



Universidad de Guanajuato

División de Ciencias Naturales y Exactas.

Maestría en ciencias químicas

Proyecto:

**ANÁLISIS DE ALGUNOS COMPUESTOS
INDÓLICOS EN PLANTAS COMESTIBLES DE
GUANAJUATO, UTILIZANDO
CROMATOGRFÍA DE LÍQUIDOS CON
DETECCIÓN FLUORIMÉTRICA.**

Elvira Vianey Rangel Samano

Para obtener el grado de
Maestría en ciencias químicas

Comité tutorial:

Dr. Kazimierz Wrobel (director de tesis), Dra. Katarzyna Dorota Wrobel (co-director), Dr. Alan Alexander González Ibarra (miembro del Comité)

Declaratoria

Guanajuato, Gto. Agosto del 2021

Por medio de la presente me responsabilizo de la autenticidad y originalidad de este proyecto titulado **“Análisis de algunos compuestos indólicos en plantas comestibles de Guanajuato, utilizando cromatografía de líquidos con detección fluorimétrica”**. Realizado por la QFB. Elvira Vianey Rangel Samano, para obtener el grado de **MAESTRA EN CIENCIAS QUIMICAS (M.C)**, en las instalaciones del campus Guanajuato en el departamento de Química de la Universidad de Guanajuato.

Director de tesis:

Dr. Kazimierz Wrobel

Co-directora:

Dra. Katarzyna Dorota Wrobel

Miembro del comité:

Alan Alexander González Ibarra

Miembros del jurado para el examen para obtener el grado de Maestra en Ciencias Químicas presenta la QFB. Elvira Vianey Rangel Samano, con el proyecto titulado "**Análisis de algunos compuestos indólicos en plantas comestibles de Guanajuato, utilizando cromatografía de líquidos con detección fluorimétrica**".

Dra. Alma Rosa Corrales Escobosa

Dra. Eunice Yáñez Barrientos

M.C. Israel Enciso Donis

Dr. Francisco Javier Acevedo Aguilar

Agradecimientos

La realización de este proyecto no hubiera sido posible sin el gran apoyo incondicional que recibí por parte de mis padres, quienes siempre dieron lo mejor de sí para que yo pudiera cumplir tanto mis metas académicas como personales y particularmente por siempre creer en mí.

A mis asesores, los doctores Kazimierz Wrobel y Katarzyna Dorota Wrobel, por recibirme en su equipo de trabajo, aun sin mucha experiencia en el área. En especial por todo el tiempo que dedicaron a mi proyecto, por sus observaciones que me llevaron a comprender mejor, fundamentos y aspectos importantes del proyecto.

Al Dr. Francisco, por haber sido mi guía experimental durante la primera parte del desarrollo de este trabajo, por tener la disponibilidad, paciencia y motivarme con su actitud siempre positiva, para que yo pudiera aprender lo necesario. También quiero dar un especial agradecimiento al Dr. Alan, por transmitir y compartir algunas de sus experiencias y conocimientos, sobre el área, con una gran paciencia y muy a pesar de que las circunstancias que se presentaron durante el desarrollo del proyecto, destacando las atenciones que tuvo hacia mis dudas y como respondió a cada una de ellas. Al M.C Israel y las Doctoras Eunice y Alma por darme la confianza para trabajar en sus respectivos laboratorios.

A todos los que fueron mis profesores durante esta parte importante de mi desarrollo académico.

A mis amigas, Jessica, Okarina, Rocío, Monserrat, Abygail, Marisol, Adriana y Claudia que siempre estuvieron apoyándome tanto en lo profesional como en la vida personal; les agradezco por todos los buenos momentos que me hicieron pasar, por las risas interminables, las fiestas y cafés, los consejos, las visitas inesperadas y por siempre creer en mí. Con una mención especial hacia Jessica y Okarina, quienes cada día me prestaron algo de su tiempo para escuchar algunas de mis preocupaciones constantes y ayudaron en todo lo que les fue posible, aun con distancia de por medio.

Al M.C Jesús, gracias por la paciencia y disponibilidad para orientarme y responder mis dudas.

A mis compañeros y nuevos amigos que hice gracias a este proyecto, Abygail y Humberto, a los cuales les deseo éxito en sus vidas.

A la dirección del posgrado que siempre estuvo disponible para atender dudas y comentarios.

A CONACyT por el apoyo económico aportado durante estos dos años.

Contenido

Índice de abreviaturas.....	10
Resumen	11
1. INTRODUCCIÓN.....	13
1.1. Compuestos indólicos endógenos y exógenos en plantas.	13
1.1.1. Biosíntesis de compuestos indólicos en plantas.	13
1.1.2. Indol-3-Ácido acético y las rutas de su biosíntesis.	14
1.1.3. Compuestos indólicos derivados de glucobrassicina (GBR).	16
1.1.4. Diferentes fuentes de compuestos indolicos en relacion a crecimiento de plantas..	17
1.2. Riesgos y beneficios relacionados con ingesta de compuestos indólicos provenientes de plantas.....	18
1.2.1. Beneficios de compuestos indólicos en humanos.	18
1.2.2. Riesgos del uso de las PGRs.....	19
1.3. Compuestos indólicos de interés.	20
1.4. Análisis de compuestos indólicos en plantas.....	20
1.4.1. Tratamiento de muestra.	21
1.4.2. Técnicas analíticas.....	26
2. Objetivos.....	32
2.1. Objetivo principal.....	32
2.2. Objetivos particulares.....	32
3. Parte experimental:.....	32
3.1. Equipo de laboratorio.	32
3.1.1. Equipos utilizados en el procesamiento de muestra y preparación de reactivos:	32
3.2. Estándares y Reactivos:.....	32
3.3. Programas de análisis de datos:	33
3.4. Muestras:.....	33
4. Resultados y discusión.	33
4.1. Revisión bibliográfica sobre las diferentes aplicaciones de la técnica QuEChERS.	33
4.1.1. Pesticidas.	42
4.1.2. Micotoxinas.....	44
4.1.3. Otras fuentes de contaminación alimentaria.....	46
4.1.4. Autenticación y calidad.....	47
4.1.5. Biomarcadores y evaluación de exposición a compuestos potencialmente tóxicos mediante consumo de alimentos.....	48
4.1.6. Determinación de compuestos bioactivos.....	50
4.1.7. Análisis farmacológicos y clínicos.	51
4.1.8. Conclusiones:.....	52

4.2. Puesta a punto de las condiciones HPLC- FLD/DAD para análisis de compuestos indólicos seleccionados.....	54
Extracto de rábano	57
4.3. Proceso de calibración directa	58
Calibración integrando el proceso QuEChERS	63
4.4. Parámetros analíticos.....	67
4.5. Evaluación comparativa de diferentes condiciones QuEChERS para análisis de compuestos indólicos en vegetales.....	69
4.6. Efecto de tratamiento con beta- glucosidasa sobre el perfil de compuestos indólicos.....	73
4.7. Estudio de recuperación en el análisis de muestras reales.	76
5. Conclusiones	83
6. Referencias bibliográficas:.....	83
7. Anexos	94
Anexo 1	94

Índice de figuras

Figura 1. Estructura del indol.	13
Figura 2. Ruta de síntesis de Triptófano[3].	13
Figura 3. Biosíntesis de índoles a partir del triptófano (Trp): IAOx – indol-3-acetaldoxima, IAN- indol-3-acetonitrilo, IAA- indol-3-ácido acético, GBR- glucobrassicina, I3C- indol-3-carbinol, I3CHO- indol-3-carboxaldehído, ABG- ascorbigen [5].	14
Figura 4. La vía de biosíntesis de IAA dependiente de triptófano[3].	15
Figura 5. La vía del indol-3-acetamida[3].	16
Figura 6. La vía del indol-3- acetaldoxima/ indol-3- acetonitrilo[3].	16
Figura 7. Compuestos indólicos seleccionados junto con el ácido orto anísico como estándar interno.	20
Figura 8. Esquema original del método QuEChERS.	25
Figura 9. Comparación de QuEChERS original con sus modificaciones propuestas posteriormente.	53
Figura 10. Típico cromatograma de la mezcla de estándares de compuestos indólicos: a)-detección fluorimétrica para la cuantificación de ICA, IAA, IPA, IAN, IBA, I3C; b)- detección DAD- para la cuantificación de I3CHO; todos los estándares se encontraban a una concentración de 20 µg/mL.	56
Figura 11. Cromatogramas sobrepuestos de la mezcla de estándares (en azul) y cromatogramas de extracto de rábano utilizando el procedimiento QuEChERS original (en rojo):	59
a) Detección Fluorimétrica, ganancia 10: sin dilución (azul), con dilución 1:20 (rojo)	59
b) Detección fluorimétrica, ganancia 14: con dilución 1:20 (rojo).	59
c) Detección espectrofotométrica, 280 nm, con dilución 1:20 (rojo).	59
Las letras en la parte superior derecha ESTD corresponden a la mezcla de estándares, MD a la muestra diluida y MSD a la muestra sin dilución.	59
Figura 12. Cromatogramas de las soluciones de calibración (a)- detección fluorimétrica para la cuantificación de ICA, IAA, I3A, IPA, IAN, IBA, I3C; b)- detección UV para la cuantificación de I3CHO; las letras P1-P5 corresponden a las soluciones de calibración a las concentraciones que se muestran en la Tabla 6).	61
Figura 13. Curvas de calibración de compuestos indólicos para la cuantificación de ICA, IAA, I3A, IPA, IAN, IBA, I3C, mediante la detección FLD y DAD para la cuantificación de I3CHO.	63
Figura 14. Cromatogramas de soluciones de calibración obtenidos mediante el proceso de extracción QuEChERS (a)- detección fluorimétrica para la cuantificación de ICA, IAA, I3A, IPA, IAN, IBA, I3C; b)- detección UV para la cuantificación de I3CHO; las letras P0 y P1-P5 corresponden al blanco y a las soluciones de calibración a diferentes concentraciones).	65
Figura 15. curvas de calibración de compuestos indólicos obtenidas mediante el método de extracción QuEChERS, para la cuantificación por detección fluorimétrica ICA, IAA, I3A, IPA, IAN, IBA, I3C y la cuantificación de I3CHO por detección UV.	67

Figura 16. Procedimiento general de extracción QuEChERS.	70
Figura 17. Cromatogramas de estándares y los cuatro diferentes métodos de extracción QuEChERS probados en la muestra de rábano (a)-detección fluorimétrica para ICA, IAA, I3A, IPA, IAN, IBA, I3C, AOA; b)- detección UV para I3CHO, AOA); Las letras mostradas en la parte superior derecha de cada cromatograma corresponden a: a) QuEChERS sin adicional control de pH, b) agregando tampón de acetatos, sin cloruro de sodio, c) agregando tampón de acetatos y cloruro de sodio, d) agregando citratos y cloruro de sodio.	72
Figura 18. Esquema general del tratamiento con β -glucosidasa.	73
Figura 19. Cromatogramas de los estándares correspondientes al punto de calibración P1 (azul- ESTD), muestra de rábano después del método QuEChERS y sin tratamiento enzimático (rojo- Rab SB) y con tratamiento con β -glucosidasa (verde- Rab CB). a) detección fluorimétrica para ICA, IAA, I3A, IPA, IAN, IBA, I3, AOA; b)-detección UV para la cuantificación de I3CHO, AOA).....	74
Figura 20. Cromatogramas de estándares correspondientes a punto de calibración P1 (azul-ESTD), muestra de nabo después de QuEChERS y sin tratamiento enzimático (rojo-Rab SB) y con tratamiento con β -glucosidasa (verde-Nab CB). a)-detección fluorimétrica para ICA, IAA, I3A, IPA, IAN, IBA, I3C, AOA; b)- detección UV para la cuantificación de I3CHO, AOA).....	75
Figura 21. Cromatogramas del extracto de muestra de rábano sin y con adicción de estándares (a)-detección fluorimétrica para la cuantificación de ICA, IAA, I3A, IPA, IAN, IBA, I3C; b)-detección UV para la cuantificación de I3CHO; las letras P0 y P1-P5 corresponden a la muestra sin adicción de estándar y a la misma muestra con adiciones de concentraciones iguales que en las soluciones de calibración).....	79
Figura 22. Cromatogramas del extracto de muestra de nabo sin y con adicción de estándares (a)- detección fluorimétrica para la cuantificación de ICA, IAA, I3A, IPA, IAN, IBA, I3C; b)- detección UV para la cuantificación de I3CHO; las letras P0 y P1-P5 corresponden a la muestra sin adicción de estándar y la misma muestra con adiciones de concentraciones iguales a las soluciones de calibración.....	82
Figura 23. Esquema de preparación de las soluciones de calibración directa y concentraciones finales de indoles en cada punto de la curva de calibración por HPLC con detección de FLD y DAD.	94

Indice de tablas

Tabla 1. Técnicas de extracción con aplicación a muestras líquidas o extractos crudos de muestras solidas.....	23
Tabla 2. Técnicas de extracción para muestras sólidas.....	23
Tabla 3. Algunas aplicaciones del método QuEChERS en el análisis de PGR y pesticidas en plantas.....	29
Tabla 4. Aplicaciones de la técnica QuEChERS.....	35
Tabla 5. Parámetros utilizados para el análisis cromatográfico de ocho compuestos indólicos y AOA-EI, mediante HPLC-DAD/FLD.....	55
Tabla 6. Concentraciones de las soluciones de calibración.....	59
Tabla 7. Protocolo de preparación de soluciones de calibración para el proceso QuEChERS. En la primera columna se presenta la concentración de IAA en la solución mixta de ocho estándares, en la segunda columna se anota el volumen de esta solución y en la tercera la concentración de IAA en la solución final preparada para QuEChERS. En la última columna, se presentan las concentraciones en las soluciones después de QuEChERS.....	63
Tabla 8. Parámetros analíticos evaluados en base al proceso de calibración integrado QuEChERS (LD-límite de detección, LC- límite de cuantificación).....	68
Tabla 9. Comparación de los valores R^2 de funciones de calibración y de coeficientes de variación (CV, %) obtenidas en calibración con QuEChERS integrado sin y con AOA como EI. Para cada compuesto, CV se calculó en base de 3 réplicas del punto P1 de calibración.	68
Tabla 10. Condiciones del método QuEChERS examinadas y señales cromatográficas relativas de IAN y el EI (se tomó la señal obtenida en condiciones originales como 100%).	70
Tabla 11. Resultados de experimento de adición estándar para la muestra de rábano....	78
Tabla 12. Resultados de experimentos de adición estándar para la muestra de nabo.	81

Índice de abreviaturas

2,4-D. <i>Ácido-2,4-dicloro-fenoxiacético</i>	IBR. <i>Brassica rapa</i>
ABA. <i>Ácido abscisico</i>	IC. <i>Cromatografía de intercambio iónico</i>
ABG. <i>Ascorbigen</i>	ICA. <i>Indol-3-ácido carboxílico, Indol-3-ácido carboxílico</i>
ACF. <i>Fibras de carbón activado</i>	IPA. <i>Indol-3-ácido propionico, Indol-3-ácido pirúvico, Indol-3-ácido propionico</i>
AOAC. <i>Asociación Oficial de Químicos Analíticos</i>	IT. <i>Trampa de iones</i>
APCI. <i>Ionización química a presión atmosférica</i>	LC. <i>Cromatografía de líquidos</i>
APPI. <i>Fotoionización a presión atmosférica</i>	LDS. <i>Dietilamida del ácido lisérgico</i>
CEN. <i>Comite Europeo de Estandarización</i>	LLE. <i>Extracción líquido-líquido</i>
CNT. <i>Nanotubos de carbón</i>	LMR. <i>Limites máximos de residuos</i>
CPE. <i>Extracción en punto de nube</i>	LPE. <i>Extracción en fase líquida</i>
DAD. <i>Detección por arreglo de diodos</i>	LPS. <i>Lipopolisacarido</i>
DE. <i>Tierra de diatomeas</i>	LQ. <i>Límite de cuantificación</i>
DIM. <i>3,3-diindolilmetano</i>	MAE. <i>Extracción asistida por microondas</i>
DLLME. <i>Microextracción líquido líquido dispersiva</i>	MEKC. <i>Cromatografía electrocinética micelar</i>
d-SPE. <i>Extracción dispersiva en fase solida</i>	MIA. <i>metil-3-indol acetato</i>
EC. <i>Electroforesis capilar</i>	MIP. <i>Polímeros impresos molecularmente</i>
ECD/ μ ECD. <i>Micro detector de captura de electrones</i>	MOF. <i>Redes metal-orgánicas</i>
EC-MS. <i>Electroforesis capilar acoplada a espectrometría de masas</i>	MRM. <i>Monitoreo de reacciones múltiples</i>
EI. <i>Estándar interno</i>	NAA. <i>Ácido-2-(1-naftil) acético</i>
ELISA. <i>Ensayo inmunoabsorbente enzimático</i>	NAD. <i>2-naftalen-1-ilo acetamida</i>
ESI. <i>Ionización por electronebulización</i>	OMS. <i>Organización mundial de la salud</i>
EVN. <i>Estireno divinilbenceno</i>	PAHs. <i>Hidrocarburos aromáticos policíclicos</i>
FAO. <i>Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y la agricultura</i>	PDA. <i>Deterctor de matriz de fotodiodos</i>
FID. <i>Detector de ionización de llama</i>	PGC. <i>Carbon poroso grafitizado</i>
FL. <i>Fluorisil</i>	PGR. <i>Reguladores del crecimiento de las plantas</i>
FLD. <i>Detección espectro fluorimétrica</i>	PLE. <i>Extracción de líquido a presión</i>
FM. <i>Fase móvil</i>	PSA. <i>Amina primaria secundaria</i>
FPD. <i>Detector fotométrico de llama</i>	PTFE. <i>Politetrafluoroetileno</i>
GBR. <i>Glucobrassicina</i>	QqQ. <i>Triple cuadrupolo</i>
GC-MS. <i>Cromatografía de gases acoplada con espectrometría de masas</i>	QuEChERS. <i>Método rápido fácil barato efectivo robusto y seguro</i>
HLB. <i>Copolímero de divinilbenceno y vinil pirrolidinona</i>	Rec. <i>Porcentaje de recuperación</i>
HPLC. <i>Cromatografía de líquidos de alta resolución</i>	RSD. <i>Desviación estándar relativa</i>
HR. <i>Alta resolución</i>	SAX. <i>intercambio fuerte de aniones</i>
I3A. <i>Indol-3-aetil, Indol-3-aetil</i>	SFE. <i>Extracción de fluido supercrítico</i>
I3C. <i>Indol-3-carbinol</i>	SIM. <i>Monitoreo selectivo de iones</i>
I3CHO. <i>Indol-3-carboxaldehído, Indol-3-carbaldehído, Indol-3-carboxaldehído</i>	SPE. <i>Extracción en fase solida</i>
IAA. <i>Indol-3-ácido acético</i>	SPME. <i>Microextracción en fase solida</i>
IAAlD. <i>Indol-3-acetaldehído</i>	TAM. <i>Triptamina</i>
IAM. <i>Indol-3-acetamida</i>	TOF. <i>Analizadores de tiempo de vuelo</i>
IAN. <i>Indol-3-acetonitrilo, Indol-3-acetonitrilo</i>	Trp. <i>Triptofano</i>
IAOx. <i>Indol-3-acetaldoxima</i>	TSO. <i>Via de triptófano de cadena lateral oxidasa</i>
IBA. <i>Indol-3-ácido butirico, Indol-3-ácido butirico</i>	UHPLC-MS / MS. <i>Cromatografía de líquidos de ultra alta resolución acoplada con espectrometría de masas masas</i>
	VWD. <i>Detección espectrofotométrico de longitud variable</i>
	α -NAA. <i>Ácido-1-naftaleno acético</i>

Resumen

El presente trabajo de tesis se enfoca en el análisis de algunos compuestos indólicos en plantas comestibles cultivadas en Guanajuato, desarrollando para ellos un procedimiento analítico consistente de un tratamiento de muestra mediante la técnica QuEChERS, separación por cromatografía de líquidos en fase inversa y detección fluorimétrica (HPLC-FLD). Los compuestos de interés han sido indol-3-ácido carboxílico (ICA), indol-3-carboxaldehído (I3CHO), indol-3-ácido acético (IAA), indol-3-acetil (I3A), indol-3-ácido propiónico (IPA), indol-3-acetonitrilo (IAN), indol-3-ácido butírico (IBA) e indol-3-carbinol (I3C). En el primer capítulo se presenta una introducción general acerca de los indoles y algunos de sus derivados más importantes, iniciando con una descripción de su biosíntesis tanto endógena como exógena. A continuación, se describen brevemente los principales beneficios de estos compuestos en el organismo humano, siendo los vegetales su mayor fuente en la dieta. Así mismo, se mencionan los riesgos en la salud, relacionados con la ingesta de excesivas cantidades de compuestos indólicos, sobre todo en el contexto del uso de algunos promotores del crecimiento en plantas (PGR). Enseguida se describen los principales procedimientos de extracción que se han aplicado a las muestras vegetales y se hace especial énfasis en la técnica QuEChERS. Dicha técnica se describe como rápida, fácil, barata, eficiente, robusta y segura, y ha sido elegida para la extracción de los indoles en este trabajo debido a sus múltiples ventajas que se resumen en esta parte del texto. Finalmente se realiza una revisión de las técnicas analíticas utilizadas para la determinación de compuestos indólicos en material vegetal, además se discute la importancia de la detección fluorimétrica para este trabajo.

En el capítulo dos se expone como objetivo principal, de este trabajo, la determinación de algunos compuestos indólicos en material de plantas, utilizando el procedimiento HPLC-FLD; también se definen los objetivos particulares a cumplir para el desarrollo completo de este trabajo.

El capítulo tres corresponde a una revisión bibliográfica realizada a partir de las principales aplicaciones encontradas para la técnica QuEChERS en los últimos años. En particular, se exponen las más importantes adaptaciones que se le han dado al método original para su efectiva aplicación a diferentes tipos de muestra y de analitos en diferentes áreas de investigación. En esta revisión, se consideró el análisis multi-residual de pesticidas, micotoxinas en alimentos, algunas otras fuentes de contaminación alimentarias, así como la autenticación y la calidad de ciertos alimentos de alto grado de importancia debió al incremento en las exportaciones de estos productos. También se han incluido aplicaciones de QuEChERS en el análisis de diversos biomarcadores de exposición a compuestos potencialmente tóxicos presentes en alimentos y compuestos con potencial actividad biológica. Además de los estudios en alimentos, se resalta la importancia de esta técnica para áreas más diversas como en el análisis farmacológicos y clínicos, en los cuales ha sido de gran ayuda el implemento de esta técnica. Para finalizar este capítulo se presentan las conclusiones a los que condujo la investigación bibliográfica y se resaltan, a manera de resumen, las principales modificaciones al procedimiento que se encontraron.

Para el capítulo cuatro se enlistan los equipos, reactivos, materiales y programas de análisis de datos, que se utilizaron durante el desarrollo de este proyecto.

En el capítulo cinco se describen los resultados obtenidos en el desarrollo de procedimiento propuesto. En primer lugar, se realiza la selección del estándar interno (ácido o-anísico) y de las condiciones de separación y detección a emplear. A continuación, se integra en procedimiento QuEChERS, se realiza el proceso de calibración y se evalúan principales parámetros analíticos del procedimiento. En aplicación a muestras reales se le realiza una comparación de cuatro diferentes protocolos QuEChERS, observando que las condiciones originales arrojaron mejores resultados. Se demuestra la formación de glicoconjugados de algunos compuestos indólicos (principalmente IAA), mediante el tratamiento de la muestra con la enzima β -glucosidasa. Finalmente, se realizan los

experimentos de recuperación, utilizando muestras de rábano y nabo a las que se agregan estándares de compuestos de interés correspondientes a los cinco puntos de calibración.

Como resultado de lo previamente investigado durante la parte introductoria, así como lo expuesto en los capítulos posteriores a este, se llegó a una serie de conclusiones generales que son presentadas en el capítulo seis de esta tesis.

1. INTRODUCCIÓN.

1.1. Compuestos indólicos endógenos y exógenos en plantas.

En 1866, mientras Baeyer y Knop estudiaban la estructura del colorante índigo, redujeron la isatina obteniendo dos productos que llamaron dioxindol y oxindol, el oxindol fue nombrado finalmente indol. Los mismos investigadores en el año 1869 propusieron la estructura química del indol (Figura 1) [1]. De ahí, el compuesto indólico es aquel que contiene en su molécula una estructura bicíclica consistente en un anillo de benceno fusionado con un anillo de pirrol.

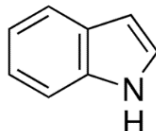


Figura 1. Estructura del indol.

1.1.1. Biosíntesis de compuestos indólicos en plantas.

El grupo indol es un componente estructural de varios compuestos presentes en las plantas; su biosíntesis se lleva a cabo a partir del corismato producido en la ruta del ácido shikímico [2]. En la Figura 2 se ubica al indol en la ruta de la síntesis de triptófano.

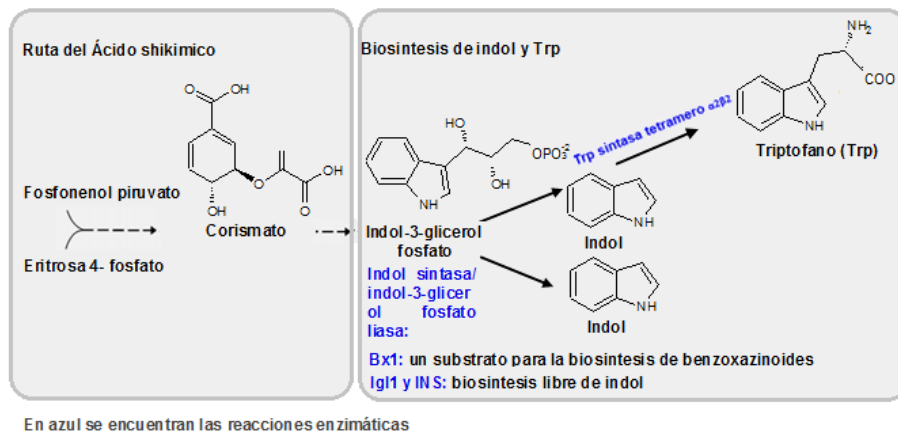


Figura 2. Ruta de síntesis de Triptófano[3].

Específicamente, el corismato es convertido a indol-3-glicerol fosfato y después, con ayuda de la subunidad alfa-sintasa Trp, se forma indol. A partir de indol, mediante acción enzimática de la subunidad beta-sintasa Trp, se sintetiza el triptófano [4]. Cabe mencionar que el indol-3-glicerol fosfato es el precursor de varias rutas tales como la biosíntesis de diterpeno indol alcaloides o benzoxazinona (Figura 3) [3].

El triptófano es el único aminoácido aromático biosintetizado solamente por microorganismos y plantas. Como en todos organismos vivos, las plantas utilizan el triptófano en la síntesis de proteínas, pero adicionalmente, el triptófano actúa como precursor de una serie de metabolitos secundarios que tienen importancia en el crecimiento de las plantas y en su defensa contra diferentes tipos de estrés. En este contexto, los metabolitos secundarios derivados del triptófano (Trp) son principalmente auxinas, fitoalexinas, glucosinolatos y alcaloides [4]. Como se presenta

esquemáticamente en la Figura 3, varios de los productos del metabolismo del Trp son compuestos indólicos [5].

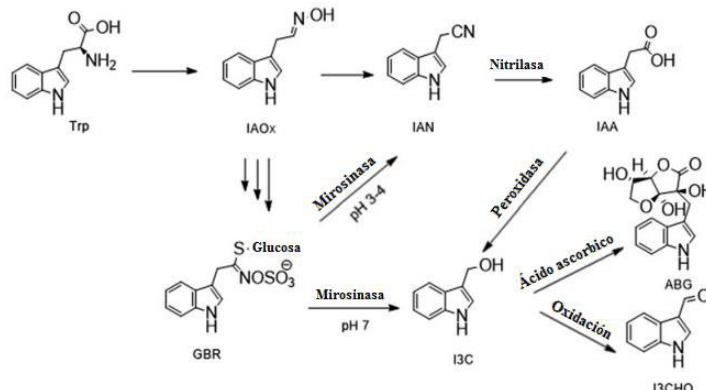


Figura 3. Biosíntesis de indoles a partir del triptófano (Trp): IAOx – indol-3-acetaldoxima, IAN- indol-3-acetonitrilo, IAA- indol-3-ácido acético, GBR- glucobrassicina, I3C- indol-3-carbinol, I3CHO- indol-3-carboxaldehído, ABG- ascorbigen [5].

Además de su papel importante en organismos vegetales (crecimiento, defensa del estrés), algunos compuestos de indol producidos por plantas presentan actividad biológica de relevancia en la salud humana [6]. Los metabolitos secundarios suelen acumularse en flores, frutos, hojas maduras, raíces maduras o corteza [7], de donde se pueden extraer para estudiar sus propiedades y, en su caso, para el uso humano. Típicos procedimientos se basan en la extracción con disolventes y posterior destilación del extracto, obteniéndose cantidades relativamente pequeñas [1].

1.1.2. Indol-3-Ácido acético y las rutas de su biosíntesis.

Entre los metabolitos secundarios indólicos, derivados del Trp se encuentra el indol-3-ácido acético (IAA), catalogado dentro del grupo de hormonas vegetales, como auxina principal [8]. Las auxinas regulan varios procesos relacionados con el crecimiento y desarrollo de plantas, incluyendo la división celular, la formación y alargamiento de raíces, señalización entre células, tejidos y órganos, entre otros [9]. Las auxinas se han estudiado ampliamente durante décadas aunque sus rutas biosintéticas en las plantas solo se han revelado recientemente [9]; estos compuestos forman parte de los llamados reguladores del crecimiento de las plantas (PGR por sus siglas en inglés) y además de su formación endógena, pueden ser biosintetizadas por microorganismos endofíticos y/o aplicados a los cultivos dentro de las prácticas agrícolas.

La principal ruta de biosíntesis de auxina en plantas, que juega un papel esencial en muchos procesos relacionados con el crecimiento y desarrollo de estos organismos, es la ruta dependiente del Trp la cual incluye el indol-3-ácido pirúvico (IPA) como intermediario [3]. Dicha ruta se presenta esquemáticamente en la Figura 4 [10]. Como se observa en esta Figura, mediante la actividad de enzimas de la familia TAA aminotransferasas, Trp se convierte primero en indol-3-ácido pirúvico (IPA); en el siguiente paso se forma el indol-3-acetaldehído (IAAlD) con ayuda de descarboxilasa

perteneciente a la familia YUC de flavin monooxigenasas y finalmente, IAAld es oxidado a IAA mediante las enzimas aldehído deshidrogenasa, mutasa u oxidasa [3].

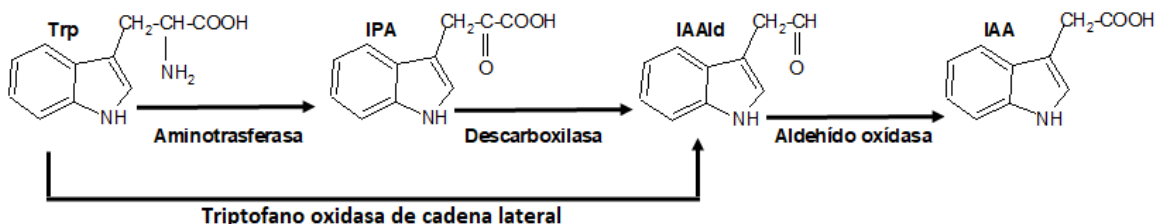


Figura 4. La vía de biosíntesis de IAA dependiente de triptófano[3].

En la misma Figura 4 se observa una vía alternativa en la que el triptófano se convierte directamente en IAAld por una enzima monooxigenasa de cadena lateral de triptófano, obviando la formación del IPA, el IAAld se oxida posteriormente a IAA. Esta ruta se ha informado principalmente en bacterias y se conoce como la vía de triptófano de cadena lateral oxidasa (TSO) [3]. Aun no hay indicios de que esta vía exista en las plantas [11].

El triptófano también puede convertirse en indol-3-acetaldehído e IAA a través de la ruta donde el intermediario es la triptamina (TAM). Esta ruta se ha identificado en bacterias mediante la identificación de la actividad de la descarboxilasa de triptófano y por la detección de la conversión de triptamina exógena a IAA en estos organismos. En las plantas, la triptamina se identificó como un compuesto endógeno y los genes que codifican para las descarboxilasas de triptófano se han clonado y caracterizado en diferentes plantas, lo que soporta la existencia de esta vía biosintética del IAA a través de triptamina en las plantas. El paso limitante de esta vía en las plantas es probablemente aquel catalizado por una proteína similar a la monooxigenasa de flavina (YUCCA), es decir, el paso de la conversión de triptamina en N-hidroxil-triptamina, aunque los intermedios posteriores a la N-hidroxil-triptamina (presumiblemente indol-3-acetaldoxima e indol-3-acetaldehído), aún deben confirmarse. El último paso es diferente entre bacterias y plantas, ya que en bacterias, la TAM es convertida directamente a IAAld por una amina oxidasa [12, 13].

Otra ruta de la biosíntesis del IAA, estudiada principalmente en células bacterianas, corresponde a la vía de indol-3-acetamida (IAM) [14], la cual se presenta brevemente en la (Figura 5). En el primer paso, ocurre la conversión de triptófano en IAM con ayuda de la enzima triptófano 2-monooxigenasa; la segunda reacción es catalizada por una hidrolasa / amidasa específica de IAM, que hidroliza IAM a IAA. Cabe mencionar que la evidencia experimental de esta ruta se obtuvo mediante detección/identificación del ^{14}C -IAM y del ^{14}C -IAA en cultivos bacterianos obtenidos en presencia de triptófano marcado con este isótopo radioactivo de carbono [3].

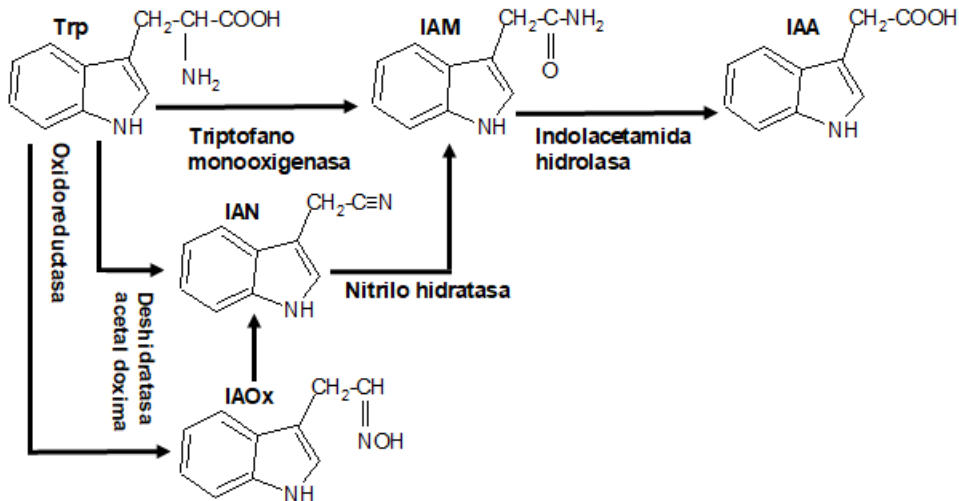


Figura 5. La vía del indol-3-acetamida[3].

En la Figura 5 se incluye al indol-3-acetonitrilo (IAN) y al indol-3-acetaldoxima (IAOx), como alternativos intermediarios en la conversión del Trp en IAM. La denominada vía IAOx / IAN ha sido estudiada en plantas y, aunque menos, también en bacterias.

En la Figura 6 se presenta la vía IAOx / IAN de manera más detallada. El primer paso de esta vía es la conversión de triptófano en indol-3-acetaldoxima; en las plantas este paso es catalizado por oxidorreductasas del citocromo p450 mientras que en bacterias la identidad de enzima(s) participante(s) no se conoce con exactitud. En el segundo paso, el IAOx se convierte en IAN por una indol acetaldoxima deshidratasa; dichas enzimas se conocen en bacterias donde son codificadas por el gen *oxd*. En plantas, dichas enzimas no han sido encontradas aún. Finalmente, el IAN es convertido en IAA por una enzima nitrilasa en un solo paso o por una nitrilhidratasa y una amidasa en un proceso de dos pasos [3].

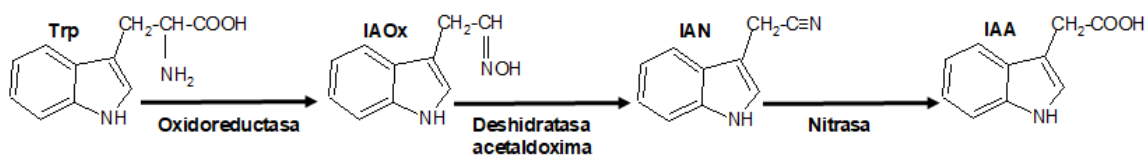


Figura 6. La vía del indol-3- acetaldoxima/ indol-3- acetónitrilo[3].

Cabe mencionar que en plantas existe la ruta de la biosíntesis de IAA independiente de Trp, aunque no se conocen con exactitud los componentes moleculares y las funciones fisiológicas de esta vía [15].

En resumen, los diferentes procesos involucrados en la síntesis de IAA dan origen a compuestos indólicos de carácter intermediario. Estos compuestos tienen importancia no solamente en la planta, algunos de ellos cuentan con demostrada actividad biológica en organismo humano.

1.1.3. Compuestos indólicos derivados de glucobrassicina (GBR).

Los glucosinolatos son un grupo de metabolitos secundarios de plantas que se biosintetizan a partir de aminoácidos (principalmente metionina) por alargamiento de cadena, y contienen en su estructura una glucosa unida mediante azufre. Como parte de la respuesta defensiva contra el estrés, las plantas emplean mirosinasa (enzima de la familia de las glucósido hidrolasas) que, en presencia de agua, elimina el grupo glucosa iniciando la conversión rápida de glucosinolatos a tiocianatos,

isotiocianatos y nitrilos. Entre una gran cantidad de glucosinolatos y productos de su hidrólisis, los mejor caracterizados y bien estudiados comprenden glucobrassicina, glucorafanina, sulforafano, erucina y alilglucosinolatos derivados de la metionina, así como varios glucosinolatos aromáticos.

En el contexto de este trabajo de tesis es importante que, además de las rutas de síntesis del IAA descritas en el apartado anterior, compuestos indólicos tienen origen en la hidrólisis enzimática de glucosinolatos. En la Figura 3 se representa dicha hidrólisis para glucobrassicina (GBR) - un glucosinolato abundante en todos los vegetales de la familia *Brassicaceae* (Cruciferae), como el brócoli, el repollo, el rábano, el nabo y la coliflor, entre otras [16]. Durante la hidrólisis enzimática de GBR se forman el indol-3-acetonitrilo (IAN) y el indol-3-carbinol (I3C), los cuales son precursores del indol-3-ácido acético (IAA), indol-3-carboxaldehído (I3CHO), ascorbigen (ABG) y una serie de isotiocianatos y nitrilos [17].

