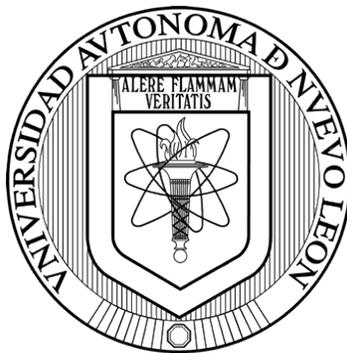


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



DESARROLLO DE UN MÉTODO DE EXTRACCIÓN ASISTIDO POR MICROONDAS
PARA LA DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS ORGANOARSENICALES EN
MUESTRAS DE PIENSO DE LA INDUSTRIA DE ALIMENTOS BALANCEADOS

Por

Q.F.B. Angel Anastacio Saucedo Velez

Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRÍA EN CIENCIAS con orientación en
QUÍMICA ANALÍTICA AMBIENTAL

Mayo, 2016

DESARROLLO DE UN MÉTODO DE EXTRACCIÓN ASISTIDO POR MICROONDAS
PARA LA DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS ORGANOARSENICALES EN
MUESTRAS DE PIENSO DE LA INDUSTRIA DE ALIMENTOS BALANCEADOS

Aprobación de la tesis:

Dr. Jorge Luis Guzmán Mar

Presidente

Secretario

Vocal 1

Vocal 2

Dra. Ma. Araceli Hernández Ramírez

Subdirectora de Estudios de Posgrado

DESARROLLO DE UN MÉTODO DE EXTRACCIÓN ASISTIDO POR MICROONDAS
PARA LA DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS ORGANOARSENICALES EN
MUESTRAS DE PIENSO DE LA INDUSTRIA DE ALIMENTOS BALANCEADOS

Comité Tutorial:

Dr. Jorge Luis Guzmán Mar

Director

Dra. Laura Hinojosa Reyes

Co-Directora

Dra. Perla Elizondo Martínez

Dr. Juan Manuel Alfaro Barbosa

Dra. María Guadalupe Sánchez Anguiano

RESUMEN

Angel Anastacio Saucedo Velez

Fecha de graduación: mayo de 2016.

Universidad Autónoma de Nuevo León - Facultad de Ciencias Químicas.

Título de tesis: DESARROLLO DE UN MÉTODO DE EXTRACCIÓN ASISTIDO POR MICROONDAS PARA LA DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS ORGANOARSENICALES EN MUESTRAS DE PIENSO DE LA INDUSTRIA DE ALIMENTOS BALANCEADOS.

Número de páginas: 103.

Candidato para el Grado de Maestro en Ciencias con Orientación en Química Analítica Ambiental.

Área de estudio: Química Analítica Ambiental.

Propósito y método de estudio:

El propósito del estudio fue desarrollar un método de extracción asistido por microondas para la determinación de roxarsona, nitarsona y ácido p-arsanílico en muestras comerciales de pienso. Las muestras de pienso fueron obtenidas de diferentes forrajeras localizadas en el área metropolitana de Monterrey. El contenido de arsénico total se determinó mediante Espectroscopía de Fluorescencia Atómica con sistema de generación de hidruros (HG-AFS) después de digestión ácida asistida por microondas de las muestras siguiendo el procedimiento EPA 3052 modificado. Se desarrolló un método asistido por microondas para la determinación de los compuestos organoarsenicales en piensos, las condiciones empleadas fueron H_3PO_4 1.5 M, temperatura de 120°C durante 45 min. El análisis de los compuestos organoarsenicales se llevo a cabo mediante HPLC-UV-HG-AFS obteniendo un LOD de 0.2 $\mu\text{g/L}$. En la parte de confirmación de la presencia de p-ASA se desarrolló una metodología para la derivatización con 1,3-propanoditiol y análisis mediante GC-MS. En esta última etapa se propuso la implementación de un nuevo agente extractante: el HCl 0.5M/MeOH 1:1 (v/v) obteniéndose recuperaciones superiores al 97% y un LOD de 24.23 $\mu\text{g/L}$.

Contribuciones y conclusiones:

En los estudios de recuperación de arsénico total en las muestras de pienso se alcanzaron porcentajes de recuperación dentro del rango de 69.0% a 99.2% para la determinación de estos compuestos en diferentes muestras de pienso. La principal especie detectada fue el ácido p-arsanílico en un rango de concentraciones de 5.50 a 57.45 mg p-ASA/kg-pienso para la metodología HPLC-HG-UV-AFS y de 4.85 a 57.17 mg p-ASA/kg-pienso mediante GC-MS, siendo esta última técnica una herramienta para confirmar la presencia inequívoca de p-ASA. Con ello, queda en evidencia el uso de estos compuestos de arsénico como agente de engorda, coexistiendo éste como un factor contaminante de alimentos y mantos acuíferos, lo cual podría representar un riesgo para salud humana.

(Estudiante) Q.F.B. Angel A. Saucedo Velez

(Director) Dr. Jorge L. Guzmán Mar



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN □ FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

A QUIEN CORRESPONDA:

Por medio de la presente, nos responsabilizamos de la autenticidad y originalidad del presente trabajo de investigación que lleva por título “DESARROLLO DE UN MÉTODO DE EXTRACCIÓN ASISTIDO POR MICROONDAS PARA LA DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS ORGANOARSENICALES EN MUESTRAS DE PIENSO DE LA INDUSTRIA DE ALIMENTOS BALANCEADOS” y que fue realizado por el Q.F.B. Angel Anastacio Saucedo Velez. El trabajo de tesis fue desarrollado en el Laboratorio de Fotocatálisis y Electroquímica Ambiental de la Escuela de Graduados en Ciencias, para obtener el grado de Maestro en Ciencias con Orientación en Química Analítica Ambiental en la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección de los Drs. Laura Hinojosa Reyes y Jorge Luis Guzmán Mar.

Durante la realización del trabajo el alumno recibió una beca académica de CONACyT (305525) y un apoyo económico para la culminación de sus estudios del proyecto Programa de Apoyo a la Investigación Científica y Tecnológica (PAICYT-UANL 2015). El trabajo de investigación fue financiado por los proyectos de Ciencia Básica CONACyT con número de registro 167372 y 177990 concedidos a los Dres. Laura Hinojosa Reyes y Jorge Luis Guzmán Mar, respectivamente.

Atentamente

Alere Flammam Veritatis

Monterrey, Nuevo León. Marzo de 2016.

Dr. Jorge Luis Guzmán Mar

Director de tesis

Dra. Laura Hinojosa Reyes

Co-Directora de tesis

AGRADECIMIENTOS

Primeramente, me gustaría agradecerle a ti Dios por bendecirme para llegar hasta donde he llegado, porque hiciste realidad este sueño.

A mi director de tesis Dr. Jorge Luis Guzmán Mar por su apoyo incondicional y la confianza que me ha depositado, sus conocimientos, su experiencia, su paciencia y su motivación para terminar esta tesis con éxito.

A mi co-directora de tesis, la Dra. Laura Hinojosa Reyes por todo su apoyo durante la maestría, su paciencia y sobre todo por la confianza.

A mi comité tutorial: Dra. Perla Elizondo, Dra. Guadalupe Sánchez y Dr. Juan Manuel Alfaro por sus comentarios e ideas tan constructivas sobre el presente trabajo de investigación.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para la realización de mis estudios de maestría (305525).

A la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, por todas las facilidades para la realización del proyecto de investigación.

Al Laboratorio de Fotocatálisis y Electroquímica Ambiental de la FCQ donde fue desarrollado el presente proyecto de investigación por todas las facilidades otorgadas.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico otorgado a través de los proyectos de Ciencia Básica (números de registro 177990 y 167372).

A la Facultad de Química de la Universidad de Oviedo, sobre todo a mis asesores en la estancia Dr. Juan Manuel Marchante Gayón y Dr. José Ignacio García Alonso, por todo su apoyo y ser una guía durante mi estancia en Oviedo.

Son muchas las personas que han formado parte de mi vida profesional a las que me encantaría agradecer su amistad, consejos, apoyo, ánimo y compañía en los momentos más difíciles de mi vida. Sin importar en donde estén quiero darles las gracias por formar parte de mí, por todo lo que me han brindado y por todas sus bendiciones.

Muchas gracias y que Dios los bendiga.

DEDICATORIA

Principalmente a mis queridos padres Eustacio Saucedo Chavez y Otilia Velez Mendoza por su amor, apoyo, sus enseñanzas y por haber confiado siempre en las decisiones que he tomado, a ellos les debo todo lo que soy.

A mis hermanos Eduardo Alejandro Saucedo Velez y Olga Lidia Saucedo Velez por que siempre me han apoyado en los momentos difíciles.

A Luz Maria Castellanos por estar a mi lado, ser un gran apoyo y ser una persona especial en mi vida.

A mis sobrinos Antonio Leonel y Alessa Nathali por traer alegría a mi vida.

A mi familia en general, por apoyarme, y por darme algo que no siempre se encuentra, una familia tan unida.

A mis padres

ÍNDICE DE CONTENIDO

I.	INTRODUCCIÓN	1
1.1	CONTAMINACIÓN AMBIENTAL DEBIDO AL DESARROLLO INDUSTRIAL	1
1.2	INDUSTRIA DE ALIMENTOS BALANCEADOS PARA ANIMALES	1
1.3	COMPUESTOS ORGANOARSENICALES	2
1.3.1	ROXARSONA (ROX)	3
1.3.2	ÁCIDO P-ARSANÍLICO (P-ASA)	4
1.3.3	NITARSONA (NIT).....	4
1.3.4	CARBARSONA (CAR).....	5
1.4	PROHIBICIÓN DEL USO DE COMPUESTOS ORGANOARSENICALES	5
1.5	PROBLEMÁTICA AMBIENTAL ASOCIADA AL USO DE COMPUESTOS ORGANOARSENICALES	5
1.6	ARSÉNICO.....	7
1.7	MARCO TEÓRICO	8
1.7.1	EXTRACCIÓN ASISTIDA POR MICROONDAS	8
1.7.2	SISTEMAS DE MICROONDAS	9
1.7.3	TEORÍA DE MICROONDAS.....	10
1.7.4	TEORÍA DEL CALENTAMIENTO POR MICROONDAS	12
1.7.5	ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCENCIA ATÓMICA	15
1.7.5.1	INTENSIDAD DE FLUORESCENCIA (IF)	16
1.7.6	SISTEMA DE GENERACIÓN DE HIDRUROS.....	16
1.7.7	CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA EFICIENCIA (HPLC, HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY)	17
1.7.8	CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA EFICIENCIA EN FASE REVERSA	18
1.7.9	ESPECIACIÓN QUÍMICA DE LOS COMPUESTOS ORGANOARSENICALES.....	19
1.7.10	DERIVATIZACIÓN	19
1.7.12	DETECTOR DE ESPECTROMETRÍA DE MASAS	22
II.	ANTECEDENTES	25
2.1	MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS ORGANOARSENICALES	25
2.2	MÉTODOS DESCRITOS PARA LA DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS ORGANOARSENICALES	27
2.3	ANÁLISIS CRÍTICO	29
III.	APORTACIÓN CIENTÍFICA	30
IV.	HIPÓTESIS	30
V.	OBJETIVO GENERAL.....	31
VI.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
VII.	METODOLOGÍA.....	32

7.1 REACTIVOS	32
7.2 MATERIALES Y EQUIPO.....	33
7.3 OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE PIENSO.....	34
7.3 PRETRATAMIENTO Y CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS	35
7.4 DETERMINACIÓN DE ARSÉNICO TOTAL Y COMPUESTOS ORGANOARSENICALES	35
7.5 PROCEDIMIENTO ANALÍTICO.....	36
7.5.1 DIGESTIÓN ÁCIDA ASISTIDA POR MICROONDAS (MAD).....	36
7.5.2 CUANTIFICACIÓN DE ARSÉNICO TOTAL	37
7.5.3 VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE ARSÉNICO TOTAL EN ALIMENTO BALANCEADO PARA ANIMALES	38
7.5.4 METODOLOGÍA PARA LA SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA DE ROXARSONA, NITARSONA Y ÁCIDO P-ARSANÍLICO.....	39
7.5.5 EXTRACCIÓN DE LOS COMPUESTOS ORGANOARSENICALES DEL ALIMENTO BALANCEADO PARA ANIMALES	39
7.5.6 DESARROLLO Y OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN ASISTIDA POR MICROONDAS (MAE) PARA ROX, NIT Y P-ASA EN ALIMENTO BALANCEADO PARA ANIMALES.....	40
7.5.7 EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS ORGANOARSENICALES EN MUESTRAS COMERCIALES	41
7.5.8 DERIVATIZACIÓN DE COMPUESTOS ORGANOARSENICALES PARA SU ANÁLISIS POR GC-MS	42
7.5.9 SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA DE p-ASA POR GC-MS	42
7.5.10 EXTRACCIÓN DE p-ASA EN MUESTRAS DE PIENSO	43
VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	44
8.1 EVALUACIÓN DE LAS CONDICIONES PARA LA DIGESTIÓN ÁCIDA VÍA MICROONDAS..	44
8.2 EVALUACIÓN DEL PORCENTAJE DE BOROHIDRURO PARA LA DETERMINACIÓN DE As POR HG-AFS	44
8.3 OPTIMIZACIÓN DE AGENTE REDUCTOR.....	45
8.4 PARÁMETROS ANALÍTICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE ARSÉNICO TOTAL EN MUESTRAS DE ALIMENTO BALANCEADO.....	46
8.5 EVALUACION DE LA EXACTITUD DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE ARSÉNICO TOTAL.....	47
8.6 DETERMINACIÓN DE ARSÉNICO TOTAL EN MUESTRAS COMERCIALES DE ALIMENTO BALANCEADO	47
8.7 SEPARACIÓN ROX, NIT Y p-ASA POR HPLC-UV/VIS	49
8.7.1 IMPLEMENTACIÓN DEL MÉTODO CROMATOGRÁFICO	49
8.8 SEPARACIÓN DE ROX, NIT Y P-ASA POR HPLC-UV/HG-AFS	54
8.9 EVALUACIÓN DE AGENTES EXTRACTANTES PARA COMPUESTOS ORGANOARSENICALES	56
8.10 EVALUACIÓN DE AGENTE EXTRACTANTE PARA COMPUESTOS ORGANOARSENICALES POR EXTRACCIÓN ASISTIDA POR MICROONDAS (MAE)	57

8.11 OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS ORGANOARSENICALES	58
8.12 EXTRACCIÓN Y ANÁLISIS DE COMPUESTOS ORGANOARSENICALES EN MUESTRAS COMERCIALES	64
8.12.1 EXTRACCIÓN DE ARSÉNICO TOTAL EN MUESTRAS COMERCIALES	64
8.12.2 ANÁLISIS POR HPLC-UV/HG-AFS DE LOS EXTRACTOS DE MUESTRAS COMERCIALES DE ALIMENTO BALANCEADO	64
8.13 DETERMINACIÓN DE p-ASA POR GC-MS	66
8.13.1 SELECCIÓN DE LA MEJOR CONDICIÓN DE DERIVATIZACIÓN	66
8.13.2 ESPECTROS DE MASAS DE p-ASA, NIT Y ROX	68
8.13.3 SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA	70
8.13.4 PARÁMETROS ANALÍTICOS PARA EL ANÁLISIS DE p-ASA POR GC-MS	71
8.13.5 VALIDACIÓN DEL MÉTODO GC-MS PARA LA DETERMINACIÓN DE p-ASA	72
8.13.6 EXTRACCIÓN DE p-ASA EN PIENSO	72
IX. CONCLUSIONES	75
X. BIBLIOGRAFÍA	77

LISTA DE TABLAS

TABLA 1. COMPUESTOS ORGANOARSENICALES, PROPIEDADES Y USOS.....	3
TABLA 2 VENTAJAS DEL CALENTAMIENTO POR MICROONDAS SOBRE EL CALENTAMIENTO CONVENCIONAL (81-84).....	9
TABLA 3. CONSTANTES DE DISOCIACIÓN ÁCIDAS PARA LOS COMPUESTOS ORGANOARSENICALES	19
TABLA 4 REACTIVOS.....	32
TABLA 5 MATERIALES Y EQUIPO.....	33
TABLA 6. PROGRAMA DE DIGESTIÓN EMPLEADO PARA LAS MUESTRAS: 0.2 G DE MUESTRA, 3 ML DE HNO ₃ CONC., 1 ML DE HCL _{CONC.} Y 1 ML DE H ₂ O ₂	36
TABLA 7. CONDICIONES PARA LA DETERMINACIÓN DE ARSÉNICO TOTAL POR HG-AFS.....	37
TABLA 8. VALORES CERTIFICADOS DEL CRM BCR-279.....	38
TABLA 9. VALORES CERTIFICADOS DEL CRM DORM-2.....	38
TABLA 10. CONDICIONES DE TRABAJO EN EL HPLC/UV-VIS	39
TABLA 11. AGENTES EXTRACTANTES EVALUADOS PARA LA EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS ORGANOARSENICALES.....	40
TABLA 12. CONDICIONES DE EXTRACCIÓN SELECCIONADAS.	41
TABLA 13. CONDICIONES PARA LA DETERMINACIÓN DE ESPECIES ORGANOARSENICALES EN MUESTRAS COMERCIALES DE PIENSO POR HPLC-UV-HG-AFS.	41
TABLA 14. CONDICIONES DE OPERACIÓN PARA EL ANÁLISIS DE P-ASA POR GC-MS.....	43
TABLA 15. EVALUACIÓN DE LA RELACIÓN DE ÁCIDOS EMPLEADOS EN LA DIGESTIÓN ASISTIDA POR MICROONDAS EN LA INTENSIDAD DE FLUORESCENCIA PARA UNA MUESTRA DE PIENSO	44
TABLA 16. EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DEL AGENTE REDUCTOR SOBRE LA IF	46
TABLA 17. PARÁMETROS ANALÍTICOS PARA DETERMINACIÓN DE AS TOTAL POR HG-AFS ..	47
TABLA 18. RESULTADOS DEL CONTENIDO DE ARSÉNICO TOTAL EN MATERIALES DE REFERENCIA OBTENIDOS DESPUÉS DE DIGESTIÓN ÁCIDA.....	47
TABLA 19. CONCENTRACIÓN DE ARSÉNICO TOTAL CONTENIDA EN MUESTRAS DE PIENSO.	48
TABLA 20. LONGITUD DE ONDA MÁXIMA DE LAS ESPECIES DE ESTUDIO	50
TABLA 21. PARÁMETROS ANALÍTICOS PARA LA SEPARACION DE DE ROX, NIT Y P-ASA POR HPLC/UV-VIS.....	52
TABLA 22. PARÁMETROS ANALÍTICOS PARA DETERMINACIÓN DE LOS COMPUESTOS DE ESTUDIO POR HPLC-UV-HG-AFS.	56
TABLA 23. RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN DE LOS AGENTES EXTRACTANTES.....	57
TABLA 24. EVALUACIÓN DE LA RECUPERACIÓN DE AS TOTAL UTILIZANDO MAE.	58
TABLA 25. RECUPERACIÓN DE ESPECIES ORGANOARSENICALES COMO % DE RECUPERACIÓN.	58
TABLA 26. DISEÑO FACTORIAL 3 ² CONTEMPLANDO CONCENTRACIÓN Y TEMPERATURA.	59
TABLA 27. DISEÑO FACTORIAL 3 ² CONTEMPLANDO CONCENTRACIÓN Y TIEMPO	61
TABLA 28. CONCENTRACIONES EN MUESTRAS COMERCIALES DE ALIMENTO BALANCEADO. .	64
TABLA 29. DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS ORGANOARSENICALES EN MUESTRAS COMERCIALES DE PIENSO.....	66

TABLA 30. EVALUACIÓN DE LAS CONDICIONES PARA LA REACCIÓN DE DERIVATIZACIÓN. CONCENTRACIÓN DE TRABAJO PARA P-ASA Y NIT DE 10 MG AS/L.	67
TABLA 31. PARÁMETROS ANALITICOS PARA EL SISTEMA GC-MS.	71
TABLA 32. RECUPERACIÓN DE P-ASA EN MUESTRAS DE PIENSO.	72
TABLA 33. COMPARACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES DE P-ASA OBTENIDAS POR LA TÉCNICA DE GC-MS Y HPLC-UV-HG-AFS AL ANALIZAR LAS MUESTRAS OBTENIDAS EN AMM.	73

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. PRODUCCIÓN MUNDIAL DE ALIMENTOS BALANCEADOS EN EL AÑO 2012.	2
FIGURA 2. FUENTES DE INGESTA DE COMPUESTOS ORGANOARSENICALES (58).	7
FIGURA 3. VISTA ESQUEMÁTICA DEL (A) HORNO DE MICROONDAS FOCALIZADO Y DEL (B) HORNO DE MICROONDAS MULTI-MODO (88)	10
FIGURA 4. PROPAGACIÓN DE LA ONDA ELECTROMAGNÉTICA.	11
FIGURA 5. LA INTERACCIÓN DE LAS MICROONDAS CON DIFERENTES MATERIALES: (A) CONDUCTORES ELÉCTRICOS. (B) MATERIALES ABSORBENTES Y (C) AISLANTES.	11
FIGURA 6. MECANISMO DE CALENTAMIENTO DE UNA SUSTANCIA EN CONTACTO CON LA RADIACIÓN POR MICROONDAS.	12
FIGURA 7. MECANISMO DE ROTACIÓN DIELECTRICA.	13
FIGURA 8. CONDUCCIÓN IÓNICA.	14
FIGURA 9. DIAGRAMA SIMPLIFICADO DE NIVELES DE ENERGÍA PARA ILUSTRAR AFS	15
FIGURA 10. DIAGRAMA ESQUEMÁTICO QUE MUESTRA LOS COMPONENTES DE UN HPLC.....	18
FIGURA 11. REACCIÓN GENERAL DE DERIVATIZACIÓN CON 1,3-PROPANODITOL.....	20
FIGURA 12. DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DEL SISTEMA GC-MS	22
FIGURA 13. COMPONENTES DE UN ESPECTRÓMETRO DE MASAS.	23
FIGURA 14. ESPECTRÓMETRO DE MASAS CUADRUPOLAR.	24
FIGURA 15. UBICACIÓN DE LOS SITIOS DE MUESTREO DE PIENSO EN EL AMM.	34
FIGURA 16. REACCIÓN DE DERIVACIÓN DE COMPUESTOS ORGANOARSENICALS CON 1,3-PROPANODITOL.....	42
FIGURA 17. EFECTO DEL PORCENTAJE DE NaBH_4 / NaOH 0.5% EN EL IF.....	45
FIGURA 18. ESPECTROS DE ABSORCIÓN DE ROX (AZUL), NIT (ROJO) Y P-ASA (VERDE) A CONCENTRACIÓN DE 1 MG/L.....	49
FIGURA 19. SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA Y SELECCIÓN DE LA LONGITUD DE ONDA DE TRABAJO PARA LA SEPARACIÓN DE ROX, NIT Y P-ASA A 1 MG/L.....	50
FIGURA 20. EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO ACÉTICO EN EL TIEMPO DE RETENCIÓN ROX, NIT Y P-ASA A UNA CONCENTRACIÓN DE 1 MG/L.	52
FIGURA 21. EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE METANOL EN EL TIEMPO DE RETENCIÓN DE ROX, NIT Y P-ASA A UNA CONCENTRACIÓN DE 1 MG/L.	53
FIGURA 22. CROMATOGRAMA DE LA SEPARACIÓN DE P-ASA, ROX Y NIT (1 MG/L, CADA UNO), EN UN SISTEMA HPLC/UV-Vis.	53
FIGURA 23. IMAGEN ESQUEMÁTICA DE LA SEPARACIÓN POR HPLC-UV-HG-AFS (144).	55
FIGURA 24. EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN Y CAUDAL DEL $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ EN LA OXIDACIÓN DE 100 $\mu\text{g/L}$ DE ROX EXPRESADO EN UNIDADES DE IF: FASE MÓVIL ÁCIDO ACÉTICO 2%/METANOL (96:4, v/v), COLUMNA C_8 Y PARA REDUCCIÓN EN AFS NaBH_4 AL 2% EN NaOH AL 0.5%.	55
FIGURA 25. A) GRÁFICA DE PARETO Y B) FUNCIÓN DE DESEABILIDAD PARA DETERMINAR LAS MEJORES CONDICIONES DE EXTRACCIÓN EN FUNCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE H_3PO_4 Y LA TEMPERATURA.	60

FIGURA 26. A) GRÁFICA DE PARETO Y B) FUNCIÓN DE DESEABILIDAD PARA LA OBTENCIÓN DE LAS MEJORES CONDICIONES DE EXTRACCIÓN EN FUNCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE H_3PO_4 Y EL TIEMPO.....	62
FIGURA 27. ESTUDIO DE RECUPERACIÓN DE ARSÉNICO TOTAL (500 μ G/L), ÁCIDO P-ARSANÍLICO, ROXARSONA Y NITARSONA (CONCENTRACIÓN A 100 μ G/L, C/U) N=3.....	63
FIGURA 28. SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA POR HPLC-UV-HG-AFS.....	65
FIGURA 29. ESPECTRO DE MASAS DE P-ASA-1,3 PROPANODITOL EN MODO SCAN.....	68
FIGURA 30. RESULTADOS OBTENIDOS PARA DETERMINAR LA MEJOR CONDICIÓN DE DERIVATIZACIÓN UTILIZANDO DIFERENTE PORCENTAJE DE DERIVATIZANTE (1,3-PROPANODITOL)	68
FIGURA 31. ESPECTRO DE MASAS DE P-ASA-1,3 PROPANODITOL OBTENIDO EN MODO SCAN.....	69
FIGURA 32. ESPECTRO DE MASAS DE NIT-1,3 PROPANODITOL OBTENIDO EN MODO SCAN.....	69
FIGURA 33. SEPARACIÓN POR GC-MS DE P-ASA Y NIT UTILIZANDO LAS CONDICIONES DE ANÁLISIS DESCRITAS EN LA TABLA 12 . MEDICIÓN EN MODO SIM RASTREANDO EL ION MOLECULAR.....	70
FIGURA 34. CURVA DE CALIBRACIÓN DE P-ASA OBTENIDA POR GC-MS.....	71
FIGURA 35. COMPARACIÓN DE LA MUESTRA DE POLLO 1 DERIVARTIZADA CONTRA UN ESTÁNDAR PURO DE P-ASA A 10 MG/L.....	74

ABREVIACIONES

μg	Microgramo
$\mu\text{g/kg}$	Microgramo por kilogramo
$\mu\text{g/L}$	Microgramo por litro
μL	Microlitro
$\mu\text{g As/L}$	Microgramos de arsénico por litro
μm	Micrometro
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
λ	Longitud de onda
%	Porcentaje
% p/v	Porcentaje peso volumen
$^{\circ}\text{C}$	Grados Celsius
$^{\circ}\text{K}$	Grados Kelvin
As	Arsénico
Arsénico III	Arsenito
Arsénico V	Arseniato
As_2O_3	Trióxido de arsénico
AsB	Arsenobetaína
AFS	Espectrometría de fluorescencia atómica
AM	Amplitud modulada
AMM	Área metropolitana de Monterrey
AsH_3	Arsina
C	Velocidad de la luz en el vacío
C	Concentración
C_8	Columna octil
C_{18}	Columna octadecil
CAB	Carbarsona
cm	Centímetro
Cu_2SO_4	Sulfato de cobre (I)
D.E.	Desviación estándar
DMA	Ácido dimetilarsénico
<i>et al.</i>	<i>et al.</i> (y otros)
ϵ	Campo eléctrico
USEPA	Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos
ESI-MS/MS	Espectrometría de masas en tándem con ionización por electrospray
FDA	Administración de alimentos y drogas (siglas en inglés)
FM	Frecuencia modulada
FMAE	Extracción asistida por microondas focalizada
g	Gramos

GC	Cromatografía de gases
GHz	Giga hercio
<i>H</i>	Campo magnético
h	Horas
Hz	Hercio
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
H ₃ PO ₄	Ácido fosfórico
HCl	Ácido clorhídrico
HF-LLLME	Microextracción líquido-líquido-líquido en microfibra hueca
HG	Generación de hidruros
HG-AAS	Espectroscopia de absorción atómica con sistema de generación de hidruros
HG-AFS	Espectroscopia de fluorescencia atómica con sistema de generación de hidruros
HNO ₃	Ácido nítrico
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución
HPLC-ICP-MS	Cromatografía de líquidos de alta resolución acoplado a espectrometría de masas con fuente de plasma de acoplamiento inductivo
HPLC-UV-HG-AFS	Cromatografía de líquidos de alta resolución acoplado a espectrometría de fluorescencia con sistema de generación de hidruros y de fotooxidación de especies orgánicas
HPLC-UV-HG-ICP	Cromatografía de líquidos de alta resolución acoplado a espectrometría de masas con fuente de plasma de Acoplamiento Inductivo con sistema de generación de hidruros y fotooxidación de especies orgánicas
IF	Intensidad de fluorescencia
IFIF	Federación internacional de industrias de piensos
IR	Espectrometría de infrarrojo
ICP-MS	Espectrometría de masas con fuente de plasma de acoplamiento inductivo
KH ₂ PO ₄	Fosfato di ácido de potasio
KBH ₄	Borohidruro de potasio
K ₂ S ₂ O ₈	Persulfato de potasio
kV	Kilo Volts
KI	Ioduro de potasio
L	Litros
LOD	Límite de Detección
LOQ	Límite de Cuantificación
<i>m</i>	Pendiente de la curva de calibración
MAD	Digestión asistida por microondas
MAE	Extracción asistida por microondas

mg	Miligramos
mg/kg	Miligramo por kilogramo
mL	Mililitros
m	Metros
mm	Milímetros
MHz	Mega hercio
MMA	Ácido monometilarsénico
mM	Milimolar
M	Molaridad
mA	Mili amperios
mL/min	Mililitro por minuto
$m\Omega\text{ cm}^{-1}$	Miliohomios
ND	No Detectable
nm	Nanómetro
ng/L	Nanogramo por litro
NIT	Nitarsona
NaBH_4	Borohidruro de sodio
NAHAA	Ácido N-acetil-4-hidroxi-m-arsanílico
NaH_2PO_4	Fosfato di ácido de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
p-ASA	Ácido p-arsanílico
pKa	Constante de disociación ácida
PMAE	Extracción asistida por microondas presurizado
PMT	Tubo fotomultiplicador
PAA	Ácido fenilarsónico
rpm	Revoluciones por minuto
ROX	Roxarsona
s	Segundos
SAGARPA	Secretaría Agricultura Ganadería Desarrollo Rural Pesca y Alimentación
SAX	Cartucho de intercambio aniónico fuerte
UV-Vis	Ultravioleta-visible
USA	Estados Unidos de América
V	Volts
v/v	Volumen/volumen

I. INTRODUCCIÓN

1.1 CONTAMINACIÓN AMBIENTAL DEBIDO AL DESARROLLO INDUSTRIAL

A nivel mundial, la contaminación ambiental es uno de los problemas más críticos a solucionar; la presencia de agentes físicos, químicos y/o biológicos en el agua, aire y suelo, continúa incrementándose proporcionalmente con el aumento de las actividades industriales y agrícolas. En la actualidad, México enfrenta importantes desafíos en materia de degradación ambiental y en particular, con respecto a la calidad del agua, suelo y aire. La mayor causa del deterioro continuo del ambiente es el insostenible modelo de producción y consumo, particularmente en los países industrializados (1-3).

El incremento de industrias genera residuos que tienen un efecto negativo sobre el ambiente, deteriorando la calidad de los recursos naturales. Dentro de estos procesos industriales, se encuentran los dedicadas a la producción de alimentos balanceados para animales (4).

1.2 INDUSTRIA DE ALIMENTOS BALANCEADOS PARA ANIMALES

La normativa europea define pienso como “cualquier sustancia o producto, incluidos los aditivos, destinado a la alimentación por vía oral de los animales, tanto si ha sido transformado entera o parcialmente”. Un pienso (compuesto) “es un alimento para los animales”, constituido por una mezcla de materias primas (vegetales y/o animales y/o minerales) que son transformadas o no con el fin de lograr un alimento nutritivo y sano para los animales (5). Existen dos tipos de pienso:

- a) Completos: son una combinación de ingredientes que aportan al animal todos los nutrientes que necesita, y son los que se utilizan normalmente en la alimentación de aves, cerdos y en los animales de compañía.
- b) Complementarios: son aquellos que están formulados para combinarse con otras materias primas. Estos piensos se combinan con forrajes y son utilizados frecuentemente en la alimentación de caballos y rumiantes (vacas, ovejas, cabras, etc.).

Por otra parte, para el tratamiento de animales con trastornos de salud y únicamente en los casos estrictamente necesarios, los piensos pueden estar formulados para llevar algún tipo de medicamento. En este caso se utiliza exclusivamente como vía de suministro de la medicación. Su elaboración necesita autorización administrativa y su utilización debe estar prescrita por un veterinario. Este tipo de pienso se denomina pienso medicamentoso (6).

Las materias primas que forman un pienso son principalmente cereales, que representan alrededor del 50-60% de la composición final del pienso, principalmente maíz, cebada y trigo (7).

Los siguientes ingredientes mayoritarios son las materias primas proteaginosas y oleaginosas, principalmente soya, que representa alrededor del 14%. Los frutos o las semillas de las plantas proteaginosas y oleaginosas se caracterizan por su elevado contenido en proteína. Además se utilizan para extraer aceites (girasol, colza, etc.) (8). Los piensos de forma minoritaria contienen una serie de ingredientes que confieren el equilibrio necesario para que cumplan con los requisitos nutricionales necesarios para mantener la salud y el bienestar de los animales como son minerales, vitaminas, etc. (4, 8-11).

La producción mundial de alimento balanceado (pienso) para animales fue de 963 millones de toneladas en el año 2013, estando México en el cuarto lugar con una producción de 29 millones de toneladas (**Figura 1**) (4, 12). En México hay 552 transformadoras de bienes agrícolas en alimentos balanceados, distribuidas principalmente en los estados de Jalisco, México, Michoacán, Puebla, Chiapas, Querétaro, Distrito Federal y Nuevo León de acuerdo al Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) (13, 14).

