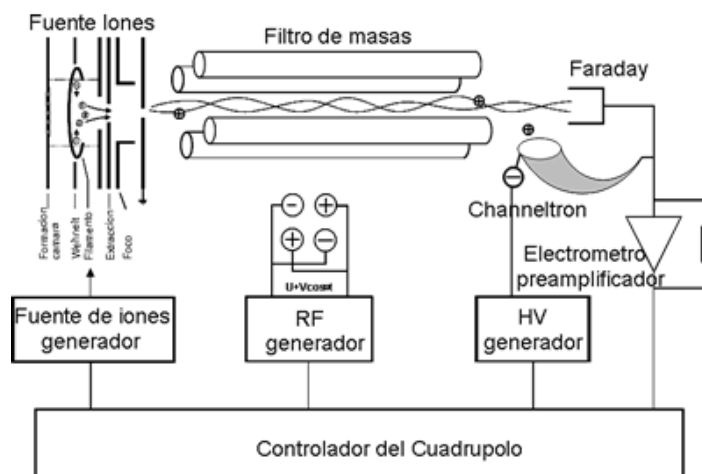


Fig. 14. Espectrómetro de masas de cuadrupolo.

La aplicación a cada par de barras opuestas de un voltaje y una radiofrecuencia posibilita un control de la trayectoria de los iones. Esto permitirá al ión m/z seguir una trayectoria rectilínea y cruzar el túnel alcanzando el detector, mientras que las demás masas, al ser inestables sus trayectorias, no alcanzan el detector, siendo desviadas fuera del conjunto de barras.

5.2.3. Analizadores de trampa de iones

El analizador de trampa de iones (IT) consiste fundamentalmente en un electrodo anular y dos electrodos laterales de geometría hiperbólica, que poseen una perforación que permite la entrada y la salida de los iones. Los iones formados en la fuente entran en el analizador donde se aplican diferentes voltajes generando un campo eléctrico tridimensional en la cavidad de la trampa. Este campo atrapa y concentra los iones dada su trayectoria de oscilación estable. La naturaleza de la trayectoria depende del potencial y de la relación masa/carga (m/z) de los iones. Para llevar a cabo la determinación de todas las especies que entran o se forman en la trampa, los potenciales de los electrodos se alteran sometiéndolos a una rampa lineal de radiofrecuencia (RF) para provocar inestabilidad en las trayectorias de los iones y expulsarlos en la dirección axial en función de su relación m/z . Una vez que estos iones llegan al detector, la señal se procesa y da lugar al espectro de masas.

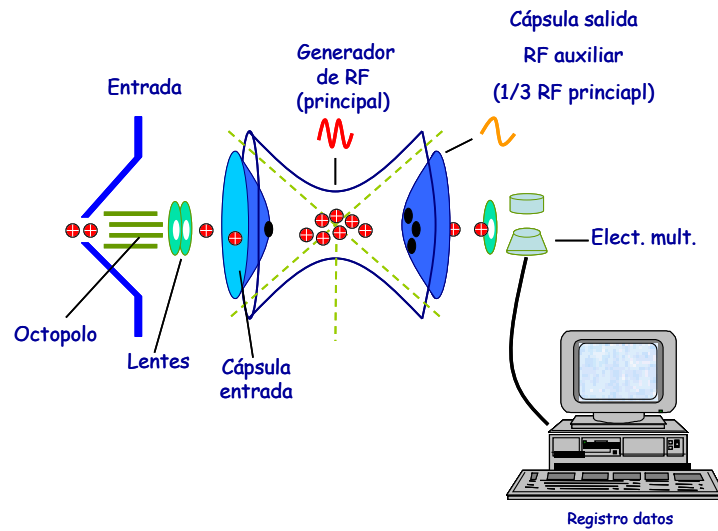


Fig. 15. Esquema de un analizador de trampa de iones (y del optopolo y lentes previas al analizador).

El siguiente esquema nos muestra las partes que posee la IT (con una fuente de ionización ESI) empleada para llevar a cabo parte del desarrollo experimental de la presente memoria.

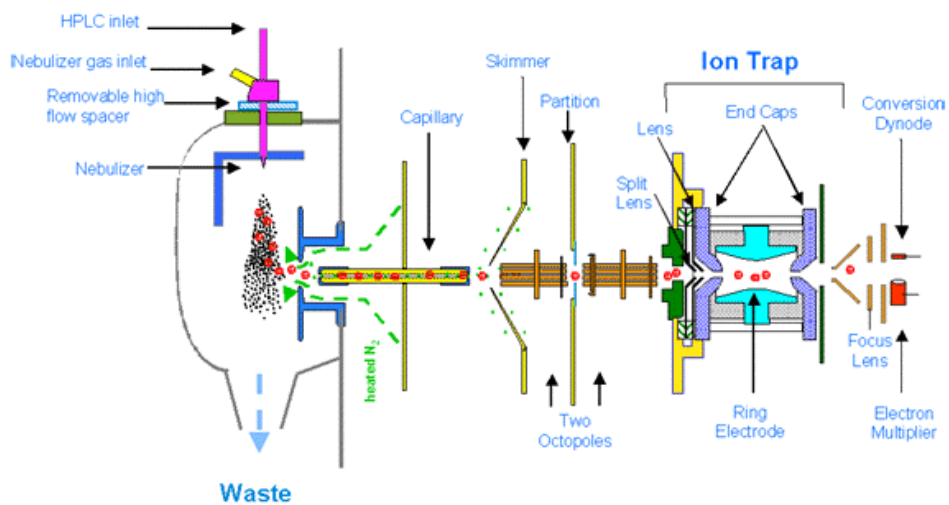


Fig. 16 Esquema de un espectrómetro de masas ESI-IT.

Está formado por cuatro partes: la interfase (ESI en este caso); la zona de “transporte y convergencia” de iones formada por skimmers, optopolos y lentes; el analizador (IT); y el detector.



La primera zona es la cámara de formación del spray (interfase) donde, como ya comentamos en la correspondiente sección, se nebuliza la solución de la muestra y se ioniza a través de un proceso de desolvatación. La zona de “transporte y focalización” de iones posee cuatro zonas que están a alto vacío originado por una serie de bombas que hay en el sistema. Los iones pasan a través de un capilar de vidrio hasta un skimmer que elimina el volumen del gas de secado; a continuación pasan por los octópolos que los transporta y guían desde justo detrás del skimmer hasta el detector atravesando una serie de lentes. Por último los iones entran en el analizador de trampa de iones donde se separan en función de su relación m/z .

Una vez que los iones se encuentran atrapados dentro de este analizador se puede llevar a cabo tanto el análisis de sus masas (obteniéndose el espectro de MS) como el aislamiento de uno o varios iones precursores y su posterior fragmentación (dando lugar a lo que se denomina espectros de MS-MS o espectros MS^2).

Algunas de las especificaciones más destacables de la trampa de iones son:

- ✓ El rango de masas que puede analizar es 50-2200 m/z .
- ✓ Resolución: podemos tener una resolución normal o máxima según la velocidad de escaneo de 1.000 a 15.000
- ✓ Posibilidad de llevar a cabo análisis MS/MS. Permite llevar a cabo fragmentaciones sucesivas de los iones seleccionados dando lugar a espectros MS^n que aportan información sobre la estructura de los analitos.
- ✓ Equipo relativamente barato y presenta menos dificultades técnicas.

5.3. Espectrometría de Masas de Plasma Acoplado (ICP-MS)

La ICP-MS es una técnica de análisis inorgánico que es capaz de determinar y cuantificar la mayoría de los elementos de la tabla periódica en un rango dinámico lineal de 8 órdenes de magnitud (ng/l – mg/l). Su principal característica reside en que posee unos límites de detección para la mayoría de los elementos de unas pocas ppb – ppt , que la hace ideal para el análisis de elementos traza. Esto se debe a que la misma combina dos propiedades analíticas que la convierten en una técnica de gran potencial en el campo del análisis de trazas multielemental. Por una parte, obtiene una matriz libre de interferencias debido a la eficacia de ionización del plasma de Ar y, por otra parte, presenta una alta relación señal-ruido característica en las técnicas de espectrometría de masas. El plasma acoplado por inducción (de argón) es usado como una fuente muy eficaz de iones en su

estado M^+ . El espectro de masas de esta fuente de iones es en la mayor parte de los casos medido por medio de un espectrómetro de masas cuadrupolar. Esto es posible mediante una zona de interfase capaz de introducir los iones del plasma a través de un orificio (Cono) por medio de una unidad de vacío diferencial y posteriormente dentro del filtro cuadrupolar de masa (Skimmer).

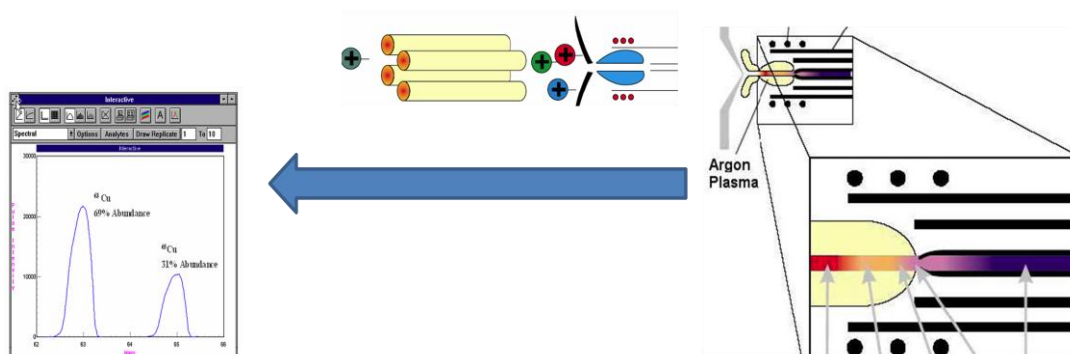


Fig. 17. Esquema de ICP-MS

Fundamento de la técnica

Los componentes de la muestra se ionizarán por efecto de un plasma de argón (plasma: volumen de gas con parte de sus átomos o moléculas ionizados). Estos iones producidos serán separados en base a su relación masa/carga en un espectrómetro de masas y posteriormente cuantificados por un detector multiplicador de electrones. Esta técnica tiene una amplia aplicación en la determinación de elementos de interés medioambiental, pudiendo analizar más de 70 elementos de forma simultánea.

6. Sensores

Aunque los sensores son también herramientas analíticas y podrían haberse incluido en el apartado anterior de esta memoria, no se ha hecho debido a su relevancia y auge en la Química Analítica actual, por lo que se ha decidido tratarlos en un apartado independiente.

El término “**sensor**” define de forma genérica “a cualquier dispositivo robusto, de uso sencillo y preferiblemente portátil, capaz de transformar (transducir) la magnitud de un fenómeno cuya identificación resulta de interés en una señal física medible, proporcionando de forma directa y continua información de su entorno”^{105,106} Estos dispositivos se pueden

¹⁰⁵ Janata J., Bezegh A., 1988. Chemical Sensors, Anal.Chem. 60, R62.

¹⁰⁶ Valcárcel M., Luque de Castro M.D. 1994. Flow-through (bio)chemical sensors. Elsevier.



dividir en dos grupos dependiendo del tipo de cambio que detecten: parámetros físicos (temperatura, presión, etc.) o bien parámetros químicos (concentración de oxígeno, pH, etc.). Los sensores físicos son sensores capaces de cuantificar fenómenos físicos y a los diseñados para medir especies (bio) químicas se les conoce como sensores (bio) químicos.

6.1. Sensores Químicos

Los sensores químicos nacen como una subdisciplina de la Química Analítica que permite el desarrollo de instrumentos de medida sencillos, portátiles y económicos que fueron desarrollados como una buena opción a los sistemas complejos antes descritos que requieren personal entrenado e instalaciones y mantenimiento adecuado.

La aportación de una definición exacta y universal de un sensor químico resulta complicada. Roe y *col*¹⁰⁷. Definen un “sensor químico ideal” como un dispositivo capaz de detectar y/o cuantificar a tiempo real una especie química en un medio complejo (muestra de interés) a través de una interacción química selectiva.

La IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) propone otra definición mediante la cual un sensor químico es un dispositivo que transforma la información química, variando desde la concentración de un componente específico de la muestra hasta el análisis total de su composición, en una señal analítica útil. La información química puede ser originada a través de una reacción química del analito o de una propiedad física del sistema investigado. Además, el sensor puede incluir dispositivos que posean las siguientes funciones: toma de muestra, transporte de muestra y procesamiento de señal y datos¹⁰⁷.

Las características ideales más importantes de un sensor químico son el funcionamiento de forma continua y reversible, directamente sobre la matriz de la muestra y la capacidad de proporcionar información sobre la distribución espacial y temporal de una especie molecular o iónica a tiempo real¹⁰⁸. Otras características ideales que debería cumplir un sensor son las siguientes: portátil, económico, mínimo mantenimiento y fácil manejo.

El principal objetivo que se persigue con un sensor ideal es la integración de dos de los tres pasos generales del proceso analítico.

¹⁰⁷ Hulanicki, A.; Glab, S.; Ingman, F. Chemical sensors definitions and classification. *Pure and Applied Chemistry* 1991, 63, 1247-1250.

¹⁰⁸ Valcárcel, M.; Luque de Castro, M. D. *Flow-through (bio)chemical sensors.*; Elsevier 1994.

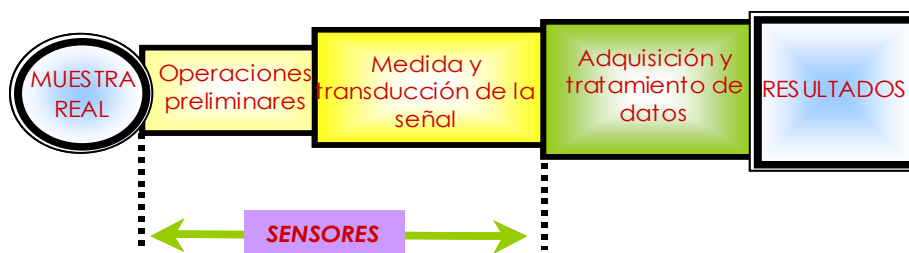


Fig. 18. Importancia de los sensores en el proceso analítico

Las prestaciones de un sensor se obtienen a partir de criterios analíticos generales así como de requerimientos específicos como son la estabilidad a largo plazo, miniaturización, estabilidad mecánica, tiempo de respuesta, estabilidad con el tiempo, temperatura, compatibilidad con la presión, explosividad, radiactividad, condiciones biológicas y esterilización.

No obstante, muy pocos sensores cumplen estrictamente todas las especificaciones anteriores. Por ello, numerosos autores denominan también sensores a ciertos diseños que no son capaces de medir de forma continua la concentración de ciertas especies, es decir, que son irreversibles y solamente permiten una determinación. En este caso, se denominan sensores “desechables o de un sólo uso”¹⁰⁹.

En determinadas ocasiones puede ocurrir que la selectividad del sensor no sea lo suficientemente elevada; en este caso, la incorporación de alguna técnica simple de pre-tratamiento en línea con la detección, para separar el analito de las especies interferentes presentes en la muestra pudiera ser de gran utilidad¹¹⁰.

Finalmente, en un amplio sentido podríamos definir un sensor como cualquier dispositivo de uso sencillo que sea para los instrumentos de medida lo que los sentidos son para los seres vivos¹¹¹, es decir, un sistema que proporcione una determinada respuesta a un estímulo exterior, la cual posteriormente es analizada y procesada.

¹⁰⁹ Janata, J.; Bezegh, A. Chemical sensors. *Analytical Chemistry* 1988, 60, R62-R74.

¹¹⁰ Cammann, K. Continuous pollution-control by chemical sensors. *Sensors and Actuators BChemical* 1992, 6, 19-24.

¹¹¹ Pereiro, R., Universidad de Oviedo, Oviedo, 1991.



6.1.1. Componentes de un sensor químico

Un sensor químico capaz de informar sobre una especie química consta básicamente de tres partes^{112, 113} (véase Figura 19):

- 1. Zona de reconocimiento o fase sensora:** En la cual se produce la interacción selectiva con el analito (o analitos) de interés, lo que origina un cambio del sistema cuya magnitud está relacionada con la concentración de la especie a determinar.

El receptor puede basarse en diferentes principios:

- *principio físico:* No se produce reacción química. Ejemplos típicos son aquellos basados en medidas de absorbancia, luminiscencia, índice de refracción, conductividad, temperatura, cambio de masa, etc.
- *principio químico:* Una reacción química donde participa el analito que genera la señal analítica.
- *principio bioquímico:* Un proceso bioquímico es la fuente que genera la señal analítica. Ejemplos típicos son los sensores potenciométricos microbianos o los inmunosensores. Como hemos comentado anteriormente, estos son considerados como un subgrupo de los sensores químicos y son denominados biosensores.

En determinadas ocasiones no es fácil averiguar inequívocamente si un sensor opera según un principio químico o físico; ya que en algunos casos se da un proceso mixto de reacción química y principio físico medido. Por ejemplo, esto se produce cuando la señal se debe a un proceso de adsorción.

- 2. Transductor:** Donde se transforma la energía que lleva la información química de la muestra en una señal analítica útil (se genera una señal óptica, eléctrica, etc.). El transductor por sí mismo no muestra selectividad.

¹¹² Hulanicki, A.; Glab, S.; Ingman, F. Chemical sensors definitions and classification. *Pure and Applied Chemistry* 1991, 63, 1247-1250.

¹¹³ Janata, J. *Principles of chemical sensors*; CRC Press: Boca Raton, FL, 1991.

- 3. Elemento electrónico:** De tratamiento y medida de señales eléctricas y que muestra los resultados.

Figura I-5. Partes de un

Fig. 19. Partes de un sensor químico.

La magnitud de la señal física obtenida se relaciona posteriormente con la concentración de analito a través de una curva de calibrado realizada previamente.

En resumen, un sensor consiste en una capa sensible o sistema de reconocimiento (receptor), un transductor para convertir la información química en una señal eléctrica y/u óptica y una electrónica para la evaluación de datos y aporte de resultados, normalmente integrada en el sensor.

6.1.2. Diseño de un sensor químico

La determinación de los pasos básicos a seguir en el diseño de un sensor químico es crucial para la resolución de un problema analítico concreto.

Las consideraciones prácticas de mayor importancia a tener en consideración en el diseño de un sensor químico son:

- **Transductor:** Según se midan cambios en alguna propiedad eléctrica, óptica, cambios de masa, etc., como consecuencia del reconocimiento, se puede hablar de transductores electroquímicos, ópticos, piezoeléctricos, etc
- **Inmovilización del reactivo:** Existen diferentes métodos (adsorción pasiva, entrecruzamiento, enlace covalente, iónico, etc.) con sus ventajas e inconvenientes. Debe tenerse en cuenta que dicha inmovilización puede alterar profundamente las características del analito en disolución.



- **Mecanismo de reconocimiento:** La fase sensora debe reconocer la especie a determinar (analito) a través de una interacción fácilmente detectable y cuya magnitud sea función de la concentración del analito.

6.1.3. Clasificación de los sensores químicos

Se pueden establecer diferentes clasificaciones de los sensores atendiendo a diversos criterios. El gran auge que existe en los últimos años en el mundo de los sensores ha incentivado que éstos evolucionen continuamente y por tanto, irán apareciendo seguramente otras clasificaciones a medida que se desarrollen nuevos tipos de sensores.

Los criterios más utilizados y la clasificación de sensores químicos correspondientes a cada criterio son los siguientes^{8*}:

- Atendiendo al modo de reconocimiento, los sensores pueden clasificarse en **sensores químicos o bioquímicos**. Cuando la etapa de reconocimiento se produce mediante un elemento sensible biológico (por ejemplo, un anticuerpo, una célula, una enzima, etc.) el dispositivo resultante se conoce como biosensor. Así pues, la diferencia entre un sensor químico y un biosensor está en la reacción (química o biológica) de reconocimiento del analito.
- De acuerdo con la naturaleza de la interacción medible los sensores se pueden clasificar en **reversibles o irreversibles**.
- Según su forma externa en sensores tipo célula de flujo, tipo sonda o tipo microchip.
- En función de la relación entre la zona de reconocimiento y el transductor, en **sensores conectados o integrados**.
- Teniendo en cuenta el modo de operación en sensores de medidas discretas o de medidas de flujo (optosensores).
- Considerando el número de especies a determinar en **sensores simples o múltiples**, (monoparamétricos y multiparamétricos, respectivamente).

- Atendiendo a la naturaleza de la señal física que se genera y se mide, es decir, atendiendo al tipo de transductor, los sensores químicos se han ido clasificando en **sensores electroquímicos, ópticos, térmicos, piezoeléctricos, etc.**^{108,114}.

Esta última clasificación, basada en la naturaleza de la señal física generada o medida, es bastante general y comúnmente utilizada para clasificar los sensores químicos.

- Los sensores **electroquímicos** miden cambios en alguna propiedad eléctrica del sistema y ese cambio producido en las magnitudes eléctricas está relacionado con la concentración de analito. Así, existen sensores amperométricos, conductimétricos, impedimétricos, potenciométricos e ISFETs (transistores de efecto de campo).
- Los sensores **ópticos** son aquellos en los que se producen cambios en alguna propiedad óptica del sistema: transmitancia, transflectancia, optotérmicos, reflexión interna atenuada (ATR), cambio de índice de refracción, reflectancia (UV, NIR, IR), fluorescencia y fosforescencia (intensidad, tiempo de vida, atenuación), transferencia de energía, espectroscopía Raman, refractometría, turbidimetría, elipsometría, polarimetría o espectroscopía fotoacústica.
- Los sensores **térmicos** miden calores de reacción o cambios en la temperatura del sistema.
- Y los **piezoeléctricos** cuantifican cambios de masa, de viscosidad, etc.

También se han desarrollado, aunque en menor medida, sensores que utilizan otros tipos de detección como los de ondas acústicas de superficie y los magnéticos, en donde se utilizan medidas de paramagnetismo.

Finalmente, no existe un principio universal para desarrollar un sensor químico, ya que cada caso requiere una adaptación específica de un principio de medida.

6.2. Sensores Ópticos

6.2.1. Generalidades de los sensores ópticos

Los sensores ópticos se fundamentan en el empleo de zonas de reconocimiento o fases sensoras químicamente activas y su implementación en dispositivos de medida, de modo

¹¹⁴ Edmonds, T. E. *Chemical Sensors*; Blackie & Son: UK 1988.



que la interacción del analito a analizar con la fase sensora provoca un cambio en sus propiedades ópticas, que es proporcional a la concentración del analito en cuestión.

El aumento de la importancia y el potencial de los sensores ópticos han crecido progresivamente durante las últimas décadas. Los primeros trabajos descritos en la literatura sobre sensores químicos estaban orientados desde el punto de vista electroquímico. Sin embargo, el gran volumen de conocimiento disponible hoy en día sobre los métodos óptico-espectroscópicos y las diversas posibilidades que los mismos ofrecen, han dado lugar a la búsqueda e investigación en el campo de los sensores con detección óptica-espectroscópica^{115,108}.

La espectroscopía de emisión luminiscente ha desarrollado métodos analíticos que se caracterizan por su elevada sensibilidad, selectividad y versatilidad; la industria de las telecomunicaciones ha puesto a la venta fibras ópticas de bajo coste que permiten transmitir luz a largas distancias; se han fabricado nuevas fuentes de radiación como láseres y diodos fotoemisivos (LEDs)¹¹⁶ que permiten la excitación del analito prácticamente en todo el intervalo de longitudes de onda de la región visible del espectro electromagnético; se han desarrollado fotodiodos y CCDs de bajo coste; y finalmente, nuevos métodos quimiométricos junto con microprocesadores de alta capacidad y pequeño tamaño permiten almacenar y procesar datos, incluso en el caso de la existencia de relaciones complejas de señal-concentración.

Por tanto, la conjunción de las excelentes características que ofrecen las fibras ópticas como vías de transmisión de luz a través de largas distancias, el desarrollo instrumental en el campo de la fotónica (láseres, LEDs, CCDs, fotodiodos, etc.), la aparición en el mercado de dispositivos baratos y miniaturizados, los avances en computación (microprocesadores, redes neuronales, etc.), junto con la abundante información química cuantitativa y cualitativa obtenida a través de las diversas técnicas analíticas espectroscópicas han producido, en las últimas décadas, un impresionante avance de los sensores ópticos para el análisis y/o control de parámetros de interés químico^{111,113}, ambiental^{117, 114}, clínico^{118, 119}, etc.

¹¹⁵ Roe, J. N.; Szoka, F. C.; Verkman, A. S. Fiber optic sensor for the detection of potassium using fluorescence energy-transfer. *Analyst* **1990**, *115*, 353-358.

¹¹⁶ Ballantine, D. S.; Callahan, D.; Maclay, G. J.; Stetter, J. R. An optical wave-guide acid vapor sensor. *Talanta* **1992**, *39*, 1657-1667.

¹¹⁷ Costa Fernández, J. M.; Sanz Medel, A. In Fosforescencia molecular analítica: una aproximación práctica; Fernández Gutiérrez, A., Schulman, S. G., Eds.; Editorial Universidad de Granada: Granada, España, 2001.

Los sensores ópticos poseen la ventaja de poder enlazar la zona de reconocimiento con el dispositivo de medida mediante el uso de fibra óptica. Por ello podemos decir que el uso de fibras ópticas permite “aproximar el espectrómetro a la muestra”, mientras que el empleo de fases sensoras inmovilizadas permite realizar medidas *in situ* (en la propia muestra)^{120,121}.

Sin embargo, en los últimos años la aparición de sensores ópticos basados en el empleo de microchips ha hecho innecesario el uso de fibras ópticas¹²². En esta configuración, la fase sensora está inmovilizada directamente sobre el transductor o sobre un soporte inerte que se encuentra unido al mismo y que está integrado en el microchip, donde están insertados tanto la fuente de excitación como el sistema de detección. De este modo, dichos sensores responden de forma similar que los sensores de fibra óptica pero con un diseño más simplificado y un menor tamaño.

Finalmente, los campos de aplicación más empleados por los sensores ópticos son el control de productos industriales^{50, 51*}, biotecnología^{52, 53*}, medicina^{43, 54*}, medioambiente^{41, 55*} y, en general, todos aquellos en los que se requiere un seguimiento de determinados parámetros para garantizar la calidad del proceso o de un producto^{56, 57*}.

6.2.2. Ventajas e inconvenientes de los sensores ópticos

De forma genérica, los sensores ópticos se han aplicado más recientemente y presentan numerosas ventajas frente a otros tipos de sensores, particularmente los electroquímicos, que aconsejan el uso de los sensores ópticos sin que esto quiera significar que se

¹¹⁸ Elaissari, A. h. Colloidal Polymers, Synthesis and Characterization: New York, 2003.

¹¹⁹ Kolle, C.; Gruber, W.; Trettnak, W.; Biebernik, K.; Dolezal, C.; Reiningner, F.; O'Leary, P. Fast optochemical sensor for continuous monitoring of oxygen in breath-gas analysis. *Sensors and Actuators B-Chemical* **1997**, *38*, 141-149.

¹²⁰ Elamari, A.; Gisin, N.; Munoz, J. L.; Poitry, S.; Tsacopoulos, M.; Zbinden, H. Photoncounting optical-fiber sensor for the detection of ammonia in neurochemical applications. *Sensors and Actuators B* **1997**, *38*, 183-188.

¹²¹ Barone, P. W.; Parker, R. S.; Strano, M. S. In vivo fluorescence detection of glucose using a single-walled carbon nanotube optical sensor: Design, fluorophore properties, advantages, and disadvantages. *Analytical Chemistry* **2005**, *77*, 7556-7562.

¹²² Seitz, W. R. Chemical sensors based on fiber optics. *Analytical Chemistry* **1984**, *56*, A16



menosprecien las importantes aplicaciones de los electroquímicos. Las ventajas se detallan a continuación:

- La señal óptica no está expuesta a interferencias eléctricas.
- No se requiere un sistema de referencia.
- No hay un consumo significativo de analito a través de la fase sensora, quedando inalterada la muestra después de la medida.
- La fase activa no requiere estar en contacto con el sistema óptico. Esto facilita enormemente el desarrollo de sensores con fases activas sustituidas o reemplazadas, resultando imprescindible para la preparación de fases basadas en reactivos con vida limitada o de sensores de un sólo uso (desechables).
- En determinadas ocasiones, la utilización de un discriminador adecuado posibilita el acoplamiento de diferentes fases ópticamente activas a un sólo sistema de transducción, proporcionando una considerable reducción del coste y una ventaja claramente económica, ya que facilita realizar análisis rápidos de diversos analitos en un mismo equipo.
- También son aptos para la miniaturización, lo que permite desarrollar sensores de fibra óptica o microchips con tamaños muy pequeños y flexibles.
- Presentan la posibilidad de ofrecer resoluciones a diversas longitudes de onda e información temporal, incluso su aplicación a técnicas de tiempo resuelto^{123, 124}.
- Posibilidad de desarrollo de sensores ópticos para analitos que no pueden ser analizados por métodos electroquímicos.
- En determinados campos como la biomedicina, los sensores ópticos presentan mayor seguridad para la realización de medidas in vivo, ya que evita el riesgo de un shock eléctrico.

¹²³ Nezel, T.; Spichiger-Keller, U. E.; Ludin, C.; Hensel, A. Gas-selective optical sensors for fire detectors. *Chimia* **2001**, *55*, 725-731.

¹²⁴ Schult, K.; Katerkamp, A.; Trau, D.; Grawe, F.; Cammann, K.; Meusel, M. Disposable optical sensor chip for medical diagnostics: New ways in bioanalysis. *Analytical Chemistry* **1999**, *71*, 5430-5435.

- Los intervalos de temperatura extremos a los que pueden llegar a trabajar determinados sensores ópticos, posibilita su esterilización a temperaturas elevadas.
- Ciertos sensores ópticos pueden ser esterilizados mediante rayos gamma, lo que favorece su utilización en biotecnología.
- La transmisión de señales ópticas a grandes distancias se consigue mediante el empleo de sistemas de fibra óptica, lo que permite la realización de análisis en ambientes peligrosos (ambientes radiactivos, atmósferas contaminadas, ambientes con elevadas presiones o temperaturas, etc.) sin la necesidad de recurrir previamente a la toma de muestra.

No obstante, los sensores ópticos también presentan algunos inconvenientes, entre los que se citan a continuación:

- ➡ La luz ambiental puede producir interferencias en las medidas.
- ➡ La fotodescomposición de los reactivos empleados en el sensor puede llegar a reducir su estabilidad temporal.
- ➡ Los tiempos de respuesta pueden ser elevados, sobre todo en los casos en los que se produzcan fenómenos de transferencia de masa.
- ➡ De forma genérica, los sensores ópticos presentan intervalos lineales más pequeños que los electroquímicos.
- ➡ Y en muchas ocasiones, la existencia de reactivos selectivos y que interaccionen reversiblemente con el analito es muy limitada. Además, se produce generalmente una pérdida de sensibilidad después de su inmovilización.

Estos inconvenientes explican, en cierta medida, la escasez del éxito comercial de los sensores ópticos hasta el momento y animan a un esfuerzo investigador continuado de equipos de personas multidisciplinares¹²⁵.

¹²⁵ Wolfbeis, O. S. Fluorescence optical sensors in analytical-chemistry. *Trac-Trends in Analytical Chemistry* **1985**, *4*, 184-188.



6.2.3. Clasificación de los sensores ópticos

La complejidad de los sensores ópticos varía considerablemente en función de las características requeridas, debido a la existencia de una amplia variedad de sensores ópticos en el mercado. Esta pluralidad dificulta una única clasificación de los mismos. A continuación se exponen las más utilizadas, atendiendo a diversos criterios¹¹⁷:

Según la naturaleza de la interacción con el analito, se puede hablar de sensores ópticos reversibles, cuando la interacción química del analito con la zona de reconocimiento es reversible; o sensores ópticos irreversibles, cuando la interacción que se produce entre el analito y la zona de reconocimiento es irreversible. Los sensores ópticos irreversibles se distribuyen, a su vez, en regenerables o reutilizables, siempre que puedan volver a ser utilizados después de un determinado tratamiento; y en no regenerables o desechables, cuando no se puedan recuperar después de la realización de la medida y por lo tanto, son de un sólo uso.

Según su morfología, los sensores ópticos pueden dividirse en tres amplias clases:

- **Sensores tipo célula de flujo (optosensores)**. En este caso, el sólido ópticamente activo está empaquetado en una celda de flujo, que puede estar localizada en el compartimento de muestra del equipo o en el exterior del mismo. (para esta configuración de sensor será necesario el uso de fibras ópticas que conduzcan la luz hasta la zona de medida).

En función de la localización de la zona de reconocimiento, los sensores de flujo se pueden agrupar en dos tipos básicos¹¹⁷ (véase Figura 20).

- ✓ **Optosensor convencional**. La zona de reconocimiento está incorporada dentro de una célula de flujo especial, que se encuentra situada en el compartimento de muestra del instrumento.
- ✓ **Optosensor no convencional**. La zona de reconocimiento se encuentra incorporada dentro de una célula de flujo, que está localizada fuera del instrumento. En este caso, es imprescindible el uso de fibra óptica para poder transportar la luz excitatriz desde el instrumento a la fase sensora y recolectar la emisión luminiscente; o el uso de un microchip que pueda alojar tanto la fuente de excitación como el sistema de detección.

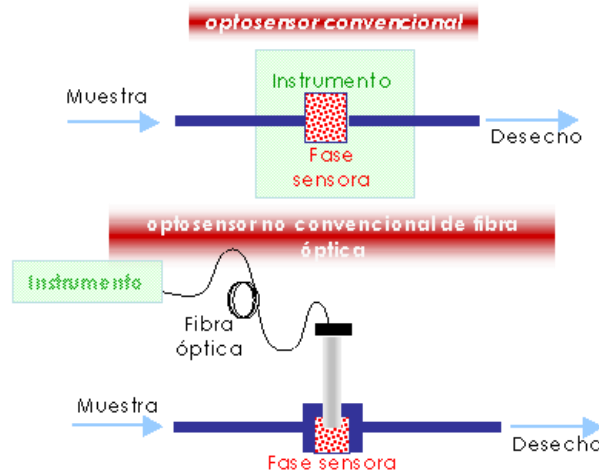


Fig. 20. Tipos básicos de sensores de flujo.

- Sensores tipo sonda (**optodos**). Este tipo de sensores está formado por una fase ópticamente activa situada en una guía de ondas, cuya morfología puede adquirir diversos formatos: cilíndrico (fibra óptica), plano, etc.
- Sensores tipo **microchip**. En ellos, la fase sensora se encuentra inmovilizada directamente sobre el transductor o sobre un soporte inerte instalado en un microchip, que posee todos los componentes necesarios para realizar la medida.

Ambos tipos de sensores (optodos y sensores tipo microchip) permiten su empleo tanto en discontinuo como en flujo; sin embargo, los optosensores solamente pueden ser utilizados en sistemas de flujo.

Según la naturaleza del fenómeno óptico medido, se pueden clasificar en sensores de absorbanza, luminiscentes (fluorescentes, fosforescentes, quimioluminiscentes, bioluminiscentes), etc.

Para los sensores de absorbanza, la relación que existe entre la intensidad de la luz incidente y la luz reflejada es directamente proporcional a la concentración del analito a determinar. Las principales características de estos sensores son sencillez, robustez y escasa selectividad.

Respecto a los diferentes mecanismos de transducción, los procesos fotoluminiscentes resultan especialmente atractivos para el desarrollo de sensores ópticos, debido a que la radiación detectada puede distinguirse de la radiación incidente sobre la fase activa por su longitud de onda. Asimismo, proporcionan sensores altamente sensibles que posibilitan la determinación de niveles de concentración de analito muy bajos. Por ello, las técnicas



fotoluminiscentes son especialmente idóneas para ser empleadas como técnicas de detección en el desarrollo de sensores ópticos.

Las dos técnicas analíticas procedentes del fenómeno fotoluminiscente son: fluorimetría y fosforimetría. Entre ellas, la fluorimetría se ha convertido en la técnica habitualmente utilizada en el desarrollo de sensores ópticos luminiscentes. Sin embargo, el número de sensores fosforescentes a temperatura ambiente es mucho menor que el número de sensores fluorescentes existentes. Esto se debe al limitado número de moléculas disponibles, que sean capaces de desarrollar fosforescencia. No obstante, en la actualidad la fosforescencia está adquiriendo un mayor interés como método de detección frente a la fluorescencia.

6.2.4. Sensores tipo célula de flujo: Optosensores

Un sistema analítico convencional de flujo continuo consta de tres etapas: la transferencia de analito entre dos fases, las reacciones (bio)químicas y la detección continua en una celda de flujo convencional¹⁰⁸.

El dispositivo que lleve a cabo de forma simultánea la detección junto con la reacción y además, la separación en la celda de flujo puede denominarse como optosensor, ya que reúne las características principales de un sensor (respuesta directa, reversible, continua y rápida a las variaciones en la concentración del analito de interés). El término optosensor fue introducido por Ruzicka y Hansen¹²⁶ para definir un nuevo principio de detección mediante análisis por inyección en flujo, basado en el cambio de las propiedades ópticas de una superficie activa localizada en el paso de un flujo.

La realización simultánea de la retención del analito y del proceso de detección óptica en un sistema de análisis por inyección en flujo (FIA) abre un nuevo horizonte de posibilidades para superar ciertos inconvenientes asociados a los sensores ópticos^{127,128}.

¹²⁶ Ruzicka, J.; Hansen, E. H. Optosensing at active surfaces - a new detection principle in flow-injection analysis. *Analytica Chimica Acta* 1985, 173, 3-21.

¹²⁷ Ruzicka, J.; Christian, G. D. Reversible optosensing in packed flow-through detectors -flow-injection or chromatography. *Analytica Chimica Acta* 1990, 234, 31-40.

¹²⁸ Ruzicka, J.; Marshall, G. D. Sequential injection - a new concept for chemical sensors, process analysis and laboratory assays. *Analytica Chimica Acta* 1990, 237, 329-343.

6.2.5. Sensores tipo sonda: Óptodos

El continuo avance de la fotónica así como el bajo coste de los componentes ópticos, han fomentado un enorme interés por la investigación y el diseño de sensores que empleen fibra óptica.

Los sensores que emplean fibra óptica se han denominado *optodos*^{85*}, cuya terminología proviene del griego “οπιχος”: óptico y “οδος”: camino; u *optrodos*, cuyo término proviene de “optical electrode”. El término optodo es más correcto desde el punto de vista lingüístico, por lo que será utilizado a lo largo de esta memoria. Evidentemente, el principio de operación de los optodos es muy diferente respecto al de los electrodos, ya que la señal generada es óptica y no eléctrica como en el caso de los electrodos.

Un optodo es un dispositivo constituido básicamente por una fase sensora o membrana ópticamente activa soportada sobre una guía de onda. La guía de onda más comúnmente utilizada para dispositivos sensores posee una morfología cilíndrica (fibra óptica). Por ello, el término optodo hace referencia en la mayoría de los casos a los sensores de fibra óptica^{37, 86-88*, 129, 130, 131, 132}.

Sin embargo, existen optodos que utilizan guías de onda planas, dando lugar a los denominados sensores planos o sensores tipo chip^{133, 134, 135, 136}.

¹²⁹ Wolfbeis, O. S. Fiber-optic chemical sensors and biosensors. *Analytical Chemistry* 2002, 74,2663-2677.

¹³⁰ Valcarcel, M.; Rios, A. Selectivity in analytical-chemistry. *Analisis* 1990, 18, 469-475.

¹³¹ Wolfbeis, O. S. Fiber-optic chemical sensors and biosensors. *Analytical Chemistry* 2004, 76,3269-3283.

¹³² Matías, I. R.; Arregui, F. J.; Claus, R. O. In *Enciclopedia of Sensors*; Grimes, C. A., Dickey, E.C., M.V., P., Eds.; American Scientific Publishers: Stevenson Ranch, CA, USA., 2006;Vol. 9, pp 1-19.

¹³³ Spichiger, U. E.; Citterio, D.; Bott, M. Analyte-selective optode membranes and optocalevaluation techniques - Characterization of response behaviour by ATR-measurements. *Chemical, Biochemical, and Environmental Fiber Sensors Vii* **1995**, 2508, 179-189.

¹³⁴ Toth, K.; Nagy, G.; Bui, T. T. L.; Jeney, J.; Choquette, S. J. Planar waveguide ion-selective sensors. *Analytica Chimica Acta* 1997, 353, 1-10.

¹³⁵ Lavers, C. R.; Itoh, K.; Wu, S. C.; Murabayashi, M.; Mauchline, I.; Stewart, G.; Stout, T. Planar optical waveguides for sensing applications. *Sensors and Actuators B-Chemical* **2000**, 69, 85-95.



Las principales ventajas que presentan los optodos frente a otro tipo de sensores son las siguientes^{137, 138, 139}:

- A diferencia de los sensores potenciométricos, donde se miden diferencias absolutas entre dos potenciales, los optodos no necesitan una señal de referencia.
- Son dispositivos pasivos constituidos por materiales dieléctricos, químicamente inertes en su mayoría, lo que les proporciona pasividad eléctrica y química. Se pueden utilizar por tanto en ambientes peligrosos, corrosivos, radiactivos, con riesgo de explosión, etc.
- Al ser la fibra óptica un medio dieléctrico, los optodos no se ven influenciados por interferencias electromagnéticas, pudiendo emplearse en medios altamente contaminados desde el punto de vista electromagnético, en contraposición a los sensores eléctricos convencionales, que son muy sensibles a las mismas. En aplicaciones clínicas no representan un peligro para el paciente, ya que no es necesaria una conexión eléctrica directa con el cuerpo, por lo que son fundamentalmente adecuados en radioterapia debido a su inmunidad a los campos electromagnéticos.
- La biocompatibilidad de la fibra óptica y la sencillez en la realización de interfases entre el sensor y la zona de medida posibilita su uso para la detección, medida e incluso, actuación de/sobre variables biomédicas.
- Los pequeños diámetros de las fibras ópticas (con valores típicos comprendidos entre 50 y 200 μm) y la disponibilidad de componentes de pequeño tamaño y bajo coste permiten la miniaturización de estos dispositivos.
- Las fibras ópticas de bajas pérdidas permiten la transmisión de señales a largas distancias, típicamente desde 10 a 1000 metros e incluso kilómetros si se emplean amplificadores. Ello posibilita la realización de análisis in situ en ambientes peligrosos

¹³⁶ Zeller, P. N.; Voirin, G.; Kunz, R. E. Single-pad scheme for integrated optical fluorescence sensing. *Biosensors & Bioelectronics* 2000, 15, 591-595.

¹³⁷ Hotate, K. Fiber sensor technology today. *Japanese Journal of Applied Physics Part 1-Regular Papers Brief Communications & Review Papers* 2006, 45, 6616-6625.

¹³⁸ Lee, B. Review of the present status of optical fiber sensors. *Optical Fiber Technology* 2003, 9, 57-79.

¹³⁹ Matías, I. R., Universidad Politécnica de Madrid, 1996.

como zonas radiactivas, lugares con temperaturas extremas y salas limpias, entre otros. Asimismo, su utilización favorece una mayor flexibilidad espacial a la hora de usar otros instrumentos.

- La realización de análisis en tiempo real, ya que no se requiere la primera etapa del proceso analítico (muestreo).
- La capacidad de multiplexación, que permite compartir la misma fuente y el mismo detector por diversos sensores, disminuyendo de este modo el coste y posibilitando el desarrollo de grandes redes de sensores.
- La posibilidad de realización de análisis no destructivos (puesto que en la mayor parte de los casos no se produce consumo del analito), resultando crítica si se poseen pequeñas cantidades de muestra.
- La posibilidad de desarrollar optodos que respondan a determinados analitos, para los cuales no existen electrodos disponibles.
- Las fibras ópticas son capaces de transmitir mayor densidad de información que los cables eléctricos porque poseen un ancho de banda más grande. Esto se debe a que las señales ópticas pueden diferir en cuanto a longitud de onda, fase, modulación de intensidad o polarización. Como resultado, una única fibra óptica puede, en principio, transmitir simultáneamente varias señales, permitiendo de este modo el análisis de varios analitos al mismo tiempo.
- La dependencia de las fibras ópticas con respecto a la temperatura es mucho menor que la de los electrodos. En algunos casos esta dependencia es casi inapreciable; si se utilizan fibras ópticas de elevado punto de fusión, ya que con ellas se puede aumentar el intervalo de temperaturas de trabajo, sin modificar prácticamente las prestaciones del sensor.

No obstante, los optodos también presentan una serie de limitaciones o inconvenientes como son:

- La estabilidad limitada de los reactivos inmovilizados a largo plazo. Este problema se puede compensar, en cierto modo, llevando a cabo la detección a diferentes longitudes de onda, empleando sensores basados en tiempos de vida, o simplemente sustituyendo la fase reactiva.



- ➡ Los elevados tiempos de respuesta que se obtienen en algunos casos, debido a la localización del indicador y del analito en diferentes fases, por lo que se requiere una etapa de transferencia de masa antes de alcanzar el equilibrio y, por lo tanto, hasta que se obtiene una respuesta constante. Este problema se disminuye considerablemente mediante el uso de pequeñas fases reactivas. Por otro lado, la transferencia de masa puede resultar en ciertos casos, en un incremento de la sensibilidad y la selectividad.
- ➡ La necesidad de indicadores más selectivos y procesos de inmovilización más reproducibles que permitan aumentar la selectividad y estabilidad a largo plazo de los optodos.
- ➡ Las fibras ópticas disponibles en la actualidad contienen impurezas de naturaleza espectral que pueden provocar absorción, fluorescencia o dispersión Raman de fondo. El material que constituye la fibra óptica determina el intervalo útil de longitudes de onda. Por ejemplo, las fibras ópticas de plástico se emplean en la región comprendida entre 420 y 800 nm, mientras que las fibras ópticas de cuarzo transmiten la radiación UV y las de vidrio se usan en la región visible del espectro electromagnético.
- ➡ La creciente necesidad de accesorios ópticos comerciales es otro inconveniente. Se precisan fuentes luminosas estables y de largo tiempo de vida útil, mejores conectores y fibras ópticas, y láseres baratos. Aunque en la actualidad ya existan LEDs (light emitting diodes), OLEDs (organic light emitting diodes) y LDs (laser diodes) para la región visible a precios asequibles, los costes de los mismos aumentan considerablemente si nos desplazamos hacia el UV. Sin embargo, se están logrando avances en el desarrollo de LEDs en este campo¹⁴⁰.
- ➡ Las fibras ópticas han sido perfeccionadas para ser utilizadas en telecomunicaciones, es decir, se han desarrollado para transmitir a determinadas longitudes de onda (1300 y 1550 nm), donde el nivel de transparencia es máximo: la atenuación es de 0.35 dB/km a 1330 nm y de 0.2 dB/km a 1550 nm. En los sistemas de telecomunicaciones es crucial reducir al máximo la atenuación (por absorción y/o dispersión) para aumentar la distancia entre los repetidores.

¹⁴⁰ McGuinness, C. D.; Sagoo, K.; McLoskey, D.; Birch, D. J. S. A new sub-nanosecond LED at 280 nm: application to protein fluorescence. *Measurement Science & Technology* **2004**, *15*, L19-L22.

Por ello, la transmisión de las fibras ópticas en la región visible o incluso ultravioleta todavía no está muy perfeccionada, aunque ya se presentan algunas fibras solarizadas para tales fines.

Existen numerosos tipos de sensores de fibra óptica, y se pueden clasificar atendiendo a la tecnología (extrínsecos o intrínsecos), según la configuración (en reflexión, en transmisión o híbridos), según el punto donde se lleve a cabo la medida (puntuales, distribuidos) o según el tipo de modulación que empleen.

6.2.6. Sensores de luminiscencia molecular

Los sensores de luminiscencia se basan en la información obtenida a partir de los espectros de emisión de moléculas que han sido previamente excitadas. A la hora de desarrollar sensores ópticos, se ha recurrido con mayor frecuencia a la fluorescencia que a la fosforescencia, dado el mayor número de reacciones indicadoras fluorescentes conocidas, que pueden ser utilizadas para la determinación continua y reversible de moléculas de interés. Por otra parte, si se compara con la fotometría convencional, las técnicas luminiscentes son más sensibles y selectivas, ofrecen mayor versatilidad y las medidas pueden ser realizadas utilizando una única fibra óptica, ya que la excitación y la emisión se producen a diferentes longitudes de onda. Por todo ello, el número de sensores ópticos basados en medidas de luminiscencia se ha incrementado considerablemente en los últimos años^{83, 108, 109*}.

A la hora de desarrollar un sensor luminiscente se pueden distinguir habitualmente tres tipologías:

El analito es un luminóforo.

El reactivo indicador presenta propiedades luminiscentes que varían como resultado de la interacción de éste (en el estado fundamental) con el analito.

La emisión luminiscente del reactivo disminuye debido a la interacción de éste (en el estado excitado) con el analito (desactivación dinámica de la emisión, aumento de la misma o un efecto de transferencia de energía entre dos indicadores que pueden ser ambos luminiscentes o bien uno sólo).

Los sensores de fibra óptica utilizan a menudo los métodos luminiscentes, debido a la gran sensibilidad y selectividad que éstos presentan con respecto a los fotométricos. Sin embargo, no siempre se pueden aplicar estas técnicas, ya que existe un número muy limitado de especies químicas capaces de emitir luminiscencia. Por este motivo, se recurre a



los sensores semiactivos, en los que el luminóforo no es el analito objetivo, sino un indicador situado en el extremo de la fibra óptica, cuya luminiscencia es sensible a la concentración de analito presente en la muestra. Los sensores de fibra óptica basados en medidas de luminiscencia pueden detectar variaciones en la intensidad de emisión^{110, 111*}, en el tiempo de vida de emisión del estado excitado^{112, 113*}, o bien en la polarización de la radiación.

Las ventajas de la utilización de medidas de intensidad de emisión luminiscente en sensores de fibra óptica son:

- ✓ Sensibilidad elevada.
- ✓ Selectividad.
- ✓ Versatilidad.
- ✓ Flexibilidad espacial.

Sin embargo, pueden aparecer interferencias en las medidas provocadas por:

- ➡ La presencia de desactivadores distintos al analito.
- ➡ El efecto de filtro interno: Se produce cuando la concentración de luminóforo presente en la muestra es elevada ($2.3 \cdot C \cdot \epsilon \cdot l > 0.05$), y tiene como resultado una disminución de la luminiscencia, debida a fenómenos de autoatenuación (desactivación por choques entre las moléculas) y autoabsorción (por solapamiento de los espectros de absorción y emisión).
- ➡ La fotodegradación del indicador empleado, tras ser expuesto durante un tiempo prolongado a la intensa radiación de la fuente de excitación.
- ➡ La presencia de un gran número de moléculas absorbentes en la muestra, que hace que sólo las más cercanas a la fuente sean excitadas, impidiendo que el haz de radiación llegue al resto.
- ➡ La medida de la intensidad absoluta de emisión también se puede ver afectada por las fluctuaciones de intensidad de la fuente y la respuesta del detector, así como por las características de transmisión de la fibra óptica.

6.2.7. Mecanismos de reconocimiento óptico

El mecanismo de reconocimiento óptico va a depender del tipo de fase sensora óptica que se diseñe. Así, los principales mecanismos de reconocimiento de los sensores ópticos son los siguientes:

Mecanismo de interacción directa analito-soporte: La fase sensora, que no incluye ningún aditivo ópticamente activo, interacciona con el analito que se retiene por interacciones físicas y/o químicas, preconcentrándose y produciendo una variación en las propiedades ópticas de la fase sensora, que es proporcional a la concentración de analito.

Mecanismo catalítico/enzimático: La fase sensora contiene, al menos, un catalizador o un enzima inmovilizado que en presencia del analito de interés cataliza una reacción donde se genera una nueva sustancia que produce un cambio en las propiedades ópticas de la misma. Este cambio puede ser un aumento o una disminución de la propiedad óptica medida, por ejemplo, la aparición de luminiscencia, siendo ésta proporcional a la concentración de analito.

Mecanismo de interacción directa analito-cromoionóforo: La fase sensora posee un cromoionóforo, que tras interactuar con el analito de interés (interacción física o química), cambia alguna de sus propiedades ópticas. Esta variación puede ser un aumento o una disminución de dicha propiedad, por ejemplo, la aparición de luminiscencia, que es proporcional a la concentración de analito.

Mecanismo de coextracción o cambio iónico: La fase sensora contiene un ionóforo (que interactúa con el analito), un cromoionóforo (cuyas propiedades ópticas serán sensibles al cambio de una propiedad química de la membrana, por ejemplo, el pH) y, en caso de cambio de carga en la membrana debido a la entrada o salida de especies cargadas, un aditivo aniónico lipofílico encargado de mantener la electroneutralidad dentro de la membrana. La interacción del analito de interés con el ionóforo provoca un cambio en una propiedad química de la membrana, por ejemplo, la entrada de iones H^+ (coextracción) que modifica el pH de la membrana o la cesión de H^+ del ionóforo al cromoionóforo (cambio iónico), que al igual que en el caso anterior, produce un cambio de pH de la membrana. Esta variación de una propiedad química de la membrana, siguiendo con el ejemplo de cambio de pH, induce un cambio en las propiedades ópticas del cromoionóforo, que se relaciona con la concentración del analito de interés. Por tanto, es un mecanismo de reconocimiento indirecto.

En esta Memoria se ha desarrollado una nueva fase sensora luminiscente para la determinación de CO_2 . Esta fase sensora se ha implementado en dos dispositivos de medida,



desarrollándose un optosensor convencional y un optosensor de fibra óptica para el control de CO₂ en muestras gaseosas y acuosas.

Capítulo I

Determinación de Contaminantes Orgánicos e Inorgánicos en la Antártida



OBJETO DEL CAPÍTULO

El objeto del presente capítulo es la determinación de contaminantes orgánicos persistentes y metales en aguas dulces de la Antártida.

Para ello, en este capítulo se describe la preparación de la campaña antártica para la recolección de muestras, así como los pasos de recogida, pretatamiento, tratamiento y análisis de las citadas muestras. Terminando con un análisis de los resultados obtenidos.



I.1. Generalidades de la Antártida

El continente antártico, llamado también Antártica o Antártida, es uno de los lugares más remotos y aislados del mundo; su nombre proviene del latín “*Antarcticus*” y éste del *gr. Antarktikos*, que significa “opuesto al ártico”; tiene una forma casi circular con un radio de 2.000 kilómetros (km) y una extensión de 14.000.000 kilómetros cuadrados (km²) en verano y casi 30.000.000 km² en invierno, debido al congelamiento del mar adyacente además, presenta dos pronunciadas entrantes que forman una angosta península en forma de "S".

Según el COMNAP (Consejo de Administradores de Programas Nacionales Antárticos) en la Antártida, funcionan un total de 82 bases antárticas de las cuales 38 son bases permanentes (ver anexo 1), siendo sus integrantes los únicos habitantes de esta región (científicos y militares); población que sólo se ve incrementada en el verano, por el turismo y el funcionamiento de las bases temporales.

El clima en la Antártida es extremo debido a la radiación indirecta del sol, a las escasas precipitaciones pluviométricas, los vientos fuertes e intensos y a las bajas temperaturas que rondan los -50°C como promedio anual y -20°C en la zona costera¹⁴¹, zona que sólo en el verano alcanza temperaturas superiores a 0 °C.

Geográficamente se encuentra en el hemisferio sur (paralelo 66°32'30") casi completamente al sur del círculo Antártico, tiene una altitud media de 2.600 metros sobre el nivel del mar (msnm), aunque refiere altitudes de 5000 msnm en algunos puntos, limita con los océanos Atlántico, Índico y Pacífico, y las islas Shetland y Orcadas del Sur. Se encuentra dividida geográficamente por las montañas Transantárticas en Antártida oriental y Antártida occidental. La Antártida oriental también llamada Antártida este, se caracteriza por su aspecto monótono hecho por el cual se la ha denominado “meseta antártica”; de la que sólo sobresalen, cadenas montañosas y montes aislados, también se observa en ella una línea de costa regular con frentes de hielo de 50 metros (m) de alto, con pocos sitios de playa; la función principal de esta zona es mantener la temperatura de la Antártida.

La Antártida Occidental o Antártida Oeste, en cambio está compuesta por un archipiélago de 1.200 km, que se desplaza al norte hacia Tierra de Fuego, llamada Península Antártida, en ella se pueden apreciar también cadenas montañosas y fiordos, además de una

¹⁴¹ Doran P. et al. 2002. Antarctic climate cooling and terrestrial ecosystem response, *Nature*, 415, 517-520.



línea de costa irregular con mayor presencia de playas y puertos libres de hielo; esta zona se mantiene debido a que su basamento de hielo se encuentra bajo del mar¹⁴².

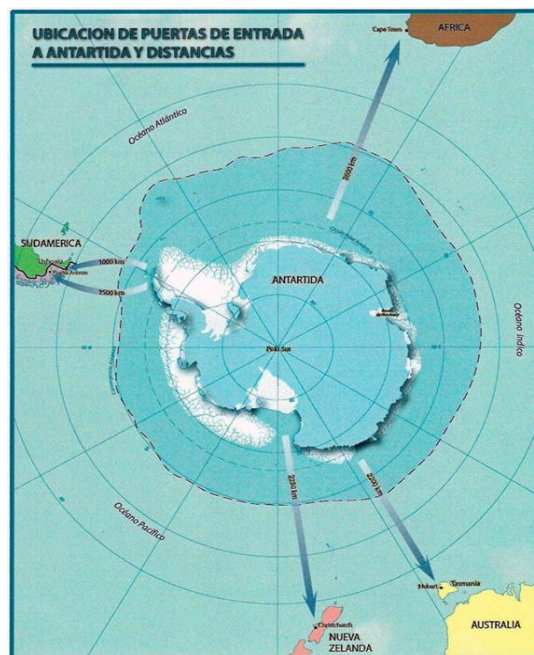


Fig. 21. Antártida y puntos de ingreso a la misma. Fuente: Izaguirre, Mataloni, 2000

Debido a su origen volcánico, la Antártida alberga setenta volcanes. Destacan de ellos dos volcanes, uno de la isla Decepción (islas Shetland del Sur) y otro del monte Erebus en la isla Ross situado a 3800 msnm, los otros volcanes se encuentran en la zona del mar de Ross, en los montes Transantárticos, en la tierra de María Byrd y en las islas de la parte norte de la península antártica.

La Antártida es la zona más importante del planeta debido a que cuenta con la mayor acumulación del hielo, que constituye el 90 % de hielo total de la Tierra y 70% de su reserva de agua dulce (*agua que contiene mínimas cantidades de sales disueltas < 0.5 %*). Además de que posee una gran importancia ambiental pues de ella depende el ciclo hidrológico global.

Algo curioso es que es el continente más seco del planeta, esto debido a la conjunción de tres factores propios como son: su posición polar, diseño de vientos y altura a la que se encuentra. El acceso a este continente está condicionado por la proximidad geográfica, de manera que Ushuaia-Argentina es la ciudad más cercana (1000 kilómetros km), seguida de

¹⁴² Sánchez Rodolfo A. 2007. Introducción a un continente remoto. Buenos Aires: Editorial Albatros. pg. 26.

Punta Arenas-Chile (1200 km) esta característica les ha dado el nombre de “*estados de entrada*”.¹⁴³

Les siguen las ciudades de Christchurch-Nueva Zelanda (2200 km), Hobart–Australia con (2250 km) y la Ciudad del Cabo–Sudáfrica (3600 km)¹⁴⁴. Todas estas ciudades son utilizadas por los grupos visitantes y equipos científicos,¹⁴⁵ mediante transporte aéreo o marítimo.

I.2. Antecedentes de contaminación en la Antártida

Como se ha mencionado antes la Antártida es la mayor reserva de agua dulce que tiene el planeta, y pese a ser un lugar remoto ha evidenciado presencia de contaminantes en diversas matrices: suelo, aire, biota y agua¹⁴⁶. Ha de mencionarse que muy pocos estudios se han realizado en aguas dulces, siendo la mayoría de ellos se han realizado en nieve, hielo y agua de mar cuyos estudios y resultados se mencionarán pues existe correlación entre éstas pues corresponden al mismo grupo (hidrosfera). Estos estudios además refieren datos de haber encontrado bajos niveles de COPs, además de HAPs y niveles traza de metales pesados MPs al igual que otras regiones de la Tierra, que pese a su remotidad no ha escapado del impacto local y mundial de las actividades antropogénicas (PNUMA, 2002).¹⁴⁷

Todo ello preocupa pues como se había mencionado antes, esta zona se había considerado desde siempre como un área prístina, remota libre de cualquier tipo de contaminación, que durante los últimos 50 años, debido al desarrollo de la investigación y el turismo se ha visto afectada a nivel local (ecosistemas costeros terrestres y marinos) a través de la combustión de combustibles necesarios para el transporte y la producción de energía, los derrames accidentales, la incineración de residuos y el vertido de aguas residuales.

¹⁴³ Guyer, R. E. 2006. Circunstancias que llevaron a la negociación y adopción del Tratado Antártico en 1959.

¹⁴⁴ Izaguirre I, Mataloni G. 2000. Antártida descubriendo el continente blanco. Editorial del Nuevo Extremo S.A. Buenos Aires Argentina 1ª Ed. Pg 15.

¹⁴⁵ Vereda M. Tierra de fuego y Antártida. Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco Ushuaia Argentina. [ref. de 2010-08-17]. Disponible en Internet: <http://www.scielo.org.ar/pdf/eypt/v17n3/v17n3a01.pdf>

¹⁴⁶ Bargagli R. 2005. Antarctic Ecosystems: Environmental Contamination, Climate Change, and Human Impact. Berlin: Springer-Verlag; 394 pp.

¹⁴⁷ UNEP. Regionally based assessment of persistent toxic substances – Antarctica regional report. Geneva: United Nations Environmental Programme; 2002. Chemicals



I.2.1. Contaminación y transporte a larga distancia

Muchas son la hipótesis que se manejan con el fin de explicar y determinar la presencia de contaminantes en la Antártida pero hasta la fecha se siguen realizando investigaciones que permitan determinar las posibles rutas que expliquen su presencia. Si se hace una relación de la misma podríamos indicar que esta preocupación comenzó en la década de los setenta, cuando *Rappe, 1974*,¹⁴⁸ indico que los COPs podían migrar a través de la atmósfera en forma de vapor adheridos a partículas de aerosoles y condensar a temperaturas frías. **Becerra, J., et al , 1992** reportó este fenómeno como **codestilación o volatilización** *indicó que los OCs menos volátiles, se evaporan más despacio, por lo que se mantienen en el aire por un tiempo y eventualmente caen a la superficie, algunos cerca de su lugar de origen, mientras otros circulan globalmente, llevados por las corrientes de aire durante miles de millas para depositarse en ríos, lagos, mares, suelo y vegetación*¹⁴⁹. Respecto a esto *Ackerman y col., 2006* que llama a este fenómeno **destilación**, indica que los contaminantes transportados persisten y quedan condensados por reducción de movilidad a bajas temperaturas en ecosistemas remotos¹⁵⁰.

Wania y Mackay , 1993 tras un estudio de 20 años y revisión de lo planteado por *Rappe* sugieren la teoría del **fraccionamiento global** (grasshopping) para explicar la presencia de estos contaminantes en ésta área; la cual plantea que a bajas latitudes las temperaturas cálidas favorecen la evaporación de estos compuestos desde la superficie de la tierra, mientras que en las altas latitudes, donde las temperaturas son bajas, se favorece el depósito de estas desde la atmósfera, fenómeno ha sido también llamado **condensación fría**.¹⁵¹

¹⁴⁸ Rappe, C. 1974. Chemical behaviour of pesticides, in: Bylund, Linderholm, H. And Rune O. Eds. Ecological problems on the circumpolar area. Papers for the International Symposium of Lulea, Sweden, June 28-30, 1971, Norbottens Museum. Lulea, Sweden: 29-32.

¹⁴⁹ Becerra, J., Gonzales, F., Chuecas, L., Pantoja, S., y Silva M. 1992. Pesticidas Organoclorados e Hidrocarburos derivados del petroleo en el paso Drake, estrecho Bransfield e Islas Shetland del Sur. Centro Eula. Universidad de Concepción. VA, Ferretti O, Moyano HI (eds) Oceanografía en Antártida Chile.

¹⁵⁰ Ackerman, Luke K.; Usenko, Sascha; Hageman, Kimberly J.; Campbell, Donald H.; Landers, Dixon H.; Simonich, Staci L. 2006. From Abstracts of Papers, 232nd ACS National Meeting, San Francisco, CA, United States, Sept. 10-14, ENVR-138. Language: English, Database: CAPLUS.

¹⁵¹ Fondecyt-regular - 2001 – 1010640 Búsqueda de evidencias del transporte atmosférico a gran escala de contaminantes: acumulación de contaminantes orgánicos persistentes (cops) en sedimentos de lagos remotos de Chile.

Negoita y col., 2003 refiere otra ruta e indica que las especies migratorias de aves y mamíferos marinos pueden contribuir a la transferencia hacia el sur de los COPs y que su transporte hasta el Océano del Sur y la Antártida se produce a través de las corrientes marinas y atmosféricas¹⁵², que provienen de continentes cercanos, como es el caso que explica la presencia del DDT cuyo uso en Europa está prohibido pero sigue siendo utilizado en Sudamérica.

Otra razón que explica la presencia de los mismos, indica que estos hayan ingresado a la cadena alimentaria para luego haber sido biomagnificados¹⁵³.



Fig. 22. Contaminantes orgánicos que se extienden mediante diferentes mecanismos a diferentes latitudes. Fuente: Adaptado de Wania y Mackay, *Ambio*, 1993.

En resumen podríamos decir que son las propiedades de estos compuestos, las que facilitan que los mismos se pueden mover a grandes distancias desde la fuente de emisión y distribuirse ampliamente por el planeta a través del aire, el agua, o mediante especies migratorias, corrientes aéreas y marítimas depositándose especialmente y que son las condiciones de esta región las que favorecen que estos se depositen en la misma.

¹⁵² Negoita T. G., Covaci A., and Schepens P. 2003. *J. Environ. Monit.*, 5, 281-286-286

¹⁵³ Melting Glaciers: A Probable Source of DDT to the Antarctic Marine Ecosystem Heidi N. Geisz, Rebecca M. Dickhut, Michele A. Cochran, William R. Fraser, Hugh W. Ducklow *Environmental Science & Technology* 2008 42 (11), 3958-3962



I.3. Análisis de la problemática en un marco regulado

La Antártida se halla protegida por el Tratado Antártico y el Protocolo de Madrid, los cuales por su importancia pasaremos a describir brevemente.

I.3.1. Tratado antártico

Suscrito en diciembre de 1959 por trece países, entró en vigencia en 1961; su firma suspendió 40 años de controversias por reclamos de soberanía, declarándose a la Antártida como *“una zona dedicada a la Ciencia y la paz”*, por lo que debe ser utilizada sólo para fines pacíficos, como la investigación científica cuyos resultados, son en bien del progreso de la humanidad¹⁵⁴. Este Tratado también prohíbe toda medida y uso militar de las bases y el ensayo de toda clase de armas, así como explosiones nucleares o almacenamiento de material radiactivo. Según la, Secretaria del Tratado Antártico (ATS), el año Geofísico Internacional (AGI), fue uno de los factores importantes que impulsó su firma, debido a la cooperación científica internacional lograda mediante la realización de actividades de investigación y el establecimiento de bases científicas en todo el continente antártico¹⁵⁵.