1.1.4. Diferentes fuentes de compuestos indólicos en relación a crecimiento de plantas.

Además de la síntesis endógena de compuestos indólicos en plantas, existen algunas fuentes exógenas de estos compuestos. Tal es el caso de microorganismos endofíticos (baterías, hongos y actinomicetos), que habitan de manera simbiótica las plantas. Los organismos endofíticos se benefician de la planta al tener mayor acceso a los nutrientes, además de tener un hábitad cómodo y protegido del estrés ambiental como la desecación, radiación UV e invasión de hongos parásitos. Por su parte, los beneficios para las plantas hospedadoras incluyen un mejor crecimiento y una mejor resistencia a estrés biótico y abiótico. En particular, endofitos producen y proveen al huésped de los PGR, siendo uno de ellos el IAA [18]. El IAA bacteriano estimula la formación del vello radicular al tiempo que aumenta el número y la longitud de las raíces laterales y primarias; sin embargo, el exceso de este compuesto puede provocar efectos adversos, principalmente en términos de inhibición del crecimiento primario de la raíz [3].

Las rutas de síntesis del IAA en bacterias se han descrito brevemente en la sección 1.1.1.

Cabe señalar que las fitohormonas endógenas, entre ellas auxinas, se presentan en plantas en muy bajas concentraciones [6], pero desde hace décadas sus análogos sintéticos se usan ampliamente en la agricultura como aditivos para mejorar la producción. De manera general, se habla de los reguladores del crecimiento de las plantas (PGR por sus siglas en inglés), que son una clase de hormonas vegetales sintéticas y que exhiben actividades fisiológicas similares a las de las hormonas endógenas. El uso de los PGR es una importante fuente externa de los compuestos indólicos en plantas. En función de sus diferentes mecanismos de acción, los PGR se clasifican principalmente en dos grupos: promotores del crecimiento vegetal (auxinas, giberelinas, citoquininas, etc.) y bioinhibidores (ácido abscísico, metiljasmonato, etc.) [19]. Entre estos compuestos, el IAA es un regulador del crecimiento muy común. Otro ejemplo de fitohormonas utilizados como PGR es el ácido giberélico (GA3 y GA4) perteneciente a las giberelinas. Cabe también mencionar el ácido abscísico (ABA) como uno de los principales inhibidores que controla la senescencia de las plantas. Además de estas fitohormonas, se han utilizado algunas fitohormonas sintéticas de bajo costo, incluido el ácido indol butírico (IBA), el ácido 1-naftaleno acético (α -NAA) y el ácido 2,4-dicloro-fenoxiacético (2,4-D) [20].

El empleo de los PGR fomenta la agricultura ecológica, disminuyendo la necesidad del uso masivo de pesticidas y/o fertilizantes tradicionales. El uso de los PGR se ha implementado en algunas partes del mundo, incluido México, ya que tienen como principal ventaja la disminución del uso de pesticidas y/o fertilizantes clásicos, pero es importante mencionar que pese a dichos beneficios, existen residuos que pueden permanecer en la tierra después de cultivar los alimentos, los cuales pueden acumularse tanto en el ambiente como en los consumidores, por lo cual pueden ser peligrosos para la salud [21, 22].

1.2. Riesgos y beneficios relacionados con ingesta de compuestos indólicos provenientes de plantas.

1.2.1. Beneficios de compuestos indólicos en humanos.

Aunado a la importancia de índoles dentro de los organismos de las plantas, varios de estos compuestos poseen actividad biológica de relevancia en la salud humana y en particular, el consumo de vegetales crucíferos, ricos en glucosinolatos y respectivos índoles, ha sido asociado con un bajo riesgo de desarrollar cáncer, de las enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas. Un vínculo común entre estas enfermedades degenerativas oxidativas y el cáncer puede ser un agravamiento por inflamación. Los componentes del brócoli pueden proteger contra la inflamación, inhibiendo la producción de citoquinas; se ha estudiado el potencial antiinflamatorio de la fracción que contiene indol en las raíces de *Brassica rapa* (IBR) (familia Brassicaceae) y los mecanismos subyacentes. Los resultados de esta investigación sugieren que las inhibiciones de expresión de iNOS, TNF- α e IL-6 causadas por una atenuación de la activación de NF- κ B son responsables de la actividad antiinflamatoria y antinociceptiva de IBR [8].

Para algunos de los compuestos derivados de los glucosinolatos, como el I3C, I3A, y el 3,3'-diindolilmetano (DIM) existen evidencias de su carácter quimiopreventivo y éstos son considerados prometedores en casos de cáncer de mama, de próstata y de colon [23]. Específicamente, el indol 3- carbinol (I3C) es una molécula bioactiva, que ha sido muy estudiada en el contexto de la prevención de algunos tipos de cáncer colono-rectal, linfoma, seno, cáncer transplacentario y cáncer de próstata. El I3C puede convertirse en dímero biológicamente activo, 3,3'-diindolilmetano (DIM), dentro del tracto gastrointestinal. Dado que DIM se acumula en el núcleo celular, es probable que contribuya a los eventos nucleares celulares que se han atribuido al I3C. Las propiedades anticancerígenas de I3C / DIM, han sido asociadas a la inhibición de los cambios en la progresión del ciclo celular, la apoptosis, la bioactivación de carcinógenos y la reparación del ADN; también se informó que I3C tiene efectos antiinflamatorios al inhibir la producción de NO, TNF e IL-10 en macrófagos, estimulados por lipopolisacárido (LPS). El metil -3-indolacetato (MIA), otro compuesto indólico presente en vegetales crucíferos, inhibe la invasión de células cancerosas al apuntar a la vía de señalización MEK1 / 2-ERK1 / 2 [8].

Por otro lado, se ha informado sobre utilidad de índoles en alivio del insomnio, para incrementar la actividad anticonvulsiva de los medicamentos antiepilépticos; algunos de los índoles presentan actividad antioxidante y/o han sido utilizados como materiales de partida para sintetizar medicamentos antiinflamatorios, etc. Por ejemplo, IPA es un fármaco potencial utilizado para tratar la ansiedad y el insomnio [24]. Otro medicamento derivado de índoles es la indometacina el cual es un antiinflamatorio no esteroideo comúnmente utilizado para reducir la fiebre, el dolor, la rigidez y la hinchazón; su función se basa en la inhibición de la producción de prostaglandinas. Es de notar también el uso de IAA sintético, derivado de indometacina para el tratamiento de la artritis reumatoide. La dietilamida del ácido lisérgico (LDS) se ha empleado en una variedad de tratamientos, como en trastornos psiquiátricos, tratamiento de alcoholismo, alivio del dolor y cefalea [8].

Aunque hoy en día muchas de las sustancias utilizadas en medicamentos son de origen sintético, en el pasado, las potentes propiedades fisiológicas de los compuestos indólicos derivados del metabolismo de triptófano en plantas, llevaron a que estos se usaran como base en varios medicamentos como la vincristina, un alcaloide indólico dimerico, el cual ha cobrado gran importancia en el tratamiento de leucemia, ésta junto con la vinblastina, también derivado de grupos indólicos, son utilizados como antitumorales, debido a su actividad como inhibidores de la polimerización de la tubulina [8].

Finalizando, es necesario enfatizar que los efectos benéficos de compuestos indólicos ingeridos con plantas y/o administrados en formulaciones farmacéuticas, se presentan en humanos solamente

cuando las dosis son adecuadas. Como en muchos otros casos, el exceso se relaciona con efectos adversos y riesgos para la salud.

1.2.2. Riesgos del uso de las PGRs.

Desde la década de 1940, los PGR se han utilizado ampliamente en cultivos para regular la producción de frutos y la floración para el crecimiento y para reducir el riesgo de plagas. Los PGR se aplican al trigo y al arroz, y su uso se ha extendido a los árboles frutales y hortalizas. Según las estadísticas, durante las últimas décadas, la venta de las PGR ha aumentado 15% en escala anual. Se estima que dichas ventas aumentaron más rápido que para los herbicidas e insecticidas, especialmente en el período comprendido entre 1960 y 1983 [25]. Hoy en día, los PGR son extensivamente utilizados en cultivos de plantas comestibles en muchos países, como Estados Unidos de Norteamérica, Australia, Japón, China e India, incluyendo también México. A pesar de obvios beneficios para la producción, los residuos que permanecen en las plantas en la etapa de cosecha imponen riesgos de contaminación medioambiental y también pueden ser nocivos para los consumidores (humanos y animales) [22]. El uso irregular o el abuso de los PGR puede provocar su acumulación en el cuerpo humano, lo que a su vez ha sido asociado con incidencia de diversas enfermedades, como enfermedad renal crónica, trastornos inmunes y hematopoyéticos, cáncer y trastornos de digestión / secreción [21]. Aunque la mayoría de los PGR se consideran de baja toxicidad, investigaciones recientes han demostrado su potencial impacto nocivo. Como un ejemplo, el producto denominado clomequat afecta la fertilidad de los mamíferos, mientras que el etefon aumenta potencialmente la actividad estrogénica, debido a que actúa sobre el eje hipotálamo-hipofisario como anticolinesterasa [25].

En la percepción general, los PGR se consideran como productos seguros, pero para evitar posibles efectos adversos en el medioambiente y en los consumidores, es necesario aplicar concentraciones apropiadas en etapas adecuadas del crecimiento y también hacer uso del equipo de seguridad. Un ejemplo de los PGR que suelen utilizarse en exceso es la cianamida de hidrogeno, la cual es muy efectiva y económica, se usa para garantizar la rotura uniforme de brotes en frutas como duraznos, kiwis y uvas, y así poder cosechar todos los frutos al mismo tiempo. Cabe mencionar que el mismo compuesto también se ha usado en el tratamiento de alcoholismo, en concentraciones menores a las que se utilizan en las plantas, debido a que combinada con alcohol ésta produce náuseas, vómitos, vértigo, hipotensión, en casos extremos, colapso circulatorio y muerte [26]. Aunque tampoco pertenecientes al grupo de compuestos indólicos, otros ejemplos de los PGR son los derivados de naftaleno: el ácido 2- (1-naftil) acético (NAA) y 2- (naftalen-1-ilo) acetamida (NAD) [27]. Ambos se han utilizado durante años en la agricultura para promover el crecimiento de frutas, raíces, inducir la floración, prevenir la fructificación prematura, y como fungicidas. Dichos PGR generalmente se rocían sobre las plantas utilizando concentraciones de 20–100 mg/L. Como consecuencia, según la Agencia de Protección Ambiental de EE. UU. (EPA), en Estados Unidos de Norteamérica se consumen aproximadamente 20,000 lb (aprox. 9,000 kg) de derivados de acetato de naftaleno como NAD y NAA cada año. La Organización Mundial de la Salud (OMS) y la EPA han considerado a ambos como peligrosos [27].

Para proteger a las personas contra la contaminación y los posibles efectos nocivos, varios órganos legislativos, incluidos los de la Unión Europea, de los Estados Unidos, de Japón y China han establecido límites máximos de residuos (LMR) para algunos PGR en alimentos comestibles específicos [28]. Como ejemplo, en la Comunidad Europea, el valor de LMR para IAA y para IBA es de 0.1 mg/kg en cítricos y en otro tipo de frutos [21]. De ahí deriva una demanda de procedimientos analíticos que permitan llevar a cabo un control riguroso de los alimentos vegetales y de esta manera asegurar la no violación de los LMR [5, 19, 29]. Desafortunadamente, la regulación de los PGR no aplica en otros países ni para los PGR tradicionales, ni para los más recientes. Por lo que en México es necesario contar con las herramientas adecuadas para analizar cualitativa- y cuantitativamente

los compuestos utilizados como PGR; los resultados de los análisis realizados serán de utilidad para conocer la identidad de los compuestos presentes en plantas comestibles, sus concentraciones y por lo tanto serán también de utilidad para evaluar posibles riesgos a la salud de la población.

1.3. Compuestos indólicos de interés.

Los compuestos indólicos como metabolitos secundarios de las plantas y como PGR, tienen claros y demostrados beneficios tanto para los cultivos como para la salud humana, pero el uso indiscriminado de los PGR impone riesgos debido a la excesiva ingesta de estos compuestos. En el estado de Guanajuato se producen cantidades considerables de vegetales crucíferos (de la familia Brassicaceae) tales como brócoli, coliflor, repollo, entre otros, pero no se encontraron datos sobre contenido de los compuestos indólicos provenientes del uso de PGR y/o del metabolismo secundario de estas plantas. Es por ello que, el trabajo de tesis se enfoca en el análisis de compuestos indólicos en estas plantas comestibles producidas en nuestro estado. Con base en la revisión bibliográfica, resumida en secciones anteriores, se eligieron los siguientes compuestos indólicos: indol-3-ácido carboxílico (ICA), indol-3-carboxaldehído (I3CHO), indol-3-ácido acético (IAA), indol-3-acetil (I3A), indol-3-ácido propiónico (IPA), indol-3-acetonitrilo (IAN), indol-3-ácido butírico (IBA) e indol-3-carbinol (I3C). Las estructuras de estos compuestos se presentan en la Figura 7, donde se incluye además el ácido orto anísico, propuesto como un estándar interno.

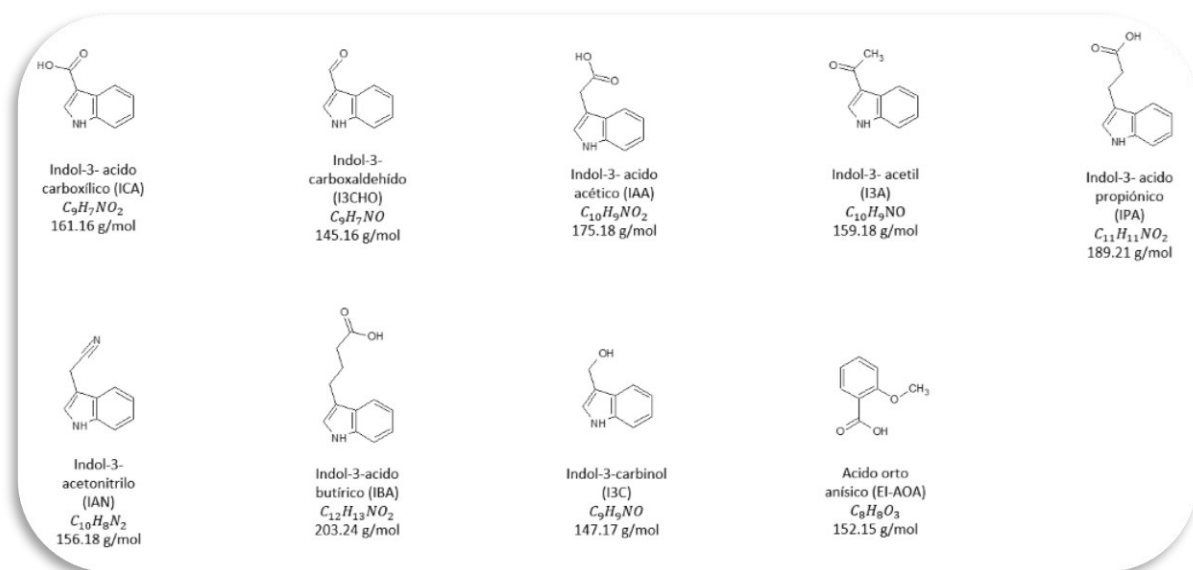


Figura 7. Compuestos indólicos seleccionados junto con el ácido orto anísico como estándar interno.

1.4. Análisis de compuestos indólicos en plantas.

Es necesario enfatizar que la identificación y determinación de compuestos indólicos en plantas es relevante en dos contextos: (1) metabolismo secundario en condiciones del cultivo y (2) seguridad alimenticia relacionada con el uso de los PGR en agricultura. A continuación, se presenta una revisión bibliográfica enfocada a los procedimientos analíticos utilizados para este tipo de análisis. Cabe mencionar que, en este trabajo se propone utilizar la cromatografía de líquidos con detección fluorimétrica como herramienta analítica.

1.4.1. Tratamiento de muestra.

El tratamiento de muestra es una etapa crucial durante cada procedimiento analítico y su objetivo principal es convertir el material de partida (muestra) a una forma que puede ser introducida al sistema de medición, proporcionando la información confiable sobre los compuestos/especies de interés. En muchos casos, esta es la etapa más desafiante del procedimiento debido a diferentes propiedades de los compuestos de interés (polaridad, carga iónica) y debido a la compleja composición química de la muestra.

En la Tabla 3, se describen brevemente algunos procedimientos utilizados en el análisis de compuestos indólicos en plantas crucíferas. Hay que señalar que la selección siempre depende del propósito del análisis. Al manejar tejidos frescos se recomienda que las extracciones se lleven a cabo inmediatamente después de la cosecha o, de no ser esto posible, las muestras deben congelarse para evitar cambios enzimáticos (por ejemplo con: la mirosinasa [30], las oxidasas y estereasas) y químicos (ácidos o bases) de compuestos presentes en los tejidos. Los compuestos encontrados en las crucíferas son susceptibles a dichos cambios [31]. Tal es el caso de la degradación de la glucobrassicina endógena con la formación de una gama de productos indólicos (IAN, IAA, I3C, I3CHO y ascorbigen). Se ha propuesto que la presencia de estos compuestos en extractos son consecuencia de no inactivar la mirosinasa antes de la extracción o por la descomposición de la glucobrassicina (o sus productos de degradación) cuando se utilizan condiciones muy acidas o básicas durante la extracción o purificación [32]. Además de estas transformaciones que se acaban de mencionar, los compuestos presentes en los extractos obtenidos a partir de la muestra a menudo son inestables como por ejemplo el IAA, el cual, al exponerse por periodos prolongados al aire o la luz, se degrada por procesos de oxidación. Para evitar dicha degradación, se ha propuesto el uso de estabilizadores como dietilditiocarbamato de sodio, ácido ascórbico y dióxido de carbono, pero es preferible la experimentación con el cuidado de la exposición a estos factores, ya que es difícil discernir entre compuestos que provienen originalmente de la planta de los que son considerados artefactos [31].

La extracción de analitos es un proceso típico, pero de vital importancia. En general en esta etapa pueden integrarse otros procesos como limpieza de la muestra (eliminación de potenciales interferentes), preconcentración de analitos y/o su derivatización. En otras palabras, el objetivo de la etapa de extracción es separar y preconcentrar los analitos de interés a partir de una matriz compleja, obteniéndose una forma de analito y composición química del extracto que sean compatibles con el sistema instrumental que se usará para su análisis posterior. Un procedimiento de extracción se establece considerando cuatro factores principales: (i) el (los) analito(s), (ii) tipo del extractante y fase de agregación de materia en la que se encuentra; (iii) el dispositivo de extracción, (iv) tipo de proceso (batch o en flujo)[33]. Al tratarse de varios analitos que presentan diferentes propiedades fisicoquímicas y diferente distribución en el sistema estudiado y, además, se encuentran en bajas concentraciones, resulta difícil hallar las condiciones que aseguren una eficaz extracción de todos los compuestos en una sola corrida y al mismo tiempo eliminar la abundante matriz química de la muestra. Tal es el caso de análisis de los compuestos indólicos en frutas y verduras.

Para la extracción y preconcentración de los compuestos a partir de plantas, se utilizan comúnmente dos métodos clásicos; la extracción líquido-líquido (LLE) [34] y la extracción en fase sólida (SPE). La principal desventaja de las extracciones mediante el uso de solventes es que se tienen incompletas recuperaciones y que se usan relativamente grandes cantidades de solventes orgánicos. Es por ello por lo que se prefieren métodos alternos de extracción y limpieza principalmente extracciones y microextracciones en fase sólida. Ambas requieren tiempo y operaciones manuales para llevar a cabo la separación de los analitos [32]. Para la purificación de fitohormonas en plantas se han empleado la extracción en fase líquida (LPE), extracción en fase sólida (SPE), extracción en fase vapor y microextracción en fase sólida (SPME). Sin embargo, LPE es extremadamente costoso y tiene efectos negativos en el medio ambiente y la salud humana debido al uso de grandes cantidades

de solventes orgánicos [35]. SPE usa mucho menos solventes orgánicos con una recuperación satisfactoria, por lo que SPE se ha convertido en el principal método de extracción y/o purificación de extractos crudos, y ha ido reemplazando gradualmente a LPE [11].

Al escoger un método de extracción es importante tomar en cuenta los siguientes aspectos; utilizar volúmenes pequeños de muestra y reactivos, obtener procesos fáciles y rápidos a un menor costo y ajustar las condiciones a la composición química de la matriz por analizar [33]. Del mismo modo, un método de preparación de muestra se considera efectivo si permite: (a) determinar analitos con un límite bajo de detección, (b) usar un pequeño volumen de solvente orgánico, (c) disminuir el número de etapas/operaciones, (d) lograr la preconcentración del (los) analito(s) de interés, (e) eliminar eficazmente la matriz de la muestra, (f) conservar la forma fisicoquímica del (los) analito(s), y (g) extraer simultáneamente diferentes clases de analitos con recuperación satisfactoria [27].

Los compuestos presentes en vegetales generalmente se extraen con solventes miscibles en agua como metanol, etanol y/o acetona. Aunque resulta ventajoso el uso de este tipo de solventes ya que pueden extraer una gran variedad de compuestos, en algunos casos estos pueden causar dificultades en la purificación debido a la presencia de contaminantes con propiedades similares a los de los analitos. Anteriormente era común utilizar el éter (sin peróxido) y/o el acetato de etilo como disolventes, pero con éter, se han observado incompletas extracciones de auxinas. Además, se ha reportado que dichas extracciones con éter pueden provocar la hidrólisis de las auxinas unidas, como resultado de la actividad enzimática de la esterasa, para dar IAA. En este sentido algunos reportes mencionan que el alcohol puede inactivar la mayoría de las enzimas por lo cual podría funcionar, a primera vista, como un buen solvente de extracción, sin embargo, otros reportes mencionan que las extracciones con este solvente pueden producir productos de etanolisis. En tal caso se puede emplear en su lugar acetona. El benceno también se ha utilizado para extraer IAA de la fase acuosa, pero no se recomienda debido a su toxicidad [31].

Últimamente la tendencia en el desarrollo de técnicas de extracción se enfoca en la miniaturización, la automatización, la versatilidad y la selectividad [33]. En este contexto, se han propuesto variantes de las técnicas clásicas para eliminar o minimizar el uso de disolventes orgánicos como es el caso de la microextracción en fase sólida (SPME) [32]. En 2007, se aplicó SPME para la extracción de hormonas vegetales por primera vez. Aunque SPME es un proceso libre de solventes, también tiene algunas desventajas; por ejemplo, la fibra con el sorbente es costosa y frágil y tiene una vida útil limitada. Otra técnica que apareció como resultados de miniaturización de LLE, es la denominada microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME) y fue introducida por primera vez en 2006. En el sistema DLLME, el disolvente de extracción inmisible en agua se mezcla con un disolvente dispersante miscible en agua y esta mezcla se inyecta rápidamente en una solución acuosa de muestra. Como resultado, se forma una emulsión turbia en la que el disolvente de extracción queda separado del disolvente dispersante y matriz acuosa que contiene los analitos diana. La enorme área de contacto entre las gotas orgánicas y la solución de muestra es beneficiosa para la transferencia rápida de masa de los analitos diana, que se extraen en gotas finas del extractante, mismas que se agregan en el fondo del tubo cónico durante la centrifugación. De esta manera, los compuestos objetivo extraídos a la fase orgánica se recogen en ella para su posterior determinación. Como una buena alternativa a SPME, DLLME se ha vuelto cada vez más popular por sus méritos superiores, como su alta capacidad de enriquecimiento, operación simple, sin necesidad de dispositivos especiales (fibras, cartuchos), bajo consumo de solventes orgánicos y rapidez. Hasta el momento, DLLME ha demostrado su viabilidad en la preparación de muestras para el análisis multicomponente en diferentes sistemas instrumentales [11]. En la Tabla 1 y 2 se muestran descripciones resumidas así como sus ventajas y desventajas, de las técnicas clásicas así como de otros ejemplos de variantes de estas técnicas para muestras líquidas y sólidas [36].

Tabla 1. Técnicas de extracción con aplicación a muestras líquidas o extractos crudos de muestras sólidas.				
	LLE	SPE	SPME	CPE
Breve descripción	El analito se reparte entre dos disolventes inmiscibles.	Analito es retenido en un sorbente sólido	Equilibrio de partición de analitos entre una fase estacionaria polimérica y la matriz de muestra	El analito se divide entre dos fases isotrópicas: "fase rica en tensoactivo" y "fase acuosa"
Tiempo de extracción	Hasta 24 h	20–30 min	Hasta 60 min	20 min
Uso de solvente	Disolvente orgánico	Disolvente orgánico	Ninguno	Agente tensoactivo
Costo	Bajo	Relativamente bajo	Relativamente bajo	Bajo
Facilidad de operación	Fácil	Relativamente fácil	Relativamente Fácil	Fácil
Desventajas	Alto consumo de solvente y extracción/preconcentración no efectiva	Retención dependiente de la selección del adsorbente.	-Elección de fibra y optimización de procedimiento requerido -Puede ocurrir una contaminación cruzada entre las muestras	Optimización de condiciones de operación
Extracción líquido-líquido (LLE), extracción en fase solida (SPE), microextracción en fase sólida (SPME) y extracción en punto de nube (CPE) [36].				

Tabla 2. Técnicas de extracción para muestras sólidas.					
	Soxhlet	Sonicación	SFE	PLE	MAE
Breve descripción	La muestra se coloca en un matraz de extracción para lograr lixiviación del (los) analito(s) con solvente caliente, en un sistema cerrado.	Extracción con solvente(s) asistida por agitación mediante ultrasonificador.	La muestra se coloca en un sistema cerrado para lograr extracción con un fluido supercrítico	La muestra se coloca junto con el solvente extractante en un recipiente de extracción cerrado aplicando el calentamiento por encima de punto de ebullición del extractante	La muestra se coloca en un recipiente abierto junto con el solvente extractante y se realiza calentamiento mediante energía de microondas
Tiempo de extracción	hasta 24–4 h	30–60 min	30–60 min	15 min	20–30 min
Uso de solvente	Grandes cantidades de disolvente orgánico	Disolvente orgánico	Pequeñas cantidades de fluido supercrítico (típicamente CO_2)	Pequeñas cantidades de solvente orgánico con elevadas temperaturas y	Pequeñas cantidades de disolvente orgánico calentado con energía de microondas

				presiones	
Costo	Bajo	Bajo	Alto	Alto	Moderado
Facilidad de operación	Fácil	Fácil	Relativamente fácil	Relativamente fácil	Relativamente fácil
Desventajas	Gran cantidad de solvente y evaporación de extracto son necesarios	Gran cantidad de solvente y filtración son requeridos	Tamaño de muestra limitado y dependencia de matriz y analito	-Dependencia de la matriz -Alto costo de inversión.	- limpieza necesaria -el disolvente debe poder absorber las microondas - enfriamiento de recipientes
Extracción de fluido supercrítico (SFE), extracción de líquido a presión (PLE) y extracción asistida por microondas (MAE) [36].					

Además de las variantes antes mencionadas, se han reportado otras técnicas derivadas de SPE, donde se usan como sorbentes los polímeros impresos molecularmente (MIP), nanotubos de carbón (CNT), hidróxidos dobles en capas, nanopartículas de TiO_2 , grafeno, y la técnica de redes metal-orgánicas (MOF) [33].

Debido a la composición compleja de algunas muestras y cada vez más grandes exigencias en cuanto a los compuestos de interés, existe una demanda de nuevos procedimientos innovadores, los cuales requieren el empleo de nuevos materiales o combinaciones con metodologías ya existentes con las que se puede lograr una mejor eliminación de la matriz, un mayor rendimiento analítico (como la sensibilidad) y una selectividad mejorada hacia los analitos objetivo en comparación con los métodos clásicos [33]. Un ejemplo relativamente reciente de la integración de diferentes procedimientos de extracción en un solo procedimiento es la técnica de extracción por QuEChERS, la cual es de interés para este trabajo. En particular existen reportes de aplicaciones de QuEChERS, para la extracción de multi-residuos de pesticidas y más específicamente, para los PGR en alimentos y en los productos agrarios [21, 27, 29, 37].

El acrónimo QuEChERS deriva del nombre de la técnica (método rápido, fácil, barato, efectivo, robusto y seguro, por sus siglas en inglés) que fue introducida en el año 2003 por Anastassiades y col. La técnica combina dos procesos de extracción:

(1) extracción dispersiva con solución acuosa de un adecuado regulador de pH (citratos, fosfatos) y un solvente orgánico (acetonitrilo), adicionando una sal ($NaCl$, $MgSO_4$) para eliminar el agua (efecto "salting out") y controlar mejor la eficacia de extracción dentro del intervalo de polaridad de compuestos de interés;

(2) purificación del extracto orgánico mediante la extracción en fase sólida.

En la Figura 8, se muestra en diagrama de flujo de QuEChERS, propuesto originalmente [38].

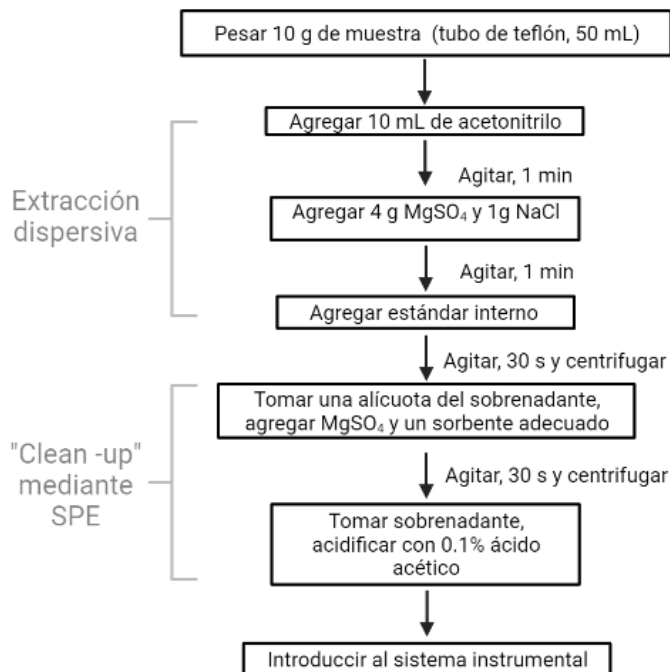


Figura 8. Esquema original del método QuEChERS.

De acuerdo con su nombre, el método es muy rápido, reduce el número de operaciones, minimiza el uso de solventes y de material del laboratorio, permite preconcentración y purificación del extracto, y puede ser adoptado para la extracción de diferentes tipos de compuestos a partir de diferentes matrices químicas. La flexibilidad de QuEChERS se basa en la selección del sistema de solventes y de la sal utilizada para lograr el efecto “salting out” y también de la selección del sorbente y de las condiciones de sorción/elución en la etapa SPE [39]. El intento de este trabajo es emplear el método QuEChERS adecuando las condiciones para el análisis de compuestos indólicos en vegetales crucíferos cultivados en Guanajuato, en largas series de muestras. En enfoque específico está en reducir al máximo el uso de solventes y reactivos, tener un procedimiento operacionalmente simple y lograr la composición final compatible con el análisis por cromatografía de líquidos en fase inversa con detección fluorimétrica y espectrofotométrica.

Desde la introducción del método QuEChERS, han surgido una gran cantidad de variantes de este, las cuales abarcan modificaciones de cada uno de los pasos del protocolo original. En el caso de compuestos indólicos en plantas [27, 38], como tratamiento previo de la extracción, se ha propuesto congelación o y liofilización del material de planta. La homogenización se ha realizado mediante trituración con nitrógeno líquido, hielo seco, o con ayuda del politron. Con estos tratamientos se ha logrado mejorar la eficacia de extracción. Durante la etapa de extracción, además de la selección del solvente, los parámetros importantes son el tamaño de la muestra y volumen del solvente [38]. El objetivo es obtener una buena separación de las fases, logrando la extracción cuantitativa de los analitos en cantidades adecuadas para su determinación. En la revisión bibliográfica se encontraron cantidades de muestra entre 5 y 15 g, siendo la de 10 g la cantidad más usada [38] (Tabla 3). El solvente de extracción propuesto originalmente es el acetonitrilo (MeCN), pero para compuestos de alta polaridad, se propuso utilizar la mezcla de acetonitrilo y ácido acético glacial 99:1% [29, 38, 40]. Se han examinado también otros solventes orgánicos tales como acetona y acetato de etilo (EtAc), pero ninguno de ellos resultó tan efectivo como acetonitrilo (solo o en mezcla con ácido acético y/o diferentes tipos de reguladores de pH) [40]. En el caso de acetona, este es altamente miscible con agua por lo que la separación de las fases por efecto de “salting out” es difícil de lograr [38], incluso utilizando como co-disolventes el metanol o el etanol [29, 38, 41]. Por su parte, el punto débil de

acetona y EtAc es que extraen también lípidos (componentes de matriz de muestra) y que no son solventes adecuados para cromatografía de líquidos. En este sentido, MeCN es realmente la mejor opción. En particular, el material lipofílico, por ejemplo, ceras, grasas y pigmentos lipofílicos no se solubilizan en MeCN, lo que simplifica el proceso de limpieza posterior [38]. Por otro lado, durante la etapa de extracción es importante el uso de reguladores del pH, lo que permite aumentar la selectividad hacia compuestos de interés y lograr mejor eficacia de su extracción [40].

Otra modificación de QuEChERS original se encuentra en la parte de la elección de las sales, en el método original se utilizó la mezcla de $MgSO_4$ y NaCl, pero también se han reportado otras sales tales como $NaNO_3$, Na_2SO_4 , LiCl y fructosa; también se probaron diferentes relaciones entre estas sales que van desde 4g de $MgSO_4$ y 1g de NaCl [38, 40], reportadas en el método original a 2g $MgSO_4$ y 0.5g de NaCl [38]. De hecho, los propios creadores del método, Anastassiades y col sugirieron que las cantidades de sales y de sus proporciones deben ser adecuados al tipo de muestra y de los analitos [38]. En este sentido, además de estudiar mezclas de $MgSO_4$ y NaCl, se examinó también acetato de sodio (NaAc) para tener un mejor control de pH [29, 38]. La agitación durante la extracción dispersiva es un parámetro esencial; para asegurar el mezclado eficiente, se recomienda el uso de vortex y/o sonicación de la mezcla [38]. Finalmente, en la etapa de SPE se han utilizado una gran variedad de sorbetes y sus mezclas con $MgSO_4$ anhidro [29, 38, 40]; el sorbente más utilizado ha sido, la amina primaria secundaria (PSA) que permite eliminar varios ácidos orgánicos, pigmentos polares, algunos azúcares y ácidos grasos [40]. Otro sorbente ha sido negro de carbón grafitado (GCB), mismo que permite eliminar esteroides y pigmentos como la clorofila. Por su parte, octadecilsilano (ODS o C18) [38] elimina efectivamente compuestos interferentes no polares como los lípidos [21, 40]. Otros sorbentes utilizados para eliminar compuestos apolares incluyen al sorbente polimerico Nexus (Varian), o alúmina neutra (alúmina-N). Para retención de compuestos altamente polares e iones, se han utilizado los intercambiadores fuertes de aniones o cationes (SAX, SCX, respectivamente) así como los sorbentes con grupos cianopropilo (-CN) y aminopropilo (- NH_2) [38].

1.4.2. Técnicas analíticas.

Desde principios de los años 70, se han publicado varios estudios sobre la determinación de diferentes fitohormonas, compuestos indólicos entre ellos. La mayoría de estos estudios se enfoca en la separación por cromatografía de líquidos, misma que dependiendo del sistema de detección permite detectar, confirmar/identificar y cuantificar diferentes compuestos en una sola corrida analítica [42]. Sin embargo, la tarea suele ser retardada debido a todos los factores ya antes mencionados y debido a usualmente bajas concentraciones de fitohormonas [27] y a que varios de ellos tienen estructuras similares [42-44]. Es por ello que se han propuesto varios procedimientos para su determinación dependiendo de los compuestos específicos y del tipo de muestra [27]. Entre dichos procedimientos se encuentra la separación por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), los típicos sistemas de detección abarcan detectores espectrofotométricos [35, 41, 45, 46], espectrofluorimétrico (FLD)[44, 47, 48] o por espectrometría de masas [5, 14, 30, 41, 44, 49]. Existen también reportes de procedimientos basado en cromatografía de gases acoplada con espectrometría de masas (GC-MS), electroforesis capilar acoplada a MS (EC-MS), además de procedimientos basados en el radioinmunoensayo y ELISA [11, 42, 43]. Algunos autores reportaron aplicaciones de separación electroforética [23, 50]. En la Tabla 3, se describen brevemente algunos ejemplos de dichos procedimientos utilizados en el análisis de compuestos indólicos en plantas crucíferas.

Cuando el objetivo del estudio es conocer la identidad de los compuestos, los detectores másicos son sin duda los más adecuados, especialmente los sistemas de alta resolución con capacidad de fragmentación de iones y adquisición de espectros MS/MS. Para la cuantificación de compuestos conocidos con sus estándares auténticos disponibles en el laboratorio, los detectores másicos también resultan atractivos, sobre todo empleado las técnicas de monitoreo selectivo de iones (SIM) o monitoreo de reacciones múltiples (MRM). Específicamente, la técnica MRM ofrece muy alta selectividad y sensibilidad gracias a la adquisición de señal para un fragmento del ion precursor y a

la eliminación efectiva del ruido [29]. Esta ventaja es especialmente importante cuando los componentes de las muestras causan interferencias en espectros de masas y con ello la sobreestimación de las concentraciones de analitos [42].

En cuanto a aplicaciones de GC-MS, esta herramienta principalmente se utiliza en el análisis de compuestos indólicos volátiles tales como alcaloides indólicos [51, 52], con una clara ventaja de alta resolución y sensibilidad [20]. Sin embargo, la técnica GC-MS no es muy recomendada para compuestos indólicos no volátiles debido al requerimiento de una derivatización previa, y debido a que las altas temperaturas alcanzadas en el inyector y la columna GC podría descomponer las fitohormonas lábiles [35].

