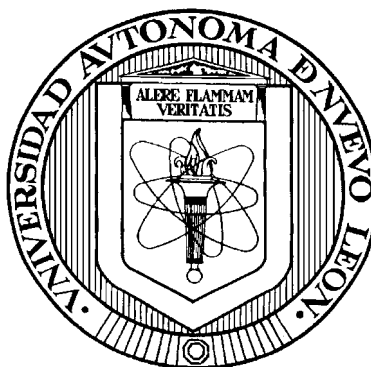


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA



**APLICACIÓN DE LA MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA
(SPME) PARA LA DETERMINACIÓN DE PLAGUICIDAS
ORGANOCORADOS EN PRODUCTOS LÁCTEOS**

Por

Q.F.B. MAGDALENA ESCOBAR SAUCEDO

**Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRO EN CIENCIAS con Especialidad en
Química Biomédica**

Febrero, 2009

**APLICACIÓN DE LA MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA
(SPME) PARA LA DETERMINACIÓN DE PLAGUICIDAS
ORGANOCORADOS EN PRODUCTOS LÁCTEOS**

Aprobación de la tesis:

DRA. ROCÍO CASTRO RÍOS.
Director de Tesis

DRA. NOEMÍ WASKMAN DE TORRES.
Co-Director de Tesis

DRA. MA. DE LA LUZ SALAZAR CAVAZOS.
Co-Director de Tesis

DR. DIONICIO A. GALARZA DELGADO.
Subdirector de Estudios de Posgrado

**APLICACIÓN DE LA MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA
(SPME) PARA LA DETERMINACIÓN DE PLAGUICIDAS
ORGANOCOLORADOS EN PRODUCTOS LÁCTEOS**

Presentado por:

Q.F.B. MAGDALENA ESCOBAR SAUCEDO

Este trabajo se realizó en los Laboratorios del departamento de Química Analítica de la Facultad de Medicina, de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección de la Dra. Rocío Castro Ríos y la codirección de la Dra. Noemí Waksman de Torres y la Dra. Ma. de la Luz Salazar Cavazos.

FIRMAS

DIRECTOR

Co-DIRECTOR

Dra. Rocío Castro Ríos.

Dra. Noemí Waksman de Torres.

Co-DIRECTOR

Dra. Ma. de la Luz Salazar Cavazos.

The important thing is not to stop questioning.

Curiosity has its own reason for existing.

Albert Einstein

Con gran amor y respeto a mis padres

Don Manuel Escobar Martínez

Doña Francisca Saucedo Cruz

Gracias por ser cómplices de mis sueños, los amo.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por haberme dado el don de la vida y estar siempre presente, aunque muchas veces no logro percibirlo.

A mis padres, por ser esos ángeles que cuidan y guían mi vida, aunque muchas veces diferimos, los necesito conmigo mucho más de lo que se los hago saber.

A mis hermanas, Brenda y Mayela, que aunque la vida la hemos vivido cada una a su manera y tenemos temperamentos muy diferentes, el tenerlas a mi lado me ha ayudado a forjar mi carácter y a descubrir mis fuerzas y mis debilidades, las amo hermanitas.

A mi ángel guardián, mi abuelita Trini, que si bien te has adelantado en el camino, has sido un ejemplo de vida y de entrega desmedida, te quiero mucho y te extraño más!

A mi familia adoptiva, Don Arturo García, Doña Juany Mata, Irene y Diana García Mata y el cuñis Jorge Luna, por ser mi apoyo y mi impulso en esos días en que todo parece ponerse imposible, gracias por estar ahí y no dejarme caer. Son una parte muy importante de mi vida.

A ese maestro que tuve durante el 5to semestre de la carrera, que creyó en mí y me brindó el apoyo suficiente para convertir mis sueños en metas, algunas de las cuales ahora las veo en mi camino como hermosas realidades. Muchas gracias Dr. Abelardo Chávez por su confianza y más aún, por su amistad.

A la Dra. Rocío Castro, por ser mi maestra, compañera, confidente y amiga. Ha sido complicado el camino, pero este logro también es suyo. He aprendido mucho de ud. Gracias por estar ahí, por confiar en mí, por su paciencia, cariño y amistad.

A Aline Gómez, por recordarme las metas planteadas, por creer en mí y por impulsarme a alcanzarlas, aunque a veces es difícil nuestra comunicación, sabes que te quiero mucho.

A mis asesores: Dra. Noemí Waksman y Dra. Ma. de la Luz Salazar, por el apoyo, los consejos y las enseñanzas que han compartido conmigo.

A Anabel Torres, por apoyarme, no solo en lo experimental de mi tesis, sino también por tu apoyo moral, por tus consejos y tu tiempo cuando las cosas no iban del todo bien.

A todo el departamento de Química Analítica, quienes me han adoptado a pesar de que era una desconocida. Gracias por esas explicaciones, las palabras de aliento, el oído presto a escuchar, las palmadas en la espalda, los abrazos y las nuevas perspectivas que me brindan cada vez que los necesito.

A Yael C. de la Torre, Jonathan P. Meseguer, David Silva, Erika Saldivar, Elda Melchor, Marsela Garza, Carlo Martínez, Martha Cavazos, Karina Álvarez, Alicia Ramírez, Graciela Granados y Eloy Castillo, por ser y haber sido mi familia en el día a día, dentro y fuera del departamento, por los consejos, los regaños y las palabras de aliento. Gracias por hacer más placentero este trayecto y ser parte de esta historia.

A Yael C. de la Torre, por tu sentido del humor, tu apoyo y sobre todo, tu amistad. La verdad, mejor compañera de aventura no pude tener, fue un verdadero placer vivirla contigo, gracias por todo Flakís!

A la familia Gutiérrez Lindner, Don Luis, Doña Gaby, Sharon, Goldie y Abraham, por sus palabras de aliento y consejos, por brindarme su amistad y por apoyar mis sueños.

A la Sra Gaby Lindner, por la amistad que surgió entre nosotros, por esos días en que calmó mi desesperación y se interesó por lo que pasaba en mi vida. Gracias por ser ese bálsamo que alivió mi dolor y tranquilizó mi alma.

A Abraham Stuart Gutiérrez, por tu apoyo desde antes del inicio de esta aventura, gracias por alentarme a realizar mis sueños, por demostrarme que siempre hay otro punto de vista, por creer y confiar en mí.

A Paola Bocanegra e Irene Rodríguez, quienes aligeraron el estrés de mis días durante el desarrollo de este trabajo. Gracias por brindarme su amistad y preocuparse por mí.

A quienes, sin saberlo ni imaginarlo, aportaron su granito de arena para que esta meta haya llegado a su término. Gracias a aquellos de quien me tuve que despedir para comenzar esta aventura, gracias a aquellos que han caminando un tiempo a mi lado y que, por diversas circunstancias nos hemos tenido que separar. Realmente, creo que nada en este mundo es accidente o simple casualidad.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico otorgado.

1.3.2.7.1 Optimización de la SPME.	28
1.4 Métodos de determinación y cuantificación de OCPs.	30
1.5 Diseño de experimentos.	30
1.5.1 Diseño Factorial.	33
1.5.1.1 Diseño factorial fraccionado.	34
1.5.2 Método Simplex.	36
1.6 Justificación.	38
1.7 Objetivo General.	39
1.8 Objetivos Específicos.	39
II MATERIALES Y MÉTODOS	40
2.1 Material, Equipos y Reactivos.	40
2.1.1 Material	40
2.1.2 Equipos	41
2.1.3 Reactivos	42
2.2 Preparación de soluciones.	43
2.2.1 Preparación de soluciones de estándares.	43
2.2.2 Preparación de soluciones de trabajo.	44
2.3 Muestra seleccionada.	44
2.4 Cromatografía de gases-masas (GC-MS).	45
2.4.1 Optimización de las condiciones de separación cromatográfica.	45
2.4.1.1 Confirmación de la identidad de los analitos.	46
2.4.1.2 Establecimiento de parámetros de adquisición de datos.	46
2.4.2 Validación del sistema.	47
2.4.2.1 Linealidad.	48
2.4.2.2 Precisión.	48
2.4.2.3 Límite de Detección	48
2.4.2.4 Límite de Cuantificación.	49

2.5 Microextracción en Fase Sólida.	49
2.5.1 Selección de la fibra para SPME.	52
2.5.2 Optimización de la Desorción.	53
2.5.3 Optimización de la Extracción.	53
2.6 Sensibilidad del método de análisis de OCPs.	56
2.6.1 Límite de Detección	57
2.6.2 Límite de Cuantificación.	57
III RESULTADOS	58
3.1 Cromatografía de Gases-Masas (GC-MS).	58
3.1.1 Optimización de las condiciones de separación cromatográfica.	58
3.1.2 Confirmación de la identidad de los analitos.	66
3.1.3 Establecimiento de parámetros de adquisición de datos.	67
3.1.4 Validación del sistema.	70
3.2 Microextracción en Fase Sólida.	71
3.2.1 Selección de la fibra para SPME.	71
3.2.2 Optimización de la extracción.	73
3.3 Sensibilidad del Método de análisis de OCPs.	81
IV DISCUSIÓN	82
4.1 Cromatografía de Gases-Masas (GC-MS).	82
4.1.1 Optimización de las condiciones de separación cromatográfica.	82
4.1.2 Validación del sistema.	85
4.2 Microextracción en Fase Sólida.	86
4.2.1 Selección de la fibra para SPME.	87
4.2.2 Optimización de la desorción.	90
4.2.3 Optimización de la extracción.	90

4.3 Sensibilidad del Método de análisis de OCPs.	98
V CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	99
5.1 Conclusiones.	99
5.2 Perspectivas.	100
BIBLIOGRAFÍA	101
APÉNDICE A	112
A.1 Contraste F para la comparación de desviaciones estándar.	112
A.2 Prueba t para la comparación de medias experimentales con varianzas iguales.	113
A.3 Prueba t para la comparación de medias experimentales con varianzas diferentes.	114
APÉNDICE B. Comparación de los espectros de masas de los 16 OCPs de estudio con lo reportado en literatura.	115

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I- 1.	Estructura y propiedades fisicoquímicas de los OCPs estudiados en este trabajo.	6
I- 2.	Persistencia en suelo de algunos OCPs.	8
I- 3.	Compuestos orgánicos persistentes listados en el anexo del Convenio de Estocolmo.	11
I- 4.	Límites máximos de Residuos de OCPs en Leche y productos lácteos.	14
I- 5.	Aplicación de las modalidades de SPME☆.	27
I- 6.	Aplicación de la SPME al análisis de OCPs en diferentes matrices.	29
I- 7.	Empleo de los diferentes sistemas de determinación de OCPs.	31
II-1.	Programa inicial para el análisis de OCPs por GC	45
II-2.	Condiciones de operación utilizadas para el espectrómetro de masas.	46
II-3.	Iones característicos de los analitos (CFR Part 136 Fed. Regist, 2009; González-Rodríguez, 2005)	47
II-4.	Condiciones de GC-FID	51
II-5.	Condiciones de trabajo empleadas para la selección de fibra de SPME.	52
II-6.	Condiciones de desorción para OCPs.	53
II-7.	Experimentos propuestos para el diseño factorial fraccionado ($2^{(k-4)}$)	54
II-8.	Experimentos iniciales propuestos para la optimización de la extracción.	55
II-9.	Valores límites de análisis.	55

III- 1.	Resolución obtenida para el p,p'-DDD y el endrín aldehído con los diferentes programas de temperatura.	65
III- 2.	Condiciones finales para la separación cromatográfica.	65
III- 3.	Tiempo de retención de cada analito obtenido con el programa de temperatura 6.	66
III- 4.	Ventanas de adquisición establecidas para el modo SIM.	67
III- 5.	Resultados de la validación del método GC-MS.	70
III- 6.	Resultados obtenidos para Selección de Fibra de SPME.	71
III- 7.	Experimentos del diseño factorial fraccionado.	73
III- 8.	Evolución del método simplex para la optimización de la extracción.	74
III- 9.	Condiciones de extracción obtenidas con el diseño simplex.	75
III- 10.	Análisis estadístico de la cantidad de muestra.	76
III- 11.	Análisis estadístico del tiempo de extracción.	79
III- 12.	Condiciones óptimas para la extracción de OCPs en yogurt.	79
III- 13.	Límites de detección y cuantificación de los OCPs con el método de SPME-GC-MS desarrollado.	81

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
I- 1.	Estructura de algunos plaguicidas organoclorados.	4
I- 2.	Dispositivo de SPME.	24
I- 3.	Modalidades de extracción en SPME.	26
II- 1.	Montaje del dispositivo de extracción por HS-SPME.	51
III-1.	Cromatograma obtenido con el programa de temperatura 1. Solución estándar a 0,5 µg/mL.	59
III- 2.	Cromatograma obtenido con el programa de temperatura 2 de temperaturas. Solución estándar a 0,5 µg/mL.	60
III- 3.	Cromatograma obtenido con el programa de temperatura 3. Solución estándar a 0,5 µg/mL.	61
III- 4.	Cromatograma obtenido el programa de temperatura 4. Solución estándar a 0,5 µg/mL.	62
III- 5.	Cromatograma obtenido el programa de temperatura 5. Solución estándar a 0,5 µg/mL.	63
III- 6.	Cromatograma obtenido el programa de temperatura 6. Solución estándar a 0,5 µg/mL.	64
III-7.	Cromatograma obtenido con la modalidad SIM con el programa de temperatura 6.	68
III- 8.	Cromatograma del ión 67 m/z del endrín aldehído.	69
III-9.	Cromatograma del ión 235 m/z del p,p'-DDD.	69
III- 10.	Gráfica de la comparación de las áreas de OCPS para la selección de la fibra para SPME (n=3).	72
III- 11.	Diagrama de pareto obtenido con el diseño factorial fraccionado para la selección de variables.	73

III- 12.	Comparación de las áreas obtenidas de la extracción de diferentes cantidades de muestra.	77
III-13.	Comparación de áreas obtenidas a diferentes tiempos de extracción.	78
III-14.	Cromatograma obtenido aplicando el método de SPME-GC-MS al analizar una muestra adicionada con 6,25 ng/g.	80

NOMENCLATURA

°C	Grados Celsius
µg	Microgramo
µm	Micrómetro
ACN	Acetonitrilo
AOAC	Asociación de Comunidades Analíticas
BCH	Hexaclorobenceno
CAR	Carboxen
CE	Comunidad Europea
CICOPLAFEST	Comisión Intersecretarial para el Control del Proceso y Uso de Plaguicidas, Fertilizantes y Sustancias Tóxicas
COPs	Compuestos Orgánicos Persistentes
D.I.	Diámetro interno
DDD	Diclorodifenil dicloroetano
DDE	Diclorodifenil dicloroetileno
DDT	Diclorodifenil tricloroetano
DER	Desviación estándar relativa
DVB	Divinilbenceno
ECD	Detector de captura de electrones
EPA	Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos
EUA	Estados Unidos de Norteamérica

FID	Detector de ionización de flama
g	Gramo
GC	Cromatografía de gases
gHz	Gigahertz
HCH	Hexaclorociclohexano
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta definición
HS	Headspace
IDF	Federación Internacional de Lechería
kHz	Kilohertz
Ko/w	Coefficiente de partición octanol/agua
L	Litro
LC	Cromatografía de líquidos
LLE	Extracción líquido-líquido
LMR	Límite máximo de residuo
LOD	Límite de detección
LOQ	Límite de cuantificación
m	Metro
MAE	Extracción asistida por microondas
min	Minutos
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mm Hg	Milímetros de mercurio
MS	Espectrometría de masas
MSPD	Extracción por dispersión en matriz de fase sólida

m/z	Relación masa-carga
NaCl	Cloruro de sodio
ng	Nanogramo
NIST	Instituto Nacional de Estándares y Tecnología
nm	Nanómetro
NR	No reportado
OCPs	Plaguicidas organoclorados
OMS	Organización Mundial de la Salud
OPPs	Plaguicidas organofosforados
PA	Poliacrilato
PCNB	Pentacloronitrobenceno
PDMS	Polidimetilsiloxano
pg	Picogramo
PLE	Extracción con Líquidos Presurizados
Psi	Libras por pulgada cuadrada
SCAN	Barrido completo
SDME	Microextracción en gota
SIM	Monitoreo de iones seleccionados
SIR	Registro de iones seleccionados
SPE	Extracción en fase sólida
SPME	Microextracción en Fase Sólida
STPs	Sustancias Tóxicas Persistentes
USE	Extracción por ultrasonido
UV	Ultravioleta

RESUMEN

Q.F.B. Magdalena Escobar Saucedo.

Fecha de graduación: Febrero 2009.

Universidad Autónoma de Nuevo León.
Facultad de Medicina.

Título del estudio: APLICACIÓN DE LA MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA (SPME) PARA LA DETERMINACIÓN DE PLAGUICIDAS ORGANOCLORADOS EN PRODUCTOS LÁCTEOS.

Número de páginas: 143

Candidato para el grado de Maestro en Ciencias con especialidad en Química Biomédica.

Área de estudio: Química Analítica

Propósito y Método de Estudio:

En la actualidad, es imperativo el control de calidad de la leche y sus derivados así como el establecimiento de la ausencia de adulterantes o contaminantes. La presencia de plaguicidas organoclorados (OCPs) en productos lácteos es un tema de interés creciente en países en vías de desarrollo, como es el caso de México, ya que no se ha disminuido el empleo de estos compuestos en actividades tanto agrícolas como sanitarias. Algunas de las características más importantes que poseen los OCPs son: elevada toxicidad por exposición crónica, alta persistencia en el suelo y en los alimentos, baja polaridad que favorece su bioacumulación en tejido graso y su posterior eliminación por leche, convirtiendo a los productos lácteos en una importante ruta de exposición del hombre a estos plaguicidas. Los métodos convencionales de análisis de OCPs en leche y sus derivados tienen como desventajas: que involucran procesos de pre-tratamiento largos, costosos y que requieren grandes volúmenes de solventes tóxicos. Debido a su simplicidad, rapidez y bajo costo, en el presente estudio se evaluó el empleo de la microextracción en fase sólida (SPME) como técnica alternativa para la determinación de los OCPs en yogurt.

Este trabajo presenta el desarrollo de un procedimiento de SPME en modalidad de *headspace* así como la optimización de las condiciones de análisis por cromatografía de gases-masas (GC-MS). Para el establecimiento del procedimiento de SPME, con la finalidad de seleccionar la fibra más adecuada se evaluó la eficiencia de extracción de 3 fases extractantes de diferente composición. Una vez seleccionada la fibra de SPME, se prosiguió con la optimización de la etapa de extracción de los OCPs a partir de la matriz, para lo cual se evaluó, mediante un diseño factorial fraccionado, el efecto sobre la eficiencia de extracción de la cantidad de muestra, el volumen de *headspace*, la temperatura de extracción, el tiempo de equilibrio, el tiempo de extracción, el contenido de cloruro de sodio y el contenido de acetonitrilo. Las variables seleccionadas fueron optimizadas utilizando un diseño simplex modificado. Por último, se establecieron los límites de detección y de cuantificación para cada uno de los analitos utilizando el método de SPME-GC-MS desarrollado.

Contribuciones y Conclusiones:

Una de las principales contribuciones del trabajo desarrollado es que se aplicó por primera vez la SPME al análisis de OCPs en yogurt. El procedimiento de SPME-GC-MS desarrollado permite la determinación de 15 OCPs en yogurt a niveles de concentración por debajo de los límites máximos de residuos recomendados por la Organización Mundial de la Salud. Con el método propuesto fue posible disminuir el tiempo y el costo de análisis por muestra para la determinación de OCPs.

FIRMA DEL DIRECTOR DE TESIS

Dra. Rocío Castro Ríos

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1.1 Plaguicidas.

El desarrollo industrial y la agricultura intensiva de los últimos 60 a 70 años han sido los responsables de la síntesis, utilización y, en muchos casos, liberación al medio ambiente de diversos compuestos químicos que están ampliamente distribuidos por todo el mundo, entre los que se encuentran los plaguicidas.

Los plaguicidas se pueden definir como una sustancia o mezcla de sustancias que se destina a controlar cualquier plaga, incluidos los vectores de enfermedades humanas y de animales, así como las especies no deseadas que causen perjuicio o que interfieran con la producción agropecuaria y forestal.(CICOPLAFEST, 2004).

Los plaguicidas pueden clasificarse atendiendo a diversos aspectos como (INSHT, 1985):

1. El destino de aplicación.
2. La acción específica.
3. La constitución química.
4. El grado de peligrosidad para las personas.
5. La presentación o formulación para su aplicación.

1.2 Plaguicidas organoclorados (OCPs).

1.2.1 Generalidades.

Cuando hablamos de plaguicidas organoclorados (OCPs), nos referimos a un grupo de compuestos orgánicos sintéticos derivados de hidrocarburos complejos, en los que uno o varios átomos de hidrógeno han sido sustituidos por átomos de cloro (García, 2002) y en los que el cloro ocupa un 60% del peso de la molécula, lo que le confiere ciertas características de interés.

La producción y el uso de este tipo de compuestos se iniciaron después de la segunda guerra mundial con la finalidad de aumentar la producción agrícola y de controlar los vectores de enfermedades tales como la malaria y el paludismo.

1.2.2 Clasificación.

Los plaguicidas organoclorados pueden ser divididos en cuatro grupos, los cuales se ejemplifican en la figura I-1 (CEPIS/OPS, 2008).