España se adhirió al Tratado Antártico en 1958, suscrito en Washington, pasando a ser miembro consultivo en septiembre de 1988. Todas las partes del Tratado se reúnen cada año con el fin de intercambiar información, formular, considerar y recomendar a sus gobiernos medidas para promover los principios y objetivos del Tratado, igualmente se comprometen a hacer los esfuerzos, compatibles con la Carta de las Naciones Unidas, con el fin de que nadie lleve a cabo en la Antártida ninguna actividad contraria a los propósitos y principios del Tratado. Estas recomendaciones dan lugar, año tras año, a una serie medidas, resoluciones y decisiones que van mejorando el sistema de control medioambiental en esta área. Participan de estas reuniones como observadores y expertos también, la Comisión para la Conservación de los Recursos Vivos Marinos (CCAMLR), el Comité Científico de Investigación Antártida (SCAR), (COMNAP), la Coalición de los Océanos Antárticos y del Sur (ASOC) y la Asociación Internacional de Tour Operadores Antárticos (IAATO).

I.3.2. Protocolo de Protección del Medio Ambiente

Conocido como Protocolo de Madrid, entró en vigor en 1998 el mismo complementa al Tratado antártico en él, las partes consideran a la Antártida como una *“reserva natural, dedicada a la paz y a la Ciencia”* al igual que el Tratado antártico; este protocolo establece

¹⁵⁴ Tratado Antártico. Preámbulo

¹⁵⁵ http://www.ats.aq/devEM/documents/001737_np.pdf

principios básicos que regulan las actividades humanas en la Antártida, que prohíbe todas las actividades relacionadas con los recursos minerales excepto las que tengan fines científicos. Pues considera “...a la Antártida como un observatorio privilegiado para el estudio e investigación de los cambios climáticos de la Tierra”.

Todo ello se debe, a que se considera a la Antártida, una de las últimas regiones prístinas del planeta; que lamentablemente según diferentes estudios, ha evidenciado la presencia de contaminantes de diversa naturaleza los cuáles se deben a que en este continente, no sólo se desarrollan investigaciones sino que también existe una elevada actividad turística, que ofrece una gran variedad de ofertas (como: cruceros, expediciones y excursiones que incluyen escaladas safaris fotográficos a colonias de pingüinos, esquí camping), actividades antropogénicas en las que se incluye el transporte.¹⁵⁶ De hecho los nuevos problemas y desafíos, no son tanto de carácter político sino científico, los cuales son producto del cambio climático, turismo, transporte (aéreo y marítimo) y seguridad en la navegación (por los derrames).¹⁵⁷ Así, muchos ecologistas y científicos manifiestan que la contaminación en la Antártida crece año a año y que son los derrames y el turismo indiscriminado las causas principales de contaminación.¹⁵⁸ Por lo que se ha remarcado la importancia de establecer programas de control y vigilancia de contaminación ambiental por parte de organismos científicos y de consulta vinculados al Tratado Antártico.¹⁵⁹ Pues existe consenso mundial en la necesidad de preservar sus recursos y su ambiente natural.

Por ello en concordancia con estas recomendaciones y conjuntamente con numerosas instituciones nacionales e internacionales resulta importante realizar estudios sobre contaminantes, que es el propósito del presente capítulo en este caso en la matriz agua. Para este fin, se hará una breve descripción de la logística a seguir para desarrollar investigación en la Antártida, una breve referencia a la causa de contaminación, sus fuentes, los contaminantes que podrían afectar esta zona o de los cuales se tiene alguna referencia según estudios ya realizados en nieve, agua de mar o hielo; que nos ayuden a lograr el

¹⁵⁶ Izaguirre Irina, Mataloni Gabriela. Antártida descubriendo el continente blanco. Editorial del Nuevo Extremo S.A. Buenos Aires Argentina 1ª Ed. 2000. Pg 163.

¹⁵⁷ Urbina Paredes Javier. El Tratado del Antártico, posición de Chile como país puente. UNISCI Discussion Papers [en línea]. Octubre 2009, Nº 21[ref. de 2010-08-17]. Disponible en Internet: <http://www.ucm.es/info/unisci/revistas/UNISCI%20DP%2021%20-%20URBINA.pdf>

¹⁵⁸ Roberto Remo Bossio. Antártida Petróleo y Turismo. GUIA del tercer mundo [presentado por el Instituto de Estudios Políticos para África y América Latina]. Editorial: Montevideo : Instituto del Tercer Mundo ; Madrid : IEPALA, D.L. 1991.639, p, 97, ISBN:84-85436-85-7

¹⁵⁹ S. Caroli, P. Cescon, and D. W. H. Walton. 2001. Environmental Contamination in Antarctica: a Challenge for Analytical Chemistry. Environmental Contamination in Antarctica. Elsevier Science, Oxford.



objetivo de este capítulo que es, el de determinar la presencia de contaminantes en aguas dulces de la Antártida.

I.4. Consideraciones generales para la investigación en la Antártida

La actividad científica española es promovida, financiada y coordinada por el Ministerio de Ciencia e Innovación, a través de convocatorias públicas de proyectos de investigación del Plan Nacional de I+D+i (desde 1988). Esta actividad abarca diferentes disciplinas¹⁶⁰ mediante el Comité Polar Español (CPE) así, las investigaciones que se realicen habrán de seguir una logística específica designada por el CPE.

I.4.1 Comité Polar

Fue creado por acuerdo de la comisión permanente de la Comisión interministerial de Ciencia y Tecnología (CICYT) en 1998. Es la base para la coordinación de todas las actividades dependientes de la autoridad nacional polar, tiene competencias sobre el antártico y el ártico. La coordinación con las instituciones implicadas (universidades o centros de investigación), la realiza a través de su Secretaría Técnica, dependiente de la Dirección General de Cooperación Internacional y Relaciones Institucionales. El CPE está presidido por la Dirección General de Cooperación Internacional y Relaciones Institucionales y cuenta con representantes de diversos Ministerios,¹⁶¹ entre sus competencias además destacan:

- ✓ Aprobación de permisos relativos a la normativa de protección ambiental.
- ✓ Reconocimiento médico y vacunaciones.
- ✓ Permisos de Aduana.

I.4.1.1 Componentes del Comité polar español

Para el éxito de la investigación polar que realiza España en la Antártida, resulta fundamental la coordinación de todos los componentes del CPE por lo que a continuación se hará una breve referencia de cada uno de ellos:

Ministerio de Asuntos Exteriores y Cooperación. Es el ente que ostenta la representación ante el Tratado Antártico.

¹⁶⁰ Pagina oficial <http://www.uam.es/otros/cn-scar/esp.htm>

¹⁶¹ <http://www.mec.es/ciencia/jsp/plantilla.jsp?area=comPolar&id=3>

La Unidad de Tecnología Marina (UTM). Dependiente del CSIC, proporciona el soporte logístico, técnico y tecnológico necesario para la investigación marina y polar promovida por el Plan Nacional de I+D+I. Sus funciones son:¹⁶²

- ✓ Asistencia técnica en campañas.
- ✓ Apoyológico y técnico a buques oceanográficos y bases polares.
- ✓ Gestión de la base Antártida española (BAE) "Juan Carlos I".
- ✓ Mantenimiento de las instalaciones científicas en buques y bases.
- ✓ Mantenimiento, calibración y manejo de instrumental científico y técnico.
- ✓ Adquisición y archivo de datos oceanográficos.
- ✓ Mantiene la presencia de España en el territorio antártico según norma el Tratado.

Ejército de Tierra (ET) mediante la División de Operaciones del Estado Mayor ejerce la función principal de gestión de la BAE "Gabriel de Castilla".

- ✓ Colabora con el MEC en las labores de investigación científica, realizadas en la Isla Decepción como ser: logística, comunicación, gestión medioambiental, desplazamientos en la zona por tierra o mar, seguridad ante situaciones de emergencia.
- ✓ Desarrolla proyectos de investigación y experimentación de interés para el ET.
- ✓ Socializa, al mundo científico y a la institución militar, la presencia y actividades del ET en la Antártida.
- ✓ Mantiene la presencia de España en el territorio antártico según el Tratado.
- ✓ La Armada Española
- ✓ Opera los buques de investigación oceanográfica (BIOs) Hespérides y Las Palmas.

¹⁶² <http://www.utm.csic.es/v06/presentacion.asp>



- ✓ Instituto Geológico y Minero de España
- ✓ Mantiene el centro nacional de datos polares.

El **Comité Nacional del SCAR**. Es una institución no gubernamental conectada con el CPE, que mantiene vínculos con el Subprograma Nacional de investigación polar; a través del cual el sistema español financia la investigación española en la Antártida.

1.4.1.2. Infraestructura para la investigación Antártida del CPE

El presente estudio se logro gracias al apoyo de la BAE Gabriel de Castilla ya que todas las extracciones se realizaron en los ambientes del laboratorio de la misma. Así, también se contó el apoyo de transporte a los diferentes lugares de la isla Decepción para el muestreo. Así también se contó con el apoyo de la BASE Juan Carlos I de la isla Livingstone donde debido a mal tiempo sólo se pudieron realizar determinaciones in situ; por lo que la colecta de las muestra fue realizada por personal técnico de la base. El BIO Las Palmas fue de gran apoyo ya que en el traslado del equipo y personal del proyecto desde Ushuaia hasta la BAE Gabriel de Castilla, la isla Decepción, la isla Livingstone, en el transito del mismo se colectaron diversas muestras de diferentes islas y bases en la Península Antártida y el puerto de Punta arenas. Por lo que a continuación se hará una breve referencia de los mismos.

BIO Las Palmas

El BIO Las Palmas fue construido por los astilleros del Atlántico en Santander en 1978. En 1982 entro en servicio en la Armada y fue el primer buque español que participó en misiones científicas en la Antártida, durante las campañas 1988-89, 1989-90 y 1990-91, hasta la entrada en funcionamiento del BIO Hespérides en mayo de 1991. Desde el año 2000 participa nuevamente en misiones de apoyo logístico a las bases de investigación españolas. Sus funciones son: el traslado de investigadores desde los puertos de Ushuaia y/o Punta Arenas hacia las diferentes bases, o zonas donde se desarrollen estudios (islas, península antártica, etc.), además del aprovisionamiento de alimentos, materiales y combustible a las bases y BIO Hespérides.

BIO Hespérides

El Buque Hespérides, buque de la Armada española, tiene su base en Cartagena, donde fue construido en 1990. Ha realizado numerosas campañas de investigación, recorriendo más de 300.000 millas náuticas y acogiendo a más de un millar de investigadores y técnicos nacionales y extranjeros. Cumple las mismas funciones que el BIO las Palmas excepto el aprovisionamiento de combustible y alimentos.



Fig.23. Fotografía de a) BIO las Palmas y b) BIO Hespérides*

BAE Gabriel de castilla

La base Gabriel de Castilla se instaló a finales de 1989 en la isla de Decepción y comenzó a funcionar a principios de 1990, como refugio militar; es gestionada por el ET y hoy en día cumple funciones de apoyo logístico a los trabajos de investigación; consta para ello de: módulos científicos, de vida, asistencia sanitaria, enfermería, náutica y motores. La base para su abastecimiento de agua dispone de dos sistemas para la captación de agua, uno principal y otro alternativo, el sistema principal recoge el agua de un cráter situado a 1,2 Km de la base a través de una bomba eléctrica que sitúa el agua en un depósito de 5.000 l del cual mediante un grupo de presión hidroneumático suministra el agua a los diferentes servicios de la base. El consumo medio de agua de la base es de 2.500 l/día lo que hace un consumo total de 225 m³ durante toda la campaña. La base está abierta únicamente durante el verano.

BAE Juan Carlos I

Está situada en la isla Livingstone, la misma es gestionada por la UTM, fue inaugurada en enero de 1988, es considerada una gran instalación científica. La base está abierta únicamente durante el verano austral, aunque mantiene registros automatizados durante todo el año de varios parámetros. Tiene como objetivo apoyar las actividades científicas de España en la Antártida.¹⁶³ La misma se abastece de agua de una laguna cercana misma que es utilizada para uso doméstico destaca también en la base la cercanía de un refugio.

Campamento Byers

Es un campamento temporal situado en la Península Byers (Zona Especialmente Protegida 126). Esta zona es considerada como la zona de interés limnológico más

¹⁶³ http://www.api-spain.es/ContribucionSpain_Logistica_y_Barcos.html



importante de la región de la Antártida marítima, dada la extensión libre de hielo (unos 60 km²) y la abundancia de lagos, charcas y arroyos.



Fig. 24. Fotografía de a) Base Gabriel de castilla, b) Base Juan Carlos I y c) Campamento Byers.*

En cada campaña cerca de un centenar de científicos y técnicos trabaja en las bases y campamentos mencionados y se moviliza gracias a los BIOs Hespérides y Las Palmas quienes además, desde la celebración del Año polar internacional (IPY), buscan coordinar estas investigaciones y observaciones a escala internacional de forma interdisciplinaria, a iniciativa conjunta de los comités ejecutivos de ICSU (Consejo Internacional de Uniones Científicas) y de la WMO (Organización Meteorológica Mundial).¹⁶⁴

I.5. Consideraciones generales para el estudio de contaminación en aguas dulces en la Antártida

Como se ha podido ver hasta ahora la Antártida se constituye en una importante zona de estudio dentro del planeta. En este caso se ha tenido a bien realizar un monitoreo que muestre la presencia de contaminantes de naturaleza orgánica e inorgánica en aguas dulces de la Antártida, esto debido a que esta es una matriz poco estudiada, pero de la que pensamos podría ser interesante su estudio como nueva matriz de monitoreo ambiental pues durante el verano austral grandes cantidades de esta se liberan al medio, por lo que a continuación se procederá a describir el trabajo realizado en esta zona con esta matriz.

El área de estudio se extendió desde Ushuaia como punto de partida hasta la Península Antártica y Punta Arenas como destino final como se puede observar en la figura 25. Donde se han seleccionado diversas zonas de muestreo que comprenden: la isla de Rey Jorge (62°15S 58°37O), isla Livingstone, la isla Decepción (63°00S 60°40O), la Isla Ronge (64°40S

¹⁶⁴ <http://www.dna.gov.ar/CIENCIA/IPY.HTM>

62°40D) y la Isla Yalour (65°15S como 64°11O). Esta ruta fue facilitada por el Comité Polar como resultado de lo solicitado por el proyecto y lo resuelto según el plan de Campaña aprobado.

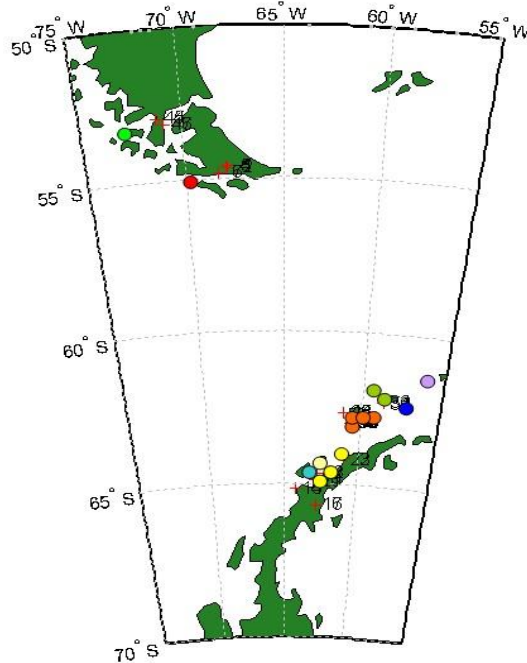


Fig. 25. Puntos de muestreo del estudio. Elab. Tauler R.

Para una mejor comprensión de lo realizado en este capítulo se dividirá el mismo en cuatro partes que corresponderían a:

- 5.1. Caracterización del agua dulce in situ.
- 5.2. Determinación de COPs en aguas dulces de la Antártida.
- 5.3. Determinación de HAPs en muestras de agua dulces de la Antártida.
- 5.4. Determinación de metales en aguas de la Antártida.

I.5.1 Caracterización del agua dulce in situ

La caracterización fisicoquímica fue una de las primeras pruebas que se realizaron en la muestras de agua dulce de la Antártida, debido a que estas pruebas son muy importantes pues constituyen una primera aproximación analítica al objeto de estudio. Estas se realizaron de forma paralela a la toma de datos. Con este fin se procedió a realizar la caracterización físico-química de las aguas mediante equipos portátiles determinando *in situ*



en cada punto de muestreo parámetros como: pH, temperatura, conductividad eléctrica y sólidos disueltos.

I.5.1.1 Equipos

La determinación de parámetro *in situ* se realizó de forma consecutiva a la toma de muestra para ello se recurrió al uso de sensores cuyas características analíticas se resumen en la siguiente tabla 9.

Tabla 9. Características analíticas de los sensores utilizados para la caracterización fisicoquímica de agua en la Antártida.

Sensor	Parámetro de medida	Rango de medida	Características analíticas
PH-200 (HM Digital-USA)	pH	0.-14	Resolución: 0.01 pH y 0.1°C T
pH metro	Tº	0-80°C	Precisión ±0.2 pH
COM-100 (HM digital-USA)	CE	0-9990 µS	Resolución: 0.1µS CE y 0.1 ppm STD
Combo Meter	STD	0.8560 ppm	Precisión: ±2%

Los mismos eran resistentes al agua, con compensación automática de temperatura. Así en cada zona de muestreo a la que se accedía, se tomaban los datos relativos a la muestra (Código, ubicación, características, coordenadas del punto de muestreo) y se procedía medir sobre la misma fuente si se estaba frente a una laguna, lago, o río; y en caso de que la muestra procediese de deshielo se realizó la prueba sobre un volumen de agua colectada en un envase. Las mediciones que se realizaron siguieron este orden: conductividad eléctrica, sólidos totales disueltos, temperatura y finalmente pH debido a que este orden se recomienda pues al medir primero el pH se corre el riesgo de que el pHmetro desprenda iones que alteren el dato de la conductividad eléctrica.

I.5.1.2. Resultados y discusión

Los resultados obtenidos se recogen en la siguiente tabla 10

Tabla 10. Datos obtenidos durante la campaña Antártida.

	Ubicación	Fecha de muestreo	Tº	pH	STD ppm KCl	CE µS	Latitud (S)	Longitud (W)	Descripción de la muestra	Características de la zona de muestreo
1	Punta Arenas	Directa 2/18/2008	8.7	6.5	249	236	52 56 30	71 12 30	Agua potable	Ciudad puertearía
2	Punta Arenas	Indirecta 2/19/2008	8.7	6.5*	113	236	53 08 50	70 53 30	Agua dulce de deshielo	Laguna Lynch cercana a la ciudad
3	Ushuaia	Indirecta 1/17/2008	10.5	8	152	210	54 35 38	67 52 22	Agua dulce de deshielo	Lago Fagñano situado a 8 km de la ciudad puertearía
4	Ushuaia	Indirecta 1/17/2008	10.2	7.7	45.20	74.70	54 39 31	67 52 22	Agua dulce deshielo	Lago escondido situado a 4 km de la ciudad es un lugar turístico que tiene energía eléctrica en base a generados a combustible
5	Ushuaia	Directa 1/18/2008	2.5	8	234	378	54 48 57	68 19 04	Agua potable	Ciudad puertearía
6	Isla Rey Jorge	Indirecta 02/07/2008	1.2	6.5	21.7	57.8	62 14 32	58 39 41	Agua dulce deshielo	Laguna de agua dulce situada cerca de la base argentina Jubany
7	Isla Rey Jorge	Indirecta 02/07/2008	2	6	68	142	62 15 29	58 37 89	Agua dulce deshielo	Laguna de agua dulce situada cercana al refugio argentino-Elefante, pingüinera y área de elefantes marinos.
8	Península Byers	Directa 02/08/2008	4.9	5	112	227	62 38 00	61 05 00	Agua dulce deshielo	Río cercano al campamento Byers
9	Península Byers	Directa 02/03/2008	4.9	5	144	227	62 40 00	61 05 78	Agua dulce deshielo	Laguna escondida
10	Isla Decepción	Directa 02/10/2008	1.6	7.86	13.9	33.6	62 55 57	60 35 41	Agua dulce de deshielo con gran cantidad de sedimento piroclasto	Caleta péndulo situada en área volcánica
11	Isla Decepción	Directa 02/11/2008	3	6.6	238	422	62 58 38	60 39 49	Agua dulce deshielo	Agua potable de la base Gabriel de Castilla obtenida de la Laguna Zapatilla situada en área volcánica
12	Isla Decepción	Directa 02/09/2008	2.4	5.5	72.3	143	62 58 41	60 33 90	Agua dulce de deshielo con mucho sedimento	Agua obtenida de la Bahía Balleneros es una área volcánica y turística



13	Isla Decepción	Directa 02/11/2008	10	7	234	465	62 58 59	60 42 01	Agua dulce de deshielo	Área volcánica y turística, cercana a base científica Argentina
14	Isla Decepción	Indirecta 02/11/2008	5.2	6	258	498	62 59 00	60 42 40	Agua dulce de deshielo.	Lago Irizar cercana a base científica Gabriel de Castilla
15	Isla Livingstone	Directa 02/05/2008	1.4	6.5	28.9	60.1	63 38 42	3048562	Agua dulce de deshielo	Laguna Helada en la Isla Livingstone. Cerca a la base científica Juan Carlos I
16	Isla Livingstone	Directa 02/05/2008	1.1	5.5	26.6	54.4	63 43 77	3099150	Agua dulce de deshielo.	Laguna Escondida en la Isla Livingstone.
17	Península Antártica	Directa 02/02/2008	4.5	6.5	64.40	127	64 09 53	60 57 23	Agua dulce de deshielo	Pingüinera cercana a la base argentina Caleta Cierva
18	Península Antártica	Directa 1/27/2008	1.5	6	12.1	5.8	64 49 29	62 51 17	Agua dulce de deshielo	Pingüinera , zona turística cercana a la base Chilena Presidente Videla
19	Península Antártica	Directa 1/28/2008	3.6	6	159	26.6	64 53 46	62 52 13	Agua dulce de deshielo	Zona turística cercana a base Argentina Almirante Brown
20	Península Antártica	Directa 1/28/2008	3.6	6	125	98	64 57 46	62 52 13	Agua dulce de deshielo	Zona turística cercana a base Argentina Almirante Brown
21	Isla Ronge	Indirecta 1/29/2008	0.7	0.94	67.9	33	64 40 30	62 40 03	Agua dulce de deshielo	Pingüinera , agua de color plumizo, ácida y con mucho sedimento
22	Isla Yalour	Directa 1/30/2008	1.5	6.5	40.2	19.4	65 10 11	64 08 02	Agua dulce de deshielo	Zona turística y pingüinera
23	Islote Orne	Indirecta 1/30/2008	0.5	6.5	21.8	434	65 40 30	62 40 03	Agua dulce de deshielo	Pingüinera

Los datos obtenidos en esta primera aproximación reflejan que la muestra con la que se trabajará en los siguientes acápite de de este capítulo corresponden a muestras de agua dulce, tomando en cuenta el pH se puede indicar que la mayoría son un poco ácidas y que unas pocas son básicas más en ambos casos los resultados están dentro de lo según la OMS. Como se puede ver los datos de pH, conductividad y sólidos totales disueltos referidos e puede evidenciar que el pH, la conductividad eléctrica y los sólidos totales disueltos reflejan que la matriz de trabajo corresponde a muestras de agua dulce.

I.6. Determinación de COPs en aguas Antártida mediante la GC-MS

I.6.1. Materiales y Reactivos

Para la recogida de muestras de agua se usaron botes de polietileno de alta densidad (HDPE) de 25L y bolsas de polietileno PE con cierre. Los cartuchos SPE empleados fueron Isolute ENV + plus (500 mg-6ml) de (Tecnología Internacional Sorbent, Hengoed, Mid Glamorgan, Reino Unido). Finalmente para filtrar las muestras se utilizaron filtros mixtos de acetato de celulosa de 0,45 μm de poro (Millipore, Irlanda).

Los disolventes utilizados fueron diclorometano, hexano, isooctano y metanol de grado HPLC que se obtuvieron de Merck (Darmstadt, Alemania). El nitrógeno utilizado fue de alta pureza 99,995% de Liquid Air (Barcelona, España). Los estándares comerciales certificados de todos los analitos a monitorear fueron adquiridos de la empresa Dr Ehrenstorfer (Braunschweig, Alemania). El papel de aluminio para cubrir los filtros y los cartuchos se adquirió de ITS Apeldoorn, Holanda. Este material se cortó en hojas (aproximadamente 20 x 20 cm) y se calentó a 300 °C durante la noche. Las láminas se almacenaron en bolsas polietileno con cremallera (SU Apeldoorn-Holanda) para el transporte a la zona de campo.

I.6.2 Equipos

Para el proceso de extracción se diseñó un equipo de extracción semiportátil. Este se utilizó el laboratorio de la base española en la isla Decepción

Para la determinación de compuestos se trabajó en colaboración con el grupo de investigación de la Dra Silvia Lacorte Bruguera del centro IDEA del CSIC-Barcelona; donde se realizaron los análisis en los que se utilizó un cromatógrafo Agilent 6890 de gases acoplado a un espectrómetro de masas Agilent 5973N con uninyector automático Agilent 7683 (Agilent Technologies, Heilbronn, Alemania).

I.6.3. Metodología

Las muestras de agua dulce se obtuvieron durante el verano Austral en la Campaña Antártica Española 2007-2008. Debido al cuidado que se debía tomar con las mismas se tomaron en cuenta los siguientes aspectos:



Identificación

Para la identificación inequívoca se etiquetó cada muestra describiendo los siguientes datos: a) lugar de muestreo el cual fue georeferenciado con un registro fotográfico de manera que facilite los datos para otros estudios (se utilizó una Palm equipada con sistema GPS), b) fecha de muestreo, c) tipo de fuente de la que se extrajo la muestra: río, lago, laguna, deshielo etc., y se asignó un código y se describió la forma de extracción; todos estos datos fueron compilados en una tabla de Excel.

Tipo de muestreo

Para éste estudio una parte de las muestras de agua se han obtenido por colecta directa de la fuente de deshielo y otra parte se logró mediante la inmersión de un bote de 2L utilizado para rellenar el bote de 25 L. No se utilizaron sistemas extractores de agua debido a que la extracción de un litro de agua con estos sistemas tarda alrededor de 15 mín, si bien se podría lograr mayor capacidad con el uso de extractores a batería aunque su uso resulta dificultoso en esa zona.

Para la determinación de COPs se decidió coleccionar un volumen de 10L que por duplicado serían 20L, este volumen fue calculado en función a estudios previos, niveles encontrados en esta zona, niveles máximos aceptados de referencia y los límites de detección de las técnicas utilizadas.

Otro factor que se tomó en cuenta para el muestreo fue la elección del envase que permita la conservación y transporte de la muestra sin afectarla. Para la elección del envase en este caso se tomó en cuenta la naturaleza de los analitos a estudiar (COPs, HAPs y trazas de metales), las recomendaciones establecidas por bibliografía y la zona de estudio (frío y remotividad).¹⁶⁵

Los envases elegidos por la lejanía del lugar y su difícil acceso fueron envases de polietileno de alta densidad HPLD de dos capacidades 25 L para las pruebas de COPs y 2L para las pruebas de trazas de metales (ver figura 26) Esta elección se debe a que estos envases son, fáciles de transportar y trasladar sin que exista riesgo de pérdida de muestra por fragilidad del envase.

¹⁶⁵ http://www.personal.us.es/jmorillo/medicion5/toma_conservacion.pdf



Fig.26 .Envases utilizados para el muestreo

La limpieza o preparación de los envases es una de las operaciones más importantes dentro del análisis de una muestra. En este caso la limpieza de los envases ha estado en función de los parámetros a determinar (COPs, HAPs y trazas de metales).

Llenado del recipiente

El llenado del envase para el muestreo también es importante. Del mismo depende la cantidad y calidad de la muestra. Así, en primera instancia, se seleccionó el lugar de muestreo, es decir se buscaba una fuente de de deshielo que emanara agua y que a su alrededor no hubiera contaminación aparente o visible, luego se procedió a enjuagar tres veces el envase con la muestra de agua para proceder a rellenarlo.

Los envases se enjuagaron con la muestra tres veces y se rellenaron dejando más de 1% de la cantidad total del envase libre el envase para evitar pérdidas por diferencia de presión al congelar.

Conservación de la muestra

La conservación de la misma se realizó en el contenedor refrigerado a -50°C del BIO Las Palmas debido a que el muestreo se realizó durante el transito del buque. Así una vez tomada la muestra ésta era congelada y así trasladada del punto de muestreo al laboratorio instalado en la BAE Gabriel de Castilla.

Se trabajó con las 23 muestras de agua que se obtuvieron de los 23 puntos de muestreo. Las muestras fueron recolectadas durante la campaña oceanográfica llevada a cabo en la primavera austral (2007-2008) a bordo del buque de investigación "Las Palmas". Esta campaña forma parte de la contribución española del Año Polar (2007-2008).



1.6.3.1 Equipo de extracción SPE

Debido a que se preveía que los niveles a encontrarse en aguas dulces iban a ser muy bajos se diseñó para la campaña, un sistema de extracción que permitiera extraer estos contaminantes y preconcentrarlos en una columna de SPE. Para su diseño se siguió el esquema básico de un sistema de extracción SPE a fin de establecer los materiales y equipos que necesitaríamos para este fin.



Fig.27. Esquema del sistema de extracción en fase sólida diseñado.

Los componentes del sistema de extracción diseñado fueron:

Bomba

La bomba permitirá aspirar la muestra y forzarla a pasar por la columna de extracción por lo que el funcionamiento en si de la bomba será el de un convertidor de energía, convirtiendo la energía mecánica en energía cinética, generando presión y velocidad en el fluido.

La bomba para la propulsión que se eligió fue una bomba de vacío Marca Millipore, Modelo: K48ZZEHM3418, Serie: 600033, la cual aparte de sus prestaciones técnicas (presión última 1100Kpa, un vacío de 1000 Kpa), fue la única bomba que se certificaba el trabajo de 10 h de manera continua durante 1 mes, tiempo de trabajo estipulado para la campaña.

Tanque de vacío

El mismo es necesario por dos funciones: una que permita mantener el vacío suficiente durante el paso de los 10 litros y otra que contenga la muestra filtrada resultante del paso de los 10 litros. Para este fin se acondiciono un tanque de seguridad de disolvente de una capacidad de 20l al que se le adaptó un sistema de válvula y conexión para los tubos de teflón del sistema de flujo.

Portafiltros y filtros

Se vio conveniente intercalar un filtro (elemento que permita retener el material grueso o particulado), seleccionando filtros de 0.45 μ m de la marca Millipore de membrana de nitrocelulosa por su naturaleza hidrófila. Estos poseen una microestructura uniforme que permite excelentes niveles de retención de partículas tal y como se referencian en estudios

medioambientales (como filtración de aguas, análisis cualitativos de partículas, prefiltración de muestras y clarificación de muestras).

El portafiltros elegido fue también de la marca Millipore, de polietileno, sencillo, pequeño, fácil de trasladar, haciéndolo fácil de adaptar al sistema en línea pues es desmontable y liviano.

Columnas o cartuchos de extracción

Para extraer los contaminantes se eligió trabajar con columnas de extracción en fase sólida SPE, método ideal para la técnica de CG-MS, debido a que en los últimos años, la SPE (del inglés Solid Phase Extracción) extracción en fase sólida, ha substituido a la LLE (del inglés Liquid Liquid Extraction) extracción líquido, debido a las ventajas que tiene, pues no requiere del uso de grandes cantidades de disolventes¹⁶⁶, propiedad que los hace ideales para estudios medioambientales y estudios que impliquen el traslado de material, como en este caso, a lugares remotos. Además que como se mencionó anteriormente, cumplen la función de eliminar interferentes, conservación y preservación de la muestra además de permitir un almacenamiento y transporte más fácil y cómodo.¹⁶⁷ Esto en nuestro caso resultó esencial, pues se trataron 23 muestras (2 réplicas de cada una); es decir, se evitó el traslado de 460 L agua que deberían ser conservados y transportados a España para su ulterior análisis.

De todas las nuevas columnas de extracción en fase sólida disponibles en el mercado se decidió trabajar con la columna ISOLUTE ENV+ (6ml, 500 mg) (Internacional Sorbent Technology) que está compuesta por un polímero entrecruzado de divinilbenceno y estireno que le dan propiedades muy útiles en el análisis de contaminantes en agua, ya que este tipo de columnas retiene tanto compuestos apolares como compuestos parcialmente polares, presentando un intervalo de polaridad mucho más amplio que otros tipos de cartuchos. Además, poseen una capacidad de retención muy elevada, por lo que hace falta menos cantidad de material extrante y, por tanto, se reduce el espacio de conservación.

Para la conexión de los diferentes sistemas en línea se ha visto por conveniente trabajar con mangueras de diferentes diámetros, de teflón (PTFE) por ser un material hidrófobo que tiene una alta resistencia química y física. El sistema de extracción resultante se puede observar en la siguiente figura.

¹⁶⁶ <http://www.nereoformacion.org/nereonautic/content/content.php-id=110.htm>

¹⁶⁷ Ferrerl., Barcelód. 1997. J. Chromatogr. A, 778 161.



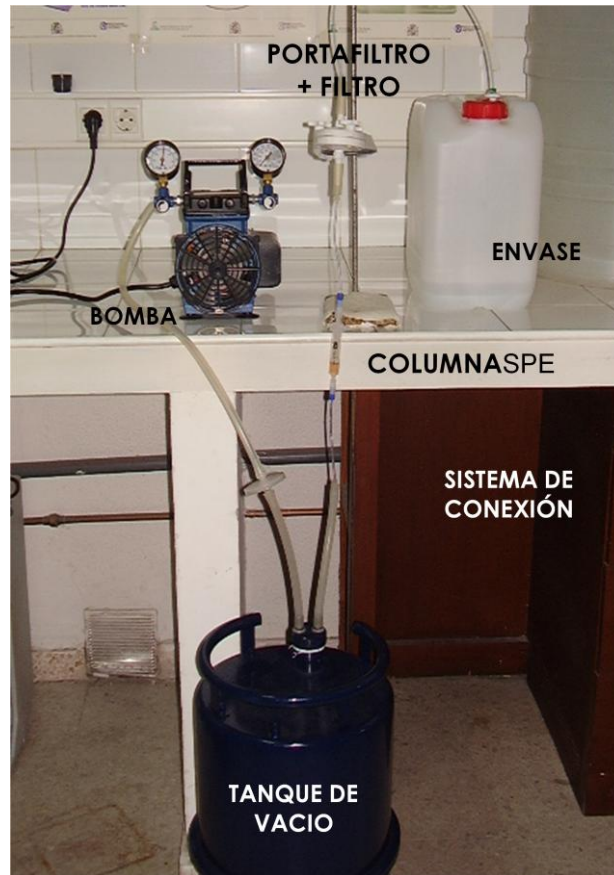


Fig. 28. Sistema de extracción de contaminantes diseñado para la Campaña. Antártida

La ventaja del sistema es que las muestras de agua se puede extraer directamente en el campo además de ser desmontable, portable y de fácil manejo. Su único inconveniente es que requiere de una fuente de energía para el funcionamiento de la bomba.

Para concluir el sistema de extracción, se tomó en cuenta la capacidad de los componentes y se realizó la puesta punto de los mismos. Esto comprendió los estudios de saturación del filtro y la activación de la columna.

A) Saturación del filtro.

Para este fin, se realizaron diferentes pruebas relacionando el volumen de agua vs velocidad filtrado de la misma.

Para ello se hicieron diferentes pruebas con agua de grifo variando la velocidad del flujo, observándose que a un vacío de -70 Kpa le corresponde a un flujo de 33 mL/min y el filtro que se satura a las 2 horas, resultando un periodo promedio de 5 horas y un recambio también promedio de tres filtros por cada 10 L aproximadamente (5-6 horas). Por tanto,

para tratar 10 L de muestra, se trataran de 5 a 6 horas y serán necesarios 3 filtros con un flujo promedio optimo de 33-34 mL/min a -70kPa.

Tabla 11. Resultados obtenidos para la determinación de saturación de filtro.

Volumen de agua	No de filtros utilizados	Tiempos	Capacidad de la bomba	Capacidad de vacío
10 Litros	3	7 hrs	600 kPa	- 65 kPa
10 Litros	3	5-6 hrs	700 kPa	-70 kPa
10 Litros	6	4 hrs	800 kPa	- 80 kPa
10 Litros	7	3 hrs	900 kPa	- 90 kPa

B) Activación de la columna

Para activar los grupos funcionales que componen la columna se procedió a acondicionarla con 5 mL de metanol y 10 mL de agua Milli-Q bajo presión de vacío, dejando aproximadamente 1 μ L de agua sobre la frita, según indicaciones de la hoja técnica del productor¹⁶⁸.



Fig. 29. Fotografías de activación de cartuchos.

La misma se realizo previa al embalado y envío a la Antártida

El proceso de extracción de contaminantes podría resumirse en el siguiente esquema:



I.6.3.2. Preparación del extracto

Para este fin se colectó un total de 22 litros aproximadamente por punto de muestreo de los cuales 10L se trasvasaron a un recipiente graduado de también 10 L el cual se hallaba conectado al sistema de extracción. Por este sistema se paso el agua de manera que al final del proceso se obtenían dos muestras unaconteniendo el material particulado retenido en los filtros y otra correspondiente a los compuestos contenidos en la fase disuelta que quedarían retenidos y concentrados en los cartuchos de extracción ENV+Plus. Todo el proceso se resume en la figura 30.

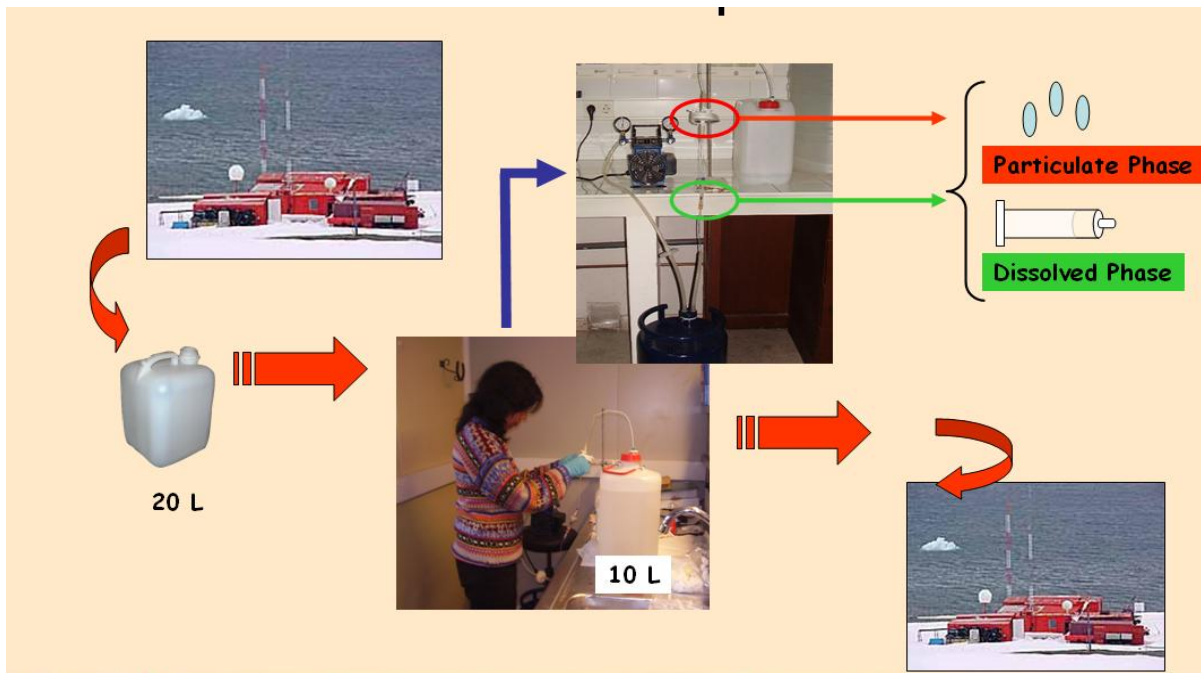


Fig. 30. Proceso de extracción de contaminantes

Proceso de elución

Para arrastrar todos los compuestos retenidos en la fase sólida, se siguieron dos procedimientos de elución, uno para las columnas y otro para los filtros, los cuales se resumen en el siguiente esquema:

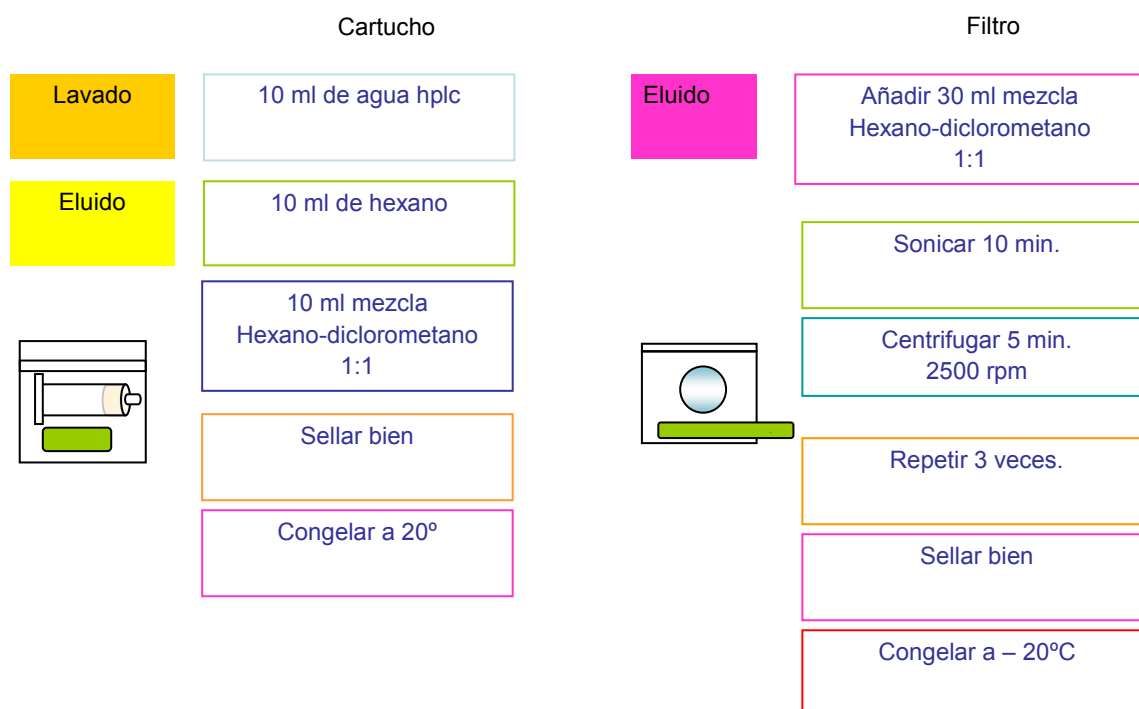


Fig. 31. Esquema de elución de las muestras para su análisis por GC-MS-NCI.

Este procedimiento se realizó bajo campana de flujo laminar, los disolventes utilizados fueron clase p.a. de la línea Scharlab. Todos los envases se limpiaron según el protocolo de limpieza. Para su análisis los eluidos se enviaron a Barcelona protegidos en nieve carbónica a fin de preservar los analitos contenidos. En este centro el protocolo que se siguió fue el siguiente:

Reconstitución de la muestra

Para la reconstitución de la muestra el eluido se trasvasó a frascos completamente limpios de 40 mL los cuales se colocaron en un turbo vapCaliper LifeSciences (Hopkinton, MA USA), evaporando el eluido hasta sequedad completa a una temperatura promedio de 40°C por espacio de 30 min. Finalmente el contenido del frasco se reconstituyó en 25 μ L de isooctano, se depositó en un vial de cromatografía de gases de color ambar y con inserto y tapa de rosca con septum, cerrándose completamente y conservándose a -20°C hasta el momento de su análisis.



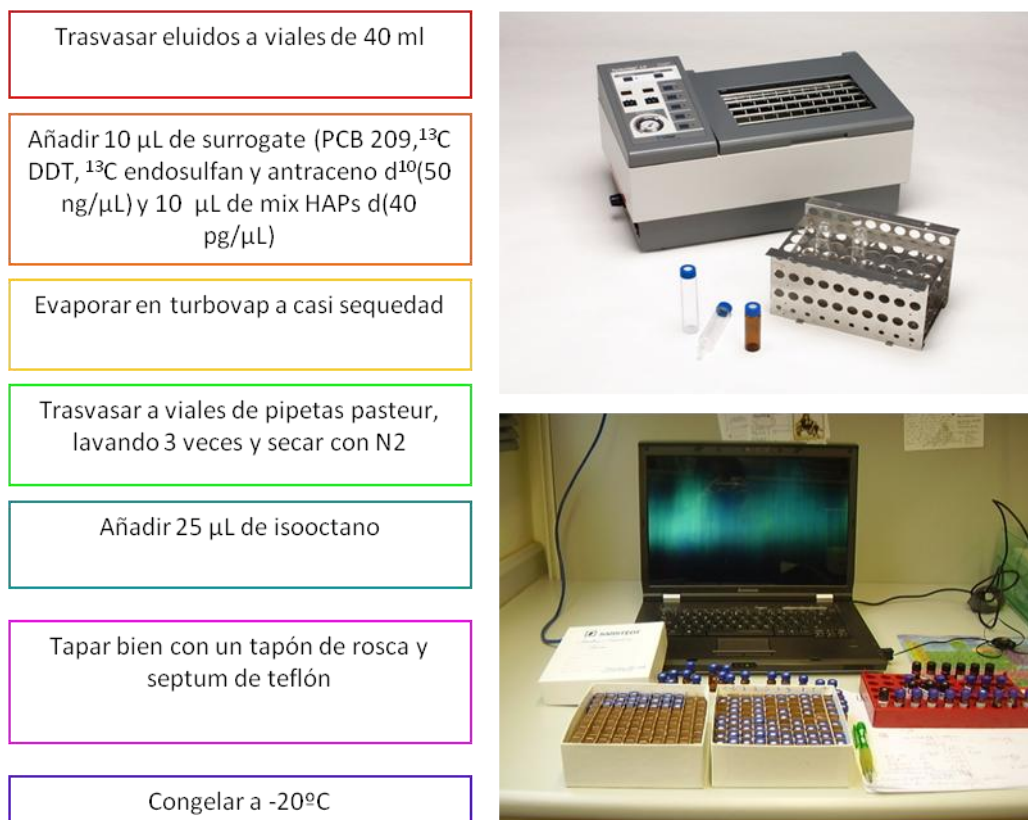


Fig.32. Esquema de reconstitución de las muestras para su análisis por GC-MS-NCI.

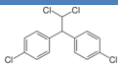

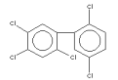
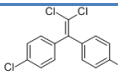
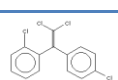
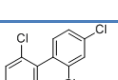
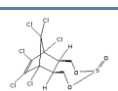
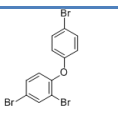
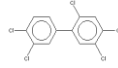
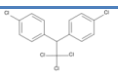
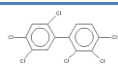
Selección de COPs a monitorear

La selección de los compuestos a monitorear se basó en los COPs encontrados en el Ártico y la Antártida en diferentes matrices bióticas y abióticas¹⁴⁶. Elijiendo en este caso 36 compuestos, los cuales se hallan recogidos en la siguiente tabla, además de información respecto a su abreviatura, número CAS, NML, solubilidad en agua, fórmula química, peso molecular y estructura química.

Tabla 12. Características químicas de los analitos (COPs) estudiados.

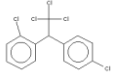
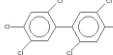
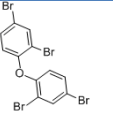
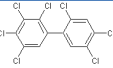
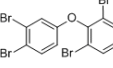
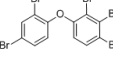
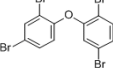

Abrev.	Numero CAS	NML $\mu\text{g l}^{-1}$ ¹⁶⁹ [$\mu\text{g/l}$]	Solub en agua 20°C (mg l ⁻¹)	log K _{ow} pH 7, 20°C	Fórmula química	PM g/mol	Estructura química
α -HCH	319-84-6	0,02 a	2.0	3.82	C ₆ H ₆ Cl ₆	290.83	
β -HCH	319-85-7	0,02	2.0	3.82	C ₆ H ₆ Cl ₆	290.83	
γ HCH	58-89-9	ne	8.52	3.69	C ₆ H ₆ Cl ₆	290.83	
δ HCH	319-86-8	ne	10 ¹⁷⁰	4.14	C ₆ H ₆ Cl ₆	290.83	
PCB 28	7012-37-5		0.117 ¹⁷¹ +	7.1	C ₁₂ H ₇ Cl ₃	257.54	
PCB 52	35693-99-3		0.110 +		C ₁₂ H ₆ Cl ₄	291.99	
	93952-18-2				C ₁₄ HCl ₅ D ₈	362.54	
¹³ C DDT			0.006		C ₁₄ H ₉ Cl ₅		
2,4'-DDD	53-19-0		0.1 at 25 °C*	5.87*	C ₁₄ H ₁₀ Cl ₄	320.05*	

¹⁶⁹ DIRECTIVA 2008/105/C¹⁷⁰ Hansch and Leo 1995 <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp43-c4.pdf>¹⁷¹ Dunnivant & Elzerman, 1988

Abrev.	Numero CAS	NML $\mu\text{g l}^{-1}$ ¹⁷² [$\mu\text{g/l}$]	Solub en agua 20°C (mg l ⁻¹)	log K _{ow} pH 7, 20°C	Fórmula química	PM g/mol	Estructura química
4,4'-DDD	72-54-8		0.090 at 25 °C*, ¹⁷³	6.02 *	C ₁₄ H ₁₀ Cl ₄	320.05*	
Endosulfan α	959-98-8		0.32	4.75	C ₉ H ₆ Cl ₆ O ₃ S		
PCB 101	37680-73-2		0.007+		C ₁₂ H ₅ Cl ₅	326.4316	
4',4'DDE	72-55-9		0.12 at 25 °C*	6.51*	C ₁₄ H ₈ Cl ₄	318.03*	
2',4'DDE	3424-82-6		0.14 at 25 EC*	6.00*	C ₁₄ H ₈ Cl ₄	318.03*	
PBDE 17	37680-66-3		N.D.	5.74 ¹⁷⁴	C ₁₂ H ₇ Cl ₃	257.54	
Endosulfan b					C ₉ H ₆ Cl ₆ O ₃ S		
PBDE 28	41318-75-6				C ₁₂ H ₇ Br ₃ O	406.89538	
PCB118	31508-00-6				C ₁₂ H ₅ Cl ₅	326.4316	
4,4'-DDT	50-29-3		0.025 at 25 °C*	6.91*	C ₁₄ H ₉ Cl ₅	354.49*	
PCB 138	35065-28-2				C ₁₂ H ₄ Cl ₆	360.8764	

¹⁷² DIRECTIVA 2008/105/C

¹⁷⁴ Braekvelt et al. 2003 k PBDE

Abrev.	Numero CAS	NML $\mu\text{g l}^{-1}$ ¹⁷⁵ [$\mu\text{g/l}$]	Solub en agua 20°C (mg l- 1)	log K _{ow} pH 7, 20°C	Fórmula química	PM g/mol	Estructura química
2,4'DDT	789-02-6		0.085 at 25 °C* ¹⁷⁶	6.79*	C ₁₄ H ₉ Cl ₅	354.49*	
PCB 153	35065- 27-1		0.0012- 0.0095 ++ ¹⁷⁷		C ₁₂ H ₄ Cl ₆	360.8764	
PBDE 47	5436-43- 1		11 ¹⁷⁸ 15 $\mu\text{g/l}$ ¹⁷⁹	6.81 ¹⁸⁰	C ₁₂ H ₆ Br ₄ O	485.79144	
PCB180	35065- 29-3				C ₁₂ H ₃ Cl ₇	395.3211	
PBDE 66					C ₁₂ H ₆ Br ₄ O	485.79	
PDBE 71	189084- 62-6		18 $\mu\text{g/l}$	-	C ₁₂ H ₆ Br ₄ O	485.79144	
Endosulfan ¹³ C							
PDBE 85	182346- 21-0		6 $\mu\text{g/l}$		C ₁₂ H ₅ Br ₅ O	564.69	
PDBE 99	60348- 60-9		9 $\mu\text{g/l}$	7.32	C ₁₂ H ₅ Br ₅ O	564.6875	
PCB 209			0.000004- 0.015 ++				

¹⁷⁵ DIRECTIVA 2008/105/C

¹⁷⁶ <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp35-c4.pdf>

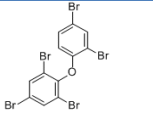
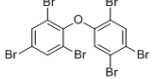
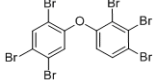
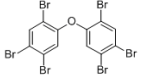
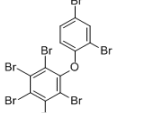
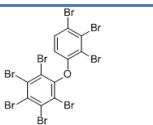
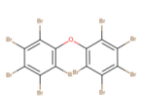
¹⁷⁷ Shiu & Mackay 1986++

¹⁷⁸ Stenzel and Markley (1997)

¹⁷⁹ Tittlemier et al. 2002 swPDBE

¹⁸⁰ Braekevelt et al. (2003); ATSDR (2004)



Abrev.	Numero CAS	NML $\mu\text{g l}^{-1}$ ¹⁸¹ [$\mu\text{g/l}$]	Solub en agua 20°C (mg l ⁻¹)	log K _{ow} pH 7, 20°C	Fórmula química	PM g/mol	Estructura química
PDBE 100	189084-64-8		40 $\mu\text{g/l}$	7.24	C ₁₂ H ₅ Br ₅ O	564.6875	
PDBE 154	207122-15-4		1 $\mu\text{g/l}$	7.82	C ₁₂ H ₄ Br ₆ O	643.58356	
PDBE 138	182677-30-1		-	-	C ₁₂ H ₄ Br ₆ O	643.58	
PDBE 153	68631-49-2		1 $\mu\text{g/l}$	7.90	C ₁₂ H ₄ Br ₆ O	643.58356	
PDBE 183	189084-67-1		2 $\mu\text{g/l}$	8.27	C ₁₂ H ₃ Br ₇ O	722.47962	
PDBE 190	446255-38-5		-	-	C ₁₂ H ₂ Br ₈ O	801.37568	
PDBE 209	2051-24-3				C ₁₂ Cl ₁₀	498.6554	

I.6.4. Análisis y cuantificación de COPs

Para el análisis de COPs las determinaciones GC-MS se llevaron a cabo con un cromatógrafo de gases Agilent 6890 acoplado a un espectrómetro de masas Agilent 5973N con inyector automático Agilent 7683 (Agilent Technologies, Heilbronn, Alemania) asistido con una fuente de ionización química (NCl). La separación cromatográfica se realizó en una columna capilar de (30m, 250 μm i.d., 0,25 μm de espesor de película) que contiene 5% de fenilo y 95% de metilpolisiloxano (Agilent HP-5MS, Folsom, CA USA). Se utilizó el siguiente programa de temperatura: el horno se fijó en 120°C durante 1 min, elevándose hasta 205°C a 8°C min⁻¹; luego se volvió a elevar la temperatura hasta 310°C a 10°C min⁻¹ manteniendo esta temperatura por 10 min. Así, 2 μL de extracto se inyectaron en modo splitless (0.80 min).

¹⁸¹ DIRECTIVA 2008/105/C

Tabla 13. Lista de COPs estudiados, los cuales están ordenados en función al orden de tiempo de retención RT obtenido por GC-NCI-MS modo SIM también se describen los iones de cuantificación, y los parámetros analíticos utilizados para la cuantificación.

Time window (min)	Id. number	Compound	Rt (min)	Ions monitored m/z	IDL pg injected	MDL pg/L water	MDL pg/L PM	F	R2	%R
4 to 9	1	α -HCH	5.332	71/255/257	1.27	1.92	11.8	0.0445	0.9963	
	2	β -HCH	6.042	71/255/257	10.7	16.7	14.8	0.0036	0.9999	
	3	γ HCH	6.618	71/255/257	25.9	24.7	2.34	0.0015	0.9985	
	4	δ HCH	7.154	71/255/257	14.2	15.0	250	0.0002	0.9890	
	5	PCB 28	7.355	255/257/259	1.87	2.50	2.74	0.0410	0.9992	
	6	PCB 52	8.173	291/289/293	1.75	2.12	2.99	0.0430	0.9991	
9 to 15		^{13}C DDT	10	237/410/412				0.0000	n.d	
	9	2,4'-DDD	10.02	246/248	0.42	12.5	20.5	0.1198	0.9998	
	10	4,4'-DDD	10.02	246/248/347	0.42	12.5	20.5	0.1198	0.9998	
	11	Endosulfan α	10.07	406/408	0.22	1.06	6.25	0.1874	0.9991	
	12	PCB 101	10.119	325/327	1.78	2.21	4.44	0.0309	0.9979	
	13	4',4'DDE	10.763	283/281	1.54	8.57	1.55	0.0239	0.9979	
	14	2',4'DDE	10.912	246/248/225	4.14	8.57	1.55	0.0175	0.9995	
	15	PBDE 17	11.06	79/81	4.17	53.57	6.38	0.3842	0.9988	
	16	Endosulfan b	11.308	406/408	0.13	1.66	10.2	0.3192	0.9959	
	17	PBDE 28	11.456	79/81	8.47	2.14	3.53	0.2697	0.9976	
	18	PCB118	11.456	326/324	0.15	6.19	1.57	0.6183	0.9977	
	19	4,4'-DDT	11.704	225/246/248	3.35	3.38	12.7	0.0152	0.9978	
	20	PCB 138	12.001	360/362/326	0.80	61.2	21.4	0.4055	0.9996	
	21	2,4'DDT	12.496	281/283/247	8.49	1.41	15.8	0.0110	0.9998	
	22	PCB 153	12.595	360/362/326	0.64	9.97	24.3	0.1478	0.9996	
	23	PBDE 47	13.832	79/81	5.32	12.5	27.0	0.2311	0.9972	
	24	PCB180	14.229	394/396	0.17	19.5	11.7	1.3712	0.9999	
	25	PBDE 66	14.575	79/81	0.42	8.12	26.5	0.2823	0.9985	
	26	PDBE 71	14.58	79/81	9.70	34.6	27.3	0.2823	0.9985	
		Endosulfan ^{13}C	14.872	277/259		0		1.0000		
15 to 27	27	PDBE 85	16.43	79/81	7.82	7.88	40.9	0.0576	0.9993	
	28	PDBE 100	17.06	79/81	5.32	14.7	20.9	0.0538	0.9997	
	29	PCB 209	18.19	498/500						
	30	PDBE 99	18.21	79/81	9.65	7.09	7.20	0.0642	0.9996	
	31	PDBE 154	18.88	79/81/362	12.7	0	40.91	0.0616	0.9975	
	32	PDBE 138	19.792	79/81/483	13.6	0	10.34	0.0618	0.9977	
	33	PDBE 153	20.976	79/81	15.4	26.8	15.5	0.0637	0.9998	
	34	PDBE 183	22.39	79/81	15.9	31.51	10.34	0.2762	0.9954	
	35	PDBE 190	23.918	79/81	11.39	15.99	17.31	0.1597	0.9933	
	36	PDBE 209	32.53	488/79/81	28.13	82.41	90.00	0.4533	0.9947	



Se utilizó helio con una pureza del 99,995% como gas portador a un flujo de 1.1 mL min⁻¹. La temperatura del inyector, de la línea de transferencia al detector de masas y la fuente de iones fue de 280, 250 y 200°C respectivamente. El tiempo total del análisis fue de 39.13 min.

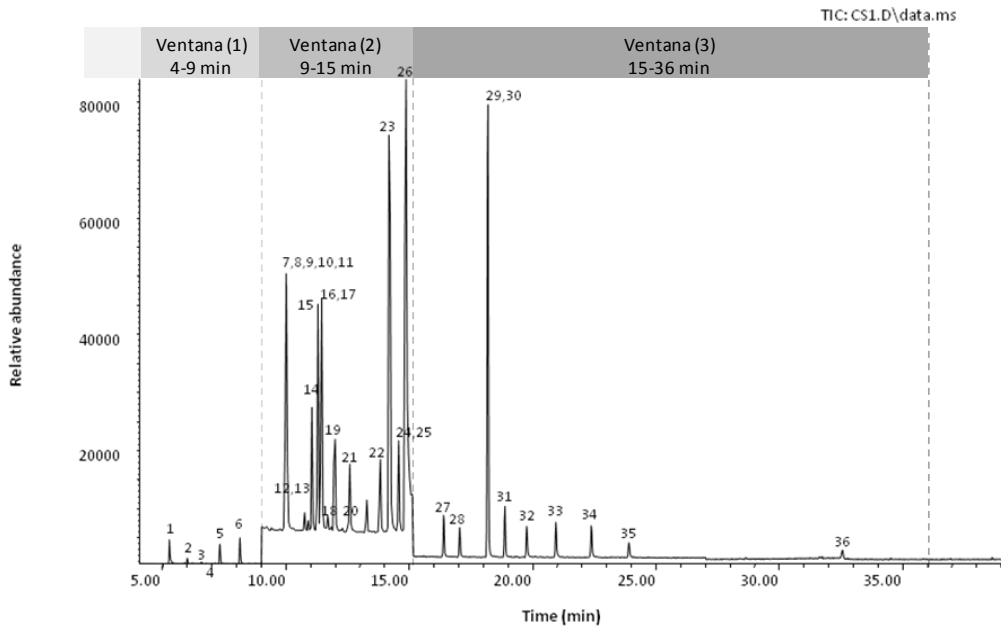
Para la adquisición de datos se trabajó en modo de seguimiento de iones seleccionados (SIM) de acuerdo con los parámetros que se muestran en la tabla 13.

En todos los casos se trató de tomar en cuenta tres iones mayoritarios del espectro de masas para la detección de la presencia de un compuesto, eligiendo el más abundante para la cuantificación.

Los iones seleccionados se verificaron con el tiempo de retención. La cuantificación se llevó a cabo mediante inyección doble. En este caso se utilizaron ventanas de análisis para aumentar la sensibilidad que también se hallan reflejadas en la tabla 13. Para determinar los parámetros del análisis se trabajó con una recta de calibrado de 14-385 pgL⁻¹ de HCH, DDTs y PCBs y de 35-770 pgL⁻¹ para BDEs, las cuales fueron utilizadas para determinar la concentración de COPs presentes en aguas dulces de la Antártida.

Con el fin de controlar la calidad analítica de los análisis se realizaron inyecciones de soluciones control (puntos de la recta de calibrado) durante el análisis de la muestra con el fin de garantizar la fiabilidad de los datos.

A continuación se muestran los cromatogramas correspondientes a los estándares analíticos utilizados para una muestra. En ellos se puede observar que los se separan bien. Los cromatogramas obtenidos fueron tratados con la aplicación ChemStation Data Analysis.



6

Fig. 33. TIC del primer punto de la recta de calibrado para determinar los tiempos de retención.

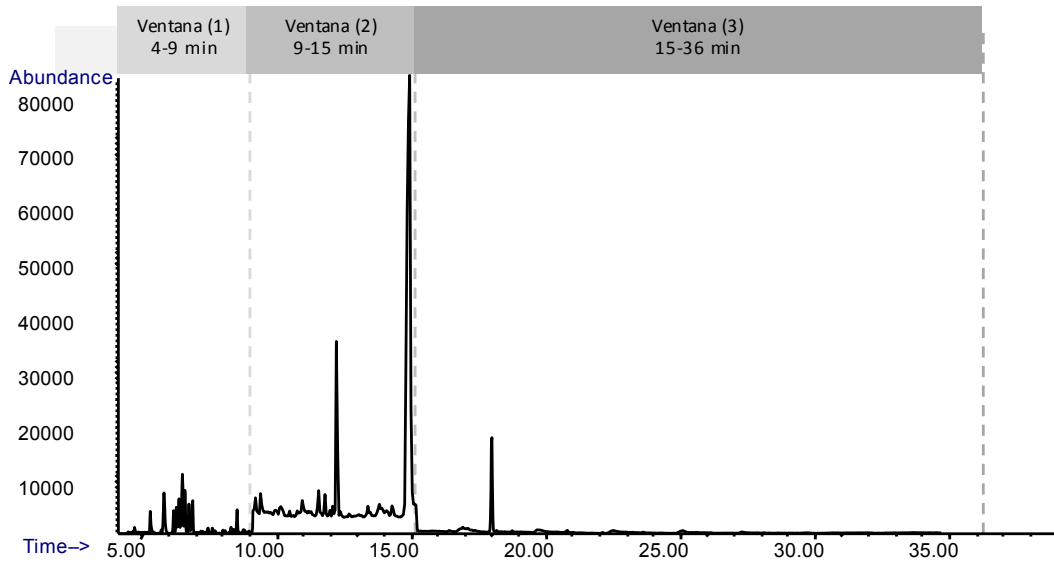


Fig. 34. TIC de una muestra que contiene COPs.



1.6.5. Resultados y discusión

Utilizando los parámetros analíticos arriba descritos se procedió a la determinación de la presencia y cantidad de COPs. En este caso se presentan dos tablas una con los compuestos retenidos en el cartucho que corresponderían a los compuestos retenidos en la fase disuelta y otra tabla que corresponde a los compuestos retenidos en los filtros que corresponderían a los compuestos presentes en la fase particulada.

Tabla 14. Concentración de COPs en aguas dulces de la Antártida (fase disuelta).

	α -HCH	β -HCH	4',4'-DDT	4,4'-DDE	2,4'-DDE	2,4'-DDD	Endosulfan α	Endosulfan β	PCB28	PCB52	PCB101	PCB118	PCB138	PCB153	PCB180	BDE17	BDE28	BDE47	BDE138	BDE153	BDE183	BDE190	BDE 99	BDE100	
1															2.99			60.58						7.55	
2														12.60	0.60			46.20							
3	0.66	11.74						0.01										14.00					1.35	2.07	
4	1.39									54.87	54.87							13.90							
5	4.21	44.86		20.27				0.09		59.95	59.95		0.07					22.50						3.49	
6	7.20	46.37	585.25			11.21				57.68	57.68							0.89					2.57		
7	12.17	78.01								3.55	3.55				1.12								3.03		
8	21.11	63.64				6.59		0.06	5.63					0.51	0.48		0.90						2.53		
9	13.77					14.81									0.23										
10	10.82	44.11								26.41	26.41				4.45								8.88		
11			105.62					0.40								4.49	0.96	7.84							
12	5.74	31.50											1.48	2.68	2.41								1.49		
13								0.17							0.23		0.69						2.90		
14		51.43	136.49			5.71				6.04	6.04					8.32		2.77					2.39		
15	0.95	15.00					0.46	0.25							0.08	0.45									
16	4.35	38.32								2.65	2.65	0.30			0.33	0.56									
17	6.16	47.06							46.56														3.74	0.50	
18	4.58	72.37							0.44				0.12	0.21									2.69	2.65	
19	51.89					23.75				15.69	15.69		0.34	0.60	0.69									1.72	
20	5.07	42.93						0.07															3.42		
21	14.95	69.24	352.00				0.50	0.14					5.61	5.43	6.06										
22	8.25				863.36		0.97	0.20	136.0				0.51	1.77	0.30								3.47	1.18	
23	4.62	44.63					0.33		165.0				1.56	3.15	3.61	3.90									

*7.55/38.8 corresponde a $\mu\text{g L}^{-1}$ para BDE 100 y 99, respectivamente.

