

MÉTODO QUECHERS CON CARBÓN ACTIVADO OBTENIDO DE GUADUA PARA ANALIZAR RESIDUOS DE PLAGUICIDAS

CAMPO TECNOLÓGICO

El objeto de la presente invención está relacionado con un método QuEChERS modificado que emplea carbón activado obtenido de *Guadua angustifolia Kunth*, para analizar residuos de plaguicidas en alimentos u otras sustancias. La presente invención tiene aplicación en la industria agrícola, en la industria de análisis biológicos y fisicoquímicos, en especial en el control de contaminantes de alimentos por agroquímicos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Los plaguicidas de uso agrícola se han convertido en una necesidad fundamental para el control de plagas y enfermedades en cultivos, algunas producciones incluso emplean plaguicidas con alto grado de toxicidad y lenta degradación en el medio ambiente como los organoclorados (OC). Los plaguicidas OC se encuentran ampliamente distribuidos en el ambiente terrestre y acuático; sus propiedades fisicoquímicas los hacen resistentes a la degradación biológica, por lo que son altamente persistentes. Debido a su espectro de distribución y difícil biodegradación estos contaminantes representan una seria amenaza para la salud pública y para la mayoría de las formas de vida, siendo compuestos altamente tóxicos que inducen mutagénesis (alteración del ADN o de los cromosomas), teratogénesis (malformaciones en el embrión) y alteraciones sobre una gran variedad de funciones metabólicas y de reproducción. De ahí que sea necesario monitorear los residuos de plaguicidas presentes en alimentos empleando métodos analíticos probados.

La cromatografía de gases es una de las técnicas más usadas en la actualidad para la separación y análisis de compuestos volátiles, permite la separación de compuestos de gran similitud en sus propiedades, con selectividad y rapidez. La cromatografía de gases es la principal técnica instrumental para el análisis de residuo de plaguicidas, se fundamenta en el uso de una fase móvil gaseosa inerte y de alta pureza, que transporta los compuestos por una columna capilar o fase estacionaria que genera la retención por grado de polaridad y por consiguiente la separación de los compuestos. El tipo de columna depende de las condiciones de las muestras; la fase móvil más usada para el análisis de residuos de plaguicidas son N_2 y H_2 , la separación de los analitos se realiza por medio de un detector de alta sensibilidad como lo es el detector de microcaptura de electrones (μ ECD), usado para la detección de plaguicidas organoclorados.

La metodología QuEChERS (acrónimo ingles de Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged y Safe [rápido, fácil, económico, eficaz, sólido y seguro]) es una técnica de preparación de muestras ideal para el análisis multi-residuos de pesticidas en alimentos y productos agrarios que se caracteriza por la minimización de uso de reactivos, menores tiempos de trabajo y menor generación de residuos (acorde con la química verde). La técnica resuelve deficiencias de los métodos tradicionales para la preparación de muestras en la disminución del proceso de extracción, simplificando el método de preparación.

La metodología QuEChERS se divide en dos etapas, la primera de extracción, en la cual se emplea Acetonitrilo o Acetona como solvente, en el método EN-15662 se usa sulfato de magnesio ($MgSO_4$), cloruro de sodio ($NaCl$) para generar el efecto de precipitación salina (*salting-out*) y como reguladores de pH se utiliza citrato de sodio y citrato di-sódico sesquihidratado; el método AOAC.2007.01 usa en la fase de extracción $MgSO_4$ y $NaCl$, además, como regulador de pH usa Acetato de Sodio; en la segunda etapa denominada fase de limpieza (*clean up*) se utiliza PSA (*primary sencondary amine*) como agente retenedor de compuestos polares interferentes en el extracto más $MgSO_4$ para terminar de eliminar las trazas de agua que la muestra

pueda contener, a diferencia en el método AOAC.2007.01 se usa adicionalmente C18 para garantizar una mejor limpieza de la muestra. La metodología QuEChERS elimina eficazmente algunos componentes frecuentes de las matrices como ácidos grasos y azúcares; sin embargo, las muestras que contienen niveles elevados de pigmento requieren tratamiento adicional, normalmente se usa carbón negro grafitizado (GCB) para eliminar estos pigmentos agregándose al tubo en la fase de limpieza (*clean up*) con PSA y MgSO_4 (AOAC.2007.01) y PSA, MgSO_4 , C18 (EN-15662). La limpieza de este tipo de interferentes es crucial para el análisis por cromatografía de gases, debido a que los pigmentos se acumulan a menudo en el puerto de inyección y obstruyen el revestimiento de inyección.