Se ha demostrado que HPLC es una técnica poderosa y versátil que puede ser utilizada en el análisis de compuestos en un amplio intervalo de su polaridad, diferente carga iónica y tamaño molecular. Aunado a ello y en contraste a cromatografía de gases, la separación no requiere de altas temperaturas evitando la descomposición no deseable o isomerización de algunos compuestos indólicos y/o PGR. Además de una gran variedad de fases estacionarias y móviles, así como de diferentes escalas cromatográficas, una ventaja importante de LC es la disponibilidad de diferentes tipos de detectores, siendo ya mencionada la espectrometría de masas uno de ellos; de hecho, los sistemas LC-MS han sido ampliamente utilizados para análisis cuantitativo de hormonas vegetales en extractos de plantas [20, 37, 43]. En el diseño de actuales sistemas LC-MS, el eluyente de la columna es transportado directamente a la entrada de uno de los dispositivos de ionización tales como la ionización química a presión atmosférica (APCI), fotoionización a presión atmosférica (APPI) y, en muchos casos de ionización por electronebulización (ESI) [42]. Se utilizan principalmente instrumentos MS en tándem basados en cuadrupolos triples (QqQ), trampa de iones (IT) y analizadores de tiempo de vuelo (TOF) [53]. Al combinar la separación cromatográfica con una muy selectiva y sensible detección, LC - MS permite una determinación rápida y confiable de muchos compuestos en una sola corrida, lo que no sería posible utilizando típicos detectores LC ni mediante introducción directa de muestra al sistema de ionización. Como un ejemplo, puede mencionarse el estudio donde se determinaron las hormonas de plantas utilizando cromatografía de líquidos de ultra-alta resolución, ionización por ESI y con detección por espectrometría de masas en tándem (UHPLC-MS / MS) [37, 42]. Cabe mencionar sin embargo que, la instrumentación LC - MS es costosa, compleja y su operación requiere de un analista con mucha experiencia. Uno de los aspectos de importancia es el uso de las fases adecuadas móviles que efectúan la ionización de los solutos sin causar interferencias en las etapas de ionización y/o en espectros de masa [27].

Por otro lado, en el análisis de fitohormonas, compuestos indólicos y PGR por HPLC, hay que mencionar los detectores espectrofotométricos, electroquímicos o fluorimétricos. Específicamente, el detector fluorimétrico (FLD) proporciona muy alta selectividad y sensibilidad para solutos naturalmente fluorescentes, como lo son los compuestos indólicos; en este caso, una ventaja adicional del HPLC-FLD es simplicidad del procedimiento ya que no es necesario incluir una etapa de derivatización [11].

Además de las técnicas antes mencionadas se encontraron informes donde para resolver algunos problemas que se pueden presentar por la naturaleza polar y la falta de interacción de estas hormonas u otros compuestos indólicos con algunas fases estacionarias, se propuso el uso de cromatografía electrocinética micelar (MEKC). Dicha técnica es una extensión de electroforesis capilar (EC) y permite la separación de compuestos neutros. MEKC se ha aplicado a la determinación de algunos compuestos de indol en plantas tales como brócoli; sin embargo se ha resaltado el requisito de eficiente eliminación de matriz mediante pretratamiento de muestras de múltiples pasos, como extracción líquido-líquido y extracción en fase sólida antes de la cromatografía [23]. Otra alternativa ha sido el uso de la cromatografía de intercambio iónico para análisis de algunos PGR, logrando una buena separación con buena pureza y simetría de picos y al mismo tiempo, reduciendo el uso de solventes orgánicos [27].

Independientemente del mecanismo de separación por LC y del tipo de detector utilizado, la preparación de muestra sigue siendo una etapa muy importante tal como se discutió en la sección

anterior y como se presenta en la Tabla 3. A manera de ejemplo, se puede mencionar el análisis de siete reguladores del crecimiento de las plantas realizado por HPLC-FLD, donde fue necesario la limpieza de muestra mediante LLE y SPE para lograr una retención adecuada de los solutos y buena simetría de los picos cromatográficos [11]. La extracción eficiente de solutos y eliminación de matriz ha sido también importante en la determinación de fitohormonas por UHPLC-MS / MS [37]. Como se demuestra en la Tabla 3, la preparación de muestra mediante QuEChERS ha sido usada en el análisis de compuestos indólicos, pesticidas y PGR.

Por su parte, es necesario mencionar el uso del ensayo inmunoabsorbente enzimático (ELISA), reportado en el análisis de fitohormonas u otros compuestos indólicos. Esta técnica se caracteriza por su buena sensibilidad y especificidad como resultado de la unión específica de ligando-anticuerpo. Además, tales inmunoensayos permiten el uso de pequeñas cantidades de material vegetal y el procesamiento de una gran cantidad de muestras en un corto período de tiempo [42]. Sin embargo, cuando se aplica este método, solo se determina los compuestos que pertenecen a una familia. Otra desventaja de este método es que la preparación de anticuerpos es bastante laboriosa y la reactividad cruzada del anticuerpo con otros compuestos vegetales de estructura similar, incluidos los análogos hormonales, disminuye la confiabilidad de los resultados [37].

Con base en la revisión bibliográfica realizada, para el análisis de compuestos indólicos considerados en este trabajo (sección 1.3) se propone emplear el método QuEChERS en la etapa de extracción y la técnica HPLC-FLD en la etapa de separación / determinación. Debido a la relativa polaridad de los compuestos indólicos, se propone llevar a cabo su separación en una columna de fase inversa. La presencia del grupo indol confiere a los analitos propiedades fluorescentes y el uso del detector fluorimétrico (FLD) parece interesante debido a su alta selectividad y sensibilidad. Como ya se mencionó en secciones anteriores, FLD asegura una alta relación señal / ruido, es relativamente fácil de usar, cubre una amplia gama de longitudes de onda de excitación y emisión y representa un relativo bajo costo, sobre todo comparado con detectores másicos.

Tabla 3. Algunas aplicaciones del método QuEChERS en el análisis de PGR y pesticidas en plantas.					
Muestra	Analitos	Preparación de muestra y extracción	Limpieza del extracto	Técnica analítica	Ref
Lechuga y fresa	Pesticidas (carbamatos, organoclorados y órganofosforados)	10 g de muestra homogeneizada, 10 mL de MeCN, Vortex 1 min; agregar 4 g de $MgSO_4$ anhidro y 1 g de NaCl, vortex 1 min; agregar Et 50 μ L, vortex 30 s; centrifugar (5000 rpm, 5 min), recuperar sobrenadante	A 1 mL de sobrenadante, agregar 25 mg de sorbente PSA y 150 mg de $MgSO_4$ anhidro, vortex 30 s, centrifugar 6000 rpm, 1 min, recuperar sobrenadante.	GC -MS. Cuantificación: calibración externa, MRM, uso de estándar interno	[38]
Durazno, guisantes y frijoles verdes, manzana, repollo	Pesticidas (organoclorados, y organofosforados)	10 g de muestra en un tubo de 50 mL, 10 mL de HAc 0.1% en MeCN, mezclar 1 min. Adicionar 4 g $MgSO_4$ y 1g de NaCl, vortex 1 min; centrifugar a 1000 rpm	5 mL de sobrenadante, agregar 300mg de $MgSO_4$ y 125 mg PSA, homogeneizar por 30 s y centrifugar.	GC-FPD y HPLC-FLD	[40]
Calabacín	fitohormonas auxinas, citoquininas y giberelinas (IAA, GA, NAA, 2,4-D, NA, IBA)	10 g de calabacín homogeneizado en un tubo de 50 mL, añadir 10 mL de HAc al 1% en MeCN. Agitar a mano 1 min. Adicionar 4 g de $MgSO_4$ anhidro, 1 g de NaCl, 1 g de SCTD y 0,5 g de SCDS agitar 1 min. Centrifugar a 4500 g, 5 min.		UHPLC-MS/MS ESI en modo \pm y MRM Cuantificación: adición de estándar.	[37]
Tomates, pepinos, sandías y manzanas	10 promotores de crecimiento vegetal (PGR) (2,4-D, Etilozato, NAAmida, GA3, NAA, IBA, 6-BA,	10 g de muestra homogeneizada en un tubo de 50 mL. 10 mL de HAc 0.1% en MeCN, vórtex y ultrasonicador	5 mL sobrenadante a un tubo con 50 mg de PSA y 150 mg de $MgSO_4$. Agitar 1 minuto y centrifugar 5 minutos a 5000 rpm. Filtrar antes del análisis con membrana de 0.22mm	HPLC-ESI-QqQ MRM Cuantificación calibración externa	[29]

	Forclorfenuron y 1-Naftilaetico metil ester)	por 30 minutos. Añadir 4,0 g de $MgSO_4$ y 1,0 g de NaAc. Agitar y centrifugar por 5 min a 5000 rpm.			
Suplementos dietéticos comerciales	Compuestos indólicos (I3C, IAN, IAA y DIM)	Moler 3 cápsulas, pesar 30 mg y disolver en 5 mL de DMF. Vórtex y sonicar 5 minutos.	Filtrar con disco de acetato de celulosa de 0,45 mm y diluir con tampón de borato (1: 20 para muestras A, C y D y 1: 40 para B y E).	MEKC con detección UV. Cuantificación: calibración externa	[23]
Jugo de caña de azúcar	Compuestos indólicos (5 isómeros de indol de Ác. carboxílico, IAA, indol-3-acético hidrazida, IAM, IPA y I3A)	500 mL de jugo fresco de caña de azúcar. El pH se ajustó a 3 con AF.	Pasar por papel de filtro (Whatman, 12.5 cm, No. 542). SPE con cartuchos C18. Liofilizar a sequedad el eluato y reconstituir en 1 mL de metanol.	HPLC-PDA y LC-MS/MS en modo MRM Cuantificación: calibración externa	[41]
Coliflor blanca, col roja, col blanca, brócoli verde, brócoli púrpura, rábano y nabo.	Compuestos indólicos (I3C, ABG, I3CHO, IAA y IAN)	Liofilizar muestras, y moler. A 1 g agregar 25 mL de agua destilada (pH 7.0), incubar en baño de agua 3 horas a $45 \pm 3^\circ C$ y enfriar 30 min. Adición de 30 mL de CH_2Cl_2 agitar 15 min.	Pasar por papel de filtro. Extraer residuo sólido 2 veces con 30 mL de CH_2Cl_2 . Combinar filtrados en embudo de separación agregar 1 g de $NaSO_4$ anhidro. Evaporar el disolvente con evaporador rotativo a $35^\circ C$ a vacío. Disolver residuo en 1 mL de MeOH. Diluir 100 μL del extracto con 100 μL de MeOH e inyectar al sistema.	UHPLC-Q-TOF-MS Cuantificación: área del pico de los cromatogramas de iones extraídos.	[5]
Naranja, cáscara de plátano, limón, pera, durazno, cereza, mango, Sandía y manzana; leche	Reguladores del crecimiento de las plantas (PGR) (NAD y NAA)	Muestras picadas y almacenadas a $-4^\circ C$. pesar 2 g, triturar en mortero, adición continúa de 2 mL y 4 mL de agua desionizada y MeCN. Transferir a tubo de 10 mL. Añadir 1 g de NaCl. Agitar a mano, colocar en sonicador a $40^\circ C$, 8 min. Centrifugar 15 min a 9000 rpm.	Fase orgánica colocar en tubo con 0.12 g de NaCl y 50 mg / mL de PS-DVB. Agitar a mano, centrifugar 5 min a 9000 rpm. Reducir volumen bajo corriente de N_2 , completar a 2 mL con 50% de MeCN. Usar filtro de membrana de 0.22 μm .	IC-FLD / UV Cuantificación: adición de estándar	[27]
Fresas, uvas, mandarinas,	28 reguladores del crecimiento	10 g de muestra homogeneizada, vórtex con 20 mL de MeCN que	2 mL de fase orgánica con 50 mg de C18 mezclar por vórtex por 2 minutos. Centrifugar 5 min (8000 rpm, $-10^\circ C$),	UHPLC-MS/MS MRM	[21]

manzanas y kiwis	(CCC, Pix, FLM, 2,3,5-TIBA, CP, 2,4-CPPA, 4-CPA, CYC, GA ₃ , IBA, IAA, TE, PNP, 5NG, DA-6, Z-IP, ZT, 6-BA, TDZ, ECZ, CPIC, IBF, PBZ, CPPU, BR, UCZ y TRIAP).	contenía 1% de HAc, 4,0 g de $MgSO_4$ y 1,0 g de NaCl por 2 min. Centrifugar a 8000 rpm 10 min (-10 ° C).	sobrenadante se diluyó con MeOH / H_2O (50:50). Pasar por filtros de jeringa de PTFE de 0,22 μ m, almacenar a 4 ° C antes de un análisis.	Cuantificación: calibración interna	
<p>Solventes y sales: Acetonitrilo (MeCN), ácido fórmico (AF), ácido acético (HAc), metanol (MeOH), SCD - citrato de trisodio dihidratado ($Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$); SCDS - citrato de hidrogeno disodico sesquihidratado ($Na_2HC_6H_5O_7 \cdot 1.5H_2O$), poliestireno-divinilbenceno (PS-DVB), N, N-dimetilformamida (DMF), sulfato de sodio ($NaSO_4$).</p> <p><u>Sorbente utilizado en SPE:</u> amina primaria secundaria (PSA) y politetrafluoroetileno (PTFE)</p> <p>Técnicas analíticas y métodos de detección: Cromatografía de gases acoplada con espectrometría de masas (GC-MS), cromatografía de líquidos de alta resolución con detección de fluorimétrica (HPLC-FLD), cromatografía de gases con detector fotométrico de flama (GC-FPD), cromatografía de líquidos de ultra-alta resolución acoplada con espectrometría de masas masas (UHPLC-MS / MS), cromatografía de líquidos de alta resolución con ionización por electroespray acoplado a un triple cuádruplo (HPLC-ESI-QqQ), cromatografía electrocinética micelar (MEKC), cromatografía de líquidos de alta resolución con <i>Detector</i> de matriz de fotodiodos (HPLC-PDA), cromatografía de líquidos acoplado a espectrometría de masas-masas (LC-MS-MS), cromatografía de líquidos de ultra-alta resolución cuádruplo tiempo de vuelo espectrometría de masas (UHPLC-Q-TOF-MS), cromatografía de intercambio iónico con detección de fluorescencia-Uv (IC-FLD / UV) y monitoreo de reacciones múltiples (MRM).</p>					

2. Objetivos.

2.1. Objetivo principal.

Desarrollar un procedimiento analítico basado en QuEChERS y cromatografía de líquidos de alta resolución en fase inversa, con detección espectrofluorimétrica para su aplicación en la determinación de algunos compuestos indólicos en plantas comestibles cultivadas en el estado de Guanajuato.

2.2. Objetivos particulares.

- Realizar un estudio bibliográfico sobre modificaciones y aplicaciones del método QuEChERS en el análisis de multi-residuos.
- Establecer las condiciones de extracción en base en la técnica QuEChERS, centrándose en los compuestos indólicos seleccionados previamente.
- Poner a punto un procedimiento para la determinación de compuestos indólicos seleccionados, por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) con detectores fluorimétrico (FLD) y espectrofotométrico de arreglo de diodos (DAD).
- Examinar la formación de aductos de compuestos indólicos con azúcares, empleando el tratamiento de muestras con β -glucosidasa.
- Realizar de determinación de compuestos indólicos en una serie de vegetales adquiridos en el mercado local.

3. Parte experimental:

3.1. Equipo de laboratorio.

3.1.1. Equipos utilizados en el procesamiento de muestra y preparación de reactivos:

- Se utilizó un cromatógrafo de líquidos de alta resolución (HPLC) con detección por arreglo de diodos (DAD) y de fluorescencia (FLD) modelo 1200 de Agilent Technologies, equipado con automuestreador, termostato y una bomba cuaternaria, controlados por el software Chemstation.
- La columna analítica fue ODS Hypersil (125 x 4.6 mm, 3 μ m). Thermo Hypersil-Keystone, con una precolumna C18, 3 μ m
- Purificador de agua Mili Q WaterPro PS (Labconco)
- pH-metro 240 Corning
- Centrifuga Z 36 HK (Hermle)
- Centrifuga Sorvall Legend Micro 17 (Thermo scientific)
- Concentrador al vacío Vacufuge Plus (Eppendorf)
- Digital Ultrasonic Cleaner, 2500 mL (KENDAL)
- Ultrasonic Cleaner Bk-2000, 1.47 L, 60 w.

3.2. Estándares y Reactivos:

Agua desionizada 18.2 M Ω cm (Labconco)

Estándares analíticos de ácido orto anísico (estándar interno, EI-AOA), indol-3-acido carboxílico (ICA), indol-3-carboxaldehído (I3CHO), indol-3- ácido acético (IAA), indol-3-acetil (I3A), indol-3-ácido propiónico (IPA), indol-3-acetonitrilo (IAN), indol-3-acido butírico (IBA) e indol-3- carbinol (I3C), fueron reactivos Sigma-Aldrich con una pureza mayor a 96%. Se prepararon soluciones stock de compuestos individuales (1000 μ g/mL) pesando 20 mg del polvo y disolviendo en 20 mL de MeCN (grado HPLC de Sigma-Aldrich). Estas soluciones se almacenaron a 4°C. Se prepararon soluciones estándar de trabajo de los compuestos a concentraciones variables (400 -20 μ g/mL) mediante la

dilución de las soluciones madre con fase móvil (FM: H₂O, MeCN, AF (0.1%)70:20:10) y se almacenaron en tubos eppendorf a 4°C.

Para las extracciones QuEChERS y otros ensayos se utilizaron, alcohol metílico y acetonitrilo grado HPLC (Karal), ácido acético glacial (Vetec química fina), solución de ácido fórmico para HPLC, 50% (Funka analytical), ácido clorhídrico, sulfato de magnesio anhidro grado reactivo (Karal), cloruro de sodio reactivo analítico (Karal), acetato de sodio 99+% (Sigma- Aldrich), ácido cítrico (Sigma- Aldrich), citrato de sodio cristales (Baker Analyzed), bicarbonato de sodio (Sigma- Aldrich) y ácido ascórbico (Karal).

3.3. Programas de análisis de datos:

- Software Chemstation
- Excel office 365

3.4. Muestras:

Rábano (*Raphanus sativus*) y Nabo (*Brassica rapa subsp. rapa*) obtenidos de comercios locales de Guanajuato, Guanajuato.

4. Resultados y discusión.

4.1. Revisión bibliográfica sobre las diferentes aplicaciones de la técnica QuEChERS.

En base a la descripción de la problemática relacionada con el análisis de compuestos indólicos en vegetales, presenta en la introducción, en este trabajo se optó por utilizar el método QuEChERS en la etapa de pretratamiento de muestra. Esta técnica fue introducida en el año 2003 por Anastassiades, Lehotay, Stajnbaher y Schenck, y en su versión original se enfocó en la determinación de residuos de pesticidas en frutas y verduras [38]. Desde entonces, se han propuesto un gran número de modificaciones logrando ampliar el campo de aplicaciones de manera muy significativa. Entre las variables de importancia para una buena eficacia de extracción a partir de una muestra dada, se han considerado: la composición y cantidad de muestras, el pH, el tipo y proporción de solvente respecto a la cantidad de la muestra, temperatura, tiempo y tipo de agitación durante la extracción, adición de la sal y/o de un co-solvente, tipo de sorbente y condiciones en la etapa de limpieza [54]. Como resultado, diferentes modalidades de QuEChERS se encuentran actualmente entre las más utilizadas técnicas de extracción de compuestos orgánicos a partir de muestras de alimentos, muestras medioambientales y de interés biomédico, especialmente en aplicaciones enfocadas en el análisis multicomponente y/o multi residuo. Cabe señalar que esta técnica ha sido adoptada como método oficial para determinación de pesticidas en frutas y verduras por el comité Europeo de Estandarización (CEN) y por la Asociación Oficial de Químicos Analíticos (AOAC internacional).

El objetivo de esta compilación es presentar las diferentes aplicaciones que se le han dado a la técnica QuEChERS, así como las modificaciones más trascendentes que se le realizaron con el fin de mejorar la eficacia de extracción y de limpieza, dependiendo del tipo del(los) analito(s) y de la composición de la muestra. En apego al tema de proyecto de tesis centrado en los compuestos indólicos, el enfoque principal está en el análisis de pesticidas, reguladores de crecimiento en plantas (PGR), metabolitos con actividad biológica, entre otros, contenidos en frutas, verduras y alimentos relacionados.

Tal como ya se mencionó en la sección de introducción, el procedimiento QuEChERS combina dos procesos de extracción: (1) extracción dispersiva con solución acuosa de un adecuado regulado de pH (citratos, fosfatos) y solvente orgánico (acetonitrilo), adicionando una sal (NaCl, MgSO₄) para eliminar el agua (efecto "salting-out") y controlar mejor la eficacia de extracción dentro del intervalo

de polaridad de compuestos de interés; (2) purificación del extracto orgánico mediante la extracción en fase sólida (Figura 8).

De acuerdo con su nombre, el método es muy rápido, reduce el número de operaciones, minimiza el uso de solventes de material de laboratorio, permite preconcentración y purificación del extracto, y puede ser adoptado para la extracción de diferentes tipos de compuestos a partir de diferentes matrices químicas. La flexibilidad de QuEChERS se basa en la selección del sistema de solventes y de la sal utilizada para lograr el efecto “salting-out” y también de la selección del sorbente (s) y de las condiciones de sorción/elución en la etapa SPE [39]. Cabe también mencionar que, en algunas aplicaciones es posible obviar el paso de limpieza de muestra, sin sacrificar la selectividad y sensibilidad del procedimiento [54].

En cuanto a las técnicas del análisis instrumental, QuEChERS ha sido empleado en combinación con diferentes tipos de cromatografía de líquidos y de gases, ambas con una variedad de sistemas de detección, tal como se ha descrito en el capítulo 1 de esta tesis.

En las siguientes secciones se presenta la revisión bibliográfica de aplicaciones de QuEChERS en el análisis de pesticidas, PGR y de algunos compuestos bioactivos en muestras de frutas, verduras y alimentos relacionados, cubriendo artículos publicados a partir del año 2016.

Dicha revisión se realizó con el fin de facilitar puesta de punto de QuEChERS para el análisis de compuestos indólicos en plantas crucíferas.

Tabla 4. Aplicaciones de la técnica QuEChERS										
		QuEChERS						Parámetros de validación		
Analitos	Muestra	Masa de muestra	Extractante	Sales de partición /buffers	Limpieza SPE	Técnica analítica (cuantificación)	Rec (RSD)	LQ	Ref	
Pesticidas										
21 plaguicidas (organoclorados, ureas, dinitroanilinas, piretroides, triazinas)	Aceites comestibles	6 g	20 mL MeCN, 14 mL H_2O	2 g NaCl, 8 g $MgSO_4$	500 mg Z-sep	HPLC-DAD (MAE, CE)	50-130 %; (<22.1%)	0.04-0.79 $\mu\text{g/mL}$	[55]	
3 herbicidas de sulfonilurea y sus metabolitos	Arroz y paja de arroz	10 g y 2 g (respectivamente)	10 mL H_2O , 10 mL MeCN	4 g $MgSO_4$, 1 g NaCl, 1 g SCDS, 0.5 g SCTD	25 mg C18, 150 mg $MgSO_4$	LC- MS/MS (MRM, MMC)	78-114,5 %; (<18%)		[56]	
Plaguicidas organoclorados (OCPs)	Tejidos de peces	0.5 g	9.2 mL MeCN/Hx (1:1 V/V)	2 g Na_2SO_4 , 4 g $MgSO_4$, 1 g NaCl	0.1 g PSA, 0.023 g C18, 0.4 g $MgSO_4$	GC-ECD (CE, MMC)	77.3-110.8 %; (<13%)	0.8-9.6 $\mu\text{g/Kg}$	[57]	
55 pesticidas (organofosforados, organoclorados, piretroides, triazinas, carbamatos, dinitroanilinas)	Bivalvas (S. plana)	5 g	5 mL MeCN (1% HAC)	500 mg NaAC, 2 g $MgSO_4$	125 mg PSA, 375 mg $MgSO_4$	GC-MS/MS. (SIM, EI, CE, MMC)	78-119 %; (2-27%)	0.3-10.3 $\mu\text{g/g}$	[58]	
Plaguicidas y sus metabolitos (organoclorados, organofosforados, piretroides)	46 muestras de frutas	5 g	10 mL MeCN	1 g NaCl, 4 g $MgSO_4$, 0.5 g SCDS, 1 g SCTD	25 mg PSA, 150 mg $MgSO_4$	GC- ECD (MAE)	70-120 %; (3.9-7.2%)	0.009 - 0.03 mg/Kg	[59]	
Pesticidas (organoclorados, triazinas, organofosforados, piretroides)	Guayaba	10 g	10 mL MeCN	1 g NaCl, 4 g $MgSO_4$, 0.5 g SCDS, 1 g SCTD	600 mg $MgSO_4$, 100 mg PSA, 30 mg GCB	GC / MS (SIM, MMC)	73.97-119.38 %; (<20%)	0.1 -0.5 mg/Kg	[60]	

Proyecto

Maestría

Residuos de pesticidas (estrobilurinas, tiadiazinas, organoclorados, triazoles, organofosforados, neonicotinoides)	Arroz	10 g	10 mL MeCN, (1%HAc)	4 g $MgSO_4$, 1.7 g NaAC	250 mg $MgSO_4$, 75 mg C18 o 125 mg quitosano	LC-MS / MS (SRM, CE, MAE)	70-120 %; ($\leq 20\%$)	5 - 20 $\mu\text{g}/\text{Kg}$	[61]
Bistriflurón	Pera asiática	20 g	100 mL Ace	50 mL sol. saturada de NaCl, 450 mL H_2O , 150 mL Hx	cartucho de amino Strata de 1000 mg	HPLC- UV-vis (CE)	84.92-83.87 %; (<3.14%)	0.05 mg/L	[62]
12 plaguicidas organoclorados	Granos de quinua	10 g	10 mL H_2O , 15 mL AcEt (1%HAc)	6 g $MgSO_4$, 1.5 g NaCl	50 mg $MgSO_4$, 150 mg PSA	GC- μ ECD (MMC)	73,66 - 128,09 %; ($\leq 16\%$)	0,001-0,010 mg/Kg	[63]
Residuos de plaguicidas organoclorados	Pulpas de frutas brasileñas	0.5 g	7 mL MeCN, 3 mL H_2O	4 g $MgSO_4$, 1 g NaCl, 0.5 g SCDS, 1g SCTD	150 mg $MgSO_4$, 50 mg PSA, 50 mg C18, 50 mg GCB	GC-ECD. (MMC, EI)	69 -110 %; (2-15%)	1.55-18.67 $\mu\text{g}/\text{Kg}$	[64]
39 plaguicidas y 2 PGR (benzimidazoles, imidazolinona, organoclorados, triazoles, organofosforados, dicarboximidias, piretroide)	Bebidas a base de soja	10 mL	10 mL MeCN	4 g $MgSO_4$, 1 g NaCl, 0.5 g SCDS, 1 g SCTD	120 mg C18, 375 mg $MgSO_4$	UHPLC-MS/MS (SRM, MMC, EI)	70-122 %; (<19%)	10 - 25 $\mu\text{g}/\text{L}$	[65]
28 carbamatos (CRB)	Quesos de alto contenido graso (Gorgonzola, Roquefort y Queso Camembert)	3g	7 mL H_2O , 10 mL MeCN (1% HAc)	4 g $MgSO_4$, 1 g NaCl	100 mg Z-Sep+	UHPLC-MS/MS (MRM, CE, MMC)	70-115 %; (<13%)	5.4 $\mu\text{g}/\text{Kg}$	[66]
8 herbicidas de sulfonilurea	Aceite de colza	15 g	10 mL H_2O , 15 mL MeCN	6 g $MgSO_4$, 3 g NaCl	75 mg C18, 75 mg z-sep	HPLC-DAD	67-133 %; (<15%)	20 ng/g	[67]

Proyecto

Maestría

Determinación de 28 carbamatos	27 muestras de hierbas aromáticas	1 g	10 mL MeCN	4 g $MgSO_4$, 1 g NaCl	200 mg $MgSO_4$, 200 mg C18	UHPLC-MS / MS (MRM, CE, MMC)	70-120 %; (<20%)	2 µg/Kg	[68]
Residuos de metalaxilo	Tomate	15 g	15 mL MeCN	6 g $MgSO_4$, 1.5 g NaCl	100 mg PSA, 20 mg GCB, 600 mg $MgSO_4$	HPLC-DAD (CE, MMC)	93-98 %; (<12.3%)	0.04 mg/Kg	[69]
Espirotetramat y sus cuatro metabolitos (B-enol, B-ceto, B-mono y B-glu)	Hojas, raíces y suelos	5 g	10 mL MeCN (FA 1%)	4 g $MgSO_4$, 1 g NaCl	6 mL MeCN (FA 1%), 200 mg FL	LC-MS/MS, (MMC)	70-120 %; (<20%)	0.001 mg/Kg	[70]
30 plaguicidas múltiples (triazinas, ureas, organoclorados, organofluorados, triazoles, dinitroanilinas, benzoilureas)	Leche cruda de bovina	20 mL	16 mL MeCN	8 g $MgSO_4$, 2 g NaCl	125 mg PSA, 25 mg Z-Sep, 5 mg Z-Sep Plus	HPLC-DAD (CE)	70-120 %; (≤20%)	0.3-18.7 ng/mL	[71]
pesticidas ácidos (residuos de 2,4-D, diclorprop, fluazifop, haloxyfop, MCPA y MCPB)	Comida orgánica	10 g, 5 g y 2 g	6 o 10 mL H_2O , 10 mL MeCN, 1 o 2 mL NaOH 5 N	NaCl, $MgSO_4$, sales de citrato	Congelar	LC-MS/MS (MRM, EI, MMC)			[72]
26 pesticidas (organofosforados, organoclorados, piretroides sintéticos y herbicidas)	Coliflor, pepino, plátano, manzana, trigo y gramo negro	10 g	10 mL H_2O , 10 mL MeCN	4 g $MgSO_4$, 1 g NaCl	150 mg $MgSO_4$, 10 mg ACF	GC-ECD y GC-MS/MS (SIM, MMC)	70- 120 %; (<15%)	3.42-16.60 ng/g	[73]
235 residuos de plaguicidas (cloronitrilo, organoclorado, organofosforado y piretroide)	46 muestras de hierbas secas	2 g	10 mL MeCN	4 g $MgSO_4$, 1 g NaCl, 1 g SCTD 0.5 g SCDS	150 mg PSA, 45 mg ENVI-Carb, 900 mg $MgSO_4$, 50 µL FA al 5%, gotitas DC	GC-MS / MS (MRM, EI, MMC)	60-128 %; (<18%)	0.001-0.002 mg/ Kg	[74]

Proyecto

Maestría

Residuos de plaguicidas (piretroides, organofosforados, organoclorados)	4 tipos de miel	2 g	12 mL MeCN	4 g $MgSO_4$, 1 g NaCl, 1 g SCTD, 0.5 g SCDS	150 mg PSA, 150 mg C18, 900 mg $MgSO_4$	LC- MS/MS (MRM, MMC)	62.06 - 108.79 %; (<12%)	0.001- 0.005 mg/ Kg	[75]
38 pesticidas multiclase (carbamatos, triazinas, acilalaninas, organofosforados, organoclorados, imidazoles, piretroide)	Frutos secos (fresa, mora, maracuyá, piña y uvas)	5 g	10 mL MeCN (1% HAc), 10 mL H_2O	6 g $MgSO_4$, 1.5 g NaCl	150 mg $MgSO_4$, 50 mg PSA, 50 mg C18	GC-MS / MS (MRM, EI, MMC)	70-120 %; (\leq 20%)	<5 ng/g	[76]
25 residuos de Pesticidas	Leche y productos lácticos (queso, yogur y nata)	10 g	10 mL MeCN (1% FA)	5,7 g NaCl, 6 g Na_2SO_4 , 4,2 g NaAc	0,5 g DE, 150 mg C18, 300 mg $MgSO_4$	GC / MS (SIM, EI, MMC)	72.5-120 %; (1.45- 17.94%)		[77]
64 plaguicidas (dinitroanilina, triazinas, organoclorados, organofosforados, piretroide, neonicotinoide, triazoles, imidazolinonas, benzonitrilos, carbamatos)	Manzana, guayaba y banano	15 g	15 mL MeCN	1.5 g NaCl, 4 g $MgSO_4$	250 mg PSA, 25 mg PGC, 750 mg $MgSO_4$	GC – MS LC – MS/MS (SIM, MRM, CE, MMC)	80-120 %; (\leq 20%)	0.005- 0.11 m g/Kg	[78]
47 plaguicidas (triazinas, estrobilurina, triazoles, carboxamida, carbamato, benzimidazoles, organofosforados, azoles, neonicotinoide, cloronitrilos)	17 nueces pecanas	5 g	10 mL MeCN	1 g NaCl, 4 g $MgSO_4$	250 mg C18, 50 mg PSA, 300 mg $MgSO_4$	LC-MS / MS (SRM, EI, MMC)	70-120 %; (<20%)	5 - 10 μ g/Kg	[79]

Proyecto

Maestría

Acaricidas (abamectina, clorfenapir y piridabén)	Judías verdes	2 g	5 mL MeCN (1% HAc)	0.5 g $MgSO_4$, 0.1 g NaCl, 0.15 g NaAc	0.05 g PSA, 0.15 g $MgSO_4$, 0.05 g CA	HPLC-HR-VWD (CE)	77.64 - 91.39 %; (<4.24%)	0.0303-0.0072 mg/L	[80]
Otros contaminantes de alimentos									
Bifenilo policlorado	Productos cárnicos (salami, soudjouk y salchicha)	1 g	10 mL Ace		400 mg PSA, 600 mg $MgSO_4$	GC-MS (SIM, EI, MMC)	95.7–101%; (<3.5%)	0.479–1.274 ng/g	[81]
Residuos de 5 tetraciclinas comunes (TCs)	Músculo de pescado	1 g	5 mL MeCN	1.25 g $(NH_4)_2SO_4$	50 mg C18	UHPLCMS / MS (MRM, MMC)	80-105 %; (<18.5%)	4.4 µg/Kg	[82]
Residuos de fenitrotión	Tomates	10 g	10 mL AcEt	20 g $MgSO_4$,	50 mg PSA, 10 mg PGC	GC-FPD (MMC)	70-120 %; (≤20%)	0.01 mg/Kg	[83]
Hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH4)	Alimentos de origen vegetal y animal	5 g	5 mL H_2O , 10 mL MeCN	4 g $MgSO_4$, 1 g NaCl, 0.5 g SCDS, 1 g SCTD	900 mg $MgSO_4$, 150 mg PSA, 150 mg C18	GC-MS / MS (MRM, EI)	75- 108 %; (2-20%)	0.1-1 µg/Kg	[84]
74 microcontaminantes (MCs)	Rábano, lechuga y fresa	10 g	10 mL MeCN (1% HAc)	1.5 g NaAc, 6 g $MgSO_4$	125 mg C18, 750 mg $MgSO_4$	LC-MS / MS (MRM, MMC)	70 – 120 %; (<20%)	0.001-2 ng/g	[85]
Residuos múltiples de medicamentos veterinarios (sulfonamidas, benzimidazoles, macrólidos, beta-lactamas, fenicol, anisol, piperidina)	37 muestras de leche	10 g	100 µL HAc, 10 mL MeCN	4 g $MgSO_4$	50 mg quitosano, 150 mg $MgSO_4$	LC-MS/MS (MRM, CE, MMC)	62 – 125 %; (<20%)	1-50 µg/Kg	[86]
5-nitroimidazol (5-NDZ)	Productos lácteos infantiles.	2.5 mL	5 mL MeCN	0.5 g $MgSO_4$, 0.1 g NaCl	150 mg $MgSO_4$, 100 mg PSA	UHPLC-MS/MS (MRM, CE, MMC)	63.2 - 94.1 %; (<10,3%)	0.08-0.65 µg/L	[87]
Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP)	Productos grasos ahumados de origen animal (pescado, queso y embutidos).	1 g	5 mL H_2O , 10 mL MeCN	5 g $MgSO_4$, 1.5 g NaCl	EMR-lipid, 5 mL H_2O , 5 g $MgSO_4$, 1.5 g NaCl	GC-MS (SIM, EI)	50–120 %; (<16.7%)	0.38 µg/Kg	[88]
Autenticación y calidad									

Proyecto

Maestría

3-alkil-2-metoxipirazinas (MP)	Vinos blancos y rojos	30 mL	1 mL Tol	12 g $MgSO_4$, 3 g NaCl	25 mg $CaCl_2$, 25 mg $MgSO_4$, 10 mg PSA	GC-MS (SIR, CE)	71-87 %; (<21%)		[89]
Multiresiduos en muestras biológicas									
Microcontaminantes orgánicos (organofosforados, neonicotinoides, triazoles, triazina)	Macroinvertebrados (gammaridos) del río Danubio	200 mg	1 mL MeCN	800 mg $MgSO_4$, 200 mg NaCl	50 mg PSA, 400 mg $MgSO_4$	LC-MS / MS (MRM, MMC)	47- 127 %; (<5.8%)	0.01 - 2.13 ng/ g	[90]
Diclofenaco (DCF) y productos de transformación biótica y abiótica	Bivalvo (mejillón cebra <i>Dreissena polymorpha</i>)	100 mg	10 mL MeCN, 5 mL H_2O , 200 μ L nH, 200 μ L DMSO			LC-MS / MS (MRM, EI, MMC)	78-117 %; (<18%)	<1ng/g	[91]
Organosiloxanos o metilsiloxanos volátiles (VMS)	36 productos de cuidado personal (PCPs)	500 mg	3 mL Hx	60 mg $MgSO_4$	60 mg PSA, 30 mg C18	GC – MS (SIM, EI, MAE)	74–104 %; (<18%)	0.17- 3.75 ng/g	[92]
Plaguicidas multiclase (organofosforados, organoclorados y piretroides sintéticos)	Plasma humano	15 mL	3 mL AcEt (2% HAc)	0,4 g $MgSO_4$	50 mg PSA	GC-MS / MS (MRM, MMC)	74- 109 %; (<10%)	0,12- 13,53 ng/mL	[93]
Pesticidas (neonicotinoides)	sangre de polluelos de búho real (<i>Bubo bubo</i>) en libertad	500 μ L	1500 μ L HAc 1% en MeCN	1.2 g $MgSO_4$, 0.3 g NaAc	180 mg $MgSO_4$, 30 mg PSA, 30 mg DSC-18	HPLC/TOF- MS (MMC)	59–76 %; (4–11 %)	2–10 ng/mL	[94]
Compuestos orgánicos volátiles	Embriones de pez cebra (<i>Danio rerio</i>)	10 ng/mL	70 μ L MeCN	7 mg NaCl, 28 mg $MgSO_4$		GC–MS/MS (MRM, MMC)	63–133 %;	1– 25 ng/mL	[95]
Nicotina	Uñas y cabello (26 bebés coreanos)	10 mg	5 mL MeCN	800 mg $MgSO_4$, 200 mg NaCl	150 mg PSA	LC-MS / MS (MRM, EI, MAE)	65.3- 87.2 %; (0.3- 12.3%)	10 pg/mg	[96]

Solventes y sales: tampón McIlvaine – tampón citrato-fosfato; MeCN – acetonitrilo; HAc - ácido acético; DCM - diclorometano, AcEt - acetato de etilo; Hx – hexano; EtOH- etanol; Ace – acetona; Tol – tolueno; MeOH -metanol; FA – ácido fórmico; cHx – ciclohexano; AcBut – acetato de butilo; nH - n-

heptano; DMSO -dimetil sulfóxido; NaAc - acetato de sodio; SCTD - citrato de trisodio dihidratado ($Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$); SCDS - citrato de hidrogeno disodico sesquihidratado ($Na_2HC_6H_5O_7 \cdot 1.5H_2O$); EDTA - ácido etilendiaminotetraacético;

Fases estacionarias utilizadas en SPE en cartuchos y/o en SPE dispersiva: C18 – fase estacionaria de sílice unida con octadecilo; PSA - amina primaria/secundaria; PGC - carbón poroso grafitizado; GCB- carbón negro grafitizado; FL – florisil; ENVI-carb™ - carbono grafitizado no-poroso; EMR-lipid – cartuchos de Agilent para eliminación de lípidos; EVN - estireno divinilbenceno; Z-sep, Z-sep+, Z-sep/C18 – sorbentes comerciales Supelco para SPE dispersivo en base a zirconia o zirconia y C18, enlazados a partículas de sílice; Mycosep™ - columnas para limpieza de muestras en el análisis de micotoxinas; SAX – strong anion exchange; HLB - copolímero de divinilbenceno y vinil pirrolidinona (hidrófilo lipófilo equilibrado); DE - tierra de diatomeas; ACF - fibras de carbón activado; CA – carbón activado; DC-dodecano; DSC-18 – sorbente de sílice C18 trifuncional unido poliméricamente.

