



**Revista  
Colombiana  
de Química**

**Volumen 43, No. 1, enero - abril de 2014**



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA**

**SEDE BOGOTÁ  
FACULTAD DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

## Edición

© Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias - Departamento de Química  
Sede Bogotá

ISBN versión impresa: 0120-2804  
ISBN versión electrónica: 2357-3791  
DOI de la publicación by CrossRef.org:  
<http://dx.doi.org/10.15446/rev.colomb.quim>

## Indizada en

Publindex- Índice Bibliográfico Nacional (categoría A2 - dic 2013)  
Chemical Abstracts  
SciELO Colombia  
Scopus Q4 (SJR/2013: 0,112)  
Latindex  
Redalyc  
Directory of Open Access Journals (DOAJ)

## Periodicidad

Cuatrimestral

## Contacto

Departamento de Química  
Universidad Nacional de Colombia  
Apartado Aéreo 5997  
Bogotá, D.C., Colombia  
Fax: 571- 3165220  
Correo electrónico: [rcolquim\\_fcbog@unal.edu.co](mailto:rcolquim_fcbog@unal.edu.co)

## Consulta Open Acces

<http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/rcolquim>  
[http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_serial&pid=0120-2804&lng=es&nrm=iso](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_serial&pid=0120-2804&lng=es&nrm=iso)

## Directores Revista

Oscar Rodríguez Bejarano, Dr. Sc., Universidad Nacional de Colombia.  
Carlos Eduardo Narváez Cuenca, Ph. D., Universidad Nacional de Colombia.

## Comité Editorial

Cristian Blanco Tirado, Ph. D., Universidad Industrial de Santander.  
Francisco Carrasco Marín, Dr. Sc., Universidad de Granada, España.  
Leonardo Castellano Hernández, Dr. Sc., Universidad Nacional de Colombia.  
Pedro Joseph-Nathan, Dr. Sc., Instituto Politécnico Nacional, México.  
Sonia Moreno Guáqueta, Dr. Sc., Universidad Nacional de Colombia.  
Cristian Ochoa Puentes, Dr. rer. nat., Universidad Nacional de Colombia.  
Luz Patricia Restrepo Sánchez, M. Sc., Universidad Nacional de Colombia.  
Juscelino Tovar, Dr. Sc., Universidad Central de Venezuela.

## Comité Científico

Gustavo Adolfo González Aguilar, Dr. Sc., Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (México).  
Ljubisa R. Radovic, Dr. Sc., Pensilvania State University (USA).  
Augusto Rivera Umaña, Dr. Sc., Universidad Nacional de Colombia.  
Fabio Zuluaga Corrales, Dr. Sc., Universidad del Valle (Colombia).  
Kushalappa Ajjamada, Ph. D., McGill University (Canadá).

## Suscripciones y canje

Valor del ejemplar \$10.000; suscripción anual \$30.000 y US\$30 para el exterior, incluyendo en ambos casos el envío. Los pagos en Colombia deben realizarse mediante consignación en la cuenta de ahorros N° 220012720017 del Banco Popular, a nombre de Fondo Especial, Facultad de Ciencias U.N. Desde el exterior los pagos deben hacerse mediante cheque de un banco de Estados Unidos girado a nombre de Fondo Especial, Facultad de Ciencias U.N. o mediante transferencia electrónica a la cuenta citada anteriormente. Por favor enviar cheques y fotocopias de giros o consignaciones a la dirección de la Revista Col. de Química.

Para canjes dirigirse al SINAB: [bibteca\\_bog@unal.edu.co](mailto:bibteca_bog@unal.edu.co) ó [cevelascoza@unal.edu.co](mailto:cevelascoza@unal.edu.co)

## Propósito y alcance

La Revista Colombiana de Química es publicada cuatrimestralmente por el Departamento de Química de la Universidad Nacional de Colombia. Publica contribuciones provenientes de la investigación en las diversas áreas de la química. El contenido de los artículos debe ser original, inédito y no debe haber sido enviado, total o parcialmente, para publicación a otra revista. La redacción asume el derecho de reproducción de los trabajos aceptados. Su publicación en otro medio requiere permiso del editor. La revista está dirigida a estudiantes y profesionales relacionados con cualquier área de la química.

## Preparación editorial

Juan Sebastián Forero Frasser, asistente editorial.  
Carlos Andrés Peña, asistente editorial.  
Coordinación de Publicaciones.  
Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia. Sede Bogotá.  
Cuidado editorial: Juan Sebastián Forero Frasser.  
Diseño y maquetación: Julián Hernández - Taller de Diseño.  
Impresión: Digiprint Editores E.U.

## Química Orgánica y Bioquímica

- Photochemical and electrochemical studies on lanthanide complexes of 6-(hydroxymethyl) pyridine-2-carboxaldehyde[2-methyl-pyrimidine-4,6-diyl]bis-hydrazone  
Estudios fotoquímicos y electroquímicos de complejos lantánidos de 6-(hidroximetil)piridin-2-carboxaldehído[2-metilpirimidina-4,6-diil]bishidrazona  
Estudios fotoquímicos e eletroquímicos do complexos lantanídeos do 6-(hidroximetil)piridin-2-carboxaldeído[2-metilpirimidina-4,6-diil]bis-hidrazona  
*Mara Alejandra Fernández, Juan Camilo Barona, Dorian Polo-Cerón, Manuel N. Chaur*

5-11

- Lignanos diarildimetilbutanos y otros constituyentes aislados de *Nectandra turbacensis* (kunth) nees (lauraceae)  
Diaryl dimethylbutane lignans and other constituents isolated from *Nectandra turbacensis* (kunth) nees (lauraceae)  
Lignanas diaryldimethylbutane e outros constituintes isolado de *Nectandra turbacensis* (kunth) nees (lauraceae)  
*Víctor Macías-Villamizar, Luis E. Cuca-Suárez*

12-16

## Química Aplicada y Analítica

- Comparación de dos metodologías para la determinación de residuos de plaguicidas en agua potable  
Comparison of two methodologies for the determination of pesticides residues in drinking water  
Comparação de metodologias para a determinação de resíduos de pesticidas em água potável  
*Jairo Arturo Guerrero Dallos, Nancy Yohanna Velandia Rodriguez*

17-24

- Desarrollo y validación de un método verde para la extracción y cuantificación de residuos de cipermetrina en tejido animal  
Development and validation of a green method for the extraction and quantification of cypermethrin residues in animal tissue  
Desenvolvimento e validação do método verde para a extração e quantificação dos resíduos da cipermetrina no tecido animal  
*Amanda L. Chaparro, Diana P. Gamboa, Yaneth Cardona, John J. Bustamante, Carlos H. García*

25-29

- Necesidades metrológicas en los laboratorios clínicos  
Metrological needs in clinical laboratories  
Necessidades metrológicas nos laboratórios clínicos  
*John E. Leguizamón, Ivonne A. González, Luisa J. Bernal*

30-35

## Enseñanza de la Química

- Actitudes y rendimiento académico: su evolución desde química general e inorgánica hasta química orgánica  
Attitudes and academic yield: its evolution from general and inorganic chemistry to organic chemistry  
Atitudes e rendimento académico: sua evolução do química geral e inorgânico para química orgânico  
*María S. Reyes, Silvia Porro, María E. Pirovani*

36-41



Recibido: 11 enero 2014. Aceptado: 21 febrero 2014

## Photochemical and electrochemical studies on lanthanide complexes of 6-(hydroxymethyl)pyridine-2-carboxaldehyde[2-methyl-pyrimidine-4,6-diyl] bis-hydrazone

### Abstract

Herein we report the synthesis of the 6-(hydroxymethyl)pyridine-2-carboxaldehyde[2-methyl-pyrimidine-4,6-diyl]bis-hydrazone by a condensation reaction between 6-(hydroxymethyl)picolinaldehyde with 4,6-(bis-hydrazino)-2-methylpyrimidine. This bis-hydrazone can be visualized as a two-arm system which exhibits photochemical induced  $[E,E]/[E,Z]/[Z,Z']$  isomerizations and double coordination to metal centers. Configurational changes, upon UV light irradiation, were followed over time by <sup>1</sup>H NMR, establishing that isomerization, in both arms, is a consecutive reaction that follows first-order kinetics ( $k_1 = 4.06 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  and  $k_2 = 2.80 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ). Furthermore, the synthesis of bis-hydrazone metal complexes with La (III) and Sm (III) ions was achieved; subsequently, the absorption and emission properties of these complexes were studied, determining the fluorescence quantum yields,  $\phi_{La} = 0.2024$  and  $\phi_{Sm} = 0.1413$ . Electrochemical studies of the complexes were conducted by square wave voltammetry, demonstrating that the bis-hydrazone and its complexes are electroactive species between +1.5 and -2.5 V.

**Keywords:** Lanthanide complexes, photochemistry, bis-hidrazones, isomerization, UV-Vis/Fluorescence, electrochemistry.

## Estudios fotoquímicos y electroquímicos de complejos lantánidos de 6-(hidroximetil)piridin-2-carboxaldehído[2-metilpirimidina-4,6-diil] bishidrazona

### Resumen

Se reporta la síntesis de la 6-(hidroximetil)piridin-2-carboxaldehído[2-metilpirimidina-4,6-diil]bishidrazona mediante la reacción de condensación entre el 6-(hidroximetil) piconaldehído con la 4,6-(bishidracino)-2-metilpirimidina. Esta bishidrazona puede ser visualizada como un sistema de dos brazos los cuales exhiben isomerizaciones  $[E,E]/[E,Z]/[Z,Z']$  fotoquímicamente inducidas y coordinación a centros metálicos. Los cambios configuracionales, después de irradiación UV, fueron seguidos en el tiempo mediante RMN <sup>1</sup>H estableciendo que la isomerización, en ambos brazos del sistema, corresponde a una reacción consecutiva que sigue una cinética de primer orden ( $k_1 = 4,06 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  y  $k_2 = 2,80 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ). Además se prepararon complejos metálicos de La (III) y Sm(III), seguidamente, las propiedades de absorción y emisión de dichos complejos fueron estudiadas calculando rendimientos cuánticos de fluorescencia de  $\phi_{La} = 0,2024$  y  $\phi_{Sm} = 0,1413$ . Estudios electroquímicos de los complejos se llevaron a cabo a través de voltametría de onda cuadrada indicando que los compuestos preparados poseen potenciales redox dentro del rango de trabajo del solvente.

**Palabras clave:** Complejos lantánidos, fotoquímica, bis-hidrazonas, isomerización UV-Vis/fluorescencia, electroquímica.

## Estuduios fotoquímicos e eletroquímicos do complexos lantanídeos do 6-(hidroximetil) piridin-2-carboxaldeído[2-metilpirimidina-4,6-diil] bis-hidrazona

### Resumo

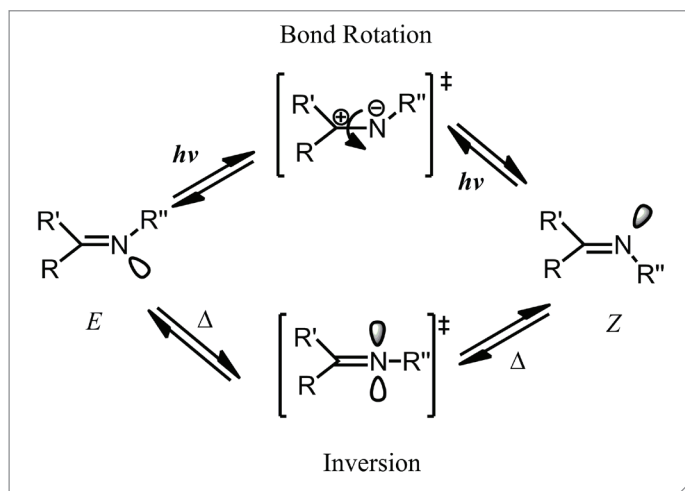
Reporta-se a síntese da 6-(hidroximetil)piridin-2-carboxaldeído[2-metilpirimidina-4,6-diil]bis-hidrazona mediante a reação de condensação entre o 6-(hidroximetil) piconaldeído e a 4,6-(bis-hidrazino)-2-metilpirimidina. Esta bis-hidrazona pode ser visualizada como um sistema de dois braços os quais exibem isomerizações  $[E,E]/[E,Z]/[Z,Z']$  fotoquímicamente induzidas e coordenação com íons metálicos (dupla coordenação a íons metálicos). Após a irradiação UV, as mudanças configuracionais foram monitoradas com o tempo por RMN <sup>1</sup>H. Essas medidas estabeleceram que a isomerização em ambos braços do sistema corresponde a uma reação consecutiva apresentando uma cinética de primeira ordem ( $k_1 = 4.06 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  e  $k_2 = 2.80 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ). Além disso, os complexos metálicos de La (III) e Sm(III) foram preparados e suas propriedades de absorção e de emissão foram estudadas, calculando os rendimentos quânticos de fluorescência de  $\phi_{La} = 0.2024$  e de  $\phi_{Sm} = 0.1413$ . Estudos eletroquímicos dos complexos foram feitos através de voltametria de onda quadrada indicando que os compostos preparados possuem potenciais redox dentro da faixa de trabalho do solvente.

**Palavras-Chave:** complexos lantanídeos, fotoquímica, bis-hidrazonas, isomerização UV-Vis/fluorescência, eletroquímica.

## Introduction

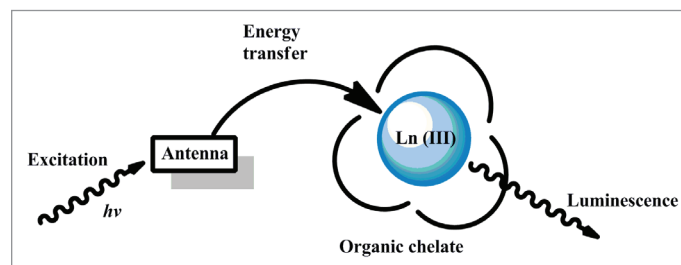
Hydrazones are a family of organic compounds that contain the  $=R-C(R_1)=N-NH-R_2$  group, which is formed by the condensation of hydrazine derivatives with aldehydes or ketones (1). Hydrazones have been of great interest due to three main characteristics: a) the possibility of attach different substituents  $R$ ,  $R_1$  and  $R_2$  in their structure; b) the photochemically induced  $E/Z$  isomerization undergone by the double bond of the imine group; and c) the capacity to chelate metal ions according to the nature of their  $R$  groups. These characteristics allow hydrazones to present diverse applications in the industry as plasticizers, polymer stabilizers, antioxidants and polymerization initiators, or in the biomedicine field in the development of new compounds with anticonvulsant, antidepressant, analgesic, anti-inflammatory, antimalarial, antibiotic, antitubercular, vasodilatory, antitumor and antiviral properties, among others (2-5 and therein).

The hydrazones represent dynamic systems capable of acting as multiple state molecular devices in which, depending on the appropriated substituents, the presence of coordination sites allows the controlled blocking and unblocking by metal ions and the interconversion of different configurational states (6, 7). In addition, some of these compounds exhibit photoinduced  $E/Z$  isomerization which can be reversed under light or heat conditions to restore the initial configuration (7, 8). This property is one of the reasons that hydrazones have been of great importance, as they present high biological activity and a wide range of applications in molecular machines and for information storage devices (7). The photochemically and thermally induced isomerization process in hydrazones is illustrated in Scheme 1. When irradiated with ultraviolet light, these imino-type compounds undergo isomerization of the  $E$  state, which is the thermodynamically most stable state, to the least stable  $Z$  state.



**Scheme 1.** The photochemically and thermally activated isomerization process of hydrazones.

The capacity of these compounds to chelate metal ions has allowed the characterization of various structures including lanthanide elements (9-11). The great attraction of lanthanide metal complexes is mainly based on their low toxicity, their luminescent and paramagnetic properties, their relatively high natural abundance and their accessible price (except for  $Sc^{3+}$ ) (12). In addition, the trivalent lanthanide ions ( $Ln^{3+}$ ) potentially have high and diverse coordination numbers with flexible coordination environments, where they behave as Pearson hard acids, showing a strong affinity for strong bases with neutral or negatively charged oxygen or nitrogen atoms (13). However, the photoluminescence of trivalent lanthanide ions can be inefficient because they exhibit low molar absorption coefficients ( $\epsilon$ ), the majority of the transitions in the absorption spectra of the lanthanide ions are lower than  $10 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Consequently, only a very limited amount of radiation is absorbed by direct excitation of the  $4f$  levels. However, this problem can be overcome by the so-called antenna effect (14), in which a chromophore compound promotes the sensitization of light emission in the lanthanides. The antenna is, in general, a highly  $\pi$ -conjugated aromatic or hetero-aromatic system characterized by a high extinction coefficient that improves the crossing efficiency between systems, and therefore improves the energy transfer processes (see Figure 1) (15).

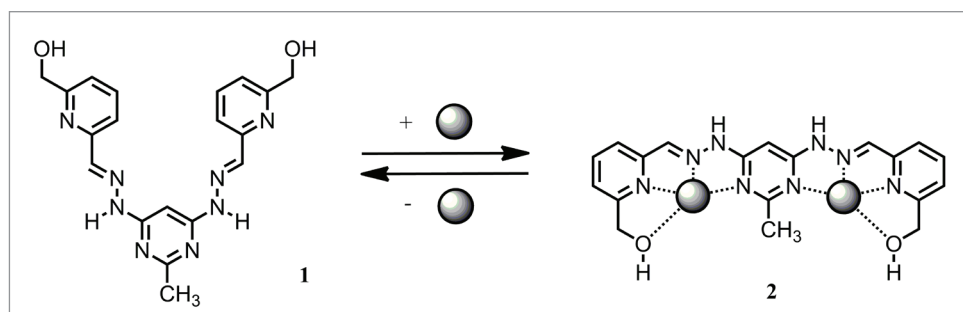


**Figure 1.** Sensitization mechanism in a lanthanide-antenna system.

Special interest is devoted to the design and development of dynamic multifunctional systems, within this aim, bis-hydrazone **1** (Scheme 2) was synthesized remarking that its structure can be visualized as a two-arm system, capable of coordinate two metal centers and it is able to undergo photochemical  $E/Z$  isomerization. Once compound **1** was prepared, light driven isomerization was studied over time; in addition, its effect as an antenna in the luminescence of La and Sm(III) complexes was investigated as well as their electrochemical properties in solution.

## Materials and methods

The FT-IR, NMR (uni- and bidimensional), fluorescence and UV-vis spectra, melting point, refraction index, elemental analysis and elec-



**Scheme 2.** Structure of the complex formed with the 6-(hydroxymethyl)pyridine-2-carboxaldehyde[2-methyl-pyrimidine-4,6-diyl]bis-hydrazone.

trochemical studies were performed in a Shimadzu FTIR-8400 spectrophotometer, a 400 MHz Bruker Ultra Shield NMR spectrometer, a FP-8500 Jasco spectrofluorometer, a UV-Vis UV-1700 PharmaSpec Shimadzu spectrophotometer, a Stuart SMP3 melting point apparatus, an Atago NAR-2T refractometer, a Thermo Flash EA 1112 series elemental analyzer and a CHI760B CH instruments potentiostat, respectively. All reactants and solvents were purchased from Sigma-Aldrich and used without further purification.

### Synthesis of [E,E']-6-(Hydroxymethyl)pyridine-2-carboxaldehyde[2-methyl-pyrimidine-4,6-diyl]bis-hydrazone (E,E') (1)

Compound **1** was synthesized by dissolving 1 eq. of 6-(hydroxymethyl)picolinaldehyde and 2 eq. of 4,6-(bis-hydrazino)-2-methylpyrimidine in dry ethanol; this mixture was refluxed under argon atmosphere for 24 h. The bis-hydrazonic compound was characterized as a light yellow solid with m.p.: 305 °C in a 84 % yield;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ ),  $\delta$ /ppm: 11.33 (s, 2H), 8.08 (s, 2H), 7.91-7.81 (m, 4H), 7.43 (d,  $J$  = 7.03 Hz, 2H), 6.77 (s, 1H), 5.47 (t,  $J$  = 5.90 Hz, 2H), 4.58 (d,  $J$  = 6.02 Hz, 4H), 2.32 (s, 3H).  $^{13}\text{C}$  RMN (101 MHz, DMSO- $d_6$ ),  $\delta$ /ppm: 166.27, 161.98, 161.83, 152.61, 142.00, 137.24, 119.83, 117.45, 79.25, 64.12, 25.06. Elemental analysis calculated for  $\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{N}_8\text{O}_2$  (%): C, 57.10; H, 5.32; N, 27.72; and found (%): C 57.15, H 5.24, N 27.65.

### Photoisomerization of 1

Compound **1** was subjected to *E/Z* photoisomerization by UV light using a Mercury Vapor Lamp of 250 W. This process was monitored by  $^1\text{H}$  NMR, for which samples of **1** were subjected to irradiation with UV light in a quartz NMR tube. The studies were performed in DMSO- $d_6$ .

### Synthesis of the metal complexes of La and Sm (III)

The formation of the metal complexes was conducted using  $\text{LaCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  and compound **1** in a 2:1 ratio, 2 equivalents of sodium hydroxide (NaOH) were added, and the mixture was subjected to reflux under argon for 24 h. The complex with Sm (III) was synthesized from **1** and  $\text{SmCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , in a similar procedure.

### Spectroscopic analysis (UV-Vis/Fluorescence)

Eight solutions of known concentration of the metal complexes in ethanol were prepared adding buffer solutions at different pH values

between 1 and 8 units. The study was monitored by fluorescence and UV-vis spectroscopy.

### Determination of the fluorescence quantum yield ( $\Phi$ )

To perform this measurement, the comparative method of Williams *et al.* (16) was used, which involved the use of a standard sample (tryptophan) with known  $\Phi$  (17). The emission spectra were collected in a wavelength range from 200 to 750 nm.

### Electrochemical analysis of the ligand and the metal complexes

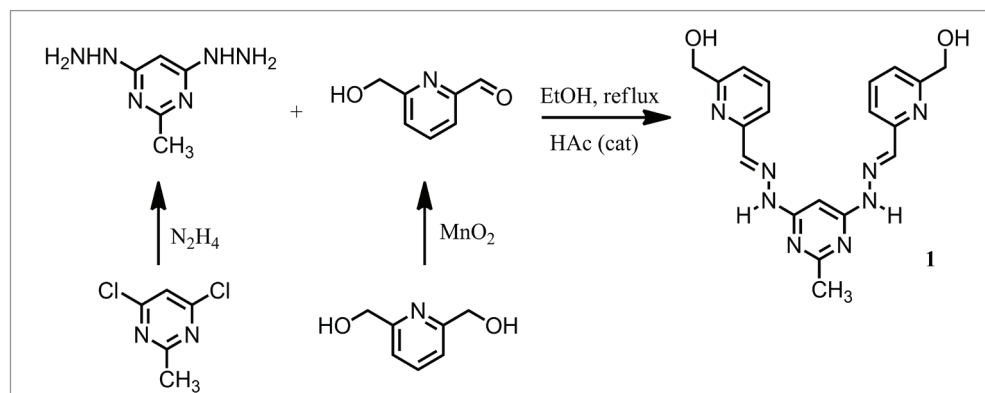
Osteryoung Square Wave Voltammetry was performed in THF containing  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  of  $\text{N}(n\text{-Bu})_4\text{PF}_6$  as the supporting electrolyte. The concentration in analyte was about  $5.0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ . A 2 mm diameter glassy carbon disk was used as the working electrode and a platinum wire as the counter electrode. A silver wire served as a pseudo reference electrode. A small amount of ferrocene was added at the end of each experiment and used as a reference for measuring the potentials.

## Results and discussion

### Synthesis of bis-hydrazone 1

Compound **1** was synthesized by the condensation reaction of 6-(hydroxymethyl)picolinaldehyde with 4,6-(bis-hydrazino)-2-methylpyrimidine in reflux of ethanol, with the addition of catalytic amounts of glacial acetic acid (Scheme 3). A yellow solid was obtained with a yield of 84% and a melting point of 305 °C; this solid was spectroscopically characterized by NMR ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , DEPT-135 and COSY). Bidimensional NMR studies confirmed the *transoid* structure of **1** and the *E,E* configuration.

Compound **1** contains two imine groups that can undergo *E*  $\rightarrow$  *Z* isomerization induced by UV light, this feature might allow the photochemical control of the movement of both arms and therefore this type of compounds exhibit configurational dynamics of potential use in molecular machines and information storage devices. The pyridine-imine-pyrimidine-imine-pyrimidine framework allows the formation of bimetallic complexes (3, 7) and, under special reaction conditions, is able of forming grids and other supramolecular architectures (3). On the other hand, the acidic N-H proton can be removed by the addition of a base, resulting in stronger metal complexes with different electronic properties.



**Scheme 3.** Synthesis of bis-hydrazone 1.

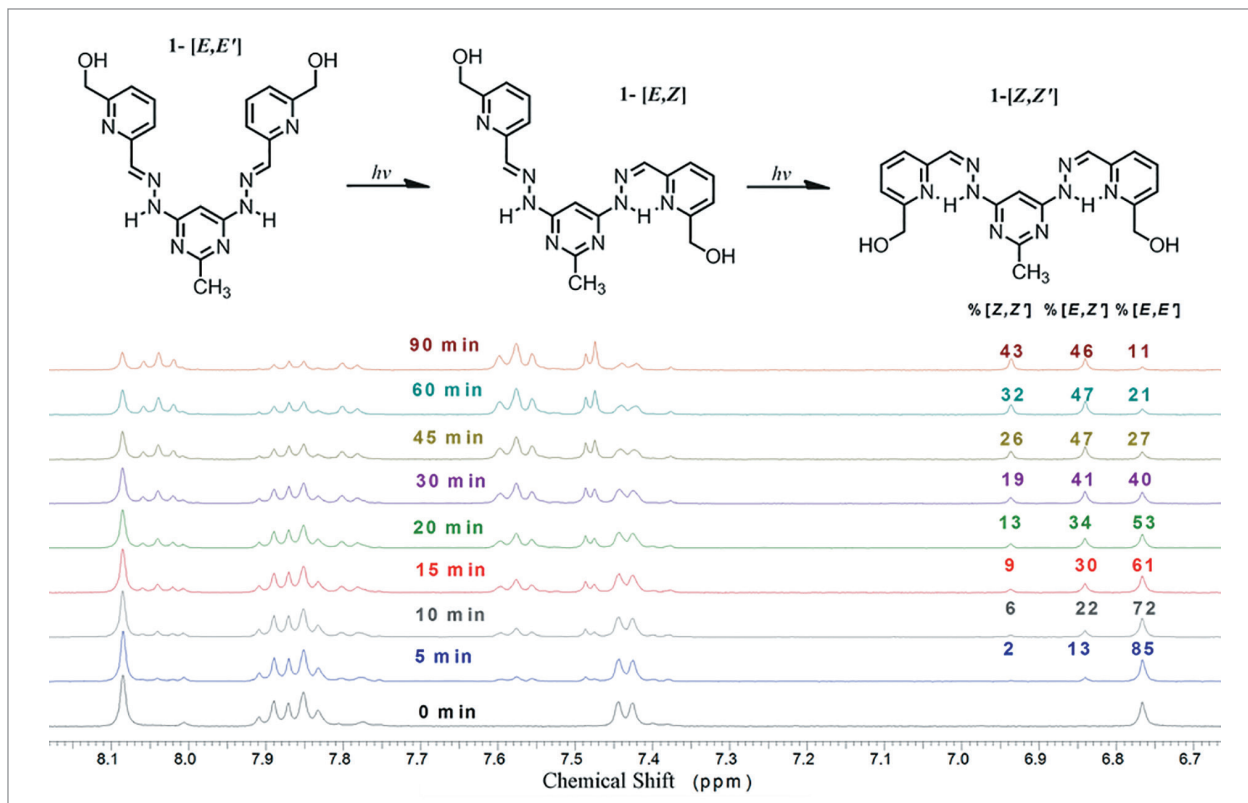


# Photochemical studies of bis-hydrazone 1

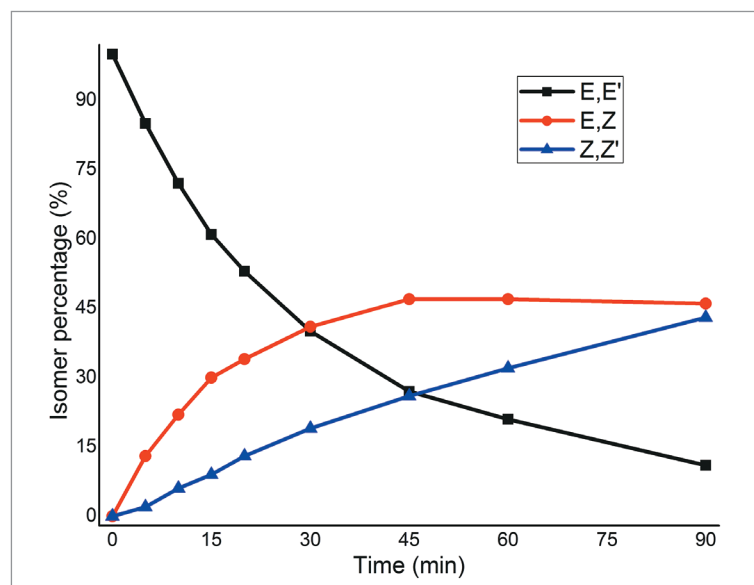
Compound **1** was subjected to controlled *E/Z* isomerization with UV light. In order to investigate the occurrence of isomers in their *Z* and *E* configurations, solutions of 1-*[E,E']* 30.58 mM in DMSO-*d*<sub>6</sub> were prepared in quartz NMR tubes and irradiated with a mercury vapor lamp of 250 W for different times varying between 0–90 min; the photoisomerization was monitored by <sup>1</sup>H NMR spectroscopy. To quantify the amounts of the *E,Z'* and *Z,Z'* isomers formed, the signal of proton 5 of

the pyrimidine ring was taken as a reference (see Figure 2). When examining the <sup>1</sup>H NMR spectrum, the singlet at 6.83 ppm, corresponding to the *N-H* proton, splits as the *E,Z* and *Z,Z'* isomers are formed, indicating the formation of intramolecular hydrogen bonds.

Photoisomerization was monitored over time and the relative amounts of each isomer were calculated (see Figure 3) and used to determine a first order consecutive reaction (of type *E,E' E,Z Z,Z'*) with kinetic constants  $k_1 = 4.06 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  and  $k_2 = 2.80 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ , the formation percentages of the *Z,Z'* and *E,Z* isomers were 43 and 46% respectively, after irradiating the sample during 90 min (when equilibrium was reached).



**Figure 2.** Photoisomerization of **1**. Top: Scheme of photochemically activated isomerization. Bottom: <sup>1</sup>H NMR (400 MHz) spectra of bis-hydrazone **1** in DMSO-*d*<sub>6</sub> at different irradiation times in a quartz tube (for clarity, only the aromatic region of the spectra is shown).



