

Doctora

EDNA MARCELA RAMIREZ OROZCO

Directora de Nuevas Creaciones Superintendencia de Industria y Comercio

Bogotá D.C - Colombia

Asunto:	Respuesta a examen de fondo oficio N° 3765
Solicitante:	Universidad del Quindío
Título de la invención:	Método Quechers con carbón activado obtenido de guadua para analizar residuos de plaguicidas
Expediente número:	NC2018/0009424

Cordial saludo

De forma atenta y respetuosa, a continuación se presentan los argumentos técnicos frente a los requerimientos realizados por el Examinador en oficio No. 3765 del 01 de abril de 2020 respecto a los requisitos de patentabilidad de la tecnología, así como del capítulo reivindicatorio.

1. MODIFICACIÓN AL CAPÍTULO REIVINDICATORIO

De conformidad con lo planteado por el Examinador, nos permitimos solicitar la siguiente modificación del capítulo reivindicatorio con la finalidad de ajustar su alcance a las condiciones necesarias para ejecutar cada etapa del método, sin ampliar en ningún momento la materia objeto de solicitud.

En este sentido, en la reivindicación 1 se precisan las características, cantidades, tiempos y porcentajes del método por cada etapa, tal y como a continuación se señala:

Reivindicación 1. Un método QuEChERS modificado, el cual emplea carbón activado pirolítico en polvo, con dominios grafiticos y sales remanentes de sodio, obtenido a partir de la *Guadua angustifolia* Kunth, para analizar residuos de plaguicidas en alimentos y productos agrícolas, **caracterizado porque** comprende:

a) Pesar 10 ± 0,1 g de la muestra vegetal a analizar, previamente triturada durante 2 minutos, en un tubo falcón de 50 mL;

b) adicionar 10 mL de acetonitrilo de 99,9 % de pureza, acidificado con ácido acético de 99,9 % de pureza, al 1 %, dejar en contacto la mezcla durante 10 a 30 segundos, agitar en vórtex entre 2500 y 3000 rpm, durante 1 minuto, a temperatura ambiente;

c) agregar 4,0 g de MgSO_4 grado analítico, 1,0 g de acetato de sodio anhidro al 99 % de pureza y 1,0 g de NaCl al 99 % de pureza, y agitar en vórtex entre 2300 y 3000 rpm, durante 1 minuto, a temperatura ambiente;

d) centrifugar entre 3000 y 4000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente;

e) tomar una alícuota de 1 mL de la fase sobrenadante y transferirla a un tubo cónico de 1,5 mL, a temperatura ambiente;

f) agregar 150 mg de MgSO_4 anhidro y entre 10-30 mg de carbón activado pirolítico en polvo, con dominios grafiticos y modificado con sales remanentes de sodio (CAM), obtenido de la *Guadua angustifolia* Kunth y agitar en vórtex entre 2500 y 3000 rpm durante 1 min, a temperatura ambiente;

g) centrifugar entre 3000 y 4000 rpm durante 3 minutos y filtrar la solución, a temperatura ambiente;

h) transferir el filtrado a un vial de cromatografía para análisis.

De conformidad con las modificaciones realizadas a la reivindicación 1, se ajustan las siguientes reivindicaciones dependientes:

Reivindicación 4. El método QuEChERS modificado de la reivindicación 1 **caracterizado porque** el carbón activado pirolítico con dominios grafiticos y modificado con sales de sodio (CAM), obtenido a partir de la *Guadua angustifolia* Kunth, presenta un tamaño de poro entre 2 y 50 nm y una área superficial de 408 m^2/g y fue activado químicamente con NaOH en una proporción 4:1 activante: carbón y lavado con ácido clorhídrico hasta lograr pH neutro.

Reivindicación 5. El método QuEChERS modificado de la reivindicación 1 **caracterizado porque** en la etapa f) se omite el uso de amina primaria/secundaria.

Reivindicación 6. El método QuEChERS modificado de la reivindicación 1 **caracterizado porque** en la etapa g) de filtrado se utiliza una membrana de politetrafluoroetano (PTFE) con diámetro de poro entre 0,2 y 0,3 μm .

Reivindicación 7. El método QuEChERS modificado de la reivindicación 1 **caracterizado porque** en la etapa h) se omite el paso de secado de la muestra con flujo de nitrógeno, previo a la inyección en el equipo de cromatografía.