Tabla 15. Concentración de COPs en agua dulces de la Antártida (en fase particulada)

	α -HCH	β -HCH	4',4'-DDT	4,4'-DDE	2,4'-DDE	2,4'-DDD	Endosulfan α	Endosulfan β	PCB28	PCB52	PCB101	PCB118	PCB138	PCB153	PCB180	BDE17	BDE28	BDE47	BDE138	BDE153	BDE183	BDE190	BDE 99	BDE100
1	0.75	1.96								24125		236.73	54.94	248.16			66.48							
2	1.09	6.51								7356.0		160.00	42.90	185.00	135.00									
3	0.97	2.66				1.99		0.03				284.00	7.30	72.71	29.77	5.66	2.25	14.00	19.14				1.35	
4	0.19	0.84				4.34		0.06	486.71			99.56	6.25	35.73	26.10			14.61						
5						4.69						2.33	3.58	14.63	7.34	6.30		22.50						
6	0.72	2.91				0.27				3596.00		15.29	76.80	237.00	239.00									
7	1.73	5.51				4.40		0.04		4557.92	14.25	61.00	23.70	94.40	108.00			8.21					3.03	
8	0.75	7.15				5.12						278.00	5.80	16.50	60.50				42.13					
9	0.75	7.15				2.67						275.57	5.93	16.25	4.26									
10	1.81	7.41									121.10	6.31	136.00	149.00	281.00			12.40					8.88	
11	0.44	1.19				10.21				2936.0	84.06	22.70	12.40	52.00	56.00			0.96					8.90	
12						1.68				4199.0	152.73	53.40	7.20	34.00	18.70		2.31	2.40						
13	2.30	30.50								3214.0		243.00	5.26	24.10	7.72									
14	3.07	16.76				14.68		0.09				106.00	13.76	60.40	42.10					8.48				
15	0.55	4.15				4.15				1151.5														
16	1.89	5.18		7.12		2.74		0.05		1499.0		52.42	57.00	208.00	137.00		5.22	6.11						
17						11.10						123.15	4.94	6.95	3.10		3.17							
18		42.84						0.13				99.00	25.90	110.12	105.00									
19	6.26	27.66				36.97		0.08				179.00	19.40	95.50	76.00			12.24			84.82			
20		25.99				33.38		0.15				179.01	25.83	95.73	34.49		7.12							
21						5.59		0.09			48.44		17.10	81.40	74.00									
22	2.48	5.10				14.19		0.14				89.30	16.30	162.70	23.50		3.92	19.34			6.81		3.47	
23	0.78	55.70				47.71		0.22								48.41		10.50						

DER 12%/ En negrita los valores que estarían bien. /En rojo los valores que aparecen en ambas muestras pero con desv std. Mayor a la media.

La DER en ambos casos fue menor al 15% obteniéndose así un DER de 9% para fase disuelta y 12 para fase particulada.

De los 36 COPs en estudio, se han detectado y cuantificado 24 compuestos, los cuales además de identificarse se han cuantificado como se observa en las tablas anteriores que corresponden a la fase disuelta y particulada. De todos ellos, solo 8 (α -HCH, β -HCH, 4',4' DDT, 4,4' DDE, PCB 52, PCB 101 y PCB 180) han sido descritos en la bibliografía por estar presentes en agua de lago tal como se muestra en la tabla 16.

Tabla 16. Concentración de compuestos encontrados en la matriz de agua dulce ($\mu\text{g L}^{-1}$) y otros estudios realizados en agua de lago, agua superficial agua de mar y nieve.

Compuesto	Agua dulce	Niveles	Lugar y matriz	Ref.	Otras matrices
α -HCH	0.44-51.89	330 $\mu\text{g L}^{-1}$ $\Sigma\alpha+\beta+\gamma$ +HCH	Estación Syowa (agua de lago)	Tanabe et al, 1983	
		5.1-19.0 (f)	Estación Syowa (agua de lago)	Tanabe et al, 1983	
		2-2.2 $\mu\text{g dm}^3$	Península antártica occidental (nieve)	Dickhut y col, 2003	
		0.04-2.18 $\mu\text{g L}^{-1}$	Península antártica occidental (agua de mar)	Dickhut y col, 2003	
		1.0-10.5 $\mu\text{g L}^{-1}$	Península antártica occidental (hielo de mar)	Dickhut y col, 2003	
		0.04-5.7 $\mu\text{g L}^{-1}$	Crucero a base Sud África (agua de mar)	Jantuten y col., 2004	
β -HCH	0.84-66.64				
4,4' DDT	105.00-585.00*				
4,4' DDE	7.12-20.27	0.5 $\mu\text{g g}^{-1}$	Península antártica(nieve)	Reisebrough y col., 1976	
2,4' DDE	863.36*	0.19 $\mu\text{g g}^{-1}$	Península antártica(nieve)	Reisebrough y col., 1976	
2,4'-DDD	0.27-47.71	Σ DDT, DDD y DDE		Klanova y col., 2008	Sedimento marino
Endosulfan α	0.33*	+ endosulfan sulfato		Deger y col., 2008	Núcleo de hielo
Endosulfan β	0.01-015				
PCB total		1.2 $\mu\text{g g}^{-1}$	Península antártica(nieve)	Reisebrough y col., 1976	
		4.0-10.0 $\mu\text{g g}^{-1}$	Estación Palmer (nieve sup.)	Reisebrough y col., 1976	
		0.2-1 $\mu\text{g g}^{-1}$	Estación Syowa (nieve)	Tanabe et al, 1983	
		0.3-0.6 $\mu\text{g g}^{-1}$	Estación Syowa (hielo)	Tanabe et al, 1983	
		36-84 $\mu\text{g L}^{-1}$ Σ 7 PCBs	Bahía Terra Nova-Mar Ross (agua de mar)	Fuocu y col., 2009	
		100-230 $\mu\text{g L}^{-1}$	Acceso a Gerlache y bahía Wood (agua de mar)	Fuocu y col., 2009	
PCB28	0.44-486	+		Montone y col., 2005 Choi y col., 2008	Atmósfera marina Atmósfera
PCB52	2.65-4557	+		Montone y col., 2005 Choi y col., 2008	Atmósfera marina Atmósfera
PCB101	2.65-121.10	+		Montone y col., 2005 Choi y col., 2008	Atmósfera marina Atmósfera
PCB118	0.30-284	+		Montone y col., 2005 Choi y col., 2008	Atmósfera marina Atmósfera
PCB138	0.07-136.00	+		Goerke y col., 2004 Montone y col., 2005 Choi y col., 2008	Krill Atmósfera marina Atmósfera
PCB153	0.20-208	+		Goerke y col., 2004 Montone y col., 2005 Choi y col., 2008	Krill Atmósfera marina Atmósfera
PCB180	0.23-281	+		Goerke y col., 2004 Montone y col., 2005 Choi y col., 2008	Krill Atmósfera marina



BDE17	0.45-48.41	+	Hale y col., 2008a	Biota marina
BDE28	0.69-7.12	+	Hale y col., 2008a	Biota marina
BDE47	0.89-66.48	+	Goerke y col., 2004 Hale y col., 2008	Krill sedimento
BDE138	19.14-43.12**	+	Hale y col., 2008a ¹⁸²	Biota marina
BDE153	8.48**	+	Hale y col., 2008	sedimento
BDE183	6.81-84.82		Hale y col., 2008a	Biota marina
BDE 99	1.35-8.90	+	Hale y col., 2008	sedimento
BDE100	0.50-3.45	+	Hale y col., 2008	sedimento

*Encontrado sólo en fase disuelta, ** encontrado sólo en fase particulada.

Los compuestos encontrados y que no están descritos en la bibliografía han sido descritos en otras matrices bióticas y abióticas tal como se observa en la tabla 16. Así, la presencia de 2.4 DDD ha sido descrita por Klanova y col. (2008) en sedimento marino. En nuestro caso se ha encontrado sólo en material disuelto en la muestra de la isla Yalour. LA presencia de este compuesto en esta muestra se puede deber a que sea producto de degradación del DDT.

La presencia de bajas concentraciones de endosulfanes α y β hace presumir que los mismos sean recientes y que estos hayan podido ser trasladados por corrientes de aire o agua hacia esta zona desde países cercanos (India, Brasil, y Australia), donde aún se utilizan pese a estar prohibidos. Esta hipótesis se fundamenta en que en estudios previos han demostrado que solo se encontró endosulfan sulfato en núcleos de hielo a una cierta profundidad, cuya presencia fue justificada por una contaminación antigua. Sin embargo, en nuestro caso, no se ha encontrado endosulfan sulfato, lo que refuerza nuestra hipótesis de contaminación actual.

En este estudio también se han encontrado compuestos que corresponderían por tiempo de retención a los PCBs (28, 52, 101, 118, 138, 153, y 180) los cuales han sido descritos en la atmósfera y en Krill, principal alimento de pingüino de la fauna antártica.

Se han encontrado también compuestos persistentes como los BDEs (17, 28, 47, 138, 153, 183, 99 y 100). La presencia de los mismos se halla descrita en estudios realizados sobre sedimento y biota marina. La presencia de estos compuestos se debería al amplio uso de los mismos en todos los materiales plásticos (muebles, enseres, ropa y aparatos electrónicos), ya que estos contienen niveles porcentuales de los PBDE que se usa como retardante de llama. De hecho, Hale y col. 2008 sugieren que la presencia de los mismos en la Antártida tengan aportaciones de fuentes locales debido a la limitados movilidad ambiental de estos

¹⁸² Hale, R. C., S. L. Kim, et al. (2008). "Antarctic Research Bases: Local Sources of Polybrominated Diphenyl Ether (PBDE) Flame Retardants." *Environmental Science & Technology* 42(5): 1452-1457.

compuestos y que la presencia de los mismos sea alta en las bases y sus cercanías, disminuyendo al alejarse de las mismas. Un estudio realizado Yogui y Sericano, 2009¹⁸³ en matrices acuáticas en EEUU refiere que los PBDE son ubicuos en todos los compartimentos como el agua, los sedimentos y la biota, por lo que podría en este caso justificar su presencia en nuestro estudio, ya que los PBDEs encontrados son los que más uso tienen (BDE 47, 99 y 100 típicamente dominan la composición de PBDE en la mayoría de las muestras y exhiben altas concentraciones en varias matrices. BDE 17, 28, 33, 49, 153, 154 y 155 también son de interés).

También se ha observado que la distribución de COPs difiere según la familia así, se ha encontrado mayor cantidad de pesticidas en fase disuelta a diferencia de los PCBs y BDEs que parecen encontrarse en mayor concentración en la fase particular.

Según Tanabe y col, 1983 las muestras de la nieve y el hielo contiene mucha mayor concentración de PCBs, DDTs y HCH en comparación con las muestras de agua. Esto implicaría que la nieve y el hielo sean un medio de suministro de estos contaminantes en la Antártida al medio ambiente marino.

I.7. Determinación de HAPs en aguas Antártida mediante la GC-EI-MS

I.7.1. Materiales-Equipo

Muestra

Se trabajó con la misma muestra utilizando como surrogate un mix de HAPs deuterados.

Equipo

Para la determinación de HAPs se utilizó el mismo equipo utilizado para determinar COPs, es decir un cromatógrafo Agilent 6890 de gases acoplado a un espectrómetro de masas Agilent 5973N con un inyector automático Agilent 7683 (Agilent Technologies, Heilbronn, Alemania), variando en este caso la fuente de ionización pues la misma da lugar a un fraccionamiento más fuerte que NCI que es recomendada para estos compuestos.

¹⁸³ Yogui, G. T. and J. L. Sericano (2009). "Polybrominated diphenyl ether flame retardants in the US marine environment: A review." *Environment International* **35**(3): 655-666.



I.7.2. Metodología

Las determinaciones se llevaron a cabo en un equipo GC-MS utilizando una fuente de ionización de impacto electrónico (GC-MS-EI), para la separación se utilizó la misma columna cromatográfica (Agilent HP-5MS, Folsom, CA USA). El programa de temperatura que se utilizó en el horno fue: temperatura inicial de 80 °C que se mantuvo por 1 min ascendiendo luego a 6 °C min⁻¹ hasta 175 °C la cual se mantuvo por espacio de 4 min, se volvió a subir la temperatura a 3 °C min⁻¹ hasta 235 °C para finalmente incrementarla a 8 °C min⁻¹ hasta 320 °C durante 20 min. El volumen de muestra que se utilizó fue 2 µl en modo splitless (el tiempo de splitless fue de 0.80 min). Se trabajó con helio (pureza 99,99%) como gas portadora a un flujo de 1.8 mL min⁻¹ con una presión constante de 18,2psi. La temperatura inicial del horno fue de 60 °C durante 1 min, aumentando la temperatura en un rango lineal hasta 175 °C en un lapso de 6 min, volviendo a subir a 235 °C en 3 min y finalmente a 300 °C en un tiempo de 2 min, dejando esta temperatura por espacio de 5 min.

La temperatura del inyector, de la línea de transferencia al detector de masas y la fuente de iones fue 300, 300 y 200°C, respectivamente. El tiempo total del análisis fue de 66.46 min.

El espectrómetro de masas fue operado en el modo de impacto electrónico (EI, 70 eV). La tensión del multiplicador de electrones se fijó en 1600V. La adquisición de datos se realizó en modo SIM, de acuerdo con los parámetros que se muestran en la tabla 17. En la mayor parte de los casos se eligieron los tres iones más abundantes para la identificación de los compuestos, seleccionando de entre ellos el más alto para la cuantificación, al igual que en el anterior caso. Los iones seleccionados se verificaron con el tiempo de retención.

La cuantificación se llevó a cabo mediante inyección doble. En esta tabla también se incluyen las características analíticas con las que se trabajó para determinar la concentración de HAPs presentes en aguas dulces de la Antártida. Para determinar los parámetros de analíticos del análisis se trabajó con una recta de calibrado de 10-1000 pg µL⁻¹.

Tabla 17. Lista de HAPs estudiados, ordenados en función a los tiempos de retención obtenido mediante GC-MS-EI modo SIM.

Time window (min)	Id. num	Compound	Rt (min)	Ions monitored m/z	IDL pg injected	MDL pg/L water	MDL pg/L PM	F	R2	%R	Repetitivity
4 a 10		Nap _{d8}	6.74	136*	0.13	1.18	1.21				3.8
	1	Nap	6.80	127, 128*, 129	0.22	0.18	0.27	2.408	0.9997		10
10 a 16.4		Acy _{d8}	12.08	160*							14.1
	2	Acy	12.11	151, 152*, 153	0.20	1.36	0.62	2.602	0.9989		7.6
	3	Ace	12,77	152, 153*, 154	0.27	1.55	1.38	1.867	0.9989		7.3
	4	Fluo	14.77	163, 165, 166*	0.26	1.03	0.77	1.976	0.9990		7.7
16.4 a 22		Phe _{d10}	18.52	184, 188*							8.2
	5	Phe	18.61	176, 178*	0.22	0.54	0.23	2.998	0.9988		8.1
		Ant _{d10}	18,8	184, 188*							10
	6	Ant	18,89	89*, 176, 178	0.26	0.72	0.25	23.61	0.9965		9.6
32 a 41		Flt _{d10}	26.47	106/212*							8.2
	7	Flt	26.60	101, 200, 202*	0.18	0.59	0.19	2.787	0.9966		8.9
		Pyr _{d10}	27.99	106/212*							7.7
	8	Pyr	28.11	101, 200, 202*	0.21	0.72	0.28	3.161	0.9960		8.7
	9	BaA	37.48	114/226/228*	0.18	1.09	0.35	2.104	0.9968		8.1
	10	Chry	37.70	114/226/228*	0.18	1.43	0.40	2.234	0.9960		4.7
41 a 52	11	BbF	44.22	126, 250, 252*	0.16	2.38	0.50	2.424	0.9978		8.7
	12	BkF	44.37	126, 250, 252*	0.23	2.10	0.50	2.510	0.9971		5.7
		BaP _{d12}	45.39	132, 264*							10
	13	BaP	45.48	126, 250, 252*	0.18	4.23	0.81	2.695	0.9987		6.9
	14	IcdP	48.96	138, 276*, 277	0.10	1.64	0.20	3.727	0.9921		13
	15	DahA	49.12	139, 276, 278*	0.21	0.38	2.36	2.354	0.9976		10.7
	16	BghiP	49.57	144, 288*	0.15	1.36	0.73	4.765	0.9855		7.4

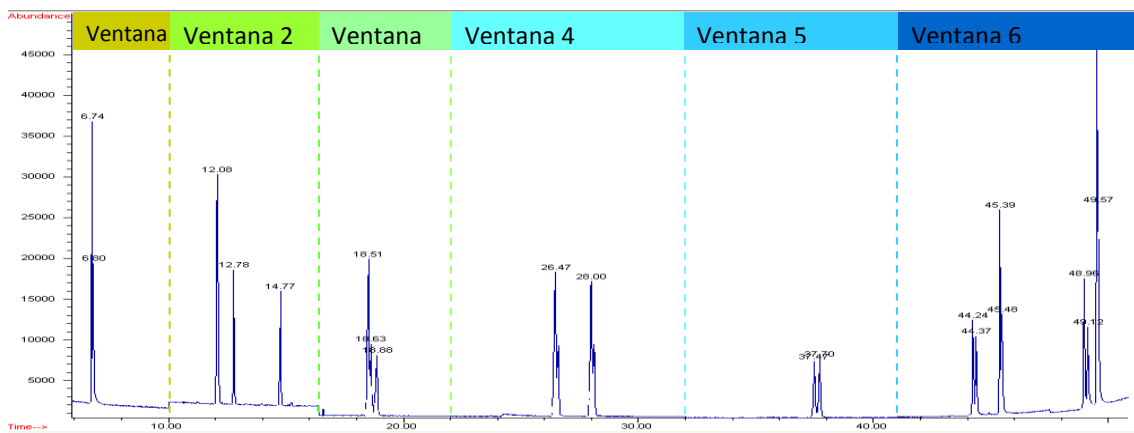


Fig. 36. TIC de patrones utilizados para determinar los tiempos de retención.



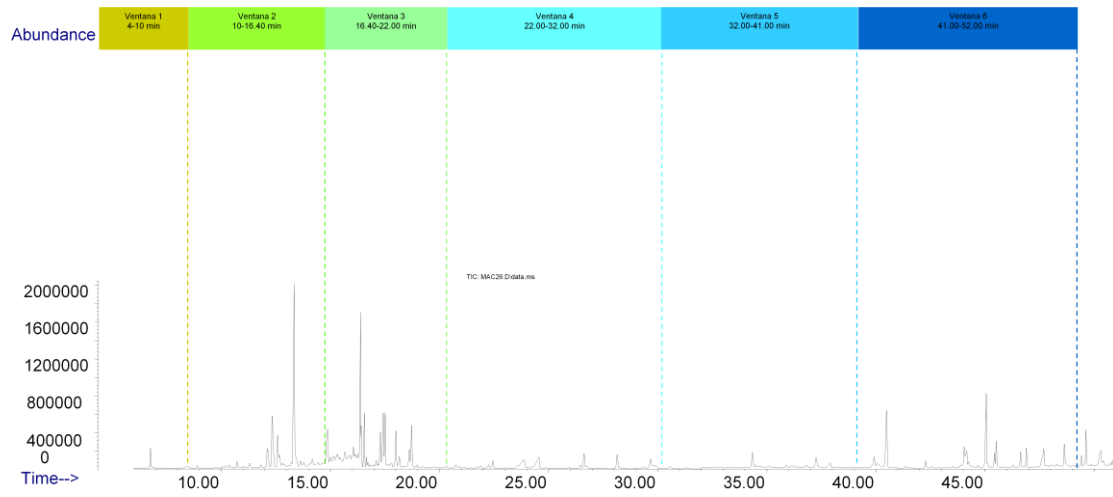


Fig. 37. TIC de patrones utilizados para determinar los tiempos de retención.

Table 19.Concentración de HAPs en agua dulces de la Antártida (fase particulada)

	Nap	Acy	Ace	Flu	Phe	Ant	Flt	Pyr	BaA	BkF	BaP	IcdP	DahA	BghiP
1	6.31	3.39	11.05	2.60	40.51	4.37	11.82				2.13			0.27
2		1.80		26.17	117.91	22.54	16.98			2.35				
3		2.59	10.10	36.45	155.35	25.00	8.44							0.23
4	1.63			7.52	13.95	1.35	3.58	2.18					0.04	
5		31.25		50.19	164.48	23.13	14.27	9.13		2.01				21.75
6			4.55	9.77	20.07	3.12	9.69				1.03			
7	3.84	3.27	7.39	25.02	81.79	16.57	4.98				0.17	0.11		
8	10.21		21.25	58.38	153.95	22.27	10.60			0.82		0.31		0.37
9				31.60	101.42	15.47	5.35				0.26			
10						12.94	13.19			1.44				
11	32.25	7.50	19.96	60.75	133.31	22.14	2.40							
12				11.22	62.77	12.15	5.12							
13			19.64	51.31	140.90	23.73	27.00	57.45						
14		26.25	10.56	28.85	73.60	11.21	5.29	4.88		0.51				
15			16.84	38.56	129.29	19.98				0.79				
16				25.13		18.56	5.27			0.54				
17		78.86	18.53	68.23	200.56	35.40	16.21		0.64	0.76	0.23			
18		61.97	16.15	43.70	96.21	19.69	7.16	5.81		0.43				
19		167.64	29.06	121.10	187.36	33.70	10.51				0.60			
20	0.43				96.52	19.18	6.63		0.35					0.29
21		93.42	26.53	61.44	175.29	23.26	7.84	12.60						
22		50.52	17.23	48.45	115.23	18.51	12.45	10.34		0.79	0.45			
23				45.95	137.16	19.68	8.13	11.64			0.38			

Las tablas 18 y 19 muestran los HAPs detectados en cada muestra en fase disuelta y en fase particulada respectivamente. Los resultados que el porcentaje de error en los valores de la relación oscila entre 12% y 6%.

La DER en ambos casos fue menor al 15% obteniéndose así un DER de 10% para fase disuelta y 8.

I.7.3. Discusiones y resultados

Tabla 20. Resumen de los estudios previos sobre HAPs en la Antártica

Compuesto	Agua dulce	Niveles	Lugar	Ref.
HAPs total		0-9400 ng L ⁻¹	Mar de Wedell (agua de mar)	Comes y col., 1987
		50-200 ng L ⁻¹	Base de Investigación Signy (agua de mar)	Cripps, 1990
		345 ng g ⁻¹	Estación Palmer	Kennicutt y Champ., 1992
		2.24-7.79 ng L ⁻¹ (d.p)	Bahía Terra Nova-Mar Ross (agua de mar)	Cincinelli y col., 2005
		1.65-14.1 (p.f.)	Bahía Terra Nova-Mar Ross (agua de mar)	Cincinelli y col., 2005
		93-360pg L ⁻¹	Bahía Terra Nova-Mar Ross (agua de mar)	Fuocu y col., 2009
		2.14-8.11 ng L ⁻¹ (d.p)	Acceso a Gerlache , Mar Ross(agua de mar)	Stornini y col., 2009
		2.81-15.83 ng L ⁻¹ (d.p)	Acceso a Gerlache , Mar Ross(agua de mar)	Stornini y col., 2009

I.8. Determinación de trazas de metales mediante ICP-MS

Una de las consecuencias del aumento de la actividad humana en la Antártida también se refleja en el aporte de contaminantes además de orgánicos inorgánicos y entre ellos los metales. Por ende el propósito de este apartado fue determinar la composición química de las aguas dulces producto del deshielo obtenido durante el muestreo que se realizó para analizar COPs.

I.8.1. Materiales

Para el muestreo se emplearon envases de 2L de HPDE (Labscan-España), envases de LDPE (30 ml),

I.8.2. Equipos

En este apartado se utilizó un equipo ICP-MS Varian Liberty 100 Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometer ICP-AES; (revisar artículo Menguchia).

I.8.3. Metodología

Actualmente, los trabajos destinados a determinar metales traza, y en especial ultra-traza, tienen un cuidado especial a la hora de la recogida de muestras y su manipulación para evitar en lo posible problemas de contaminación. Para ello se recurre a la aplicación de técnicas limpias, las cuales serán abordadas posteriormente. Este hecho, unido a la



utilización de técnicas analíticas con menores límites de detección ha conseguido la obtención de valores fiables de concentración de metales traza en aguas.

Toma de muestra

El volumen de muestra a tomar en el caso de los metales fue de aproximadamente dos litros que sería el volumen necesario para realizar una medición por duplicado (700 ml).

Para este fin se colectaron un total de 14 muestras de agua dulce provenientes de deshielo, no tomándose en cuenta para este estudio aguas de deshielo que hayan sufrido algún tratamiento como el caso de las bases de investigación ni el agua potable de las ciudades de entrada y salida de la Antártida, por lo que su número es diferente al de los anteriores estudios (COPs y HAPs).

El muestreo se realizó en envases especialmente tratados para este propósito (envases cuya limpieza se realizó para determinar niveles traza) durante el tránsito realizado en BIO Las Palmas. Los mismos que incluyeron puntos de partida e inicio de campaña, bases, lagunas. También de forma paralela a la colecta de la muestra se efectuaron determinaciones de pH, conductividad eléctrica (CE), sales totales disueltas (STD) además de la posición exacta de cada muestra mediante la toma de coordenadas de cada punto como en el caso de los contaminantes orgánicos como se puede observar en la tabla 21.

La caracterización físico-química en el área inorgánica es muy importante pues permite tener una idea de los posibles procesos e interacciones que tienen lugar entre los elementos considerados y como antes ya se dijo constituye una primera aproximación a las aguas objeto de estudio.

Tabla 21. Descripción de las muestras con las que se trabajó (T, pH, STD, CE y posición geográfica (latitud y longitud))

	Muestra	Tº	PH	STD ppm KCl	CE µS	Latitud (S)	Longitud (W)
1	Ushuaia-Lago Escondido	10.20	7.77	45.20	74.70	54 39 31	67 52 22
2	Isla Rey Jorge. Base Jubany	1.20	6.50	29.10	60.40	62 14 32	58 39 41
3	Isla rey Jorge-Refugio elefante	1.20	5.50	71.40	145.00	62 15 29	58 37 89
4	Península Byers- Laguna escondida	4.90	5	114.00	236.00	62 40 00	61 05 78
5	Isla Livingstone- Laguna helada	1.40	6.50	30.10	62.70	63 38 42	3048562
6	Península -Byers-Rio cercano a Campamento Byers	4.90	6.50	114.00	236.00	62 38 00	61 05 00
7	Isla decepción-Caleta péndulo	1.60	7.86	16.10	34.90	62 55 57	60 35 41
8	Isla decepción –Bahía Balleneros	2.40	5.50	72.30	150.00	62 58 41	60 33 90
9	Península antártica-base Caleta cierva-	4.50	6.5	64.40	131.00	64 09 53	60 57 23
10	Isla Ronge	0.70	0.94	33.00	67.90	0.04629	0.09514
11	Islote Orne	0.50	7.00	215.00	452.00	0.09137	0.07879
12	Península Antártica- base Presidente Videla	1.50	6.00	11.60	5.60	0.01517	0.2905
13	Península Antártica- base Almirante Brown	3.60	6.00	12.30	26.80	0.03436	0.07446
14	Isla Yalour	1.50	7.00	19.40	40.20	0.00924	0.04425

Conservación de la muestra

Debido a que las muestras no se acidificaron pues el manejo de ácidos y bases no es recomendable por el peligro de contaminación que conlleva y que todas las prácticas realizadas en la Antártida deben ser lo más ambientales posibles, se decidió que inmediatamente después de coleccionar la muestra esta fuese congelada y conservada a -50°C siguiendo para ello lo que indica M. Stoepler 1997 quien indica que para preservar la distribución original de las especies en las muestras estas se pueden almacenar sin acidificar siempre y cuando sean congeladas.

De esta manera manteniendo la cadena de frío las muestras fueron recogidas en Cartagena del contenedor refrigerado y llevadas a Granada para luego ser enviadas a la Universidad de Cádiz para la determinación de trazas de metales que pudieran estar presentes por ICP MS. Este trabajo se logró gracias a la colaboración del Prof. Carlos Moreno y colaboradores del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Cádiz en Puerto Real.



Preparación de la muestra

Las muestras una vez en Cádiz fueron filtradas a través de un filtro de celulosa de 0,45 μm , el filtrado se recogió en botes en envases de LDPE (30 ml) totalmente limpios y tratados para la determinación de cantidades traza de metales. Las muestras fueron luego acidificadas a $\text{pH} < 2$ con HCl en una sala blanca clase 10000 que se encuentra ubicada en el Centro Andaluz de Ciencia y Tecnología Marina de la Universidad de Cádiz (CACYTMAR).

Una vez acondicionadas las muestras se procedió al análisis directo de cada una de ellas en el equipo de ICP-MS del mismo centro; lamentablemente algunos metales no se observaron. Por lo que una de las dificultades encontradas durante el análisis fueron las asociadas al análisis de metales traza en aguas, como ser las bajas concentraciones. Por esta razón se decidió realizar las pre concentraciones en la misma sala blanca, bajo una campana de flujo laminar con filtro ULPA (Clase II), que permite la evaporación de disolventes orgánicos en su interior en unas condiciones de atmósfera óptima para evitar la contaminación de las muestras debido a partículas presentes en el aire.



Fig. 38. Fotografías sala blanca.

Equipo.

Para la determinación de metales traza se utilizó un ICP-AES (Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometer) Varian Liberty 100 ICP-AES.



Fig. 39. Fotografía del equipo de ICP-MS de la Universidad de Cádiz.

En todos los casos las determinaciones que se realizaron utilizando la adición de patrón de cada uno de los elementos analizados.

Se analizaron los siguientes elementos: Al, Ag, Cd, Co, Cu, Fe, Mg, Mn, Ni, Pb, V y Zn. Se cuantificaron los siguientes elementos mediante un espectrómetro de masa con fuente de plasma de acoplamiento inductivo ICP/MS detectándose Mg, Al, V, Fe, Fe, Mg, Co, Ni, Cu, Zn, Ag, Cd, y Pb.

I.8.4. Resultados y discusiones

Se pudo observar que las aguas estudiadas son ligeramente ácidas ya que los valores de pH de las mismas varían entre 5.5 y 8, los cuales se encuentran dentro del rango normal descrito por la EPA que refiere el rango aceptable de pH entre 5 y 9. Solo se reportó un caso especial en el que la muestra de la isla Ronge reportaba un pH de 1. Esta muestra en particular presentaba mucho sedimento de color plomizo fino.

La conductividad eléctrica también se encontró aceptable ya que el rango de la misma variaba entre 19.4-434 NaCl ppm siendo lo máximo permitido 500 ppm KCl (EPA); respecto a las sales disueltas también estas se encontraron aceptables en un rango de 33/465 $\mu\text{S}/\text{cm}$ por debajo del límite permitido que es 750 $\mu\text{S}/\text{cm}$. Estos valores se pueden observar en la tabla de datos obtenida durante el muestreo (ver tabla 20).

A continuación en la tabla 21 se pueden observar los metales detectados y las concentraciones a las que estos fueron detectados, lo que da una visión global de los compuestos inorgánicos encontrados en la Antártida.



Como se puede observa en las muestras no se ha detectado sodio por lo que esto corrobora la naturaleza de las muestras de estudio (muestras de agua dulce)

Respecto a los metales encontrados se debe mencionar que se han encontrado Mg, Al, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Cd y al igual que un estudio realizado en la Isla Rey Jorge por Préndez y colaboradores, 1996¹⁸⁴ cuyo estudio también muestra la presencia de estos metales, y a diferencia de este estudio se observa la ausencia de K, Ca, Cr, Sn, Sb, Ba, As, Se, Te, Bi y Na como se mencionó antes. Pero se detectaron otros metales como Ag, Pb y V en cantidades del orden de ppt.

Tabla 21. Concentraciones promedio de los elementos traza obtenidos mediante análisis ICP-MS en ppb ($\mu\text{g/L}$) de los puntos de muestreo realizados en la Antártida.

COD	Mg	Al	V	Fe	Mn	Co	Ni	Cu	Zn	Ag	Cd	Pb
MA-001	137.1	11.49	0.25	0.26	0.8	0.02	0.58	0.62	0.31	0.00355	0.00797	0.01902
MA-002	84	14.24	1.27	0.2	0.07	0.08	0.35	1.37	0.36	0.00539	0.00088	0.00873
MA-003	273.2	103.5	11.32	1.55	0.39	0.02	4.41	2.31	2.65	0.00474	0.00105	0.01199
MA-004	558.3	28.65	2.46	0.33	16.57	0.004	0.07	1.34	0.61	0.00463	0.01147	0.84816
MA-005	78.19	22.95	1.03	0.5	0.7	0.004	0.07	0.63	0.66	0.00648	0.00296	0.01144
MA-006	146.7	12.21	0.25	0.17	0.84	0.11	0.49	3.58	12.73	0.0096	0.01096	0.06489
MA-007	30.05	28.39	5.51	0.48	1.33	0.004	0.07	0.38	0.3	0.00687	0.00306	0.05494
MA-008	139.9	43.75	49.82	0.35	0.85	0.02	0.07	0.42	0.63	0.00171	0.00196	0.04106
MA-009	135.6	210.4	0.52	1.14	54.33	0.04	1.82	1.87	6.56	0.00612	0.12534	0.06571
MA-010	44.46	29.17	0.7	2.15	9.78	0.004	0.07	1.35	2.26	0.00561	0.04629	0.09514
MA-011	354.5	26.69	0.81	0.84	3.51	0.02	0.07	0.7	1.05	0.02475	0.09137	0.07879
MA-012	16.25	7.03	0.37	0.35	1.1	0.13	0.47	12.37	6.31	0.05228	0.01517	0.2905
MA-013	79.14	38.58	112	0.37	1.13	0.02	3.94	n.d.	0.31	0.00632	0.03436	0.07446
MA-014	36.94	2.89	0.19	0.21	1.28	0.1	4.44	1.49	3.23	0.00352	0.00924	0.04425

Podemos indicar que se ha encontrado una menor cantidad de metales en las muestras analizadas que en otros estudios previos realizados en la Antartida. Esto se debe a que las muestras analizadas corresponden con muestras de agua dulce, sin embargo, los

¹⁸⁴ Préndez M. , Muñoz V. 1996. ... Ser. Cient. INACH 46:09-29.

estudios previos hacían referencia a muestras de agua superficial, agua de mar y nieve, como se puede observar en la tabla 22.

Tabla 22.-Rango de concentraciones de los metales encontrados en diversos puntos de la Antártida en referencia a un estudio realizado en la isla rey Jorge y Terra Nova Bay y datos referidos como cantidades normales según la OMS

Metal	Estudio realizado	Otros autores	Terra Nova Bay	OMS
Mg	16.25-558.8	2957		
Al	2.89-103.5	103		
Fe	0.2-1.14	217	0.008-74	1000
Co	0.004-0.13	28	0.003-10	-
Ni	0.07-4.41	99	0.03-2.9	-
Cu	0.42-12.37	133	0.013-1.7	1500
Zn	0.31-12.73	53	0.14-9.0	15000
Cd	0.002-0.12	52	0.00005-0.04	10
V	0.25-49.82	n.d.		
Ag	0.001-0.052	n.d.		
Pb	0.01-0.84	n.d.		

n.d.= no detectado

Así, comparando los valores obtenidos observamos que los mismo son concordantes con datos similares a los obtenidos por el estudio llevado a cabo por Cremisini y colaboradores, 1991¹⁸⁵.

Por otra parte los valores obtenidos de los diferentes metales están muy por debajo de los límites permitidos por la OMS (contenido de metales en agua potable) lo que no supone un peligro. Pero llama la atención la presencia de Pb, Ag y V cuya presencia pueden ser una muestra de contaminación antropogénico.

Para ver si existía una correlación entre el contenido de metales y las otras variables como pH, CE, STD. Se realizo un análisis de clúster

¹⁸⁵ Cremisini e al, 1991



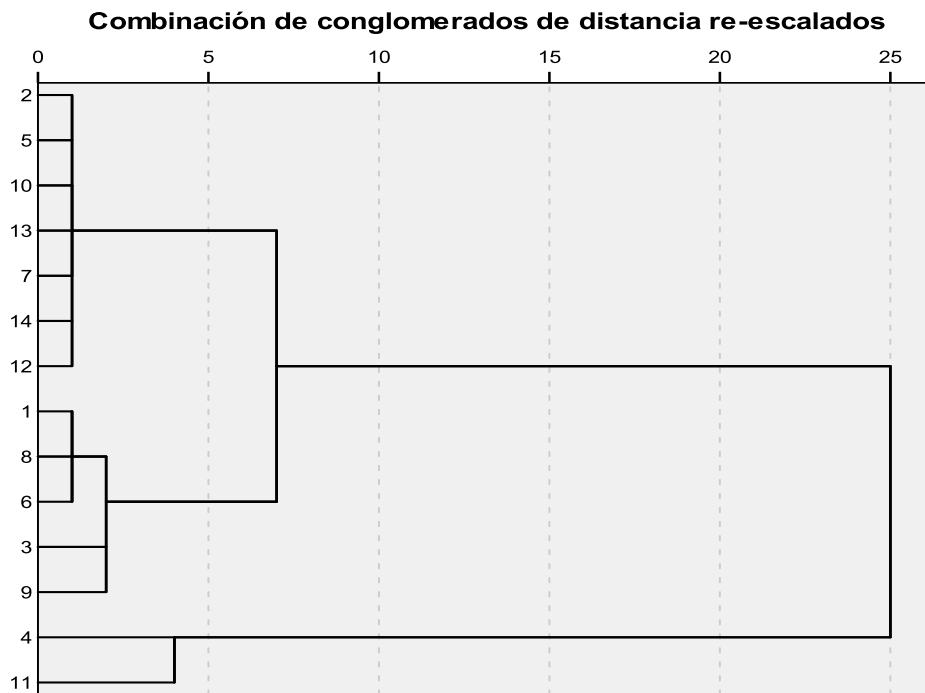


Fig. 40. Dendrograma que utiliza una vinculación de Ward

Finalmente se llevo a cabo un análisis de PCA en el que se puede observar que la mayoría de la muestras guardan una correlación entre las mismas y que sólo las muestras MA-012, MA009, MA004 y MA011, que corresponden a cercanías de la base presidente Videla (península antártica), caleta cierva (península antártica) y laguna escondida (península Byers), islote Orne respectivamente se alejan del resto de las muestras.

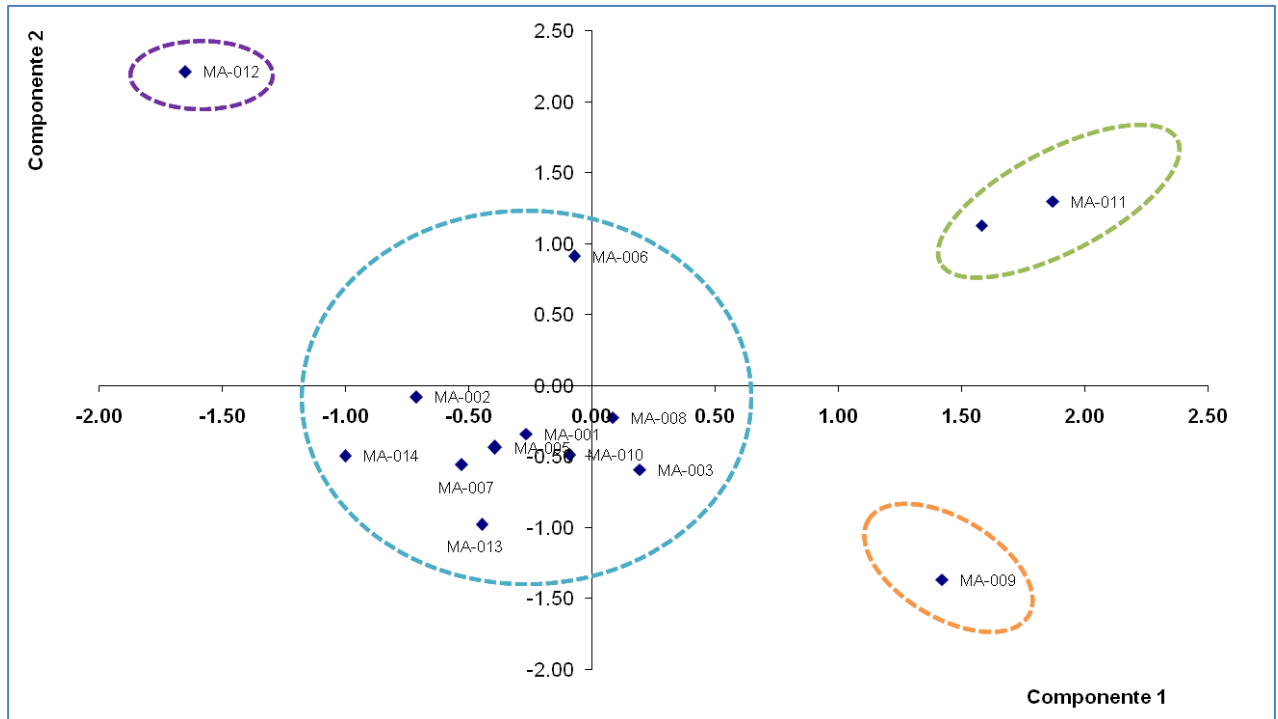


Fig. 41. PCA de distribución de datos de metales encontrados en la Antártida.

Conclusiones

Según los resultados obtenidos en el estudio de determinación de contaminantes inorgánicos en aguas dulces de la Antártida se pudieron evidenciar muy bajas concentraciones de metales en estas aguas debajo incluso de los límites permitidos por la OMS (cantidades permitidas de metales en aguas potables). Pero se han evidenciado también la presencia de Pb, Ag y V los cuales son metales que estarían presentes en esta zona debido a la contaminación antropogénica.



La Química es nuestra vida y futuro
Germán Llanos
Dir. Cs. Qcas. UMSA

Capítulo II

Desarrollo de una fase sensora para CO₂



OBJETO DEL CAPÍTULO

El objeto del presente capítulo es el diseño y puesta a punto de una fase sensora sensible al analito dióxido de carbono (CO_2), debido a la importancia que tiene la detección y determinación del mismo en ambientes gaseosos y líquidos.

Esta fase sensora se basará en un nuevo copolímero (NP1X) el cual es fluorescente, sensible a pH y que tiene un pka de ~ 8.5 ; condiciones ideales en un material para el desarrollo de fases sensoras ópticas sensibles a CO_2 . Esta fase sensora utilizará la atenuación de intensidad luminiscente (disminución de fluorescencia proporcional a la cantidad de CO_2). Para su valoración y optimización se procederá a realizar una caracterización espectroscópica y analítica, se evaluará su estabilidad frente a gases interferentes y se realizará un estudio de degradación en diferentes condiciones ambientales.

Además se evaluarán diversos sistemas de medida. Así, en primer lugar, se utilizará instrumentación de medida estándar de laboratorio, tal como un espectrómetro de luminiscencia y posteriormente se demostrará su utilidad usando dispositivo de carga acoplada CCD (del inglés Charge-coupled device) que permita demostrar su aplicabilidad en el futuro desarrollo de un sistema portátil y barato para determinar CO_2 en muestras gaseosas y líquidas.



II.1. Generalidades del dióxido de carbono

El dióxido de carbono es uno de los analitos más importantes en la tierra y según su estado y cantidad posee diferentes propiedades que pueden ser útiles o peligrosas.

Así, por ejemplo, en condiciones ambientales normales de presión y temperatura se encuentra de manera natural en la atmósfera en un 0.03%, constituyendo un gas minoritario. Un aumento de su concentración resulta peligroso, pues debido a sus propiedades radiativas, da lugar al calentamiento global; por lo que se encuentra en la lista de gases invernadero.

El CO_2 es, por otra parte, la base del metabolismo celular, regulando funciones importantes como la respiración (que regula el pH fisiológico) y la fotosíntesis (generación de oxígeno). Así también es muy útil en el campo de la industria, medicina, bioquímica, etc., como se verá más adelante.

El CO_2 se produce y emite a la atmósfera a partir volcanes, aguas termales, géiseres, etc., y se libera de las rocas carbonatadas por disolución. Pero el aporte principal de este gas a la atmósfera se produce por la combustión del carbón o hidrocarburos, la fermentación de los líquidos y la respiración de los humanos y de los animales. Este gas es eliminado de la atmósfera mediante “sumideros” naturales como los océanos y las plantas.

II.1.1. Estructura molecular

El CO_2 es una molécula compuesta por dos átomos de oxígeno y uno de carbono. Es una molécula lineal y no polar, a pesar de tener enlaces polares.

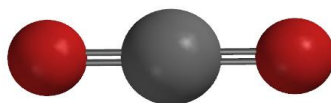


Fig.42.Estructura molecular de dióxido de carbono.

II.1.2 Nomenclatura e historia

Según la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (I.U.P.A.C.), este analito se denomina óxido de carbono (IV) o dióxido de carbono.

El dióxido de carbono fue uno de los primeros gases en ser descritos como una sustancia distinta del aire. Así, en el siglo XVII, el químico flamenco Jan Baptist Van Helmont



indicó que éste se producía tras fenómenos de combustión y fermentación, pero no fue hasta 1750 cuando fue descubierto como tal por el químico-físico escocés Joseph Black, quien lo denominó “aire fijo”, indicando que tenía la propiedad de ser más pesado que el aire.

La primera descripción de dióxido de carbono sólido fue dada por Carlos Thilorier, en 1834. Y fue Svante Arrhenius el primer científico que determinó la importancia potencial del dióxido de carbono (CO_2) en el clima, pues en 1886 propuso que la temperatura de la Tierra era controlada por las propiedades radiativas del CO_2 . Sin embargo, no fue hasta 1938 cuando George Callendar obtuvo la primera evidencia del incremento de CO_2 en la atmósfera. Dos décadas más tarde, en 1957, Charles Keeling inició un proyecto de medida continua y precisa del CO_2 atmosférico en la red de vigilancia a nivel mundial. Los datos de Keeling obtenidos en la estación de Mauna-Loa (Hawaii) donde a partir de 1958 demostrarían de forma inequívoca el inexorable incremento de CO_2 .

II.1.3. Propiedades físico-químicas del CO_2

El CO_2 es un gas incoloro e inodoro a bajas concentraciones, pero a altas concentraciones es un gas amarillento que presenta un olor fuerte y ácido.

Es un compuesto inerte que tiene un peso molecular de 44 g/mol. A la temperatura de $-56.60\text{ }^\circ\text{C}$ y presión de 417 kPa el dióxido de carbono se encuentra en sus tres fases simultáneamente, siendo éste su correspondiente punto triple; sublima a $-78,50\text{ }^\circ\text{C}$ formando nieve carbónica y está en estado gaseoso a una temperatura crítica de $31,06\text{ }^\circ\text{C}$, posee una densidad relativa respecto al aire de 1,52 a $15\text{ }^\circ\text{C}$ y al agua de 0,82 a $15\text{ }^\circ\text{C}$, refiere una presión de vapor de 57,3 a $20\text{ }^\circ\text{C}$ y es poco soluble en agua $870\text{ cm}^3/\text{L}$ a $20\text{ }^\circ\text{C}$ aumentando al disminuir la temperatura.

II.1.4 Aplicaciones

Debido a que el dióxido de carbono puede existir en diferentes estados dependiendo de su temperatura y presión, las aplicaciones del mismo son varias, especialmente en la industria. Éstas se resumen en la Tabla 23.

Tabla 23.Aplicaciones del CO₂

Industria	Aplicaciones
Química	Control de la temperatura en reactores. Neutralización de efluentes alcalinos. Purificaciones o para operaciones de teñido de polímeros, fibras animales o vegetales.
Alimentos y bebidas	Carbonatación de bebidas. Mantenimiento de productos alimenticios. AMP Fluido criogénico en operaciones de enfriamiento o congelación. Nieve carbónica. Extracción de sustancias.
Metalurgia	Elimina los humos rojos durante las cargas de chatarra y carbón. En la metalurgia de no féreos, el dióxido de carbono suprime los humos durante la transferencia de mata (producción de Cu/Ni) o lingotes de metales preciosos (producción de Zn/Pb).
Electrónica	Tratamiento de efluentes líquidos o durante el enfriamiento de los componentes en los ensayos de componentes electrónicos. Aumentar la conductividad del agua ultra pura o para limpiar los abrasivos de piezas como nieve carbónica y en el propio proceso de limpieza de las resinas fotosensibles al CO ₂ supercrítico, a fin de evitar la utilización de disolventes orgánicos.
Ambiental	La inyección de dióxido de carbono permite manejar el pH de los efluentes líquidos. El CO ₂ es una excelente alternativa para el control del pH del ácido sulfúrico.
Farmacéutica	Inertización, síntesis química, extracción con fluidos supercríticos, neutralización (pH) de aguas residuales o de proceso y transporte a baja temperatura (-78°C ó -108°F).
Médica	Produce una atmósfera similar a las condiciones fisiológicas útil durante la manipulación de órganos artificiales. Mezclado con el aire o el oxígeno se usa como estimulante para mejorar la aireación del sistema respiratorio. Sirve además, en la dilatación quirúrgica para la realización de laparoscopia abdominal.
Laboratorios & análisis	El CO ₂ Supercrítico se usa como fase móvil en aplicaciones cromatográficas y de extracción.
Papelera	Regula el pH en la fabricación de pastas recicladas o químicas después de un blanqueamiento alcalino. El CO ₂ puede usarse en la neutralización de "tall oil" y para la mejora del funcionamiento de las máquinas de papel.
Otras industrias	Control de pH y neutralización. Utilizado en limpieza industrial (CLEANBLAST), en extintores (nieve carbónica).

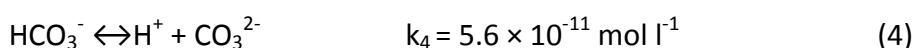
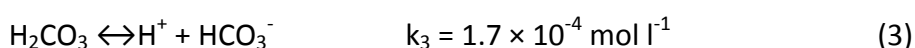
Debido a sus amplias aplicaciones, la detección y determinación cuantitativa de CO₂ gaseoso será importante en campos tales como: protección ambiental,



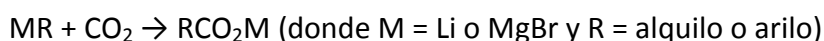
biotecnológico^{186,187} alimenticio¹⁸⁸ (desarrollo de paquetes inteligentes)¹⁸⁹ y médico (análisis de la respiración, valoración de desequilibrios del balance ácido-base, etc.)^{190,191}

II.1.5 Reacciones más importantes en las que está involucrado el CO₂

El CO₂ frente al agua actúa como ácido de Lewis dando lugar al ácido carbónico.



A partir de carbaniones como los proporcionados por los reactivos de Grignard y los compuestos de organolitio da lugar a carboxilatos:



En los complejos metálicos el CO₂ actúa como un ligando que facilita la conversión de CO₂ a otros productos químicos.

II.1.6 Toxicología del CO₂

Toxicológicamente el CO₂ se define como un gas asfixiante e irritante, peligroso en altas concentraciones para humanos y animales. Así la exposición a niveles entre 0,2% y 1,5% se considera preocupante; siendo el 7% el límite por encima del cual puede causar la muerte en humanos;¹⁹² aunque otros autores fijaron este límite en un 30%¹⁹³. El mecanismo

¹⁸⁶Ferguson J.A., Healey B.G., Bronk K.S., Barnard S.M., Walt D.R. 1997. *Analytica Chimica Acta* 340:123-131.

¹⁸⁷ Ge X., Kostov Y., Rao G. 2005. *Biotechnology and Bioengineering* 89:329-334.

¹⁸⁸ Von Bultzingslowen C., McEvoy A.K., McDonagh C., MacCraith B.D., Klimant I., Krause C., Wolfbeis O.S. 2002. *Analyst* 127:1478-1483.

¹⁸⁹ Puligundla P., Jung J., et al. 2011. "Carbon dioxide sensors for intelligent food packaging applications." *Food Control* 25(1): 328-333.

¹⁹⁰ Mills A., Lepre A., Wild L. 1997. *Sensors and Actuators B: Chemical* 39:419-425.

¹⁹¹ Cooney C.G., Towe B.C., Eyster C.R. 2000. *Sensors and Actuators B: Chemical* 69:183-188.

¹⁹² Mazzoldi A., T. Hill, et al. 2009. "A Consideration of the jet-mixing effect when modelling CO₂ emissions from high pressure CO₂ transportation facilities." *Energy Procedia* 1(1): 1571-1578.

de acción se debe a que el CO₂ desplaza el oxígeno produciendo una rápida insuficiencia circulatoria¹⁹⁴.

II.2. Métodos analíticos de determinación de CO₂

Existe una gran cantidad de métodos que permiten la detección y determinación de CO₂. Los cuales se pueden clasificar en:

- ✓ Métodos químicos o clásicos (aquellos que se basan en realizar reacciones químicas).
- ✓ Métodos fisicoquímicos (aquellos que se basan en interacciones físicas o instrumentales).

II.2.1 Métodos químicos o clásicos

Fueron los primeros métodos químicos que se desarrollaron desde 1812 para medir el contenido de CO₂ gaseoso fueron tres: gravimétrico, volumétrico y manométrico. Destaca de entre ellos el método volumétrico de Pettenkofer que se usó como método de referencia durante más de 100 años (por ser simple, rápido y exacto).

II.2.2 Métodos fisicoquímicos

Entre ellos se encuentran la colorimetría, la espectrometría de masas, la cromatografía de gases, y los métodos espectroscópicos y electroquímicos,¹⁹⁵ siendo estos dos últimos los más utilizados.

II.2.2.1. Métodos electroquímicos

En ellos destaca el electrodo de Severinghaus, método convencional para medir CO₂ en ambientes acuosos que consiste en un electrodo de vidrio relleno de una solución de bicarbonato de sodio cubierto por una membrana de teflón (PTFE) o silicona permeable sólo

¹⁹³Benson S.M., Hepple R., Apps J., Tsang C.F., Lippmann M., 2002. Lessons Learned from Natural and Industrial Analogues for Storage of Carbon Dioxide in Deep Geological Formations. Lawrence Berkeley National Laboratory.

¹⁹⁴ Frank Hues H. "The extreme carbon dioxide outburst at the Menzengraben potash mine 7 July 1953." Safety Science 50(3): 537-553.

¹⁹⁵Fatibello-Filho O., Andrade J.F., et al. 1989. "Piezoelectric crystal monitor for carbon dioxide in fermentation processes." Analytical Chemistry 61(7): 746-748.



para CO_2 e impermeable para agua y electrólitos. El fundamento del electrodo se basa en que el CO_2 en una solución acuosa forma ácido carbónico, que luego se disocia en un anión bicarbonato y un protón. El protón induce a un cambio de pH en la disolución electrolítica que puede ser medido por una sonda de pH.¹⁹⁶ Así, la modificación del pH es proporcional a la concentración de CO_2 en la muestra. Hasta hoy en día el electrodo de Severinghaus es el método convencional de medida de CO_2 disuelto y gaseoso.

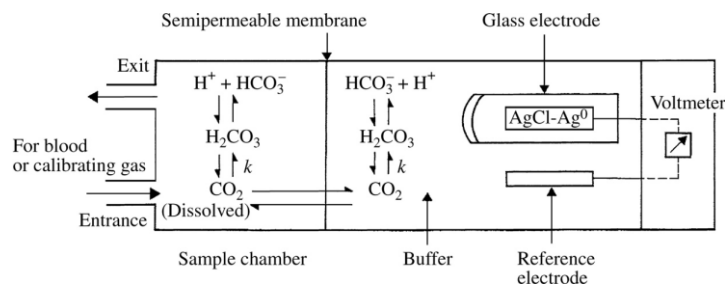
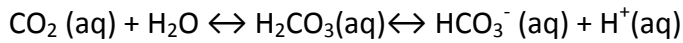


Fig.43. Esquema electrodo Severinghaus

Sin embargo, este método es caro, voluminoso, susceptible a las interferencias y de respuesta lenta¹⁹⁷.

Entre los sensores conductimétricos desarrollados para medir CO_2 , la bibliografía refiere el sensor de CO_2 desarrollado por Varlan y Sansen (1997),¹⁹⁸ que difiere ligeramente del electrodo de Severinghaus pues el parámetro que se mide es la diferencia de conductividad producida en el medio líquido tras la reacción del dióxido carbono y la solución de bicarbonato. Este tipo de sensores puede medir concentraciones de CO_2 entre 0 y 11 kPa con una respuesta muy rápida. La ventaja de este tipo de sensores es que no requiere el uso de un electrodo de referencia.

II.2.2.2. Métodos espectrométricos

Entre los métodos espectrométricos para la detección de dióxido de carbono en fase gaseosa, el más convencional es el que se realiza a través de mediciones espectroscópicas no

¹⁹⁶ Severinghaus J.W., and Bradley A.F. 1958. "Electrodes for blood pO₂ and pCO₂ determination." *Journal of applied physiology* 13(3): 515-20.

¹⁹⁷ Dansby-Sparks RN, Jin J, Mechery SJ, Sampathkumaran U, Owen TW, Yu BD, Goswami K, Hong K, Grant J, Xue Z-L. 2009. *Analytical Chemistry* 82:593-600.

¹⁹⁸ Roxana Varlan A. and Sansen W. 1997. "Micromachined conductometric p(CO₂) sensor." *Sensors and Actuators B: Chemical* 44(1-3): 309-315.

dispersivas en el infrarrojo, denominado NDIR, que es considerado desde 1950 uno de los mejores métodos para la medición de este gas.

El fundamento de este método consiste en determinar la presencia de CO₂ mediante la absorción del mismo en esta zona; en este caso la radiación infrarroja se hace pasar a través de un celda que contiene el gas, y la absorción cuantitativa de energía por el CO₂ es medida por un detector apropiado en un fotómetro no dispersivo que convierte la señal en un valor de concentración de CO₂.

Esta técnica es ampliamente utilizada,¹⁹⁹ de hecho fue adoptada como estándar analítico para la determinación del CO₂ en todo el mundo, incluyendo la Asociación Meteorológica Mundial (AMM). Se basa en la condensación criogénica de muestras de aire seguida de un análisis espectroscópico NDIR contrastado con un gas de referencia, usando calibración manométrica. Lamentablemente ve limitada su aplicación en fase acuosa debido a la intensa absorción intrínseca del agua.

II.2.2.3. Métodos cromatográficos

Dentro de los métodos cromatográficos destaca el uso de la cromatografía de gases con detección infrarroja,²⁰⁰ que permite detectar CO₂ a niveles de baja concentración (incluso ppm). Pero a pesar de que estos métodos son muy fiables, la complejidad de su instrumentación prohíbe la detección de CO₂ *in situ*, además de que su funcionamiento no es práctico por el tamaño, la complejidad de los equipos, y resultar caro para uso rutinario.²⁰¹ Frente a esto el uso de sensores para el análisis cuantitativo de CO₂ ofrece ventajas potenciales, por lo que se hará especial énfasis en este tipo de dispositivos.

II.3 Sensores desarrollados para CO₂

Los sensores químicos desarrollados hasta ahora para la determinación de CO₂ corresponden a dos grupos de sensores: electroquímicos y químico-ópticos.

¹⁹⁹ Wong J.Y., Shell M. 2011. Zero drift NDIR gas sensors, *Sens. Rev.* 31 70–77.

²⁰⁰ Van Dam J., and Daenens P. 1994. "Microanalysis of Carbon Monoxide in Blood by Head-Space Capillary Gas Chromatography," *Journal of Forensic Sciences*, Vol. 39, No. 2, pp. 473-478.

²⁰¹ Loftfield N., Flessa H., et al. "Automated Gas Chromatographic System for Rapid Analysis of the Atmospheric Trace Gases Methane, Carbon Dioxide, and Nitrous Oxide." *J. Environ. Qual.* 26(2): 560-564.



II.3.1. Sensores electroquímicos de CO₂

Los sensores electroquímicos son sensores químicos con sistemas de transducción electroquímica, los cuales a su vez se dividen en amperométricos, conductimétricos y potenciométricos.

Así, los sensores potenciométricos han demostrado gran aplicabilidad desde los años 30, destacando entre ellos el electrodo desarrollado por el Dr. John W. Severinghaus descrito anteriormente. Si bien los primeros sensores en desarrollarse fueron los electroquímicos hoy en día lo son los sensores químico-ópticos, debido a sus numerosas ventajas y los cuales han supuesto un importante avance.²⁰²

II.3.2 Sensores ópticos de CO₂

Los sensores ópticos desarrollados para detectar CO₂ pueden clasificarse en dos.²⁰³

II.3.2.1. Sensores ópticos húmedos

Fueron los primeros sensores que se desarrollaron para detectar CO₂ en ellos el indicador sensible al pH se encuentra disuelto en una solución de bicarbonato de sodio, la cual se halla contenida en una membrana permeable a CO₂ e impermeable a iones. Así, los componentes del mismo son: un indicador (forma aniónica, D⁻; forma protonada, HD), una disolución reguladora y una membrana cuya función principal es evitar la lixiviación del indicador y la interferencia de especies iónicas que afecten al pH, especialmente cuando se mida dióxido de carbono disuelto en agua.

Variaciones de este método incluyen el desarrollo de nuevos materiales como geles o materiales porosos, en los que se ha empapado una disolución de bicarbonato con el indicador de pH unido.²⁰⁴⁻²⁰⁶

²⁰² Pejčić B., Eadington P., Ross A. 2007. Environmental Monitoring of Hydrocarbons: A Chemical Sensor Perspective. *Environm.Sci. Technol.* 41, 6333-6342.

²⁰³ Mills A. and Hodgen S. 2005. Fluorescent carbon dioxide indicators. *Topics in Fluorescence Spectroscopy Advanced Concepts in Fluorescence Sensing Part A: Small Molecule Sensing.* 9 pag 121.

²⁰⁴ Wolfbeis O., Weis L., Leiner M., Ziegler W. 1988. *Anal. Chem.*, 60, 2028.

²⁰⁵ Uttamlal M., Walt 1995. *D. Bio/Technology*, 13, 597.

²⁰⁶ Hauser P., & Liang C. 1997. All solid-state instrument for absorbance based optical gas sensor membranes. *Instrumentation Science & Technology*, 25(2), 147e156.

Otros sensores húmedos desarrollados se basan en el trabajo pionero de Lubbers y Opitz en los que se reemplazan los indicadores de pH que registran cambios colorimétricos, indicadores de pH basados en el cambio de intensidad luminiscente. Esto ayudó a fomentar la generación posterior de muchos otros sensores, donde la intensidad de la emisión luminiscente puede ser relacionada con la concentración de gas presente en la muestra.

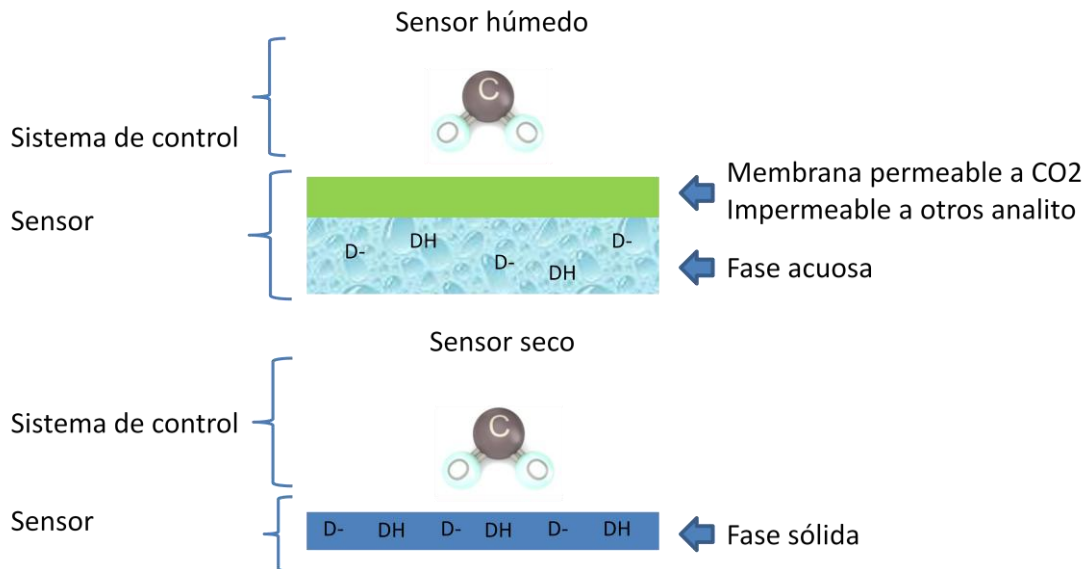


Fig.44. Esquema de las principales características de los dos sensores ópticos, húmedo y seco para dióxido de carbono. Fuente Mills, A. and M.-I. Baraton (2009).²⁰⁷

Si bien estos sensores son de gran utilidad, presentan algunas desventajas que limitan su uso. Así, las fases sensoras están influenciadas por la presión (mediciones en CO_2 gaseoso) o la presión osmótica (CO_2 disuelto). Además, se ha demostrado que su hidratación o deshidratación interfiere en el rendimiento del sensor. Por ello, su uso actual es limitado.

II.3.2.2. Sensores secos

En este tipo de sensores, la fase sensora es un soporte inerte en el que se inmovilizan las sustancias que detectan y cuantifican al analito, CO_2 en este caso. Por lo tanto, un sensor seco de CO_2 comprende: un compuesto ópticamente activo sensible al pH, un agente de transferencia de fase que capte el CO_2 y un polímero que proporcione cohesión y soporte a todos estos reactivos.

²⁰⁷Mills A., and M.-I.2009. Optical Sensors for Carbon Dioxide and Their Applications Sensors for Environment, Health and Security, Springer Netherlands: 347-370.



Estas fases sensoras a diferencia de las anteriores, no contienen un solución reguladora acuosa, la cual es remplazado por el agente de transferencia de fase (hidróxido de amonio cuaternario) que se utiliza para solubilizar el indicador de pH en el medio hidrófobo del polímero, así como regular el intercambio de H^+ entre el CO_2 y el indicador óptico de pH.

Dentro de los sensores secos, en función de la propiedad óptica medida, las fases sensoras desarrolladas para CO_2 se pueden clasificar en tres tipos **¡Error! Marcador no definido.:**

- a) Aquellas que contienen un indicador de pH colorimétrico.
- b) Aquellas que contienen un indicador de pH luminiscente^{208,209}.
- c) Aquellas que contienen un indicador de pH ópticamente activo co-inmovilizado con un indicador de referencia interno.

Una de las estrategias más prometedoras para el diseño de fases sensoras ópticas de CO_2 es la que refirió Mills y *col.* en 1997, donde la fase sensora estaba basada en la co-inmovilización de un indicador de pH hidrofílico y un agente de transferencia de fase como el hidróxido de tetraoctil amonio (TONOH). Esta fase sensora fue posteriormente optimizada por el grupo de investigación de la Prof. U.E. Spichiger (ETH-Zürich) demostrando que las características deseables que debe cumplir el indicador de pH son: un pKa mayor de 7.5 y poseer dos tipos de grupos funcionales, uno susceptible de ser desprotonado (por ejemplo un fenol) y otro que estabilice la carga negativa (por ejemplo una lactona, un sulfito o un diazo) **¡Error! Marcador no definido..**

Lamentablemente, como se mencionó en las desventajas de los sensores ópticos, los fenómenos de fotodescomposición de los indicadores, su precipitación en la membrana líquida y los tiempos de recuperación son a menudo insalvables para que puedan tener una aplicación real. Con objeto de mejorar sus prestaciones y con la idea de encontrar soluciones a estos inconvenientes, existe hoy en día un gran esfuerzo investigador dirigido a encontrar nuevos materiales que den lugar a sensores más robustos y apropiados.

²⁰⁸ Mills, A. and Q. Chang. 1993. "Fluorescence plastic thin-film sensor for carbon dioxide." *The Analyst* 118(7): 839-843.

²⁰⁹ Mills A., Lepre A., et al. 1997. "Breath-by-breath measurement of carbon dioxide using a plastic film optical sensor." *Sensors and Actuators, B: Chemical* 39(1-3): 419-425.

Así, Medina Castillo y *col.*²¹⁰ diseñaron un polímero funcional que posee propiedades químicas y físicas óptimas para el diseño de una fase sensora óptica sensible a CO₂ (véase la Fig. 45). Este nuevo copolímero funcional es insoluble en agua pero permeable a la misma, es estable, luminiscente, sensible a pH (pK_a ~8.5) y el indicador luminiscente de pH está incorporado (unido covalentemente) a la estructura polimérica. Por tanto, cuando se evapora el disolvente, el indicador de pH queda unido covalentemente al soporte. De esta forma se evita su salida de la fase sensora así como su precipitación. Además, este polímero funcional contiene un grupo lactona capaz de estabilizar la carga, por lo que reúne todas las características establecidas para ser útil en el desarrollo de fases sensoras ópticas sensible a CO₂.