**Figure 3.** Isomer percentages vs. irradiation time.



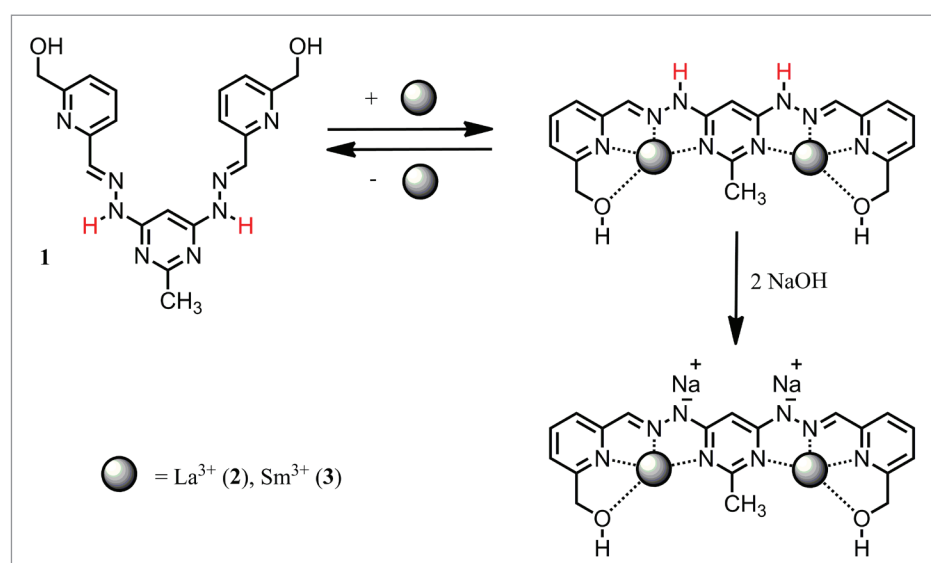
These results allowed quantification of the irradiation times at which separation would produce a greater yield of isomers  $[E,Z]$  and  $[Z,Z']$ . In addition, the formation of metastable compounds such as  $[E,Z]$  and  $[Z,Z']$  that exhibit different absorption and emission properties and that can also be thermally driven to  $[E,E']$  makes it possible to obtain multiple dynamics systems.

### Reaction of 6-(hydroxymethyl)pyridine-2-carboxaldehyde[2-methylpyrimidine-4,6-diyl]bis-hydrazone with lanthanide chlorides

The reaction of **1** in refluxing ethanol with trivalent metal salts ( $\text{LaCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  and  $\text{SmCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) in the presence of two equivalents of sodium hydroxide led to the formation of the neutral complexes **2** and **3** (Scheme 4). These compounds were obtained as solids with moderated yields (50–76%), (see Table 1).

### Spectroscopic analysis (UV-Vis/Fluorescence)

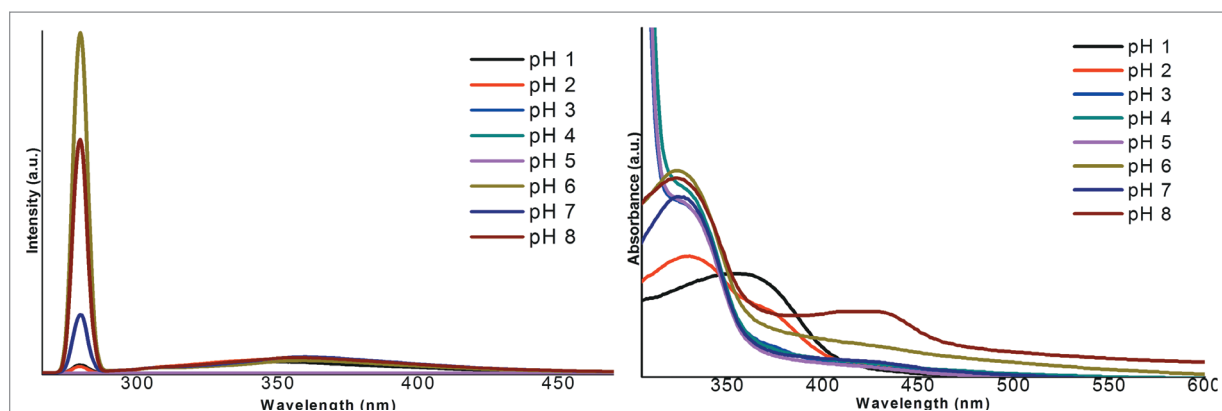
Fluorescence and UV/Vis spectra were carried out in buffer solutions of pH between 1 and 8. The emission spectra of complex **3** in the pH interval of 6–8 exhibited a marked fluorescence improvement, while at pH between 4 and 5 the fluorescence intensity was sharply reduced. Consistently, the optical behavior shown by the complex at different pH values can be attributed to a sensitization of the hydrazine (antenna); this ligand can be protonated and deprotonated under acidic and alkaline conditions, and therefore, the coordination strength can be tunneled, as a consequence a greater efficiency is observed in the energy transmission (see Figure 4). The electronic spectrum of complex **3** has a band of significant absorption at a  $\lambda_{\text{max}}$  of  $\sim 311$  nm in the pH interval of 3–5; this result indicates the protonation of the hydrazone. Consequently, it is demonstrated that the ligand, in this pH range, is a good organic chelator that absorbs energy and transfers it to the Sm (III) ion.



**Scheme 4.** Formation reaction of the metal complexes **2** and **3** with **1**.

**Table 1.** Characteristics of the complexes **2** and **3**.

Compound	Yield (%)	Color	Decomposition temperature (°C)
2	76	Violet	312
3	50	Dark yellow	298



**Figure 4.** Spectra of **3** at different pH values. Left: Fluorescence at  $\lambda_{\text{exc}} = 280.5$  nm. Right: UV-Vis.

This absorption maximum occurs due to the  $\pi$ - $\pi^*$  and  $n$ - $\pi^*$  transitions of the fluorophore.

### Determination of the fluorescence quantum yield ( $\phi$ )

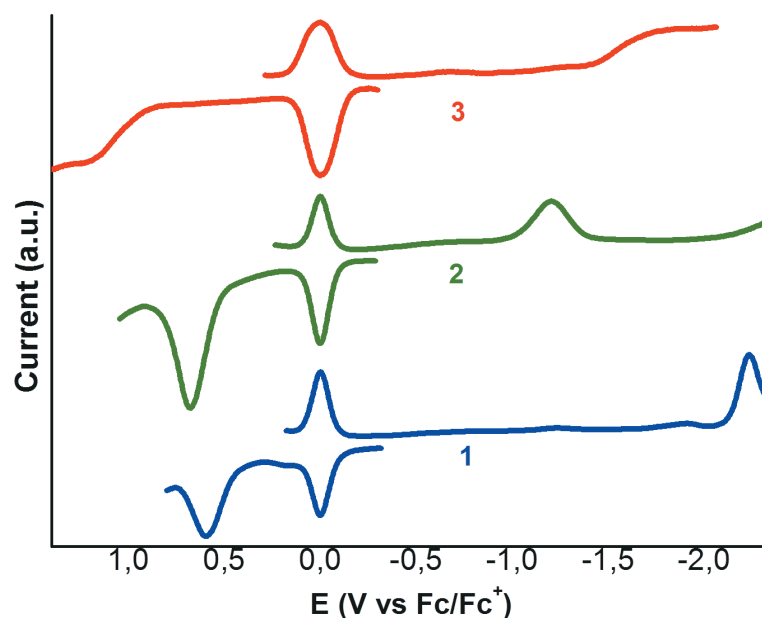
The fluorescence quantum yields were determined by comparison to the emission intensity of a tryptophan sample in water as standard (16, 17). Compound **1** barely showed fluorescence in ethanol (see Table 2); however, its complexes with lanthanide ions exhibited a relatively strong fluorescence with an increase in  $\phi$  of  $\sim 74$  times for complex **2** and  $\sim 52$  times for complex **3**.

The greater  $\phi$  values result from the suppression of the non-radiant relaxation of the excited state through increased structure rigidity and the sensitization of the metal  $f$ - $f$  transitions. A slight decrease in the  $\phi$  value of the complex with La(III) was observed with respect to the complex formed with Sm(III), caused by a decrease in the ionic radius. The acidity of the metal centers plays a fundamental role in the improvement of  $\phi$  due to an increase in the size of the different metal centers with the same oxidation state. According to Pearson's acid-base concept, the trivalent lanthanide ions behave as hard acids, with low polarizability and high oxidation number (18). Because hard acids interact strongly with hard bases, the lanthanide ions preferentially form very stable complexes with ligands that contain donating atoms such as oxygen or nitrogen (13), so that La(III) will have a greater affinity towards the ligand; the greater ionic radius will decrease the distance between the sensitizer and the cation, consequently improving the  $\phi$  (19).

### Electrochemical analysis of bis-hydrazone and metal complexes

The electrochemical properties of **1** and the complexes **2** and **3** were studied in solutions of  $(n\text{-Bu})_4\text{NPF}_6$  mol  $\text{L}^{-1}$  in THF at a scanning speed of  $100 \text{ mV s}^{-1}$ . They were measured using a glassy carbon electrode as the working electrode, a wire of silver as a pseudo-reference electrode and a wire of platinum as a counter electrode. After the measurements, ferrocene was added as an internal standard. The voltammogram of **1** shows two peaks at  $-2.23$  and  $+0.59 \text{ V}$  (versus  $\text{Fc}/\text{Fc}^+$ ) corresponding to the reductive and oxidative processes on the hydrazone framework (see Figure 5); both processes are irreversible (by cyclic voltammetry) and characterized by a  $\Delta E_{\text{gap}}$  of  $-2.82 \text{ V}$ . The first oxidation potential of the hydrazone **1** is anodically shifted to  $+0.67 \text{ V}$  in the complex **2** and to  $+1.21 \text{ V}$  in the complex **3**. This anodic shift is due to the inherent inductive effect of a coordination between an aromatic ligand and a metal center and the difference ( $+0.67$  vs  $+1.21 \text{ V}$ ) between the two complex probably is due to the electronegativity difference of both metals (see Table 3) although further studies are needed in order to corroborate this trend. Compound **3** does not exhibit a well-defined electrochemistry, at least in the solvent window.

The study of the hydrazone structure demonstrated that both the hydrazone and its complexes have luminescent properties and are electrochemically active species in THF. It is noted that both **1** and its respective complexes have a maximum excitation wavelength between  $380$  and  $400 \text{ nm}$ , which facilitates the use of low cost excitation sources, avoids the use of quartz optics and makes them potential compounds for investigations in biological systems, as a light source in the visible range.



**Figure 5.** Osteryoung square wave voltammetry of the ligand (**1**) and its complexes (**2,3**), scanning speed:  $100 \text{ mV s}^{-1}$ .

**Table 2.** Fluorescence quantum yield for bis-hydrazone and the complexes.

Compound	Solvent	Quantum yield
Standard	Water	0.13 (theoretical)
<b>1</b>	Ethanol	0.0027
<b>2</b>		0.2024
<b>3</b>		0.1413

**Table 3.** Electrochemical peak potentials of the ligands and complexes.

Compound	E <sub>red (I)</sub> (V)	E <sub>oxi (I)</sub> (V)	ΔE <sub>gap</sub> (V)
1	-2.23	0.59	-2.82
2	-1.20	0.67	-1.87
3	-1.36	1.21	-2.57

## Conclusions

The 6-(hydroxymethyl)pyridine-2-carboxaldehyde[2-methyl-pyrimidine-4,6-diyl]bis-hydrazone ligand was successfully synthesized and obtained as a yellow solid with a yield of 84 %. This bis-hydrazone was effectively photoisomerized when irradiating the sample with a mercury vapor lamp of 250 W. After 90 min, it was possible to obtain the isomers *Z,Z'*, *E,Z* and *E,E'* with percentages of 43, 46 and 11%, respectively.

Reaction conditions were successfully established, and metal complexes of La (III) and Sm (III) with bis-hydrazone as ligand could be synthesized with yield percentages between 50–76%. Their photophysics was investigated by fluorescence and UV-vis spectroscopy at different pH values establishing that the pH ranges in which there is greater absorption and where improvement of the fluorescence intensity occurs are 3–5 and 6–8, respectively. The luminescence properties of the complexes were determined by the study of the fluorescence quantum yield, where it is observed that for the complexes **2** (0.024) and **3** (0.1413), the luminescence increases significantly with respect to the ligand **1** (0.0027). This result is attributed to the suppression of the non-radiant relaxation of the excited state by the increased structural rigidity and the sensitization of the 4f–4f transitions of the lanthanide ions.

## Acknowledgements

The authors are grateful to Colciencias (code grant 110656934339), to the “Fundación para la Promoción de la Investigación y la Tecnología (Banco de la República-3238)” the Vicerrectoría de Investigaciones (convocatoria interna) and the CENM from Universidad del Valle for their generous financial support.

## References

- Schiff, H. Mittheilungen aus dem Universitätslaboratorium in Pisa: eine neue Reihe organischer Basen. *Justus Liebigs Annalen der Chemie*. 1864. **131**: 118–119.
- Rollas, S.; Güniz-Küçükgül, Ş. Biological Activities of Hydrazone Derivatives. *Molecules*. 2007. **12**: 1910–1939.
- Hutchinson, D. J.; Cameron, S. A.; Hanton, L. R.; Moratti, S. Sensitivity of silver (I) complexes of a pyrimidine-hydrazone ligand to solvent, counteranion, and metal-to-ligand ratio changes. *Inorg. Chem.* 2012. **51**: 5070–5081.
- Tamboura, F. B.; Diouf, O.; Barry, A. H.; Gayea, M.; Sall, A. Dinuclear lanthanide(III) complexes with large-bite Schiff bases derived from 2,6-diformyl-4-chlorophenol and hydrazides: Synthesis, structural characterization and spectroscopic studies. *Polyhedron*. 2012. **43**: 97–103.
- Volpi, N. Springer Science Business Media, Inc.: New York, 2011.
- Dugave, C.; Demange, L. Cis–Trans Isomerization of Organic Molecules and Biomolecules: Implications and Applications. *Chemical reviews*. 2003. **103**: 2475–532.
- Chaur, M. N.; Collado, D.; Lehn, J. M. Configurational and Constitutional Information Storage: Multiple Dynamics in Systems Based on Pyridyl and Acyl Hydrazones. *Chem. Eur. J.* 2011. **17**: 248–258.
- Bren, V.; Minkin, V.; Shepelenko, E.; Dobonosov, A.; Bushkov, A. Photoisomerization of Hydrazones of 2-Acetyl-3-hydroxy-benzo[b]furan and -benzo[b]thiophene. *Mendeleev. Comm.* 1991. **1**: 72–73.
- Bunzli, J.; Chauvin, A.; Kim, H.; Deiters, E. Lanthanide luminescence efficiency in eight- and nine-coordinate complexes: Role of the radiative lifetime. *Coord. Chem. Rev.* 2010. **254**: 2623–2633.
- Moreno-Fuquen, R.; Chaur, M. N.; Romero, E. L.; Zuluaga, F.; Ellena, J. 6-Bromopyridine-2-carbaldehyde phenylhydrazone. *J. Acta Crystallogr. Sect. B-Struct. Sci.* 2012. **68**: o2131.
- Chaur, M. N. Dichlorido{(E)-4-dimethylamino-N=[(pyridin-2-yl)methylidene-κN]benzohydrazide-κO}zinc. *Acta Crystallogr. Sect. E-Struct* 2013. **69**: 27.
- Bünzli, J. C. G.; Eliseeva, S. V. J. Lanthanide NIR luminescence for telecommunications, bioanalyses and solar energy conversion. *J Rare Earths*. 2010. **28**: 824–842.
- Moeller, T. In MTP International Review of Science, Inorganic Chemistry, Series I, Vol.VII. Ed. Bagnall K. W., London: Butterworths. pp. 275. 1972.
- Binnemans, K. Lanthanide-Based Luminescent Hybrid Materials. *Chem. Rev.* 2009. **109**: 4283–4374.
- Armelaio, L.; Quici, S.; Barigelletti, F.; Accorsi, G.; Bottaro, G.; Cavazzini, M.; Tondello, E. Design of luminescent lanthanide complexes: From molecules to highly efficient photo-emitting materials. *Coord. Chem. Rev.* 2010. **254**: 487–505.
- Williams, A. T. R.; Winfield, S. A.; Miller, J. N. Relative fluorescence quantum yields using a computer controlled luminescence spectrometer. *Analyst*. 1983. **108**: 1067.
- Scaiano, J. C. Handbook of Organic Photochemistry. CRC Press. pp. 142. 1989.
- Pearson, R. G. Hard and Soft Acids and Bases. *J. Am. Chem. Soc.* 1963. **85**: 3533–3539.
- Chandrasekhar, V.; Azhakar, R.; Murugesapandian, B.; Senapati, T.; Bag, P.; Pandey, M. D.; Maurya, S. K.; Goswami, D. Synthesis, Structure, and Two-Photon Absorption Studies of a Phosphorus-Based Tris Hydrazone Ligand (S)P[N(Me)N=CH-C<sub>6</sub>H<sub>3</sub>-2-OH-4-N(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]<sub>3</sub> and Its Metal Complexes. *Inorg. Chem.* 2010. **49**: 4008–4016.

### Article citation:

Fernández, M. A.; Barona, J.C.; Polo-Cerón, D.; Chaur, M.N. Photochemical and electrochemical studies on lanthanide complexes of 6-(hydroxymethyl)pyridine-2-carboxaldehyde[2-methyl-pyrimidine-4,6-diyl]bis-hydrazone. *Rev Colomb Quim.* 2014. **43**(1): 5–11.

Recibido: 5 diciembre 2013. Aceptado: 17 febrero 2014

## Lignanos diarildimetilbutanos y otros constituyentes aislados de *Nectandra turbacensis* (kunth) nees (lauraceae)

### Resumen

Ocho compuestos conocidos fueron aislados del extracto etanólico de corteza de *Nectandra turbacensis* (Kunth) Nees (Lauraceae). Estos fueron identificados como ácido *meso*-dihidroguayarético **1**, ácido *treo*-dihidroguayarético **2**, sauriol B **3**, y *treo*-austrobailignano-6 **4**; vitexina (8-C- $\beta$ -D-glucopiranosil-5,7,4'-trihidroxi flavona) **5**; estigmast-4-en-3-ona **6** y la mezcla sitosterol **7** / estigmasterol **8**. Las estructuras de los compuestos fueron elucidadas por métodos espectroscópicos, que incluyeron técnicas de RMN en 1D y 2D, CG/EM y por comparación de los datos espectroscópicos, reportados en la literatura de compuestos relacionados. Este es el primer reporte de la presencia de este tipo de compuestos en la especie. Se describen también las implicaciones quimiotaxonómicas; relacionadas con la presencia frecuente de lignanos en especies del género *Nectandra*.

**Palabras clave:** *Nectandra turbacensis*, lignanos diarildimetilbutánicos, flavonoides, esteroides, esteroides.

## Diaryl dimethylbutane lignans and other constituents isolated from *Nectandra turbacensis* (kunth) nees (lauraceae)

### Abstract

Eight known compounds were isolated from the ethanol extract of bark *Nectandra turbacensis* (Kunth) Nees (Lauraceae); which were identified as *meso*-dihydroguaiaretic acid **1**, *threo*-dihydroguaiaretic acid **2**, sauriol B **3**, and *threo*-austrobailignan-6 **4**; vitexin (8-C- $\beta$ -D-glucopyranosyl-5,7,4'-trihydroxyflavone) **5**; stigmast-4-en-3-one **6**; and sitosterol **7**/ stigmasterol **8** mixture. The structures of the compounds were elucidated by spectroscopic methods, techniques involving 1D and 2D NMR, GC/MS and by comparison of spectral data, reported in the literature, of related compounds. This is the first report of the presence of such compounds in the species. The chemotaxonomic implications are also described; related to the frequent presence of lignans in the genus *Nectandra*.

**Keywords:** *Nectandra turbacensis*, diaryl dimethylbutane lignans, flavonoid, sterols and steroid.

## Lignanas diaryldimethylbutane e outros constituintes isolado de *Nectandra turbacensis* (kunth) nees (lauraceae)

### Resumo

Oito compostos conhecidos foram isolados do extrato etanólico da casca de *Nectandra turbacensis* (Kunth) Nees (Lauraceae). Quais foram identificados como ácido *meso*-dihidroguayarético **1**, ácido *treo*-dihidroguayarético **2**, sauriol B **3**, e *treo*-austrobailignano-6 **4**; vitexina (8-C- $\beta$ -D-glucopiranosil-5,7,4'-trihidroxi flavona) **5**; estigmast-4-en-3-ona **6** e mistura sitosterol **7**/ estigmasterol **8**. As estruturas dos compostos foram determinadas por métodos espectroscópicos, técnicas que envolvem a 1D e 2D RMN, CG/EM e a comparação dos dados espectroscópicos, relatados na literatura, compostos relacionados. Este é o primeiro relato da presença de tais compostos na espécie. As implicações quimiotaxonômicas também são descritos; relacionada com a presença frequente de lignanas no gênero *Nectandra*.

**Palavras-chave:** *Nectandra turbacensis*, diarildimetilbutanos lignanas, flavonóides, esteróis, esteróides.

## Introducción

La Química de los Productos Naturales Vegetales, entendida como la investigación en metabolitos secundarios procedente de plantas (1), contempla generalmente aspectos relacionados con una o varias de las siguientes líneas generales: *a*-elucidación de la bioactividad o mecanismo de acción directa (biodirigidos) y caracterización de compuestos activos, *b*-modificación y/o síntesis de análogos, *c*-estudios de los mecanismos de acción. Por lo tanto, el estudio de los metabolitos, es un proceso interactivo donde se combinan el aislamiento, la caracterización y la síntesis y/o transformaciones de nuevos análogos para la determinación de, por ejemplo, los perfiles farmacológicos (2). En este contexto, son diversos los estudios fitoquímicos que involucran diferentes géneros; entre los que se encuentra *Nectandra*, y que en términos de caracterización y elucidación estructural de los metabolitos secundarios aislados de este, están articulados con las líneas generales planteadas anteriormente. De hecho, son diversos los estudios reportados en la literatura, que involucran, el género *Nectandra*, los cuales permitieron determinar la presencia de algunos tipos de metabolitos secundarios, encontrándose sesquiterpenos, fitoesteres, polialcoholes, derivados de arilpropanoides, flavonoles, arilpropanoides; lignanos furofuránicos, neolignanos del tipo dihidrobenzofuránicos (3) y algunos norlignanos (4). Otros estudios han reportado, también, la presencia de alcaloides indólicos (5), taninos (6), diterpenos (7) y componentes de aceites esenciales (8). No obstante, a pesar de la variedad de metabolitos aislados en el género *Nectandra*, la característica quimiotaxonómica la da la presencia de compuestos del tipo lignano (9), en donde varios poseen incluso actividad biológica quimioterapéutica (5). Se presenta en este trabajo el aislamiento de metabolitos secundarios de la especie *Nectandra turbacensis*.

## Materiales y métodos

### General

Los espectros de RMN  $^1\text{H}$  y RMN  $^{13}\text{C}$ , DEPT, HMQC, HMBC, y experimento COSY fueron tomados en un Bruker Avance 400 ( $\text{CDCl}_3$  o  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) usando TMS como estándar interno. Las cromatografías en columna a gravedad (CC) fueron corridas usando silica gel (Merck, 40-63 mm), la cromatografía líquida al vacío (CLV) usando silica gel para placa, malla 70-230 (Merck), y la cromatografía de capa delgada (CCD) sobre silica gel 60  $\text{F}_{254}$  (Merck, 0,30 mm de espesor). Se utilizó como complemento de purificación sephadex LH-20. El análisis CG/EM (cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas) fue corrido en un cromatógrafo de gases Shimadzu GC-17A acoplado a un espectrómetro de masas Shimadzu GCMS-QP5050A. Los disolventes hexano, tolueno, éter etílico, acetato de etilo, acetona y metanol fueron purificados antes de su uso. Los reactivos de identificación preliminar fueron preparados minutos antes de la aplicación de los procedimientos, y entre ellos están: reactivo de Gibbs (utilizados para los lignanos diarildimetilbutánicos); prueba en medio básico y con  $\text{AlCl}_3$  (para el flavonoide, vitexina); prueba del nitrato amónico cérico en dioxano, junto con la reacciones de Salkowski y de Liebermann-burchard (cada una independiente), para la identificación de la mezcla sitosterol y estigmasterol.

### Material vegetal

El material vegetal utilizado para el estudio fitoquímico corresponde a la corteza de la especie *Nectandra turbacensis*, recolectada en la ciudad de Santa Marta (Magdalena, Colombia), en el corregimiento de Bonda

(+11° 14' 13.20"), en marzo de 2010; asistido por el botánico Magister Eduino Carbonó de la Universidad del Magdalena (Director del Herbario de la Universidad del Magdalena) y determinada por el biólogo Adolfo Jara Muñoz de la Universidad Nacional de Colombia. Un espécimen reposa en el Herbario Nacional Colombiano del Instituto de Ciencias Naturales con el número COL- 556717.

### Extracción y aislamiento

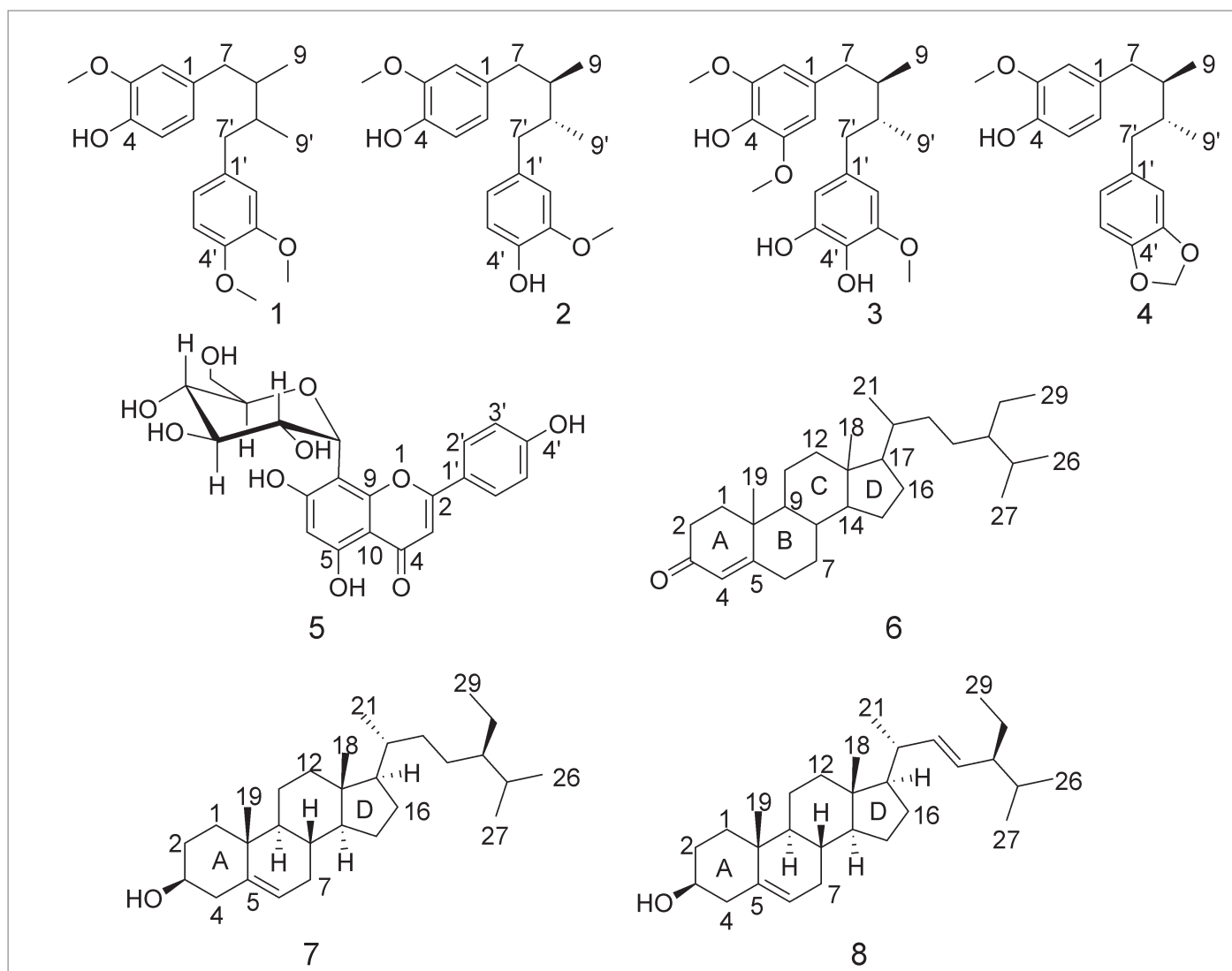
El material (corteza) seco y molido (1000 g) de *Nectandra turbacensis* fue sometido por una semana a extracción por percolación con etanol al 96%, y a temperatura ambiente. El disolvente fue retirado a presión reducida, obteniéndose el correspondiente extracto etanólico, denominado NtEtOH (242 g); posteriormente fue sometido a fraccionamiento por cromatografía líquida al vacío (CLV) utilizando disolventes con polaridad específica (no mezclados) y de las cuales se obtuvieron seis fracciones (hexano, 10g; tolueno, 45 g; éter etílico, 50 g; acetato de etilo 70 g, acetona 70 g; y metanol, 30 g) que fueron monitoreadas por cromatografía de capa delgada (CCD). Con base en el análisis de los perfiles cromatográficos, se reunieron, la fracción de tolueno con la de éter etílico (cuya unión fue denominada, *Fr-1*) (95 g), y la fracción de acetato de etilo con la de acetona (*Fr-2*) (140 g), las cuales fueron purificadas, en forma independiente, por cromatografía en columna sobre silica gel usando en ambos casos la mezcla de hexano:acetona en gradiente (95:5 a 0:100), obteniéndose 20 fracciones en cada una de ellas. Con base en el análisis del perfil cromatográfico de las fracciones monitoreadas con CCD de *Fr-1* (95 g), se reunieron las subfracciones 4 a 7 (*Fr-1.4 a Fr-1.7*) (120 mg) y de 8 a 10 (*Fr-1.8 a Fr-1.11*) (150 mg), sometiéndose en forma independiente, a cromatografía en columna sobre silica gel utilizando como disolvente la mezcla hexano:acetona en proporción de 9:1 a 7:3, en ambos casos; seguido por filtración sobre sephadex LH-20. De las primeras subfracciones reunidas (*Fr-1.4 a Fr-1.7*), luego del proceso cromatográfico y de filtración, se obtuvieron los compuestos: estigmast-4-en-3-ona **6** (30 mg) y la mezcla sitosterol 7/estigmasterol **8** (en proporción, 80/20) (50 mg) (ver Figura 1), las cuales fueron determinadas por CG/EM; y elucidadas por RMN; mientras que de las segundas subfracciones reunidas (*Fr-1.8 a Fr-1.11*), se aislaron e identificaron los compuestos: ácido meso-monometil dihidroguayarático **1** (15 mg), ácido treo-dihidroguayarático **2** (19 mg), sauriol B **3** (15 mg), y treo-austrobailignano-6 **4** (22 mg) (ver Figura 1).