1. DDT y análogos. DDE, DDD y sus isómeros.
2. HCH. Consiste en una mezcla de 8 isómeros químicamente distintos, que difieren entre sí por las posiciones en el espacio de los átomos de cloro e hidrógeno, además de heptaclorociclohexanos y octaclorociclohexanos.
3. Ciclodienos y compuestos similares. Este grupo a su vez se divide en:
 - ∞ Derivados de dimetanonaftaleno: aldrín, dieldrín, isodrín y endrín.
 - ∞ Derivados del indano: clordano y heptacloro
 - ∞ Derivados del biciclohepteno: telodrín, endosulfán, ciclodan y bromodan
4. Toxafeno y compuestos relacionados.

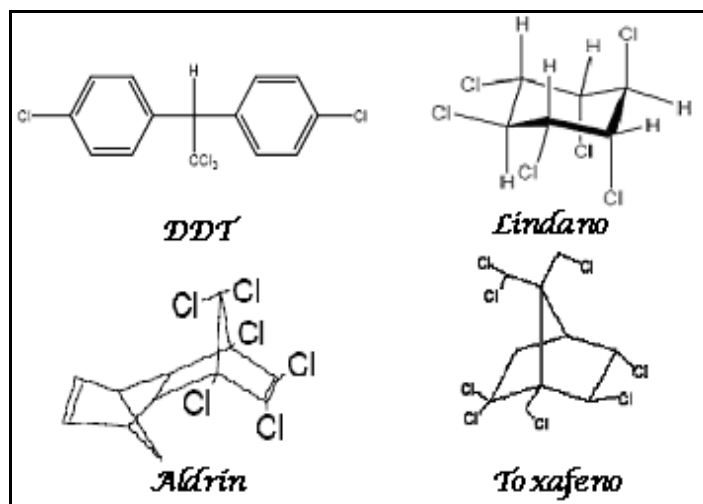


Figura I- 1. Estructura de algunos plaguicidas organoclorados.

1.2.3 Características fisicoquímicas

Entre las principales características que comparten los OCPs podemos citar las siguientes (INE, 2008):

1. Gran estabilidad química, debida a su baja reactividad química.
2. Estabilidad frente al aire, la luz y el calor, aunque algunos son sensibles a la radiaciones UVA.
3. Insolubilidad en agua, por lo que tienden a inmovilizarse en suelos y concentrarse en los organismos vivos.
4. Solubilidad en disolventes orgánicos y lípidos. Son compuestos con un coeficiente de partición octanol/agua ($K_{o/w}$) mayor a 1, liposolubles, se absorben fácilmente a través de las membranas biológicas y se acumulan en tejido graso.

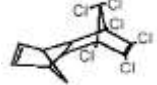
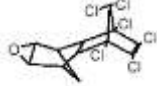
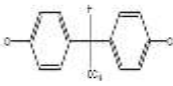

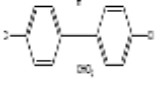
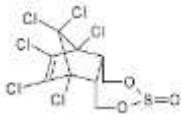

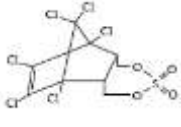
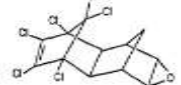
5. Resistencia a la biodegradación, lo que indica la baja posibilidad de que un plaguicida se descomponga y disminuya su actividad.
6. Moderada volatilidad, lo que ayuda a tener movilidad y dispersión hacia la atmósfera.

En la tabla I-1 se enlistan los OCPs incluidos en este trabajo y se presenta además su estructura química y algunas propiedades fisicoquímicas.

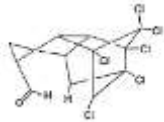
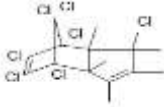
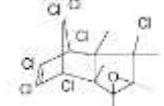
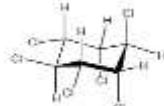
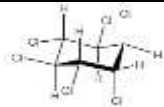
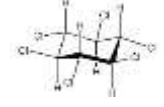

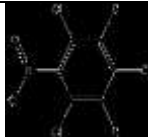
1.2.4 Persistencia de los Plaguicidas Organoclorados.

Se define como persistencia a la capacidad del plaguicida para retener sus características físicas, químicas y funcionales en el medio en el cual es transportado o distribuido, por un periodo de tiempo limitado después de su emisión. Se ha observado que los plaguicidas que persisten más tiempo en el ambiente, tienen mayor probabilidad de interacción con los diversos elementos que conforman los ecosistemas (INE, 2008).

Tabla I- 1. Estructura y propiedades fisicoquímicas de los OCPs estudiados en este trabajo (ATSDR, Toxicological Profile Information Sheet).

Plaguicida Fórmula Empírica	Estructura	Peso Molecular	Presión de Vapor (mmHg)	Coeficiente de Partición (Ko/w)
Aldrín C ₁₂ H ₈ Cl ₆		364,91	1,2x10 ⁻⁴	6,50
Dieldrin C ₁₂ H ₈ Cl ₆ O		380,91	5.89x10 ⁻⁶	6,20
p,p'-DDT C ₁₄ H ₉ Cl ₅		354,49	1,6x10 ⁻⁷	6,91
p,p'-DDE C ₁₄ H ₈ Cl ₄		318,03	6,0x10 ⁻⁶	6,51
p,p'-DDD C ₁₄ H ₁₀ Cl ₄		320,05	1,35x10 ⁻⁶	6,02
Endosulfán I C ₉ H ₆ Cl ₆ O ₃ S		406,93	1x10 ⁻⁵	3,83
Endosulfán II C ₉ H ₆ Cl ₆ O ₃ S		406,93	1x10 ⁻⁵	3,52
Endosulfán Sulfato C ₉ H ₆ Cl ₆ O ₄ S		422,90	1x10 ⁻⁵	3,66
Endrín C ₁₂ H ₈ Cl ₆ O		380,90	2x10 ⁻⁷	5,6

Continuación de Tabla I-1.

Plaguicida Fórmula empírica	Estructura	Peso Molecular	Presión de Vapor (mmHg)	Coeficiente de partición (K _o /w)
Endrín Aldehído C ₁₂ H ₈ Cl ₆ O		381,90	2x10 ⁻⁷	4,7
Heptacloro C ₁₀ H ₅ Cl ₇		373,32	3x10 ⁻⁴	6,1
Heptacloro Epóxido C ₁₀ H ₅ Cl ₇ O		389,40	1,95x10 ⁻⁵	5,4
Lindano C ₆ H ₆ Cl ₆		290.83	4.2x10 ⁻⁵	3.72
α- HCH C ₆ H ₆ Cl ₆		290.83	4.5x10 ⁻⁵	3.8
β- HCH C ₆ H ₆ Cl ₆		290.83	3.6x10 ⁻⁷	3.78
δ- HCH C ₆ H ₆ Cl ₆		290.83	3.5x10 ⁻⁵	4.14
PCNB C ₆ Cl ₅ NO ₂		295.3	5x10 ⁻⁵	4.77

De acuerdo con su periodo de persistencia, los plaguicidas se clasifican en (CICOPLAFEST, 2004):

- I. Ligeramente persistentes (menos de cuatro semanas).
- II. Poco persistentes (de cuatro a 26 semanas).
- III. Moderadamente persistentes (de 26 a 52 semanas).
- IV. Altamente persistentes (más de un año y menos de 20).
- V. Permanentes (más de 20 años).

En la Tabla I-2 se muestra la persistencia en suelo, expresada en años, de los plaguicidas organoclorados de principal interés. Como puede observarse, el periodo de persistencia varía entre 4 y 14 años por lo cual se clasifican como altamente persistentes.

Tabla I- 2. Persistencia en suelo de algunos OCPs.

Plaguicida	Persistencia en suelo (años)
Aldrín	10.2
Dieldrín	6
DDT	10.5
Endrín	12
Hexaclorobenceno	4
Lindano	14

1.2.5 Toxicodinamia y Toxicología.

Los plaguicidas organoclorados se absorben a través del intestino, pulmón y piel. La grasa y los disolventes orgánicos aumentan la absorción gastrointestinal y probablemente la absorción dérmica. Después de la exposición a alguno de estos compuestos, una parte importante de la dosis absorbida se almacena en el tejido adiposo, como el compuesto inalterado. La mayoría de los OCPs se metabolizan en el hígado mediante reacciones de descloración, oxidación y posterior conjugación. Su principal ruta de eliminación es la vía biliar, aunque también presentan excreción renal, fecal y a través de leche materna (Rouff, 1999).

La principal acción tóxica de los OCPs se produce en el sistema nervioso, en donde estos compuestos inducen a un estado de sobreexcitación en el cerebro. Esto es debido a que alteran la conducción axonal, aumentando el tiempo de apertura de los canales de sodio, lo que provoca una continua despolarización y bloqueando los canales de potasio, lo que lleva a crisis convulsivas parciales o generalizadas violentas. Los ciclodienos causan convulsiones que pueden repetirse por varios días debido a que son metabolizados con más lentitud. La parestesia, agitación involuntaria, ataxia e hiperreflexia son otras señales menos severas de toxicidad neurológica características de intoxicación por estos compuestos. En el caso de los niños, la naturaleza del desarrollo neurológico envuelve un nivel adicional de riesgo, que no está presente en los adultos.

Las concentraciones tisulares elevadas de OCPs aumentan la irritabilidad del miocardio, lo que predispone a arritmias cardíacas. También pueden interaccionar con algunos receptores endocrinos, en particular los receptores de estrógeno y andrógeno. Los niveles elevados de algunos OCPs, especialmente DDT, DDE y ciclodienos, han demostrado inducir las enzimas microsomales hepáticas, lo que tiende a acelerar la excreción de los mismos pesticidas, pero también puede estimular la biotransformación de sustancias naturales críticas, tales como hormonas esteroidales y algunos medicamentos (Routt, 1999).

1.2.6 Legislación.

En los últimos años, se ha tomado conciencia sobre las amenazas a la salud y al ambiente por el uso indiscriminado de las sustancias químicas tóxicas, particularmente, aquellas de origen sintético y que requieren tiempos prolongados para su degradación en el ambiente, mejor conocidas como sustancias tóxicas persistentes (STPs). A nivel mundial las principales acciones realizadas se enfocan al control de las 12 sustancias de mayor uso y peligrosidad, las cuales son conocidas como Contaminantes Orgánicos Persistentes (COP) y que se enlistan en la Tabla I-3 (Fernández, 2004).

En mayo de 2001 se estableció la Convención de Estocolmo sobre Contaminantes Orgánicos Persistentes, cuyo objetivo es eliminar o restringir la

producción y uso de los Contaminantes Orgánicos Persistentes que se fabrican intencionalmente, además de buscar disminuir la generación de los contaminantes producidos de manera no intencional. El Convenio entró en vigor el 17 de mayo de 2004 contando con 151 países signatarios y 76 países miembros. México firmó este convenio el 23 de mayo 2001 y lo ratificó el 10 de febrero de 2003 (Fernández, 2004).

Tabla I- 3. Compuestos orgánicos persistentes listados en el anexo del Convenio de Estocolmo.

Plaguicidas	Productos industriales	Productos secundarios de procesos industriales no intencionales
Aldrín Clordano DDT Dieldrín Heptaclo Hexaclorobenceno Mirex Toxafeno	Bifenilos policlorados	Dioxinas Furanos

Cabe señalar que existe otro grupo de sustancias que son candidatas a ser incluidas en el Convenio de Estocolmo: α , β y γ hexaclorociclohexanos, clordecona, atrazina, endosulfán, pentaclorofenol, los ftalatos, las parafinas policloradas, hexabromobifenilo, éteres bifenílicos polibromados, hidrocarburos policíclicos aromáticos, nonil y octil-fenoles, el perfluorooctansulfonato, y los compuestos organo-estánnicos, organo-mercúricos y órgano-plúmbicos (Fernández, 2004).

En México, para optimizar las actividades relacionadas con la regulación y el control de riesgos químicos y con ello, simplificar la reglamentación y gestión, en 1987 se publicó un decreto para que se establecieran las bases de coordinación entre las Secretarías de: Comercio y Fomento Industrial (actualmente de Economía), Agricultura y Recursos Hidráulicos (actualmente de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación), Desarrollo Urbano y Ecología (actualmente de Medio Ambiente y Recursos Naturales) y Salud, que posteriormente dieron origen a la Comisión Intersecretarial para el Control del Proceso y Uso de Plaguicidas, Fertilizantes y Sustancias Tóxicas (CICOPLAFEST). (CICOPLAFEST, 2004).

Con la finalidad de coadyuvar al buen uso y manejo de los diversos plaguicidas y minimizar los riesgos para la salud, el ambiente y la comercialización de productos, la CICOPLAFEST publicó en 1988 el primer Catálogo Oficial de Plaguicidas, en el cual se puede consultar los plaguicidas que están autorizados en nuestro país por ingrediente activo y por uso, así como su categoría toxicológica. (CICOPLAFEST, 2004).

En México, ha sido prohibida, conforme al Diario Oficial de la Federación del 3 de enero de 1991, la importación, fabricación, formulación, comercialización y uso de los plaguicidas aldrín, dieldrín, endrín y mirex. En el catálogo oficial de plaguicidas publicado en el Diario Oficial de la Federación el 19 de agosto de 1991, se ha restringido el uso de los plaguicidas DDT, BHC y lindano, mientras que para el toxafeno, hexaclorobenceno y heptacloro no existe registro. (CICOPLAFEST, 2004).

Sin embargo, a pesar de estos esfuerzos no se ha creado una legislación nacional que marque los límites máximos permisibles de plaguicidas organoclorados en alimentos, por lo que para el aseguramiento de la calidad de los alimentos se utilizan los valores establecidos por organizaciones internacionales o la legislación de países a donde se exportan los productos mexicanos.

Los Límites Máximos de Residuos (LMR) establecidos en el Codex Alimentarius 2007 y en la Comunidad Europea (CE) para los OCPs para leches, expresados en $\mu\text{g}/\text{Kg}$ de producto se presentan en la tabla I-4. Según lo establecido en el Codex Alimentarius, en el caso de productos lácteos con un contenido de grasa inferior al 2 por ciento, los LMR que se aplican son la mitad de los especificados para la leche, mientras que para productos lácteos con un contenido de grasa del 2 por ciento o superior son 25 veces el LMR especificado para la leche, expresados con referencia a la grasa. (FAO/OMS, 2008)

1.2.7 Plaguicidas Organoclorados y Productos lácteos.

Los productos agropecuarios tales como la carne, la leche y sus derivados, son de uso frecuente en la dieta del hombre, por lo que la aplicación de OCPs ha sido prohibida o restringida en el entorno del ganado bovino.

Tabla I- 4. Límites máximos de Residuos de OCPs en Leche y productos lácteos.

Plaguicida	Leche		Productos Lácteos	
	CODEX*	CE**	CODEX *	
			Contenido de grasa < 2%	Contenido de grasa > 2%
$\mu\text{g/Kg}$	$\mu\text{g/Kg}$	$\mu\text{g/Kg}$	$\mu\text{g/Kg}$ grasa	
Aldrín y dieldrín	6	6	3	7,5
DDT + metabolitos	20	40	10	25
Endosulfán	10	50	5	12,5
Endrín	-	0.8	-	-
α -HCH	-	4	-	-
Lindano	10	1	5	12,5
Heptacloro	6	4	3	7,5
β -HCH	-	3	-	-

*FAO/OMS 2008, **EU, 2005

Las principales causas de contaminación con OCPs del ganado lechero son (Noa, 2001):

1. Control de parásitos en el animal.
2. Control de insectos en los establos.
3. Alimentos.
4. Contaminación ambiental.
5. Accidentes o negligencias.

Los alimentos de origen animal como la carne y la leche se consideran la mayor fuente de residuos de estos plaguicidas en la alimentación humana. (Prado y cols., 1998) Las causas fundamentales de la presencia de residuos de OCPs en la leche son: sus propiedades fisicoquímicas de persistencia, liposolubilidad y bioacumulación. Cabe resaltar que el ganado expuesto a estos compuestos elimina residuos de plaguicidas o derivados de su biotransformación en la leche, por lo que los productos lácteos contienen OCPs, aún después de su procesamiento.

1.2.7.1 Antecedentes de la Presencia de OCPs en Productos Lácteos en México.

La presencia de OCPs en productos lácteos es un tema de interés creciente en países en vías de desarrollo, como es el caso de México, ya que al contrario de los países desarrollados, no se ha disminuido el empleo de estos compuestos en actividades tanto agrícolas como sanitarias.

Debido a la preocupación de los efectos tóxicos de estos compuestos, se han realizado estudios que demuestran la presencia de OCPs en diversos productos de origen animal en diferentes zonas del país. El estudio realizado en leche pasteurizada de venta comercial en la Cd. de México (Prado y cols., 1998) mostró que algunas de las

marcas de leche pasteurizada presentaron valores superiores a los límites máximos de residuos establecidos en el Codex Alimentarius para algunos plaguicidas.

En el estudio realizado por Albert y cols. (1988) en Sinaloa, se identificaron y cuantificaron los OCPs contenidos en queso y en huevos de gallina procedentes de una región agrícola de Sinaloa, México, encontrándose epóxido de heptacloro, p,p'-DDE y p,p'-DDT. Por su parte, Waliszewski y cols. (1996) encontraron que muestras de carne y grasa de bovinos contenían algún OCP aunque éstos no sobrepasaron el nivel de aceptación de EUA. Y recientemente en un trabajo publicado en 2007 por Prado y cols., se encontró la presencia de alguno de los OCPs en leche de cabra en la región de Querétaro, México, aunque en concentraciones menores de las encontradas en leche de vaca o de humanos.

1.3 Métodos de análisis de OCPs

1.3.1. Métodos Oficiales

Los métodos de análisis convencionales para OCPs involucran etapas de extracción, limpieza del extracto y análisis cromatográfico (Fidalgo y cols, 2003). Para la determinación de estos compuestos en leche se han reportado diferentes métodos. En general, los métodos oficiales involucran procesos de extracción y purificación muy largos, con mucha manipulación de la muestra, empleo de grandes volúmenes de

solventes orgánicos y además elevados costos, por lo que el control de los OCPs resulta complicado. A continuación se resumen los métodos más ampliamente utilizados:

El método propuesto por la Federación Internacional de Lechería (IDF 75C:1991) se basa en la separación y extracción de la grasa láctea por la adición de una solución detergente, la grasa extraída se deshidrata pasándola a través de sulfato de sodio anhidro y posteriormente se purifica en columna de florisil, eluyendo los plaguicidas organoclorados con una mezcla hexano:diclorometano (4:1); el eluato se lleva a sequedad en rotavapor y el residuo se redisuelve con isooctano. Este extracto purificado se inyecta al cromatógrafo de gases para su identificación y cuantificación con detector de captura de electrones (Noa, 2001).

En el método 970.52 de la AOAC, la muestra se prepara con metanol y oxalato de sodio y potasio, la grasa se extrae con éter de petróleo, posteriormente la fase orgánica se pasa a través de una columna de sulfato de sodio anhidro y se lava con pequeñas porciones de éter de petróleo. La determinación y cuantificación se realiza también por cromatografía de gases con detección de captura de electrones (AOAC, 1997).

1.3.2 Métodos emergentes.

Entre los métodos emergentes para el análisis de OCPs en matrices biológicas, se encuentran la microextracción en fase sólida, la extracción con líquidos presurizados, la extracción en fase sólida, la dispersión en matriz de fase sólida, la extracción por ultrasonido, la extracción asistida por microondas y la microextracción en gota.

1.3.2.1 Extracción con líquidos presurizados (PLE).

La PLE es un proceso de extracción sólido-líquido que se desarrolla en envases cerrados a temperaturas y presiones elevadas. Es similar a la extracción con fluidos supercríticos, pero el CO₂ es reemplazado por solventes orgánicos para mitigar los problemas potenciales de polaridad. La extracción se lleva a cabo bajo presión para mantener los solventes orgánicos convencionales en su estado líquido, pero a temperaturas de extracción muy por arriba de su punto de ebullición, lo que aumenta su poder de solvatación y disminuye su viscosidad aumentando así el coeficiente de difusión del analito (Fidalgo y cols., 2007).

Mezcua y cols. (2007) reportaron el empleo de esta técnica para el análisis de 12 plaguicidas organoclorados y organofosforados en fórmulas lácteas, realizando la etapa de limpieza en línea antes del análisis por GC-MS/MS. Estos autores reportaron que el método desarrollado permitió la identificación y cuantificación exacta de cada uno de

los analitos, mientras que el empleo de alúmina en el paso de limpieza del extracto y la optimización de la temperatura de desorción durante la inyección al cromatógrafo de gases permitieron la eliminación de las interferencias típicas causadas por la coextracción de lípidos presentes en la muestra.

1.3.2.2 Extracción en Fase Sólida (SPE).

La SPE es una técnica que se lleva a cabo pasando una disolución que contenga el o los analitos sobre una fase sólida que los adsorbe específicamente. Después de la adsorción, los analitos se eluyen con una pequeña cantidad de disolvente con el que interaccionan más fuertemente que con la fase sólida. (Rubinson, 2001). Algunas ventajas de la SPE sobre las extracciones convencionales y limpieza son: mayor reproducibilidad, elimina el uso de grandes cantidades de solventes, rapidez, versatilidad, costos menores, posibilidad de automatización y obtención de extractos libres de interferencias (Yagüe y cols., 2002).

Esta técnica de preparación de muestras se utiliza en los métodos oficiales descritos anteriormente, el método 970.52 de la AOAC y el IDF 75C. Como ejemplo de la aplicación de esta técnica, Schenck y cols. (2000) desarrollaron un método de SPE para la extracción y análisis por GC de OCPs no polares y plaguicidas organofosforados (OPPs) polares a partir de huevos, el cual consiste en una extracción con acetonitrilo, seguido por una limpieza mediante SPE, utilizando columnas de aminopropil y carbón

activado para eliminar interferencias de color y para los OCPs columnas de Florisil. Los porcentajes de recuperación con esta técnica, para los OCPs estudiados, se encontraron entre 86-108%.