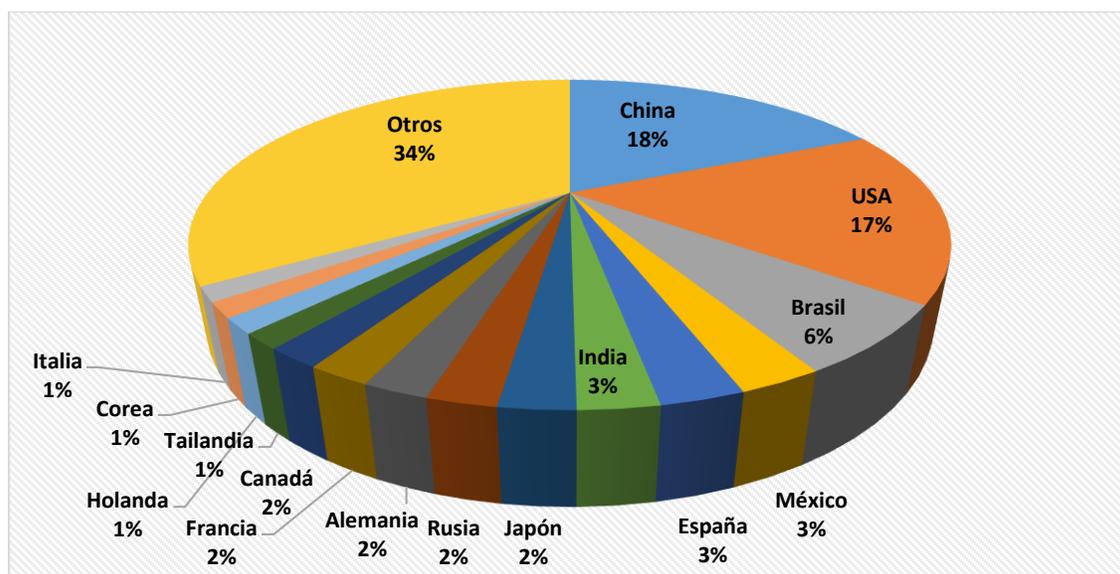


Figura 1. Producción mundial de alimentos balanceados en el año 2012.

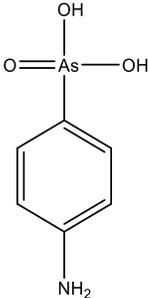
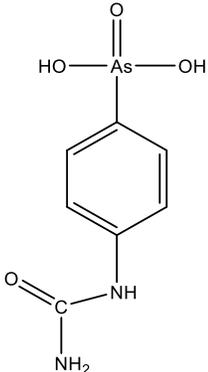
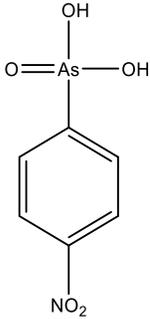
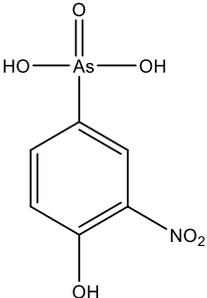
FUENTE: Elaborada por el Consejo Nacional de Fabricantes de Alimentos Balanceados y de la Nutrición Animal, A.C., con datos de IFIF / 2013 Alltech Global Feed Summary.

1.3 COMPUESTOS ORGANOARSENICALES

Los compuestos organoarsenicales se adicionan a los piensos con el fin de controlar enfermedades, favorecer el incremento de peso, proporcionar un mejor plumaje, aumentar la producción de huevos en pollos y para ayudar en la pigmentación de la carne en las aves y cerdos de corral (15, 16). Son cuatro los aditivos organoarsenicales aprobados por la Administración de Alimentos y Drogas de los Estados Unidos Americanos (FDA-USA, por

sus siglas en inglés) para la prevención de enfermedades en el ganado: roxarsona (ROX), ácido p-arsanílico (P-ASA), nitarsona (NIT) y carbarsona (CAB) (**Tabla 1**), siendo este último compuesto el de menor uso (17). Estos compuestos son solubles en agua, pueden ser excretados a través de las heces de los animales tratados sin sufrir grandes cambios y también son desechados durante el proceso de fabricación en el agua residual de las industrias que se dedican a la fabricación de alimentos para ganado (17-21). Estudios realizados por Garbarino *et al.* (17), Rutherford *et al.* (22), Chiou *et al.* (23) entre otros, han puesto en duda la seguridad al utilizar estos compuestos organoarsenicales como aditivos de engorda.

Tabla 1. Compuestos organoarsenicales, propiedades y usos.

	Ácido p-Arsanílico	Carbarsona	Nitarsona	Roxarsona
Nombre IUPAC	Ácido 4-aminofenil arsónico	Ácido 4-carbamilaminofenil arsónico	Ácido 4-nitrofenil arsónico	Ácido 3-nitro-4-hidroxifenil arsónico
Nombre comercial	Atoxyl	Carb-O-Sep	Histostat-50	3-nitro
Nombre abreviado	p-ASA ARS	p-UPAA CAR	p-NPAA NIT	3-NHPAA ROX
Fórmula molecular	C ₆ H ₈ AsNO ₃	C ₇ H ₉ AsN ₂ O ₄	C ₆ H ₆ AsNO ₅	C ₆ AsNH ₆ O ₆
Masa molecular (g/mol)	217.05	260.08	247.04	263.04
Estructura				
Porcentaje de arsénico (%)	34.6	28.8	30.4	28.5
Numero CAS	98-50-0	121-59-5	98-72-6	121-19-7
Uso	Pollos, pavos, cerdos	Pavos	Pollos, pavos	Pollos, pavos

1.3.1 ROXARSONA (ROX)

La roxarsona (ácido (4-hidroxi-3-nitrofenil) arsónico) es un compuesto organoarsenical derivado de ácido fenilarsónico que se utiliza ampliamente para la producción de aves de corral como aditivo para piensos que mejora la absorción de los nutrientes del alimento en los animales, aumentando la ganancia de peso y mejorando el rendimiento de la alimentación, y como un coccidiostático, se empleó por primera vez en la década de 1940 (24). El fármaco

se aprobó para su uso en aves de corral y/o en cerdos, junto con la nitarsona, ácido arsenílico y carbarsona (25). La roxarsona es conocida en el mercado con el nombre de 3-nitro por Zoetis, filial de Pfizer (26).

La roxarsona presenta en su estructura arsénico (As) orgánico pentavalente. El riesgo de intoxicación por roxarsona se produce por una sobredosis accidental o deliberada. La dosis recomendada de roxarsona es de 25 a 50 mg/kg. En pollos una dosis de 100 mg/kg reduce el crecimiento muscular (27, 28).

La roxarsona se utiliza en el pienso para prevenir la enfermedad de coccidiosis que es causada por especies del género *Eimeria*. Se han reportado infecciones por las siguientes especies: *E. acervulina*, *E. maxima*, *E. tenella*, *E. brunetti*, *E. mitis*, *E. mivati*, *E. hagani*, *E. necatrix* y *E. praecox* (18, 29). Además, la roxarsona se administra en combinación con ionóforos y otros antibióticos, incluyendo la bacitracina, disalicilato de metileno, lincomicina, virginiamicina, y tilosina para combatir los parásitos intestinales y las infecciones (30).

1.3.2 ÁCIDO P-ARSANÍLICO (P-ASA)

El ácido p-arsanílico (ácido (4-aminofenil) arsónico) ha sido ampliamente utilizado en la industria de aves de corral y cerdos para promover el crecimiento y prevenir la disentería (31). Además es recomendado para la prevención y tratamiento de la coccidiosis (32, 33). También es utilizado por la industria de la alimentación para promover el crecimiento, aumentar la eficiencia de alimentación y controlar la enfermedad de la cabeza negra (histomoniasis). Para la promoción del crecimiento, el ácido p-arsanílico se incorpora generalmente en alimentos para cerdos a niveles entre 50 y 100 mg/kg y en aves de corral se adiciona a 100 mg/kg (20, 34). El ácido p-arsanílico es conocido en el mercado con el nombre de Pro-Gen Plus Feed Supplement de Fleming Laboratories (35). El ácido p-arsanílico mejora la eficiencia de la alimentación en la codorniz; sin embargo, el arsénico se deposita en los huevos, el riñón, el hígado y el corazón (36). Un estudio realizado por Aschbacher (37) detectó la presencia de ácido p-arsanílico en hígado y riñones de cerdos y pollos. Además, los productos metabólicos de ácido p-arsanílico se detectaron en las heces, la orina y la bilis, lo que sugiere que la absorción, distribución y metabolismo de los compuestos organoarsenicales no son insignificantes.

1.3.3 NITARSONA (NIT)

La nitarsona (ácido (4-nitrofenil) arsónico) se utiliza para el tratamiento y prevención de histomoniasis en pavos provocada por *Histomonas meleagridis* (15). Comercialmente es conocida como Histostat, distribuido por Zoetis una filiar de Pfizer. La nitarsona es el único fármaco antiparasitario de uso veterinario a base de arsénico que actualmente está aprobado

en el tratamiento de ganado de engorda. La dosis recomendada para este compuesto en la dieta de pavos con una edad de entre 2 a 12 semanas de vida es de 185.7 mg/kg (38, 39).

1.3.4 CARBARSONA (CAR)

La carbarsona (ácido (4-carbamoilaminofenil) arsónico) distribuida en el mercado con el nombre de Carb-O-Sep, es utilizado en las dietas de aves de corral para la prevención de enterohepatitis infecciosa o histomoniasis (enfermedad de la cabeza negra o tiflohepatitis del pavo), la cual es una enfermedad parasitaria producida por el protozoo *Histomonas meleagridis* afectando a gallináceas en general y especialmente a los pavos. También es utilizado en el tratamiento de la amebiasis provocado por *Entamoeba histolytica* (40, 41). En las aves de corral, la carbarsona se administra en dosis de 75 mg/kg para el tratamiento de la amebiasis y histomoniasis en los pavos (42). En 2013, la carbarsona fue retirada del mercado de USA (43).

1.4 PROHIBICIÓN DEL USO DE COMPUESTOS ORGANOARSENICALES

A partir del año 1999, se prohibió el uso de la roxarsona en el tratamiento de ganado avícola en la Unión Europea (44). En el caso de USA, en 2008 la FDA retiró del mercado la roxarsona al encontrar resultados que indicaron que las aves tratadas con este compuesto presentaron un aumento en la cantidad de arsénico en tejidos siendo una vía que significativamente contribuye a la exposición de arsénico (24, 45). Derivado del mismo estudio, en 2013 la empresa farmacéutica Zoetis retiró del mercado el ácido p-arsanílico y carbarsona en USA. La nitarsona al igual que todas sus mezclas con agentes de engorda será retirada del mercado en USA para finales del 2015 (46, 47). Sin embargo, para los países de Latinoamérica y, en especial México aún no se tiene una regulación para la venta y utilización de estos compuestos organoarsenicales como agentes de engorda para ganado (48).

1.5 PROBLEMÁTICA AMBIENTAL ASOCIADA AL USO DE COMPUESTOS ORGANOARSENICALES

La roxarsona, ácido p-arsanílico y nitarsona se consideran compuestos inofensivos para el hombre, sin embargo, son rápidamente transformadas durante el compostaje y almacenaje del estiércol (17) y su aplicación como fertilizante en los suelos agrícolas (49).

Debido a que el uso excesivo de fertilizantes convencionales, especialmente los nitrogenados, puede causar la degradación de los suelos y la disminución de la calidad del agua superficial y subterránea. En los últimos años el empleo alternativo de abono orgánico ha tomado especial relevancia, y su uso ha sido enmarcado bajo el contexto de una agricultura sostenible (50).

Entre los abonos más utilizados se destaca el estiércol de pollo, por su alto contenido en nitrógeno y fósforo (51). En relación a esto, el uso de roxarsona en la alimentación de pollos de engorda y de ácido p-arsanílico en los cerdos (52, 53) es discutible, ya que estos compuestos organoarsenicales son eliminados en los desechos sin cambios en su estructura química y por lo tanto, tenderán a acumularse en el estiércol del ganado (54).

En el caso del pollo, durante la fase de crecimiento, en los 42 días de administración de roxarsona en la dieta, cada pollo excreta aproximadamente 150 mg del compuesto (55) lo que equivale a una concentración de 30 a 50 mg/kg de arsénico en el estiércol. Cuando estos productos se utilizan como fertilizantes, se aplican dosis entre 1 a 2 toneladas/hectárea (17). Diversos autores han reportado concentraciones de arsénico entre 14 y 47 mg/kg en el estiércol de aves de corral, cuando fueron alimentados con roxarsona (55, 56). Estudios realizados por Garbarino *et al.* (17) y Rutherford *et al.* (22) para la determinación de especies arsenicales en extractos de suelo, revelaron que los suelos tratados con estiércol de ave contenían cinco a seis veces más arsénico que los suelos no tratados.

Existe evidencia clara de que la roxarsona puede permanecer en la superficie del suelo, como también puede ser movilizada por los procesos de lixiviación y escorrentía hacia estratos más profundos del suelo agrícola, en donde estaría sujeta a sufrir procesos de biotransformación a compuestos arsenicales inorgánicos más móviles y tóxicos (57).

El aumento de la movilidad de los productos de degradación de los compuestos organoarsenicales representa una amenaza para la calidad del suelo y las aguas subterráneas. En la **Figura 2** se muestran los mecanismos posibles por el cual el ser humano está expuesto a la contaminación por los compuestos organoarsenicales (58).

Entre los productos de transformación de los compuestos organoarsenicales como la roxarsona se incluyen compuestos inorgánicos, como arseniato (As (V), AsO_4^{3-}), arsenito (As (III), AsO_2^-), así como una variedad de compuestos arsenicales orgánicos como ácido monometilarsénico (MMA) y ácido dimetilarsénico (DMA) (20, 58). Los compuestos arsenicales inorgánico y arsenicales metilados producto de la transformación de la roxarsona podrían constituir un riesgo significativo para la salud (24, 59, 60). Los metabolitos pentavalentes MMA y DMA son menos tóxicos que las especies inorgánicas de As(III) y As(V) (61). La toxicidad del arsénico es bien conocida y no sólo depende del estado de oxidación, sino también de su forma química, siendo más tóxicas las especies inorgánicas. El As (III) es 60 veces más tóxico que el As (V) para humanos (62, 63). Así el empleo de aditivos organoarsenicales ha sido considerada como una fuente de contaminación ambiental en las últimas décadas (64).

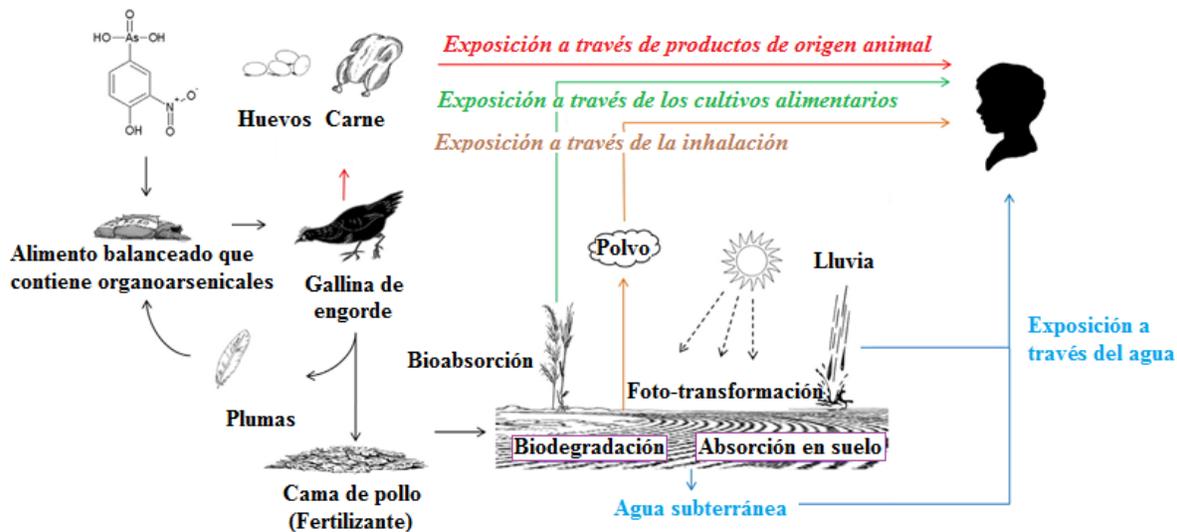


Figura 2. Fuentes de ingesta de compuestos organoarsenicales (58).

1.6 ARSÉNICO

El arsénico es el elemento número 33 de la tabla periódica de los elementos y tiene dos formas comunes de oxidación: el trivalente As (III) y el pentavalente As (V). El arsénico tiene la capacidad de formar componentes orgánicos e inorgánicos en el ambiente y el cuerpo humano (65).

El arsenito es capaz de unirse a los grupos sulfhidrilo de las enzimas (receptor de glucocorticoides, GR) e inhibir diversas actividades enzimáticas relacionadas con el metabolismo celular y la respiración. La intoxicación crónica por arsénico produce anorexia acompañada de alteraciones gastrointestinales, neuritis periférica, conjuntivitis y lesiones de la piel que incluyen hiperqueratosis y melanosis. Este oscurecimiento de la piel es característico de una exposición prolongada a arsénico y puede ser un factor en el desarrollo de cáncer de piel (66).

El arseniato al ser un análogo del fosfato, entra a la célula por medio de vías específicas para el transporte de fosfatos, inhibiendo la fosforilación oxidativa. A pesar de que el As (V) no interactúa directamente con el ácido desoxirribonucleico (ADN), los efectos indirectos del arseniato pueden crear una alteración de la expresión génica, a través de la interrupción de la metilación del ADN, la inhibición de la reparación del ADN, del estrés oxidativo, o la alteración de la modulación de las vías de transducción de señales (67-69).

De igual forma el As (V) que es absorbido se reduce a As (III) en la sangre. El As (III) es considerado biológicamente la forma más tóxica del arsénico, que sufre de una metilación primaria en el hígado formándose el MMA y DMA, siendo estos metabolitos excretados más rápidamente que las especies de arsénico inorgánicos (70, 71).

Los humanos pueden estar expuestos al arsénico a partir de una variedad de fuentes en el ambiente, incluyendo alimentos, agua potable y el aire (**Figura 2**). Después de la ingestión y la absorción, la mayoría de las especies de arsénico inorgánico se eliminan rápidamente de la sangre (vida media entre una y dos h). Aproximadamente el 40 al 70% del arsénico que es absorbido y metabolizado, se excreta en 48 h. A través de análisis de orina, se ha informado que el MMA y el DMA son fácilmente y rápidamente absorbidos, aproximadamente 75-85%, a través del tracto gastrointestinal (68, 69, 72, 73).

Los signos de las enfermedades crónicas por exposición a largo plazo a baja concentración de arsénico son: decoloración de la piel, indigestión crónica y calambres en el estómago. La exposición a largo plazo puede producir cáncer de piel, pulmón, riñón e hígado, además de daño cardiovascular (74), y depresión del sistema inmunológico (75) .

Bajo este contexto, la fertilización de suelo agrícola con estiércol de pollo y la excreta de orina implicarían un transporte probable de especies organoarsenicales desde el estiércol al suelo, con el consecuente impacto en la salud. Por otro lado, también existe el riesgo de contaminación por arsénico del agua para consumo humano, tales como agua superficial o subterránea.

Así, el objetivo del presente estudio es implementar una metodología de extracción asistida por microondas y detección por el sistema de HPLC-UV-HG-AFS para la determinación de ROX, NIT y p-ASA en muestras de pienso y una posterior confirmación de las especies detectadas por el sistema GC-MS.

1.7 MARCO TEÓRICO

1.7.1 EXTRACCIÓN ASISTIDA POR MICROONDAS

En los últimos años el uso de la tecnología de microondas para la preparación de muestras ha sido ampliamente utilizado para la separación de analitos en diferentes matrices ambientales, alimentos y muestras biológicas (76-80). Las razones de la gran difusión de la tecnología de microondas se relacionan con las ventajas que esta posee sobre las tecnologías más tradicionales, en la **Tabla 2** se mencionan dichas ventajas.

Tabla 2 Ventajas del calentamiento por microondas sobre el calentamiento convencional (81-84).

<i>Calentamiento convencional</i>	<i>Calentamiento por microondas</i>
<i>Se produce de la superficie hacia el interior, menos homogéneo</i>	Se produce directamente dentro de la mezcla, más homogéneo
<i>El contenedor debe estar en contacto con la mezcla para provocar el calentamiento</i>	No se requiere contacto físico con el contenedor
<i>Se requiere de una fuente térmica</i>	Las ondas electromagnéticas provocan el calentamiento
<i>El calentamiento es por conducción</i>	El calentamiento es dieléctrico, volumétrico y selectivo
<i>La transferencia de energía va del contenedor hacia la mezcla</i>	Se calienta la mezcla mientras que el contenedor provoca pérdida de calor
<i>Los componentes de la mezcla se calientan por igual</i>	Existe un calentamiento específico sobre moléculas con momento dipolar
<i>La velocidad de calentamiento es menor</i>	La velocidad de calentamiento es mayor
<i>La temperatura máxima está limitada por el punto de ebullición de la mezcla</i>	Se puede generar sobrecalentamiento
<i>Poco amigable con el medio ambiente</i>	Amigable con el medio ambiente
<i>Uso de volúmenes de reactivos mayores a 50 mL</i>	Uso de volúmenes de reactivos desde 5 a 50 mL
<i>Procedimientos poco reproducibles</i>	Procedimientos más reproducibles
<i>Perdida de elementos volátiles</i>	Recuperación cuantitativa de elementos volátiles

La radiación por microondas calienta solamente la fase líquida, mientras que los vapores no absorben energía de microondas. La temperatura de la fase de vapor es por lo tanto inferior a la temperatura de la fase líquida y se da la condensación de vapor en las paredes de los vasos (84, 85).

1.7.2 SISTEMAS DE MICROONDAS

Los equipos de microondas utilizados para el tratamiento de la muestra, se pueden clasificar en dos grupos de acuerdo a cómo se aplica la energía de microondas a la muestra:

- Sistemas multimodo, donde la radiación de microondas se dispersa de forma aleatoria en una cavidad, de tal forma que se tiene una radiación uniforme dentro de la zona de la cavidad y la muestra es irradiada de manera uniforme.
- Sistema focalizado o monomodo, donde la radiación de microondas se concentra en una zona restringida, aquí la muestra se somete a un campo eléctrico mucho más fuerte que en el caso anterior.

Por lo general los sistemas multimodo son del tipo de recipiente cerrados y los sistemas monomodo utilizan recipientes del tipo abierto.

En los llamados sistemas de vasos abiertos, las extracciones proceden bajo presión atmosférica. Como consecuencia de ello, la temperatura máxima posible se determina por el punto de ebullición del disolvente a esa presión. Tales sistemas utilizan un sistema de microondas focalizado, de modo que el calentamiento de la muestra es homogénea y muy eficiente. Las pérdidas de vapores se impiden por la presencia de un sistema de reflujo como se ilustra en la **(Figura 3a)** (85) en la parte superior del recipiente de extracción. Esta técnica es nombrada MAE focalizado (FMAE, por sus siglas en inglés).

En el caso de sistema de vasos cerrados, la muestra se sumerge en un recipiente que contiene un disolvente que al recibir la radiación de microondas tiene la propiedad de absorberla. Al ser irradiado con energía de microondas el disolvente se puede calentar muy por encima de su punto de ebullición y al utilizar vasos cerrados se puede trabajar a altas presiones **(Figura 3b)**. Este sistema es generalmente nombrado como MAE presurizado (PMAE, por sus siglas en inglés) (86-88).

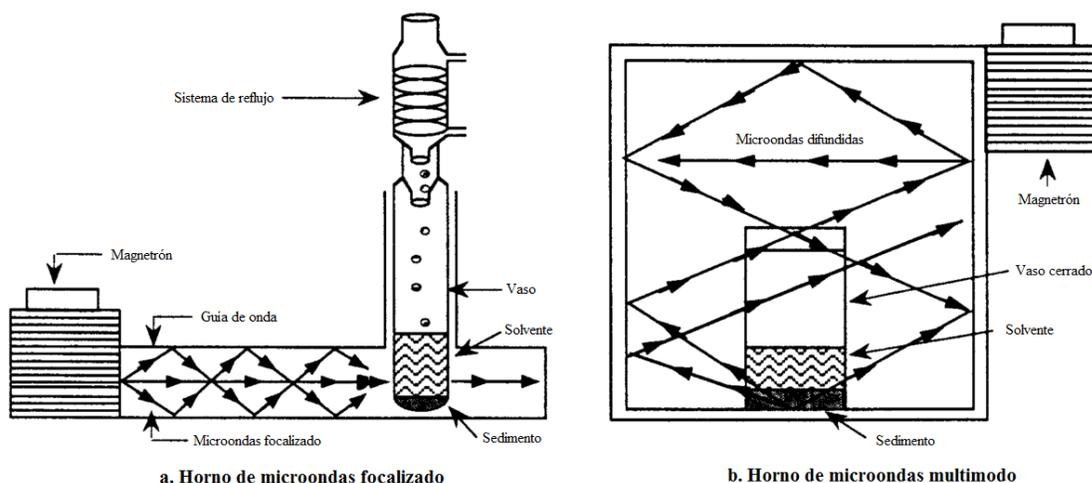


Figura 3. Vista esquemática del (a) horno de microondas focalizado y del (b) horno de microondas multi-modo (88)

1.7.3 TEORÍA DE MICROONDAS

Las microondas son ondas de radio de alta frecuencia (campos de radiofrecuencia) e igual que la radiación visible, son parte del espectro electromagnético. La irradiación por microondas es una irradiación electromagnética en el rango de frecuencia de 0.3 a 300 GHz, que corresponde a longitudes de onda de 1 mm a 1 m.

Los hornos de microondas hoy en día operan a una frecuencia de 2.45 GHz (correspondiente a una longitud de onda de 12.25 cm) con el fin de evitar la interferencia con las telecomunicaciones, las redes inalámbricas, y las frecuencias de telefonía celular (89-91). Al incidir la radiación de microondas sobre un cuerpo que tiene material dieléctrico, se ve

afectada la rotación de las moléculas de la sustancia que lo forma, mientras que su estructura molecular se mantiene inalterable. La energía de microondas consiste en un campo eléctrico y un campo magnético (**Figura 4**), aunque solamente el campo eléctrico transfiere energía en forma de calor a la sustancia con la que dicha radiación entra en contacto y de tal forma las moléculas vibren, muevan u oscilen más rápidamente.

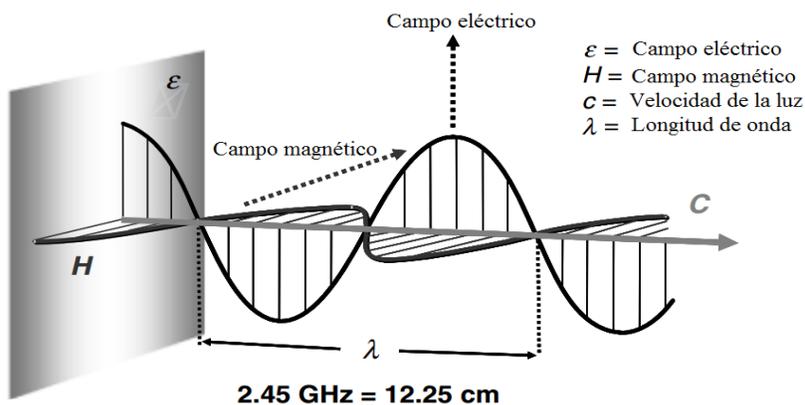


Figura 4. Propagación de la onda electromagnética.

Las microondas son reflejadas, transmitidas o absorbidas por los materiales en sus trayectorias, de manera similar a la luz. Los materiales metálicos reflejan totalmente las microondas mientras que los materiales no metálicos como el vidrio y algunos plásticos son mayormente transparente a las microondas (92) (**Figura 5**).

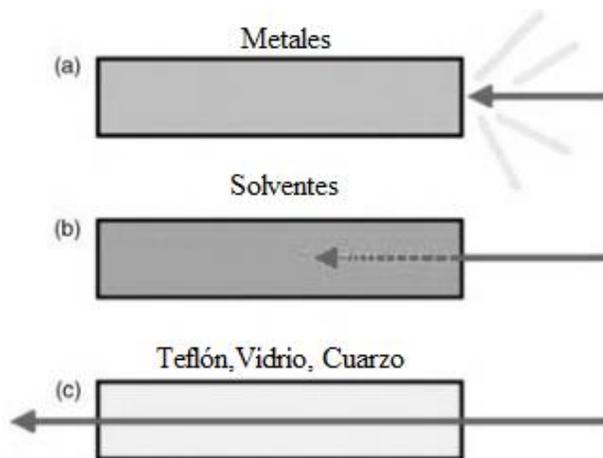


Figura 5. La interacción de las microondas con diferentes materiales: (a) conductores eléctricos. (b) materiales absorbentes y (c) aislantes.

Los materiales que contienen agua, por ejemplo los alimentos, los fluidos o los tejidos, rápidamente absorben la energía de las microondas, la cual después es convertida en calor (83).

1.7.4 TEORÍA DEL CALENTAMIENTO POR MICROONDAS

Mientras que, por ejemplo, en un proceso convencional empleando un baño de agua, el calentamiento es dirigido a través de la sustancia pasando primeramente a través de las paredes del recipiente para finalmente llegar al disolvente y los reactivos, en el caso de la radiación de microondas el acoplamiento con las moléculas se lleva a cabo directamente en el interior del medio, que puede ser un alimento, una disolución acuosa, o por extensión un determinado medio de reacción. En la **Figura 6** se expone esquemáticamente este mecanismo (93-95).

Dado que el proceso no es dependiente de la conductividad térmica del material del recipiente, el resultado es un supercalentamiento localizado de forma instantánea. Los dos mecanismos de transferencia de energía de la radiación de microondas para conseguir el calentamiento de la muestra son la *rotación dieléctrica* y la *conducción iónica*.

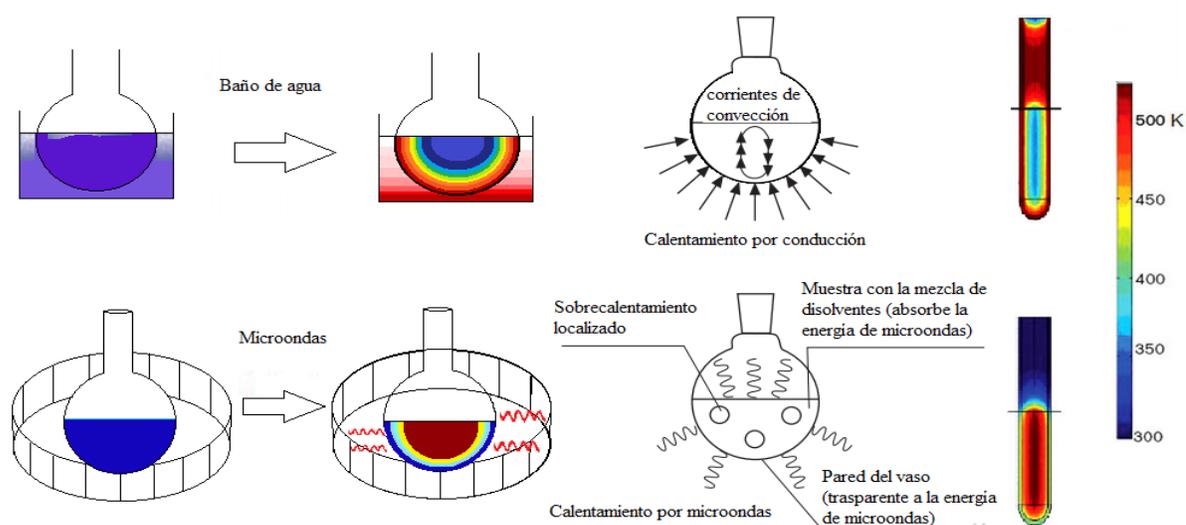


Figura 6. Mecanismo de calentamiento de una sustancia en contacto con la radiación por microondas.

1.7.4.1 MECANISMO DE ROTACIÓN DIELECTRICA.

Para que un material pueda generar calor cuando es irradiado con microondas debe poseer un momento dipolar. Cuando este material es expuesto a radiación de frecuencias de microondas, los dipolos de las moléculas se alinean según el campo eléctrico aplicado.

Como el campo aplicado oscila, las moléculas que se comportan como dipolos intentan alinearse con éste, y durante este proceso la energía se pierde en forma de calor mediante fricción molecular y pérdidas dieléctricas. La cantidad de calor generado es directamente proporcional a la habilidad de alinearse de los dipolos con el campo aplicado. Si los dipolos

no tienen suficiente tiempo para alinearse o se reorientan demasiado rápido con el campo, la muestra no se calienta.

A 2.45 GHz el campo rota 4.9×10^9 veces/s y se encuentra situado entre estos dos extremos mencionados anteriormente, da tiempo a los dipolos para alinearse con el campo, pero no para seguir la alternancia de éste. De esta forma, se genera una diferencia de fase entre la orientación del campo y el dipolo. Esta diferencia de fase causa que la energía se pierda en forma de calor por fricciones o colisiones moleculares y por pérdidas dieléctricas dando lugar a la calefacción dieléctrica.

Es preciso remarcar que la interacción entre la irradiación microondas y los líquidos polares ocurre cuando la frecuencia de la radiación es similar a la frecuencia del proceso de relajación rotacional y, por lo tanto, no es un fenómeno de resonancia de mecánica cuántica (**Figura 7**).

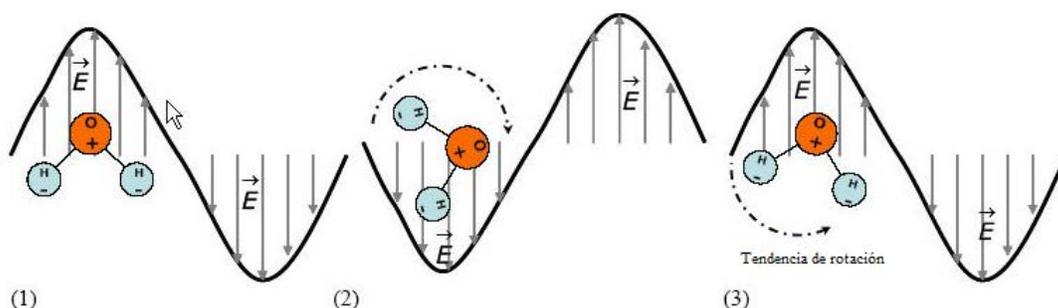


Figura 7. Mecanismo de rotación dieléctrica.

En el tiempo (1) la molécula de agua está alineada con el campo eléctrico de la onda. En el tiempo (2) el campo invierte su dirección y tiende a girar la molécula. En el tiempo (3) la dirección de la ola de nuevo se cambia y la molécula tiende a seguir. El proceso se repite 4.9×10^9 veces por segundo (92).

Los gases no pueden ser calentados mediante radiación de microondas ya que las distancias entre las moléculas en rotación son demasiado grandes, además, no poseen momentos dipolares adecuados para las pérdidas dieléctricas. A su vez, los sólidos cristalinos son prácticamente transparentes a la radiación de microondas, ya que si las moléculas se encuentran formando una estructura cristalina no pueden moverse libremente como en el caso de los líquidos (92, 95, 96).

1.7.4.2 MECANISMO DE CONDUCCIÓN IÓNICA

El otro mecanismo principal de calefacción es la conducción iónica. Durante la aplicación del campo electromagnético oscilante las partículas cargadas disueltas (iones) en una muestra oscilan de un lado a otro provocando colisiones con los átomos o moléculas vecinas. Estas colisiones causan agitación o movimiento produciendo calor. Así, si dos muestras que contienen la misma cantidad de agua desionizada y agua mineral, respectivamente, son calentadas con radiación microondas a una potencia de irradiación fija el mismo tiempo, el agua mineral se calentará más rápido debido al contenido en iones (**Figura 8**).