Paralelamente, del tratamiento de purificación de *Fr-2* (140 g) y con base en el análisis del perfil cromatográfico de las fracciones monitoreadas con CCD, se reunieron las subfracciones (*Fr-2.10 a Fr-2.20*) (160 mg) las cuales se sometieron a CC, utilizando también la mezcla de los disolventes hexano:acetato de etilo, pero con mayor polaridad (6:4 a 4:6), obteniéndose el compuesto vitexina (8-C- $\beta$ -D-glucopiranosil-5,7,4'-trihidroxi-flavona o apigenin-8-C- $\beta$ -D-glucopiranosido) **5** (30 mg) (ver Figura 1).

## Resultados y discusión

Los compuestos **1**, **2**, **3** y **4** dieron resultados positivos para la reacción del reactivo de Gibbs (2,6-dicloro-*p*-benzoquinona cloroimida); que suponen la presencia de fenoles o sus derivados sustituidos en la posición para (-*p*) (10), la cual es una de las características estructurales presente en los compuestos en mención. Los compuestos **1**, **2**, **3** y **4**, muestran señales que de acuerdo a los valores de desplazamiento corresponden a lignanos del tipo diarildimetilbutano (11); y que en el caso del compuesto **1**, el cual se presentó como un aceite incoloro; mostró, de acuerdo al análisis de los datos espectroscópicos, los siguientes valores de desplazamiento en RMN  $^1\text{H}$ ; a  $\delta$  6,62 (1H, *d*, *J*=2,0, H-2), 6,82 (1H, *d*, *J*=8,0,





**Figura 1.** ácido meso-dihidroguayarético **1**, ácido treo-dihidroguayarético **2**, sauriol B **3**, treo-austrobailignano-6 **4**, vitexina **5**, stigmast-4-en-3-ona **6** y sitosterol **7**/stigmasterol **8**.

H-5), 6,66 (1H, *dd*,  $J=8,2$ , H-6), 2,30 (1H, *dd*, 13,4, 9,3, H-7a), 2,76 (1H, *dd*,  $J=13,4$ , 4,8, H-7b), 1,77 (1H, *m*, H-8), 0,84 (3H, *d*,  $J=6,7$ , H-9), 6,64 (1H, *d*,  $J=2,0$ , H-2'), 6,78 (1H, *d*,  $J=8,0$ , H-5'), 6,69 (1H, *dd*,  $J=8,2$ , H-6'), 2,30 (1H, *dd*,  $J=13,4$ , 4,8, H-7'a), 2,76 (1H, *dd*,  $J=13,4$ , 4,8, H-7'b), 1,77 (1H, *m*, H-8'), 0,86 (3H, *d*,  $J=6,7$ , H-9'), 3,84 (6H, *s*, OMe), 3,85 (3H, *s*, OMe), 5,49 (1H, *s*, OH); correspondientes al ácido *meso*-monometil dihidroguayarético **1** (12); el compuesto **2** (aceite incoloro), el análisis del espectro de RMN  $^1\text{H}$ , mostró los siguientes valores de desplazamiento, RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) a  $\delta$  6,80 (2H *d*,  $J=7,9$  Hz, H-5,5'), 6,58 (2H, *dd*,  $J=7,0$ , 1,6, H-6,6'), 6,52 (2H, *d*,  $J=1,6$ , H-2,2'), 5,43 (2H, *s*, Ar-OH), 3,81 (6H, *s*, OMe), 2,52 (2H, *dd*,  $J=13,6$ , 7,1, H-7b, 7'b), 2,38 (2H, *dd*,  $J=13,5$ , 7,5, H-7a, 7'a), 1,73 (2H, *dd*,  $J=12,9$ , 6,5, H-8, 8'), 0,83 (6H, *d*,  $J=6,6$ , H-9, 9'), los cuales concuerdan con el compuesto denominado, ácido *treo*-dihidroguayarético **2** (11); el compuesto **3**, mostró los siguientes valores de desplazamientos de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  0,80 (6H, *d*,  $J=6,6$ , H-9/9'), 1,71 2H, (*bm*, H-8/8'), 2,34 (1H, *dd*, H-7'), 2,37 (1H, *dd*, H-7), 2,48 (1H, *dd*, H-7'), 2,51 (1H, *dd*, H-7'), 3,77 (3H, *s*, OMe, C-3'), 3,81 (3H, *s*, OMe, C-3/5), 5,19 (1H, *s*, OH, C-4' o 5'), 5,21 (1H, *s*, OH, C-4' o 5'), 5,33 (1H, *s*, OH, C-4), 6,12 (1H, *d*,  $J=1,7$ , H-2'), 6,26 (2H, *s*, H-2/6), y 6,33 (1H, *d*,  $J=1,8$ , H-6), (13). La rotación específica fue de ( $c$ , 1,5,  $\text{CHCl}_3$ ), lo cual concuerda con los datos espectroscópicos del compuesto sauriol B (14); mientras que el compuesto **4**, mostró valores de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) a  $\delta$ : 6,83 (1H, *d*,  $J=7,8$ , H-5'),

6,72 (1H, *d*,  $J=7,9$ , H-5), 6,63 (1H, *m*, H-6'), 6,56 (1H, *m*, H-6), 6,52 (1H, *m*, H-2'), 6,67 (1H, *d*,  $J=1,5$ , H-2), 5,92 (2H, *s*, O-CH<sub>2</sub>-O), 5,51 (1H, *s*, Ar-OH), 3,87 (3H, *s*, OMe), 2,56 (2H, *dd*,  $J=13,0$ , 6,6, H-7b, 7'b), 2,30 (1H, *dd*,  $J=14,5$ , 9,5, H-7'a), 2,38 (1H, *dd*,  $J=13,4$ , 8,3, H-7a), 1,76 (2H, *m*, H-8, 8'), 0,83 (3H, *d*,  $J=6,4$ , H-9'), 0,83 (3H, *d*,  $J=6,9$ , H-9) (11).

El compuesto **5**, vitexina nombrada como 8-C- $\beta$ -D-glucopiranosil-5,7,4'-trihidroxi-6-ona o apigenin-8-C- $\beta$ -D-glucopiranosido, fue obtenida como un polvo amarillo, con un punto de fusión de 262-264 °C y que dio positivo a las pruebas de análisis fitoquímico preliminar como son: prueba en medio básico (15) y por formación del complejo con  $\text{AlCl}_3$  (16, 17); permitiendo presumir preliminarmente que se trataba de un flavonoide. El análisis del espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ) mostró un protón con multiplicidad en singlete a  $\delta$  13,14, que corresponde a un grupo hidroxilo quelatado ubicado en el carbono 5; que ligado a las señales a  $\delta$  6,75 (1H, *s*, H-6),  $\delta$  6,25 (1H, *s*, H-3), sugiere que se trata de un flavonoide. Se observa, también, un sistema de acoplamiento del tipo  $A_2X_2$  de los protones ubicados a desplazamientos de  $\delta$  8,01 (2H, *d*,  $J=8,6$  Hz, H-2', 6'), y  $\delta$  6,86 (2H, *d*,  $J=8,6$  Hz, H-3', 5') que son atribuibles a un grupo fenilo con sustituyentes *para* (-*p*). También se observan valores de desplazamiento a  $\delta$  6,75 (1H, *s*, H-6),  $\delta$  6,25 (1H, *s*, H-3), correspondiente a los hidrógenos especificados, y un protón anomérico a  $\delta$  4,66 (1H, *d*,  $J=9,9$  Hz, H-1') cuyo valor de desplazamiento junto con la ausencia de las señales del hidrógeno

anomérico de un O-glicósido; sugieren la presencia de un flavonoide C-glicósido. El espectro también muestra una serie de señales a  $\delta$  3,19-3,98 que correspondería a una unidad de azúcar, que para nuestro caso es la glucosa (18-20).

El análisis de los datos espectroscópicos de RMN 1D para el compuesto mencionado anteriormente y la interpretación de los experimentos DEPT-135, HMQC y HMBC confirman que el compuesto aislado es la vitexina (8-C- $\beta$ -D-glucopiranosil-5,7,4'-trihidroxiavona o apigenin-8-C- $\beta$ -D-glucopiranosido) 5.

El compuesto 6, se presentó como un sólido con punto de fusión de 92 °C (89-90 °C, reportado) (21). La complejidad de las señales observadas en el espectro de RMN  $^1\text{H}$ , en especial en la zona  $\delta$  0,7-2,35 ppm, indica que se trata de un compuesto del tipo esteroideal. En el mismo se observan a campo alto algunas señales como a  $\delta$  0,71 ppm (s, 3H) que es generada por el grupo metilo de la posición 18; a  $\delta$  1,05 ppm (s, 3H) para el grupo metilo ubicado en la posición 19, a  $\delta$  0,95 ppm (d, 3H) para el grupo metilo ubicado en la posición 21; también muestra un multiplete ancho a campo bajo en el rango  $\delta$  2,2-2,35 ppm (para dos protones) generado por el sistema (-CH<sub>2</sub>-CO-) y la señal del protón vinílico (como un singlete ancho) a  $\delta$  5,72 ppm correspondiente al sistema (-CO-CH=C). Por su parte el análisis del espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ , presentó valores de desplazamientos a  $\delta$  123,6 ppm que es consistente con la insaturación ubicada en el carbono 4 (C4), a  $\delta$  171,5 ppm con el carbono de la posición beta (5 ppm con el carbono de la posición  $\beta$ -C) del sistema  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturado; mientras que el carbono con el grupo carbonilo aparece a  $\delta$  199,49 ppm (22, 23). El EIMS del compuesto mostró un  $m/z$  (intensidad relativa) a 412 ( $\text{M}^+$ ) como un ion molecular consistente con la fórmula molecular ( $\text{C}_{29}\text{H}_{48}\text{O}$ ). El espectro de masas del compuesto con un peso molecular de 412 sugiere que este es un  $\Delta^4$ -3-ceto esteroide y adicionalmente los picos fuertes a  $m/z$  124 (100%) el cual resulta del rompimiento del anillo B. Otras fragmentaciones observadas en el espectro de masas del compuesto incluye fragmentos a  $m/z$  398 ( $\text{M}-15$ )<sup>+</sup> (18), 370 ( $\text{M}-42$ )<sup>+</sup> (4.5), 289 ( $\text{M}-124$ )<sup>+</sup> (10), y 124 (100), entre otros, que resultan de la fisión de enlaces alílicos. Por lo tanto estos resultados y los valores de desplazamiento de RMN que son consistente con la literatura, permiten sugerir que el compuesto debe ser estigmast-4-en-3-ona 6 (21).

La mezcla sitosterol 7/estigmasterol 8 (en proporción 80/20), se presentó como un sólido de color blanco, dando positivo tanto a la prueba del nitrato amónico cérico en dioxano como a las reacciones de Salkowski y de Liebermann-burchard (24). El análisis de los datos espectroscópicos de esta mezcla muestran algunos valores representativos para estos compuestos, por ejemplo, para el sitosterol 7, a  $\delta_{\text{H}}$  3,25 ( $\text{tdd}$ ,  $J=4,5, 1,1$ ) que correspondería al hidrógeno ubicado en la posición 3 (H-3), un protón olefínico (H-6) que se presenta como un multiplete a  $\delta_{\text{H}}=5,14$ , dos protones olefínicos que aparecen a campo bajo ( $\delta_{\text{H}}$  4,14, m) y a ( $\delta_{\text{H}}=4,61$ , m) parecidos a los del estigmasterol 8. No obstante, este último (estigmasterol) presente en la mezcla mostró señales a  $\delta_{\text{H}}$  3,29 con multiplicidad de un triplete de un doble de doble ( $J=4,5, 1,1$ ) y un protón olefínico similar al anterior compuesto. En la mezcla se observan señales que se solapan en algunos casos y que pertenecen a estos compuesto como son:  $\delta_{\text{H}}=1,07, 1,26, 0,91, 1,01, 1,00, 0,97, 1,16, 1,25$  y que de acuerdo a la literatura los valores  $\delta_{\text{H}}=1,16, 1,25$  deben ser del estigmasterol 8 y  $\delta_{\text{H}}=1,07, 1,00$  y 0,97 deben corresponder al sitosterol 7 (25). El análisis del espectro de masas permite ubicar un pico a  $m/z$  414 y otro a  $m/z$  367, lo cual sugiere que se trata de una mezcla de dos compuestos con peso molecular 414 y 412; mientras que los picos a  $m/z$  271 y  $m/z$  273 (por la formación de un carbocatión) se explica por la fisión del enlace beta ( $\beta$ ), que luego de la deshidratación de este último daría el pico a  $m/z$  255. Sucesivas dealquilaciones de este explican la presencia de otros picos, por ejemplo, a 188, 189, 175, etc. (24).

En la especie *N. turbacensis* se ha reportado previamente la presencia de lignanos del tipo 2,6-diarilfurofuranos, tales como: (+)-sesamina, (+)-demetoxiexelsina, (+)-piperitol, (+)-metoxipiperitol y (1R,2S,5R)-

2-(3'-metoxi-4',5'-metilenodioxifenil)-3,7-dioxa-6-oxobicyclo(3.3.0)octano aislados de madera y de corteza tronco (26). Sin embargo, este es el primer reporte de este tipo de metabolitos secundarios tanto en la especie como en el género; contribuyendo al estudio fitoquímico del género; y donde el aislamiento, de lignanos, como los aislados en el presente trabajo, está en concordancia con las implicaciones quimiotaxonómicas planteadas por Rohwer, que propone que los compuestos del tipo fenilpropanoides y productos de dimerización (lignanos y neolignanos) corresponden a los metabolitos secundarios más comunes en el género *Nectandra* (9).

## Conclusiones

Del extracto etanólico de corteza de la especie *Nectandra turbacensis* se lograron aislar cuatro lignanos del tipo diarildimetilbutano (ácido meso-dihidroguayarático 1, y ácido treo-dihidroguayarático 2, sauriol B 3, treo-austrobailignano-6 4, un flavonoide (vitexina 5) y tres compuestos de tipo esteroideal (estigmast-4-en-3-ona 6 y la mezcla sitosterol 7 / estigmasterol 8); los cuales fueron determinados y elucidados mediante el uso de técnicas espectroscópicas 1D y 2D, IR, y EM. Se considera importante el estudio de otras partes estructurales (raíces y hojas, por ejemplo) de la especie como forma de presentar su estudio fitoquímico completo; y adicionalmente, dada la gran diversidad de metabolitos, reportados en el género, plantear la posibilidad de ensayos biológicos como forma de complementar la investigación fitoquímica.

## Agradecimientos

Los autores agradecen al laboratorio de Resonancia Magnética Nuclear de la Universidad Nacional de Colombia-Sede Bogotá, por la toma de los espectros; al Profesor Eduino Carbonó por la asistencia en la recolección e identificación preliminar de la muestra vegetal; al Instituto de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de Colombia, en especial al biólogo Adolfo Jara Muñoz, por la confirmación en la identificación de la muestra vegetal y al grupo de Química Orgánica y Medicinal de la Universidad Jaime I, Castellón de la Plana, España; por sus orientaciones académicas.

## Referencias

- Pomilio, A.B. Investigación en Química de Productos Naturales en Argentina: vinculación con la Bioquímica. *Acta Bioquím. Clín. Latinoam.* 2012. **46**(1): 73-82.
- Lee, K-H. Current Developments in the Discovery and Design of New Drug Candidates from Plant Natural Product Leads. *J. Nat. Prod.* 2004. **67**: 273-283.
- Barbosa-Filho, J.M.; Yoshida, M.; Gottlieb, O.R. Lignoids from *Nectandra amazonum* and *N. Glabrescens*. *Phytochemistry* 1989. **28**(7): 1991.
- Chérigo, L.; Polanco, V.; Ortega-Barria, E.; Heller, M.V.; Capson, T.L.; Rios, L.C. Antitrypanosomal activity of a novel norlignan purified from *Nectandra lineata*. *Nat. Prod. Res.* 2005. **19**(4): 373-377.
- Filho, A.; Albuquerque, S.; Silva, M.; Eberlin, M.; Tomazela, D.; Bastos, J. Tetrahydrofuran Lignans from *Nectandra megapotamica* with Trypanocidal Activity. *J. Nat. Prod.* 2004. **67**: 42-45.
- Moreno, S.; Arnobio, A.; Carvalho, J.; Nascimento, A.; Timoteo, M.; Olej, B.; Rocha, E.; Pereira, M.; Bernardo-Filho, M.; Caldas, L. The ingestion of a *Nectandra membranacea* extract changes the bioavail-



- lability of technetium-99m radiobiocomplex in rat organs. *Biol. Res.* 2007. **40**: 131-135.
7. Moro, J.; Fernandes, J.; Vieira, P.; Yoshida, M.; Gottlieb, O.; Gottlieb, H. Neolignans from *Nectandra puberula*. *Phytochemistry*. 1987. **26**(1): 269-272.
  8. Agius, B.; Setzer, M.; Stokes, S.; Walker, T.; Haber, W.; Setzer, W. Composition and bioactivity of essential oils of Lauraceae from Monteverde, Costa Rica. *Int. J. Essen. Oil Ther.* 2007. **1**(14): 167-171.
  9. Rohwer, J. Lauraceae: *Nectandra*. Flora Neotropica, Monograph 60. In: Flora Neotropica Monograph. Volume 60, edn. Ed. by Zannoni, T., New York: Garden TNYB. pp.1-332. 1993.
  10. Josephy, P.; Van Damme, A. Reaction of Gibbs reagent with para-substituted phenols. *Anal. Chem.* 1984. **56**(4): 813-814.
  11. Guzmán, J.; Cuca, L.; Isaza, J. Fragmentación diastereoespecífica en NCI de dos lignanos dibencilbutánicos de la corteza de *Dugan diodendron argyrotichum* (Magnoliaceae). *Rev. Prod. Nat.* 2008. **1**: 6-12.
  12. Miyazawa, M.; Kasahara, H.; Kameoka, H. O-demethylation of meso-dimethyl dihydroguaiaretic acid in *Spodoptera litura*. *Phytochemistry*. 1997. **46**(7): 1173-1175.
  13. Kubanek, J.; Fenical, W.; Hay, M.E.; Brown, P.J.; Lindquist, N. Two antifeedant lignans from the freshwater macrophyte *Saururus cernuus*. *Phytochemistry*. 2000. **54**(3): 281-287.
  14. Mori, N.; Watanabe, H.; Kitahara, T. Simple synthesis of enantiomerically pure sauriols A and B. *Biosci. Biotechnol., Biochem.* 2006. **70**(7): 1750-1753.
  15. Ajayi, I.; Ajibade, O.; Oderinde, R. Preliminary phytochemical analysis of some plant seeds. *Res. J. Chem. Sci.* 2011. **1**(3): 58-62.
  16. Mbaebie, B.; Edeoga, H.; Afolayan, A. Phytochemical analysis and antioxidants activities of aqueous stem bark extract of *Schotia latifolia* Jacq. *APJTB*. 2012. **2**(2): 118-124.
  17. Meda, A.; Lamien, C.E.; Romito, M.; Millogo, J.; Nacoulma, O.G. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. *Food Chem.* 2005. **91**(3): 571-577.
  18. Kim, J.; Lee, B.; Kim, J.; Sim, G.; Lee, D.; Lee, K.; Yun, Y.; Pyo, H. The isolation and antioxidative effects of vitexin from *Acer palmatum*. *Arch. Pharmacol. Res.* 2005. **28**(2): 195-202.
  19. Peng, X.; Zheng, Z.; Cheng, K-W.; Shan, F.; Ren, G-X.; Chen, F.; Wang, M. Inhibitory effect of mung bean extract and its constituents vitexin and isovitexin on the formation of advanced glycation endproducts. *Food Chem.* 2008. **106**(2): 475-481.
  20. Choo, C.; Sulong, N.; Man, F.; Wong, T. Vitexin and isovitexin from the Leaves of *Ficus deltoidea* with *in-vivo*  $\alpha$ -glucosidase inhibition. *J. Ethnopharmacol.* 2012. **142**(3): 776-781.
  21. Alexander-Lindo, R.; Morrison, E.; Nair, M. Hypoglycaemic effect of stigmast-4-en-3-one and its corresponding alcohol from the bark of *Anacardium occidentale* (cashew). *Phytother. Res.* 2004. **18**(5): 403-407.
  22. Jamaluddin, F.; Mohameda, S.; Lajis, M. Hypoglycaemic effect of Stigmast-4-en-3-one, from *Parkia speciosa* empty pods. *Food Chem.* 1995. **54**(1): 9-13.
  23. Fernández, I.; Pedro, J.; Seoane, E. Constituents of a hexane extract of *Phoenix dactylifera*. *Phytochemistry*. 1983. **22**(9): 2087-2088.
  24. Kamboj, A.; Saluja, A. Isolation of stigmasterol and  $\beta$ -sitosterol from petroleum ether extract of aerial parts of *Ageratum conyzoides* (Asteraceae). *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 2011. **3**(1): 94-96.
  25. Habib, M.; Nikkon, F.; Rahman, M.; Haque, Z.; Karim, M. Isolation of stigmasterol and  $\beta$ -sitosterol from methanolic extract of root. *Pak. J. Biol. Sci.* 2007. **10**(22): 4174-4176.
  26. De Carvalho, M.; Yoshida, M.; Gottlieb, O.; Gottlieb, H. Lignans from *Nectandra turbacensis*. *Phytochemistry*. 1986. **26**(1): 265-267.

**Article citation:**

Macías-Villamizar, V.; Cuca-Suárez, L.E. Lignanos diarildimetilbutanos y otros constituyentes aislados de *Nectandra turbacensis* (kunth) nees (lauraceae). *Rev Colomb Quím.* 2014. **43**(1): 12-16.

Recibido: 17 noviembre 2013. Aceptado: 20 enero 2014

## Comparación de dos metodologías para la determinación de residuos de plaguicidas en agua potable

### Resumen

Se realizó un estudio comparativo de dos metodologías para la determinación de residuos de plaguicidas en agua potable con el fin de establecer cuál de ellas es más adecuada como metodología de análisis. Las metodologías evaluadas involucraron extracción en fase sólida empleando el adsorbente polimérico LiChrolut®EN y extracción líquido-líquido utilizando n-hexano como solvente de extracción. La determinación se realizó por cromatografía de gases con detectores  $\mu$ -ECD y NPD. El estudio involucró 50 plaguicidas, entre los que se encuentran diferentes familias químicas, tales como organofosforados, organoclorados y piretroides entre otros. Para comparar las metodologías, se evaluó la capacidad de detección y cuantificación estableciendo los límites de detección y cuantificación; la exactitud con experimentos de recuperación y la dispersión por medio de la precisión. Se estableció que estas presentan detección adecuada frente a las concentraciones máximas permitidas por la normativa colombiana, excepto para el insecticida monocrotopos, para el cual se obtuvo un límite de detección superior al exigido. Los experimentos de recuperación mostraron que la totalidad de plaguicidas organoclorados y piretroides pueden ser analizados empleando extracción líquido-líquido, mientras que la extracción en fase sólida es más adecuada para los plaguicidas más polares, tales como los organofosforados y azoles. Se determinó que 22 compuestos se pueden analizar por cualquiera de las dos metodologías, que por extracción en fase sólida es posible analizar 36 de los 50 compuestos evaluados mientras que empleando extracción líquido-líquido se pueden analizar 28 de ellos.

**Palabras clave:** Plaguicidas, agua potable, extracción líquido-líquido, extracción en fase sólida.

## Comparison of two methodologies for the determination of pesticides residues in drinking water

### Abstract

A comparative study of two methodologies for the determination of pesticide residues in drinking water was performed in order to establish which of them is more suitable of a method of analysis. The assessed methodologies involved solid phase extraction using polymeric adsorbent LiChrolut®EN and liquid-liquid extraction using n-hexane as the extraction solvent; its determination was performed by GC with  $\mu$ ECD and NPD detectors. The study involved 50 pesticides, including different chemical families, such as organophosphates, organochlorines and pyrethroids among others. The detection capability was assessed by establishing the limits of detection and quantification, and the accuracy and precision performing recovery experiments. It was determined that the two methodologies have suitable detection regarding the maximum concentrations permitted by the Colombian regulations, except for monocrotophos insecticide, for which the limit of detection obtained was slightly above to the required value. The recovery experiments showed that all organochlorine and pyrethroid pesticides can be analyzed using liquid-liquid extraction, while the solid phase extraction is more suitable for the more polar pesticides such as organophosphates and azoles; It was determined that 22 compounds can be analyzed by either of the two methods, that is possible to analyze 36 of the 50 compounds evaluated by solid phase extraction, while using liquid liquid extraction 28 can be analyzed.

**Keywords:** Pesticides, drinking water, liquid-liquid extraction, solid phase extraction.

## Comparação de metodologias para a determinação de resíduos de pesticidas em água potável

### Resumo

Um estudo comparativo de dois métodos foi realizada para a determinação de resíduos de pesticidas em água potável, a fim de estabelecer qual deles é mais adequado como um método de análise. As metodologias avaliadas envolvendo extração em fase sólida, utilizando o adsorvente polimérico LiChrolut®EN e extração líquido-líquido utilizando n-hexano como solvente de extração. A determinação foi realizada por detectores de GC-ECD e NPD. O estudo envolveu 50 pesticidas, incluindo aqueles que são diferentes famílias químicas, tais como os organofosforados, organoclorados e piretróides, entre outros. Para comparar os métodos, a capacidade de detectar e quantificar a estabelecer os limites de detecção e quantificação foi avaliada; a precisão e as experiências de recuperação usando precisão dispersão. Foi estabelecido que estes apresentaram taxas de detecção adequados para as concentrações máximas permitidas pela legislação colombiana, com exceção de monocrotophos inseticida, para que requerido foi obtido um limite de detecção de. Ensaios de recuperação, mostraram que todos os pesticidas organoclorados e piretróides podem ser analisados utilizando-se extração líquido-líquido, enquanto que a extração da fase sólida é mais adequado para os pesticidas mais polares, tais como organofosfatos e azóis. Determinou-se que 22 compostos podem ser analisados por qualquer um de dois métodos, que a extração de fase sólida, é possível analisar 36 dos 50 compostos avaliados, enquanto utilizando a extração líquido-líquido 28 pode analisar.

**Palavras-Chave:** Pesticidas, água potável, extração líquido-líquido, extração em fase sólida.

## Introducción

El acceso a fuentes de agua de calidad tiene una incidencia directa sobre la salud de la población. En Colombia la calidad del agua potable está regulada por la resolución 2115 de junio de 2007 del Ministerio de la Protección Social e indica en su artículo 8 las concentraciones máximas de plaguicidas y otras sustancias tóxicas en el agua potable, establecidas según su toxicidad y peligrosidad. Para garantizar que el agua potable cumple con dichas características de inocuidad es necesario contar con medidas de control en campo las cuales se verifican con metodologías confiables que permitan la determinación de contaminantes a los niveles establecidos en la reglamentación, como es el caso de los plaguicidas, que son ampliamente usados en la agricultura y que frecuentemente, por su uso incorrecto pueden ir a contaminar fuentes hídricas tanto superficiales como subterráneas (1).

Existe una gran variedad de métodos para la determinación de plaguicidas en aguas, algunos de ellos desarrollados con el fin de determinar grupos de compuestos en particular, como es el caso de los plaguicidas organoclorados, que tienen gran importancia desde el punto de vista medioambiental debido a su elevada persistencia, o los organofosforados que debido a su elevada toxicidad aguda en mamíferos son considerados relevantes desde el punto de vista toxicológico (2).

Una de las metodologías más comunes es la extracción líquido – líquido, en la cual se utilizaron inicialmente solventes de baja polaridad tales como el diclorometano, el hexano y el éter de petróleo para la extracción de plaguicidas organoclorados y organofosforados (1, 3). En 2010 Wu *et al.* (4), desarrollaron una metodología para el análisis de piretroides mediante extracción líquido – líquido, empleando 60 mL de diclorometano como solvente de extracción. Para la determinación de plaguicidas organoclorados principalmente se valen del uso de n-hexano (5), éter etílico o cloruro de metileno (6) utilizando entre 25 y 300 mL. Las metodologías desarrolladas eran adecuadas para el propósito, sin embargo tenían como desventaja el uso de grandes volúmenes de solvente, generando cantidades de residuos contaminantes, además de ser dispendiosas en su ejecución experimental debido a la formación de emulsiones durante el análisis. Posteriormente se desarrollaron metodologías analíticas más amigables con el ambiente en las que se redujo considerablemente el uso de solventes de elevada toxicidad y se disminuyó significativamente el tiempo de análisis, incrementando a la vez el número de analitos al alcance de las metodologías (6).

Actualmente la tendencia en el análisis de plaguicidas en aguas involucra el uso de solventes de menor toxicidad y con cantidades pequeñas de estos, tales como la extracción líquido – líquido con n-hexano (7) y la extracción líquido – líquido miniaturizada en la que se usan tan solo unos cuantos microlitros de solvente para realizar la extracción (8). Esta metodología ha sido utilizada para la determinación de plaguicidas organofosforados en aguas empleando como solvente de extracción una mezcla de acetonitrilo y 1-dodecanol, obteniendo porcentajes de recuperación elevados (90-99%) y bajos límites de detección ( $5 \times 10^{-4}$  –  $5 \times 10^{-1}$  mg/L), empleando para la separación y detección cromatografía líquida con detección DAD (9). Así mismo, la microextracción líquido – líquido asistida con aire empleando tolueno como solvente de extracción, fue utilizada por Farajzadeh *et al.* (10), para analizar plaguicidas de la familia de los triazoles en aguas superficiales y matrices vegetales empleando cromatografía de gases y detección de ionización de llama, obteniendo bajos límites de detección y cuantificación. Para la determinación de herbicidas del grupo de los fenoxiacidos, Jimenez (11) empleó pequeños volúmenes de muestra (10 mL) y acetona como solvente de extracción (3,5 mL) para realizar una extracción líquido – líquido y posteriormente una limpieza en fase sólida dispersiva con octadecilsilano para eliminar interferencias, obteniendo porcentajes de recuperación entre el 82% y el 114%.