Uno de los materiales más usados para eliminar pigmentos y otras interferencias es el carbón activado, el cual es un material con estructura porosa utilizado como adsorbente para la eliminación de interferencias como pigmentos y esteroides. Se prepara artificialmente a través de un proceso de carbonización de material vegetal, y al realizar su activación incrementa el área superficial debido a la formación de poros internos de dimensiones variable. El carbón activado tiene la capacidad de efectuar quimiadsorciones, es decir pueden realizarse reacciones químicas en la superficie del carbón, realizando cambios en el estado del adsorbato y debido a su gran posibilidad de reutilización permite tratamientos eficaces y de bajo costo.

En documentos de patente se presentan métodos para preparar carbones activados a partir de materiales biológicos tales como el bambú, además de metodologías que emplean el método QuEChERS como método de purificación y de detección de residuos de pesticidas en hierbas, tales como los siguientes:

La solicitud de patente CN1333180 trata un método para preparar carbón activado a partir de materia prima de bambú, que incluye los siguientes pasos: (1) cortar y tamizar desechos del procesamiento de productos de bambú, formando virutas de bambú en trozos, la conformación de las virutas de bambú se selecciona, seca y extruye en un aparato de moldeo por prensado a alta temperatura, el equipo de

moldeo puede usar extrusora de tornillo o extrusora hidráulica; (2) La materia prima de bambú se somete a carbonización a baja temperatura en un horno de carbonización, donde la temperatura es de 200 a 600 °C; (3) en presencia de trazas de oxígeno, el material carbonizado se coloca en un horno de activación y se activa con vapor de agua sobrecalentado a alta temperatura, de 400 a 850 °C; y (4) romper o lavar en agua el carbón activado, secar, clasificar y tamizar para obtener el producto final. Antes de la carbonización, la materia prima de bambú se puede empapar en una solución mixta formada a partir de Cloruro de Zinc y Peróxido de Hidrógeno o una solución mixta formada a partir de Ácido Fosfórico y Peróxido de Hidrógeno. El producto no solo posee las ventajas de todos los carbones activados de madera, sino que también, en las mismas condiciones de proceso, su poder de decoloración del azul de Metileno puede elevarse en un 20% y, al mismo tiempo, los mesoporos se desarrollan con un contenido de impurezas bajo.

A diferencia de la anterior invención, para la obtención del carbón activado modificado producido en la presente invención, y al realizar su activación con hidróxido de sodio y posteriormente una neutralización con HCl hace que se produzca cloruro de sodio y este permanezca remanente en la estructura porosa del carbón activado modificado, este tipo de sal que se encuentra remanente en el carbón es un reactivo que se requiere en el método QuEChERS para promover el fenómeno de “*salting-out*”, lo cual favorece la transferencia del plaguicida presente en la muestra a la fase de Acetonitrilo.

La solicitud de patente de invención CN101643208 divulga un carbón biológico activado compuesto y un método de preparación rápida del mismo, donde las materias primas comprenden cáscara de coco, bambú, cáscara de arroz, serrín, paja de trigo o paja de arroz. En el método, las materias primas se trituran para preparar gránulos, se realiza un calentamiento directo de los gránulos, luego se alimenta una capa fija de gránulos en el fondo de un horno, y se calienta usando materiales de ignición, la alimentación se adopta en la parte superior del horno y la inducción de aire se lleva a cabo en la parte inferior del horno para acelerar la

carbonización de los gránulos; la inducción de aire se detiene después de la carbonización de los gránulos, donde la temperatura en el horno se mantiene entre 430 a 700 °C, luego se enfría mediante pulverización para activar el carbón granular, obteniéndose un producto final después de 20 a 30 minutos. Como ventajas se tienen, la mezcla de una pluralidad de materias primas, la formación natural de más poros, expandiendo así el área de superficie específica del carbono y aumentando en gran medida los microporos efectivos, lo que hace que el rendimiento de la absorción sea mucho mejor que con carbón activado obtenido a partir de un solo material.

Como se deduce de la anterior invención, el carbón activado es obtenido de un compuesto de diversos materiales orgánicos, que aunque contienen bambú también contienen otros precursores, modificando el producto final, lo cual influye fuertemente la estructura del carbón activado.

La solicitud de patente CN106526001 describe un método para detectar pigmentos en condimentos. El método comprende los siguientes pasos: 1) realizar el pretratamiento de una muestra para obtener una solución; y 2) usar un método UPLC-MS / MS para medir la solución de muestra, y comparar el resultado de la determinación con una solución estándar. El método de detección puede realizar análisis cualitativo y cuantitativo a través de un modo de conmutación de iones positivo y negativo, puede detectar simultáneamente los iones positivos y negativos del pigmento y resuelve los problemas técnicos de detección limitados actuales de detección única de pigmentos ilegales. Se utiliza un método de purificación QuEChERS para eliminar la grasa en la muestra, el complejo proceso de pretratamiento en la detección del pigmento puede mejorarse efectivamente, haciendo el método simple y rápido. Comparado con el método de detección de la técnica anterior, el tiempo de análisis es corto y la sensibilidad es alta, la eficiencia de detección aumenta por completo y el período de detección se acorta considerablemente.