Teniendo en cuenta las anteriores modificaciones del capítulo reivindicatorio, se realizó el correspondiente ajuste al capítulo descriptivo (anexo 2).

2. ESTADO DE LA TÉCNICA – NOVEDAD

Frente al requisito de novedad, el Examinador manifiesta como estado de la técnica más cercano los documentos “D1: un método QuEChERS modificado que emplea carbón activado para analizar residuos de plaguicidas en vegetales, granos y frutas” y “D2: un método de adsorción de colorantes de muestras acuosas empleando carbón activado obtenido a partir de activación química de bambú”:

Estado de la técnica			
Item	Documento	Título	Fecha de Publicación
D1	Singh S., Srivastava A., et al. <i>Analytical and Bioanalytical Chemistry</i> .	"Inexpensive, effective novel activated carbon fibers for sample cleanup: application to multipesticide residue analysis in food commodities using a QuEChERS method"	12 de febrero de 2018
D2	Ahmad A., Hameed B. <i>Journal of Hazardous Materials</i> .	"Effect of preparation conditions of activated carbon from bamboo waste for real textile wastewater"	Enero de 2010

No obstante, a través de los siguientes paralelos se evidenciarán las características técnicas que diferencian la invención del estado de la técnica anterior, a saber:

2.1.Diferencias técnicas frente al método descrito en el documento D1

D1	Solicitud de Patente NC2018/0009424
El documento D1 divulga un método QuEChERS modificado que emplea Fibras de carbón activado obtenidas de resinas fenólicas.	Esta solicitud de patente se diferencia del documento D1, debido a que presenta un método QuEChERS modificado, el cual emplea polvo de carbón activado pirolítico, con dominios grafíticos y sales remanentes de sodio (CAM), obtenido a partir de la <i>Guadua angustifolia</i> Kunth, diferente a lo conocido, pues se trata de polvo de carbón activado y sin considerar fibras de carbón activado de resinas fenólicas.
Comprende, agregar 4 g de MgSO ₄ , y 1 g NaCl (Proporción 4:1) y agitar	Esta solicitud de patente se diferencia del documento D1, debido a que está Caracterizado porque comprende, agregar 4,0 g de MgSO ₄ grado analítico, 1,0 g de acetato de sodio anhidro al 99 % de pureza y 1,0 g de NaCl al 99 % de pureza, y agitar. Lo cual es diferente a lo conocido, pues considera la adición de 1,0 g de acetato de sodio anhidro al 99 % de pureza.
Comprende, agregar 150 mg de sulfato de magnesio y Fibras de carbón activado obtenidas de resinas fenólicas	Esta solicitud de patente se diferencia del documento D1, debido a que está Caracterizado porque comprende, agregar 150 mg de MgSO ₄ y entre 10 y 30 mg de polvo de carbón activado pirolítico, con dominios grafíticos y modificado con sales remanentes de sodio (CAM), obtenido de la <i>Guadua angustifolia</i> Kunth, con tamaño de grano inferior a 180 µm, el cual propicia la eliminación de los interferentes (pigmentos, grasas, entre otros). Lo cual es diferente a lo conocido, pues se emplea polvo de carbón activado diferente a las fibras de carbón activado del documento D1 y asimismo, el precursor para obtener carbón activado es diferente, pues se emplea <i>Guadua angustifolia</i> Kunth y evita el uso de resinas fenólicas como en el documento D1.

Comprende, centrifugar la solución a 10000 rpm durante 10 min	Esta solicitud de patente se diferencia del documento D1, debido a que está Caracterizado porque comprende, centrifugar la solución entre 3000 y 4000 rpm durante 3 min. Lo cual es diferente a lo conocido, pues se trata de valores de velocidad y tiempo menores, en el proceso de centrifugado.
---	--