Técnicas analíticas y modos de detección: LC - cromatografía de líquidos; HPLC - cromatografía líquida de alta resolución; UHPLC - cromatografía líquida de ultra alto rendimiento; GC - cromatografía de gases; MS - espectrometría de masas; MS/MS – espectrometría de masas en tándem; ESI – ionización por electro nebulización; HR – alta resolución; TOF – analizador de tiempo de vuelo; SIM (SIR) – monitoreo de iones seleccionados; MRM – monitoreo de reacciones múltiples; SRM – monitoreo de reacciones seleccionadas; VWD - detector espectrofotométrico de longitud de onda variable; DAD – detector espectrofotométrico de arreglo de diodos (DAD); ECD/ μ ECD (micro)detector de captura de electrones (μ ECD); FPD - detector fotométrico de llama;

Otras abreviaciones: Rec – porcentaje de recuperación; RSD – desviación estándar relativa (%); LQ – límite de cuantificación, EI – estándar interno; MAE – método de adición de estándar, CE – calibración externa; MMC – calibración en presencia de matriz de muestra.

4.1.1. Pesticidas.

Los plaguicidas comprenden un gran número de sustancias con actividad antimicrobiana y se caracterizan por distintos grados de persistencia en medio ambiente; estos compuestos pueden dividirse en diferentes clases incluyendo herbicidas, fungicidas, insecticidas, etc.[97] Su introducción se dio a la par con la creciente población mundial y con la creciente demanda de producción de alimentos. Cuando surgió la necesidad de proteger los cultivos agrícolas de diversas enfermedades y asegurar altos rendimientos y alta calidad nutritiva de las cosechas; se ha normalizado empleo de plaguicidas[61, 62, 97, 98]. Como se comentó durante la parte introductoria de este trabajo, el uso imprudente de plaguicidas durante las etapas de producción, procesamiento, almacenamiento, transporte o comercialización puede dejar residuos en los alimentos con ciertos riesgos para la salud de consumidores, además de causar contaminación medioambiental por su persistencia [97, 99-101]. Aunque algunos plaguicidas tienen un bajo potencial de toxicidad, o pueden degradarse casi totalmente en el medio ambiente, esto no garantiza su seguridad, ya que productos de descomposición a menudo presentan una mayor persistencia y efectos adversos en la salud, comparando con el compuesto original. Las rutas de degradación así como la cinética de dichos procesos depende de diferentes parámetros del medio como la humedad, el pH, temperatura y luz, entre otros [101].

Para el monitoreo de pesticidas y sus productos de degradación/transformación, se requiere en primer lugar un procedimiento de extracción eficiente, que permita obtener un alto número de compuestos y realizar el análisis del tipo multiresiduo [102]. Hay que señalar sin embargo que la falta de selectividad en este tipo de extracción puede introducir errores en posteriores etapas del análisis; para evitar estos problemas, a menudo se integra un paso de limpieza, en el que se eliminan potenciales interferentes extraídos junto con los analitos con el fin de minimizar los efectos de matriz y los falsos positivos, obteniendo resultados confiables[61]. Entre diferentes estrategias de preparación de muestras para el análisis de residuos de plaguicidas, QuEChERS ofrece importantes ventajas, especialmente en el análisis de vegetales y alimentos derivados de ellos [60, 61, 100, 103]. En la Tabla 4, se presentan de manera resumida algunos estudios de los últimos cuatro años, enfatizando tipos de muestras y variables específicas del procedimiento QuEChERS aplicadas.

En cuanto al tamaño de muestra, en varios estudios se repitieron las condiciones originales (10 g del homogenado para análisis de frutas y vegetales), pero también se demostró la factibilidad de disminuir la escala, cuidando siempre mantener gran superficie de contacto y buena eficacia de extracción.

Desde la propuesta inicial, acetonitrilo ha sido el solvente preferencial en la etapa de extracción; entre sus ventajas hay que mencionar: (i) miscibilidad con agua en cualquier proporción; (ii) efectiva separación del agua por el efecto de “salting-out”; (iii) eliminación de trazas de agua con $MgSO_4$ (secado); (iv) su polaridad permite extracción de un amplio rango de compuestos; (v) compatible con GC y HPLC; (vi) baja toxicidad. En algunos casos se han explorado otros solventes, como diclorometano, acetona, acetato de etilo o sus mezclas, pero debido a su capacidad de extraer compuestos lipofílicos, era necesaria una etapa adicional de limpieza [62, 63].

El efecto “salting-out” se refiere a la separación de dos solventes miscibles después de agregar un electrolito a su mezcla. Se han propuesto dos siguientes mecanismos subyacentes: (i) el solvente de mayor polaridad es atraído preferencialmente a los iones de la sal por fuerzas electrostáticas; (ii) el solvente de mayor polaridad solvata el electrolito impidiendo acceso del otro solvente y de esta manera provocando formación de un sistema bifásico. En la selección del tipo de la sal, se consideran aquellas solubles en agua y poco solubles en solvente orgánico (acetonitrilo), siendo $MgSO_4$ y $NaCl$ (o sus mezclas) las más utilizadas. Sus ventajas no solamente abarcan una efectiva eliminación del agua, pero también un buen control de la polaridad del extractante [104]. Para procedimientos basados en espectrometría de masas con ionización ESI, se recomienda el uso de

sales volátiles, específicamente de amonio, que favorecen formación de iones de moléculas protonadas y limitan su cationización con metales.

Existe el consenso que el pH 5.0 – 5.5 ofrece condiciones robustas en la etapa de extracción; para ello se han utilizado diferentes tipos de tampones, incluyendo los de formiatos, acetatos, citratos y fosfatos. En la selección del tampón y del pH, obviamente se toma en cuenta el tipo de pesticidas a analizar, pero es importante mencionar que ambos parámetros pueden influir sobre la eficacia de la posterior limpieza de muestra. Como ejemplo, se ha demostrado que el tampón de citratos es el más adecuado si para la limpieza se utiliza PSA.

Antes de la extracción en fase sólida, es necesario eliminar trazas de agua, para lo cual se agrega al extracto un agente de secado, principalmente $MgSO_4$ o $CaCl_2$, seleccionando cuidadosamente la cantidad dependiendo de la polaridad de los analitos, cantidad de extracto y solubilidad de la sal en estas condiciones.

Tal vez el mayor esfuerzo en estudios sobre QuEChERS se ha dedicado al desarrollo de sorbentes utilizados para la extracción dispersiva en fase sólida. Hoy en día varias compañías tales como Supelco, Agilent u otros, ofrecen más de 50 diferentes tipos, cada uno de ellos desarrollado específicamente para cierta polaridad de analitos y ciertos tipos de las muestras. Algunos de estos sorbentes están incluidos en la tabla y descritos debajo de ella.

Para mencionar algunos ejemplos recientes de estudios sobre QuEChERS en el análisis de pesticidas, Kemmerich y col. evaluaron diferentes métodos para la extracción en peras, examinando acetato y con citrato, mini-Luke, acetato de etilo y el método oficial de referencia de la Unión Europea para residuos de pesticidas en frutas y vegetales. Además, para la extracción dispersiva en fase sólida (d-SPE) se evaluaron diferentes sorbentes (C18, PSA y florisil) y las combinaciones de ellos, también se probó el análisis directo del extracto por UHPLC-MS/MS obviando etapa de limpieza. Este proyecto demostró la eficiencia de la técnica QuEChERS con acetato, pues de 170 compuestos que se evaluaban allí, se logró recuperar 156 pesticidas en un porcentaje de recuperación del 70-120% y un rango RSD $\leq 20\%$. Por otro lado, la evaluación de los sorbentes mostró que no existían diferencias significativas entre ellos e incluso cuando no se aplicaba este paso; por lo tanto, este paso se eliminó haciendo el método más rápido y económico[102]. Li y col. utilizaron QuEChERS empelando acetonitrilo en la etapa de extracción, para la determinación de varios insecticidas piretroides, en frutas y verduras; los extractos se limpiaron con cartuchos de extracción en fase sólida (SPE) de carbono no poroso grafitizado o C18 y el análisis se realizó mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS)[105]. Ramadan y col. aplicaron QuEChERS con ligeras modificaciones para la extracción de cuatro insecticidas; en concreto, evaluaron los niveles residuales y la distribución de abamectina, tiametoxam, espinosad y clorpirifos en jitomate (*Solanum lycopersicum*L.). Los análisis se realizaron por HPLC-DAD. Las extracciones se llevaron a cabo con una mezcla de acetonitrilo con 1% de ácido acético, mientras que para el paso de partición se usaron sulfato de magnesio anhidro y acetato de sodio. Para la limpieza, la muestra fue mezclada con PSA, GCB y $MgSO_4$. Los resultados de esta investigación mostraron que los frutos se pueden consumir de forma segura después de 15 días de la aplicación de estos 4 insecticidas, a las dosis recomendadas por la UE[106].

A partir de las modificaciones realizadas al método original y su éxito en muestras vegetales; ha crecido el interés en otras modificaciones que permitieran adaptar la técnica a muestras aún más complejas. Faraji y col. investigaron, por primera vez, los residuos de acetamiprid, imidacloprid, espirotetramat y de sus metabolitos relevantes en muestras de pistaches, mediante LC-MS/MS, el cual combinado con QuEChERS modificado (combinación de acetonitrilo con el kit c, que contenía $NaHCO_3$) mostró una excelente eficiencia de extracción y extractos muy limpios[107]. Janaki y col. sugirieron que la extracción de metil-bensulfuron (BSM) de muestras de arroz y suelos, debía llevarse con una mezcla de tres solventes, ácido acético al 1% en acetonitrilo y diclorometano con una mezcla de sales ($MgSO_4$ y $NaOAC \cdot 3 H_2O$), mientras que el paso de limpieza se realizó con C18. Las

recuperaciones fueron superiores al 80%[100]. Una de las muestras más complejas debido a su alto contenido de azúcares es la miel. En este caso, Zheng y col. analizaron cuatro tipos de miel provenientes de supermercados de Seúl, mediante el método QuEChERS modificado para la cuantificación simultánea de residuos de plaguicidas (cimiazol, fipronil, cumafos, fluvalinato, amitraz y 2,4-dimetilamina). Las modificaciones abarcan el uso de tampón de fosfatos 0.2 M (pH 9) y posteriormente una extracción con acetonitrilo, para el paso de purificación se utilizó una combinación de amina primaria/secundaria (PSA) y C18 para finalmente realizar un análisis por LC-MS/MS. Se detectaron residuos de plaguicidas en las muestras, pero solo en tres de ellas se logró cuantificación[75]. Otra muestra químicamente compleja debido a la alta cantidad de grasas es el cacao, por lo que Zainudin y Salleh adaptaron QuEChERS a esta matriz. Hay que recordar que el método original se enfoca en el análisis de compuestos no lipofílicos, mientras que alto contenido de grasas en la muestra favorece la acumulación de ingredientes activos de pesticidas lipofílicos. Durante este experimento se evaluó el efecto de la hidratación, así como el efecto de la cantidad de muestra y el volumen de agua, sobre la eficiencia de extracción de 19 residuos de plaguicidas y para ello se aplicó un diseño factorial completo donde las recuperaciones porcentuales fungieron como variables de respuesta. Fue imposible obtener una máxima recuperación para todos los analitos en las mismas condiciones, pero en resumen el 76 % mostró una mejor extracción con 2g de muestra, para 76% resultado favorable 15 min de hidratación y 56 % mostraron preferencia por 10 mL de volumen de agua. En conclusión, reducir la cantidad de la muestra y aumentar la cantidad de agua pueden resultar en mejores recuperaciones, por lo que este paso de hidratación de la matriz es importante en el caso de granos de cacao que contienen poca agua y altos porcentajes de grasas [108]. También Grande-Martínez y col. recomendaron realizar las extracciones con adición de agua, ya que la humedad adecuada mejoró la eficacia de extracción. Ellos utilizaron acetato de etilo para la extracción en lugar de acetonitrilo recomendada en la metodología original, y un paso de limpieza final con un cartucho de florisil; con estas modificaciones pretendían extraer alrededor de 100 pesticidas en muestras de harina de arroz y trigo para finalmente analizarlas por medio de GC-MS/MS[109]. Rahman y col. Aplicaron la técnica QuEChERS con acetonitrilo para la extracción de insecticidas organofosforados en huevos, músculos de cerdo y pollo; para el paso de limpieza, se sugirió mantener el extracto a -20°C por 30 min seguido del uso de un sorbente dSPE obteniendo una muestra más limpia sin perjudicar la recuperación[110]. Rutkowska y col. también aplicaron el método basado en la extracción con acetonitrilo junto con GC-MS/MS para la determinación simultánea de 235 pesticidas en diferentes hierbas, en este proyecto se analiza el impacto del tamaño de muestra (1, 2, 5 g), el tipo de sorbente (chloroFil, ENVI-carb, GCB, octadecil, PSA y Z-sep) y los efectos de matriz. El método más efectivo resultó con 2 g de muestra seguida la extracción con acetonitrilo y limpieza con PSA/Envi-carb/ $MgsO_4$, así minimizaron los efectos de matriz [74]. De O. Stremel y col. encontraron a través de un diseño factorial 2^3 que no existe diferencia significativa con respecto al tamaño de muestra por lo que se puede elegir cantidades menores[57]. Algunos autores como Mandal y col. siguen el uso de combinaciones de sorbentes para la completa eliminación de co-extractos como carotenoides, ya que uno solo sorbente puede no resultar efectivo en aplicación a muestras con matriz compleja[78]. Guedes y col. proponen después del paso de limpieza el uso de 10 μ L de una solución de ácido fórmico 5% para la estabilización de los extractos de pesticidas[60].

4.1.2. Micotoxinas.

Las micotoxinas son metabolitos secundarios de hongos filamentosos como *Aspergillus*, *Penicillium* y/o *Fusarium* [111]. La agencia de la Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y la agricultura (FAO) estima que el 25% de los cultivos son afectados por la presencia de estos productos, lo que se traduce en pérdidas de miles de millones de dólares[112]. La importancia de la determinación de las micotoxinas se centra en que estos compuestos tienen efectos adversos en la salud humana y animal, para garantizar la seguridad de los consumidores estas deben ser

reguladas[111]. Dependiendo del organismo fúngico y del organismo huésped, principales tipos de micotoxinas incluyen aflatoxinas, ocratoxina A, tricotecenas, zearaleonas y fumisinas; estos compuestos presentan diferentes estructuras y polaridades lo que hace su extracción completa como un solo extractante prácticamente imposible. Se han encontrado varios procedimientos analíticos para la determinación de micotoxinas basados en el uso de QuEChERS; para ello se han probado varias mezclas de disolventes incluyendo acetonitrilo[113], metanol, acetona, cloroformo[111], diclorometano, acetato de etilo[113], ácido acético [114], hexano [113] y en algunos casos se agregó el ácido fórmico[113, 115]. Cabe señalar que acetonitrilo-agua ha sido una de las mezclas más empleadas[111-113]. En la etapa de limpieza por SPE dispersivo, se han utilizado sorbentes tales como EMRLipid [115], mezclas de C18 y PSA[113, 115] o con $MgSO_4$ [113, 114], GCB con $CaCl_2$ [113] y columnas multifuncionales Mycosep [112]; sin embargo, debido a la amplia gama de polaridades y propiedades físicas de las micotoxinas, se sugiere evitar, esta segunda etapa de QuEChERS para asegurar efectiva extracción de mayor número de compuestos [112]. Entre estudios reportados, Peromingo y col. lograron determinar algunas micotoxinas sin dSPE, mediante UHPLC-MS/MS. La determinación es difícil pues algunas suelen reaccionar con el oxígeno ambiental, el material de plástico e inclusive con la fase estacionaria de la columna. En este trabajo de investigación se evaluaron cuatro métodos diferentes de extracción de micotoxinas, dos basados en extracción líquido-líquido, y los otros dos en la metodología QuEChERS modificada, todos aplicados a muestras de jamón curado. En el primer método de extracción se utilizó cloroformo, el segundo consistía en una mezcla de agua y ácido acético, después de ser mezclados se agregaba una nueva mezcla de acetonitrilo y ácido acético al 0.1%, el tercero consistió en agregar en el segundo método una sal para eliminación de trazas de agua ($NaCl$ y $MgSO_4$ anhidro), y finalmente el cuarto método solo reducía a la mitad los volúmenes y cantidades de reactivos utilizados. Los cuatro métodos resultaron efectivos, ya que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre resultados obtenidos en cada uno de ellos; sin embargo, los autores enfatizaron ventajas del método cuarto, en el que se redujo drásticamente el tiempo de análisis y el uso de disolventes. Adicionalmente se remarca la efectividad de estos cuatro métodos, pues ninguno de ellos requirió un paso de limpieza por dSPE para eliminar grasas, como se reporta en otros estudios[111]. Debido a la complejidad de las muestras analizadas, varios autores mencionan diferentes modificaciones para la eliminación de los efectos de matriz los cuales se muestran a continuación. Dagnac y col, para analizar micotoxinas en maíz, aplicaron el primer paso de extracción del procedimiento QuEChERS y compararon resultados obtenidos sin el segundo paso contra los resultados arrojados empleando columnas Mycosep TM 400. Como técnica analítica, en este estudio se utilizó el sistema LC-HESI-MS/MS; observándose que dSPE no permitió eliminar supresiones de ionización de compuestos de interés en las muestras; por ello se recomendó obviar la segunda etapa de QuEChERS y llevar a cabo la cuantificación mediante calibración externa en presencia de matriz de muestra [112]. Alcántara-Duran y col. desarrollaron un método para el análisis de semillas, basado en QuEChERS y en LC-HRMS. La extracción se llevó a cabo con 10 mL de MeCN-ácido fórmico (grado LC-MS) (99.9/0.1 v/v) para después evaluar dos estrategias de limpieza. Una de ellas consistió en la eliminación de lípidos utilizando EMRLipid en la etapa de dSPE; mientras que en la segunda se aplicó una mezcla de sorbentes PSA y C18. Se prepararon curvas de calibración con estándares puros contra la calibración externa en presencia de la matriz química de muestra. Se concluyó que el sorbente EMR-Lipid reduce el efecto matriz, logrando mejores recuperaciones (superiores al 75%) en comparación con la mezcla de sorbentes C18 + PSA [115]. En otro estudio, Gonzalez-Jartín y col. optimizaron los parámetros QuEChERS y los del sistema UHPLC-MS/MS, para eliminar interferencias y de esta manera evitar la presencia de muestra en soluciones de calibración o el uso de estándares marcados con isótopos pesados (método de dilución isotópica). En el análisis cromatográfico evaluaron diferentes mezclas y proporciones de disolventes, seleccionando finalmente la mezcla de acetonitrilo/agua/acético (2%) 49/50/1 (v/v/v). Una vez establecidas las condiciones UHPLC-MS/MS, se procedió con la optimización del procedimiento de extracción, el cual incluía un paso previo de preconcentración después que las muestras se extrajeron con ácido acético y acetonitrilo. Para el paso de limpieza, se evaluaron tres procedimientos

con mezclas de 400 mg de $MgSO_4$ con variable cantidad de C18 (100, 200, 300 mg), eligiendo 100 mg de C18. El procedimiento fue aplicado en cerveza, en el cual se determinaron 23 micotoxinas en una corrida analítica de 13 min [114]. Es evidente que se debe tener en cuenta las propiedades fisicoquímicas de los analitos y la composición de muestra para poder ajustar las condiciones que permitan obtener mejores recuperaciones. En otro trabajo enfocado en el análisis de uvas, se evaluaron acetonitrilo, hexano y acetato de etilo, siendo este último elegido como disolvente para la extracción del ácido tenuazónico (TA); para la selección de extractante se tomó en cuenta la solubilidad del analito y se ajustó el volumen para una cantidad de muestra. También se encontró que, para aumentar el rendimiento de extracción, era necesario agregar a la muestra agua y ajustar el pH mediante adiciones del ácido. Para el paso de limpieza se evaluaron sales y sorbentes (PSA, C18, GCB, $MgSO_4$ y $CaCl_2$); cada uno de manera individual o en combinaciones. Como resultado de experimentos sistemáticos, se seleccionó finalmente $CaCl_2$ el cual ayudo a eliminar agua del extracto de manera eficiente y de esta manera se logró la precipitación de potenciales interferentes polares co-extraídos con micotoxinas, sin necesidad de la etapa de dSPE, la determinación se realizó por medio de HPLC-UV[113].

4.1.3. Otras fuentes de contaminación alimentaria.

Además de los pesticidas y micotoxinas, en los alimentos se pueden encontrar diversos tipos de compuestos, muchos de ellos agregados con un propósito, pero en múltiples ocasiones en cantidades no adecuadas, sin regulación o inclusive prohibidos. Por otro lado, es necesario considerar la presencia de xenobióticos en materia prima y la contaminación de los alimentos durante su elaboración, procesamiento o almacenamiento; de cualquier manera, los contaminantes pueden afectar la salud de los consumidores por lo que es importante mantener una regulación constante de ellos.

Entre los contaminantes agregados con un propósito específico en los alimentos se encuentran los conservadores. Aunque los potenciales efectos adversos de los conservadores son de conocimiento común y se ha tratado de restringir su uso, existen varios informes sobre los efectos adversos de estos inclusive a bajas concentraciones. De Oliveira Arias y col. modificaron la técnica QuEChERS, para el análisis de 82 muestras de diferentes alimentos procesados, de super mercados locales de Río Grande, Brasil. Entre las modificaciones a la técnica se contemplan la reducción de la cantidad de la muestra de 10 g a 1 g, realizar la extracción con una mezcla de acetonitrilo- ácido acético (96%) y agregar NaCl y $MgSO_4$ para eliminar trazas de agua y mejorar la migración de los analitos al acetonitrilo. Los autores argumentan que QuEChERS supera todas las limitaciones de los métodos clásicos, ya que se puede aplicar tanto en muestras líquidas como sólidas, además la extracción presentada por los autores se puede llevar a cabo en 10 min y presenta porcentajes de recuperación de 91-107% con $RSD \leq 5.3$, por lo que es una buena alternativa para la determinación de conservantes [116].

Como se discute en la introducción de este proyecto, otro de los contaminantes de alimentos son los reguladores del crecimiento en plantas (PGR). Pu y col. Han determinado 24 PGR en 50 muestras de uvas de Taiwán, mediante la técnica QuEChERS y LC-MS/MS; el método de extracción fue modificado, se emplearon 10 g de cada muestra a las cuales se les adicionó el ácido fórmico 1% en una solución de acetonitrilo/metanol (4:1, V/V); una vez mezclado, se le agregó 6.5 g de una mezcla de sales (sulfato de magnesio anhidro, cloruro de sodio, citrato de trisodio dihidratado y citrato de hidrogeno disodico sesquihidratado), la mezcla se agitó nuevamente y después se centrifugó. El extracto fue purificado en el paso de limpieza con una mezcla de PSA y $MgSO_4$ anhidro; el sobrenadante se secó con flujo de gas nitrógeno y se reconstituyó en la solución de ácido fórmico al 0.05% en metanol. Antes de la introducción al sistema LC-MS/MS el extracto se filtró. En estas condiciones, se obtuvieron recuperaciones superiores al 70% con una precisión a corto y mediano plazo aceptable ($RSD < 20\%$) [117]. Algunos investigadores como Neely y col. han planteado el uso

de la técnica QuEChERS como un complemento a otras técnicas de extracción. Ellos encontraron mejores porcentajes de recuperación de los PGR en diferentes tipos de alimentos con el uso de un tampón a pH 10. En este mismo trabajo se comparó la efectividad de extracción entre acetonitrilo y acetato de etilo. Se observó que el acetato de etilo provocaba la pérdida de analitos, además de que este solvente no era compatible con las condiciones en la columna cromatográfica y tuvo que ser evaporado y sustituido por acetonitrilo o metanol. El procedimiento fue validado para el análisis de lechuga, uvas, leche, pollo, cerdo y ternera encontrándose la eliminación de interferencias en todos los casos con un corto tiempo de análisis, adecuado para los casos de emergencia como lo es el terrorismo alimentario[118]. En otro trabajo, Kuzukiran y Filazi opinaron que la eficiencia de extracción depende principalmente de los disolventes y evaluaron comparativamente tres de ellos: acetona, metanol y acetonitrilo, recomendando el uso de metanol, especialmente para muestras con bajo contenido de grasas. En muchos casos, el punto crítico de QuEChERS es la eliminación de lípidos, para lo cual se ha demostrado la factibilidad del tratamiento con ácido sulfúrico (descomposición de grasas) y de la congelación/ centrifugación [81].

Por otro lado, entre los contaminantes agregados a los alimentos sin intención durante alguna etapa del procesamiento se encuentran los componentes que migran desde envolturas/recipientes de plástico. De esta manera Ramos y col. determinaron 12 esteres de ácido ftálico (PAE) en cerveza, sidra y jugo de uva; la extracción y preconcentración de los analitos se realizó con acetonitrilo seguido de una adición de agua para lograr la cantidad requerida para una extracción eficiente. A continuación, se agregaron las sales de partición ($MgSO_4$ y NaCl) y para la limpieza de extractos de cerveza y sidra se utilizó una mezcla de $MgSO_4$ con PSA mientras que para jugo de uva se usó C18. Los extractos obtenidos fueron introducidos al sistema de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas en tándem (GC-TQMS). En la aplicación del procedimiento desarrollado, se obtuvieron valores de recuperación que varían entre el 75 y el 120% para todas las matrices con valores de desviación estándar relativa inferiores al 20%, los límites de cuantificación se encontraban entre 0.034 y 1.415 $\mu\text{g/L}$ [119].

4.1.4. Autenticación y calidad.

La procedencia geográfica y/o autenticidad de bebidas y alimentos han tomado importancia debido a la competencia mercantil con imitaciones, falsificaciones o adulteraciones de dichos productos, surgiendo así la necesidad de identificar los productos originales con la llamada denominación de origen. Aunado a ello, la composición química de un producto permite dictaminar sobre su valor nutritivo, posibles contaminaciones y por ende, evaluar su calidad. En este tipo de estudios, sobre todo enfocados en los compuestos orgánicos, se han demostrado la utilidad de QuEChERS en la etapa de tratamiento de muestra. Como un ejemplo, Silva y col. analizaron 52 muestras de miel, en las cuales se determinaron compuestos fenólicos, estableciendo las condiciones para cada una de las etapas QuEChERS, es decir extracción, "salting-out" y limpieza; en los extractos obtenidos se determinaron 16 compuestos por HPLC-DAD y se utilizó el análisis de componentes principales para separar las muestras con respecto a su composición fenólica. Como resultado de experimentos sistemáticos, se recomendó el uso de sales $NaCl$ y $MgSO_4$ en el paso de "salting-out", y para el paso de limpieza el uso la mezcla de $CaCl_2$, PSA y C18. Los autores concluyeron que la hesperidina y el ácido sirínico podrían usarse como marcadores de la autenticación de mieles[120]. Para evaluar la calidad del proceso de elaboración de vinos, Fontana y Bottini propusieron como indicadores las metoxipirazinias. Se estableció el método QuEChERS modificado, en el que se utilizó el tolueno en lugar de acetonitrilo para el paso de extracción; cabe mencionar que también se probaron hexano y acetato de etilo, pero para ambos se observó una co-extracción de contaminantes. Entre las ventajas del tolueno, se mencionó su relativamente alto punto de ebullición (110°C). Por otro lado, ya que el pH es un parámetro crítico para la extracción, se probaron NaOH (0.5, 0.8 y 1.2%, p / v) o FA (1%, v / v) a pH de 2 y 6 respectivamente; se observan mayores problemas de co-extracción a pH bajos (pH 2), mientras que pH 6 aseguró una reducción en la extracción de potenciales interferentes a la

fase de tolueno y una mejor relación S/R. Se mantuvo el uso de *NaCl* y *MgSO₄* para el paso de partición ya que este último retiene el agua restante de la muestra; como ya se ha mencionado antes, al aumentar la fuerza iónica de la fase acuosa, mejora la extracción de los analitos neutros al solvente orgánico (tolueno). Para la limpieza del extracto se evaluaron PSA y C18 de manera individual y en combinaciones, también se probó la adición de *CaCl₂*, para reducir la solubilidad de los ésteres aumentando la capacidad de sorción del PSA hacia los ácidos grasos. Finalmente se eligió una combinación de *CaCl₂* anhidro, *MgSO₄* anhidro y PSA; esta mezcla resultó muy efectiva para reducir los efectos de matriz[89]. Gressler y col. determinaron residuos de ractopamina, un aditivo utilizado para aumentar el crecimiento de animales para consumo humano, demostrando que el procesamiento térmico de carne no elimina totalmente el fármaco. El procedimiento propuesto consistió en una hidrólisis enzimática de la muestra de carne, seguida un ajuste de pH >12 con NaOH 10 M; la extracción se realizó con acetonitrilo y se agregaron *NaCl*, *MgSO₄*, citrato de sodio tribásico dihidrato y citrato de sodio dibásico sesquihidratado; finalmente, para la limpieza dSPE se aplicó *MgSO₄*, PSA y C18 [121].

4.1.5. Biomarcadores y evaluación de exposición a compuestos potencialmente tóxicos mediante consumo de alimentos.

Otra de las múltiples aplicaciones de QuEChERS encontradas en la bibliografía es la determinación de biomarcadores de enfermedades. Este tipo de análisis se realiza en muestras tales, como leche materna o animal [122-125], cabello[126], heces de ratones[127] y alimentos variados[128-132]. En todos los estudios citados se utilizó la técnica de extracción QuEChERS, pero en cada uno de ellos, al igual que en otras aplicaciones se realizaron modificaciones aprovechando su adaptabilidad para mejorar la extracción de compuestos específicos. Dependiendo del tipo de compuestos de interés y de la composición de la muestra, se examinaron diferentes solventes en la etapa de extracción; entre ellos acetonitrilo[123, 125, 128, 129, 132, 133], metanol[127], etanol[123], acetona[123], hexano[125, 128, 131], tolueno[132] y ácido fórmico[125], estos han sido usados solos o en mezclas. En la mayoría de los casos, las sales de partición fueron *MgSO₄* y/o *NaCl*[123, 128, 129, 132, 133]. La mayor variedad corresponde a la etapa de dSPE, donde se han reportado sorbentes como PSA solo o mezclado con *MgSO₄*[123, 127, 128, 132, 133], C18[123, 125, 133], PSA[133], SAX[131], Florisil (FL)[131], estireno divinilbenceno (EVN)[131], materiales agrícolas[124]. Después del tratamiento de muestra, el análisis se llevó a cabo utilizando, diferentes técnicas analíticas, principalmente UHPLC-MS/MS[123, 126-128], GC-MS[125, 126, 129, 131, 132, 134] y HPLC-DAD[122].

El objetivo de uno de los estudios ha sido la identificación de ácidos grasos de cadena corta (SCFA) en heces de ratones, como una evidencia de asociación entre enfermedades crónicas y el estatus de la flora intestinal. A las heces se agregó metanol como solvente de extracción en QuEChERS y después, los ácidos grasos fueron derivatizados con 2-picolilamina; con este método se obtuvieron recuperaciones arriba del 90%[127]. En otro trabajo, Feddern y col. determinaron ractopamina (RAC), un aditivo en la dieta porcina empleado para promover la síntesis de proteínas y la lipólisis de grasas, cuyo uso está prohibido en varios países. Las máximas concentraciones de RAC sugeridas por el Codex Alimenticio en riñón y en hígado porcinos corresponden a 90 y 40 µg/Kg, respectivamente. El análisis se llevó a cabo en muestras de riñón, hígado y pulmones; después de proteólisis, el fármaco fue liberado de sus conjugados con el uso de la enzima β-glucuronidasa y a continuación se aplicó QuEChERS utilizando, acetonitrilo, *MgSO₄* y *NaCl*, citrato de sodio tribásico dihidratado y citrato de sodio dibásico sesquihidratado. En la etapa de dSPE, se usó una mezcla de *MgSO₄*, PSA y C18; el extracto obtenido se analizó mediante LC-MS. Con este trabajo se pretendía evaluar el cumplimiento de las normas, como medida de control de calidad y la seguridad alimentaria de los productos cárnicos. Se concluyó que el método analítico propuesto era capaz de cuantificar los residuos de RAC en las 3 matrices pudiéndose observar el cumplimiento de los límites propuestos en el Codex Alimenticio[133]. Para la determinación de acrilamida, un compuesto clasificado como posible cancerígeno, Shahrabaki y col. utilizaron QuEChERS junto con el sistema UHPLC-MS/MS;

además se realizó la simulación Monte Carlo (MCS) con el fin de evaluar la probabilidad de exposición de niños y adultos a este compuesto relacionada con el consumo de alimentos. Para ello, se analizaron 27 muestras de producto Tah-dig (papa, arroz y pan). Se demostró que los tiempos largos de cocción y altas temperaturas influyen en la formación de acrilamida y se recomendó modificar los métodos de cocción. En este caso las recuperaciones oscilaron entre el 80%-106% y el RSD% entre 11.3 y 20% [128]. Surma y col. también determinaron acrilamida con esta técnica de extracción, pero debido a que el análisis se realizó por GC-MS se aplicó un paso de derivatización, el procedimiento se aplicó a muestras de café tostado e instantáneo y sucedáneos del café, encontrándose en todas las muestras acrilamida, pero relativamente mayores cantidades correspondieron a café tostado. En cuanto a QuEChERS, con el uso de hexano como solvente de extracción y de los sorbentes PSA y SAX en la etapa dSPE, se obtuvieron recuperaciones de 95% [131]. Hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) también pueden ser encontrados en alimentos como productos de procesos térmicos aplicados en su elaboración; Rociak y col. determinaron PAHs en diferentes tipos de alimentos, empleando QuEChERS como pretratamiento de muestra. Se evaluó el efecto de congelación de muestra previo y posterior al paso de limpieza dSPE, llegando a la conclusión de que la congelación previa al dSPE favorece la eliminación de lípidos en esta etapa, aunque con el riesgo de empeorar la recuperación de los analitos. Otra variable estudiada en este trabajo era la adición de sulfato de magnesio, el cual en el método original es utilizado en ambas etapas (extracción y limpieza del extracto). Los resultados mostraron que $MgSO_4$ agregado en la etapa de extracción afecta más a los rendimientos de recuperación que la etapa de limpieza, pero ambas adiciones son indispensables para asegurar aceptables niveles de recuperación los cuales se encontraron entre 50-110% y $RDS_r < 5.6\%$ $RDS_R < 7.7\%$ [129]. Petrarca y Godoy realizaron un experimento similar en determinación 12 PAHs, en alimentos procesados para bebés, pero ellos después de la extracción QuEChERS agregaron la microextracción líquido-líquido dispersiva en disolventes de baja densidad (LDS-DLLME) y de igual manera se recurrió a la congelación para la eliminación de grasas. La implementación de este procedimiento junto con el análisis de extractos obtenidos mediante GC-MS arrojó las recuperaciones del 72-112% con los valores $RDS \leq 11\%$ [132]. También preocupados por la salud de bebés, Vela-Soria y col. decidieron determinar algunos compuestos clasificados como disruptores endocrinos (EDC), específicamente parabenos (PB) y filtros ultravioleta (UVF); estos análisis se realizaron en 15 muestras de leche materna. Para establecer condiciones QuEChERS, se examinaron tres solventes (etanol, acetonitrilo y acetona) a diferentes volúmenes, utilizando el diseño experimental factorial 2^3 ; como resultado se seleccionó acetonitrilo. En cuanto a sales de partición, la cantidad de NaCl y $MgSO_4$ no tenía un efecto notorio por lo que se eligió la menor posible cantidad de estas sales. En la etapa dSPE, se eligió la mezcla de $MgSO_4$ y C18 lo que permitió eliminar lípidos. El procedimiento propuesto permitió realizar el análisis en corto tiempo, con bajos volúmenes de solventes y obteniéndose las recuperaciones en el intervalo de 87% a 112%, lo que permite recomendar este procedimiento para los estudios de biomonitorio [123]. Por su parte, Adenuga y col. han determinado la exposición de lactantes a ésteres de ftalato. Estos compuestos son contaminantes ubicuos, provenientes de plásticos donde se utilizan como plastificadores. A través de la técnica QuEChERS modificada se evaluó el uso de materiales agrícolas (semillas y cascaras de coco) como sorbentes en la etapa dSPE contra sorbentes clásicos (C18); la determinación de ftalatos en extractos obtenidos se llevó a cabo mediante GC-FID. Los resultados de este trabajo mostraron la factibilidad de estos sorbentes nuevos en el análisis de típicos ftalatos en leche materna [124]. El muestreo de leche materna es una alternativa no invasiva para el análisis de ciertos contaminantes como pesticidas o hepatoxinas en evaluación de la exposición de los bebés. Ferronato y col. desarrollaron y validaron un procedimiento analítico para la evaluación de exposición a niveles traza de compuestos organoclorados en 20 muestras de leche materna empleando un QuEChERS modificado seguido por un procedimiento analítico de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas con ionización química negativa reduciendo las interferencias en la etapa de análisis instrumental. En cuanto a las condiciones QuEChERS, se probaron dos diferentes solventes de extracción (n-hexano y acetonitrilo), seleccionando finalmente la mezcla de acetonitrilo con ácido fórmico lo que permitió

precipitar las proteínas y eliminar interferencias debidas a co-extracción de componentes de leche. Se eligió el sorbente C18 para el paso de limpieza dSPE. En este caso, el procedimiento también resulto ser rápido, confiable y económicamente viable, por lo que se consideró atractivo para el análisis de rutina [125]. Entre compuestos de riesgo para lactantes, la leche materna puede proveer diferentes antibióticos ingeridos por las madres con alimentos de origen animal. Karageorgou y col. presentaron un trabajo donde demuestran la efectividad de QuEChERS y HPLC-DAD al compararlo con ensayos de inhibición microbiana (MIA) para antibióticos del grupo β -lactámicos y cloranfenicol. En este sentido, se demostró una ventaja puesto que la sensibilidad de los kits MIA se veía altamente comprometida en aplicación a las muestras deterioradas, mientras que la técnica QuEChERS no se ve afectada por este factor [122].