1.3.2.3 Extracción por dispersión en matriz de fase sólida (MSPD).

La MSPD es una técnica de extracción en fase sólida que elimina la necesidad de la homogenización de la muestra y la remoción de remanentes de matriz, antes de la aplicación en la columna. En la MSPD la muestra se mezcla con un adsorbente hasta la obtención de una masa homogénea que se empaca en una columna, a partir de la cual eluirán los analitos de interés utilizando un solvente orgánico apropiado, mientras los componentes no deseados son retenidos en la columna (Fidalgo y cols., 2007).

Es una técnica simple, requiere pequeñas cantidades de muestra, tiene un tiempo de extracción corto, utiliza una menor cantidad de solventes orgánicos que los métodos convencionales, no requiere preparación ni mantenimiento de equipo y ofrece la posibilidad del desarrollo de extracción y limpieza simultáneamente; sin embargo son procedimientos laboriosos y algunas aplicaciones siguen requiriendo grandes volúmenes de solventes (Fidalgo y cols., 2007).

En el 2001, Yagüe y cols. desarrollaron un método analítico para la determinación de 22 plaguicidas organoclorados y 6 bifenilos policlorados en leche entera líquida utilizando MSPD-GC-ECD, sin embargo no obtuvieron resultados satisfactorios para 3 de los 22 OCPs ya que presentaban retención excesiva en la columna de alúmina.

1.3.2.4 Extracción asistida por microondas (MAE).

La MAE es una extracción sólido-líquido que utiliza radiación de microondas (0,3 a 300 GHz) como fuente de calor para acelerar el proceso de extracción de los analitos de interés. La generación de calor en la muestra por la aplicación de microondas requiere la presencia de un compuesto dieléctrico. El efecto de la energía de microondas es fuertemente dependiente de la naturaleza del solvente y de la matriz sólida. Usualmente el solvente posee una constante dieléctrica alta, además debe disolver selectiva y eficientemente a los analitos blanco y debe absorber las microondas sin conducir a un calentamiento fuerte. Otros parámetros importantes en esta técnica son la temperatura y el tiempo de extracción, la potencia aplicada y el contenido de agua de la muestra (Fidalgo y cols., 2007).

Se han reportado diversos estudios del acoplamiento de la extracción asistida por microondas con la SPME en modalidad *headspace* (HS-SPME), por ejemplo, en el análisis de 16 OCPs en muestras de agua se demostró que es un procedimiento de pretratamiento muy simple y rápido comparado con el procedimiento convencional (Li y cols., 2003).

También se ha empleado para el análisis de 11 plaguicidas clorados en suelos, logrando un eficiente enriquecimiento y limpieza del extracto, así como buena selectividad, sensibilidad y rapidez, produciendo solo una pequeña cantidad de residuos de solventes orgánicos (Herbert y cols., 2006). Más recientemente, la MAE se ha empleado para el análisis de compuestos orgánicos semivolátiles en muestras acuosas. La comparación del comportamiento del sistema MAE-HS-SPME y el procedimiento de HS-SPME convencional, mostró que la técnica asistida por microondas es viable y además mejora la eficiencia de extracción (Huang y cols., 2007).

1.3.2.5 Extracción por ultrasonido (USE).

Es la extracción sólido-líquido más simple y consiste en sumergir la muestra con un solvente orgánico apropiado y someterlo a ondas de ultrasonido. El proceso se lleva a cabo en un baño ultrasónico; la sonicación involucra el uso de ondas sonoras que tienen una energía de alrededor de 20kHz, que aceleran el transporte de masas y la remoción mecánica de los analitos de la superficie sólida por un mecanismo llamado “cavitación”.

La cavitación es la formación e implosión de burbujas de vacío a través del solvente, creando microambientes con altas presiones y temperaturas que provoca una mayor penetración del solvente en el sólido mejorando la transferencia de masa y llevando así a una mejora en la eficiencia de la extracción de la muestra (Fidalgo y cols., 2007).

Lambropoulou y cols. (2006) acoplaron la microextracción en fase sólida modalidad *headspace* con la extracción por ultrasonido, previa limpieza con ácido sulfúrico al 40% para la determinación de 19 plaguicidas clorados en hígado de aves y observaron que la metodología provee una buena separación cromatográfica de los analitos y satisfactorios porcentajes de recuperación, reduciendo también el ruido de fondo debido a la matriz biológica.

1.3.2.6 Microextracción en gota (SDME).

La SDME es una técnica que surge como resultado de la miniaturización de la extracción líquido-líquido (LLE) por una gran reducción de la relación de solvente-fase acuosa. Es una técnica desarrollada en 1996 por Jeannot y Cantwell y es una alternativa que integra muestreo, extracción, concentración e introducción de la muestra al sistema analítico en un paso. En SDME, la fase extractante es una gota de solvente inmiscible en agua, suspendida dentro de la muestra acuosa en agitación. Es una técnica simple, de bajo costo, rápida, efectiva y virtualmente libre de solventes (Psillakis y cols, 2002). Se basa en la distribución pasiva de los analitos entre el microvolumen de fase orgánica y la fase acuosa (Ye y cols., 2007).

Zhang y cols. (2008) desarrollaron un procedimiento para la extracción de 9 OCPs a partir de muestras vegetales, obteniéndose valores de recuperación entre 63.3 a 100%.

1.3.2.7 Microextracción en Fase Sólida (SPME)

La microextracción en fase sólida es una técnica relativamente nueva que consiste en una pequeña cantidad de fase extractante dispersa sobre un soporte sólido, fue desarrollada por Pawliszyn y dada a conocer a partir de 1990. Una de las configuraciones del sistema de SPME consiste en una pequeña fibra de sílice fundida, normalmente recubierta de una fase polimérica, la cual está instalada sobre un soporte, obteniéndose un sistema semejante a una jeringa modificada (Pitarch, 2001), como se muestra en la Figura I-2.

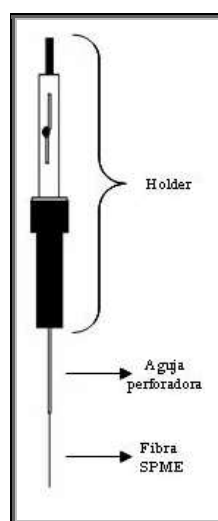


Figura I- 2 Dispositivo de SPME.

El mecanismo de extracción está basado principalmente en la adsorción de los analitos a partir de las soluciones acuosas sobre una fibra de sílice fundida recubierta con un adsorbente polimérico (Hwang, 2000). Esto es, la fibra es expuesta a una muestra por un periodo de tiempo determinado, lo suficientemente largo para que se alcance una condición de equilibrio entre la matriz de la muestra y la fase extractante. Cuando el equilibrio se ha alcanzado, la exposición por un mayor tiempo, no conlleva al aumento de la concentración del analito en la fase extractante (Lord y cols., 2000).

Las modalidades de extracción que se pueden desarrollar con esta técnica son tres: extracción directa (inmersión directa), extracción por *headspace* y por membrana protectora, las cuales se ejemplifican en la figura I-3 (Lord y cols., 2000).

En la inmersión directa, la fibra es introducida dentro de la muestra y los analitos son transportados directamente de la muestra a la fase extractante. Para acelerar la extracción, son requeridos niveles de agitación para transportar los analitos, reduciendo el efecto provocado por la zona de depleción producida alrededor de la fibra (Lord y cols., 2000).

En la modalidad de *headspace* los analitos deben ser transportados a la fase gaseosa antes de que ellos alcancen la fibra. Esta modificación sirve principalmente para proteger la fibra de daños causados por compuestos de alto peso molecular, para eliminar interferencias no volátiles presentes en la muestra y también permite la

modificación de la matriz, por ejemplo, el cambio de pH. La extracción consiste en que la jeringa modificada puesta sobre el vial de la muestra perfora la septa, después la fibra es expuesta en la fase gaseosa existente sobre la muestra por un periodo de tiempo predeterminado para establecer el equilibrio entre la fibra, el *headspace* y la muestra (Lord y cols., 2000).

Por último, en la modalidad de membrana protectora, se realiza una extracción indirecta, siendo el principal propósito de la membrana el proteger a la fibra contra daños cuando se analizan muestras muy sucias. Las ventajas que posee sobre la modalidad de *headspace* son: que permite extraer analitos poco volátiles y que el material con el que está elaborada la membrana puede aumentar la selectividad del proceso de extracción. La cinética de extracción es más lenta que en la modalidad de inmersión directa porque los analitos deben difundir primero a través de la membrana antes de alcanzar la fibra (Lord y cols., 2000).

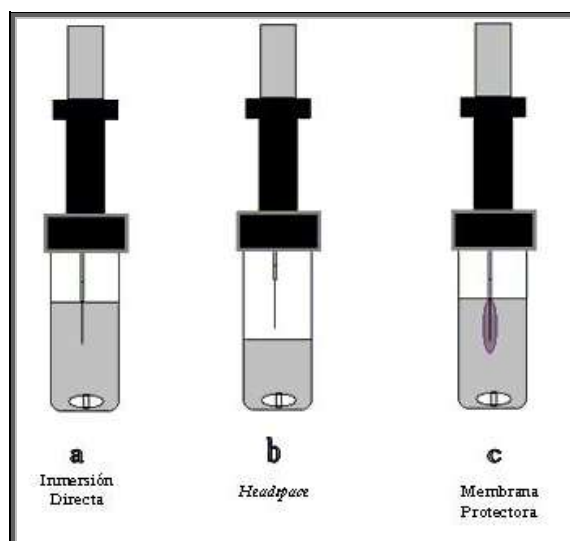


Figura I- 3 Modalidades de extracción en SPME.

Para la selección de la modalidad de extracción se debe considerar las características de la matriz a trabajar, la volatilidad de los analitos de interés y la afinidad de éstos por la matriz. En la Tabla I-5 se resumen las características de las muestras y analitos sugeridas para cada uno de las modalidades de extracción.

Tabla I- 5. Aplicación de las modalidades de SPME☆.

Modalidad SPME	Volatilidad del Analito	Matriz
Inmersión directa	Media a baja	Muestras gaseosas y líquidas simples.
<i>Headspace</i>	Alta a media	Muestras líquidas (simples o complejas) y sólidas.
Membrana protectora	Baja	Muestras complejas.

☆ Pitachr, 2001

En la tabla I-6 se muestran algunas de las aplicaciones de la SPME en su modalidad de inmersión directa y *headspace* para la determinación de algunos plaguicidas organoclorados en diferentes tipos de matrices.

Cabe resaltar que son pocos los trabajos reportados sobre la aplicación de SPME para la determinación de plaguicidas organoclorados en leche. En el Departamento de Química Analítica de la Facultad de Medicina, UANL, se desarrolló un método de GC-HS-SPME para la determinación de 7 OCPs en leche en polvo (Garza Tapia, 2008). Por otro lado, a la fecha no se ha encontrado ningún reporte del empleo de la SPME en la determinación de OCPs en productos lácteos derivados como yogurt o queso, entre otros.

1.3.2.7.1 Optimización de la SPME.

La técnica de SPME involucra los procesos de extracción y desorción de los analitos al sistema analítico. El desarrollo de un método de SPME para la determinación de un analito de interés necesita que ambos procesos garanticen un óptimo comportamiento, por lo que las variables que afectan cada una de estas etapas deben ser establecidas de manera que aseguren la mayor extracción de los analitos.

- Extracción.

Entre las variables más destacadas que afectan la eficiencia de extracción de los analitos se encuentran: el tipo de fibra, el tiempo de extracción, la fuerza iónica de la matriz, el pH, la temperatura de extracción, la cantidad de muestra, la agitación, la adición de modificadores orgánicos, el volumen de *headspace*, así como las características propias de la muestra (Lord y cols., 2000).

- Desorción.

Una vez que el analito se ha extraído, los analitos deben ser desorbidos para el análisis ya sea por HPLC o por GC. En el caso de GC es importante optimizar variables como la temperatura y el tiempo de desorción (Li y cols., 2003).

Tabla I- 6. Aplicación de la SPME al análisis de OCPs en diferentes matrices.

Muestra	Fibra	Modalidad	Condiciones de extracción	Condiciones de desorción	Límite de detección	Referencia
Leche	PDMS/DVB 65 μm	Inmersión directa	30 minutos 100 ° C Agitación	270 ° C 5 min	3×10^{-3} – $1,6 \times 10^{-1}$ $\mu\text{g/L}$ (GC-ECD)	Fernández y cols. 2008
Leche	PDMS/DVB 65 μm	Inmersión directa	55 minutos 25 ° C agitación	250 ° C 5 min	0,01 - 0,30 $\mu\text{g/L}$ (GC-MS)	Gonzalez y cols. 2005
Agua	PDMS/DVB 60 μm	Inmersión directa	60° C 45 min agitación	250 ° C 2 min	5- 32 ng/L (GC-MS)	Beceiro y cols. 2007
Agua	DVB-CAR-PDMS 50/30 μm	Inmersión directa	45 min pH 6 Agitación	260 ° C 3 min	$1,3 \times 10^{-3}$ – $4,5 \times 10^{-1}$ ng/L (GC-ECD)	Raposo y cols. 2007
Agua	PA 85 μm	Inmersión directa	55° C 40 min Agitación	250 ° C 5 min	0,05 – 0,40 ng/mL (GC-MS)	Brondi y cols. 2005
Suero	PDMS 100 μm	Headspace	3mL HS 85°C 50 min pH 3	Inyector 270°C 10 minutos	1 – 51.7 ng/L (GC-ECD)	López y cols. 2007
Sedimentos superficiales	PDMS 100 μm	Headspace	10mL HS 70°C 60 minutos	Inyector 270°C 5 minutos	0.029 – 0.301 ng/g (GC-ECD)	Chang y cols. 2005

1.4 Métodos de determinación y cuantificación de OCPs.

La determinación de los OCPs se lleva a cabo principalmente por cromatografía de gases (GC), aunque existen reportes del análisis por cromatografía de líquidos (LC). La GC representa el método más ampliamente utilizado (Sherma, 2001), empleando columnas capilares, aunque algunos métodos oficiales todavía especifican columnas empacadas. Los sistemas de detección son detectores de captura de electrones (ECD) y espectrómetro de masas (MS). En años recientes la LC ha emergido como una técnica alternativa para la determinación de estos analitos, la mayoría de las determinaciones por LC se realizan sobre un sistema de fase inversa con detectores de UV de longitud de onda fija o variable. En la tabla I-7 se muestran algunos ejemplos de métodos de análisis de OCPs (Blasco y cols., 2003).

1.5 Diseño de experimentos.

El diseño estadístico de experimentos se refiere al proceso realizado para planear el experimento de tal forma que se recaben datos adecuados que puedan analizarse con métodos estadísticos que llevarán a conclusiones válidas y objetivas (Montgomery, 2004). Los métodos del diseño experimental han encontrado una amplia aplicación en diversas disciplinas.

Tabla I- 7. Empleo de los diferentes sistemas de determinación de OCPs.

	Condiciones cromatográficas	LOD	LOQ	Referencia
GC-EDC	Columna VF-5ms, de 30 m x 0,25mm d.i. y un espesor de 0,25 μ m. Gas acarreador: helio a 1mL/ min y Gas auxiliar: nitrógeno a 30 mL/ min Temperatura del inyector 260 $^{\circ}$ C Apertura de la válvula de split: 3 min Programa de temperatura: <p style="text-align: right;">Inicial 80$^{\circ}$C por 4 min 215 $^{\circ}$C a 15$^{\circ}$C/min mantener por 0 min 230$^{\circ}$C a 2$^{\circ}$C/min mantener por 0 min 260$^{\circ}$C a 5$^{\circ}$C/min mantener por 0 min</p> Temperatura del detector: 300 $^{\circ}$ C	1,3x10 ⁻³ – 1x10 ⁻¹ ng/L	4,5 x 10 ⁻³ – 1,5 ng/L	Raposo y cols. 2007
	Columna HP-5, de 30 m x 0,32mm d.i. y un espesor de 0,25 μ m. Gas acarreador y Gas auxiliar: nitrógeno a 9,92 psi Temperatura del inyector 260 $^{\circ}$ C Apertura de la válvula de split: 2 min Programa de temperatura: <p style="text-align: right;">Inicial 60$^{\circ}$C por 2 min 200 $^{\circ}$C a 30$^{\circ}$C/min mantener por 30 s 230$^{\circ}$C a 3$^{\circ}$C/min mantener por 3 min 300$^{\circ}$C a 4$^{\circ}$C/min mantener por 2 min</p> Temperatura del Detector: 300 $^{\circ}$ C	3x10 ⁻³ – 1,6x10 ⁻¹ ng/mL	1,0x10 ⁻² – 2x10 ⁻¹ ng/mL	Fernández y cols. 2008
GC-MS	Columna Croma-5, de 30 m x 0,25mm d.i. y un espesor de 0,33 μ m. Gas acarreador: helio Temperatura del inyector 250 $^{\circ}$ C Apertura de la válvula de split: 2 min Programa de temperatura: <p style="text-align: right;">Inicial 140$^{\circ}$C por 3 min 280 $^{\circ}$C a 6$^{\circ}$C/min mantener por 1 min</p>	5x10 ⁻² – 4x10 ⁻¹ ng/mL	5x10 ⁻² – 4x10 ⁻¹ ng/mL	González y cols. 2002

Tabla I- 7. Empleo de los diferentes sistemas de determinación de OCPs. (Continuación)

	Condiciones cromatográficas	LOD	LOQ	Referencia
GC-MS	Columna VF-5, de 30 m x 0,25mm d.i. y un espesor de 0,25 µm. Gas acarreador: helio a 1 mL/min Temperatura del inyector 250 °C Apertura de la válvula de split: 2 min Programa de temperatura: <div style="text-align: right; margin-left: 200px;"> Inicial 80°C por 2 min 190 °C a 15°C/min mantener por 4 min 230°C a 10°C/min mantener por 5 min 290°C a 10°C/min mantener por 6 min </div> Detector ITS a 180 °C	5- 32 ng/L	15- 97 ng/L	Beceiro y cols. 2007
HPLC-DAD	Columna Microsorb-MV 100-5, 150 x 4,6 mm, diámetro de partícula de 4µm. Fase móvil: metanol:agua 84:16 % Flujo: 1 mL/min. Temperatura de la columna: 30°C Detección a 220 y 238 nm	36- 164 ng/g	NR*	Vega y cols. 2006
	Columna Microsorb-MV C18, 150 x 4,0 mm. Fase móvil: metanol:agua 83:17 % Flujo: 1 mL/min. Temperatura de la columna: 30°C Detección a 220 y 238 nm	0,3 – 3,6 ng/mL	NR*	Torres y cols. 2006

* NR- No reportado

El diseño experimental es una herramienta que tiene importancia fundamental para la identificación de los factores que pueden influir en el resultado de un experimento y para la minimización los efectos de factores no controlados en el sistema (Miller, 2002).

Una vez que se han identificado los diferentes factores e interacciones que afectan el resultado de un experimento, se necesitan diseños experimentales separados para determinar la combinación de los niveles del factor que proporcionarán la respuesta óptima, definiéndose como óptimo una señal de respuesta máxima. Un buen método de optimización posee dos cualidades (Miller, 2002):

1. Produce un conjunto de condiciones experimentales que proporcionan la respuesta máxima o al menos un valor más aproximado al máximo.
2. Llega al óptimo con el número más pequeño posible de etapas experimentales de ensayo.

1.5.1 Diseño Factorial.

El diseño factorial describe los experimentos más adecuados para conocer simultáneamente el efecto que tienen ciertos factores sobre una respuesta y descubrir si interaccionan entre ellos. Estos experimentos están planeados de forma que se varían

simultáneamente varios factores, pero se evita que se cambien siempre en la misma dirección. Al no haber factores correlacionados se evitan experimentos redundantes. Además, los experimentos se complementan de tal modo que la información buscada se obtiene combinando las respuestas de todos ellos. Esto permite obtener la información con el mínimo número de experimentos y con la menor incertidumbre posible. (Montgomery, 2007)

El número de experimentos necesarios viene dado por la fórmula:

$$N = n^k$$

Donde n es el número de niveles y k el número de variables a estudiar.

El diseño 2^k más simple es el de dos factores cada uno con dos niveles, donde el diseño corresponde a cuatro corridas, que se pueden representar gráficamente como un cuadrado, donde cada experimento se representa en los vértices. (Montgomery, 2007)

1.5.1.1 Diseño factorial fraccionado.

Conforme el número de factores se incrementa en un estudio, el número de corridas requeridas para el análisis de los efectos de las variables aumenta rápidamente, por ejemplo un diseño 2^5 requiere 32 corridas. Al analizar este ejemplo, solo 5 grados de libertad corresponden a los efectos principales y 10 grados de libertad corresponden a las

interacciones de dos factores. Si puede suponerse que ciertas interacciones de órdenes superiores son insignificantes, entonces puede utilizarse un diseño factorial fraccionado que incluya menos de las 2^k corridas del conjunto completo a fin de obtener información únicamente sobre los efectos principales y de las interacciones de órdenes inferiores. Este tipo de diseños fraccionados son útiles en los casos en los que se requiere agilizar el procedimiento de optimización y disminuir el gasto de insumos. (Montgomery, 2007)

Tipos de diseño factorial fraccionado.