Como técnica alterna, la extracción en fase sólida se popularizó para el análisis de muestras ambientales debido a sus grandes ventajas en cuanto a la disminución del uso de solventes, la rapidez de su ejecución y su capacidad para concentrar los analitos, lo cual permitió la determinación de menores concentraciones (2, 6, 12). En el ámbito instrumental se ha utilizado la cromatografía de gases para la determinación principalmente, de plaguicidas volátiles y térmicamente estables como son los plaguicidas organoclorados, organofosforados y piretroides. Los detectores más usados han sido el detector de captura electrónica, actualmente detector de micro captura electrónica ( $\mu$ -ECD), detectores como el detector de nitrógeno fósforo y el fotométrico de llama, los cuales son más selectivos; actualmente el detector selectivo de masas es el más utilizado (5, 13), incluso empleando metodologías de extracción en fase sólida “on line” acopladas al instrumento, lo que permite minimizar el tiempo de preparación de la muestra, la cantidad de muestra y el consumo de reactivos y solventes (14).

Actualmente la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas en tandem con analizador de triple cuadrupolo (11) o cuadrupolo acoplado a trampa de iones (15), permite analizar un gran número de compuestos, con mayor selectividad y a concentraciones más bajas (16). Para compuestos con características fisicoquímicas de solubilidad, volatilidad y peso molecular que no les permiten ser incluidos en las metodologías multiresiduo, como es el caso del herbicida glifosato y su metabolito, AMPA, se han desarrollado metodologías específicas empleando extracción en fase sólida y posterior análisis en cromatografía líquida con derivatización post columna y detección con fluorescencia, obteniendo porcentajes de recuperación entre 70% y 73% y límites de detección de  $4 \times 10^{-3}$  mg/L (17).

Con el propósito de contar con metodologías rápidas y adecuadas para análisis de residuos de plaguicidas en agua potable, en este estudio se realizó una comparación de dos metodologías de extracción para la determinación de residuos de 50 plaguicidas de diferentes familias químicas, entre los que se encuentran insecticidas y fungicidas ampliamente utilizados en Colombia.

## Materiales y métodos

### Estándares, reactivos y soluciones

Se emplearon estándares de plaguicidas proporcionados por el Dr. Ehrenstorfer y por Chemservice con una pureza mayor al 95%. Las soluciones madre fueron preparadas en acetato de etilo a concentraciones aproximadas de 500  $\mu$ g/mL y almacenadas en frascos ámbar a -20 °C. A partir de las soluciones madre se prepararon mezclas de plaguicidas para los diferentes ensayos. Los analitos evaluados, sus concentraciones y características toxicológicas relevantes se muestran en la Tabla 1.

Se emplearon solventes y reactivos marca J.T. Baker grado residuos. Para la extracción en fase sólida se emplearon cartuchos LiChrolut®EN marca Merck de 200 mg de fase estacionaria y 3 mL de capacidad empacados en tubos de polipropileno.

### Instrumentos y equipos

Para la separación, identificación y cuantificación de los compuestos se utilizó un cromatógrafo de gases HP6890\* con inyector automático 7683 marca Agilent Technologies\* (Palo Alto, CA, EUA). Se utilizó un inyector split/splitless conectado por medio de una columna capilar sin fase estacionaria (1,0 m, 0,25 mm id), a un divisor de flujo de vidrio silanizado en forma de “Y” unido a una columna HP-5 (30 m, 0,25 mm id, 0,25  $\mu$ m df) conectada a un detector  $\mu$ -ECD  $^{63}$ Ni y una columna HP-50

**Tabla 1.** Concentración en la mezcla de plaguicidas, dosis letal 50 y carcinogenicidad de los analitos evaluados.

compuesto	C ( $\mu\text{g/mL}$ ) (a)	LD <sub>50</sub> (mg/kg) (b)	Cancerígeno (c)	Compuesto	C ( $\mu\text{g/mL}$ ) (a)	LD <sub>50</sub> (mg/kg) (b)	Cancerígeno (c)
Cimoxanil	9,56	1196	No	HCB	0,40	10000	Si
$\alpha$ -HCH	0,72	500	Si	Lindano	0,20	88	Si
Dimetoato	0,44	291	No	Alaclor	0,20	3160	Si
$\beta$ -HCH	0,62	600	Si	Diazinon	0,80	300	No
Clorotalonilo	0,48	10000	Si	Diclofluanida	1,60	5000	No
Paration metilo	0,50	6	No	Triadimefon	2,90	1000	No
Fenitrothion	0,38	250	No	Captan	2,10	9000	No
Malation	2,80	290	No	Isofenfos	3,00	20	No
Clorpirifos	0,72	163	No	Fentoato	1,10	71	No
Folpet	5,32	10000	No	4,4'-DDE	0,60	880	Si
Endosulfan	0,78	18	No	Ciproconazol	6,30	1020	No
Hexaconazol	1,40	2189	No	Oxadicyl	7,80	1860	No
Profenofos	0,31	358	No	Propiconazol	0,50	1517	No
4,4'-DDD	0,71	4000	Si	Epoxiconazol	1,10	5000	No
4,4'-DDT	1,24	113	Si	Iprodiona	1,50	3500	No
Propargita	51,67	1480	No	Tetradifon	0,30	14700	No
Bifentrina	19,04	2150	No	$\lambda$ -Cihalotrina	0,30	56	No
Cipermetrina	3,10	251	No	Pirazofos	3,00	151	No
Difenoconazol	3,49	1453	No	$\beta$ - Ciflutrina	1,00	450	No
Azoxistrobina	2,99	5000	No	Deltametrina	0,40	31	No
Metamidofos	4,34	20	No	Dimetomorf	29,20	3900	No
Acefato	13,03	945	No	Pirimetanil	7,90	4150	No
Monocrotofos	6,07	8,4	No	Fention	0,70	190	No
Metalaxil	8,76	669	No	Fenamifos	1,60	5	No
Tiabendazol	22,32	3300	No	Tebuconazol	3,00	1700	No

(a) Concentración en la solución mezcla.

(b) Según LD<sub>50</sub> y toxicidad regulada por la resolución 2115 del MPS (18).

(c) Carcinogenicidad. Catalogada por la International Agency for Research on Cancer IARC (19).

(30 m, 0,25 mm id, 0,25  $\mu\text{m}$ ) conectada a un detector NPD. Se utilizó nitrógeno UAP como gas de transporte. Se realizó la inyección en modalidad splitless pulsado con un pulso de presión de 4,48 bar durante 0,8 min. El flujo de purga fue de 40 mL/min y la válvula estuvo cerrada durante 0,6 min. El volumen de inyección fue de 2  $\mu\text{L}$  y la temperatura del inyector fue de 256 °C. La temperatura del detector  $\mu$ -ECD fue de 310 °C con flujo de gas auxiliar (nitrógeno) de 10 mL/min. El detector NPD se trabajó a 330 °C con flujos constantes de gas auxiliar (nitrógeno), hidrógeno y aire de 10, 3 y 60 mL/min, respectivamente. El programa de temperatura del horno inició en 52 °C (0 min), incrementándose la temperatura a una velocidad de 4 °C/min hasta alcanzar 100 °C, consecutivamente se aumentó la temperatura hasta 110 °C a 2 °C/min. A continuación se incrementó hasta 130 °C a una velocidad de 20 °C/min,

luego se llevó hasta 195 °C a 4 °C/min y finalmente se llegó a una temperatura de 280 °C a una velocidad de 5 °C/min. Se empleó un equipo para extracción en fase sólida marca Tecknokroma de 12 posiciones conectado a una bomba de vacío.

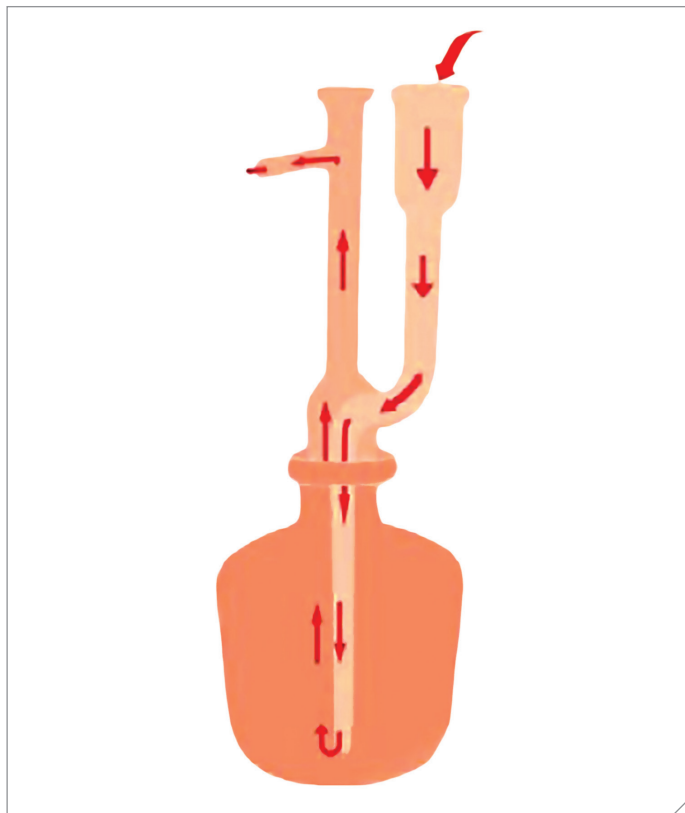
### Metodologías de extracción de plaguicidas en aguas

#### Extracción líquido-líquido

La extracción líquido – líquido se llevó a cabo usando n-hexano como solvente de extracción. 1L de agua se filtró a través de una membrana de 0,45  $\mu\text{m}$  y se depositó en una botella ámbar, se adicionaron 10 g de cloruro de sodio y 60 mL de n-hexano. La botella tapada se colocó en



agitación magnética durante 30 min, luego se realizó la recolección de la fase orgánica por medio del dispositivo que se muestra en la Figura 1. La fase orgánica se filtró a través de 15 g de sulfato de sodio anhidro y se concentró a una temperatura de 35 °C hasta aproximadamente 0,5 mL. El solvente se eliminó en su totalidad bajo una corriente de nitrógeno y el extracto se transfirió cuantitativamente con acetato de etilo a un balón aforado de 1 mL (7).



**Figura 1.** Montaje para la extracción líquido-líquido (4).

#### Extracción en fase sólida

La extracción en fase sólida se llevó a cabo empleando cartuchos Li-Chrolut® EN, previamente acondicionados con 3 mL de metanol y 3 mL de agua grado HPLC. 500 mL de agua previamente filtrada por una membrana de 0,45 µm se pasaron a través del cartucho a una velocidad de 15 mL/min aplicando vacío. Una vez se pasó la totalidad de la muestra, se secó el cartucho durante 10 min en una corriente de nitrógeno. La elución de los analitos se llevó a cabo utilizando 6 mL de una mezcla acetato de etilo:metanol 1:1, la cual posteriormente se evaporó en su totalidad. El extracto se transfirió cuantitativamente a un balón aforado de 1 mL con acetato de etilo (20).

#### Aptitud y desempeño de las metodologías

Se llevaron a cabo ensayos de recuperación por triplicado con las mezclas de analitos, utilizando agua potable del grifo como matriz blanco, adicionando dicha mezcla a 1L o 500 mL de muestra, según la metodología. Como control de calidad, previo al procedimiento de extracción y análisis se adicionaron 20 µL de una mezcla de PCB 103 (2,2',4,5',6-pentaclorobifenil) y TPP (trifenil fosfato) denominados estándares subrogados. Además, al extracto final se le adicionaron 20 µL de una mezcla de PCB 52 (2,2',5,5'-tetraclorobifenil) y Sulfotep (ditiopirofosfato de O,O,O,O-tetraetilo), utilizados como estándares internos.

La aptitud de las metodologías se evaluó teniendo en cuenta los límites de detección y cuantificación, el porcentaje de recuperación y la precisión en condiciones de repetibilidad.

#### Límites de detección y cuantificación y selectividad

Se realizó la inyección de tres blancos de matriz, extraídos según las metodologías a evaluar en la misma secuencia con la mezcla de estándares preparada en extracto de matriz blanco. Se estimaron los límites de detección (LD) y cuantificación (LC) con base en el criterio de la EPA (21). Se realizó una inyección de blanco fortificado al valor del límite de detección y al límite de cuantificación estimados para verificar la capacidad instrumental de detectar el analito a estas concentraciones y garantizar la ausencia de interferencias en los tiempos de retención de los analitos de interés. Con base en estos resultados se calcularon los límites de detección y cuantificación en matriz.

#### Porcentaje de recuperación y precisión

Se fortificaron por triplicado muestras blanco de matriz a las concentraciones establecidas como límite de cuantificación y se analizaron con cada una de las dos metodologías. Se determinó el porcentaje de recuperación y la desviación estándar relativa para cada compuesto.

## Resultados y discusión

Con el fin de determinar los compuestos de interés a las concentraciones exigidas por la legislación colombiana (18), se calcularon los límites de detección y cuantificación de cada metodología. En la Tabla 2 se observa la concentración máxima permitida por la normativa, así como los valores de límite de detección calculados.

En esta tabla se muestra que para todos los compuestos se obtuvieron límites de detección por debajo de la concentración máxima permitida para las dos metodologías, a excepción del compuesto monocrotofos para el cual se obtuvo un límite superior a este valor en la metodología de extracción en fase sólida. En general, se observa que la mayoría de los compuestos tienen un límite de detección entre  $1,00 \times 10^{-05}$  mg/L y  $1,00 \times 10^{-04}$  mg/L, valor que se encuentra por debajo del límite más exigente de la normativa, el cual es  $1,00 \times 10^{-04}$  mg/L. Se determinó que utilizando ELL se obtienen extractos con menos interferencias, lo cual incrementa la relación señal/ruido y permite obtener límites de detección menores a  $1,00 \times 10^{-05}$  mg/L para varios de los compuestos evaluados. Estos valores son comparables con los encontrados en el estudio de Majzik-Solymos *et al.* (5), en el que se empleó extracción líquido – líquido con un volumen de muestra superior (1L) y utilizando 200 mL diclorometano para la extracción de plaguicidas neutros y 300 mL de éter de petróleo para extraer compuestos ácidos. La extracción en fase sólida presentó extractos con mayores interferencias, por lo cual, los límites de detección se ven incrementados para ciertos compuestos, como es el caso de monocrotofos, que aunque se observa por el detector NPD el cual presenta mayor selectividad, muestra interferencias que aumentan el ruido y por tanto el LD como se observa en la Tabla 2. Los límites de detección obtenidos para este compuesto por las dos metodologías son en realidad bastante bajos, sin embargo empleando la metodología por EFS no se podría determinar la concentración exigida por la normativa colombiana.

Una vez establecido que los compuestos pueden ser determinados por las dos metodologías se evaluó la capacidad de estas para recuperar los analitos de estudio de la matriz de interés. Se realizaron ensayos de recuperación a una concentración equivalente al límite de cuantificación.

La extracción líquido – líquido es un método experimentalmente sencillo, económico y rápido de ejecutar, pues hace uso de las propiedades fisicoquímicas de los plaguicidas con baja solubilidad en agua y baja polaridad, para, por medio de una agitación magnética fuerte y constata durante 30 min, hacerlos pasar de la matriz acuosa al solvente de extracción, en este caso, n-hexano, aumentando la fuerza iónica con la adición de cloruro de sodio y facilitando así la partición.

**Tabla 2.** Concentración máxima permitida y límites de detección para los compuestos evaluados por cada metodología.

Compuesto	Detector empleado	CMP (mg/L) (a)	LD (ELL) (mg/L)	LD (EFS) (mg/L)	Compuesto	Detector empleado	CMP (mg/L) (a)	LD (ELL) (mg/L)	LD (EFS) (mg/L)
Cimoxanil	μECD	1,00 x10 <sup>-2</sup>	1,50 x10 <sup>-4</sup>	3,00 x10 <sup>-4</sup>	HCB	μECD	1,00 x10 <sup>-4</sup>	5,00 x10 <sup>-6</sup>	1,67 x10 <sup>-5</sup>
α-HCH	μECD	1,00 x10 <sup>-4</sup>	1,00 x10 <sup>-5</sup>	2,00 x10 <sup>-5</sup>	Lindano	μECD	1,00 x10 <sup>-4</sup>	5,00 x10 <sup>-6</sup>	1,67 x10 <sup>-5</sup>
Dimetoato	NPD	1,00 x10 <sup>-2</sup>	2,15 x10 <sup>-5</sup>	4,30 x10 <sup>-5</sup>	Alaclor	μECD	1,00 x10 <sup>-4</sup>	5,00 x10 <sup>-6</sup>	1,67 x10 <sup>-5</sup>
β-HCH	μECD	1,00 x10 <sup>-4</sup>	2,16 x10 <sup>-5</sup>	4,32 x10 <sup>-5</sup>	Diazinon	NPD	1,00 x10 <sup>-2</sup>	2,20 x10 <sup>-5</sup>	7,33 x10 <sup>-5</sup>
Clorotalonilo	μECD	1,00 x10 <sup>-4</sup>	1,35 x10 <sup>-5</sup>	2,70 x10 <sup>-5</sup>	Diclofluanida	μECD	1,00 x10 <sup>-2</sup>	1,70 x10 <sup>-5</sup>	5,67 x10 <sup>-5</sup>
Paration metilo	NPD	1,00 x10 <sup>-4</sup>	1,00 x10 <sup>-5</sup>	2,00 x10 <sup>-5</sup>	Triadimefon	μECD	1,00 x10 <sup>-2</sup>	3,00 x10 <sup>-5</sup>	1,00 x10 <sup>-4</sup>
Fenitrothion	NPD	1,00 x10 <sup>-2</sup>	1,00 x10 <sup>-5</sup>	2,00 x10 <sup>-5</sup>	Captan	μECD	1,00 x10 <sup>-2</sup>	2,20 x10 <sup>-5</sup>	7,33 x10 <sup>-5</sup>
Malation	NPD	1,00 x10 <sup>-2</sup>	2,80 x10 <sup>-5</sup>	5,60 x10 <sup>-5</sup>	Isofenfos	NPD	1,00 x10 <sup>-4</sup>	3,00 x10 <sup>-5</sup>	1,00 x10 <sup>-4</sup>
Clorpirifos	NPD	1,00 x10 <sup>-3</sup>	8,50 x10 <sup>-6</sup>	1,70 x10 <sup>-5</sup>	Fentoato	NPD	1,00 x10 <sup>-3</sup>	2,00 x10 <sup>-5</sup>	6,67 x10 <sup>-5</sup>
Folpet	μECD	1,00 x10 <sup>-2</sup>	7,00 x10 <sup>-5</sup>	1,40 x10 <sup>-4</sup>	4,4'-DDE	μECD	1,00 x10 <sup>-4</sup>	6,00 x10 <sup>-6</sup>	2,00 x10 <sup>-5</sup>
Endosulfan	μECD	1,00 x10 <sup>-4</sup>	1,00 x10 <sup>-5</sup>	2,00 x10 <sup>-5</sup>	Ciproconazol	μECD	1,00 x10 <sup>-2</sup>	2,50 x10 <sup>-4</sup>	8,33 x10 <sup>-4</sup>
Hexaconazol	μECD	1,00 x10 <sup>-2</sup>	2,00 x10 <sup>-5</sup>	4,00 x10 <sup>-5</sup>	Oxadacyl	uECD	1,00 x10 <sup>-2</sup>	2,80 x10 <sup>-4</sup>	9,33 x10 <sup>-4</sup>
Profenofos	NPD	1,00 x10 <sup>-2</sup>	1,00 x10 <sup>-5</sup>	2,00 x10 <sup>-5</sup>	Propiconazol	μECD	1,00 x10 <sup>-2</sup>	1,00 x10 <sup>-5</sup>	3,33 x10 <sup>-5</sup>
4,4'-DDD	μECD	1,00 x10 <sup>-4</sup>	1,00 x10 <sup>-5</sup>	2,00 x10 <sup>-5</sup>	Epoxiconazol	μECD	1,00 x10 <sup>-2</sup>	6,60 x10 <sup>-5</sup>	2,20 x10 <sup>-4</sup>
4,4'-DDT	μECD	1,00 x10 <sup>-4</sup>	2,00 x10 <sup>-5</sup>	4,00 x10 <sup>-5</sup>	Iprodiona	NPD	1,00 x10 <sup>-2</sup>	4,00 x10 <sup>-5</sup>	1,33 x10 <sup>-4</sup>
Propargita	μECD	1,00 x10 <sup>-2</sup>	1,40 x10 <sup>-3</sup>	2,80 x10 <sup>-3</sup>	Tetradifon	NPD	1,00 x10 <sup>-2</sup>	5,00 x10 <sup>-6</sup>	1,67 x10 <sup>-5</sup>
Bifentrina	μECD	1,00 x10 <sup>-2</sup>	2,00 x10 <sup>-5</sup>	4,00 x10 <sup>-5</sup>	λ-Cihalotrina	μECD	1,00 x10 <sup>-3</sup>	5,00 x10 <sup>-6</sup>	1,67 x10 <sup>-5</sup>
Cipermetrina	μECD	1,00 x10 <sup>-2</sup>	4,00 x10 <sup>-5</sup>	8,00 x10 <sup>-5</sup>	Pirazofos	NPD	1,00 x10 <sup>-3</sup>	3,00 x10 <sup>-5</sup>	1,00 x10 <sup>-4</sup>
Difenoconazol	μECD	1,00 x10 <sup>-2</sup>	1,00 x10 <sup>-4</sup>	2,00 x10 <sup>-4</sup>	β-Ciflutrin	μECD	1,00 x10 <sup>-2</sup>	2,00 x10 <sup>-5</sup>	6,67 x10 <sup>-5</sup>
Azoxistrobin	μECD	1,00 x10 <sup>-2</sup>	3,00 x10 <sup>-5</sup>	6,00 x10 <sup>-5</sup>	Deltametrina	NPD	1,00 x10 <sup>-3</sup>	6,00 x10 <sup>-6</sup>	2,00 x10 <sup>-5</sup>
Metamidofos	NPD	1,00 x10 <sup>-4</sup>	5,00 x10 <sup>-5</sup>	1,00 x10 <sup>-4</sup>	Dimetomorf	NPD	1,00 x10 <sup>-2</sup>	3,00 x10 <sup>-4</sup>	1,00 x10 <sup>-3</sup>
Acefato	NPD	1,00 x10 <sup>-2</sup>	1,35 x10 <sup>-4</sup>	2,70 x10 <sup>-4</sup>	Pirimetanil	μECD	1,00 x10 <sup>-2</sup>	8,00 x10 <sup>-5</sup>	2,67 x10 <sup>-4</sup>
Monocrotofos	NPD	1,00 x10 <sup>-4</sup>	7,00 x10 <sup>-5</sup>	1,40 x10 <sup>-4</sup>	Fention	NPD	1,00 x10 <sup>-3</sup>	7,50 x10 <sup>-6</sup>	2,50 x10 <sup>-5</sup>
Metalaxil	NPD	1,00 x10 <sup>-2</sup>	6,00 x10 <sup>-4</sup>	1,20 x10 <sup>-3</sup>	Fenamifos	NPD	1,00 x10 <sup>-4</sup>	1,70 x10 <sup>-5</sup>	5,67 x10 <sup>-5</sup>
Tiabendazol	NPD	1,00 x10 <sup>-2</sup>	6,70 x10 <sup>-4</sup>	1,34 x10 <sup>-3</sup>	Tebuconazol	NPD	1,00 x10 <sup>-2</sup>	1,00 x10 <sup>-4</sup>	3,33 x10 <sup>-4</sup>

(a) CMP Concentración máxima permitida. (18)

Los criterios seleccionados para evaluar la recuperación de los compuestos fueron los establecidos en el documento SANCO (22) que, aunque establece los lineamientos para la determinación de residuos de plaguicidas en alimentos y piensos, pueden ser extrapolados para la determinación en otras matrices de interés.

En la Tabla 3 se muestran los porcentajes de recuperación, límites de cuantificación y desviación estándar relativa empleando la metodología ELL para los compuestos que cumplieron los criterios establecidos en SANCO.

Se observa que los compuestos recuperados corresponden a los plaguicidas organoclorados y piretroides incluidos en el ensayo, así como algunos organofosforados tales como el malation, el clorpirifos y beneno sustituidos como el clorotalonilo entre otros, que por su elevado coeficiente de partición octanol/agua (23) pasan fácilmente a la fase

orgánica, obteniendo así altos porcentajes de recuperación. Compuestos de la familia de los azoles, como el difenoconazol o epoxiconazol, y organofosforados de mayor polaridad como el dimetoato y el monocrotofos tienen porcentajes de recuperación muy bajos o nulos. Esto se debe a su elevada solubilidad en agua y bajo coeficiente de partición octanol/agua, que en algunos casos es menor a la unidad (Monocrotofos=0,6) (23). Se observa también que para todos los plaguicidas recuperados se tienen desviaciones estándar relativas dentro del rango esperado (<20%) haciendo adecuada la metodología para su análisis (22).

En la Figura 2a se puede ver que empleando ELL, el 56% de los compuestos evaluados presentan un porcentaje de recuperación entre 70% y 120% mientras que el 26% tienen una recuperación nula; el porcentaje restante presenta recuperación entre el 10% y el 70%.

**Tabla 3.** Exactitud y precisión al límite de cuantificación para la metodología de extracción líquido-líquido.

Compuesto	LC (mg.L <sup>-1</sup> )	Rec (%)	RSD (%)	Compuesto	LC (mg.L <sup>-1</sup> )	Rec (%)	RDS (%)
a-HCH	3,00x10 <sup>-05</sup>	76,94	8,28	Difenoconazol	3,00 x10 <sup>-04</sup>	77,42	5,46
b-HCH	6,48 x10 <sup>-05</sup>	89,04	10,63	g-HCH	1,50 x10 <sup>-05</sup>	82,25	5,40
Clorotalonilo	4,05 x10 <sup>-05</sup>	88,16	6,14	Alaclor	1,50 x10 <sup>-05</sup>	90,59	4,51
Paration metil	3,00 x10 <sup>-05</sup>	81,16	8,16	Diclofluanid	5,10 x10 <sup>-05</sup>	82,18	1,21
Fenitrothion	3,00 x10 <sup>-05</sup>	85,94	6,00	Triadimefon	9,00 x10 <sup>-05</sup>	72,03	1,39
Malation	8,40 x10 <sup>-05</sup>	91,89	7,81	Isofenfos	9,00 x10 <sup>-05</sup>	80,52	0,93
Clorpirifos	2,55 x10 <sup>-05</sup>	90,97	10,06	Fentoato	6,00 x10 <sup>-05</sup>	83,86	3,22
Endosulfan	3,00 x10 <sup>-05</sup>	85,14	10,10	4,4'-DDE	1,80 x10 <sup>-05</sup>	81,99	3,76
Profenofos	3,00 x10 <sup>-05</sup>	90,57	9,04	Tetradifon	1,50 x10 <sup>-05</sup>	77,94	2,97
4,4'-DDD	3,00 x10 <sup>-05</sup>	84,66	8,44	l-cihalotrina	1,50 x10 <sup>-05</sup>	76,38	3,59
4,4'-DDT	6,00 x10 <sup>-05</sup>	84,91	11,40	Pirazofos	9,00 x10 <sup>-05</sup>	79,45	2,60
Propargita	4,20 x10 <sup>-03</sup>	75,89	6,44	b- ciflutrina	6,00 x10 <sup>-05</sup>	77,68	4,41
Bifentrina	6,00 x10 <sup>-05</sup>	91,53	0,00	Deltametrina	1,80 x10 <sup>-05</sup>	73,97	7,22
Cipermetrina	1,20 x10 <sup>-04</sup>	90,00	7,87	Pirimetanil	2,40 x10 <sup>-04</sup>	74,35	0,39

LC: Límite de cuantificación.

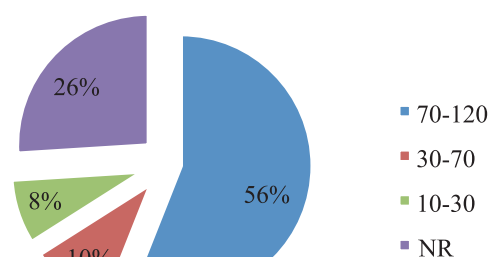
Rec (%): Porcentaje de recuperación.

RSD (%): Desviación estándar relativa.

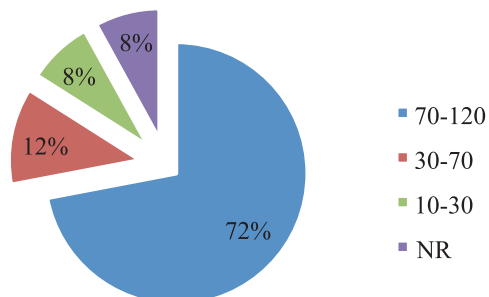
En cuanto a la metodología de extracción en fase sólida, en la Figura 2b se observa que un 72% de los compuestos evaluados presentaron porcentajes de recuperación dentro del rango de aceptación de la metodología (70-120%) (22) mientras que un 8% presentó recuperación nula. Estos resultados son comparables con los obtenidos por Robles-Molina *et al.* (5), quienes en su estudio comparativo determinaron que, a una concentración de fortificación de  $1,5 \times 10^{-4}$  mg/L, de un total de 57 compuestos de diferentes familias químicas, un 53% presentaban porcentajes de recuperación superiores al 70% empleando ELL y un 63% empleando EFS.

El proceso de extracción en fase sólida tiene como objetivo realizar el aislamiento selectivo de los analitos objetivo en una muestra compleja y al mismo tiempo realizar un proceso de concentración, como es el caso del presente estudio. En el proceso se emplean interacciones reversibles, entre el analito y la superficie de la fase estacionaria. Comercialmente se encuentran diversas modificaciones en materia de adsorbentes; en este caso se utilizó una fase polimérica compuesta por un polímero de etilvinilbenceno y divinilbenceno entrecruzado (20), el cual provee una gran área superficial y permite retener sustancias de mayor polaridad que pueden ser eluidas posteriormente utilizando la mezcla metanol:acetato de etilo. Debido a la polaridad intermedia de la fase estacionaria, compuestos como el acefato (Log Kow=-0,89) y su metabolito, el metamidofos (Log Kow=-0,89) que poseen muy elevada solubilidad en agua (650 g/L a 25 °C y >2000 g/L a 25 °C respectivamente) (24) no se quedan retenidos en la fase estacionaria, sino que tienden a quedarse disueltos en la matriz acuosa, por lo tanto su recuperación es baja o nula. Este tipo de compuestos requiere el uso de fases estacionarias con sustituyentes polares que permitan su retención y elución selectiva con disolventes de elevada polaridad. Así mismo, compuestos como algunos organoclorados o como el clorotalonilo, que es un benceno sustituido no fueron eluidos con la mezcla de solventes empleada, quedándose retenidos en la superficie del adsorbente, por lo que su recuperación en EFS es muy baja o nula. En

#### a. Porcentajes de recuperación (%) ELL



#### b. Porcentajes de recuperación (%) EFS

**Figura 2.** Porcentaje de recuperación de analitos dentro del rango de aceptación para las dos metodologías evaluadas.



la Tabla 4 se muestran los porcentajes de recuperación, los límites de cuantificación y la desviación estándar relativa para los compuestos extraídos por esta metodología. En su estudio Robles-Molina *et al.* (5) muestran que pueden encontrarse marcadas diferencias en la recuperación de analitos de diferentes familias químicas empleando una u otra técnica, lo cual se evidenció con las triazinas, que presentaron porcentajes de recuperación superiores al 90% con EFS y menores a 60% con ELL. Robles-Molina *et al.* (5), también determinaron que los compuestos organoclorados presentaron mejores recuperaciones con ELL y que para los organofosforados se obtienen, en general, buenos porcentajes de recuperación con ambas metodologías.