Para evaluación de la exposición de humanos a pesticidas, algunos investigadores utilizaron muestras de cabello, ya que su recolección es sencilla, no es invasiva, puede llevarse a cabo fuera de laboratorio y no requiere un tipo especial de almacenamiento. Lehmann y col. determinaron 37 plaguicidas de múltiples clases en cabello, utilizando QuEChERS, GC-MS y UHPLC-MS. En este estudio se evaluaron tres sorbentes de limpieza (PSA, Z-Sep+, Z-Sep/C18), observándose mejores resultados para Z-Sep+ con el cual se consiguió la cuantificación de 28 pesticidas con alta sensibilidad, buena precisión y exactitud. Cabe resaltar que QuEChERS proporcionó efectiva extracción de plaguicidas multiclase en un solo procedimiento, lo que finalmente simplificó todo el tratamiento de muestra y acortó el tiempo de análisis [126].

El uso de biomarcadores puede ir más allá de la evaluación de exposición a ciertos químicos como lo demuestran Herrera-Herrera y col. realizando los análisis en materiales arqueológicos. Estos autores, aprovecharon la fuerte resistencia de los n-alcános a la degradación para buscar restos de materia orgánica en sitios de entierro. Se determinaron 29n alcános ($C_{12} - C_{40}$) y dos hidrocarburos acíclicos isoprenoides en cinco muestras de sedimentos arqueológicos obtenidos del sitio arqueológico Wollersdorf-Heidelberg (Austria). El pretratamiento fue mediante QuEChERS y el análisis mediante GC-MS. Debido a la complejidad de la muestra, se optimizaron los factores que afectan la eficiencia de extracción. Debido a poca cantidad de muestra disponible, se disminuyó la escala del procedimiento, se remplazó el acetónitrilo por una mezcla de diclorometano (DCM) con hexano, ya que estos proporcionan un mejor rendimiento de extracción. La adición de agua durante la extracción no favoreció la eficacia de esta etapa QuEChERS; el modo de agitación (manual vortex, ultrasonidos y agitadores orbitales rotatorio) tampoco tuvo efecto significativo, por lo que se optó por agitación manual. En cuanto a las sales de partición ($MgSO_4$ y $NaCl$), se evaluaron diferentes cantidades de ellas, seleccionando finalmente 4 g y 1 g, respectivamente. Aunque los resultados fueron similares sin y con aplicación de la etapa dSPE (PSA como sorbentes), se prefirió incluir la limpieza de extracto para evitar interferencias por compuestos lipídicos potencialmente presentes en la muestra. Gracias a este proyecto se detectaron ($C_{22} - C_{34}$) en cuatro muestras en un intervalo de concentraciones 5.8- 27.8 ng/g. La detección de estos alcános en las muestras sugiere la presencia de restos de plantas vasculares terrestres, aunque los autores enfatizan que se requieren estudios isotópicos para obtener pruebas contundentes[134].

4.1.6. Determinación de compuestos bioactivos.

La búsqueda de compuestos bioactivos en diferentes alimentos proporciona información acerca sus potenciales beneficios para la salud, asociados con el consumo de los mismos; se pueden mencionar aquí los compuestos con propiedades antioxidantes[135-137], antiinflamatorias[135], relajantes[135] antibacterianos, y antimicrobianos[137], o inclusive propiedades que pueden ser utilizadas en el ámbito cosmético como despigmentantes[138]. Tal vez los más estudiados han sido los compuestos fenólicos del origen de plantas y se han reportado diferentes aplicaciones de QuEChERS para su extracción. Rotta y col. determinaron compuestos fenólicos en extractos de fruta (*Passiflora spp.*) mediante UHPLC-MS/MS, ajustando para ello las condiciones QuEChERS. Se probaron diferentes

solventes y sales de partición y también sorbentes en la etapa dSPE (PSA, GCB, C18, Oasis®HLB), encontrándose que el método original con C18 proporcionó las mejores condiciones para extracción/limpieza en la cuantificación de quercetina, rutina y de los ácido 4- hidroxibenzóico, clorogénico, ferúlico, vanillico, cafeico, trans-cinammico y p-coumarico[135]. Utilizando una herramienta instrumental similar (UHPLC-MS/MS), Rodrigues y col. determinaron ácidos 4-hidroxibenzóico, cafeico, p-coumarico, ferúlico, ellagico, sinápico, vanillico y naringenina en chile rojo dulce (*Capsicum annuum L.*). En este trabajo también se optimizaron las condiciones QuEChERS; el procedimiento final consistió en la extracción con 1% ácido acético en acetonitrilo, adición de sulfato de magnesio y citrato de sodio para “salting-out” y limpieza de extracto utilizado mezcla de sorbentes C18 con GCB en presencia de sulfato de magnesio anhidro [136]. Cabe mencionar que el ajuste de pH en QuEChERS es muy importante para asegurar buena recuperación de compuestos fenólicos debido a la presencia de grupos hidroxilo y/o carboxílicos en sus estructuras [135]. En varios estudios se han evaluado modificaciones de QuEChERS original consistentes en adición de sales de citratos o acetatos en etapa de “salting-out”. Como ejemplo, Nicacio y col [137] y el grupo de Rodrigues[136] llegaron a la conclusión que el mejor método era el que aplicaba el tampón de acetatos, mientras que Rotta y col.[135] obtuvieron mejores resultados utilizando condiciones originales. Para el análisis de compuestos fenólicos en plantas y alimentos también se probaron modificaciones de la etapa dSPE utilizando diversos sorbentes y sus combinaciones, entre ellos PSA [135-137] solo combinado con $MgSO_4$ [137], C18 [135-137], GCB [135-137], HLB [135, 136], quitosano[136], tierra de diatomeas (DE)[137] y sorbente fluorado[136]. Para controlar y mejorar la confiabilidad de los resultados, algunos investigadores proponen el uso de método de adición estándar[135] y/o el uso de ensayos espectrofotométricos para verificar la eliminación de potenciales contaminantes en la etapa de dSPE [136, 137]. Las recuperaciones reportadas en estos trabajos se encuentran por encima del 70% en todos los casos. Finalmente, el análisis por UHPLC-MS/MS es el más empleado para compuestos fenólicos [135-137].

Kim y col. También utilizaron la técnica QuEChERS y LC-MS/MS para determinar arbutina en cáscaras de peras. Cabe mencionar que este es un glucósido conocido por sus diferentes propiedades beneficiosas, pero también por sus efectos tóxicos de sus altas concentraciones. Para QuEChERS, se propuso utilizar mezcla de agua con acetonitrilo en la etapa de extracción y para el efecto de “salting-out” se agregó solamente NaCl [138].

4.1.7. Análisis farmacológicos y clínicos.

La identificación y cuantificación de drogas en sangre son tareas importantes en las áreas de farmacología, toxicología clínica, análisis forense, en el control de drogas al volante, entre otras[139-141]. Por lo general, debido a la importancia y urgencia de contar con resultados fiables, se requieren procedimientos analíticos confiables, robustos, rápidos, relativamente simples y amigables al medio ambiente[140]. En base al carácter de la mayoría de los compuestos de interés, la herramienta que cumple con la mayoría de estos requisitos es la cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS)[139, 140]. En cuanto al pretratamiento de muestra, es el paso crítico puesto que los analitos se encuentran en concentraciones bajas, en una matriz química compleja constituida por proteínas, lipoproteínas, lípidos y sales[139]. Entre técnicas de pretratamiento, varios autores han sugerido la implementación de extracción en fase sólida (SPE)[142], extracción líquido-líquido (LLE)[140-142] y QuEChERS como una de sus más novedosas aplicaciones [139-141]. Con esta última técnica, Pouliopoulos y col. se enfocaron en la determinación de fármacos psiquiátricos (6 antipsicóticos, 8 antidepresivos y 1 hipnótico) en suero post mortem. Los autores propusieron realizar mini-QuEChERS, la cual requiere pequeños volúmenes de muestra y solventes- condiciones adecuadas para muestras forenses; además, evaluaron varios solventes de extracción entre ellos ciclohexano, acetato de butilo, 1-clorobutano, diclorometano y acetonitrilo, de los cuales el último proporcionó el mejor rendimiento de extracción. Así mismo, se probaron NaCl y K_2CO_3 como sales de partición, seleccionando carbonato que aseguró

condiciones básicas; en el protocolo final se utilizó una mezcla de K_2CO_3 y $MgSO_4$. Se compararon los resultados de mini-QuEChERS sin y con el paso de limpieza con PSA, obteniéndose mejores porcentajes de recuperación sin dSPE. El extracto obtenido fue sometido al análisis por UHPLC-MS/MS[140]. Kusano y col. analizaron muestras de sangre, para la determinación de drogas y algunos pesticidas, utilizando dos diferentes condiciones de QuEChERS; en ambos se utilizó acetonitrilo, pero para la determinación de fentolaminas se adicionó ácido acético al 0.2%. En el paso de limpieza dSPE, en ambos procedimientos se utilizó $MgSO_4$ y C18, pero para el análisis de fentolaminas era necesario agregar una mezcla de HCl y metanol (5 % p/v); después de agitación, los sobrenadantes se evaporaron a sequedad y fueron reconstituídos en acetato de etilo para su introducción al sistema GC-MS/MS en modo MRM. Para las fenetilaminas, se efectuó una derivatización mediante trifluoroacetilación (TFA) en columna. Cabe señalar que el procedimiento propuesto permitió separar y cuantificar isómeros estructurales. Como parte adicional en este trabajo los resultados validados se emplearon en el desarrollo de un software toxicológico cuantitativo "Quick-DB Forensic", el cual fue probado con muestras reales demostrando ser rápido y fácil de usar. Como la principal ventaja del software, los autores mencionan que no es necesario realizar la calibración de cada día [142].

En otro estudio, realizado por Dulaurent y col., se utilizó QuEChERS para la determinación de 35 drogas de abuso, así como sus respectivos metabolitos en 253 sospechosos de consumir y conducir bajo los efectos de estos químicos. El análisis se llevó a cabo en sangre total, mediante LC-MS/MS (6 min). Se encontró que la cantidad de sales de partición no es un parámetro crítico, siempre y cuando se agregan entre 10 y 70 mg [140]. Dybowski y Dawidowicz también eligieron QuEChERS para analizar muestras sanguíneas de 30 personas con sospecha por conducir bajo los efectos de las drogas (DUID). En este caso, se determinó tetrahidrocannabinol (THC) y dos de sus metabolitos. La herramienta instrumental era GC-MS/MS para lo cual se agregaron a las muestras estándares internos deuterados. Como resultado de este análisis se pudo determinar el tiempo aproximado desde que se consumió la droga, además este método se caracterizó por una buena linealidad, bajos límites de detección y precisiones inter-e intradías satisfactorias[141].

4.1.8. Conclusiones:

En base a la revisión bibliográfica realizada, se observa la creciente popularidad de la técnica QuEChERS debido a su versatilidad, eficacia, sencillez y carácter amigable al medio ambiente. Aunque la técnica originalmente se desarrolló para la determinación de pesticidas en frutas y vegetales, a lo largo de las últimas décadas se han realizado varias modificaciones y adecuaciones ampliando el espectro de compuestos y de matrices químicas, entre las cuales se incluyen diferentes tipos de alimentos. Cabe señalar que la selección de las condiciones QuEChERS siempre es dictada por polaridad de los analitos y su concentración, por la composición química de muestra y también depende de la técnica instrumental elegida para el análisis. Aunque no es posible establecer parámetros QuEChERS universales, en varios estudios se logró la extracción efectiva de un gran número de compuestos tales como pesticidas, micotoxinas, fármacos, drogas y sus metabolitos, compuestos fenólicos, entre otros.

Entre las modificaciones/adecuaciones de QuEChERS se deben mencionar las siguientes:

- Reducción de la escala del procedimiento, especialmente para muestras disponibles en pequeñas cantidades, para largas series de muestras y buscando cumplir con postulados de química verde;
- Control de pH como un paso vital para lograr extracciones con altos rendimientos y evitar la degradación de la molécula objetivo durante el procesamiento;
- Adición de agua para mejorar extracción/partición de los analitos a partir de muestras de baja humedad y/o alto contenido de lípidos (la técnica original se propuso para el análisis de muestra con relativamente alto contenido de agua);

- Selección del tipo y cantidad de solvente(s), buscando el mayor posible rendimiento de extracción de los analitos;
- Uso o eliminación del paso de limpieza mediante dSPE;
- Selección de un sorbente (o mezcla de varios) y de la sal para la etapa de limpieza;
- Congelación de extracto crudo antes de etapa dSPE para más eficiente eliminación de lípidos;
- Selección de modo y tiempo de agitación en etapa de extracción y de limpieza.

Cabe señalar que, en muchos estudios, las condiciones QuEChERS fueron optimizadas basándose en el uso de diseños experimentales, lo que permitió obtener resultados estadísticamente fiables con menor gasto de muestras, reactivos y solventes.

Las modificaciones realizadas al método original se presentan mediante un diagrama en la Figura 9. Aunque en el esquema no se incluyen ni el tipo de analitos ni de muestras, estos datos siempre son clave para seleccionar las condiciones para una aplicación dada.

Finalmente, en el contexto de trabajo de tesis cabe mencionar que en los últimos cuatro años no han encontrado aplicaciones de QuEChERS para extracción de compuestos indólicos a partir de vegetales, lo que asegura la contribución original del proyecto.

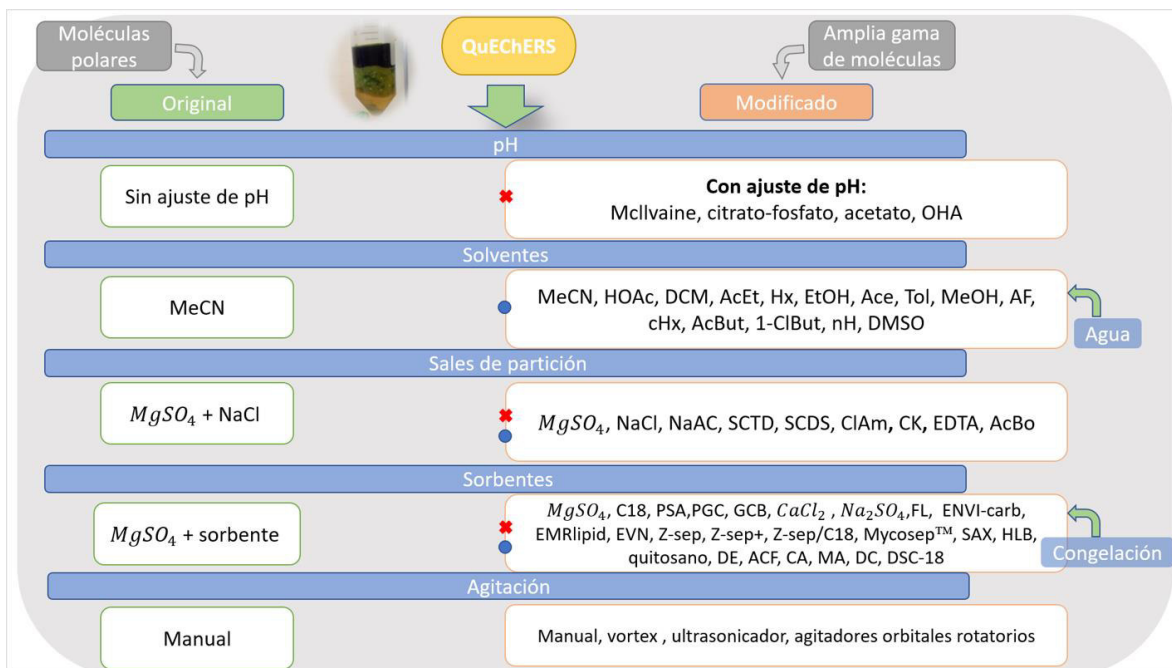


Figura 9. Comparación de QuEChERS original con sus modificaciones propuestas posteriormente

Se marcaron con una "x" roja los pasos que en algunos estudios fueron eliminados, con círculos azules se marcaron los pasos en los cuales se utilizó un solo reactivo o una combinación de varios. Con flechas verdes se marca la posibilidad de agregar el agua para mejorar rendimiento de extracción o de congelar los extractos para más eficiente eliminación de lípidos.

Solventes y sales: tampón Mcllvaine – tampón citrato-fosfato- tampón acetato- OHA- hidróxido de amonio; MeCN – acetonitrilo; HOAc - ácido acético; DCM - diclorometano, AcEt - acetato de etilo; Hx – hexano; EtOH- etanol; Ace – acetona; Tol – tolueno; MeOH -metanol; AF – ácido fórmico; cHx – ciclohexano; AcBut – acetato de butilo; 1-ClBut- 1cloro butano nH - n-heptano; DMSO -dimetil sulfóxido; NaAc - acetato de sodio; SCTD - citrato de trisodio dihidratado ($Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$); SCDS

- citrato de hidrogeno disodico sesquihidratado ($Na_2HC_6H_5O_7 \cdot 1.5H_2O$); ClAm- cloruro de amonio; CK- carbonato de potasio; AcBo- ácido bórico; EDTA - ácido etilendiaminotetraacético;

Fases estacionarias utilizadas en SPE en cartuchos y/o en SPE dispersiva: C18 – fase estacionaria de sílice unida con octadecilo; PSA - amina primaria/secundaria; PGC - carbón poroso grafitizado; GCB- carbón negro grafitizado; FL – florisil; ENVI-carb™ - carbono grafitizado no-poroso; EMR-lipid – cartuchos de Agilent para eliminación de lípidos; EVN - estireno divinilbenceno; Z-sep, Z-sep+, Z-sep/C18 – sorbentes comerciales Supelco para SPE dispersivo en base a zirconia o zirconia y C18, enlazados a partículas de sílice; Mycosep™ - columnas para limpieza de muestras en el análisis de micotoxinas; SAX – strong anion exchange; HLB - copolímero de divinilbenceno y vinil pirrolidinona (hidrófilo lipófilo equilibrado); DE - tierra de diatomeas; ACF - fibras de carbón activado; CA – carbón activado; MA- materiales agrícolas. DC-dodecano; DSC-18 – sorbente de sílice C18 trifuncional unido poliméricamente.

4.2. Puesta a punto de las condiciones HPLC- FLD/DAD para análisis de compuestos indólicos seleccionados.

Soluciones de estándares de nueve compuestos

En primer lugar, se procedió con la selección de un estándar interno, buscando un compuesto con estructura similar a los indoles, estable y ausente en las muestras. Bajo estos criterios, se optó por el ácido orto anísico (EI-AOA), el cual presenta estructura cíclica y conjugada, similar que los compuestos indólicos, AOA es un compuesto fluorescente y puede ser detectado bajo las mismas condiciones que resulten adecuadas para otros compuestos de interés. Aunado a ello, se puede esperar muy similar comportamiento del AOA y de los analitos en el procedimiento QuEChERS, permitiendo mejorar la precisión y exactitud de los resultados a pesar de no ser un riguroso protocolo analítico. El estándar interno se agregaba directamente a la muestra y a todas las soluciones de calibración en la misma cantidad, asegurando su concentración en las soluciones introducidas a la columna de 1.069 µg/mL.

Para definir las condiciones adecuadas de separación, se partió de procedimientos reportados en la bibliografía [143-146]. Con base en estos trabajos, se realizaron experimentos sistemáticos donde se probaron diferentes columnas de fase inversa, se variaron la composición de fases móviles y el programa de gradiente. En primer lugar, se evaluaron dos diferentes columnas: ODS Hypersil 125 x 4.6 mm, 3 µm y Kinetex 2.6 µm C18 150 x 3 mm, 3 µm; ambas permitieron la separación de ocho compuestos de interés (ICA, I3CHO, IAA, I3A, IPA, IAN, IBA, I3C) y del estándar interno (AOA-EI). La más corta, con partículas de diámetro 3 µm y de mayor diámetro interno, columna ODS Hypersil, proporcionó mejor forma de las señales cromatográficas y más corto tiempo de separación por lo que esta se utilizó para todos los estudios posteriores. Las fases móviles consideradas inicialmente eran el agua y acetonitrilo variando las proporciones de ambos, ya que estos dos solventes eran los más utilizados en la bibliografía para algunos compuestos indólicos [144-146]. Posteriormente, se decidió acidificar la fase móvil agregando el ácido fórmico (0.1%) en proporción de 10% durante toda la corrida. También se agregó metanol como un segundo modificador orgánico y se variaron proporciones entre fases durante la elución de compuestos, buscando una mejor posible resolución y el corto tiempo de cromatograma. Las condiciones finales se resumen en la Tabla 5. Estas condiciones permitieron la separación de los nueve compuestos en 20 min tal como se observa en la Figura 10.

Del mismo modo que para las condiciones de separación se comenzó a establecer las condiciones de detección. En el caso de detección espectrofotometría con detector de arreglo de diodos (DAD), como en la mayoría de los estudios previos [146, 147], se optó por la longitud de onda de 280 nm y también se probó la longitud de 260 nm, ambas con referencia en 400 nm; el detector DAD fue empleado para estudiar condiciones de separación y era también necesario para la detección de los compuestos que presentan baja fluorescencia (ICA, I3CHO, I3A, I3C, además de AOA-EI). De acuerdo con el objetivo del proyecto, se buscaron las más adecuadas condiciones de detección

fluorimétrica (FLD); cabe mencionar que en la revisión bibliográfica se encontraron diferentes longitudes de onda tanto de excitación como de fluorescencia, dependiendo del (de los) compuesto(s) estudiados; estos valores iban en un rango de 220-335 nm para excitación y 350-538 nm para la emisión [44, 144, 148-154]. Como resultado de experimentos sistemáticos realizados con los estándares de nueve compuestos, se eligió la longitud de onda de 280 nm para la excitación y se evaluaron dos longitudes diferentes para la emisión, 320 y 360 nm. En la revisión de espectro de absorción y de fluorescencia, se observaron pequeñas variaciones en la posición del máximo de las bandas correspondientes, teniendo en cuenta estas diferencias, se eligió 280 nm para la excitación y 360 nm para la emisión para la detección FLD, mientras que para DAD se optó 280 nm como la longitud de onda analítica y 400 nm como la de referencia. Cabe resaltar que el criterio de selección era lograr la más alta posible relación señal/ ruido (S/R) para un mayor posible número de analitos.

Tabla 5. Parámetros utilizados para el análisis cromatográfico de ocho compuestos indólicos y AOA-EI, mediante HPLC-DAD/FLD.					
Columna	ODS Hypersil 125 x4.6 mm, 3 µm. Thermo Hypersil-Keystone				
Temperatura	40 °C				
Velocidad de flujo	1 mL/ min				
Gradiente de elución	Tiempo, min	MeCN	AF (0.1%)	MeOH	H ₂ O
	0-8	20	10	0	30
	10	30	10	25	65
	15	60	10	25	95
	18	60	10	25	95
	20	20	10	0	30
DAD	280 nm; Ref 400 nm (I3CHO, AOA-EI)				
FLD	λEx:280; λEm:360 (ICA, IAA, I3A, IPA, IAN, IBA, I3C, AOA-EI)				

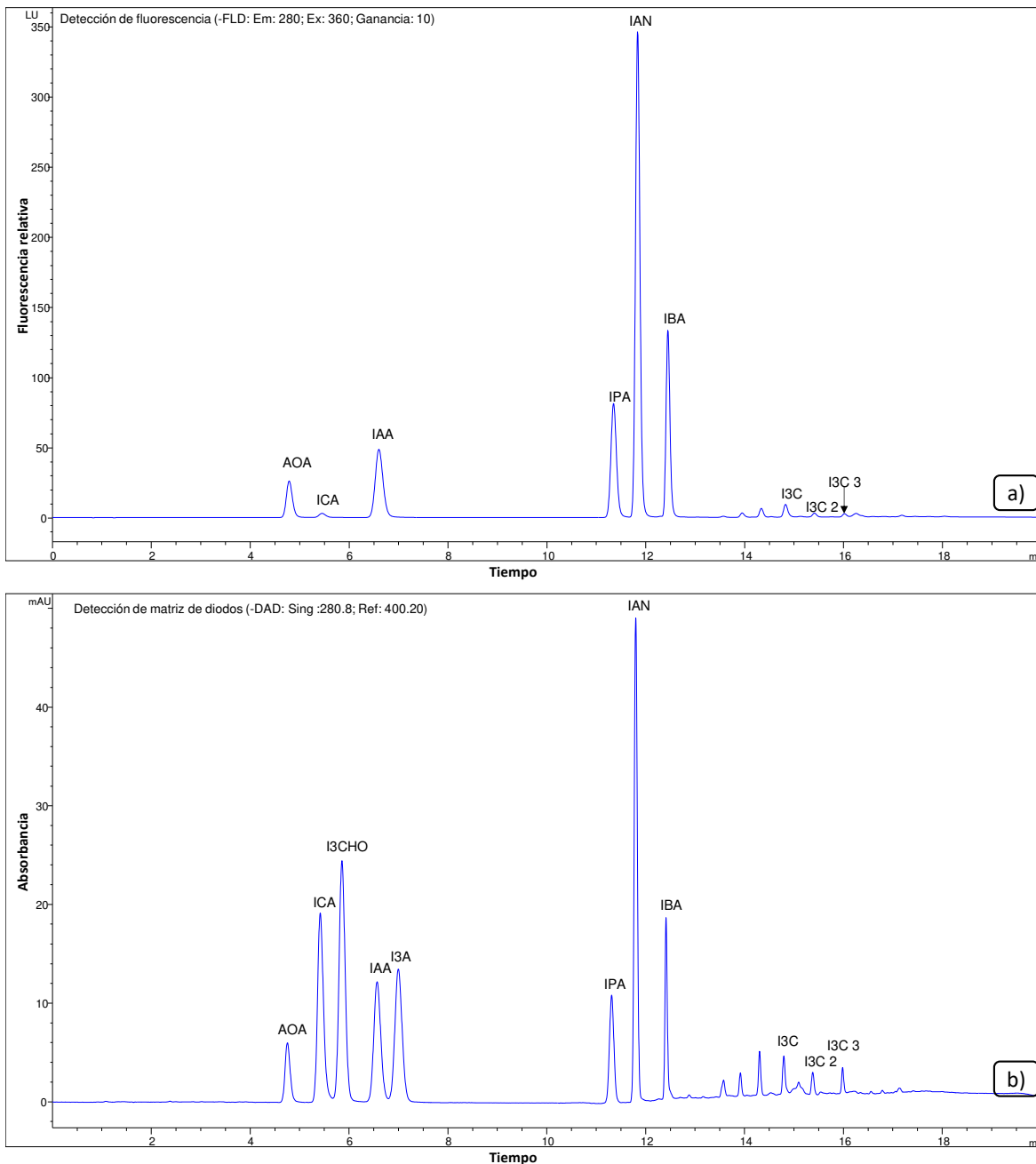


Figura 10. Típico cromatograma de la mezcla de estándares de compuestos indólicos: a)- detección fluorimétrica para la cuantificación de ICA, IAA, IPA, IAN, IBA, I3C; b)- detección DAD- para la cuantificación de I3CHO; todos los estándares se encontraban a una concentración de 20 µg/mL.

Es de notar que los resultados obtenidos confirman que AOA puede ser utilizado como estándar interno, debido a su resolución cromatográfica y detección en las mismas condiciones DAD y FLD que los analitos de interés en este trabajo.

Utilizando las condiciones seleccionadas, se obtuvo la separación de todos los compuestos, con los siguientes tiempos de retención: AOA 4.94 ± 0.01 min, ICA 5.66 ± 0.01 min, I3CHO 6.09 ± 0.03 min,

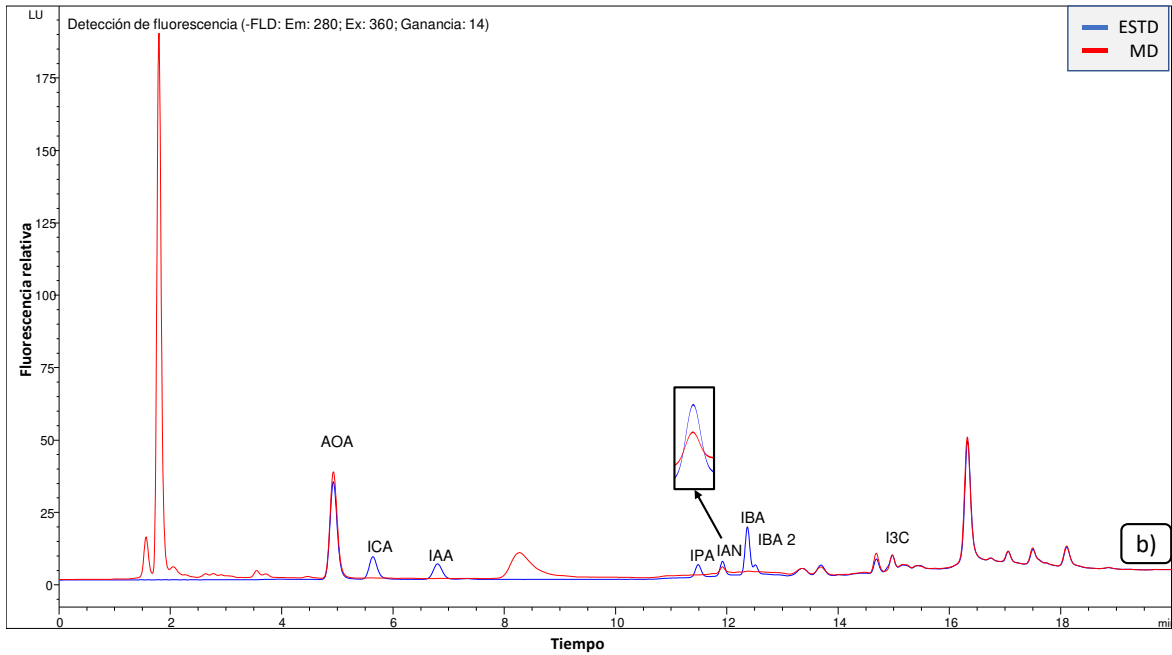
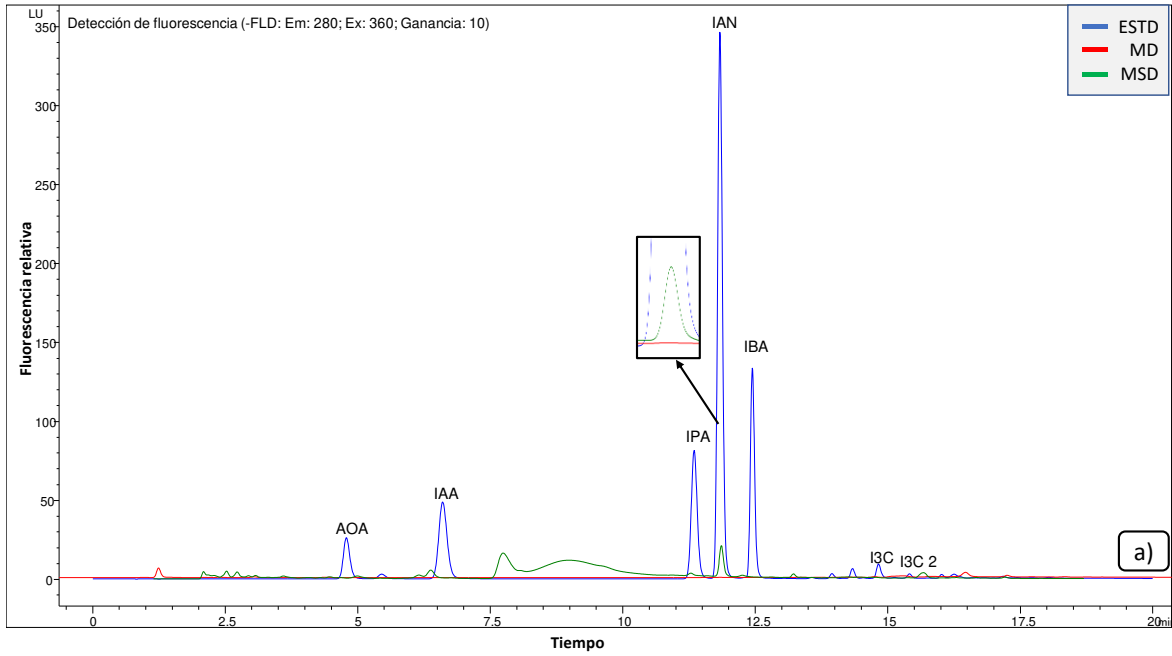
IAA 6.83 ± 0.01 min, I3A 7.31 ± 0.01 min, IPA 11.50 ± 0.01 min, IAN 11.93 ± 0.01 min; IBA 12.37 ± 0.01 min, IBA 2 12.52 ± 0.01 min, I3C 14.90 ± 0.01 min, I3C 2 15.47 ± 0.01 min, I3C 3 16.06 ± 0.01 min, (dando un tiempo total de corrida cromatográfica de 20 min). Cabe señalar que IBA se eluyó en forma de dos picos y el I3C se eluyó en forma de tres picos, reportando para cada uno de ellos el tiempo de retención de la señal más intensa.

Extracto de rábano

La composición química del extracto de cualquier muestra real difiere de la solución preparada a partir de estándares auténticos de los analitos y la matriz de muestra puede afectar tanto el proceso de separación cromatográfica como de detección. Es por ello por lo que, la siguiente etapa de trabajo era realizar experimentos con extracto de una muestra real, obtenido mediante el procedimiento QuEChERS original, sin extracción en fase sólida. Se trabajó con el extracto de rábano y los objetivos eran: (i) evaluar la factibilidad de las condiciones seleccionadas para el análisis de compuestos seleccionados en muestras reales; (ii) ajustar adecuadamente la dilución del extracto y (iii) ajustar la ganancia del detector fluorimétrico.

Se inició con la dilución del extracto 1:2 y la ganancia 10 del detector FLD, obteniéndose un cromatograma marcado en verde en la Figura 11a. Como se puede observar, en estas condiciones se presentan fuertes interferencias de matriz con una ancha señal detectada entre 7.5 y 10 min de la corrida cromatográfica, que no correspondió a la elución de ninguno de los estándares (cromatograma azul en Fig. 11a). Por otro lado, en este mismo cromatograma se aprecia la presencia de indol-3 acetonitrilo (IAN) con detección FLD (Fig. 11a) y del indol-3- carboxaldehído (I3CHO) con detección por DAD (Fig. 11c). Variando la dilución del extracto, se logró una línea base baja sin señales de fluorescencia fuera de los tiempos de retención de los analitos (cromatograma rojo en la Figura 11a); sin embargo, no se detectaron los compuestos de interés ni tampoco la señal del EI. Se decidió aumentar la sensibilidad de detección mediante el aumento de ganancia del detector FLD. En la Figura 11b, se muestra el cromatograma obtenido para el mismo extracto de rábano diluido, sobrepuesto con el cromatograma de estándares utilizando ganancia 14 del detector FLD. Se observa claramente la señal del EI y de algunos compuestos indólicos en la muestra con tiempos de retención acordes a los obtenidos en ausencia de matriz química. En base a estos resultados, en todos los experimentos posteriores, se utilizó ganancia del detector FLD 14 y la dilución de extractos 1:20. También cabe señalar que la detección DAD era menos susceptible a la presencia de matriz.

4.3. Proceso de calibración directa



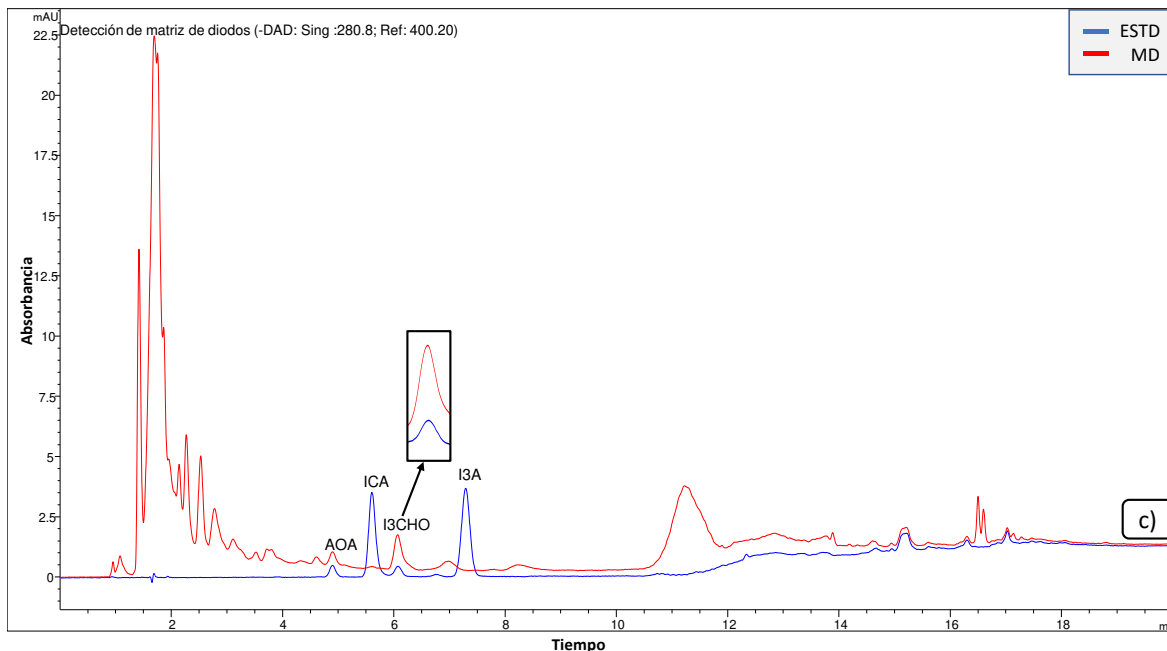


Figura 11. Cromatogramas sobrepuestos de la mezcla de estándares (en azul) y cromatogramas de extracto de rábano utilizando el procedimiento QuEChERS original (en rojo):

- a) Detección Fluorimetrica, ganancia 10: sin dilución (azul), con dilucion 1:20 (rojo)
- b) Detección fluorimetrica, ganancia 14: con dilución 1:20 (rojo)
- c) Detección espectrofotométrica, 280 nm, con dilución 1:20 (rojo).

Las letras en la parte superior derecha ESTD corresponden a la mezcla de estandares, MD a la muestra diluida y MSD a la muestra sin dilución.

Una vez establecidos los parámetros antes discutidos, se procedió a realizar el proceso de calibración directa, utilizando una serie de soluciones mixtas de estándares en los intervalos de concentración que se muestran en la Tabla 6. Cabe hacer notar que los intervalos de calibración no eran idénticos para todos los compuestos ya que el intento era obtener similares intensidades de las señales FLD para todos los compuestos en cada uno de los puntos de calibración. El protocolo detallado de preparación de soluciones estándar se presenta en forma de un esquema, como ANEXO 1, las soluciones de calibración se introdujeron directamente al sistema HPLC-FLD/DAD, sin realizar el proceso QuEChERS. Las curvas de calibración se construyeron realizando un análisis de regresión lineal, tomando como la señal analítica la relación entre la altura del pico del analito y del estándar interno (EI-AOA), frente a la relación de la concentración del analito con dicho estándar interno. Se utilizaron valores promedio de las señales adquiridos en tres replicas.