2.2. Diferencias técnicas frente al método descrito en el documento D2

D2	Solicitud de Patente NC2018/0009424
El documento D2 divulga un método de adsorción de colorantes de muestras acuosas provenientes de residuos de la industria textil, empleando carbón activado obtenido a partir de la activación química de bambú	Esta solicitud de patente se diferencia del documento D2, debido a que está Caracterizado porque comprende, un método QuEChERS modificado, el cual emplea polvos de carbón activado pirolítico, con dominios grafiticos y sales remanentes de sodio (CAM), obtenido a partir de la <i>Guadua angustifolia</i> Kunth, para analizar residuos de plaguicidas en alimentos y productos agrarios. Lo cual es diferente a lo conocido, pues se trata de un método modificado para analizar residuos de plaguicidas en alimentos y productos agrarios, sin considerar, la adsorción de colorantes de muestras acuosas provenientes de residuos de la industria textil y además, se trata de polvo de carbón activado obtenido de la <i>Guadua angustifolia</i> Kunth del género Bambú, el cual precisa la especie endémica y sin considerar el género.
Consiste en carbón activado a partir de bambú, empleando activación química con H_3PO_4	Esta solicitud de patente se diferencia del documento D2, debido a que está Caracterizado porque comprende, polvo de carbón activado pirolítico, con dominios grafiticos y modificado con sales remanentes de sodio (CAM), obtenido de la <i>Guadua angustifolia</i> Kunth, con tamaño de grano inferior a $180\mu m$, presenta un tamaño de poro entre 2 y 50 nm y un área superficial de $408 m^2/g$, el cual fue activado químicamente con NaOH en una proporción 4:1 (activante: carbón) y lavado con ácido clorhídrico hasta lograr pH neutro, este carbón activado propicia la eliminación de los interferentes (pigmentos, grasas, entre otros). Lo cual es diferente a lo conocido, pues se utiliza NaOH como agente activante químico tipo base y sin considerar H_3PO_4 como activante tipo ácido.
y adicionar el carbón activado a una muestra acuosa que comprende colorantes	Esta solicitud de patente se diferencia del documento D2, debido a que está Caracterizado porque comprende, adicionar el polvo de carbón activado pirolítico, con dominios

	grafíticos y sales remanentes de sodio (CAM), a una muestra que contiene residuos de pesticidas en alimento y productos agrarios. Lo cual es diferente a lo conocido, pues se trata de un método modificado para analizar residuos de plaguicidas en alimentos y productos agrarios y no en muestra acuosa que comprende colorantes.
--	--

3. EXAMEN DE PATENTABILIDAD - NIVEL INVENTIVO

De conformidad con la revisión realizada de los métodos contenidos en los documentos D1 y D2, a continuación se presenta la siguiente Tabla comparativa que permitirá identificar las características y efectos técnicos esenciales de la invención frente a los del estado de la técnica precisados por el Examinador.

Cabe aclarar, que el presente análisis se realiza teniendo en cuenta las precisiones y ajustes realizados en el capítulo reivindicatorio modificado* plasmado en el ítem 1 y el anexo.

Reivindicaciones modificadas*	D1	D2	Característica diferenciadora – efecto técnico
Un método QuEChERS modificado, el cual emplea carbón activado pirolítico en polvo, con dominios grafiticos y sales remanentes de sodio, obtenido a partir de la <i>Guadua angustifolia</i> Kunth, para analizar residuos de plaguicidas en alimentos y productos agrícolas, caracterizado porque comprende:	Un método QuEChERS modificado que emplea carbón activado para analizar residuos de plaguicidas en vegetales, granos y frutas, caracterizado porque comprende (Pág. 2242, Column 2. Pág. 2243, Column. 1 y 2, Experimental, Preparación de la muestra):	Un método de adsorción de colorantes de muestras acuosas empleando carbón activado obtenido a partir de la activación química de bamboo (genero al que pertenece la <i>Guadua angustifolia</i>) que consiste en (Resumen; Pág 488; column 1 y Column 2):	Un método QuEChERS modificado, el cual emplea carbón activado pirolítico en polvo, con dominios grafiticos y sales remanentes de sodio, obtenido a partir de la <i>Guadua angustifolia</i> Kunth, para analizar residuos de plaguicidas en alimentos y productos agrarios. El cual se diferencia del documento D1, debido a que se trata de polvo de carbón activado obtenido de la <i>Guadua angustifolia</i> kunth y sin considerar fibras de carbón activado de resinas fenólicas, lo cual tiene un efecto técnico en el área superficial y el volumen de poros del carbón activado. El cual se diferencia del documento D2, debido a que se trata de un método QuEChERS modificado, el cual emplea polvos de carbón activado pirolítico, con dominios grafiticos y sales remanentes de sodio, obtenido a partir de la <i>Guadua angustifolia</i> Kunth, para analizar residuos de plaguicidas en alimentos y productos agrarios, sin