Se evidenció que 22 de los 50 plaguicidas presentaron recuperación entre el 70% y el 120% tanto por EFS como por ELL. Compuestos organoclorados como el 4,4'-DDD, el endosulfan y el alaclor tienen porcentajes de recuperación estadísticamente superiores empleando EFS ( $t$  student  $p < 0,05$ ), sin embargo la metodología de ELL es más adecuada para su análisis puesto que el valor de RSD es menor. De los 22 compuestos, 13 no presentaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) en la recuperación por las dos metodologías.

## Conclusiones

En el presente estudio se realizó la comparación del desempeño en cuanto a detección, porcentaje de recuperación y precisión de dos

metodologías para la extracción de 50 plaguicidas en muestras de agua potable empleando cromatografía de gases acoplada a detector de micro captura electrónica y de nitrógeno fósforo. Las dos metodologías permiten determinar los analitos evaluados de acuerdo a los valores establecidos por la normativa en Colombia, con excepción del insecticida monocrotofos, cuyo límite de detección es superior al exigido.

Se determinó que 36 de los 50 compuestos evaluados pueden ser determinados empleando la metodología de extracción en fase sólida mientras que empleando extracción líquido-líquido pueden analizarse 28 de ellos. Así mismo, se determinó que 22 de los compuestos evaluados pueden ser determinados con cualquiera de las dos metodologías, teniendo porcentajes de recuperación mayores con la metodología de extracción en fase sólida y siendo más precisa la extracción líquido-líquido. Se determinó que el insecticida acefato y su metabolito metamidofos no pueden ser analizados por ninguna de las dos metodologías propuestas debido a su elevada polaridad y solubilidad en agua.

## Agradecimientos

Expresamos nuestros agradecimientos al Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación, COLCIENCIAS y al Laboratorio de Análisis de Residuos de Plaguicidas LARP del Departamento de Química de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá por la financiación de este proyecto.

**Tabla 4.** Porcentaje de recuperación y precisión al límite de cuantificación para la metodología de extracción en fase sólida.

Compuesto	Rec (%)	RSD (%) n=3	LC (mg L <sup>-1</sup> )	Compuesto	Rec (%)	RSD (%) n=3	LC (mg L <sup>-1</sup> )
Cimoxanil	82,34	10,12	1,35 x10 <sup>-03</sup>	Lindano	72,17	17,75	5,00 x10 <sup>-05</sup>
Dimetoato	81,32	1,63	1,29 x10 <sup>-04</sup>	Diazinon	97,50	10,34	2,20 x10 <sup>-04</sup>
b-HCH	108,60	5,15	1,30 x10 <sup>-04</sup>	Diclofluanid	116,57	3,63	1,70 x10 <sup>-04</sup>
Malation	101,39	9,86	1,68 x10 <sup>-04</sup>	Triadimefon	96,91	2,14	3,00 x10 <sup>-04</sup>
Clorpirifos	94,72	3,26	5,10 x10 <sup>-05</sup>	Fentoato	93,80	13,26	2,00 x10 <sup>-04</sup>
Endosulfan	73,50	4,09	6,00 x10 <sup>-05</sup>	Ciproconazol	95,47	5,74	2,50 x10 <sup>-03</sup>
Hexaconazol	90,05	7,38	1,20 x10 <sup>-04</sup>	Oxadicyl	109,80	7,32	2,80 x10 <sup>-03</sup>
Profenofos	81,88	5,95	6,00 x10 <sup>-05</sup>	Propiconazol	98,51	11,71	1,00 x10 <sup>-04</sup>
4,4'-DDD	97,84	8,84	6,00 x10 <sup>-05</sup>	Epoxiconazol	102,30	0,84	6,60 x10 <sup>-04</sup>
4,4'-DDT	88,95	5,35	1,20 x10 <sup>-04</sup>	Iprodiona	96,48	8,66	4,00 x10 <sup>-04</sup>
Propargita	142,43	12,58	8,40 x10 <sup>-03</sup>	Tetradifon	92,77	4,55	5,00 x10 <sup>-05</sup>
Cipermetrina	80,91	11,04	2,40 x10 <sup>-04</sup>	Cihalotrina	84,98	16,26	5,00 x10 <sup>-05</sup>
Difenoconazol	99,30	15,83	6,00 x10 <sup>-04</sup>	Pirazofos	90,24	12,09	3,00 x10 <sup>-04</sup>
Azoxistrobin	94,65	10,87	1,80 x10 <sup>-04</sup>	Deltametrina	74,53	24,57	6,00 x10 <sup>-05</sup>
Monocrotofos	77,16	2,95	4,20 x10 <sup>-04</sup>	Dimetomorf	105,53	7,06	3,00 x10 <sup>-03</sup>
Metaxil	108,41	6,24	3,60 x10 <sup>-03</sup>	Pirimetanil	99,79	5,73	8,00 x10 <sup>-04</sup>
Tiabendazol	82,80	6,57	4,02 x10 <sup>-03</sup>	Fention	96,51	3,10	7,50 x10 <sup>-05</sup>
HCB	71,62	11,34	5,00 x10 <sup>-05</sup>	Tebuconazol	84,84	4,22	1,00 x10 <sup>-03</sup>

LC: Límite de cuantificación

Rec (%): Porcentaje de recuperación

RSD (%): Desviación estándar relativa.

## Referencias

- Estévez-Arias, M.; López-Periago E.; Martínez-Carballo, E.; Simal-Gándara, J.; Mejuto, J.-C.; García Río, J. The mobility and degradation of pesticides in soils and the pollution of groundwater resources. *Agriculture, Ecosystems & Environment*. 2008. **123**(4): 247-260.
- Chowdhary, S., R. Bhattacharyya, and D. Banerjee, Acute organophosphorus poisoning. *Clinica Chimica Acta*. 2014. **431**: 66-76.
- Environmental Protection Agency. Methods for organic chemical analysis of municipal and industrial wastewater. Method 608—organochlorine pesticides and PCBs. 2007.
- Wu, J.; Lu, J.; Wilson, C. Effective liquid-liquid extraction method for analysis of pyrethroid and phenylpyrazole pesticides in emulsion-prone surface water samples. *Journal of Chromatography A*. 2010. **1217**. **41**: 6327-6333.
- Robles-Molina, J.; López, G.; García-Reyes, JF., Molina-Díaz, A. Comparative evaluation of liquid-liquid extraction, solid-phase extraction and solid-phase microextraction for the gas chromatography-mass spectrometry determination of multiclass priority organic contaminants in wastewater. *Talanta*. 2013. **117**: 382-391.
- Majzik-Solymos, E.; Visi, E.; Károly G.; Beke-Berczi, B.; Györfi, L. Comparison of extraction methods to monitor pesticide residues in surface water. *J Chromatogr Sci*. 2001. **39**: 325-31.
- Mojica, A. Determinación de residuos de plaguicidas en aguas y suelos de la región del lago de Tota. Tesis de Maestría. Departamento de Química. 2010, Universidad Nacional de Colombia.
- Tankiewicz, M.; Fenik, J.; Biziuk, M.; Solventless and solvent-minimized sample preparation techniques for determining currently used pesticides in water samples: A review. *Talanta*. 2011. **86**: 8-22.
- Seebunrueng, K.; Santaladchaiyakit, Y.; Srijaranai, S. Vortex-assisted low density solvent based demulsified dispersive liquid-liquid microextraction and high-performance liquid chromatography for the determination of organophosphorus pesticides in water samples. *Chemosphere*. 2014. **103**: 51-58.
- Farajzadeh, M.A.; Khoshmaram, L.; Air-assisted liquid-liquid microextraction-gas chromatography-flame ionisation detection: A fast and simple method for the assessment of triazole pesticides residues in surface water, cucumber, tomato and grape juices samples. *Food Chemistry*. 2013. **141**(3): 1881-1887.
- Jiménez, J.J. Simultaneous liquid-liquid extraction and dispersive solid-phase extraction as a sample preparation method to determine acidic contaminants in river water by gas chromatography/mass spectrometry. *Talanta*. 2013. **116**: 678-687.
- Żwir-Ferenc, A.; Biziuk, M. Solid Phase Extraction Technique – Trends, Opportunities and Applications. *Polish J. of Environ. Stud*. 2006. **15**(5): 13-17.
- Latrous El Atrache, L.; Ben Sqhaier, R.; Bejaoui Kefi, B.; Haldys, V.; Tortajada, J. Factorial design optimization of experimental variables in preconcentration of carbamates pesticides in water samples using solid phase extraction and liquid chromatography-electrospray-mass spectrometry determination. *Talanta*, 2013. **117**: 392-398.
- Hurtado-Sánchez, M.C.; Romero-González, R.; Rodríguez Cáceres, M.I.; Durán-Merás, I.; Frenich, AG. Rapid and sensitive on-line solid phase extraction-ultra high performance liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry analysis of pesticides in surface waters. *Journal of Chromatography A*. 2013. **130**: 193-202.
- Patsias, J.; Papadopoulou-Mourkidou, E. Rapid method for the analysis of a variety of chemical classes of pesticides in surface and ground waters by off-line solid-phase extraction and gas chromatography-ion trap mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 1996. **740**(1): 83-98.
- Masiá, A.; Ibáñez, M.; Sancho, JV.; Picó Y.; Hernández, F. Combined use of liquid chromatography triple quadrupole mass spectrometry and liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry in systematic screening of pesticides and other contaminants in water samples. *Analytica Chimica Acta*. 2013. **761**: 117-127.
- Rodríguez, H.A.; Guerrero, J.; Castro, R. Determinación de residuos de glifosato y de su metabolito ácido aminometilfosfonico en aguas mediante cromatografía líquida de alta eficiencia con derivación poscolumna y detección por fluorescencia. *Revista Colombiana de Química*. 2002. **31**(1): 7 – 18.
- Ministerio de la protección social, Ministerio de ambiente, vivienda y desarrollo territorial. Resolución 2115 del 22 de Junio de 2007. Capítulo 8.
- World Health Organization-International agency for cancer research. Agents classified by the IARC monographs, volumes 1-109. 345 Disponible en <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/>. [consultado el 10 de Julio de 2014].
- Junker-Buchheit, A.; Witztenbacher, M. Pesticide monitoring of drinking water with the help of solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 1996. **737**(1): 67-74.
- Corley, J. Best practices in establishing detection and quantification limits for pesticide residues in foods. En: Handbook of Residue Analytical Methods for Agrochemicals. J.W.S. Ltd. Editor. 2003.
- SANCO. Method Validation and quality Control Procedures for pesticide residues analysis in food and feed. 2011. Disponible en [http://ec.europa.eu/food/plant/protection/resources/qualcontrol\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/plant/protection/resources/qualcontrol_en.pdf). [Consultado el 10 de Julio de 2013].
- Kegley, S.E.; Hill, B.R.; Orme S.; Choi A.H. PAN Pesticide Database, Pesticide Action Network. Estados Unidos. 2014. Disponible en: <http://www.pesticideinfo.org>. [Consultado el 25 de junio de 2014].
- Yen, J.H.; Lin, KH.; Wang, Y.S. Potential of the insecticides acephate and methamidophos to contaminate groundwater. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2000. **45**(1): 79-86.

### Article citation:

Guerrero-Dallos, J.A.; Velandia - Rodríguez, N.Y. Comparación de dos metodologías para la determinación de residuos de plaguicidas en agua potable. *Rev Colomb Quim*. 2014. **43**(1): 17-24.

Recibido: 20 octubre 2013. Aceptado: 15 diciembre 2013

## Desarrollo y validación de un método verde para la extracción y cuantificación de residuos de cipermetrina en tejido animal

### Resumen

En este trabajo se desarrolló y validó un método simple, amigable ambientalmente y efectivo, para la extracción y cuantificación de cipermetrina en muestras de bovino (hígado, grasa perirrenal y músculo) utilizando dispersión de matriz en fase sólida (MSPD) y cromatografía de gases con detector de ionización de llama (GC-FID). Se evaluaron diferentes parámetros del método, tales como el agente dispersante, el disolvente de extracción y el volumen de disolvente. Los mejores resultados para la extracción de cipermetrina por MSPD fueron: 0,20 g de muestra macerados con 0,80 g de sílica gel y extraídos con 5,00 mL de acetona. El procedimiento propuesto fue validado mostrando comportamiento lineal en el intervalo de 10,20-400,40 µg/L ( $R^2=0,9988$ ). Los límites de detección y cuantificación fueron 2,00 y 5,70 µg/L respectivamente, con una desviación estándar relativa de 0,0875 ( $n=5$ ). Este método permite determinar cipermetrina hasta niveles traza en muestras de tejido animal, con una recuperación de 98,96%.

**Palabras Claves:** Dispersión de matriz en fase sólida (MSPD), cipermetrina, extracción, cromatografía de gases con detector de ionización de llama (GC-FID), tejido animal.

## Development and validation of a green method for the extraction and quantification of cypermethrin residues in animal tissue

### Abstract

In the present study a simple, effective and environmentally friendly method was developed and validated for the extraction and quantification of cypermethrin in animal tissue (meat, fat and liver) using matrix solid-phase dispersion (MSPD) and gas chromatography with flame ionization detector (GC-FID). Different parameters of the method were evaluated, such as dispersant, extractive solvent and solvent volume. The best results for the extraction of cypermethrin by MSPD were 0.20 g of sample with 0.80 g of silica gel and 5.00 mL of acetone as eluting solvent. The proposed procedure was validated showing linear behavior in the interval of 10.20 to 400.40 µg/L ( $R^2= 0.9988$ ). Detection and quantification limits ranged from 2.00 and 5.70 µg/L respectively, with a standard deviation of 0.0875 ( $n=5$ ). This method enables to determine cypermethrin at trace level in animal tissue samples, with a recovery of 98.96%.

**Keywords:** Matrix solid-phase dispersion (MSPD), cypermethrin, extraction method, gas chromatography with flame ionization detector (GC-FID), animal tissue.

## Desenvolvimento e validação do método verde para a extração e quantificação dos resíduos da cipermetrina no tecido animal

### Resumo

Neste trabalho foi desenvolvido e validado um método verde para extração e quantificação de cipermetrina em amostras de fígado, gordura perirrenal e músculo em gado bovino, por meio da técnica de dispersão de matriz em fase sólida (MSPD) e cromatografia de gases com detecção de ionização de chama (GC-FID). Foram avaliados diferentes parâmetros do método, como dispersante, extração com solvente e volume de solvente. Os melhores resultados para a extração da cipermetrina por MSPD foram 0.20 g da amostra macerada com 0.80 g de gel de sílica e extraíu-se com 5.00 mL de acetona. O método proposto foi validado mostrando um comportamento linear na gama testada (10.20-400.40 µg/L) com  $R^2$  de 0.9988. Os limites de detecção e de quantificação foram 2.00 e 5.70 µg/L, respectivamente, com um desvio padrão de 0.0875 ( $n = 5$ ). O método proposto neste trabalho permitiu determinar níveis traza da cipermetrina em amostras de tecidos animais, com uma recuperação de 98.96%.

**Palavras chave:** Dispersão da matriz em fase sólida (MSPD), cipermetrina, extração, cromatografia de gases com detecção de ionização de chama (GC-FID), tecido animal.

## Introducción

Los pesticidas piretroides son compuestos químicos que presentan propiedades que disminuyen, alteran o inhiben diferentes procesos biológicos. Están diseñados para combatir diversas plagas y malezas que atacan los cultivos agrícolas y se usan para controlar la vegetación no deseada en sistemas acuáticos (1). Son los más utilizados en la agricultura, la silvicultura, la horticultura e industria textil, además son ampliamente usados en cultivos de arroz, maíz, soja y pastos que son fuente de alimento para el ganado (2) que consume más del 10% de su peso en pasturas, esto representa un riesgo potencial en la medida en la que estas sustancias pueden pasar a través de la cadena alimenticia del pasto al animal y de este al humano (3, 4). Algunos piretroides como la cipermetrina están registrados en una gran variedad de formulaciones para el control de pulgas y garrapatas en animales, y para el tratamiento de instalaciones donde se crían con la finalidad de controlar las moscas (5), su uso excesivo puede ocasionar que el pesticida se logre bioacumular en los tejidos de los bovinos que posteriormente son consumidos por los humanos, situación que podría ser la causa de muchas enfermedades (3).

La principal fuente proteica en la dieta humana es de origen animal, especialmente la carne de bovino, este tejido debe estar libre de cualquier tipo de sustancias xenobióticas, razón por la cual resulta importante establecer técnicas analíticas que por un lado permitan su detección y cuantificación en carne, y por el otro favorezcan la implementación de medidas que garanticen la calidad e inocuidad de este producto. De esta manera es posible impactar positivamente la salud humana y la producción animal, logrando mejorar la competitividad y aumentando las posibilidades para acceder a los mercados internacionales con mejores precios.

En los últimos años se han llevado a cabo estudios de piretroides en diferentes muestras utilizando técnicas de extracción como ultrasonido, extracción asistida por microondas, extracción soxhlet clásica o automatizada, extracción en fase sólida (SPE), microextracción en fase sólida (SPME) y dispersión de matriz en fase sólida (MSPD) (6, 7). Aunque en un principio MSPD parece muy similar a la SPE, existen claras diferencias entre ambas. En MSPD se consigue una completa disrupción y dispersión de la muestra en partículas de

pequeño tamaño, proporcionando una superficie mejorada para la posterior extracción de la muestra, mientras que en SPE la disrupción de la muestra debe llevarse a cabo en un paso previo, ya que la muestra debe ser líquida para que se pueda aplicar la extracción en fase sólida. La muestra suele quedar retenida en la parte superior de la columna cuando se realiza la SPE; por el contrario, en MSPD la muestra se dispersa por toda la columna. Finalmente, las interacciones físicas y químicas de los componentes del sistema son mayores en MSPD (6, 8).

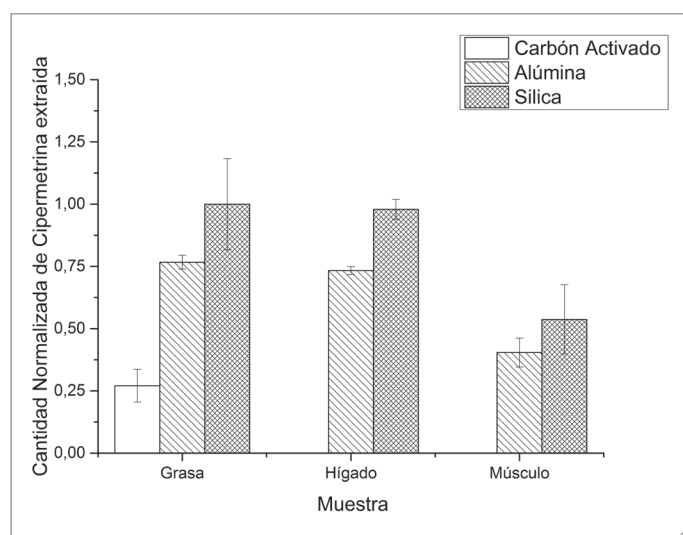
Debido al contenido de grasa de las muestras objeto y a la cantidad disponible de las mismas, en este trabajo se decidió utilizar la técnica MSPD ya que disminuye el tiempo de análisis, el tamaño de la muestra y el consumo de disolventes, además es idónea para muestras biológicas que son particularmente complejas (9, 10). Por lo anterior, el presente artículo tiene como finalidad establecer un método verde estandarizado para determinar la cantidad de cipermetrina presente en diferentes tejidos de ganado bovino; este método puede ser utilizado en posteriores estudios y en el control de calidad de este producto alimenticio. Según la comisión europea los límites máximos de residuos de cipermetrina son 20 µg/kg para hígado y músculo y 200 µg/kg para grasa, y estos han sido adoptados por la legislación colombiana (11).

## Materiales y métodos

### Instrumentos, materiales y reactivos

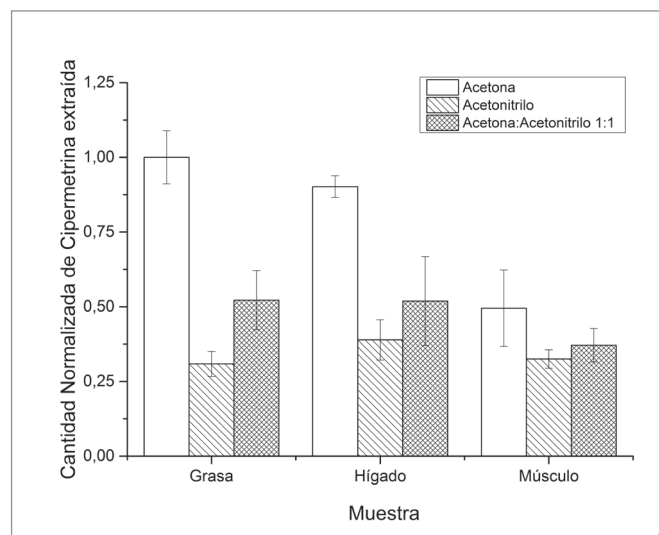
Para el presente estudio se empleó el estándar analítico cipermetrina (mezcla de isómeros) 95,10% (Fluka®), acetona y acetonitrilo grado HPLC (Merck®), Sulfato de sodio anhidro (Merck®), Carbón Activado (Sigma®), Sílica Gel (Merck®) y Alúmina (Sigma®).

Para la cuantificación de cipermetrina se empleó un cromatógrafo de gases Agilent 6890 con puerto de inyección split-splitless y detector de ionización de llama (FID), una columna capilar HP-5 de 60 m x 0,25 mm de diámetro interno x 0,25 µm de espesor. El gas portador fue helio (99,995%, Aga-fano®) a un flujo de 2,00 mL/min; la temperatura



**Figura 1.** Comparación de la eficiencia de la extracción por MSPD al utilizar diferentes fases estacionarias.

Los resultados están expresados como el contenido de Cipermetrina relativo al máximo valor encontrado



**Figura 2.** Comparación de la eficiencia de la extracción por MSPD al utilizar diferentes disolventes.

Los resultados están expresados como el contenido de Cipermetrina relativo al máximo valor encontrado



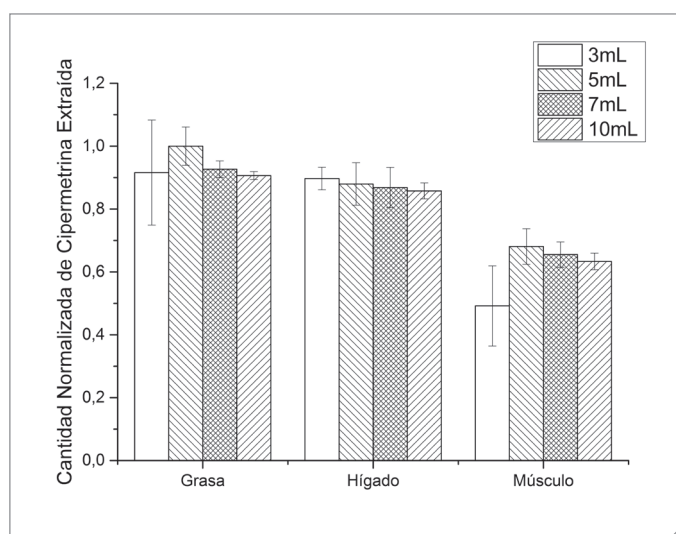
del inyector fue de 270 °C y la inyección se realizó en modo splitless. Se utilizó la programación utilizada por Cardona y colaboradores para muestras de tejido vegetal (12), en esta metodología se inicia a 200 °C y se mantiene esta temperatura por dos min; luego se aumenta a 20 °C/min hasta 270 °C y de ahí se aumenta a 3 °C/min hasta alcanzar los 273 °C, en donde se mantiene constante por un min; luego se lleva hasta 278 °C a 0,5 °C/min y por último a 10 °C/min hasta alcanzar una temperatura final de 290 °C, en la cual se deja por 4 min.

### Desarrollo del método de extracción

La evaluación de los parámetros para el proceso de extracción (Tipo de fase estacionaria, tipo de disolvente y cantidad del mismo) se llevaron a cabo utilizando 0,20 g de muestra de tejido (músculo, hígado o grasa perirrenal), adquirido en un mercado de la ciudad. El tejido se dopó hasta una concentración en muestra de 40,00 µg/kg de cipermetrina, esta muestra se dejó en reposo y refrigeración durante 24 h, posteriormente fue macerada y homogenizada con 0,80 g de la fase estacionaria (Sílica, alúmina o carbón activado). Esta mezcla se transfirió a una jeringa desechable de 5,00 mL, la cual contenía en su interior una capa de lana de vidrio, una de sulfato de sodio, una de la mezcla de la muestra con la fase estacionaria y finalmente una nueva capa de lana de vidrio; a continuación se compactó. Posteriormente se eluyó con 5,00 mL del disolvente (Acetona, acetonitrilo o mezcla de los dos) en un equipo de SPE (Máx 20" Hg) y se concentró a 1 mL. Una vez definido el disolvente, se evaluaron diferentes volúmenes (3, 5, 7 y 10 mL) del mismo. Los ensayos llevados a cabo se realizaron por triplicado. Enseguida se procedió a inyectar 1 µL de esta solución en el cromatógrafo para la determinación y cuantificación del analito.

### Resultados y discusión

Existen varios factores que influyen en la extracción mediante MSPD. Así, un tamaño de partículas muy pequeño alarga el proceso de elución y hace necesario aplicar un vacío excesivo para conseguir un flujo adecuado. El tipo y cantidad de adsorbente en relación a la cantidad de muestra es otro parámetro que hay que tener en cuenta. Igualmente el



**Figura 3.** Comparación de la eficiencia de la extracción por MSPD al utilizar diferentes cantidades de disolventes.

Los resultados están expresados como el contenido de Cipermetrina relativo al máximo valor encontrado

disolvente y el volumen del eluyente también influyen en la eficiencia del proceso de extracción mediante esta técnica (13).

### Selección del tipo de fase estacionaria

La distribución de los analitos entre la muestra dispersada y el disolvente de elución, depende de la fase estacionaria. La ruptura brusca de la muestra y la dispersión de sus componentes, solo se producirán en la medida que los componentes interactúen con las características químicas de la fase estacionaria; por estas razones y teniendo en cuenta que la muestra es sólida se decidió trabajar con una fase estacionaria en su mismo estado.

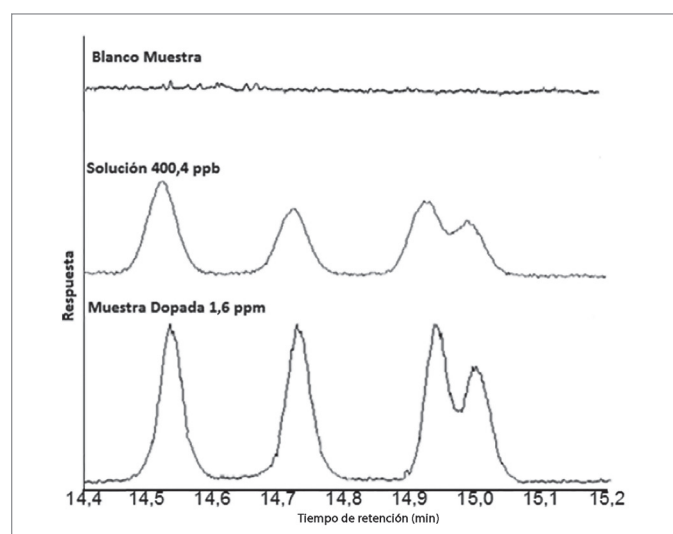
En la Figura 1, se observa que la fase estacionaria que dio mejores resultados de extracción fue la sílica gel, seguida de la alúmina y por último el carbón activado que presentó menor eficiencia de extracción.

La sílica ( $\text{SiO}_2$ ) y la alúmina ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) son adsorbentes denominados de fase normal utilizados para la extracción de pesticidas, herbicidas y contaminantes prioritarios en matrices biológicas mediante MSPD. La sílica y la alúmina son polares, por tanto la cipermetrina, que es de moderada polaridad, eluye en mayor cantidad y a mayor velocidad en estas fases. Los materiales derivados de la sílica son los más empleados en la disrupción de la matriz en MSPD, debido a que presentan la ventaja de poseer grupos silanoles no enlazados, tanto en la superficie de las partículas como en los poros, que interaccionan con el agua de la muestra, actuando a su vez como agente desecante (13).

Cheng y colaboradores usaron un método por MSPD para la extracción de cipermetrina en tejido de porcinos, para ello utilizaron acetonitrilo como disolvente y alúmina como fase estacionaria, obteniendo una recuperación de 83,50%, que es menor a la obtenida usando acetona como disolvente de elución (14).

### Selección de tipo de disolvente

Al igual que en cromatografía o en SPE, la polaridad del disolvente es de gran importancia para determinar la velocidad y el orden de elución de los analitos del cartucho de MSPD. La correcta elección del disolvente y el diseño del perfil de elución permiten obtener extractos libres de impurezas por la retención de las mismas en la fase estacionaria (8).



**Figura 4.** Cromatograma de cipermetrina.

Como se observa en la Figura 2, la acetona fue la que presentó la mejor recuperación, seguida de la mezcla acetonitrilo:acetona (1:1) y del acetonitrilo. Dada la moderada polaridad de la cipermetrina y teniendo en cuenta la polaridad de la acetona, se entiende que esta se disuelva y eluya más rápidamente usando la acetona como disolvente de arrastre, seguido de la mezcla acetona-acetonitrilo y por último del acetonitrilo.

### Volumen de disolvente

Este factor debe evaluarse, pues varía la cantidad necesaria para la elución dependiendo de la aplicación, además debe ser examinado con cuidado para reducir el uso de disolventes y la coelución no intencional de las posibles interferencias que pueden hacer difícil la integración de la molécula de interés en el cromatograma.