1. Fracción un medio

Contiene 2^{k-1} corridas. Puede construirse escribiendo las combinaciones de un diseño factorial completo en $k-1$ factores y agregando el k -ésimo factor identificando sus niveles positivo y negativo con los signos positivo y negativo de la interacción de orden superior. Si uno o más factores de una fracción un medio de un diseño 2^k pueden eliminarse, el diseño se proyectará en un diseño factorial completo. Esta propiedad de proyección es de gran utilidad en el tamizado o selección de factores, debido a que permite eliminar los factores insignificantes, dando como resultado un experimento más robusto en los factores activos que quedan. (Montgomery, 2007)

2. Fracciones menores:

Un diseño 2^k puede correrse en una fracción $\frac{1}{2}^p$ llamada diseño factorial fraccionado 2^{k-p} . Por tanto a una fracción $\frac{1}{4}$ se le llama diseño factorial fraccionado 2^{k-2} , una fracción $\frac{1}{8}$ se le llama diseño 2^{k-3} y una fracción $\frac{1}{16}$ se le llama diseño 2^{k-4} . Este tipo de diseño proporcionará casi la misma cantidad de información útil con una economía todavía mayor. Para la construcción de este tipo de diseño se debe seleccionar generadores de diseños, ya que para un dado número de factores y de corridas que deseen realizarse, se deberá seleccionar el generador de tal modo que el diseño tenga la resolución más alta posible. (Montgomery, 2007)

1.5.2 Método Simplex.

La optimización puede lograrse por diferentes metodologías, una de ellas es por el método simplex, el cual permite la optimización simultánea de varios factores y se aplica cuando éstos son variables continuas. (Harvey, 2002)

La representación gráfica de un simplex da una figura geométrica que tiene $k+1$ vértices cuando se trata de optimizar una respuesta respecto a k factores. (Miller, 2002) En la etapa inicial de los experimentos, es recomendable construir un simplex grande para que por sí mismo se mueva rápidamente sobre la superficie de respuesta y pueda localizar la región del óptimo. Para definir más precisamente el óptimo, se construye un

simplex menor y se continúa la optimización. En la definición del primer simplex se deben establecer las variables que estarán sujetas a la optimización. Después, se define el tamaño del paso de cada variable del simplex. Los valores del nuevo experimento de un simplex se localizan por cálculos en lugar de figuras, lo que resulta esencial cuando se trabajan más de 2 variables. Existen algunas variantes del método simplex que son: el simplex secuencial básico y el simplex modificado. A continuación se presentan los pasos a seguir en un simplex secuencial básico, los cuales dependen de los resultados obtenidos al realizar los experimentos que se plantean inicialmente (Harvey, 2002):

1. Ordenar la respuesta de cada vértice del simplex de mejor a peor.
2. Rechazar el peor vértice y sustituirlo por un nuevo vértice generado reflejando el peor vértice a través del punto medio de los vértices restantes. Los niveles de factores para el nuevo vértice será el doble de los niveles medios de factor de los vértices conservados, menos los niveles de factor del peor vértice.
3. Si el nuevo vértice da la peor respuesta, se rechazará el vértice con la segunda peor respuesta y se calculará el nuevo vértice aplicando el paso 2, el cual garantiza que el simplex no regresará al simplex previo.
4. Una forma útil de limitar la gama de posibles niveles de factores son las condiciones límite. Si el nuevo vértice supera la condición límite, se le asignará una respuesta menor que la de todos los demás y se seguirá el paso 2. Los ensayos finalizan cuando los factores retienen sus valores o presentan una tendencia.

1.6 Justificación.

En la actualidad es imperativo el control de calidad de la leche y sus derivados, no solamente en lo que concierne a la verificación rutinaria de tipo fisicoquímico, microbiológico y sensorial, sino también al establecimiento de la ausencia de adulterantes o contaminantes.

La baja polaridad de los plaguicidas organoclorados favorece su bioacumulación en tejido graso y su posterior eliminación por leche, convirtiendo a los productos lácteos en una importante ruta de exposición del hombre a estos plaguicidas.

Los métodos convencionales de análisis de plaguicidas organoclorados en leche y sus derivados involucran procesos de pre-tratamiento largos, costosos y que requieren grandes volúmenes de solventes tóxicos. La Microextracción en Fase Sólida (SPME) es una técnica alternativa que permitirá superar estas desventajas debido a su simplicidad, rapidez y bajo costo.

1.7 Objetivo General.

Desarrollar un procedimiento de microextracción en fase sólida para el análisis de plaguicidas organoclorados presentes en yogurt.

1.8 Objetivos Específicos.

1. Optimizar y validar el método de análisis por GC/MS para OCPs.
2. Seleccionar la fibra más adecuada para la extracción de OCPs en la modalidad de *headspace*.
3. Establecer las condiciones óptimas de extracción y desorción de los OCPs en yogurt.

CAPÍTULO 1.....	1
INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Plaguicidas.....	1
1.2 Plaguicidas organoclorados (OCPs).....	2
1.2.1 Generalidades.....	2
1.2.2 Clasificación.....	3
1.2.3 Características fisicoquímicas.....	4
1.2.4 Persistencia de los Plaguicidas Organoclorados.....	5
1.2.5 Toxicodinamia y Toxicología.....	9
1.2.6 Legislación.....	10
1.2.7 Plaguicidas Organoclorados y Productos lácteos.....	13
1.2.7.1 Antecedentes de la Presencia de OCPs en Productos Lácteos en México.....	15
1.3 Métodos de análisis de OCPs.....	16
1.3.1. Métodos Oficiales.....	16
1.3.2 Métodos emergentes.....	18
1.3.2.1 Extracción con líquidos presurizados (PLE).....	18
1.3.2.2 Extracción en Fase Sólida (SPE).....	19
1.3.2.3 Extracción por dispersión en matriz de fase sólida (MSPD).....	20
1.3.2.4 Extracción asistida por microondas (MAE).....	21
1.3.2.5 Extracción por ultrasonido (USE).....	22
1.3.2.6 Microextracción en gota (SDME).....	23
1.3.2.7 Microextracción en Fase Sólida (SPME).....	24
1.3.2.7.1 Optimización de la SPME.....	28
1.4 Métodos de determinación y cuantificación de OCPs.....	30
1.5 Diseño de experimentos.....	30
1.5.1 Diseño Factorial.....	33
1.5.1.1 Diseño factorial fraccionado.....	34
1.5.2 Método Simplex.....	36
1.6 Justificación.....	38
1.7 Objetivo General.....	39
1.8 Objetivos Específicos.....	39

FIGURA I- 1. ESTRUCTURA DE ALGUNOS PLAGUICIDAS ORGANOCORADOS.....	4
FIGURA I- 2 DISPOSITIVO DE SPME.....	24
FIGURA I- 3 MODALIDADES DE EXTRACCIÓN EN SPME.....	26

TABLA I- 1. ESTRUCTURA Y PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE LOS OCPs ESTUDIADOS EN ESTE TRABAJO.....	6
TABLA I- 2. PERSISTENCIA EN SUELO DE ALGUNOS OCPs.....	8
TABLA I- 3. COMPUESTOS ORGÁNICOS PERSISTENTES LISTADOS EN EL ANEXO DEL CONVENIO DE ESTOCOLMO.....	11
TABLA I- 4. LÍMITES MÁXIMOS DE RESIDUOS DE OCPs EN LECHE Y PRODUCTOS LÁCTEOS.....	14

TABLA I- 5. APLICACIÓN DE LAS MODALIDADES DE SPME ☆.	27
TABLA I- 6. APLICACIÓN DE LA SPME AL ANÁLISIS DE OCPS EN DIFERENTES MATRICES.	29
TABLA I- 7. EMPLEO DE LOS DIFERENTES SISTEMAS DE DETERMINACIÓN DE OCPS.	31

CAPÍTULO II

MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Material, Equipos y Reactivos.

2.1.1 Material

- ♦ Barras magnéticas.
- ♦ Columna cromatográfica ZB-5, 0,32 mm diametro interno x 30 m, 0,25 μm de espesor de fase, Phenomenex.
- ♦ Cristalizadores.
- ♦ Cronómetro.
- ♦ Espátulas.
- ♦ Fibras para SPME: Polidimetilsiloxano (PDMS) 100 μm , Divinilbenceno-Polidimetilsiloxano (DVB-PDMS) de 65 μm y Divinilbenceno-Carboxen-Polidimetilsiloxano (DVB-CAR-PDMS) 50-30 μm , Supelco.
- ♦ Portafibras, Supelco.
- ♦ Jeringas de 10, 25, 50 y 500 μL .

- ♦ Material volumétrico.
- ♦ Pinzas de tres dedos.
- ♦ Pinzas para soporte.
- ♦ Pinzas para termómetro.
- ♦ Soporte universal.
- ♦ Termómetro de -20 a 150°C.
- ♦ Vaso de Precipitados.
- ♦ Viales de vidrio de 2 mL con tapón de rosca y septa de PTFE y silicón.
- ♦ Viales de vidrio de 15 mL con tapón de rosca y septa de PTFE y silicón.
- ♦ Viales de vidrio ámbar de 40 mL con tapón de rosca y septa de PTFE y silicón.

2.1.2 Equipos.

- ♦ Agitador, Heidolph Instruments, Unimax 1010.
- ♦ Balanza semianalítica, AND, GX200.
- ♦ Baño con temperatura controlada, Haake C1.
- ♦ Cromatógrafo de gases, Agilent 6890N equipado con inyector split/splitless y detector selectivo de masas 5973 inert.
- ♦ Cromatógrafo de gases, Perkin Elmer Autosystem XL con inyector splits/splitless y detector de ionización de flama.
- ♦ Placa de calentamiento y agitación, Barnstead Thermolyne, Cimarec 2.
- ♦ Baño de ultrasonido, Branson, 3510.

2.1.3 Reactivos

- ♦ Acetonitrilo LiChrosolv, 99,8%, Merck.
- ♦ Agua Bidestilada Plus, Laboratorio Monterrey.
- ♦ Cloruro de sodio 99,5%, Sigma.
- ♦ Mezcla de 16 plaguicidas organoclorados 2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en Tolueno: Hexano (50:50), Ultra Scientific, Analytical Solutions:

Aldrín	Dieldrín
α -HCH	Endosulfán I
β -HCH	Endosulfán II
δ -HCH	Endosulfán Sulfato
γ -HCH	Endrín
p,p'-DDD	Endrín aldehído
p,p'-DDE	Heptacloro
p,p'-DDT	Heptacloro epóxido

- ♦ Pentacloronitrobenceno 5000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en metanol, Supelco.
- ♦ Acetona, R.A., CTR.
- ♦ Acetona, grado HPLC, 99,9%, Burdick & Jackson.
- ♦ Acetona Suprasolv, para análisis orgánico de trazas, Merck.

2.2 Preparación de soluciones.

2.2.1 Preparación de soluciones de estándares.

A partir de la solución estándar de los 16 analitos (2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$), se preparó una solución stock a una concentración de 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, en acetonitrilo.

Además se preparó una solución stock de pentacloronitrobenceno (PCNB) a una concentración de 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, por dilución del estándar concentrado (5000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) utilizando acetonitrilo.

Para la optimización del método de GC-MS, a partir de las soluciones stock de la mezcla de los 16 analitos y de pentacloronitrobenceno, se preparó una solución de estándares con una concentración final de 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en acetonitrilo.

La curva de calibración utilizada para la validación del método de GC-MS, constituida por cinco niveles de concentración en un rango de 0,4 a 1,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de OCPs y 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de pentacloronitrobenceno, se preparó a partir de las soluciones stock.

Todas las soluciones se almacenaron a 4 °C en viales de vidrio de 2 mL con tapón de rosca y septa de PTFE y silicón.

2.2.2 Preparación de soluciones de trabajo.

Para la preparación de las soluciones de trabajo empleadas en la selección de la fibra, se diluyó la solución estándar de los 16 analitos de 2000 $\mu\text{g/mL}$ a una concentración de 10 $\mu\text{g/mL}$ con acetonitrilo al 10% en agua. Las soluciones se almacenaron en frascos con tapón esmerilado a 4 °C. Antes de emplear las soluciones, se permitió que alcanzaran la temperatura ambiente y se mezclaron por sonicación por 10 minutos.

2.3 Muestra seleccionada.

Como matriz modelo se seleccionó yogurt natural sólido Yoplait® con un contenido de grasa del 2,0%. El yogurt se adquirió en supermercados y se mantuvo en refrigeración hasta su utilización. Una vez abierto, cada envase se utilizó por un máximo de 5 días manteniéndolo siempre en refrigeración.

2.4 Cromatografía de gases-masas (GC-MS).

2.4.1 Optimización de las condiciones de separación cromatográfica.

Para establecer las condiciones óptimas para la separación cromatográfica de los 16 OCPs y el PCNB incluidos en este trabajo, se analizó por inyección directa 1 μL de una solución estándar de 0,5 $\mu\text{g/mL}$ en el cromatógrafo de gases-masas utilizando una columna cromatográfica ZB-5 (0,32 mm d.i. x 30 m, 0,25 μm de espesor, Phenomenex).

El programa inicial de temperatura se muestra en la Tabla II-1 y fue establecido en la tesis de licenciatura de Padilla Alonso (2006), este programa se modificó hasta obtener una separación satisfactoria de los 17 compuestos. El espectrómetro de masas se operó en modalidad de impacto electrónico y las condiciones utilizadas se muestran en la tabla II-2.

Tabla II- 1. Programa inicial para el análisis de OCPs por GC-MS.

Gas acarreador	Helio
Flujo	2.5 mL/ min
Temperatura del inyector	250° C
<u>Programa de temperaturas:</u>	
Inicial.	45 °C /1 min
Rampa 1.	25 °C/min hasta 150° C y mantener 1 minuto
Rampa 2.	3 °C/min hasta 200° C y mantener 2 minutos
Rampa 3.	3 °C/min hasta 250° C y mantener 2 minutos

Tabla II- 2. Condiciones de operación utilizadas para el espectrómetro de masas.

Temperatura de la interfase	280 °C
Temperatura del analizador	150 °C
Temperatura de la fuente	230 °C
Adquisición	Barrido completo (50-600 m/z)
Velocidad de barrido	2,69 barridos/s

2.4.1.1 Confirmación de la identidad de los analitos.

Para la identificación de cada uno de los 17 compuestos, una vez obtenido el cromatograma se analizaron los espectros de masas correspondientes a cada pico cromatográfico y se identificaron mediante la comparación con los espectros de masas de la base de datos NIST (D.04.00, octubre 2002), además, se seleccionaron los iones característicos mostrados en la Tabla II-3.

2.4.1.2 Establecimiento de parámetros de adquisición de datos.

Con la finalidad de mejorar la sensibilidad y selectividad del método, una vez establecido el programa de temperaturas óptimo para la separación cromatográfica, se cambió la modalidad de adquisición de datos de barrido completo (SCAN) a monitoreo selectivo de iones (SIM). Para ello, se establecieron ventanas de adquisición de datos en las que se monitorearon los iones principales de cada uno de los analitos mostrados en la tabla II-2. El establecimiento de estas ventanas se realizó en función de los tiempos de retención de los analitos.

Tabla II- 3. Iones característicos de los analitos (CFR Part 136 Fed. Regist, 2009; González-Rodríguez, 2005).

Analito	Ion primario (m/z)	Iones secundarios (m/z)	
Aldrín	263	66	220
α-HCH	181	183	109
β-HCH	181	183	109
δ-HCH	183	109	181
γ-HCH	181	183	109
p,p'-DDD	235	237	165
p,p'-DDE	246	248	176
p,p'-DDT	235	237	165
Dieldrín	263	79	279
Endosulfán I	237	339	341
Endosulfán II	339	237	341
Endosulfán Sulfato	272	387	422
Endrín	263	81	82
Endrín aldehído	67	345	250
Heptacloro	100	272	274
Heptacloro epóxido	353	355	351
PCNB	265	237	235

2.4.2 Validación del sistema.

Para asegurar el comportamiento adecuado del procedimiento cromatográfico desarrollado para el análisis de los OCPs de interés, se evaluaron la linealidad, precisión, límite de detección y límite de cuantificación del sistema (ICH, 1996).

2.4.2.1 Linealidad.

Se construyó una curva de calibración a 5 niveles de concentración en un intervalo de concentración de 0,4 a 1,5 µg/mL por triplicado. Con los datos obtenidos se realizó un análisis de regresión lineal.

La aceptación de la linealidad se basó en la observación visual de la curva construida así como en un valor superior a 0,99 del coeficiente de correlación (r).

2.4.2.2 Precisión.

La precisión del sistema cromatográfico se evaluó mediante el cálculo de la desviación estándar relativa (% DER) de los factores de respuesta de los estándares analizados para la curva de calibración.

El criterio de aceptación fue una % DER menor al 20 %.

2.4.2.3 Límite de Detección

El límite de detección para cada analito se calculó en función de la relación señal-ruido, empleando la ecuación:

$$\text{Límite de detección} = 3 \frac{S}{N}$$

Donde tenemos que:

S es la señal del analito

N es la señal del ruido de fondo

2.4.2.4 Límite de Cuantificación.

El límite de cuantificación para cada analito se calculó en función de la relación señal-ruido, empleando la ecuación:

$$\text{Límite de cuantificación} = 10 \frac{S}{N}$$

Donde:

S es la señal del analito

N es la señal del ruido de fondo

2.5 Microextracción en Fase Sólida.

Con el fin de establecer las mejores condiciones de extracción y desorción de los OCPs, de la matriz de interés a la fibra y de la fibra al sistema analítico respectivamente, se estudiaron las variables que de acuerdo a la bibliografía pueden tener influencia sobre el comportamiento del sistema. Durante el desarrollo de éstas etapas se utilizó el GC-FID y el programa de temperatura mostrado en la Tabla II-4.

La optimización se realizó en tres etapas: la selección de fibra para SPME, la optimización de la desorción y por último, la optimización de la extracción.

Antes de comenzar con los experimentos de optimización de la SPME, se acondicionaron las fibras según las recomendaciones del proveedor, las cuales fueron:

- a) 250 °C por 30 minutos para la fibra de DVB-PDMS de 65 μm .
- b) 270 °C por 60 minutos para la fibra de DVB-CAR-PDMS 50-30 μm .
- c) 250 °C por 30 minutos para la fibra de PDMS de 100 μm .

Las extracciones se realizaron en modalidad *headspace* y con agitación magnética a alta velocidad. El dispositivo de extracción se montó de acuerdo al diagrama que se muestra en la Figura II-1, el cual consistió en un baño de agua colocado sobre una placa de calentamiento y agitación con temperatura regulada. Se introdujo una barra magnética al vial para mantener la muestra en agitación constante, posteriormente éste se sumergió completamente en posición vertical en el baño de temperatura y transcurrido el tiempo de equilibrio, se perforó la septa con el portafibras de SPME, se fijó en la posición adecuada, para finalmente exponer la fibra y proceder a la extracción por el tiempo establecido. Al término del tiempo de extracción, la fibra se extrajo y se introdujo en el inyector para el análisis por GC.

Tabla II- 4. Condiciones de GC-FID.

Gas acarreador	Helio
Flujo	2.5 mL/min
<u>Programa de temperaturas:</u>	
Inicial.	45 °C /1 min
Rampa 1.	25 °C/min hasta 150 °C y mantener 15 minutos
Rampa 2.	3 °C/min hasta 180 °C y mantener 8 minutos
Rampa 3.	10 °C/min hasta 270 °C y mantener 10 minutos
Temperatura del Detector	300 °C

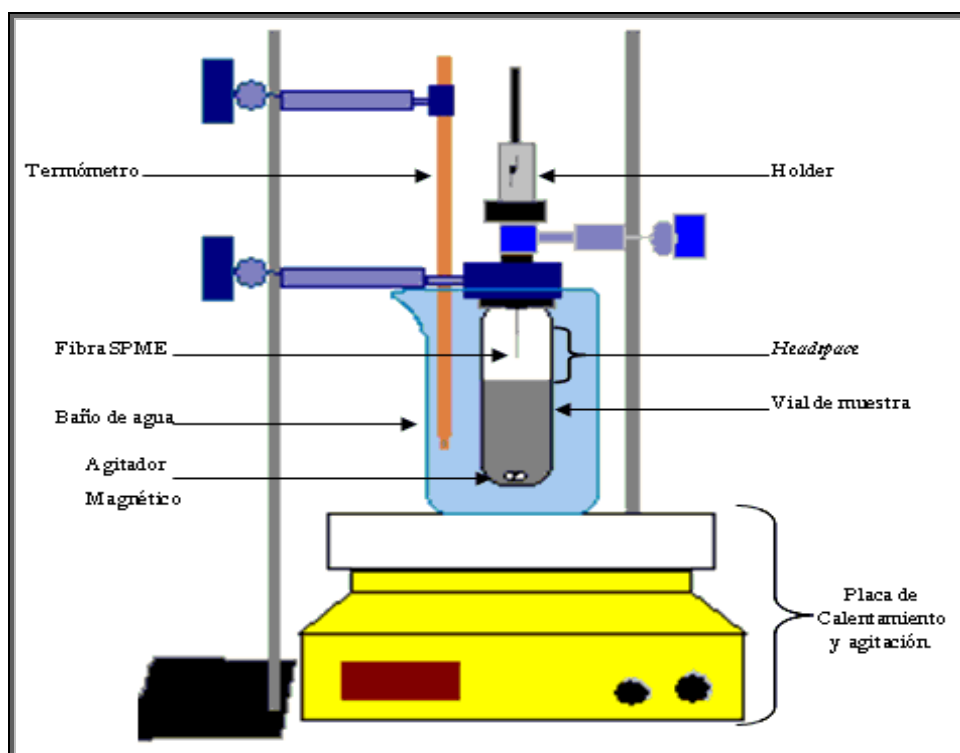


Figura II- 1. Montaje del Dispositivo de Extracción por HS-SPME

2.5.1 Selección de la fibra para SPME.

Para la selección de la fibra más adecuada en la extracción de los OCPs de interés, se estudió el comportamiento de las fibras de DVB-PDMS de 65 μ m, DVB-CAR-PDMS 50-30 μ m y PDMS de 100 μ m. Se realizaron extracciones por triplicado, a partir de una solución de estándares a una concentración de 10 μ g/mL. Las condiciones de extracción utilizadas fueron las indicadas en la Tabla II-5.