La anterior invención proporciona un método para detectar 49 pigmentos ilícitos en condimentos usando el método QuEChERS como un método adicional de purificación para eliminar la grasa en la muestra, no pretende mejorar o modificar el método QuEChERS en el análisis de plaguicidas en alimentos como en la presente invención.

La solicitud de patente CN106370758 proporciona una bolsa de relleno QuEChERS mejorada de medicina herbal china. La bolsa de relleno QuEChERS contiene 1 parte (en peso) de nanomaterial de carbono, 2 a 15 partes (en peso) de material de adsorción funcionalizado con amino, 2 a 15 partes (en peso) de sílice modificada de grupo funcional no polar y, 2 a 15 partes (en peso) de absorbente de agua; en el que los cuatro tipos de cargas en la bolsa de relleno se mezclan uniformemente y se llenan en un tubo centrífugo de 15 ml. La invención proporciona además un método para detectar residuos de pesticidas en hierbas medicinales chinas. La bolsa de relleno QuEChERS y el método, mediante el uso de los materiales de diferentes propiedades físicas y químicas de una manera mixta, logran eliminar las matrices de interferencia en un proceso de detección de residuos de plaguicidas de muestras de siete especies de hierbas medicinales chinas, radix glycyrrhizae, radix paeoniae alba, angélica china, raíces de ruibarbo, atractylodes macrocephala, rizoma chuanxiong y tubérculo pinelia. Comparado con el método de pretratamiento de extracción en fase sólida común, el tiempo de detección se reduce en por lo menos la mitad, y el consumo de la carga es solo 1/4 de la columna de extracción en fase sólida, por lo que el costo de detección y tiempo de las muestras se reducen en gran medida.

La anterior invención se basa en una bolsa de relleno QuEChERS mejorada de medicina herbal china para ser empleada en un método de detección de residuos de pesticidas de hierbas chinas, donde la bolsa de relleno comprende preferiblemente nanotubos de carbón de pared múltiple, sílice ligada a una poliamina (PSA) y unión de grupos funcionales octadecilo; diferente a lo que se pretende con la presente invención, que es el análisis de plaguicidas en alimentos

mediante un método QuEChERS modificado que emplea carbón activado obtenido a partir de un tipo de guadua (*Guadua angustifolia Kunth*).

En el estado de la técnica, aún existe la necesidad de proporcionar un método confiable, económico, sencillo y rápido que mejore aún más los estándares de calidad y seguridad y los estándares de tecnología de detección de residuos de plaguicidas en alimentos, principalmente aquellos con altos contenidos de clorofilas, carotenoides, y otro tipo de pigmentos que a la hora de realizar su análisis por cromatografía gaseosa no tienen una buena eficiencia.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La invención soluciona los problemas técnicos anteriormente descritos, ya que se proporciona un método QuEChERS modificado con carbón activado obtenido a partir de la *Guadua angustifolia Kunth* para analizar residuos de plaguicidas en alimentos, en donde el carbón activado es empleado en la fase de limpieza como sorbente, reemplazando el C18 y la PSA (*amina primaria secundaria*), disminuyendo los costos de análisis, además, de aprovechar las propiedades adquiridas por medio de las etapas de carbonización y activación.

El carbón activado de la invención se obtuvo a partir del culmo de la *Guadua angustifolia Kunth* el cual inicialmente se cortó en forma de tabletillas, de dimensiones 3 x 3 x 0,2 cm aproximadamente, y se sometió a un proceso de pirolisis a condiciones de temperatura controlada (200 °C durante una hora) con una corriente de nitrógeno para garantizar las condiciones adecuadas, luego de esto, el carbón se sometió a molienda hasta un tamaño menor a 180 micras y posteriormente se realizó la impregnación del polvo de carbón vegetal con hidróxido de sodio (NaOH) en una relación agente de activación:carbón de 4:1; la muestra de carbón se sometió luego a un tratamiento térmico de preimpregnación a 60 °C durante una hora y a un tratamiento de impregnación a 150 °C durante cinco horas para finalmente realizar la activación a 700 °C durante una hora; las curvas de

calentamiento se establecieron a una tasa de 0,3 °C/s y en el proceso de enfriamiento a una tasa de 0,1 °C/s. Luego de la activación se lavó el carbón con agua desionizada y se adiciono ácido clorhídrico (HCl) para obtener un remanente de sales de cloruro de sodio (NaCl), se realizó filtración a vacío con un embudo Gooch y papel de filtro de grado 3, y finalmente se secó y almacenaron las muestras. El anterior procedimiento de carbonización y activación, también, se realizó modificando condiciones como el uso de ácido sulfúrico al 15% y cloruro de zinc 3 molar)