Como se puede observar en la Figura 3, utilizando 3,00 mL de acetona, la cantidad eluida de cipermetrina es menor que la cuantificada utilizando 5,00 mL y las cantidades mayores a este volumen (7,00 y 10,00 mL) extraen una cantidad muy similar a la obtenida con 5,00 mL, pero con estos volúmenes disminuye notablemente la resolución de los cromatogramas obtenidos; además con estos volúmenes el gasto de disolventes es mayor.

Cheng y colaboradores, usaron 20,00 mL de una mezcla acetonitrilo-agua (85:15) en la determinación de piretroides en tejido de porcino, este volumen es mayor que el que presentó la mejor recuperación en este trabajo, el cual fue de 5,00 mL (14).

### Validación del método analítico

Las condiciones recomendables para la extracción y determinación de cipermetrina en hígado, músculo y grasa perirrenal por MSPD-GC/FID son 0,20 g de muestra de tejido (músculo, hígado o grasa perirrenal), se maceran y homogenizan con 0,80 g de sílica. Esta mezcla se transfiere a una jeringa desechable de 5,00 mL, la cual contiene en su interior una capa de lana de vidrio, una de sulfato de sodio, una de la mezcla de la muestra con la fase y finalmente una nueva capa de lana de vidrio; a con-

**Tabla 1.** Datos de validación para el método MSPD-CG/FID

PARÁMETRO	VALOR
Ecuación	$Y = 0,0042 X + 0,2865$
Rango Lineal ( $\mu\text{g/L}$ )	10,20 – 400,40
n	7
Pendiente (m)	0,0042
Intercepto con el eje y (b)	0,2865
$R^2$	0,9988
LOD ( $\mu\text{g/L}$ )	2,00
LOQ ( $\mu\text{g/L}$ )	5,70
Recuperación (Grasa) (n=5)	98,98%
Recuperación (Hígado) (n=5)	97,53%
Recuperación (Músculo) (n=5)	97,46%
Desviación estándar	0,0875

LOD: Límite de detección.

LOQ: Límite de cuantificación.

tinuación se compacta. Posteriormente se eluye con 5,00 mL de acetona, en un equipo de SPE (Máx 20" Hg) y se concentra hasta 1,00 mL. Enseguida se procede a inyectar 1,00  $\mu\text{L}$  de esta solución en el cromatógrafo para la determinación y cuantificación de la cipermetrina. Un cromatograma obtenido en la determinación de cipermetrina es presentado en la Figura 4. Los parámetros de validación son presentados en la Tabla 1.

### Linealidad, límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ)

La linealidad se evaluó utilizando 7 concentraciones diferentes en el rango 10,20 – 400,40  $\mu\text{g/L}$  obteniendo un coeficiente de correlación ( $R^2$ ) de 0,9988 que exhibe una buena linealidad en el rango de concentraciones examinadas (Tabla 1). Los análisis se llevaron a cabo por triplicado.

Los valores calculados de LOD (proporción señal a ruido de 3;  $S/N = 3$ ) y LOQ (Proporción señal a ruido de 10;  $S/N = 10$ ) fueron 2,00  $\mu\text{g/L}$  y 5,70  $\mu\text{g/L}$  respectivamente.

### Exactitud, precisión y reproducibilidad

Se evaluó la recuperación de cantidades conocidas de cipermetrina en muestras con tres concentraciones diferentes (221,10; 301,50 y 400,4  $\mu\text{g/L}$ ) en cada una de las muestras de hígado, músculo y grasa perirrenal. Todos los análisis se llevaron a cabo por triplicado. La precisión del método fue evaluada durante un día y los valores de repetibilidad se calcularon analizando muestras ( $n = 5$ ) a una concentración de 5,00  $\mu\text{g/kg}$ .

En la Tabla 1 se puede observar una buena recuperación de 98,98%, 97,53% y 97,46% para grasa, hígado y músculo respectivamente.

### Comparación de la técnica de extracción validada con métodos tradicionales

Se compararon los resultados obtenidos para la extracción de fracciones de una misma muestra con MSPD frente a Soxhlet, como método de referencia, y ultrasonido. Los resultados obtenidos para ultrasonido y Soxhlet, expresados como recuperaciones frente a la concentración obtenida usando MSPD, se presentan en la Tabla 2. MSPD proporcionó valores análogos a Soxhlet y superiores a ultrasonido, siendo la primera técnica más sencilla y menos costosa. Con ultrasonido y MSPD se pueden extraer varias muestras simultáneamente, contrario a Soxhlet, en el cual solo se puede tratar una muestra por extracción.

En Soxhlet y MSPD se han integrado las etapas de limpieza en el proceso de extracción, minimizando la manipulación de los extractos y evitando así la pérdida de analito. Frente a MSPD, Soxhlet requiere un mayor consumo de disolvente (250 mL) por lo cual no es una técnica viable a pesar de ser una técnica convencional, la gran cantidad de disolvente usado proporciona una alta contaminación al ambiente. La cantidad de muestra (10 g) para Soxhlet es mucho mayor que para las otras dos técnicas estudiadas y el proceso de extracción dura 8 h comparado con 15 min por MSPD. Por lo anterior, MSPD ha demostrado que

**Tabla 2.** Comparación de la recuperación de cipermetrina por los tres métodos

Muestra	Soxhlet (%)	Ultrasonido (%)	MSPD (%)
Grasa	91,06	45,63	97,02
Hígado	94,40	69,02	95,33
Músculo	89,75	66,86	97,46

genera resultados equivalentes o mejores que Soxhlet y Ultrasonido y presenta grandes ventajas, puesto que reduce el consumo de disolventes orgánicos, que son tóxicos para la salud y el medio ambiente además de ser un método rápido, barato y que requiere poca cantidad de muestra.

## Conclusiones

El método propuesto es sencillo, requiere menor tiempo de análisis, disminuye el consumo de disolvente y genera menos residuos tóxicos, lo que lo hace una técnica ambientalmente amigable y más económica. La metodología desarrollada en este trabajo para la extracción y cuantificación de cipermetrina en hígado, músculo y grasa perirrenal, cubre el rango legislado. El método expuesto es recomendado para extracción y cuantificación de cipermetrina en muestras de tejido animal, ya que la recuperación para grasa, hígado y músculo fue de 97,02%, 95,33% y 97,46%, respectivamente.

## Agradecimientos

Los autores agradecen al Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural de la República de Colombia, por su apoyo financiero a esta investigación bajo el macroproyecto titulado “Mejoramiento de la inocuidad de la agroindustria cárnica con relación a la presencia de sustancias xenobióticas en los subsistemas agrícola y pecuario”, Según convenio MADR 2008 H2468-3968.

## Referencias

1. Bonasea, R.; Amé, M.; Wunderlin, D. Determination of priority pesticides in water samples combining SPE and SPME coupled to GC-MS. A case study: Suquia River basin (Argentina). *Chemosphere*. 2013. **90**: 1860-1869.
2. Macedo, A.; Nogueira, A.; Govoni, S. Matrix solid-phase dispersion extraction for analysis of cipermethrin residue in cows' milk. *Chromatographia*. 2009. **69**: 571-573.
3. Bowman D.; Lynn, R. Parasitología para veterinarios. 8ª ed., España, Elsevier. pp 480. 2004.
4. Mudiam, M.; Jain, R.; Maurya, S.; Khan, H.; Bandyopadhyay, S.; Murthy, R. Low density solvent based dispersive liquid-liquid microextraction with gas chromatography-electron capture detection for the determination of cypermethrin in tissues and blood of cypermethrin treated rats. *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 2012. **895**: 65-70.
5. Anadón, A.; Martínez-Larrañaga, M. R.; Martínez, M. A. Use and abuse of pyrethrins and synthetic pyrethroids in veterinary medicine. *J. Veterinary*. 2009. **182**: 7-20.
6. Barker, S. Matrix solid-phase dispersion (MSPD). *J. Biochem. Biophys. Methods*. 2007. **70**: 151-162.
7. Ledoux, M. Analytical methods applied to the determination of pesticide residues in foods of animal origin. A review of the past two decades. *J. Chromatogr. A*. 2011. **1218**: 1021-1036.
8. Capriotti, A.; Cavaliere, C.; Giansanti, P.; Gubbiotti, R.; Samperi, R.; Laganà, A. Recent developments in matrix solid-phase dispersion extraction. *J. Chromatogr. A*. 2010. **1217**: 2521- 2532.
9. López, B.; García, J.; Molina, A. Sample treatment and determination of pesticide residues in fatty vegetable matrices: A review. *Talanta*. 2009. **79**: 109-128.
10. Ding, Y.; You, J.; Lydy, M. Analysis of Pyrethroid Insecticides in Chironomus dilutus Using Matrix Solid Phase Dispersion Extraction. *Bull Environ Contamin Toxicol*. 2009. **83**: 388-392.
11. Diario Oficial de la Unión Europea. Bruselas. 2009. REGLAMENTO (UE) No 37/2010 DE LA COMISIÓN de 22 de diciembre de 2009. Disponible en: [http://ec.europa.eu/health/files/eudralex/vol-5/reg\\_2010\\_37/reg\\_2010\\_37\\_es.pdf](http://ec.europa.eu/health/files/eudralex/vol-5/reg_2010_37/reg_2010_37_es.pdf) [Consultado el 15 de julio de 2013]
12. Cardona, Y.; Chaparro, A.; Calderón, L.; Peláez, M.; García, C. Standardization of analytical method for extraction and quantification of cypermethrin in grass. *Rev Colomb Quím*. 2011. **40**: 211-226.
13. Albero, M. Determinación de residuos de contaminantes orgánicos en miel y zumos. Trabajo de grado, Departamento de Química Analítica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, 2009, pp 174.
14. Cheng, J.; Liu, M.; Yu, Y.; Wang, X.; Zhang, H. Ding, L. Jin, H. Determination of pyrethroids in porcine tissues by matrix solid-phase dispersion extraction and high-performance liquid chromatography. *Meat Science*. 2009. **82**: 407-412.

### Article citation:

Chaparro, A. L.; Gamboa, D.P.; Cardona, Y.; Bustamante, J.J.; García, C.H. Desarrollo y validación de un método verde para la extracción y cuantificación de residuos de cipermetrina en tejido animal. *Rev Colomb Quím*. 2014. **43**(1): 25-29.



Recibido: 12 diciembre 2013. Aceptado: 28 enero 2014

## Necesidades metroológicas en los laboratorios clínicos

## Metrological needs in clinical laboratories

## Necessidades metroológicas nos laboratórios clínicos

### Resumen

Los resultados generados por los laboratorios clínicos son elementos claves para el diagnóstico y tratamiento de enfermedades, así como para el seguimiento de los pacientes, por lo tanto se requiere un control metroológico sobre el proceso de medición, el cual determinará el grado de comparabilidad y de confianza requerido sobre los resultados obtenidos. Esta revisión aborda el tema de comparabilidad de las mediciones y de cómo esta se ve influenciada por factores como la conmutabilidad de los materiales de referencia, los métodos de medición, la disponibilidad de materiales y procedimientos de referencia, además de los intervalos de referencia y límites de decisión para un mensurando en particular. Finalmente se exponen cuáles son los mecanismos adoptados que permitirán garantizar la comparabilidad de las mediciones en esta área.

**Palabras clave:** Metrología, Trazabilidad, Material de referencia, Medición, Química clínica.

### Abstract

The results produced by clinical laboratories are key elements in the diagnosis and treatment of diseases and to monitor patients, so, it requires a metrological control over the measurement process, which will determine the degree of comparability and trust required on the obtained measurement results. Therefore, in this paper we discuss about the comparability of measurements and how it is influenced by factors such as commutability of reference materials, measurement methods, availability of materials and reference procedures, in addition to reference intervals and decision limits for a particular measurand. Finally it is exposed what are the mechanisms that allow ensure measurements comparability on this area.

**Keywords:** Metrology, Traceability, Reference material, Measurement, Clinical chemistry.

### Resumo

Os resultados gerados pelos laboratórios clínicos são elementos chaves para o diagnóstico e tratamento de doenças, assim como para o seguimento dos pacientes, sendo preciso um controle metroológico sobre o processo de medição, que determina o grau de comparabilidade e confiança requerido sobre os resultados obtidos. Neste documento trata-se o tópico de comparabilidade das medições e de como a mesma se encontra influenciada por fatores como a comutatividade dos materiais de referência, os métodos de medição, a disponibilidade de materiais e procedimentos de referência, além dos intervalos de referência e limites de decisão para um mensurando em particular. Finalmente, são expostos quais são os mecanismos adotados que permitirão garantir a comparabilidade das medições nesta área.

**Palavras chave:** Metrologia, Rastreabilidade, Material de referência, Medição, Química clínica.

## Introducción

La metrología es la ciencia de las mediciones y sus aplicaciones e incluye todos los aspectos teóricos y prácticos del proceso de medición, cualquiera que sea su incertidumbre de medición y su campo de aplicación (1). Esta ciencia es transversal a todas las ciencias analíticas, entre ellas la química clínica, área encargada del estudio de matrices de origen biológico (sangre, orina, líquido cefalorraquídeo, heces, entre otros) y de sus componentes, a través de métodos químicos o bioquímicos, emple-

ando técnicas de análisis convencionales, instrumentales o moleculares. Las mediciones que en esta área se llevan a cabo son de gran impacto en la calidad de vida de las personas, los resultados obtenidos permiten establecer límites de decisión o intervalos de referencia para diagnosticar un paciente, referir un tratamiento médico y tomar decisiones. La necesidad de obtener resultados de medición de varios mensurandos en periodos muy cortos y de aumentar el número de muestras analizadas ha llevado a que en los últimos años el grado de automatización de los laboratorios clínicos crezca de forma exponencial sin sacrificar la confianza exigida en los resultados de medición que se reportan; para lograrlo los

laboratorios deben asegurar el control metrológico de los procesos, de los métodos y las técnicas de medición; sin embargo, se han identificado algunas barreras que enfrenta este sector y que se resumen a continuación.

## Comparabilidad de los resultados

La comparabilidad metrológica de resultados hace alusión a valores o resultados de medida para magnitudes de una naturaleza dada, que son metrológicamente trazables a la misma referencia, sin importar que los valores y sus incertidumbres sean o no del mismo orden de magnitud (1).

El obtener resultados confiables y comparables, es uno de los objetivos más importantes de cualquier laboratorio clínico (2), sin embargo, lo que se observa en varias ocasiones es que, a pesar de analizar la misma sustancia química por diferentes métodos, el resultado que se obtiene depende del método de medición y de las referencias que este utilice. Es por esto que no es posible comparar directamente los resultados de las mediciones para obtener intervalos de referencia (3) y límites de decisión comunes útiles en el diagnóstico y tratamiento del paciente (4, 5).

Una forma de alcanzar la comparabilidad de los resultados, después del uso de materiales de referencia, es emplear metodologías establecidas por convenio internacional (6), Infusino y colaboradores exponen que el objetivo principal de los procedimientos de referencia en el campo clínico es permitir la comparación entre resultados de muestras humanas, independiente de los procedimientos comerciales, reactivos e instrumentos empleados para el análisis, así como de los laboratorios que realizan la determinación (7).

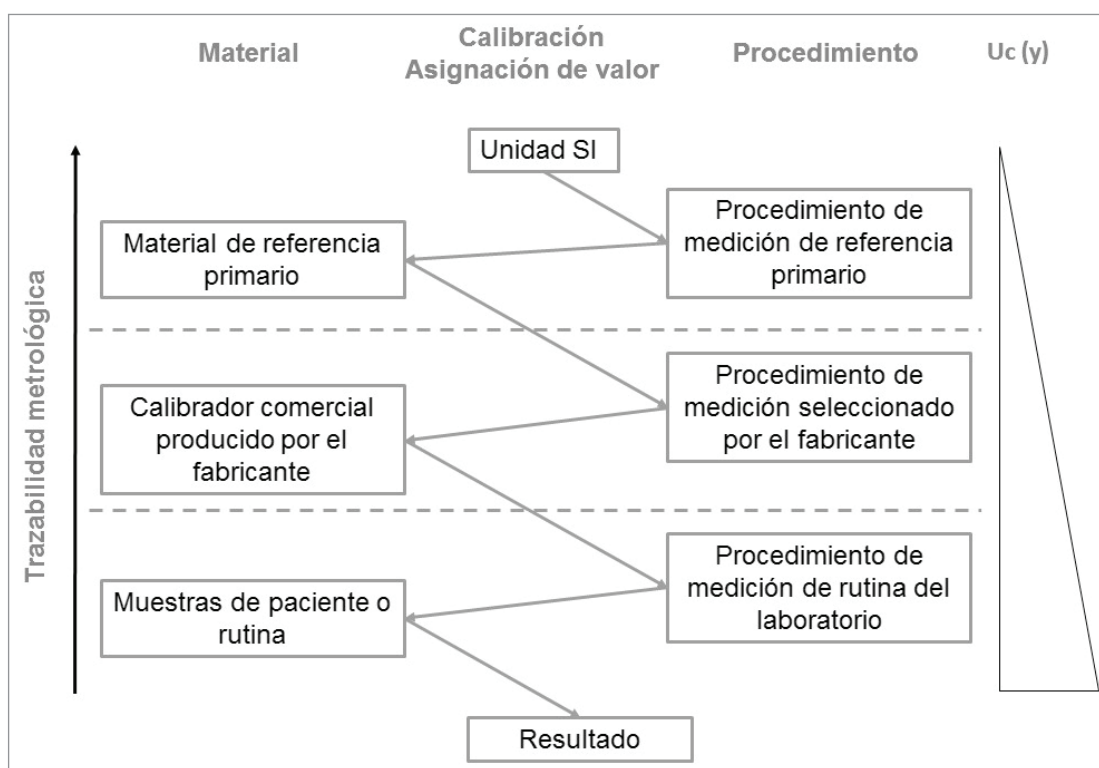
Junto con materiales de referencia, los procedimientos de referencia, consolidan una herramienta que permite establecer la comparabilidad de las mediciones a nivel global por medio de la trazabilidad, entendida como la propiedad del resultado de una medición, que puede ser relacionada con patrones de mayor jerarquía a través de una cadena ininte-

rrumpida de calibraciones, todas con una incertidumbre establecida (1). La trazabilidad se da a través de un sistema de medición de referencia y un sistema de unidades de medición (8) como se muestra en la Figura 1.

De acuerdo con la Figura 1, en la cima de la cadena se encuentra la definición de la unidad de medida asociada a una magnitud dada por el Sistema Internacional de Unidades (SI), que a través de un procedimiento de medición primario establece un material de referencia (MR) primario; este eslabón es responsabilidad de los institutos nacionales de metrología (INM) y organismos internacionales como la Oficina Internacional de Pesas y Medidas (BIPM), la Federación Internacional de Química Clínica y Laboratorio Clínico (IFCC), o la Organización Mundial de la Salud (OMS). A partir de estos MR primarios, los laboratorios de referencia (quienes normalmente prestan sus servicios a los fabricantes) desarrollan sus procedimientos de medición, con los cuales generan sus propios MR secundarios, normalmente asociados a un kit de ensayo, para luego ser empleados por los laboratorios de rutina para calibrar sus equipos y desarrollar metodologías (*in-house*) que les permitan analizar las muestras de los pacientes y cuyos resultados (materiales y métodos) son trazables al SI. En la medida que un resultado de medición dependa de varios eslabones en la cadena de trazabilidad, incrementa su incertidumbre, dado que cada calibración aporta su incertidumbre al resultado final.

Emplear MR trazables al SI y procedimientos de referencia, además de permitir la comparabilidad de los resultados de medición, resulta clave para establecer la confianza en el resultado de medición a través del aseguramiento del sistema de medición, compuesto por una sustancia o analito definido inequívocamente, un MR y un procedimiento de medición de referencia (8).

A pesar de los grandes avances en la automatización de los procedimientos de medición en algunos casos, y como barrera técnica, los métodos de rutina presentan una selectividad diferente a la del método de referencia, o los MR empleados por los laboratorios no son trazables al SI, lo que dificulta la comparabilidad de los resultados y la conmutabilidad entre MR (11).



**Figura 1.** Cadena de trazabilidad (9, 10).

Uc (y): incertidumbre de la medición

## Conmutabilidad de los materiales

Uno de los principales inconvenientes de las mediciones en el área clínica está relacionado con el tipo de matrices que trabaja y la amplia variedad de analitos que estudia, lo que se traduce en que el efecto matriz es uno de los responsables de generar un comportamiento analítico diferente del analito en solución y del mismo dentro de la matriz de análisis, es decir una falta de conmutabilidad entre los materiales (12).

La conmutabilidad de los materiales de referencia es entendida como la propiedad de un material de referencia expresada por la proximidad, por una parte, entre los resultados de medida obtenidos para una magnitud determinada de este material utilizando dos procedimientos de medida dados, y por otra, entre los resultados de medida para otros materiales especificados (1). Normalmente estos otros materiales corresponden a las muestras de los pacientes. En pocas palabras significa que el MR presente un comportamiento similar al de las muestras de los pacientes bajo los diferentes métodos de análisis. Mientras no exista conmutabilidad no es posible establecer la trazabilidad a un sistema de referencia (13, 14).

Además del efecto matriz, la conmutabilidad de los materiales de referencia depende de las características de los componentes al ser medidos (12), del procedimiento de purificación y preparación de la muestra (15, 16), de las características específicas del ensayo y de la técnica analítica usada, entre otras (17, 18). Un ejemplo de la ausencia de esta propiedad es el caso del análisis de lipasa en suero para el diagnóstico de pancreatitis, donde se ha evidenciado que el tamaño de las micelas del sustrato y la presencia o ausencia de proteínas, pueden afectar el resultado de medición (19, 20).

Otro ejemplo es el caso de las determinaciones enzimáticas empleadas como herramienta de diagnóstico y monitoreo de enfermedades relacionadas con órganos vitales. Se observa que la actividad catalítica depende de la enzima activa presente, de la naturaleza y la concentración de los sustratos usados, de la presencia de cofactores, el pH, la temperatura, la fuerza iónica del medio de reacción, entre otros; en consecuencia

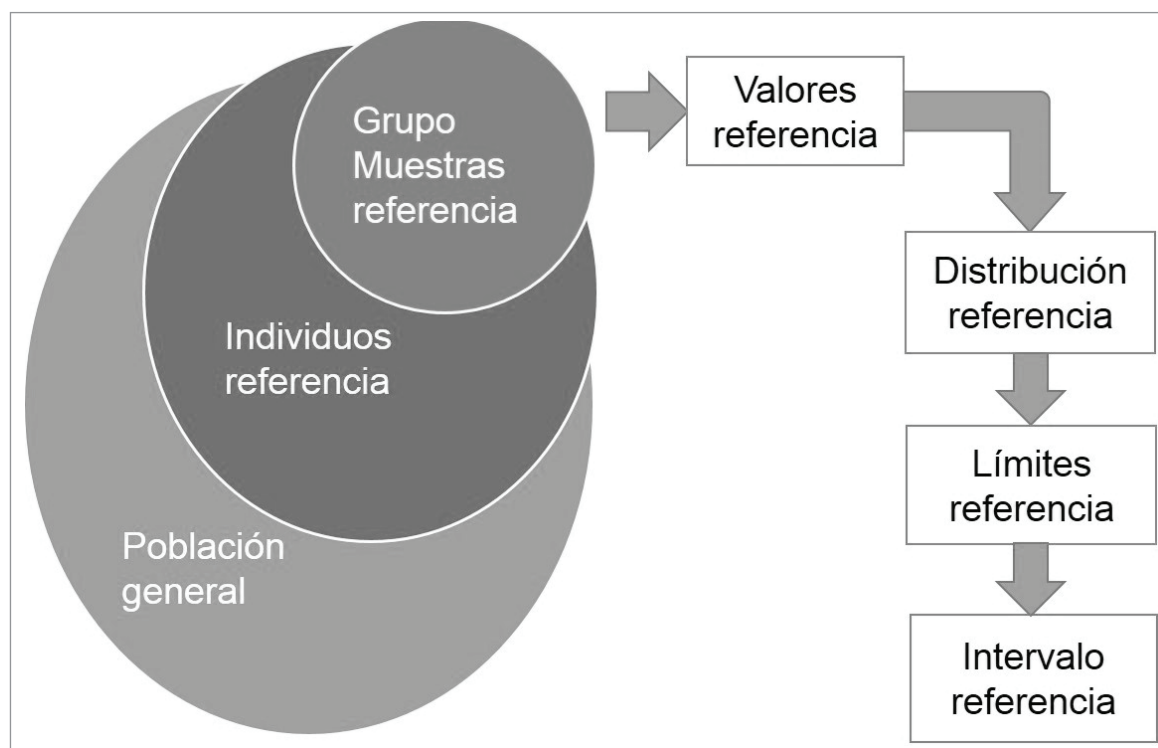
el resultado es dependiente del método de ensayo empleado y es difícil implementar una metodología estándar que permita, con un mismo procedimiento, evaluar diferentes actividades enzimáticas. En estudios realizados por varios investigadores se encontró que los resultados obtenidos entre diferentes laboratorios presentan una alta dispersión debido a las diferentes metodologías usadas, las condiciones en que se lleva a cabo el análisis son las responsables de la no conmutabilidad de los MR y comparabilidad de los resultados de medida para este tipo de mediciones (7). Recientemente, varias enzimas han sido purificadas y estabilizadas sin alteración significativa en sus actividades catalíticas, y algunas de ellas han sido certificadas a nivel internacional. Es bien conocido que las propiedades catalíticas dependen de la fuente del material, y por lo tanto la conmutabilidad de una enzima de referencia puede depender de la matriz de origen seleccionada y de factores tales como interferentes presentes en la matriz (21, 22) y el procedimiento de purificación usado (23).

En pro de darle solución al problema de conmutabilidad y comparabilidad, la IFCC junto con el Instituto para Materiales y Métodos de Referencia (IMMR) crearon un programa colaborativo cuya misión fue la de establecer sistemas de medición de referencia para las enzimas clínicas de mayor importancia; el programa desarrolló procedimientos de medición de referencia, materiales de referencia certificados (MRC) y creó una red de laboratorios de referencia (23).

## Límites de decisión e intervalos de referencia para el diagnóstico médico

En el esquema (Figura 2) definido por el Comité Nacional de Normas para Laboratorios Clínicos (NCCLS) se muestra cómo se establecen los límites de decisión, y por ende, los intervalos de referencia en los laboratorios clínicos (5, 24).

Para realizar la determinación en primer lugar es necesario seleccionar, de la población general, unos individuos de referencia que cum-



**Figura 2.** Esquema determinación intervalos de referencia.

plan con unas condiciones o criterios específicos establecidos según el estudio, por ejemplo: mujeres embarazadas, fumadores, prescripción de medicamentos, etc., quienes se denominan “población o individuos de referencia”; de este grupo se selecciona uno más pequeño llamado “grupo de muestras de referencia”, del que se obtienen los resultados del(los) mensurando(s) de interés, por ejemplo colesterol; por último, con los valores obtenidos, se grafica la distribución de los resultados y se definen los límites e intervalos de referencia (5).

En algunas ocasiones la determinación de los intervalos o límites de referencia puede ser equivocada, ya que se pueden presentar valores atípicos debidos a registros erróneos, fallas en los laboratorios, selección inadecuada de los individuos del grupo de muestras de referencia, entre otros (4). Es importante tener en cuenta que los intervalos de referencia y los límites de decisión no pueden ser generalizados para toda la población debido a que dependen de la edad, sexo, raza, estado de salud (antecedentes de enfermedades), entre otros, relacionados con la muestra seleccionada y el método de medición empleado (25).

Es habitual que los límites de referencia los establezcan los fabricantes de los kits diagnósticos; los laboratorios clínicos, en algunos casos, adoptan toda la información suministrada y no realizan una verificación adecuada antes de usarlos debido, generalmente, a los costos que esto implica. Dentro de los parámetros que un laboratorio debe evaluar para validar un kit diagnóstico se encuentran: veracidad, precisión, intervalo dinámico, sensibilidad y selectividad analítica (26).

## Métodos de medición y materiales de referencia en el campo clínico

### Métodos de medición

Debido a la naturaleza, concentración, heterogeneidad y diversidad de sustancias o analitos de las muestras clínicas y de sus interacciones, existe un conjunto amplio de técnicas analíticas usadas por los laboratorios clínicos para su análisis. Además de los métodos de análisis instrumental convencional (cromatografía, espectrofotometría, electroforesis, etc.), se observa cómo en el área clínica cobran gran importancia los ensayos inmunológicos, que en términos generales están basados en el grado de interacción entre un antígeno y un anticuerpo, con la ventaja de ofrecer una alta selectividad y sensibilidad.

La estandarización de los inmunoensayos dentro de un laboratorio no es tan sencilla, ya que no existen métodos de referencia que faciliten las comparaciones entre resultados y MR de conmutabilidad demostrada, no es posible asegurar que el calibrador sea químicamente igual a la muestra u homogéneo debido a la naturaleza proteica de las sustancias o analitos de interés, por lo que la asignación del valor a partir de un estándar es difícil de realizar (27). Adicionalmente, en algunas ocasiones, para este tipo de ensayos, en la validación de los métodos de medición se emplean técnicas estadísticas diferentes a las empleadas en la validación de métodos analíticos químicos convencionales, por ejemplo, en el caso de las enzimas las respuestas de estas no presentan comportamientos lineales, por lo que las regresiones planteadas (28) obligan a desarrollos estadísticos más complejos respecto a las calibraciones lineales.

En el sector clínico algunas de las sustancias o analitos evaluados se reportan en unidades diferentes a las del SI, generalmente se expresan en Unidades Internacionales (UI), las cuales están basadas en el efecto o actividad biológica del compuesto en cuestión; son establecidas por consenso a través de un estudio colaborativo internacional coordinado por la OMS a través del comité sobre estandarización biológica. Normalmente tienen una equivalencia con una determinada masa del

compuesto en relación con el efecto que produce, dado los continuos avances en las técnicas de purificación es probable que estos valores de masa cambien, por lo que cual no son trazables al SI. Es por esto que la IFCC recomienda aplicar el SI en química clínica cuando sea posible (29), pero autores como Doumas y colaboradores, argumentan que no es adecuado aplicar una interpretación muy estricta al SI (30, 31) dado que no siempre es factible hacerlo para esta área de la química.

En el caso de las técnicas de medición que involucran ácidos nucleicos como es el caso de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), la cuantificación de cantidades relativas de secuencias de ácido desoxirribonucleico (ADN) permanecen como un proceso analítico complejo supeditado tanto a la calidad de los reactivos, las condiciones de los equipos, pero principalmente a la calidad del ADN o ácido ribonucleico (ARN) de partida, y esta normalmente es función del proceso de extracción, de la matriz de análisis, lo que puede generar problemas de conmutabilidad con los MR disponibles.