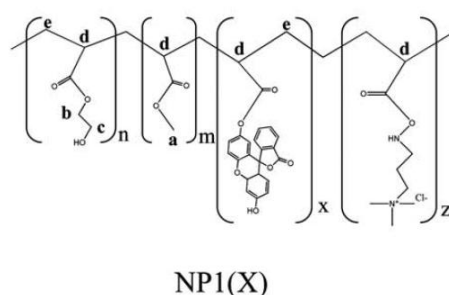


Fig.45. Estructura del copolímero lineal NP1X

Hasta la actualidad, este polímero funcional se ha usado para el desarrollo de fases sensoras sensibles a pH, pero nunca se ha testado para determinar CO₂. En esta memoria se partirá de este copolímero para el desarrollo de una nueva fase sensora que permita determinar CO₂ en muestras gaseosas y líquidas, intentando solventar algunos de los problemas habituales de este tipo de fases sensoras ópticas.

II.4. Establecimiento de las condiciones experimentales óptimas para el desarrollo de la nueva fase sensora

Se debe tener en cuenta que para el desarrollo de fases sensoras ópticas sensible a CO₂ se requiere de tres elementos: 1) polímero que incluya un indicador de pH hidrofílico con pK_a >7.5 y con dos tipos de grupos funcionales, uno susceptible de ser desprotonado

²¹⁰ Medina-Castillo A. L., Fernandez-Sanchez J. F., et al. 2011. "Design and synthesis by ATRP of novel, water-insoluble, lineal copolymers and their application in the development of fluorescent and pH-sensing nanofibres made by electrospinning." *Journal of Materials Chemistry* 21(18): 6742-6750.



(por ejemplo, un fenol) y otro que estabilice la carga negativa (por ejemplo una lactona, un sulfito o un diazo); 2) un agente de transferencia de fase; y 3) un disolvente.

II.4.1. Mecanismo de acción implicado en la detección de CO₂

El mecanismo de acción implicado en la detección de CO₂ se resume en la Fig. 46, el cual está basado en el intercambio de protones del indicador de pH químicamente inmovilizado en el polímero; que produce una disminución o atenuación de la intensidad del espectro de emisión la cual puede ser correlacionada con la concentración de la CO₂ presente en la muestra.

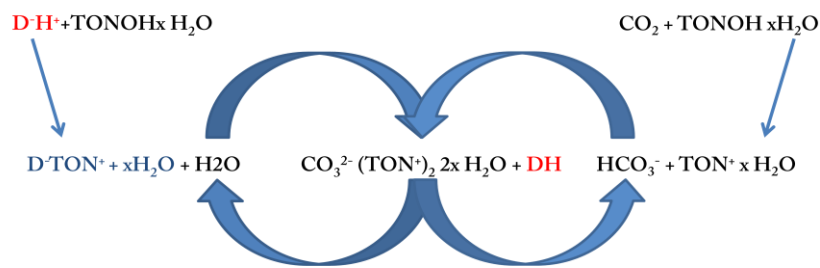


Fig. 46. Esquema de mecanismo de detección de CO₂

II.5. Materiales y Métodos

II.5.1. Reactivos

En este estudio se utilizó como polímero el copolímero NP1X que incluye un indicador sensible a pH con pKa de ~ 8.5 y que cuenta con un grupo fenol y un grupo lactona libre. Como agente de transferencia de fase se utilizó el hidróxido de tetraoctil amonio (TONOH) y como disolvente metanol. En este caso sólo fue necesario la coinmovilización del agente de transferencia de fase, para ello se preparó un cóctel que contenía estos tres elementos los cuales se depositaron por *spin-coating* sobre una mirilla de vidrio utilizada como soporte, el volumen de cóctel inyectado fue de 200 µL y la velocidad de giro utilizada fue de 300 r.p.m. en atmósfera de nitrógeno por espacio de 2 minutos.

II.5.2. Equipos

Para la preparación de las membranas se utilizaron: una balanza analítica Metler Toledo y para el preparado de las muestras un equipo de Spin coating.

Las mediciones para la caracterización espectroscópica de la fase sensora sensible a CO₂ en medio gaseoso se llevó a cabo utilizando un espectrómetro de luminiscencia Varian

Cary-Eclipse equipado con una lámpara de pulsos de Xe (con un pico de potencia a 75 kW), monocromadores Czerny-Turner, un tubo fotomultiplicador R-928 controlado mediante software.

Para la mezcla de gases se utilizó una estación de gases que contaba con cuatro controladores de flujo másico (MFC) Tipo de E-FLOW[®] de diferentes capacidades (20, 300 y dos de 500 ml/min). Se usaron tubos de teflón para realizar las conexiones entre la estación de gases y la celda de medida (tanto para medidas de gases como en disolución).

La estación de gases fue controlada por una unidad de control digital (interfase) conectada via RS-232 al puerto serie de un ordenador. La gestión de esta unidad de control (monitorización, control del proceso de mezclado de gases en los MFCs) fue llevada a cabo mediante un programa de ordenador desarrollado en lab VIEW 8.5. a través de una aplicación desarrollada a partir del programa LabVIEW 8.2 (permitiendo así controlar de forma automatizada el porcentaje de humedad el flujo y la concentración de gases a ensayar).

En todos los casos se llevaron a cabo tres réplicas para cada determinación, de forma que se pudiese establecer el error cometido.

El sistema de medida completo se muestra en la Fig.47, diseñado para demostrar la aplicabilidad de esta fase sensora a la determinación de CO₂.



Fig. 47. Fotografía del sistema de medida de CO₂ en fase gaseosa.

Las fases sensoras luego fueron sometidas a diferentes concentraciones de CO₂ tanto en estado gaseoso como disuelto en agua, así se registraron los cambios de intensidad de la emisión luminiscente en presencia y ausencia de CO₂. El tiempo de respuesta del analizador de CO₂ fue de 3s en medio gaseoso y de 15 s en medios acuosos, según la evaluación de la fase de latencia después de la entrada de concentraciones conocidas de CO₂. La Fig. 48 resume el esquema de fabricación de la fase sensora.



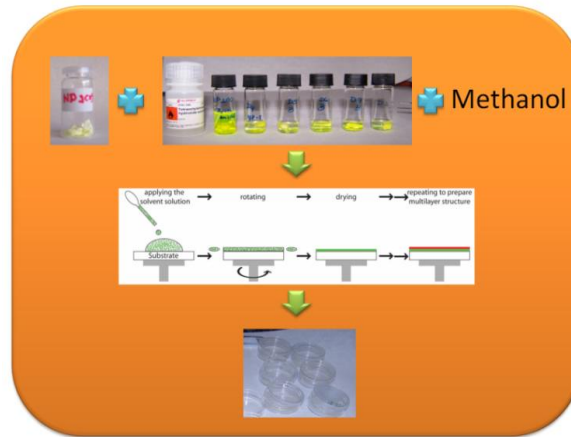


Fig. 48. Esquema de elaboración de las fases sensoras

II.6. Resultados y discusión

II.6.1. Determinación de las características espectroscópicas en fase gaseosa

Para comenzar el estudio se procedió a determinar las características espectroscópicas de la fase sensora. Para ello se expuso la fase sensora a un ambiente de 100% de N_2 con una humedad del 40% y posteriormente, a una atmósfera saturada de CO_2 con la misma humedad, para detectar posibles variaciones/cambios en sus características espectroscópicas. La Fig. 49 muestra las características espectroscópicas de la fase sensora compuesta por 50 mg/mL NP1X y 125 mg/mL TONOH en ausencia y en presencia de CO_2 gaseoso.

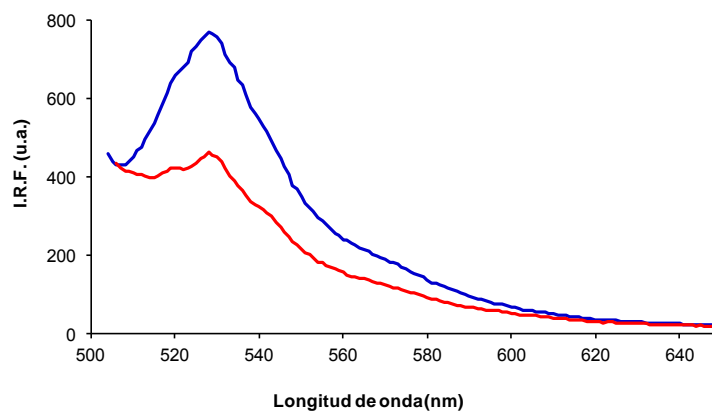


Fig. 49. Espectros de emisión de la fase sensora en fase gaseosa: en ausencia (—) y en presencia de CO_2 (—). λ_{exc} = 480 nm, rendijas_{exc/em} = 5/5 nm, average time 3s, voltaje del detector 650 V. RH=40%

Como se puede observar, la fase sensora presenta un máximo de emisión a 520 nm cuando se excita a 480 nm; propiedades espectroscópicas que coinciden con las del polímero funcional NP1(X).

II.6.1.1. Optimización de la composición de la fase sensora

Para optimizar la fase sensora se evaluaron cinco composiciones diferentes (véase la Tabla 24). En dicha tabla se mantuvo constante la concentración de polímero sensible a pH (50 mg/mL) variando la concentración de TONOH (de 50 a 150 mg/mL) y del disolvente, usando un volumen final de 1 mL para todas las composiciones.

Tabla 24. Composición de las membranas preparadas

Membrana	[NP1X] (mg/mL)	[TONOH] (mg/mL)	V _{MeOH} (μ L)	V _{final} (μ L)
D4	50	50	691.36	1000
D5	50	75	537.04	1000
D6	50	100	382.72	1000
D7	50	125	228.4	1000
D8	50	150	74.07	1000

La figura 50 muestra los resultados experimentales del efecto que posee la concentración de TONOH sobre la señal analítica.

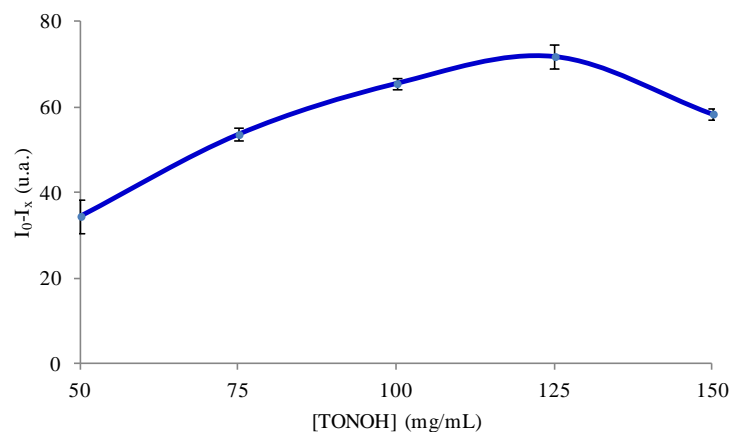


Fig.50. Efecto de la concentración de TONOH sobre la señal analítica; I_0 es la intensidad de emisión en ausencia de CO_2 , I_x es la intensidad de luminiscencia en presencia de 15% CO_2 .

$\lambda_{\text{exc/em}} = 480/520$ nm, rendijas_{exc/em} = 5/5 nm, average time 3s, voltaje del detector 650 V, [NP1X] = 50 mg/mL, Flujo total 100 mL/min. RH=40%



En esta figura puede apreciarse que un aumento de la concentración de TONOH lleva consigo un aumento de la respuesta de la fase sensora, reportando la señal más alta a la concentración de 125 mg/mL. Se observa también que para concentraciones mayores a 125 mg/mL de TONOH se produce un decrecimiento de esta respuesta. Se entiende como respuesta de la fase sensora la diferencia de emisión luminiscente $I_0 - I_x$, donde I_0 es la intensidad de emisión en ausencia de CO_2 e I_x es la intensidad de luminiscencia en presencia de CO_2 (15% CO_2).

Por tanto, para el resto del trabajo experimental se seleccionó la fase sensora compuesta por 50 mg/mL de NP1X y 125 mg/mL TONOH.

II.6.1.2. Efecto del flujo total sobre la determinación de CO_2

Uno de los parámetros a controlar en toda aplicación en medios gaseosos es el flujo total del sistema, o lo que es lo mismo, la suma del flujo de gas portador y de gas analito. En este estudio se pretende optimizar el flujo total para el cual se obtienen las mejores características analíticas, así como conocer la influencia del flujo total sobre la sensibilidad de la fase sensora (para así poder determinar en qué aplicaciones podría implementarse).

Para ello, se evaluó cómo variaba la respuesta de la fase sensora óptima para una misma concentración de CO_2 (15%), variando únicamente en este caso el flujo total de gas de 25 a 200 mL/min (véase la Fig. 51).

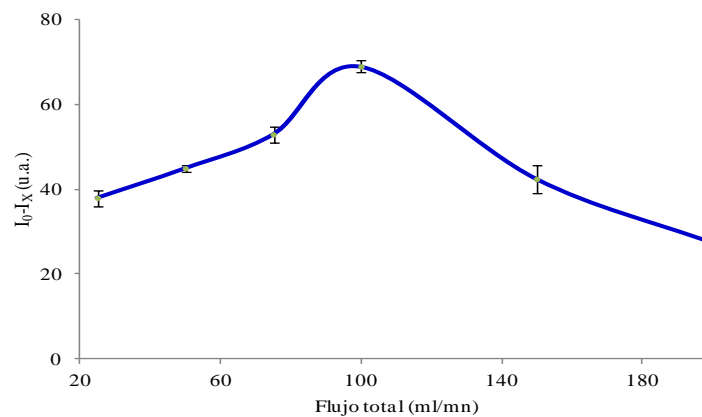


Fig. 51. Efecto de la variación del flujo total sobre la señal analítica; I_0 es la intensidad de emisión en ausencia de CO_2 , I_x es la intensidad de luminiscencia en presencia de 15% CO_2 . $\lambda_{\text{exc/em}} = 480/520$ nm, rendijas $_{\text{exc/em}} = 5/5$ nm, average time 3s, voltaje del detector 650 V, [NP1X]= 50 mg/mL. RH=40%

Como puede verse en dicha figura, la mejor respuesta se obtiene para un flujo de 100 mL/min, por lo que se fijó este flujo total para el resto del trabajo experimental en fase gaseosa.

II.6.1.3. Efecto del porcentaje de humedad sobre la determinación de CO₂

Para demostrar la aplicabilidad de esta fase sensora para la determinación de CO₂ en diferentes ambientes, se evaluó su respuesta en presencia diferentes porcentajes de humedad. La Fig.52 muestra cómo cambia la respuesta de la fase sensora para un 15% de CO₂ cuando se varía la humedad relativa del 0 al 80 %.

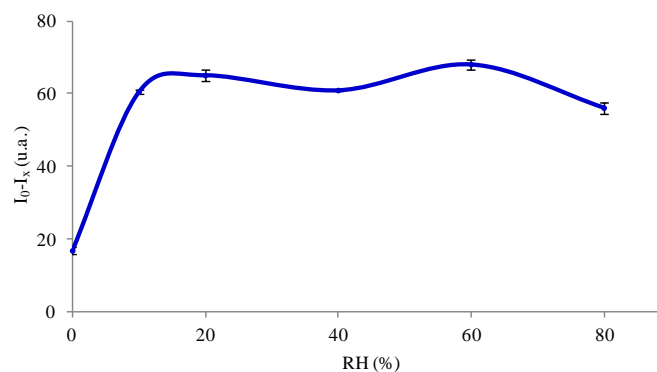


Fig. 52. Efecto de la variación de la humedad sobre la señal analítica; I_0 es la intensidad de emisión en ausencia de CO₂, I_x es la intensidad de luminiscencia en presencia de CO₂. RH entre 0 y 80% $\lambda_{exc/em} = 480/520$ nm, rendijas_{exc/em} = 5/5 nm, average time 3s, voltaje del detector 650 V, [NP1X] = 50 mg/mL, Flujo total 100 mL/min.

Como se puede ver en la figura para que la fase sensora responda a CO₂, la humedad del medio debe ser superior al 10%. Esto es debido a que para que la fase sensora responda, el CO₂ se tiene que transformar en bicarbonato y, para ello, necesita humedad. Cuando la humedad del medio es superior al 10%, se puede considerar que la respuesta de la fase sensora no se ve afectada por la misma, cumpliendo uno de los requisitos indispensables que tienen que tener estas fases sensoras para que puedan ser utilizadas en el desarrollo de sensores para análisis *breath-to-breath*.

II.6.1.4. Estudio de interferentes y reproducibilidad de la fase sensora de CO₂

Para demostrar la aplicabilidad de esta fase sensora en diferentes ambientes se evaluó también su respuesta en presencia de diferentes especies gaseosas que podrían interferir en su determinación. Concretamente se evaluó la señal de la fase sensora a diferentes concentraciones de monóxido de carbono (CO), dióxido de nitrógeno (NO₂) y oxígeno (aire y O₂ sintético). El sistema de gases utilizado fue el mismo que para el CO₂ que permite la conexión a diferentes gases tal y como se observa en la siguiente Fig. 53



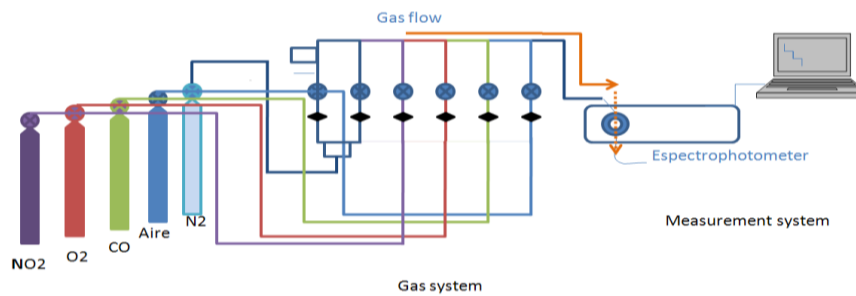


Fig. 53. Esquema de estación de gases para el estudio de interferentes.

En todos los casos se utilizó como parámetro de medida la respuesta de la fase sensora $I_0 - I_x$, donde I_0 es la intensidad de emisión en ausencia de CO_2 e I_x es la intensidad de luminiscencia en presencia de diferentes porcentajes del interferente.

La Fig. 54 muestra la respuesta de la fase sensora cuando se expone a diferentes concentraciones de CO , NO_2 , aire y O_2 .

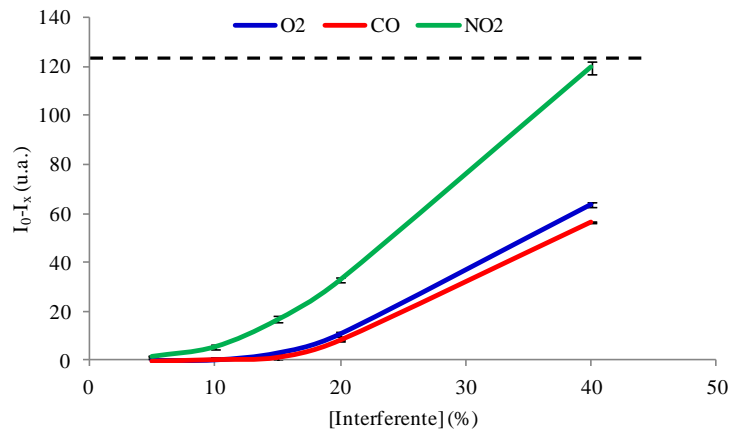


Fig. 54. Estudio de interferentes (O_2 , CO y NO_2) referenciados a la señal del CO_2 (15%); I_0 es la intensidad de emisión en ausencia de gas, I_x es la intensidad de luminiscencia en presencia de gas interferente. $\lambda_{\text{exc/em}} = 480/520$ nm, rendijas $_{\text{exc/em}} = 5/5$ nm, average time 3s, voltaje del detector 650 V, [NP1X] = 50 mg/mL, Flujo total 100 mL/min, RH=40%.

Como se puede ver en esta figura, tomando como referencia la señal de CO_2 (línea negra discontinua) a una concentración del 20%, se puede decir que sólo interfiere el NO_2 .

Además, para comprobar si la membrana soportaba múltiples medidas y no se degradaban los compuestos ópticamente activos incorporados en la fase sensora, se evaluó la reproducibilidad de las membranas. Para ello se llevó a cabo la realización de 150 medidas continuas alternando 100% de N_2 y 30% de CO_2 v/v.

La Fig. 55 muestra la variación de I_0 (intensidad de la fase sensora en ausencia de CO_2). Esta variable da información sobre la pérdida de luminiscencia de la fase sensora cuando se expone sucesivamente a CO_2 . Se puede ver que esta señal no varía significativamente en un

número elevado de ciclos, por lo que se puede concluir que no se produce deterioro de ninguno de los componentes ópticamente activos de la fase sensora.

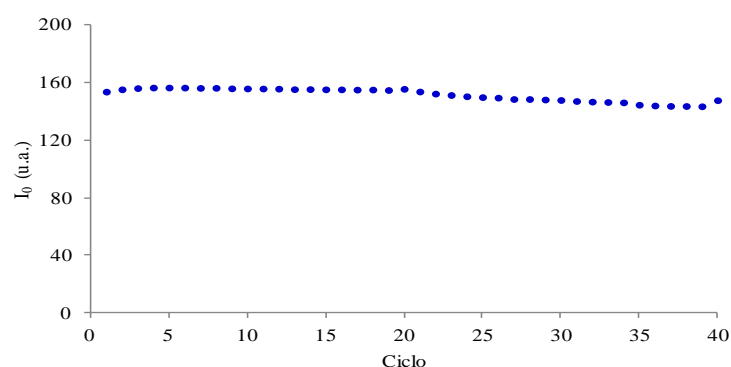


Fig. 55. Variación de la intensidad relativa de luminiscencia en ausencia de CO_2 (I_0) de la fase sensora durante 150 ciclos de determinación de CO_2 . $\lambda_{\text{exc/em}} = 480/520$ nm, rendijas $_{\text{exc/em}} = 5/5$ nm, average time 3s, voltaje del detector 650 V.

Como se puede observar se produce una ligera disminución de la intensidad luminiscente por lo que puede concluirse que la señal es reproducible y que la membrana puede utilizarse para la determinación de CO_2 , al menos, para 150 ciclos.

II.6.2. Aplicabilidad de la fase sensora en la determinación de CO_2 disuelto

Para demostrar la aplicabilidad de esta fase sensora para la determinación de CO_2 en disolución, se incorporó al sistema inicial un matraz donde se realizó la mezcla del gas en agua destilada, la cual se transfirió a la celda de medida del espectrofotómetro a través de 33s de una bomba peristáltica (Gilson Inc.) bajo un sistema cerrado como se muestra en la Fig.56.

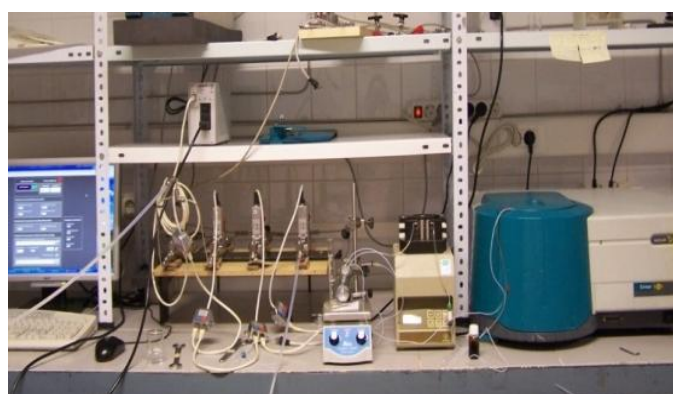


Fig. 56. Fotografía del sistema de medida de CO_2 en fase acuosa.

De esta forma, burbujeando en agua destilada una cierta mezcla de N_2 y CO_2 se puede controlar la cantidad de CO_2 disuelto y, a la vez, se puede bombear esa disolución hasta la



celda de medida donde se localiza la fase sensora y el sistema de transducción de la señal óptica (espectrómetro de luminiscencia).

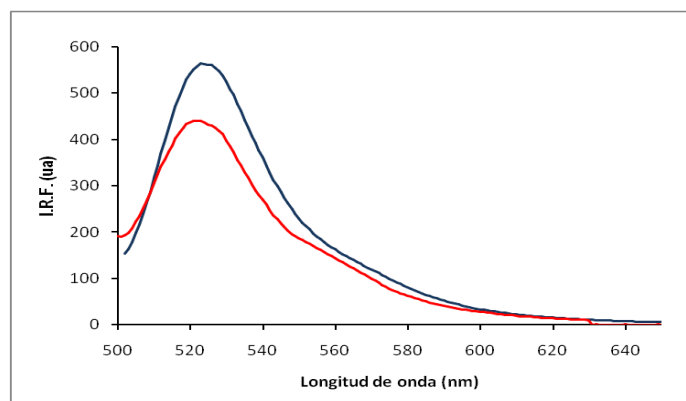


Fig. 57. Espectros de emisión de la fase sensora en fase acuosa: en ausencia (—) y en presencia de CO₂ (—) en agua. $\lambda_{exc} = 480$ nm, rendijas_{exc/em}=5/5 nm, average time 3s, voltaje del detector 650 V.

II.6.2.1. Características espectroscópicas en fase acuosa

Al igual que en el caso anterior se realizó la caracterización espectroscópica de la fase sensora en presencia y ausencia de CO₂ en medio acuoso. Como se puede observar, la fase sensora presenta un máximo de emisión a 520 nm cuando se excita a 480 nm; propiedades espectroscópicas que al igual que en el estado gaseoso coinciden con las del polímero funcional NP1(X) en disolución.

II.6.2.2. Estudio de reproducibilidad de la fase sensora de CO₂ disuelto

En la Fig. 58 se representa un diagrama en el que se muestra cómo varía la emisión luminiscente de la fase sensora cuando se expone a diferentes concentraciones de CO₂ disuelto en agua. Se puede observar que se produce un cambio en sus propiedades ópticas y que este cambio varía con la concentración de CO₂ disuelto; mostrando al mismo tiempo que la fase sensora es reversible.

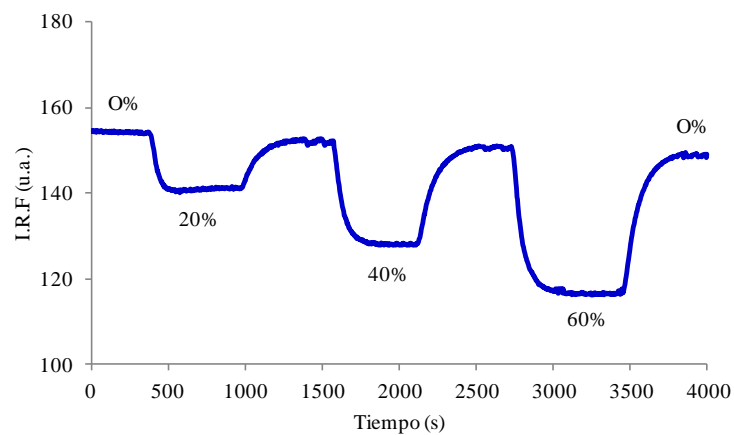


Fig. 58. Variación de la intensidad relativa de luminiscencia en disolución cuando la membrana se expone a diferentes concentraciones de CO_2 . $\lambda_{\text{exc/em}} = 480/520 \text{ nm}$, rendijas $_{\text{exc/em}} = 5/5 \text{ nm}$, average time 3s, voltaje del detector 650 V

Además, para ver si la membrana soportaba múltiples medidas y no se producía la lixiviación de los compuestos ópticamente activos incorporados en la fase sensora, además de evaluar la reproducibilidad de las membranas se llevó a cabo la realización de 40 medidas continuas alternando agua libre de CO_2 y agua a la que se le había burbujeado una mezcla aire- CO_2 al 20% v/v.

La Fig. 59 muestra la respuesta de la fase sensora para cada ciclo de medida. Esta variable nos da información sobre la reproducibilidad de la medida así como de la estabilidad de la fase sensora en disolución.

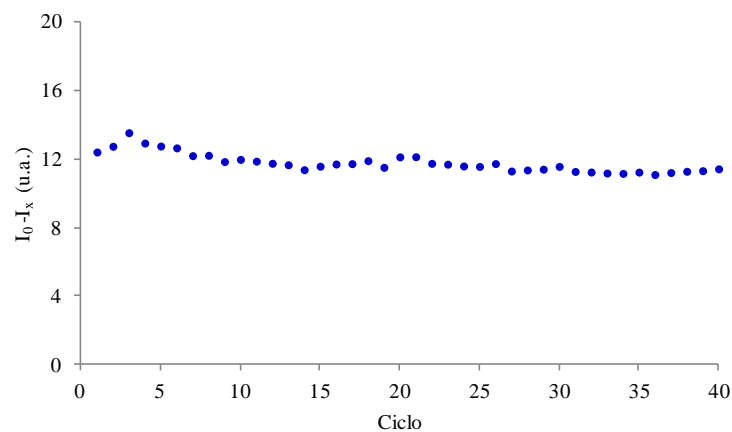


Fig. 59. Variación de la respuesta de la fase sensora durante 40 ciclos de determinación de CO_2 disuelto en agua. $\lambda_{\text{exc/em}} = 480/520 \text{ nm}$, rendijas $_{\text{exc/em}} = 5/5 \text{ nm}$, average time 3s, voltaje del detector 650 V.

Como se puede observar se producen mínimas variaciones después de 40 ciclos de medida, por lo que se puede concluir que la señal es reproducible y que la membrana se



puede usar para la determinación de CO_2 disuelto en agua, al menos, para 40 ciclos, demostrándose la no lixiviación ni deterioro de ninguno de los componentes ópticamente activos de la fase sensora.

II.6.3. Características analíticas de la fase sensora desarrollada

Para establecer la curva de calibrado se tomó como variable analítica la diferencia de emisión luminiscente $I_0 - I_x$, donde I_0 es la intensidad de emisión en ausencia de CO_2 e I_x es la intensidad de luminiscencia en presencia de una determinada concentración de CO_2 .

En todos los casos se llevaron a cabo tres réplicas para cada nivel de concentración, de forma que se pudiese establecer el error cometido en la determinación.

La Fig. 60 muestra un fiagrama de cómo varía la intensidad de emisión cuando cambia la concentración de CO_2 en el gas portador.

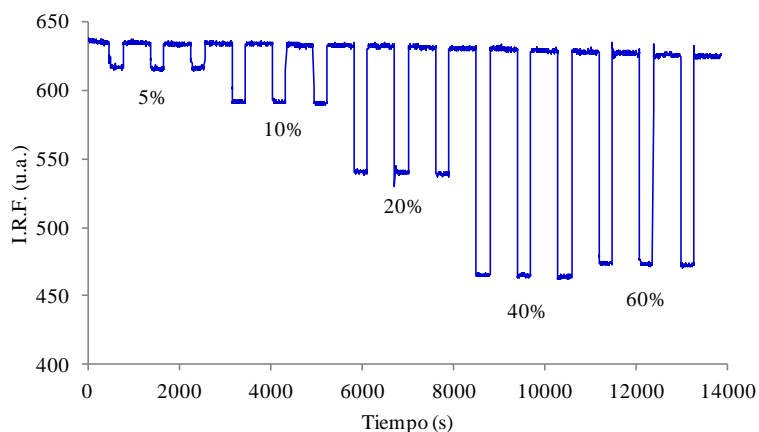


Fig. 60. Variación de la intensidad relativa de luminiscencia con la concentración de CO_2 en el gas portador. $\lambda_{exc/em} = 480/520$ nm, rendijas $_{exc/em} = 5/5$ nm, average time 3s, voltaje del detector 650 v, [NP1X] = 50 mg/mL, Flujo total 100 mL/min, RH=40%.

La Fig.61 muestra la curva de calibrado de la fase sensora óptica en medio gaseoso y la Fig. 62 la curva de calibrado de CO_2 disuelto en agua.

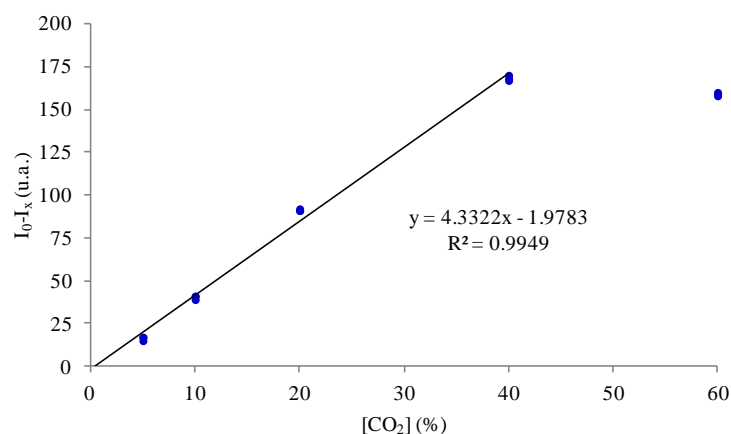


Fig. 61. Curva de calibrado de la fase sensora óptima para la determinación de CO₂ en fase gaseosa. $\lambda_{exc/em} = 480/520$ nm, rendijas_{exc/em}=5/5 nm, average time 3s, voltaje del detector 650 v, [NP1X]= 50 mg/mL, Flujo total 100 mL/min, RH=40%.

Se puede ver que en estado gaseoso la fase sensora tiene un intervalo dinámico lineal que va de 0 a 40% de CO₂, obteniéndose un límite de detección de 2.3% y un límite de cuantificación de 7.7%.

En el caso de la determinación de CO₂ disuelto en agua, la fase sensora tiene un intervalo dinámico lineal que va de 0 a 60% de CO₂, obteniéndose un límite de detección de 1.3% y un límite de cuantificación de 4.4%. En las Tablas 25 y 26 se resumen los parámetros de fiabilidad de ambas curvas de calibrado.

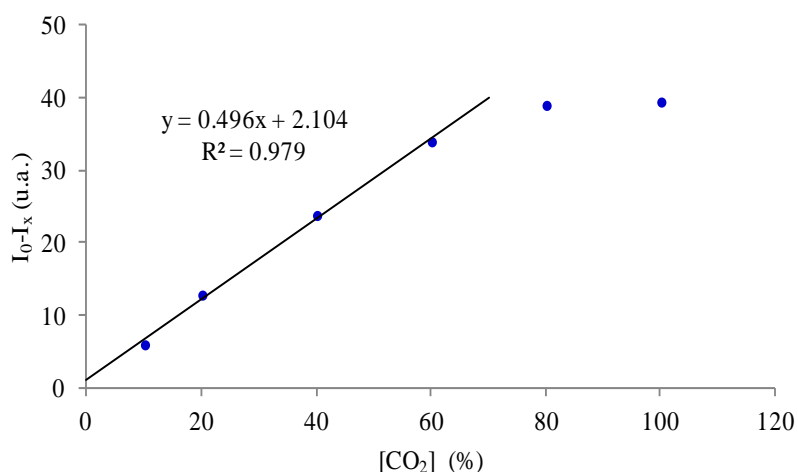


Fig. 62. Curva de calibrado de la fase sensora óptima para la determinación de CO₂ disuelto en agua. $\lambda_{exc/em} = 480/520$ nm, rendijas_{exc/em}=5/5 nm, average time 3s, voltaje del detector 650 V, [NP1X]= 50 mg/mL.



Tabla 25. Parámetros de fiabilidad de la fase sensora para la determinación de CO₂ en medio gaseoso

Parámetros	Valor estimado
s_0	3.3530
Límite de detección (%)	2.3
Límite de cuantificación (%)	7.7
Intervalo dinámico lineal (%)	2.3-40.0

Tabla 26. Parámetros de fiabilidad de la fase sensora para la determinación de CO₂ en medio acuoso.

Parámetros	Valor estimado
s_0	0.2175
Límite de detección (%)	1.3
Límite de cuantificación (%)	4.4
Intervalo dinámico lineal (%)	1.3-60

Para calcular el límite de detección (*L.D.*) y el límite de cuantificación (*L.C.*) se siguió el criterio IUPAC, por lo que se calculó la desviación estándar de un blanco (s_0). Para ello se registró la desviación estándar de la línea base del optosensor y a partir de ella se calculó el *L.D.* y el *L.C.*

II.6.4. Estudio de estabilidad de la fase sensora

Uno de los grandes inconvenientes de las fases sensoras ópticas en su inestabilidad fototérmica, es decir, que estas fases sensoras se degradan en presencia de luz y/o calor. Esto se debe principalmente a la fotodegradación del compuesto ópticamente activo, así como a la precipitación del mismo en el interior de la membrana polimérica, lo que lleva consigo una aglomeración y, por tanto, una pérdida de sensibilidad.

En este caso, para evitar estos fenómenos se optó por la inmovilización química del indicador de pH en la estructura polimérica inerte, de esta forma se evita la agregación (precipitación) en la membrana líquida, aunque no se poseen datos bibliográficos de cómo afecta esta inmovilización química sobre la fotodegradación del indicador químicamente soportado.

Por ello, se prepararon diversas membranas que se conservaron en diferentes ambientes, midiendo la respuesta de las mismas a una concentración determinada de CO₂ (15%) durante 5 meses, para evaluar qué parámetros eran más importantes a tener en cuenta para la producción industrial de estas fases sensoras ópticas.

En total este estudio se llevó a cabo con 15 membranas, que se conservaron en 5 ambientes diferentes (3 réplicas por cada ambiente) durante un total de 5 meses (véase la Fig. 63).

- Ambiente 1: en oscuridad y a 4º C; es decir, en un refrigerador en ausencia de luz (véase la Fig. 63a)
- Ambiente 2: oscuridad y temperatura ambiente (20º C, aprox.); es decir en un cajón del laboratorio véase la Fig. 63b)
- Ambiente 3: oscuridad y 35º C; es decir en una estufa en ausencia de luz (véase la Fig. 63c).
- Ambiente 4: a temperatura ambiente y continuamente iluminada con luz UV (intensidad luminosa de 163 lumens), (véase la Fig. 63d).
- Ambiente 5: a temperatura ambiente y expuesta a luz solar directa (véase la Fig. 63e).

Los resultados obtenidos en cada ambiente se muestran en las siguientes figuras.





Fig. 63. Fotografías de los diferentes ambientes de conservación a los que se sometieron las fases sensoras para realizar el estudio de estabilidad a) 4° C en ausencia de luz, 24-b) temperatura ambiente (20° C, aprox) en ausencia de luz, 24-c) 35° C en ausencia de luz, 24-d) luz UV continua, e) luz solar continua.

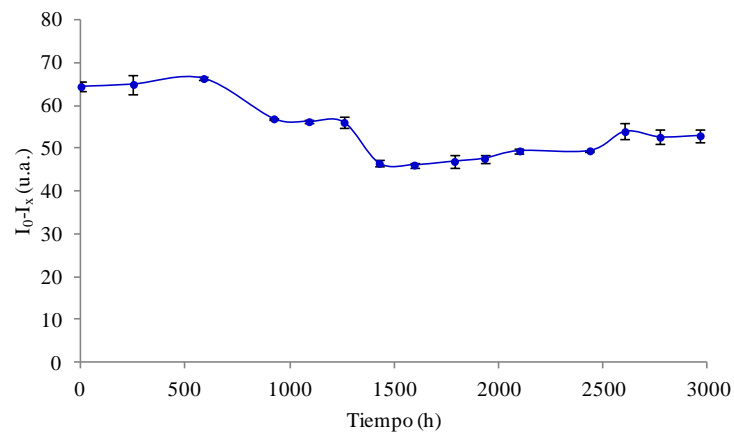


Fig. 64. Estabilidad de la fase sensora a 4°C en ausencia de luz. $\lambda_{exc/em} = 480/520$ nm, rendijas $_{exc/em} = 5/5$ nm, average time 3s, voltaje del detector 650 V.

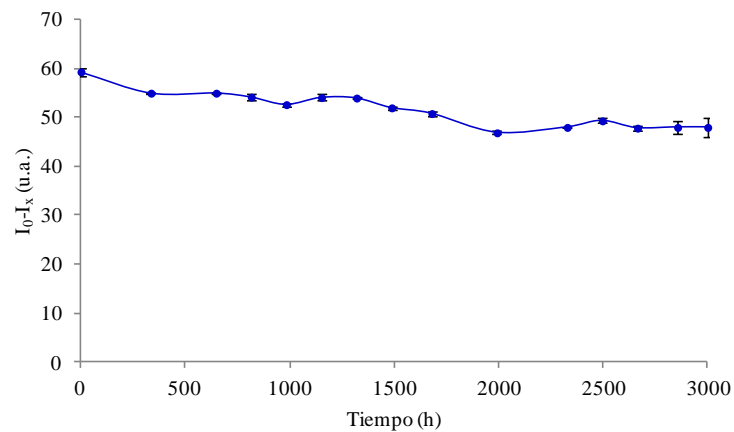


Fig. 65. Estabilidad de la fase sensora a temperatura ambiente (20°C, aprox) en ausencia de luz. $\lambda_{exc/em} = 480/520$ nm, rendijas $_{exc/em} = 5/5$ nm, average time 3s, voltaje del detector 650 V.

A la vista de las figuras 64 y 65 se puede concluir que la membrana es estable cuando se conserva en ausencia de luz y a temperaturas iguales o más bajas a la temperatura ambiente, perdiendo un 19% de la señal a los 4 meses si se conserva a temperatura ambiente y del 17% si se conserva a 4° C.



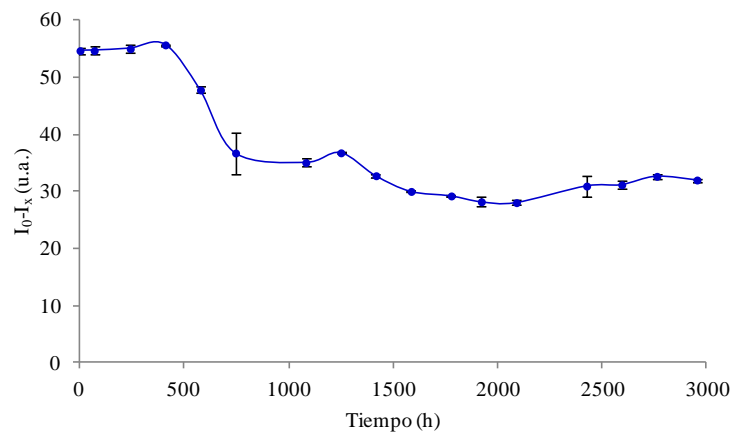


Fig. 66. Estabilidad de la fase sensora a 35° C en ausencia de luz. $\lambda_{exc/em} = 480/520$ nm, rendijas_{exc/em}=5/5 nm, average time 3s, voltaje del detector 650 v.

Sin embargo, como se observa en la Fig. 66 si la temperatura de conservación es de 35° C, la membrana es estable durante medio mes aproximadamente (17 días), perdiendo un 32% de la respuesta al final del primer mes y mantenido esta sensibilidad por al menos 3 meses más.

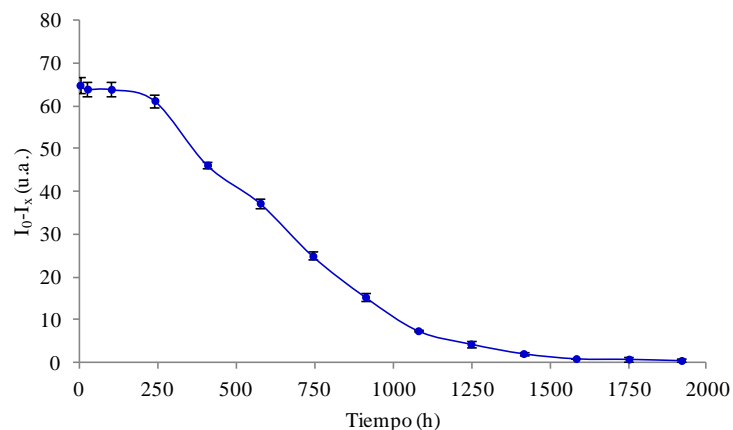


Fig. 67. Estabilidad de la fase sensora frente a la luz UV. $\lambda_{exc/em} = 480/520$ nm, rendijas_{exc/em}=5/5 nm, average time 3s, voltaje del detector 650 v.

En cuanto a la estabilidad de la membrana frente a la luz UV, la Fig. 67 muestra que cuando la membrana se expone a radiaciones intensas de esta luz (163 lumens), la misma es estable durante 10 días, y a partir de entonces va perdiendo sensibilidad, llegando a perder el 50% al mes de ser almacenada y el 100% a los dos meses.

No obstante, una fase sensora óptica que mantiene sus propiedades analíticas totalmente intactas tras 10 días continuados de iluminación UV se puede considerar altamente estable, demostrando que la unión covalente del indicador en la cadena

polimérica proporciona un aumento considerable de la estabilidad fotoquímica de la membrana.

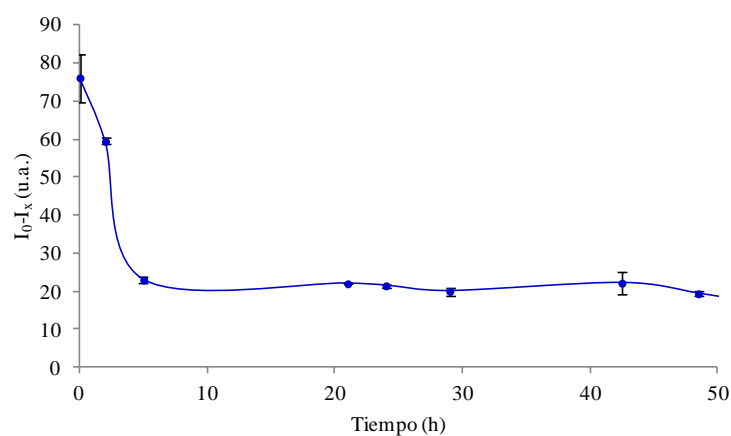


Fig. 68. Estabilidad de la fase sensora frente a la luz solar. $\lambda_{exc/em} = 480/520$ nm, rendijas_{exc/em} = 5/5 nm, average time 3s, voltaje del detector 650 v.

Finalmente, cuando la fase sensora se expone a luz solar y por tanto, a calor de forma simultánea, ésta se deteriora rápidamente; perdiendo un 22% de su señal a las 2 horas de exposición y un 70% a partir de las 5 horas. No obstante, es de señalar que esa pérdida de señal se mantiene durante al menos 45 horas más.

Por tanto, se puede concluir que la unión covalente del indicador ópticamente activo a la estructura polimérica del soporte inerte, además de simplificar la preparación de la fase sensora, aumenta considerablemente su estabilidad fototérmica.

II.7. Desarrollo de optosensor de fibra óptica

Una vez demostrada la aplicabilidad de la nueva fase sensora desarrollada para la detección y cuantificación de CO₂ en muestras gaseosas y líquidas, y para seguir demostrando la versatilidad de la fase sensora desarrollada se procedió a desarrollar un optosensor de fibra óptica.

Para ello, se sustituyó el transductor usado (el espectrómetro de luminiscencia comercial) Varian por un espectrómetro de fibra óptica y una fuente de excitación LED. Para acoplar la fuente de excitación con la fase sensora y coleccionar la emisión luminiscente desde la misma hasta el detector se usó una fibra óptica bifurcada, así como otros componentes electrónicos y optoelectrónicos. La Fig. 69 muestra un esquema del diseño instrumental.



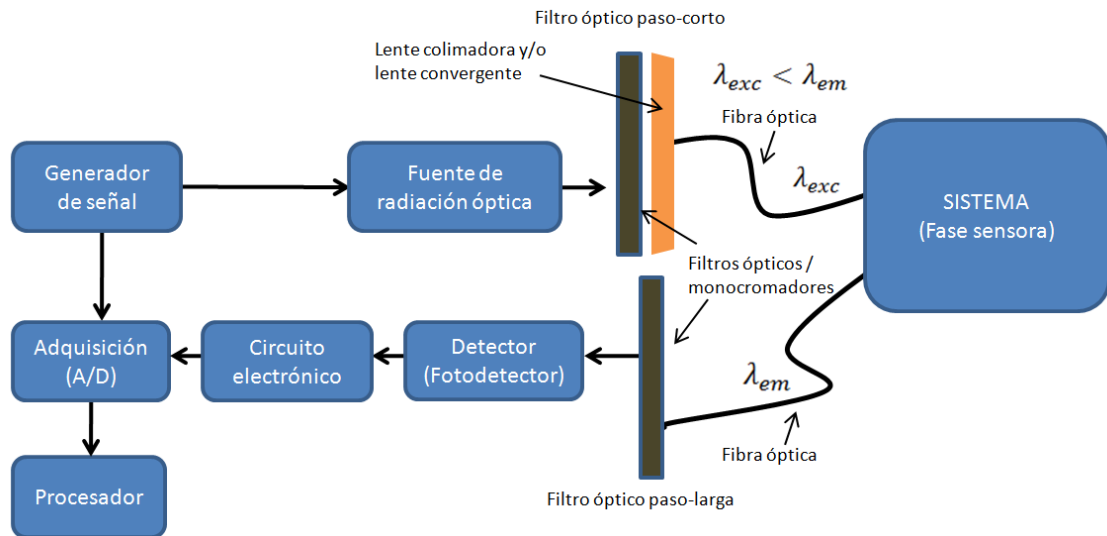


Fig.69. Esquema simplificado de los componentes básicos del optosensor óptico de fibra óptica diseñado.

Con este sistema se pretende evaluar la potencialidad de la fase sensora para desarrollar sensores de fibra óptica portátiles y a control remoto.

II.7.1 Diseño del transductor óptico

Para desarrollar un optosensor luminiscente de fibra óptica es necesario contar con:

Fuente de excitación, que excite el indicador de la fase sensora. En el optosensor desarrollado se usó un diodo LED azul de 470 nm (Ocean Optics, USA), ya que el máximo de excitación del indicador unido covalentemente al polímero era de 488 nm. Este LED fue instalado en un dispositivo LED driver comercial (LS-450, Ocean Optics, USA).

Selectores de longitud de onda de excitación, este dispositivo no siempre es necesario, pero debido a que en este caso las longitudes de onda de excitación y emisión eran muy próximas se decidió usar un filtro óptico paso-corto de excitación de $\lambda=469 \text{ nm} \pm 35 \text{ nm}$ (Thorlabs GmbH, MFC469-35). De esta forma, toda la radiación del LED a altas longitudes de onda (cola de emisión) fue eliminada, evitando el solapamiento de ésta con la señal de emisión luminiscente procedente de la fase sensora.

Guía de ondas, para llevar la luz de la fuente de excitación a la muestra y de la muestra al detector. En este caso se usó una fibra óptica bifurcada como la que se muestra en la Fig. 70.

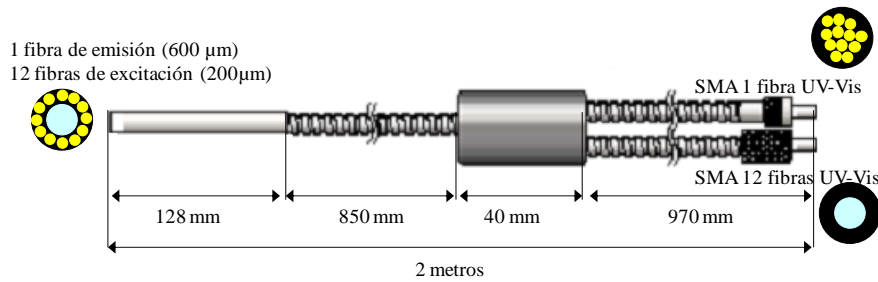


Fig. 70. Esquema de la fibra óptica bifurcada empleada.

Como puede verse en la figura, la fibra óptica bifurcada utilizada está compuesta por dos haces de fibras ópticas; el haz de excitación que está formado por 12 fibras de 200 nm de diámetro de núcleo que se disponen, en el extremo de la fibra óptica, alrededor del haz de fibras de emisión, que en este caso está formado por una sola fibra de 600 nm de diámetro. De esta forma, las fibras de excitación iluminan toda la zona central de medida y la fibra de emisión puede recolectar una gran cantidad de emisión luminiscente, ganando en sensibilidad con respecto a una distribución aleatoria de las fibras.

Celda de medida. La celda de medida es la zona donde se sitúa la fase sensora y es por donde circula la muestra. La celda de medida empleada fue especialmente diseñada para este trabajo de forma que pudiese ser usada para poner en contacto la fase sensora con muestras gaseosas y líquidas, y que permitiese acoplar el extremo del haz de fibras ópticas a la fase sensora para poder recoger la emisión luminiscente al mismo tiempo. La Fig. 71 muestra una fotografía de la celda de medida.



Fig. 71. Celda de medida

Selector de longitud de onda de excitación, para asegurarse de que la radiación que llega al detector es sólo debido a la emisión luminiscente de la fase sensora, se suelen utilizar selectores de longitud de onda de emisión. En este caso se usó un filtro paso largo de $\lambda=500$ nm (Thorlabs GmbH, FEL0500)



Detector, en este caso se utilizó el espectrómetro de fibra óptica equipado con una red de difracción y un detector CCD de 2048 píxeles (AvaSpec-2048, Avantes, Instrumatic Española S.A., España). Este espectrómetro permite registrar de forma simultánea espectros de emisión de 200 a 1100 nm, con una alta sensibilidad y poco ruido.

Software de control. Se utilizó el programa informático proporcionado por el fabricante del espectrómetro (AvaSoft v.6.1[®]) que permite la visualización y el almacenamiento de los espectros registrados por el dispositivo CCD (entre otras funciones) así como registrar la variación de la emisión luminiscente a lo largo del tiempo, a la vez que permite configurar los parámetros de medida (tiempo de integración, el número de promedios del espectro visualizado o el intervalo espectral de barrido).

II.7.2 Mecanismo de funcionamiento

El funcionamiento de este sistema se basa en que la radiación de excitación del LED es conducida por una de las ramas de la fibra óptica hasta la superficie de la fase sensora contenida en la celda de flujo de gases. En este lugar es donde tiene lugar el fenómeno de luminiscencia. Este fenómeno dará lugar a la formación de un punto (o “*spot*”) luminiscente sobre la superficie de la fase sensora excitada (que corresponde a la radiación de emisión de la fase sensora). Esta radiación de emisión es recogida por una de las ramas de la fibra óptica y transportada hacia el espectrómetro, permitiendo así registrar el espectro de emisión luminiscente.

Para poder exponer la fase sensora a diferentes concentraciones de CO₂ se utilizó la estación de gases anteriormente comentada, que se conectó a la celda de medida del optosensor de fibra óptica. La Fig 72 muestra un esquema del dispositivo.

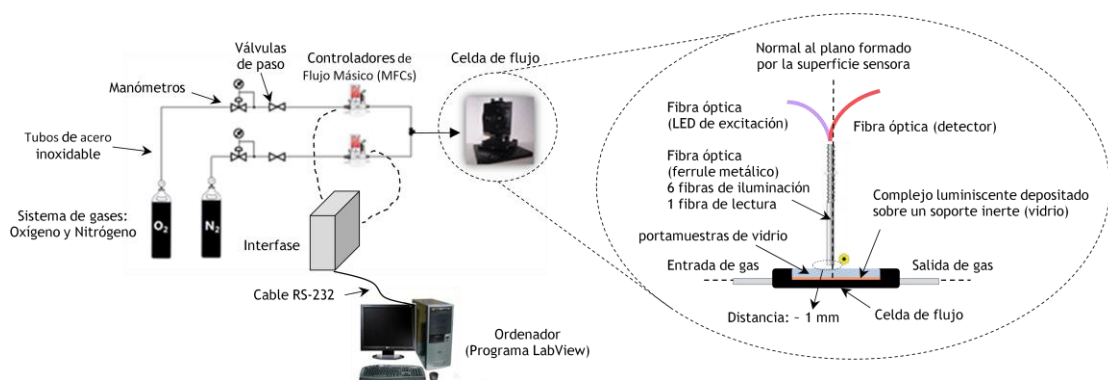


Fig. 72. Esquema del sistema de medida del optosensor de fibra óptica.

II.7.3 Características espectroscópicas.

Para demostrar la utilidad del sistema desarrollado así como evaluar el buen funcionamiento de los dispositivos ensamblados, se llevó a cabo una evaluación de las características espectroscópicas de la fase sensora con este nuevo transductor óptico en presencia y ausencia de CO_2 (véase la Fig. 73).

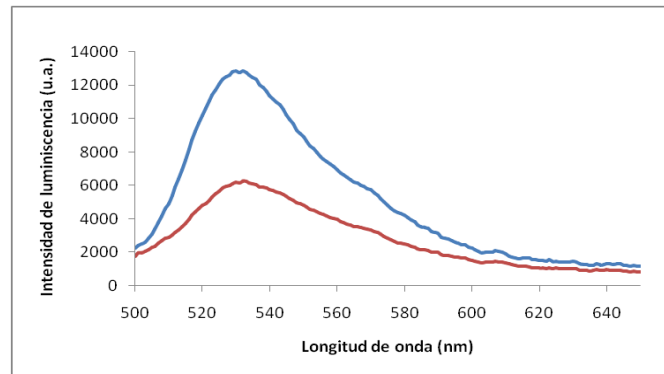


Fig. 73. Espectros de emisión de la fase sensora obtenidos con el transductor de fibra óptica en ausencia (—) y en presencia de CO_2 (—) gaseoso.

Como se puede observar, los espectros obtenidos coinciden con los obtenidos con el material de partida NP1X y con los obtenidos con el optosensor convencional. Además se demuestra que el optosensor de fibra óptica permite registrar cambios de intensidad de emisión luminiscente de la fase sensora en presencia de CO_2 .

II.7.4 Caracterización analítica del optosensor

Para poder evaluar la potencialidad de este optosensor de fibra óptica, se procedió a establecer sus propiedades analíticas. Para ello se llevó a cabo la determinación de la curva de calibrado en medio gaseoso. La Fig. 74 muestra cómo variaba la emisión luminiscente en el detector CCD cuando se variaba la concentración de CO_2 en la fase sensora.

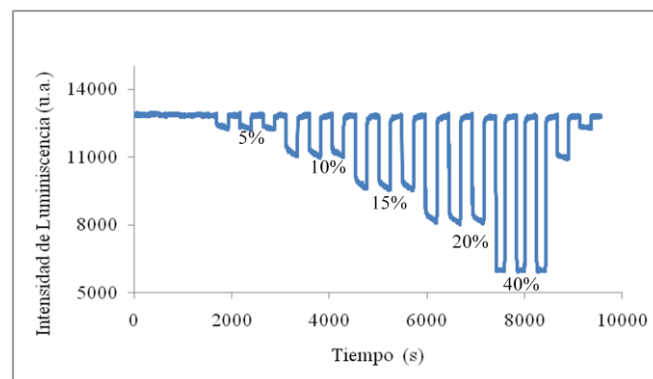


Fig.74. Variación de la intensidad de luminiscencia con la concentración de CO_2 en el gas portador. Flujo total 100 mL/min, RH=40%.



Como se puede observar, el transductor de fibra óptica diseñado es capaz de detectar los cambios de fluorescencia que se producen en la fase sensora y permite obtener una curva de calibrado (véase la Fig. 75).

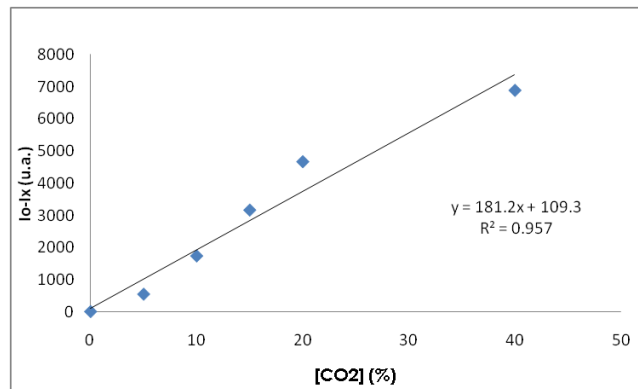


Fig. 75. Curva de calibrado del optosensor de fibra óptica para la determinación de CO₂ en fase gaseosa.

La Tabla 27 muestra los parámetros analíticos del optosensor de fibra óptica propuesto.

Tabla 27. Parámetros de fiabilidad del optosensor de fibra óptica para la determinación de CO₂ en medio gaseoso.

Parámetros	Valor estimado
S ₀	26.25
Límite de detección (%)	0.43
Límite de cuantificación (%)	1.44
Intervalo dinámico lineal (%)	0.43-40.0

De esta forma se demuestra la versatilidad de la fase sensora desarrollada y la posibilidad de implementarla en dispositivos portátiles de medida que permitan la determinación de CO₂ en muestras gaseosas y líquidas de forma “in situ”, a tiempo real y, en caso de ser necesario, a control remoto.

Conclusiones

Se ha desarrollado una nueva fase sensora sensible a CO₂ muy útil para el desarrollo de sensores ópticos en ambientes gaseosos y acuosos.

La fase sensora desarrollada presenta sensibilidad y estabilidad en ambos ambientes (acuoso y gaseoso) lo que la hace recomendable para su utilización en el desarrollo de un sensor óptico comercial útil en diferentes áreas (ambiental, alimentaria, salud, etc.), especialmente si se toma en cuenta los resultados satisfactorios que se han obtenido de la



Capítulo III

Importancia de la implementación de laboratorios básicos de control de calidad de aguas en Bolivia



OBJETO DEL CAPÍTULO

Es necesario controlar la calidad del agua de consumo en Bolivia y, para ello, se debe contar con instalaciones, personal y organización adecuada para este fin.

Para ello el grupo FQM-297 solicitó diversos proyectos que financiaron la dotación de equipos, la formación de personal y la organización de dos laboratorios, uno de parámetros fisicoquímicos y otro de parámetros microbiológicos capaces de controlar la calidad de las aguas de consumo.

En este capítulo se detallan todas las labores y operaciones desarrolladas en España y Bolivia para conseguir tal fin y que estos laboratorios sean hoy en día una realidad.



III.1. Introducción

El presente capítulo tiene como objetivo mostrar la importancia de la aplicación de los conocimientos adquiridos mediante la implementación de un laboratorio de control de calidad básico de aguas en Bolivia.

El desarrollo del presente capítulo ha sido posible gracias a las ayudas logradas mediante proyectos solicitados por el Grupo de Investigación FQM-297 de la Universidad de Granada UGR, a iniciativa y bajo la responsabilidad de su Director, el Dr. D. Alberto Fernández Gutiérrez, Catedrático de Química Analítica de la UGR. Estos proyectos han sido concedidos por entes importantes como la AECID (Agencia Española de Cooperación Iberoamericana para el Desarrollo), el CICODE (Centro de Iniciativas a la Cooperación al Desarrollo) órgano dependiente de la Universidad de Granada UGR, la empresa EMASAGRA y la asociación española Adecagua (Asociación para la defensa de la calidad de las aguas).

Por tanto el objetivo es aplicar los conocimientos adquiridos durante los estudios de postgrado para implementar un laboratorio de control de calidad de aguas de consumo que cumpla con los propósitos encomendados al grupo FQM 297 y dé solución a alguno de los problemas a los que se enfrenta el país origen de la doctoranda.

III.2. Calidad del agua

A lo largo de la historia, la calidad del agua ha sido un factor importante para el bienestar humano,²¹¹ pues como bien cita la OMS...*“el agua es esencial para la vida y todas las personas deben disponer de un suministro satisfactorio (suficiente, accesible e inocuo)”*²¹².

Este último atributo (inocuo) será otorgado o no dependiendo del resultado del estudio de control de calidad, este incluirá el estudio de sus componentes propios y la detección de compuestos añadidos. Los cuales en su mayoría afectan de manera negativa la calidad del agua, pues como bien manifiesta la OMS, *“la calidad del agua puede verse comprometida por la presencia de agentes infecciosos, productos químicos tóxicos,*

²¹¹Stanley, E. M. Introducción a la Química Ambiental. Editorial Reverte S. A. 2007.

²¹²Organización Mundial de la Salud OMS, 2010.



radiaciones²¹³, desechos orgánicos, nutrientes vegetales inorgánicos, compuestos orgánicos, sedimentos y materiales suspendidos, radiación y contaminación térmica”.

Para determinar la calidad del agua será necesario el desarrollo de programas de control²¹⁴ y de medios como laboratorios que permitan determinar la calidad del agua de forma precisa.

La calidad del agua se puede evaluar de dos maneras, de forma parcial según los usos a los que se destine o de forma total donde se manifieste su buen estado en el medio ambiente. En este caso nos remitiremos a la primera manera. La calidad del agua se determinará entonces, comparando las características físicas y químicas de una muestra de agua con unas directrices de calidad del agua o estándares (normas y reglamentos).

Debido a que el agua aun en estado natural no es un elemento puro, según al uso al que esta se destinada, puede presentar distintos niveles de calidad,²¹⁵ es decir, los criterios y los estándares de calidad de agua variarán dependiendo de si se trata de agua para consumo humano (agua potable), para procedimientos médicos (aguas destiladas, esterilizadas, etc), para usos agrícolas (riego), para usos industriales (según el producto) y mineros (extracción de metales) o de recreación e investigación.

Estas normas se basan normalmente en unos niveles de toxicidad científicamente aceptables tanto para los humanos como para otros organismos.²¹⁶ Además, las mismas estarán en función a cada país, de manera que le sean accesibles y responda a sus demandas como recomienda la OMS 2010.

La calidad del agua dependerá también de otros factores como la fuente de la que se obtenga (ríos, pozos, manantiales, bofedales, deshielos), del medio que la rodee y del tratamiento que se le haga, ya que en algunos puntos será apta para el consumo humano, animal o agrícola, y en otros no lo será debido a la elevada carga de contaminantes que presente (puntos cercanos a desmontes o colas mineras). Otro factor del que depende la variabilidad de la calidad del agua es la época donde se determine su calidad, haciendo que

²¹³ <http://www.who.int/topics/water/es/> (03 de agosto 2010).

²¹⁴ Holguín C. [et al]. 2006. Water quality of the Río Conchos in the region of Ojinaga, Chihuahua: physico-chemical parameters, metals and metalloids. Villahermosa, Tab.: Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.

²¹⁵ Amaya Navas O. 2003 *La protección del agua en Colombia dentro del marco de la Constitución Política y ecológica de 1991*, p.107, en Derecho de Aguas, Tomo1 Universidad Externado de Colombia. Bogotá.

²¹⁶ http://www.un.org/spanish/waterforlifedecade/issues_water_quality.html (02de agosto 2010)

su control sea necesario especialmente en aguas que estén destinadas al consumo humano.²¹⁷

A nivel global, el principal problema relacionado con la calidad del agua lo constituye la eutrofización, que es el resultado de un aumento de los niveles de nutrientes (generalmente fósforo y nitrógeno) que afectan sustancialmente a los usos del agua. Las mayores fuentes de nutrientes provienen de la escorrentía agrícola y de las aguas residuales domésticas (fuente de contaminación orgánica y microbiana), de efluentes industriales y emisiones a la atmósfera procedentes de la combustión de combustibles fósiles y de los incendios forestales²¹⁸ o emanaciones volcánicas.

Casi todos estos agentes son productos de la acción humana, pues sin su intervención la calidad del agua vendría determinada por la erosión del substrato mineral, los procesos atmosféricos de evapotranspiración y sedimentación de lodos y sales, la lixiviación natural de la materia orgánica y los nutrientes del suelo por los factores hidrológicos, y los procesos biológicos en el medio acuático.

Esto resulta peligroso si tenemos en cuenta que el agua es un recurso único, limitado y vulnerable, cuyo uso está limitado más que por su disponibilidad a su calidad.²¹⁹

III.3. Problemática de la determinación de la calidad del agua a nivel mundial

El agua a nivel mundial tiene implicancias en diferentes ámbitos, como son el económico, social, cultural y político,^{220,221} debido a que es un recurso esencial para la vida y para la salud. Lamentablemente hoy, en pleno siglo XXI, 884 millones de personas todavía carecen de un acceso seguro a agua potable para beber, cocinar, bañarse y realizar otras tareas domésticas.