Los efectos de la conducción iónica son particularmente importantes cuando se está trabajando con líquidos iónicos y en microondas. El mecanismo de la conductividad es mucho más fuerte que el de la rotación dipolar en cuanto a la generación de calor se refiere (92).

Las fricciones que ocurren en ambos mecanismos producen incrementos rápidos y eficientes de temperatura en la solución. Con frecuencia el agua es el componente mayoritario presente en los procesos de extracción o digestión, por tal motivo, la rotación del momento dipolar del agua es la que generalmente contribuye más al incremento de temperatura.

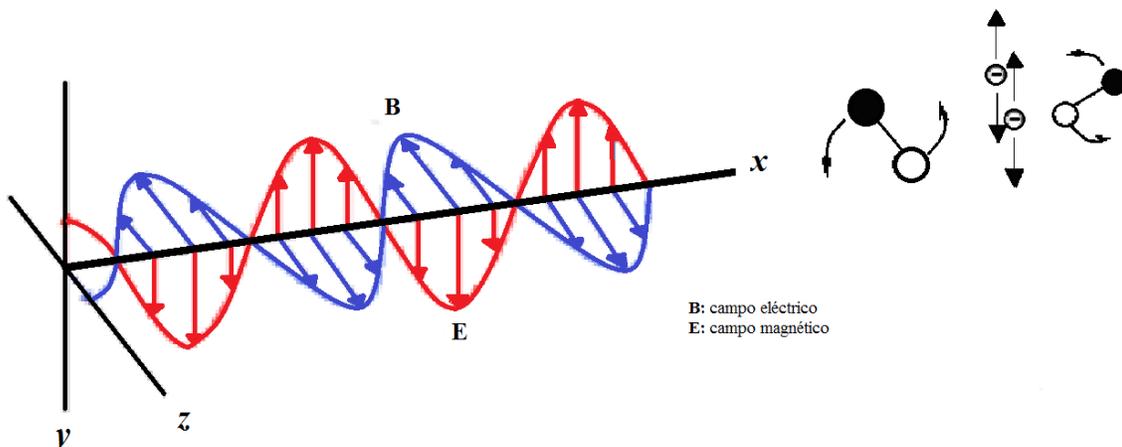


Figura 8. Conducción iónica.

Cualquier compuesto que posea un dipolo importante, o alguna especie iónica, puede interactuar con las microondas, y así se incrementará la temperatura. La cantidad de las especies que interactúan con la radiación de microondas, es el factor más importante en el calentamiento de la mezcla sometida al proceso de digestión (97).

1.7.5 ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCENCIA ATÓMICA

Los átomos o moléculas que son excitados a altos niveles de energía pueden caer a niveles más bajos emitiendo radiación (emisión o luminiscencia). Para los átomos excitados por una fuente de energía a alta temperatura esta emisión de luz es comúnmente llamada emisión atómica y óptica (espectroscopia de emisión atómica) y para los átomos excitados con radiación electromagnética, es llamada fluorescencia (espectroscopia de fluorescencia atómica, AFS).

En AFS, un átomo neutro en fase gaseosa es capaz de emitir un fotón, tras haber sido excitado mediante la absorción de otro fotón proveniente de una fuente de radiación intensa. Existen tres tipos de transiciones, principalmente: de resonancia, Stokes y anti-Stokes.

En el primer caso (**Figura 9a**), los niveles energéticos basales y excitados involucrados en los fenómenos de absorción y emisión son los mismos. Sus líneas de emisión son las más intensas, debido a que estas transiciones son las más probables. En las transiciones no resonantes (Stokes y anti-Stokes), los fotones absorbidos y emitidos tienen distinta energía.

En la transición Stokes (**Figura 9b**), el átomo absorbe radiación y pasa del estado basal a un estado excitado 2, seguido por fluorescencia para quedar en un estado excitado intermedio y finalmente llegar al estado basal a través de un fenómeno no radiante. En la transición anti-Stokes, se llega a un estado excitado 1 a través de un fenómeno no radiante y al estado excitado 2 por absorción de radiación, donde al regresar a su estado basal se emite fluorescencia (**Figura 9c**). Las líneas fluorescentes no resonantes se utilizan generalmente cuando la excitación es por láser (98).

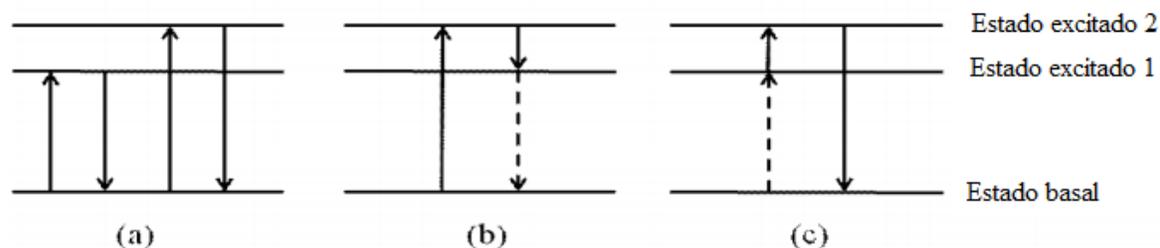


Figura 9. Diagrama simplificado de niveles de energía para ilustrar AFS
a) transición de resonancia, b) transición Stokes y c) transición anti-Stokes. Líneas continuas, absorción o emisión de radiación; líneas discontinuas, procesos no radiantes.

Las técnicas analíticas basadas en la fluorescencia atómica se han aplicado a la determinación de metales y metaloides en materiales como aceites lubricantes, agua de mar, muestras geológicas, metalúrgicas, clínicas, ambientales, agrícolas, alimentos, etc. (99).

1.7.5.1 INTENSIDAD DE FLUORESCENCIA (IF)

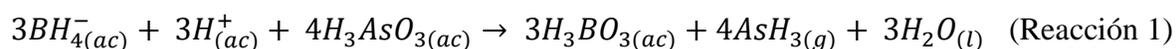
La Intensidad de Fluorescencia (IF) es la medida de la luz emitida por una molécula fluorescente (fluoróforo) tras ser excitada por un haz de fotones de mayor intensidad y con una longitud de onda menor. Una molécula es excitada por la radiación producida por una fuente y filtrada a una longitud de onda específica por un sistema monocromador.

La muestra excitada emite radiación, normalmente con menor energía y a una longitud de onda mayor que la radiación de excitación y fluoresce durante microsegundos tras la excitación. La radiación emitida es filtrada, recogida y detectada por un tubo fotomultiplicador (PMT), y es cuantificada en unidades de intensidad de fluorescencia

En ausencia de autoabsorción, la intensidad de fluorescencia (IF) es directamente proporcional a la concentración (C) de la sustancia absorbente, pero solo a concentraciones relativamente bajas (99).

1.7.6 SISTEMA DE GENERACIÓN DE HIDRUROS

Las técnicas de generación de hidruros representan un método para introducir como un gas muestras que contienen compuestos volátiles de algunos elementos como son arsénico, antimonio, estaño, selenio, bismuto y plomo en un atomizador. Tal procedimiento reduce los límites de detección para estos elementos, aumentando la sensibilidad por un factor de 10 a 100. Los hidruros volátiles se generan al añadir una disolución acuosa acidificada de la muestra a un pequeño volumen de una disolución acuosa al 1% de borohidruro de sodio contenida en un recipiente de vidrio. Una reacción característica es como se muestra en la Reacción 1:



El hidruro volátil (arsina AsH_3) se arrastra hacia la cámara de atomización mediante un gas inerte. La cámara es por lo regular un tubo de sílice calentado entre 300 a 450°C, un horno de tubo o en una flama donde tiene lugar la descomposición del hidruro, lo que da lugar a la formación de átomos del analito. La concentración del analito se mide entonces por absorción o emisión. La señal tiene una forma de pico similar a la que se obtiene con la atomización electrotérmica (99).

1.7.7 CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA EFICIENCIA (HPLC, HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY)

La cromatografía es una técnica instrumental (Mikhail Tswett, 1906) que ha evolucionado enormemente en los últimos años desde la década de los setenta, inicialmente concebida como método de separación, ha llegado a convertirse en una fuente inagotable de métodos de análisis (100).

El proceso cromatográfico contempla la separación de los componentes de una mezcla, para ello, una muestra de la mezcla (o el extracto de una muestra) será disuelta en una fase móvil (en este caso un líquido). La fase móvil es impulsada a través de una fase estacionaria, que debe ser inmisible con ella, y que debe de ser sólida (cromatografía líquido-sólido) (100, 101).

Las fases estacionarias son seleccionadas de tal forma que los componentes de las muestras presenten diferencias en cuanto a sus propiedades fisicoquímicas (solubilidad, tamaño, fuerza iónica, polaridad, afinidad, etc.) para cada fase. Las interacciones químicas entre la fase móvil y la muestra, y entre la muestra y la fase estacionaria, determinan el grado de migración y separación de los compuestos contenidos en la muestra (102). Como resultado de estas diferencias en la movilidad de los componentes de una muestra estos se separarán uno de otro (100).

En la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés), la muestra es inyectada en el seno de la fase móvil, donde es soluble, y es transportada a través de una columna por el flujo continuo de fase móvil a alta presión. La fase estacionaria está formada por partículas de pequeño diámetro, por tanto, con una gran superficie de interacción, contenidas en la columna. Este proceso cinético es conocido con el nombre de elución. La velocidad a la que un analito se mueve a través de la columna, con respecto a los demás presentes en la mezcla, está determinada por el tiempo que permanece en la fase móvil.

Los instrumentos modernos para la cromatografía de líquidos de alta resolución están equipados a menudo con válvulas de alimentación que introducen los solventes desde dos o más recipientes a una velocidad que varía en forma continua (**Figura 10**). La relación de volumen de los solventes se puede modificar lineal o exponencialmente con el tiempo.

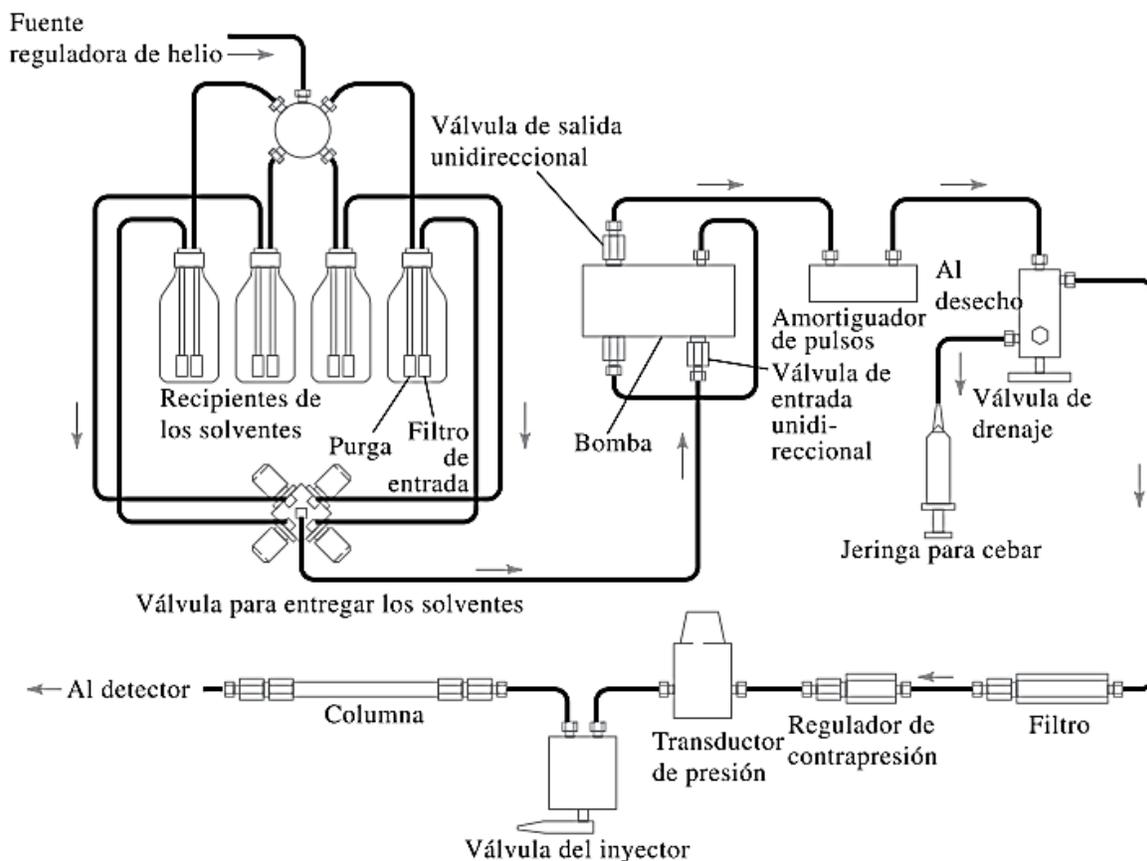


Figura 10. Diagrama esquemático que muestra los componentes de un HPLC (99).

1.7.8 CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA EFICIENCIA EN FASE REVERSA

Todas las formas de cromatografía de líquidos son procesos de migración diferencial, donde los componentes de la muestra son selectivamente retenidos por una fase estacionaria y eluidos secuencialmente mediante el cambio de polaridad de la fase móvil. En la cromatografía de fase reversa se utiliza una fase estacionaria de partículas de sílice químicamente modificadas con hidrocarburos saturados, insaturados o aromáticos de diferentes tipos, usualmente un grupo funcional octadecilo u octilo que convierte a la fase estacionaria en una matriz apolar y una fase móvil polar con ello la cromatografía en fase reversa permite separar moléculas en base a su polaridad. Para este tipo de cromatografía se emplean mezclas de solventes polares, tales como agua, acetonitrilo, acetato de etilo, acetona y alcoholes alifáticos.

Las moléculas se retienen en la columna en función de las interacciones hidrofóbicas que establecen con la sílice modificada. Aunque las interacciones hidrofóbicas son en general bastante débiles, son también a menudo muy numerosas y para eluir las moléculas es necesario disminuir la polaridad del disolvente; para ello se puede substituir el agua de la

fase móvil con un solvente orgánico cuya concentración se va aumentando gradualmente (103).

1.7.9 ESPECIACIÓN QUÍMICA DE LOS COMPUESTOS ORGANOARSENICALES

Es de suma importancia la especiación de los compuestos organoarsenicales, ya que de ello depende su destino y el posible impacto en los procesos ambientales. Los valores de pKa para los compuestos organoarsenicales se presentan en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Constantes de disociación ácidas para los compuestos organoarsenicales

<i>Compuesto</i>	<i>pK_{a1}</i>	<i>pK_{a2}</i>	<i>pK_{a3}</i>	<i>Referencia</i>
<i>Ácido p-arsanílico</i>	2.00	4.00	8.90	(104)
<i>Carbarsona</i>	3.80	8.10	-	(58)
<i>Nitarsona</i>	2.20	7.78	-	(105)
<i>Roxarsona</i>	3.45	5.95	9.15	(105)

La carbarsona, nitarsona, y roxarsona son especies neutras a pH por debajo de pK_{a1}; la primera constante de disociación ácida para estos tres compuestos es en el rango de pH de 2.20 a 3.45. A mayor pH, estas se convierten en especies aniónicas debido a la desprotonación de los grupos carboxilo y arseniato que tienen en su estructura.

En el caso del ácido p-arsanílico al trabajar en valores de pH por debajo de su pK_{a1}, el grupo amino de la estructura química se encuentra protonado de tal forma que la carga neta en la molécula será positiva; a valores de pH entre su pK_{a1} y pK_{a2} el grupo hidroxilo está desprotonado y el grupo amino protonado dando una carga cero en la estructura; a valores superiores del pK_{a2} el grupo hidroxilo y amino se encuentran desprotonados siendo la carga neta negativa. El grado de disociación de los compuestos organoarsenicales afecta la interacción con sólidos, suelo, agua, y su reacción a través de medios fotolíticos y acumulación en los organismos vivos. Estas propiedades también influyen en la selección de los métodos de extracción para el análisis de los compuestos organoarsenicales (58).

1.7.10 DERIVATIZACIÓN

Uno de los pasos para el desarrollo de técnicas analíticas es el tratamiento de la muestra, es una etapa crucial para el análisis de muestras complejas y constituye uno de los pasos más importantes del proceso analítico, dado que permite convertir la matriz original en una simple y acorde para el análisis; para ello se llevan a cabo diversos procesos que tienen como objetivo la remoción de interferencias, aumentar la concentración del analito, incremento de la robustez del método haciéndolo independiente de las variaciones de la matriz y también

transformar al elemento estudiado en una especie apta para su detección o separación, este último aspecto se conoce como derivatización (106).

La derivatización es una técnica que implica una reacción química entre el analito y un reactivo para cambiar las propiedades químicas y físicas del mismo. La derivatización es comúnmente aplicada sobre todo en Cromatografía de Gases (CG) con la finalidad de obtener especies más volátiles y no emplear temperaturas demasiado altas que puedan descomponer los analitos en el equipo o también con la finalidad de insertar un grupo funcional a la estructura de la molécula de estudio que aumente su resolución y sensibilidad en la detección.

La derivatización suele llevarse a cabo en disolución, es decir, las muestras acuosas son mezcladas directamente con la disolución del reactivo, formándose derivados más adecuados para su aislamiento y preconcentración, así como para su detección (107).

Dada la afinidad del arsénico para formar enlaces fuertes con azufre, muchos métodos para el análisis por GC se han desarrollado utilizando diversos mercaptanos tales como 1-etanotiol, 1-propanotiol (108), 2,3-dimercapto-1-propanol (109), toluen-3,4-ditio (110) tioglicol metilato (111) metiltioglicolato, etiltioglicolato, 1,3-propanoditio y 1,5-pentanoditio (112). Diversos trabajos reportados en la literatura, concuerdan que el mejor agente derivatizante para los compuestos orgánicos de arsénico tales como MMA, DMA y roxarsona es el 1,3-propanoditio (113, 114). En la **Figura 11** se muestra la reacción típica de derivatización utilizando 1,3-propanoditio.

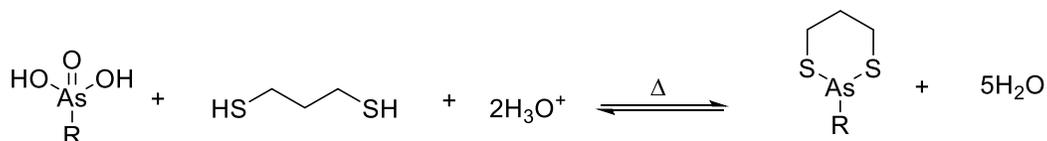


Figura 11. Reacción general de derivatización con 1,3-propanoditio

1.7.11 CROMATOGRAFÍA DE GASES

Como ya se ha mencionado en la sección 1.7.7 la cromatografía es una técnica que permite separar los diferentes componentes de una matriz basada en el intercambio de los solutos entre 2 fases.

En cromatografía de gases (CG), la muestra se volatiliza y se inyecta en una columna cromatográfica a una temperatura controlada. La elución se produce por el flujo de una fase móvil de gas portador (químicamente inerte), la fase móvil no interacciona con las moléculas del analito cuya única función es la del transporte de este a través de la columna. El helio es el gas para fase móvil más común, pero también se usan argón, nitrógeno e hidrógeno. En este punto se produce la separación de los componentes de la mezcla por medio de un mecanismo de partición (cromatografía de gas-líquido) o de adsorción (cromatografía gas-

sólido), que finalmente son determinados gracias a un detector que amplifica la señal integrándola y dando lugar a los resultados analíticos. Una clave para que se lleva a cabo la separación es la presión de vapor de los compuestos que en terminaos generales a mayor presión de vapor menor será el tiempo de retención en la columna (115).

Existen fundamentalmente dos tipos de cromatografía de gases:

- Cromatografía Gas-Sólido (CGS) cuya fase estacionaria es un sólido y el tipo de equilibrio con la fase móvil es una adsorción.
- Cromatografía Gas-Líquido (CGL) cuya fase estacionaria es un líquido adsorbido sobre un sólido, el equilibrio lo marca el coeficiente de reparto.

Esta técnica ha sido la más empleada por exactitud, sensibilidad y reproducibilidad, dado que permite la separación e identificación de mezclas complejas al proporcionar información estructural cuando el detector es un espectrómetro de masas (116).

Los componentes básicos de cromatografo de gases acoplado a espectrometría de masas se muestran en la **Figura 12** y los cuales son (117):

- ✓ Gas portador. Su propósito es transportar los componentes volátiles de la muestra a través de la columna. El gas es inerte y no reacciona con la muestra y la fase estacionaria.
- ✓ Puerto de inyección. Existen tres técnicas de inyección de muestras (gas o líquido) las cuales son modo Split, Split-less y on column. Tanto en el modo Split y Split-less se inyecta y vaporiza la muestra en una cámara de vaporización, pero en el modo Split solo se envía una pequeña fracción de la muestra a la columna y en el modo Split-less toda la muestra es dirigida a la columna, de tal forma que el modo Split-less es adecuado para el análisis de trazas o de componentes muy volátiles. Por otro lado, la técnica on column se lleva a cabo en frío, eliminando la etapa de vaporización, principalmente para evitar una descomposición de compuestos termolábiles.
- ✓ Columna y horno. Se utilizan principalmente dos tipos de columna, las empacadas y las capilares, su longitud puede variar entre 5 a 100 m. Normalmente se configuran como helicoides con diámetros de 10 a 30 cm, para poder colocarse en un horno termostatzado. El horno termostatzado proporciona tantos programas de aumento constante de temperatura (isotérmica) o definidas (rampa de temperatura) para un control práctico de la temperatura ya que es una variable importante para la separación de los compuestos de la matriz.
- ✓ Detector. Es un dispositivo que mide la concentración de cada uno de los componentes de la muestra y genera una señal eléctrica proporcional a la concentración.

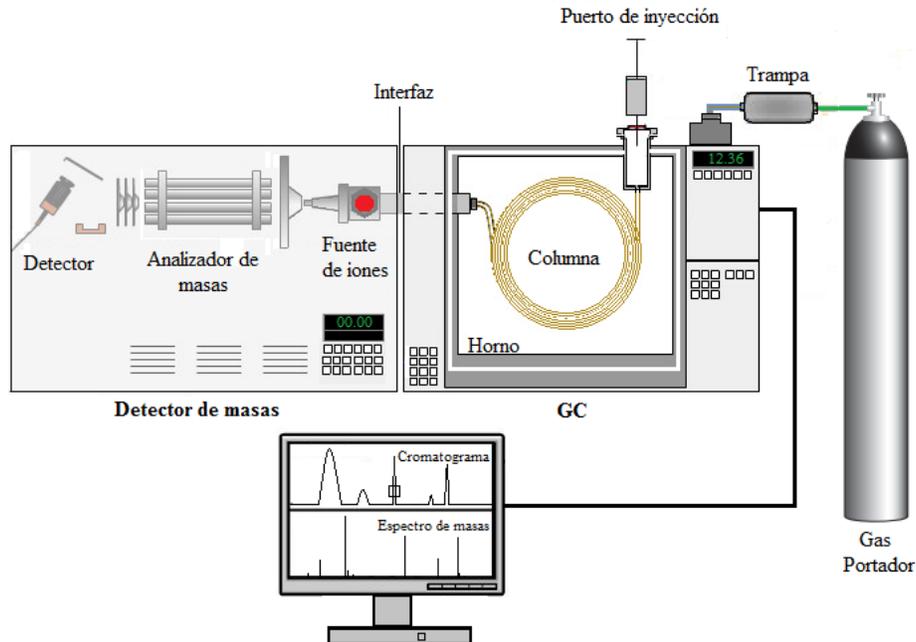


Figura 12. Diagrama esquemático del sistema GC-MS

1.7.12 DETECTOR DE ESPECTROMETRÍA DE MASAS

El espectrómetro de masas es considerado uno de los detectores más potentes para la cromatografía de gases. El espectrómetro de masas debe de ser capaz de desempeñar cuatro funciones:

- ✓ Ionización de la muestra.
- ✓ Aceleración de los iones por un campo eléctrico.
- ✓ Dispersión de los iones según su masa/carga.
- ✓ Detección de los iones y producción de la correspondiente señal eléctrica.

Para desempeñar estas funciones el espectrómetro debe de constar de cuatro partes independientes (**Figura 13**):

- ✓ Un sistema para la introducción de la muestra.
- ✓ Una fuente de iones.
- ✓ Analizador de masas.
- ✓ Sistema detector y adquisición de datos.

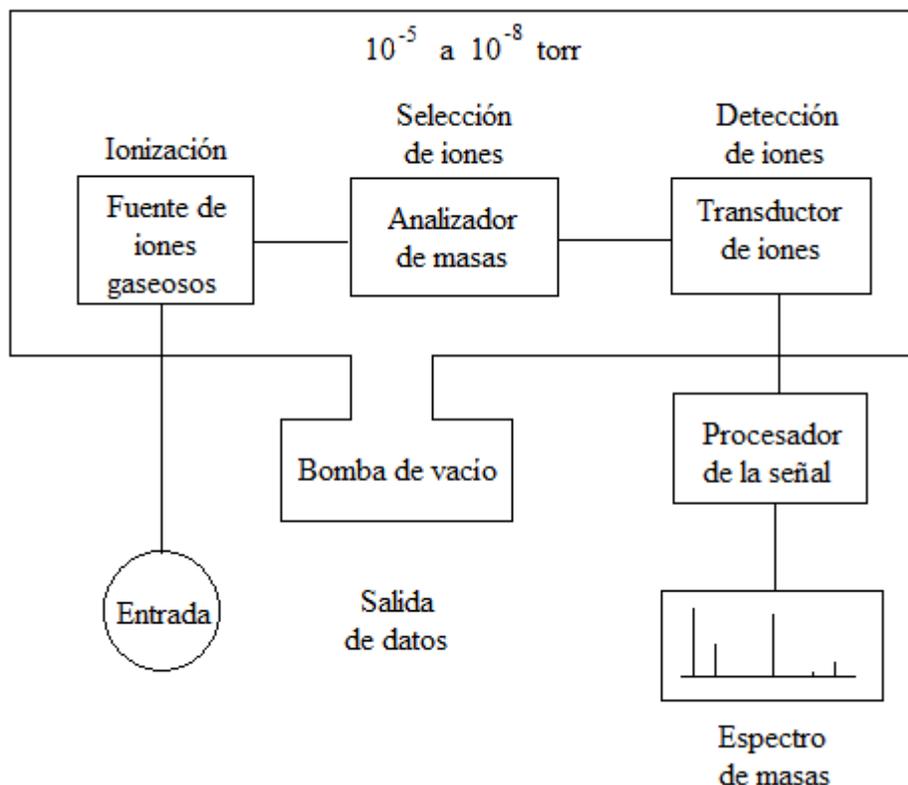


Figura 13. Componentes de un espectrómetro de masas.

El objetivo del sistema de entrada es la introducción de una cantidad pequeña de la muestra en la fuente de iones, donde los componentes de la muestra son transformados en iones gaseosos gracias al bombardeo con electrones, fotones, iones o moléculas. Otra manera de lograr la ionización es aplicar energía térmica o eléctrica. Lo más habitual de la salida de la fuente de iones es un flujo de iones positivos o también iones negativos gaseosos que son acelerados en el analizador de masas.

La función del analizador de masas es que se lleve a cabo la separación de los iones producidos por diferentes métodos en una fuente de iones, de acuerdo a su relación masa-carga (m/z) para que puedan llegar al detector.

Un espectrómetro de masas contiene un transductor que convierte el haz de iones en una señal eléctrica que pueda ser procesada, almacenada y mostrada. Los espectrómetros de masas requieren un complejo sistema de vacío para mantener una presión baja para asegurar las colisiones no frecuentes para producir y conservar iones y electrones libres (99).

El trabajo realizado en esta tesis se basa en la metodología analítica de GC-MS con una fuente de iones por impacto de electrones, analizador de cuadrupolo (Q) y multiplicador de electrones, el siguiente apartado se centrará en estos elementos.

1.7.12.1 ANALIZADOR DE MASAS

En la ionización por impacto de electrones la muestra entra en la fuente desde la interfaz de GC-MS donde los electrones emitidos por un filamento entran a la cámara de ionización que es guiado por un campo magnético. Los electrones son emitidos por un filamento caliente de tungsteno o renio y se aceleran por un potencial de aproximadamente 70 eV que son aplicados entre el filamento y el ánodo. Los electrones de alta energía interactúan con las moléculas de la muestra, ionizándolas y fragmentándolas. El voltaje positivo empuja los iones positivos y pasan a través de varias lentes electrostáticas concentrando los iones en un haz apretado que es dirigido hacia el analizador de masas.

La parte principal de un instrumento cuadrupolar son las cuatro barras cilíndricas de sílice fundida (cuarzo) recubiertas con una fina capa de oro acomodadas en paralelo y conectadas de manera opuestas, de ellas un par están conectadas al polo positivo y otro par están al polo negativo. A cada par de barras se les aplica voltajes variables de corriente. Para la obtención de un espectro de masas los iones son acelerados en el espacio entre las barras mediante una diferencia de potencial de 5 a 10 V. Todos los iones que tengan un determinado valor de m/z llegan al transductor y los demás iones chocan con las barras y se convierten en moléculas neutras (**Figura 14**) (99).

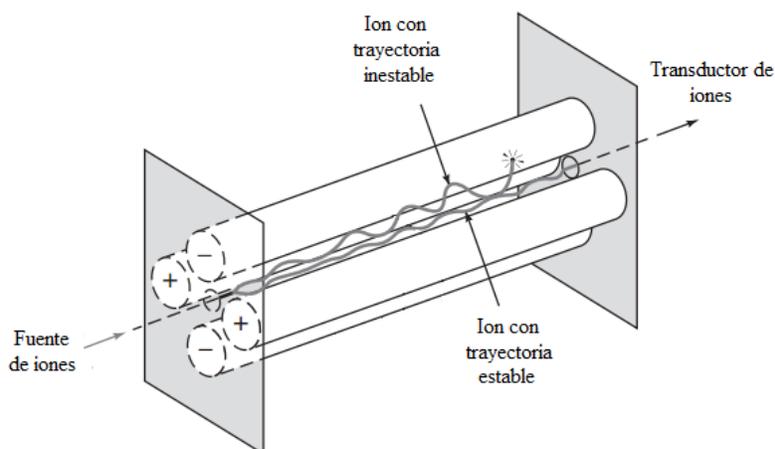


Figura 14. Espectrómetro de masas cuadrupolar.

El detector en el analizador es un dínodo conversor de alta energía (HED) acoplado a un multiplicador de electrones (EM) el cual recibe los iones que han pasado a través del analizador de masas y son golpeados por el dínodo, el cual genera una señal eléctrica proporcional al número de iones que lo golpean. Los electrones secundarios del dínodo son acelerados y enfocados hacia un segundo dínodo, el cual también emite electrones secundarios, de ese modo la amplificación es llevada a través de un efecto “cascada”(99).

II. ANTECEDENTES

2.1 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS ORGANOARSENICALES

Liu *et al.* (2015) desarrollaron un método de extracción enzimática para la determinación de ácido N-acetil-4-hidroxi-m-arsanílico (NAHAA), arseniato, arsenito, roxarsona, arsenobetaína (AsB), MMA y DMA en muestras de carne de pollo por HPLC-ICP-MS y HPLC-ESI-MS. Para la extracción se pesó 0.3 g de muestra y se agregaron 30 mg de papaína y 5 mL de agua desionizada. La extracción fue asistida por ultrasonido durante dos ciclos de dos min. Posteriormente, la muestra se incubó en un baño maría a 60°C durante seis horas. El sobrenadante se analizó por HPLC. En este trabajo se reportaron porcentajes de extracción de 88% para arsénico total en las muestras de estudio (118). El análisis de muestras de pollos que reciben alimentación que contenía roxarsona mostró la presencia de: (concentración en $\mu\text{g}/\text{kg} \pm$ desviación estándar) AsB (10 ± 4), As (III) (113 ± 7), As (V) (7 ± 2), MMA (51 ± 5), DMA (64 ± 6) y roxarsona (18 ± 1), además de cuatro especies de arsénico no identificadas con una concentración aproximada entre 1-10 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Huang *et al.* (2014) determinaron las especies de As (III), As (V), DMA, MMA, 3-A-HPA (ácido 3-amino-4-hidroxi fenil arsónico), 4-HPAA (ácido 4-hidroxi fenil arsónico) y ROX en muestras de suelo, fertilizante del tipo gallinaza y diferentes vegetales recogidos después de 33,48, 50, 54 y 68 días de crecimiento donde se empleó gallinaza como fertilizante mediante la técnica de HPLC-HG-AFS. Para la extracción de estas especies en muestras de suelo y gallinaza se utilizó 10 mL de H_3PO_4 0.1 M/ NaH_2PO_4 0.1 M (1:9 v/v) y agua para el los vegetales y se puso en baño maría a 50°C durante 10 h. El sobrenadante se pasó a través de un cartucho C_{18} para la remoción de pigmentos y compuestos orgánicos hidrofóbicos. El filtrado se liofilizó y se disolvió en agua y se analizó por HPLC-HG-AFS. Las recuperaciones de las especies de arsénico estudiadas estuvieron en un rango de 45.8 a 98.8% en gallinaza, de 60.3 a 104.1% en suelos, de 58.6 a 99.1% en los brotes de los vegetales y de 60.1 a 96.5% en raíces de vegetales. Los resultados reflejan que el As podría ser absorbido por los vegetales a través de la roxarsona presente en la gallinaza que se emplea como fertilizante orgánico (19).

Yao *et al.* (2013 y 2012) separaron por HPLC-HG-AFS siete compuestos organoarsenicales entre ellos ROX, 3-A-HPA, 4-A-HPA, MMA, DMA, As (V) y As (III) en muestras de suelo, estiércol de pollo, plantas y muestras de alimentos balanceados. En las muestras de suelo y estiércol se pesaron 1.0 y 2.0 g de muestra respectivamente, y para la extracción de los compuestos organoarsenicales se utilizó 10 mL de $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4$ (0.1 M de PO_4^{3-}) (9:1 v/v) en baño maría a 55°C durante 10 h, pasando este tiempo se extrajo asistido por ultrasonidos durante 20 min, y se centrifugó a 4000 rpm durante 10 min. El sobrenadante fue separado y el residuo re-extraído con 5 mL de extractante. Los residuos de mezclaron y aforados a 20 mL y finalmente se filtraron las muestras. En el caso de las muestras de plantas el procedimiento fue igual, pero se utilizó agua para extraer 0.25 g de muestra. Las recuperaciones para ROX, 3-A-HPA, 4-A-HPA, MMA, DMA, As (V) y As (III) en muestras

de plantas fueron en el rango de 62.2 a 103.7%. En muestras de estiércol se reportaron recuperaciones entre 54.4 y 104% y para las muestras de suelo de 66.1 a 99.8% (119) y (120).

Liu *et al.* (2008) determinaron ROX y p-ASA por HPLC-HG-AFS en tres tipos de alimentos balanceados para animales, utilizando como agente extractante metanol al 20% (v/v) en agua. Para ello 1.0 g de muestra se le adicionó 75 mL del agente extractante, la extracción se realizó en baño de ultrasonido durante 15 min, seguido de 30 min en agitación, posteriormente la muestra se filtró. La evaluación de la recuperación de especies de arsénico por el método propuesto se llevó a cabo analizando muestras fortificadas, reportando porcentajes entre 77 a 83% (121).