El carbón modificado obtenido presentó una densidad porosa diferente, con un alto contenido de metales debido a las impurezas generadas en la carbonización, formando sales de cloruro de sodio remanentes en la estructura porosa después de la neutralización que sigue a la activación, generando en la estructura del carbón un ambiente de pH neutro lo cual favorece el transporte de los plaguicida, evitando de esta manera que en los extractos haya una interacción entre el carbón y los analitos, generando que estos no queden adsorbidos en la parte superficial del carbón y proporcionando una mejora en los porcentajes de recuperación de los plaguicidas.

El método QuEChERS modificado de la presente invención empleando el carbón activado obtenido a partir de la *Guadua angustifolia Kunth* comprende los siguientes pasos:

Fase de extracción:

- a) Pesar 10 g de una matriz previamente triturada y transferirla a un tubo falcón, asegurando que el contenido sea homogéneo y lo más representativo posible;
- b) adicionar 10 y mL de acetonitrilo, como solvente de extracción, y agitar vigorosamente durante un tiempo de 1 minuto;
- c) agregar 6 g de MgSO₄; 1,5 g de acetato de sodio anhidro y 1,5 g de NaCl, para generar una precipitación salina (*salting-out*) en la fase de extracción; y agitar a velocidades entre 2300 y 3300 r.p.m. durante un tiempo de 3 minutos, con el fin de

lograr una buena separación de la matriz y las sales, y de esta manera obtener el extracto;

Fase de limpieza:

d) tomar una alícuota de 2 mL de la fase sobrenadante de la fase y transferirla a un tubo falcón;

e) agregar 300 mg de sulfato de magnesio anhidro y entre 200 y 500 mg de carbón activado modificado (CAM) con sales de sodio obtenido de la *Guadua angustifolia Kunth*;

f) agitar durante 60 segundos a una velocidad de 3000 rpm aproximadamente, asegurando homogeneidad de todos los componentes;

g) centrifugar durante 3 minutos a una velocidad de 3000 rpm aproximadamente; y

h) filtrar la solución evitando el paso de sólidos y depositarla en un vial de cromatografía de 2 mL para su posterior análisis por cromatografía.

El uso de carbón activado modificado (CAM) con sales obtenido a partir de la *Guadua angustifolia Kunth* retiene clorofila y pigmentos en los alimentos mejorando el porcentaje de recuperación al eliminar estas interferencias, con lo cual se obtiene una muestra más limpia para inyectar al equipo de cromatografía de gases, permitiendo una mayor resolución de los picos de los cromatogramas y aumentando la vida útil de los consumibles (*liner* y columna) ya que los extractos obtenidos van a estar libres de interferentes que puedan adherirse al *liner* de vidrio y no dejan ningún tipo de trazas en la columna ayudando a que la eficiencia de esta se mantenga, por lo tanto, se pueden utilizar por un mayor tiempo.

Otra ventaja del carbón activado modificado (CAM) es que se obtiene a partir de una materia prima que se encuentra muchas veces como un desecho en las construcciones; dicho carbón tiene un potencial alto y un costo bajo en comparación con el que suministran las casas comerciales.

El método QuEChERS modificado de la presente invención permite la disminución en el uso de sales en el proceso de preparación y el incremento en el porcentaje de

eliminación de interferencias, lo cual produce mayores límites de detección de residuos de plaguicidas y la prevención de atascamiento del puerto de inyección en el cromatógrafo de gases.

Otra ventaja del presente método QuEChERS modificado es que omite dos pasos con respecto a los métodos estándar, el secado con Nitrógeno y la reconstitución en Heptano para inyectar la muestra al cromatógrafo, ya que en la fase de limpieza (*clean up*) se obtiene la muestra en acetonitrilo y con el uso de carbón activado modificado (CAM) con sales obtenido a partir de la *Guadua angustifolia Kunth* se puede introducir la muestra directamente al cromatógrafo de gases, mejorando los porcentajes de recuperación de los analitos presentes en las muestras. Además, el uso de carbón activado modificado (CAM) con sales de sodio obtenido a partir de la *Guadua angustifolia Kunth* en lugar de carbón negro grafitizado (GCB) de la metodología estándar disminuye el costo del procedimiento.