²¹⁷ Maldonado M., Van Damme P., Rojas J. 1998. Contaminación y eutrofización en la cuenca del río Rocha (Cochabamba). Rev. Bol. de Ecol. 3: 3-9.

²¹⁸ Ministerio de Medio Ambiente. Instituto Nacional de Meteorología. Centro meteorológico territorial de Castilla y León. Valladolid. 1999)

²¹⁹ IHH-UMSA Escenarios de uso y asignación del agua Oferta y Calidad de aguas.

²²⁰ IBNORCA, Calidad de Agua para consumo humano-Requisitos NB-512. Tercera Edición La Paz: IBNORCA, 2004.

²²¹ Bolivia. Ley No. 1333 Ley del Medio Ambiente, de 27 de Abril de 1992. Gaceta Oficial de Bolivia, 15 de Junio 1992, Art, 36-39, p. 8.



Este dato resulta preocupante por lo que, recientemente, la Asamblea General de las Naciones Unidas ha confirmado este hecho y “declara el acceso seguro a un agua limpia y al saneamiento como un derecho humano esencial para la vida y el desempeño de todos los derechos humanos” (ONU, 2010), hecho que había referido antes por la OMS.

Por esta razón, los ámbitos nacional, regional y local deben lograr que la inocuidad del agua de consumo sea la mayor posible, pues *“un agua potable segura y un saneamiento básico son intrínsecos a la supervivencia, el bienestar y la dignidad humana.”*²²² Además, la mejora del acceso al agua potable puede proporcionar beneficios tangibles en materia de salud y desarrollo²²³.

Esta preocupación en muchos países desarrollados se ha volcado en políticas que incluyen leyes, decretos y directivas, destinadas al establecimiento de programas de control y vigilancia que implican el control de calidad del agua en función de sus usos, haciendo énfasis especial en el agua de consumo. De hecho, en algunas regiones se ha comprobado que las inversiones en sistemas de abastecimiento de agua y de saneamiento son rentables desde un punto de vista económico, pues disminuyen los efectos adversos para la salud reduciendo por tanto los gastos de asistencia sanitaria.

Según refiere el informe de la ONU, en las regiones en vías de desarrollo en su conjunto, el acceso a agua potable en las áreas urbanas se mantiene igual al 96%, pero ha mejorado en las áreas rurales del 60% registrado en 1990 al 76% registrado actualmente; datos similares refiere el programa JMP (Joint Monitoring Programme, por sus siglas en inglés) para el abastecimiento de agua y saneamiento dependiente de la OMS/UNICEF, que reporta una mejora del abastecimiento de agua del 77% registrado en 1990 al 87% en 2008^{224,225}. Esto significa que una gran mayoría de las regiones del mundo han conseguido reducir la proporción del uso de agua de fuentes no aptas²²⁶. Este aumento se puede observar en la siguiente figura.

²²² Secretario General de las Naciones Unidas, Ban Ki-Moon.

²²³ Informe de la Conferencia de las Naciones Unidas sobre el Medio Ambiente y el Desarrollo, Resolución aprobada por la Asamblea General.

²²⁴ WHO/ UNICEF. Joint Monitoring Programme (JMP) for Water Supply and Sanitation.

²²⁵ Progresos en la ampliación del acceso al agua potable; en la esfera del saneamiento es preciso redoblar los esfuerzos: OMS/UNICEF. 2010.

²²⁶ Neves Mariana Leonor

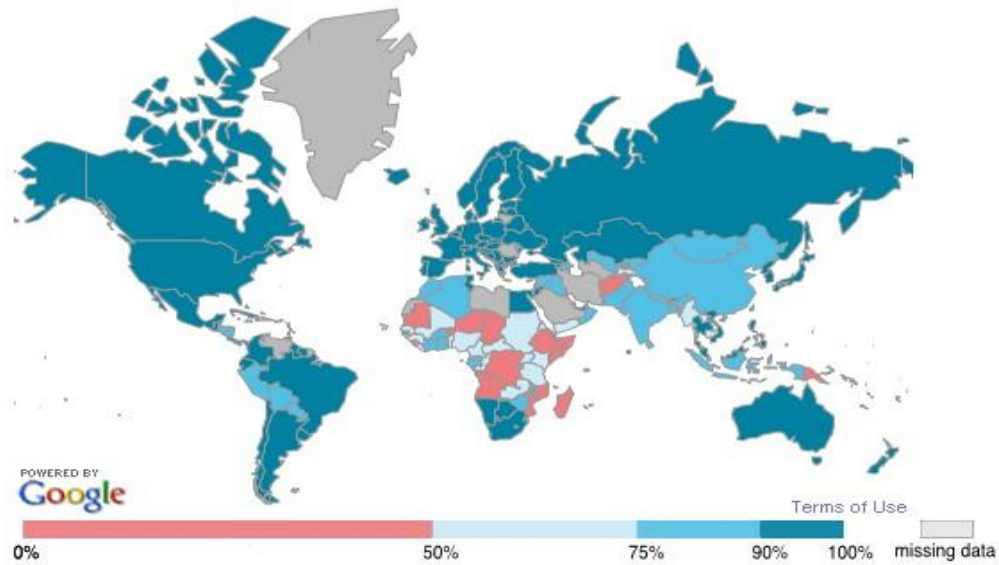


Fig. 76. Distribución de agua potable a nivel mundial.

Fuente: Programa de Monitoreo Conjunto OMS/UNICEF /JMP 2006.

Por ello, para garantizar la calidad del agua de una o más fuentes de agua, será necesario llevar a cabo un control continuo, donde se evalúen parámetros fisicoquímicos y microbiológicos del agua, de manera que se garantice su calidad según su uso. Al respecto se menciona que para recopilar datos sobre la calidad del agua *“en las regiones en vías de desarrollo, es necesario encontrar formas rápidas, confiables y económicas de medir la calidad del agua localmente”*.

III.4. Problemática de la calidad del agua en Bolivia

“La problemática de la calidad del agua en Bolivia es tan diversa como las zonas y regiones y actividades del país”.²²⁷ Esto se debe a que la calidad del agua en Bolivia es vulnerable a las muchas fuentes de contaminación que existen como producto de las diferentes actividades antropogénicas que se realizan.

Así, la presencia de residuos químicos, orgánicos e inorgánicos provenientes de las actividades industriales en fuentes de agua serán propios de la zona Oriental; la presencia de residuos químicos producto de las actividades mineras serán propios en la zona Occidental o región andina; y la presencia de residuos orgánicos y tóxicos utilizados en la producción

²²⁷ España C. y Rodríguez C. 1996. Situación regional sobre la calidad del agua en la República de Bolivia. Reunion general sobre la calidad del agua potable.



agrícola (plaguicidas y fertilizantes)^{228,229} y de actividades hidrocarburíferas serán propios en la zona Central,²³⁰ a la que se ha sumado la presencia de compuestos químicos derivados del narcotráfico contaminantes emergentes.

La mayoría de estos contaminantes son vertidos de manera directa más que indirecta a las macrocuencas y subcuencas las cuales reciben estos contaminantes por medio de escorrentías, precipitaciones, desmontes, colas mineras y descargas de origen antropogénico²³¹, cuyos contaminantes llegarán a diferentes poblaciones.

Las tres cuencas principales que abastecen de agua a Bolivia son: la cuenca Amazónica, del Plata y Lacustre. La cuenca amazónica representa el 66% del territorio, pues a través del río Madera drena alrededor del 95% de las aguas del país; la cuenca del Plata corresponde al 21% del territorio; y la cuenca Lacustre o Cerrada representa 13% del territorio la misma que gira alrededor de los lagos Titicaca y Poopó.²³²



Fig. 77. Cuencas hidrográficas en Bolivia.

²²⁸ COSUDE, GTA, INTERCOOPERATION. Contexto del agua en Bolivia- Capitalización de experiencias “Agua, Tierra y Gente”. Bolivia 2007.

²²⁹ Maldonado M., I Van Damme P. y Rojas J. 1998. Contaminación y eutrofización en la cuenca del río Rocha (Cochabamba). Rev. Bol. de Ecol. 3: 3-9.

²³⁰ Mamani Quiquinta W., Suárez Rueda N., García Terrazas C., Estudio socioambiental de la contaminación del agua por actividad hidrocarburífera en la Serranía Aguarague de Tarija. Zona de influencia Villa Montes.

²³¹ Copa R. Escenarios de la problemática del agua en la coyuntura boliviana.

²³² Servicio Nacional de Meteorología e Hidrología (SENAMHI).

En un ranking mundial sobre disponibilidad de los recursos hídricos realizado por el Centro de Recursos Hídricos del Reino Unido, Bolivia ocupó el puesto 16 (de 180 países), ubicándose en el segmento medio-alto de la lista de los países de América Latina con acceso al agua. Por otro lado, al momento de hablar de la calidad del líquido, Bolivia se encuentra en el puesto 60 de esta misma lista.

Esto se refleja también en los datos referidos por el Ministerio de Medio Ambiente y Agua de Bolivia, que indica que el 74,5 % de los bolivianos cuenta con agua potable y que el campo es el lugar más afectado por la ausencia de estos servicios, ya que solamente el 50,3 % de sus habitantes posee agua potable con relación a las ciudades donde el 87,5 % cuenta con líquido potable.

Tabla 28. Indicadores de población con acceso a fuente con accesos de agua en Bolivia
Fuente: Programa de Monitoreo Conjunto OMS/UNICEF /JMP 2010.

País	Año	Población			Aprovisionamiento de agua en áreas					
		Urbana	Rural	Nacional	Urbana		Rural		Nacional	
		%	%	x1000	Mejora (%)	Total	Mejora (%)	Total	Mejora (%)	Total
Bolivia	2000	62	38	8307	94		57		80	
	2010	67	33	9930	96		71		88	

El abastecimiento de agua en el área rural, se realiza por captación directa de fuentes de aguas (ríos, lagunas, embalses) que en su mayoría no llevan ningún control de desinfección y menos de calidad.

La provisión de agua en el área urbana en Bolivia se da de cuatro maneras:

- Agua intradomiciliaria distribuida a través de redes y piletas públicas, muchas de las cuales se encuentran en mal estado pues las conexiones datan de los años 60.
- Camiones cisterna repartidores de agua²³³ que no cuentan con niveles de seguridad exigidos y en los que no se realiza ningún control de calidad.
- Pozos públicos (pertenecientes a las OTB; Organizaciones Territoriales de Base o juntas vecinales) y pozos individuales o familiares en los que tampoco se realiza ningún control de calidad ya que son a iniciativa de los usuarios finales.

²³³ ANESAPA Asociación de Nacional de Empresas de Servicios de Agua Potable y Alcantarillado. (Bolivia).



Así por ejemplo el Servicio Municipal de Agua Potable y Alcantarillado de Cochabamba (zona central) refiere que seis de cada diez pobladores (60%) consumen agua que no tiene estudios de calidad, el restante 40% se aprovisiona de otras fuentes o por camiones cisternas que no siguen un tratamiento adecuado; hecho que se refleja en el 90% de problemas gastrointestinales.

En Potosí (zona Occidental) un informe municipal, indica que la actividad minera genera, entre otras, la contaminación de las aguas por el vertido directo de las colas de ingenios o por la liberación de polvos en suspensión a la misma. Así, se han detectado la presencia de elementos pesados cuyos orígenes se deben a la existencia de los drenajes de los pasivos ambientales y al uso intensivo de activos químicos en las plantas de flotación de la actividad minera.²³⁴

Por esta razón se están tomando acciones, como la última que se realizó en el Seminario regional de remediación ambiental minera que *“prohíbe totalmente el uso del cianuro en la actividad minera, por la peligrosidad que éste representa”*. Así también el mismo seminario se exigió *“la necesidad de exigir el cumplimiento de la normativa en relación al vaciado de colas a cursos de agua natural, dado que aún existen ríos en los departamentos de Oruro y Potosí que presentan este problema y la importancia de implementar mecanismos más eficaces de control social en actividades mineras que están afectando el medio ambiente”*.²³⁵

Por otra parte en el control de las aguas del Río Guadalquivir (zona Oriental) realizados por la Prefectura, Universidad y la Cooperativa de Servicios de Agua y Alcantarillado Tarija (Cosaalt Ltda.) evidenciaron niveles preocupantes de contaminación tanto físico-químicos como biológicos en las aguas del río y sus afluentes, ya que existían sustancias o agentes contaminantes por encima o debajo de los límites máximos y mínimos permisibles, limitándose estas aguas para actividades como el riego e industria agrícola entre otras.^{236,237}

Todos estos problemas se deben a la ausencia de una Política de Estado y marco institucional disperso sin mandatos claros para el manejo integral del agua y al manejo

²³⁴ Administración Autónoma para Obras Sanitarias Potosí (Aapos). Agosto 2010. El Potosí www.elpotosi.net/ Potosí - Bolivia 24 de agosto de 2010.

²³⁵ La Patria www.lapatriaenlinea.com/ Oruro - Bolivia 08 de septiembre de 2010.

²³⁶ El País www.elpaionline.com/ Tarija - Bolivia 03 de agosto de 2004.

²³⁷ Miller J.R., Hudson-Edwards K.A., Lechler P.J., Preston D., Macklin M.G., 2004. Heavy metal contamination of water, soil and produce within riverine communities of the Río Pilcomayo basin, Bolivia. *Sci. Total Environ.* 320, 189-209.

fragmentado de los recursos hídricos entre entidades con funciones y competencias en el tema. También está inmersa la visión mercantilista del agua que genera desigualdades e inequidades en el acceso a este vital elemento.

III.5. Normativa de aguas

Según refiere la OMS la elección o normativa a seguir” debe estar en función de las necesidades, capacidades y seguridad, o riesgo que se considere aceptable en circunstancias concretas de cada país” y puede estar en función a los recursos del laboratorio. Por lo que estas son establecidas por los países por adaptar las directrices a sus prioridades nacionales y tomando en cuenta sus características técnicas, económicas, sociales, culturales y políticas y restricciones. Varios ejemplos se presentan con el objetivo de diferenciar las normas de las directrices, y para mostrar cómo los países han ido adaptando directrices de la OMS a sus situaciones con el fin de elaborar normas nacionales de calidad del agua potable, y para el uso de las aguas residuales tratadas para el riego de cultivos.²³⁸ En Bolivia las leyes que resguardan el recurso agua son:

- Ley de medio ambiente Ley 1333 (27-Abril-1992).Septiembre-1879) que fue elevado a rango de Ley s/n de 28/11/1906; que concibe el recurso hídrico como un bien.
- Ley de Servicios Básicos Ley Nº 2066 Ley modificatoria a la Ley 2029 de Servicios de agua potable alcantarillado sanitario.
- Ley de Riego Ley No. 2878 y sus reglamentos -Acceso al agua para riego basado en usos y costumbres, a iniciativa de los regantes.

III.6. Parámetros utilizados en la determinación de calidad de agua.

El control de la calidad del agua se ejecuta con la realización de los análisis físicos, químicos y microbiológicos que determinen la aceptabilidad o no del agua, para el uso que se haya designado. En algunos casos comprende desde el muestreo hasta el reporte de la información.

²³⁸Hespanhol I., Prost A.M.E., 1994. Who guidelines and national standards for reuse and water quality. Water Res. 28, 119-124.



III.6.1 Evaluación fisicoquímica

La medición de parámetros físico-químicos tales como: pH, turbidez y cloro residual se consideran para algunos autores como parámetros esenciales y necesarios para determinar la calidad del agua a nivel básico (Solano, 2002) pues éstas determinaciones son prácticas, accesibles y aplicables a la realidad.

Otros autores refieren que para garantizar la inocuidad de una fuente de agua es mejor realizar un análisis exhaustivo, e indican que para la clasificar el agua para consumo humano será necesario la determinación de por lo menos 20 parámetros, entre los que destacan: temperatura, conductividad, oxígeno disuelto, amonio, nitrógeno, cloruros, cianuros, recuentos microbiológicos y algunos metales.

Estos parámetros también son útiles para determinar el grado de contaminación tanto orgánica como inorgánica. Estos además son de una gran precisión, pues se los considera testigos de las condiciones instantáneas de las aguas y los efectos de los contaminantes se detectan si son dispuestos en el momento (Toro J y col., 2003)²³⁹

Pese a ello su determinación en temas de salud no es de rigor, ya que se requieren de periodos de exposición prolongados para causar un efecto negativo sobre la salud y sus riesgos son distintos de los asociados a la contaminación microbiana: Así pues pocos componentes químicos del agua pueden ocasionar problemas de salud como resultado de una exposición única, excepto en el caso de una contaminación masiva accidental.²⁴⁰ Pocas sustancias químicas, como el fluoruro, el arsénico y el nitrato, produce grandes efectos sobre la salud, y otras sustancias, como el plomo, el selenio y el uranio, pueden producir también efectos significativos en determinadas condiciones (a elevadas dosis). Por eso se afirma que la vigilancia y el control de los contaminantes químicos tienen importancia secundaria cuando el agua está contaminada por microorganismos.

pH. Es una medida que permite determinar el grado de acidez o alcalinidad del agua; su valor para ser adecuado deberá ser en lo posible neutro. Valores bajos o muy altos ocasionan problemas en el sabor del agua e incrementan el peligro de corrosión o de incrustación de los materiales que se utilizan en la construcción del sistema. En aguas superficiales pueden existir variaciones de pH pero no más allá de una unidad, variaciones

²³⁹ XVI Congreso Chileno de Ingeniería Hidráulica. Noviembre 2003, Santiago. Toro J, Schuster J, Kurosawa J, Araya E, Contreras M. Diagnostico de la calidad del agua en sistemas loticos utilizando diatomeas y macroinvertebrados bentónicos como bioindicadores río Maipo.

²⁴⁰ http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/gdwq3_es_full_lowsres.pdf

mayores señalan la presencia de material foráneo que puede alterar la calidad del agua. En aguas subterráneas el pH tiene una menor variación. Su fácil determinación permitirá contar con una evaluación rápida de la existencia de variaciones fisicoquímicas del agua.

Turbidez. Se origina por la presencia de partículas en suspensión y de tipo coloidal en el agua así cuando la misma tenga elevada turbiedad se corre el riesgo de que bacterias patógenas estén presentes en el agua: Una turbiedad elevada también interfiere el proceso de cloración o desinfección.

Cloro Residual. Es el primer parámetro evaluado en sistemas de agua que cuenten con proceso de cloración. Así, si el agua contiene cloro residual (0.2 mg/l) en forma continua, será suficiente para garantizar la calidad bacteriológica adecuada para el consumo, requiriéndose una menor frecuencia de análisis de Coliformes fecales en agua.

Sólidos totales (ST).son la suma de todos los sólidos disueltos y suspendidos en el agua. Para su análisis se seca la muestra y se pesa el residuo se pesa después. Los ST pueden ser tanto las sustancias orgánicas como inorgánicas, los microorganismos y partículas más grandes como la arena y arcilla.

Conductividad (CE). La medición de la conductividad del agua se encuentra muy relacionada con la cantidad de sólidos disueltos presentes en el agua. La conductividad de un agua en condiciones naturales dependerá de las condiciones geoquímicas de las fuentes de agua. En el caso de sistemas superficiales se espera que existan cambios de conductividad entre valores máximos y mínimos conforme al ciclo hidrológico.

En aguas subterráneas una variación drástica de conductividad evidencia la existencia de focos de contaminación, por lo tanto se deberá evaluar la contaminación iniciando un control más completo de la calidad del agua, como también realizar una inspección sanitaria más minuciosa de la cuenca.

Evaluación de las características organolépticas. Constituyen en otro factor de gran relevancia para la evaluación de las características organolépticas del agua, es decir, aquellas que pueden ser detectadas por los sentidos de los consumidores, tales como la turbidez, el color, el olor y el sabor. Este aspecto es esencial porque puede ser motivo de rechazo del agua suministrada y conducir al empleo de otra fuente alternativa de abastecimiento de agua no controlado. Sin embargo, se reconoce que la ausencia de efectos sensoriales no necesariamente garantiza la inocuidad el agua para el consumo humano. Las característica



organolépticas, han de ser tomados en cuenta en el momento del muestreo. Estas incluyen la evaluación del color, olor y gusto.²⁴¹

III.6.2 Evaluación microbiológica

La experiencia ha demostrado que los peligros microbianos continúan siendo la principal preocupación tanto de los países desarrollados como de los países en desarrollo.²⁴² No se debe olvidar que en muchas ocasiones los microorganismos se convierten en un riesgo para la salud humana, como es el caso de los agentes patógenos transmitidos por el agua, que constituyen un problema de salud mundial²⁴³.

Se ha determinado que los parámetros microbiológicos esenciales y básicos para determinar la calidad de agua son: la determinación o recuento de: Coliformes totales y Coliformes fecales, los cuales son considerados indicadores de contaminación.²⁴⁴ Es más, se habla de que aun cuando la contaminación del agua es ante todo un problema biológico muchos países han dependido esencialmente de parámetros fisicoquímicos para evaluar su calidad.

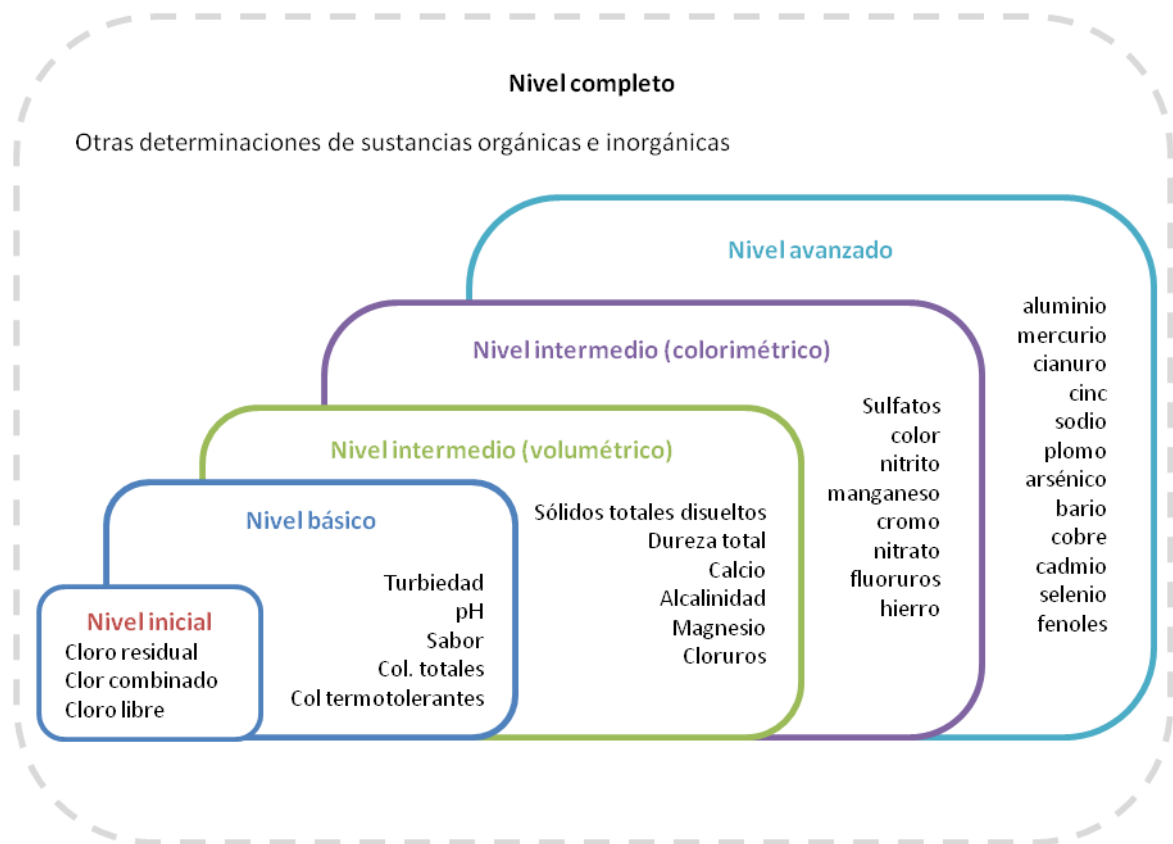
²⁴¹ J. Rodier y col. 1998. "Análisis de las aguas". Ediciones Omega S.A., Barcelona.

²⁴² http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/gdwq3_es_full_lowres.pdf

²⁴³ Vargas C., Rojas R., Joseli J. 1996. Control y Vigilancia de la Calidad del Agua de Consumo humano. Textos Completos. CEPIS; 27p.

²⁴⁴ Mireya del Pilar Arcos Pulido¹, Sara Lilia Ávila de Navia, Msc.², Sandra Mónica Estupiñán Torres MSc.², Aura Cristina Gómez Prieto¹. Indicadores microbiológicos de contaminación de las fuentes de agua.

Tabla 28. Nivel del laboratorio de control de calidad de agua en función a la capacidad analítica.



III.6.3. Inspección Sanitaria básica

Otros aspecto que se deben tomar en cuenta para determinar la calidad del agua es la Inspección Sanitaria básica, aspecto en el que se debe trabajar también es en la inspección Sanitaria básica donde sea la observación y el sentido común los que permitan establecer el o los que factores dan lugar a la contaminación (daño de redes, presencia de basurales cercanos, niveles de higiene) de la fuente de agua a estudiar. De su observación podrían depender los análisis a realizar para determinar el los contaminantes de la muestra a estudiar.

Para ello la Elaboración de manuales resulta esencial de un laboratorio es el establecimiento de manuales (conjunto de procedimientos a seguir de forma ordenada y consecutiva) respecto al todo lo concerniente al laboratorio en este caso habrán manuales recompra de material o equipos, de muestreo, de conservación y traslado de muestras.



III.7. Materiales y métodos

III.7.1 Aspectos económicos

Para el desarrollo de este proyecto se contó, en primera instancia, con la concesión de un proyecto titulado “Implementación y formación de personal para el funcionamiento de un laboratorio analítico y de calidad de agua en Bolivia” por parte de la AECID. Esto permitió financiar el establecimiento de dos laboratorios dotándolos de equipamiento y recursos; entendiéndose por equipamiento la infraestructura (mobiliario, instrumentos básicos y material fungible) para la evaluación fisicoquímica y microbiológica del agua; y por recursos la capacitación de personal que hiciese funcionar dichos laboratorios, así como todos aquellos aspectos organizativos de los mismos.

Además, este primer proyecto financió la realización del “*Curso Internacional Teórico y Práctico de Aguas*” desarrollado en la Universidad Mayor de San Simón de Cochabamba (Bolivia) en la que además de formar al personal que iba a trabajar en las instalaciones financiadas con este proyecto se abrió a la comunidad universitaria para concienciarlos de la necesidad de conocer la calidad de las aguas de consumo así como dotarlos de unos conocimientos mínimos para la evaluación de su calidad.

Posteriormente, se concedió un segundo proyecto, por parte del CICODE, titulado “Implementación del Área de Microbiología de Aguas y Apoyo Formación de Formadores del Laboratorio Analítico de Control ambiental y de Calidad de agua.” que ayudó a poder culminar la instalación del laboratorio de microbiología.

Por último, la AECID, concedió la renovación y ampliación del primer proyecto lo que permitió ampliar su instrumentación y potencial mediante la adquisición de un equipo HPLC con detección UV para poder determinar pesticidas y otros compuestos orgánicos en muestras de agua.

III.7.2 Parámetros a determinar

Antes de plantear las instalaciones y el material necesario para implementar el laboratorio, lo que se evaluó fueron los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos a implantar en estas instalaciones, ya que todo va a depender de esto.

Para ello se llevó a cabo una amplia revisión bibliográfica que permitiera establecer los parámetros básicos para poder establecer la calidad de un agua, así como una revisión de la normativa legal en Bolivia. Además, se contó con el asesoramiento gratuito de dos

instituciones españolas de gran prestigio y experiencia en el sector como son EMASAGRA (Empresa de Aguas de Granada) y LAB S.L. (Laboratorio de Análisis Bioclínico).

Así, a partir de los parámetros fisicoquímicos básicos referidos por Solano y el asesoramiento externo, se decidió establecer los parámetros que se detallan en la Tabla 30.

Tabla 30. Parámetros a determinar en los nuevos laboratorios a implementar en Bolivia.

Parámetros a determinar
Fisicoquímicos
pH
Conductividad
Dureza total
Cloro residual libre
Fluoruros
Magnesio
Nitratos
Nitritos
Calcio
Cloruros
Color
Turbidez
Microbiológicos
E Coli
Bacterias coliformes totales

Por tanto, la optimización de recursos económicos permitió no limitarse a los parámetros básicos, que eran los que inicialmente estaban programados en la memoria del proyecto concedido, sino que se pudieron ampliar, implementándose un laboratorio de nivel intermedio. Una vez establecidos los parámetros a determinar, lo siguiente fue el establecimiento de los métodos analíticos para poder llevar a cabo su determinación. Para ello, se tuvieron en cuenta los siguientes requisitos:

- Rentabilizar al máximo la instrumentación necesaria, es decir, seleccionar aquellos métodos que conlleven la adquisición de la menor instrumentación posible y que un mismo instrumento se pueda utilizar para la determinación de más de un parámetro.



- Seleccionar métodos que utilicen instrumentación robusta que no precise de un gran mantenimiento y que no conlleve un gasto excesivo de reactivos y fungible, así como de fácil mantenimiento y reparación.
- Utilizar métodos simples y robustos, que no requieran una alta especialización de personal.
- Y, por último, métodos que requieran de material fungible básico y reactivos comunes que se puedan obtener con facilidad en Bolivia. La Tabla 31 Resumen de los parámetros, métodos, aplicados según normativa boliviana y normativa implementada en los laboratorios del LAN.

Tabla 31. Parámetros y normativas del laboratorio implementado en Bolivia.

Parámetros a determinar	Método	Norma Boliviana	Norma utilizada en el laboratorio
Fisicoquímicos			
Determinación de pH	Método electrométrico	NB 31001:2006 Método electrométrico	NB
Determinación de conductividad	Método electrométrico	Método electrométrico	Método electrométrico
Determinación de dureza total	Método titulométrico de EDTA	NB 31002:2006 Método titulométrico de EDTA	NB
Determinación de cloro residual libre	Método colorimétrico ortotoluidina	NB 528:1985 Método colorimétrico ortotoluidina	NB
Determinación de fluoruros	Método del electrodo específico	NB 531:1985 Método del electrodo específico	NB
Determinación del magnesio	Método gravimétrico	NB 532:1985 Método gravimétrico	Se determina por diferencia de Calcio y dureza total)
Determinación de nitratos	Método especto fométrico ultravioleta	NB 534:1985 Determinación de nitratos por el método espectrofotométrico ultravioleta	NB
Determinación de nitritos	Método especto fométrico ultravioleta	NB 535:1985 Determinación de nitritos por el método espectrofotométrico ultravioleta	NB
Determinación del calcio	Método titrimétrico del EDTA	NB 519:1985 Determinación del calcio por el método titrimétrico con EDTA	NB
Determinación de cloruros	Método de Mohr	NB 520:1985 Determinación de cloruros por argentometría	NB
Determinación del color		NB 513:1985	
Determinación de la turbiedad	Método Nefelométrico.	NB 514:1985 Método Nefelométrico	NB

Microbiológicos			
E Coli	Método de membrana filtrante	NB 31005:2007 Método de membrana filtrante	NB
Bacterias coliformes tot.	Método de membrana filtrante	NB 31003:2007 Método de membrana filtrante	NB

Establecidos los parámetros y los métodos a seguir se comprobó si estaban en acuerdo con la normativa Boliviana y no al revés, como sería lo usual; es decir, establecer los métodos a partir de la normativa. Pero en este caso, se procedió de esta forma para poder optimizar los recursos económicos de los que se disponía. No obstante, esta estrategia viene avalada por la OMS que indica que la normativa *“debe estar en función de las necesidades, capacidades y seguridad, o riesgo que se considere aceptable en circunstancias concretas de cada país”*, por lo que se debe seguir la normativa boliviana, pero también refiere que *“la elección de los mismos estará en función a los recursos del laboratorio”*. Por lo que aquellos parámetros que se pudieron adaptar a las normas bolivianas se adaptaron y aquellos que no, se refrendaron con bibliografía científica o normativa de otros países (generalmente europeos) que avalasen la calidad de las determinaciones desarrolladas.

III.7.3 Establecimiento de los laboratorios

Una vez establecidos los parámetros, los métodos y la normativa a seguir, se procedió a establecer las instalaciones, iniciándose la implementación del laboratorio con la consecución de espacios, dotándolos de mobiliaria, equipos informáticos, instrumentos y material fungible.

III.7.3.1 Infraestructura

Debido a que los recursos económicos de los que se disponían eran limitados y se querían dedicar a la dotación de instrumentación y recursos para los laboratorios, las primeras acciones que se llevaron a cabo fueron las negociaciones con la Universidad Mayor de San Simón (UMSS) y más concretamente con la Facultad de Bioquímica y Farmacia de esta Universidad para la cesión del espacio físico en el que se instalaran estos dos laboratorios. Estas negociaciones dieron lugar a la concesión de 100 m² en las nuevas instalaciones del Laboratorio de Análisis Nutricional y de Aguas (LAN) que en aquellos entonces estaban en remodelación; por lo que transitoriamente la Facultad cedió uno de sus laboratorios para el establecimiento de este centro.





Fig. 78. Facultad de Bioquímica y Farmacia.

Así, la instalación inicial se llevó a cabo, de forma provisional, en el laboratorio 206 de Facultad de Bioquímica y Farmacia, que contaba con los servicios básicos de agua y electricidad y mobiliario de laboratorio básico.

Una vez finalizada la remodelación del LAN, todo el equipamiento, mobiliario, instrumentación etc. Se trasladaron a estas instalaciones. Empezando a funcionar en julio de 2011.

III.7.3.2. Mobiliario

Una de las partidas presupuestarias del proyecto de la AECID estaba dedicada a la dotación del mobiliario del laboratorio. Así, a partir del espacio gratuito conseguido en el LAN se realizaron diversas distribuciones de mobiliario para intentar conseguir dos fines: 1) aprovechar al máximo el espacio y la funcionalidad de las instalaciones; 2) con el menor coste posible para rentabilizar la dotación económica conseguida.

Las premisas iniciales o condiciones que debía de cumplir la distribución de los laboratorios fueron que contase con cuatro áreas definidas e independientes: una para la recepción de muestras y administración/gestión del laboratorio; una segunda dedicada al laboratorio fisicoquímico; un tercer espacio dedicado al laboratorio de microbiología; y un cuarto habitáculo destinado al personal técnico para consulta bibliográfica, formación y discusiones científicas. Esto es necesario tanto para el buen funcionamiento del laboratorio como para cumplir con la normativa existente y poder acreditarse antes los órganos competentes como la RELOA.

Así, de las diversas propuestas evaluadas se seleccionó la que se muestra en la Fig. 79, ya que cumplía con todas estas premisas y adaptaba los espacios disponibles para la implementación de todas la instrumentación y material necesarios.

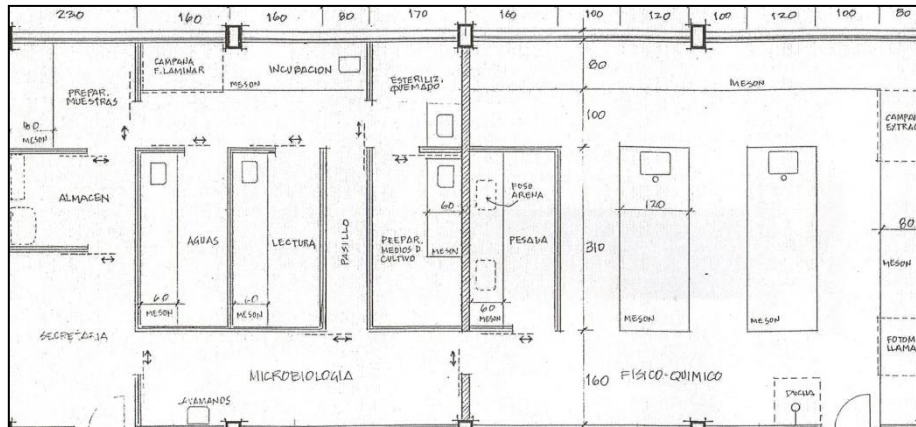


Fig. 79. Plano del nuevo laboratorio del LAN donde funcionará el laboratorio de aguas.
Fuente: Laboratorio del LAN.

III.7.3.3. Material informático

Para facilitar el trabajo del personal y poder organizar adecuadamente la gestión del laboratorio se dotó de material informático básico tanto el área de recepción como el área de personal técnico.

Así, el área de gestión y recepción de muestra se dotó con un ordenador de sobremesa y una impresora multifunción equipada con impresora, scanner, fotocopidora, teléfono y fax; mientras que en el área de personal técnico se dotó con un ordenador portátil y un proyector multimedia.



Fig. 80. Material informático de apoyo.

Como se puede ver, esta dotación fue la básica para poder comenzar la actividad y, además de facilitar el trabajo de laboratorio, permite la realización de campañas, seminarios y charlas de difusión a la comunidad; acciones necesarias dentro el área urbana y rural pues mediante las mismas se puede mostrar a la población la importancia que tiene determinar la calidad de agua que se consume y usa.

III.7.3.4 Instrumentación

Como se ha comentado anteriormente, para poder definir la instrumentación necesaria se establecieron los parámetros así como los métodos para su determinación. Así, a partir de la tabla 32, se deduce que es necesario la adquisición de un potenciómetro, un valorador potenciométrico y un espectrofotómetro. Además, para poder realizar medidas de campo, se decidió adquirir un pH-metro, un colorímetro y un turbidímetro portátiles. Esto fue posible debido a la gestión de reducción de costes y a la optimización de recursos. Para la selección de los instrumentos a adquirir se contó con la colaboración del Director del Laboratorio de EMASAGRA (D. Juan José Cabrera).

La tabla 32 muestra una lista de los instrumentos adquiridos

Tabla 32. Equipos adquiridos para la implementación de los laboratorios.

Equipos	Parámetros a determinar
pH 25 pH-metro portátil con disoluciones reguladoras certificadas de pH 4, 7 y 9	pH temperatura
pH-Burette 24 Valorador potenciométrico automático.	Dureza Calcio
Glp-22 pH-metro ionómetro con agitador para acoplar y medir con los siguientes electrodos ión selectivo de e ión selectivo de Flúor de pH y Temperatura. Kit para análisis de cloruros.	pH Sodio Fluor
GLP 31 conductímetro con agitador magnético Célula de CE sensor de Tº universal.	Conductividad
Turbidímetro portátil 2100 ISO HACH6 cubetas turbidímetro 2100/AN HACH.	Turbidez

<p>Colorímetro Pocket II Cloro HACH STABCAL set patrones viales HACH</p>		<p>Cloro residual</p>
<p>Espectrofotómetro Shimadzu</p>		<p>Nitratos Niritos Otros</p>

Esta instrumentación permite la determinación fiable de todos los parámetros fisicoquímicos establecidos en el apartado anterior y, además, la determinación *in situ* de los parámetros más relevantes para evaluar la calidad de un agua de consumo (pH, turbidez y cloro residual) con los instrumentos portátiles de medida. De esta forma, además de analizar las muestras que lleguen al laboratorio se pueden desarrollar campañas en lugares alejados del mismo, disminuyendo costes de transporte y almacenamiento.

También, se adquirieron equipos de apoyo necesarios para poder llevar a cabo las diferentes determinaciones. Estos equipos se detallan en la tabla 33.

Tabla 33. Equipos de apoyo adquiridos para la implementación del laboratorio.

Equipos de apoyo	
<p>Desionizador de agua</p>	
<p>Mantas calefactoras</p>	



Siguiendo con la política de reducción de costes, para poder rentabilizar al máximo la dotación con la que se contaba, no sólo se evaluó cuidadosamente qué equipos adquirir sino dónde; siendo necesario establecer toda la logística para su transporte e instalación en las dependencias cedidas por la UMSS. Así, una gran parte de los instrumentos fueron adquiridos en España, ya que incluso añadiendo el precio del transporte a Bolivia, su coste era sustancialmente inferior que si se adquiría allí directamente; sólo el espectrofotómetro y los equipos de apoyo se compraron en Bolivia. Todos los demás instrumentos fueron adquiridos en España siguiendo los procedimientos establecidos por la legislación española y la UMSS. Además, se consiguió que el coste de los impuestos de aduanas fuera financiado por la Facultad de Bioquímica y Farmacia de la UMSS, lo que disminuyó el coste de adquisición con cargo al presupuesto disponible e implicó más a esta Organización en la consecución de los objetivos de estos proyectos.

Además, para dotar el laboratorio de microbiología se recibió una donación por parte de EMASAGRA, completando así la instrumentación necesaria para la primera etapa de actividad del laboratorio. La tabla 34 muestra los equipos donados instalados en el nuevo laboratorio muestra los equipos donados por EMASAGRA y la figura 81 muestran una parte de los mismos (estufas de cultivo) instaladas ya en el nuevo laboratorio.

Tabla 34. Equipos donados al laboratorio por parte de la empresa EMASAGRA

Descripción
Estufa de cultivo 0-35 °C, marca: P Selecta, S.A.
Estufa de cultivo 0-45°C, marca: P Selecta, S.A.
Baño hervidor (Baño María) color beige, marca: P Selecta S.A.
Agitador magnético color café, marca: P Selecta S.A..
Agitador magnético color metálico, marca: P Selecta S.A. .
Agitador magnético de sólidos con plato, color beige, marca: P Selecta S.A.



Fig. 81. Estufas de cultivo donadas por la empresa EMASAGRA instaladas en el LAN (Área microbiológica).

De esta información se deduce que el laboratorio de parámetros fisicoquímicos tiene la dotación necesaria para poder funcionar adecuadamente, sin embargo, el laboratorio de parámetros microbiológicos debe de mejorarse. Para ello, se solicitó un segundo proyecto titulado *“Implementación del Área de Microbiología de Aguas y Apoyo Formación de Formadores del Laboratorio Analítico de Control ambiental y de Calidad de agua”* ante el CICODE bajo la dirección del Profesor D. Alberto Fernández Gutiérrez.

La concesión de este proyecto (10.000 €) permitió la adquisición de una cabina de flujo laminar que completase las instalaciones del laboratorio de microbiología y permitiera trabajar con agentes patógenos (véase la Fig. 82).





Fig.82. Fotografía de la campana de flujo laminar

Por último, indicar que una vez finalizada la primera fase y dotado el laboratorio con la instrumentación básica para poder ser considerado con un laboratorio de control intermedio, se decidió solicitar financiación para la adquisición de un instrumento de HPLC. Proyecto que fue solicitado y concedido por la AECID como renovación del primer proyecto y que ha permitido instalar este instrumento en las instalaciones del LAN y que va a permitir la determinación de pesticidas y otros contaminantes de origen orgánico.

III.7.3.5 Material fungible y reactivos.

Al igual que la instrumentación, el material fungible y los reactivos se seleccionaron en función de los parámetros a determinar (véanse las Tablas 35 y 36).

Tabla 35. Material fungible comprado para la implementación de los laboratorios.

Materiales	
Buretas calibradas (2)	Pipetas 1 ml (10)
Desecador (1)	Pipetas 2 ml (3)
Erlenmeyer 50 ml (10)	Pipetas 5 ml (10)
Erlenmeyer 100 ml (10)	Pipetas 10 ml (10)
Erlenmeyer 250 ml (10)	Pipetas 20 ml (3)
Erlenmeyer 500 ml (10)	Probeta 10 ml (4)
Matraces aforados 10 ml (8)	Probeta 50 ml (4)
Matraces aforados 25 ml (10)	Probeta 100 ml (4)
Matraces aforados 50 ml (8)	Probeta de 1000 ml (2)
Matraces aforados 100 ml (10)	Tubos de ensayo 180x18 (50)
Matraces aforados 500 ml (2)	Vasos de precipitado 25 ml
Matraz aforado 1000 ml (2)	Vasos de precipitado 50 ml (10)
Micropipetas de 0-10 μ l (1)	Vasos de precipitado 100 ml (4)
Micropipetas de 10-100 μ l (1)	Vasos de precipitado 500 ml (8)
Micropipetas de 100-1000 μ l (1)	Embudo de filtración inoxidable (1)
Gradillas (2)	Cajas petri de vidrio para membrana (100)
Balones de 500 y 1000 ml (5)	Botellas de agua pyrex de 1litro (10)
Portapuntas de 10, 100 y 1000 μ l (3)	Matraz kitasato de 1ltro (2)
Varilla de vidrio (2m)	Mechero bunsen (1)
Pipetas pasteur	Tubos rosca 190x10 (100)
Puntas de 0-10 μ l y porta puntas	Picetas (2)
Puntas de 10-100 μ l y porta puntas	Tubos Durham (100)
Puntas de 100-1000 μ l y porta puntas	Pinza anatómica (1)
Caja de membranas para microbiología	

Entre paréntesis se detalla la cantidad.



Tabla 36. Reactivos comprados para la implementación del proyecto.

Reactivos
Anaranjado de metilo 10 g
Cloruro de potasio 20 g
Tartrato de potasio y sodio 20 g
Hidróxido de amonio 500 ul
Solución Nessler 100 ml
EDTA 250 g
Solución estándar 1413 us 250 ml
Solución estándar 23 us 250 ml
Nitrito de sodio 150 g
Nitrato de sodio 150 g
1 frasco ácido oxálico pa 1k
1 frasco sulfato de Zinc
1 frasco cloruro de bario
1 frasco agar Mc Conkey x 500 g
Agar Rojo violeta bilis Lactosa
1 frasco agar cetrimide x 500 g
Hidróxido de aluminio
Murexida
Carbón activado
Eriocromo cianina
Agar MFC x 500 g
Medio SIM x 500 g
Silica gel x1000 g

A diferencia de los instrumentos, el material fungible y los reactivos fueron adquiridos en Bolivia, y que no tenía sentido implementar una metodología que no dispusiese de estos materiales básicos y que se tuviese que recurrir a compras en el extranjero, una vez agotadas las existencias iniciales.

Destacar que se consiguió financiación extra para la adquisición de reactivos por parte de la Facultad de Bioquímica y Farmacia de la UMSS, por lo que aunque la literatura refiere que la cantidad de reactivos y materiales debe estar en función de la demanda del laboratorio, se hizo una estimación que permitiera cubrir las determinaciones a realizar durante la primera fase de vida del laboratorio, aprovechándonos de la buena disposición de todos los organismos de aportar dinero en esa primera fase de implementación.

III.7.3.6 Protocolos de análisis

Para poder llevar a cabo la determinación de los parámetros establecidos anteriormente, además de instrumentación, fungibles y reactivos, se hace necesario establecer los protocolos de análisis así como el control de calidad de las medidas.

Por ello, a partir de la bibliografía y el asesoramiento por parte de EMASAGRA y LAB se establecieron los protocolos de análisis de cada uno de los parámetros fisicoquímicos que se detallan a continuación.

III.7.3.7 Material de consulta

Un buen laboratorio, además de contar con instrumentos, material y reactivos, debe contar con material bibliográfico de consulta. Por ello, inicialmente se programó una partida presupuestaria para la adquisición de material didáctico de apoyo. Éste se seleccionó teniendo en cuenta calidad científica y ampliación de los conocimientos y determinaciones inicialmente implementados. La tabla 37 muestra el material bibliográfico adquirido.

Tabla 37. Libros comprados para la implementación del laboratorio.

Libros
Manual de agua potable
Procesos potabilización de agua
Gestión integrada de la calidad en el Medio Ambiente
Libro Microbiología
Manual Nalco (3 tomos)
Purificación de agua

Esta bibliografía, además de detallar los protocolos establecidos inicialmente, contempla la determinación de otros parámetros de gran interés y en conjunto ofrece una gama amplia de pruebas y conocimientos, que ayudarán a hacer frente a la determinación de parámetro(s) fuera de los mencionados, que sean necesarios analizar en algún momento



de vida del laboratorio. Además, este material sirve para la formación y capacitación del personal del laboratorio.

Esta bibliografía fue adquirida en España, ya que no estaba disponible en Bolivia.

III.7.4 Formación del personal

Toda esta infraestructura serviría para poco si no se contase con personal cualificado capaz de llevar a cabo los protocolos establecidos. Como bien refiere la literatura un laboratorio básico ha de contar con personal capacitado y personal técnico entendido en el área; y para la elección del mismo habrá que realizar antes una evaluación de lo que se tiene (demanda de análisis) versus lo que se necesita (número de personal para hacer frente a esa demanda). Por ello, se reservó una partida del presupuesto para la realización de un curso de formación al personal que iba a estar trabajando en estos laboratorios.

Además, ha de tomarse en cuenta que un laboratorio básico debe ser ante todo accesible, lo que limita en este caso la cantidad de personal que trabaje en el laboratorio. Para evitar que esta formación quedase limitada al personal que va a formar parte de este laboratorio y en colaboración con la Facultad de Bioquímica y Farmacia de la UMSS se decidió ampliar esta formación a todos los estudiantes de los últimos cursos y maestrías de las licenciaturas de Bioquímica y Farmacia, así como abrirlo a técnicos, especialistas de otras entidades tanto públicas como privadas.

Por lo que otra de las actividades de este proyecto fue la organización de un “Curso Internacional de Calidad del Agua”. Este curso tuvo dos vertientes, una teórica en el que participaron 100 personas (jefes de laboratorio, técnicos de laboratorio, profesionales varios y estudiantes) y una vertiente práctica en la que participaron 30 personas (por limitaciones de espacio en laboratorio).

La parte teórica se desarrolló en las instalaciones de la Escuela Técnica de Salud y la parte práctica se llevó a cabo en el laboratorio 206 de la Facultad de Bioquímica y Farmacia.

Para su impartición se contó con profesorado de la UGR (Dr. D. Alberto Fernández Gutiérrez y Dr. D. Jorge F. Fernández Sánchez), el Director de los Laboratorios de Calidad de Agua de EMASAGRA (D. Juan José Cabrera Jordán), y profesorado de la UMSS (Dra. Teresa Cardoso y Dra. Gaby Espinosa). La tabla 38 muestra los contenidos de este curso teórico.

Tabla 38. Contenidos teóricos del curso internacional del agua (España Bolivia)

Contenido	País
Importancia del Agua	ESP
Bioquímica del Agua	BOL
Usos del Agua	ESP
Introducción a la Microbiología de aguas	BOL
Prácticas de Microbiología	BOL
Teoría de Microbiología de Aguas	BOL
Aguas Residuales	ESP
Prácticas de Microbiología	BOL
Introducción al análisis de parámetros físico-químicos en aguas. Análisis volumétrico	ESP
Técnicas Electroanalíticas	ESP
Prácticas de análisis volumétrico, potenciometría, y conductimetría	ESP
Técnicas Ópticas	ESP
Gestión de un laboratorio de análisis de aguas	ESP
Prácticas de análisis volumétrico, potenciometría, y conductimetría	ESP
Nuevas tecnologías para el tratamiento de aguas	ESP
Consideraciones ambientales respecto al recurso agua y sus implicaciones sociales, económicas y políticas.	
Gestión del Agua	BOL

Para la realización del bloque práctico se contó con la participación de los Drs. Fernández Gutiérrez y Fernández Sánchez (UGR), la tesinanda (Paulina K. Contreras Gutiérrez) y D. Juan José Cabrera Jordán (EMASAGRA). Realizándose las siguientes prácticas:

- Toma de muestra.
- Determinación de parámetros básicos (pH, conductividades, sólidos totales disueltos).

Para estas sesiones se contó también con la ayuda de la asociación española ADECAGUA (Asociación para la Defensa de la Calidad de las Aguas), que donó diversos kits



de diagnóstico rápidos para parámetros básicos que dan información de la calidad de un agua de consumo (pH, DTD, OD y turbidez).



Fig.83. Kit donado por Adecagua.

Con la realización del curso Teórico - Práctico se dio lugar inauguración y puesta en marcha del laboratorio, que además de prestar servicios de determinación de calidad de aguas buscará que se realicen trabajos de investigación que muestren la importancia de determinar la calidad del agua.

En esencial que se promueva en Bolivia el interés de las personas e instituciones para determinar la calidad de sus aguas, haciendo énfasis en la importancia del agua de consumo. Hay que concienciar a las autoridades que la falta de acceso a agua “limpia” constituye una gravísima carencia que priva a las personas de una necesidad básica y de un derecho fundamental.

Conclusiones-presente y futuro del laboratorio

El laboratorio actualmente se halla equipado para brindar a los estudiantes de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y de Bioquímicas de la UMSS Bolivia, la formación básica en la determinación de la calidad de agua fisicoquímica y microbiológica.

En el laboratorio cuenta con los recursos necesarios para llevar investigaciones en (salud, industria,) cuyas temáticas se hallen referidas al control de calidad del agua.

“La salud es la interacción entre nutrición, genética y nuestros hábitos de vida”
José María Ordobás-España

Capítulo IV

Caracterización de metabolitos presentes en tres variedades de vegetales del género *Allium* cultivadas en Andalucía



OBJETO DEL CAPÍTULO

El objetivo del presente capítulo fue, caracterizar de forma cualitativa los metabolitos presentes en tres variedades del género *Allium*, (cebolla roja, blanca y cebolleta), esto con el fin de generar información que permita la ampliación, mejora y actualización de información en las Tablas de Composición de Alimentos.

Las variedades elegidas fueron: cebolla roja y cebolla blanca (*Allium cepa*) y cebolleta (*Allium fistulosum*), cultivadas en la zona de Andalucía, las cuales son de amplio uso dentro de la dieta mediterránea así, como también a nivel mundial.

Para caracterizar estas muestras, se realizó una extracción metanólica que favorece la extracción de compuestos polifenólicos. Para la separación, ionización y detección de estos compuestos se ha hecho uso del acoplamiento HPLC-UV-ESI-TOF.

Los resultados obtenidos en las muestras analizadas muestran la presencia de las diferentes familias de metabolitos algunos de ellos compuestos activos.



IV.1. Generalidades especies *Allium* sp.

El género *Allium* pertenece a la familia de las *Alliaceae*²⁴⁵; que comprende aproximadamente unas 800 especies²⁴⁶; de las que destacan las especies ornamentales y comestibles. Este género es conocido como el de la cebolla, el ajo, puerros, chalotes, cebolletas y cebollines.

De todos estos cultivos, en este capítulo se ha tenido a bien caracterizar tres variedades *Allium* como son la cebolla roja y blanca (*Allium cepa* L.) y la cebolleta (*Allium fistulosum* L.). Las mismas se han elegido por su amplia demanda y ser producidas en algunas zonas de Andalucía. A continuación se procederán a realizar más consideraciones acerca de la producción de estas variedades, las actividades funcionales que se le han asignado y las herramientas que han sido empleadas en su caracterización.

IV.1.1 Generalidades de la cebolla

La cebolla es un vegetal íntimamente relacionado con el ajo; morfológicamente es una planta bulbosa, herbácea, con tallos huecos y hojas cilíndricas algo carnosas.

Se comercializa en forma de bulbo, que es la parte de la planta de mayor consumo, la cual puede ser redonda, ovoide o aplanada, según la variedad de cebolla. El bulbo está formado por varias capas concéntricas (llamadas cascós), los cuales se hallan separadas por finas membranas muy ricas en agua. Durante su desarrollo la última capa se seca para cumplir la función de protección al resto del bulbo.

Existen muchas variedades de cebolla: roja, amarilla, blanca y verde; cada una de ellas con sabor propio, que va desde muy fuerte a ligeramente dulce. De todas ellas son las variedades de cebolla roja y blanca las de mayor cultivo.

El consumo de cebolla data desde hace más de 5000 años²⁴⁷; sus orígenes parecen indicar que procede de Asia.²⁴⁸ La producción y consumo de esta verdura ha reflejado un crecimiento del 25% en los últimos diez años pues constituye una fuente importante de

²⁴⁵ Rabinowitch H.D., Currah L. 2002. *Allium* Crop Science: Recent advances. Wallingford UK: CABI publishing.

²⁴⁶ Block E. 2010. *Garlic and Others Alliums. The Lore and the Science*. Cambridge UK: Royal Society of Chemistry.

²⁴⁷ Jones R.N. 1983. Cytogenetic evolution in the genus *Allium*. In: Swaminathan MS, Gupta PK, Sinha U (eds) *Cytogenetics of crop plants*. MacMillan, New York, pp 516–55.

²⁴⁸ Halnet P. 1990. *Taxonomy, evolution and history*: In *Onion and Allium Crops*. Boca Raton florida: CRC.



compuestos beneficiosos para la salud,^{249,250} considerándose, por ello, como una planta medicinal además de alimenticia (consumiéndose de forma cruda, cocida, frita, seca o tostada).

Con referencia a su cultivo, la cebolla es la especie más cultivada del género *Allium*²⁵¹, la gran mayoría de los cultivos pertenecen al “grupo de la cebolla común” (*A. cepa* L.), por lo que generalmente se conocen como cebolla”. A nivel mundial es el cuarto cultivo hortícola más importante 4´197.549 toneladas Food and Agricultural Organization (FAO), 2010²⁵² y, en España, el segundo después de los tomates²⁵³. Respecto a su producción, los datos estadísticos de la FAO muestran que China es el principal productor de cebolla a nivel mundial (figura 85) y en los que España ocupa el decimosexto lugar.

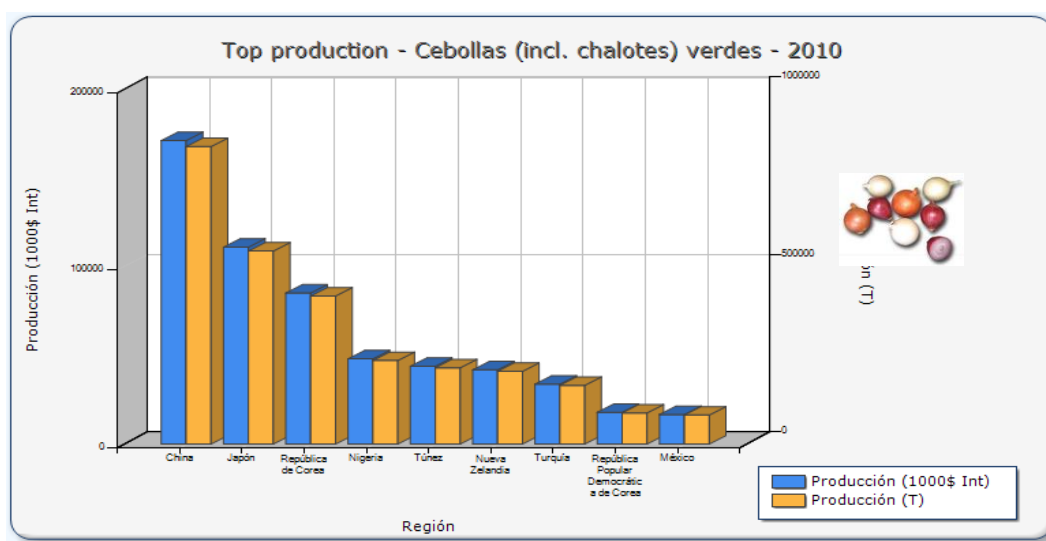


Fig. 85. Principales países productores de cebolla a nivel mundial
Fuente FAO 2010

²⁴⁹Zill-e-Huma., Abert Vian M., Maingonnat J.F., & Chemat, F. 2009. Clean recovery of antioxidant flavonoids from onions: Optimising solvent free microwave extraction method. *Journal of Chromatography A*, 1216(45), 7700-7707.

²⁵⁰Petersson E.V., Puerta A., Bergquist J., Turner C. 2008. Analysis of anthocyanins in red onion using capillary electrophoresis-time of flight-mass spectrometry. *Electrophoresis*, 29(12):2723-2730.

²⁵¹Brewster James L. 1994. *Onions and other vegetable alliums* (1st ed.). Wallingford, UK: CAB International. p. 16. ISBN 0-85198-753-2.

²⁵²Food and Agricultural Organization 2010. Data drawn from FAOSTAT (available at <http://faostat.fao.org/>).

²⁵³Ministerio de Medio Ambiente, Medio Rural y Marino. MARM. <http://www.marm.es/es/>

En España las principales comunidades productoras de cebolla son Castilla la Mancha, Andalucía y Valencia²⁵⁴.

IV.1.2 Generalidades de la cebolleta

La cebolleta es una especie del género de las cebollas. Es una planta perenne que no forma bulbos, su forma característica es alargada y de poco grosor, sus hojas y tallos son prácticamente huecos, su sabor es más bien dulce y más delicado, aunque en gusto y en olor es muy semejante a la cebolla.

El consumo de la cebolleta viene también de antiguo, se opina que apareció en Siberia y que fue introducida en Europa a finales de la edad media.

IV.2. Composición nutricional de la cebolla y cebolleta

A continuación se muestra la composición de nutricional de la cebolla, y la cebolleta^{255,256,257}, (véase la tabla 39).

²⁵⁴E. Roldán C., Sánchez-Moreno B., De Ancos Y M. P. Cano. 2007. Onion By - Products As Antioxidant Food Ingredientsv Congreso Iberoamericano De Tecnología Postcosecha Y Agroexportaciones.

²⁵⁵ BEDCA. Base de Datos Española de Composición de Alimentos/URL:<http://www.bedca.net>

²⁵⁶ <http://www.personalhealthzone.com/nutrition/nutrients/vegetables/onion.html>

²⁵⁷ Release 18, 2006 - Nutrition and Diet Datahttp://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/cgi-bin/list_nut_edit.pl

USDA National Nutrient Database for Standard Reference



Tabla 39. Composición nutricional de la cebolla y cebolleta.

Fuentes: BEDCA y USDA

Componente	Cebolla Valor	Cebolleta Valor	Unidad
Energía, total	103 (25)	166(40)	kJ (kcal)
Grasa, total (lípidos totales)	0.53	0.10	g
Proteína, total	3	1.10	g
Agua (humedad)	91.3	91.3	g
<u>Hidratos de Carbono</u>			
Carbohidratos	1.9	9.34	g
Fibra, dietética total	2.3	1.7	g
Almidón, total	trazas	0	g
Azúcares, totales	1.9	4.24	g
Sucrosa	-	0.99	g
Glucosa (dextrosa)	-	1.97	g
Fructuosa	-	1.29	g
<u>Grasas</u>			
Ácidos grasos, monoinsaturados totales	0.08	0.08	g
Ácidos grasos, poliinsaturados totales	0.22	0.22	g
Ácidos grasos saturados	0.12	0.12	g
Colesterol	0	0	mg
Fitoesteroles	-	16.5	mg
<u>Vitaminas</u>			
Vitamina A	500	500	ug
Vitamina D	0	0	ug
Vitamina E	0.9	0.9	mg
Folato, total	130	130	ug
Riboflavina	0.11	0.11	mg
Tiamina	0.08	0.08	mg
Vitamina B-12	0	0	ug
Vitamina B-6, total	0.13	0.13	mg
Vitamina C (ác. ascórbico)	60	60	mg
Niacina		0.163	mg
Ácido pantoténico		0.117	mg

Componente	Cebolla Valor	Cebolleta Valor	Unidad
Folatos totales		20.9	mcg
Colina total		6.1	mg
Betaina		0.1	mg
B caroteno		1	µg
Luteína-zeaxantina		4	µg
Vitamina K		0.4	µg
<u>Minerales</u>			
Calcio	86	23	mg
Hierro, total	1.5	0.21	mg
Potasio	275	146	mg
Magnesio	40	10	mg
Sodio	3	4	mg
Fósforo	54	29	mg
Zinc (cinc)	0.4	0.17	mg
Cobre		0.039	mg
Manganeso		0.129	mg
Selenio		0.50	µg
Flúor		1.1	µg
<u>Aminoácidos</u>			
Triptófano		0.014	g
Treonina		0.021	g
Isoleucina		0.014	g
Leucina		0.025	g
Lisina		0.039	g
Metionina		0.002	g
Cistina		0.004	g
Fenilalanina		0.025	g
Tirosina		0.014	g
Valina		0.021	g
Arginina		0.104	g
Histidina		0.014	g
Alanina		0.021	g
Ácido aspártico		0.091	g
Ácido glutámico		0.258	g
Glicina		0.025	g
Prolina		0.012	g
Serina		0.021	g

IV.3. Propiedades funcionales descritas en variedades *Allium*

Las especies de *Allium* son una rica fuente de metabolitos secundarios, que resultan útiles para el tratamiento o prevención de una serie de enfermedades. Así lo sugieren numerosos estudios e informes farmacológicos que indican que sus extractos tienen actividad:

- **Antioxidante**, debido al alto contenido de flavonoides que poseen, en especial por los niveles de quercetina que reportan cuya actividad antioxidante, es comparable a la del α -tocoferol.
- **Antifúngica**, debida a la presencia de péptidos²⁵⁸ y compuestos azufrados²⁵⁹.
- **Antimicrobiana**, debido a la presencia de compuestos azufrados considerados principales agentes antimicrobianos activos, que también han mostrado efecto bacteriostático frente a *helicobacter pylori*, agente responsable de la úlcera y cáncer gástrico. Además de los compuestos azufrados, se ha informado de que la quercetina, también posee actividad antiviral y mejora la biodisponibilidad de algunos fármacos.
- **Antiasmática**, debido a que ciertos derivados de compuestos de cebolla, en particular los tiosulfatos y cepaenos muestran propiedades anti-inflamatorias y antiasmáticas in vivo.
- **Antiagregante y antiplaquetaria o antitrombótica**, pues se han atribuido estas actividades in vitro^{260,261,262,263} al efecto de los flavonoides, Acsos(S-alquenil-L-cisteína sulfóxidos) y cepaenos^{264,265}.

²⁵⁸Wang H.X. and T.B. Ng 2004. "Isolation of alliceptin, a novel antifungal peptide from onion (*Allium cepa*) bulbs." *Journal of Peptide Science* 10(3): 173-177.

²⁵⁹ Cammue B. P. A., Thevissen K., et al. 1995. "A Potent Antimicrobial Protein from Onion Seeds Showing Sequence Homology to Plant Lipid Transfer Proteins." *Plant Physiology* 109(2): 445-455.

²⁶⁰ Ariga T., Oshiba S. y Tamada. 1981. Platelet aggregation inhibitor in garlic. *Lancet* 2:150.

²⁶¹ Makhej A.N. y Bailey J.M. 1990. Antiplatelet constituents of garlic and onion. *Agents Actions* 29:360-363.

²⁶² Lawson L.D., Ransom D.K. y Hughes B.G. 1992. Inhibition of whole blood platelet-aggregation by compounds in garlic clove extracts and commercial garlic products. *Thromb. Res.* 65:141-156



- **Hipocolesterolémica e hipolipemiante**, debido a la presencia de alicina y compuestos derivados que actúan como sustancias activas con efectos responsables de esta actividad. En la que además participan saponinas y flavonoides de quercetina que han mostrado tener la capacidad de reducir los niveles séricos de colesterol y la arterioesclerosis, actúan también contra la obesidad ejerciendo un efecto protector ante esta sobre el metabolismo lipídico de los niveles de colesterol, fosfolípidos y triglicéridos²⁶⁶.
- **Antihiper glucémico**, o anti-diabética, debido al efecto hipoglicemiante de alguno de sus compuestos²⁶⁷.
- **Anticancerígena**, debida a que el consumo de ajo y cebolla disminuye el riesgo de sarcoma y carcinoma en diversos tejidos y órganos^{268,269}, siendo responsables de este efecto los compuestos azufrados, saponinas (erubosido-B), quercetina y kaempferol, y en especial, los selenocompuestos, que tienen efecto preventivo contra el cáncer de páncreas²⁷⁰.