Chen *et al.* (2011) utilizaron una mezcla de metanol/ácido acético (90:10, v/v) para la extracción de ROX, NIT y p-ASA en muestras de alimento balanceado y su posterior detección por HPLC-UV-Vis. Para la extracción cinco gramos de muestra se agitaron durante 15 min con el agente extractante, se sonicó en un baño ultrasónico durante 10 min y se centrifugaron. Al extracto obtenido se agregó sulfato de cobre (I) (Cu_2SO_4) al 2% para la precipitación de proteínas. El sobrenadante se pasó por un cartucho de intercambio aniónico fuerte (SAX, por sus siglas en inglés), se eluyó con 5 mL de ácido fórmico/metanol (5:95, v/v) y se evaporó hasta sequedad bajo una corriente de nitrógeno. El residuo seco se disolvió con 2 mL de una mezcla al 1% ácido acético/metanol (97:3, v/v). La evaluación de la recuperación del método se llevó a cabo analizando muestras fortificadas con roxarsona, nitarsona y ácido p-arsanílico reportando porcentajes de recuperación de los compuestos organoarsenicales del 81 a 91% (122).

Al igual que en los trabajos anteriores, Wang *et al.* (2011) determinaron p-ASA por HPLC-UV-Vis en alimento para ganado. Para la extracción se utilizó NaOH 25 mM, donde las muestras se dejaron por 30 min a baño maría a 50°C con agitación ocasional, se centrifugó a 3500 rpm por 10 min, pasándose el sobrenadante por un filtro de 1.2 μm y el sedimento se volvió a extraer dos veces con 20 mL de NaOH 0.025 M y se adicionaron al sobrenadante 5 mL una disolución de sulfato de cobre (1%, p/v) para precipitar las proteínas, por último se filtró a través de una membrana de nylon de 0.22 μm . Se reportaron porcentajes de recuperación de 93 a 98% (34).

Liu *et al.* (2013) desarrollaron un método para la cuantificación de ROX, p-ASA, As (III), As (V), DMA y MMA en muestras de sedimentos y suelos utilizando HPLC-ICP-MS. Para la extracción 0.5 g de muestra se extrajo con 5 mL de 0.5 M H_3PO_4 durante 16 h a temperatura ambiente. Posteriormente el sobrenadante se centrifugó a 5000 rpm y se filtró. Para evaluar el rendimiento de extracción, una muestra de suelo fortificado se preparó a partir del suelo que no contenía los analitos. Se reportaron en las muestras de estudio porcentajes de recuperación para As(III), DMA, MMA, As(V), ASA, y ROX de 101 ± 0.87 , 102 ± 2.8 , 101 ± 1.0 , 114 ± 3.3 , 102 ± 6.4 y $103\pm 2.6\%$, respectivamente (123).

2.2 MÉTODOS DESCRITOS PARA LA DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS ORGANOARSENICALES

Peng *et al.* (2014) determinaron arsenobetaína (AsB), As (III), DMA, As (V), 3-AHPAA, N-AHPAA, ROX y ácido 4-amino fenilarsónico (4-APAA) en muestras de hígado de pollo. Para la separación cromatográfica se utilizó una columna de intercambio aniónica PRP-X110S y dos fases móviles: a) 5% de metanol y b) una mezcla de bicarbonato de amonio 60 mM con 5% de metanol y pH 8.75, la detección se realizó de forma simultánea por espectrometría de masas con fuente de plasma acoplado inductivamente (ICP-MS) y por espectrometría de masas en tándem con ionización por electrospray (ESI-MS/MS). Los límites de detección reportadas con las dos técnicas fueron de 0.001 a 2.2 µg/L (124).

Jackson *et al.* (2011) determinaron ROX, p-ASA y sus precursores (MMA, DMA, arseniato y arsenito) en gallinaza utilizando como agente extractante agua. Las muestras se separaron por cromatografía iónica y detección en línea por ICP-MS. Se utilizaron tres diferentes columnas: la AS14 con un grupo funcional alquilo de amonio cuaternario utilizando como eluyente NaH₂PO₄ 0.01 M (pH 7.2), la AS16 con grupo funcional alcanol de amonio cuaternario y eluyente NaOH 0.05 M y la AS7 con grupo funcional alquilo de amonio cuaternario usando HNO₃ en concentraciones de 0.05 y 0.0025 M como eluyente. Los límites de detección fueron menores empleando las columnas AS16 y AS7 (<0.05 µg/L). La principal especie de arsénico detectada en el extracto acuoso de gallinaza fue roxarsona, además se encontraron concentraciones traza de DMA y As(V) (125).

Cui *et al.* (2012) utilizaron cromatografía de líquidos de alta resolución con generación de hidruros y oxidación ultravioleta acoplada a espectrometría de fluorescencia atómica (HPLC-UV-HG-AFS) para la determinación de p-ASA, ROX y NIT en muestras de tejido animal. Para la separación cromatográfica emplearon una columna en fase reversa C₁₈ con una fase móvil de 5:95, v/v metanol/KH₂PO₄ 0.050 M (con 0.1% v/v de ácido trifluoroacético) pH 1.67, un caudal de 1.2 mL/min reportando un tiempo de análisis de 20 min. Para la generación de hidruros se utilizó 20% KBH₄ al 5% de KOH. El límite de detección para p-ASA, NIT y ROX fue de 0.24, 0.74 y 0.41 µg/L, respectivamente (15).

Guo *et al.* (2013), emplearon cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) acoplada a un espectrómetro de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS) para determinar p-ASA, ácido 4-hidroxifenil arsónico (4-OH), ROX, ácido fenilarsónico (PAA), As(V) y ácido 4-nitrofenil arsónico (4-NPAA) en muestras de pollo y alimento balanceado. Las condiciones reportadas para la separación cromatográfica fueron el empleo de una columna CAPCELL PACK C₁₈ con fase móvil metanol/agua (5:95, % v/v), butanosulfonato de sodio 0.0025 M como par iónico y ácido malónico 0.01 M con un caudal de 1 mL/min a una temperatura de 55°C y tiempo total de análisis de 20 min. Se reportó un límite de detección para p-ASA de 10 ng/L, As(V) de 16 ng/L, 4-OH de 2.5 ng/L, 3-NHPA de 1.4 ng/L, PA de 3.1 ng/L y ROX de 2 ng/L (104).

Otro estudio sobre la determinación de los tres compuestos de estudio fue el realizado por Monasterio *et al.* (2011) que utilizaron cromatografía de líquido de fase reversa con pares

iónicos empleando detección por espectroscopia de fluorescencia atómica con sistema de generación de hidruros (IP-HPLC-HG-AFS) para la determinación de p-ASA, ROX y NIT en muestras de orina, carne y alimento balanceado. Este método de HPLC con elución isocrática utilizó una columna de fase reversa Zorbax SB-AQ C₁₈ con una fase móvil compuesta de una mezcla de ácido cítrico 0.020 M y hexanosulfonato de sodio 0.005 M con un caudal de 0.9 mL/min; para la foto-oxidación se utilizó como oxidante K₂S₂O₈ al 2% (p/v) en NaOH al 2% (p/v) y para la generación de hidruros se utilizó NaBH₄ al 1.1% (p/v) en NaOH al 1% (p/v). Los límites de detección para el p-ASA, ROX y NIT fueron de 0.6, 1.6 y 1.6 µg/L, respectivamente y el tiempo de análisis fue de 16 min (126).

Chen *et al.* (2011) determinaron ROX, NIT, p-ASA y CAR en muestras de alimento balanceado utilizando cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) con detección UV. En este trabajo se empleó cromatografía de fase reversa (columna Zorbax SB-Aq C₁₈ a temperatura de separación 40°C) con una fase móvil de ácido acético/ metanol al 1% (97/3 % v/v) a un caudal de 0.7 mL/min, volumen de inyección de 50 µL, y detección UV (260 nm) dando un tiempo total de análisis de 20 min. Los límites de cuantificación reportados en este trabajo fueron de 1 a 2 µg/g para los compuestos organoarsenicales (122).

Li *et al.* (2011) desarrollaron un método basado en la micro-extracción líquido-líquido-líquido y fibra hueca (HF-LLLME) combinado con determinación por electroforesis capilar y detector de ultravioleta (CE/UV) para la especiación de cinco compuestos organoarsenicales: PAA, 4-APAA, 4-H-PAA, ROX y 4-NPAA en muestras de pienso para cerdo, desecho de cerdos, suelos y agua. Para la separación se utilizó un capilar de sílice fundida con un diámetro interno de 50 µm y 48.5 cm de longitud a una temperatura controlada de 25°C. La detección fue a 210 nm. En la parte de la separación se utilizó 25 mM NaHCO₃ / Na₂CO₃ (1:1, % (v/v)) a pH 9.75 como electrolito de fondo. Con esta metodología se reportan límites de detección de 6.9 µg/L para 4-APAA, 1.56 µg/L para 4-NPAA, 11.8 µg/L para PAA, 5.6 µg/L para 4-HPAA y 10.2 µg/L para ROX (127).

Rosal *et al.* (2005) determinaron ROX y seis productos de degradación de este compuesto: As(III), As(V), DMA, MMA, 3-AHPAA y 4-HPAA en muestras de excreta de gallina mediante electroforesis capilar y detección por ICP-MS. Se utilizó un capilar de sílice fundida de 75 µm de diámetro interno y 120 cm de longitud. El método analítico empleó para la separación un buffer de fosfatos 20 mM a pH 5.7 (NaH₂PO₄-H₂O/Na₂HPO₄-7H₂O, 1:1, % (p/p) y se aplicó un voltaje de 30 kV. Los límites de detección reportados con la utilización de esta técnica fueron en un rango de 0.97 a 3.2 µg/L. El tiempo total de análisis reportado fue 15 min (128).

Roerdink *et al.* (2004) desarrollaron un método para la cuantificación de roxarsona y sus posibles metabolitos de degradación en muestras de aguas superficiales. El método desarrollado incluye una derivatización con 1,3-propanoditiol y separación por cromatografía de gases con detector de masas cuadrupolar en paralelo con trampa de iones (QIT-MS) y detector fotométrico de llama pulsante (PFPD). Para la separación cromatográfica se utilizó una columna MS CP-Sil 8 (30 m × 0.25 mm con 0.25 µm de película). El puerto de inyección se mantuvo a 250°C durante 1 min para la etapa de desorción. La temperatura inicial de la columna se mantuvo a 70°C durante 1 min luego pasando una rampa de 20°C/min hasta

165°C, seguido de 8°C/min hasta 213°C y finalmente 50°C/min para alcanzar 303°C donde se mantuvo durante 2 min (tiempo de análisis total 15.75 min). La temperatura en el detector de MS se mantuvo a 275°C. Con este método se reportaron límites de detección de 2.69 µg/L y recuperaciones de ROX de 103±10.9% en las muestras de agua superficial (113).

2.3 ANÁLISIS CRÍTICO

La determinación de ácido p-arsanílico (p-ASA), nitarsona (NIT) y roxarsona (ROX) en los piensos es crucial para comprender los mecanismos de transporte y destino final de estas especies de arsénico, así como su impacto al ambiente (58). Por lo cual es necesario implementar nuevas técnicas que permitan la extracción, separación y determinación de estos aditivos en matrices ambientales, que permitan ahorrar costos y tiempo de análisis. Para la extracción de compuestos organoarsenicales en diferentes matrices se han empleado solventes polares, asistido en algunos casos por ultrasonido, requiriendo tiempo largo para la extracción además que se requiere tratar nuevamente la muestra para mejorar los porcentajes de recuperación y el empleo de volúmenes grandes de disolventes (122, 129-132). Una alternativa dentro de los procedimientos de extracción lo constituye el uso de la extracción asistida por microondas (MAE, por sus siglas en inglés), que ha demostrado ser una herramienta rápida y sencilla que permite recuperaciones cuantitativas y reduce la cantidad de disolventes y muestras necesarias para la extracción, además de permitir el control de parámetros que afectan a la eficacia de extracción (temperatura, potencia y tiempo de extracción) para conseguir que el compuesto o compuestos de interés pasen de la muestra al disolvente adecuado. Además el uso de un sistema de recipientes cerrados otorga la ventaja que no se produzca contaminación o pérdida de compuestos volátiles durante la extracción (133).

Para el caso de la determinación, se reportan el uso de diferentes técnicas de separación y detección para estos compuestos en diferentes matrices, como es el caso de la cromatografía de líquidos de alta resolución con fase reversa con detector UV (HPLC-UV) para la determinación en alimento balanceado (122) este detector tiene la desventaja de que solo puede ser utilizados para sustancias que absorben en un rango de longitud de onda del UV-Vis, y que no es selectiva por la presencia de otros compuestos que absorban a la longitud de onda del analito. También se describe el uso de la cromatografía de líquidos de alta resolución acoplado a la espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo (HPLC-ICP-MS) para su aplicación en agua superficial, sedimentos y suelos cercanos a granjas de cerdos (123, 132, 134-136) que presenta las desventaja de altos costos de adquisición y mantenimiento y complejidad de uso del equipo. También se describe el uso de la electroforesis capilar acoplado a ICP-MS (128) y UV-Vis (127) que aunque es una técnica cromatográfica que presenta resolución cromatográfica comparada a la obtenida por cromatografía de gases, su aplicación a muestras reales se limitada por los efectos de matriz. De igual forma también se describe el uso de la cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (113), una de las limitaciones con la cromatografía de gases es que implica el uso de agentes derivatizantes para llevar a cabo la separación de compuestos

orgánicos polares, sin embargo, acoplada a detector de espectrometría de masas (GC-MS) permite una identificación inequívoca de los compuestos de estudio. Otra técnica descrita es la cromatografía de líquidos de alta resolución de fase reversa acoplada a un sistema de detección por espectrometría de fluorescencia atómica con sistema de generación de hidruros (HPLC-HG-AFS) que se ha utilizado para la determinación de estos componentes en diferentes matrices como muestras de hígado de cerdos y de pollos (15), pechuga de pollo (129) y alimento balanceado (120, 121), siendo esta técnica una alternativa que proporciona bajos costos de operación y mantenimiento además que presenta sensibilidades comparables con ICP-MS para la determinación de arsénico (137).

En base a lo anterior, se seleccionó la cromatografía de líquidos de alta resolución de fase reversa acoplada a un sistema de detección por espectrometría de fluorescencia atómica con sistema de generación de hidruros (HPLC-HG-AFS) como técnica de separación y detección de los compuestos organoarsenicales, pero además se seleccionó la cromatografía de gases acoplada a detector de espectrometría de masas (GC-MS) como técnica para la confirmación estructural de los analitos detectados. Así en este trabajo se propone el desarrollo de un método para la determinación de compuestos organoarsenicales en alimentos balanceados para animales que se produzcan en la industria forrajera de la región, este proyecto constó de un etapa de tratamiento de muestra con extracción asistida por microondas y un procedimiento de análisis que incluye tanto la determinación por HPLC acoplado a un detector de fluorescencia atómica con sistema de generación de hidruros o bien el empleo de la GC acoplado a espectrometría de masas para la identificación inequívoca de los compuestos organoarsenicales en el pienso.

III. APORTACIÓN CIENTÍFICA

Desarrollar un método de extracción asistido por microondas para su aplicación en la determinación de ROX, NIT y p-ASA en pienso, por espectrometría de fluorescencia atómica con sistema de generación de hidruros.

IV. HIPÓTESIS

El método de extracción asistida por microondas para la determinación ROX, NIT y p-ASA en muestras de pienso permite obtener porcentajes de recuperación $\geq 95\%$ en un tiempo ≤ 60 min.

V. OBJETIVO GENERAL

Desarrollar un método de extracción asistida por microondas para la determinación de NIT, ROX y p-ASA, en pienso proveniente de la industria de alimentos balanceados.

VI. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Obtener muestras de pienso de las industrias dedicadas a la fabricación y distribución dentro del área metropolitana de Monterrey.
2. Determinar el contenido total de arsénico mediante HG-AFS en las muestras de estudio.
3. Implementar una metodología de separación y detección de los compuestos ROX, NIT y p-ASA por HPLC/HG-AFS.
4. Evaluar, bajo las mismas condiciones, los agentes extractantes reportados en la literatura para la extracción de ROX, NIT y P-ASA en pienso.
5. Desarrollar un método de extracción asistida por microondas (MAE) para ROX, NIT y p-ASA en pienso.
6. Desarrollar una metodología alternativa de determinación de compuestos organoarsenicales por GC-MS.
7. Implementar un procedimiento de extracción alternativa para la determinación p-ASA en muestras de pienso compatible con GC-MS.
8. Comparar los métodos propuestos para la determinación de compuestos organoarsenicales.
9. Aplicar el procedimiento de extracción propuesto para la determinación de NIT, ROX y p-ASA en muestras de pienso.

VII. METODOLOGÍA

7.1 REACTIVOS

Tabla 4 Reactivos

Reactivo	Fórmula química	Pureza y casa comercial
<i>Ácido nítrico</i>	HNO ₃	grado ultratrazo, (Fisher scientific)
<i>Peróxido de hidrógeno</i>	H ₂ O ₂	grado ultratrazo, (Fisher scientific)
<i>Persulfato de potasio</i>	K ₂ S ₂ O ₈	pureza ≥99.9% (Sigma-Aldrich)
<i>Tiourea</i>	CH ₄ N ₂ S	pureza ≥99.0% (Sigma-Aldrich)
<i>Ácido L-ascórbico</i>	C ₆ H ₈ O ₆	grado reactivo (Sigma-Aldrich)
<i>Yoduro de potasio</i>	KI	pureza ≥99.5% (Sigma-Aldrich)
<i>Ácido fosfórico</i>	H ₃ PO ₄	pureza ≥99.0% (Sigma-Aldrich)
<i>Metanol</i>	CH ₃ OH	grado HPLC (M-TEDIA)
<i>Ácido acético glacial</i>	C ₂ H ₄ O ₂	grado ACS (FERMONT)
<i>CRM DORM-2</i>	Músculo de pescado	National Research Council, Canadá
<i>CRM BCR-279</i>	Lechuga marina	IRMM - Institute for Reference Materials and Measurements, Bélgica
<i>Roxarsona</i>	C ₆ AsNH ₆ O ₆	pureza 99.9% (Sigma-Aldrich)
<i>Nitarsona</i>	C ₆ H ₆ AsNO ₅	pureza 99.6% (Sigma-Aldrich)
<i>Ácido p-arsanílico</i>	C ₆ H ₈ AsNO ₃	pureza ≥99.0% (Sigma-Aldrich)
<i>Estándar de arsénico 1000 mg/L</i>	As ₂ O ₃	(Sigma-Aldrich)
<i>Sulfato de cobre (II)</i>	CuSO ₄	pureza ≥99.0% (Sigma-Aldrich)
<i>Agua grado reactivo analítico</i>	H ₂ O	resistividad de 18.0 MΩ cm ⁻¹ , Barnstead, Thermo Scientific
<i>Borohidruro de sodio</i>	NaBH ₄	pureza ≥99.0% (Sigma-Aldrich)
<i>1,3-propanoditiol</i>	HS(CH ₂) ₃ SH	pureza 99% (Sigma-Aldrich)
<i>N-Hexano</i>	C ₆ H ₁₄	≥95%, (Fluka Analytical)
<i>Metanol</i>	CH ₃ OH	99.99%, Fisher Scientific
<i>Ácido clorhídrico fumante</i>	HCl	37%, grado ACS, EMSURE
<i>Helio comprimido</i>	H ₂	≥ 99.999%, Alphagaz, Air Liquide España

7.2 MATERIALES Y EQUIPO

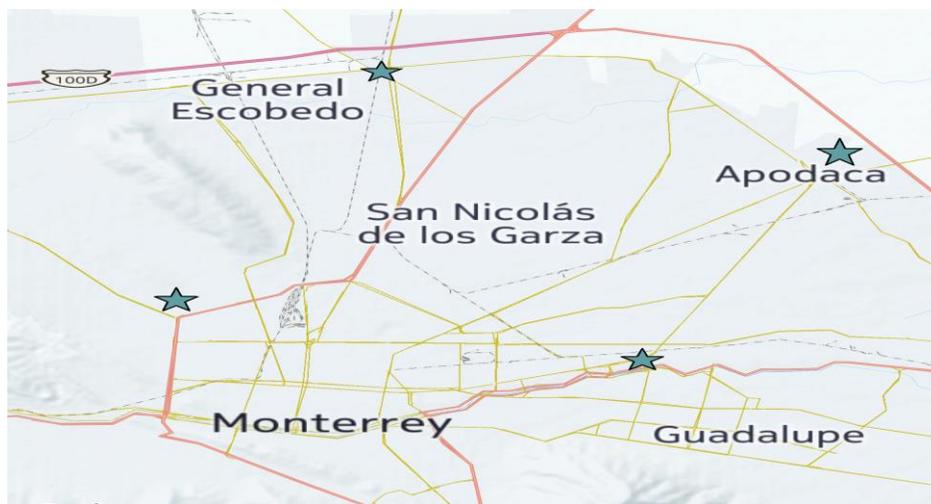
Tabla 5 Materiales y equipo

Material	Casa comercial y especificaciones
<i>Columna de fase reversa para HPLC</i>	Luna C ₈ , 5µm 150 x 4.60 mm, Phenomenex
<i>Guarda columna para HPLC C₈ fase reversa</i>	4 x 3 mm, Phenomenex
<i>Jeringa de inyección para HPLC</i>	capacidad 100 µL modelo 810, Hamilton
<i>Micropipetas</i>	capacidad de 200 µL y 1000 µL, BioPette, Labnet Inc.
<i>Baño de agua con agitación recíproca</i>	capacidad 14.5L, Thermo Scientific
<i>Filtros de disco</i>	de teflón adaptables a jeringa con tamaño de membrana de 0.45 µm, Phenomenex.
<i>Tubos de polipropileno</i>	capacidad de 15 y 50 mL, (Corning)
<i>Balanza analítica</i>	TP-214, Denver instruments
<i>Mortero y pistilo de porcelana</i>	100 mL, Coorstek
<i>Horno de microondas</i>	MARS 6, CEM
<i>Centrífuga</i>	ST 16, Thermo scientific
<i>Campana de humos</i>	CH 110, Prendo
<i>Barra de agitación magnética recubierta de PTFE</i>	8 mm largo x 3 mm diámetro, MAGC-008-030, Lab box
<i>Vial de 12x32mm. Rosca Corta HP. Vidrio Claro.</i>	0.3 mL., 8004-WM-H/i3µ, CromLab.
<i>Septa de Silicona/PTFE</i>	Blanca, 1 mm, G004-HP-CB-SWFR10, CromLab.
<i>Vial de vidrio transparente</i>	con tapa de melamina verde con revestimiento PTFE, 7 ml, 27150-U, SUPELCO
<i>Pipetas pasteur en vidrio</i>	230 mm
<i>Jeringa 5ml</i>	BD Plastipak.
<i>Filtro PVDF</i>	0.2 µm
<i>Micropipeta</i>	100–1,000 µL, 20-200 µL, Eppendorf research plus
<i>Balanza analítica AB204-S/FACT</i>	10 mg-220 g, METTLER TOLEDO
<i>Termómetro electrónico de contacto</i>	IKA ETS-D5
<i>Plancha de calentamiento</i>	IKA RCT basic
<i>Cromatografo de gases</i>	Agilent 6890N network GC system con detector selectivo de masas Agilent 5973 Network.
<i>Columna capilar DB-5MS</i>	(methyl 5% phenyl polysiloxane 30m × 0.25mm i.d. × 0.25µm) Agilent.

<i>Cromatógrafo de líquidos de alta resolución</i>	detector UV-Vis (Series 200, Perkin-Elmer)
<i>Módulo de bomba HPLC</i>	(SY-8100, Rayleigh Analytical Instrument Corporation)
<i>Espectrómetro de fluorescencia atómica con sistema de generación de hidruros</i>	AF-640, Rayleigh Analytical Instrument Corporation

7.3 OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE PIENSO

Las muestras comerciales de pienso se obtuvieron de diferentes establecimientos dedicados a la producción, distribución y venta de alimento balanceado ubicadas dentro del Área Metropolitana de Monterrey (AMM), tomando como criterio industrias que produzcan alimento balanceado, además que en el producto comercial se especifique la utilización de alguno de los agentes de engorda de estudio. La ubicación de los establecimientos donde se colectaron las muestras se observa en la **Figura 15**, se obtuvieron siete tipos de muestras de pienso correspondientes a alimentos para pollo de engorda, gallo de pelea, caballo y cerdo en engorda.



MUNICIPIO	FORRAJERA
MONTERREY	Forrajera “Las Espigas”
ESCOBEDO	Agronutrientes del Norte
APODACA	Forrajera Elizondo
GUADALUPE	Forrajera “La Milpa”

Figura 15. Ubicación de los Sitios de muestreo de pienso en el AMM.

7.3 PRETRATAMIENTO Y CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS

Las muestras de alimento balanceado para animales se pulverizaron utilizando un mortero y pistilo cerámico para la reducción del tamaño de partícula. El polvo obtenido se pasó a través de un tamiz (WS TYLER) con un tamaño de poro de 250 μm , al final las muestras se almacenaron en bolsas con cierre hermético y se almacenaron a temperatura controlada de 4°C hasta el momento de su análisis.

7.4 DETERMINACIÓN DE ARSÉNICO TOTAL Y COMPUESTOS ORGANOARSENICALES

Antes del empleo de los equipos de AFS para determinación de As total y de HPLC-HG-AFS para la separación de compuestos, se prepararon los estándares para la curva de calibración, en el caso de arsénico total de 8 puntos en un rango de 0-160 $\mu\text{g As/L}$ a partir de un estándar de 1000 $\mu\text{g As/L}$ (As_2O_3) que fue usada para la determinación de arsénico total por AFS-HG, utilizando en todos los casos agua nanopura (18.0 M Ω cm).

Para el análisis por cromatografía se prepararon estándares de 100 mg As/L de los compuestos en estudio pesando 35.5 mg de la sal, en el caso de roxarsona ($\text{C}_6\text{AsNH}_6\text{O}_6$), 32.8 mg en el caso de nitarsona ($\text{C}_6\text{H}_6\text{AsNO}_5$) y 29 mg en el caso del ácido p-arsanílico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{AsNO}_3$) obtenidos de Sigma-Aldrich y aforados a 100 mL con agua.

En el caso de la especiación de arsénico por HPLC-HG-AFS se preparó una curva de calibración de 8 puntos en un rango de 0 a 1000 $\mu\text{g As/L}$ tomando alícuotas de cada estándar de los compuestos preparados anteriormente y de 6 puntos en un rango de 0 a 1200 $\mu\text{g As/L}$ para el caso de especiación en HPLC/UV-Vis. En todos los casos para la preparación de los reactivos se utilizó agua nano pura 18.0 M Ω cm.

Para la validación del método analítico se tomó en cuenta el cálculo del coeficiente de correlación utilizando el software de Excel 2013 (Microsoft), además se calcularon los límites de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ) en base a lo descrito por Ellison en 2009 (138) utilizando las siguientes ecuaciones:

$$LOD = s \times \frac{3.3}{b} \quad (\text{Ecuación 1})$$

$$LOQ = s \times \frac{10}{b} \quad (\text{Ecuación 2})$$

Donde:

b = pendiente de la curva de calibración.

s = desviación estándar (medición de 10 blancos reactivos).

La preparación del borohidruro 2% p/v con NaOH 0.2% p/v se realizó pesando 5.0 g de (NaBH₄ pureza ≥99.0% Sigma-Aldrich), se agregaron 0.5 g de NaOH para asegurar la estabilidad del borohidruro de sodio y se aforó con agua nano pura a 250 mL. En el caso de la preparación de HCl al 10% v/v se pipeteo una alícuota de 50 mL de HCl_{conc.} y se aforó a 500 mL con agua nano pura. El reactivo de persulfato de potasio (K₂S₂O₈) al 2% v/v con NaOH 0.2% p/v se preparó pesando 5 g de la sal y 0.5 g de NaOH para asegurar la estabilidad del reactivo, finalmente se aforó a 250 mL. En el caso de la mezcla de KI al 12%/tiourea al 10% (1:1 v/v) se pesaron 6.0 g de KI y 5.0 g de tiourea y se aforó a 50 mL. Finalmente, para la preparación de la fase móvil se tomó un alícuota 20 mL ácido acético glacial (C₂H₄O₂) y se aforó a 1 L, de igual forma se tomaron 40 mL de metanol (CH₃OH) y se mezclaron en una relación de 96% ácido acético/4% metanol, seguido de la desgasificación en baño de ultrasonido durante 30 min.

7.5 PROCEDIMIENTO ANALÍTICO

7.5.1 DIGESTIÓN ÁCIDA ASISTIDA POR MICROONDAS (MAD)

Para la determinación de As total se realizó una modificación del método 3052 (139) descrito por la Agencia de Protección Ambiental de USA (EPA, por sus siglas en inglés) que describe el procedimiento de digestión ácida asistida por microondas; para ello se utilizaron inicialmente 0.25 g de pienso, 2.5 mL de HNO₃_{conc.} y 2.5 mL de HCl_{conc.} Posteriormente, las condiciones fueron modificadas para mejorar los resultados de digestión. En la etapa de digestión MAD se utilizó el programa de digestión descrito en la **Tabla 6**.

Tabla 6. Programa de digestión empleado para las muestras: 0.2 g de muestra, 3 mL de HNO₃_{conc.}, 1 mL de HCl_{conc.} y 1 mL de H₂O₂

<i>Etapa</i>	<i>Temperatura (°C)</i>	<i>Tiempo (min)</i>
<i>Pre-digestión</i>	20	15
<i>Rampa de calentamiento</i>	temperatura ambiente a 210	20
<i>Digestión</i>	210	10
<i>Enfriamiento</i>	210 a temperatura ambiente	30

7.5.2 CUANTIFICACIÓN DE ARSÉNICO TOTAL

Las muestras digeridas se recuperaron y diluyeron a un volumen final de 50 mL con agua nanopura, se centrifugaron durante 10 min a 8,000 rpm; posteriormente del sobrenadante se tomó una alícuota de 1 mL, a la que se le adicionó 1 mL de la mezcla de tiourea al 10% (p/v) /KI 10% (p/v), y se aforó a un volumen de 5 mL con agua nanopura. La mezcla se dejó reaccionar durante 30 min. Finalmente se determinó el contenido de arsénico total por HG-AFS bajo las condiciones descritas en la **Tabla 7**. Cada muestra se analizó por triplicado y se midió un blanco reactivo.

Tabla 7. Condiciones para la determinación de arsénico total por HG-AFS.

<i>Reductor</i>	Mezcla de KI al 10%-tiourea al 10% (1:1 v/v)
<i>Acarreador</i>	HCl al 10%(p/v) a 3.0 mL/min
<i>Generación de Hidruros</i>	NaBH ₄ al 2% (p/v) en 0.5% (p/v) de NaOH, 3.0 mL/min
<i>Lámpara</i>	Cátodo hueco de As (193.7 nm)
<i>Voltaje PMT</i>	280 V
<i>Corriente lámpara</i>	100 mA
<i>Temperatura de atomización</i>	300 °C
<i>Tipo de atomización</i>	Flama
<i>Gas acarreador</i>	Argón (600 mL/min)

En la parte de medición de As total, se midieron una serie de estándares de arsénico en el equipo de HG-AFS, y se obtuvo la intensidad de fluorescencia (IF) para arsénico medido en función de la concentración de los estándares. A partir de los datos obtenidos se calculó aplicando el modelo de regresión por el método de mínimos cuadrados (Ecuación 3):

$$y = mx + b \quad (\text{Ecuación 3})$$

Donde b es la ordenada al origen, y m es la pendiente de la recta, x es la variable independiente (concentración de As) y y es la variable dependiente (IF). Para determinar una concentración desconocida c_x a partir de la ecuación de la recta, se obtiene y_x que es el valor de la respuesta del instrumento para la concentración de As en la muestra, y la pendiente y la ordenada al origen se usan para calcular la concentración desconocida c_x como se muestra en la Ecuación 4:

$$c_x = \frac{y_x - b}{m} \quad (\text{Ecuación 4})$$

7.5.3 VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE ARSÉNICO TOTAL EN ALIMENTO BALANCEADO PARA ANIMALES

Se llevó a cabo mediante el análisis de dos materiales de referencia certificado (CRM, por sus siglas en inglés): el DORM-2 y BCR-279 cuyos valores certificados para arsénico total se describen en las **Tablas 8 y 9**, respectivamente. En los materiales de referencia certificados se realizó el procedimiento de digestión ácida asistida por microondas descrito en la sección 7.5.1 para las muestras de alimento balanceado.

Tabla 8. Valores certificados del CRM BCR-279

<i>Elemento</i>	Valor certificado mg/kg±I.C.*
<i>Arsénico</i>	3.09±0.21
<i>Cadmio</i>	0.274±0.022
<i>Cobre</i>	13.1±0.4
<i>Plomo</i>	13.1±0.4
<i>Selenio</i>	0.59±0.04
<i>Zinc</i>	51.3±1.2

* I.C.=Intervalo de confianza, nivel de confianza del 95% |

Tabla 9. Valores certificados del CRM DORM-2

<i>Elemento</i>	Valor certificado mg/kg±I.C.*
<i>Aluminio</i>	10.9±1.7
<i>Arsénico</i>	18±1.1
<i>Cadmio</i>	0.043±0.008
<i>Cobalto</i>	0.182±0.031
<i>Cromo</i>	34.7±5.5
<i>Cobre</i>	2.34±0.16
<i>Hierro</i>	142±10
<i>Plomo</i>	0.065±0.007
<i>Manganeso</i>	3.66±0.34
<i>Mercurio</i>	4.64±0.26
<i>Níquel</i>	19.4±3.1
<i>Selenio</i>	1.4±0.09
<i>Plata</i>	0.041±0.013

* I.C.=Intervalo de confianza, nivel de confianza del 95% |

7.5.4 METODOLOGÍA PARA LA SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA DE ROXARSONA, NITARSONA Y ÁCIDO P-ARSANÍLICO

Para la separación cromatográfica por HPLC/UV-Vis se utilizaron las condiciones reportadas en la **Tabla 10**, logrando una separación de ROX, NIT y p-ASA en un tiempo de análisis menor a 10 min.

Tabla 10. Condiciones de trabajo en el HPLC/UV-Vis

<i>Fase móvil</i>	2% Ácido Acético/Metanol (96:4, v/v)
<i>Caudal</i>	1 mL/min
<i>Fase estacionaria</i>	C ₈ Luna 5 µm, 150 x 4.60 mm
<i>Volumen de inyección</i>	20 µL
<i>Detector</i>	UV ($\lambda=223$ nm)

7.5.5 EXTRACCIÓN DE LOS COMPUESTOS ORGANOARSENICALES DEL ALIMENTO BALANCEADO PARA ANIMALES

Para la extracción de las especies de estudio se evaluaron diferentes agentes extractantes descritos para la extracción de compuestos organoarsenicales en muestras de pienso. En la **Tabla 11** se muestran los agentes extractantes que se seleccionaron. Las condiciones en las que fueron evaluados los extractantes se tomaron del trabajo reportado por Liu *et al.* (123), del cual se consideró la cantidad de muestra, volumen de agente extractante, temperatura y tiempo de extracción. Para la preparación de cada reactivo de extracción se tomaron en cuenta las condiciones reportadas en cada estudio. Se seleccionó aquel agente extractante que presentó el mayor porcentaje de As extraído frente a la concentración de arsénico total obtenido de la digestión ácida para el alimento balanceado para animales. La evaluación se realizó para cada procedimiento por triplicado.