Tabla II- 5. Condiciones de trabajo empleadas para la selección de fibra de SPME.

Extracción	Tiempo de Equilibrio	20 minutos
	Tiempo de Extracción	60 minutos
	Temperatura de Extracción	70 °C
	Adición de NaCl	0%
	Adición de ACN	0%
	Volumen de <i>Headspace</i>	5 mL
Desorción	Temperatura del inyector	228 °C
	Apertura de la válvula de split	A los 5,4 minutos

Transcurrido el tiempo de extracción, se analizó por GC-FID. La fibra de SPME se dejó en el inyector a 250 °C por 20 minutos como paso de limpieza, preparando así la fibra para la siguiente extracción.

La selección de la fibra más adecuada se realizó comparando las áreas obtenidas y el % DER observada de cada analito con las fibras analizadas. Se seleccionó la fibra que mostró los valores menores de % DER y que no presentó analitos remanentes después de la limpieza.

2.5.2 Optimización de la Desorción.

Debido a que la fibra seleccionada fue la de PDMS de 100 μm , la etapa de desorción no se optimizó y las condiciones utilizadas fueron las establecidas por Padilla Alonso (2006), que se muestran en la tabla II-6.

Tabla II- 6. Condiciones de desorción para OCPs.

Temperatura del inyector	250 °C
Apertura de la válvula de split	3 minutos

2.5.3 Optimización de la Extracción.

Para la optimización de la extracción de los OCPs se realizó el estudio de siete variables que afectan la eficiencia de extracción de los analitos: cantidad de muestra, volumen de *headspace*, temperatura de extracción, tiempo de equilibrio, tiempo de extracción, contenido de cloruro de sodio y contenido de acetonitrilo. Esta etapa se realizó con muestra de yogurt adicionada con OCPs a un nivel de 50 $\mu\text{g/g}$. Las condiciones de desorción utilizadas fueron las que se muestran en la tabla II-6.

Con la finalidad de seleccionar las variables que tienen mayor influencia sobre este sistema de extracción, se realizó un diseño de experimentos factorial fraccionado a dos niveles, aleatorizado. Los experimentos realizados se muestran en la tabla II-7.

Para el planteamiento y análisis del diseño de experimentos se utilizó el programa STATISTICA 5.1, edición 97. Para el análisis de los resultados se calculó el coeficiente de deseabilidad, es decir para cada analito se normalizaron las respuestas obtenidas asignando un valor de deseabilidad de 0,0 para la respuesta más baja y de 1,0 al resultado más alto, y se calculó un valor integral para cada experimento.

Tabla II- 7. Experimentos propuestos para el diseño factorial fraccionado ($2^{(k-4)}$)

Exp.	Temperatura de extracción (°C)	Tiempo de extracción (min)	Tiempo de equilibrio (min)	Cantidad de muestra (g)	Volumen de <i>headspace</i> (mL)	ACN (%)	NaCl (%)
4	80	60	10	4	10	1	1
5	60	30	30	4	10	1	10
8	80	60	30	4	20	10	10
1	60	30	10	4	20	10	1
2	80	30	10	1	10	10	10
7	60	60	30	1	10	10	1
3	60	60	10	1	20	1	10
6	80	30	30	1	20	1	1

Con los resultados obtenidos, se seleccionaron las variables que tienen una mayor influencia en la eficiencia de la extracción de los 16 OCPs. Las condiciones óptimas para dichas variables se establecieron utilizando un diseño de experimentos simplex modificado utilizando el software Multisimplex v. 2.1.3, 2001, Grabitech Solutions.

Para la optimización mediante el método simplex, no se adicionó cloruro de sodio y se mantuvieron fijos el tiempo de equilibrio en 20 minutos y el tiempo de extracción en 60 minutos, mientras que las condiciones de desorción fueron las que se muestran en la tabla II-6. Los experimentos iniciales se presentan en la tabla II-8.

Tabla II- 8. Experimentos iniciales propuestos para la optimización de la extracción.

Experimento	ACN (%)	Cantidad de muestra (g)	Temperatura (°C)	Volumen de <i>headspace</i> (mL)
1	8	3	75	13
2	3	3	65	13
3	8	3	65	18
4	8	2	65	13
5	3	2	75	18

En base a los resultados obtenidos, se plantearon nuevos experimentos, pero se realizaron sólo aquellos que estuvieron dentro de las condiciones que aseguraron un adecuado comportamiento del sistema y que se muestran en la tabla II-9. Una vez que las variables retuvieron su valor o presentaron una tendencia, se finalizaron los experimentos.

Tabla II- 9. Valores límites de análisis.

VARIABLES	LÍMITES:
Adición de ACN	0 - 10 %
Cantidad de muestra	1 - 4 g
Temperatura de extracción	60 – 83 °C
Volumen de <i>headspace</i>	10 a 22 mL

Debido a que se esperan niveles bajos de los OCPs en las muestras de yogurt, se evaluó la posibilidad de incrementar la cantidad de muestra y de esta manera, aumentar la probabilidad de que estos analitos sean detectados y cuantificados en muestras reales. Con esta finalidad, se comparó la respuesta obtenida extrayendo 3 y 4 gramos de yogurt adicionado con una cantidad fija de 50 μg de OCPs y las condiciones de extracción establecidas en la tabla III-10.

Además, considerando el número de muestras a analizar durante un día de trabajo, se analizó la posibilidad de disminuir el tiempo de extracción de las muestras, para lo cual, se compararon las respuestas obtenidas al extraer 3 gramos de yogurt adicionado con una cantidad total de 50 μg de OCPs, utilizando las condiciones establecidas en la tabla III-10 y probando tiempos de extracción de 45 y 60 minutos de extracción.

Los resultados de estos experimentos se compararon usando la prueba t con un nivel de confianza del 95%; el procedimiento realizado se muestra en el p A.

2.6 Sensibilidad del método de análisis de OCPs.

Para asegurar la aplicabilidad del método desarrollado al análisis de los OCPs de interés en yogurt, se evaluaron los límites de detección y cuantificación del método.

2.6.1 Límite de Detección

El límite de detección para cada analito se calculó en función de la relación señal-ruido, empleando la ecuación:

$$\text{Límite de detección} = 3 \frac{S}{N}$$

Donde tenemos que:

S es la señal del analito

N es la señal del ruido de fondo

2.6.2 Límite de Cuantificación.

El límite de cuantificación para cada analito se calculó en función de la relación señal-ruido, empleando la ecuación:

$$\text{Límite de cuantificación} = 10 \frac{S}{N}$$

Donde:

S es la señal del analito

N es la señal del ruido de fondo

CAPÍTULO 2	40
MATERIALES Y MÉTODOS	40
2.1 Material, Equipos y Reactivos.	40
2.1.1 Material	40
2.1.2 Equipos.	41
2.1.3 Reactivos	42
2.2 Preparación de soluciones.	43
2.2.1 Preparación de soluciones de estándares.	43
2.2.2 Preparación de soluciones de trabajo.	44
2.3 Muestra seleccionada.	44
2.4 Cromatografía de gases-masas (GC-MS).	45
2.4.1 Optimización de las condiciones de separación cromatográfica.	45
2.4.1.1 Confirmación de la identidad de los analitos.	46
2.4.1.2 Establecimiento de parámetros de adquisición de datos.	46
2.4.2 Validación del sistema.	47
2.4.2.1 Linealidad.	48
2.4.2.2 Precisión.	48
2.4.2.3 Límite de Detección	48
2.4.2.4 Límite de Cuantificación.	49
2.5 Microextracción en Fase Sólida.	49
2.5.1 Selección de la fibra para SPME.	52
2.5.2 Optimización de la Desorción.	53
2.5.3 Optimización de la Extracción.	53
2.6 Sensibilidad del método de análisis de OCPS.	56
2.6.1 Límite de Detección	57
2.6.2 Límite de Cuantificación.	57
FIGURA II- 1. MONTAJE DEL DISPOSITIVO DE EXTRACCIÓN POR HS-SPME	51
TABLA II- 1. PROGRAMA INICIAL PARA EL ANÁLISIS DE OCPS POR GC-MS.	45
TABLA II- 2. CONDICIONES DE OPERACIÓN UTILIZADAS PARA EL ESPECTRÓMETRO DE MASAS.	46
TABLA II- 3. IONES CARACTERÍSTICOS DE LOS ANALITOS (CFR PART 136 FED. REGIST, 2009; GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ, 2005).	47
TABLA II- 4. CONDICIONES DE GC-FID.	51
TABLA II- 5. CONDICIONES DE TRABAJO EMPLEADAS PARA LA SELECCIÓN DE FIBRA DE SPME.	52
TABLA II- 6. CONDICIONES DE DESORCIÓN PARA OCPS.	53
TABLA II- 7. EXPERIMENTOS PROPUESTOS PARA EL DISEÑO FACTORIAL FRACCIONADO ($2^{(K-4)}$).	54
TABLA II- 8. EXPERIMENTOS INICIALES PROPUESTOS PARA LA OPTIMIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN.	55
TABLA II- 9. VALORES LÍMITES DE ANÁLISIS.	55

CAPÍTULO III

RESULTADOS

3.1 Cromatografía de Gases-Masas (GC-MS).

3.1.1 Optimización de las condiciones de separación cromatográfica.

Para la separación cromatográfica se evaluaron diferentes programas de temperatura, a partir del programa inicial, modificando y agregando gradientes de temperatura con el fin de obtener una separación adecuada de los 16 analitos y el estándar interno. En las Figuras III-1 a III-6 se presentan los cromatogramas obtenidos con los diferentes programas de temperatura probados. En la tabla II-1 se muestra la resolución obtenida en cada caso entre los picos cromatográficos de los analitos p,p'-DDD y endrín aldehído.

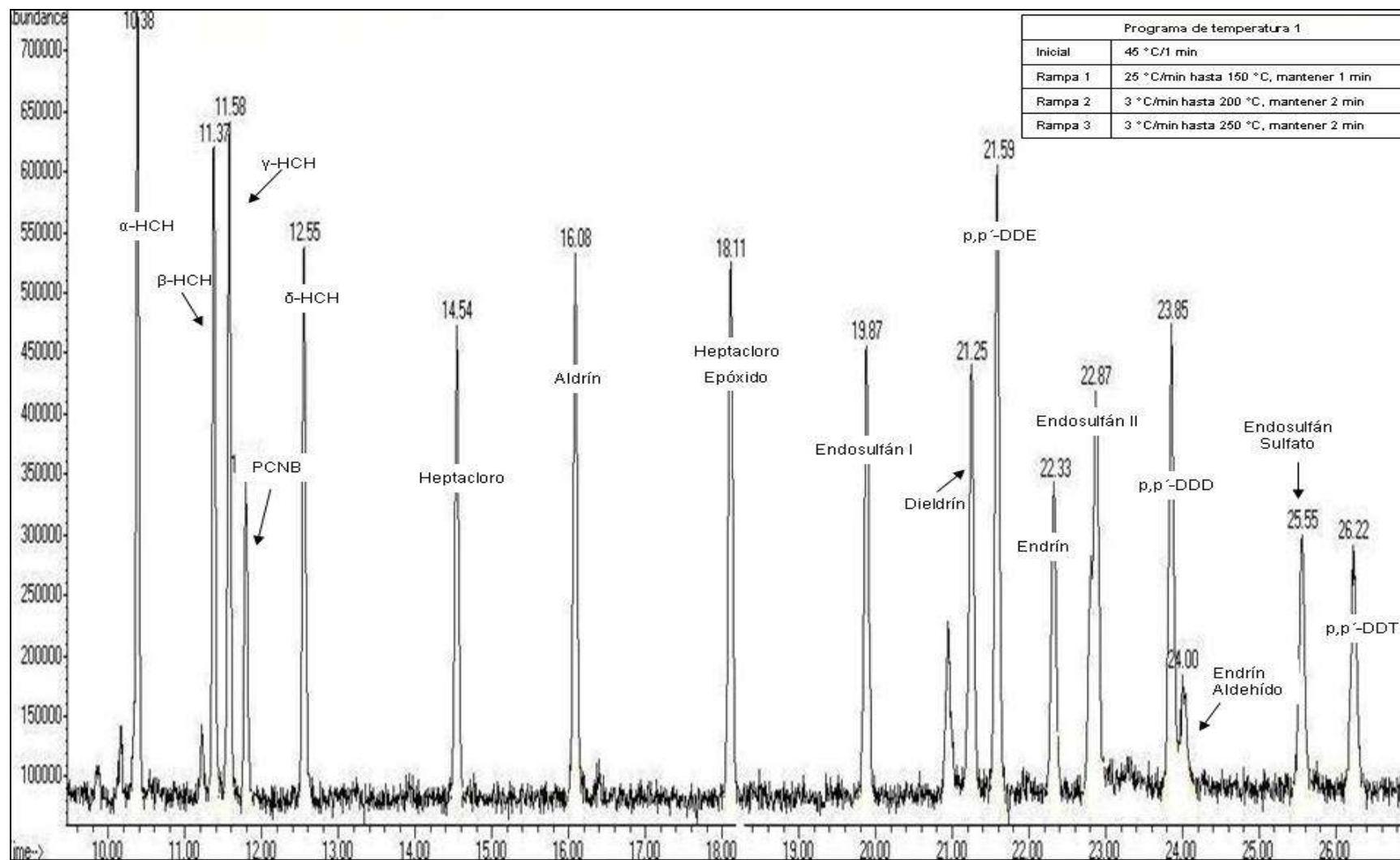


Figura III- 1. Cromatograma obtenido con el programa de temperatura 1. Solución estándar a 0,5 $\mu\text{g/mL}$.

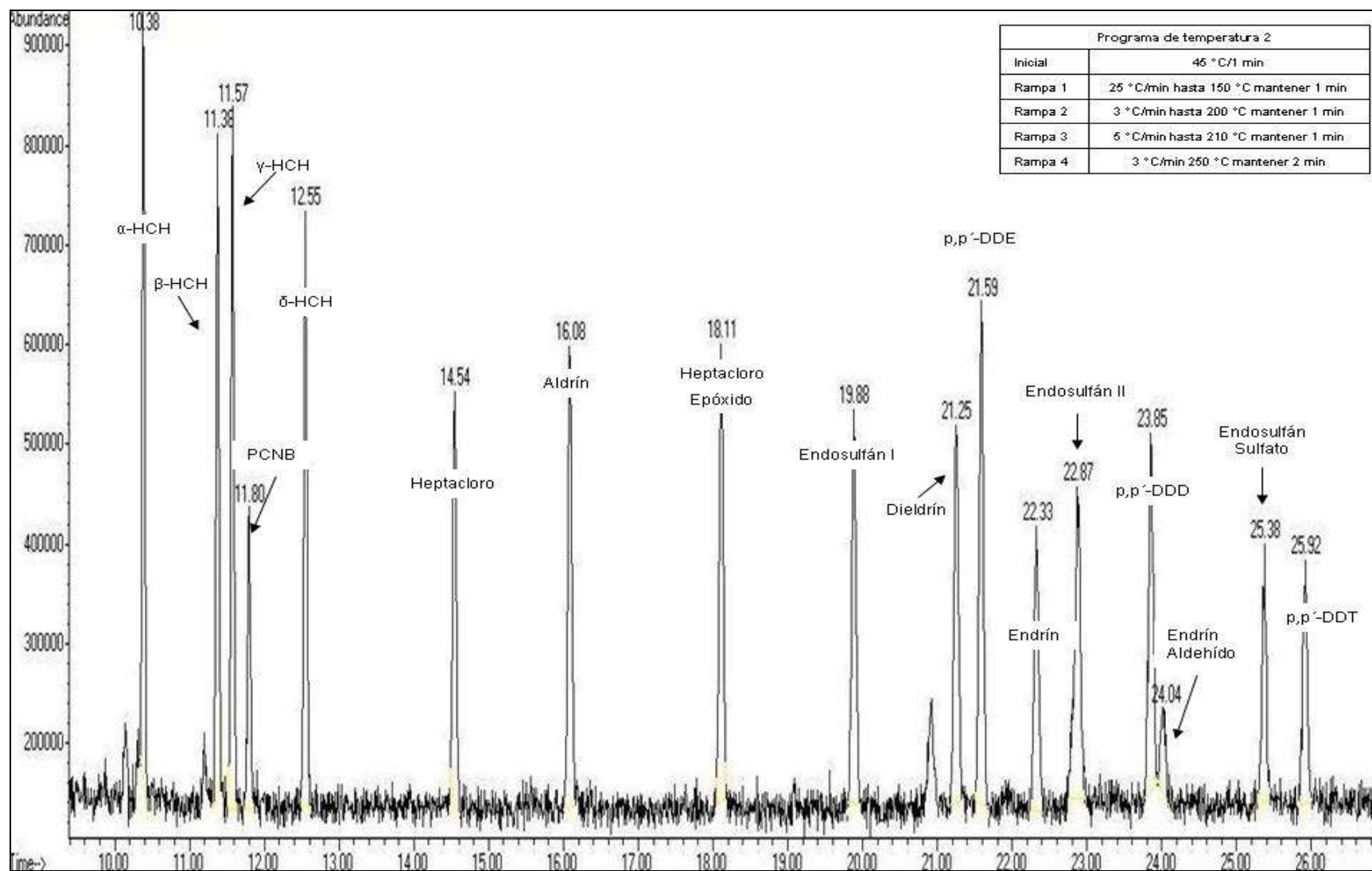


Figura III- 2. Cromatograma obtenido con el programa de temperatura 2 de temperaturas. Solución estándar a 0,5 μ g/mL.

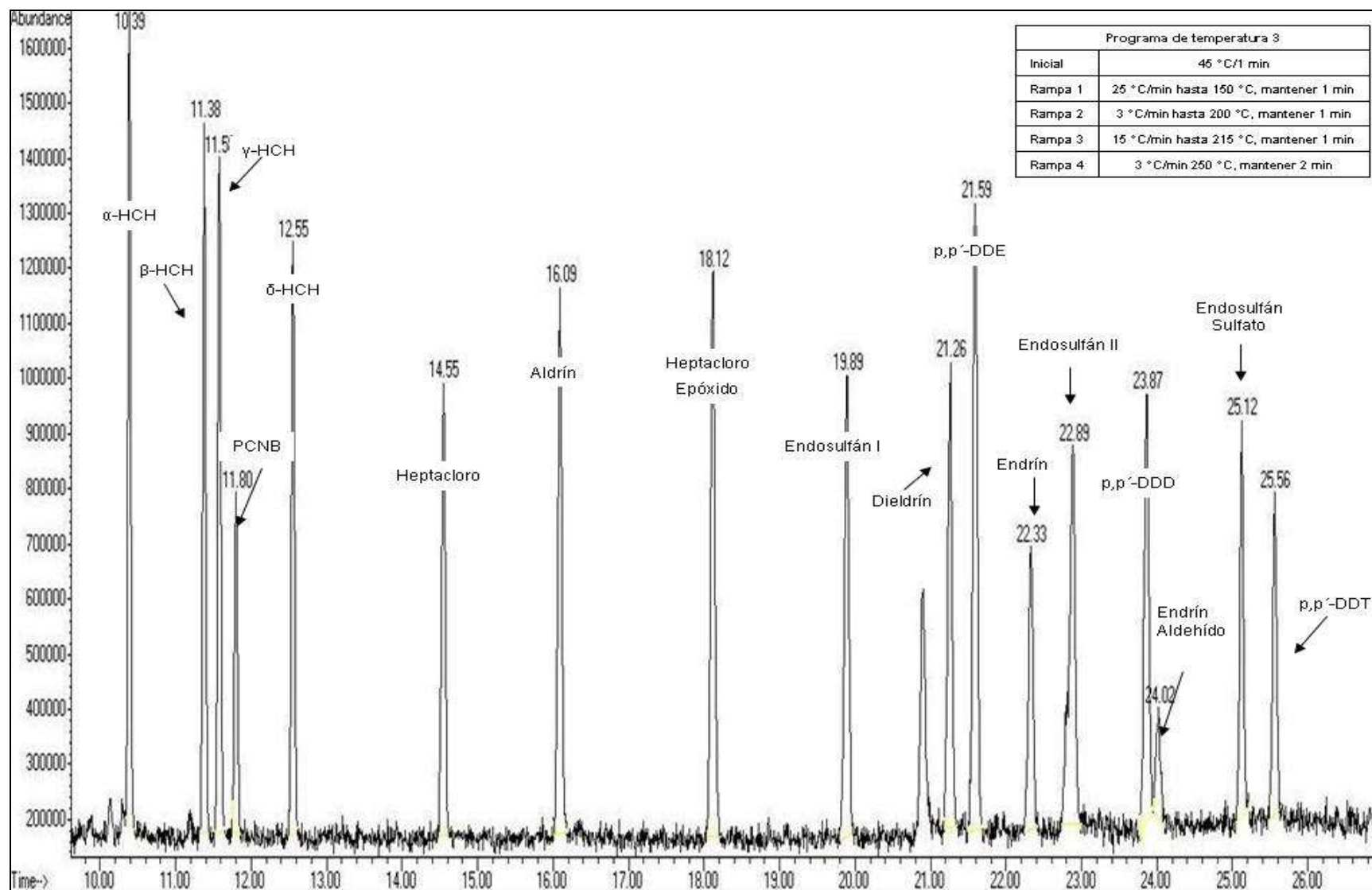


Figura III- 3. Cromatograma obtenido con el programa de temperatura 3. Solución estándar a 0,5 $\mu\text{g/mL}$.