Tabla 6. Concentraciones de las soluciones de calibración					
Analito	Conc µg/mL. P1 (—)	Conc µg/mL. P2 (—)	Conc µg/mL. P3 (—)	Conc µg/mL. P4 (—)	Conc µg/mL. P5 (—)
EI-AOA	1.069	1.069	1.069	1.069	1.069
ICA	0.346	0.692	2.076	3.460	4.845
I3CHO	0.301	0.602	1.807	3.011	4.216
IAA	0.020	0.040	0.121	0.202	0.283

I3A	0.712	1.424	4.272	7.119	9.967
IPA	0.018	0.036	0.107	0.178	0.249
IAN	0.032	0.064	0.193	0.322	0.451
IBA	0.015	0.030	0.089	0.148	0.207
I3C	0.310	0.619	1.858	3.097	4.335

En la Figura 12 se muestran los cromatogramas de las soluciones de calibración y en la Figura 13 se presentan las curvas de calibración obtenidas para cada analito las cuales se calcularon a partir de las señales (alturas) obtenidas por el detector de fluorescencia (FLD) para todos los casos excepto para los analitos indol-3-carboxaldehído (I3CHO) para el cual se tomó en cuenta las señales obtenidas por el detector espectrofotométrico (DAD), ya que su respuesta a estas concentraciones no es muy buena mediante fluorescencia comparada con la que se observa en DAD.

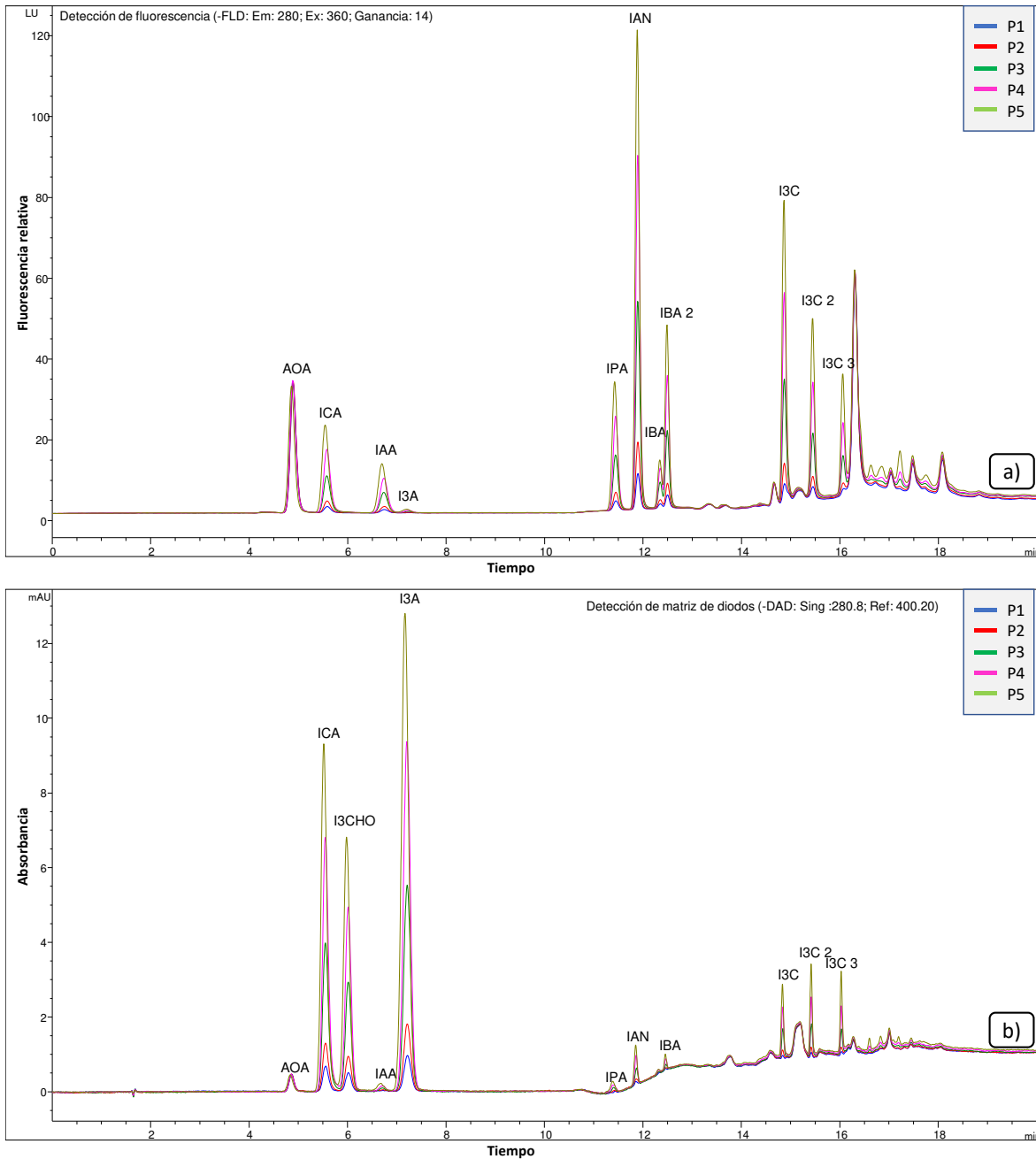
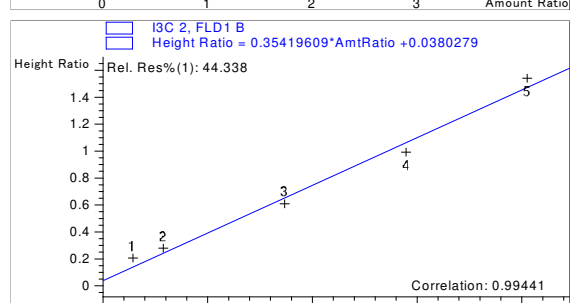
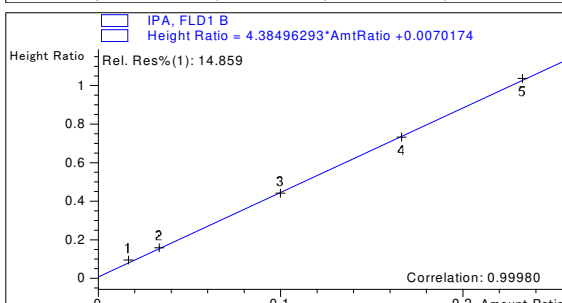
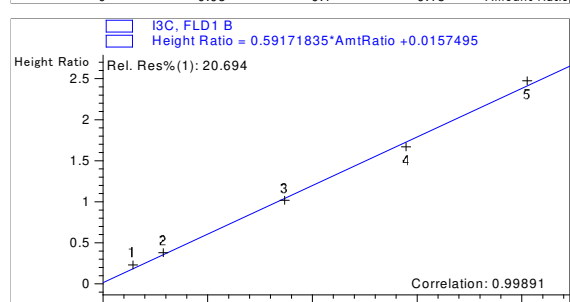
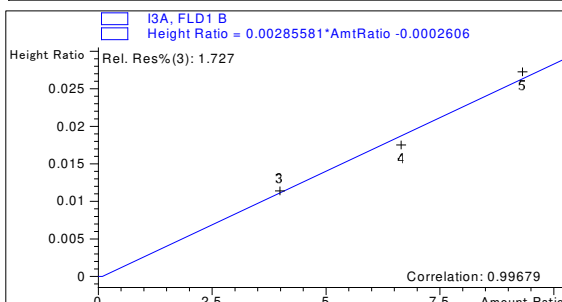
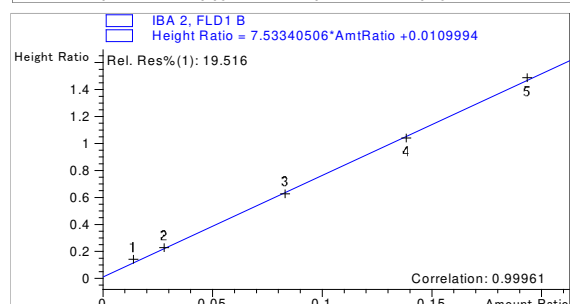
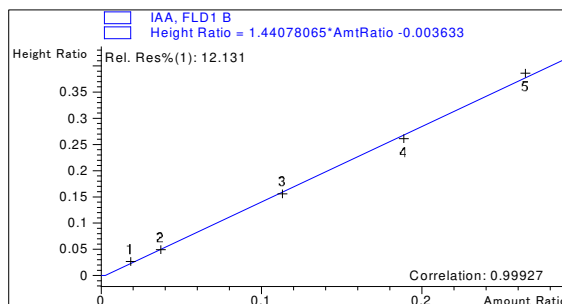
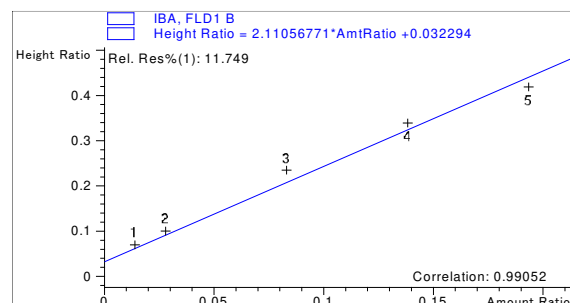
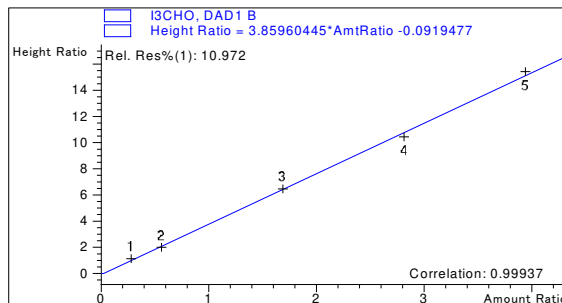
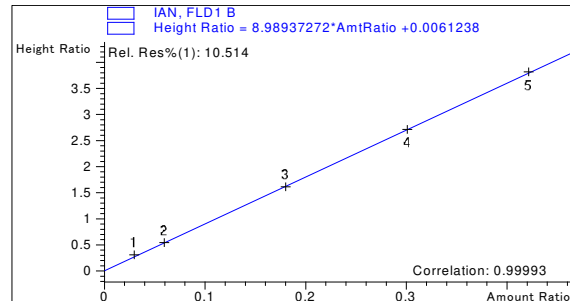
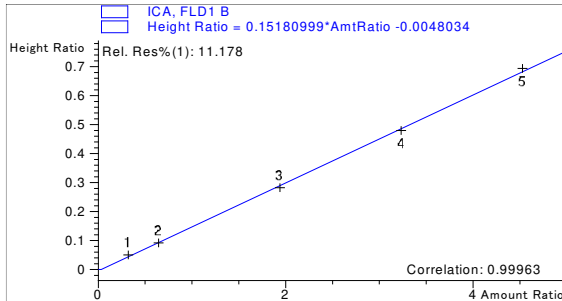


Figura 12. Cromatogramas de las soluciones de calibración (a)- detección fluorimétrica para la cuantificación de ICA, IAA, I3A, IPA, IAN, IBA, I3C; b)- detección UV para la cuantificación de I3CHO; las letras P1-P5 corresponden a las soluciones de calibración a las concentraciones que se muestran en la Tabla 6).



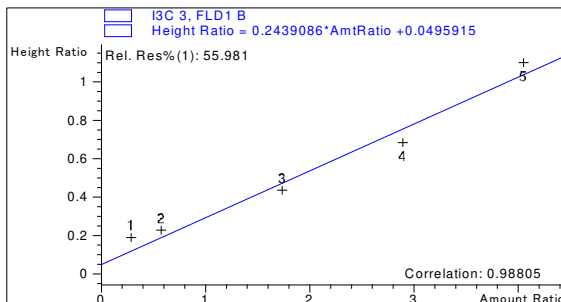


Figura 13. Curvas de calibración de compuestos indólicos para la cuantificación de ICA, IAA, I3A, IPA, IAN, IBA, I3C, mediante la detección FLD y DAD para la cuantificación de I3CHO.

Calibración integrando el proceso QuEChERS

Las curvas de calibración directas sirvieron para verificar los intervalos de concentraciones y la linealidad de funciones de regresión lineal construidas a partir de la relación entre las alturas de señales del analito y del EI-AOA, frente a la relación de la concentración del analito con dicho estándar interno. Una vez demostrada la linealidad en el intervalo de concentraciones utilizadas, se procedió a realizar las curvas de calibración integrando el proceso QuEChERS original. En base a varios estudios previos, en la primera etapa del procedimiento, en lugar de puro acetonitrilo, se utilizó este solvente con 1% de ácido acético [37, 111]. De ahí, las soluciones mixtas de los estándares, correspondientes a cada uno de los puntos de calibración se prepararon en 10 mL de acetonitrilo conteniendo 1% de ácido acético (9.9 mL MeCN y 0.1 mL HAC 99.7%). De manera similar como se hizo en la calibración directa, los puntos de calibración se prepararon partiendo de una solución mixta de estándares. Para observar el protocolo de preparación de soluciones, en la Tabla 7 a manera de ejemplo se presentan los datos para IAA.

Tabla 7. Protocolo de preparación de soluciones de calibración para el proceso QuEChERS. En la primera columna se presenta la concentración de IAA en la solución mixta de ocho estándares, en la segunda columna se anota el volumen de esta solución y en la tercera la concentración de IAA en la solución final preparada para QuEChERS. En la última columna, se presentan las concentraciones en las soluciones después de QuEChERS.

Conc. inicial	Volumen de mezcla de estándares	Conc. Final en 10 mL	Volumen de MeCN	Volumen de Hac (99.7%)	EI (267 µg/mL)	Volumen total (mix STD+ MeCN+ Hac)	Punto	Conc. después del proceso QuEChERS
0 µg/mL	0 µL	0 µg/mL	9.9 mL	0.1 mL	200 µL	10 mL	0	0 µg/mL
36.4 µg/mL	0.2 mL	0.728 µg/mL	9.7 mL	0.1 mL	200 µL	10 mL	1	0.146 µg/mL
36.4 µg/mL	0.4 mL	1.46 µg/mL	9.5 mL	0.1 mL	200 µL	10 mL	2	0.291 µg/mL
36.4 µg/mL	0.6 mL	2.18 µg/mL	9.3 mL	0.1 mL	200 µL	10 mL	3	0.437 µg/mL
36.4 µg/mL	0.8 mL	2.91 µg/mL	9.1 mL	0.1 mL	200 µL	10 mL	4	0.583 µg/mL
36.4 µg/mL	1 mL	3.64 µg/mL	8.9 mL	0.1 mL	200 µL	10 mL	5	0.728 µg/mL

A las soluciones obtenidas (10 mL), se agregaron las sales de particion (4 g $MgSO_4$ y 1 g NaCl) y las mezclas se agitaron. Después de centrifugar a 5000 rpm por 10 min, se tomaron alícuotas de 2 mL del sobrenadante y cada uno se colocó en un tubo eppendorf para evaporación en el Speed vac (45°C por 75 min) hasta un volumen final de aproximadamente 100 μ L. Las muestras se aforaron a 500 μ L con ácido fórmico 0.1% (70:20:10). Posteriormente se centrifugaron a 10000 g por 10 min. Los sobrenadantes se diluyeron tomando 100 μ L y completando el volumen a 2000 μ L con fase móvil ($H_2O:MECN:AF$ al 0.1% 70:20:10). Finalmente, la muestra se introdujo al sistema HPLC (concentración de estándares se calcularon de igual manera como se muestra para IAA en la última columna de la Tabla 7).

Puesto que el EI se agregaba directamente a la muestra y a las soluciones estándar antes de la etapa de extracción, con la normalización de las señales por la señal del EI se esperaba al menos reducir los errores cometidos durante el procedimiento QuEChERS y en el análisis cromatográfico. Los cromatogramas obtenidos en el proceso de calibración con QuEChERS se muestran en la Figura 14. En la Figura 15 se muestran las curvas de calibración obtenidas en base a los valores promedio de cada señal (tres replicas), donde se puede observar una buena linealidad de las funciones de calibración con $R^2 > 0.98$.

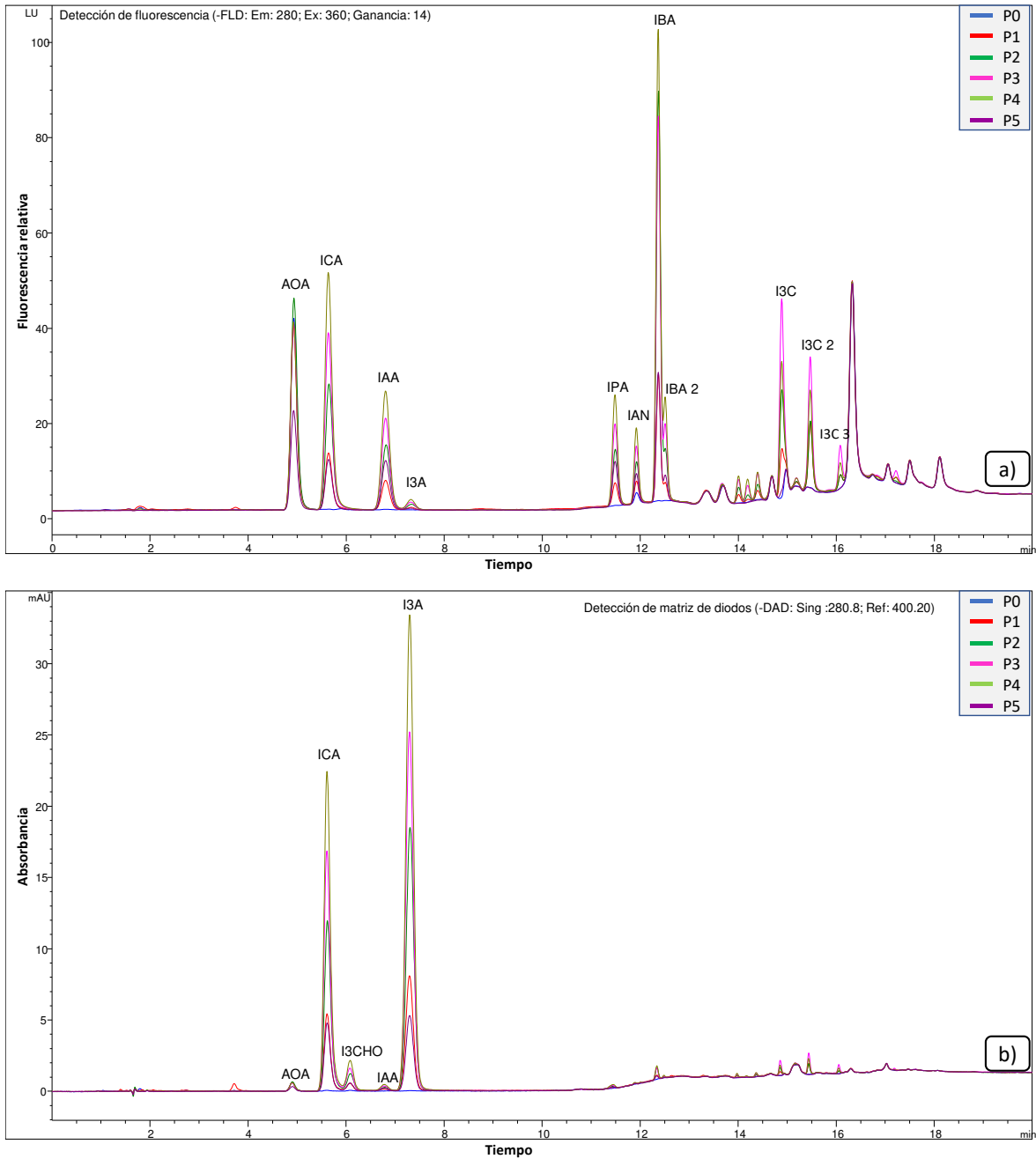
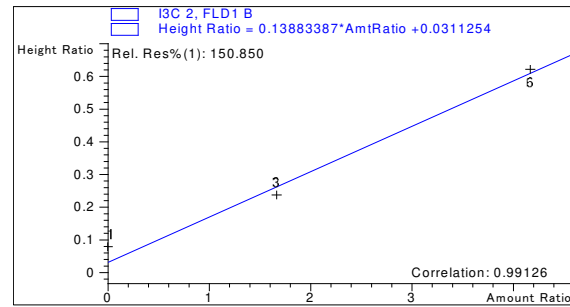
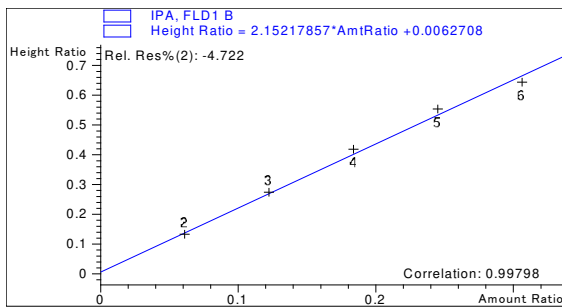
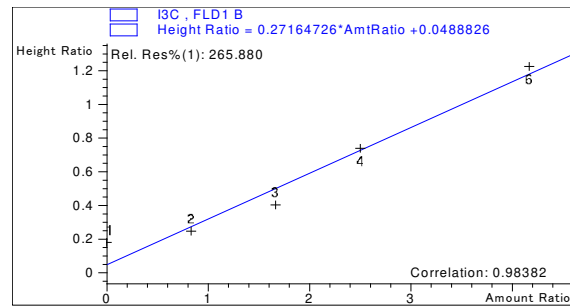
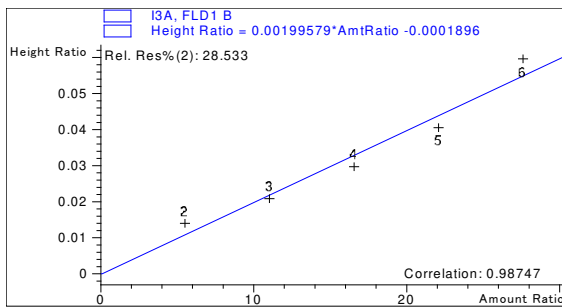
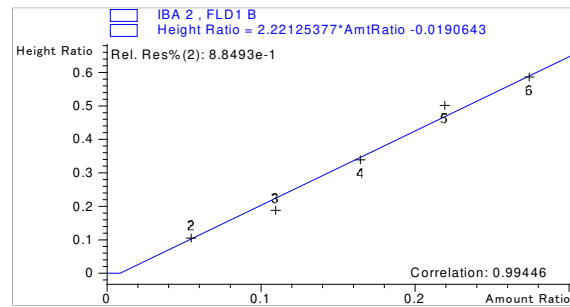
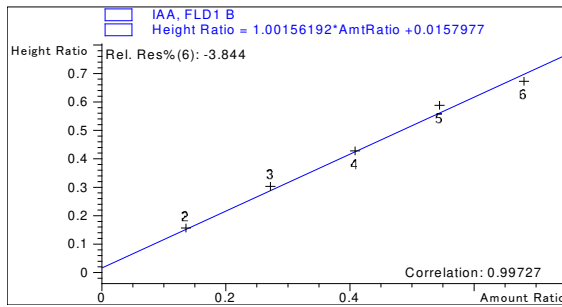
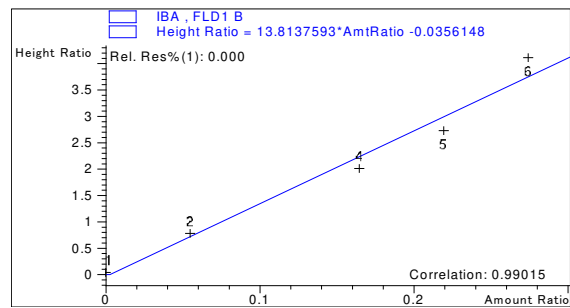
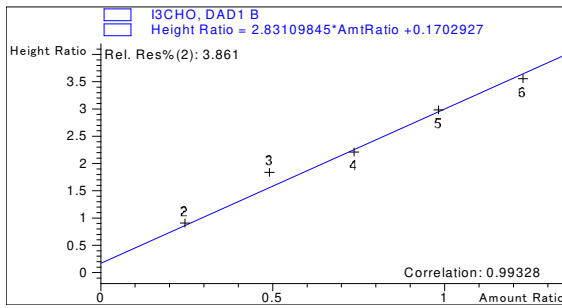
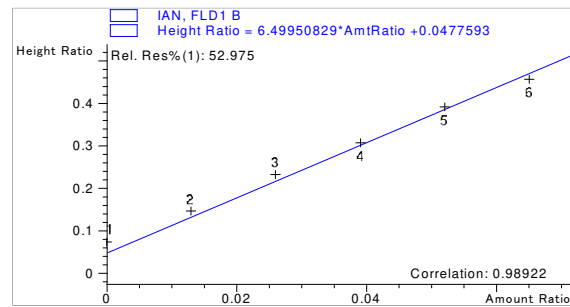
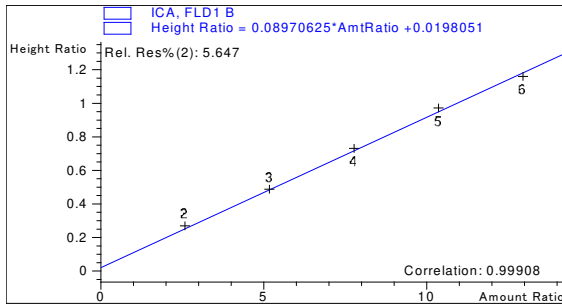


Figura 14. Cromatogramas de soluciones de calibración obtenidos mediante el proceso de extracción QuEChERS (a)- detección fluorimétrica para la cuantificación de ICA, IAA, I3A, IPA, IAN, IBA, I3C; b)- detección UV para la cuantificación de I3CHO; las letras P0 y P1-P5 corresponden al blanco y a las soluciones de calibración a diferentes concentraciones).



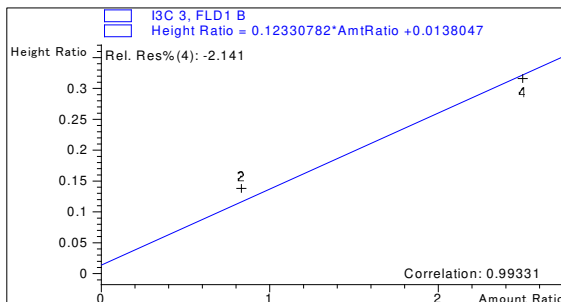


Figura 15. curvas de calibración de compuestos indólicos obtenidas mediante el método de extracción QuEChERS, para la cuantificación por detección fluorimétrica ICA, IAA, I3A, IPA, IAN, IBA, I3C y la cuantificación de I3CHO por detección UV.

4.4. Parámetros analíticos

Utilizando los datos obtenidos en el proceso de calibración con QuEChERS integrado, se calcularon las funciones de regresión lineal, mismas cuyas pendientes e interceptos se presentan en la Tabla 8. Además, en esta tabla también se presentan los errores estándar de la pendiente e intercepto, los cuales demuestran la poca variación entre cada inyección. En cuanto a la linealidad, para ICA, I3CHO, IAA, IPA e IBA2, se obtuvieron valores $R^2 > 0.99$, mientras que para el resto de los compuestos la linealidad era un poco peor $R^2 \geq 0.98$. También en esta tabla se encuentran los límites de detección (LD) y límites de cuantificación (LQ) para cada analito, obtenidos a partir de un blanco procesado con el método QuEChERS, estos fueron calculados en base a la relación señal / ruido; adoptando los criterios de tres y diez desviaciones estándar, respectivamente, y calculados a partir del promedio de la señal del blanco más tres o diez veces la desviación estándar de la respuesta y la pendiente del grafico de calibración. Para todos los compuestos de interés, los valores LQ mostraron factibilidad de su determinación cuando la solución introducida a la columna contenía las concentraciones del orden de sub- partes por billón.

Tabla 8. Parámetros analíticos evaluados en base al proceso de calibración integrado QuEChERS (LD-límite de detección, LC- límite de cuantificación).

Analito	TR±DE (min)	Función de calibración			Error estándar		LD, ng /mL (*µg/mL)	LQ, ng /mL (*µg/mL)
		Pendiente	Intercepto	R^2	pendiente	Intercepto		
ICA	5.66±0.01	8.97E-2	1.98E-02	0.9991	5.48E-3	4.72E-2	70	232
I3CHO	6.09±0.03	2.83	1.70E-1	0.9933	2.36E-1	1.92E-1	44	146
IAA	6.83±0.01	1.00	1.58E-02	0.9973	8.05E-2	3.64E-2	3.9	13
I3A	7.31±0.01	2.00E-03	-1.90E-04	0.9875	1.86E-4	3.42E-3	4.2*	14*
IPA	11.50±0.01	2.15	6.27E-03	0.9980	1.59E-1	3.24E-2	5.2	17
IAN	11.93±0.01	6.5	4.78E-02	0.9892	2.39E-1	9.42E-3	1.9	6.4
IBA	12.37±0.01	13.8	-3.56E-02	0.9902	6.24E-1	1.09E-1	1.1	3.8
IBA2	12.52±0.01	2.22	-1.91E-02	0.9945	1.56E-1	2.83E-2	9.1	30
I3C	14.90±0.01	2.72E-1	4.89E-02	0.9838	3.08E-2	8.01E-2	78	260
I3C2	15.47±0.01	1.39E-1	3.11E-02	0.9913	9.50E-3	2.46E-2	85	284
I3C3	16.06±0.01	1.23E-1	1.38E-02	0.9933	2.95E-09	5.51E-09	247	822

Para mostrar la importancia de usar el estándar interno, en la Tabla 9 se hace una comparación de los valores R^2 y de coeficiente de variación obtenidos para cada uno de los analitos, utilizando sus señales sin y con normalización por estándar interno. Como se puede observar, en todos los casos, el uso de EI permitió mejorar la linealidad de las curvas de calibración y también disminuir los valores de CV lo que es indicativo de una mejor precisión. Con estos resultados se confirma la adecuada selección de AOA como EI en el procedimiento propuesto.

Tabla 9. Comparación de los valores R^2 de funciones de calibración y de coeficientes de variación (CV, %) obtenidas en calibración con QuEChERS integrado sin y con AOA como EI. Para cada compuesto, CV se calculó en base de 3 réplicas del punto P1 de calibración.

Analito	Con EI		Sin EI	
	R^2	CV, %	R^2	CV, %
ICA	0.9991	17.1	0.9901	24.1
I3CHO	0.9933	2.76	0.9722	9.42
IAA	0.9973	3.71	0.9840	9.74
I3A	0.9875	2.25	0.9915	1.73
IPA	0.9980	1.31	0.9876	6.41
IAN	0.9892	9.82	0.9721	2.92
IBA	0.9902	27.7	0.9960	32.3

IBA2	0.9945	25.0	0.9933	28.8
I3C	0.9838	24.1	0.9865	31.0
I3C2	0.9913	75.0	0.9900	79.1
I3C3	0.9933	6.86	0.9880	6.35

4.5. Evaluación comparativa de diferentes condiciones QuEChERS para análisis de compuestos indólicos en vegetales.

La siguiente etapa de trabajo consistió en examinar si con la modificación del método QuEChERS original podría lograrse una mejor eficacia de extracción de compuestos indólicos de muestras de vegetales. Se siguió trabajando con rábano. Con base en la revisión bibliográfica presentada en el capítulo 3 de esta tesis se evaluaron dos tipos de modificaciones: (i) adición de un tampón para regular el pH durante la extracción y (ii) cantidad y tipo de sales de partición. Los procedimientos empleados se detallan a continuación.

En cada uno de los casos, se congeló una porción de aproximadamente 100 g de rábano fresco, una vez congelada la muestra se molió con mortero y pistilo, se pesaron 10 g y se colocaron en tubos falcón de 50 mL. Se agregaron 10 mL de una mezcla de MeCN y HAc 1%. Se agregaron 200 µL del estándar interno (EI-AOA) de concentración 267 µg/mL y enseguida se agitó a mano por un min.

a) Método QuEChERS sin adicional control de pH (original)

Se agregaron las sales de partición, 4 g de MgSO₄ y 1 g de NaCl.

b) Método QuEChERS agregando el tampón de acetatos, sin cloruro de sodio.

Se agrego la sal de partición (4 g de MgSO₄) y 1 g de acetato de sodio (NaAC).

c) Método QuEChERS agregando tampón de acetatos y cloruro de sodio

Se agregaron las sales de partición (4 g de MgSO₄ y 1 g de NaCl) y 1 g de NaAC.

d) Método QuEChERS agregando tampón de citratos y cloruro de sodio

Se agregaron las sales de partición (4 g de MgSO₄ y 1 g de NaCl) y las sales para formar el tampón de citratos (1 g de ácido cítrico y 0.5 g citrato de sodio).

Para todos los métodos, después agregadas las sales de partición y/o las sales de buffer, las mezclas se agitaron por un minuto, a mano, posteriormente se centrifugaron a 5000 rpm por 10 min y se extrajo el sobrenadante de cada una de ellas. Se tomaron alícuotas de 2 mL de sobrenadantes y se colocaron en un tubo eppendorf para evaporación en el Speed vac (45°C por 75 min) hasta un volumen final de aproximadamente 100 µL. Las muestras se acidificaron al aforar a 500 µL con ácido fórmico 0.1% (AF) y posteriormente se centrifugaron a 10000 g por 10 min. Los sobrenadantes se diluyeron tomando 100 µL y completando el volumen a 2000 µL con fase móvil (H₂O: MeCN: AF al 0.1% 70:20:10). Finalmente, las muestras se introdujeron al sistema HPLC. El procedimiento general de extracción se presenta en la Figura 16.

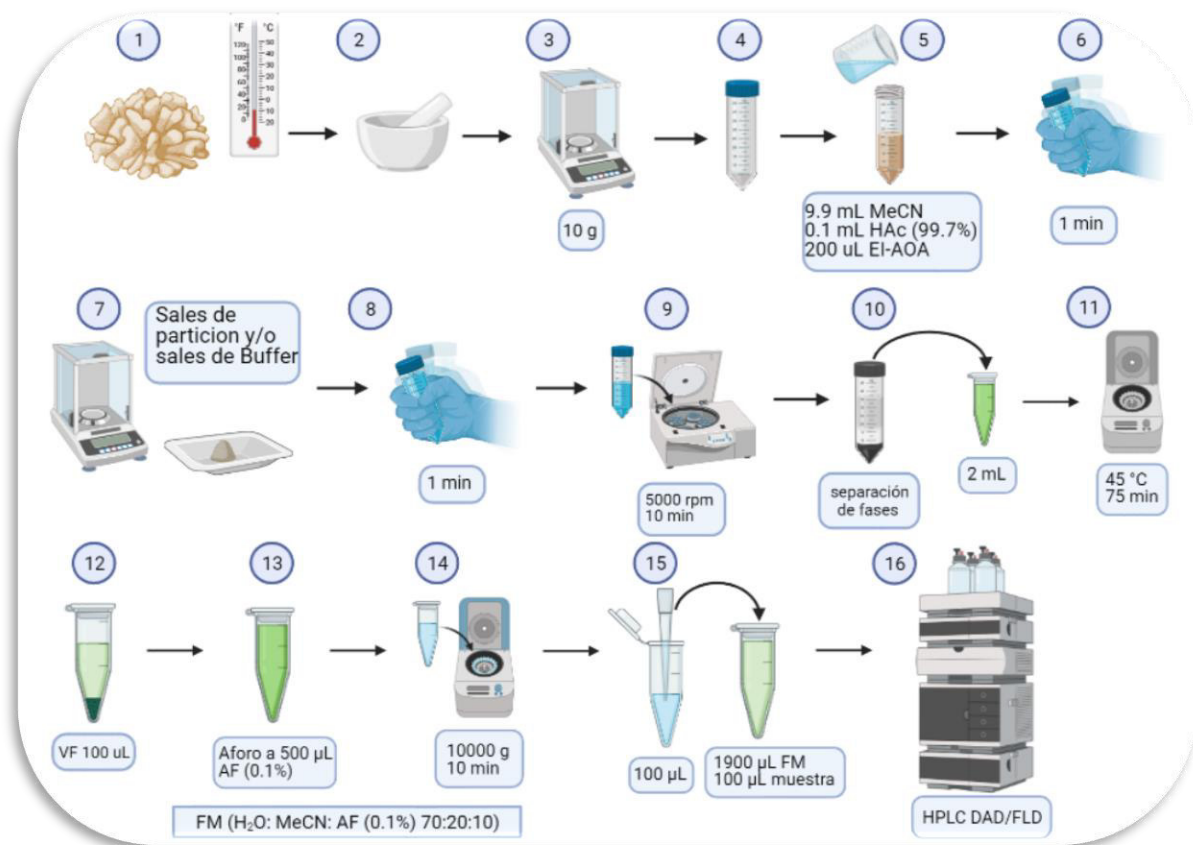


Figura 16. Procedimiento general de extracción QuEChERS.

Para cada una de las condiciones definidas arriba (a, b, c, d), se registraron los cromatogramas y se tomaron las señales analíticas de los compuestos de interés sin normalizar por EI. De manera de ejemplo, en la Tabla 10 se presentan detalladamente las modificaciones utilizadas, pH del extracto final y las señales relativas del IAN y de AOA-EI. En la Figura 17 se muestran cromatogramas registrados para cada una de las condiciones, donde se observa para todos los compuestos la misma tendencia que se presenta en la Tabla 10 para IAN. Los cromatogramas y los datos presentados en la Tabla 10 claramente demuestran que la acidificación inicial con el ácido acético proporcionó la mejor eficacia de extracción. La adición del tampón de acetatos o de citratos, aunque favorable en el caso de otras aplicaciones (ver capítulo 3), no resultó apropiada para compuestos indólicos ni para EI, en esta muestra.

Tabla 10. Condiciones del método QuEChERS examinadas y señales cromatográficas relativas de IAN y el EI (se tomó la señal obtenida en condiciones originales como 100%).						
Método	Masa de muestra	Extractante	Sales de partición/ buffers	Señal cromatográfica relativa del IAN	Señal cromatográfica relativa del AOA-EI	pH del extracto

a)	10 g	9.9 mL MeCN 0.1 mL HAc (99.7 %)	4 g MgSO ₄ , 1 g NaCl	100 %	100 %	2.45
b)	10 g	9.9 mL MeCN 0.1 mL HAc (99.7 %)	4 g MgSO ₄ , 1 g NaAC	83.6 %	55.7 %	5.46
c)	10 g	9.9 mL MeCN 0.1 mL HAc (99.7 %)	4 g MgSO ₄ , 1 g NaCl, 1 g NaAC	75.9 %	49.0 %	5.09
d)	10 g	9.9 mL MeCN 0.1 mL HAc (99.7 %)	4 g MgSO ₄ , 1 g NaCl, 1 g CitAc 0.5 g NaCit	89.4 %	64.3 %	2.65
Solventes y sales: MeCN- acetonitrilo, HAc- ácido acético, NaAC- acetato de sodio, CitAc- ácido cítrico, NaCit- citrato de sodio.						