			considerar un método de adsorción de colorantes de muestras acuosas empleando carbón activado obtenido a partir de la activación química de bambú; lo cual tiene un efecto en la aplicación del carbón activado y en el agente activante empleado, pues en el documento D2 el carbón se activa químicamente con H_3PO_4 y en la patente se emplea como agente activante NaOH y la presencia de sales remanentes, le confieren al carbón activado de la reivindicación 1, la capacidad de eliminar interferentes del análisis por adsorción de grasas y precipitación, de una manera diferente a lo conocido.
Pesar $10 \pm 0,1$ g de la muestra vegetal a analizar, previamente triturada durante 2 minutos, en un tubo falcón de 50 mL;	Pesar una matriz previamente triturada	N/A	Un método QuEChERS modificado el cual se diferencia del documento D1 porque en la presente solicitud se precisa el peso de $10 \pm 0,1$ g de una matriz previamente triturada, así como el tiempo que corresponde a 2 minutos, en un tubo falcón de 50 mL, lo cual tiene un efecto técnico en la eficacia y robustez del método, diferente a lo conocido.
adicionar 10 mL de acetonitrilo de 99,9 % de pureza, acidificado con ácido acético de 99,9 % de pureza, al 1 %, dejar en contacto la mezcla durante 10 a 30 segundos, agitar en vórtex entre 2500 y 3000 rpm, durante 1 minuto;	Agregar acetonitrilo y agitar --	N/A	Un método QuEChERS modificado el cual se diferencia del documento D1 porque en la presente solicitud se precisa la cantidad de 10 mL de acetonitrilo, su porcentaje de pureza de 99,9%, acidificación del 1% con ácido acético al 99,9% y el tiempo de agitación de 10 a 30 segundos. Además, se realiza la agitación en vórtex entre 2500 – 3000 rpm durante 1 minuto a temperatura ambiente, lo cual tiene un efecto en la eficacia y robustez del método, diferente a lo conocido.
agregar 4,0 g de $MgSO_4$ grado analítico, 1,0 g de acetato de sodio anhidro al 99 % de pureza y 1,0 g de NaCl al 99 % de pureza, y agitar en	Agregar 4 g de $MgSO_4$, y 1 g NaCl (Proporción 4:1) y agitar	N/A	Un método QuEChERS modificado el cual se diferencia del documento D1 en que se emplea acetato de sodio anhidro 1 g, lo cual tiene un efecto en la regulación del pH de la solución y favorece la extracción de los analitos, diferente a lo conocido.

vórtex entre 2300 y 3000 rpm, durante 1 minuto, a temperatura ambiente;			
tomar una alícuota de 1 mL de la fase sobrenadante y transferirla a un tubo cónico de 1,5 mL;	Se toma 1 mL del extracto	N/A	Un método QuEChERS modificado el cual se diferencia del documento D1 porque se precisa la fase de extracción y el tubo cónico al cual se transfiere de 1,5mL, lo cual tiene un efecto en la facilidad de manipulación de la muestra, diferente a lo conocido.
agregar 150 mg de MgSO ₄ anhidro y entre 10-30 mg de carbón activado pirolítico en polvo, con dominios grafiticos y modificado con sales remanentes de sodio (CAM), obtenido de la Guadua angustifolia Kunth y agitar en vórtex entre 2500 y 3000 rpm durante 1 min;	agregar 150 mg de sulfato de magnesio y carbón activado. La mezcla se agita en un vortex shaker por 10 min	Preparación de carbón activo a partir de bamboo. La activación se realiza mediante activación química (uso de sales y ácidos) y Adicionar el carbón activado a una muestra acuosa que comprende colorantes (Resumen; Pág 488; column 1 y column 2).	Un método QuEChERS modificado el cual se diferencia respecto a los documentos D1 y D2, en que se precisa el tipo de carbón activado, el cual es pirolítico en polvo, con dominios grafiticos y modificado con sales remanentes de sodio (CAM), obtenido de la Guadua angustifolia Kunth, con tamaño de grano inferior a 180µm, tamaño de poro entre 2 y 50 nm y área superficial de 408 m²/g es un material mesoporoso de una fuente renovable con mayor capacidad de absorción que el carbón activado convencional, obtenido con un método diferente al del método D2, lo cual tiene un efecto sobre la capacidad de remoción de los diferentes interferentes, diferente a lo conocido. El método propuesto requiere un tiempo máximo 20 min diferente a los 60 min necesarios que requiere el método del documento D1 (Pág. 2242, Column 2. Pág. 2243, Column. 1 y 2, Experimental, Preparación de la muestra), lo cual tiene un efecto en la eficacia y robustez del método. El método D2 usa 300 mg del carbón activado, pero no aclara el tiempo necesario para la remoción del color del agua residual de la industria textil ni tiene presente las diferentes interferencias que se presentan al realizar el análisis de residuos de plaguicidas en matrices vegetales. Lo anterior se diferencia