El método QuEChERS modificado de la presente invención tiene la ventaja de no utilizar los sorbentes de los métodos tradicionales, ya que reemplaza este tipo de sorbentes por el carbón activado obtenido a partir de la *Guadua angustifolia Kunth*.

El método QuEChERS modificado puede ser usado en una gran variedad de frutas, vegetales y otros alimentos. Esto teniendo en cuenta que este método es ampliamente empleado en la industria alimentaria para realizar los análisis de componentes de múltiples muestras de alimentos.

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Absorbancia presentada en matrices de aguacate con diferentes tipos de carbón activado modificado y carbón negro grafitizado (GCB) empleando el método QuEChERS de la invención.

Figura 2. Absorbancia presentada en matrices de tomate con diferentes tipos de carbón activado modificado y carbón negro grafitizado (GCB) empleando el método QuEChERS de la invención.

Figura 3. Cromatograma de matriz de zanahoria, comparando el método QuEChERS de la invención con los métodos de las normas AOAC.2007.01 y EN-15662.

Figura 4. Zoom de cromatograma de matriz de zanahoria, comparando el método QuEChERS de la invención con los métodos de las normas AOAC.2007.01 y EN-15662, donde se observa la reducción de algunos interferentes con el método de la invención y otros interferentes de alturas y áreas similares.

Figura 5. Cromatograma de matriz de aguacate, comparando el método QuEChERS de la invención con los métodos de las normas AOAC.2007.01 y EN-15662.

Figura 6. Zoom de cromatograma de matriz de aguacate, comparando el método QuEChERS de la invención con los métodos de las normas AOAC.2007.01 y EN-15662, donde se observa la reducción de algunos interferentes, en la escala de tiempo de los 2 a los 3 minutos aproximadamente, con el método de la invención y otros interferentes de alturas y áreas similares.

Figura 7. Cromatograma de matriz de tomate, comparando el método QuEChERS de la invención con los métodos de las normas AOAC.2007.01 y EN-15662.

Figura 8. Zoom de cromatograma de matriz de tomate, comparando el método QuEChERS de la invención con los métodos de las normas AOAC.2007.01 y EN-15662, donde se observa la reducción de algunos interferentes con el método de la invención y otros interferentes de alturas y áreas similares.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

El objeto de la presente invención está relacionado con un método QuEChERS modificado que emplea carbón activado obtenido de la *Guadua angustifolia Kunth* para analizar residuos de plaguicidas en alimentos.

El método QuEChERS es un sistema de extracción en fase sólida dispersiva (dSPE) que implica dos etapas fundamentales, una primera etapa de extracción simple seguida de una fase de limpieza del extracto mediante extracción en fase sólida por dispersión.

El método QuEChERS modificado de la presente invención empleando el carbón activado obtenido a partir de la *Guadua angustifolia Kunth* comprende los siguientes pasos:

fase de extracción:

- a) Pesar 10 g de una matriz previamente triturada y transferirla a un tubo falcón, asegurando que el contenido sea homogéneo y lo más representativo posible;
- b) adicionar 10 mL de acetonitrilo, como solvente de extracción, y agitar vigorosamente durante un tiempo de 1 minuto;
- c) agregar 6 g de $MgSO_4$; 1,5 g de acetato de sodio anhidro y 1,5 g de NaCl, para generar una precipitación salina (*salting-out*) en la fase de extracción; y agitar a velocidades entre 2300 y 3300 r.p.m. durante un tiempo de 3 minutos, con el fin de lograr una buena separación de la matriz y las sales, y de esta manera obtener el extracto;

fase de limpieza:

- d) tomar una alícuota de 2 mL de la fase sobrenadante de la fase y transferirla a un tubo falcón;
- e) agregar 300 mg de sulfato de magnesio anhidro y entre 200 y 500 mg de carbón activado modificado (CAM) con sales de sodio obtenido de la *Guadua angustifolia Kunth*;

- f) agitar durante 60 segundos a una velocidad de 3000 rpm aproximadamente, asegurando homogeneidad de todos los componentes;
- g) centrifugar durante 3 minutos a una velocidad de 3000 rpm aproximadamente; y
- h) filtrar la solución evitando el paso de sólidos y depositarla en un vial de cromatografía de 2 mL para su posterior análisis por cromatografía.

Las matrices que pueden llegar a analizarse mediante el método QuEChERS modificado de la presente invención son, pero no limitándose a alimentos como frutas y vegetales, con residuos de plaguicidas. Donde dichas matrices pueden estar contaminadas con plaguicidas organoclorados o sus mezclas.