IV. 4. Metodologías analíticas aplicadas al estudio de metabolitos en *Allium*

Debido a que la cebolla es una matriz en la que se han descrito la presencia de varias familias de compuestos: ácidos fenólicos, flavonoides, cepaenos, compuestos organoazufrados, tiosulfatos, fructooligosacáridos, compuestos organoselénicos,

²⁶³ Goldman I. L.,. KopelbergM, et al. 1996. "Antiplatelet activity in onion (*Allium cepa*) is sulfur dependent." *Thrombosis and Haemostasis* 76(3): 450-452.

²⁶⁴Griffiths G., TruemanL., et al.2002."Onions-A global benefit to health." *Phytotherapy Research* 16(7): 603-615.

²⁶⁵ Kawakishi S., Morimitsu Y. 1988. New inhibitor of platelet aggregation in onion oil.*Lancet* Aug 6 2 330-330.

²⁶⁶ Chow J. 2002. Probiotics and prebiotics: a brief overview. *J. Renal Nutr.* 12:76-86

²⁶⁷ Jain R. C., yasC. R. V., et al.1973. "Hypoglycaemic action of onion and garlic." *Lancet* 2(7844): 1491.

²⁶⁸ Reddy B.S., Hamid R.y RacC.V. 1997. Evaluation of oligosaccharides for potential chemopreventive properties in colon carcinogenesis using aberrant crypt foci. *Carcinogenesis*. 18:1371-1374.

²⁶⁹ Rowland I.R., RumneyC.J., Coutts J.T. y LievensL.C. 1998. Effect of *Bifidobacterium longum* and inulin on gut bacterial metabolism and carcinogen-induced crypt foci in rats. *Carcinogenesis* 19:281-285

²⁷⁰Nöthlings U., MurphyS. P., et al.2007."Flavonols and Pancreatic Cancer Risk." *American Journal of Epidemiology* 166(8): 924-931.

ACSOs y antocianinas (que imparten un color rojo/morado),²⁷¹ su detección se ha realizado usando diferentes metodologías para lograr su caracterización. La tabla 40 muestra un resumen de las más relevantes.

Tabla 40. Relación de familias y metabolitos secundarios detectados en cebolla y la técnica utilizada.

COMPUESTO	TÉCNICA ANALÍTICA UTILIZADA	REFERENCIA
POLIFENOLES		
Flavonoles	HPLC-ESI-DAD LC MS/MS LC(ESI)-MS/MS HPLC-UV/LC-DAD-MS-MS CE-UV HPLC-UV-TIS-MS/MS TLC, PC,UV NMR HPLC-UV-RMN HPLC-DAD, LC-MS	²⁷² ¡Error! Marcador o definido. ²⁷⁴ ²⁷⁵ ²⁷⁶ , ²⁷⁷ ²⁷⁸ , ²⁷⁹ ¡Error! , Marcador no definido., ²⁸⁰

²⁷¹ Donner et al., H. Donner, L. Gao and G. Mazza, 1997. Separation and characterization of simple and malonylated anthocyanins in red onions, *Allium cepa* L, *Food Research International* 30, pp. 637–643.

²⁷² Rodrigues A. S., Pérez-Gregorio M. R., García-Falcón M. S., Simal-Gándara J., & Almeida, D. P. F. 2011. Effect of meteorological conditions on antioxidant flavonoids in Portuguese cultivars of white and red onions. *Food Chemistry*, 124(1), 303-308.

²⁷³ Olsson M.E., Gustavsson K-, Vagen IM. 2010. Quercetin and Lsoramnetin in sweet and red cultivars of onion (*Allium cepa* L.) at Harvest, after field curing, heat treatment, and storage. *J Agric Food Chem* 58(4):2323-2330.

²⁷⁴ Rodríguez Galdón B., Rodríguez Rodríguez E. M., & Díaz Romero C. 2008. Flavonoids in onion cultivars (*allium cepa* L.).*Journal of Food Science*, 73(8), C599-C605.

²⁷⁵ Seung U. L., Jong H. L., Suk H. C., Jin S. Lee, Mayumi O.-K., N. K., Carol E. L., Mendel F. 2008. Flavonoid Content in Fresh, Home-Processed, and Light-Exposed Onions and in Dehydrated Commercial Onion Products.*Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56 (18), 8541-8548

²⁷⁶ LeeJ.,& Mitchell A. E. 2011. Quercetin and isoramnetin glycosides in onion (*allium cepa* L.): Varietal comparison, physical distribution, coproduct evaluation, and long-term storage stability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(3), 857-863.

²⁷⁷ Caridi D., Trenerry V.C., Rochfort S., Duong S., Laughler D., Jones R.2007. Profiling and quantifying quercetin glucosides in onion (*Allium cepa* L.) varieties using capillary zone electrophoresis and high performance liquid chromatography. *Food Chem*, 105(2):691-699.

²⁷⁸Yoo K.S., Lee E.J., & Patil B.S. 2010.Quantification of quercetin glycosides in 6 onion cultivars and comparisons of hydrolysis-HPLC and spectrophotometric methods in measuring total quercetin concentrations.*Journal of Food Science*, 75(2), C160-C165.

²⁷⁹ Idem Caridi et al 2007.



	UPLC-QTOF HPLC-QQQ	¡Error! Marcador no definido.
Antocianinas	HPLC-DAD CE-ESI-TOF-MS 68 LC-DAD-MS RP-HPLC-MS-RMN RP-HPLC-DAD-ESI-MS-MS-RMN CZE-TOF-MS 68	²⁸¹ ²⁸² , ²⁸³ ²⁸⁴
Taninos	HPLC-DAD	²⁸⁵
Ácidos fenólicos	HPLC TIS	²⁸⁶
COMPUESTOS TERPENICOS		
Saponinas	HPLC-RMN	
COMPUESTOS NITROGENADOS		
Aminoácidos	HPLC-RMN RP-HPLC ²⁸⁷ HPLC ²⁸⁸	

²⁸⁰ Singh B.N., Singh B.R., Singh R.L., Prakash D., Singh D.P., Sarma B.K., et al. 2009. Polyphenolics from various extracts/fractions of red onion (*Allium cepa*) peel with potent antioxidant and antimutagenic activities. *Food and Chemical Toxicology*, 47(6), 1161-1167.

²⁸¹Xianli Wu and, Ronald L. 2005. Identification and Characterization of Anthocyanins by High-Performance Liquid Chromatography–Electrospray Ionization–Tandem Mass Spectrometry in Common Foods in the United States: Vegetables, Nuts, and Grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53 (8), 3101-3113

²⁸² Rodrigues A.S., Pérez-Gregorio M.R., García-Falcón M.S., Simal-Gándara J., & Almeida, D. P. F. 2011. Effect of meteorological conditions on antioxidant flavonoids in portuguese cultivars of white and red onions. *Food Chemistry*, 124(1), 303-308.

²⁸³Petersson E.V., Puerta A., Bergquist J., & Turner C. 2008. Analysis of anthocyanins in red onion using capillary electrophoresis-time of flight-mass spectrometry. *Electrophoresis*, 29(12), 2723-2730.

²⁸⁴ Steimer S., & Sjöberg P. J. R. 2011. Anthocyanin characterization utilizing liquid chromatography combined with advanced mass spectrometric detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(7), 2988-2996.

²⁸⁵Akaranta O. and. Odozi T. O. 1986. "Antioxidant properties of red onion skin (*Allium cepa*) tannin extract." *Agricultural Wastes* 18(4): 299-303.

²⁸⁶ Singh B.N., Singh B.R., Singh R.L., Prakash D., Singh, D. P., Sarma B. K., et al. 2009. Polyphenolics from various extracts/fractions of red onion (*Allium cepa*) peel with potent antioxidant and antimutagenic activities. *Food and Chemical Toxicology*, 47(6), 1161-1167.

²⁸⁷ Dini I., Tenore G.C., et al. 2008. "Chemical composition, nutritional value and antioxidant properties of *Allium caepa* L. Var. *tropeana* (red onion) seeds." *Food Chemistry* 107(2): 613-621.

COMPUESTOS AZUFRADOS		
Glucosinolatos	UPLC	
Cepaenos	HPLC, LC-MS-UV-DAD-H NMR CG-MS LC-APCI-MS	289, 290
FOS	HPLC-DAD	
Oligosacáridos	HPLC	
Selenocompuestos	HPLC-ICP-MS GC-AED CE/HPLC-ICP-MS EC/HPLC-APCI-MS-MS RP-IP-HPLC-SEC-ICP-MS RP-IP-HPLC-ICP-MS	291, 292, 293, 294, 295 296
ACSOs	HPLC	297

²⁸⁸Hansen S. L. 2001. "Content of Free Amino Acids in Onion (*Allium cepa* L.) as Influenced by the Stage of Development at Harvest and Long-term Storage." *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B - Soil & Plant Science* 51(2): 77-83.

²⁸⁹ Block E., Naganathan S., et al. 1992. "Allium chemistry: HPLC analysis of thiosulfinates from onion, garlic, wild garlic (ramsoms), leek, scallion, shallot, elephant (great-headed) garlic, chive, and Chinese chive. Uniquely high allyl to methyl ratios in some garlic samples." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 40(12): 2418-2430.

²⁹⁰ Calvey E.M., Matusik J.E., et al. 1997. "Allium Chemistry: Supercritical Fluid Extraction and LC-APCI-MS of Thiosulfinates and Related Compounds from Homogenates of Garlic, Onion, and Ramp. Identification in Garlic and Ramp and Synthesis of 1-Propanesulfinothioic Acid S-Allyl Ester." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45(11): 4406-4413.

²⁹¹ Ge H., Cai X.J., et al. 1996. "Identification of selenium species in selenium-enriched garlic, onion and broccoli using high-performance ion chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometry detection." *Analytical Communications* 33(8): 279-281.

²⁹² Kotrebai M., Bird S.M., et al. 1999. "Characterization of selenium species in biological extracts by enhanced ion-pair liquid chromatography with inductively coupled plasma-mass spectrometry and by referenced electrospray ionization-mass spectrometry." *Spectrochimica acta, Part B: Atomic spectroscopy* 54(11): 1573-1591.

²⁹³ Uden P.C., Bird S. M., et al. 1998. "Analytical selenoamino acid studies by chromatography with interfaced atomic mass spectrometry and atomic emission spectral detection." *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* 362(5): 447-456.

²⁹⁴ Wróbel K., Kannamkumarath S.S., et al. 2004. "HPLC-ICP-MS speciation of selenium in enriched onion leaves - A potential dietary source of Se-methylselenocysteine." *Food Chemistry* 86(4): 617-623.

²⁹⁵ Arnault I. and Auger J. 2006. "Seleno-compounds in garlic and onion." *Journal of Chromatography A* 1112(1-2): 23-30.

²⁹⁶ Shah M., Kannamkumarath S. S., et al. 2004. "Identification and characterization of selenium species in enriched green onion (*Allium fistulosum*) by HPLC-ICP-MS and ESI-ITMS." *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 19(3): 381-386.



Por lo general, todos los estudios realizados en cebolla utilizan como matriz de estudio la parte comestible de la misma, es decir, el bulbo de la planta, la cual en la mayoría de los casos se corta en finos trozos los que se liofilizan o criogenizan, con el fin de que estos se puedan luego moler y obtener una muestra seca en polvo que suele conservarse a -20°C . Este paso facilita la extracción de los metabolitos contenidos en la muestra, pues mejora la interacción de la misma con el disolvente empleado en el proceso de extracción, siendo la extracción sólido-líquido la que más se utiliza, empleando mezclas de metanol y agua en diferentes proporciones.

Haciendo un resumen general sobre la caracterización de estos compuestos se puede indicar que las técnicas de elección son: HPLC²⁹⁸, seguida de la CE que muestra también buenos resultados. Para la detección y cuantificación se utiliza mucho la detección UV²⁹⁹ y, recientemente, en los últimos años técnicas más sofisticadas como MS, IT, TOF e incluso Q-TOF, las cuales permiten la cuantificación de los componentes estudiados cuyos resultados pueden ser verificados posteriormente mediante la técnica de RMN.

El acoplamiento HPLC-ESI-TOF puede ser considerado como ideal para la caracterización de compuestos en matrices vegetales, debido a que genera información que facilita la identificación de los posibles compuestos que podrían estar presentes en la muestra. Sus datos pueden ser empleados con acoplamientos que permitan hacer análisis MS/MS.

IV.5. Análisis del perfil metabólico las tres variedades *Allium*

IV.5.1. Materiales y métodos

IV.5.1.1. Muestra

Para este estudio se trabajó con tres muestras liofilizadas enteras (piel y pulpa) de cebolla roja, cebolla blanca y cebolleta. Estas muestras fueron facilitadas por el Departamento de Química Analítica de la Universidad de Almería, dentro del marco del

²⁹⁷Randle W.M., Lancaster J.E., Et Al. 1995. "Quantifying Onion Flavor Compounds Responding To Sulfur Fertility - Sulfur Increases Levels Of Alk(en)yl Cysteine Sulfoxides and Biosynthetic Intermediates." Journal Of The American Society For Horticultural Science 120(6): 1075-10.

²⁹⁸Merken H.M. and Beecher G.R. 2000. "Measurement of Food Flavonoids by High-Performance Liquid Chromatography: A Review." Journal of Agricultural and Food Chemistry 48(3): 577-599.

²⁹⁹Price K.R. and Rhodes M.J.C.. 1997. "Analysis of the Major Flavonol Glycosides Present in Four Varieties of Onion (*Allium cepa*) and Changes in Composition Resulting from Autolysis." Journal of the Science of Food and Agriculture 74(3): 331-339.

proyecto Mejora del contenido de información de las tablas de composición de alimentos, (contrato de investigación realizado con la Junta de Andalucía), cuyo objetivo principal es la caracterización de los polifenoles y otros compuestos bioactivos presentes en las frutas y verduras de alto consumo en Andalucía.

IV.5.1.2. Reactivos

Como disolvente de extracción se utilizó metanol grado HPLC (High Purity Liquid Chromatography) de Lab-Scan (Dublín, Irlanda) y agua Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, EE.UU.).

Como fases móviles se utilizó acetonitrilo grado HPLC de Lab-Scan (Gliwice, Sowińskiego, Poland) y agua Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, EE.UU.). Para la acidificación de la fase móvil (agua Milli Q) se utilizó ácido acético grado análisis Fluka (Suiza). Ambos disolventes se filtraron con un equipo de filtración de solventes 58.061 (Supelco, Bellefonte, PA, EE.UU.) y se sonicó en un baño ultrasonidos (Selecta Mod.513. Barcelona-España).

IV.5.2. Técnica analítica utilizada para la caracterización

Como se describió anteriormente, los extractos vegetales son muestras muy complejas debido a que contienen gran diversidad de metabolitos primarios y secundarios que pueden diferir bastante en su concentración. La determinación de dichos metabolitos requiere una técnica potente capaz de llevar a cabo una correcta y una detección que aporte información acerca de la identidad de los compuestos bajo estudio. En este caso, se ha utilizado como técnica separativa HPLC, ESI como interface y DAD y TOF como sistemas de detección.

IV.5.2.1. Condiciones HPLC

La separación de los compuestos se realizó utilizando un equipo de RRLC (Rapid Resolution Liquid Chromatography) 1200 Series de Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA) dotado de una bomba binaria G1312B y un detector array de diodos (DAD) G1315C. Se utilizó una columna Zorbax Eclipse Plus (Agilent Technologies) RP-C18 de 4,6x150 mm y 1,8 μm de poro. El volumen de inyección fue de 15 μl y el flujo de 0,8 ml/min. La fase móvil consistió en A: agua/ácido acético 0,5 % y B: acetonitrilo. El gradiente utilizado fue: 0 min, 0% B; 20 min, 20% B; 30 min, 30% B; 40 min, 50% B; 50 min, 75% B; 60 min, 100% B.

IV.5.2.2. Condiciones sistema de ionización

Para la ionización y transferencia de los compuestos, desde el RRLC (instrumento de separación) hasta el espectrómetro de masas, se utilizó una fuente de ionización por electrospray (ESI), usando diferentes condiciones en función de si la detección de las masas se realiza mediante tiempo de vuelo o por trampa de iones. Para el caso del



tiempo de vuelo (TOF) se usó una temperatura de 190 °C, una presión del gas nebulizador de 2 bares, un flujo del gas nebulizador de 9 l/min y un voltaje en la cámara de nebulización de -500 V y un voltaje en la entrada del capilar de +4500 V.

IV.5.2.3. Condiciones del microTOF

La detección de las masas exactas de las moléculas se logró utilizando un analizador en tiempo de vuelo TMmicroTOF de Bruker Daltonics con aceleración ortogonal de (Bremen, Alemania). Las condiciones fueron: voltaje de +1960 V en el detector y una ionización en modo negativo en un rango de 50 a 1100 m/z. Para conseguir la exactitud de masas necesaria para la identificación de los compuestos se utilizó calibración externa. Debido al amplio rango de masas que se quería detectar se utilizó como calibrante el acetato sódico que cubre un rango de m/z de 50 a 1200. Este calibrante se preparó mezclando en una proporción 5:995 (v/v) una disolución 1 M de NaOH y otra de agua:isopropanol (50:50, v/v) con 0,2% de ácido acético.

IV.5.2.4. Análisis de datos

Los datos de las masas exactas y los fragmentos obtenidos por TOF se procesaron con el software Data Analysis 3.5 y su editor Generate Molecular Formula TM (Bruker Daltonics Bremen, Alemania), que proporciona una lista de posibles fórmulas elementales mediante el uso de un editor inteligente de fórmula, el cual utiliza un algoritmo CHNO, que proporciona funciones estándar, como mínimo/máximo elemental, configuración electrónica y el anillo de más dobles enlaces equivalentes, así como una comparación sofisticada del teórico con el patrón de isótopos obteniendo así un “error” para una mayor confianza en la fórmula molecular sugerida. La precisión ampliamente aceptada para un umbral de la confirmación de la composición elemental se ha establecido en 5 ppm de error y 50 de $m\sigma$ con excepción de algunos compuestos.

Al comienzo de los análisis se realizó una calibración *in situ* del instrumento mediante una inyección directa del calibrante con una bomba de jeringa (Cole Palmer Cole-Vernon Hills, IL, EE.UU.), conectada directamente a la interface, pasando la solución de clúster acetato de sodio. Este método permite obtener una curva de calibración exacta sobre la base de numerosos masas de cada grupo difieren en 68 Da (NaCHO₂). Debido a la compensación de la variación de temperatura en el TOF, esta calibración externa siempre precisa los valores de masa (más de 5 ppm).

IV.5.3. Preparación de los extractos

Para la preparación de los extractos en cada caso se pesaron 0.5 g de muestra liofilizada, en un tubo de rosca pírax, al que se le añadieron 15 ml de una disolución de metanol: agua (80:20). Esta mezcla se sonicó durante 30 minutos y luego se centrifugó durante 15 minutos a 3700 r.p.m. Transcurrido ese tiempo y con ayuda de una pipeta

pasteur se trasvasó el líquido sobrenadante del tubo a un matraz para su posterior evaporación en un rotaevaporador a 38°C con agitación media hasta casi sequedad.

Este residuo fue reconstituido en 500 µl de solución metanol: agua (80:20). Para la disolución total del extracto en el disolvente se utilizó un vórtex. Finalmente con ayuda de una pipeta pasteur se procedió a trasvasar la solución reconstituida a una jeringa conectada a un filtro de celulosa de 0.2 µm. El extracto filtrado se colectó luego en un vial color ámbar de cierre hermético. El extracto se conservó a -20°C hasta el momento de su análisis.



Fig. 86. Esquema de tratamiento de la muestra.

Una vez obtenido el extracto y definidas las condiciones de análisis se procedió al análisis de la muestra mediante RRLC-ESI-TOF (Fig. 87) en modo negativo con un rango de masas de m/z de 50 a 1100 para la detección de metabolitos secundarios presentes en las tres variedades Allium.



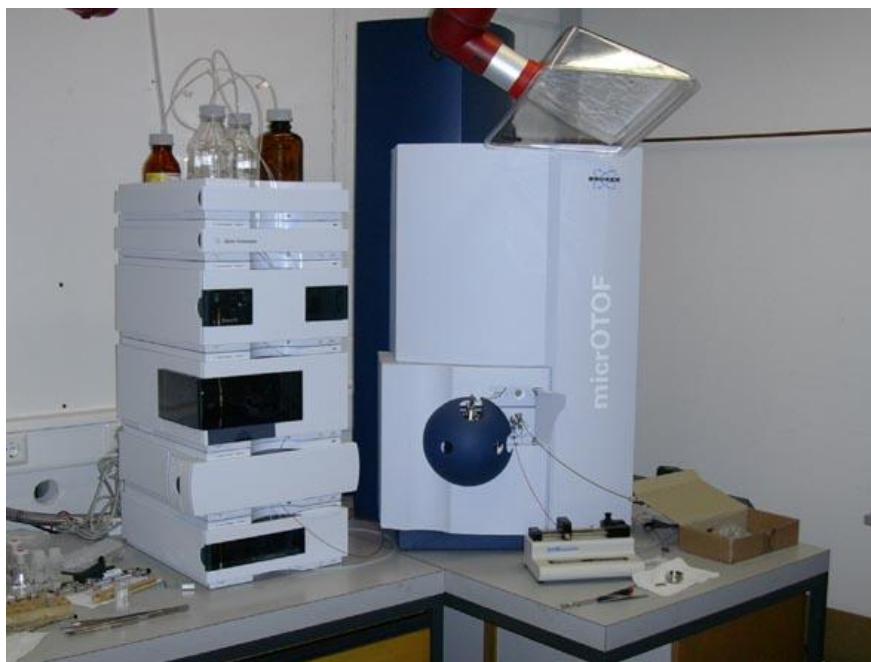


Fig.87. Fotografía de equipo de análisis.

IV.5.4 Resultados y discusión

IV.5.4.1. Determinación de la dilución de trabajo del extracto

La primera prueba que se realizó fue determinar la dilución del extracto a la que trabajar, Debido a la gran cantidad de metabolitos que contiene el extracto se inyectó el extracto a diferentes diluciones (1/2, 1/4 y 1/10) con el fin de observar la mejor separación. Los cromatogramas obtenidos a diferentes diluciones se muestran en la figura 88.

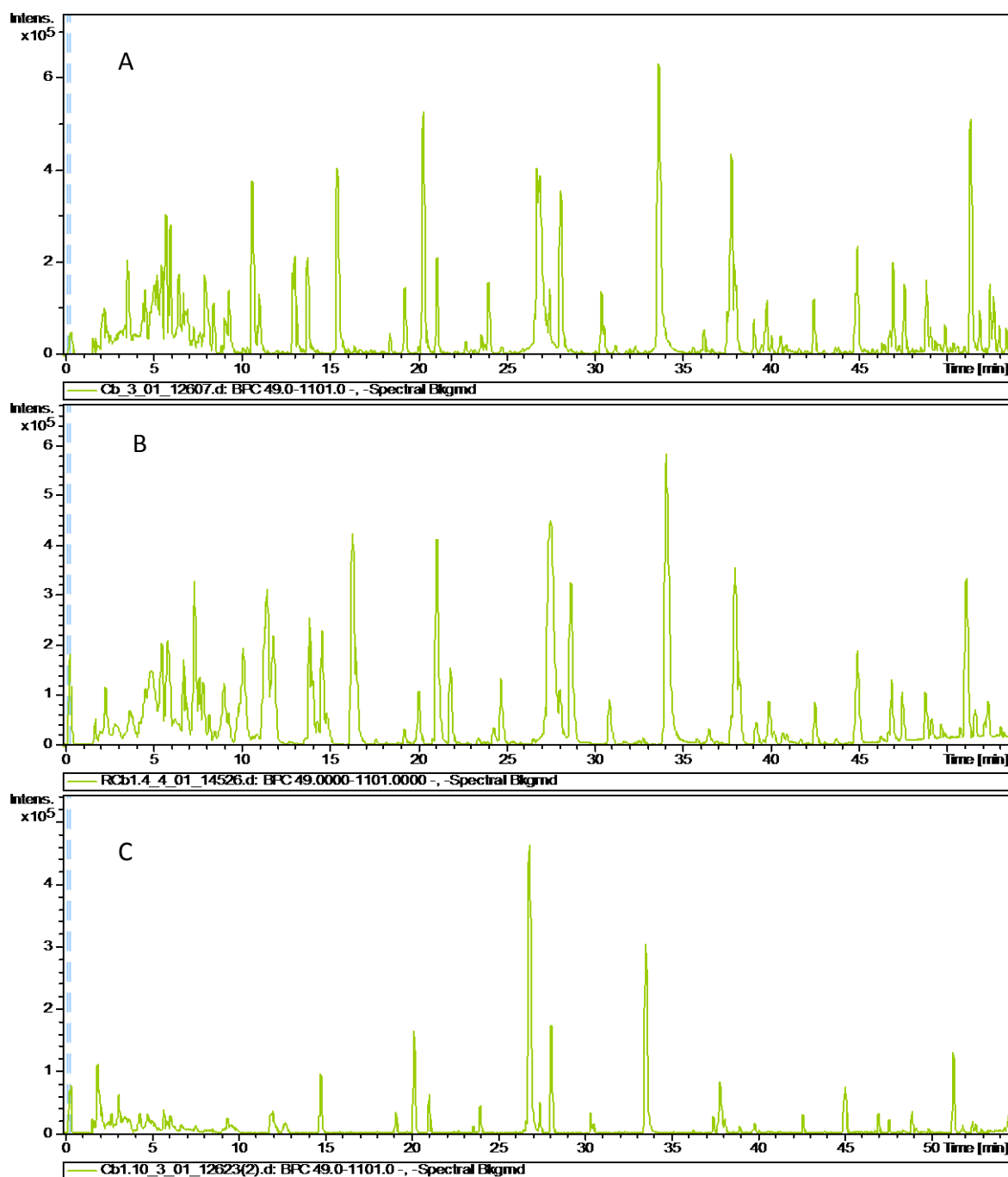


Fig. 88. Cromatogramas del extracto de cebolleta, diluciones (1/2) A, (1/4) B y (1/10) C.

Si bien el cromatograma que corresponde a la dilución c (1/10) muestra unos picos más resueltos que las diluciones 1/2 y 1/4, se observó que tras realizar la caracterización del cromatograma este no contiene toda la información, que contrastaba con la información encontrada o descrita en bibliografía, por lo que se decidió trabajar con la dilución 1/4. Los cromatogramas de los extractos de las diferentes variedades a analizar se pueden observar en las figuras.



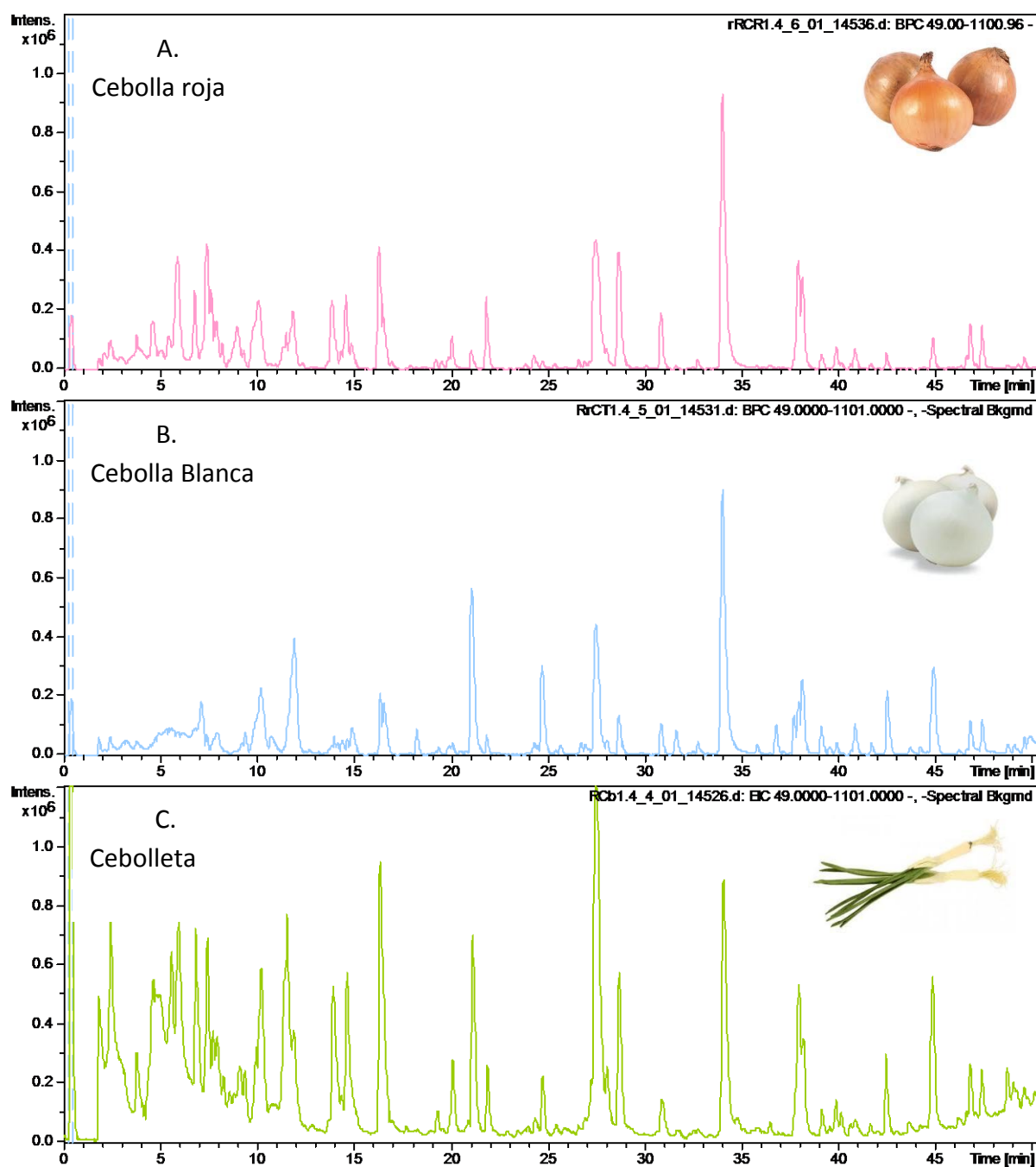


Fig.89. BPC de los extractos metanólicos de cebolla roja A, cebolla blanca B y cebolleta C.

Como bien reporta la bibliografía, la cebolla es una fuente rica en metabolitos como se puede observar en las siguientes figuras en las que se recoge el mapa de intensidades de cada variedad donde se puede observar en la parte superior los compuestos existentes entre el rango de 200 y 500 nm (relación absorbancia tiempo de retención) para la cebolleta y cebolla blanca y, 200-650 para la cebolla roja y en la parte inferior los compuestos separados en función de la relación m/z (50-1100) tiempo de retención.

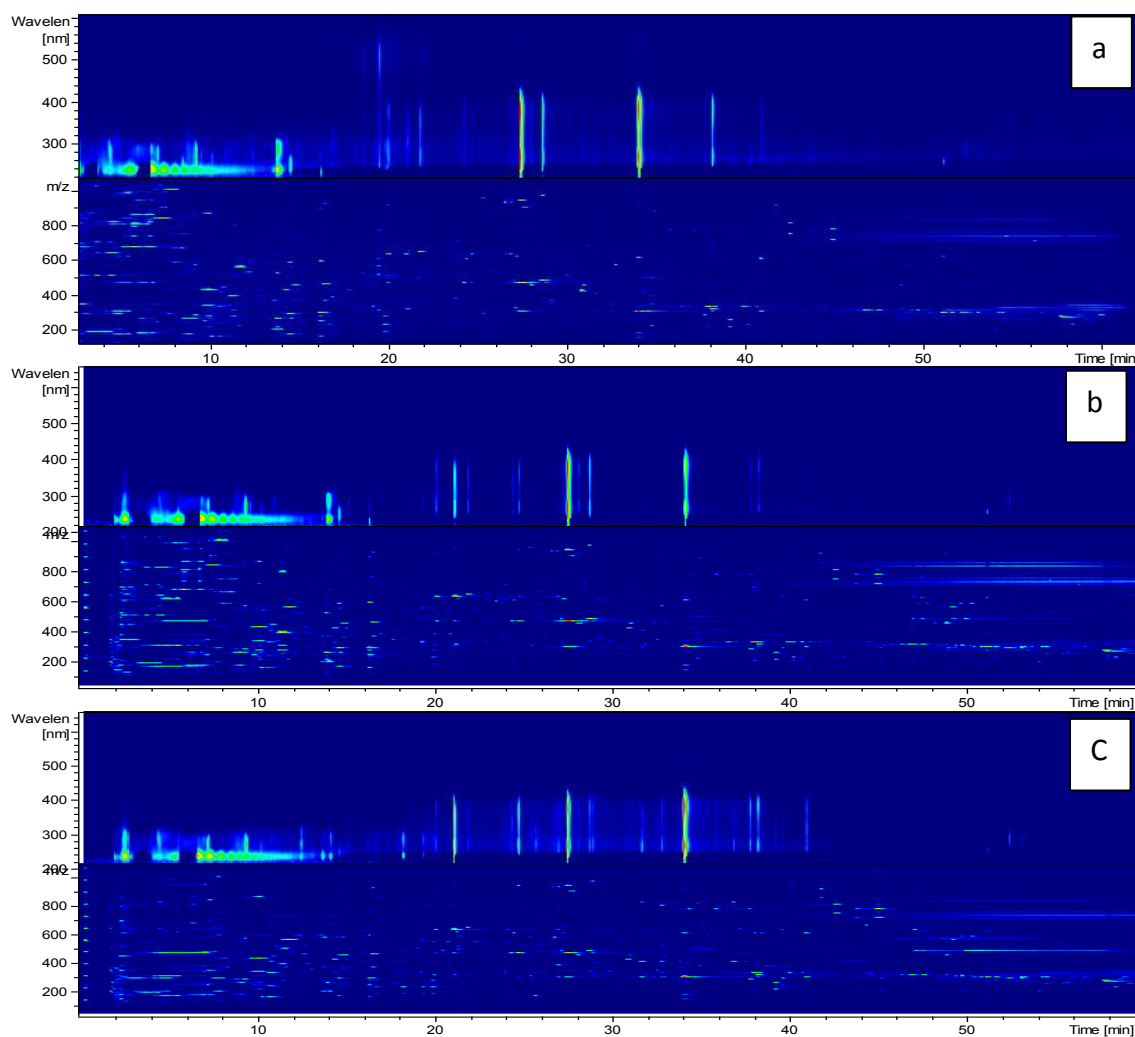


Fig. 90. Mapa de intensidades de los extractos obtenidos: a) cebolla roja, b) cebolla blanca y c) cebolleta.

IV.5.5. Análisis de muestras

El uso de DAD permitió registrar el espectro de UV/Vis de cada compuesto en el cromatograma, debido a que cada compuesto exhibe un espectro característico con un máximo de absorbancia. Este se utilizó en especial en los picos resueltos ya que en los picos que se encontraban a niveles traza esta medida no fue posible debido a la presencia de otros compuestos que impiden detectar los espectros UV/Vis de estos compuestos traza.

Extrayendo los espectros de las longitudes de onda se pudo observar que existe la presencia de: aminoácidos y ácidos orgánicos que han sido previamente detectados



a 210-220 nm,³⁰⁰ nucleósidos a 260 nm³⁰¹, ácidos hidroxicinámicos a 320 nm y los ácidos hidroxibenzoicos a 280 nm. En cuanto a los flavonoides, cada subclase absorbe en una banda características; así flavonas y flavonoles presentan una banda intensa comprendida entre 320-370 nm, mientras que flavanonas y dihidrochalconas absorben a 280 nm, isoflavonas a 260nm y chalconas a 348 nm.

Para proceder al estudio de los perfiles obtenidos en TOF se siguieron dos estrategias que pueden resultar complementarias:

- Buscar en los perfiles aquellos compuestos que ha sido previamente descrito en las matrices bajo estudio.
- Obtener la fórmula molecular de cada uno de los compuestos presentes en el perfil y buscar candidatos en las bases de datos.

Los resultados obtenidos se muestran en las siguientes figuras donde cabe hacer notar que la numeración de los compuestos es simplemente para dar una idea al lector de la cantidad de compuestos hallados en cada caso, no llevando consigo la identificación de los compuestos.

³⁰⁰ Ruhul Amin M., Y. Tomita et al. 1995. "Rapid determination of phenylalanine and its related compounds in rumen fluid by high-performance liquid chromatography." *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 663(2): 201-207.

³⁰¹ Ikeda R., Nishimura M., et al. 2008. "Simple HPLC-UV determination of nucleosides and its application to the authentication of Cordyceps and its allies." *Biomedical Chromatography* 22(6): 630-636.

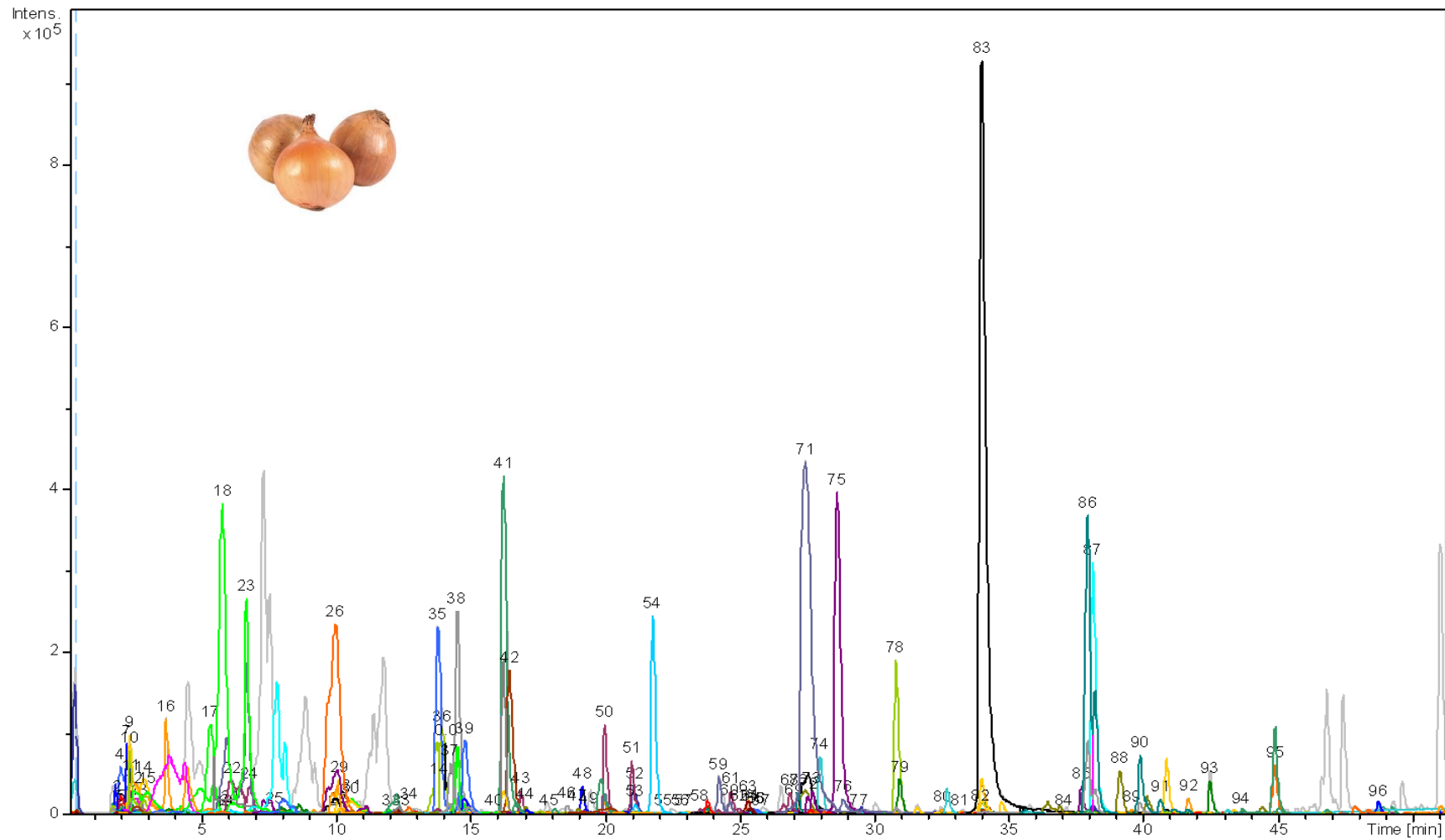


Fig. 91. Relación de los compuestos encontrados utilizando HPLC-ESI-TOF-MS en cebolla roja.

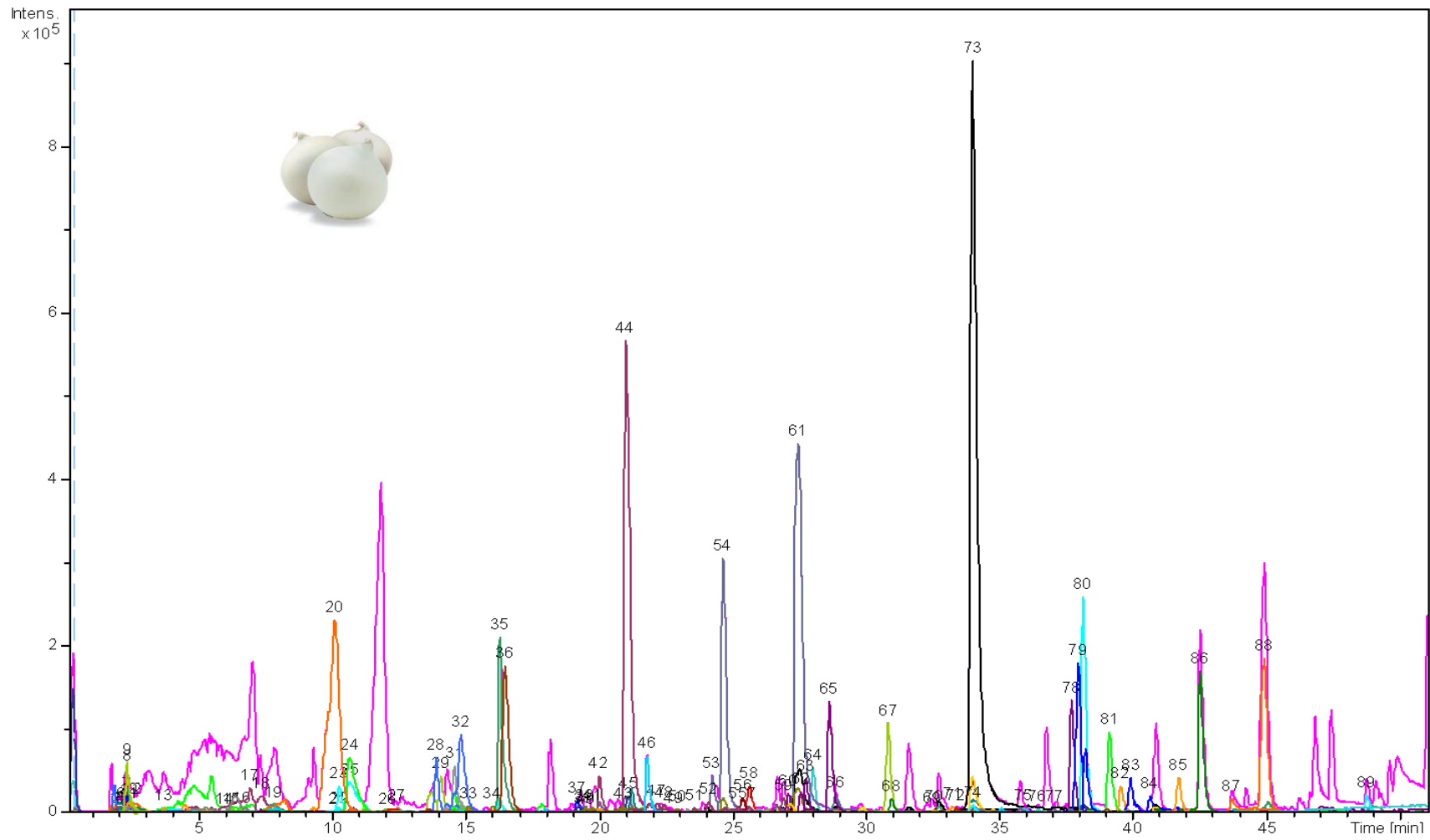


Fig. 92. Relación de los compuestos encontrados utilizando HPLC-ESI-TOF-MS en cebolla blanca.

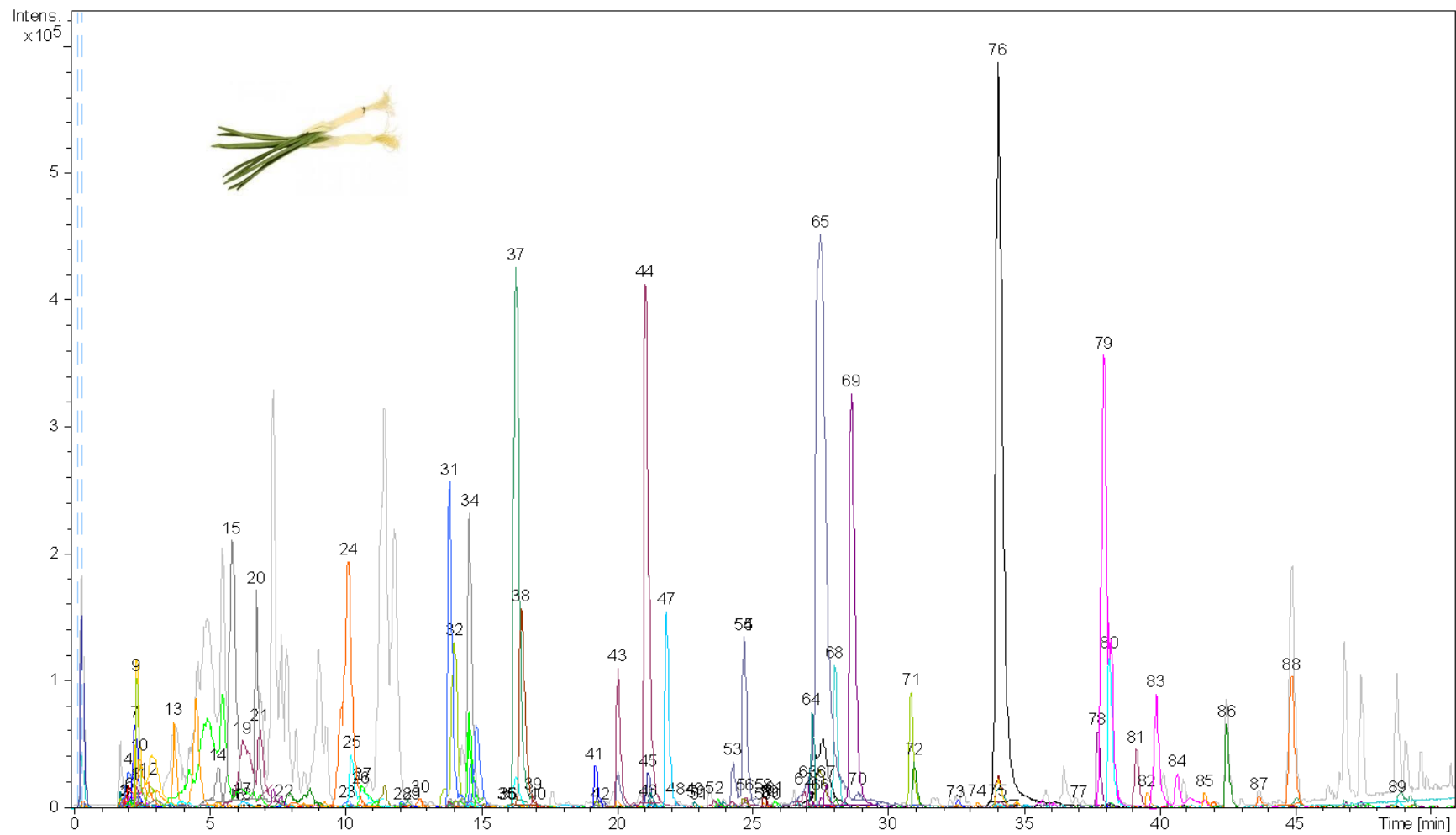


Fig. 93. Relación de los compuestos encontrados utilizando HPLC-ESI-TOF-MS en cebolleta.

Para la detección de los compuestos se eligió la ventana analítica la comprendida entre los minutos 1-54. En ésta se detectaron una gran cantidad de compuestos, los cuales según tiempo de retención y espectro de absorbancia familia a la que corresponden se describen a continuación:

Tabla 41. Relación de los compuestos encontrados en los extractos metanólicos de cebolla roja, blanca y cebolleta utilizando HPLC-ESI-TOF-MS utilizando el modo negativo, en la que se incluye los tiempos de retención, masas experimentales y calculado (m/z), la fórmula molecular, el error (ppm), el valor de mSigma, así como el compuesto propuesto y la familia a la que pertenece.

Compuesto Propuesto	RT (min)	Masa Molecular[M-H] ⁻	Fórmula Molecular[M-H] ⁻	m/z calculada[M-H] ⁻	m/z experiment al[M-H] ⁻	Error (ppm)	mSigma a value	Cebol laroja	Ceboll ablanc a	Ceb ollet a
Aminoácidos y derivados										
Asparagina	1.98	131	C ₄ H ₇ N ₂ O ₃	131.0462	131.047	-1.8	29.5	+	+	+
Glutamina	2.06	145	C ₅ H ₉ N ₂ O ₃	145.0619	145.0612	0.6	35.7	+	+	+
Arginina	2.06	173	C ₆ H ₁₃ N ₄ O ₂	173.1044	173.1044	0.2	15.2	+	+	+
Valina	3.25	116	C ₅ H ₁₀ NO ₂	116.0717	116.0711	1.9	33	+	+	+
Isolueucina	6.14	130	C ₆ H ₁₂ NO ₂	130.0874	130.0871	-1	39	+	+	+
Tirosina	6.21	180	C ₉ H ₁₀ NO ₃	180.0666	180.0666	0.3	8.8	+	+	+
Tirosina	6.81	180	C ₉ H ₁₀ NO ₃	180.0666	180.0665	0.5	2.8	+	+	+
Isolueucina	7.81	130	C ₆ H ₁₂ NO ₂	130.0874	130.0887	-1	26.5	+	+	+
Fenilalanina	10.05	164	C ₉ H ₁₀ NO ₂	164.0717	164.0717	-0.3	9.5	+	+	+
Metionina	10.17	148	C ₅ H ₁₀ NO ₂ S	148.0438	148.0442	-1	12.3	+	+	+
Triptófano	13.73	203	C ₁₁ H ₁₁ N ₂ O ₂	203.0826	203.0828	-0.8	9.3	+	+	+
Triptófano	13.93	203	C ₁₁ H ₁₁ N ₂ O ₂	203.0826	203.0825	0.6	0.5	+	+	+
Compuestos Organosulfurados										
Metiin	2.06	150	C ₄ H ₈ NO ₃ S	150.0231	150.0230	0.7	2.9	+	-	+
Alliin,	2.46	176	C ₆ H ₁₀ NO ₃ S	176.0387	1,760,408	-0.1	4.1	+	+	+
Dímero gama-glutamil-s-allil-l-cisteína	14.42	579	C ₂₂ H ₃₅ N ₄ O ₁₀ S ₂	579.1719	579.1789	-12	44.4	+	+	-
L-γ-glutamil-s-allil-l-cisteína	14.49	289	C ₁₁ H ₁₇ N ₂ O ₅ S	289.0864	289.0864	0	5	+	+	+

Deoxialliin	16.24	162	C ₆ H ₁₂ NO ₂ S	162.0594	162.0599	11.4	53.3	+	+	+
Allicina	32.20	161	C ₆ H ₉ OS ₂	161.01	161.0885	9.2	30.1	+	+	+
Derivados de aminoácidos y péptidos										
Fenilalanina fructuosa	10.64	326	C ₁₅ H ₂₀ NO ₇	326.1245	326.1245	0.6	2.4	+	+	+
Gamma-glutamil-leucina dímero.	13.88	259	C ₁₁ H ₁₉ N ₂ O ₅	259.1269	259.1301	-0.4	15.8	+	+	+
N-(β-d-fructopiranosil)-l-ile-l-glu-oh	14.27	421	C ₁₇ H ₂₉ N ₂ O ₁₀	421.128	421.1831	-0.7	0.8	+	+	+
G glutamil fenilalanina	16.23	293	C ₁₄ H ₁₇ N ₂ O ₅	293.1143	293.1148	-1.7	16	+	+	+
L-α-glutamil-l-triptófano	19.25	332	C ₁₆ H ₁₈ N ₃ O ₅	332.1252	332.1237	4.5	8.9	+	+	+
Glicil-l-prolina	21.55	171	C ₇ H ₁₁ N ₂ O ₃	171.0775	171.0776	5.1	4.4	+	+	+
Ácidos hidroxibenzoicos										
Ácido vainílico	11.99	167	C ₈ H ₇ O ₄	167.035	167.035	2.8	41.3	+	+	+
Ácido protocatechuico	12.35	153	C ₇ H ₅ O ₄	153.0193	153.0195	3.9	44	+	+	+
Ácido siríngico	19.96	197	C ₉ H ₉ O ₅	197.0455	197.0456	-0.5	14.4	+	-	+
Ácido gálico	25.66	169	C ₇ H ₅ O ₅	169.0142	169.0138	2.4	6.3	+	+	+
Ácidos hidroxicinámicos										
Ácido cinámico	10.24	147	C ₉ H ₇ O ₂	167.0452	147.0453	1.7	26.9	+	+	+
Ácido sinápico	16.86	223	C ₁₁ H ₁₁ O ₅	223.0612	223.0613	-0.5	8.2	+	+	+
Ácido ferúlico	18.35	193	C ₁₀ H ₉ O ₄	193.0506	193.0504	1.2	40	+	+	+
Ácido p-cumárico	22.65	163	C ₉ H ₇ O ₃	163.0401	163.0393	4.5	6.1	-	+	+
Ácido isoferúlico	24.17	193	C ₁₀ H ₉ O ₄	193.0506	193.0508	-0.7	31.9	-	+	+
Ácido sinápico	24.39	223	C ₁₁ H ₁₁ O ₅	223.0612	223.0618	-2.7	3.9	-	+	+
Flavonas										
Dietil flavone-5,7-dioxiacetato	10.34	425	C ₂₃ H ₂₁ O ₈	425.1242	425.1244	0.5	26.9	+	+	+
Dietil flavone-5,7-dioxiacetato	12.71	425	C ₂₃ H ₂₁ O ₈	425.1242	425.1223	4.5	31.4	+	-	+
Flavonol										



Taxifolin glucósido	17.05	465	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₂	465.1038	465.1033	3.2	13.3	+	-	+
Curculigosides										
Curculigósido A	18.99	465	C ₂₂ H ₂₅ O ₁₁	465.1402	465.1389	3.4	8.8	+	-	-
Flavonol										
Isorhamnetin 3,4'-diglucósido	15.89	639	C ₂₈ H ₃₁ O ₁₇	639.1567	639.1547	0	26.4	+	-	+
Quercetin diglucósido	19.89	625	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₇	625.141	625.1413	0.1	13.3	+	+	+
Isoramnetin 3,4'-di glucósido	21.18	639	C ₂₈ H ₃₁ O ₁₇	639.1567	639.1566	0.1	28.4	+	-	+
Miricetin 3-o-rutinoside	21.19	625	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₇	625.141	625.1413	-0.4	6.7	+	+	+
Miricetin	21.45	317	C ₁₅ H ₉ O ₈	317.0303	317.03	2.6	1.3	+	+	+
Quercetina diglucósido	22.10	625	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₇	625.141	625.1403	-0.3	15.8	+	+	+
Rutina	22.80	609	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₆	609.1461	609.1462	-0.1	7.5	+	+	+
Isoramnetin 3,4'-diglucoside	22.83	639	C ₂₈ H ₃₁ O ₁₇	639.1567	639.4508	-0.5	49.9	+	-	+
Quercetin-3,4'-o-di-beta-glucopiranoside	23.57	625	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₇	625.141	625.1414	0.6	17	+	+	+
Miricetin-3-o-ramnoside	24.39	463	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₂	463.0882	463.0884	0	15.6	+	+	+
Quercetina glucósido	24.77	463	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₂	463.0882	463.0878	0.8	25.5	+	+	+
Quercetina diglucósido	24.79	625	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₇	625.141	625.1411	0.7	19.9	+	-	+
Quercetina diglucósido	25.07	625	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₇	625.141	625.141	0	25.8	+	-	+
Quercetin diglucósido	25.53	625	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₇	625.141	625.1408	-2.8	42.9	+	+	+
Quercetina diglucósido	26.53	625	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₇	625.141	625.1408	0.4	15.0	+	-	-
Quercetina diglucósido	26.73	625	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₇	625.141	625.141	0	14.5	+	+	+
Isorhamnetin glucoside	27.16	477	C ₂₂ H ₂₁ O ₁₂	477.1038	477.0493	0.6	34	+	+	+
Hesperidin	27.18	609	C ₂₈ H ₃₃ O ₁₅	609.1461	609.1825	3.5	2.8	+	-	+
Quercetina glucósido	27.45	463	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₂	463.0882	463.0882	0.1	1.8	+	+	+

Quercetina ramnoside	28.18	447	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₁	447.0933	447.0922	2.5	7.2	+	+	+
Isorhamnetin glucoside	28.69	477	C ₂₂ H ₂₁ O ₁₂	477.1038	477.1039	0.1	15.6	+	+	+
Quercetina glucósido	28.80	463	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₂	463.0882	463.0883	-0.2	25.8	+	+	+
Luteolin	33.59	285	C ₁₅ H ₉ O ₆	285.0405	285.0404	0.1	17.5	+	+	+
Quercetina	33.77	301	C ₁₅ H ₉ O ₇	301.0354	301.0354	0.3	13.1	+	+	+
Quercetina dímero	33.90	603	C ₃₀ H ₁₉ O ₁₄	603.078	603.078	0.1	8.4	+	+	+
Quercetina trímero	33.94	905	C ₄₅ H ₂₉ O ₂₁	905.1207	905.1212	-0.5	29.8	+	+	+
Kaempferol	37.52	285	C ₁₅ H ₉ O ₆	285.0405	285.0405	1.4	10.2	+	+	+
Isorhamnetin	37.97	315	C ₁₆ H ₁₁ O ₇	315.051	315.0511	-0.2	15.1	+	+	+
Flavanona										
Naringenina	36.98	271	C ₁₅ H ₁₁ O ₅	271.0612	271.0589	3.9	45.8	+	+	+
Isoflavona										
7,2'-dihidroxi-4'-methoxy-isoflavanol	39.47	287	C ₁₆ H ₁₅ O ₅	287.0925	287.0915	1.3	11.9	+	-	+
Derivado de cumarina										
Chalepensin (xilotenin)	23.80	253	C ₁₆ H ₁₃ O ₃	253.087	253.0834	14.4	22.9	+	-	+
Chalcona										
Asebotin	31.11	449	C ₂₂ H ₂₅ O ₁₀	449.1453	449.1445	1.7	8.2	+	+	+
Davidigenin,	39.04	257	C ₁₅ H ₁₃ O ₄	257.0819	257.0818	0.3	2.9	+	+	+
Terpenoides y esteroides										
Tanshinone	25.28	603	C ₁₉ H ₁₇ O ₃	603.2388	603.2391	-0.4	37.8	+	-	-
Alliofuranosido A	27.67	887	C ₄₄ H ₇₁ O ₁₈	887.4673	887.4643	0.4	7.4	+	+	+
Alliofuranosido A	27.72	887	C ₄₄ H ₇₁ O ₁₈	887.4646	887.4643	0.5	25.5	+	+	+
Alliospirosido D	32.42	753	C ₃₉ H ₆₁ O ₁₄	753.4067	753.4071	0.5	53	-	+	-
Ascalonicosido B	32.45	899	C ₄₅ H ₇₁ O ₁₈	899.4646	899.4645	0.1	18.8	+	+	+
Alliospirosido D	33.34	753	C ₃₉ H ₆₁ O ₁₄	753.4067	753.4075	0.1	27	+	+	-



Chinenosido V	33.67	915	C ₄₅ H ₇₁ O ₁₉	915.4595	915.4595	0.9	37.6	+	+	+
Alliospirosido C	35.85	723	C ₃₈ H ₅₉ O ₁₃	723.3961	723.3937	3.3	41.3	+	+	+
Alliospirosido C	36.40	723	C ₃₈ H ₅₉ O ₁₃	723.3961	723.3949	1.7	24.4	-	+	+
Alliospirosido B	40.83	897	C ₃₉ H ₆₁ O ₂₃	737.4118	737.4105	1.7	49.2	+	+	-
Ascalonicosido B	41.58	899	C ₄₅ H ₇₁ O ₁₈	899.4646	899.4646	0	7	+	+	+
Nuatigenin glucósido	42.33	737	C ₃₉ H ₆₁ O ₁₃	737.4118	737.4127	-1.2	4.2	+	+	+
Alliospirosido B	42.37	897	C ₃₉ H ₆₁ O ₂₃	737.4118	737.4118	3.1	12	+	+	-
Alliospirosido A	44.52	707	C ₃₈ H ₅₉ O ₁₂	707.4012	707.4017	0.9	22.9	+	+	+
Alliospirosido A	44.59	707	C ₃₈ H ₅₉ O ₁₂	707.4012	707.4017	-0.7	24.7	+	+	+
Carbohidratos										
Sucrosa	2.36	341	C ₁₂ H ₂₁ O ₁₁	341.1081	341.1089	0	4	+	+	+
Sucrosa dímero	2.39	683	C ₂₄ H ₄₃ O ₂₂	683.2251	683.2251	0.4	8.7	+	+	+
Maltosa	2.93	341	C ₁₂ H ₂₁ O ₁₁	341.1089	341.1089	0	2.3	+		
Maltosa dímero	2.90	683	C ₂₄ H ₄₃ O ₂₂	683.2250	683.2251	0.2	30.8			
Isomaltotriosa	2.48	503.4	C ₁₈ H ₃₁ O ₁₆	503.1618	503.1614	0.7	6.2	+	+	+
Maltotetraosa	2.51	665	C ₂₄ H ₄₁ O ₂₁	665.2146	665.2146	0.5	4.3	+	+	+
Ribosa, xilosa, ribulosa, arabinosa	2.54	149	C ₅ H ₉ O ₅	149.0455	149.0456	-0.3	12.2	+	+	+
Maltosa	3.06	341	C ₁₂ H ₂₁ O ₁₁	341.1081	341.1087	0.8	1.7	+	+	+
Maltotetraosa	3.06	665	C ₂₄ H ₄₁ O ₂₁	665.2146	665.2142	-0.4	1.8	+	-	-
Isomaltotriosa	3.65	503.4	C ₁₈ H ₃₁ O ₁₆	503.1618	503.1609	0.5	10.4	+	+	+
Rafinosa	4.74	503.4	C ₁₈ H ₃₁ O ₁₆	503.1618	503.1616	0.3	7.6	+	-	+
Estaquiosa	5.25	665	C ₂₄ H ₄₁ O ₂₁	665.2146	665.214	0.9	6.2	+	-	+
Estaquiosa	5.67	665	C ₂₄ H ₄₁ O ₂₁	665.2146	665.2147	0.9	16.7	+	-	-
Isolichnose	6.48	665	C ₂₄ H ₄₁ O ₂₁	665.2146	665.2146	0.1	10.8	+	-	+
Maltohexosa	7.70	989	C ₃₆ H ₆₁ O ₃₁	989.3202	989.3203	-0.1	15.7	+	+	+
Maltohexosa	8.30	989	C ₃₆ H ₆₁ O ₃₁	989.3202	989.3171	-1.5	3.2	+	+	+
1-o-beta-d-glucopiranosil	16.96	385	C ₁₇ H ₂₁ O ₁₀	385.114	385.1132	2.1	18.9	+	+	+

sinapic acid										
Isorhapontin	30.86	419	C ₂₁ H ₂₃ O ₉	419.1348	419.1336	2.7	4.1	+	+	+
Glucosido								+	+	+
iridoide										
Ácido 4'-o-acetillogánico	19.35	415	C ₁₉ H ₂₇ O ₁₀	415.161	415.1603	1.7	21	+	+	+
Ácidos orgánicos										
Ácido aspártico	1.98	132	C ₄ H ₆ NO ₄	132.0302	132.0311	-9.1	10	+	+	+
Ácido málico	2.76	133	C ₄ H ₅ O ₅	133.0153	133.0157	-9.1	6.7	+	+	+
Ácido succínico	5.89	117	C ₄ H ₅ O ₄	117.0193	117.0198	-4.1	25.4	+	+	+
Ácido tianshico	37.85	329	C ₁₈ H ₃₃ O ₅	329.2333	329.2335	-0.1	1.1	+	+	+
Ácido tianshico	39.74	329	C ₁₈ H ₃₃ O ₅	329.2333	329.2334	0	3.4	+	+	+
Ácido tianshico	40.51	329	C ₁₈ H ₃₃ O ₅	329.2333	329.2333	0.1	5.3	+	+	+

A continuación se procederá a describir los compuestos por familias que se observan en la tabla 41, en esta sección las señales m/z se recogen sin decimales (aunque fueron obtenidas mediante TOF con 4 decimales) para facilitar la lectura de este capítulo.

- **Aminoácidos y derivados**

Entre el minuto 1 y 14 se identificó, de manera tentativa, la presencia de los iones correspondientes a los aminoácidos esenciales como isoleucina m/z 130, tirosina m/z 180, metionina m/z 148, fenilalanina m/z 164, triptófano m/z 203 y valina m/z 116 que se hallan reflejados en la tabla de alimentos proporcionada por el BEDCA y Mariotte y col.^{302,303,304}. También se encontraron los aminoácidos asparagina m/z 131, glutamina m/z 145, arginina m/z 173 en las tres variedades; así como también se detectó la presencia de derivados de aminoácidos.

³⁰²Marotti M. and Piccaglia R. 2002. "Characterization of Flavonoids in Different Cultivars of Onion (*Allium cepa* L.)." *Journal of Food Science* 67(3): 1229-1232.

³⁰³Kuon J. and Bernhard R. A. 1963. "An Examination of the Free Amino Acids of the Common Onion (*Allium cepa*)a." *Journal of Food Science* 28(3): 298-304.

³⁰⁴Hansen S. L. 2001. "Content of Free Amino Acids in Onion (*Allium cepa* L.) as Influenced by the Stage of Development at Harvest and Long-term Storage." *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B - Soil & Plant Science* 51(2): 77-83.



Entre el minuto 2 y 16 se detectaron gamma-glutamil péptidos, entre los que se encontraron la gamma-glutamil-leucina dímero m/z 293, glicil-l-prolina m/z 171, l- α -glutamil-l-triptófano m/z 332, y gama glutamil fenilalanina m/z 293. La presencia de los mismos fue confirmada en las tres variedades.

- **Compuestos Organosulfurados**

Las plantas del género *Allium*, en especial el ajo y la cebolla, son fuentes muy ricas de compuestos organosulfurados. Estos compuestos son los que le otorgan al sabor a la especie, además de ser los principales responsables de su bioactividad³⁰⁵. En este caso se detectó la presencia de methiin m/z 150, deoxiiallin m/z 162, alliin m/z 176, allicin m/z 161,³⁰⁶ y derivados como gamma-glutamil-s-allil-l-cisteína y el dímero l-gamma-glutamil-s-allil-l-cisteína en las tres variedades, los cuales se han encontrado en estudios realizados por HPLC en el ajo, donde se observa que existe una estrecha relación entre los péptidos y los compuestos organosulfurados³⁰⁷.

- **Compuestos fenólicos polifenólicos y taninos**

Ácidos hidroxibenzoicos

Entre los ácidos hidroxibenzoicos se pudo detectar la presencia del ácido vanílico m/z 167; **Error! Marcador no definido.**, protocatechuico m/z 153; **Error! Marcador no definido.** y gálico m/z 9³⁰⁸. En las tres variedades y la presencia del ácido siríngico m/z 197 en la cebolla roja y cebolleta.