Normalmente las metodologías disponibles requieren de procesos de extracción, purificación, detección y cuantificación del ADN. Sin embargo, los estándares basados en ADN genómico o amplificaciones por PCR no son lo suficientemente estables, ya que dan como resultado un número de copias variable. La preparación de la curva de calibración al igual que en otros procedimientos analíticos está sujeta a errores, con una veracidad dependiente de la calidad del ADN que se emplea como MR y la precisión en la preparación en la curva de calibración (32).

Debido a la diversidad de analitos, así como al tipo de mediciones que se llevan a cabo en el área de química clínica, los sistemas de medición se pueden clasificar en dos: los que son trazables al SI (analitos libres y familias de analitos) y los que se expresan en UI, no trazables al SI.

### Materiales de Referencia

El uso apropiado de un MRC es indispensable para asegurar la calidad de la mediciones, disminuir el sesgo y mejorar la precisión de los resultados clínicos y de las técnicas analíticas (33, 34). Los MR clínicos con valores conocidos, según De Bièvre (35), son destinados a la validación de un procedimiento y la verificación de un instrumento de medición (es decir, para asegurar que se proporciona adecuada, precisa y reproduciblemente la información), además son una herramienta ampliamente usada como control de calidad. Emplear MR en la etapa de validación, previo al análisis de muestras de rutina, permite evaluar las contribuciones a la incertidumbre de los resultados de medición según el procedimiento validado (36).

La exactitud global en los resultados de los ensayos clínicos de rutina es atribuida a un mecanismo de dos pasos, en primer lugar a la búsqueda de la veracidad por medio de la calibración, y en segundo lugar al aseguramiento de la coherencia de la veracidad a través del control de calidad. Ambos pasos implican una serie de actividades, de acuerdo con el desarrollo de la técnica de medición específica, que conectan los resultados con una referencia de mayor orden metrológico, como un MR o un método de referencia, trazable al SI. La calibración conlleva directamente al uso de calibradores que cumplen los requisitos de un MR: valores de las propiedades definidos y asignados por un procedimiento metrológicamente válido (37).

Un ejemplo de MR desarrollados para el área clínica son los 13 MRC en concentración o cantidad de materia de creatinina registrados en la base de datos de la Joint Committee for Traceability in Laboratory Medicine (JCTLM), estos materiales, según se reporta, han sido elaborados por INM de países como Japón, EEUU y México en matrices como suero humano, suero bovino o certificados en pureza; tienen como objetivo ser utilizados en la validación de métodos analíticos. Sin embargo, la JCTLM también relaciona MR no trazables al SI, sino a protocolos reconocidos internacionalmente, un ejemplo son los factores de coagulación (38).



## Mecanismos actuales para asegurar la trazabilidad

En Europa en 1998 se generó la directiva EC IVDD 98/79/EC con el objetivo de promover la estandarización y armonización global para los laboratorios clínicos, aplica para los productores de dispositivos de diagnóstico *in vitro* (IVDD); esta directiva establece que los productos empleados como instrumentos o aparatos de diagnóstico con función primaria de medición analítica deberán diseñarse y fabricarse de forma que proporcionen mediciones con una exactitud adecuada, dentro de unos márgenes convenientes de acuerdo con la finalidad prevista del producto, métodos de medición y materiales de referencia disponibles. Adicionalmente, esta directiva exige la aplicación de un sistema de calidad por parte de los fabricantes en el que se documenten los exámenes y ensayos que se efectúan antes, durante y después de la fabricación, la frecuencia y el equipo empleado, junto con la calibración realizada, para la cual se debe garantizar una correlación apropiada, entre otros requisitos (39). De acuerdo con esto, se observa que se hace necesario establecer una cadena de trazabilidad de los productos empleados en los laboratorios clínicos. Con el cumplimiento de los lineamientos de esta directiva los productores pueden portar en sus productos el sello CE como garantía de la calidad del mismo, permitiéndoles la comercialización dentro de la Comunidad Europea.

Con el objetivo de apoyar y soportar la directiva EC IVDD 98/79/EC, a través de la identificación de materiales y métodos de referencia, en el 2002 se estableció una declaración de cooperación entre BIPM, IFCC, y la Cooperación Internacional de Acreditación de Laboratorios (ILAC), dando origen al JCTLM, cuya principal función es la de satisfacer la necesidad de una plataforma internacional que promueva y brinde directivas para el reconocimiento y la aceptación de equivalencias de las mediciones en laboratorios clínicos, así como la trazabilidad a estándares de medición apropiados. Dicha labor se ha venido desarrollando a través del establecimiento de una base de datos de laboratorios de medición de referencia, MR y procedimientos de medición del más alto orden jerárquico, de modo que puedan ser usados por la industria de los IVDD y los usuarios interesados (organizaciones para el aseguramiento de la calidad en el área de los laboratorios clínicos, entidades regulatorias, organizaciones internacionales, institutos nacionales de metrología e investigadores).

El JCTLM está conformado por dos grupos de trabajo: WG1 (por sus siglas en inglés), responsable de identificar procedimientos de medición y MR internacionalmente aceptados, y WG2, encargado de identificar laboratorios de referencia para proveer procedimientos de medición de referencia aceptados internacionalmente para ser usados en la asignación de valores para MR y la evaluación de la conmutabilidad (40).

En cuanto a los MR, el JCTLM hace una clasificación en dos grupos: tipo A, aquellos compuestos bien caracterizados, disponibles en forma pura y que pueden ser expresados en unidades del SI, y tipo B, donde el mensurando no está completamente definido, normalmente hace referencia a mezclas heterogéneas, expresados en unidades arbitrarias como las UI.

No todos los mensurandos evaluados en los laboratorios clínicos cuentan con un MRC disponible, ya que su naturaleza, las metodologías diseñadas, los efectos matriciales asociados, entre otros, no lo permiten. La ISO 17511 (41) establece cinco casos donde expone todas las posibilidades en cuanto a la manera de generar trazabilidad y a su vez una comparabilidad de las mediciones. La Tabla 1 describe cada uno de los casos y presenta algunos ejemplos:

El caso 1 se da para los MR tipo A, que corresponden a compuestos químicamente puros, para los que se han desarrollado procedimientos de medición de referencia independientes de los procesos analíticos de rutina.

Los casos 2 a 5, son característicos de analitos tipo B, donde los procesos de estandarización son más complejos dada su naturaleza heterogénea, tanto los MR como los procedimientos de medición, normalmente, se obtienen por consenso entre representantes de las partes

**Tabla 1** Casos posibles estipulados por la ISO 17511 (41).

Caso	Se encuentran MR	Procedimiento de medición de referencia	Ejemplo
1	Si <sup>a</sup>	Si <sup>a</sup>	Glucosa
2	Si <sup>b</sup>	Si <sup>b</sup>	Hemoglobina glicosilada
3	No	Si <sup>b</sup>	Factores de coagulación
4	Si <sup>b</sup>	No	Inmunoglobulinas
5	No	No	Marcadores tumorales

<sup>a</sup> Trazable al SI; <sup>b</sup> No es trazable al SI.

interesadas. En el caso 4 se encuentra una limitante adicional, a varios de los MR no se les ha evaluado su conmutabilidad con matrices reales o muestras clínicas o ya se ha demostrado que no son conmutables (42). En el caso 5, donde no existen materiales ni procedimientos de referencia, el mecanismo de trabajo consiste en establecer procesos de medición bajo consenso de tal forma que se logre la armonización de los resultados, de esta forma la trazabilidad está dada a los procedimientos desarrollados por cada uno de los fabricantes de los IVDD.

De acuerdo con la base de datos de JCTLM, cerca del 20% de los mensurandos son tipo A, y el 80% son tipo B. Dada la importancia de los analitos tipos B en el campo médico, específicamente en áreas como oncología, la necesidad de establecer los mecanismos que conduzcan a la armonización de los procedimientos de medición para los casos 4 y 5 es crítica.

## Conclusiones

En un esfuerzo por solucionar el problema actual de comparabilidad de resultados, la comunidad científica del área clínica, busca desarrollar procesos de medición estandarizados y materiales de referencia trazables y de conmutabilidad demostrada, que permitan obtener resultados de medición confiables, facilitando su interpretación clínica y permitiendo continuidad en el diagnóstico de un paciente. Uno de los mecanismos encontrados es la implementación de procedimientos reconocidos internacionalmente que se relacionen con referencias metrológicas aceptadas; en este desarrollo se han identificado varios actores claves: institutos de metrología, fabricantes de dispositivos de diagnóstico *in vitro*, laboratorios clínicos, organizaciones profesionales del área, los organismos de gobierno, universidades y los proveedores de programas de evaluación externa de la calidad.

## Referencias

1. BIPM. International vocabulary of metrology—Basic and general concepts and associated terms (VIM). 3a. ed., JCGM. 2012.
2. Panteghini, M.; Forest, J.C. Standardization in laboratory medicine: new challenges. *Clin. Chim. Acta*. 2005. **355**(1-2): 1–12.
3. Murat, J.B.; Dard, C.; Fricker, Hidalgo H.; Dardé, M.L.; Brenier-Pinchart, M.P.; Pelloux, H. Comparison of the Vidas system and two recent fully automated assays for diagnosis and follow-up of toxoplasmosis in pregnant women and newborns. *Clin. Vaccine Immunol.* 2013. **20**(8): 1203–1212.

4. Horn, P.S.; Pesce, A.J. Reference intervals: an update. *Clin. Chim. Acta.* 2003. **334**(1-2): 5–23.
5. Aytekin, M.; Emerk, K. Accurate reference intervals are required for accurate diagnosis and monitoring of patients. *Electron. J. Int. Fed. Clin. Chem. Lab. Med.* 2008. **19**(2): 1–5.
6. Dufour D.R.; Lott J.A.; Nolte, F.S.; Gretch, D.R.; Koff, R.S.; Seeff, L.B. Diagnosis and monitoring of hepatic injury. I. Performance characteristics of laboratory tests. *Clin. Chem.* 2000. **46**(12): 2027–2049.
7. Infusino, I.; Bonora, R.; Panteghini, M. Traceability in clinical enzymology. *Clin. Biochem. Rev.* 2007. **28**(4): 155–161.
8. Thienpont, L.M.; Van Uytanghe, K.; De Leenheer, A.P. Reference measurement systems in clinical chemistry. *Clin. Chim. Acta.* 2002. **323**(1-2): 73–87.
9. Siekmann, L. Establishing measurement traceability in clinical chemistry. *Accredit. Qual. Assur.* 2004. **9**(1-2): 5–17.
10. Bock, J.L.; Eckfeldt, J.H. Advances in standardization of laboratory measurement procedures: implications for measuring biomarkers of folate and vitamin B-12 status in NHANES. *Am. J. Clin. Nutr.* 2011. **94**(1): 332S–336S.
11. Féraud, G.; Edwards, J.; Kanno, T.; Lessinger, J.M.; Moss, D.W.; Schiele, F.; Tietz, N.W.; Vassault, A. Interassay calibration as a major contribution to the comparability of results in clinical enzymology. *Clin. Biochem.* 1998. **31**(6): 489–494.
12. Franzini, C.; Ceriotti, F. Impact of reference materials on accuracy in clinical chemistry. *Clin. Biochem.* 1998. **31**(6): 449–457.
13. Ricós, C.; Juvany, R.; Simón, M.; Hernandez, A.; Alvarez, V.; Jimenez, C.V.; Minchinela J.; Perich, C. Commutability and traceability: their repercussions on analytical bias and inaccuracy. *Clin. Chim. Acta.* 1999. **280**(1-2): 135–145.
14. Miller, W.G. Specimen materials, target values and commutability for external quality assessment (proficiency testing) schemes. *Clin. Chim. Acta.* 2003. **327**(1-2): 25–37.
15. Panteghini, M.; Ceriotti, F.; Schumann, G.; Siekmann, L. Establishing a reference system in clinical enzymology. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2001. **39**(9): 795–800.
16. Vesper, H.W.; Miller, W.G.; Myers, G.L. Reference materials and commutability. *Clin. Biochem. Rev.* 2007. **28**(4): 139–147.
17. Van Nevel, L.; Örnemark, U.; Smeyers, P.; Harper, C.; Taylor, P.D.P. IMEP-17 Trace and Minor Constituents EUR 20657. En: Report to Participants. Bélgica: Institute for Reference Materials and Measurements (IRMM). 2003.
18. Panteghini, M.; Myers, G.L.; Miller, W.G.; Greenberg, N. La importancia de la trazabilidad metrológica en la validez de la medición de creatinina como índice de función renal. *Acta Bioquím. Clin. Latinoam.* 2009. **43**(2): 271–277.
19. Lawson, N.S.; Williams, T.L.; Long, T. Matrix effects and accuracy assessment. Identifying matrix-sensitive methods from real-time proficiency testing data. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 1993. **117**(4): 401–411.
20. Eckfeldt, J.H.; Copeland, K.R. Accuracy verification and identification of matrix effects. The College of American Pathologists' Protocol. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 1993. **117**(4): 381–386.
21. Sánchez, M.; Canalias, F.; Palencia, T.; Gella, F.J. Creatine kinase 2 mass measurement: methods comparison and study of the matrix effect. *Clin. Chim. Acta.* 1999. **288**(1-2): 111–119.
22. Jackson, C.M.; Esnouf, M.P.; Winzor, D.J.; Duewer, D.L. Defining and measuring biological activity: applying the principles of metrology. *Accredit. Qual. Assur.* 2007. **12**(6): 283–294.
23. Féraud, G.; Lessinger, J.M. Preparation of enzyme calibration materials. *Clin. Chim. Acta.* 1998. **278**(2): 151–162.
24. National Committee for Clinical Laboratory Standards–NCCLS. C28-A2: How to Define and Determine Reference Intervals in the Clinical Laboratory; Approved Guideline. Second. pp 172. 2000.
25. Schnabl, K.; Khun, M.; Adeli, K. Pediatric reference intervals: critical gap analysis and establishment of a national initiative. *Electron. J. Int. Fed. Clin. Chem. Lab. Med.* 2008. **19**(2): 1–8.
26. Horowitz, G.L. Reference intervals: Practical aspects. *Electron. J. Int. Fed. Clin. Chem. Lab. Med.* 2008. **19**(2): 1–11.
27. Stenman, U.H. Immunoassay Standardization: Is It Possible, Who Is Responsible, Who Is Capable? *Clin. Chem.* 2001. **47**(5): 815–820.
28. Miller, J.N.; Miller, J.C. Estadística y quimiometría para química analítica. 4a ed., Madrid, Pearson Educacion S.A. pp 296. 2002.
29. IUPAC IU of P and AC, Chemistry, IFCC IF of C. Expert panel on quantities and units in clinical chemistry (recommendations 1979). *Pure Appl. Chem. Chem.* 1979. **1**: 2451–2479.
30. Rigg, J.C.; Brown, S.S.; Dybkaer, R.; Olsen, H. Compendio de terminología y nomenclatura de propiedades en las ciencias de laboratorio clínico. IUPAC, Union Internacional de Quimica Pura y Aplicada, e IFCC, Federacion Internacional de Quimica Clinica. pp 125. 1993.
31. Dumas, B.T.; Laessig, R.H.; Larson, F.C. The sanitized Système International (SI) d'Unités. Opinion. *Clin. Chim. Acta.* 1987. **167**: 113–116.
32. Rutledge, R.G.; Côté, C. Mathematics of quantitative kinetic PCR and the application of standard curves. *Nucleic Acids Res.* 2003. **31**(16): e93.
33. Davies, K.W.; Park, H. Quality assurance in clinical chemistry laboratories in the UK. *Accredit. Qual. Assur.* 1999. **4**: 18–26.
34. Ibáñez, C.; López, J.F.; Sahuquillo, A. Certified reference materials for analytical mercury speciation in biological and environmental matrices: do they meet user needs?; a review. *Anal. Chim. Acta.* 2012. **720**: 9–15.
35. De Bièvre, P.; Dybkaer, R.; Fajgelj, A.; Hibbert, D.B. Metrological traceability of measurement results in chemistry: Concepts and implementation (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.* 2011. **83**(10): 1873–1935.
36. Buzoianu, M.; Aboul-Enein, H.Y. Clinical reference materials for the validation of the performance of photometric systems used for clinical analyses. *Accredit. Qual. Assur.* 1997. **2**(8): 375–380.
37. International Organization for Standardization. ISO Guide 35:2006 Reference materials — General and statistical principles for certification. pp 72. 2006.
38. JCTLM Laboratory medicine and in vitro diagnostics. List of all available certified reference materials. pp. 1–76. 2013.
39. Parlamento Europeo y del Consejo. Directiva 98/79/CE. 1998. (6): 37.
40. BIPM–Bureau International des Poids et Mesures. BIPM. Disponible en: <http://www.bipm.org/>. [Consultado el 17 de Febrero de 2014].
41. International Organization for Standardization. ISO 17511:2003 In diagnostic medical devices–Measurement of quantities in biological samples–Metrological traceability of values assigned to calibrators and control materials. pp 23. 2003.
42. Miller, G.W.; Myers, G.L.; Lou-Gantzer, M.; Kahn, S.E.; Schönbrunner, E.R.; Thienpont, L.M.; Bunk, D.M.; Christenson, R.H.; Eckfeldt, J.H.; Lo, S.F.; Nübling, C.M.; Sturgeon, C.M. Roadmap for harmonization of clinical laboratory measurement procedures. *Clin. Chem.* 2011. **57**(8): 1108–1117.

**Article citation:**

Leguizamón, J.E.; González, I.A.; Bernal, L. J. Necesidades metrológicas en los laboratorios clínicos. *Rev Colomb Quím.* 2014. **43**(1): 30–35.

Recibido: 13 enero 2013. Aceptado: 2 marzo 2014

## Actitudes y rendimiento académico: su evolución desde química general e inorgánica hasta química orgánica

### Resumen

Esta investigación tiene un doble propósito, en primer lugar, valorar las actitudes hacia la química de alumnos universitarios de carreras biológicas en dos cursos relacionados con esta disciplina y, por otro lado, relacionar dichas actitudes con el rendimiento académico presentado por los estudiantes. El instrumento elegido para medir las actitudes de los alumnos fue un cuestionario según la escala Likert, encuestándose a la totalidad de estudiantes que cursaban cada uno de los cursos de química analizados: Química General e Inorgánica (QGI) y Química Orgánica (QO). Para estimar el rendimiento académico se analizaron actas de parciales y se realizaron cálculos de correlación. Los alumnos que cursaban QGI presentaron actitudes hacia la química valoradas como indiferentes. Sin embargo al finalizar el curso de QO sus actitudes fueron evolucionando favorablemente, ya que la puntuación media obtenida para los ítems positivos y negativos estuvo en el rango de actitudes positivas. Los valores del coeficiente de Pearson obtenidos para los dos cursos estudiados fueron superiores a 0,80, lo que indica una fuerte relación entre las variables implicadas, por lo cual se infiere la importancia de desarrollar actitudes positivas hacia la química para favorecer el rendimiento académico de los alumnos.

**Palabras clave:** Actitudes, química general e inorgánica, química orgánica, escala Likert, rendimiento académico.

## Attitudes and academic yield: its evolution from general and inorganic chemistry to organic chemistry

### Abstract

This work has a double aim, on the one hand, to value the attitudes towards the chemistry of university students of biological careers in two courses related to this discipline and, on the other hand, to relate these attitudes to the academic yield presented by the students. The chosen instrument to measure the attitudes of the students was a questionnaire according to the Likert scale; the totality of students who attended each one of the analyzed courses of chemistry, General and Inorganic Chemistry (GIC) and Organic Chemistry (OC), were polled. In order to consider the academic yield, proceedings of midterms were analyzed and calculations of correlation were made. The students who attended GIC presented attitudes towards chemistry valued like indifferent. Nevertheless, at the end of OC attitudes of students were evolving favorably, since the obtained average score for the positive and negative items was in the rank of positive attitudes. The values of the obtained coefficient of Pearson for both courses studied were superior to 0.80, which indicates a strong relation between the implied variables. Whereby, it follows the importance of developing positive attitudes towards chemistry to favor the academic yield of the students.

**Keywords:** Attitudes, general and inorganic chemistry, organic chemistry, Likert scale, academic yield.

## Atitudes e rendimento académico: sua evolução do química geral e inorgânico para química orgânico

### Resumo

Esta pesquisa tem um duplo propósito, antes de tudo, medir atitudes em relação a química de estudantes universitários em ciências biológicas, em dois cursos relacionou-se a esta disciplina e, em seguida, relacionar estas atitudes ao desempenho académico apresentou-se pelos estudantes. O instrumento escolhido para medir as atitudes dos estudantes era um questionário de acordo com a escala de Likert, encuestando próprio a totalidade dos estudantes que atenderam a cada dos cursos analisados do química: Química Geral e Inorgânica (QGI) e Química Orgânica (QO). Para considerar os atos académicos do rendimento os registros dos exames foram analisados e os cálculos da correlação foram feitos. Os estudantes que atenderam a QGI apresentaram-se atitudes indicados para o química avaliado como indiferente. Não obstante quando finalizar atendido de QO suas atitudes estava evoluindo favorável, desde que a contagem média obtida para os artigos positivos e negativos estava na gama de atitudes positivas. Os valores do coeficiente obtido de Pearson para ambos cursos estudados eram superiores a 0.80, indicando uma relação forte entre as variáveis implicadas; pelo que pode-se inferir a importância de desenvolver atitudes positivas para a química para favorecer o rendimento académico dos estudantes.

**Palavras chave:** Atitudes, geral inorgânico química, orgânica química, escala Likert, desempenho académico.



## Introducción

En la actualidad, investigadores como Shapiro (1); Hong *et al.* (2), Rebollo Catalán *et al.* (3), y Dávila Acedo *et al.* (4), afirman que las emociones tienen un papel vital en el desarrollo del aprendizaje, ya que es sabido que el mundo subjetivo y emocional que cada persona desarrolla sobre la realidad exterior da sentido a las relaciones y hace comprender el lugar propio que se ocupa en el mundo. Por este motivo, la idea de la enseñanza como una práctica emocional en la que intervienen procesos cognitivos y afectivos es aceptada por investigadores y educadores.

La investigación afectiva en didáctica de la ciencia ha recibido la mayor contribución a través del manejo del concepto de actitud, nacido en la psicología social. Eagly y Chaiken (5) definen la actitud como “una tendencia psicológica que se expresa por la evaluación de un ente específico con cierto grado de aprobación o desaprobación”.

La palabra actitud es, sin dudas, un término polisémico que se presta a múltiples interpretaciones. Etimológicamente, proviene del latín *aptus* que significa capacidad o adaptación (6).

Las actitudes tienen un carácter multidimensional que integra diversos componentes, en este contexto, pueden reconocerse los componentes cognitivo, afectivo y conductual, los que ajustan favorable o desfavorablemente la predisposición y modulan la acción hacia el objeto. Algunos autores, entre los que se encuentran Gargallo López *et al.* (7), sostienen que el componente afectivo-evaluativo es el elemento esencial o específico de la actitud. Una de las dimensiones más importante en el proceso de enseñanza y aprendizaje, lo constituye el rendimiento académico del alumno. Cuando se trata de evaluar el rendimiento académico de los alumnos y cómo mejorarlo se analizan distintos factores. En este sentido, diversos autores como Benítez *et al.* (8); Jiménez (9) y Navarro (10), sostienen que el rendimiento académico es un fenómeno complejo y multicausal, definiéndolo como la suma de diferentes y complejos factores que actúan en la persona que aprende. En cuanto a autores que relacionan actitudes hacia el aprendizaje con el rendimiento académico podemos mencionar los trabajos de Quiles (11) y Ramírez (12), que comprueban la incidencia de las actitudes en el rendimiento de los estudiantes de primaria, y el trabajo de Akey (13) en estudiantes de secundaria. Con respecto a estudiantes universitarios son interesantes los trabajos de House y Prion (14) y Herrero *et al.* (15), donde se analiza la incidencia de las actitudes sobre la población universitaria, concluyendo que es una variable con influencia sobre el rendimiento de los estudiantes. Sin embargo, no se han encontrado trabajos en nuestro país que relacionen las actitudes hacia la química con el rendimiento académico de estudiantes universitarios que cursan carreras biológicas, como lo son la Licenciatura en Biodiversidad (LB) y el Profesorado en Biología (PB) de la Facultad de Humanidades y Ciencias (FHUC), pertenecientes a la Universidad Nacional del Litoral (UNL), Santa Fe-Argentina. El currículo de ambas carreras posee dos asignaturas relacionadas con la química en el primer año: Química General e Inorgánica (QGI) y Química Orgánica (QO). En general, el rendimiento de los alumnos en QGI es bajo y es común que los alumnos recursen la materia dos o hasta tres veces; atendiendo a esta realidad, la presente investigación persigue dos objetivos: en primer lugar valorar las actitudes hacia la química de alumnos universitarios de carreras biológicas en QGI y QO y, por otro lado, relacionar dichas actitudes con el rendimiento académico presentado por los estudiantes en los cursos antes mencionados.

## Metodología

La metodología utilizada en este trabajo fue de tipo cuantitativa, de corte longitudinal.

## Muestra

Se encuestó a la totalidad de los alumnos de las carreras de LB y/o PB de la FHUC perteneciente a la UNL, que cursaban QGI en el primer cuatrimestre del año 2012. El número de encuestados fue de 40. Luego se los volvió a encuestar cuando se encontraban cursando QO, en el 2° cuatrimestre de 2012, siendo 30 los alumnos encuestados en esta asignatura. La diferencia en 10 alumnos se explica porque 6 quedaron “libres” en QGI, es decir no alcanzaron la regularidad de la asignatura ya sea por exámenes parciales (obteniendo un porcentaje menor al 60% en cada uno de los dos exámenes parciales que se exigen) o bien porque no cumplieron con el 80% de asistencia a las clases de trabajos prácticos. De este modo aquellos alumnos que quedaron bajo la condición de “libres” no pudieron cursar QO en el 2° cuatrimestre, y los 4 restantes abandonaron la carrera por diferentes motivos (trabajo, falta de interés por la carrera, entre otros). Estas respuestas fueron expresadas por los propios alumnos a los cuales se los entrevistó personalmente.

## Instrumento

El instrumento elegido para valorar las actitudes de los estudiantes es un cuestionario tipo Likert (L). En el mismo se usa una escala que va desde el total desacuerdo (TD) hasta el total acuerdo (TA). Para cuantificar las respuestas se asigna un valor a cada opción de la escala Likert, de 1 a 5 para las preguntas que están en forma positiva, así: TA (en total acuerdo)=5, A (acuerdo)=4, I (indecisión)=3, D (desacuerdo)=2 y TD (en total desacuerdo)=1; mientras que para las preguntas en forma negativa la escala se invierte. El cuestionario utilizado fue adaptado del propuesto por Molina *et al.* (16). La confiabilidad del instrumento fue medida por el coeficiente Alfa de Cronbach. Dicha fiabilidad expresa el grado de exactitud, consistencia interna y precisión que posee cualquier instrumento de medición (17). Los criterios utilizados para el análisis e interpretación del Alfa de Cronbach son los propuestos por Celina Oviedo y Campo Arias (18), quienes sostienen que por debajo de 0,70 la consistencia interna de la escala utilizada es baja. El instrumento, validado previamente, arrojó un Alfa de Cronbach igual a 0,83, con lo cual se asegura coherencia interna y fiabilidad. El cuestionario completo se observa en la Tabla 1. El mismo constó de 18 proposiciones declarativas (PD), 10 redactadas de forma positiva: (1, 3, 4, 5, 7, 9, 12, 14, 15 y 17) y 8 de manera negativa: (2, 6, 8, 10, 11, 13, 16 y 18). Para la técnica de Likert se consideran actitud positiva las respuestas con puntuación 4 y 5; indiferente: puntuación 3 y actitud negativa: puntuación 1 y 2 (19). Siguiendo al autor antes mencionado y a los efectos de asignar categorías de “valoración” a las respuestas obtenidas para las diferentes PD se aplicó el siguiente criterio de división en subintervalos, según la puntuación media (PM) de cada PD: valoración negativa: ( $1,00 < PM \leq 2,33$ ); valoración indiferente: ( $2,33 < PM \leq 3,67$ ) y valoración positiva: ( $3,67 < PM \leq 5,00$ ). En el caso de las PD formuladas en forma negativa esta escala de subintervalos se invierte: positiva ( $1,00 < PM \leq 2,33$ ); indiferente ( $2,33 < PM \leq 3,67$ ) y negativa ( $3,67 < PM \leq 5,00$ ) (20).

## Análisis del rendimiento académico

Para estudiar el rendimiento académico de los alumnos se analizaron las actas de parciales. Esta información fue utilizada para detectar la posible relación entre la actitud hacia la química y el rendimiento académico de los alumnos en las asignaturas estudiadas. Se tomó en cuenta un promedio entre las notas (en porcentaje) de los parciales; el porcentaje de aprobación es del 60%.

Tabla 1. Cuestionario según escala Likert.

Estos cuestionarios han sido diseñados para conocer tus actitudes hacia la Química y mejorar la calidad de la enseñanza de esta asignatura, que te brindará elementos básicos para desarrollarte en la carrera que elegiste. Si querés colaborar con esta investigación, te garantizo que tu participación será anónima, reservada y confidencial. Es importante que sepas que tus respuestas **NO AFECTARÁN EN ABSOLUTO TUS CALIFICACIONES COMO ESTUDIANTE**. Desde ya muchas gracias por colaborar.

En esta encuesta hay que marcar una sola opción. Las opciones de respuestas son las siguientes:

TA = totalmente de acuerdo. A = de acuerdo. I = Indecisión. D = en desacuerdo. TD = totalmente en desacuerdo.

CARRERA:_____		CUATRIMESTRE_____	AÑO_____		SEXO: F / M	
1	La química me gusta más que otras materias	TA	A	I	D	TD
2	La simbología utilizada en las clases de química me parece difícil de entender	TA	A	I	D	TD
3	Me gustaría tener mayor carga horaria de química	TA	A	I	D	TD
4	La química nos ayuda a comprender muchos aspectos de la vida cotidiana	TA	A	I	D	TD
5	Resuelvo con facilidad los ejercicios de química	TA	A	I	D	TD
6	Me aburro en las clases de química	TA	A	I	D	TD
7	La esperanza en resolver muchos problemas ambientales está en la química	TA	A	I	D	TD
8	Mi desempeño profesional es independiente del conocimiento químico	TA	A	I	D	TD
9	El progreso del país está relacionado con el avance de la química	TA	A	I	D	TD
10	La química es una ciencia muy compleja para mi nivel de conocimiento	TA	A	I	D	TD
11	Debo esforzarme mucho para aprender química	TA	A	I	D	TD
12	El lenguaje de la química y sus símbolos son fáciles de entender	TA	A	I	D	TD
13	La actividad de un químico es poco interesante	TA	A	I	D	TD
14	Todas las carreras universitarias deberían tener química en su currícula	TA	A	I	D	TD
15	Los conocimientos en química son necesarios para el desarrollo de mi carrera	TA	A	I	D	TD
16	Desearía que el programa de mi carrera tuviera menos asignaturas relacionadas con la química	TA	A	I	D	TD
17	Comprendo los conceptos de química con facilidad	TA	A	I	D	TD
18	Consideraría cambiarme de carrera y elegir otra donde no hubiera química	TA	A	I	D	TD

## Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los resultados se utilizó el programa SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*). La fiabilidad del instrumento se obtuvo a partir del coeficiente Alfa de Cronbach. También se realizaron análisis de varianza (ANOVA) con el objetivo de interpretar las puntuaciones medias de las actitudes hacia la química de los alumnos a medida que cursaban diferentes asignaturas relacionadas con esta disciplina. Para la comparación de medias se aplicó el test de Duncan. Para establecer diferencias estadísticamente significativas fue utilizado un valor de  $p \leq 0,05$ . Finalmente, se hicieron estudios de correlación entre las actitudes presentadas por los alumnos y su rendimiento académico, para esto se calculó el coeficiente de Pearson. El mismo mide la correlación entre dos variables cuantitativas (actitud hacia la química y nota obtenida en el curso de química). Los gráficos fueron realizados a través del programa Origin 8.