El equipo de agitación normalmente empleado es un agitador tipo vórtex o un mezclador de vórtice.

En la etapa de limpieza el filtro a utilizar puede ser una membrana de PTFE (Poli-Tetra-Fluoro-Etileno, Teflón) o de polipropileno, con tamaño de poro entre 0,2 y 0,3 μm .

Los cambios que se hicieron en el método QuEChERS modificado de la presente invención se realizaron principalmente en la fase de limpieza, reemplazando los sorbentes usados actualmente en las normas por carbón activo modificado (CAM) más el sulfato de magnesio anhidro para asegurar la eliminación de trazas de agua presentes en el extracto, el carbón activo modificado obtenido a partir de la *Guadua angustifolia Kunth* presenta propiedades que ayudan a la limpieza de los extractos, además, retiene sales de NaCl remanentes lo cual ayuda al transporte de los plaguicidas y hace que estos no se retengan en grandes cantidades, favoreciendo que el método obtenga altos porcentajes de recuperación.

Este nuevo método logra mejorar la limpieza de interferentes tales como esteroides, ácidos grasos, pigmentos, carotenoides, entre otros; comparado con dos tipos de normas diferentes (EN-15662 y la AOAC.2007.01) se evidenció, en los

cromatogramas, que hay algunos interferentes que se disminuyen u otros que presentan la misma altura, lo cual indica que el método QuEChERS modificado de la presente invención tiene la capacidad de generar mejor resolución de los picos y eliminar otro tipo de interferentes, además, mejorando la vida útil de los consumibles y puertos de inyección del equipo donde es analizado este tipo de analito, y de igual manera ser un método de costo bajo ya que el carbón del que se obtiene su materia prima es un desecho industrial (*Guadua angustifolia Kunth*), que puede ser reutilizado para la creación del sorbente.

Así mismo, el método de la invención omite el uso de amina primaria/secundaria, y los pasos de secado de la muestra con flujo de nitrógeno y dilución con un estándar interno para inyectar la muestra al vial de cromatografía, de los métodos tradicionales (AOAC.2007.01 y EN-15662).

Ejemplos:

Ejemplo 1. Método QuEChERS modificado con carbón activado obtenido a partir de la *Guadua angustifolia Kunth* para el análisis de residuos de plaguicidas organoclorados (OC) en matrices de aguacate y tomate

Para la evaluación del método QuEChERS modificado de la invención se evaluaron dos tipos de matrices, una de ellas de tomate (*Solanum lycopersicum*), el cual tiene un alto contenido de agua y un contenido lipídico bajo, donde se evidenció que el carbón activado modificado (CAM) con sales de sodio obtenido a partir de la *Guadua angustifolia Kunth* elimina los pigmentos y carotenoides que este contiene, y la otra matriz fue de aguacate (*Persea americana*) que tiene un contenido muy alto de lípidos, aproximadamente entre un 15 y 20 % dependiendo del tipo de aguacate, pigmentos y carotenoides, entre otros, obteniéndose una mejor limpieza de estos componentes.

Como solvente de extracción, se usó acetonitrilo y ácido acético grado HPLC, sulfato de magnesio (MgSO_4), cloruro de sodio (NaCl), citrato de sodio sesquihidratado, carbón negro grafitizado (GCB), y diferentes tipos de carbón activado modificado (CAM) obtenido a partir de la *Guadua angustifolia Kunth* (CA2 KCl E68; CA KCl-KOH 3:1 E68; CA35 NaCl; CA E61-62 NaCl y ESPONJA E157 GO). El cromatógrafo de gases empleado fue un *Agilent Technologies 6890N* equipado con auto inyector 7693, detector de μECD , puerto de inyección de gases Split/splitless, auto inyector de 7693^a, ultra-Turrax (Ika T18 Basic), además, un pH-metro (Hanna Instruments, HI 2221), una balanza analítica (precisa XB220A), y una centrifuga (Hettich zentrifugen EBA 20). Para el desarrollo de la metodología se empleó el detector de μECD a 300°C, además el puerto de inyección en modo *splitless* a 250°C. Para la separación de cada uno de los analitos se utilizó una columna capilar de sílice fundida, HP-5 de 30 cm x 320 μm (D.I) con fase estacionaria de 5%-fenil metil (polisiloxano) de 0.25 μm (dF). Se empleó un generador de Nitrógeno, con flujo constante (99.9995 %, Praxar. S.A.) a una velocidad lineal de 30 cm/s y flujo de Nitrógeno de 1.4 mL/min. La rampa de calentamiento se ajustó según necesidades.