³⁰⁵ Lawson L. D. 1993. Bioactive organosulfur compounds of garlic and garlic products. Role in reducing blood lipids. In Human Medical Agents from Plants; ACS Symposium Series 534; Kinghorn, A. D., Balandrin, M. F., Eds.; American Chemical Society: Washington, DC. pp 306–330.

³⁰⁶ Wang H., Li X., et al. 2010. "Quantitative Determination of Allicin in *Allium sativum*; L. Bulbs by UPLC." *Chromatographia* 71(1): 159-161.

³⁰⁷ Ichikawa M., Ide N., et al. 2006. "Determination of Seven Organosulfur Compounds in Garlic by High-Performance Liquid Chromatography." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54(5): 1535-1540.

³⁰⁸ Singh, B. N., B. R. Singh, et al. 2009. "Polyphenolics from various extracts/fractions of red onion (*Allium cepa*) peel with potent antioxidant and antimutagenic activities." *Food and Chemical Toxicology* 47(6): 1161-1167.

Ácidos hidroxicinámicos

Entre los ácidos hidroxicinámicos se encontraron los ácidos cinámico m/z 147, sinápico m/z 223, ferúlico m/z 193 en las tres variedades y la presencia de ácido *p*-cumárico m/z 163 sólo en la cebolleta, de acuerdo a lo descrito por Seo G. y col³⁰⁹.

Flavonas

Dos posibles nuevos compuestos pertenecientes a ésta familia fueron detectados con m/z 425 que corresponderían a la dietil flavona-5,7-dioxiacetato con tiempos de retención de (10.34 min) el cual está presente en las tres variedades; y (12.71 min) presente en sólo en la cebolla roja y cebolleta.

Dihidroflavonoles

Se detectó también la presencia de taxifolin glucósido m/z 465 descrita por otros autores en cebolla roja³¹⁰ y cebolleta³¹¹, en el minuto 18.99 así, cuando se observa el espectro de masas, se puede ver con facilidad la presencia de la aglicona de taxifolin (m/z 303) y un fragmento de glucosa [M-162].

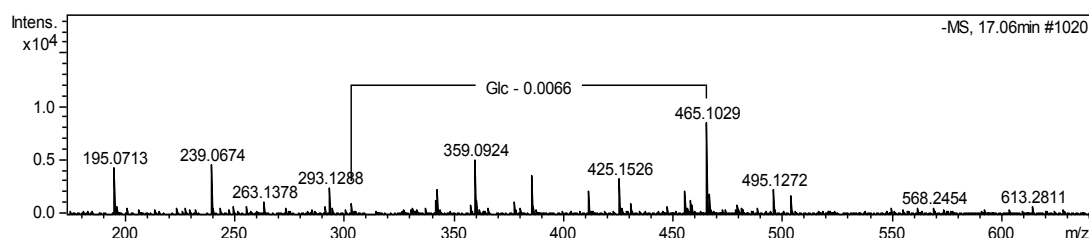


Fig. 94. Espectro de taxifolin glucósido

³⁰⁹ Seo G.W., ChoJ.Y., et al. 2011. "Isolation and identification of cinnamic acid amides as antioxidants from *Allium fistulosum* L. and their free radical scavenging activity." *Food Science and Biotechnology* 20(2): 555-560.

³¹⁰ Corea G., FattorussoE., et al. 2005. "Antispasmodic Saponins from Bulbs of Red Onion, *Allium cepa* L. Var. Tropea." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53(4): 935-940.

³¹¹ Ferreres F., GilM.I., et al. 1996. Anthocyanins and flavonoids from shredded red onion and changes during storage in perforated films. *Food Research International*. 29: 389-395.



Curculigósidos

Otros compuestos que también generan la misma señal en MS, es decir m/z 465, son los curculigósidos, que se extraen desde *Curculigo orchioides*³¹². Esta señal fue encontrada sólo en la cebolla roja generando la fórmula (C₂₂H₂₆O₁₁) que correspondería a la de los curculigósidos A o D cuyas fórmulas se recogen en la figura. Estos compuestos poseen efectos anti-amiloidogénicos contra péptidos útiles contra el Alzheimer.³¹³

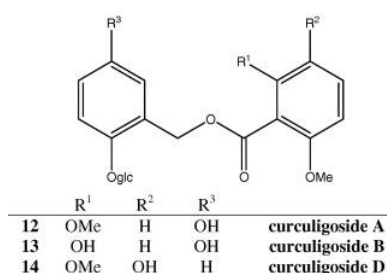


Fig.95. Estructura molecular genérica de los compuestos fenólicos curculigósidos

Flavonoles

Las especies del género *Allium* se caracterizan por ser una importante fuente de flavonoides particularmente de flavonoles y dentro de la presencia de quercetina y sus derivados glicosídico. Así, la quercetina se observa en el minuto 33.77 con un ión mayoritario correspondiente a m/z 301, también se observa la presencia en el espectro del dímero m/z 603 y el trímero de éste compuesto m/z 905. Estos compuestos están presentes en las tres variedades y concuerda con lo que refiere la literatura al respecto. **Marcador no definido.** **Marcador no definido.** **Marcador no definido.** **Marcador no definido.** **Marcador no definido.**^{314,315} donde se reporta su presencia en cebolla roja^{316,317,318}, cebolla blanca **Marcador no definido.**

³¹² Jiang W., FuF., et al. 2011. "Curculigoside A attenuates experimental cerebral ischemia injury in vitro and vivo." *Neuroscience* 192(0): 572-579.

³¹³ Rivière C., RichardT., et al.2008. "New polyphenols active on β -amyloid aggregation." *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 18(2): 828-831.

³¹⁴ Park Y.K. and Lee C.Y. 1996. "Identification of Isorhamnetin 4-Glucoside in Onions." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44(1): 34-36.

³¹⁵ Fossen T., PedersenA. T., et al. 1998. "Flavonoids from red onion (*Allium cepa*)." *Phytochemistry* 47(2): 281-285.

Marcador no definido. ^{319, 320}, y cebolleta³²¹. La quercetina no sólo se encuentra en forma de aglicona sino también en forma de mono-di e incluso triglicósidos según refiere *Slimestad y col*³²². Así, se detectó la presencia de mono glucósidos de quercetina en los tiempos de retención de 24.40, 24.61, 27.40 y 27.40 min que tienen un m/z de 463. En los espectros de masas de estos compuestos se observa la presencia de la aglicona (301) y la fracción de glucosa correspondiente a [MH-162], que corresponderían a los isómeros glucosídicos de quercetina 4,7, 3 descritos en bibliografía **Marcador no definido.**

De la misma manera, se detectó la presencia de cinco isómeros diglucósidos de quercetina m/z 625, los cuales en su totalidad se observan en la cebolla roja y blanca **Marcador no definido.** y solo dos en la cebolleta. Así, en el espectro masas de estos compuestos se observa la presencia de la aglicona (301) y dos fracciones de glucosa [MH-162] **Marcador no definido.**

Se debe mencionar también que se observó la presencia de derivados glicosilados de quercetina como es el caso de la hesperidina o quercetina rutinósido m/z de 609. La presencia de este compuesto fue recogida por *Slimestad y col* **Marcador no definido.**, echo que se corrobora en este estudio, donde se detecta la presencia de este compuesto en el min 27.15 en las tres variedades.

En su espectro de masas se pueden ver las señales correspondientes a la aglicona (301) y los fragmentos de azúcares [MH-162] y [MH-146]. Se observa también en el mismo

³¹⁶ Corea G., Fattorusso E., et al. 2005. "Antispasmodic Saponins from Bulbs of Red Onion, *Allium cepa* L. Var. Tropea." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53(4): 935-940.

³¹⁷ Price K.R., Bacon J.R., et al. 1997. "Effect of Storage and Domestic Processing on the Content and Composition of Flavonol Glucosides in Onion (*Allium cepa*)." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45(3): 938-942.

³¹⁸ Marotti M. and Piccaglia R. 2002. "Characterization of Flavonoids in Different Cultivars of Onion (*Allium cepa* L.)." *Journal of Food Science* 67(3): 1229-1232.

³¹⁹ Zill e, H., M. Abert Vian, et al. 2009. "Clean recovery of antioxidant flavonoids from onions: Optimising solvent free microwave extraction method." *Journal of Chromatography A* 1216(45): 7700-7707.

³²⁰ Lombard K., E. Peffley et al. 2005. "Quercetin in onion (*Allium cepa* L.) after heat-treatment simulating home preparation." *Journal of Food Composition and Analysis* 18(6): 571-581.

³²¹ Mian K.H. and Mohamed S. 2001. "Flavonoid (Myricetin, Quercetin, Kaempferol, Luteolin, and Apigenin) Content of Edible Tropical Plants." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49(6): 3106-3112.

³²² Slimestad R., Fossen T., et al. 2007. "Onions: A Source of Unique Dietary Flavonoids." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55(25): 10067-10080.



espectro la señal 321 que corresponde a otro compuesto que está presente en mayor cantidad cuya parte final que coeluye con este compuesto.

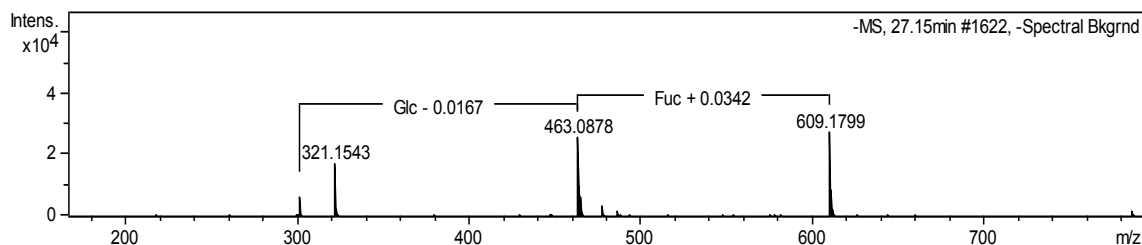


Fig. 96. Espectro de masas de hesperidina

Otro derivado de la quercetina que se detectó es la quercetina rutinósido m/z de 609. En su espectro de masas se observa la aglicona (301) y el fragmento [MH-308] en el minuto 22.80, presente en este caso en la cebolla roja y blanca siendo un nuevo compuesto descrito para el caso de la cebolleta como se observa en la siguiente figura.

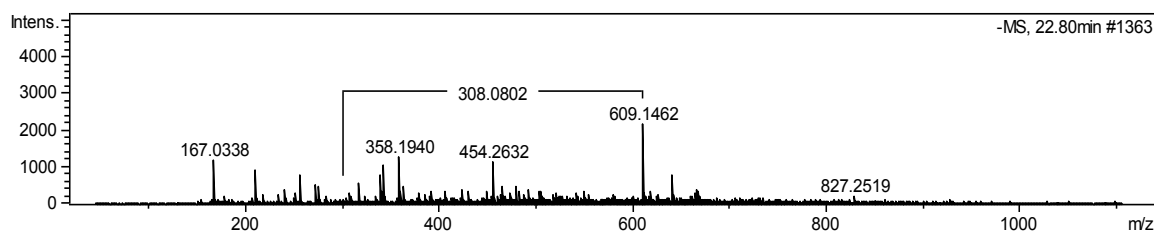


Fig. 97. Espectro de masas de quercetina rutinósido

Otros flavonoles que están presentes en cebolla y cebolleta en cantidades traza son los flavonoles kaempferol, luteolina, y apigenina cuyos compuestos glicosilados también coexisten. Así, se detectó la presencia de kaempferol m/z 285; **Error! Marcador no definido.** en el minuto 37.63 en las tres variedades cuyo derivados glucosado se detectó en el minuto 27, el espectro correspondiente a este compuesto muestra la aglicona (285) y el fragmento [MH-162] el cual se observa en las tres variedades. El siguiente flavonol observado fue la luteolina m/z 285 en el minuto 33.59 la cual se presenta en las tres variedades.

Por otra parte, se detectó isorhamnetin m/z 315 un flavonol metilado, en las tres variedades. Marotti y col ya habían descrito la presencia de este compuesto en varios tipos de cebolla, determinando incluso la cantidad de los mismos. Sin embargo, es la primera vez que dicho compuesto se detecta en cebolleta. Y al igual que los anteriores flavonoles, se

detectó la presencia de tres isómeros glucosados,; isorhamnetin glucósido m/z 477 que también habían sido ya determinados en cebolla roja y blanca³²³ pero no en cebolleta. Pudiéndose observar en el espectro de masas la aglicona 315 y el fragmento [MH-162] en los minutos 27.01, 28.69, y 28.59. De igual modo, se encontraron diglucósidos de isorhamnetin m/z 639, cuya presencia ha sido referenciada en cebolla roja y tierna **Error! Marcador no definido..** En nuestro caso el ión extraído 639 presentaba dos picos en la cebolla roja y cebolleta en los minutos 15.89 y 22.83; que corresponderían según bibliografía a los compuestos isorhamnetin 3-O-glucósido 7-O-ramnósido e isoramnetin-3-glucosido-4'-glucosido, respectivamente³²⁴.

Otro flavonol que se detectó fue la miricetina m/z 317 que previamente había sido hallada sólo en la cebolla tierna **Error! Marcador no definido.** y que en este caso se observa en las tres variedades en el minuto 21.08. También se encontraron derivados glicosídicos de este compuesto; así la miricetin 3-O-rutinoside podría estar presente en las tres variedades pues su espectro de masa muestra la presencia de la aglicona (317) y dos azúcares glucosa y fructuosa.

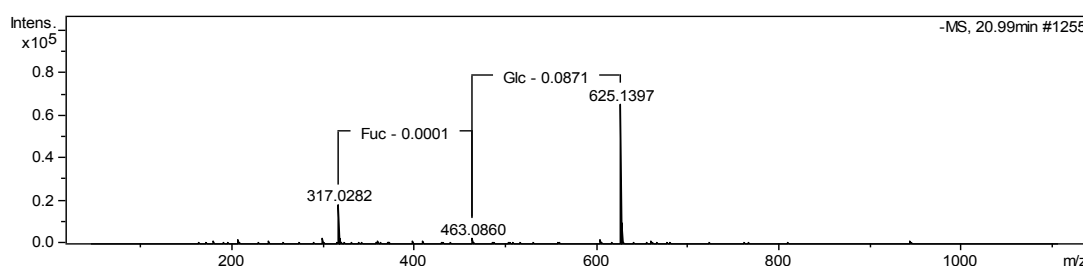


Fig. 98. Espectro de masas de miricetin rutinósido

Otros flavonoides

Entre el grupo de flavanonas se detectó la presencia de naringenin m/z 271 en las tres variedades, apareciendo este compuesto con un tiempo de retención de 36.98.

³²³ Park Y.K. and Lee C. Y. 1996. "Identification of Isorhamnetin 4'-Glucoside in Onions." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44(1): 34-36.

³²⁴ Rösch D., Bergmann M., Knorr D., Kroh L.W. 2003. Structure-Antioxidant Efficiency Relationships of Phenolic Compounds and Their Contribution to the Antioxidant Activity of Sea Buckthorn Juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51:4233-4239.



Entre las isoflavonas se detectó un compuesto con m/z de 287 en el minuto 39.47 que podría ser el 7,2'-dihidroxi-4'-metoxi-isoflavanol cuya fórmula molecular es $C_{17}H_{16}O_5$, el cual está presente en las tres variedades.

Dentro las cumarinas se detectó la presencia de la furanocumarina, chalepensin (xilotenin) m/z 253 ($C_{16}H_{14}O_3$) que aparece en el minuto 23.8, en la cebolla roja y la cebolleta.

Finalmente dentro de la familia de los flavonoides se observó la presencia de una dihidrochalcona glucosilada denominada asebotin m/z 449 cuya presencia ha sido descrita en fuentes vegetales³²⁵ que refiere propiedades antihipertensivas y antihelmínticas³²⁶. A este grupo le corresponde la fórmula $C_{22}H_{25}O_{10}$ y ha sido encontrado en las tres especies *Allium* incluidas en este estudio.

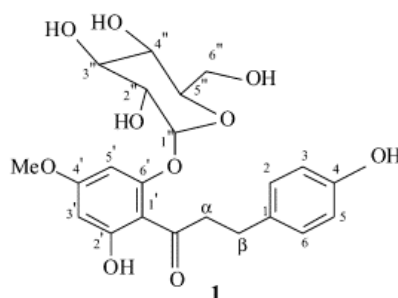


Fig 99. Estructura molecular de asebotin (dihidrochalcona glucosada).

Otra dihidrochalcona glucosada que se encontró fue davidigenin (4,2',4'-trihidroxi-dihidrochalcona 2'-O-(6''-O-4'''-hidroxibenzoil)- β -glucósido) m/z 257, cuya fórmula molecular corresponde a $C_{15}H_{14}O_4$. Aparece en el minuto 39.02 en las tres variedades.³²⁷

Glicósidos esteroideos

³²⁵ Nkengfack A. E., F. R. Van Heerden, et al. 2001. "Asebotin, a dihydrochalcone glucoside from *Guibourtia tessmannii*." *Fitoterapia* 72(7): 834-836.

³²⁶ Adjanohaon E.J., Ake Assi L. *Medecine traditionnelle et pharmacopée*. 1984. Contribution aux Etudes Ethnobotaniques et Floristes en République Populaire du Congo, Agence de Coopération Culturelle et Technique (ACCT), Paris p. 39

³²⁷ Desire O., Rivière C., et al. 2010. "Antispasmodic and antioxidant activities of fractions and bioactive constituent davidigenin isolated from *Mascarenhasia arborescens*." *Journal of Ethnopharmacology* 130(2): 320-328.

Dentro de esta familia se detectó la presencia de diferentes compuestos terpénicos como tanshinone m/z 293 (C₁₉H₁₈O₃) cuyo pico se observa en el minuto 22.88 el cual se detectó sólo en la cebolla roja en este estudio. Este compuesto ha sido descrito como un importante compuesto bioactivo, que es una naftoquinona diterpenoide aislada a partir de la raíz de *Salvia miltiorrhiza*.^{328,329} La detección de la presencia de estos compuestos en este análisis se debe a la potencialidad de la técnica analítica utilizada en especial de HPLC.³³⁰ Otro compuesto terpénico que se detectó fue alliofuranoside A m/z 887 descrito por Kravets y col. en 1986³³¹ en *Allium cepa*. Este compuesto y un isómero del mismo se observan en las tres variedades, apareciendo en los minutos 27.67 y 27.72 respectivamente.

Así también en el perfil obtenido se puede observar la presencia de varios alliospirosidos, así se observa un pico con un m/z 753 alliospirosido D (C₃₉H₆₂O₁₄) que fue encontrado en *Allium cepa* L. por Amhad col.³³² En este caso este compuesto sólo se detecta en cebolla blanca apareciendo en el perfil como dos picos que corresponden a dos isómeros que tienen tiempos de retención de 32.42 y 33.24 min. Otro isómero también descrito en cebolla fue el alliospirosido B m/z 899³³³, del que se observan dos picos con tiempos de retención 40.83 y 42.37 (minutos) el cual se observa en cebolla roja y blanca. También se observó el alliospirosido C m/z 723 (C₃₈H₅₉O₁₃) encontrado en *Allium cepa*,³³⁴ se observa como dos isómeros que aparecen con tiempos de retención de 35.85 y 36.40

³²⁸ Park E. J., Ji H. Y., et al. 2008. "Simultaneous determination of tanshinone I, dihydrotanshinone I, tanshinone IIA and cryptotanshinone in rat plasma by liquid chromatography–tandem mass spectrometry: application to a pharmacokinetic study of a standardized fraction of *Salvia miltiorrhiza*, PF2401-SF." *Biomedical Chromatography* 22(5): 548-555.

³²⁹ Sun J., Yang M., et al. 2007. "Profiling the metabolic difference of seven tanshinones using high-performance liquid chromatography/multi-stage mass spectrometry with data-dependent acquisition." *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 21(14): 2211-2226.

³³⁰ Hunter I. R., Walden M. K., et al. 1981. "High-Performance Liquid Chromatography, Infrared and Raman Spectra of Steroidal Sapogenins." *Journal of Natural Products* 44(3): 245-251

³³¹ Kravets S. D., Vollerner Y. S. et al. 1986. "Steroids of the spirostan and furostan series from plants of the genus *Allium*. XXI. Structure of alliospiroside a and alliofuroside a from *Allium cepa*." *Chemistry of Natural Compounds* 22(2): 174-181.

³³² Ahmad V. U. and Basha A. 2006. *Alliospiroside D Spectroscopic Data of Steroid Glycosides: Stigmastanes, Furostanes, Spirostanes*, Springer US: 1314-1315.

³³³ Kravets C., Vollerner Y., et al. 1986. "Steroids of the spirostan and furostan series from plants of the genus *Allium* II. The structure of alliospiroside B from *Allium cepa*." *Chemistry of Natural Compounds* 22(5): 553-556.

³³⁴ Ahmad V. U. and Basha A. 2006. *Alliospiroside C Spectroscopic Data of Steroid Glycosides: Stigmastanes, Furostanes, Spirostanes*, Springer US: 1256-1256.



(minutos) de los cuales el primero se observa en las tres variedades y el segundo sólo en cebolla blanca y cebolleta. Un último alliospirósido que se detectó fue el aliospiroside A m/z 707 con fórmula ($C_{38}H_{59}O_{12}$) descrito por Ahmad y col. **Error! Marcador no definido**. El cual resenta dos picos con tiempos de retención de 44.52 y 44.59 (minutos) los cuales se observan en las tres variedades estudiadas.

La presencia de la señal m/z 899 podría corresponder a ascalonicoside B ((25S)-spirost-5-ene-1 β ,3 β -diol 1-O-(α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-galactopiranosido) ($C_{45}H_{71}O_{18}$) que fue encontrado en *Allium cepa* L por Ahmad y col. **Error! Marcador no definido**. Dicho compuesto se observa en las tres variedades en el minuto 32.42.

Una saponina que se detectó fue la chinenoside V m/z 915 (26-O- β -glucopiranosil-3 β , 26-dihidroxi-23-hidroximetil-25-(R)-5 α -furost-20(22)-en-6-ona 3-O- α -arabinopyranosyl (1 \rightarrow 6)- β -glucopiranosido), cuya presencia fue determinada en *Allium cinense* por Peng. y col.,³³⁵ el cual en este caso sólo se encontró en la cebolla blanca con un tiempo de retención de 33.67 minutos .

Finalmente se observó una m/z 737 que correspondería a nuatigenina glucósido su presencia fue descrita en *Allium vineale* por Ahmad y col., 2006³³⁶ que en este estudio se observa en las tres variedades estudiadas en el minuto 42.44.

Otro importante grupo de compuestos que fueron detectados fue el de los sacáridos en los que se describe la presencia de las siguientes familias:

- Carbohidratos

Monosacáridos

Dentro de esta familia sólo se encontró la ribosa m/z 149 en el minuto 2.54.

Oligosacáridos

Los carbohidratos no estructurales constituyen cerca del 80% de la materia seca del bulbo de la cebolla siendo la glucosa, fructuosa y sucrosa los carbohidratos que mayor

³³⁵ Peng J., Yao X., et al. 1996. "New Furostanol Glycosides, Chinenoside IV and V, from *Allium chinense*." *Planta Med* 62(05): 465,468.

³³⁶ Ahmad V.U. and Basha A. 2006. *Allium Vineale* Saponin 2 Spectroscopic Data of Steroid Glycosides: Stigmastanes, Furostanes, Spirostanes, Springer US: 743-743.

proporción tienen (28%, 24% y 10%, respectivamente). Así, se detectó la presencia de sucrosa m/z 341³³⁷ y del dímero de sucrosa m/z 683³³⁸ en el minuto 2.39 del análisis.

Un importante porcentaje de sacáridos que presenta la cebolla (10 % del total de carbohidratos), son los tetrasacáridos. En este caso se ha detectado la presencia de estaquiosa m/z 665 como dos isómeros, el primero con un tiempo de retención de 5.25 presente en cebolla roja y cebolleta y otro isómero presente en el minuto 5.67 que sólo se observa en la cebolla roja.

También dentro de esta familia se observaron oligosacáridos cuya presencia en cebolla fue descrita por *Benkeblia y col.*,³³⁹ detectándose la presencia de los siguientes sacáridos en éste estudio: maltotetraosa en cebolla roja en el minuto 3.06, isomaltotriosa **Error! Marcador o definido.** presente en las tres variedades y no sólo en cebolla roja como refiere la bibliografía, isolychnose, (3f-alfa-D-galactosilrafinosa), rafinosa presente en cebolla roja³⁴⁰ y en cebolleta al minuto 6.48 y 4.74, respectivamente y finalmente maltohexaosa, presente en las tres variedades

- Estilbenos

En este grupo se detectó el glicósido isorhapontin, m/z 419 el cual aparece en el minuto 30.76 y que se detectó en las tres variedades.

- Ácidos Orgánicos

Entre los ácidos orgánicos se detectó la presencia del ácido aspártico, málico, malónico y succínico los cuales se observan en las tres variedades. Por último mencionar que se encontró el ácido tiánico (tianshic acid) m/z 329 en el minuto 37.85 el cual se observó en las tres variedades.

³³⁷ Gennaro L., Leonardi C., et al. 2002. "Flavonoid and Carbohydrate Contents in Tropea Red Onions: Effects of Homelike Peeling and Storage." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50(7): 1904-1910.

³³⁸ Davis F., Terry L. A., et al. 2007. "Effect of Extraction Procedure on Measured Sugar Concentrations in Onion (*Allium cepa* L.) Bulbs." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55(11): 4299-4306

³³⁹ Benkeblia N., Ueno K., et al. 2005. "Variation of fructooligosaccharides and their metabolizing enzymes in onion bulb (*Allium cepa* L. cv. Tenshin) During Long-term Storage." *Journal of Food Science* 70(3): S208-S214.

³⁴⁰ Siddeshwar S., Kondal Reddy K. *, Madhava Rao T., Arun K. and Reddy P.V.M. 2008. Screening and Estimation of Pre-biotic Oligosaccharides in Fruits and Vegetables *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy*, Vol.2 (1) 183-191



Conclusiones

De manera general podemos afirmar que los perfiles cromatográficos obtenidos para la cebolla roja, cebolla blanca y cebolleta respectivamente fueron muy similares desde un punto de vista cualitativo; es decir un importante número de compuestos resueltos están presente en las tres muestras. Pero aún así hubo compuestos que sólo fueron hallados en una sola variedad, como por ejemplo tanshinone y curculigosidos en cebolla roja, alliospiroside D en cebolla blanca. En otros casos, algunos compuestos estuvieron presentes en dos variedades y ausentes en la tercera variedad. Tal es el caso de la cebolla blanca en la que no se observa la presencia de ácido siríngico, taxifolin glucósido, dietilflavona-5,7-dioxiacetato y diglucósidos de isorhamnetin.

La cebolleta es probablemente la matriz que ha sido menos estudiada de las tres que aquí se analizaron, así que este capítulo puede ser considerado como un aporte en la caracterización exhaustiva de una matriz cuya composición es bastante desconocida. Además aunque la cebolla roja y blanca han sido evaluadas en un mayor número de estudios, no en muchos de dichos trabajos se empleaba MS como sistema de detección, así los datos que aquí se recogen serán completados con análisis MS/MS para corroborar la identidades referidas en el presente trabajo además de lograr los datos cuantitativos en un futuro próximo. Datos experimentos se están llevando a cabo en las instalaciones de nuestro grupo de investigación.



Capítulo V

Estudio evolutivo del perfil metabólico de frutos de aguacate (*Persea americana*) mediante un nuevo método CZE-ESI-IT MS





OBJETO DEL CAPÍTULO

En el presente trabajo describimos un nuevo método basado en el uso de la técnica de electroforesis capilar en zona (CZE) acoplada a espectrometría de masas con trampa de iones (IT MS), mediante la interfase (ESI). Este acoplamiento puede ser considerado una poderosa herramienta para el análisis metaboloma.

El método desarrollado es un método simple que permite la detección y cuantificación de metabolitos de interés presentes en matrices vegetales. En este caso, la matriz sobre la que se trabajó fue el fruto aguacate *Persea Americana*, llevando a cabo la determinación de flavonoides, ácidos fenólicos, vitaminas, polialcoholes y ácidos orgánicos.

Utilizando el mencionado método se ha podido realizar también un seguimiento del desarrollo metabólico de este fruto durante el proceso de maduración.



V.1. Generalidades del aguacate (*Persea americana*)

El aguacate o palto (*Persea americana* Mill) es un árbol que pertenece a la familia de las Lauráceas, abarca ocho familias y unas 2.500 especies (muchas de las cuales presentan interesantes estructuras botánicas y algunas tienen valor económico por los productos útiles que se extraen de ellas).

El mismo es originario de América Central (México, Guatemala, Antillas)³⁴¹ y alcanza una altura de 30 metros. Este árbol tiene una distribución en áreas tropicales y subtropicales. De hecho su cultivo se fue extendiendo por América (Guatemala, Perú, Venezuela) y a partir del descubrimiento de América, por otros países cálidos, ya que ha demostrado fácil adaptación a otras regiones tropicales, razón por lo que su fruto puede ser incluido entre los frutos tropicales. En España se cultiva en Andalucía y Canarias.



Fig. 100. Aspecto de un fruto de aguacate de la Hass.

V.1.1. El fruto

El fruto se conoce como aguacate o palta y es comestible. La evidencia más antigua del consumo de esta fruta data de 7000 años A. C., encontrada en una cueva localizada en Coxcatlán, Puebla³⁴².

En función de la variedad, el fruto tendrá forma piriforme (forma de pera), ovoide, oblonga o esférica, cuyas dimensiones van de 7 a 20 cm de largo y de 8 a 20 cm de diámetro

³⁴¹Chen H., Morrell P. L., et al. 2009. "Tracing the Geographic Origins of Major Avocado Cultivars." *Journal of Heredity* 100(1): 56-65.

³⁴²Smith C.E. Jr. 1966. Archeological evidence for selection in avocado. *Economic Botany* 20: 169-175.

en su parte mayor, una semilla central grande de aproximadamente 5-6.4 cm de largo y 250 gramos de peso, por lo que su peso total puede oscilar entre los 100 y 1000 gramos³⁴³.

De igual modo, también en función de la variedad, la piel presentará una superficie rugosa o lisa de color verde oliva, morado o incluso negro; la pulpa, por lo general, tiene consistencia pastosa de color amarillo pálido o verde-amarillenta. Respecto a la pulpa, podemos decir que es rica en aceites vegetales, y es apreciada por sus atributos sensoriales, en especial por el sabor, el cual puede resultar bastante peculiar, sin ser dulce, ni ácido, ni aromático; se menciona que el sabor es ligeramente nogado (olor a nuez). El sabor es considerado un importante factor de selección, siendo las especies preferidas por esta propiedad las variedades Hass y Fuerte³⁴⁴.

Con respecto a las variedades, en el mundo existen cerca de 500 variedades de aguacate, que difieren, tal y como se mencionaba previamente, en la forma de la fruta y el color. Todas estas especies derivarían de tres razas que son: mexicana (M), guatemalteca (G) y antillana (A), las cuales presentan unas características propias en cuanto a sus hojas, frutos, periodo de floración, formación del pedúnculo, vida del fruto post-cosecha, etc. De entre todas las variedades existentes, aquellas de mayor consumo se recogen a continuación:

Tabla 43. Variedades comerciales de aguacate

Variedad	Raza	Peso fruta promedio	Producción	Sabor	Color cáscara
lorena	A	430	muy buena	muy bueno	verde amarillo
trapp	A	450	muy buena	muy bueno	verde amarillo
trinidad	GxA	560	muy buena	bueno	verde oscuro
booth7	GxA	450	muy buena	muy bueno	verde oscuro
both8	GxA	485	muy buena	bueno	verde
Monroe	GxA	850	bueno	bueno	verde oscuro
choquette	GxA	900	muy buena	muy bueno	verde oscuro
hass	G	250	muy buena	muy bueno	verde
fuerte	MxG	310	bueno	muy bueno	verde
reed	G	425	muy buena	muy bueno	verde

³⁴³Dembitsky V. M., PoovarodomS., et al. 2011. "The multiple nutrition properties of some exotic fruits: Biological activity and active metabolites." *Food Research International* 44(7): 1671-1701.

³⁴⁴Razeto B., RomeroF., et al. 2004. "Influencia de algunas propiedades organolépticas en la aceptabilidad del fruto de palto (*Persea americana* Mill.)." *Agricultura Técnica* 64: 89-94.



Para este estudio se han tenido en cuenta las variedades de mayor cultivo y consumo en España que son Hass, Reed, Bacon y Fuerte, las cuales a continuación se describen brevemente.

Hass

Fue desarrollado por Rudolph Hass, en La Habra Heights (California), en 1926. Es un fruto piriforme, que pesa aproximadamente 210 g; tiene la piel rugosa y oscura en el árbol, la cual se torna negra y suave al madurar, la pulpa es cremosa y amarilla. El árbol empieza a dar fruto a partir del segundo año de vida y puede soportar temperaturas de $-1\text{ }^{\circ}\text{C}$. Su cultivo es el mayor a nivel mundial pues corresponde al 80% de los aguacates cultivados. Se produce en México, California y en España, concretamente en la zona de Andalucía.

Bacon

Esta variedad fue desarrollada por James Bacon en 1928 en Bueno Park (California). Es un fruto ovoide, de tamaño mediano (pesa aproximadamente 360 g), la piel es lisa de tacto suave y de color amarillo-verde, la cual al madurar cambia ligeramente a un tono más oscuro; la pulpa es muy pálida de color amarillo-verdosa. El árbol es alto y delgado y muestra excelente resistencia a las heladas -5°C ; es una variedad muy cultivada en España.

Fuerte

Es originario de Atlixco-México; es un fruto piriforme, con un peso de 450 g; la piel es de color verde oscuro con pequeños puntos levantados pálidos; la pulpa es cremosa de sabor suave, y la semilla es pequeña (en comparación con la de otras variedades). Su nombre se debe a que soportó una fuerte helada a -3°C en California en 1913, por lo que se puede afirmar que estos árboles son resistentes a bajas temperaturas.

Reed

Es originario de San Diego (California), fue desarrollado por James S. Reed en 1948. Es un fruto redondo, de piel gruesa y de color verde que se torna oscura gruesa y brillante y que resulta fácil de pelar al madurar. Es una fruta grande cuyo peso oscila entre 280 y 680 g; resiste temperaturas de -1°C , y es mayormente cultivado en Israel, Kenia, Sudáfrica y España.

V.2. Importancia económica del aguacate

Una característica importante de este fruto que no ha sido aún mencionada es el que el aguacate es un fruto climatérico, esta propiedad es aprovechada para su comercio, por lo que el mismo ha adquirido importancia económica para varios países productores.

Así al ser un fruto climatérico, alcanza una madurez de recogida (fisiológica o de cosecha) en el árbol en la que tiene aproximadamente un 23% de materia seca, por lo que los frutos se recogen verdes y duros los cuales se mantienen en refrigeradores a 3,3 a 5,6 ° C, conservándose así hasta que lleguen a su destino final donde obtendrán la madurez de consumo en unos pocos días a temperatura ambiente (o bajo la influencia de etileno). La determinación del momento óptimo de cosecha del fruto de palto es difícil y, por eso, en algunos países se han determinado niveles mínimos de aceite que garanticen una buena aceptabilidad.

Así cada año se siembran mayor número de hectáreas de aguacate debido a que este fruto es considerado por algunos como el “oro verde”, lo que ha hecho a otros países barajar como una práctica apropiada la siembra del producto con variedades tales como Hass, Fuerte, Reed, Green.

V.2.1. Niveles de producción

Producción

Según la página de datos estadísticos de la FAO México (38%), Estados Unidos de Norteamérica (7,5%) y República Dominicana (6,3%) son los principales productores y exportadores de aguacate, ocupando España el undécimo lugar.

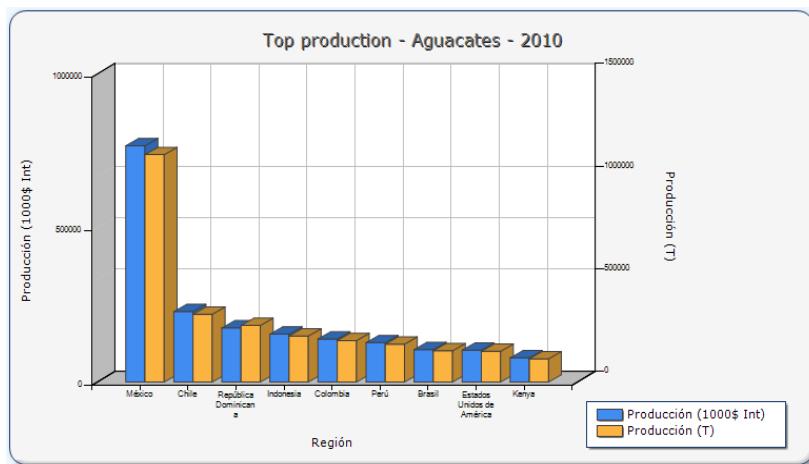


Fig. 101. Producción de aguacate a nivel mundial.



Los principales importadores de aguacate a nivel mundial son países como Francia, Reino Unido y Alemania, Canadá, Japón y los Estados Unidos de Norteamérica.

V.3. Composición nutricional

Como ya se indico antes la parte comestible del fruto es la pulpa cuyo contenido de nutrientes depende notablemente de la variedad, el grado de madurez, las condiciones de cultivo, etc. La palta, al igual que la leche, es un alimento muy completo; incluso se señala que posee valor energético más alto que la banana y la carne.

El nivel de proteínas en relación a otros frutos es bastante alto ya que estos alcanzan como mínimo un 2,1% de proteínas También representa una fuente de vitaminas, principalmente de vitamina A y B. Además presenta alcoholes y azúcares poco usuales, como Perseitol y D-manoheptulosa³⁶¹.

Es importante señalar que el ácido graso dominante en la palta es el oleico (entre el 70 y el 80%), el cual se acumula en las células preferentemente bajo forma de triglicéridos. Cuanto mayor es el contenido de aceite menor es el de agua en el mesocarpo. Otros ácidos grasos que se forman con el desarrollo del fruto, si bien en proporciones muy inferiores al oleico, son el linoleico (10- 11%) y el palmítico (casi un 7%). También aparecen trazas de ácido esteárico, mirístico, linolénico y araquídico. En cualquier caso los ácidos grasos insaturados prevalecen en la composición, haciendo el aceite de palta muy apto para la alimentación. El siguiente esquema presenta los contenidos nutricionales típicos recogidos por la USDA.

V.4. Propiedades funcionales

Los aguacates proporcionan, tal y como podía observarse en la tabla anterior, alrededor de veinte nutrientes esenciales, incluyendo fibra, potasio, vitamina E, vitamina B y ácido fólico. También actúan como un "refuerzo de nutrientes", al permitir que el cuerpo absorba más nutrientes solubles en grasa, tales como α - y β -caroteno y luteína en los alimentos que se comen con la fruta.

La Guía Alimentaria de la American Heart Association (AHA) recomienda una dieta que tenga, por lo menos, cinco porciones de frutas y vegetales Dicha dieta ha de contener hasta un 30% de calorías provenientes de grasas insaturadas (principalmente) y ser baja en grasas saturadas, grasas *trans* y colesterol, y sodio, mientras que ha de ser rica en potasio. Los aguacates pueden ayudar a cumplir las directrices de la dieta de la AHA porque tienen grasas, tanto monosaturadas y poliinsaturadas y contienen potasio.



Fig. 102 Esquema del contenido nutricional del aguacate.

Los aguacates son también una rica fuente de metabolitos secundarios, que resultan útiles para el tratamiento o prevención de una serie de enfermedades; así lo sugieren numerosos estudios e informes farmacológicos que indican que sus extractos tienen actividad:

Anticolesterlemica, debida a la presencia de beta-sitosterol que es ampliamente prescrito como un fármaco anti-colesterol pues interfiere con la absorción de colesterol, promoviendo así los niveles más bajos de colesterol. Los análisis de laboratorio han



demostrado que los aguacates contienen 76 mg de beta-sitosterol por cada 100 gramos de fruta fresca y comestible³⁴⁵.

Antioxidantes, debida a la presencia de glutatión que se compone de tres aminoácidos, ácido glutámico, cisteína, glicina y que funcionan como antioxidantes. Los estudios han revelado que los aguacates contienen 17,7 mg de glutatión por 100 gramos de fruta comestible crudo. Esto es más de tres veces la cantidad de cualquier otra fruta. Los estudios han revelado una fuerte correlación entre el consumo de glutatión aumento y disminución del riesgo de cáncer oral y faríngeo. La disminución en el riesgo sólo se produjo cuando el glutatión vino de frutas y verduras crudas.

V.5. Análisis de metabolitos de aguacate. Estudios realizados

La complejidad del metaboloma de una planta es muy elevada, ya que hay un sinnúmero de compuestos orgánicos -productos del metabolismo primario y secundario de la planta- que están presentes en las frutas y vegetales. La división entre metabolitos “primarios” y “secundarios” es bastante típica cuando se trabaja en metabolómica de plantas, tal y como se recogía en la introducción de la presente memoria. En la misma, se mencionaba que los metabolitos primarios están directamente relacionados con el crecimiento, desarrollo y reproducción (carbohidratos, aminoácidos, ácidos grasos, ácidos orgánico...); mientras que aquellas sustancias que determinan el color de una fruta o vegetal, protegen la planta frente a microorganismos y herbívoros, etc., son descritos como metabolitos secundarios^{346,347}.

La diversidad química de las plantas hace que para llevar a cabo una caracterización profunda de su metaboloma, haya que usar herramientas bastante sofisticadas con las que actualmente se cuenta dentro de la Química analítica.

³⁴⁵ Duester KC.J Avocado fruit is a rich source of beta-sitosterol. (2001) Journal of the American Dietetic Association 101(4): 404-405.

³⁴⁶ Haeuduer, 1965; Human, 1987 D.S. Seiger. 1998. Plant secondary metabolism. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers. p 592.

³⁴⁷ A. Crozier, M. Clifford, H. Ashihara. 2006. Plant secondary metabolites: occurrence, structure and role in the human diet. Oxford, U. K.: Blackwell Publishing Ltd. p 384.).

Las fracciones que más se conocen del aguacate son las que incluyen a los ácidos grasos y a los triglicéridos^{348,349}, habiendo sido también determinado en numerosas ocasiones el contenido en materia seca de N, P, K, Ca, Mg, S, Fe, Cu, Mn, Zn y B, y los azúcares y carbohidratos presentes en el mesocarpio del fruto de aguacate^{350 351}

En lo que respecta a la caracterización de metabolitos secundarios de esta fruta, podemos mencionar la exhaustiva revisión bibliográfica elaborada por Ding y col.³⁵², que dividía los metabolitos en: alcoholes alifáticos (acetogeninas alifáticas), glicósidos de terpenoides, derivados de furanos, flavonoides y cumarinas.

La fracción fenólica ha sido estudiada en profundidad sólo recientemente. En algunos artículos en los que se determinaban compuestos fenólicos en diferentes frutas, se incluía la identificación y cuantificación de algunos de ellos en aguacate como Torres y col.³⁵³, Pascual y col., 2000³⁵⁴; Arts y col., 2000³⁵⁵; Harnly y col., 2006³⁵⁶ quienes fueron

³⁴⁸ Effect of Varietal Differences on Composition and Thermal Characteristics of Avocado Oil Journal of the American Oil Chemists Society. 88, 12, 1997-2003

³⁴⁹ Ozdemir, F; Topuz, A. (2004). Changes in dry matter, oil content and fatty acids composition of avocado during harvesting time and post-harvesting ripening period. Food chemistry., 86, 1, 79-83.

³⁵⁰ Richings, EW; Cripps, RF; Cowan, AK. (2000). Factors affecting 'Hass' avocado fruit size: Carbohydrate, abscisic acid and isoprenoid metabolism in normal and phenotypically small fruti. Physiologia plantarum., 109, 1, 81-89.

³⁵¹ Salazar-García, S. González-Durán, I. J. L.; Tapia-Vargas, L. M. (2011). Influencia del clima, humedad del suelo y época de floración sobre la biomasa y composición nutrimental de frutos de aguacate "Hass" En Michoacán, México. Revista Chapingo. Serie Horticultura, Mayo-Agosto, 183-194.

³⁵² Ding, H., Y.-W. Chin, et al. (2007). Chemopreventive characteristics of avocado fruit. Seminars in Cancer Biology 17(5): 386-394.

³⁵³ Torres, A. M.; Mau-Lastovicka, T.; Rezaaiyan, R. (1987). Total phenolics and high-performance liquid chromatography of phenolic acids of avocado. J. Agric. Food Chem., 35, 921-925.

³⁵⁴ Pascual-Teresa, S.; Santos-Buelga, C.; Rivas-Gonzalo J. C. (2000) Quantitative analysis of flavan-3-ols in Spanish foodstuffs and beverages. J. Agric. Food Chem., 48, 5331-5337

³⁵⁵ Arts, I. C. W.; van de Putte, B.; Hollman, P. C. H. (2000). Catechin contents of foods commonly consumed in the Netherlands. 1. Fruits, vegetables, staple foods, and processed foods. J. Agric. Food Chem., 48, 1746-1751.

³⁵⁶ Harnly, J. M.; Doherty, R. F.; Beecher, G. R.; Holden, J. M.; Haytowitz, D. B.; Bhagwat, S.; Gebhardt, S. (2006). Flavonoid content of U.S. fruits, vegetables and nuts. J. Agric. Food Chem., 54, 9966-9977.



pioneros determinando ácidos fenólicos en esta fruta y Hurtado-Fernández y col., 2011^{357,358} han publicado recientemente varios artículos en los que se lleva a cabo una caracterización cualitativa y cuantitativa de un gran número de compuestos en esta matriz. Cabe mencionar también algunos interesantes trabajos donde se analizan las procianidinas y pigmentos presentes en la fruta de *Persea americana*³⁵⁹

V.6 Materiales Y Métodos

V.6.1. Reactivos

Los reactivos utilizados en la preparación de las diferentes disoluciones fueron: hidróxido de sodio de Panreac (EEUU), acetato amónico de Sigma Aldrich (Japón), metanol y 2-propanol de Panreac (España), amoniaco de Panreac (España) y agua Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, EE.UU.).

Los estándares comerciales que se utilizaron fueron: perseitol de Carbosynth (UK), epicatequina, catequina, ácidos abscísico, pantoténico, quínico, *trans*-cinámico, clorogénico, ferúlico, *p*-cumárico y fólico y taxifolin, que fueron comprados de Extrasynthèse (Lyon, France), Sigma-Aldrich (EEUU). El ácido fólico y el taxifolin fueron empleados como estándares internos, uno para evaluar la repetibilidad de los análisis y otro, para controlar la eficacia del proceso de extracción.

Todas las disoluciones y extractos obtenidos del aguacate fueron filtrados con filtros de jeringa desechables de celulosa regenerada (Symta, Madrid, España) de 0.2 micras de antes de inyectarse en el instrumento.

³⁵⁷ Hurtado-Fernández, E., A. Carrasco-Pancorbo, Fernández-Gutiérrez A. (2011). Profiling LC-DAD-ESI-TOF MS Method for the Determination of Phenolic Metabolites from Avocado (*Persea americana*). Journal of Agricultural and Food Chemistry 59(6): 2255-2267.

³⁵⁸ Hurtado-Fernández, E., T. Pacchiarotta, et al. Pacchiarotta T., Gómez-Romero M., Schoenmaker B., Derks R., Deelder M. A., Mayboroda A. O., Carrasco-Pancorbo A., Fernández-Gutiérrez A. (2011) Ultra high performance liquid chromatography-time of flight mass spectrometry for analysis of avocado fruit metabolites: Method evaluation and applicability to the analysis of ripening degrees. Journal of Chromatography A 1218(42): 7723-7738.

³⁵⁹ Wang, W; Bostic, T. R.)1; Gu, LW . Antioxidant capacities, procyanidins and pigments in avocados of different strains and cultivars. 2010. Food Chemistry. 122, 4, 1193-1198

V.6.2. Muestras

Frutas de las siguientes variedades de aguacate fueron usadas en este estudio: Hass, Reed, Bacon y Fuerte. Las cuatro variedades mencionadas fueron usadas en los estudios preliminares, centrándonos en etapas más avanzadas en la variedad Reed. Todas las variedades nos fueron proporcionadas por la Estación Experimental "La Mayora" (CSIC), ubicada en Algarrobo-Costa (Málaga, España). Todas las variedades fueron cultivadas bajo las mismas condiciones ambientales (suelo, lluvia, luz, etc.). Los frutos eran enviados a nuestro laboratorio, donde eran pesados, pelados, cortados, congelados, liofilizados y triturados) antes de proceder a la preparación de los extractos.

Para la segunda parte del estudio, se trabajó con 17 muestras de aguacate variedad Reed, que habían sido recogidas en diferentes estadios de maduración (comprendidos entre junio y octubre del 2011) durante la campaña 2011 (ver 44). El objetivo era ver la evolución metabólica que esta variedad sufría a lo largo de toda su campaña.

Tabla. 44. Fechas de recogida:

Junio	Julio	Agosto	Septiembre	Octubre
27/06/2011	06/07/2011 18/07/2011	01/08/2011 17/08/2011 31/08/2011	16/09/2011 31/09/2011	17/10/2011

Todos los frutos, tras ser recogidos, pasaban 10 días en cámara fría en la Estación del CSIC de La Mayora, bajo condiciones controladas de temperatura, luz y humedad. Tras ello, eran enviados a nuestro laboratorio.

V.6.3. Preparación del extracto

Para la extracción de los metabolitos contenidos en las muestras de aguacate, se procedió a trabajar según el método de extracción de (Hurtado-Fernández et al, 2011 a357, Hurtado-Fernández et al, 2011 b358), que se explica a continuación:

Se realizó una extracción sólido-líquido a partir de muestra liofilizada, pesando 4 g de aguacate liofilizado en un tubo falcón. Al mismo se le añadieron 50 μ L de taxifolin (50 ppm utilizado como estándar interno) y 40 ml de metanol y se cerró herméticamente agitando con ayuda de un vórtex a máxima velocidad (800 rpm) durante 30 min. Se dejó decantar durante 10 min y se colectó el líquido sobrenadante en tubos de vidrio para centrifugar a 3500 rpm durante 10 min. Tras ello, se recogió el sobrenadante en un matraz de rotavapor,



procediendo a evaporar el hasta sequedad. El extracto se redisolvió en 1ml de MeOH/H₂O 50:50. La siguiente figura resume el proceso de extracción.



Fig. 103. Esquema que recoge todas las etapas del proceso de extracción

V.6.4. Análisis mediante CE-ESI-IT MS

V.6.4.1. Instrumentación utilizada

Todas las separaciones se llevaron a cabo utilizando un equipo Beckman Coulter P/ACE™ MDQ de Beckman Instruments (USA) acoplado a espectrómetro de masas provisto con un analizador trampa de iones de Bruker Daltonics, Alemania. El control del equipo se llevó a cabo mediante el programa Esquire NT 2000, también de Bruker Daltonics.

Para llevar a cabo el acoplamiento CE-MS se utilizó una interfase electrospray ESI ortogonal con flujo adicional, modelo G1607A Agilent Technologies (USA). El flujo adicional se suministró utilizando una bomba de jeringa modelo 74900 Cole Palmer (Vernon Hills, CA, USA).

Se tuvo especial cuidado en la posición del capilar debido a que esta es crucial cuando se llevan a cabo análisis CE-MS. En este caso, para el ajuste del capilar este se colocó haciéndolo sobresalir aproximadamente 1mm respecto del sprayer (tubos concéntricos del flujo adicional y el gas nebulizador), para ello se utilizó una lupa de 25x. El equipo utilizado se muestra en la figura 104.



Fig. 104. Fotografía de la técnica acoplada CE-ESI-MS utilizado

El electrolito de separación se preparó disolviendo acetato **amónico** en agua Milli-Q, seguido del ajuste de pH con una disolución diluída de amoniaco. Para esto se utilizó un pH-metro microPH 2000 de Crison (España).

V.6.4.2. Condiciones CE-ESI-IT MS

Las separaciones electroforéticas se llevaron a cabo utilizando un capilar de sílice fundida de 85 cm x 50 μm de Beckman Instruments (Fullerton, CA, USA), una disolución reguladora de acetato amónico 40mM a un pH de 9.5 y un líquido adicional formado por isopropanol/agua 60:40(v/v). Dicho líquido adicional era bombeado a la interfase a un flujo de 0.24 ml/h. La inyección de las muestras se realizó a 5 psi durante 5 s. Las condiciones del MS fueron +3500 V (polaridad negativa), 250°C temperatura gas de secado, 5 l/min flujo del gas de secado, y 5 psi presión del gas nebulizador. Los datos se recogían en el rango comprendido entre 50-800 m/z . En MS se llevaron a cabo tanto análisis en *full scan*, como empleando *Multiple Reaction Monitoring* (MRM). Cuando la segunda aproximación era usada, se crearon segmentos a diferentes tiempos para facilitar la determinación de los compuestos seleccionados, aplicando diferentes condiciones MS (*Octopole*, voltaje de los *skimmers*, *Trap Drive*, etc.) en cada uno de dichos segmentos. En una última etapa de este estudio también se llevaron a cabo análisis en AutoMS/MS. Un resumen de las mencionadas condiciones se muestra a continuación:



Condiciones de separación EC	Condiciones MS
Capilar: 50 μm x 85 cm Tiempo de inyección=5s V= 30kV Tampón: Acetato amónico 40mM, pH=9.5	End Plate Offset= -500 V Capillary +3500V Nebulizer 5 psi Dry gas 5Lmín Dry Temp 250°C
Líquido de acompañamiento: 60/40(v/v) 2propanol/agua Flujo= 0.24 mL/h	

Fig. 105. Condiciones optimizadas CE-ESI-MS-IT

El acondicionamiento del capilar fue más drástico en su primer uso (20 min de NaOH 1M, 3 min de agua y 15 min de disolución reguladora); entre análisis bastaba con lavar el capilar 5 min con disolución reguladora para asegurar una repetibilidad razonable. Al final de cada sesión experimental, el capilar se lavaba con H₂O Milli-Q durante 1 h.

Cuando se procedía al análisis de una secuencia de muestras de aguacate, nos asegurábamos de intercalar una muestra control cada 4 extractos de aguacate, así como una mezcla de estándares cada 8. Proceder de este modo facilitaba el saber cuándo era necesario sustituir el capilar o cortar su extremo al perder eficacia en las separaciones o intensidad en MS.

Para cuantificar los 10 compuestos bajo estudio (tanto en full scan, como en MRM), se utilizó un calibrado con patrones externos, construyendo curvas de calibrado con 6 niveles de concentración diferentes (cada nivel era analizado, al menos, 3 veces).

Cada uno de los extractos de aguacate era analizado 3 veces (n=3).

V.7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

V.7.1. Estudios preliminares

En una primera fase de este estudio, para conseguir una mezcla de compuestos lo más representativa posible y poder proponer un potente método para el análisis de los metabolitos presentes en cualquier tipo de aguacate, se evaluó la presencia de 35 compuestos en extractos procedentes de las variedades Bacon, Hass, Reed y Fuerte. Los estándares utilizados fueron: glucosa, ácidos sinápico, succínico, esteárico, 2,3-dihidroxibenzoico, ferúlico, gálico, protocatecúico, 3-hidroxi-4-metoxibenzoico, fólico, p-cumárico, cafeico, clorogénico, homovanílico, siríngico, quínico, benzoico, cítrico, abscísico, pantoténico, ascórbico, scopoletina, riboflavina, crisina, triptófano, tirosina, fenilalanina, tiamina, catequina, epicatequina, naringenina, kaemferide, laricitrin, β -caroteno, perseitol.

Como se puede ver, la mezcla incluía aminoácidos, flavonoides, vitaminas, ácidos fenólicos, ácidos grasos, azúcares, etc., buscando que la determinación del metaboloma de la fruta bajo estudio fuese lo más ambiciosa posible.

En la siguiente figura se recogen los Base Peak Chromatograms (BPC) obtenidos en el análisis de las 4 variedades incluidas en los estudios preliminares. La variabilidad en los perfiles era más cuantitativa que cualitativa, si bien es cierto que algunas señales m/z detectadas en una variedad, no estaban presentes en las demás.

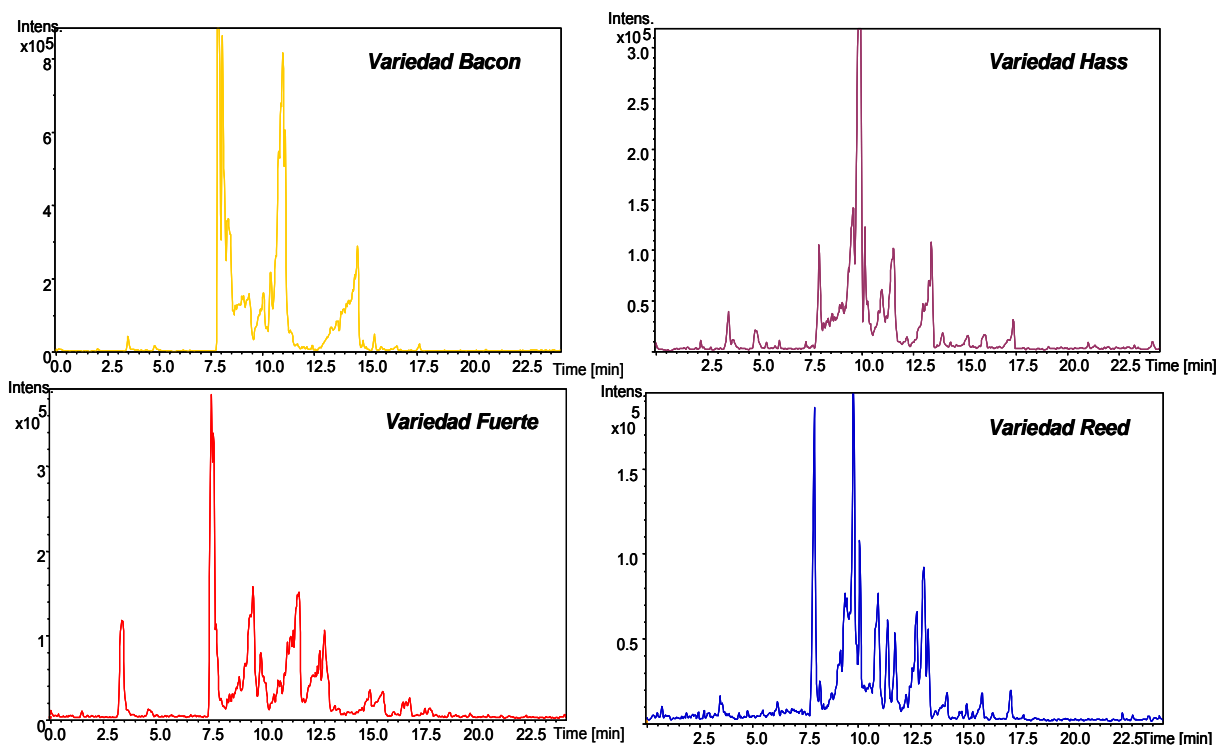


Fig. 106. Base Peak Electropherograms (BPEs) de los extractos metabólicos de aguacates de las variedades Bacon, Hass, Reed y Fuerte. Columna capilar 85 cm x 50 μ m solución reguladora acetato amónico 40mM (pH de 9.5), líquido adicional isopropanol/agua 60:40(v/v de Beckman Instruments (Fullerton, CA, USA), una disolución reguladora de acetato amónico 0.24 ml/h. La inyección de las muestras se realizó a 5 psi durante 5 s

El propósito de analizar esta mezcla era doble: ver si dichos compuestos podían ser analizados mediante nuestro método y, en caso tal, ver si los mismos estaban presentes en los extractos de aguacate.

Diez compuestos fueron seleccionados para las posteriores etapas de este estudio: perseitol, epicatequina, catequina, ácidos abscisico, pantoténico, quínico, *trans*-cinámico, clorogénico, ferúlico y *p*-cumárico.



Tras demostrar que la metodología CZE-ESI-IT MS podría ser aplicada al estudio de cualquier variedad de aguacate, se optimizaron exhaustivamente todas las variables responsables de la separación electroforética y de la detección en MS. Se utilizó tanto la mezcla de estándares (que contenía 10 metabolitos pertenecientes a distintas familias, que estaban presentes en todas las muestras analizadas en los estudios preliminares), como una mezcla de los extractos de aguacate que se estudiarían en etapas sucesivas.

V.7.2. Optimización exhaustiva de las variables CE y MS (Full Scan y MRM)

Tras decidir cuáles eran los compuestos que serían determinados en etapas posteriores en los extractos de aguacate, se procedió a estudiar en profundidad la señal que estos deparaban en MS (en polaridad positiva y negativa y en experimentos MS/MS). En la siguiente tabla 45 se recogen los resultados obtenidos para cada uno de los analitos bajo estudio.

Tabla 45. Señales obtenidas para cada uno de los compuestos bajo estudio en polaridad negativa y positiva y MS/MS.

Nº	Compuesto	MW	Fórmula molecular	Modo	Señales (m/z) mayoritarias en MS *	Ión precursor y Fragmentos MS/MS **	Cut energy ♦ off
1	Perseitol	212.20	C ₇ H ₁₆ O ₇	-	210.8 [M-H] ⁻ / 422.9 [2M-H] ⁻ / 300.9 / 495.1	211: 192.7 [M-H-H ₂ O] ⁻ / 100.7 / 88.7 / 118.7 423: 210.7	57 113
				+	234.8 [M+Na] ⁺ / 447.0 [2M+Na] ⁺ / 337.9 / 477.0	235: 222.8 / 213.8 447: 234.8 / 252.8	60 123
2	Epicatequina	290.27	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	-	288.9 [M-H] ⁻ / 579.0 [2M-H] ⁻ / 325.0 / 553.1	289: 244.7 [M-H-44] ⁻ / 204.7 [M-H-44-40] ⁻ / 270.7 [M-H-H ₂ O] ⁻ 579: 288.8 / 244.7 / 202.7 / 468.8	79 161
				+	312.9 [M+Na] ⁺ / 304.1 / 290.9 [M-H] ⁺ / 230.0 / 603.0	313: 138.7 / 272.8 / 122.7 / 290.8 305: No fragmentación 603: 312.8 / 483.3	85 ♦ 83 ♦ 167
3	Catequina	290.27	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	-	288.8 [M-H] ⁻ / 579.0 [2M-H] ⁻ / 325.0 / 339.0 / 480.9	289: 244.7 [M-H-44] ⁻ / 204.7 [M-H-44-40] ⁻ / 270.7 [M-H-H ₂ O] ⁻ 579: 288.8 / 244.7 / 202.7 / 468.9	79 161
				+	312.9 [M+Na] ⁺ / 360.1 / 290.9 [M-H] ⁺ / 230.0 / 603.0	313: 172.7 / 112.9 / 256.9 / 272.9 / 290.8 360: 268.0 / 207.8 / 324.9 / 340.1 603: 312.9	85 ♦ 99 167
4	Ác. Abscísico	264.32	C ₁₅ H ₂₀ O ₄	-	262.9 [M-H] ⁻ / 527.1 [2M-H] ⁻	263: 152.7 / 218.8 [M-H-44] ⁻ / 110.8 [M-H-	71

						152]- 527 : 262.8 / 152.8 / 218.9	146
				+	302.9 / 286.9 [M+Na]+ / 551.1 [2M+Na]+ / 416.0 / 529.1 [2M+H]+	303 : 276.9 287 : 274.9 / 246.9 [275-28]+ / 184.8 / 228.8 [247-18]+ 551 : 286.9	83 78 153
5	Ác. pantoténico	219.23	C ₉ H ₁₇ NO ₅	-	217.8 [M-H]- / 437.0 [2M-H]- / 694.2	218 : 87.7 [M-H-130]- / 145.7 [M-H-72]- 437 : 217.7 [M-H]-	59 120
				+	257.8 [M+K]+ / 477.0 [2M+K]+ / 367.4 [M+148]+ / 275.8 [258+18]+ / 496.0	258 : 217.8 [258-40]- / 127.7 [M-H-90]- / 145.6 [M-H-72]- 447 : 275.8 [M+K+18]+ / 459.0 [447-18]- / 346.9 [447-130]- / 257.8 [447-219]+ / 219.8 [447-258]+ 367 : 201.8 [367-147-18]+ / 219.8 [367-147]+ / 257.8 [M+K]+ / 302.4 [258+44]+	70 132 101
6	Ác. quínico	192.17	C ₇ H ₁₂ O ₆	-	190.7 [M-H]- / 382.8 [2M-H]- / 339.0 [2M-H-44]-	191 : 84.7 [M-H-106]- / 126.6 [M-H-64]- / 172.6 [M-H-18]- / 92.7 / 110.6 383 : 190.6 [383-192]-	51 112
				+	406.9 [2M+Na]+ / 214.8 [M+Na]+ / 307.9 / 241.9 [M+K+H]+	407 : 214.8 [407-192]+ / 310.7 [407-96]+ / 388.9 [407-18]+ 215 : 196.8 [215-18]+	112 58
7	Ác. <i>trans</i> -cinámico	148.16	C ₉ H ₈ O ₂	-	146.7 [M-H]- / 339.0	147 : 102.6 [147-44]-	39
				+	170.8 [M+Na]+ / 316.0 [171+145]+	171 : 152.8 [171-18]+ / 138.9 [171-32]+ 316 : 148.8 [316-167]+ / 130.8 [149-18]+ / 102.8 [149-18-28]+	45 86
8	Ác. clorogénico	354.31	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	-	352.9 [M-H]- / 707.1 [2M-H]- / 190.7 [quinic-H]-	353 : 190.7 [M-163]- 707 : 352.8 [707-M]-	97 197
				+	376.9 [M+Na]+ / 354.9 [M+H]+ / 731.1 [2M+Na]+	377 : 358.9 [377-18]+ / 214.8 [377-162]+ / 330.9 [377-46]+ / 184.7 [377-192]+ / 162.8 355 : 162.7 [M+H-quinic]+ 731 : 376.8 [731-M]+	103 97 203
9	Ác. ferúlico	194.18	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	-	192.7 [M-H]- / 339.0 [M-H+146]- / 133.7 [M-H-59]- / 288.8 [M-H+96]- / 482.8 [M-H+96+194]-	193 : 133.6 [M-H-59]- / 148.6 [M-H-44]- / 177.6 [M-16]- 339 : 192.6 [339-147]- / 133.6 [193-59]-	52 93 ♦



				+	216.8 [M+Na] ⁺ / 410.9 [2M+Na] ⁺ / 194.8 [M+H] ⁺	217 : No fragmentación 411 : 216.8 [411-194] ⁺ / 194.8 [217-Na] ⁺ / 176.8 [195-18] ⁺	58 ♦ 113
10	Ác. <i>p</i> - cumárico	164.16	C ₉ H ₈ O ₃	-	162.7 [M-H] ⁻ / 190.7 [M-H+28] ⁻ / 118.7 [M-H-44] ⁻ / 324.9 [M- H+162] ⁻	163 : 118.6 [M-H-44] ⁻ 191 : 84.7 [191-106] ⁻ / 126.6 [191-64] ⁻ / 172.7 [191-18] ⁻	43 51
				+	186.7 [M+Na] ⁺ / 146.8 [M+H- 18] ⁺ / 347.9 [187-161] ⁺	187 : 168.7 [187-18] ⁺ 348 : 164.7 [348-183] ⁺ / 146.7 [M+H-18] ⁺ / 118.8 [M+H-18-28] ⁺	50 ♦ 95

* En negrita se señala la señal m/z predominante en el espectro de masas.