Tabla 11. Agentes extractantes evaluados para la extracción de compuestos organoarsenicales.

<i>Extractante</i>	<i>Condiciones</i>	<i>Referencia</i>
<i>Metanol 20%, v/v</i>	0.5g de muestra, 10mL de agente extractante, calentamiento por baño maría a 50°C durante 16 h y agitación mecánica constante	(121)
<i>Metanol/ácido acético (90:10, v/v)</i>		(122)
<i>NaOH 25 mmol/L</i>		(34)
<i>H₃PO₄ 0.5 M</i>		(123)
<i>NaH₂PO₄/H₃PO₄ 0.5M (90:10, v/v), pH 2.32</i>		(120)

Primero se obtuvo la ecuación de la recta (Ecuación 3), y para el cálculo de la concentración de As en las muestras se utilizó la Ecuación 4. Posteriormente se determinó el porcentaje de arsénico recuperado usando la Ecuación 5:

$$\text{Porcentaje de recuperación \%} = \frac{\text{Arsénico Total} - \text{Arsénico Extraído}}{\text{Arsénico Total}} \times 100 \quad (\text{Ecuación 5})$$

7.5.6 DESARROLLO Y OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN ASISTIDA POR MICROONDAS (MAE) PARA ROX, NIT Y P-ASA EN ALIMENTO BALANCEADO PARA ANIMALES

Se seleccionó el mejor agente extractante para la implementación de una metodología de extracción asistida por microondas. Las condiciones de extracción por MAE se optimizaron utilizando primeramente un diseño de experimentos factorial 3^2 con repetición en el punto central para evaluar la concentración del agente extractante y la temperatura de extracción, seguido de un segundo diseño de experimentos factorial 3^2 con repetición en el punto central para evaluar la concentración y el tiempo de extracción. Para el análisis de los resultados se utilizó el programa estadístico STATISTICA 10 de StatSoft, Inc. Se seleccionaron las mejores condiciones tomando como variable respuesta el porcentaje de extracción de arsénico total. La validación de la etapa de extracción se realizó mediante estudios de recuperación tanto de arsénico total como de los compuestos organoarsenicales para asegurar la estabilidad de las especies extraídas empleando para la muestra etiquetada como Pollo 1, la cual contiene 19.83 mg As/kg de pienso. No se llevo a cabo la validación mediante el análisis de un material de referencia certificado ya que no se encuentra disponible comercialmente un material para estos compuestos de estudio. En la **Tabla 12** se reportan las condiciones de extracción seleccionadas.

Tabla 12. Condiciones de extracción seleccionadas.

<i>Parámetro</i>	<i>Condición</i>
<i>Agente extractante</i>	10 mL H ₃ PO ₄ 1.5 M
<i>Temperatura</i>	120°C
<i>Tiempo</i>	45 min

7.5.7 EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS ORGANOARSENICALES EN MUESTRAS COMERCIALES

Una vez optimizado el método MAE se analizaron muestras comerciales de pienso para determinar los compuestos organoarsenicales empleando las condiciones reportadas en la **Tabla 12**. Las muestras fueron analizadas por HPLC-UV/HG-AFS y las condiciones de trabajo están reportadas en la **Tabla 13**.

Tabla 13. Condiciones para la determinación de especies organoarsenicales en muestras comerciales de pienso por HPLC-UV-HG-AFS.

<i>Parámetro</i>	<i>Condición</i>
<i>Fase móvil</i>	Ácido Acético 2%/ Metanol (96:4, v/v)
<i>Caudal</i>	1 mL/min
<i>Columna</i>	C ₈ Luna (5 µm, 150 x 4.60 mm)
<i>Volumen de inyección</i>	300 µL
<i>Oxidación UV</i>	K ₂ S ₂ O ₈ al 2% a 1 mL/min
<i>Velocidad de la bomba para oxidación</i>	0.5 mL/min
<i>Solución ácida y velocidad de bomba</i>	HCl al 10% a 3.0 mL/min
<i>Agente reductor y velocidad de bomba</i>	NaBH ₄ al 2% en NaOH al 0.5% a 3.0 mL/min
<i>Gas acarreador</i>	Argón (700 mL/min)
<i>Corriente PMT</i>	290V
<i>Temperatura del quemador</i>	300°C

De igual forma se calculó la concentración de arsénico en las muestras por medio de la **Ecuación 4** y el porcentaje de arsénico recuperado empleando la **Ecuación 5**.

7.5.8 DERIVATIZACIÓN DE COMPUESTOS ORGANOARSENICALES PARA SU ANÁLISIS POR GC-MS

Para la etapa de la derivatización de ROX, NIT y p-ASA se desarrolló una metodología basada en el trabajo de Roerdink *et al.* (113) utilizándose para la reacción el reactivo 1,3-propanoditiol al 5% (v/v) con un tiempo de reacción de 30 min a un pH 2 asegurando con ello la mejor respuesta. En la **Figura 16** se representa el mecanismo de reacción para los compuestos organoarsenicales, el cual es dado por la reacción del grupo reductor SH del tiol o ditiol con el grupo OH⁻ de los compuestos de arsénico perdiéndose H₂O en la reacción, esto da como resultado un tioéter (dithiaarsenolines cíclicos) en la disolución acuosa (113).

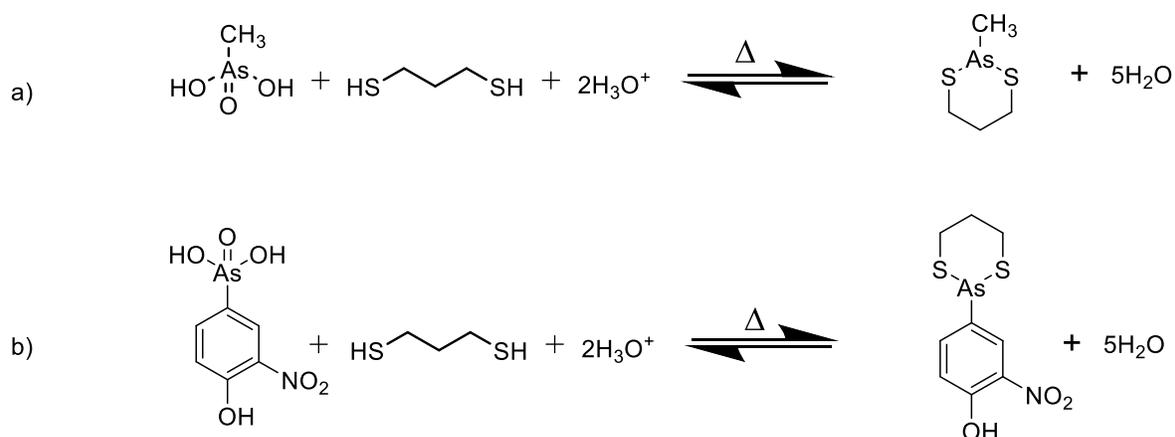


Figura 16. Reacción de derivación de compuestos organoarsenicales con 1,3-propanoditiol al 5% para formar dithiaarsenolinas cíclicas. Se muestran las reacciones para a) MMA y b) roxarsona (113).

7.5.9 SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA DE P-ASA POR GC-MS

Para la implementación de la técnica de separación cromatográfica por GC-MS se tomó como referencia el trabajo reportado por Richter *et al.* (112) y se modificó para tener la mejor respuesta en el equipo de trabajo. En la **Tabla 14** se presentan las condiciones de operación del equipo de GC-MS.

De igual manera se preparó una solución patrón de 100 mg As/L de cada uno de los compuestos organoarsenicales. Posteriormente se preparó una solución de trabajo de 10 mg As/L de cada compuesto organoarsenical para obtener los fragmentos característicos en GC-MS. Al igual que se prepararon 7 estándares para la construcción de la curva de calibración en un rango de 30 a 2850 µg p-ASA/L.

Tabla 14. Condiciones de operación para el análisis de p-ASA por GC-MS.

Equipo	6890N Network GC system / 5973 Network Mass Selective Detector
Detector	Cuadropolo con fuente de impacto de electrones (EI)
Columna	DB-5MS (30 m x 0.250 mm con 0.25 μ m, Apolar)
Rampa de temperatura	Temperatura 60°C durante 1 min 25°C/min hasta 300°C y mantener durante 12.6 min
Gas acarreador	H ₂ \geq 99.999%
Flujo de gas acarreador	2 mL/min (42 cm/s)
Volumen de inyección	2 μ L (Splitless)
Temperatura del inyector	250°C
Solvent delay	4 min
Emv mode	Relative
Relative voltage	106 V
MS source	230°C
MS quad	150°C
Temperatura de la interface	280°C

7.5.10 EXTRACCIÓN DE p-ASA EN MUESTRAS DE PIENSO

Tomando en cuenta que el agente extractante seleccionado para los compuestos organoarsenicales fue el H₃PO₄, resulta que el PO₄³⁻ presenta propiedades estructurales y química similares al As (V) y con lo cual el riesgo por la posible formación de gases nocivos provenientes de la reacción de derivatización con 1,3-propanoditiol, por lo que se desarrolló un método alternativo para la extracción de p-ASA en las muestras de pienso analizadas. Para tal caso se propuso como agente extractante la mezcla HCl/metanol. Para la extracción se pesaron 0.2 g de la muestra y se le adicionó 5 mL de HCl 0.5 M/metanol (1:1, v/v); la extracción se realizó durante 16 h en agitación constante a 70°C en baño maría. Una vez que la muestra se encontró a temperatura ambiente, el extracto se hizo pasar a través de un filtro de PVDF 0.2 μ m, se aforó 25 mL y de ser necesario el extracto se acidificó a pH 2 con HCl 5M; posteriormente se tomo una alícuota de 2 mL y se realizó el proceso de derivatización descrito en la sección 9.4.3. Cada extracción se realizó por triplicado y se utilizó la NIT como patrón interno a una concentración de 500 μ g NIT/L.

VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 EVALUACIÓN DE LAS CONDICIONES PARA LA DIGESTIÓN ÁCIDA VÍA MICROONDAS

Para la digestión de las muestras de pienso se realizó una modificación del método 3052 descrito por la EPA variando la relación de ácido nítrico (HNO_3), ácido clorhídrico (HCl) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) empleado. En la **Tabla 15** se describe las diferentes relaciones de ácido evaluadas y los resultados obtenidos medidos en la intensidad de fluorescencia (IF) obtenida de una muestra etiquetada como Pollo 1 enriquecida con un patrón estándar de As (III) con una concentración de 500 $\mu\text{g/L}$.

Tabla 15. Evaluación de la relación de ácidos empleados en la digestión asistida por microondas en la intensidad de fluorescencia para una muestra de pienso

<i>HNO₃conc.</i>	<i>HClconc.</i>	<i>H₂O₂ al 30%</i>	<i>IF</i>
1	2	2	4038.5
2	1	2	1991.9
3	1	1	6938.5
3	-	2	3943.1
3.7	-	1.3	1577.6
4	1	-	1697.9

Como se puede observar en la **Tabla 15** la relación de ácidos que proporcionó los mejores resultados fue 3 mL de $\text{HNO}_{3\text{conc.}}$, 1 mL de $\text{HCl}_{\text{conc.}}$ y 1 mL de H_2O_2 al 30%. Esta relación permitió una digestión completa de la materia orgánica que se traduce en una mejor respuesta (IF). El ácido nítrico, es un potente agente oxidante, que puede disolver una cantidad del material orgánico. El ácido clorhídrico, por su parte, proporciona iones cloruro, que se coordinan con los iones libres de los metales producto de la oxidación, sacando los iones de la disolución. Esto permite que siga oxidándose el material orgánico, por lo que el material orgánico acaba mineralizándose. El papel del peróxido de oxígeno es acelerar el proceso de la oxidación de la materia orgánica (98).

8.2 EVALUACIÓN DEL PORCENTAJE DE BOROHIDRURO PARA LA DETERMINACIÓN DE As POR HG-AFS

Para la determinación de As por HG-AFS, se requiere la formación de hidruro de arsénico, que es una especie volátil, el cual se forma al hacer reaccionar la muestra con borohidruro de sodio en medio ácido. Se evaluaron diferentes porcentajes de borohidruro (1, 2 y 3%) en medio básico (NaOH 0.5%) que asegure la generación de arsina. Para ello se utilizó una

muestra de alimento balanceado digerida bajo las condiciones de la sección 7.5.1 y enriquecida con 100 µg/L arseniato. En la **Figura 17** se muestra el efecto en la variación de la concentración de NaBH₄ en la IF.

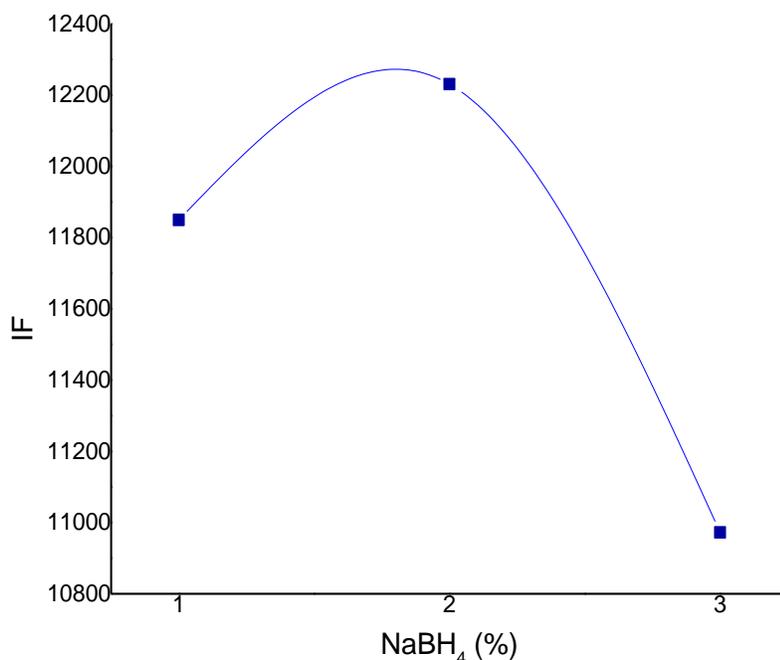


Figura 17. Efecto del porcentaje de NaBH₄ /NaOH 0.5% en el IF.

Como se observa al incrementar el porcentaje de NaBH₄ mayor es la respuesta al generarse la arsina, sin embargo, a porcentajes superiores al 2% de NaBH₄ se presenta una disminución de la IF, posiblemente debido a una mayor producción de hidrógeno que satura el medio disminuyendo la generación de arsina (140).

8.3 OPTIMIZACIÓN DE AGENTE REDUCTOR

Previo a la medición de arsénico total, se evaluó el efecto del agente reductor sobre la intensidad de fluorescencia (IF). Se tomaron como base los trabajos realizados por Wei *et al.* (141) que emplearon una mezcla de tiourea y ácido ascórbico al 5% (% p/v) y dos Santos *et al.* (142) que describen el uso de una mezcla de ioduro de potasio (KI) al 10% con ácido ascórbico al 2% (% p/v). Para los experimentos se utilizó una muestra de 10 mL conteniendo 50 µg/L de arseniato que se le adicionó el agente reductor y se dejó en reposo durante 30

min. En la **Tabla 16** se muestra los experimentos realizados entre mezclas con diferentes relaciones de volumen entre los agentes reductores y sus resultados obtenidos.

Tabla 16. Efecto de la concentración del agente reductor sobre la IF

<i>Experimento</i>	<i>IF</i>
200 μ L de tiourea/ácido ascórbico 10:1 al 5% (p/v)	132.1
200 μ L de tiourea/ácido ascórbico 10:1 al 10% (p/v)	258.3
200 μ L de KI/ácido ascórbico 10:1 al 5% (p/v)	137.9
200 μ L de KI/ácido ascórbico 10:1 al 10% (p/v)	225.9
200 μ L de tiourea/KI/ácido ascórbico 10:10:1 al 10% (p/v)	596.2
400 μ L de tiourea/KI/ácido ascórbico 10:10:1 al 10% (p/v)	1118.7
1 mL de tiourea/KI/ácido ascórbico 10:10:1 al 10% (p/v)	2447.9

Al incrementar la concentración de los agentes reductores se incrementó la respuesta (IF), la combinación de estos reductores indica mejores IF, siendo que al utilizar 1 mL de una mezcla de tiourea/KI/ácido ascórbico al 10% se obtienen los mejores resultados, fijando esta como la condición para la medición de arsénico por HG-AFS.

Las condiciones finales de operación para la medición de arsénico total por HG-AFS fueron el empleo de 1 mL de tiourea/KI/ácido ascórbico al 10% (10:10:1) (% p/v) con un tiempo de reacción de 30 min. En la detección de especies de arsénico para la producción de la arsina por AFS fueron: NaBH₄ 2%/NaOH 0.5% y HCl 10%, bajo estas condiciones se obtuvieron límites de detección de 0.02 μ g/kg.

8.4 PARÁMETROS ANALÍTICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE ARSÉNICO TOTAL EN MUESTRAS DE ALIMENTO BALANCEADO

Los parámetros analíticos calculados para la medición de arsénico total por HG-AFS se muestran en la **Tabla 17**. El valor de correlación obtenido de 0.9999 indica que la correlación entre las mediciones realizadas del método es significativa, realizando una prueba t se obtiene un valor de $t_{calculada}$ de 158.10 contra el valor de $t_{tabulada}$ de 2.45 cuando $n= 8$ con un $\alpha=0.05$ demostrando que la linealidad entre los puntos es significativa. Se obtiene un límite de cuantificación de 0.06 μ g/kg. En este sentido se encuentra que la medición de As por HG-AFS se obtienen resultados comparables que con ICP-MS como ya lo mencionó Gómez-Ariza *et al.* (137), presentando el método por HG-AFS la ventaja de ser más económico y sencillo de operar en comparación con otras técnicas de detección.

Tabla 17. Parámetros analíticos para determinación de As total por HG-AFS

<i>Analito</i>	As
<i>Rango de trabajo (µg/kg)</i>	0.06-200
<i>Ecuación de la recta</i>	IF = 320.61(As) + 268.23
<i>Coefficiente de correlación</i>	0.9999
<i>LOD (µg/kg)</i>	0.02
<i>LOQ (µg/kg)</i>	0.06
<i>Desviación estándar relativa (%)</i>	1.57

8.5 EVALUACION DE LA EXACTITUD DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE ARSÉNICO TOTAL

Empleando la técnica de fluorescencia atómica con sistema de generación de hidruros (HG-AFS) como método de determinación de arsénico total, por las ventajas que ofrece como: fácil operación, buena sensibilidad, y bajo costo de operación, se evaluó la exactitud del método de digestión por microondas utilizando los materiales de referencia certificados DORM-2 y el BCR 279, reportándose sus valores certificados para arsénico total en las **Tablas 8 y 9**. Como se muestra en la **Tabla 18**, la concentración obtenida se encuentra dentro del valor certificado a un nivel de confianza del 95% y n = 3.

Tabla 18. Resultados del contenido de arsénico total en materiales de referencia obtenidos después de digestión ácida.

<i>MRC</i>	<i>Concentración* (mg/kg)</i>	
	HG-AFS	Valor certificado
<i>BCR 279</i>	2.94±0.30	3.09±0.21
<i>DORM 2</i>	19.08±1.19	18.00±1.10

*n=3, Promedio ± intervalo de confianza, α=0.05

8.6 DETERMINACIÓN DE ARSÉNICO TOTAL EN MUESTRAS COMERCIALES DE ALIMENTO BALANCEADO

Una vez que el método para la determinación de As total fue validado mediante el análisis de los materiales de referencia certificados, se procedió a realizar el análisis de las muestras comerciales de alimento balanceado para animales.

El contenido de arsénico total fue determinado en las muestras comerciales de alimento balanceado y se resumen en la **Tabla 19**, se detectó arsénico en todas las muestras analizadas, siendo la muestra etiquetada como pollo 1 la que presentó mayor concentración de As total (19.83 mg As/kg), esta muestra corresponde a un tipo de alimento para pollo de engorda en

crecimiento. Esta concentración fue ligeramente mayor a lo reportado por Yao *et al.* (120) reportando concentraciones que van de 0.1 hasta 17.7 mg As/kg en alimento balanceado y al igual son considerablemente más altos que los reportados por Nicholson *et al.* (143) determinaron concentraciones de arsénico en alimento balanceado entre 0.10 a 0.23 mg As/kg.

Estos resultados corroboran que el adicionar roxarsona, nitarsona o ácido p-arsanílico al alimento balanceado pudiera contribuir a la contaminación de arsénico en carne de animales que son tratados con estos compuestos (24). Por otra parte, estos compuestos son expulsados del organismo en la excreta y al ser utilizada como abono en tierras de cultivo también se puede presentar contaminación de arsénico por la degradación natural de los compuestos organoarsenicales, además de contaminación a mantos acuíferos por lixiviación durante las etapas de riego o lluvia (22).

Tabla 19. Concentración de arsénico total contenida en muestras de pienso.

<i>Muestra</i>	<i>Concentración (mg/kg±I.C.*)</i>
<i>Pollo 1</i>	19.83±2.73
<i>Pollo 2</i>	1.97±0.02
<i>Pollo 3</i>	13.1±1.24
<i>Cerdo 1</i>	4.29±0.20
<i>Cerdo 2</i>	1.83±0.07
<i>Gallo de pelea</i>	1.69±0.02
<i>Caballo</i>	1.47±0.50
*n=3, I.C.= intervalo de confianza, α=0.05	

Por otro lado, es de suma importancia determinar que especie o especies de arsénico contribuyen a la concentración total de arsénico, teniendo esto como objetivo se pasó a desarrollar un método cromatográfico para la separación y detección de roxarsona, nitarsona y ácido p-arsanílico para su determinación en muestras comerciales previamente tratadas mediante extracción asistida por microondas. El siguiente paso fue el desarrollo de una técnica de separación cromatográfica para estos tres compuestos de arsénico con una buena resolución con tiempos de retención cortos, teniendo en cuenta esto, se procedió a establecer las condiciones por HPLC con detección UV.

8.7 SEPARACIÓN ROX, NIT Y p-ASA POR HPLC-UV/VIS

8.7.1 IMPLEMENTACIÓN DEL MÉTODO CROMATOGRÁFICO

Para la separación cromatográfica de ROX, NIT y p-ASA con detección espectrofotométrica UV-Vis se determinó primeramente la longitud de onda máxima ($\lambda_{\text{máx}}$) en la cual los compuestos organoarsenicales tienen una mayor absorción, en la **Figura 18** se aprecian los espectros de absorción de 200 a 300 nm obtenidas en un espectrómetro de UV-Vis de los tres compuestos organoarsenicales, apreciándose bandas de absorción, cuyas longitudes de onda máxima son reportados en la **Tabla 20**. Para la selección de la longitud de onda de trabajo se analizó por HPLC/UV-Vis la respuesta medida en absorbancia que tienen estos compuestos en cada $\lambda_{\text{máx}}$, para ello se utilizó como base el trabajo realizado por Chen *et al.* (122) y los resultados de la separación en los diferentes $\lambda_{\text{máx}}$ se muestra en la **Figura 18**.

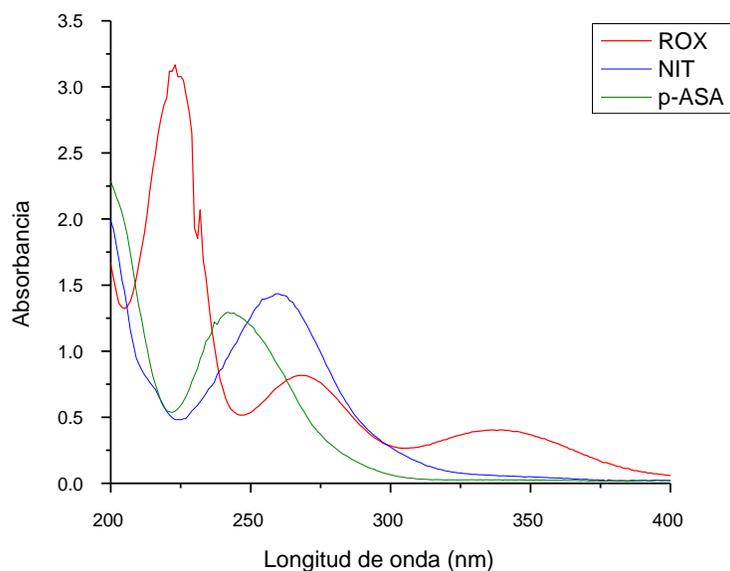


Figura 18. Espectros de absorción de ROX (azul), NIT (rojo) y p-ASA (verde) a concentración de 1 mg/L.

Como se observa en la **Figura 18** se evaluó la respuesta de ROX, NIT y p-ASA a las longitudes de onda de 223, 243 y 260 nm en la separación por HPLC con detección de ultravioleta.

Se puede observar en la **Figura 19** que los compuestos a una $\lambda = 223$ nm tienen una mejor intensidad de respuesta que al ser medido a 243 y 260 nm, por lo cual se seleccionó la longitud de onda de 223 nm para el análisis de los compuestos mediante HPLC.

Para la separación cromatográfica en HPLC/UV-Vis se modificó el método reportados por Chen *et al.* (122) con el fin de reducir el tiempo de análisis que asegure la separación de los compuestos. Para los experimentos se utilizó una columna C₈ Luna con tamaño de partícula de 5 µm y medidas de 150 x 4.60 mm.

Como primer paso se modificó el porcentaje de ácido acético en la fase móvil, en este caso se varió 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0%. En la **Figura 20** se puede apreciar que al aumentar la concentración de ácido acético en la fase móvil se reduce el tiempo de retención de los compuestos organoarsenicales, además que se evita un efecto de ensanchamiento de los picos cromatográficos.

Tabla 20. Longitud de onda máxima de las especies de estudio

<i>Compuesto</i>	$\lambda_{m\acute{a}x}$
roxarsona	223 nm
nitarsona	243 nm
ácido p-arsanílico	260 nm

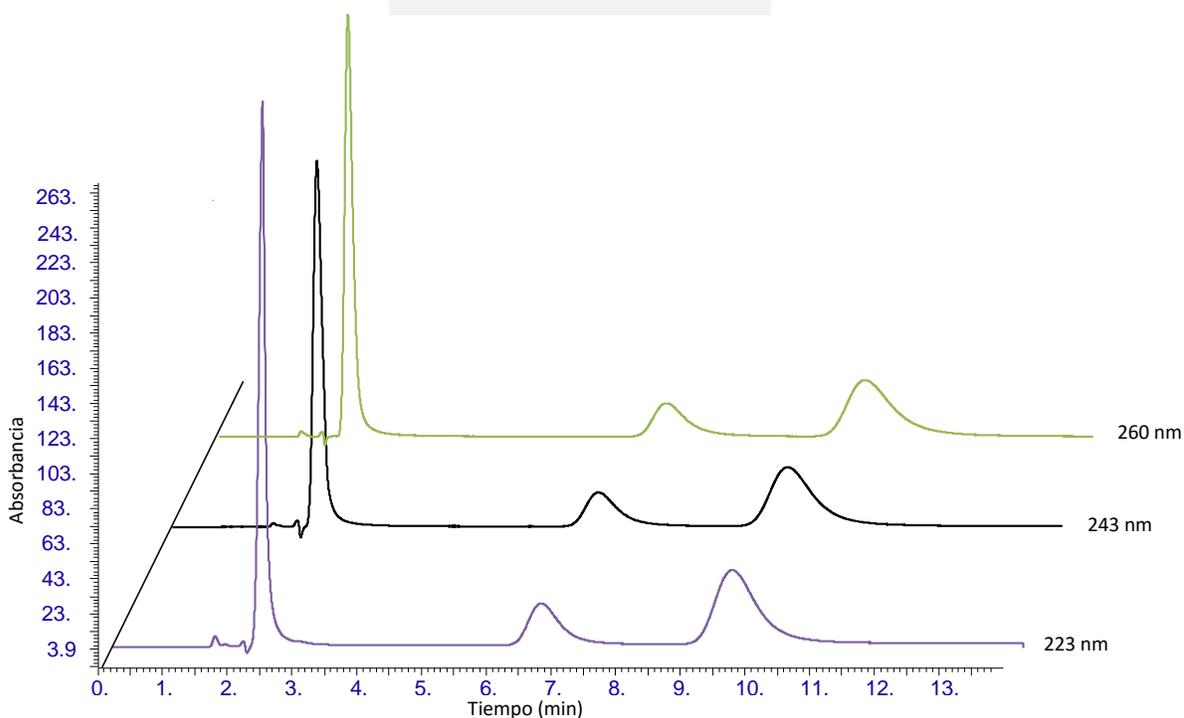


Figura 19. Separación cromatográfica y selección de la longitud de onda de trabajo para la separación de ROX, NIT y p-ASA a 1 mg/L.

Fase móvil: 1% ácido acético/metanol (97:3, v/v), caudal de 1 mL/min y columna de fase reversa C₈.

En la **Figura 20** se muestra el efecto que tiene la concentración de ácido acético en el tiempo de retención. Al trabajar con ácido acético al 2% el pH de trabajo es 1.88, a este pH las moléculas de nitarsona y roxarsona se encuentran con polaridad neutro ya que su pK_{a1} es 2.0 y 3.45 respectivamente; en cambio, como se mencionó en la sección 1.7.9, el ácido p-arsanílico se encuentra de forma catiónica a un pH inferior a 1.90 dado que su pK_{a1} es de 1.90, esto se ve reflejado en el tiempo de retención observado en la **Figura 20**, donde al utilizar una columna del tipo C_8 se tiene que los compuestos apolares presentan más interacción con la columna, aumentando su tiempo de retención, en el caso del p-ASA al contar en su estructura con un grupo amino y al estar presente la molécula en un medio ácido, este grupo adquiere una carga positiva, resultando con una interacción más afín a la fase móvil y reteniéndose menos en la columna. Partiendo de este resultado se seleccionó ácido acético al 2% como la mejor condición de trabajo.

Como segundo paso se varió el porcentaje de metanol (2, 3 y 4%), como modificador orgánico, en la fase móvil. En la **Figura 21** se ilustra el efecto del metanol en el tiempo de retención de estos compuestos organoarsenicales, teniendo como resultado que aumentando el porcentaje de metanol disminuye el tiempo de retención debido a una disminución de la polaridad de la fase móvil, de tal forma que los compuestos organoarsenicales interactúan de manera más efectiva con la fase estacionaria y eluyen a menor tiempo de retención. En base a estos resultados se seleccionó la relación de ácido acético 2% / metanol (96:4, v/v) como condición final de trabajo, lográndose con ello una adecuada resolución para ROX, NIT y p-ASA, en tiempos cortos de análisis sin presentar un efecto en el ensanchamiento de los picos cromatográficos.

En la **Tabla 10** se reportan las condiciones finales para la separación cromatográfica de los tres compuestos organoarsenicales en el sistema HPLC/UV-Vis que implicó el uso de una columna del tipo C_8 Luna (5 μ m, 150 x 4.60 mm), un volumen de inyección de 20 μ L, fase móvil de ácido acético 2% / metanol (96:4, v/v) y detección UV (223 nm). A continuación, se calcularon los parámetros analíticos del método cromatográfico que se reportan en la **Tabla 21**, además en la **Figura 22** se muestra un cromatograma con la separación de estos compuestos organoarsenicales con un tiempo de análisis menor a 9 min y con límites de detección en el rango de 0.06 a 0.10 mg/L.

Tabla 21. Parámetros analíticos para la separación de de ROX, NIT y p-ASA por HPLC/UV-Vis

<i>Analito</i>	<i>Rango de trabajo (mg/L)</i>	<i>Ecuación de la recta</i>	<i>Coefficiente de correlación</i>	<i>LOD* (mg/L)</i>	<i>LOQ* (mg/L)</i>	<i>DSR* (%)</i>	<i>Tiempo de retención (min)</i>
<i>p-ASA</i>	0.1-12	A= 210299 (p-ASA) - 6310.1	0.9992	0.03	0.10	1.0	2.2
<i>ROX</i>	0.06-12	A= 66188 (ROX) - 6258.6	0.9991	0.02	0.06	1.6	5.7
<i>NIT</i>	0.06-12	A= 155761(NIT) - 9112.4	0.9991	0.02	0.06	1.9	8.2

*n=3, $\alpha=0.05$ y DSR= Desviación estándar relativa.

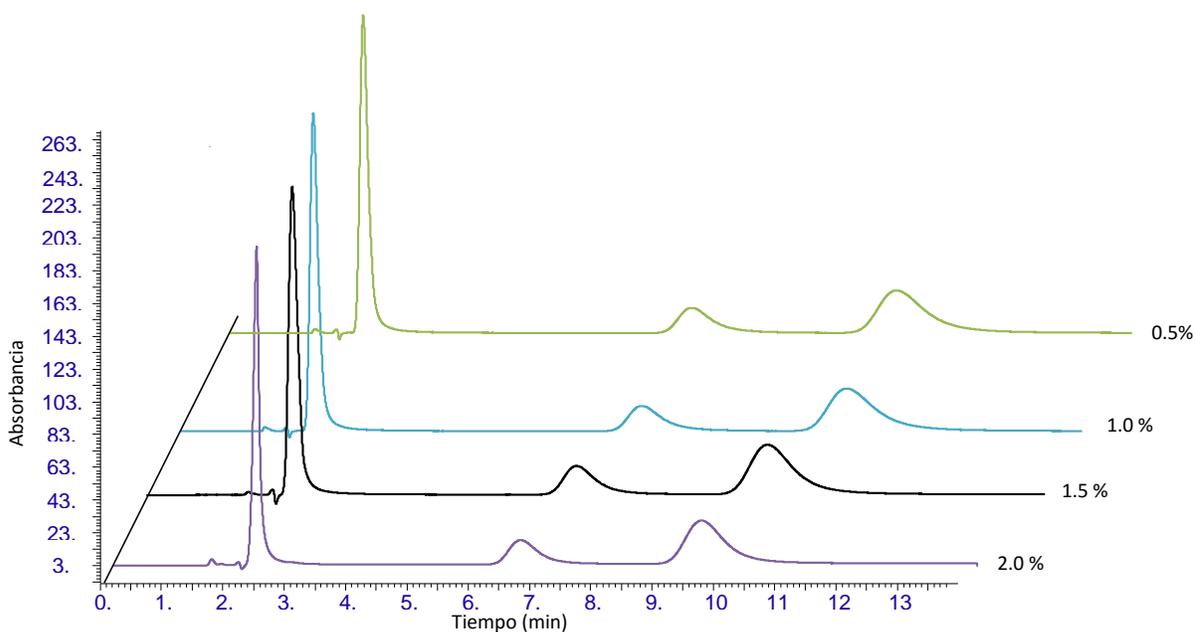


Figura 20. Efecto de la concentración de ácido acético en el tiempo de retención ROX, NIT y p-ASA a una concentración de 1 mg/L. Fase móvil: ácido acético/metanol (97:3, v/v), columna C8 y detector UV (223 nm).