El método utilizado en la preparación de las muestras con las matrices de tomate y aguacate fue el método QuEChERS de la AOAC 2007.01. Cada una de las matrices vegetales (aguacate y tomate) se doparon con una mezcla de plaguicidas la cual estuvo compuesta por α -BHC, β -BHC, γ -BHC y δ -BHC, heptacloro, aldrín, heptacloro epóxido, α -clordano, γ -clordano, 4,4-DDE, endosulfán I, dieldrin endrín, 4,4-DDD, endosulfán II, 4,4-DDT, endrín aldehído, metoxicloro, endosulfán sulfato, endrín cetona; variando en cada una de las matrices la concentración del plaguicida.

Se utilizaron cinco (5) diferentes tipos de carbón activado modificado (CAM) a partir de la *Guadua angustifolia Khunt* (CA2 KCl E68; CA KCl-KOH 3:1 E68; CA35 NaCl; CA E61-62 NaCl y ESPONJA E157 GO), en los cuales se variaron los contenidos de sales y las condiciones de preparación, por lo tanto, con diferencias en el tamaño

de poro, debido a la diferencia estructural adquirida por el método de activación y variación de las condiciones de temperatura a las que se sometieron.

De cada una de las matrices (tomate y aguacate) se realizaron 10 muestras, se seleccionaron seis (6), de las cuales cinco (5) pertenecen a los carbones modificados y una (1) al carbón comercialmente utilizado en el método. Los cinco (5) tipos de CAM y el carbón negro grafitizado (GCB) comercial fueron los que a continuación se presentan:

MUESTRAS DE AGUACATE	TIPO DE CARBÓN	MUESTRAS DE TOMATE	TIPO DE CARBÓN
A1	CA2 KCl E68	T1	CA2 KCl E68
A2	CA KCl-KOH 3:1 E68	T2	CA KCl-KOH 3:1 E68
A3	CA35 NaCl	T3	CA35 NaCl
A4	CA E61-62 NaCl	T4	CA E61-62 NaCl
A5	ESPONJA E157 GO	T5	ESPONJA E157 GO
A6	GCB (comercial)	T6	GCB (comercial)

Luego de emplear los diferentes tipos de carbón, en iguales condiciones, durante la fase de limpieza (clean-up) del método QuEChERS modificado de la invención, a las soluciones obtenidas se les realizó un análisis espectrofotométrico por la técnica de UV-Vis, obteniendo 2 bandas de absorción (269 y 279 nm) para el aguacate y una banda de absorción para la muestra de tomate en 480 nm, que se presenta en la figura 1 y la figura 2. En dichas figuras se observa el cambio en cada una de las absorbancias dependiendo del tipo de carbón. Luego de obtener los resultados se logró determinar que el carbón modificado de referencia CA E61-62 que contiene sales de cloruro de sodio remanentes retiene más cantidad de pigmentos, este carbón logró obtener para la matriz de aguacate una absorbancia a 269 nm de 0,35184 y a 279 nm de 0,39027, en comparación con el carbón comercial (GCB) que a las mismas longitudes, presentó valores en absorbancia de 0,95512 y 0,98721 respectivamente. En la matriz de tomate se obtuvieron resultados similares entre los carbones analizados, pero con menores absorbancias que las del carbón comercial (GCB), con una absorbancia de 0,11946 a una longitud de 480 nm para

el carbón modificado y una absorbancia de 0,21001 para el carbón comercial (GCB), a la misma longitud; esto quiere decir que la eliminación de pigmentación con el método de la invención es mejor en comparación con los otros (carbón comercial usado en el método EN-15662 y métodos modificados de la AOAC.2007.01).

A continuación, se resumen los resultados obtenidos:

MUESTRA AGUACATE	Abs (269 nm)	Abs (279 nm)	MUESTRA TOMATE	Abs (480nm)
CA2 KCl E68	1,44670	1,39290	CA2 KCl E68	0,59156
CA KCl-KOH 3:1 E68	0,59945	0,58442	CA KCl-KOH 3:1 E68	0,51300
CA35 NaCl	0,71067	0,69473	CA35 NaCl	0,48882
CA E61-62 NaCl	0,35184	0,39027	CA E61-62 NaCl	0,11946
ESPONJA E157 GO	1,50940	1,48890	ESPONJA E157 GO	0,33648
GCB (comercial)	0,95512	0,98721	GCB	0,21001

Ejemplo 2. Preparación de un carbón activado modificado (CAM) a partir de la *Guadua angustifolia* Khunt

El carbón activado modificado tipo CA E61-62 NaCl fue obtenido del precursor *Guadua Angustifolia Kunth*, a una temperatura de activación de 700 °C, donde el agente activante fue hidróxido de sodio y fue neutralizado con ácido clorhídrico, el cual produce cloruro de sodio que queda remanente en la estructura del carbón; su estructura es gráfica o de tipo grafitos, además, su mesoporo está alrededor de 2 a 50 nm, y su área superficial mediante BET fue de 408,0509 m²/g; este tipo de características son adquiridas de acuerdo al precursor y materia orgánica contenida, lo cual hace que adquiera propiedades únicas, que dependen de la humedad de la materia, biotipo, cantidad de compuestos orgánicos, metales, entre otros.