			de la solicitud presentada porque el método del documento D2 utiliza 10 veces mayor cantidad de carbón activado, no aclara el tiempo necesario para la remoción de los colorantes y además no presenta su capacidad de retirar otras interferencias presentes en las matrices vegetales, lo cual tiene un efecto en la disminución de residuos peligrosos y en la eficacia del método, diferente a lo conocido.
centrifugar entre 3000 y 4000 rpm durante 3 minutos y filtrar la solución, a temperatura ambiente;	La solución se centrifuga a 10000 rpm durante 10 min y posteriormente filtrado. Hace análisis cromatográfico	N/A	Un método QuEChERS modificado el cual se diferencia respecto al documento D1 en que se utiliza una velocidad de centrifugación entre 3000 y 4000 rpm durante 3 minutos, inferiores a las reportadas en el documento D1, lo cual tiene un efecto en la eficacia y robustez del método. La invención en cuestión presenta un filtrado de la solución empleando una membrana de politetrafluoroetano (PTFE) con diámetro de poro entre 0,2 y 0,3 μm , mientras que el documento D1 emplea un papel filtro Whatman No. 1 de 11 μm , lo cual tiene por efecto evitar el paso de sólidos de menor tamaño y grasas, asegurando la recuperación de los analitos de una manera diferente a lo conocido.
El método QuEChERS modificado de la reivindicación 1 caracterizado porque en la etapa f) se omite el uso de amina primaria/secundaria.	El método no emplea aminas (primaria/secundaria).	N/A	Un método QuEChERS modificado el cual se diferencia respecto al documento D1, en que la obtención del carbón activado que sustituye la amina primaria/secundaria, se da a partir de diferente fuente y con procedimientos de fácil implementación, lo cual tiene un efecto en la disminución de residuos peligrosos producidos en el proceso de obtención del carbón activado. Además, el tiempo requerido es inferior al reportado en el documento D1, lo cual tiene un efecto en la eficacia del método al omitir el uso de la amina

			primaria/secundaria, de una manera diferente a lo conocido.
--	--	--	---

4. CONCLUSIÓN

Respecto a la pregunta planteada en el requerimiento por el Examinador sobre ¿Cómo modificar el método QuEChERS modificado que emplea carbón activado conocido en D1, con el fin de obtener un método alternativo?, a lo largo de la respuesta se han evidenciado las diferencias sustanciales y los efectos que producen el método solicitado, resaltando entre otras, las siguientes:

- La invención omite el uso de la resina fenólica basada en fibras de carbón activado (ACFs), reemplazándolo por un carbón obtenido a partir de un precursor natural renovable.
- El método propuesto se desarrolla en máximo 20 min en comparación de los 60 min necesarios del método D1 (Pág. 2242, Column 2. Pág. 2243, Column. 1 y 2, Experimental, Preparación de la muestra).
- El método D2 usa 300 mg del carbón y no aclara el tiempo necesario para la remoción del color del agua residual de la industria textil, ni tiene presente las diferentes interferencias que se presentan al realizar el análisis de residuos de plaguicidas en matrices vegetales, lo cuál es el principal objetivo del método propuesto.