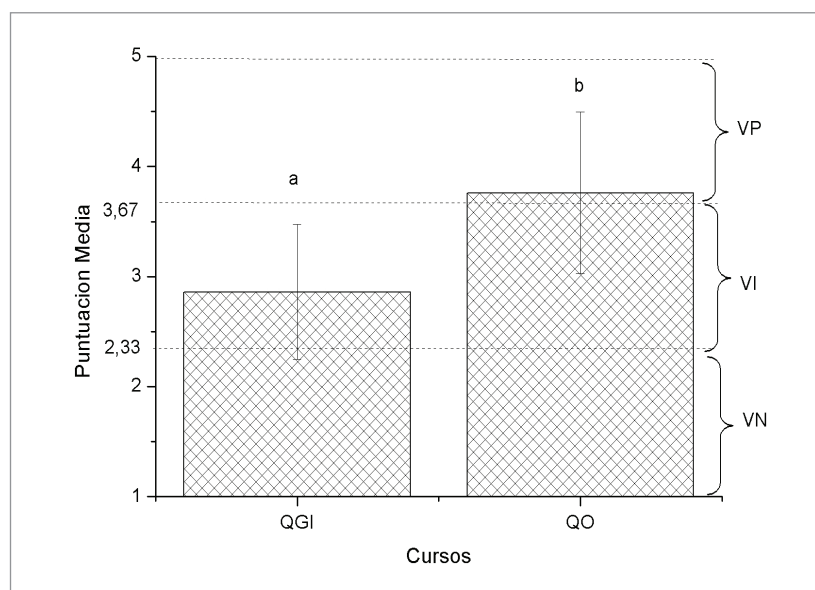
## Resultados y discusión

Los resultados obtenidos muestran que los alumnos que cursaban QGI presentaron una PM de 2,86 para los ítems positivos y una PM de 3,13 para los ítems negativos, ambos valores asociados al intervalo de valoración indiferente. Sin embargo, al finalizar el cursado de QO se produjo un cambio de actitud por parte de los alumnos, tanto en las PD enunciadas en forma positiva como negativa. Los valores de las PM fueron de 3,76 y de 2,08 respectivamente, ambos valores indicando una valoración ligeramente positiva. Por lo cual se observa una evolución favorable en la medición de las actitudes hacia la química en su trayectoria estudiantil, lo cual se aprecia en un aumento de la PM para los ítems positivos y una disminución de la misma en los ítems formulados negativamente (Figuras 1 y 2). Tal como puede observarse en las figuras, las PM de los reactivos negativos y positivos de QGI difieren significativamente ( $p \leq 0,05$ ) de las respectivas PM obtenidas en QO. La actitud hacia la química

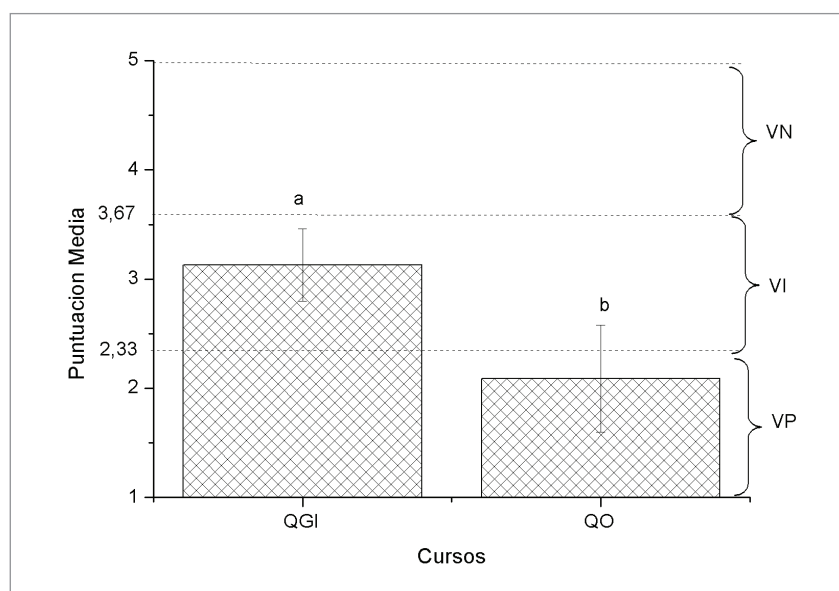
mica de los estudiantes que se encontraban cursando QGI en el primer cuatrimestre de 1° año proviene prácticamente, de lo adquirido en el nivel secundario (teniendo en cuenta que el cuestionario se aplicó al inicio del cuatrimestre) es por ello que la puntuación media encontrada corresponde a la actitud que mostraban al finalizar la escuela secundaria e ingresar a la universidad. Los valores obtenidos reflejan una cierta apatía hacia la asignatura (recordemos que las PM tanto para los ítems enunciados en forma positiva como negativa estuvieron dentro del subintervalo de valoración indiferente) y coinciden con lo expresado por Espinosa García y Román Galán (21), quienes sostienen que la indiferencia hacia la química se refleja con mayor fuerza justamente en estudiantes de los últimos años del nivel medio. También coinciden con lo expuesto por Ariza Traslaviña y Amaya Posse (22) quienes encontraron

que las actitudes hacia la química en los primeros años del Instituto Politécnico Nacional de Colombia son de indiferencia y apatía.

Por otro lado, a medida que los estudiantes transitan su primer año en la universidad enfrentan muchos retos, entre ellos el aumento de la exigencia, necesidad creciente de organización del trabajo académico, mayor dedicación al estudio, autonomía, entre otros factores que sin duda afectan de manera directa su actitud (7). En este sentido es interesante recordar que hubo 10 alumnos que fueron encuestados en QGI que no siguieron cursando en QO, por eso la reducción en el número de alumnos de 40 a 30. De estos 10 alumnos, 6 quedaron libres por parciales y los 4 restantes abandonaron la carrera por diferentes motivos como desinterés, disgusto por la carrera, falta de adaptación a la vida universitaria y/o trabajo. Este dato explicaría en parte el



**Figura 1.** Evolución de las Proposiciones Declarativas Positivas de los alumnos en QGI: número de alumnos ( $n = 40$  y  $QO: n = 30$ ; VP = Valoración Positiva; VI = Valoración Indiferente; VN = Valoración Negativa. Diferentes letras en diferentes barras, indican diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ).

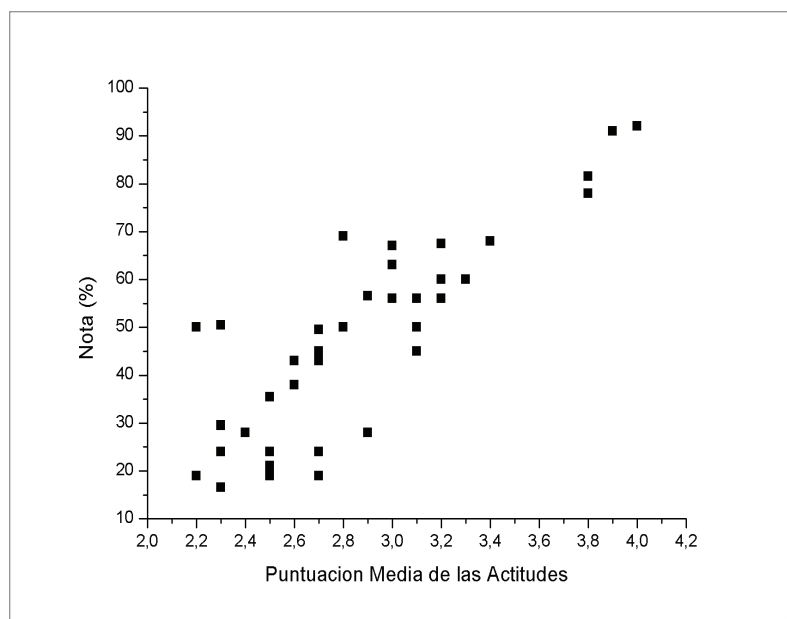


**Figura 2.** Evolución de las Proposiciones Declarativas Negativas de los alumnos en QGI: número de alumnos ( $n = 40$  y  $QO: n = 30$ ; VP = Valoración Positiva; VI = Valoración Indiferente; VN = Valoración Negativa. Diferentes letras en diferentes barras, indican diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ).

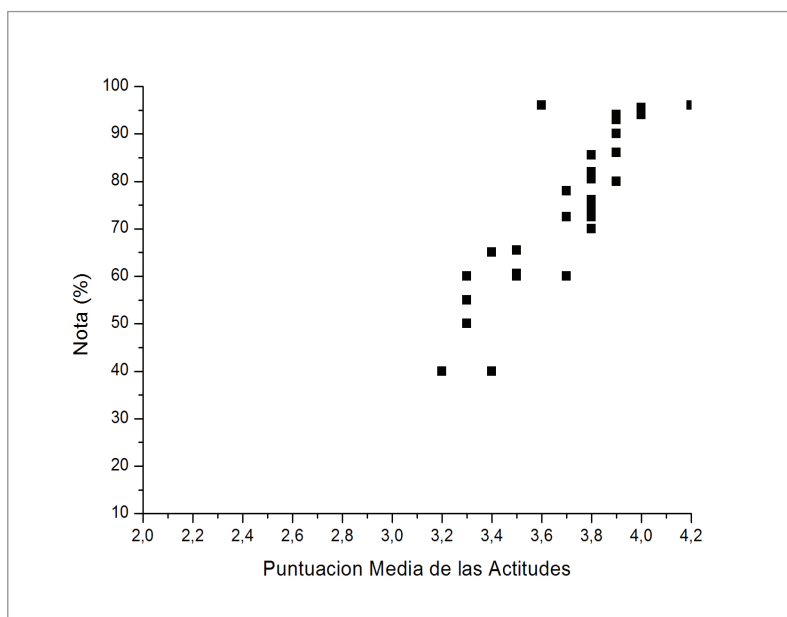
cambio de actitud encontrado en QO. Otro factor a tener en cuenta es el currículum, en este sentido, son diversos los autores que relacionan estas dos variables (23-25); lo anterior también explicaría el cambio actitudinal observado en los alumnos de las carreras de LB y/o PB al finalizar el cursado de QO, donde se observa una mayor predisposición hacia el aprendizaje de la química, ya que encuentran temas más afines a su futura formación profesional como el estudio de las biomoléculas.

Como se mencionó anteriormente, para relacionar las variables actitud y rendimiento se realizó un análisis de correlación. Para el mismo se utilizó el coeficiente de Pearson entre las puntuaciones medias de las actitudes hacia la química y las calificaciones de los estudiantes. El coeficiente de correlación en ambos casos (0,841 y 0,871 para QGI y QO respectivamente) fue mayor a 0,80 indicando una fuerte correlación entre las variables estudiadas (26). Considerando

que los valores extremos del coeficiente son -1 y +1, el valor absoluto del coeficiente puede usarse como un indicador del grado o fuerza de la correlación entre las variables: el grado es más fuerte cuanto más cercano se encuentre la magnitud del coeficiente a 1, y más débil cuanto más cercana se encuentre a cero. Podría decirse entonces que los valores del coeficiente de Pearson obtenidos indican un grado de correlación fuerte entre las variables actitud y rendimiento. Resultados similares fueron obtenidos por Gargallo López *et al.* (7), quienes comprobaron la incidencia de las actitudes en el rendimiento de los estudiantes. Santandreu Ledda *et al.* (27) también encontraron un alto grado de implicancia entre las variables actitud hacia la química y el desempeño académico de los alumnos. En las Figuras 3 y 4 se observa el grado de asociación entre las variables en cada uno de los cursos de química estudiados (QGI y QO) de las carreras de LB y/o PB.



**Figura 3.** Correlación entre las actitudes presentadas por los alumnos en QGI y la nota obtenida (n= 40).



**Figura 4.** Correlación entre las actitudes presentadas por los alumnos en QO y la nota obtenida (n= 30).

## Conclusiones

los alumnos de primer año de las carreras de Licenciatura en Biodiversidad y/o Profesorado en Biología que se encontraban cursando QGI presentaron actitudes hacia la química valoradas como indiferentes. Sin embargo al finalizar el cursado de QO, sus actitudes fueron evolucionando favorablemente, ya que la puntuación media obtenida para los ítems positivos y negativos estuvo en el rango de actitudes positivas. La fuerte relación entre las variables implicadas queda demostrada por un alto valor del coeficiente de Pearson tanto para QGI como para QO. Estos resultados muestran la importancia de desarrollar actitudes positivas hacia la química para favorecer el rendimiento académico.

Lo anterior constituye un dato significativo e insta a generar acciones educativas por parte de los profesores, como por ejemplo la implementación de metodologías de enseñanza y evaluación más activas y constructivas en QGI. También sería necesario profundizar en las características que acompañan a los grupos de estudiantes para completar su perfil, a nivel de estrategias que utilizan, enfoques de aprendizaje, autoconcepto, etc. Lo mencionado anteriormente excede los límites del presente trabajo, no obstante serán cuestiones a abordar en ulteriores investigaciones.

## Referencias

- Shapiro, S. Revisiting the teachers' lounge: Reflections on emotional experience and teacher identity. *Teaching and Teacher Education*. 2010. **26**(3): 616-621.
- Hong, Z. R.; Lin, H. S.; Lawrenz, F. P. Effects of an Integrated Science and Societal Implication Intervention on Promoting Adolescents' Positive Thinking and Emotional Perceptions in Learning Science. *International Journal of Science Education*. 2012. **34**(3): 329-252.
- Rebollo-Catalán, M.A.; García Perez, R.; Buzón García, O.; Vega Caro, L. Las emociones en el aprendizaje universitario apoyado en entornos virtuales: diferencia según actividad de aprendizaje y motivación del alumnado. *Revista Complutense de Educación*. 2013. **25**(1): 69-93.
- Dávila Acedo, M.A.; Borrachero Cortés, A.B.; Brígido Mero, M.; Costillo Borrego, E. Las emociones y sus causas en el aprendizaje de la física y la química. *International Journal of Developmental and Educational Psychology*. 2014. **1**(4): 287-294.
- Eagly, A. H.; Chaiken, S. The psychology of attitudes. Harcourt Brace Jovanovich Orlando. College Publishers. pp 794. 1993.
- Fernández, L. J. A.; Moreno, S. J. I. La química en el aula: entre la ciencia y la magia. Página del Consejo Escolar de la Región de Murcia, 20. Disponible en: [http://www.murciencia.com/upload/comunicaciones/quimica-ciencia\\_y\\_magia.pdf](http://www.murciencia.com/upload/comunicaciones/quimica-ciencia_y_magia.pdf). [Consultado el 10 de septiembre de 2013].
- Gargallo-López, B.; Cruz-Perez-Perez, B.; Serra-Caronell, F.; Sánchez-Periz, J.; Ros-Ros, I. Actitudes ante el aprendizaje y rendimiento académico en los estudiantes universitarios. *Revista Iberoamericana de Educación*. 2007. **42**(1): 1-11.
- Benítez, M.; Giménez, M.; Osicka, R. Las asignaturas pendientes y el rendimiento académico: ¿existe alguna relación?. 2000. Disponible en: <http://fai.unne.edu.ar>. [Consultado el 10 de septiembre de 2013].
- Jimenez, M. Competencia social: intervención preventiva en la escuela. *Infancia y Sociedad*. 2000. **24**: 21-48.
- Navarro, R. El Rendimiento Académico: Concepto, Investigación y Desarrollo. *Revista Electrónica Iberoamericana sobre Calidad, Eficacia y Cambio en Educación*. 2003. **1**(2): 1-14.
- Quiles, M. Actitudes hacia las matemáticas y rendimiento escolar. *Comunicación, Lenguaje y Educación*. 1993. **18**: 115-125.
- Ramírez, M. J. Actitudes hacia las matemáticas y rendimiento académico entre estudiantes de octavo básico. *Estudios pedagógicos*. 2005. **31**(1): 97-112.
- Akey, T. School context, student attitudes and behavior, and academic achievement: and exploratory analysis. Informe de investigación. 2006. Disponible en: [http://www.eric.ed.gov/ERICDocs/data/ericdocs2/content\\_storage.pdf](http://www.eric.ed.gov/ERICDocs/data/ericdocs2/content_storage.pdf). [Consultado el 15 de noviembre de 2008]
- House, J. D.; Prion, S. K. Student attitudes and academic background as predictors of achievement in college English. *International Journal of Instructional Media*. 1998. **25**(1): 29-42.
- Herrero, M. E.; Nieto, S.; Rodríguez, M. J.; Sánchez, M. C. Factores implicados en el rendimiento académico de los alumnos de la Universidad de Salamanca. *Revista de Investigación Educativa*. 1999. **17**(2): 413-421.
- Molina, M.; Carriazo, J.; Farías, D. Actitudes hacia la química de estudiantes de diferentes carreras universitarias en Colombia. *Química Nova*. 2011. **34**(9): 1672-1677.
- Hernández-Sampieri, R.; Fernández, C.; Baptista, P. Metodología de la Investigación. México. Mc Graw Hill. pp. 656. 2010.
- Celina-Oviedo, H.; Campo-Arias, A. Aproximación al uso del coeficiente alfa de Cronbach. *Revista Colombiana de Psiquiatría*. 2005. **34**: 572-580.
- Pliego, O. H.; Rodríguez, C. S.; Carbó, M.I.; Peretó, N.; Odetti, H.S. Evaluación de las actitudes hacia la química de los estudiantes de las carreras de Ingeniería de proceso: validación del instrumento. *Anuario Latinoamericano de Educación Química*. 2003. **36**: 150-156.
- Pliego, O. H.; Contini, L.; Odetti, H. S.; Güemes, R.; Tiburzi, M. C. Las actitudes de los estudiantes universitarios hacia el fenómeno radiactivo, la energía nuclear y sus aplicaciones. *Educación Química*. 2004. **15**(2): 60-66.
- Espinosa-García, J.; Román-Galán, T. La medida de las actitudes usando las técnicas de Likert y de Diferencial semántico. *Enseñanza de las Ciencias*. 1998. **16**(3): 477-484.
- Ariza-Traslaviña, L. B.; Amaya-Posse, C. A. La enseñanza de la química desde las CTS para el desarrollo de actitudes favorables en los estudiantes. *Revista PPDQ Boletín*. 2014. **2**: 5-14.
- Murray, I.; Reiss, M. The student review of the science curriculum. *School Science Review*. 2005. **87**(318): 83-93.
- Jenkins, E. W. The Student Voice and School Science Education. *Studies in Science Education*. 2006. **42**: 49-88.
- Lyons, T. Different countries, same science classes: Students' experiences of school science in their own words. *International Journal of Science Education*. 2006. **28**(6): 591-613.
- Peña, D. Análisis de datos multivariantes. Madrid. MacGraw Hill. pp. 515. 2002.
- Santandreu Ledda, N.; Pandiela, S.; Macías, A. Actitudes hacia las Ciencias y el Rendimiento Académico de Estudiantes de Nivel Secundario. *Revista Electrónica Iberoamericana de Educación en Ciencias y Tecnología*. 2010. **2**(2): 47-57.

### Article citation:

Reyes, M.S.; Porro, S.; Pirovani, M.E. Actitudes y rendimiento académico: su evolución desde química general e inorgánica hasta química orgánica. *Rev Colomb Quim*. 2014. **43**(1): 36-41.



## Instrucciones para los autores

La *Revista Colombiana de Química* es una publicación científica, arbitrada del Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia que acepta contribuciones provenientes de investigación en las diversas áreas de la química. El contenido de los artículos debe ser original, inédito y no debe haber sido enviado, total o parcialmente, para publicación a otra revista. La redacción asume el derecho de reproducción de los trabajos aceptados. Su publicación en otro medio requiere permiso del editor.

Se publicarán contribuciones consideradas como resultados de trabajos de investigación, y revisiones bibliográficas, no se incluirán notas breves. La aceptación de los trabajos para publicación en la *Revista Colombiana de Química* depende de las evaluaciones del Comité Editorial y del concepto de especialistas en el tema, para lo cual se utiliza un sistema de doble ciego. Los manuscritos que no se ajusten a la temática o al estilo de la revista serán devueltos sin pasar a evaluación.

### Requisitos para el envío de manuscritos

- La *Revista Colombiana de Química* acepta contribuciones en inglés y en español.
- Todas las secciones del artículo se presentarán en formato .doc o .docx, a doble espacio, con letra Times New Roman (tamaño 12) en páginas tamaño carta. Todas las páginas deben estar numeradas.
- Las gráficas, fotos y figuras deben adjuntarse como archivos independientes del manuscrito sometido para evaluación, además, deben cumplir los siguientes requisitos: (i) deben estar ajustadas al tamaño en que deben salir en el documento impreso y en formato tiff o jpg con mínimo 300 dpi de resolución, (ii) en caso de que las imágenes se puedan imprimir a blanco y negro, las mismas deben ajustarse a escala de grises; en caso de que tengan 4 o más ítems, se debe cambiar la escala de grises por diferentes tramas, (iii) las imágenes **no** deben estar insertadas en el artículo ya que así pierden resolución y (iv) si las gráficas o figuras, corresponden a archivos trabajados en hojas de cálculo (p.ej. MS Excel) o procesadores de texto (p. Ej. MS Word), se deben enviar los archivos originales (.xls, .doc, etc) abiertos, no como imagen para que así el equipo de diagramación pueda editarlos.
- Adjunte una carta de presentación y aceptación de autoría firmada por los investigadores involucrados. Los autores podrán sugerir los nombres de tres posibles árbitros con sus respectivas direcciones electrónicas.
- Los manuscritos en formato .doc o .docx, la carta de presentación, las imágenes y los archivos suplementarios deben ser enviados a la siguiente dirección de correo electrónico: rcolquim\_fcbog@unal.edu.co.

### Nota de Copyright

Una vez que un artículo es aceptado para su publicación, el autor está de acuerdo en que la revista se publicará On-Line bajo los términos de una licencia Creative Commons Attribution-Noncommercial 3.0 Unported License.

## Forma y organización del artículo

Los trabajos para publicación deben incluir:

- **Título.** Debe ser conciso, consistente con el trabajo y de ser posible no contener fórmulas ni abreviaturas. El título se debe escribir en español, centrado y en mayúsculas; en renglón aparte, la versión del título en inglés y después la versión del título en portugués. Si el manuscrito está en inglés, el título en este idioma aparecerá en primer lugar.
- **Nombre de los autores y filiación institucional.** Se debe incluir el primer nombre, la inicial del segundo nombre y el primer apellido de todos los autores. Indique las filiaciones institucionales con un número arábigo en superíndice escrito inmediatamente después del nombre de cada autor y en frente de la dirección apropiada. Las filiaciones institucionales deben incluir la dirección postal completa y en la del autor corresponsal debe adicionarse el correo electrónico y el número telefónico.
- **Resumen y palabras clave.** En el resumen tipo analítico, preferiblemente en un solo párrafo, con una extensión no mayor a 180 palabras, deben mencionarse los propósitos de la investigación, los resultados relevantes (proporcionando datos específicos y, de ser posible, su significación estadística), y las conclusiones principales sin incluir citas bibliográficas. Se debe hacer énfasis en los aspectos nuevos e importantes del estudio.  
Al final del resumen se deben escribir de 3 a 6 palabras clave que ayuden a clasificar el artículo.  
Incluya la versión del resumen y de las palabras clave tanto en inglés (Abstract) como en portugués (resumo).
- **Introducción.** Describa el planteamiento general del tema, dando la información necesaria en forma concisa y precisa haciendo referencia solamente a la bibliografía directamente relacionada, considerada indispensable para el desarrollo del tema y que permita conocer el estado actual del mismo. Expresé con claridad los objetivos principales y secundarios del trabajo y no incluya datos ni conclusiones del trabajo que está dando a conocer.
- **Materiales y métodos.** Si existen secciones diferenciadas, deben indicarse mediante encabezados pertinentes (p. e. muestreo, preparación de la muestra, etc.). Las fuentes y estado de pureza de los materiales y reactivos químicos y la descripción de equipos solo se debe incluir cuando estos sean específicos o novedosos. La descripción de la experimentación debe hacerse con los detalles suficientes para que otros investigadores puedan repetirla. La descripción de procedimientos descritos en la literatura debe evitarse, a menos que hayan sido modificados, en cuyo caso deben incluirse los detalles de la modificación.
- **Resultados y discusión.** Los resultados y discusión deben presentarse de forma precisa incluyendo, si da a lugar, tablas y figuras. No se debe presentar la información en ambas formas. La discusión debe ser breve y enfocada a la interpretación de los resultados experimentales, incluidas sus limitaciones e implicaciones para investigaciones futuras. Relacione las observaciones con otros estudios pertinentes.

- **Conclusiones.** Presente las conclusiones más relevantes considerando los objetivos del trabajo y oriente sobre posibles vías para continuar la investigación o el estudio emprendido. Absténgase de hacer afirmaciones generales y extraer conclusiones que no estén respaldadas por los datos. No cite referencias bibliográficas en esta sección.
- **Referencias bibliográficas.** Numere las referencias consecutivamente en el orden en que son mencionados por primera vez en el texto. Identifique las referencias en el texto con números arábigos y en paréntesis, por ejemplo, (11). Las referencias bibliográficas deben ir al final con su respectiva numeración en el siguiente formato:
  1. **Artículos de revista.** Apellidos de todos los autores e inicial del nombre, título completo del artículo, nombre de la revista (preferiblemente abreviado), año, volumen y páginas. Para el nombre abreviado puede consultar el servicio del Chemical Abstracts en: <http://www.cas.org/sent.html>.
    - Paniandy, J.; Chane-Ming, J.; Pieribattesti, J. Chemical composition of the essential oil and headspace solid-phase microextraction of the guava fruit (*Psidium guajava*, L.). *J. Essent. Oil Res.* 2000. 12: 153–158.
  2. **Libros:** Apellidos e inicial del nombre de los autores, título del libro, ciudad, editorial, páginas, año de publicación.
    - Skoog, D.; Holler, E.; Crouch, S. Principios de análisis instrumental. 6.a ed., México, D. F., Cengage Learning. pp 20–34. 2008.
  3. **Capítulo de libro:** apellidos e inicial del nombre de los autores del capítulo, seguido de la palabra En: título del libro, apellidos e inicial del editor del libro, ciudad, editorial páginas, año de publicación.
    - Ferst A. The three-dimensional structure of proteins. En: *Structure and mechanism in protein science*. Ed. Por Pelletier, S., New York: W.H. Freeman and Company. pp. 1–50. 2003.
  4. **Patente:**
    - Davis, R. U.S. Patent 5,708,591, 1998.
  5. **Referencias de internet.** Cuando se usan versiones electrónicas se debe incluir la URL donde se encuentra disponible el documento y la fecha en la cual se consultó por última vez:
    - Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Colombia. 2011. Disponible en: [http://www.minagricultura.gov.co/archivos/agenda\\_prospectivainvestigación\\_y\\_desarrollo\\_tecnológico\\_parralacadena\\_productiva\\_de\\_flores\\_y\\_follajes\\_con\\_enfasis\\_en\\_clavel](http://www.minagricultura.gov.co/archivos/agenda_prospectivainvestigación_y_desarrollo_tecnológico_parralacadena_productiva_de_flores_y_follajes_con_enfasis_en_clavel). [Consultado el 7 de abril de 2011].

## Requisitos de los manuscritos

- **Nomenclatura, unidades y abreviaturas.** Deben emplearse nomenclaturas y símbolos aceptados internacionalmente y reconocidos por la International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) y unidades de medida del Systeme International d'Unités (SI). Cuando se incluyen datos analíticos debe indicarse el número de repeticiones así como la desviación típica de los resultados u otra magnitud que indique la reproducibilidad de los mismos. Escribir las fórmulas de forma clara, prestando especial atención a la colocación de los sub y superíndices.

Cuando se utilice por primera vez una abreviatura, irá precedida del término completo al que corresponde, salvo si se trata de unidades de medida común, por ejemplo: dicroísmo circular (DC). El nombre de las enzimas no debe abreviarse, exceptuando las abreviaturas comunes como ATPasa. En lo posible para las enzimas utilice los números E.C. y las recomendaciones del Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB) [www.chem.qmw.ac.uk/iubmb](http://www.chem.qmw.ac.uk/iubmb).

- **Caracterización de compuestos.** Los datos físicos y espectroscópicos para compuestos nuevos deben presentarse en el siguiente orden: nombre del compuesto y el número asignado en el texto; estado físico del compuesto (cristal, líquido, etc.), constantes físicas: punto de fusión/punto de ebullición; rotación óptica y medidas de dicroísmo circular si es ópticamente activo; UV; IR, RMN-<sup>1</sup>H; RMN-<sup>13</sup>C; EM. Los datos de RMN y espectrometría de masas se presentarán completos solo si estos no han sido publicados anteriormente en tal caso solo las referencias más relevantes deben mostrarse. La presentación de los datos de espectrometría de masas debe seguir las recomendaciones dadas en *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes*, **142**, 211–240 (1995) y deben indicar el método utilizado (EM (IE), EM (IQ), CG-EM, etc.) y la energía de ionización.
- **Tablas, figuras y ecuaciones.** Las tablas y figuras deben estar citadas en el texto, ennumeradas con números arábigos en el orden de aparición en el texto. Las tablas deben estar encabezadas por un título breve e informativo, en el caso de las figuras el título se coloca debajo. Las ecuaciones se numeran a la derecha, utilizando números arábigos que se escriben entre paréntesis cuadrados [ ].

## Costo de la publicación

La publicación de un artículo, con una extensión no mayor a 3 páginas impresas de la revista, tendrá un costo de 30.000 pesos colombianos. Cada página adicional tendrá un costo de 20.000 pesos colombianos. Cada autor recibirá un ejemplar de la revista.