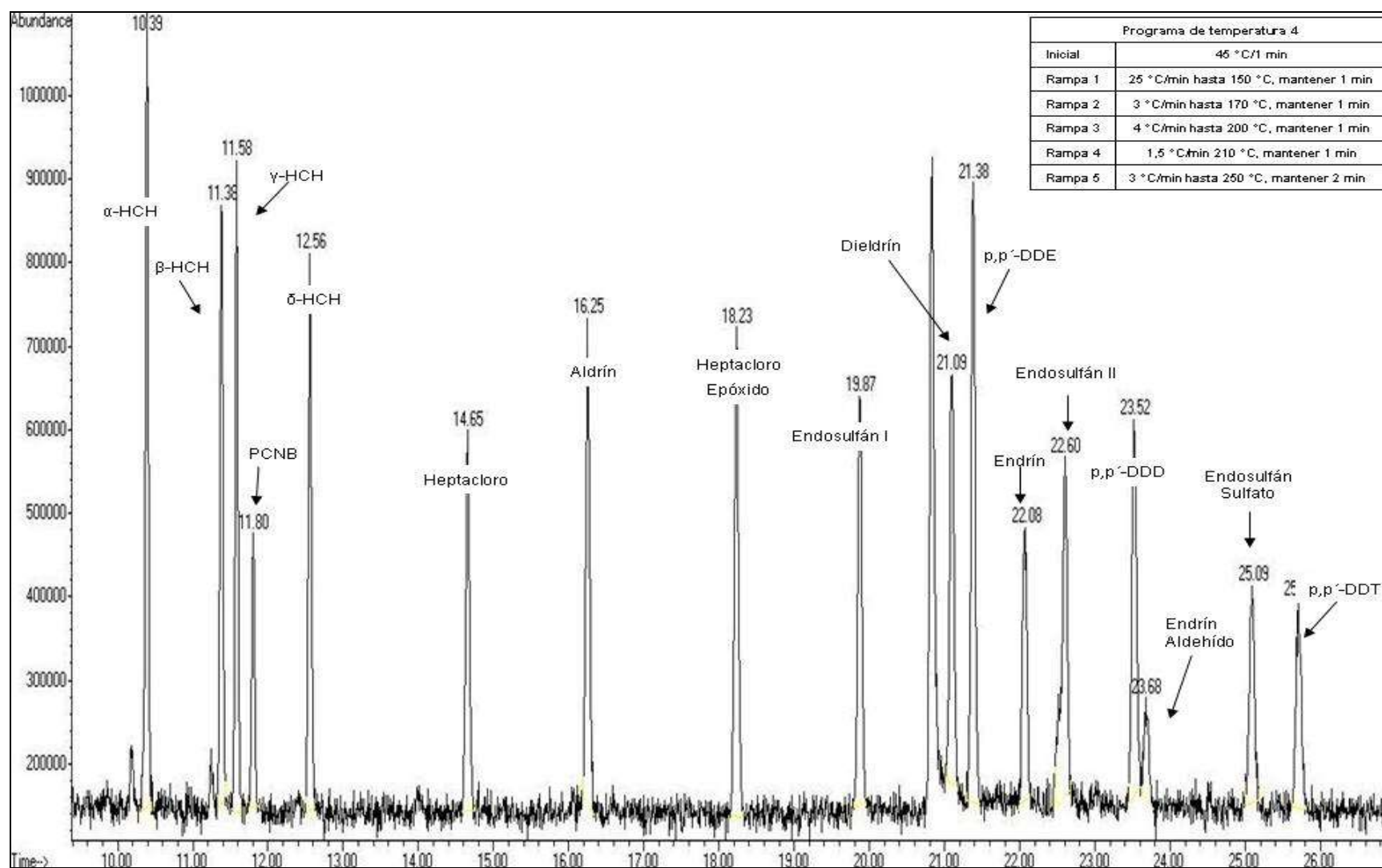


Figura III- 4. Cromatograma obtenido el programa de temperatura 4. Solución estándar a 0,5 µg/mL.

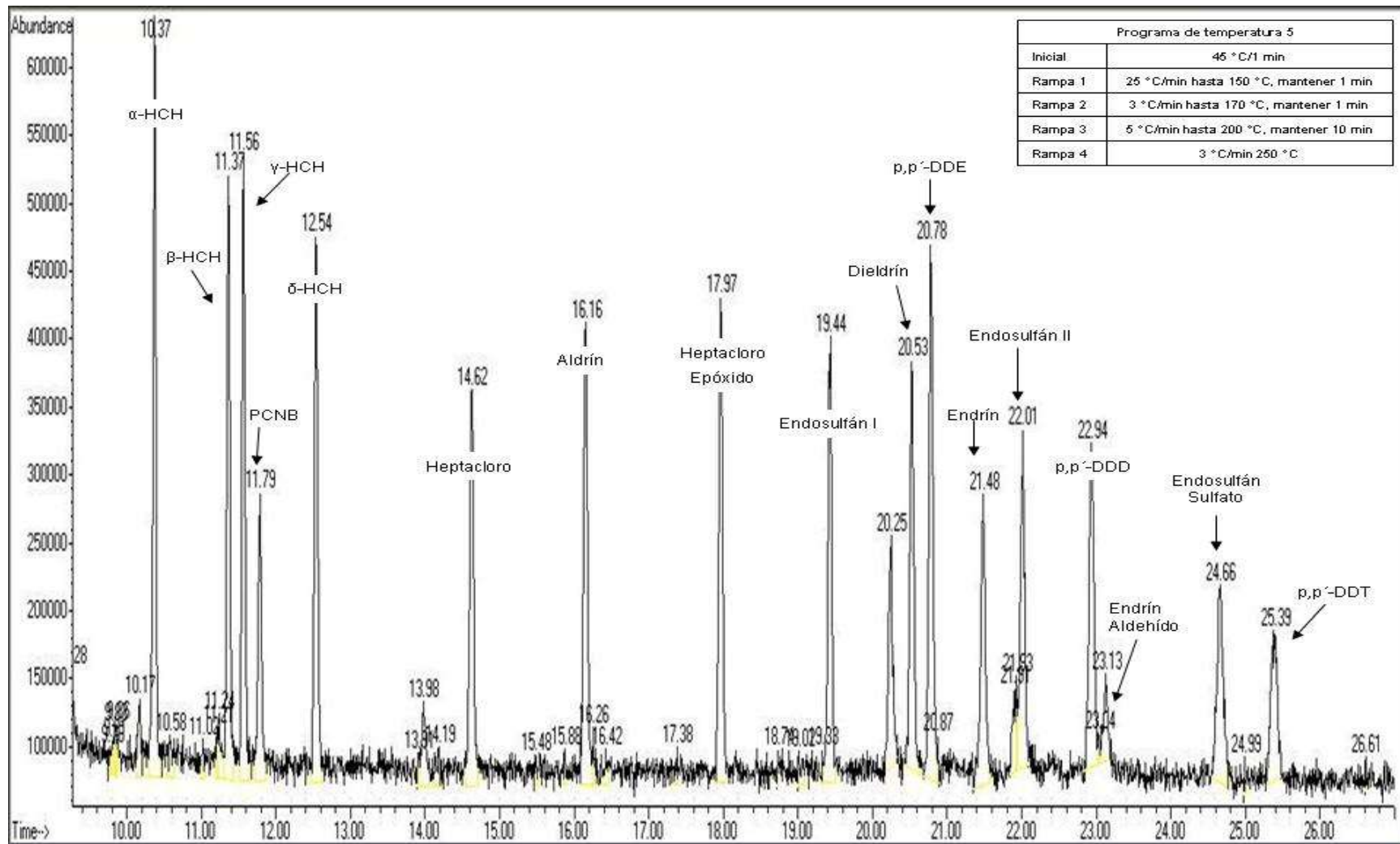


Figura III- 5. Cromatograma obtenido el programa de temperatura 5. Solución estándar a 0,5 µg/mL.

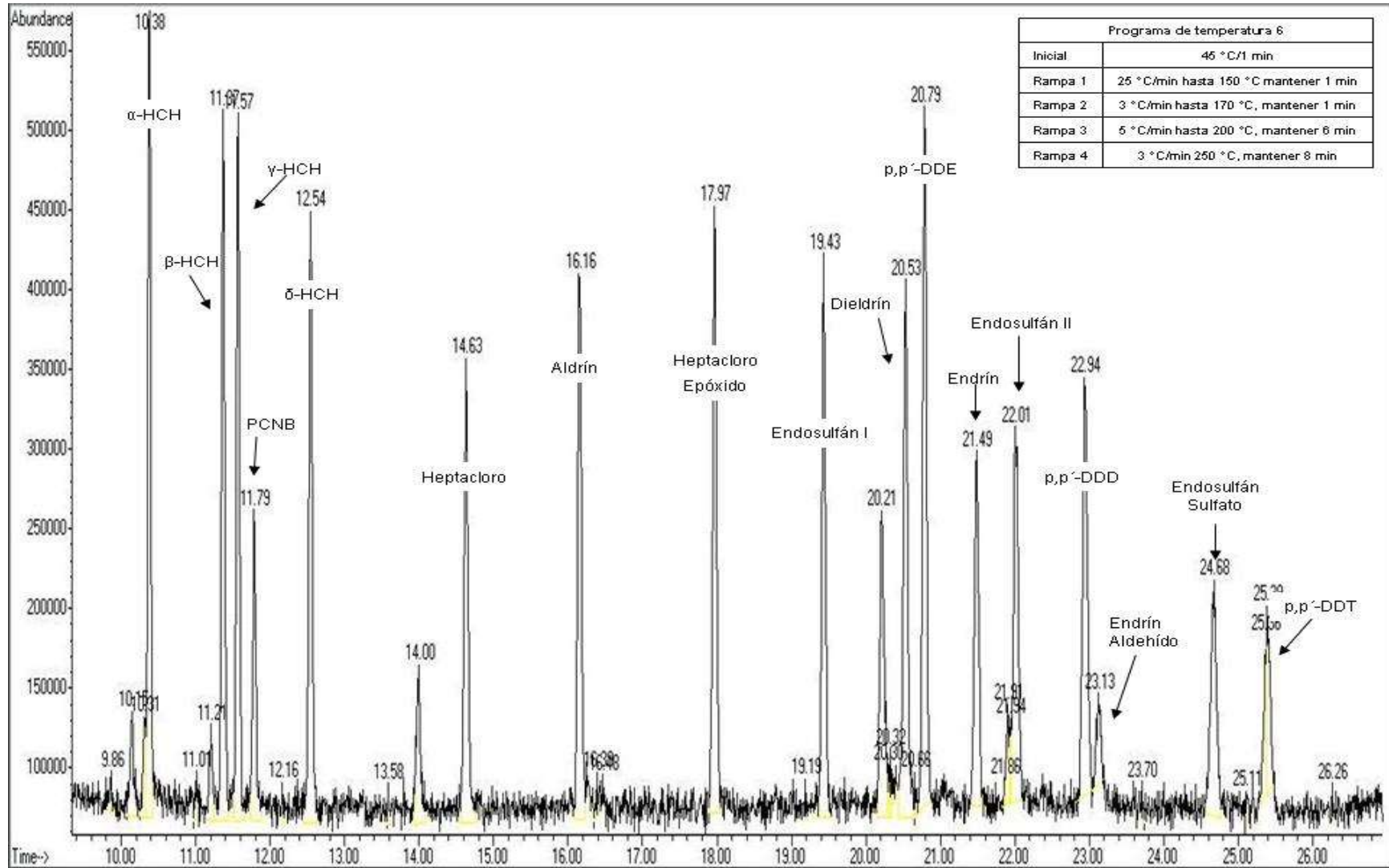


Figura III- 6. Cromatograma obtenido el programa de temperatura 6. Solución estándar a 0,5 µg/mL.

Tabla III- 1. Resolución obtenida para el p,p'-DDD y el endrín aldehído con los diferentes programas de temperatura.

PROGRAMA DE TEMPERATURAS	RESOLUCIÓN (R_s)
Programa de temperatura 1	0,64
Programa de temperatura 2	0,88
Programa de temperatura 3	0,88
Programa de temperatura 4	1,20
Programa de temperatura 5	1,27
Programa de temperatura 6	1,27

Las condiciones cromatográficas finales para el análisis se presentan en la Tabla III-2 y en la figura III-6 se muestra el cromatograma obtenido bajo estas condiciones.

Tabla III- 2 Condiciones finales para la separación cromatográfica.

Temperatura del Inyector	250 °C
Temperatura del Horno	Inicial. 45 °C /1 min
	Rampa 1. 25 °C/min hasta 150 °C y mantener 1 minuto.
	Rampa 2. 3 °C/min hasta 170 °C y mantener 1 minutos.
	Rampa 3. 4 °C/min hasta 200 °C y mantener 6 minutos.
	Rampa 4. 25 °C/min hasta 270 °C y mantener 8 minutos.
Temperatura de la Interfase	280 °C
Temperatura del analizador	150 °C
Temperatura de la fuente	230 °C.
Adquisición	Barrido completo (50-600 m/z)

3.1.2 Confirmación de la identidad de los analitos.

De cada pico cromatográfico se analizó el espectro de masas obtenido y se comparó con los datos contenidos en la biblioteca del equipo. En el Apéndice B se presentan los espectros de masas de cada uno de los OCPs obtenidos del cromatograma de la figura III-6 y los espectros de masas reportados en la biblioteca NIST. En la tabla III-3 se presenta el tiempo de retención correspondiente a cada analito utilizando el programa de temperatura 6.

Tabla III- 3 Tiempo de retención de cada analito obtenido con el programa de temperatura 6.

ANALITO	T_R (min)
α -HCH	10,38
β -HCH	11,37
γ -HCH	11,57
PCNB	11,80
δ -HCH	12,55
Heptacloro	14,64
Aldrín	16,16
Heptacloro epóxido	17,98
Endosulfán I	19,43
Dieldrín	20,53
p,p'-DDE	20,79
Endrín	21,49
Endosulfán II	22,02
p,p'-DDD	22,95
Endrín aldehído	23,13
Endosulfán Sulfato	24,68
p,p'-DDT	25,39

3.1.3 Establecimiento de parámetros de adquisición de datos.

Una vez obtenidas las condiciones óptimas de separación cromatográfica, se cambió la modalidad de adquisición de datos de SCAN a SIM, por lo que se establecieron 6 ventanas de adquisición de datos, que se muestran en la tabla III-4 y el cromatograma obtenido bajo estas condiciones se muestra en la figura III-7. Para asegurar una buena cuantificación de los analitos p,p'-DDD y el endrín aldehído se extrajeron los cromatogramas individuales de los iones principales, siendo el ión 235 en el caso del p,p'-DDD y el ión 67 para el endrín aldehído, que se muestran en la figura III-8 y III-9.

Tabla III- 4. Ventanas de adquisición establecidas para el modo SIM.

Tiempo (min)	Iones monitoreados m/z	Analitos
9 a 13,89	181, 183, 109, 265, 235, 237	α -HCH, β -HCH, δ -HCH, γ -HCH, PCNB.
13,9 a 17,19	66, 100, 220, 263, 272, 274	Heptacloro, Aldrín.
17,2 a 19,89	353, 355, 351, 237, 339, 341	Heptacloro epóxido, Endosulfán I
19,9 a 22,39	79, 81, 82, 263, 279, 246, 248, 176, 237, 339, 341	Dieldrín, p,p'-DDE, Endrín, Endosulfán II
22,4 a 23,79	67, 345, 250, 235, 165, 237	p,p'-DDD, Endrín aldehído
23,79 a 36,67	272, 387, 422, 235, 237, 165	Endosulfán sulfato, p,p'-DDT

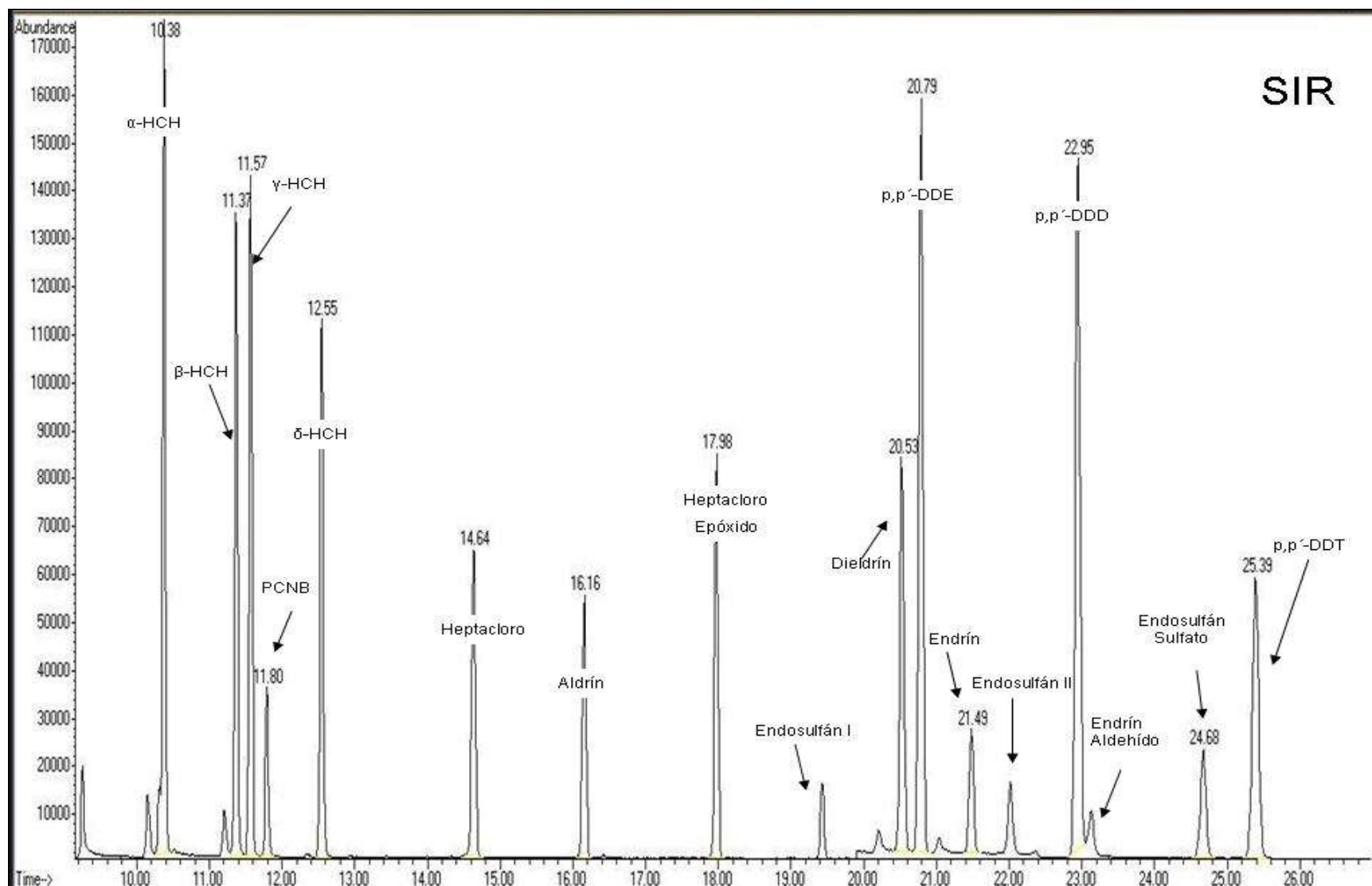


Figura III- 7. Cromatograma obtenido con la modalidad SIM con el programa de temperatura 6.

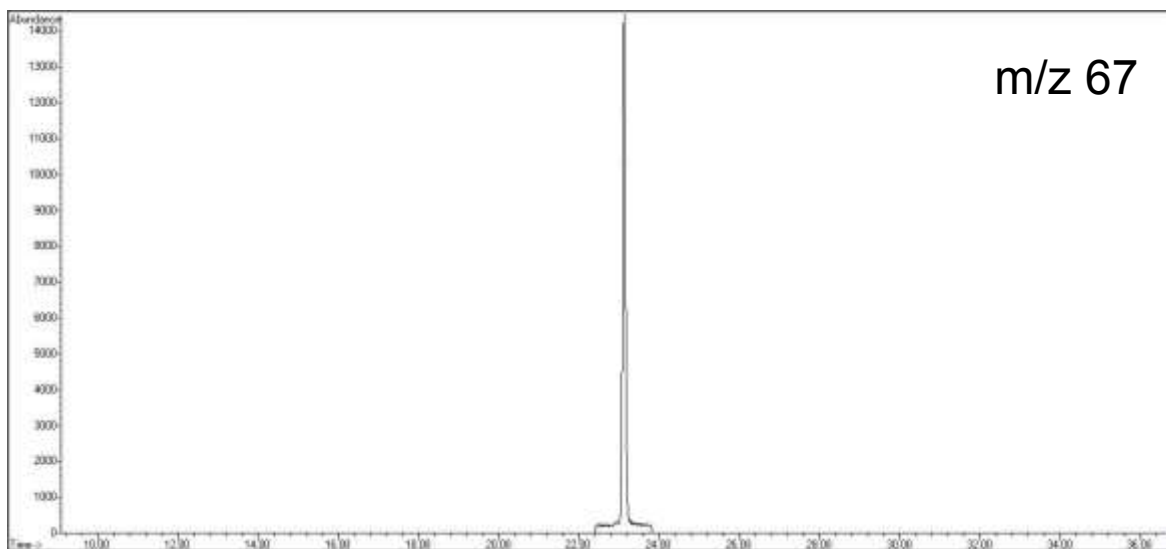


Figura III- 8. Cromatograma del i3n 67 m/z del endr3n aldehido.