** Los fragmentos aparecen en orden decreciente según su intensidad en el espectro MS/MS

♦ Los parámetros que se modificaban para obtener los espectros MS/MS con calidad suficiente eran Amplitude (V) y Cut Off; siendo width (m/z) fijado siempre en 4. A menos que se indique lo contrario (♦), Ampl era fijado a 1.0; para aquellos compuestos que no se fragmentaban aplicando esa energía, se variaba el valor de este parámetro, usado valores de 1.25, 1.5, 1.75, 2.0, 2.25 e incluso 2.5. De igual modo, si la fragmentación era excesiva con 1.0 de Ampl., se disminuía dicho valor.

La presente tabla muestra los posibles fragmentos comunes encontrados en los espectros de MS.

Tabla 46. Posibles fragmentos comunes encontrados en los espectros de MS.

59: CH ₃ COO
28: CO o C ₂ H ₄
44: HCOO
18: H ₂ O

Dichos datos pueden se completan con aquellos incluidos en la figura 44, donde se muestran los espectros de masas de, al menos, un representante de cada una de las familias de compuestos incluidas en este estudio.

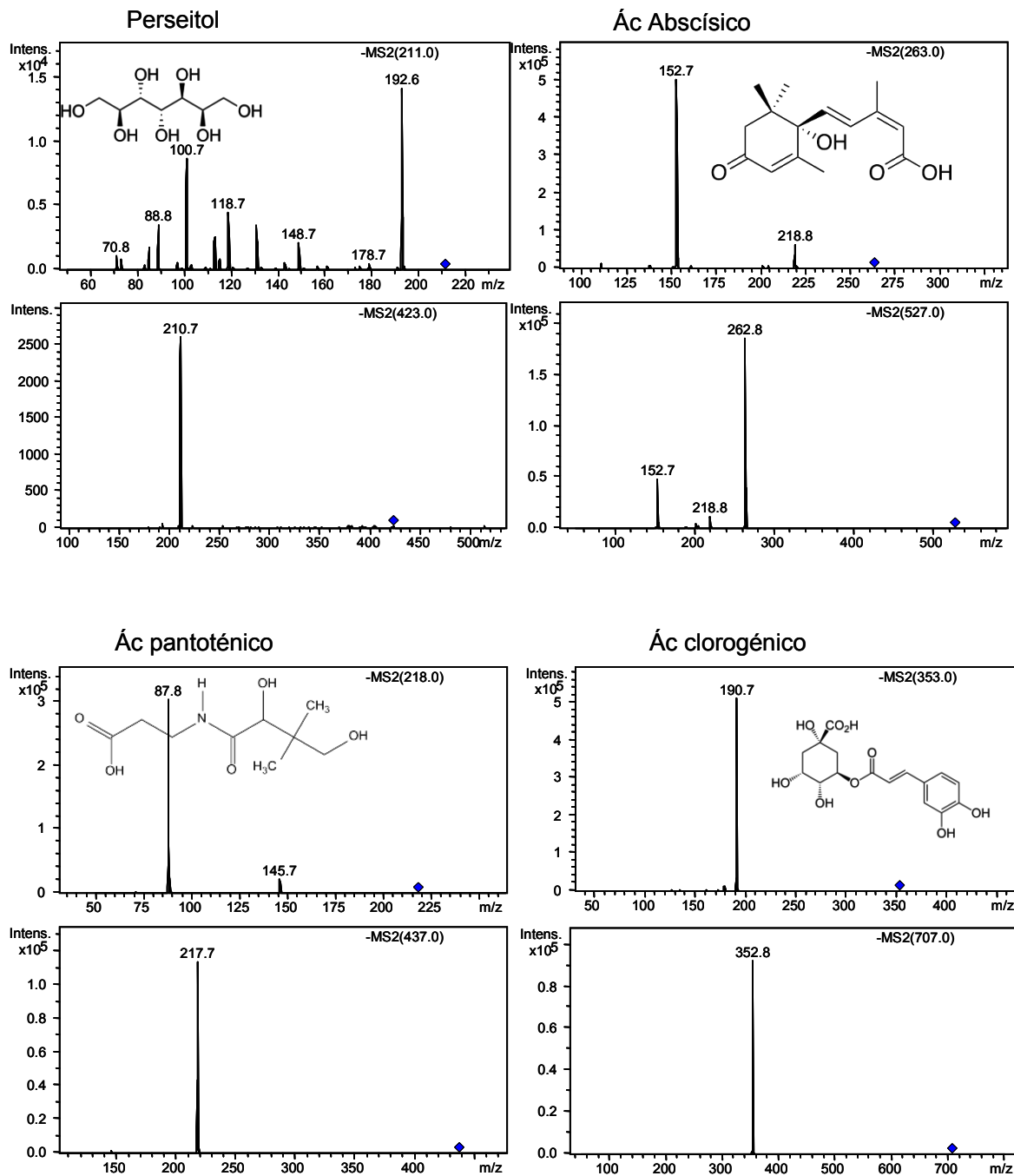


Fig. 107. Espectros MS MS/MS del perseitol y los ácidos abscísico, pantoténico y clorogénico en modo negativo.

Puede parecer particularmente interesante la información relativa a los espectros MS y MS/MS de la epicatequina y catequina, isómeros que generan espectros de masas muy similares. De hecho, en polaridad negativa, los espectros MS y MS/MS, son prácticamente iguales, siendo mucho más sencillo distinguirlas cuando se determinan en polaridad positiva.



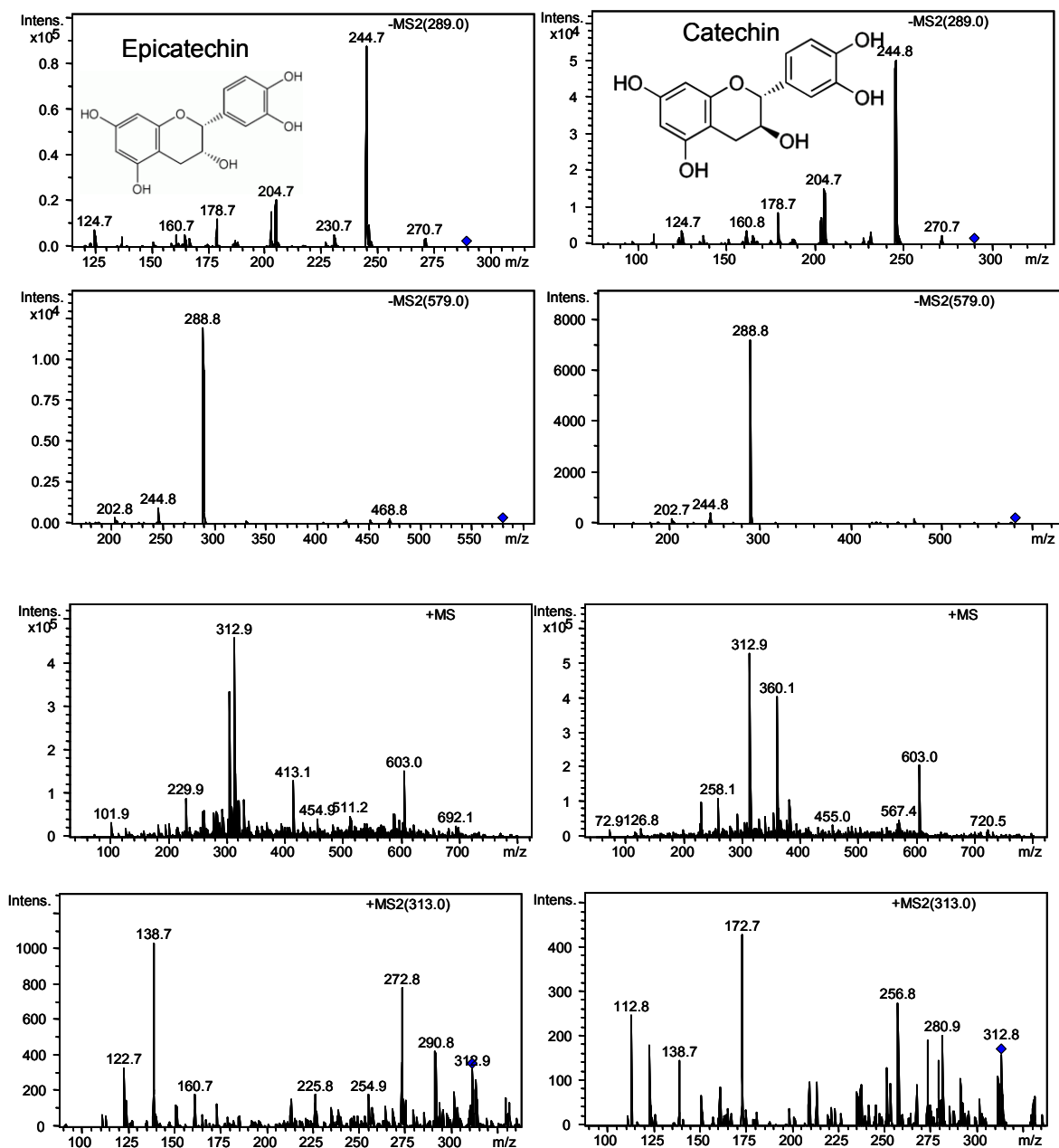


Fig. 45. Espectros MS y MS/MS de la epicatequina y catequina en modo negativo y positivo.

Se llevaron a cabo experimentos de infusión directa de una mezcla de los 10 compuestos para optimizar las condiciones de detección, persiguiendo unas condiciones que nos dieran señales con la máxima intensidad posible para cada uno de los compuestos.

V.7.3. Optimización de la separación

Decididos cuáles serían los compuestos a determinar y conociendo el comportamiento de los mismos en MS, se optimizó la separación electroforética. Dicha optimización consiste en la selección de los valores de los parámetros electroforéticos de tal forma que se obtenga

la mejor respuesta, con la mejor resolución posible de los picos electroforéticos en el menor tiempo. Se optimizaron los parámetros CE usando tanto la mezcla de los 10 estándares seleccionados, como una mezcla de todos los extractos que serían posteriormente analizados.

En los estudios preliminares, se evaluó la utilidad de disoluciones reguladoras de distinta naturaleza (acetato amónico, carbonato amónico, 40 mM), siendo el acetato amónico el que ofrecía una mayor capacidad para separar convenientemente la mezcla de analitos elegida.

Se optimizaron las siguientes variables: acondicionamiento del capilar, voltaje, pH y fuerza iónica de la disolución reguladora, tiempo de inyección, composición del sheath-liquid e influencia de modificadores orgánicos.

El capilar empleado tenía las siguientes dimensiones 85 cm x 50 μm y fue acondicionado lavando 5 min con la disolución reguladora tras cada análisis. Al comienzo del día se llevaba a cabo un acondicionamiento algo más exhaustivo, 2 min de solución y 15 de agua Milli-Q.

Se puede señalar que se ensayaron valores de voltaje comprendidos entre 20 y 30 kV, siendo este último valor el más adecuado, ya que deparaba tiempos de análisis más cortos sin empeorar la separación.

El pH resultó ser una de las variables más críticas. Basándonos en nuestra experiencia previa y la información recogida en bibliografía, el valor óptimo de pH que deparase la mejor separación debería estar comprendido entre 8.5 y 10; así, estudiamos distintos valores dentro de dicho intervalo (8.5, 8.75, 9.0, 9.25, 9.5, 9.75 y 10). A valores de pH inferiores a 9.0, la separación era bastante rápida, pero la resolución entre varios de los compuestos de la mezcla era insuficiente. A pHs por encima de 9.5, se alargaba notablemente el tiempo de análisis, sin conseguir una mejor resolución.

En la siguiente figura 46, se muestran los resultados alcanzados para pHs de 9.0, 9.25 y 9.5. A pH 9.0 se puede observar que no se lograban separar la siguientes parejas de compuestos: catequina y epicatequina, ácidos pantoténico y abscísico, y que entre el ácido trans-cinámico y el ferúlico, la resolución no era suficiente. A pH 9.0 mejoraba la separación entre los ácidos pantoténico y abscísico y entre los flavonoides catequina y epicatequina, siendo en esta ocasión la pareja de analitos más crítica la formada por los ácidos trans-cinámico y clorogénico. A pH 9.5 se lograba un tiempo de análisis razonable y una buena separación entre todos los compuestos bajo estudio; es por ello, por lo que se consideró este valor de pH como una buena solución de compromiso.



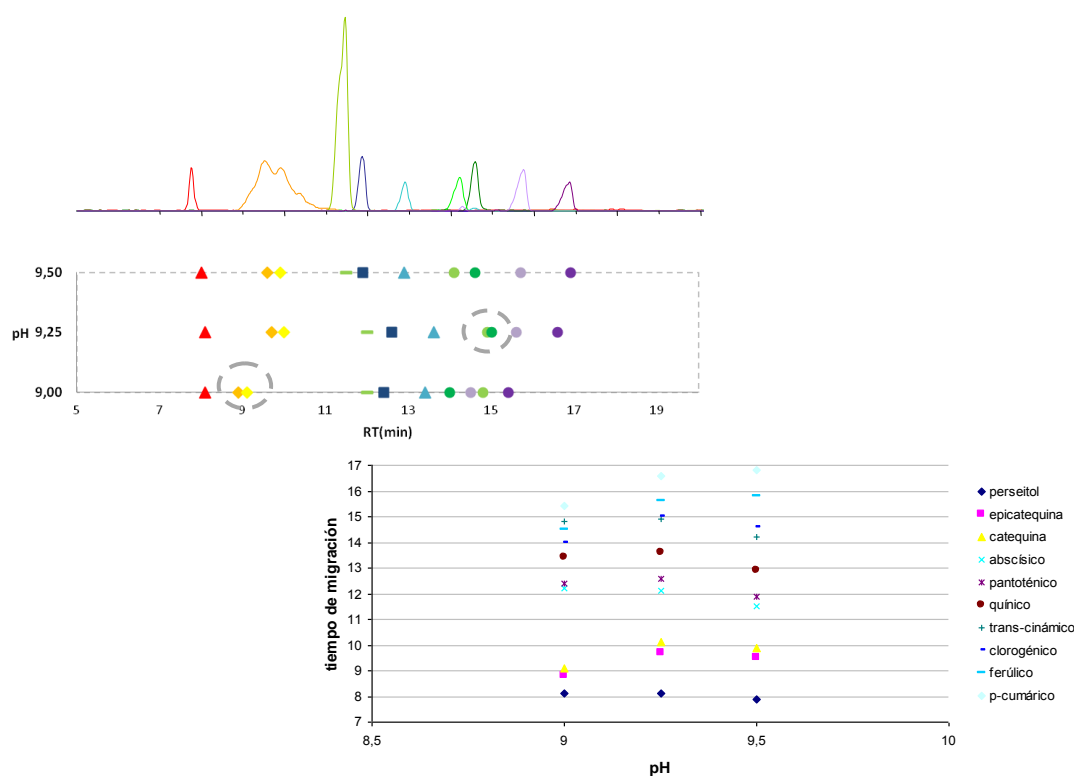


Fig. 108. a) Extracted Ion Electropherograms (EIEs) de los 10 compuestos incluidos en el estudio y evolución de su tiempo de migración en función del pH. b) Tiempo de migración de cada uno de los 10 analitos a determinar frente al valor de pH. Identificación de los picos: 1- Perseitol; 2-Epicatequina; 3-Catequina; 4-Ácido abscísico; 5-Ácido pantoténico; 6-Ácido quínico; 7-Ácido *trans*-cinámico; 8-Ácido clorogénico; 9-Ácido ferúlico; 10-Ácido *p*-cumárico

La fuerza iónica de la disolución reguladora osciló entre 30 y 45 mM, ya que habíamos identificado ese rango como óptimo en los estudios preliminares. 40 mM a pH 9.5 deparaba una buena separación en un tiempo de análisis razonable.

La presencia de modificadores orgánicos fue evaluada, resultando la adición de metanol o 2-propanol (5-10%) innecesaria, ya que se alargaban notablemente los tiempos de migración sin mejorar la separación entre picos.

El tiempo de inyección se varió entre 3-10 segundos. A mayor tiempo de inyección, se alcanzaban mejores límites de detección, pero cuando se inyectaban extractos de aguacate usando tiempos de inyección superiores a 5 segundos, los valores de corriente oscilaban en intervalos más extensos de lo habitualmente es considerado normal, que es $\pm 3-5 \mu\text{A}$.

La composición del sheath-liquid y su flujo también se modificaron, persiguiendo ver cuál era su efecto en relación con la intensidad de las señales detectadas. El sheath-liquid facilita de igual modo el cierre del circuito eléctrico responsable para llevar a cabo la separación, por lo que su composición puede influir también en la estabilidad de la corriente durante el análisis. Los valores óptimos resultaron ser 60:40 (v/v) 2-propanol-agua a 0.24 ml/h. La presencia de trietilamina (que es, a veces, usada para mejorar la sensibilidad cuando se trabaja en polaridad negativa), no aumentó la señal de nuestros analitos.

Optimizadas las condiciones de separación y detección procedimos a analizar la mezcla de estándares y una mezcla de todos los extractos de aguacate que serían estudiados posteriormente, considerando dicha mezcla como muestra representativa de los extractos bajo estudio. El resultado se recoge en la figura 109, que muestra los iones extraídos (EIE) de los 10 analitos bajo estudio en (a) mezcla de estándares y b) mezcla de extractos Reed).

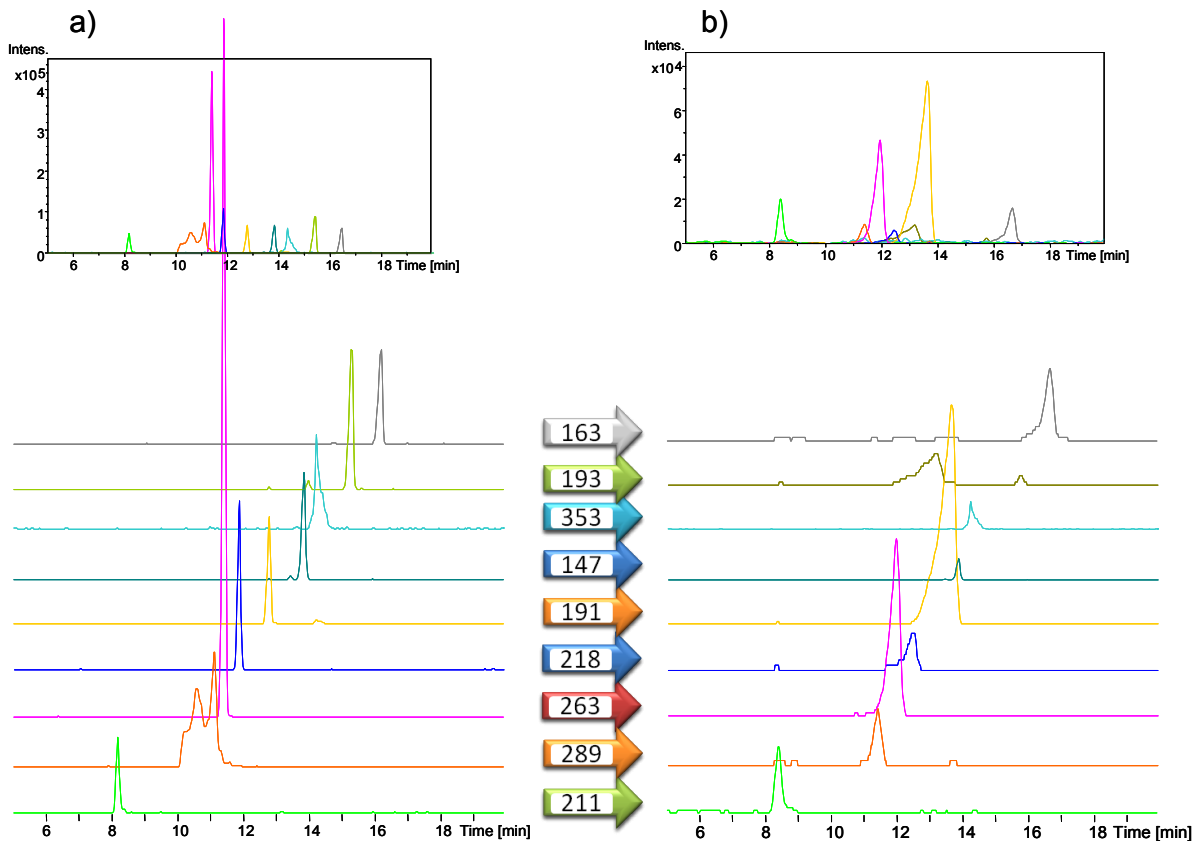


Fig. 109. Electroferograma con iones extraídos de: a) la mezcla de los 10 estándares bajo estudio y b) el extracto representativo de todas las muestras Reed.



La siguiente figura muestra los electroferogramas (BPE) obtenidos empleando las condiciones CE-ESI-IT MS seleccionadas como óptimas. La separación entre los estándares se lograba en unos 17 minutos, estando los picos bien resueltos. Cuando se observa el perfil obtenido para la mezcla de extractos de aguacate, puede verse que además de los compuestos que cuantificaríamos con la ayuda de estándares, había otros compuestos de intensidad apreciable en el perfil.

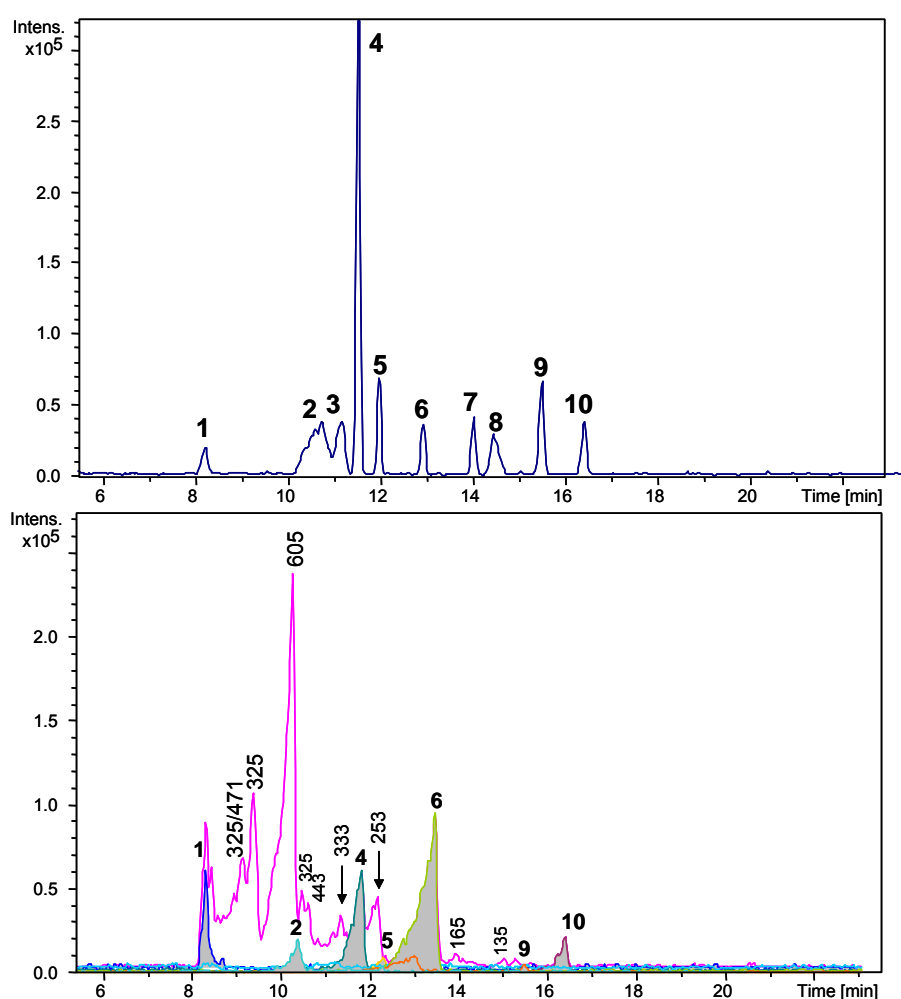


Fig. 110. Electroferogramas (BPE) obtenidos para una mezcla de los 10 estándares bajo estudio (parte superior) y un extracto representativo de todas las muestras Reed a distintos puntos de la campaña. En la parte inferior (extracto mezcla de Reed) se señalan los compuestos identificados con estándares, así como otras señales m/z detectadas. 1. perseitol, 2. epicatequina, 3. catequina, 4. ácido abscísico, 5. ácido pantoténico, 6. ácido quínico, 7. ácido trans-cinámico, 8. ácido clorogénico, 9. ácido ferúlico y 10. ácido p-cumárico.

Esto nos llevó a pensar que podría resultar muy interesante usar dos aproximaciones metodológicas diferentes: *untargeted* y *targeted*. En la primera de ellas, la detección en MS se llevaría a cabo en Full Scan, donde se detectarían todas las señales m/z comprendidas entre 50-800. Para la aproximación *targeted* se optimizaría un método *multiple reaction monitoring* (MRM) que perseguiría la determinación selectiva de 10 compuestos presentes en la matriz bajo estudio (vitaminas, ácidos fenólicos, flavonoides...) creando varios segmentos donde se aplicarían distintas condiciones MS (*Octopole*, voltaje de los *skimmers*, *Trap Drive*, etc.) para asegurar el menor límite de detección para cada compuesto.

Se utilizaron dos aproximaciones metodológicas distintas:	
<u>Untargeted (con FULL SCAN)</u>	<u>Targeted (con Multiple Reaction Monitoring (MRM))</u>
Análisis cualitativo y cuantitativo del mayor número de metabolitos posible de un sistema	Determinación selectiva de uno o pocos compuestos de interés

Fig.111. Características de las aproximaciones *targeted* y un *targeted*.

Las condiciones empleadas en *Full Scan* más relevantes han sido ya descritas, si bien se recogen con mucho más detalle en la siguiente figura:

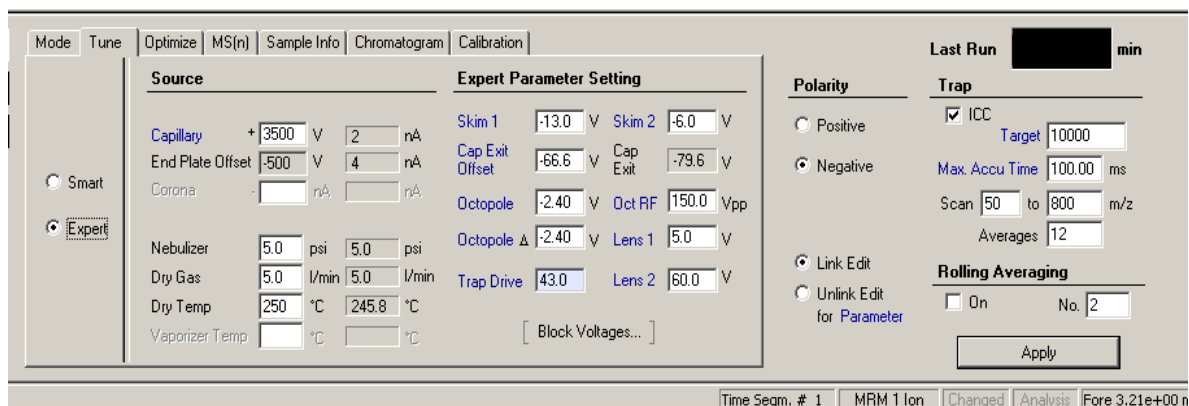


Fig. 112. Parámetros MS utilizados para llevar a cabo la detección en *Full Scan*, incluyendo polaridad, rango de masas estudiado, velocidad de barrido y parámetros propios de la fuente (capillary, gas nebulizador, gas de secado y temperatura) y del analizador (*skimmers*, *optopoles*, *trap drive*, etc.).

Una vez decidido que se llevaría a cabo también la detección empleando un método *MRM* en MS, se procedió a optimizar las condiciones de *skimmers*, *optopoles*, *trap drive*, etc., en cada uno de los segmentos para facilitar la detección de los analitos bajo estudio. De los parámetros del analizador incluidos en la figura anterior, los que más influencia demostraron tener en la intensidad de las señales en cada segmento resultaron ser: *Skim 1*,



Cap ExitOffset, *Cap Exit*, *Octopole* y *trap drive*. A continuación se muestra el electroferograma MRM obtenido para una mezcla de estándares, junto con las condiciones MS de cada segmento.

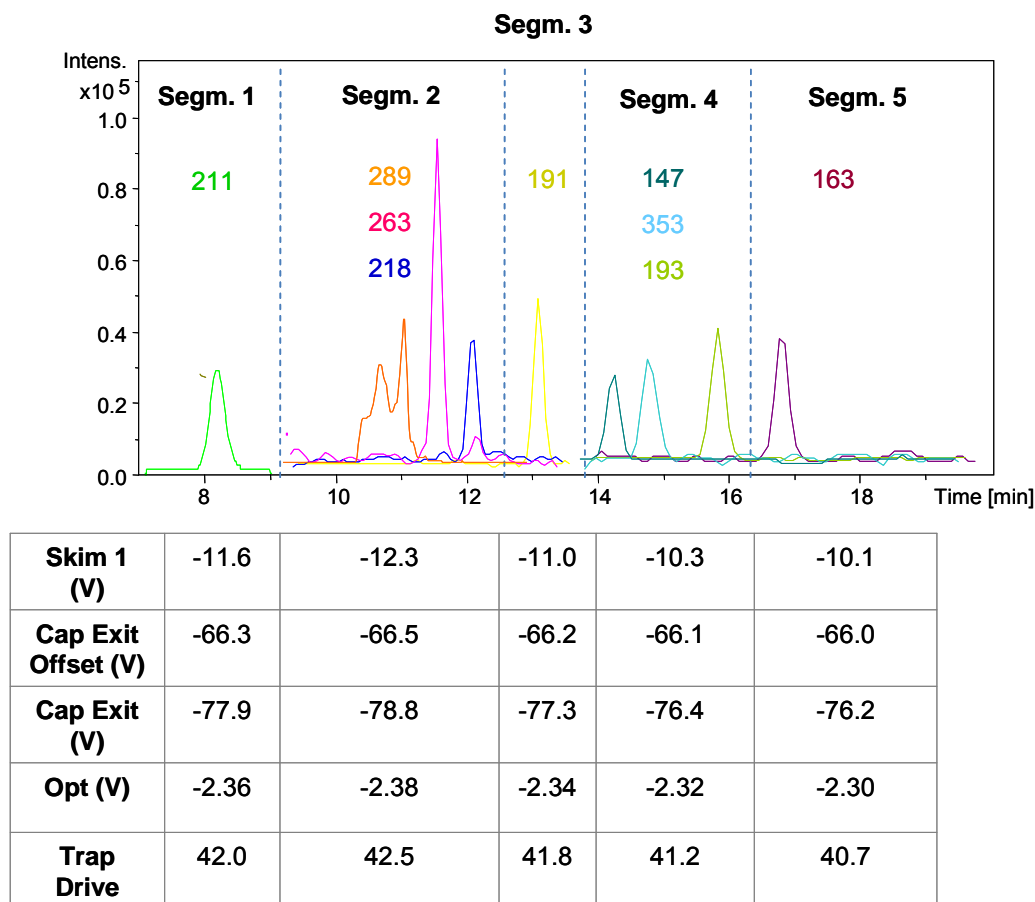


Fig. 113. Electroferograma MRM obtenido para una mezcla de estándares, junto con las condiciones MS de cada segmento y las señales m/z detectadas.

Se aplicaron entonces dichas condiciones MRM para analizar extracto representativo de todas las muestras Reed a distintos puntos de la campaña y ver el potencial de esta aproximación MS. Los resultados fueron muy prometedores, ya que estas condiciones nos permitían determinar selectivamente los 10 compuestos bajo estudio, evitando posible efectos de supresión iónica que podrían conducir a errores en la cuantificación.

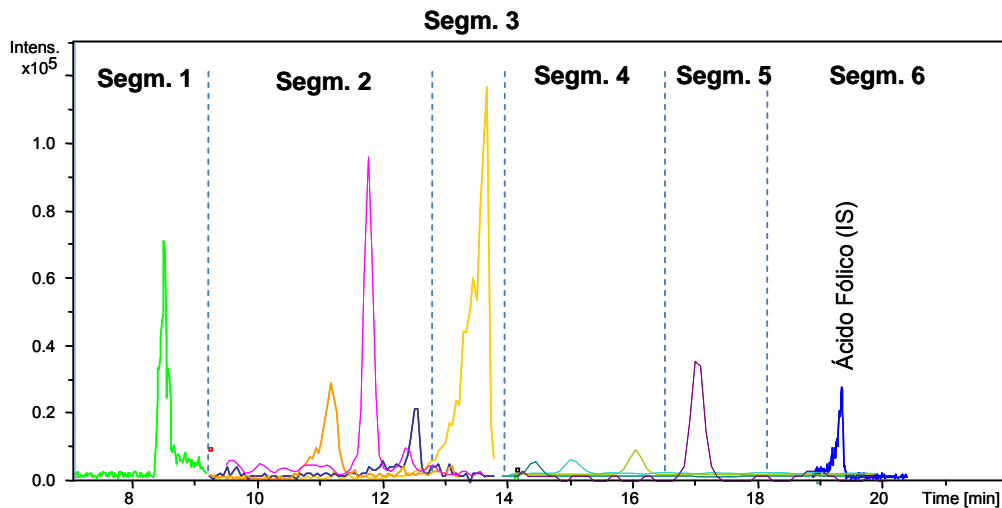


Fig. 114. Electroferograma MRM obtenido para el extracto representativo de todas las muestras Reed a distintos puntos de la campaña. El segmento 6 fue creado para detectar convenientemente el ácido fólico, que había sido añadido como IS. En dicho segmento, se aplicaron las siguientes condiciones: *Skim 1*= -17.4 V; *Cap Exit Offset*= -67.5 V; *Cap Exit*= -84.9 V; *Optopole*= -2.54 V; *Trap Drive*= 46.6.

V.7.4. Determinación de parámetros analíticos (en Full Scan y MRM)

Antes de proceder al análisis de distintas muestras de aguacate de la variedad Reed obtenidas en períodos diferentes dentro de la campaña de producción de dicha variedad, se determinaron los parámetros analíticos de nuestro método empleando *Full Scan* y *MRM*.

La detección se llevó a cabo tanto en polaridad positiva, como negativa, generando los analitos bajo estudio señales con S/N más favorables usando polaridad negativa. Es por ello, por lo que se incluyen en la siguiente tabla los parámetros analíticos (para *Full Scan* y *MRM*) obtenidos en polaridad negativa.



Tabla 47. Parámetros analíticos del método CE-MS empleando Full Scan y MRM.

Compuestos	Fórmula molecular	[M-H]	t _r [min]	Full Scan				MRM			
				Función calibrado	r ²	LD (ppm)	LQ (ppm)	Función calibrado	r ²	LD (ppm)	LQ (ppm)
perseitol	C ₇ H ₁₆ O ₇	211.2	8.2	y = 1531x + 7386	0.9970	5.70	18.99	y = 3310x + 27733	0.9940	0.61	2.03
epicatequina	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	289.0	10.5	y = 9947x - 19443	0.9990	0.88	2.92	y = 17576x + 49179	0.9980	0.11	0.38
catequina	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	289.3	10.6	y = 7853x - 10519	0.9990	1.11	3.70	y = 12858x + 67071	0.9990	0.16	0.52
ácido abscísico	C ₁₅ H ₂₀ O ₄	263.3	11.5	y = 13340x - 15776	0.9990	0.65	2.18	y = 35266x + 3E+06	0.9980	0.06	0.19
ácido pantoténico	C ₉ H ₁₇ NO ₅	218.2	12.2	y = 2963x + 16898	0.9930	2.94	9.81	y = 9799x + 30130	0.9960	0.21	0.68
ácido quínico	C ₇ H ₁₂ O ₆	191.2	13.2	y = 1756x + 27560	0.9870	4.97	16.55	y = 5568x + 24786	0.9960	0.36	1.21
ácido <i>trans</i> -cinámico	C ₉ H ₈ O ₂	147.1	14.4	y = 1592x + 13498	0.9940	5.48	18.26	y = 4000x + 77666	1.0000	0.50	1.68
ácido clorogénico	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	353.3	14.8	y = 6480x - 42425	0.9880	1.35	4.49	y = 6931x + 34978	0.9870	0.29	0.97
ácido ferúlico	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	193.2	16.0	y = 3937x + 15590	0.9960	2.22	7.38	y = 10098x + 38317	0.9950	0.20	0.66
ácido <i>p</i> -cumárico	C ₉ H ₈ O ₃	163.2	17.0	y = 2338x + 14524	0.9950	3.73	12.43	y = 7164x + 21816	0.9980	0.28	0.94

En términos generales, se observó que los límites de detección y cuantificación mejoraban notablemente cuando se aplicaban en MS las condiciones de MRM. Considerando los 10 compuestos cuantificados en este estudio, se puede indicar que los límites de detección eran aproximadamente 10.2 veces más pequeños (en promedio). Los LDs se encontraban en el rango comprendido entre 0.65 ppm (ácido abscísico) y 5.70 ppm (perseitol) en Full Scan y 0.06-0.61 ppm para los mismos compuestos, respectivamente, en MRM.

Los valores de r^2 fueron muy elevados (cerca de la unidad) en ambos casos, hallándose en el rango 0.9870-0.9990 en Full Scan y 0.9870-1.000 en MRM.

V. 7.5. Evolución del perfil metabólico

Tras establecer los parámetros analíticos del método, se procedió a analizar las 17 muestras seleccionadas usando las dos aproximaciones de MS. Nuestro objetivo era múltiple:

- cuantificar los 10 metabolitos bajo estudio y ver su evolución cuantitativa durante el periodo de campaña;

- comparar los resultados obtenidos mediante Full Scan y MRM, viendo si estaban en concordancia; y

- observar (mediante Full Scan) la evolución de otros compuestos, intentando dar una identificación tentativa de los mismos empleando MS/MS y análisis de masa exacta.

Los resultados que se obtuvieron tras analizar las 17 muestras son los que se recogen a continuación:



Tabla 48. Resultados cuantitativos (mg analito/kg de muestra liofilizada) obtenidos para diferentes estadios de maduración de aguacate variedad Reed mediante el uso del método CE-ESI-MS bajo las 2 aproximaciones de MS (MRM y Full Scan). Cada punto corresponde al resultado obtenido de dos réplicas con excepción de Reed 3 de la cuál solo se tuvo una muestra haciendo un total de 17 muestras.

lón	Reed 1	Reed 1B	Reed 2	Reed 3	Reed 4	Reed 5	Reed 6	Reed 7	Reed 8	Modo
211	46.95	46.45	43.19	35.65	34.50	33.95	33.52	32.14	32.41	RMR
	40.91	44.96	34.59	35.65	38.22	39.95	34.00	32.00	29.27	FULL
263	25.83	20.52	23.24	19.96	9.26	9.04	7.24	5.98	5.28	RMR
	17.19	18.70	14.62	12.94	10.50	10.02	7.22	5.08	2.37	FULL
218	9.36	9.06	10.10	8.70	8.60	6.48	4.05	4.07	4.48	RMR
	10.82	7.74	9.76	7.81	5.16	6.20	3.87	3.87	2.51	FULL
191	216.89	123.80	117.37	112.00	93.08	86.54	83.00	80.96	81.47	RMR
	190.64	163.34	112.41	103.24	82.00	85.01	87.08	59.47	63.26	FULL
289	14.12	15.60	14.04	11.62	11.04	8.02	7.36	5.46	3.91	RMR
	18.84	16.56	14.62	12.94	10.05	9.04	7.22	5.08	3.00	FULL
289	1.64	1.66	1.86	nd	1.51	nd	1.23	1.09	1.43	RMR
	1.72	1.51	nd	1.45	1.72	nd	1.25	nd	1.39	FULL
147	9.75	9.80	9.00	8.80	7.72	6.84	6.49	1.34	1.91	RMR
	10.65	9.10	6.16	7.70	nd	1.40	0.97	0.52	0.47	FULL
353	2.23	2.62	2.18	1.50	1.48	1.47	1.20	1.08	1.13	RMR
	2.60	1.92	1.79	1.64	1.62	1.43	1.18	1.07	0.60	FULL
193	1.50	1.66	1.60	1.51	0.81	0.84	1.58	2.18	2.70	RMR
	1.78	1.65	1.51	0.82	0.86	0.96	1.00	1.25	1.31	FULL
163	7.50	8.94	10.00	11.08	12.74	12.47	12.99	13.28	14.98	RMR
	7.80	7.69	8.03	9.58	11.80	12.60	14.60	15.79	15.93	FULL

Como se puede observar se ha logrado cuantificar los diez analitos propuestos bajo los dos modos encontrando concordancia entre el resultado mediante Full Scan y MRM.

Como se indicó antes, durante la maduración se siguen sucediendo diferentes procesos metabólicos los cuales requieren de energía, la cual, por lo general, es suministrada por la oxidación de carbohidratos y ácidos orgánicos del fruto que se convierten en CO₂ y agua³⁶⁰. Este hecho explicaría que en el caso específico del aguacate se observe en primera

³⁶⁰ Primo Yufera E. (1979). Química agrícola: alimentos. Madrid. Alhambra v 3, 682p.

instancia una disminución de la presencia de perseitol m/z 211 conforme el fruto de aguacate va madurando y ablandándose³⁶¹.

Así, se puede observar que dicho compuesto decrece en concentración de 46.95 a 32.41ppm como se puede ver en la siguiente figura.

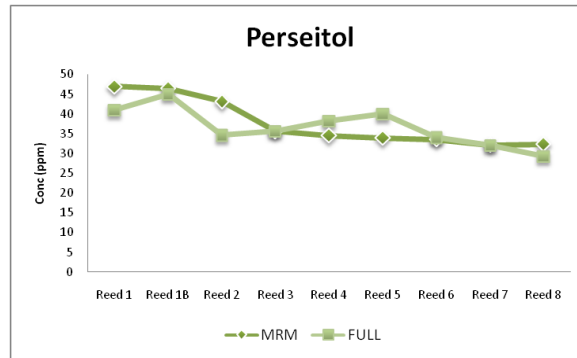
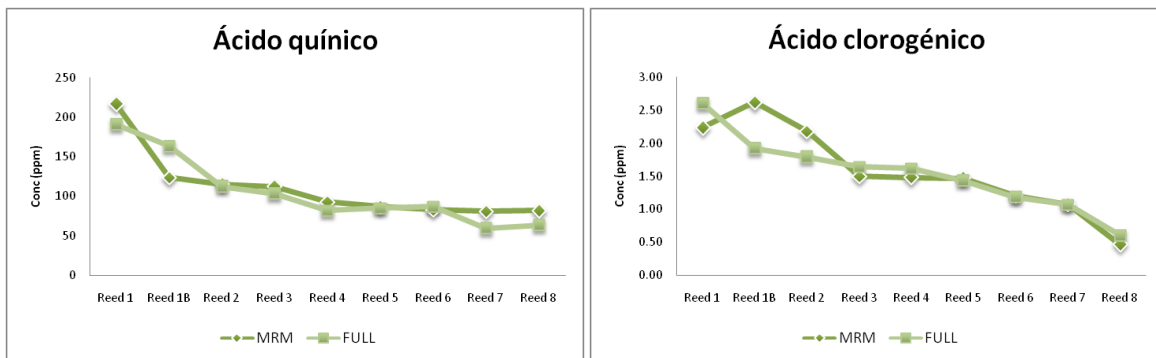


Fig 115. Comportamiento de la concentración del perseitol durante la maduración de aguacate variedad Reed bajo las dos aproximaciones analíticas (targeted, untargeted).

También se observa una disminución del ácido quínico, clorogénico y transcinámico que, como se indico antes, serían participarían en los procesos oxidativos que permitan generar energía durante la maduración.



³⁶¹ Liu, X., P. W. Robinson, et al. (1999). "'Hass' avocado carbohydrate fluctuations. II. Fruit growth and ripening." Journal of the American Society for Horticultural Science 124(6): 676-681.



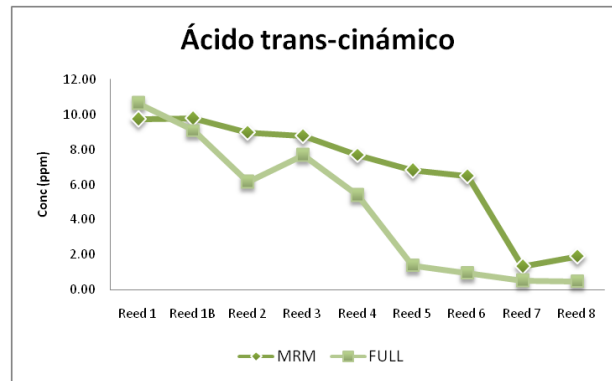


Fig 116. Comportamiento de la concentración de los ácidos quínico, transcinámico y clorogénico durante la maduración de aguacate variedad Reed bajo las dos aproximaciones analíticas (targeted, untargeted).

Llama mucho la atención la cantidad tan elevada de ácido quínico encontrado. Sorprendidos por este hecho, analizamos también las muestras por HPLC-ESI-IT MS y HPLC-ESI-TOF MS, por lo que se ha realizado un estudio sobre el mismo y se ha encontrado que existe por lo menos tres isómeros del mismo, que podrían estar presente en la matriz de estudio. Es por ello que la concentración de ácido quínico que encontramos es muy elevada.

Contrariamente se observa un aumento del ácido ferúlico dicho compuesto podría ser precursores de otros compuestos por lo aparece a una concentración más elevada en el ultimo estado de maduración. El ácido p cumárico tabeen aumenta conforme el fruto madura. Ambos compuestos podrían estar relacionados con reacciones de pardeamiento del fruto.

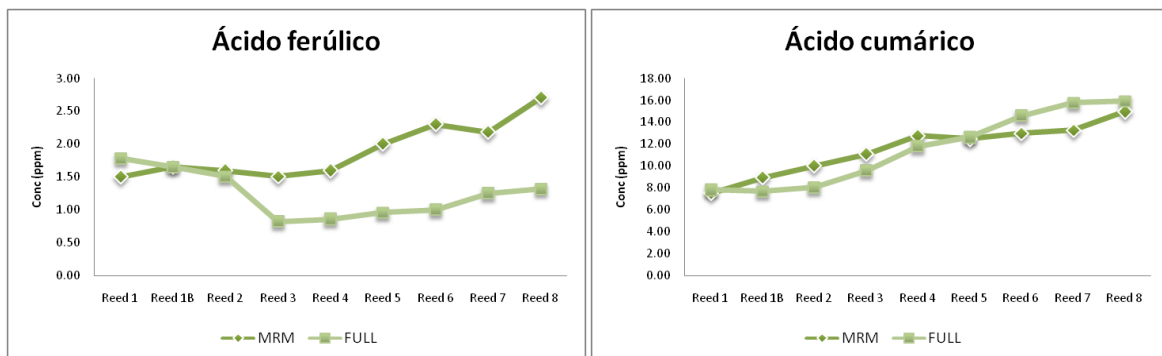


Fig 117. Comportamiento de la concentración de los ácidos ferúlico y p-cumárico durante la maduración de aguacate variedad Reed bajo las dos aproximaciones analíticas (targeted, untargeted).

La disminución de flavonoides durante el proceso de maduración ha sido observada en otros frutos ³⁶². En este caso se observó la disminución de epicatequina y catequina las cuales halla asociadas a la modulación y activación de compuestos antifúngicos preformados y quiescentes ³⁶³.

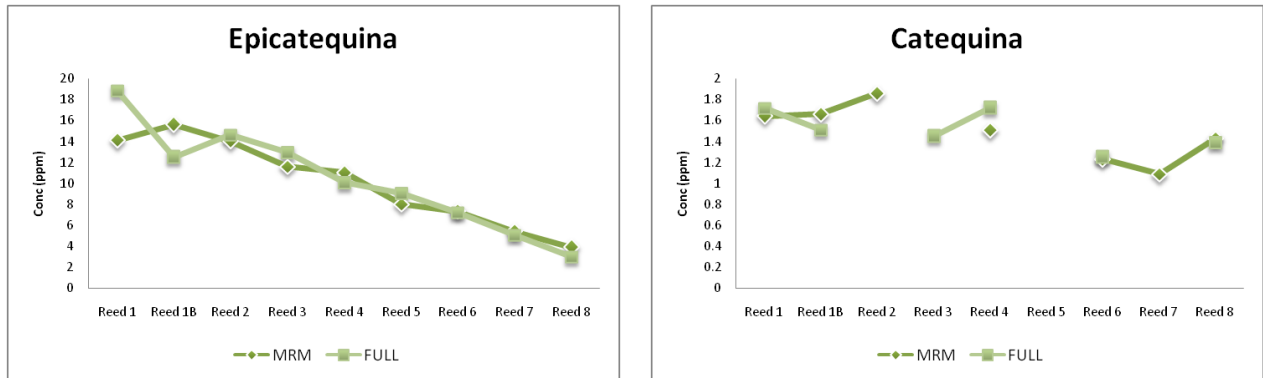


Fig. 118. Comportamiento de la concentración de los ácidos ferúlico y p-cumárico durante la maduración de aguacate variedad Reed bajo las dos aproximaciones analíticas (targeted, untargeted).

ABA o ácido abscísico es una fitohormona que, en este caso, disminuye. Este hecho ha sido también observado por varios autores ^{364,365, 366} y contrario a lo descrito por donde un incremento de este compuesto se observa a la par de la producción de etileno ³⁶⁷.

³⁶² Castrejón, A. D. R., I. Eichholz, et al. (2008). "Phenolic profile and antioxidant activity of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) during fruit maturation and ripening." *Food Chemistry* 109(3): 564-572.

³⁶³ Guetsky, R., I. Kobiler, et al. (2005). "Metabolism of the Flavonoid Epicatechin by Laccase of *Colletotrichum gloeosporioides* and Its Effect on Pathogenicity on Avocado Fruits." *Phytopathology* 95(11): 1341-1348.

³⁶⁴ Kondo, S. and H. Gemma. 1993. Relationship between ABA content and maturation of the sweet cherry. *J. Jpn. Soc. Hort. Sci.* 62:63-68.

³⁶⁵ Kondo, S. and A. Tomiyama. 1998. Changes of free and conjugated ABA in the fruit of 'Satohnishiki' sweet cherry and the ABA metabolism after application of (s)-(+)-ABA. *J. Hort. Sci. Biotechnol.* 73:467-472

³⁶⁶ Serrano, M., M.C. Martínez Madrid, F. Riquelme, and F. Romojaro. 1995. Endogenous levels of polyamines and abscisic acid in pepper fruits during growth and ripening. *Physiol. Plant.* 95:73-76.

³⁶⁷ Adato, I., S. Gazit, et al. (1976). "Relationship Between Changes in Abscisic Acid and Ethylene Production During Ripening of Avocado Fruits." *Functional Plant Biology* 3(4): 555-558.



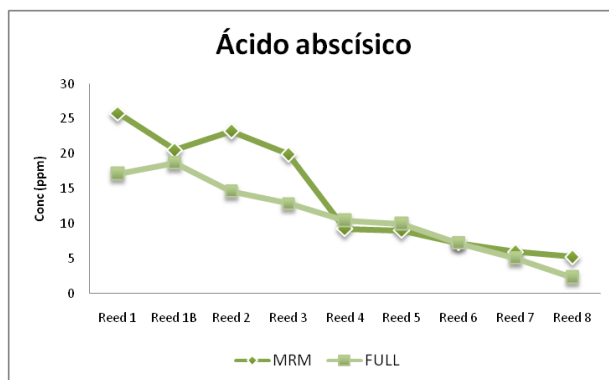


Fig. 119. Comportamiento de la concentración de los ácidos ferúlico y p-cumárico durante la maduración de aguacate variedad Reed bajo las dos aproximaciones analíticas (targeted, untargeted).

Finalmente la vitamina B5 o ácido pantoténico disminuye durante el proceso de maduración oscilando en el rango comprendido entre 9.36 y 4.48ppm en Full y MRM.

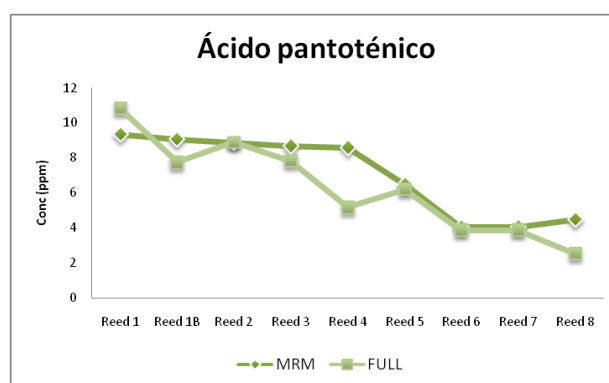


Fig. 120. Comportamiento de la concentración de los ácidos pantoténico durante la maduración de aguacate variedad Reed bajo las dos aproximaciones analíticas (targeted, untargeted).

Como puede verse, si bien los compuestos cuantificados representan una parte importante del BPE, hay otros compuestos en el perfil, que podrían ser también estudiados. Como se habían llevado a cabo análisis usando condiciones de MS de *Full Scan*, procedimos a estudiar dichos datos. Así, se compararon los electroferogramas de las 17 muestras, viendo si había algún compuesto cuya concentración oscilase notablemente durante el periodo de campaña (la maduración).

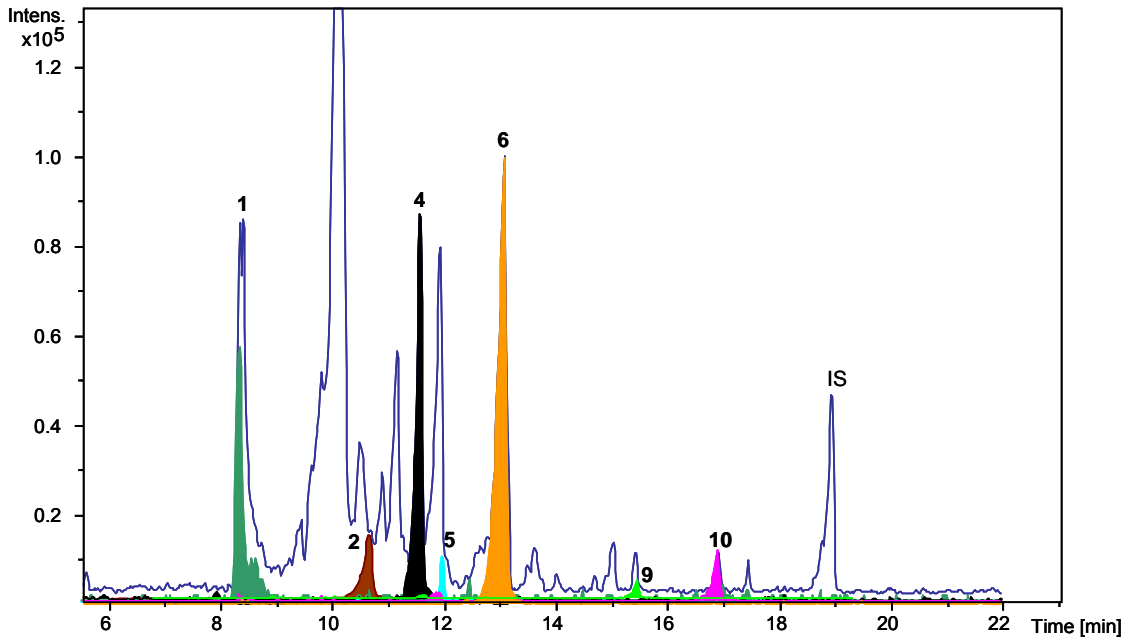


Fig. 121. BPE de la muestra 1 (Reed 1-I) señalando los iones extraídos de los compuestos cuantificados respecto a estándares.

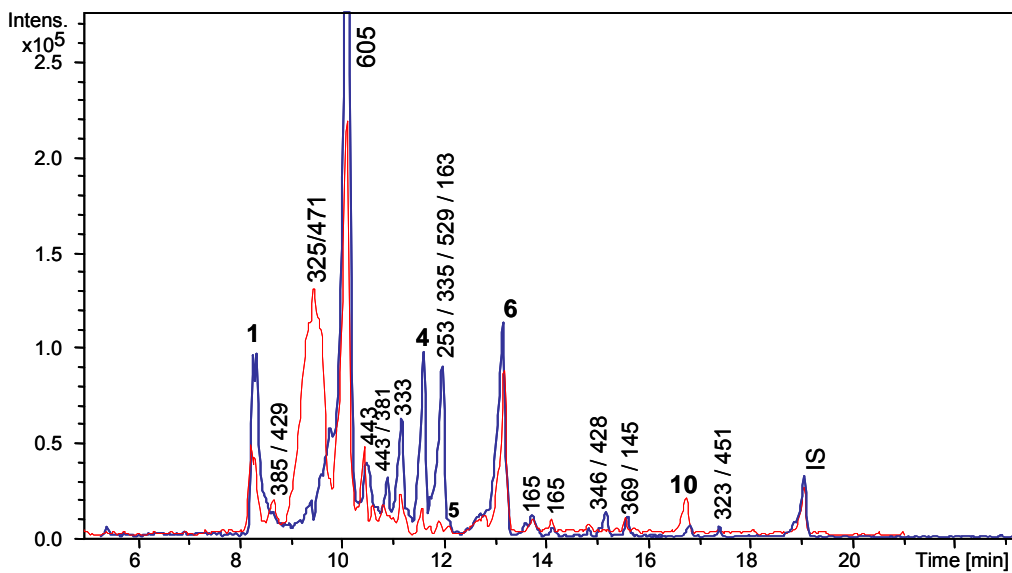


Fig. 122. BPE de la **muestra 1** (Reed 1-I) y de la **muestra 17** (Reed 8-V), donde se señalan los iones extraídos de los compuestos cuantificados respecto a estándares y las señales m/z detectadas para el resto de compuestos.



Sí que resultó haber compuestos “desconocidos” cuya concentración oscilaba considerablemente durante el proceso de maduración. Aprovechando el potencial de la trampa de iones para realizar análisis MSn, se recogieron los espectros MS/MS de los compuestos no identificados por el momento.

Tabla.49. Compuestos detectados en Full Scan.

t migración	-			+
	m/z	Otras señales en MS	MS/MS *	m/z
9.0-10.5	325	134 / 385	145 / 163 / 187 / 265 / 119 / 295	
9.0-10.0	471	457	163 / 187 / 351 / 411	490 / 511 / 449 / 406 / 311
10.0	605	533 / 647 / 687	573 / 415 / 283 / 265 / 543	689 / 625 / 312 / 265
10.5	443	503 / 325	381 / 232 / 267	
11.0	333		153 / 241 / 271	
11.9	253	335 / 529 / 163	163 / 133 / 101 / 149 / 193 / 235 / 172	277 / 293
13.8, 14.1	165	149 / 109		280 / 350 / 249 / 185
15.2	346	428		
15.5	369	145		
17.4	323	451 / 691		

Cuando la intensidad lo permitía, se llevaban a cabo análisis MS/MS. Cuando el pico al que se le quería hacer el análisis MS/MS era demasiado pequeño, se recurría a análisis MRM específicos para ese ión. Si no se incluyen los fragmentos detectados es porque su intensidad era excesivamente baja como para detectar con calidad el espectro MS/MS.

-La señal *m/z* de algunos compuestos no se recoge en polaridad positiva. Tal y como se indicó anteriormente, los compuestos bajo estudio se ionizaban peor de polar. +, siendo el espectro de MS generado de baja calidad en aquellos casos en los que la concentración de los compuestos era baja.

-En polaridad positiva, se veía un pico grandísimo (que representaba alrededor del 75% del BPC completo) con *m/z* 104 y un tiempo de migración de 5.0 min.

Nos llamaron particularmente la atención, los compuestos con m/z 325, 471 y 605, por ser aquellos de intensidad más elevada en los perfiles electroforéticos y porque su concentración relativa variaba considerablemente durante la campaña. Su evolución se puede seguir en la siguiente figura:

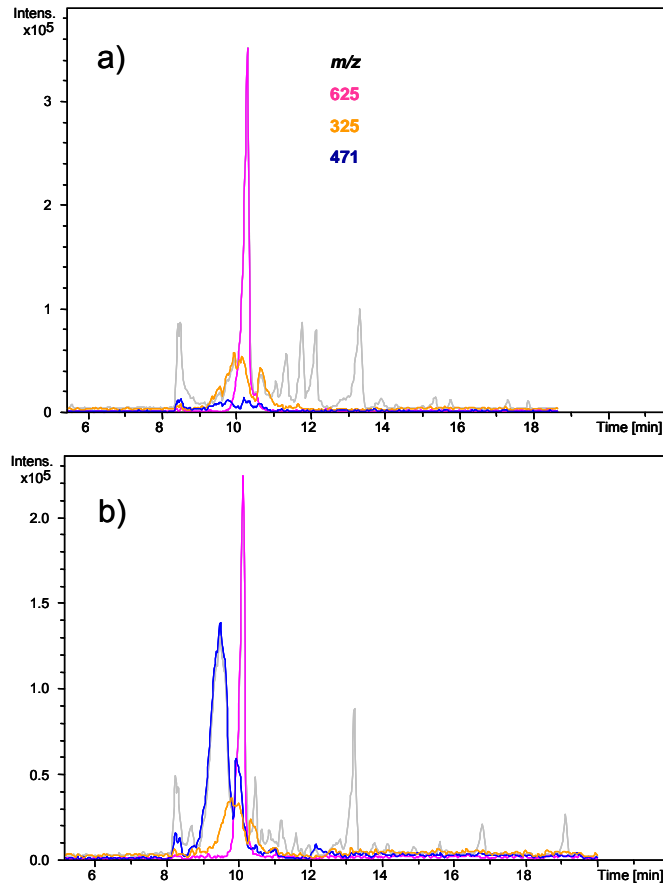


Fig.123. BPE de la muestra 1 (a) y de la muestra 17 (b) en gris, junto con los iones extraídos de las señales m/z 605, 325 y 471.

El compuesto con m/z 605 es uno de los compuestos predominantes en el perfil, tanto en estadios de maduración iniciales, como al final de la campaña. Sin embargo, un compuesto que estaba en una concentración relativamente baja en la muestra 1, aumenta notablemente su concentración durante el proceso de maduración (m/z 471). Tanto ese compuesto, como el que tiene m/z 325, presentan varios isómeros, ya que su ión extraído contiene más de un pico.

Se llevó a cabo un análisis con TOF MS para determinar la masa exacta de estos compuestos y, así, poder conocer su fórmula molecular. Los resultados se incluyen en la tabla 50.



Tabla 50. Información generada por TOF MS acerca de 3 de los compuestos no identificados en el perfil electroforético; incluye m/z experimental y teórico, tolerancia, lista de posibilidades en Smart Molecular Formula, error (ppm) y valor de mSigma.

m/z experimental	Ión seleccionado	Tolerancia (ppm) en Smart Molecular Formula	Lista de posibilidades en SmartMolecular Formula	m/z teórico	Error (ppm)	mSigma Value	Posible/s candidato/s
325.0930	[M-H] ⁻	20	C ₁₅ H ₁₈ O ₈	325.0929	-0.2	2.2	Coumaroyl-hexose / coumaric acid glucoside / Glucosyl-4-hydroxycinnamate
471.1511	[M-H] ⁻	25	C ₂₁ H ₂₈ O ₁₂	471.1508	-1.6	3.4	
605.2438	[M-H] ⁻	15	C ₂₇ H ₄₂ O ₁₅	606.2440	-3.4	11.2	Dehydrophaseic acid dihexose

Conclusiones

-Se ha desarrollado un nuevo método sencillo y rápido que permite la determinación de metabolitos mayoritarios en el aguacate.

-En este trabajo se han utilizado dos aproximaciones analíticas diferentes para caracterizar extractos de aguacate. Una de las aproximaciones perseguía el estudio global de las muestras bajo estudio y, la otra, sin embargo, la determinación selectiva de algunos metabolitos particulares (vitaminas, ácidos fenólicos, flavonoides...).

-Se compararon los parámetros analíticos obtenidos en cada caso (linealidad, límites de detección y cuantificación, etc.), resultando la aproximación targeted mucho más sensible.

-Sin embargo, la aproximación untargeted permitía observar diferencias metabólicas que no habrían sido detectadas de otro modo.

-Este método ha sido aplicado al análisis de diferentes muestras de aguacate variedad Reed que corresponden a diferentes estadios de maduración del mismo con el objetivo de evaluar el perfil metabólico de los mismos durante el proceso de maduración.

-Los resultados cuantitativos que ponen de manifiesto la evolución metabólica de cada compuesto nos indican que compuestos como el perseitol y los ácidos quínico, pantoténico, clorogénico decrecen, así como también lo hace la fitohormona (ácido abscísico) y los flavonoides epicatequina y catequina, siendo los ácidos ferúlico y p-cumárico los únicos que aumentan en concentración.



CONCLUSIONES



CONCLUSIONES

Capítulo 1

Se ha detectado la presencia de COPs en distintos puntos de la Antártida lo cual muestra la validez de la muestra propuesta y la capacidad del método empleado.

Se han detectado también HAPs en las muestras de agua lo cual corrobora un estudio previamente realizado en el grupo.

Según los resultados obtenidos en el estudio de determinación de contaminantes inorgánicos en aguas dulces de la Antártida se pudo evidenciar muy bajas concentraciones de metales en estas aguas, debajo incluso de los límites permitidos por la OMS (cantidades permitidas de metales en aguas potables). Pero se han evidenciado la presencia de Pb, Ag y V los cuales son metales que están presentes en esta zona debido a la contaminación antropogénica.

Capítulo 2

Se ha desarrollado una nueva fase sensora sensible a CO₂ muy útil para el desarrollo de sensores ópticos en ambientes gaseosos y acuosos.

La fase sensora desarrollada presenta sensibilidad y estabilidad en ambos ambientes (acuoso y gaseoso) lo que la hace recomendable para su utilización en el desarrollo de un sensor óptico comercial útil en diferentes áreas (ambiental, alimentaria, salud, etc.), especialmente si se toma en cuenta los resultados satisfactorios que se han obtenido de la misma durante el desarrollo del optosensor.

Capítulo 3

Se han llevado a cabo la implementación de un laboratorio básico de control de calidad de aguas en Bolivia, dotándolo de equipación, material y formación que permitan su funcionamiento.

Capítulo 4

En este capítulo se llevó a cabo la caracterización de metabolitos presentes en las tres variedades de especies del género *Allium* de mayor consumo dentro de la dieta mediterránea, como son la cebolla roja, la cebolla blanca y la cebolleta. Esta caracterización ha sido posible gracias al gran potencial del acoplamiento HPLC-ESI-TOF que ha permitido la



separación y detección de un gran número de compuestos presentes en estas tres variedades.

En las matrices estudiadas se ha encontrado una importante diversidad de familias de compuestos, principalmente aminoácidos, sacáridos, compuestos fenólicos (ácidos y otros), compuestos organoazufrados, flavonoides, cumarinas y saponinas. Así, un promedio de noventa compuestos fueron identificados de manera tentativa en las tres especies. Estos compuestos otorgan a las muestras incluidas en éste capítulo su carácter funcional.

Capítulo 5

En este trabajo se han utilizado dos aproximaciones analíticas diferentes para caracterizar extractos de aguacate. Una de las aproximaciones perseguía el estudio global de las muestras bajo estudio y, la otra, sin embargo, la determinación selectiva de algunos metabolitos particulares (vitaminas, ácidos fenólicos, flavonoides, fitohormonas y carbohidratos).

Se compararon los parámetros analíticos obtenidos en cada caso (linealidad, límites de detección y cuantificación, etc.), resultando la aproximación *targeted* mucho más sensible. Sin embargo, la aproximación *untargeted* ofrecía la ventaja de que permitía observar diferencias metabólicas que no habrían sido detectadas de otro modo.

Los resultados cuantitativos que ponen de manifiesto la evolución metabólica de cada compuesto muestran que los compuestos como el perseitol aumentan de concentración a medida que el aguacate madura lo mismo que los ácidos p-cumárico y ferúlico y que a diferencia de estos disminuyen los ácidos quínico, abscísico, transcinámico al igual que disminuyen los flavonoides epicatequina y catequina.