Cabe señalar que la mayoría de los compuestos de interés presentan valores de pKa en el intervalo de 3.5-4.9, por lo que su extracción a acetonitrilo se debe ver beneficiada a pH < 2.5 (prevalencia de moléculas no disociadas). En el método original (a), la adicción inicial del ácido acético confiere el pH 2.45 al extracto final y por ello, la eficacia de extracción es relativamente buena. Por su parte, la adición de tampones de citratos o acetatos produce un no deseado aumento de pH lo que resulta en la presencia de parcialmente disociados grupos ácidos de compuestos indólicos y peor eficacia de su extracción a solvente orgánico. Como resultado de los experimentos realizados, se optó por utilizar el procedimiento QuEChERS original, con acidificación inicial con ácido acético.

Por otro lado, en la Figura 17 se observa la elución de compuestos con altas señales tanto FLD como DAD a tiempos de retención cortos (previos al EI-AOA), los cuales no se pudieron identificar, pero sugieren la formación de conjugados de los compuestos indólicos con azúcares (glucósidos) ya que esta modificación aumenta la polaridad de la molécula de indol acortando con ello el tiempo de retención. Estos resultados están de acuerdo con otros estudios, donde se hace mención sobre la presencia de reacciones metabólicas de o-glucosilación en el tejido folicular de las plantas [155]. Para examinar la posible formación de gluco-conjugados, se utilizó la enzima β-glucosidasa que

cataliza la hidrólisis de enlaces glicosídicos en arilo y alquil β -glucosidos, liberando glucosa y su correspondiente algicona. Los resultados se describen en la siguiente sección.

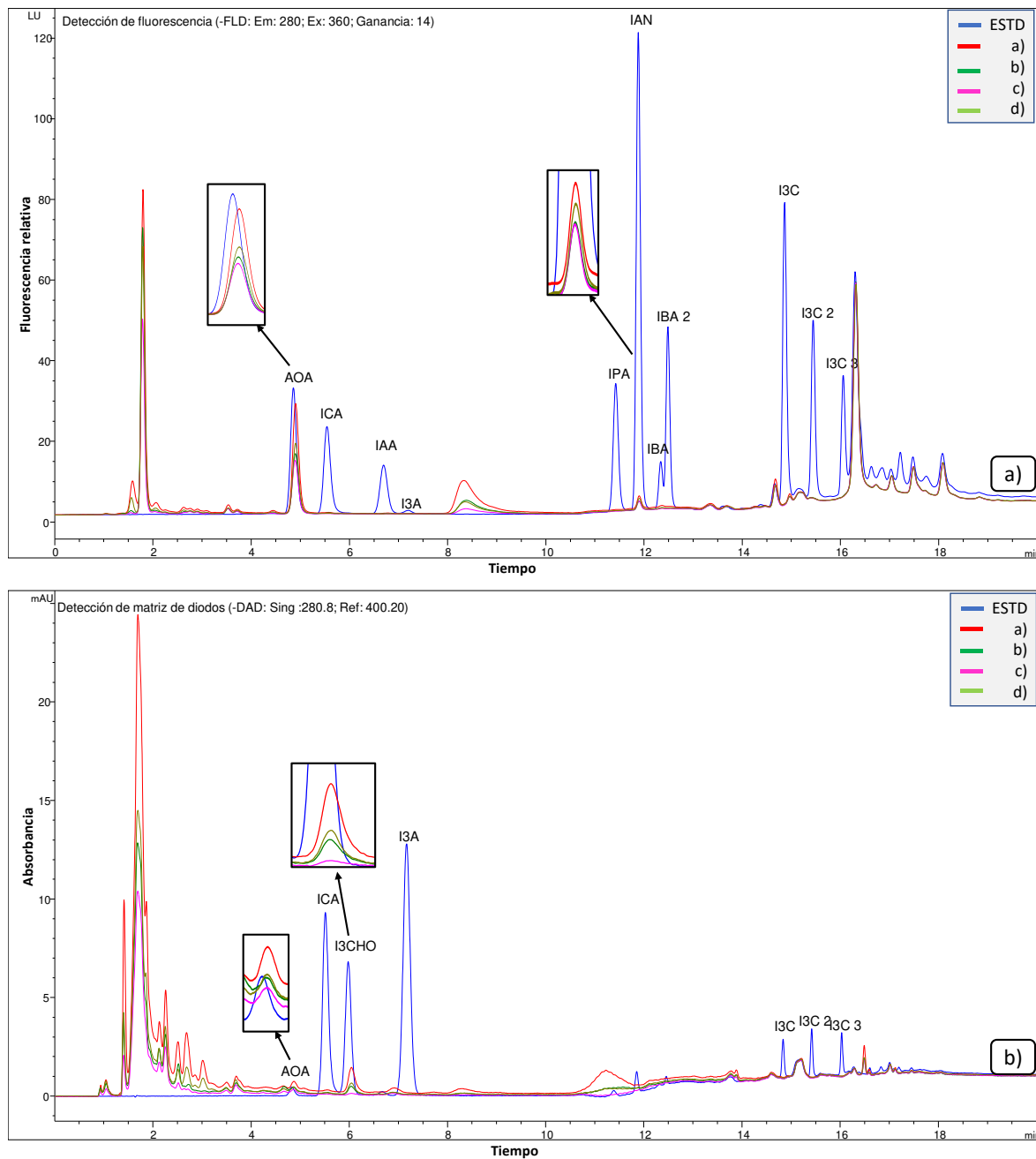


Figura 17. Cromatogramas de estándares y los cuatro diferentes métodos de extracción QuEChERS probados en la muestra de rábano (a)-detección fluorimétrica para ICA, IAA, I3A, IPA, IAN, IBA, I3C, AOA; b)- detección UV para I3CHO, AOA); Las letras mostradas en la parte superior derecha de cada cromatograma corresponden a: a) QuEChERS sin adicional control de pH, b) agregando tampón de acetatos, sin cloruro de sodio, c) agregando tampón de acetatos y cloruro de sodio, d) agregando citratos y cloruro de sodio.

4.6. Efecto de tratamiento con beta- glucosidasa sobre el perfil de compuestos indólicos.

Para esta prueba, se adoptaron las condiciones de hidrolisis enzimática de un estudio previo [155]. En concreto, se realizó la extracción de dos alícuotas de muestra de rábano utilizando QuEChERS con acidificación inicial de HAc. Después de la evaporación a un volumen aproximado de 100 μL , cada una de las soluciones se aforó a 500 μL con fase móvil y enseguida se añadieron 200 μL de acetato de sodio (pH 5.0, ajustado con HCl), y se sónico por 10 minutos a 20°C. A continuación, una porción se incubó con 2 unidades o 100 μL de β -glucosidasa, previamente diluidas en el tampón de acetatos (5 mg/mL), (EC 3.2.1.21; Sigma-Aldrich) bajo agitación continua a 37 ° C durante 2 h; la segunda porción de muestra se procesó en paralelo, pero sin agregar la enzima. La reacción se detuvo con la adición de 500 μL de una solución de bicarbonato de sodio 0.10 M, este reactivo se agregó a ambas porciones de muestra. Para la dilución, se tomaron 180 μL de muestra y se llevaron a 1000 μL con fase móvil (H_2O : MeCN: AF al 0.1% 70:20:10). Una vez centrifugadas las soluciones se introdujeron al sistema HPLC. El proceso general se presenta en la Figura 18; en este esquema, para la muestra sin tratamiento enzimático (control), en el paso 4 se agregaron 100 μL del agua.

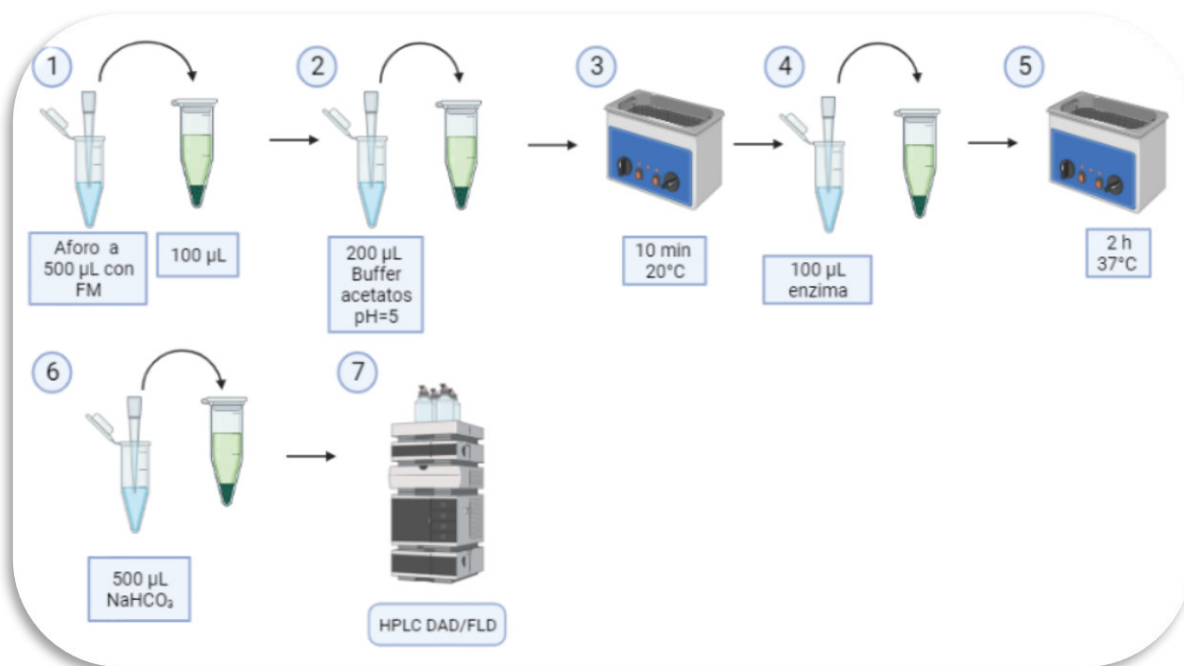


Figura 18. Esquema general del tratamiento con β -glucosidasa.

En la Figura 19, se presentan los cromatogramas obtenidos para dos muestras de rábano, una sin y otra con tratamiento enzimático (rojo-Rab SB y verde-Rab CB, respectivamente) y un cromatograma de estándares correspondiente a punto de calibración P1 (azul- ESTD). En primer lugar, el tratamiento con β -glucosidasa causó una clara disminución de las señales con tiempo de retención de aproximadamente 2 min (tentativamente asignados como conjugados de compuestos indólicos) y se observaron cambios en el perfil de elución en tiempos de retención más largos. Tal es el caso de un pico cuyo tiempo de retención coincide con el estándar IAA y el cual aparece en la muestra hidrolizada (detección FLD), lo que sugiere la liberación de indol-3-ácido acético de sus conjugados glucosídicos existentes en rábano. De manera similar, utilizando detección DAD, se observa un aumento de la señal I3CHO después del tratamiento con β -glucosidasa respecto a la muestra sin tratamiento con esta enzima (Fig. 19 abajo). En el caso de IAN, el tratamiento enzimático no afectó de manera significativa su señal cromatográfica registrada con FLD, lo que indica que este compuesto aparentemente no forma conjugados con azúcares. Hay que resaltar que la señal de EI

es prácticamente idéntica en tres cromatogramas (estándares, Rab SB, Rab CB), lo que sustenta los efectos observados para otras señales cromatográficas. Cabe también notar la aparición de una serie de señales registradas con detector DAD después del tratamiento enzimático, los cuales sugieren presencia de glucósidos de algunos compuestos no fluorescentes en rábano.

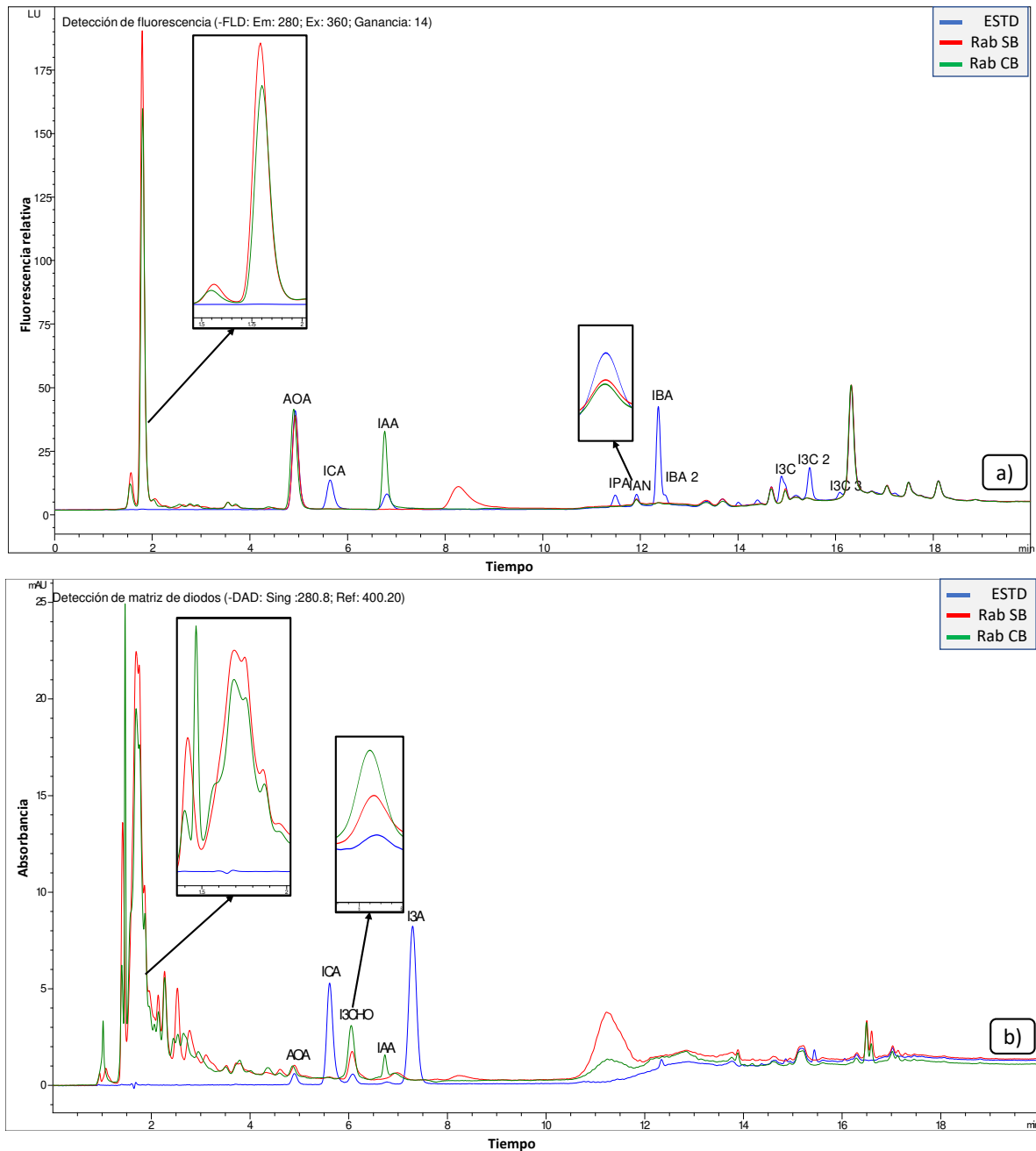


Figura 19. Cromatogramas de los estándares correspondientes al punto de calibración P1 (azul-ESTD), muestra de rábano después del método QuEChERS y sin tratamiento enzimático (rojo- Rab SB) y con tratamiento con β -glucosidasa (verde- Rab CB). a) detección fluorimétrica para ICA, IAA, I3A, IPA, IAN, IBA, I3, AOA; b)-detección UV para la cuantificación de I3CHO, AOA).

Para confirmar la presencia de glucósidos de compuestos indólicos en otros vegetales, se realizó el mismo experimento con la muestra de nabo, mostrando los cromatogramas obtenidos en la Figura 20. En esta figura se observan efectos parecidos que los descritos para la muestra de rábano. Mediante detección de fluorimétrica, se detecta una nueva señal correspondiente a IAA (pico verde), igualmente se aprecia el desplazamiento del pico correspondiente a este analito cuando no es adicionada la enzima (pico 7.0 - 7.5 min).

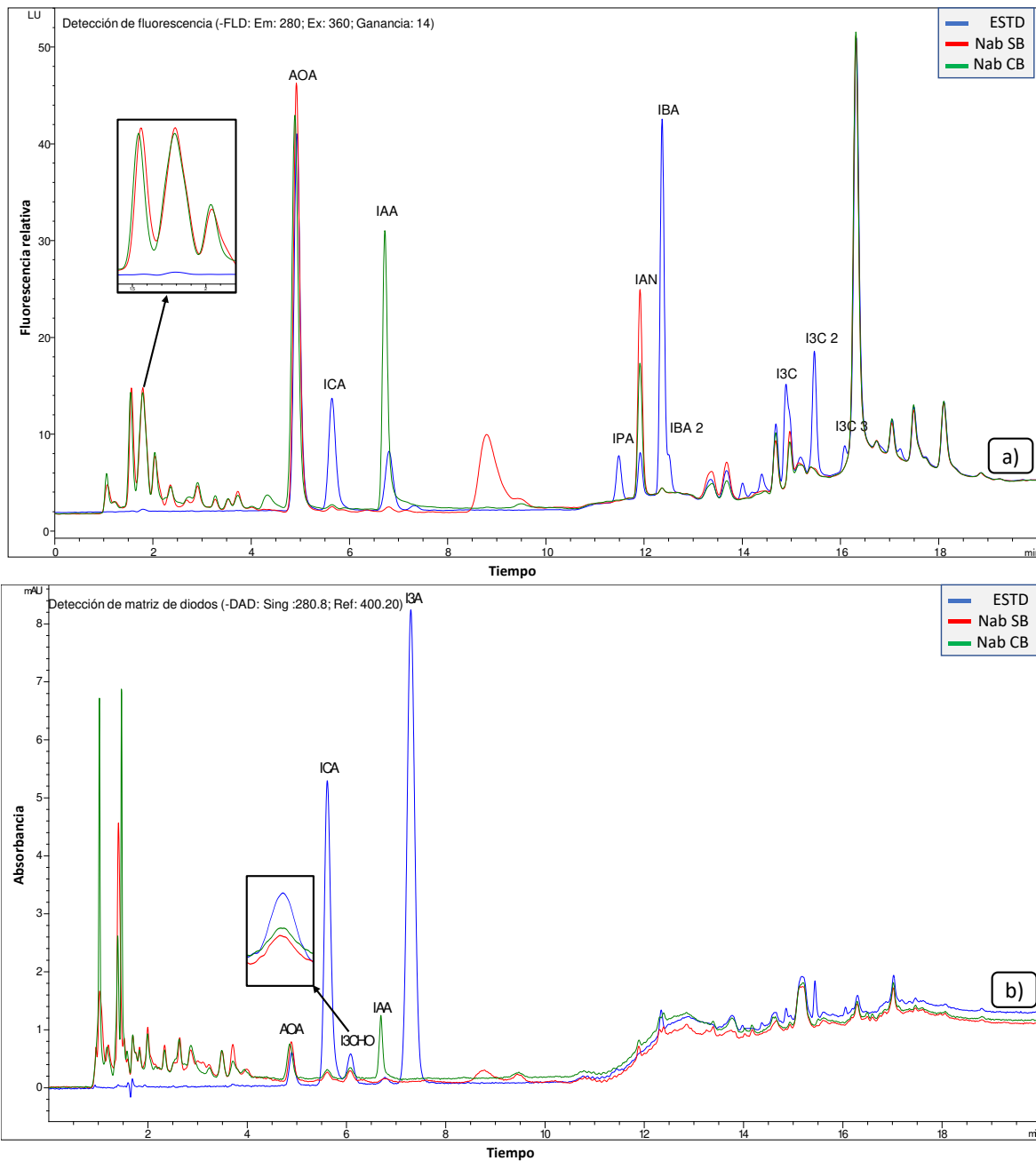


Figura 20. Cromatogramas de estándares correspondientes a punto de calibración P1 (azul-ESTD), muestra de nabo después de QuEChERS y sin tratamiento enzimático (rojo-Rab SB) y con

tratamiento con β -glucosidasa (verde-Nab CB). a)-detección fluorimétrica para ICA, IAA, I3A, IPA, IAN, IBA, I3C, AOA; b)- detección UV para la cuantificación de I3CHO, AOA).

Por último, al igual que en la muestra de rábano, se observa una ligera disminución de las alturas de los picos encontrados entre el tiempo de retención 1.5 y 2, lo cual demuestra la hidrólisis de glucósidos mediante tratamiento con β -glucosidasa. Con la detección DAD se nota un aumento de la señal antes identificada como I3CHO cuando se sigue el proceso de la hidrólisis enzimática.

De manera importante para este trabajo, los experimentos realizados con β -glucosidasa ponen de manifiesto que, sin uso de esta enzima, el procedimiento QuEChERS HPLC-DAD/FLD propuesto proporciona información sobre compuestos indólicos libres (no conjugados).

4.7. Estudio de recuperación en el análisis de muestras reales.

Para examinar la factibilidad de la determinación de compuestos indólicos en rábano y nabo y confiabilidad de los resultados, se realizaron experimentos de adición de estándar evaluando la recuperación de cada uno de analitos. En concreto, a las muestras de rábano y nabo, se agregaron estándares en cantidades correspondientes a los cinco puntos de calibración (P1-P5).

Las adiciones se realizaron agregando alícuotas de solución patrón directamente a las muestras y después las muestras se procesaron tal y como se indica en la sección 4.5.

Los cromatogramas registrados en este experimento para rábano y nabo considerando adición de todos los puntos de calibración (P1-P5), se muestran en las Figuras 21 y 22, respectivamente. En las Tablas 11 y 12 se reportan los resultados obtenidos en el proceso de cuantificación para dos puntos de adición de estándares (P1 y P2).

En las primeras dos filas de estas Tablas, se reportan pendientes de las funciones de regresión lineal obtenidas para adición de estándar a la muestra y para la curva de calibración. La relación entre estas pendientes, expresada en porcentaje, es la medida de supresión o aumento de las señales debido a la presencia de matriz (SSE- por sus siglas en inglés: signal suppression/enhancement). Como se puede observar en la tercera fila de las Tablas 11 y 12, prácticamente para todos los analitos y en ambas muestras se presentaron importantes interferencias de matriz con valores SSE mayores de 120% o menores de 80%. De allí, los resultados de cuantificación por adición estándar se consideran más confiables respecto a aquellos calculados en base a la calibración externa.

Para calcular la recuperación de cada analito en el experimento realizado, en las tablas se reporta masa del analito en un gramo de muestra, correspondiente a la muestra sin adición de estándar (solamente para I3CHO y IAN, mientras que otros compuestos no fueron detectados), la masa agregada por 1 g de muestra, y la masa encontrada después de adición estándar.

Los porcentajes de recuperación se calcularon utilizando la siguiente formula:

$$\%R = \left(\frac{Y_{ad} - Y}{X} \right) * 100$$

Donde:

Y_{ad}- μ g del analito encontrado en muestra después de adición de estándar

Y- μ g del analito encontrado en muestra sin agregar el estándar (solamente para I3CHO y IAN, mientras que otros compuestos no fueron detectados).

X- μg del analito agregados a la muestra

Para rábano (Tabla 11), los analitos I3CHO e IAN fueron detectados en los extractos y sus concentraciones estimados por el método de calibración externa, mientras que otros compuestos no fueron detectados. Los valores de porcentajes de recuperación fueron satisfactorios para la mayoría de los analitos, ya que estaban en el intervalo de 97.4%-108% para el primer punto de adicción y 94.5% -101% para el segundo punto de adicción. En el caso de I3CHO, su concentración natural en la muestra era solamente estimada mediante calibración externa y el error cometido en esta estimación, claramente afecto el resultado de recuperación (209% para el primer punto de adicción y 131% para la segunda). Los resultados arrojados para I3C tampoco eran aceptables (154% y 77.5% para el primero y segundo punto de adicción, respectivamente) porque este compuesto se eluyó en forma de tres picos lo que perjudico la magnitud de las señales.

Tabla 11. Resultados de experimento de adición estándar para la muestra de rábano.									
Analito	ICA	I3CHO	IAA	I3A	IPA	IAN	IBA	IBA2	I3C
Efecto de matriz									
Pend., calibración	8.97E-02	2.83	1.00	2.00E-03	2.15	6.50	13.8	2.22	2.72E-01
Pend., adicción de ESTD	1.20E-01	4.66	1.59	2.83E-03	4.51	9.4	4.52	7.24	0.141
SSE, %	133	165	159	142	210	145	32.7	326	51.7
Experimentos de recobro									
µg en 1 g de muestra	ND	0.600	ND	ND	ND	0.01	ND	ND	ND
µg adicionados (1)	139	13.1	7.28	295	3.28	0.70	2.93	2.93	44.6
µg encontrados (1)	135	28.03	7.37	301	3.32	0.741	3.17	2.94	68.6
Recobro 1, %	97.4	209	101	102	101	105	108	100	154
µg adicionados (2)	277	26.3	14.6	591	6.56	1.39	5.87	5.87	89.2
µg encontrados (2)	280	34.9	14.2	566	6.46	1.34	5.54	5.81	69.1
Recobro 2, %	101	131	97.6	95.7	98.5	95.7	94.5	99.0	77.5
ND: NO DETECTADO									

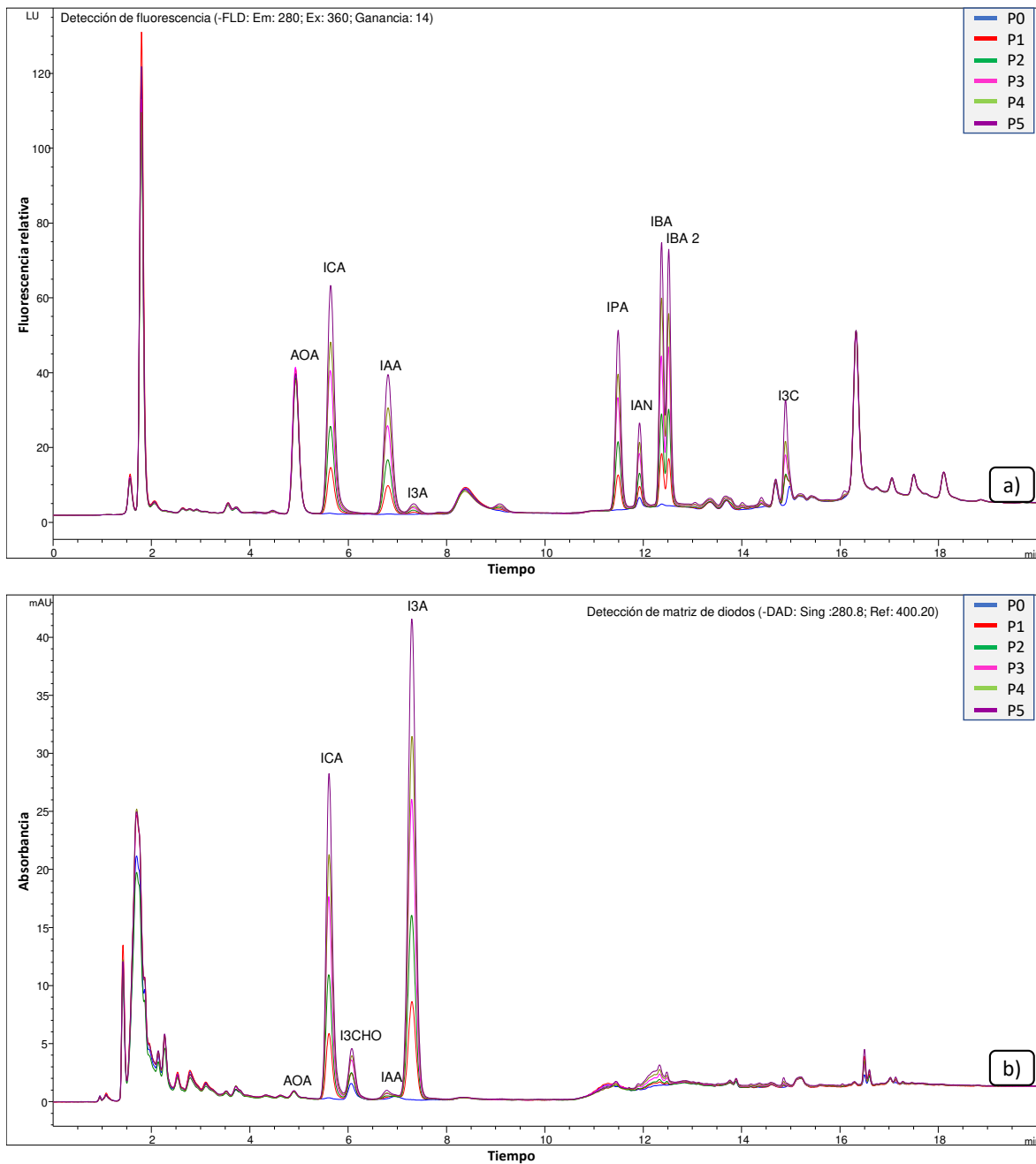


Figura 21. Cromatogramas del extracto de muestra de rábano sin y con adición de estándares (a)-detección fluorimétrica para la cuantificación de ICA, IAA, I3A, IPA, IAN, IBA, I3C; b)-detección UV para la cuantificación de I3CHO; las letras P0 y P1-P5 corresponden a la muestra sin adición de estándar y a la misma muestra con adiciones de concentraciones iguales que en las soluciones de calibración).

En la muestra de nabo se encontraron los mismos dos compuestos indólicos (I3CHO, IAN) y se obtuvieron resultados de recuperación similares a los del rábano (Tabla 12). Debido al error cometido en la estimación de concentraciones de los dos analitos por calibración externa, las recuperaciones

se vieron afectadas en el caso de I3CHO (128% para el primer punto de adición) y para IAN (220% y 158%, para dos puntos de adición, respectivamente).

En general, los resultados de experimentos de recuperación indican la factibilidad de la determinación de compuestos indólicos en extractos de vegetales por el procedimiento propuesto, siempre y cuando la cuantificación se realice por el método de adición de estándar.

Hay que recordar que los resultados presentados en la Tabla 11 y 12 corresponden al contenido de compuestos indólicos libres. En un trabajo futuro, sería interesante integrar en el procedimiento la etapa de tratamiento enzimático para cuantificar la fracción de indólicos en forma de glicósidos. De estas Tablas se percibe la necesidad de aumentar la sensibilidad del procedimiento propuesto, lo que forma otro reto para estudios posteriores.

Finalmente, cabe resaltar que las muestras de nabo y de rábano analizadas en este trabajo contenían I3CHO y IAN en forma libre, además de IAA conjugado con azúcares.

Tabla 12. Resultados de experimentos de adición estándar para la muestra de nabo.									
Analito	ICA	I3CHO	IAA	I3A	IPA	IAN	IBA	IBA2	I3C
Efecto de matriz									
Pend., calibración	8.97E-02	2.83	1.00	2.00E-03	2.15	6.50	13.8	2.22	2.72E-01
Pend., adición de ESTD	1.27E-01	3.57	1.43	2.45E-03	3.32	21.02	8.14	4.25	0.248
SSE, %	142	126	143	123	154	323	58.9	192	91.3
Experimentos de recobro									
µg en 1 g de muestra	ND	0.140	ND	ND	ND	0.051	ND	ND	ND
µg adicionados (1)	139	13.1	7.28	295	3.28	0.70	2.93	2.93	44.6
µg encontrados (1)	129	16.9	7.85	326	3.49	1.58	2.37	3.16	48.8
Recobro 1, %	93.2	128	108	110	106	220	81	108	109
µg adicionados (2)	277	26.3	14.6	590	6.56	1.39	5.87	5.87	89.2
µg encontrados (2)	272	28.5	14.6	568	6.73	2.25	6.19	6.14	84.6
Recobro 2, %	97.9	108	100	96.1	103	158	106	105	95
NC: NO DETECTADO									

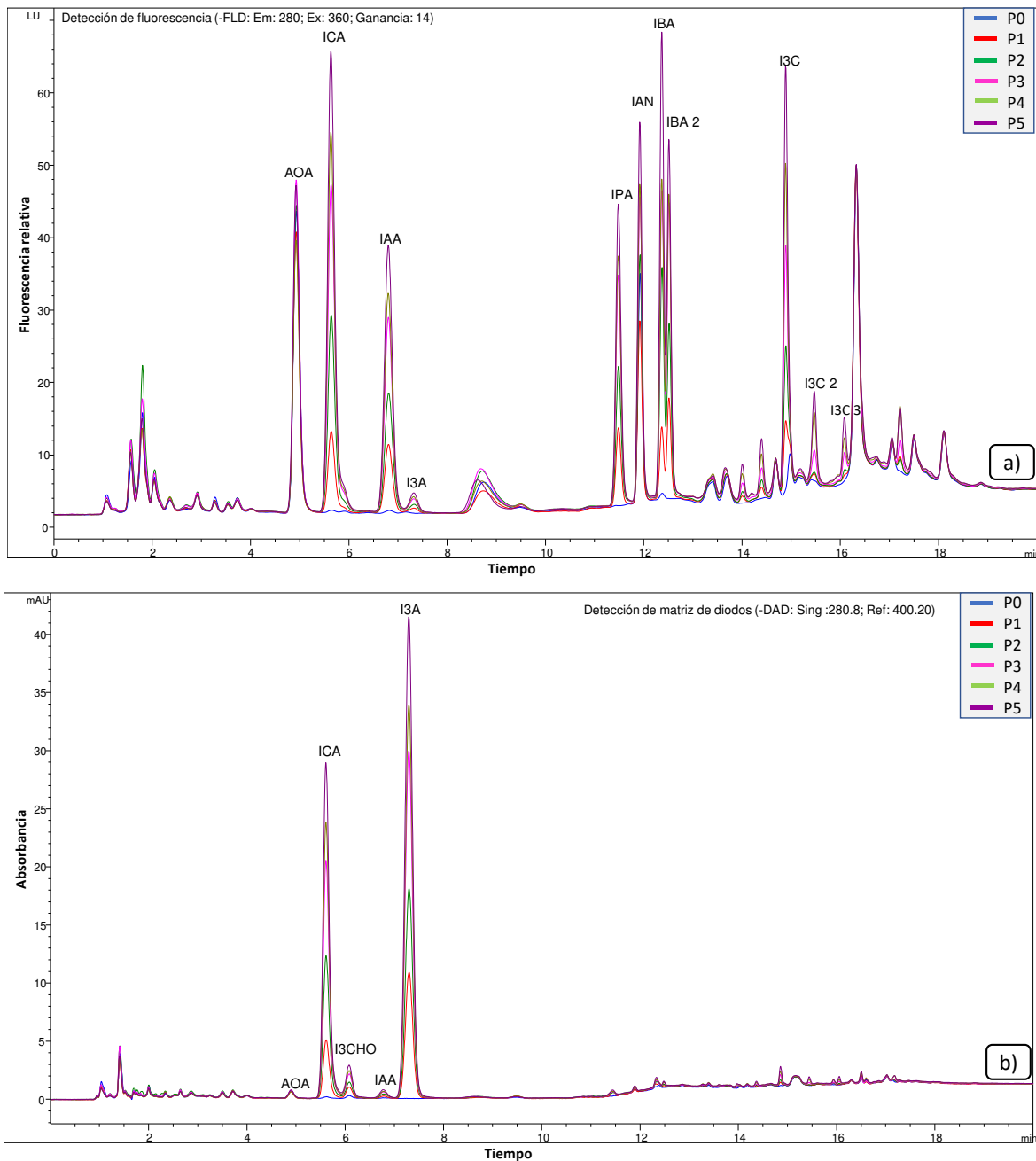


Figura 22. Cromatogramas del extracto de muestra de nabo sin y con adición de estándares (a)-detección fluorimétrica para la cuantificación de ICA, IAA, I3A, IPA, IAN, IBA, I3C; b)- detección UV para la cuantificación de I3CHO; las letras P0 y P1-P5 corresponden a la muestra sin adición de estándar y la misma muestra con adiciones de concentraciones iguales a las soluciones de calibración.

5. Conclusiones

El trabajo de tesis ha sido enfocado en la determinación de los siguientes compuestos indólicos en plantas comestibles cultivadas en el estado de Guanajuato; indo-3-acido carboxílico (ICA), Indol-3-carboxaldehído (I3CHO), indol-3-ácido acético (IAA), Indol-3- acetil (I3A), indol-3-ácido propiónico (IPA), indol-3- acetonitrilo (IAN), indol-3-acido butírico (IBA) e indol-3-carbinol (I3C). Para ello, se ha desarrollado un procedimiento analítico basado en QuEChERS y cromatografía de líquidos de alta resolución con detección espectrofluorimétrica y espectrofotométrica. A continuación, se presentan las conclusiones del trabajo realizado:

1. Se ha demostrado que el ácido o-anísico puede ser utilizado como el estándar interno mejorando el desempeño del procedimiento propuesto.
2. Los experimentos sistemáticos han permitido seleccionar las condiciones de separación y detección de ocho compuestos y del EI en 20 min, logrando límites de detección en el intervalo de partes por billón (70 ng/mL ICA, 44 ng/mL I3CHO, 3.9 ng/mL IAA, 4.2 µg/mL I3A, 5.2 ng/mL IPA, 1.9 ng/mL IAN, 1.1 ng/mL IBA, 9.1 ng/mL IBA2, 78 ng/mL I3C, 85 ng/mL I3C2, 247 ng/mL I3C3). El punto clave para la detección FLD era seleccionar adecuadamente el grado de dilución del extracto vegetal y ajustar la sensibilidad relativa del detector (ganancia).
3. En base a la revisión bibliográfica sobre recientes modificaciones y aplicaciones de QuEChERS y considerando propiedades fisicoquímicas de los compuestos de interés, se evaluaron comparativamente cuatro protocolos de este método de extracción encontrándose la mejor eficacia de extracción con el método original (sin etapa de extracción en fase sólida y con adición de ácido acético al acetonitrilo- el pH del extracto 2.45).
4. Mediante el tratamiento con enzima β -glucosidasa, se ha demostrado la formación de glicoconjugados de algunos compuestos indólicos en vegetales analizados (principalmente IAA).
5. Se han propuesto integrar el procedimiento QuEChERS en la preparación de soluciones estándar para el proceso de calibración
6. Debido a fuertes interferencias de matriz, observadas en el análisis de nabo y de rábano (valores SSE fuera del intervalo de 80-120%), en el procedimiento propuesto, la cuantificación debe llevarse a cabo por el método de adición estándar.
7. Las muestras de rábano y nabo contenían concentraciones de I3CHO y de IAN (en forma no-conjugada), que pudieron ser cuantificados por el procedimiento propuesto, mientras que otros analitos no fueron detectados en estas condiciones.
8. Los experimentos de recuperación arrojaron resultados satisfactorios para los compuestos no detectados en las muestras. Para I3CHO y IAN, los resultados no fueron satisfactorios, debido a error de estimación de su concentración natural en la muestra. En un experimento futuro, será necesario repetir el experimento de recuperación para estos compuestos utilizando la muestra real más diluida o una muestra que no contenga detectables concentraciones de estos dos compuestos.