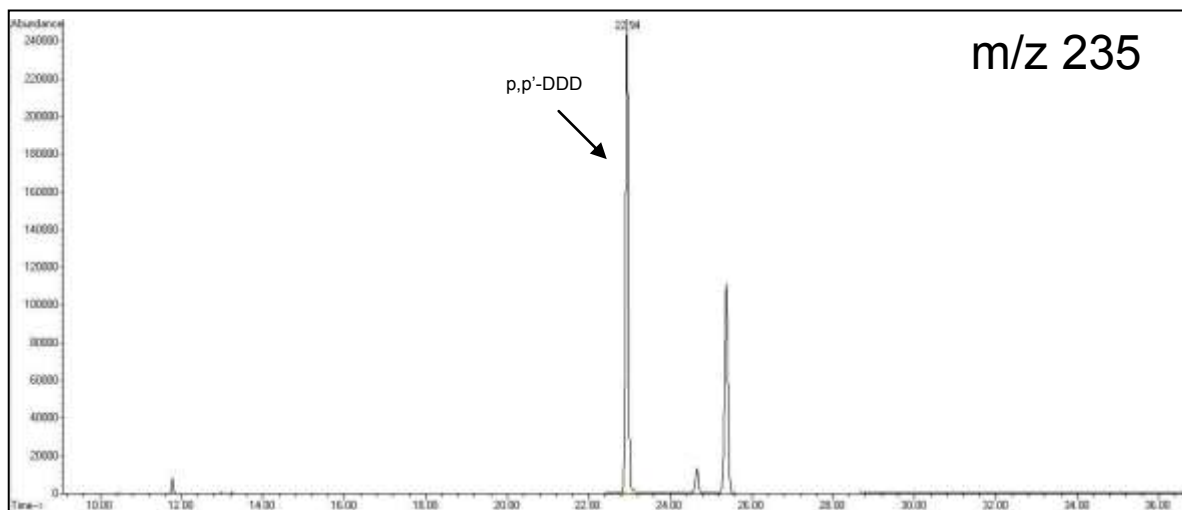


Figura III- 9. Cromatograma del i3n 235 m/z del p,p'-DDD

3.1.4 Validación del sistema.

Los resultados obtenidos durante la validación del sistema cromatográfico se muestran en la tabla III-5.

Tabla III- 5. Resultados de la validación del método GC-MS.

Analito	Coefficiente de correlación (r)	Factores de respuesta (% DER)	Límites de detección (µg/mL)	Límite de cuantificación (µg/mL)
α -HCH	0,9926	7,6	0,005	0,016
β -HCH	0,9943	7,7	0,004	0,012
γ -HCH	0,9947	7,6	0,007	0,022
δ -HCH	0,9951	8,6	0,008	0,026
Heptacloro	0,9970	10,8	0,006	0,020
Aldrín	0,9953	8,6	0,005	0,016
Heptacloro epóxido	0,9974	11,0	0,002	0,007
Endosulfán I	0,9974	11,2	0,008	0,027
Dieldrín	0,9951	10,2	0,008	0,028
p,p'-DDE	0,9954	10,5	0,003	0,009
Endrín	0,9913	13,6	0,011	0,037
Endosulfán II	0,9963	13,7	0,034	0,112
p,p'-DDD	0,9960	15,8	0,003	0,009
Endrín aldehído	0,9941	13,8	0,052	0,172
Endosulfán sulfato	0,9932	19,9	0,010	0,035
p,p'-DDT	0,9956	19,1	0,004	0,013

3.2 Microextracción en Fase Sólida.

3.2.1 Selección de la fibra para SPME.

En la tabla III-6 se muestran las áreas promedio obtenidas de cada analito con las fibras de PDMS 100 μm , DVB-PDMS de 65 μm y DVB-CAR-PDMS 50/30 μm , además se representan gráficamente estos resultados en la figura III-10.

Tabla III- 6. Resultados obtenidos para Selección de Fibra de SPME.

ANALITO	FIBRA					
	DVB-CAR-PDMS*		DVB-PDMS*		PDMS*	
	Área	% DER	Área	% DER	Área	% DER
α -HCH	1465,99	48,6	2088,46	20,9	2157,95	7,6
β -HCH	336,37	59,1	517,81	23,1	339,90	3,9
γ -HCH	912,75	49,0	1308,37	18,6	1149,70	3,2
δ -HCH	395,12	54,6	636,55	21,4	465,54	4,9
Endosulfán I	949,28	17,6	931,78	15,1	774,00	4,8
Endosulfán II	195,00	17,0	219,72	15,3	159,96	7,0
Endosulfán sulfato	42,35	21,1	55,71	9,6	48,59	10,3
p,p'-DDE	2177,07	37,1	1164,00	19,3	1115,04	6,1
p,p'-DDD	657,94	31,3	443,16	12,8	436,85	14,7
p,p'-DDT	582,04	42,4	290,39	14,2	330,60	16,2
Endrín	782,34	14,5	756,53	16,3	627,32	4,6
Endrín aldehído	141,57	72,0	18,05	63,8	5,76	81,8
Dieldrín	1484,42	17,2	1150,17	17,6	946,41	5,4
Heptacloro epóxido	1546,52	16,9	1551,15	15,4	1299,38	4,9
Heptacloro	5660,59	13,3	5322,20	13,2	5019,32	7,5
Aldrín	7620,16	15,1	5544,14	13,7	4933,79	7,9

* n=3

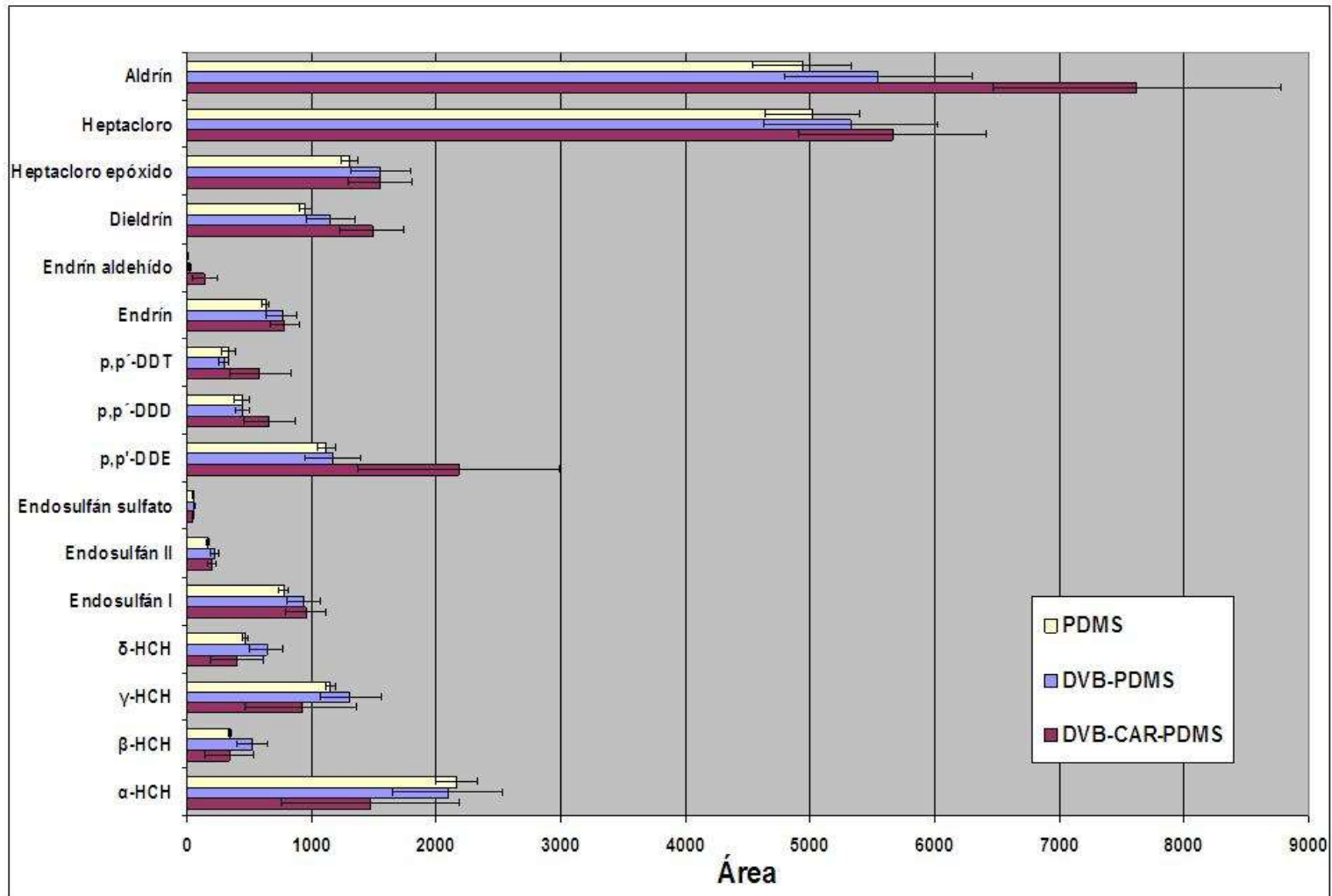


Figura III- 10. Gráfica de la comparación de las áreas de OCPS para la selección de la fibra para SPME (n=3).

3.2.2 Optimización de la extracción.

Los resultados obtenidos para los experimentos del diseño factorial fraccionado realizados para la selección de las variables de mayor influencia sobre el sistema se muestran en la tabla III-7 y en la figura III-11 se muestra el diagrama de Pareto correspondiente a dichos resultados.

Tabla III- 7. Experimentos del diseño factorial fraccionado.

Temperatura (°c)	Tiempo de extracción (min)	Tiempo de equilibrio (min)	Cantidad de muestra (g)	Volumen de HS (ml)	ACN (%)	NaCl (%)	Coefficiente de Deseabilidad
80	60	10	4	10	1	1	15,000
60	30	30	4	10	1	10	3,646
80	60	30	4	20	10	10	1,903
60	30	10	4	20	10	1	0,312
80	30	10	1	10	10	10	0,314
60	60	30	1	10	10	1	0,034
60	60	10	1	20	1	10	0,810
80	30	30	1	20	1	1	1,902

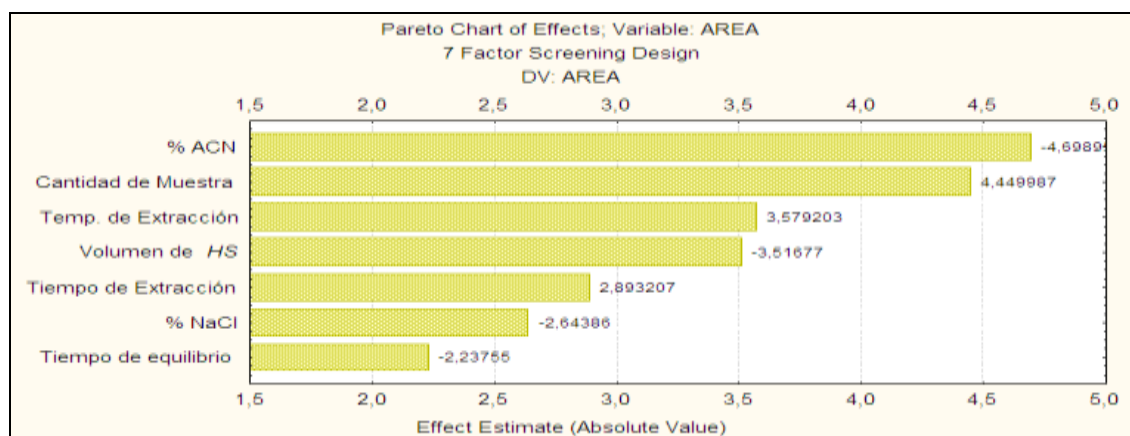


Figura III- 11. Diagrama de Pareto obtenido con el diseño factorial fraccionado para la selección de variables.

Las variables que mostraron tener mayor influencia sobre este sistema de extracción fueron el contenido de acetonitrilo, la cantidad de muestra, la temperatura de extracción y el volumen de *headspace*, por lo que fueron las que se optimizaron por el método simplex.

Para la optimización de las variables de mayor influencia se plantearon inicialmente cinco experimentos, mostrados en la tabla II-8. Las respuestas obtenidas para cada uno de los analitos se analizaron con ayuda del programa Multisimplex® para generar los nuevos experimentos a realizar. La evolución del diseño simplex para la optimización de la extracción planteó los 12 experimentos mostrados en la tabla III-8, en esta tabla se muestra también las respuestas obtenidas de cada experimento, expresadas como la sumatoria de las áreas de los analitos de interés.

Tabla III- 8. Evolución del método simplex para la optimización de la extracción.

Experimento	ACN (%)	Cantidad de muestra (g)	Temperatura (°C)	Volumen <i>headspace</i> (ml)	Σ área
1	8	3	75	13	931,73
2	3	3	65	13	848,89
3	8	3	65	18	1011,88
4	8	2	65	13	689,27
5	3	2	75	18	1614,93
6	3	4	75	18	1646,47
7	1	4	80	21	2667,76
8	7	3	83	22	2291,75
9	2	3	92	19	931,73
10	3	3	85	19	1614,93
11	-1	3	87	27	848,89
12	6	3	78	17	2036,65

La tendencia observada para la cantidad de muestra fue hacia 3 gramos y para la temperatura de extracción y el volumen de *headspace* fue hacia valores altos, mientras que para la adición de acetonitrilo no se observó una tendencia definida. En la tabla III-9 se presentan las condiciones de extracción establecidas como óptimas.

Tabla III- 9. Condiciones de extracción obtenidas con el diseño simplex.

Tiempo de Equilibrio	20 minutos
Tiempo de Extracción	60 minutos
Temperatura de Extracción	75 °C
Adición de NaCl	0%
Adición de ACN	2,5%
Volumen de headspace	20 mL
Cantidad de muestra	3 g

Los resultados obtenidos de las extracciones realizadas para la comparación de la cantidad de muestra se pueden observar en la figura III-12 y además, en la tabla III-10 se presentan los resultados de la prueba t para la comparación de medias de estos datos, que no mostró diferencia significativa entre la eficiencia de extracción con 3 y 4 gramos para ninguno de los OCPs.

En el caso de las pruebas realizadas para determinar el tiempo de extracción, los resultados obtenidos se muestran en la figura III-13 y los resultados de la prueba t para la comparación de medias se encuentran en la tabla III-11. En estos experimentos, se

observó que a menor tiempo de extracción se obtiene una mejor recuperación para los todos los analitos, existiendo una diferencia significativa en el caso del endosulfán I, p,p'-DDD, p,p'-DDE, p,p'-DDT, endrín y heptacloro epóxido.

Las condiciones óptimas establecidas para la extracción de OCPs a partir de yogurt se presentan en la tabla III-12 y en la figura III-14 se muestra el cromatograma obtenido al analizar una muestra de yogurt adicionada con 6,25 ng/g aplicando el método desarrollado.

Tabla III- 10. Análisis estadístico de la cantidad de muestra.

Analito	Área *		Estadístico t		Diferencia significativa
	3 gramos	4 gramos	t _{cal}	t _{crit}	
α-HCH	59,14	34,14	1,352	4,303	No
β-HCH	8,44	4,1	1,895	4,303	No
γ-HCH	43,10	23,08	1,512	4,303	No
δ-HCH	16,32	13,94	0,788	4,303	No
Endosulfán I	23,66	19,37	0,908	4,303	No
Endosulfán II	5,11	4,34	0,693	4,303	No
Endosulfán sulfato	4,04	1,33	3,432	4,303	No
P,p'-DDE	46,50	48,38	-0,149	4,303	No
p,p'-DDD	11,37	11,4	-0,012	4,303	No
P,p'-DDT	9,86	9,48	0,171	4,303	No
Endrín	21,70	18,36	1,081	4,303	No
Dieldrín	31,24	26,67	0,967	4,303	No
Heptacloro epóxido	40,19	33,22	0,809	4,303	No
Heptacloro	172,38	163,63	0,154	4,303	No
Aldrín	247,96	213,81	0,313	4,303	No

*n=2

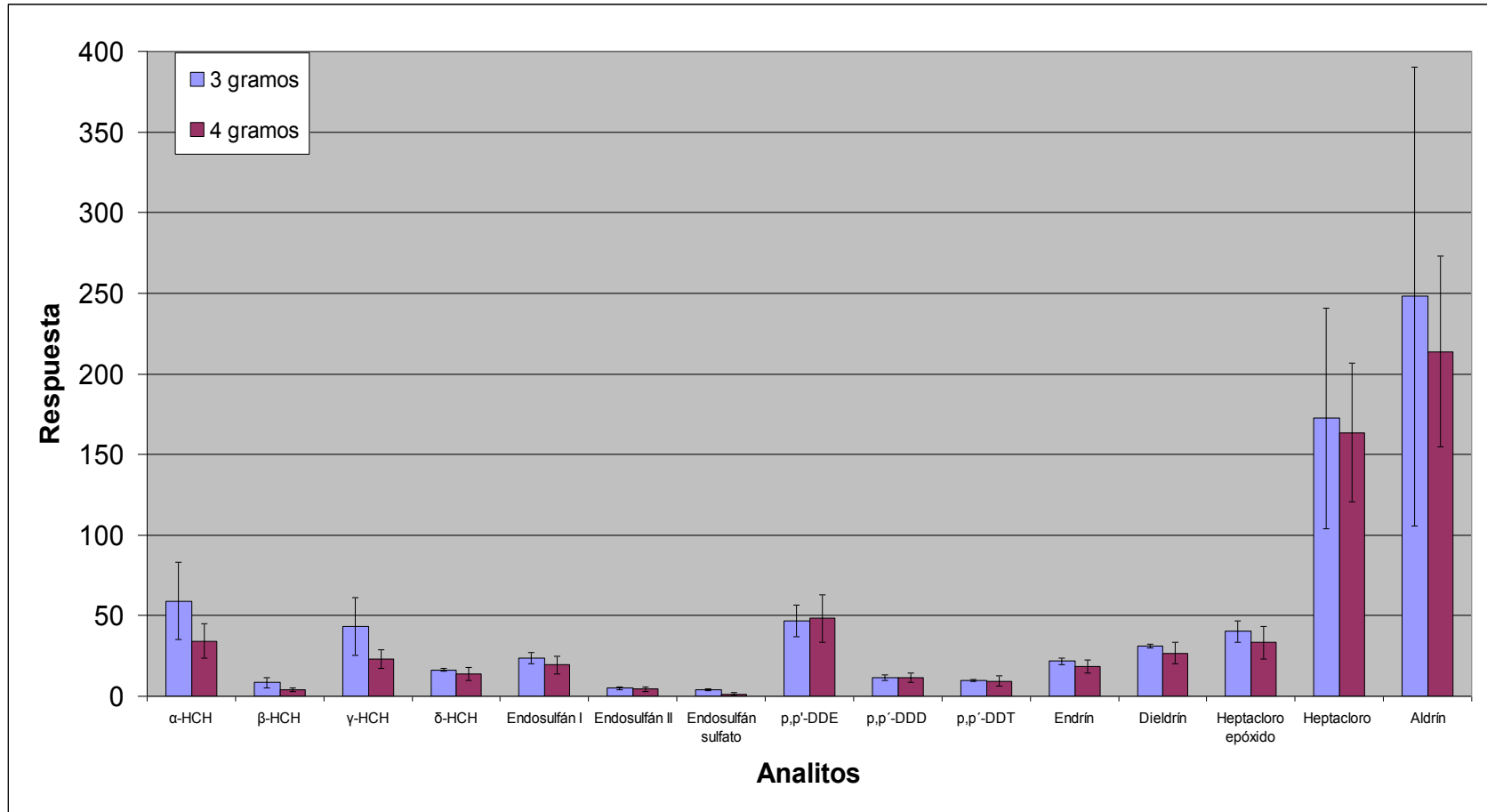


Figura III- 12. Comparación de las áreas obtenidas de la extracción de diferentes cantidades de muestra.