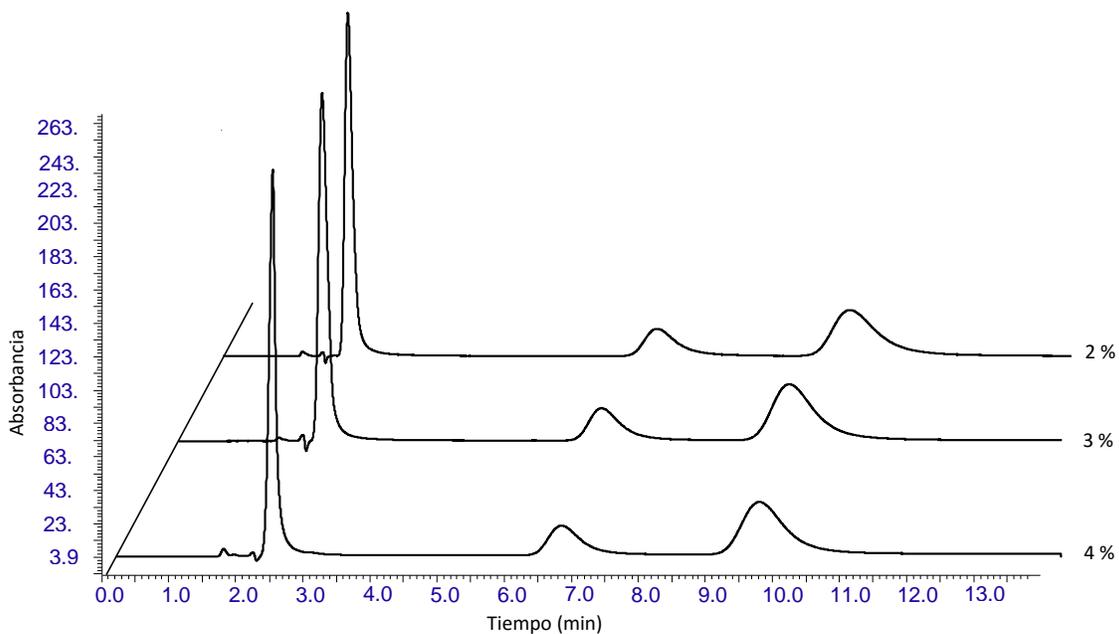


Figura 21. Efecto de la concentración de metanol en el tiempo de retención de ROX, NIT y p-ASA a una concentración de 1 mg/L.
Fase móvil: ácido acético 2.0 %/metanol (v/v), columna C₈ y detector UV (223 nm).

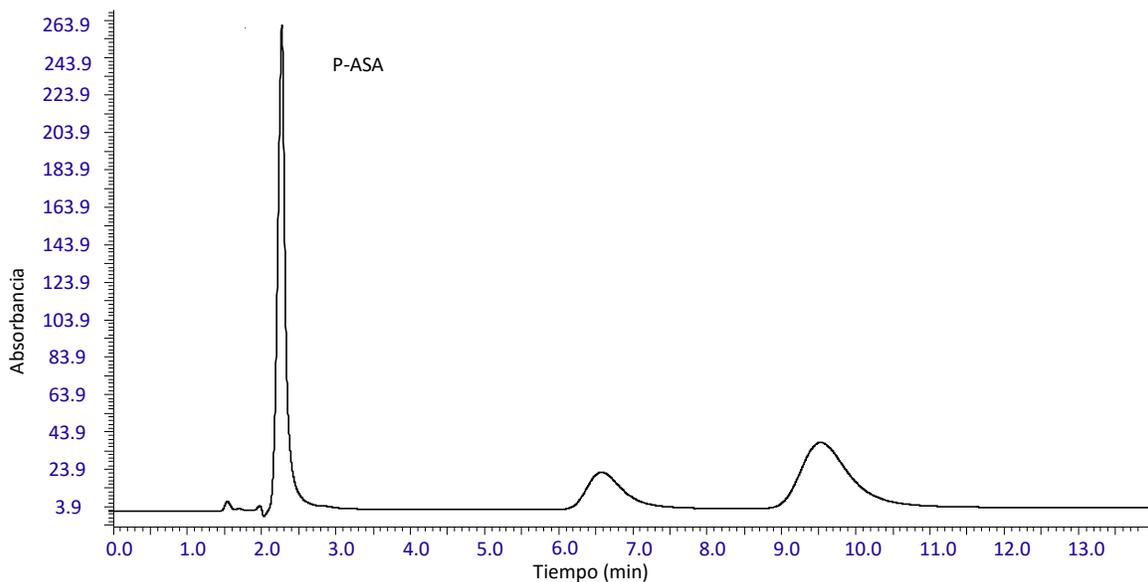


Figura 22. Cromatograma de la separación de p-ASA, ROX y NIT (1 mg/L, cada uno), en un sistema HPLC/UV-Vis.
Columna C₈ y fase móvil ácido acético 2%/metanol (96:4, v/v) y detector UV (223 nm).

8.8 SEPARACIÓN DE ROX, NIT Y P-ASA POR HPLC-UV/HG-AFS

Posteriormente de haber implementado el método para la determinación de ROX, NIT y p-ASA por HPLC-UV-Vis y aprovechando las ventajas de la técnica de AFS en cuanto límites de detección, costo de operación, sencillez en manejo, selectividad y precisión, se implementó la metodología de separación en un equipo de cromatografía de líquidos con detector de fluorescencia atómica con sistema de generación de hidruros y fotooxidación UV (HPLC-UV/HG-AFS) mostrado de manera esquemática en la **Figura 23**.

Con el fin de obtener los mejores resultados en la generación de la arsina, primeramente, se desarrolló un método para la rápida descomposición de estos compuestos antes de la generación de hidruros. En este trabajo se acopló, la técnica de foto-oxidación UV en línea con HPLC y HG-AFS para la especiación de arsénico. La formación de la arsina se logra por la descomposición de los compuestos organoarsenicales que son eluidos por HPLC seguidos de una foto-oxidación con $K_2S_2O_8$ en presencia de luz UV. Le sigue la reducción de As (V) a As(III) con $NaBH_4$ para la formación de la arsina e hidrógeno. La arsina al llegar a una llama de difusión de hidrógeno-argón forma átomos de arsénico; en esta parte la corriente de hidrógeno continua es proporcionada por la reacción de $NaBH_4$ y HCl (140).

Para esta etapa se evaluó el efecto de la concentración de $K_2S_2O_8$ en la intensidad de fluorescencia (IF) de los compuestos organoarsenicales, tomando como base los estudios realizados por Monasterio *et al.* (126) y Liu *et al.* (121). En la **Figura 24** se puede apreciar el efecto que tiene la concentración de $K_2S_2O_8$ en la oxidación de un estándar de ROX a una concentración de 100 $\mu\text{g/L}$.

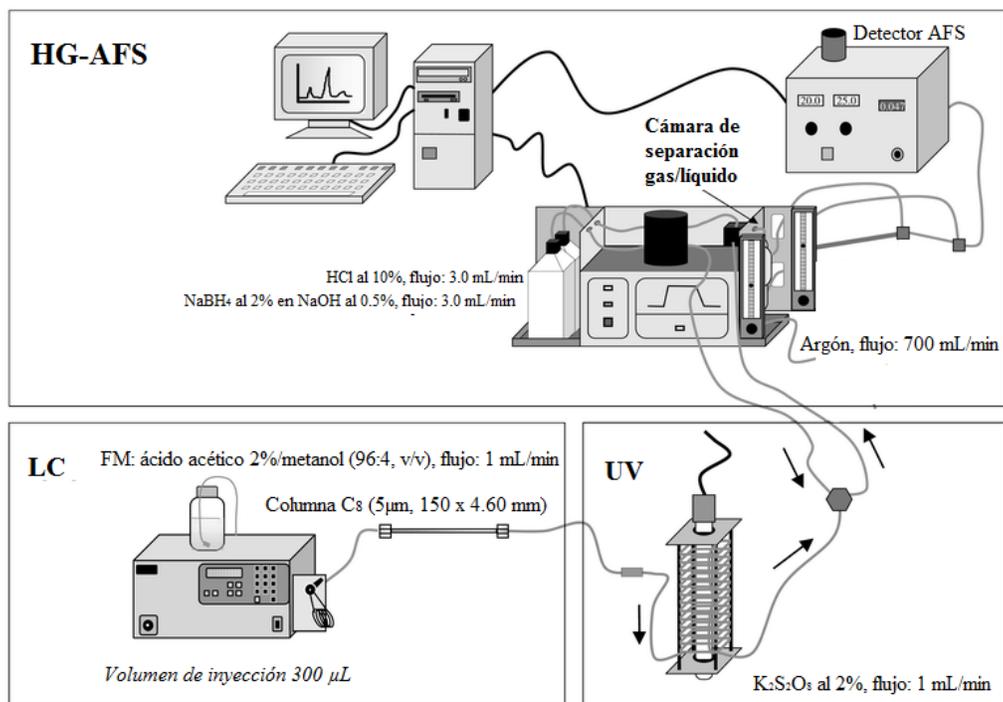


Figura 23. Imagen esquemática de la separación por HPLC-UV-HG-AFS (144).

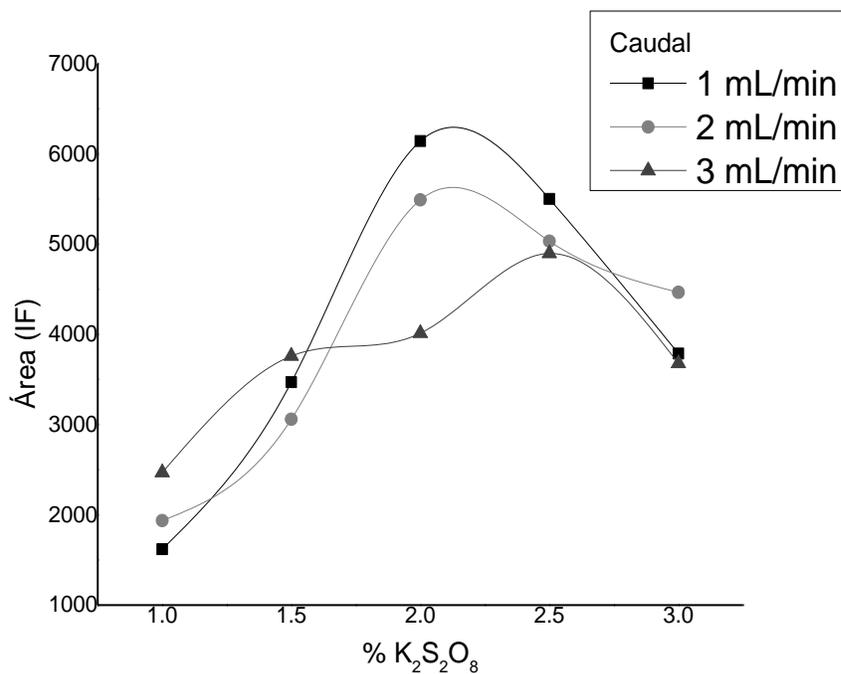


Figura 24. Efecto de la concentración y caudal del K₂S₂O₈ en la oxidación de 100 μg/L de ROX expresado en unidades de IF: fase móvil ácido acético 2%/metanol (96:4, v/v), columna C₈ y para reducción en AFS NaBH₄ al 2% en NaOH al 0.5%.

En la **Figura 24** se muestra que al aumentar la concentración de $K_2S_2O_8$ se logra una mejora en la eficiencia de descomposición hasta la concentración de 2.0% $K_2S_2O_8$. Concentraciones mayores a 2.0% conducen a una disminución de la eficiencia debido al consumo de $NaBH_4$ por el reductor $K_2S_2O_8$, en la parte del caudal se tiene una mejor eficiencia de degradación a 1 mL/min dado que se tiene una mejor interacción del $K_2S_2O_8$ con los analitos (140). Se fijó como parámetro final el usar $K_2S_2O_8$ al 2% a un caudal de 1 mL/min.

Las condiciones para la separación cromatográfica y detección por AFS se muestran en la **Tabla 13**. Estas condiciones fueron evaluadas en la sección 8.7.1 y adecuadas para el sistema de HPLC-UV-HG-AFS. En cuanto a las condiciones de corriente de la lámpara, caudal del HCl y $NaBH_4$ para la detección por AFS fueron tomadas de un trabajo realizado por Cui *et al.* (15). Los parámetros analíticos se reportan en la **Tabla 22**, los rangos de trabajo para la determinación de ROX, NIT y p-ASA fueron desde 0.21 a 1000 $\mu\text{g/L}$. Los coeficientes de correlación calculados estuvieron arriba de 0.9995 indicándonos una buena linealidad en el método desarrollado. En cuanto a los límites de detección calculados se tiene un rango de 0.07 a 0.08 $\mu\text{g/L}$ siendo estos menores en comparación a lo calculado en el equipo de HPLC-UV-Vis, que tiene límites de detección en un rango de 20 a 30 $\mu\text{g/L}$ y mejores que los reportados por Cui *et al.* (15), por lo cual el análisis por HG-AFS mostró LOD en un rango de 0.07 a 0.08 $\mu\text{g/L}$ para la detección de ROX, NIT y p-ASA.

Tabla 22. Parámetros analíticos para determinación de los compuestos de estudio por HPLC-UV-HG-AFS.

<i>Analito</i>	p-ASA	ROX	NIT
<i>Rango de trabajo ($\mu\text{g/L}$)</i>	0.21-1000	0.22-1000	0.23-1000
<i>Ecuación de la recta</i>	IF = 14.431(p-ASA) + 169.98	IF = 14.08(ROX) + 37.746	IF = 12.903(NIT)- 48.395
<i>Coefficiente de correlación</i>	0.9995	0.9999	0.9998
<i>LOD ($\mu\text{g/L}$)</i>	0.07	0.08	0.08
<i>LOQ ($\mu\text{g/L}$)</i>	0.21	0.22	0.23

8.9 EVALUACIÓN DE AGENTES EXTRACTANTES PARA COMPUESTOS ORGANOARSENICALES

Se evaluaron primeramente los agentes extractantes descritos en la literatura para la extracción de compuestos organoarsenicales (**Tabla 11**) empleando calentamiento convencional (baño maría) para determinar cuál de los extractantes proporcionaba mayor grado de extracción de estos compuestos. Se utilizó la muestra etiquetada como Pollo 1, la

cual presentó una concentración de arsénico total de 19.83 mg/kg de pienso. Para la evaluación se utilizó el porcentaje de recuperación de arsénico total en las muestras ya que no se cuenta con material de referencia certificado para la validación de este procedimiento.

Tabla 23. Resultados de la evaluación de los agentes extractantes.

<i>Extractante</i>	mg As/L ± D.E.*	As Extraído (%)
<i>Metanol 20 % v/v</i>	0.67 ±0.15	3.4
<i>NaOH 0.025 M</i>	0.17±0.03	0.9
<i>Ácido acético 1%/metanol (10:90 v/v)</i>	0.21±0.02	1.1
<i>H₃PO₄ 0.5 M</i>	5.93±0.09	29.9
<i>NaH₂PO₄/H₃PO₄ 0.5M (90:10 v/v), pH 2.32</i>	7.79±0.19	39.3

*n=3, D.E. = desviación estándar

En la **Tabla 23** se puede observar que tanto el H₃PO₄ y el buffer de fosfatos (NaH₂PO₄/H₃PO₄) presentaron mayor porcentaje de recuperación de arsénico total como lo reportó Yao *et al.* (145), D'Angelo *et al.* (146) y Peryea (1991) (147). Este último autor menciona que la solubilidad del arsénico empleando el extractante de fosfatos consiste en un mecanismo de intercambio específico PO₄-AsO₄ debido a que el fosfato puede desorber arseniato de la matriz por la similitud en las propiedades fisicoquímicas de las dos especies (148). De esta forma se procedió a evaluar estos dos agentes extractantes a base de fosfato mediante extracción asistida por microondas para reducir el tiempo de preparación e incrementar el porcentaje de extracción de los compuestos organoarsenicales.

8.10 EVALUACIÓN DE AGENTE EXTRACTANTE PARA COMPUESTOS ORGANOARSENICALES POR EXTRACCIÓN ASISTIDA POR MICROONDAS (MAE)

Se procedió a evaluar por el procedimiento MAE los dos agentes extractantes que proporcionaron mejores resultados de extracción de arsénico utilizando la muestra etiquetada como pollo 1, ya que presentó la mayor concentración de arsénico total de las muestras comerciales analizadas; se pesaron 0.5 g de la muestra y 10 mL de agente extractante, tomando en cuenta el trabajo realizado por Wolle *et al.* (148) se programó la rampa de temperatura que consistió en primer paso de temperatura ambiente a 50°C durante 15 min y se mantuvo a 50°C por 30 min. Los resultados se muestran en la **Tabla 24**.

Tabla 24. Evaluación de la recuperación de As total utilizando MAE.

	NaH ₂ PO ₄ /H ₃ PO ₄ 0.5M (90:10, v/v) pH: 2.3	H ₃ PO ₄ 0.5M
<i>Recuperación de As total</i> <i>mg/kg±D.E*.</i> <i>(%recuperación)</i>	5.44±1.22 (27.4%)	10.97±0.25 (55.3%)

*n=3, D.E. = desviación estándar

Como se puede observar, con el ácido fosfórico se alcanzaron porcentajes de recuperación mayores de arsénico total que con el buffer de fosfatos, debido a que el ácido fosfórico puede romper los enlaces de As-S y además, el fosfato puede desorber a los iones arseniato de la matriz debido a la similitud en las propiedades fisicoquímicas de las dos especies (148). Estos resultados concuerdan con lo descrito por Bohari *et al.* (149) y de Alam *et al.* (150) que obtuvieron mayores porcentajes de recuperación de arsénico utilizando como agente extractante H₃PO₄ para muestras ambientales como suelo y plantas.

De igual forma se procedió a evaluar la recuperación de los compuestos organoarsenicales por MAE, los resultados se resumen en la **Tabla 25**, teniendo mayor recuperación de ROX, NIT y p-ASA con el empleo del ácido fosfórico como agente extractante. Sin embargo, como se pudo observar en la **Tabla 24**, la recuperación de arsénico total fue de 55.3%, por lo cual se procedió a optimizar las condiciones de extracción para mejorar el porcentaje de recuperación para arsénico total.

Tabla 25. Recuperación de especies organoarsenicales como % de recuperación.

	NaH ₂ PO ₄ /H ₃ PO ₄ 0.5M (90:10, v/v) pH 2.3	H ₃ PO ₄ 0.5 M
<i>p-ASA (%)</i>	96.4	96.9
<i>ROX (%)</i>	83.5	93.2
<i>NIT (%)</i>	88.9	95.1

8.11 OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS ORGANOARSENICALES

Como se mencionó en la sección 7.5.6, se planteó un diseño de experimento del tipo factorial completo 3² con dos repeticiones en el punto central resultando 11 experimentos para determinar los factores que influyen en la extracción asistida por microondas (MAE). Los factores evaluados fueron la concentración de H₃PO₄ (0.5, 1.0 y 1.5 M), y temperatura (60, 90 y 120°C). Se utilizaron 0.5 g de pienso etiquetado como pollo 1 para optimizar el proceso de extracción. El tiempo para la extracción se fijó en 60 min basando en un trabajo realizado por Kirby *et al.* (151) para determinar compuestos de arsénico en distintas especies marinas utilizando una metodología asistida por microondas. En la **Tabla 26** se presentan los

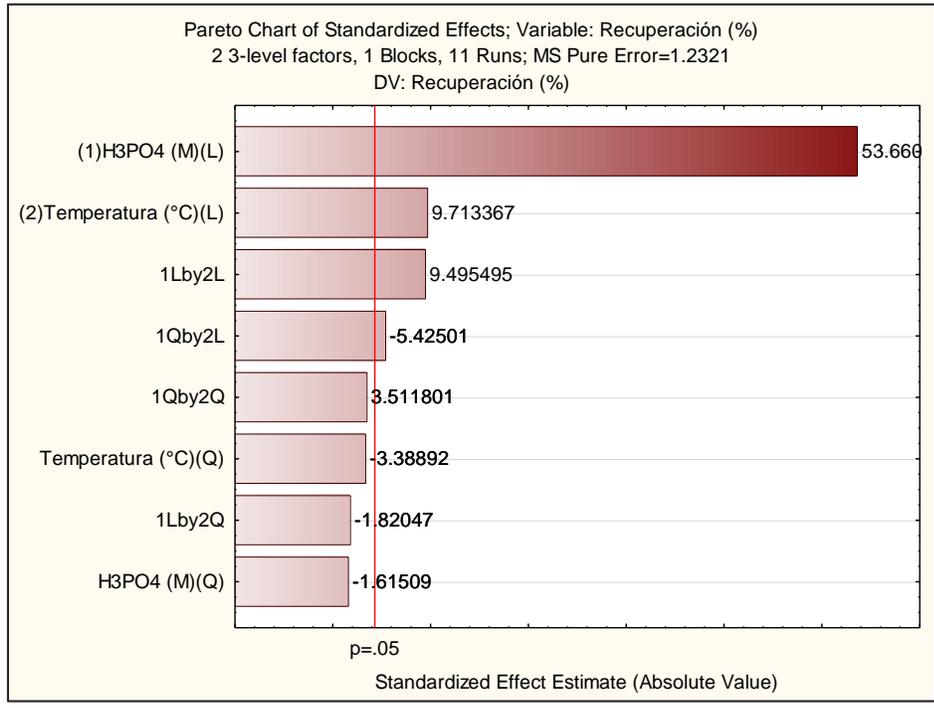
experimentos realizados y las recuperaciones obtenidas de cada uno de los experimentos del diseño factorial 3^2 , en la **Figura 25a** se muestra el gráfico de Pareto y en la **Figura 25b** se presenta la función de deseabilidad cuando los datos obtenidos fueron tratados con el software STATISTICA 10 de StatSoft.

Tabla 26. Diseño factorial 3^2 contemplando concentración y temperatura.

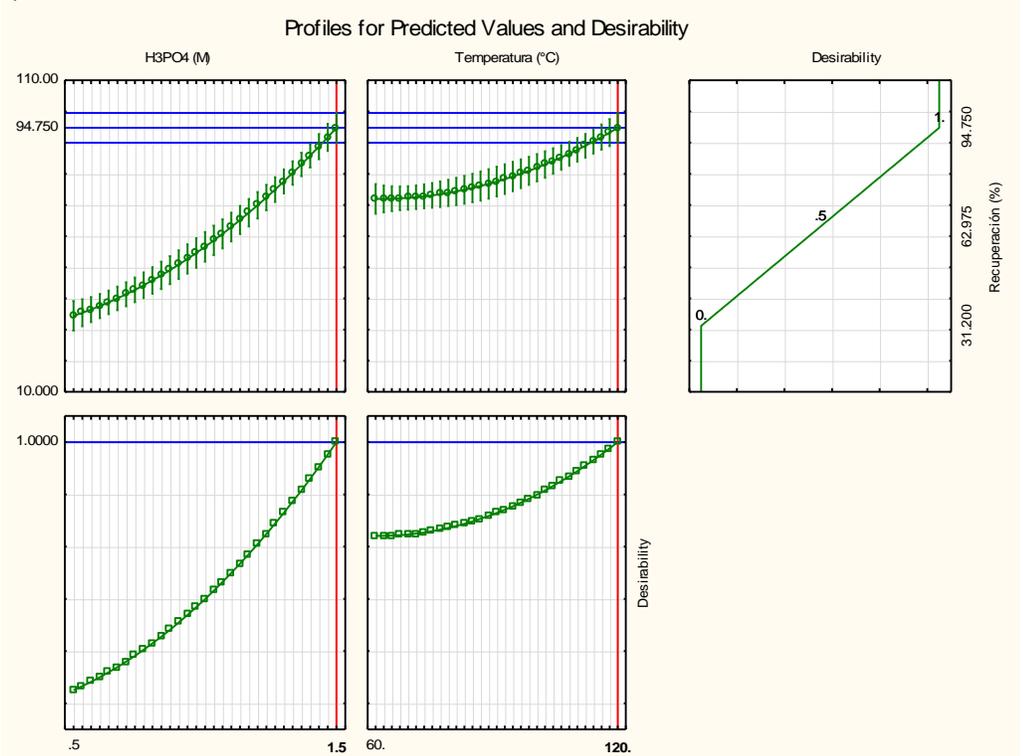
Experimento	H ₃ PO ₄ (M)	Temperatura (°C)	Respuesta (% recuperación de As total)
1	0.5	60	32.67
2	0.5	90	31.20
3	0.5	120	34.41
4	1.0	60	54.71
5	1.0	90	56.45
6	1.0	120	56.56
7	1.5	60	71.93
8	1.5	90	77.50
9	1.5	120	94.75
10	1.0	90	57.56
11	1.0	90	55.34

De acuerdo con lo observado en la gráfica de Pareto **Figura 25a**), tanto la concentración de ácido fosfórico y la temperatura influyen positivamente en el porcentaje de recuperación de arsénico ($p=0.05$), es decir que con el incremento en los niveles para estos factores fue mayor la recuperación. En la función de deseabilidad **Figura 25b**), que consiste en convertir las respuestas de múltiples problemas, en un problema de una sola respuesta; esto es, la respuesta que se analiza es la deseabilidad total, la cual se expresa con un valor respuesta sobre una escala de 0 a 1, se observó que la temperatura de 120°C permitió la extracción cuantitativa y desorber a los analitos de la matriz; por otro lado, el empleo de H₃PO₄ 1.5 M permitió una gran solubilidad de las especies debido a su capacidad para romper enlaces As-S (148).

Se aplicó un segundo diseño de experimentos para evaluar el efecto del tiempo en el porcentaje extraído de arsénico, en este experimento se empleó la temperatura de extracción 120°C debido a que a temperaturas mayores los compuestos organoarsenicales podrían degradarse, el experimento fue del tipo factorial 3^2 con repetición en el punto central, variando en este caso la concentración de ácido fosfórico en 1.0, 1.5 y 2.0 M y el tiempo de extracción en 30, 45 y 60 min, la temperatura se fijó en 120°C ya que en esta temperatura se obtuvieron los mejores resultados en el diseño anterior, en la **Tabla 27** se muestran los experimentos realizados y las recuperaciones obtenidas de cada uno de los experimentos del segundo diseño factorial 3^2 , en la **Figura 26a** se muestra el gráfico de Pareto y en la **Figura 26b** se presenta la función de deseabilidad de los datos obtenidos.



a)



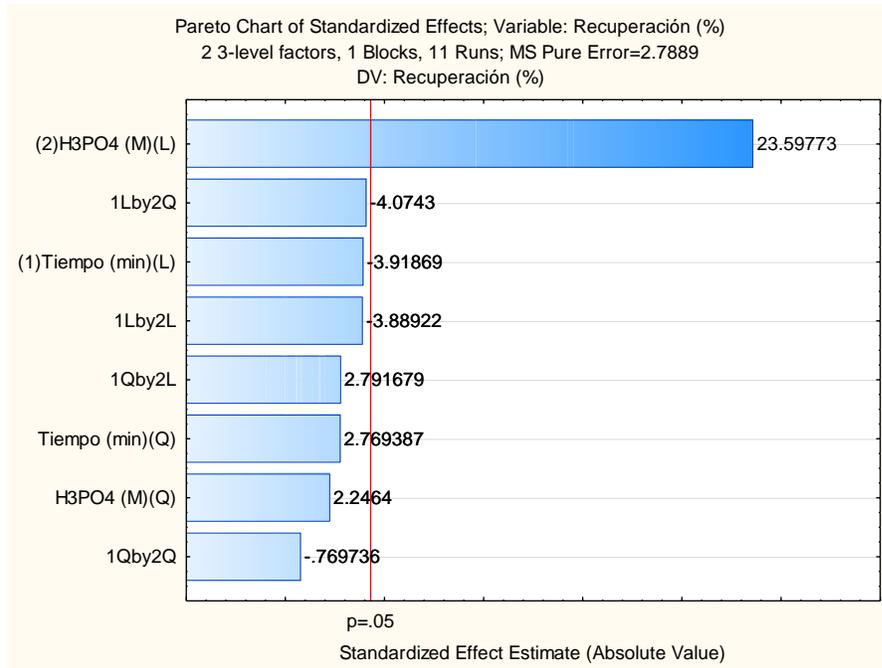
b)

Figura 25. a) Gráfica de Pareto y b) función de deseabilidad para determinar las mejores condiciones de extracción en función de la concentración de H₃PO₄ y la temperatura.

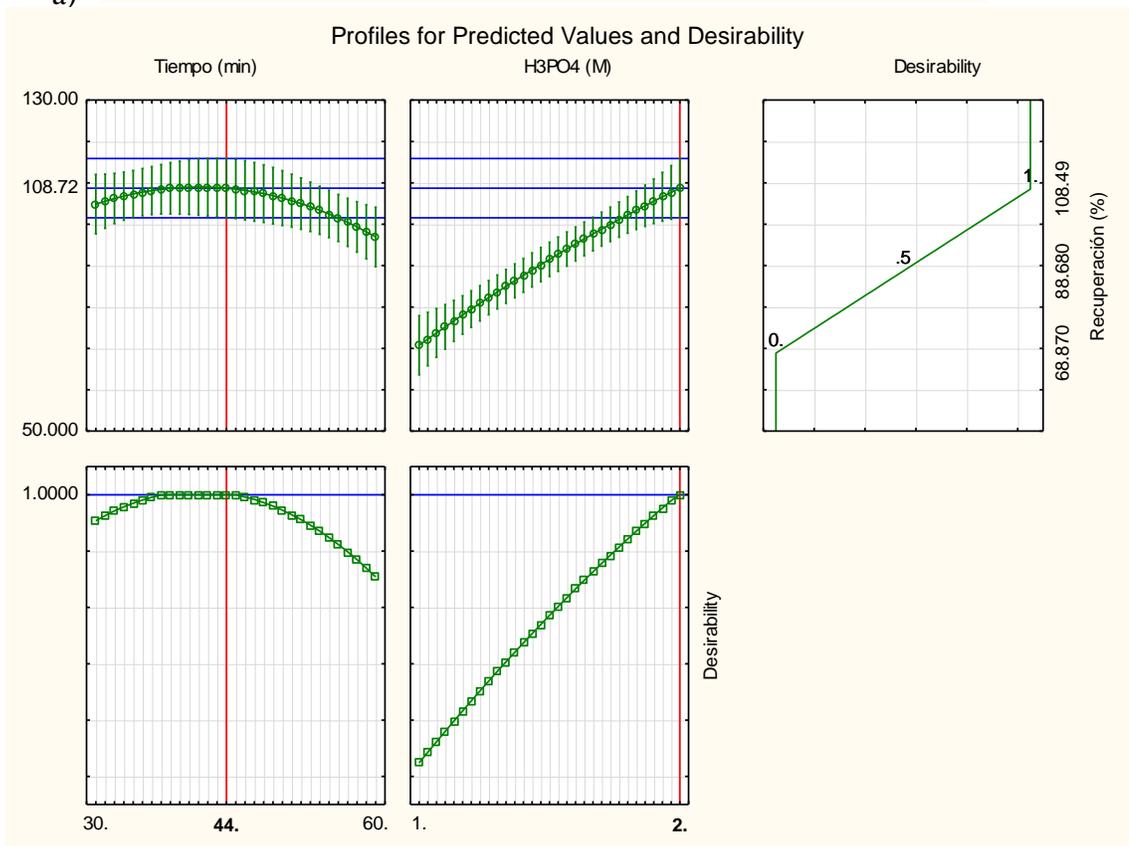
Tabla 27. Diseño factorial 3² contemplando concentración y tiempo

Experimento	H₃PO₄ (M)	Tiempo (min.)	Respuesta (% recuperación As total)
1	1.0	30	68.87
2	1.0	45	70.93
3	1.0	60	73.95
4	1.5	30	95.74
5	1.5	45	91.08
6	1.5	60	82.54
7	2.0	30	104.85
8	2.0	45	108.49
9	2.0	60	96.94
10	1.5	45	92.75
11	1.5	45	89.41

Como se puede observar en la gráfica de Pareto solamente la concentración de ácido fosfórico presentó un efecto significativo en el porcentaje de recuperación de arsénico total siendo mayor al valor estandarizado de $p=0.05$ indicando que el tiempo puede ser modificado sin afectar esta recuperación. En la función de deseabilidad se observa que concentración de H₃PO₄ 2.0 M es la más conveniente empleando un tiempo de extracción de 45 min se obtienen los mejores resultados de recuperación. Teniendo en cuenta las mejores condiciones obtenidas que fueron la utilización de H₃PO₄ 2.0 M, una temperatura de extracción de 120°C y un tiempo de extracción de 45 min se procedió a evaluar la recuperación de las especies de roxarsona, nitarsona y ácido p-arsanílico, para conocer la estabilidad química de estas especies a estas condiciones de extracción.



a)



b)

Figura 26. a) Gráfica de Pareto y b) función de deseabilidad para la obtención de las mejores condiciones de extracción en función de la concentración de H_3PO_4 y el tiempo.

En la **Figura 27** se muestran los resultados de la evaluación de la recuperación de los compuestos organoarsenicales, a partir de una concentración de H_3PO_4 1.5 M se logra una recuperación de arsénico total del 100%; sin embargo, al evaluar la recuperación de compuestos organoarsenicales, para el caso del ácido p-arsanílico se presentó la degradación de este compuesto empleando H_3PO_4 2.0 M, por lo que las condiciones que aseguran estabilidad y buen porcentaje de recuperación de los compuestos organoarsenicales (>95%) son la extracción a 120°C durante 45 min empleando H_3PO_4 y 1.5 M. Teniendo estas condiciones como las óptimas, se procedió al análisis de las muestras comerciales de alimento balanceado.