En resumen, en este trabajo se ha demostrado la factibilidad de QuEChERS como método de tratamiento de material de planta para el análisis de compuestos indólicos por cromatografía de líquidos en fase inversa con detección espectrofluorimétrica. Por otro lado, en el trabajo futuro, es necesario mejorar las condiciones de extracción para eliminar interferencias de matriz que afectaron la pendiente de las curvas de calibración prácticamente de todos los compuestos. También sería interesantes integrar en el procedimiento la etapa de tratamiento enzimático para cuantificar la fracción de indólicos en forma de glicósidos. Otro reto es adecuar el procedimiento para cuantificación de más bajas concentraciones de compuestos indólicos.

6. Referencias bibliográficas:

1. Van Order, R. and H.J.C.R. Lindwall, *Indole*. 1942. **30**(1): p. 69-96.
2. Cna'ani, A., M. Seifan, and V. Tzin, *Indole is an essential molecule for plant interactions with herbivores and pollinators*. *J Plant Biol Crop Res*, 2018. **1**: p. 1-5.
3. Duca, D., et al., *Indole-3-acetic acid in plant-microbe interactions*. 2014. **106**(1): p. 85-125.
4. Radwanski, E.R. and R.L.J.T.P.C. Last, *Tryptophan biosynthesis and metabolism: biochemical and molecular genetics*. 1995. **7**(7): p. 921.
5. Revelou, P.-K., M.G. Kokotou, and V.J.N.p.r. Constantinou-Kokotou, *Determination of indole-type phytonutrients in cruciferous vegetables*. 2018: p. 1-4.
6. Stowe, B.B., *Occurrence and metabolism of simple indoles in plants*, in *Fortschritte der Chemie Organischer Naturstoffe/Progress in the Chemistry of Organic Natural Products/Progrès dans la Chimie des Substances Organiques Naturelles*. 1959, Springer. p. 248-297.
7. Yeoman, M. and C.J.N.P. Yeoman, *Tansley Review No. 90. Manipulating secondary metabolism in cultured plant cells*. 1996: p. 553-569.
8. Kaushik, N.K., et al., *Biomedical importance of indoles*. 2013. **18**(6): p. 6620-6662.
9. Enders, T.A. and L.C.J.A.j.o.b. Strader, *Auxin activity: Past, present, and future*. 2015. **102**(2): p. 180-196.
10. Zhao, Y.J.M.p., *Auxin biosynthesis: a simple two-step pathway converts tryptophan to indole-3-acetic acid in plants*. 2012. **5**(2): p. 334-338.
11. Lu, Q., et al., *Extraction and analysis of auxins in plants using dispersive liquid-liquid microextraction followed by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection*. 2010. **58**(5): p. 2763-2770.
12. Patten, C.L. and B.R.J.C.j.o.m. Glick, *Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid*. 1996. **42**(3): p. 207-220.
13. Spaepen, S., J. Vanderleyden, and R.J.F.m.r. Remans, *Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling*. 2007. **31**(4): p. 425-448.
14. Bridges, J. and R.J.B.J. Williams, *The fluorescence of indoles and aniline derivatives*. 1968. **107**(2): p. 225-237.
15. Malka, S.K. and Y.J.F.i.p.s. Cheng, *Possible interactions between the biosynthetic pathways of indole glucosinolate and auxin*. 2017. **8**: p. 2131.
16. McDanell, R., et al., *Chemical and biological properties of indole glucosinolates (glucobrassicins): a review*. 1988. **26**(1): p. 59-70.
17. Cna'ani, A., et al., *Indole is an essential molecule for plant interactions with herbivores and pollinators*. 2018. **1**: p. 1003.
18. Ting, A.S., et al., *Endophytic microorganisms as potential growth promoters of banana*. 2008. **53**(3): p. 541-553.
19. Toungos, M.D.J.I.J.I.A.B.R., *Plant growth substances in crop production: A Review*. 2018. **6**: p. 1-8.
20. Ma, L., et al., *Simultaneous determination of 15 plant growth regulators in bean sprout and tomato with liquid chromatography-triple quadrupole tandem mass spectrometry*. 2013. **6**(3): p. 941-951.
21. Xu, X., et al., *Simultaneous determination of multiclass plant growth regulators in fruits using the quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe method and ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. 2020. **43**(4): p. 788-798.
22. Liu, S., et al., *Evaluation of selected plant growth regulators and fungicide residues in fruits for dietary risk assessment*. 2016. **22**(6): p. 1386-1395.

23. Phonchai, A., P. Wilairat, and R.J.A.m. Chantiwas, *Rapid simultaneous determination of four indole compounds in dietary supplements by micellar electrokinetic chromatography with a dilute and shoot step*. 2016. **8**(3): p. 637-643.
24. Silvestri, R., et al., *Indole-3-pyruvic acid as a possible hypnotic agent in insomniac subjects*. 1991. **19**(5): p. 403-409.
25. Xue, J., et al., *Multi-residue determination of plant growth regulators in apples and tomatoes by liquid chromatography/tandem mass spectrometry*. 2011. **25**(21): p. 3289-3297.
26. Ferguson, L. and J.E. Lessenger, *Plant growth regulators*, in *Agricultural Medicine*. 2006, Springer. p. 156-166.
27. Muhammad, N., et al., *Simultaneous determination of two plant growth regulators in ten food samples using ion chromatography combined with QuEChERS extraction method (IC-QuEChERS) and coupled with fluorescence detector*. 2018. **241**: p. 308-316.
28. Mou, Y., D. Guo, and Z.J.A. Ding, *Maximum residue limits and detection methods of plant growth regulators commonly used in amphisarcas*. 2013. **52**(6): p. 398-401.
29. Shuiying, R., et al., *Simultaneous determination of 10 plant growth promoters in fruits and vegetables with a modified QuEChERS based liquid chromatography tandem mass spectrometry method*. 2015. **7**(21): p. 9130-9136.
30. Śmiechowska, A., A. Bartoszek, and J.J.C.R.i.A.C. Namieśnik, *Determination of glucosinolates and their decomposition products—indoles and isothiocyanates in cruciferous vegetables*. 2010. **40**(3): p. 202-216.
31. Yokota, T., N. Murofushi, and N. Takahashi, *Extraction, purification, and identification*, in *Hormonal Regulation of Development I*. 1980, Springer. p. 113-201.
32. Elliott, M.C. and B.B.J.P.p. Stowe, *Indole compounds related to auxins and goitrogens of woad (*Isatis tinctoria* L.)*. 1971. **47**(3): p. 366-372.
33. Tang, S., H. Zhang, and H.K.J.A.c. Lee, *Advances in sample extraction*. 2016. **88**(1): p. 228-249.
34. Pedras, M.S.C., Q.-a. Zheng, and V.K.J.N.P.C. Sarma-Mamillapalle, *The phytoalexins from Brassicaceae: structure, biological activity, synthesis and biosynthesis*. 2007. **2**(3): p. 1934578X0700200315.
35. Hou, S., et al., *Simultaneous determination of gibberellic acid, indole-3-acetic acid and abscisic acid in wheat extracts by solid-phase extraction and liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry*. 2008. **76**(4): p. 798-802.
36. Ferrera, Z.S., et al., *The use of micellar systems in the extraction and pre-concentration of organic pollutants in environmental samples*. 2004. **23**(7): p. 469-479.
37. Flores, M.I.A., et al., *QuEChERS-based extraction procedure for multifamily analysis of phytohormones in vegetables by UHPLC-MS/MS*. 2011. **34**(13): p. 1517-1524.
38. Anastassiades, M., et al., *Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce*. 2003. **86**(2): p. 412-431.
39. Rahman, M.M., et al., *Quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe sample preparation approach for pesticide residue analysis using traditional detectors in chromatography: A review*. 2017. **40**(1): p. 203-212.
40. Schenck, F., J.J.B.o.e.c. Hobbs, and toxicology, *Evaluation of the quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe (QuEChERS) approach to pesticide residue analysis*. 2004. **73**(1): p. 24-30.

41. Yong, J.W.H., et al., *Analyses of Indole Compounds in Sugar Cane (Saccharum officinarum L.) Juice by High Performance Liquid Chromatography and Liquid Chromatography-Mass Spectrometry after Solid-Phase Extraction*. 2017. **4**(1): p. 7.
42. Delatorre, C., et al., *Hormonal profiling: Development of a simple method to extract and quantify phytohormones in complex matrices by UHPLC-MS/MS*. 2017. **1040**: p. 239-249.
43. Liu, M., et al., *Accurate Analysis and Evaluation of Acidic Plant Growth Regulators in Transgenic and Nontransgenic Edible Oils with Facile Microwave-Assisted Extraction-Derivatization*. 2015. **63**(36): p. 8058-8067.
44. Nakurte, I., A. Keisa, and N.J.J.o.a.m.i.c. Rostoks, *Development and validation of a reversed-phase liquid chromatography method for the simultaneous determination of indole-3-acetic acid, indole-3-pyruvic acid, and abscisic acid in barley (Hordeum vulgare L.)*. 2012. **2012**.
45. Sheikhan, L. and S.J.J.o.C.B. Bina, *Simultaneous extraction and HPLC determination of 3-indole butyric acid and 3-indole acetic acid in pea plant by using ionic liquid-modified silica as sorbent*. 2016. **1009**: p. 34-43.
46. Gupta, V., et al., *Simultaneous determination of different endogenous plant growth regulators in common green seaweeds using dispersive liquid-liquid microextraction method*. 2011. **49**(11): p. 1259-1263.
47. Bosco, R., et al., *Development of a rapid LC-DAD/FLD method for the simultaneous determination of auxins and abscisic acid in plant extracts*. 2013. **61**(46): p. 10940-10947.
48. Campanella, B., et al., *New polymeric sorbent for the solid-phase extraction of indole-3-acetic acid from plants followed by liquid chromatography-Fluorescence detector*. 2016. **128**: p. 68-74.
49. Xu, X., et al., *ZIF-8@ SiO₂ core-shell microsphere extraction coupled with liquid chromatography and triple quadrupole tandem mass spectrometry for the quantitative analysis of four plant growth regulators in navel oranges*. 2018. **41**(18): p. 3561-3568.
50. Phonchai, A., P. Wilairat, and R.J.T. Chantiwas, *Development of a solid-phase extraction method with simple MEKC-UV analysis for simultaneous detection of indole metabolites in human urine after administration of indole dietary supplement*. 2017. **174**: p. 314-319.
51. Hong, B., et al., *Determination of indole alkaloids and highly volatile compounds in Rauvolfia verticillata by HPLC-UV and GC-MS*. 2013. **51**(10): p. 926-930.
52. Zeng, L., et al., *Formation of volatile tea constituent indole during the oolong tea manufacturing process*. 2016. **64**(24): p. 5011-5019.
53. Songsermsakul, P., E.J.J.o.L.C. Razzazi-Fazeli, and R. Technologies®, *A review of recent trends in applications of liquid chromatography-mass spectrometry for determination of mycotoxins*. 2008. **31**(11-12): p. 1641-1686.
54. Santana-Mayor, A., et al., *Current trends in QuEChERS method. A versatile procedure for food, environmental and biological analysis*. Trends Anal Chem, 2019. **116**: p. 214-235.
55. Tuzimski, T. and T. Rejczak, *Application of HPLC-DAD after SPE/QuEChERS with ZrO₂-based sorbent in d-SPE clean-up step for pesticide analysis in edible oils*. Food chemistry, 2016. **190**: p. 71-79.
56. Lee, Y.-J., et al., *Detection of three herbicide, and one metabolite, residues in brown rice and rice straw using various versions of the QuEChERS method and liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. Food Chemistry, 2016. **210**: p. 442-450.
57. Stremel, T.R.D.O., et al., *Development, validation and matrix effect of a QuEChERS method for the analysis of organochlorine pesticides in fish tissue*. Journal of Environmental Science and Health, Part B, 2018. **53**(4): p. 246-254.

58. Cruzeiro, C., et al., *Development and application of a QuEChERS-based extraction method for the analysis of 55 pesticides in the bivalve Scrobicularia plana by GC-MS/MS*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2016. **408**(14): p. 3681-3698.
59. Stocka, J., M. Biziuk, and J. Namieśnik, *Analysis of pesticide residue in fruits and vegetables using analytical protocol based on application of the QuEChERS technique and GC-ECD system*. International Journal of Global Environmental Issues, 2016. **15**(1-2): p. 136-150.
60. Guedes, J.A.C., et al., *Matrix effect in guava multiresidue analysis by QuEChERS method and gas chromatography coupled to quadrupole mass spectrometry*. Food Chemistry, 2016. **199**: p. 380-386.
61. Cabrera, L.d.C., et al., *Evaluation of alternative sorbents for dispersive solid-phase extraction clean-up in the QuEChERS method for the determination of pesticide residues in rice by liquid chromatography with tandem mass spectrometry*. Journal of Separation Science, 2016. **39**(10): p. 1945-1954.
62. Truong, L.T., et al., *Various extraction methods for detection of bistrifluron residues in Asian pear using high-performance liquid chromatography: Application to dissipation patterns under open-field conditions*. Biomedical Chromatography, 2016. **30**(10): p. 1535-1540.
63. Barriga, R.E.O., et al., *Determination of organochlorine pesticides in organic quinoa grains (Chenopodium quinoa Willd.) by GC- μ ECD, using the QuEChERS method*. Revista Investigaciones Altoandinas, 2016. **18**(1): p. 19-26.
64. Paz, M., et al., *Application of the QuEChERS method for the determination of organochlorine pesticide residues in Brazilian fruit pulps by GC-ECD*. Journal of Environmental Science and Health, Part B, 2017. **52**(1): p. 48-58.
65. May, M.M., et al., *Determination of pesticide residues in soy-based beverages using a QuEChERS method (with clean-up optimized by central composite design) and ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. Food Analytical Methods, 2017. **10**(2): p. 369-378.
66. Hamed, A.M., et al., *Evaluation of a new modified QuEChERS method for the monitoring of carbamate residues in high-fat cheeses by using UHPLC-MS/MS*. Journal of separation science, 2017. **40**(2): p. 488-496.
67. Rejczak, T. and T. Tuzimski, *Method development for sulfonylurea herbicides analysis in rapeseed oil samples by HPLC-DAD: Comparison of zirconium-based sorbents and EMR-lipid for clean-up of QuEChERS extract*. Food analytical methods, 2017. **10**(11): p. 3666-3679.
68. Nantia, E.A., et al., *QuEChERS-based method for the determination of carbamate residues in aromatic herbs by UHPLC-MS/MS*. Food chemistry, 2017. **216**: p. 334-341.
69. Malhat, F.M., *Persistence of metalaxyl residues on tomato fruit using high performance liquid chromatography and QuEChERS methodology*. Arabian journal of chemistry, 2017. **10**: p. S765-S768.
70. Łozowicka, B., et al., *The fate of spirotetramat and dissipation metabolites in Apiaceae and Brassicaceae leaf-root and soil system under greenhouse conditions estimated by modified QuEChERS/LC-MS/MS*. Science of The Total Environment, 2017. **603**: p. 178-184.
71. Rejczak, T. and T. Tuzimski, *QuEChERS-based extraction with dispersive solid phase extraction clean-up using PSA and ZrO₂-based sorbents for determination of pesticides in bovine milk samples by HPLC-DAD*. Food chemistry, 2017. **217**: p. 225-233.
72. Steinborn, A., et al., *Development of a QuEChERS-based method for the simultaneous determination of acidic pesticides, their esters, and conjugates following alkaline hydrolysis*. Journal of agricultural and food chemistry, 2017. **65**(6): p. 1296-1305.

73. Singh, S., A. Srivastava, and S.P. Singh, *Inexpensive, effective novel activated carbon fibers for sample cleanup: application to multipesticide residue analysis in food commodities using a QuEChERS method*. Analytical and bioanalytical chemistry, 2018. **410**(8): p. 2241-2251.
74. Rutkowska, E., B. Łozowicka, and P. Kaczyński, *Modification of multiresidue QuEChERS protocol to minimize matrix effect and improve recoveries for determination of pesticide residues in dried herbs followed by GC-MS/MS*. Food analytical methods, 2018. **11**(3): p. 709-724.
75. Zheng, W., et al., *Development and validation of modified QuEChERS method coupled with LC-MS/MS for simultaneous determination of cymiazole, fipronil, coumaphos, fluvalinate, amitraz, and its metabolite in various types of honey and royal jelly*. Journal of Chromatography B, 2018. **1072**: p. 60-69.
76. Varela-Martínez, D.A., et al., *Analysis of multiclass pesticides in dried fruits using QuEChERS-gas chromatography tandem mass spectrometry*. Food chemistry, 2019. **297**: p. 124961.
77. Manav, Ö.G., Ş. Dinç-Zor, and G. Alpdoğan, *Optimization of a modified QuEChERS method by means of experimental design for multiresidue determination of pesticides in milk and dairy products by GC-MS*. Microchemical Journal, 2019. **144**: p. 124-129.
78. Mandal, S., et al., *Validation of a modified QuEChERS method to determine multiclass multipesticide residues in apple, banana and guava using GC-MS and LC-MS/MS and its application in real sample analysis*. SN Applied Sciences, 2020. **2**(2): p. 1-14.
79. Barci, P.E., et al., *Modified QuEChERS Method for Multiresidue Determination of Pesticides in Pecan Nuts by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry*. Food Analytical Methods, 2020. **13**(3): p. 793-801.
80. Badawy, M.E., M.S. Mahmoud, and M.M. Khattab, *Residues and dissipation kinetic of abamectin, chlorfenapyr and pyridaben acaricides in green beans (Phaseolus vulgaris L.) under field conditions using QuEChERS method and HPLC*. Journal of Environmental Science and Health, Part B, 2020: p. 1-8.
81. Kuzukiran, O. and A. Filazi, *Determination of selected polychlorinated biphenyl residues in meat products by QuEChERS method coupled with gas chromatography-mass spectrometry*. Food Analytical Methods, 2016. **9**(7): p. 1867-1875.
82. Grande-Martínez, Á., et al., *Optimization of a modified QuEChERS method for the determination of tetracyclines in fish muscle by UHPLC-MS/MS*. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, 2018. **155**: p. 27-32.
83. Malhat, F., et al., *Validation of QuEChERS based method for determination of fenitrothion residues in tomatoes by gas chromatography-flame photometric detector: Decline pattern and risk assessment*. Food chemistry, 2017. **229**: p. 814-819.
84. Urban, M. and C. Lesueur, *Comparing d-SPE sorbents of the QuEChERS extraction method and EMR-lipid for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH4) in food of animal and plant origin*. Food Analytical Methods, 2017. **10**(7): p. 2111-2124.
85. Martínez-Piernas, A.B., et al., *Validation and application of a multiresidue method based on liquid chromatography-tandem mass spectrometry for evaluating the plant uptake of 74 microcontaminants in crops irrigated with treated municipal wastewater*. Journal of Chromatography A, 2018. **1534**: p. 10-21.
86. de Oliveira Arias, J.L., et al., *Chitosan from shrimp shells: A renewable sorbent applied to the clean-up step of the QuEChERS method in order to determine multi-residues of veterinary drugs in different types of milk*. Food chemistry, 2018. **240**: p. 1243-1253.

87. Hernández-Mesa, M., A.M. García-Campaña, and C. Cruces-Blanco, *Development and validation of a QuEChERS method for the analysis of 5-nitroimidazole traces in infant milk-based samples by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. *Journal of Chromatography A*, 2018. **1562**: p. 36-46.
88. Slámová, T., et al., *Application of QuEChERS-EMR-Lipid-DLLME method for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked food of animal origin*. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2020. **87**: p. 103420.
89. Fontana, A.R. and R. Bottini, *QuEChERS Method for the Determination of 3-Alkyl-2-Methoxypyrazines in Wines by Gas Chromatography-Mass Spectrometry*. *Food Analytical Methods*, 2016. **9**(12): p. 3352-3359.
90. Inostroza, P.A., et al., *Body burden of pesticides and wastewater-derived pollutants on freshwater invertebrates: Method development and application in the Danube River*. *Environmental pollution*, 2016. **214**: p. 77-85.
91. Daniele, G., et al., *Development of a multi-residue analysis of diclofenac and some transformation products in bivalves using QuEChERS extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Application to samples from mesocosm studies*. *Talanta*, 2016. **155**: p. 1-7.
92. Capela, D., et al., *Volatile methylsiloxanes in personal care products—using QuEChERS as a “green” analytical approach*. *Talanta*, 2016. **155**: p. 94-100.
93. Srivastava, A., et al., *Simultaneous determination of multiclass pesticide residues in human plasma using a mini QuEChERS method*. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 2017. **409**(15): p. 3757-3765.
94. Taliansky-Chamudis, A., et al., *Validation of a QuEChERS method for analysis of neonicotinoids in small volumes of blood and assessment of exposure in Eurasian eagle owl (*Bubo bubo*) nestlings*. *Science of the Total Environment*, 2017. **595**: p. 93-100.
95. Kurth, D., et al., *Measuring the internal concentration of volatile organic compounds in small organisms using micro-QuEChERS coupled to LVI–GC–MS/MS*. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 2017. **409**(25): p. 6041-6052.
96. Kim, J., et al., *Analysis of Nicotine Metabolites in Hair and Nails Using QuEChERS Method Followed by Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry*. *Molecules*, 2020. **25**(8): p. 1763.
97. Rizzetti, T.M., et al., *Optimization of a QuEChERS based method by means of central composite design for pesticide multiresidue determination in orange juice by UHPLC–MS/MS*. *Food Chemistry*, 2016. **196**: p. 25-33.
98. Chung, H.S., et al., *Simultaneous determination of sulfoxaflo and its metabolites, X11719474 and X11721061, in brown rice and rice straw after field application using LC-MS/MS*. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 2017. **97**(2): p. 99-111.
99. Rai, S., et al., *Comparative evaluation of QuEChERS method coupled to DLLME extraction for the analysis of multiresidue pesticides in vegetables and fruits by gas chromatography-mass spectrometry*. *Food Analytical Methods*, 2016. **9**(9): p. 2656-2669.
100. Janaki, P., et al., *Residue of bensulfuron methyl in soil and rice following its pre-and post-emergence application*. *Plant, Soil and Environment*, 2016. **62**(9): p. 428-434.
101. Tavakoli, M., et al., *Application of Fe₃O₄/RGO Nanocomposite as a Sorbent of Pesticides*. *Chromatographia*, 2017. **80**(9): p. 1423-1432.
102. Kemmerich, M., et al., *Comprehensive method validation for the determination of 170 pesticide residues in pear employing modified QuEChERS without clean-up and ultra-high*

- performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry*. Food analytical methods, 2018. **11**(2): p. 556-577.
103. Villaverde, J.J., et al., *Computational-based study of QuEChERS extraction of cyclohexanedione herbicide residues in soil by chemometric modeling*. Molecules, 2018. **23**(8): p. 2009.
 104. Valente, I.M., L.M. Gonçalves, and J.A. Rodrigues, *Another glimpse over the salting-out assisted liquid-liquid extraction in acetonitrile/water mixtures*. Journal of Chromatography A, 2013. **1308**: p. 58-62.
 105. Li, W., et al., *Measurement of pyrethroids and their environmental degradation products in fresh fruits and vegetables using a modification of the quick easy cheap effective rugged safe (QuEChERS) method*. Talanta, 2016. **151**: p. 42-50.
 106. Ramadan, G., et al., *Dissipation of four insecticides in tomato fruit using high performance liquid chromatography and QuEChERS methodology*. Chilean journal of agricultural research, 2016. **76**(1): p. 129-133.
 107. Faraji, M., et al., *Determination of acetamiprid, imidacloprid, and spirotetramat and their relevant metabolites in pistachio using modified QuEChERS combined with liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. Food chemistry, 2018. **240**: p. 634-641.
 108. Zainudin, B.H. and S. Salleh, *Method development, optimization and validation of matrix hydration effect on pesticide residues in cocoa beans using modified QuEChERS method and gas chromatography tandem mass spectrometry*. Food Analytical Methods, 2017. **10**(12): p. 3874-3885.
 109. Grande-Martínez, Á., et al., *Optimization and validation of a multiresidue pesticide method in rice and wheat flour by modified QuEChERS and GC-MS/MS*. Food analytical methods, 2016. **9**(2): p. 548-563.
 110. Rahman, M.M., et al., *QuEChERS method for the simultaneous quantification of phorate and its metabolites in porcine and chicken muscle and table eggs using ultra-high performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry*. Journal of Separation Science, 2016. **39**(11): p. 2079-2086.
 111. Peromingo, B., et al., *Sensitive determination of cyclopiazonic acid in dry-cured ham using a QuEChERS method and UHPLC-MS/MS*. Food chemistry, 2018. **263**: p. 275-282.
 112. Dagnac, T., et al., *Validation and application of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry based method for the assessment of the co-occurrence of mycotoxins in maize silages from dairy farms in NW Spain*. Food Additives & Contaminants: Part A, 2016. **33**(12): p. 1850-1863.
 113. Fontana, A.R., et al., *High-throughput modified QuEChERS method for the determination of the mycotoxin tenuazonic acid in wine grapes*. RSC advances, 2016. **6**(98): p. 95670-95679.
 114. González-Jartín, J.M., et al., *A QuEChERS based extraction procedure coupled to UPLC-MS/MS detection for mycotoxins analysis in beer*. Food chemistry, 2019. **275**: p. 703-710.
 115. Alcántara-Durán, J., et al., *Use of a modified QuEChERS method for the determination of mycotoxin residues in edible nuts by nano flow liquid chromatography high resolution mass spectrometry*. Food chemistry, 2019. **279**: p. 144-149.
 116. de Oliveira Arias, J.L., et al., *Fast and simple method of simultaneous preservative determination in different processed foods by QuEChERS and HPLC-UV: Method development, survey and estimate of daily intake*. Food chemistry, 2019. **293**: p. 112-119.
 117. Pu, C.-H., et al., *Modified QuEChERS method for 24 plant growth regulators in grapes using LC-MS/MS*. journal of food and drug analysis, 2018. **26**(2): p. 637-648.
 118. Neely, S., et al., *Application of dispersive solid phase extraction for trace analysis of toxic chemicals in foods*. Journal of Chromatography B, 2018. **1092**: p. 65-71.

119. Rodríguez-Ramos, R., et al., *A simple, fast and easy methodology for the monitoring of plastic migrants in alcoholic and non-alcoholic beverages using the QuEChERS method prior to gas chromatography tandem mass spectrometry*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2020. **412**(7): p. 1551-1561.
120. Silva, B., et al., *Improved strategy based on QuEChERS method followed by HPLC/DAD for the quantification of phenolic compounds from Mimosa scabrella Bentham honeydew honeys*. LWT, 2019. **116**: p. 108471.
121. Gressler, V., et al., *Development of a readily applied method to quantify ractopamine residue in meat and bone meal by QuEChERS-LC-MS/MS*. Journal of Chromatography B, 2016. **1015**: p. 192-200.
122. Karageorgou, E., et al., *Detection of β -lactams and chloramphenicol residues in raw milk—development and application of an HPLC-DAD method in comparison with microbial inhibition assays*. Foods, 2018. **7**(6): p. 82.
123. Vela-Soria, F., et al., *QuEChERS and ultra-high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for the determination of parabens and ultraviolet filters in human milk samples*. Journal of Chromatography a, 2018. **1546**: p. 1-9.
124. Adenuga, A.A., et al., *Biomonitoring of phthalate esters in breast-milk and urine samples as biomarkers for neonates' exposure, using modified quechers method with agricultural biochar as dispersive solid-phase extraction absorbent*. Microchemical Journal, 2020. **152**: p. 104277.
125. Ferronato, G., et al., *Determination of organochlorine pesticides (OCPs) in breast milk from Rio Grande do Sul, Brazil, using a modified QuEChERS method and gas chromatography-negative chemical ionisation-mass spectrometry*. International Journal of Environmental Analytical Chemistry, 2018. **98**(11): p. 1005-1016.
126. Lehmann, E., C. Oltramare, and L.F. De Alencastro, *Development of a modified QuEChERS method for multi-class pesticide analysis in human hair by GC-MS and UPLC-MS/MS*. Analytica chimica acta, 2018. **999**: p. 87-98.
127. Nagatomo, R., et al., *Application of 2-Picolylamine Derivatized Ultra-high Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry for Determination of Short-chain Fatty Acids in Feces Samples*. Analytical Sciences, 2018: p. 18SCP10.
128. Shahrabaki, P.E., et al., *Probabilistic non-carcinogenic and carcinogenic risk assessments (Monte Carlo simulation method) of the measured acrylamide content in Tah-dig using QuEChERS extraction and UHPLC-MS/MS*. Food and chemical toxicology, 2018. **118**: p. 361-370.
129. Sadowska-Rociek, A., E. Cieřlik, and K. Sieja, *Simultaneous sample preparation method for determination of 3-monochloropropane-1, 2-diol and polycyclic aromatic hydrocarbons in different foodstuffs*. Food Analytical Methods, 2016. **9**(10): p. 2906-2916.
130. Chiaia-Hernandez, A.C., et al., *Long-term persistence of pesticides and TPs in archived agricultural soil samples and comparison with pesticide application*. Environmental Science & Technology, 2017. **51**(18): p. 10642-10651.
131. Surma, M., et al., *Optimization of QuEChERS sample preparation method for acrylamide level determination in coffee and coffee substitutes*. Microchemical Journal, 2017. **131**: p. 98-102.
132. Petrarca, M.H. and H.T. Godoy, *Gas chromatography–mass spectrometry determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in baby food using QuEChERS combined with low-density solvent dispersive liquid–liquid microextraction*. Food chemistry, 2018. **257**: p. 44-52.

133. Feddern, V., et al., *Ractopamine analysis in pig kidney, liver and lungs: A validation of the method scope extension using QuEChERS as a sample preparation step*. Journal of Chromatography B, 2018. **1091**: p. 79-86.
134. Herrera-Herrera, A.V., et al., *Development of a QuEChERS-based method combined with gas chromatography-mass spectrometry for the analysis of alkanes in sediments*. Microchemical Journal, 2020: p. 104774.
135. Rotta, E.M., et al., *Determination of phenolic compounds and antioxidant activity in passion fruit pulp (Passiflora spp.) using a modified QuEChERS method and UHPLC-MS/MS*. LWT, 2019. **100**: p. 397-403.
136. Rodrigues, C.A., et al., *Determination of phenolic compounds in red sweet pepper (Capsicum annuum L.) using a modified QuEChERS method and UHPLC-MS/MS analysis and its relation to antioxidant activity*. Journal of the Brazilian Chemical Society, 2019. **30**(6): p. 1229-1240.
137. Nicácio, A.E., et al., *Modified QuEChERS method for phenolic compounds determination in mustard greens (Brassica juncea) using UHPLC-MS/MS*. Arabian Journal of Chemistry, 2020. **13**(3): p. 4681-4690.
138. Kim, J., J.I. Kim, and C.W. Lee, *Development and validation of a modified QuEChERS method coupled with LC-MS/MS to determine arbutin in pear peels*. Food science and biotechnology, 2016. **25**(4): p. 987-992.
139. Pouliopoulos, A., et al., *Quantification of 15 psychotropic drugs in serum and postmortem blood samples after a modified mini-QuEChERS by UHPLC-MS-MS*. Journal of Analytical Toxicology, 2018. **42**(5): p. 337-345.
140. Dulaurent, S., et al., *QuEChERS sample preparation prior to LC-MS/MS determination of opiates, amphetamines, and cocaine metabolites in whole blood*. Analytical and bioanalytical chemistry, 2016. **408**(5): p. 1467-1474.
141. Dybowski, M.P. and A.L. Dawidowicz, *Application of the QuEChERS procedure for analysis of Δ 9-tetrahydrocannabinol and its metabolites in authentic whole blood samples by GC-MS/MS*. Forensic toxicology, 2018. **36**(2): p. 415-423.
142. Kusano, M., et al., *Development of "Quick-DB forensic": A total workflow from QuEChERS-dSPE method to GC-MS/MS quantification of forensically relevant drugs and pesticides in whole blood*. Forensic science international, 2019. **300**: p. 125-135.
143. Li, Z., et al., *Development of a simple method for determination of anti-cancer component of indole-3-carbinol in cabbage and broccoli*. Journal of Food and Nutrition Research, 2017. **5**(9): p. 642-648.
144. Bjeldanes, L.F., et al., *Aromatic hydrocarbon responsiveness-receptor agonists generated from indole-3-carbinol in vitro and in vivo: comparisons with 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin*. Proceedings of the national academy of sciences, 1991. **88**(21): p. 9543-9547.
145. Tam, Y.Y., E. Epstein, and J. Normanly, *Characterization of auxin conjugates in Arabidopsis. Low steady-state levels of indole-3-acetyl-aspartate, indole-3-acetyl-glutamate, and indole-3-acetyl-glucose*. Plant physiology, 2000. **123**(2): p. 589-596.
146. Moussata, J., Z. Wang, and J. Wang, *Development and validation of an HPLC method for the simultaneous quantification of indole-3-carbinol acetate, indole-3-carbinol, and 3, 3'-diindolylmethane in mouse plasma, liver, and kidney tissues*. Journal of Chromatography B, 2014. **958**: p. 1-9.
147. Pilipczuk, T., et al., *Simultaneous determination of indolic compounds in plant extracts by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with UV and fluorescence detection*. Food analytical methods, 2015. **8**(9): p. 2169-2177.

148. Castillo, G., et al., *Cuantificación de AIA por HPLC utilizando el método del estándar interno*. ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar, 2005. **39**(2): p. 51-55.
149. Kema, I.P., et al., *Profiling of tryptophan-related plasma indoles in patients with carcinoid tumors by automated, on-line, solid-phase extraction and HPLC with fluorescence detection*. Clinical Chemistry, 2001. **47**(10): p. 1811-1820.
150. Szkop, M. and W. Bielawski, *A simple method for simultaneous RP-HPLC determination of indolic compounds related to bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid*. Antonie Van Leeuwenhoek, 2013. **103**(3): p. 683-691.
151. Li, G., et al., *A simple and sensitive HPLC method based on pre-column fluorescence labelling for multiple classes of plant growth regulator determination in food samples*. Food chemistry, 2015. **170**: p. 123-130.
152. Alvarez, R., S.J. Nissen, and E.G. Sutter, *Relationship between indole-3-acetic acid levels in apple (*Malus pumila* Mill) rootstocks cultured in vitro and adventitious root formation in the presence of indole-3-butyric acid*. Plant physiology, 1989. **89**(2): p. 439-443.
153. Nordström, A.-C., F.A. Jacobs, and L. Eliasson, *Effect of exogenous indole-3-acetic acid and indole-3-butyric acid on internal levels of the respective auxins and their conjugation with aspartic acid during adventitious root formation in pea cuttings*. Plant physiology, 1991. **96**(3): p. 856-861.
154. Mattivi, F., U. Vrhovšek, and G. Versini, *Determination of indole-3-acetic acid, tryptophan and other indoles in must and wine by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection*. Journal of Chromatography A, 1999. **855**(1): p. 227-235.
155. Böttcher, C., et al., *The biosynthetic pathway of indole-3-carbaldehyde and indole-3-carboxylic acid derivatives in Arabidopsis*. Plant physiology, 2014. **165**(2): p. 841-853.

7. Anexos

Anexo 1

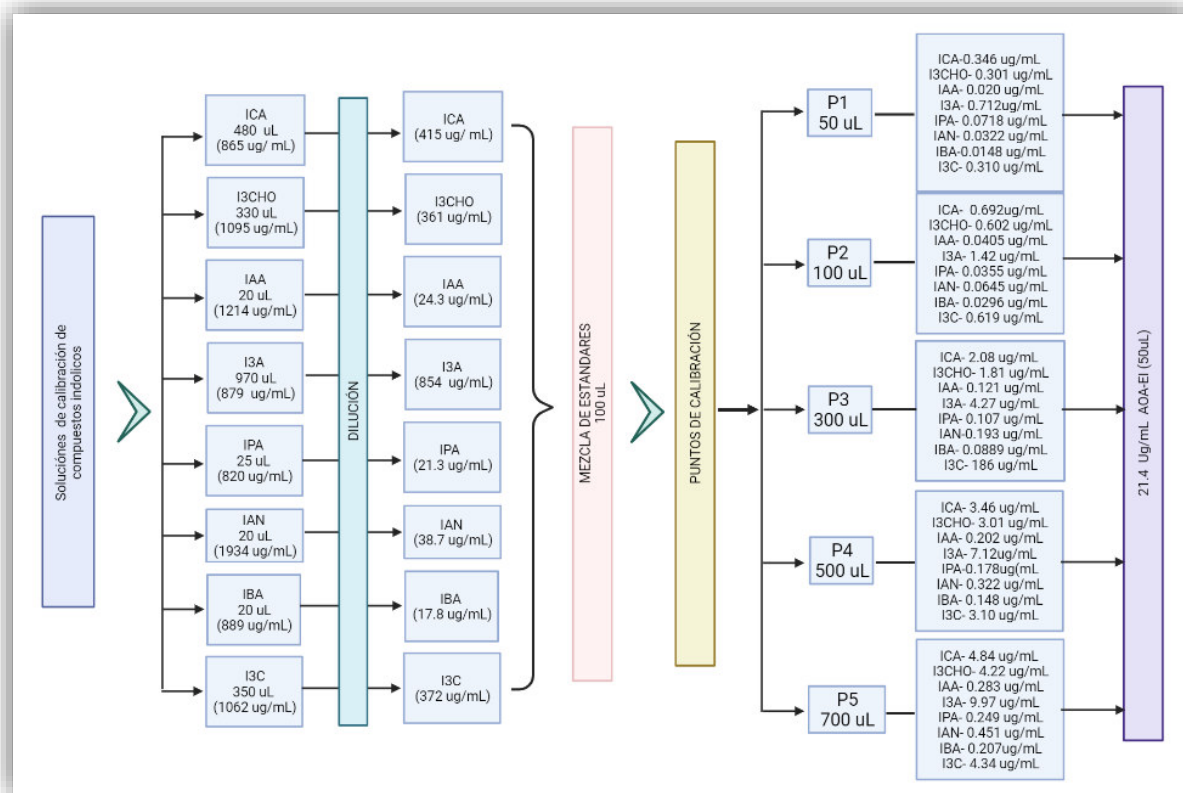


Figura 23. Esquema de preparación de las soluciones de calibración directa y concentraciones finales de indoles en cada punto de la curva de calibración por HPLC con detección de FLD y DAD.