Ejemplo 3. Comparación del método QuEChERS modificado con carbón activado obtenido a partir de la *Guadua angustifolia* Kunth (CA E61-62 NaCl) con los métodos tradicionales de las normas AOAC.2007.01 y EN-15662

Se prepararon tres matrices vegetales (zanahoria, tomate y aguacate) y compararon las extracciones obtenidas luego de aplicar el método QuEChERS modificado de la invención contra los métodos de las normas AOAC.2007.01 y EN-15662 para el

estudio de la eliminación de interferentes (esteroles, pigmentos, carotenoides, clorofila, etc). La zanahoria con un nivel alto de contenido de pigmentación, el tomate con un nivel medio y el aguacate con un nivel de pigmentación bajo.

En los cromatogramas se evidenciaron que algunos de los picos de los interferentes (pigmentos, ácidos grasos, esteroles, entre otros) tienen mayor afinidad con el carbón activado modificado obtenido a partir de la *Guadua angustifolia Kunth* (CA E61-62 NaCl), esto se debe a que la estructura porosa con las sales remanentes crean un ambiente el cual puede reaccionar superficialmente con compuestos de bajo peso molecular y de esta manera retenerse; y para otros interferentes tales como carotenoides, clorofilas, esteroles y aceites, se logra observar una altura de pico equivalente, lo que indica que sobre estos interferentes no hay ninguna diferencia apreciable y se obtienen resultados similares en comparación con las normas tradicionales. En los cromatogramas presentados en las figuras 3 a 8, las líneas de color verde indican los resultados obtenidos con el nuevo método QuEChERS modificado de la invención, las líneas de color rojo indican los resultados obtenidos con el método EN-15662 y las líneas de color azul indican los resultados obtenidos con el método AOAC.2007.01.

Las figuras 3 y 4 representan los cromatogramas obtenidos para la matriz de zanahoria, donde se aprecia que en comparación con los métodos de las normas AOAC.2007.01 y EN-15662, el método QuEChERS modificado de la invención (líneas verdes) presenta reducción de algunos interferentes y otros se logran evidenciar con alturas y áreas similares o mayores a la de los otros métodos. De la misma forma, en las figuras 5 y 6, que representan los resultados de la matriz de aguacate, se aprecia que el método QuEChERS modificado de la invención (líneas verdes) presenta reducción de algunos interferentes y otros se logran evidenciar con alturas y áreas similares o mayores en comparación con los métodos de las normas AOAC.2007.01 y EN-15662. Y un comportamiento similar se presentó en los cromatogramas para la matriz de tomate, figuras 7 y 8, donde también el método QuEChERS modificado de la invención (líneas verdes) presenta reducción de

algunos interferentes y otros se logran evidenciar con alturas y áreas similares o mayores en comparación con los métodos de las normas AOAC.2007.01 y EN-15662.

Se logró la elaboración de un nuevo método QuEChERS, el cual usa carbón activado modificado obtenido del precursor *Guadua angustifolia Khunt*, para la fase de limpieza (*clean-up*) obteniendo resultados positivos para la eliminación de algunos interferentes que pueden deteriorar los puertos de inyección y las columnas usadas para el análisis de residuo de plaguicidas.

Comparado con el carbón negro grafitizado (GCB) comercial se evidenció que, a las mismas condiciones y tratamientos de muestras de alimentos con residuos de plaguicidas, se logró eliminar más pigmentación con el carbón activado modificado con sales de cloruro remanentes obtenido a partir de la *Guadua angustifolia Kunth* de la invención.

Las descripciones anteriores, de elementos y realizaciones específicas de la presente invención se han presentado con fines de ilustración y descripción. Estas no pretenden ser exhaustivas o limitar la invención a las formas precisas descritas en los ejemplos. Las modificaciones y variaciones son posibles a la luz de las enseñanzas anteriores. Las realizaciones se eligieron y describieron con el fin de explicar mejor los principios de la invención y su aplicación práctica, para permitir a otros expertos en la técnica utilizar mejor la invención y hacer modificaciones que sean adecuadas para un uso particular.