Finalmente, aunque pareciera lógico pensar que el uso de carbón activado obtenido por cualquier método a partir de *Guadua angustifolia* garantizaría el éxito del proceso QuEChERS, los resultados obtenidos usando diferentes carbones activados indican que cualquier tipo de carbono no asegura la eficacia del método. Por tanto, a pesar que el carbón activado del método D2 permita la remoción de colorantes, esto no garante que puede reemplazar el uso de PSA, de carbón negro grafitizado (GCB) o de CAM que se usa en el método objeto de la reivindicación 1.

5. ANEXOS

Se anexa al presente oficio:

- Nuevo capítulo reivindicatorio que reemplaza al documento anteriormente presentado.
- Capítulo “breve descripción de la invención” ajustado que reemplaza el capítulo anteriormente presentado.
- Capítulo “descripción detallada de la invención” ajustado que reemplaza el capítulo anteriormente presentado.

REIVINDICACIONES MODIFICADAS

1. Un método QuEChERS modificado, el cual emplea carbón activado pirolítico en polvo, con dominios grafiticos y sales remanentes de sodio, obtenido a partir de la *Guadua angustifolia* Kunth, para analizar residuos de plaguicidas en alimentos y productos agrícolas, **caracterizado porque** comprende:
 - a) Pesar $10 \pm 0,1$ g de la muestra vegetal a analizar, previamente triturada durante 2 minutos, en un tubo falcón de 50 mL;
 - b) adicionar 10 mL de acetonitrilo de 99,9 % de pureza, acidificado con ácido acético de 99,9 % de pureza, al 1 %, dejar en contacto la mezcla durante 10 a 30 segundos, agitar en vórtex entre 2500 y 3000 rpm, durante 1 minuto, a temperatura ambiente;
 - c) agregar 4,0 g de MgSO_4 grado analítico, 1,0 g de acetato de sodio anhidro al 99 % de pureza y 1,0 g de NaCl al 99 % de pureza, y agitar en vórtex entre 2300 y 3000 rpm, durante 1 minuto, a temperatura ambiente;
 - d) centrifugar entre 3000 y 4000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente;
 - e) tomar una alícuota de 1 mL de la fase sobrenadante y transferirla a un tubo cónico de 1,5 mL, a temperatura ambiente;
 - f) agregar 150 mg de MgSO_4 anhidro y entre 10-30 mg de carbón activado pirolítico en polvo, con dominios grafiticos y modificado con sales remanentes de sodio (CAM), obtenido de la *Guadua angustifolia* Kunth y agitar en vórtex entre 2500 y 3000 rpm durante 1 min, a temperatura ambiente;
 - g) centrifugar entre 3000 y 4000 rpm durante 3 minutos y filtrar la solución, a temperatura ambiente;
 - h) transferir el filtrado a un vial de cromatografía para análisis.
2. El método QuEChERS modificado de la reivindicación 1 **caracterizado porque** la matriz es seleccionada entre frutas, vegetales y otros alimentos contaminados con plaguicidas.
3. El método QuEChERS modificado de la reivindicación 2 **caracterizado porque** la matriz está contaminada con plaguicidas organoclorados o sus mezclas.
4. El método QuEChERS modificado de la reivindicación 1 **caracterizado porque** el carbón activado pirolítico con dominios grafiticos y modificado con sales de sodio (CAM), obtenido a partir de la *Guadua angustifolia* Kunth, presenta un tamaño de poro entre 2 y 50 nm y una área superficial de 408 m^2/g y fue activado químicamente con NaOH en una proporción 4:1 activante: carbón y lavado con ácido clorhídrico hasta lograr pH neutro.

5. El método QuEChERS modificado de la reivindicación 1 **caracterizado porque** en la etapa f) se omite el uso de amina primaria/secundaria.
6. El método QuEChERS modificado de la reivindicación 1 **caracterizado porque** en la etapa g) de filtrado se utiliza una membrana de politetrafluoroetano (PTFE) con diámetro de poro entre 0,2 y 0,3 μm .
7. El método QuEChERS modificado de la reivindicación 1 **caracterizado porque** en la etapa h) se omite el paso de secado de la muestra con flujo de nitrógeno, previo a la inyección en el equipo de cromatografía.