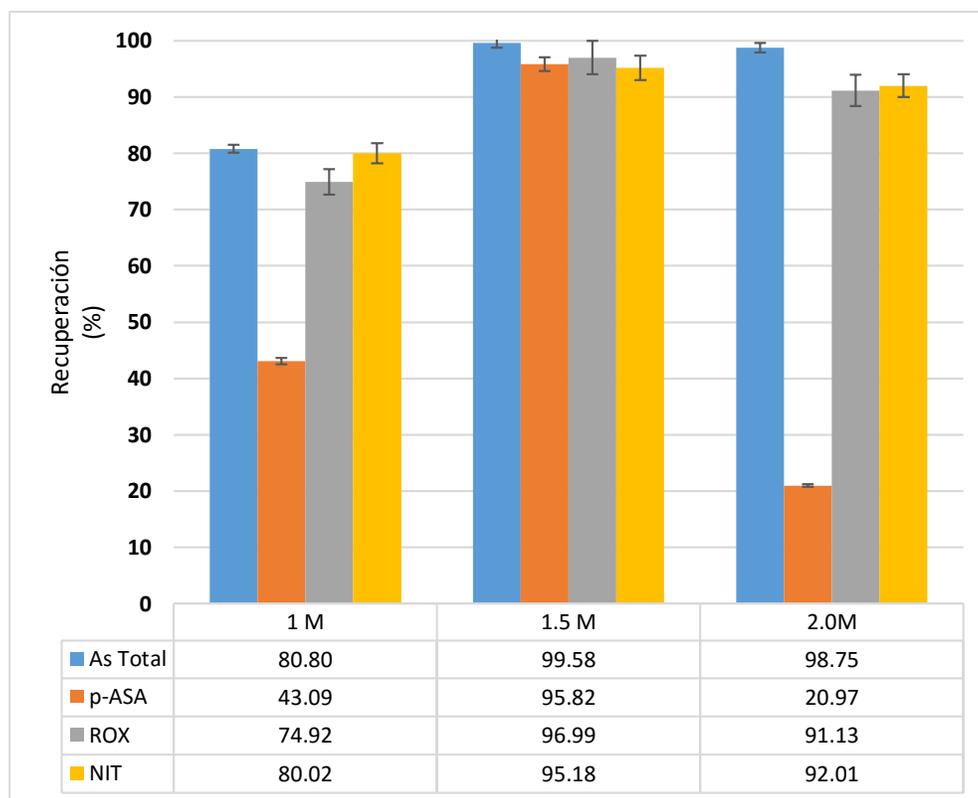


Figura 27. Estudio de recuperación de arsénico total ($500 \mu\text{g/L}$), ácido p-arsanílico, roxarsona y nitarsona (concentración a $100 \mu\text{g/L}$, c/u) $n=3$. Fase móvil ácido acético 2%/metanol (96:4, v/v), columna C_8 y NaBH_4 al 2% como agente reductor en NaOH al 0.5% a 3.0 mL/min .

8.12 EXTRACCIÓN Y ANÁLISIS DE COMPUESTOS ORGANOARSENICALES EN MUESTRAS COMERCIALES

8.12.1 EXTRACCIÓN DE ARSÉNICO TOTAL EN MUESTRAS COMERCIALES

Se analizaron siete muestras de alimentos balanceados (**Tabla 28**), en los cuales se midió la recuperación de arsénico con las condiciones desarrolladas, las mediciones se realizaron en el equipo de HG-AFS. Se obtuvieron porcentajes de recuperación de arsénico total superiores al 75% en la mayoría de las muestras excepto para la etiquetada como cerdo 1, en la cual se obtuvo un porcentaje de recuperación de 69%, donde posiblemente los componentes de la muestra como agentes quelantes u otros compuestos afecten la recuperación de compuestos organoarsenicales (152).

Tabla 28. Concentraciones en muestras comerciales de alimento balanceado.

Muestra	As total digestión (mg/L±D.E.)*	As total extracción (mg/L±D.E.)*	% Recuperación
Pollo 1	19.83±1.10	19.35±0.10	97.6
Pollo 2	1.97±0.01	1.70±0.10	86.3
Pollo 3	13.1±0.50	12.99±0.10	99.2
Cerdo 1	4.29±0.10	2.96±0.04	69.0
Cerdo 2	1.83±0.03	1.76±0.20	96.2
Gallo de pelea	1.69±0.01	1.32±0.05	78.1
Caballo	1.47±0.20	1.43±0.09	97.3

*n=3, D.E.= desviación estándar

8.12.2 ANÁLISIS POR HPLC-UV/HG-AFS DE LOS EXTRACTOS DE MUESTRAS COMERCIALES DE ALIMENTO BALANCEADO

Teniendo las mejores condiciones de separación cromatográfica y extracción por MAE se procedió a la determinación de los compuestos organoarsenicales en las muestras comerciales. En la **Figura 28** se presentan tres cromatogramas correspondiente a) una mezcla de estándares de los tres compuestos de estudio b) un extracto de la muestra pollo 1 y c) el extracto de la muestra fortificado con los tres compuestos de estudio. Se pudo ver la presencia de dos señales en la muestra etiquetada como pollo en los tiempos de retención 1.65 min y 2.20 min. En el caso del cromatograma de la muestra fortificada, se aprecia un incremento en la intensidad de fluorescencia de la señal a 2.20 min, que corresponde al ácido p-arsánico, de esta manera se corroboró la presencia de este compuesto como agente de engorda en los alimentos balanceados. De igual forma se analizaron las diferentes muestras comerciales y sus resultados se resumen en la **Tabla 29**.

<i>Especie</i>	<i>Tiempo de retención (min)</i>
Especie de As no identificada	1.65
p-ASA	2.24
ROX	4.03
NIT	5.73

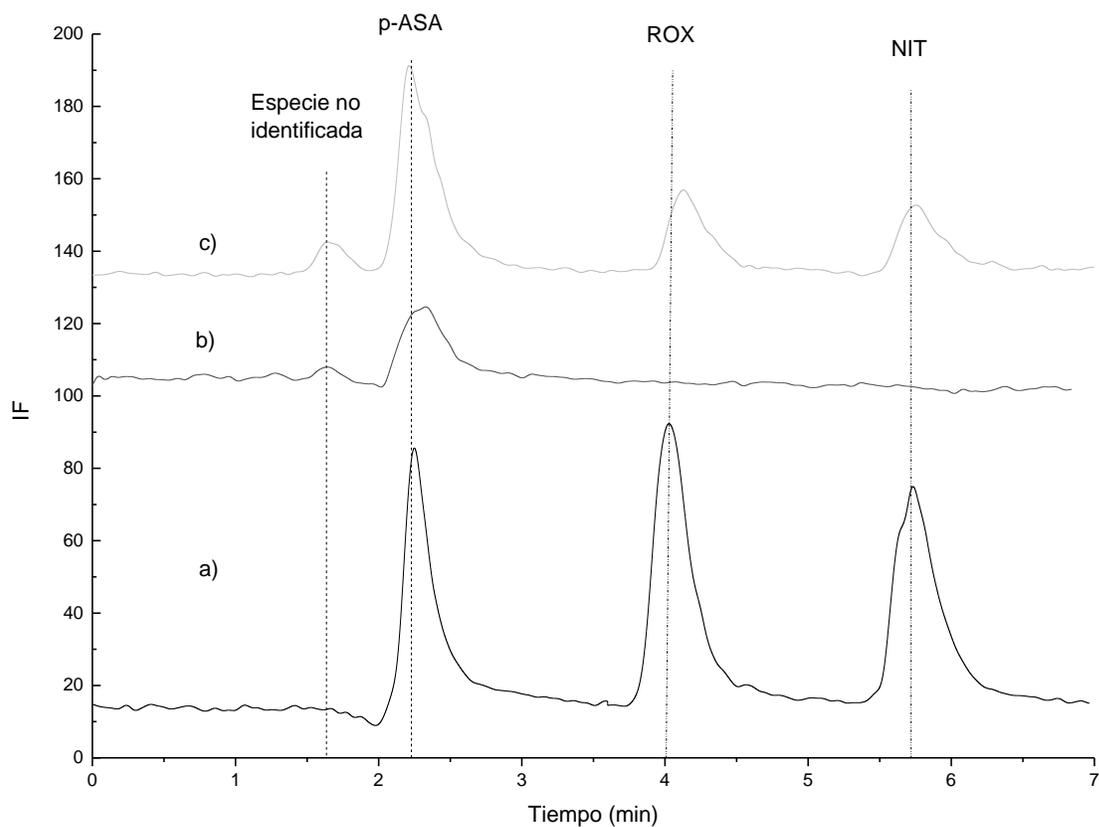


Figura 28. Separación cromatográfica por HPLC-UV-HG-AFS. a) estándares de ROX, NIT, p-ASA a concentraciones de 200 $\mu\text{g/L}$ cada uno. b) extracto de muestra pollo 1. c) muestra pollo 1 fortificada con la mezcla de ROX, NIT y p-ASA a 50 $\mu\text{g/L}$; fase móvil ácido acético 2%/metanol (96:4, v/v), columna C_8 .

Tabla 29. Determinación de compuestos organoarsenicales en muestras comerciales de pienso.

Muestra	Otras especies de As (mg/kg±D.E.*)	Ácido p-arsanílico (mg/kg±D.E.*)	Roxarsona (mg/kg±D.E.*)	Nitarsona (mg/kg±D.E.*)	As total extracción (mg/kg±D.E.*)
Pollo 1	12.91±0.50	6.44±0.3	N.D.	N.D.	19.35±0.10
Pollo 2	0.72±0.10	0.98±0.1	N.D.	N.D.	1.70±0.010
Pollo 3	8.49±0.20	4.49±0.1	N.D.	N.D.	12.99±0.10
Cerdo 1	2.96±0.01	N.D.	N.D.	N.D.	2.96±0.01
Cerdo 2	1.76±0.07	N.D.	N.D.	N.D.	1.76±0.07
Gallo de pelea	1.32±0.03	N.D.	N.D.	N.D.	1.32±0.03
Caballo	1.43±0.04	N.D.	N.D.	N.D.	1.43±0.04

N.D.: No detectado, *n=3, D.E.= desviación estándar

Los resultados indican que el el ácido p-arsanílico es el principal compuesto organoarsenical empleado principalmente en el alimento de engorda de aves de corral, también se observan especies de arsénico que no son retenidas por la columna C₈, las cuales podrían ser el arseniato, arsenito o especies derivadas de la degradación del ácido p-arsanílico, esto coincide con lo ya reportado por otros autores como Huang *et al.* (19) y Liu *et al.* (123). Las concentraciones encontradas de ácido p-arsanílico en muestras de pienso fueron menores a lo reportado por Yao *et al.* (120) de 0.4 hasta 64.3 mg/kg y Wang *et al.* (132) que reportó concentraciones de 32.69 mg/kg.

Como se ha mencionado, el compuesto organoarsenical contenido en las muestras de estudio fue p-ASA y es de suma importancia realizar una confirmación inequívoca debido a su adición como agente de engorda. En el siguiente apartado se discuten los resultados obtenidos sobre la metodología de determinación de p-ASA mediante GC-MS que es una técnica analítica que aporta información sobre la estructura del analito de estudio.

8.13 DETERMINACIÓN DE p-ASA POR GC-MS

8.13.1 SELECCIÓN DE LA MEJOR CONDICIÓN DE DERIVATIZACIÓN

Para determinar las mejores condiciones para la reacción de derivatización se realizaron una serie de experimentos donde se varió la concentración de 1,3-propanoditiol, el tiempo de reacción y el pH de la solución. En la **Tabla 30** se muestran los experimentos realizados al igual que los resultados. Se seleccionaron las condiciones que proporcionaron el mayor rendimiento de reacción (el resultado se expresa en área) tanto del analito (p-ASA) como para el patrón interno (NIT). La mejor condición se obtuvo para el experimento 6.

Tabla 30. Evaluación de las condiciones para la reacción de derivatización. Concentración de trabajo para p-ASA y NIT de 10 mg As/L.

Experimento	pH	Tiempo min	1,3	p-ASA	NIT
			propaneditiol %		
1	2	5	2	15098114	0
2	2	5	5	18602357	2762265
3	2	10	2	14807399	0
4	2	10	5	18508877	2721462
5	2	30	2	16606242	6502062
*6	2	30	5	12317774	7666836
7	3	5	2	14792107	0
8	3	5	5	17262663	0
9	3	10	2	13768613	0
10	3	10	5	14316328	0
11	3	30	2	11149724	3614224
12	3	30	5	14168087	6596239
13	4	5	2	0	0
14	4	5	5	0	0
15	4	10	2	712239	0
16	4	10	5	0	0
17	4	30	2	553448	0
18	4	30	5	1422921	0

Estos resultados para determinar las mejores condiciones de derivatización se aprecian en la **Figura 30**. Los resultados encontrados para la derivatización de p-ASA concuerdan con lo reportado por Roerdink *et al.* (2004) (113) ya que a pH 2 y tiempo de reacción de 5 min se tiene los mejores rendimientos en la reacción al utilizar 1,3-propanoditiol al 5%. De igual forma como se muestra en la **Tabla 30** la mejor condición para la obtención del mejor rendimiento en la derivatización de NIT son el uso de tiempo de reacción de 30 min y 1,3-propanoditiol al 5% a pH 2, considerando esta condición la mas adecuada para obtener una buena respuesta tanto del analito como del patrón interno. A tiempos mayores de 30 min de reacción se aprecia la formación de compuestos no deseados como se aprecia en la **Figura 29**.

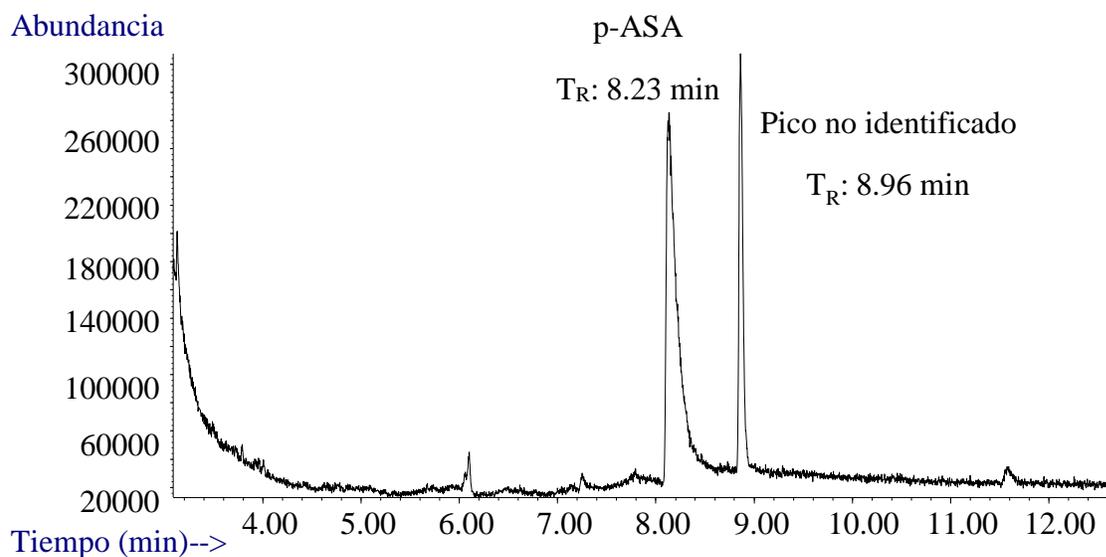


Figura 29. Espectro de masas de p-ASA-1,3 propanoditiol en modo SCAN. Reacción llevada en condiciones de pH 3, tiempo de reacción 1 h y 5% de 1,3-propanoditiol.

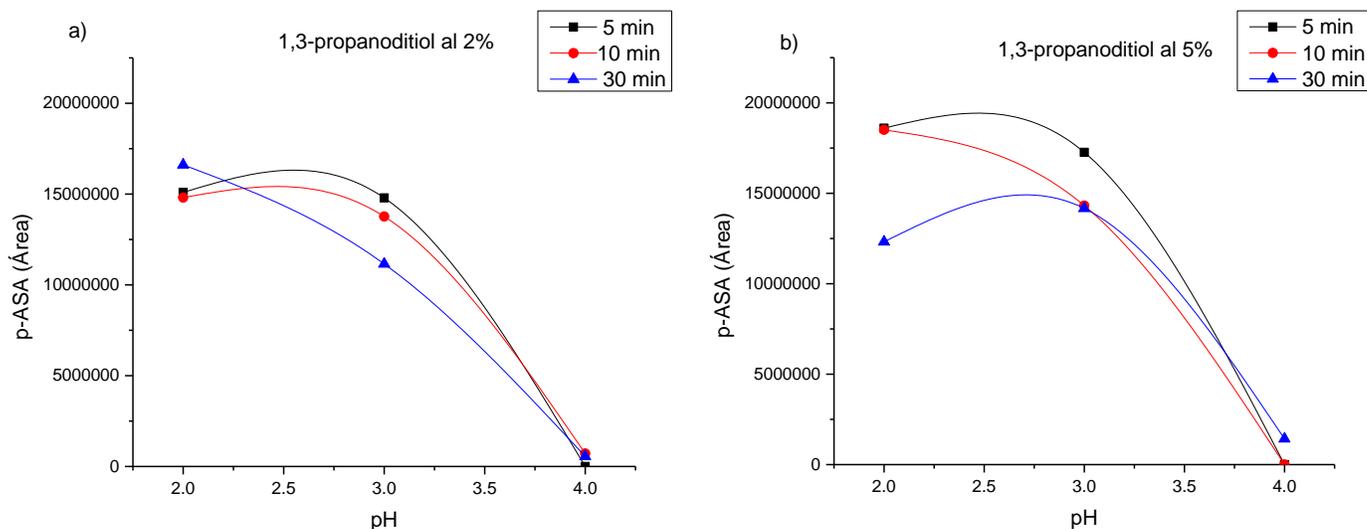


Figura 30. Resultados obtenidos para determinar la mejor condición de derivatización utilizando diferente porcentaje de derivatizante (1,3-propanoditiol) a) al 2% y b) al 5%. Así como variación del pH de 2 a 4 y tiempo de reacción de 5 a 30 min.

8.13.2 ESPECTROS DE MASAS DE p-ASA, NIT Y ROX

En la **Figura 31** se muestra el espectro derivatizado de p-ASA obtenido en el modo SCAN en GC-MS que mostró el ion molecular a una m/z de 273.00, además se presentó el pico base en la m/z 167.00 correspondiente posiblemente al rompimiento de los enlaces As-S, otra

masa importante fue a m/z 198.00 posiblemente por el reareglo de enlace As-S con un grupo metilo formando un enlace As-C.

En la **Figura 32** se muestra el espectro de NIT obtenido en el modo SCAN en GC-MS, el cual mostró el ion molecular con una m/z de 302.90 y el pico base a m/z 106.90 correspondiente a la separación del grupo ditiol en la molécula derivatizada, otra masa importante fue a m/z 180.90 dada por la fragmentación del As-Ph, y por último se tuvo un fragmento de intensidad importante a m/z 148.90.

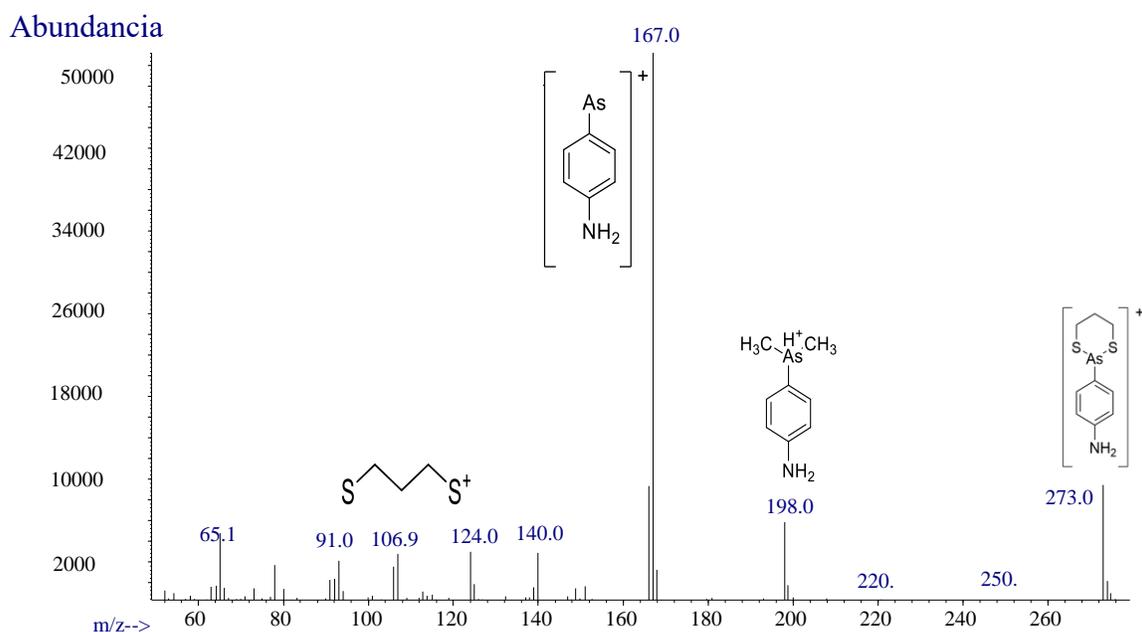


Figura 31. Espectro de masas de p-ASA-1,3 propanoditiol obtenido en modo SCAN.

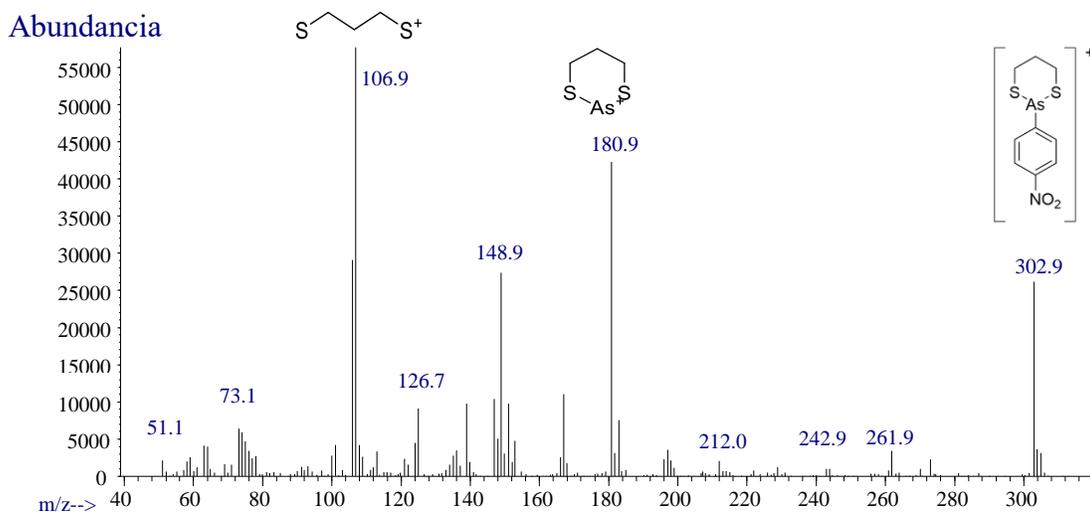


Figura 32. Espectro de masas de NIT-1,3 propanoditiol obtenido en modo SCAN.

8.13.3 SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA

Teniendo los resultados de las mejores condiciones para la derivatización, se llevo a cabo la separación cromatográfica de NIT y p-ASA mostrada en la **Figura 33** con las condiciones experimentales descritas en la **Tabla 14**. Como se aprecia en la **Figura 33** se realizó la separación cromatográfica de p-ASA en el GC-MS en modo SIM siguiendo el ion molecular de cada compuesto, en el caso del p-ASA se monitorizó la m/z 272.9 que presentó un tiempo de retención de 10.19 min y para la NIT la m/z 302.9 con un tiempo de retención de 10.19 min. La baja resolución cromatográfica entre p-ASA y NIT, posiblemente fue debido al constante uso que se le dio a la columna.

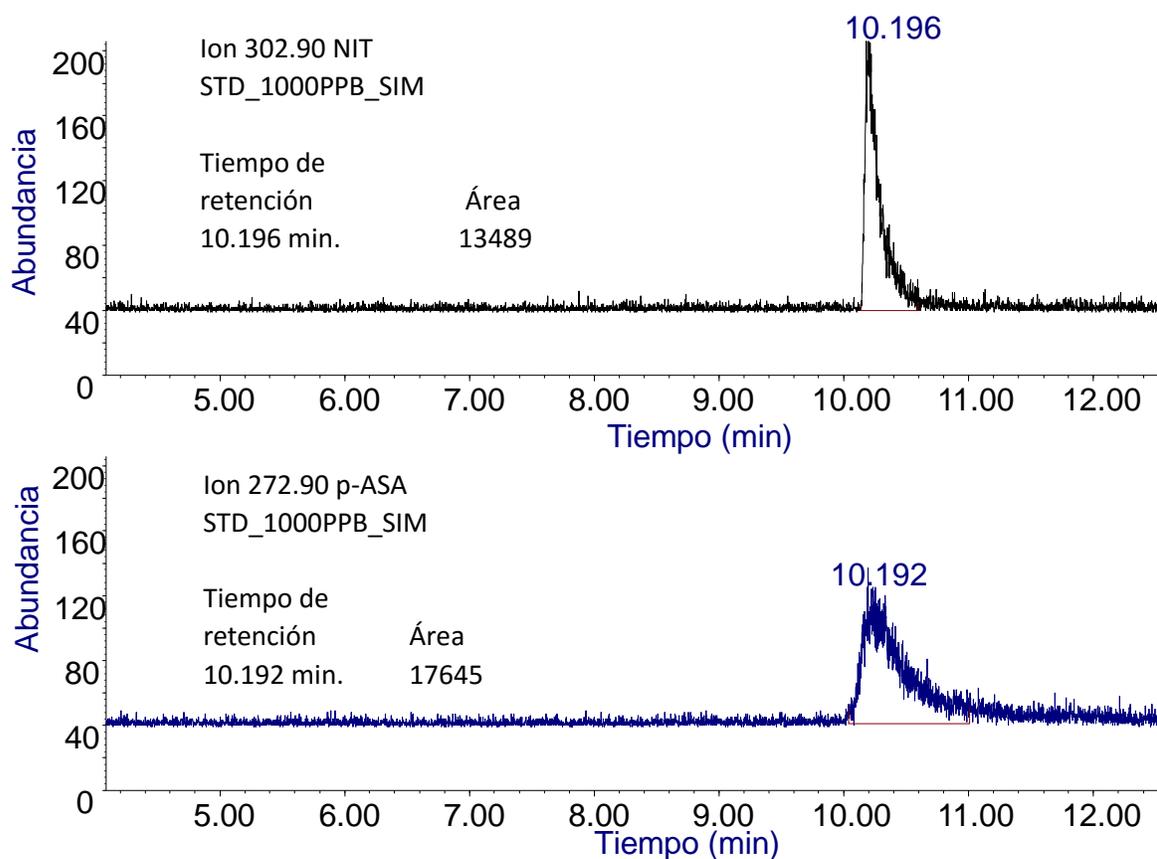


Figura 33. Separación por GC-MS de p-ASA y NIT utilizando las condiciones de análisis descritas en la **Tabla 12**. Medición en modo SIM rastreando el ion molecular.

8.13.4 PARÁMETROS ANALÍTICOS PARA EL ANÁLISIS DE p-ASA POR GC-MS

Para la curva de calibración se prepararon 7 estándares en el rango de 0 a 2800 mg p-ASA/L a partir del patrón de 100 mg As/L de p-ASA. En la **Tabla 31** se muestra los parámetros analíticos obtenidos. El LOD fue de 24.23 µg/L, comparando este resultado con lo obtenido en el sistema HPLC-UV-HG-AFS (75.84 µg/L) las dos metodologías que se han desarrollado para la detección de compuestos organoarsenicales, siendo el de GC-MS menor. Por otra parte, con el sistema GC-MS se obtuvo un rango lineal de trabajo de 73-2849 µg/L y un coeficiente de correlación 0.9993. A modo de ejemplo en la **Figura 34** se muestra la curva de calibración.

Tabla 31. Parámetros analíticos para el sistema GC-MS.

<i>Analito</i>	<i>Rango de trabajo (µg/L)</i>	<i>Ecuación de la recta</i>	<i>Coefficiente de correlación</i>	<i>LOD (µg/L)</i>	<i>LOQ (µg/L)</i>	<i>DSR %</i>
<i>p-ASA</i> *	73-2849	$y = 0.0049 (p\text{-ASA}) + 0.8044$	0.9993	24.23	73.41	2.3

* Patrón interno NIT 500 µg/L. DSR: desviación estándar relativa, n=10

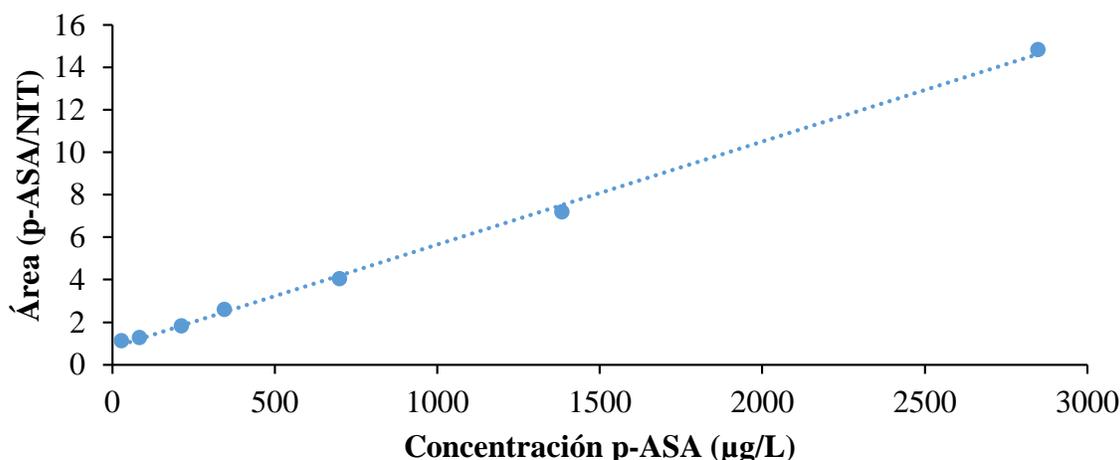


Figura 34. Curva de calibración de p-ASA obtenida por GC-MS.

8.13.5 VALIDACIÓN DEL MÉTODO GC-MS PARA LA DETERMINACIÓN DE p-ASA

Para la validación del método se realizaron estudios de recuperación de muestras fortificadas con p-ASA utilizando como patrón interno NIT, los resultados mostrados en la **Tabla 32**, donde se evaluaron dos niveles de recuperación a 3 mg p-ASA L⁻¹ y a 30 mg p-ASA L⁻¹ teniendo recuperaciones de 85 % y 98 %, respectivamente, estos valores son la concentración media de 3 mediciones realizadas. Los porcentajes de recuperaciones fueron superiores al 85%, los cuales pueden considerarse aceptables de acuerdo al criterio que establece la AOAC (80-100%) y la INECC-CCA (70-130%) (153, 154)

Tabla 32. Recuperación de p-ASA en muestras de pienso.

	Promedio recuperado p-ASA (mg L ⁻¹) n= 3	Desviación estándar	Recuperación %
Adición a 30 mg/L p-ASA*	29.26	0.34	98.76
Adición a 3 mg/L p-ASA**	2.55	0.08	85.29

*Recuperación evaluada con la muestra Pollo 1 **Recuperación evaluada con la muestra Pollo 3

8.13.6 EXTRACCIÓN DE p-ASA EN PIENSO

Se realizó el análisis por GC-MS de las muestras comerciales de pienso obtenidas del Área Metropolitana de Monterrey (AMM) y en la **Tabla 33** se muestran los resultados, los cuales fueron comparados con lo obtenido mediante HPLC-UV-HG-AFS (**Tabla 29**). A fin de poder comparar los resultados se realizó la conversión de los resultados obtenidos mediante HPLC-UV-HG-AFS mediante la **Ecuación 6** para dejar expresada la concentración como p-ASA.

$$(Resultado\ por\ HPLC - UV - HG - AFS) \times \left(\frac{74.92160 \frac{g}{mol}}{217.05 \frac{g}{mol}} \right) \qquad \text{Ecuación 6}$$

Tabla 33. Comparación de las concentraciones de p-ASA obtenidas por la técnica de GC-MS y HPLC-UV-HG-AFS al analizar las muestras obtenidas en AMM.

Muestra	p-ASA HG-AFS (mg/kg \pm I.C.)	p-ASA GC-MS (mg/kg \pm I.C.)
Cerdo 1	N.D.	N.D.
Gallo de pelea	N.D.	N.D.
Cerdo 2	N.D.	N.D.
Caballo	N.D.	N.D.
Pollo 1	57.45 \pm 7.92	57.17 \pm 7.99
Pollo 2	5.50 \pm 0.07	4.85 \pm 0.92
Pollo 3	37.95 \pm 3.60	36.95 \pm 2.71

I.C.: Intervalo de confianza N.D.: No detectable n=3, $\alpha= 0.05$

Los resultados muestran que las técnicas de GC-MS y HPLC-UV-HG-AFS son confiables para el análisis de p-ASA ya que no hubo diferencia significativa en los resultados de concentración obtenidas por ambas técnicas a un nivel de confianza del 95% y $n = 3$. En la **Figura 35** se muestran una comparación los espectros obtenidos por GC-MS de p-ASA correspondientes a un extracto de la muestra etiquetada como Pollo 1 y a un patrón puro de p-ASA.

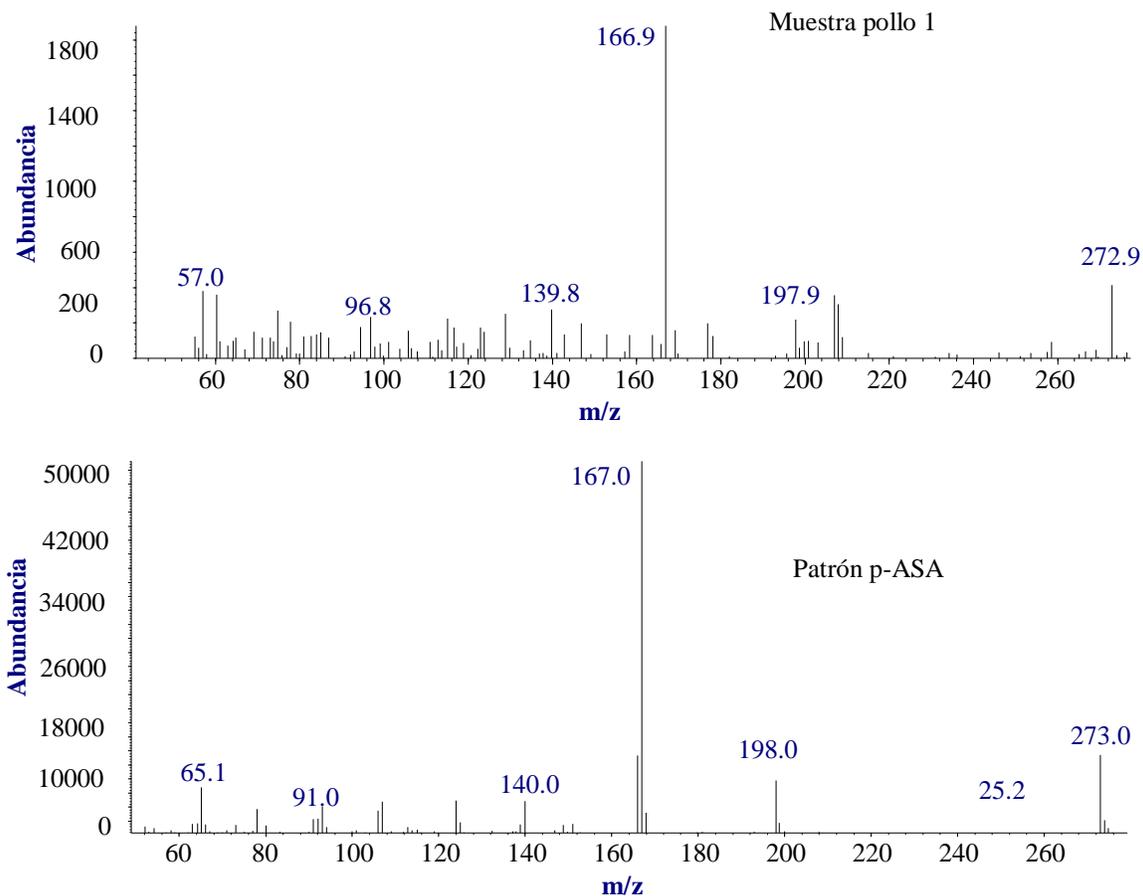


Figura 35. Comparación de la muestra de pollo 1 derivatizada contra un estándar puro de p-ASA a 10 mg/L.

Los patrones de fragmentación para ambos espectros presentan m/z importantes en 279.00, 179.90 y 169.90, de tal manera que el compuesto analizado corresponde al ácido p-arsanílico, en el caso donde se presenta mayor concentración de este compuesto es la muestra etiquetada como pollo 1, presentando una concentración de 57 mg/kg, que se encuentra dentro del valor recomendado por la FDA. Si bien esta concentración no supera la normativa, actualmente estos compuestos están prohibidos para su uso como agentes de engorda, dado el riesgo que conlleva al ser ingerido y acumularse en los tejidos de los animales y/o ser excretado en las heces de los animales tratados y su posterior uso como composta que puede conllevar la contaminación de suelo y agua.

IX. CONCLUSIONES

En las muestras comerciales de pienso analizadas se encontraron concentraciones de As total que van de 1.47 hasta 19.8 mg As/L.

Las condiciones para la separación de los compuestos organoarsenicales en un sistema de HPLC-UV-HG-AFS mediante cromatografía de fase reversa (C₈ Luna de 5µm, 150 x 4.60 mm) fueron una fase móvil de ácido acético 2%/metanol (96:4, v/v) a un caudal de 1 mL/min y un volumen de inyección de 300 µL.

Los límites de detección (LOD) alcanzados con el equipo de HPLC-UV-HG-AFS fueron de 0.20 µg p-ASA/L, 0.23 µg ROX/L y 0.23 µg NIT/L, de tal forma que con este sistema de detección se detectan concentraciones trazas de ROX, NIT y p-ASA.

Para la parte de extracción MAE de los compuestos organoarsenicales, se encontró que el mejor agente extractante fue el H₃PO₄ 1.5M utilizando una temperatura de extracción de 120°C durante 45 min, lo cual proporcionó recuperaciones completas de arsénico total, 95.8% para p-ASA, 97.0% para ROX y 95.2% para NIT, logrando para ello condiciones que no comprometen la estabilidad de las especies durante su extracción, con ello la hipótesis planteada es aceptada.

Para la determinación de p-ASA en pienso por GC-MS se empleó como agente derivatizante 1,3-propanoditiol al 5% a pH 2 y un tiempo de reacción de 30 min.

Las condiciones para la separación de p-ASA en el sistema GC-MS fueron He (99.999%) como gas acarreador y una columna DB-5MS (fenil arileno con 5% de fenilmetilpolisiloxano) (30 m x 0.250 mm con 0.25 µm) y un volumen de inyección de 2 µL (splitless). Los límites de detección calculados para el sistema GC-MS fueron de 24.23 µg p-ASA/L (8.36 µg As/L) y coeficiente de correlación de 0.9993

En cuanto a la extracción de p-ASA en las muestras de pienso comerciales para su análisis por GC-MS se implementó una metodología cuyo agente extractante fue el HCl 0.5 M/metanol (1:1, v/v) alcanzando recuperaciones de hasta 98% indicando que la metodología analítica propuesta es confiable para la recuperación de p-ASA.

Los métodos analíticos específicos para la determinación de p-ASA en pienso con el sistema HPLC-UV-HG-AFS y GC-MS presentaron un LOD comparable de 0.20 µg p-ASA/kg y 24.23 µg p-ASA/kg respectivamente, siendo más sensible el sistema de HG-AFS al utilizar un sistema de generación de hidruro y una lámpara de cátodo hueco específica para As.

Las concentraciones de p-ASA detectadas en las muestras de pienso por el sistema HPLC-UV-HG-AFS están en un rango de 5.5 a 57.4 mg/kg y para GC-MS esta en un rango de 4.8 a 57.1 mg/kg. Si bien las concentraciones encontradas no superan los límites permisibles dados por la FDA para el uso de este compuesto (p-ASA: 100 mg/kg), es de suma importancia destacar que actualmente estos compuestos de arsénico están prohibidos para su uso como agentes de engorda dado el riesgo que conlleva al ser ingerido y acumularse en los tejidos de

los animales o bien al ser excretado dentro de las heces de los animales tratados contribuyendo en gran medida a un medio de exposición para los humanos al ser consumida la carne de estos animales (cerdo, pollo y pavo).

X. BIBLIOGRAFÍA

1. Orozco LC. Deterioro ambiental vs. Desarrollo económico y social. Secretaría de Energía Instituto de Investigaciones Eléctricas 2003:103-8.
2. Lezama JL, Graizbord B. Los grandes problemas de México IV Medio Ambiente: El Colegio de México, A.C; 2010. 429 p.
3. Pérez JL, Meza VS. Los procesos industriales sostenibles y su contribución en la prevención de problemas ambientales. Revista de la Facultad de Ingeniería Industrial. 2013;16(1):108-17.
4. CONAFAB. La Industria Alimentaria Animal de México 2013. In: CONAFAB, editor.: CONAFAB; 2013. p. 42.
5. Reglamento de ejecución (UE) No 505/2012 de la comisión, (2012).
6. Reglamento (CE) No 767/2009 del parlamento europeo y del consejo, (2009).
7. Subcommittee on Poultry Nutrition NRC. Nutrient requirements of poultry. 9th ed: National Academies Press; 1994.
8. Gonzalo G. Mateos, Mario García Jiménez. Uso de premezclas en fabricación de piensos. Características y composición de las materias primas utilizadas en macrocorrectores. Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal 1998.
9. Chapman HD, Johnson ZB. Use of Antibiotics and Roxarsone in Broiler Chickens in the USA Analysis for the Years 1995 to 2000. Poult Sci. 2002;81:356–64.
10. Nachman KE, Raber G, Francesconi KA, Navas-Acien A, Love DC. Arsenic species in poultry feather meal. Science of the Total Environment. 2012;417-418:183-8.
11. Stanton TL. Feed Composition for Cattle and Sheep. Fact Sheet. 2014(1.615).
12. ALLTECH. Allech Global Feed Survey Summary: Alltech's; 2014 [20/02/2014]. Available from: <http://www.alltech.com/sites/default/files/alltechglobalfeedsummary2014.pdf>.
13. Campo ARId. México, competitivo en producción de alimentos balanceados 2000 [28/02/2014]. Available from: <http://www.2000agro.com.mx/agroindustria/mexico-competitivo-en-produccion-de-alimentos-balanceados/>.
14. OEIDRUS. Agroindustria [28/02/2014]. Available from: <http://www.agronuevoleon.gob.mx/oeidrus/agroindustria/agroindnl.pdf>.
15. Cui J, Xiao Y-b, Dai L, Zhao X-h, Wang Y. Speciation of Organoarsenic Species in Food of Animal Origin Using Accelerated Solvent Extraction (ASE) with Determination by HPLC-Hydride Generation-Atomic Fluorescence Spectrometry (HG-AFS). Food Analytical Methods. 2012;6(2):370-9.
16. Waldroup PW, Izat AL, Primo RA, Twining PF, Hebert JA, Trammell JH, et al. The Effect of Zinc Bacitracin and Roxarsone on Performance of Broiler Chickens When Fed in Combination With Narasin. Poultry Science. 1990;69(9):898-901.
17. Garbarino JR, Bednar AJ, Rutherford DW, Beyer RS, Wershaw RL. Environmental Fate of Roxarsone in Poultry Litter. I. Degradation of Roxarsone during Composting. Environmental Science & Technology. 2003;37:1509-14.
18. Roerdink AR, Aldstadt JH. Sensitive method for the determination of roxarsone using solid-phase microextraction with multi-detector gas chromatography. Journal of Chromatography A. 2004;1057(1-2):177-83.

19. Huang L, Yao L, He Z, Zhou C, Li G, Yang B, et al. Roxarsone and its metabolites in chicken manure significantly enhance the uptake of As species by vegetables. *Chemosphere*. 2014;100:57-62.
20. Silbergeld EK, Nachman K. The environmental and public health risks associated with arsenical use in animal feeds. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2008;1140:346-57.
21. Huang LX, Yao LX, He ZH, Zhou CM, Li GL, Yang BM, et al. Uptake of arsenic species by turnip (*Brassica rapa* L.) and lettuce (*Lactuca sativa* L.) treated with roxarsone and its metabolites in chicken manure. *Food Addit Contam Part A-Chem*. 2013;30(9):1546-55.
22. Rutherford DW, Bednar A, Garbarino JR, Needham R, Staver KW, Wershaw RL. Environmental Fate of Roxarsone in Poultry Litter. Part II. Mobility of Arsenic in Soils Amended with Poultry Litter. *Environmental Science and Technology*. 2003;37(8):1515-20.
23. Chiou PW-S, Chen K-L, Yu B. Effects of Roxarsone on Performance, Toxicity, Tissue Accumulation and Residue of Eggs and Excreta in Laying Hens. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 1997;74:229-36.
24. Anderson BK, Chamblee TN. The Effect of Dietary 3-Nitro-4-Hydroxyphenylarsonic Acid (Roxarsone) on the Total Arsenic Level in Broiler Excreta and Broiler Litter. *The Journal of Applied Poultry Research*. 2001;10:323-8.
25. Gupta RC. *Veterinary Toxicology: Basic and Clinical Principles*. Press A, editor. USA: Elsevier; 2007.
26. Zoetis. Pfizer To Suspend Sale of 3-Nitro (Roxarsone) In The United States 2011 [28-05-2015]. Available from: <http://news.zoetis.com/press-release/farm-animals/pfizer-suspend-sale-3-nitro-roxarsone-united-states#sthash.z7oXbia8.dpuf>.
27. McDougald LR, Gilbert JM, Fuller L, Rotibi A, Xie M, Zhu G. How much does roxarsone contribute to coccidiosis control in broilers when used in combination with ionophores? *The Journal of Applied Poultry Research*. 1992;1:172-9.
28. Jones FT. A Broad View of Arsenic. *Poultry Science*. 2007;86(1):2-14.
29. Izquierdo OA, Parsons CM, Baker DH. Interactive Effects of Monensin, Roxarsone, and Copper in Young Chickens Infected with *Eimeria tenella* or a Combination. *Poultry Science*. 1987;66(12):1934-40.
30. Chapman HD, Johnson ZB. Use of Antibiotics and Roxarsone in Broiler Chickens in the USA: Analysis for The Years 1995 to 2000. *Poultry Science*. 2002;81(3):356-64.
31. Misnia M, Sathishkumara P, Ahamada R, Rahim A, Yusoff M. Determination of para-arsanilic acid with improved diazotization reaction using differential pulse cathodic stripping voltammetry in aqueous system. *Environmental technology*. 2015:1-6.
32. Frost DV. Considerations on the Safety of Arsanilic Acid for Use in Poultry Feeds. *Poultry Science*. 1953;32(2):217-27.
33. Marusich WL, Ogrinz E, Brand M, Mitrovic M. Safety and Compatibility of Sulfadimethoxine Potentiated Mixture (Ro 5-0013), a New Broad Spectrum Coccidiostat-Antibacterial, in Chickens. *Poultry Science*. 1969;48(1):217-22.
34. Wang J, Nie L, Zhang L, Zhang C. Determination of Arsanilic Acid in Livestock Feeds by Hplc Using an Anion Exchange Column and Ultraviolet Detection. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. 2011;34(5):341-9.
35. FDA. NADA Number: 008-019 2015 [01-06-2015]. Available from: <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/animaldrugsatfda/details.cfm?dn=008-019>.

36. Desheng Q, Niya Z. Effect of Arsanilic Acid on Performance and Residual of Arsenic in Tissue of Japanese Laying Quail. *Poultry Science*. 2006;85(12):2097-100.
37. Aschbacher PW, Feil VJ. Fate of [¹⁴C]arsanilic acid in pigs and chickens. *Journal of agricultural and food chemistry*. 1991;39(1):146-9.
38. Skinner JT, editor Effects of nitarosone as an aid in prevention of blackhead in turkeys challenged with *Histomonas meleagridis* carried by nematodes. Proc Arkansas Poultry Symposium, Springdale; 2000.
39. Sims MD, Hooze DM. Efficacy of Nitarosone, Monensin or Nitarosone Followed by Monensin, in Female Turkeys in Litter Pens and Exposed to Coccidial (25 Days) and Cochlosomal (28 Days) Inoculations. *International Journal of Poultry Science*. 2002;1(5):164-6.
40. Sullivan TW, Al-Timimi AA. Safety and Toxicity of Dietary Organic Arsenicals Relative to Performance of Young Turkeys: 2. Carbarsone. *Poultry Science*. 1972;51(5):1498-501.
41. Lund EE. Oral Transmission of *Histomonas* in Turkeys. *Poultry Science*. 1956;35(4):900-4.
42. Worden AN, Wood EC. The effect of carbarsone (33.6% w/v p-ureidobenzene arsonic acid) on bodyweight gain, food conversion and tissue arsenic levels of turkey poult. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 1973;24(1):35-41.
43. FDA. FDA Response to Citizen Petition on Arsenic-based Animal Drugs 2013 [30-06-2015]. Available from: <http://www.fda.gov/AnimalVeterinary/SafetyHealth/ProductSafetyInformation/ucm370568.htm>.
44. Arsenic In Chicken Production [Internet]. Government & Policy. 2007 [cited 17/02/2014]. Available from: <http://pubs.acs.org/email/cen/html/041107160748.html>.
45. (FDA) FaDA. FDA: Pfizer will voluntarily suspend sale of animal drug 3-Nitro: Food and Drug Administration (FDA); [updated 06/08/2011]. Available from: <http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm258342.htm>.
46. FDA. FDA Announces Pending Withdrawal of Approval of Nitarosone 2015 [cited 01-06-2015 01-06-2015]. Available from: <http://www.fda.gov/AnimalVeterinary/NewsEvents/CVMUpdates/ucm440668.htm>.
47. Fisher DJ, Yonkos LT, Staver KW. Environmental concerns of roxarsone in broiler poultry feed and litter in Maryland, USA. *Environ Sci Technol*. 2015;49(4):1999-2012.
48. EVISA. U.S. sales of widely used drug "Roxarsone" for chickens to be suspended: European Virtual Institute for Speciation Analysis; 2011 [01-06-2015]. Available from: <http://www.speciation.net/News/US-sales-of-widely-used-drug-Roxarsone-for-chickens-to-be-suspended-;~/2011/06/10/5648.html>.
49. Jackson BP, Bertsch PM, Cabrera ML, Camberato JJ, Seaman JC, Wood CW. Trace Element Speciation in Poultry Litter. *Journal of environmental quality*. 2003;32(2):535-40.
50. Pérez MV, Álvarez RC, Chávez PC, Avalos DR, Basulto AC. Determinación de niveles críticos externos de fósforo y potasio en huertos intensivos. *Centro Agrícola*. 2012;39(2):13-7.
51. Stolz JF, Perera E, Kilonzo B, Kail B, Crable B, Fisher E, et al. Biotransformation of 3-Nitro-4-hydroxybenzene Arsonic Acid (Roxarsone) and Release of Inorganic Arsenic by *Clostridium* Species. *Environmental Science & Technology*. 2007;41(3):818-23.

52. Makris KC, Quazi S, Punamiya P, Sarkar D, Datta R. Fate of Arsenic in Swine Waste from Concentrated Animal Feeding Operations. *Journal of environmental quality*. 2008;37(4):1626-33.
53. Krishnasamy V, Otte J, Silbergeld E. Antimicrobial use in Chinese swine and broiler poultry production. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*. 2015;4(1):17.
54. Gul Kazi T, Qadir Shah A, Imran Afridi H, Ali Shah N, Balal Arain M. Hazardous impact of organic arsenical compounds in chicken feed on different tissues of broiler chicken and manure. *Ecotoxicology and environmental safety*. 2013;87:120-3.
55. A B, J G, I F, D R, R W, J R, et al. Photodegradation of roxarsone in poultry litter leachates. *The Science of the total environment*. 2003;302:237–45.
56. Arai Y, Lanzirrotti A, Sutton S, Davis JA, Sparks DL. Arsenic Speciation and Reactivity in Poultry Litter. *Environmental Science & Technology*. 2003;37(18):4083-90.
57. Fisher DJ, Yonkos LT, Staver KW. Environmental Concerns of Roxarsone in Broiler Poultry Feed and Litter in Maryland, USA. *Environmental Science & Technology*. 2015;49(4):1999-2012.
58. Mangalgi KP, Adak A, Blaney L. Organoarsenicals in poultry litter: detection, fate, and toxicity. *Environment international*. 2015;75:68-80.
59. Tchounwou PB, Centeno JA, Patlolla AK. Arsenic toxicity, mutagenesis, and carcinogenesis – a health risk assessment and management approach. *Mol Cell Biochem*. 2004;255(1-2):47-55.
60. Lin W, Wang S-L, Wu H-J, Chang K-H, Yeh P, Chen C-J, et al. Associations between Arsenic in Drinking Water and Pterygium in Southwestern Taiwan. *Environmental health perspectives*. 2008;116(7):952-5.
61. Marafante E, Vahter M, Norin H, Envall J, Sandström M, Christakopoulos A, et al. Biotransformation of dimethylarsinic acid in mouse, hamster and man. *Journal of Applied Toxicology*. 1987;7(2):111-7.
62. Rahman MM, Sengupta MK, Ahamed S, Chowdhury UK. Arsenic contamination of groundwater and its health impact on residents in a village in West Bengal, India. *Bulletin of the World Health Organization*. 2005;83(1):49-57.
63. Ferguson JF, Gavis J. A review of the arsenic cycle in natural waters. *Water Research*. 1972;6(11):1259-74.
64. Joseph T, Dubey B, McBean EA. A critical review of arsenic exposures for Bangladeshi adults. *Science of The Total Environment*. 2015;527–528(0):540-51.
65. Rodríguez VM, Jiménez-Capdeville ME, Giordano M. The effects of arsenic exposure on the nervous system. *Toxicology letters*. 2003;145(1):1-18.
66. Kaltreider RC, Davis AM, Lariviere JP, Hamilton JW. Arsenic alters the function of the glucocorticoid receptor as a transcription factor. *Environmental health perspectives*. 2001;109(3):245-51.
67. Rosen BP, Liu Z. Transport pathways for arsenic and selenium: A minireview. *Environment international*. 2009;35(3):512-5.
68. Hughes MF. Arsenic toxicity and potential mechanisms of action. *Toxicology letters*. 2002;133(1):1-16.
69. Miller WH, Schipper HM, Lee JS, Singer J, Waxman S. Mechanisms of Action of Arsenic Trioxide. *Cancer Research*. 2002;62(14):3893-903.
70. Abernathy CO, Thomas DJ, Calderon RL. Health Effects and Risk Assessment of Arsenic. *The Journal of Nutrition*. 2003;133(5):1536S-8S.

71. Thomas DJ, Styblo M, Lin S. The Cellular Metabolism and Systemic Toxicity of Arsenic. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2001;176(2):127-44.
72. Buchet JP, Lison D. Clues and uncertainties in the risk assessment of arsenic in drinking water. *Food and Chemical Toxicology*. 2000;38:81-5.
73. Registry AfTSA. Toxicological Profile for Arsenic Public Health Service; 2007.
74. Wang J, Zhao F-J, Meharg AA, Raab A, Feldmann J, McGrath SP. Mechanisms of Arsenic Hyperaccumulation in *Pteris vittata*. Uptake Kinetics, Interactions with Phosphate, and Arsenic Speciation. *Plant Physiology*. 2002;130(3):1552-61.
75. Fuente HDL, Portales-PÉREZ D, Baranda L, DÍAz-Barriga F, Saavedra-AlanÍS V, Layseca E, et al. Effect of arsenic, cadmium and lead on the induction of apoptosis of normal human mononuclear cells. *Clinical & Experimental Immunology*. 2002;129(1):69-77.
76. Smith FE, Arsenault EA. Microwave-assisted sample preparation in analytical chemistry. *Talanta*. 1996;43(8):1207-68.
77. Pawliszyn J, Lord HL. *Handbook of sample preparation: John Wiley & Sons, Inc.*; 2010.
78. Chan C-H, Yusoff R, Ngoh G-C, Kung FW-L. Microwave-assisted extractions of active ingredients from plants. *Journal of Chromatography A*. 2011;1218(37):6213-25.
79. Pan X, Niu G, Liu H. Microwave-assisted extraction of tea polyphenols and tea caffeine from green tea leaves. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*. 2003;42(2):129-33.
80. Paré JRJ, Bélanger JMR, Stafford SS. Microwave-assisted process (MAP™): a new tool for the analytical laboratory. *Trends in Analytical Chemistry*. 1994;13(4):176-84.
81. Sosnik A, Gotelli G, Abraham GA. Microwave-assisted polymer synthesis (MAPS) as a tool in biomaterials science: How new and how powerful. *Progress in Polymer Science*. 2011;36(8):1050-78.
82. Leonellia C, Mason TJ. Microwave and ultrasonic processing: Now a realistic option for industry. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*. 2010;49(9):885-900.
83. Solanki HK, D.Prajapati V, Jani GK. Microwave Technology—A Potential Tool in Pharmaceutical Science. *International Journal of PharmTech Research*. 2011;42(24):1754-61.
84. Agazzi A, Pirola C. Fundamentals, methods and future trends of environmental microwave sample preparation. *Microchemical Journal*. 2000;67(1-3):337-41.
85. Camel V. Microwave-assisted solvent extraction of environmental samples. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2000;19(4):229-48.
86. Labbozzetta S, Valvo L, Bertocchi P, Manna L. Focused microwave-assisted extraction and LC determination of the active ingredient in naproxen-based suppositories. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2005;39(3-4):463-8.
87. Luque-García JL, Castro MDLd. Where is microwave-based analytical equipment for solid sample pre-treatment going? *Trends in Analytical Chemistry*. 2003;22(2):90-8.
88. Letellier M, Budzinski H. Microwave assisted extraction of organic compounds. *Analisis*. 1999;27(3):259-70.
89. Kappe CO. *Microwaves in Organic and Medicinal Chemistry*. 2 ed: Wiley-VCH Verlag & Co.; 2012.
90. Oliver Kappe C. Microwave dielectric heating in synthetic organic chemistry. *Chemical Society reviews*. 2008;37(6):1127-39.

91. Eskilsson CS, Bjorklund E. Analytical-scale microwave-assisted extraction. *Journal of Chromatography A*. 2000(902):227–50.
92. Bogdal D, Prociak A. *Microwave-Enhanced Polymer Chemistry and Technology*: Blackwell Publishing Professional; 2007.
93. Zapata DA, Pujol RO, Coda FE. La química de la radiación de microondas. *Técnica Industrial*. 2009(287):55 - 8.
94. Meredith RJ. *Engineers' Handbook of Industrial Microwave Heating*. Energy P, editor: The Institution of Engineering and Technology 1998. 365 p.
95. Kappe CO, Stadler A, Dallinger D. *Microwaves in Organic and Medicinal Chemistry*: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim; 2005.
96. Leadbeater NE, McGowan CB. *Laboratory Experiments Using Microwave Heating*: CRC Press 2013.
97. Casares WAV, Escoffié POA, Quiñonez MEV. *Análisis Ultravioleta-Visible: la teoría y la práctica en el ejercicio profesional*: Universidad Autónoma de Yucatán; 2006.
98. Robinson JW, Frame EMS, II GMF. *Undergraduate Instrumental Analysis*. 7th ed: CRC Press; 2014.
99. Skoog DA, Holler FJ, Crouch SR. *Principios de análisis instrumental*. 6 ed. México, D.F. 2008. 1038 p.
100. Wixom RL, Gehrke CW. *Chromatography : a science of discovery*: John Wiley & Sons, Inc.; 2010.
101. D.Christian G. *Química Analítica*. 6th ed: McGraw-Hill / Interamericana de México; 2014.
102. Dong MW. *Modern HPLC for practicing scientists*: John Wiley & Sons, Inc.; 2006.
103. Snyder LR, Kirkland JJ, Glajch JL. *Practical HPLC Method Development*. 2nd ed: John Wiley & Sons, Inc.; 1997.
104. Guo X, Chen B, He M, Hu B, Zhou X. Ionic liquid based carrier mediated hollow fiber liquid liquid liquid microextraction combined with HPLC-ICP-MS for the speciation of phenylarsenic compounds in chicken and feed samples. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. 2013;28(10):1638-47.
105. Adak A, Mangalgi KP, Lee J, Blaney L. UV irradiation and UV-H₂O₂ advanced oxidation of the roxarsone and nitarsone organoarsenicals. *Water Research*. 2015;70:74-85.
106. Welna M, Szymczycha-Madeja A, Pohl P. Comparison of strategies for sample preparation prior to spectrometric measurements for determination and speciation of arsenic in rice. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2015;65:122-36.
107. Rosenfeld JM. Solid-phase analytical derivatization: enhancement of sensitivity and selectivity of analysis. *Journal of Chromatography A*. 1999;843(1–2):19-27.
108. Haas R, Krippendorf A. Determination of chemical warfare agents in soil and material samples. *Environ Sci & Pollut Res*. 1997;4(3):123-4.
109. Takeuchi A, Namera A, Kawasumi Y, Imanaka T, Sakui N, Ota H, et al. Development of an Analytical Method for the Determination of Arsenic in Urine by Gas Chromatography-mass Spectrometry for Biological Monitoring of Exposure to Inorganic Arsenic. *Journal of Occupational Health*. 2012;54(6):434-40.
110. Eom HY, Yang D-H, Suh JH, Kim U, Kim J, Cho H-D, et al. Determination of residual arsenic compounds in chicken muscle by ultra-performance liquid chromatography coupled with ultraviolet detection after pre-column derivatization with toluene-3,4-dithiol. *Journal of Chromatography B*. 2015;1006:151-7.

111. Mester Z, Pawliszyn J. Speciation of dimethylarsinic acid and monomethylarsonic acid by solid-phase microextraction–gas chromatography–ion trap mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2000;873(1):129-35.
112. Richter J, Lischka S, Piechotta C. Analysis of arsenic species in fish after derivatization by GC–MS. *Talanta*. 2012;101:524-9.
113. Roerdink AR, III JHA. Sensitive method for the determination of roxarsone using solid-phase microextraction with multi-detector gas chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2004;1057(1–2):177-83.
114. Szostek B, Aldstadt JH. Determination of organoarsenicals in the environment by solid-phase microextraction–gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 1998;807(2):253-63.
115. Poole C. *Gas Chromatography*. First ed: Elsevier; 2012.
116. Halket JM, Waterman D, Przyborowska AM, Patel RKP, Fraser PD, Bramley PM. Chemical derivatization and mass spectral libraries in metabolic profiling by GC/MS and LC/MS/MS. *Journal of Experimental Botany*. 2005;56(410):219-43.
117. Dettmer-Wilde K, Engewald W. *Practical Gas Chromatography: A Comprehensive Reference*. First ed: Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2014.
118. Liu Q, Peng H, Lu X, Le XC. Enzyme-assisted extraction and liquid chromatography mass spectrometry for the determination of arsenic species in chicken meat. *Analytica Chimica Acta*. 2015.
119. Yao L, Huang L, He Z, Zhou C, Li G, Yang B, et al. External inorganic N source enhances the uptake of As species in garland chrysanthemum (*C. coronarium*) amended with chicken manure bearing roxarsone and its metabolites. *Journal of hazardous materials*. 2013;254-255:270-6.
120. Yao L, Huang L, He Z, Zhou C, Li G. Occurrence of arsenic impurities in organoarsenics and animal feeds. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2013;61(2):320-4.
121. Liu J, Yu H, Song H, Qiu J, Sun F, Lia P, et al. Simultaneous determination of p-arsanilic acid and roxarsone in feed by liquid chromatography-hydride generation online coupled with atomic fluorescence spectrometry. *Journal of Environmental Monitoring*. 2008;10(8):975-8.
122. Chen D, Zhang H, Tao Y, Wang Y, Huang L, Liu Z, et al. Development of a high-performance liquid chromatography method for the simultaneous quantification of four organoarsenic compounds in the feeds of swine and chicken. *Journal of Chromatography B*. 2011;879(11-12):716-20.
123. Liu X, Zhang W, Hu Y, Cheng H. Extraction and detection of organoarsenic feed additives and common arsenic species in environmental matrices by HPLC–ICP-MS. *Microchemical Journal*. 2013;108:38-45.
124. Peng H, Hu B, Liu Q, Yang Z, Lu X, Huang R, et al. Liquid chromatography combined with atomic and molecular mass spectrometry for speciation of arsenic in chicken liver. *Journal of Chromatography A*. 2014;1370:40-9.
125. Jackson BP, Bertsch PM. Determination of Arsenic Speciation in Poultry Wastes by IC-ICP-MS. *Environmental Science & Technology*. 2001;35(24):4868-73.
126. Monasterio RP, Londonio JA, Farias SS, Smichowski P, Wuilloud RG. Organic solvent-free reversed-phase ion-pairing liquid chromatography coupled to atomic fluorescence spectrometry for organoarsenic species determination in several matrices. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2011;59(8):3566-74.

127. Li P, Hu B. Sensitive determination of phenylarsenic compounds based on a dual preconcentration method with capillary electrophoresis/UV detection. *Journal of Chromatography A*. 2011;1218(29):4779-87.
128. Rosal CG, Momplaisir G-M, Heithmar E. Roxarsone and transformation products in chicken manure: determination by capillary electrophoresis-inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Electrophoresis*. 2005;26(7-8):1606-14.
129. Sánchez-Rodas D, Gómez-Ariza JL, Oliveira V. Development of a rapid extraction procedure for speciation of arsenic in chicken meat. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 2006;385(7):1172-7.
130. Weston RE, Wheals BB, Kensett MJ. The gas-chromatographic determination of arsanilic acid and carbarsone in animal feeding stuffs. *The Analyst*. 1971;96(1145):601-3.
131. Wang W-X, Yang T-J, Li Z-G, Jong T-T, Lee M-R. A novel method of ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction coupled to liquid chromatography-mass spectrometry for the determination of trace organoarsenic compounds in edible oil. *Analytica Chimica Acta*. 2011;690(2):221-7.
132. Wang P, Zhao G, Tian J, Su X. High-performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry based method for the determination of organic arsenic feed additives and speciation of anionic arsenics in animal feed. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2010;58(9):5263-70.
133. Hinojosa-Reyes L, Guzmán-Mar JL, Hernández-Ramírez A, Peralta-Hernández JM, Alfaro-Barbosa JM. Microwave assisted extraction for mercury speciation analysis. *Micro and Trace Chemistry*. 2011;172(1):3-14.
134. Bednar AJ, Garbarino JR, Burkhardt MR, Ranville JF, Wildeman TR. Field and laboratory arsenic speciation methods and their application to natural-water analysis. *Water Research*. 2004;38(2):355-64.
135. Dean JR, Ebdont L, Foulkes ME. Determination of the Growth Promoter, 4-Hydroxy-3-Nitrophenyl- Arsonic Acid in Chicken Tissue by Coupled High-performance Liquid Chromatography-Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. 1994;9.
136. Wangkarn S, Pergantis SA. High-speed separation of arsenic compounds using narrow-bore high-performance liquid chromatography on-line with inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. 2000;15(6):627-33.
137. Gómez-Ariza JL, Sánchez-Rodas DS, Giráldez I, Morales E. A comparison between ICP-MS and AFS detection for arsenic speciation in environmental samples. *Talanta* 2000;51:257-68.
138. Ellison SLR, Barwick VJ, Farrant TJD. *Practical Statistics for the Analytical Scientist: A Bench Guide (Valid Analytical Measurement)*. 2nd ed: Royal Society of Chemistry; 2009.
139. Microwave assisted acid digestion of siliceous and organically based matrices, (1996).
140. He B, Jiang G-b, Xu X-b. Arsenic speciation based on ion exchange high-performance liquid chromatography hyphenated with hydride generation atomic fluorescence and on-line UV photo oxidation. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*. 2000(368):803-8.
141. ChangjinWei, Liu J. A new hydride generation system applied in determination of arsenic species with ion chromatography-hydride generation-atomic fluorescence spectrometry (IC-HG-AFS). *Talanta*. 2007;73(3):540-5.

142. Santos WNLd, Cavalcante DD, Macedo SM, Nogueira JS, Silva EGPd. Slurry Sampling and HG AFS for the Determination of Total Arsenic in Rice Samples. *Food Analytical Methods*. 2013;6(4):1128-32.
143. Nicholson FA, Chambers BJ, Williams JR, Unwin RJ. Heavy metal contents of livestock feeds and animal manures in England and Wales. *Bioresource Technology*. 1999;70(1):23-31.
144. Vilano M, Rubio R. Liquid chromatography-UV irradiation-hydride generation-atomic fluorescence spectrometry for selenium speciation. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. 2000;15(2):177-80.
145. Yao L, Li G, Dang Z, He Z, Zhou C, Yang B. Arsenic speciation in turnip as affected by application of chicken manure bearing roxarsone and its metabolites. *Plant and Soil*. 2009;316(1-2):117-24.
146. D'Angelo E, Zeigler G, Beck EG, Grove J, Sikora F. Arsenic species in broiler (*Gallus gallus domesticus*) litter, soils, maize (*Zea mays* L.), and groundwater from litter-amended fields. *The Science of the total environment*. 2012;438:286-92.
147. Peryea FJ. Phosphate-Induced Release of Arsenic from Soils Contaminated with Lead Arsenate. *Soil Science Society of America Journal*. 1991;55(5):1301-6.
148. Wolle MM, Rahman GMM, Kingston HMS, Pamuku M. Speciation analysis of arsenic in prenatal and children's dietary supplements using microwave-enhanced extraction and ion chromatography–inductively coupled plasma mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*. 2014;818(0):23-31.
149. Bohari Y, Lobos G, Pinochet H, Pannier F, Astruc A, Potin-Gautier M. Speciation of arsenic in plants by HPLC-HG-AFS: extraction optimisation on CRM materials and application to cultivated samples. *Journal of Environmental Monitoring*. 2002;4(4):596.
150. Alam MGM, Tokunaga S. Chemical Extraction of Arsenic from Contaminated Soil. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*. 2006;41(4):631-43.
151. Kirby J, Maher W. Measurement of water-soluble arsenic species in freeze-dried marine animal tissues by microwave-assisted extraction and HPLC-ICP-MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. 2002;17(8):838-43.
152. Campabadal C. *Guía Técnica para Alimentación de Cerdos*. Ganadería MdAy, editor: Imprenta Nacional; 2009.
153. Chile IdSPd. Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: “Aspectos generales sobre la validación de métodos”. 2010.
154. INECC-CCA. *Guía para la validación de métodos alternos de análisis*. México2010. p. 33.