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 adicionó 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 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 químico que desfavorece una interacción entre el carbón y los analitos (plaguicidas), evitando que estos queden adsorbidos en la parte superficial del carbón, lo cual mejora 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 $10 \pm 0,1$ g de la muestra vegetal a analizar, previamente triturada durante 2 minutos, en un tubo falcón de 50 mL;
- b) adicionar 10 mL de acetonitrilo de 99,9 % de pureza, acidificado con ácido acético de 99,9 % de pureza, al 1 %, dejar en contacto la mezcla durante 10 a 30 segundos, agitar en vórtex entre 2500 y 3000 rpm, durante 1 minuto, a temperatura ambiente;
- c) agregar 4,0 g de $MgSO_4$ grado analítico, 1,0 g de acetato de sodio anhidro al 99 % de pureza y 1,0 g de NaCl al 99 % de pureza, y agitar en vórtex entre 2300 y 3000 rpm, durante 1 minuto, a temperatura ambiente;
- d) centrifugar entre 3000 y 4000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente;

Fase de limpieza:

- e) tomar una alícuota de 1 mL de la fase sobrenadante y transferirla a un tubo cónico de 1,5 mL, a temperatura ambiente;
- f) agregar 150 mg de $MgSO_4$ anhidro y entre 10-30 mg de carbón activado pirolítico

en polvo, con dominios grafiticos y modificado con sales remanentes de sodio (CAM), obtenido de la *Guadua angustifolia* Kunth y agitar en vórtex entre 2500 y 3000 rpm durante 1 min, a temperatura ambiente;

g) centrifugar entre 3000 y 4000 rpm durante 3 minutos y filtrar la solución, a temperatura ambiente;

h) transferir el filtrado a un vial de cromatografía para análisis.

El uso de carbón activado modificado (CAM) con sales obtenido a partir de la *Guadua angustifolia* Kunth retiene grasas, clorofila y pigmentos en los alimentos mejorando el porcentaje de recuperación de los analitos al eliminar estas interferencias, con lo cual se obtiene una muestra más limpia para inyectar al equipo de cromatografía de gases, permitiendo una mejor resolución de los picos de los cromatogramas y aumentando la vida útil de consumibles (*liner* y columna) ya que los extractos obtenidos van a estar libres de artefactos interferentes que puedan adherirse al *liner* de vidrio y a la columna, lo cual favorece que la eficacia del método 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 renovable 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 mejores límites de detección y cuantificación de residuos de plaguicidas, a la vez que previene problemas generados por la matriz en los equipos cromatográficos de análisis.

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

solvente apolar (heptano), previo a la inyección de 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 la cantidad de residuos peligrosos y 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.

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 $10 \pm 0,1$ g de la muestra vegetal a analizar, previamente triturada durante 2 minutos, en un tubo falcón de 50 mL;
- b) adicionar 10 mL de acetonitrilo de 99,9 % de pureza, acidificado con ácido acético de 99,9 % de pureza, al 1 %, dejar en contacto la mezcla durante 10 a 30 segundos, agitar en vórtex entre 2500 y 3000 rpm, durante 1 minuto, a temperatura ambiente;
- c) agregar 4,0 g de $MgSO_4$ grado analítico, 1,0 g de acetato de sodio anhidro al 99 % de pureza y 1,0 g de NaCl al 99 % de pureza, y agitar en vórtex entre 2300 y 3000 rpm, durante 1 minuto, a temperatura ambiente;
- d) centrifugar entre 3000 y 4000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente;

Fase de limpieza:

- e) tomar una alícuota de 1 mL de la fase sobrenadante y transferirla a un tubo cónico de 1,5 mL, a temperatura ambiente;
- f) agregar 150 mg de $MgSO_4$ anhidro y entre 10-30 mg de carbón activado pirolítico en polvo, con dominios grafiticos y modificado con sales remanentes de sodio

- (CAM), obtenido de la *Guadua angustifolia* Kunth y agitar en vórtex entre 2500 y 3000 rpm durante 1 min, a temperatura ambiente;
- g) centrifugar entre 3000 y 4000 rpm durante 3 minutos y filtrar la solución, a temperatura ambiente;
- h) transferir el filtrado a un vial de cromatografía para análisis.

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 y 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, mejora la vida útil de los consumibles y puertos de inyección del equipo analítico, 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 el desarrollo 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.