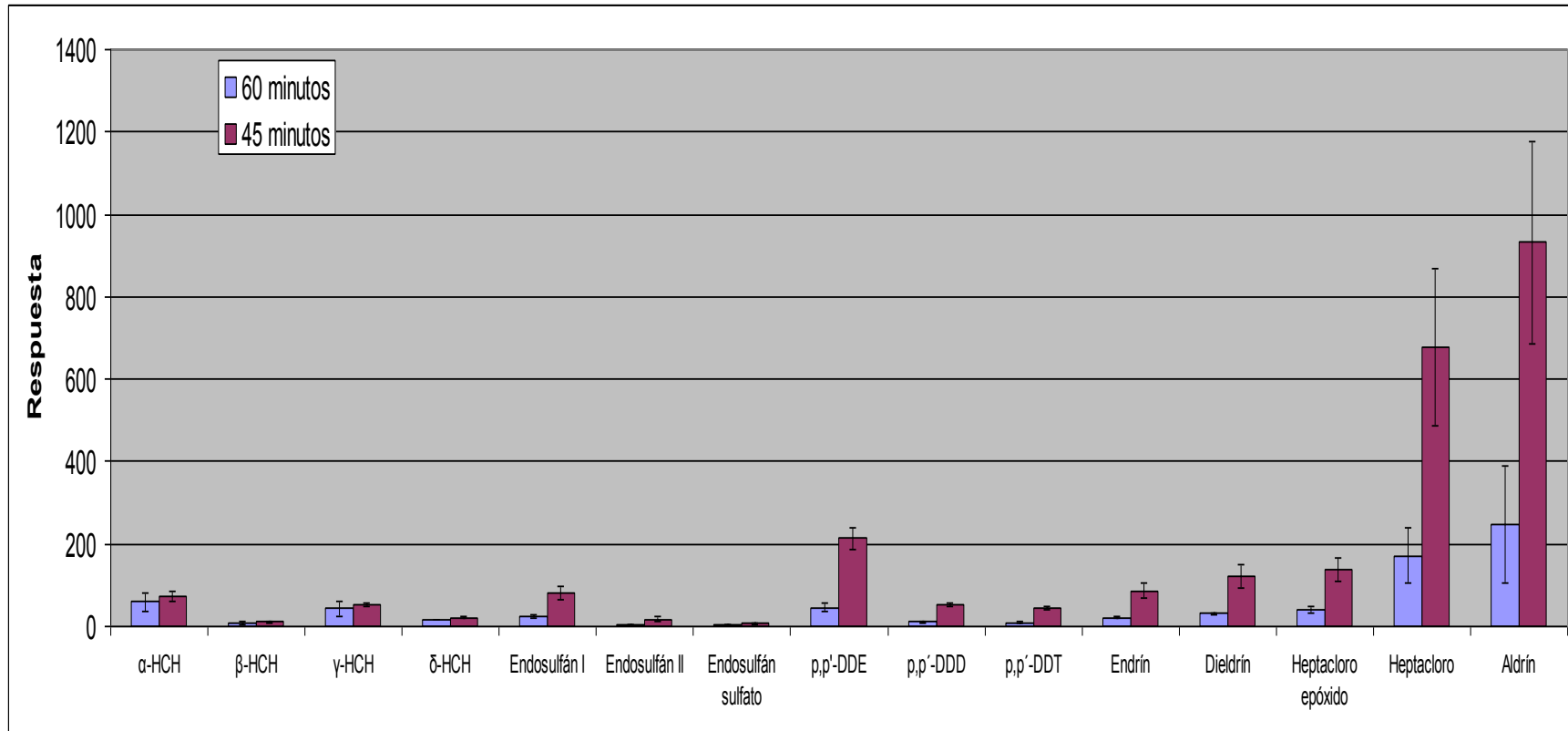


Figura III- 13. Comparación de áreas obtenidas a diferentes tiempos de extracción.

Tabla III- 11. Análisis estadístico del tiempo de extracción.

ANALITO	ÁREA *		ESTADÍSTICO t		Diferencia significativa
	60 min	45 min	t _{cal}	t _{crit}	
α -HCH	59,14	74,2	-0,799	4,303	No
β -HCH	8,445	10,58	-0,869	4,303	No
γ -HCH	43,105	52,265	-0,706	4,303	No
δ -HCH	16,315	21,785	-2,769	4,303	No
Endosulfán I	23,665	81,27	-4,693	4,303	Si
Endosulfán II	5,11	18,04	-2,702	4,303	No
Endosulfán sulfato	4,045	6,535	-1,357	4,303	No
p,p'-DDE	46,505	213,85	-8,482	4,303	Si
p,p'-DDD	11,37	52,66	-10,555	4,303	Si
p,p'-DDT	9,855	45,25	-9,985	4,303	Si
Endrín	21,695	85,76	-5,080	4,303	Si
Dieldrín	31,245	122,33	-4,640	12,706	No
Heptacloro epóxido	40,19	138,645	-4,619	4,303	Si
Heptacloro Aldrín	172,38	676,67	-3,516	4,303	No
Aldrín	247,955	931,67	-3,404	4,303	No

* n=2

Tabla III- 12. Condiciones óptimas para la extracción de OCPs en yogurt.

Tiempo de Equilibrio	20 minutos
Tiempo de Extracción	45 minutos
Temperatura de Extracción	75 °C
Adición de NaCl	0%
Adición de ACN	2,5%
Volumen de <i>headspace</i>	20 mL
Cantidad de muestra	4 g

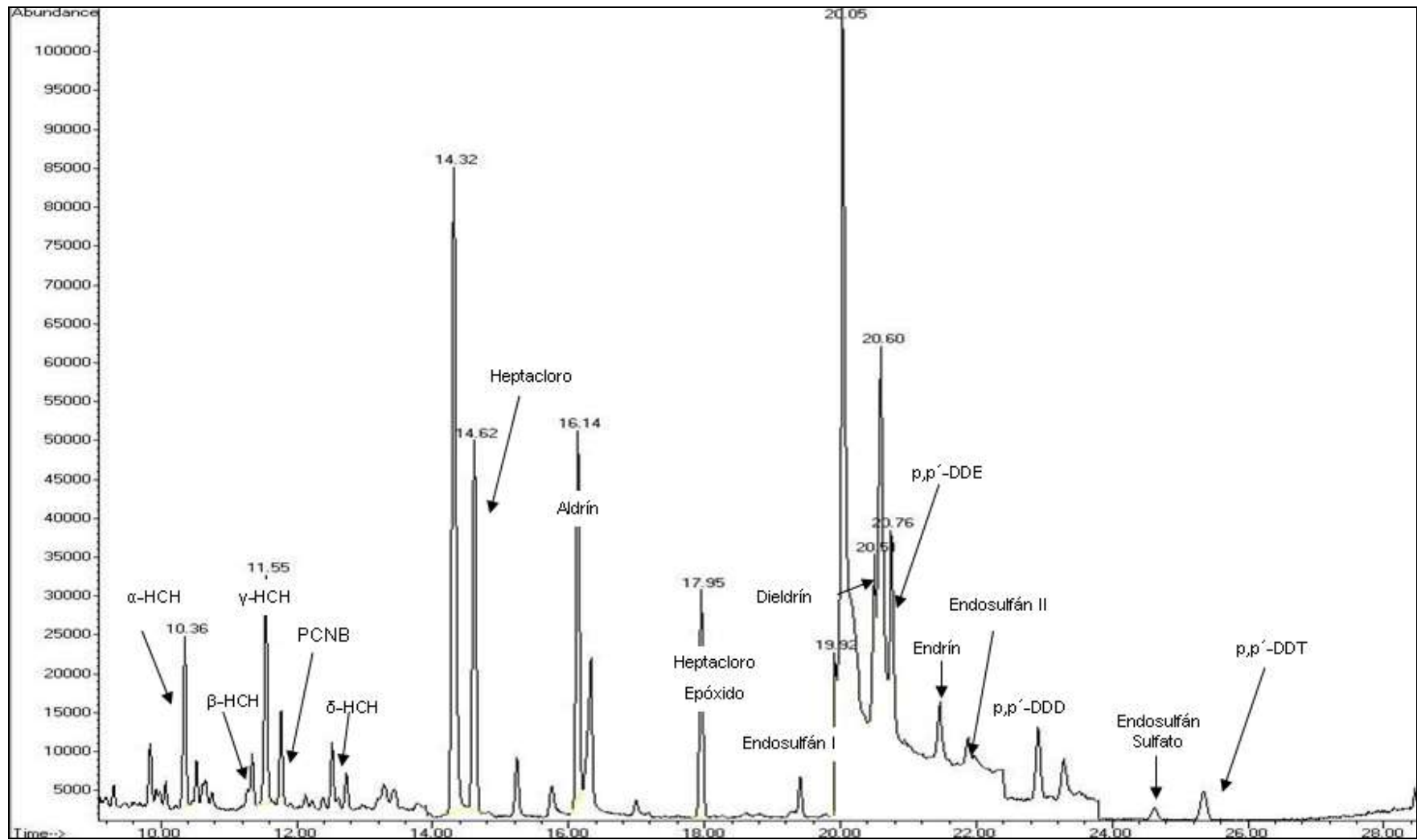


Figura III- 14. Cromatograma obtenido aplicando el método de SPME-GC-MS al analizar una muestra adicionada con 6,25 ng/g.

3.3 Sensibilidad del Método de análisis de OCPs.

En la tabla III-13 se muestran los límites de detección y cuantificación obtenidos con el método desarrollado para los OCPs incluidos en el estudio.

Tabla III- 13. Límites de detección y cuantificación de los OCPs con el método de SPME-GC-MS desarrollado.

Analito	Límites de detección (ng/g grasa)	Límites de cuantificación (ng/g grasa)
α-HCH	0,08	0,25
β-HCH	0,24	0,82
γ-HCH	0,08	0,27
δ-HCH	0,05	0,18
Heptacloro	0,20	0,67
Aldrín	0,02	0,07
Heptacloro epóxido	0,03	0,11
Endosulfán I	0,20	0,66
Dieldrín	0,05	0,17
p,p'-DDE	0,14	0,48
Endrín	0,07	0,23
Endosulfán II	0,52	1,74
p,p'-DDD	0,10	0,33
Endosulfán sulfato	0,33	1,12

CAPÍTULO III**58**

RESULTADOS	58
3.1 Cromatografía de Gases-Masas (GC-MS).	58
3.1.1 Optimización de las condiciones de separación cromatográfica.	58
3.1.2 Confirmación de la identidad de los analitos.	66
3.1.3 Establecimiento de parámetros de adquisición de datos.	67
3.1.4 Validación del sistema.	70
3.2 Microextracción en Fase Sólida.	71
3.2.1 Selección de la fibra para SPME.	71
3.2.2 Optimización de la extracción.	73
3.3 Sensibilidad del Método de análisis de OCPs.	81

FIGURA III- 1. CROMATOGRAMA OBTENIDO CON EL PROGRAMA DE TEMPERATURA 1. SOLUCIÓN ESTÁNDAR A 0,5 µG/ML.	59
FIGURA III- 2. CROMATOGRAMA OBTENIDO CON EL PROGRAMA DE TEMPERATURA 2 DE TEMPERATURAS. SOLUCIÓN ESTÁNDAR A 0,5 µG/ML.	60
FIGURA III- 3. CROMATOGRAMA OBTENIDO CON EL PROGRAMA DE TEMPERATURA 3. SOLUCIÓN ESTÁNDAR A 0,5 µG/ML.	61
FIGURA III- 4. CROMATOGRAMA OBTENIDO EL PROGRAMA DE TEMPERATURA 4. SOLUCIÓN ESTÁNDAR A 0,5 µG/ML.	62
FIGURA III- 5. CROMATOGRAMA OBTENIDO EL PROGRAMA DE TEMPERATURA 5. SOLUCIÓN ESTÁNDAR A 0,5 µG/ML.	63
FIGURA III- 6. CROMATOGRAMA OBTENIDO EL PROGRAMA DE TEMPERATURA 6. SOLUCIÓN ESTÁNDAR A 0,5 µG/ML.	64
FIGURA III- 7. CROMATOGRAMA OBTENIDO CON LA MODALIDAD SIM CON EL PROGRAMA DE TEMPERATURA 6.	68
FIGURA III- 8. CROMATOGRAMA DEL IÓN 67 M/Z DEL ENDRÍN ALDEHÍDO.	69
FIGURA III- 9. CROMATOGRAMA DEL IÓN 235 M/Z DEL P,P'-DDD	69
FIGURA III- 10. GRÁFICA DE LA COMPARACIÓN DE LAS ÁREAS DE OCPS PARA LA SELECCIÓN DE LA FIBRA PARA SPME (N=3).	72
FIGURA III- 11. DIAGRAMA DE PARETO OBTENIDO CON EL DISEÑO FACTORIAL FRACCIONADO PARA LA SELECCIÓN DE VARIABLES.	73
FIGURA III- 12. COMPARACIÓN DE LAS ÁREAS OBTENIDAS DE LA EXTRACCIÓN DE DIFERENTES CANTIDADES DE MUESTRA.	77
FIGURA III- 13. COMPARACIÓN DE ÁREAS OBTENIDAS A DIFERENTES TIEMPOS DE EXTRACCIÓN.	78
FIGURA III- 14. CROMATOGRAMA OBTENIDO APLICANDO EL MÉTODO DE SPME-GC-MS AL ANALIZAR UNA MUESTRA ADICIONADA CON 6,25 NG/G.	80

TABLA III- 1. RESOLUCIÓN OBTENIDA PARA EL P,P'-DDD Y EL ENDRÍN ALDEHÍDO CON LOS DIFERENTES PROGRAMAS DE TEMPERATURA.	65
TABLA III- 2 CONDICIONES FINALES PARA LA SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA.	65

TABLA III- 3 TIEMPO DE RETENCIÓN DE CADA ANALITO OBTENIDO CON EL PROGRAMA DE TEMPERATURA 6.	66
TABLA III- 4. VENTANAS DE ADQUISICIÓN ESTABLECIDAS PARA EL MODO SIM.	67
TABLA III- 5. RESULTADOS DE LA VALIDACIÓN DEL MÉTODO GC-MS.	70
TABLA III- 6. RESULTADOS OBTENIDOS PARA SELECCIÓN DE FIBRA DE SPME.	71
TABLA III- 7. EXPERIMENTOS DEL DISEÑO FACTORIAL FRACCIONADO.	73
TABLA III- 8. EVOLUCIÓN DEL MÉTODO SIMPLEX PARA LA OPTIMIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN.	74
TABLA III- 9. CONDICIONES DE EXTRACCIÓN OBTENIDAS CON EL DISEÑO SIMPLEX.	75
TABLA III- 10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA CANTIDAD DE MUESTRA.	76
TABLA III- 11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL TIEMPO DE EXTRACCIÓN.	79
TABLA III- 12. CONDICIONES ÓPTIMAS PARA LA EXTRACCIÓN DE OCPS EN YOGURT.	79
TABLA III- 13. LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LOS OCPS CON EL MÉTODO DE SPME-GC-MS DESARROLLADO.	81

CAPÍTULO IV

DISCUSIÓN

4.1 Cromatografía de Gases-Masas (GC-MS).

4.1.1 Optimización de las condiciones de separación cromatográfica.

Para obtener una separación satisfactoria de todos los analitos y el estándar interno fue necesario evaluar diferentes programas de temperatura hasta elegir aquel en el que todos los componentes aparecieran con tiempos de retención diferentes y no solapados, es decir, hasta obtener un cromatograma con buena resolución. Durante esta etapa, la identificación de los analitos se llevó a cabo mediante la comparación de los espectros de masas obtenidos con los reportados en la biblioteca NIST, que está integrada al software del aparato (Anexo B). En las figuras III-I a III-6 se muestran los cromatogramas obtenidos con las diversas modificaciones al programa de temperaturas y en la tabla III-1 se presentan los valores de resolución entre el p,p'-DDD y endrín aldehído correspondientes.

Se comenzó a trabajar con el programa de temperatura previamente establecido en la tesis de Padilla Alonso (2006) y, como puede observarse en el cromatograma mostrado en la figura III-1, entre los 23,80 y 24,10 min se presentan dos picos cromatográficos no resueltos ($R_s = 0,64$), correspondientes al p,p'-DDD y al endrín aldehído. Con la finalidad de plantear las modificaciones pertinentes, se analizó el programa de temperaturas y se determinó que la elución de estos analitos se produce a una temperatura de 200 °C, con una velocidad de cambio de temperatura de 3 °C/min.

La primera modificación al programa de temperaturas (programa de temperatura 2) consistió en agregar una rampa de temperatura a 210 °C con una velocidad de cambio de 5 °C/min. Como puede observarse en la Figura III-2, esta modificación produjo solo una ligera mejora en la separación de los dos picos ($R_s = 0,88$), por lo que se decidió aumentar la temperatura de la rampa agregada en el programa de temperatura 2 hasta 215 °C a una velocidad de cambio de 15 °C/min. Como se aprecia en la figura III-3, con el programa de temperatura 3, tampoco se logró separar adecuadamente a los analitos y la resolución entre p,p'-DDD y endrín aldehído no presentó cambio. El comportamiento observado permitió concluir que la separación de estos analitos requiere una menor temperatura y una menor velocidad de cambio.

Considerando esta información, se plantearon las siguientes modificaciones al programa de temperatura. En la Figura III-4 se puede observar que con el programa de temperatura 4 no se afectó la separación entre los analitos que eluyen entre 13,87 a 22,37 min y en el caso del p,p'-DDD y endrín aldehído se mejoró la resolución ($R_s = 1,2$).

De acuerdo a estos resultados y debido a que el cambio de rampa iniciaba en un tiempo muy próximo a la elución de los analitos, se modificó la velocidad de cambio de temperatura de 4 a 5 °C/ min de la rampa de 170 a 200 °C con la finalidad de disminuir el tiempo en que se alcanzaran los 200 °C, manteniendo posteriormente un periodo isotérmico a 200 °C por 10 min. El cromatograma que se presenta en la Figura III-5 fue el obtenido con el programa de temperatura 5 y en éste, se aprecia una separación ligeramente mayor de los picos de interés ($R_s = 1,27$). No se consideró necesario seguir trabajando en la mejora de la resolución entre estos dos analitos, ya que el valor obtenido fue más o menos aceptable, aunque no se llegó a los valores óptimos, debido a que es posible realizar la cuantificación extrayendo los cromatogramas individuales de los iones principales de estos 2 analitos.

Finalmente, para asegurar una limpieza adecuada de la columna entre corridas y un tiempo de análisis menor, se modificó el periodo isotérmico a 200 °C manteniéndolo por 6 minutos con un posterior aumento hasta 270 °C a 25 °C/min, temperatura que fue mantenida por 8 minutos. El cromatograma obtenido con el programa de temperatura 6 se presenta en la figura III-6.

Con la finalidad de mejorar la sensibilidad y selectividad del método desarrollado, una vez establecidas las condiciones óptimas de separación cromatográfica, se cambió la modalidad de adquisición de datos de barrido completo (SCAN) al modo de monitoreo selectivo de iones (SIM). Para ello, se crearon las 6 ventanas de adquisición de datos mostradas en la tabla III-4 y en la figura III-24 se observa el cromatograma obtenido adquiriendo los datos mediante la modalidad SIM.

Además, para lograr una adecuada cuantificación de los analitos p,p'-DDD y endrín aldehído se decidió extraer el cromatograma individual de los iones principales de estos analitos, siendo el ión 67 m/z para el endrín aldehído (Figura III-25) y el ión 235 m/z correspondiente al p,p'-DDD (Figura III-26)

4.1.2 Validación del sistema.

Con el propósito de validar el método cromatográfico desarrollado para la determinación de OCPs, se evaluaron la linealidad, precisión, límites de detección y cuantificación para cada uno de los analitos.

Como puede verse en la tabla III-5, en el caso de linealidad, para todos los analitos los coeficientes de correlación (r) fueron mayores a 0,99. Para la precisión se calculó el % DER de los factores de respuesta de cada analito, encontrándose en un rango de 7,6 a 19,9 %. Los valores obtenidos son aceptables de acuerdo a lo establecido por la EPA en el método 8081 (< 20%).

Los límites de detección y cuantificación de cada uno de los analitos se determinaron considerando la relación señal-ruido, los resultados obtenidos se muestran en la tabla III-5. Los límites de detección del sistema se encuentran entre 0,002 y 0,052 $\mu\text{g/mL}$ y los límites de cuantificación en un rango de 0,007 a 0,172 $\mu\text{g/mL}$.

4.2 Microextracción en Fase Sólida.

La optimización de la microextracción en fase sólida se llevó a cabo en tres etapas: selección de la fibra más adecuada para la extracción de OCPs, optimización de la desorción y finalmente optimización de la extracción. La modalidad de SPME seleccionada fue la de headspace, ya que presenta ventajas significativas en términos de selectividad, debido a que sólo los compuestos volátiles o semivolátiles pueden ser liberados de la matriz a la fase gaseosa, además de que al evitar el contacto directo de la fibra con la muestra se pueden reducir los efectos de matriz y aumentar el tiempo de vida de las fibras de SPME (Doong y cols., 2001).

4.2.1 Selección de la fibra para SPME.

La elección de una fase de extracción apropiada es fundamental en un método de SPME. Con la finalidad de elegir la fibra más adecuada para la extracción de OCPs en yogurt, se comparó la eficiencia de extracción de fibras de DVB-PDMS (65 μm), de DVB-CAR-PDMS (50-30 μm) y de PDMS (100 μm).

La selectividad de cada fibra depende del peso molecular, la volatilidad y la polaridad de los analitos a ser extraídos, por lo que los OCPs con diferentes características químicas presentaron diferentes comportamientos de extracción con las tres fibras seleccionadas (Li y cols., 2003).

En esta parte de la optimización, se realizó el análisis del comportamiento de los 16 analitos frente a las fibras evaluadas. En la figura III-10 se presenta una gráfica de comparación de las áreas obtenidas para cada analito con las fibras analizadas.

Como puede observarse en la figura III-10, la fibra de DVB-CAR-PDMS presentó la mayor capacidad adsorbente para los compuestos que eluyen después de los primeros 13 minutos, es decir, heptacloro, heptacloro epóxido, aldrín, endosulfán I, dieldrín, p,p'-DDE, p,p'-DDD, p,p'-DDT, endrín, endrín aldehído, endosulfán II y endosulfán sulfato. Por otro lado, esta fibra presenta una menor eficiencia de extracción, en comparación con los OCPs mencionados anteriormente, para los analitos que eluyen

al principio del cromatograma, como son los hexaclorociclohexanos. El comportamiento observado coincide con lo reportado por Li y cols. (2003), quienes probaron 6 fibras de SPME de venta comercial y observaron que la fibra de DVB-CAR-PDMS presentó una buena eficiencia en la extracción de 14 OCPs. Por otra parte, Pérez-Trujillo y cols. (2002) analizaron el comportamiento de fibras de carbowax-divinilbenceno (CW-DVB), de carboxen-polidimetilsiloxano (CAR-PDMS) y de DVB-CAR-PDMS, encontrando que las tres fibras analizadas eran adecuadas para la extracción de aldrín, o,p-DDT, p,p'-DDE, o,p-DDE, dieldrín, endosulfán I, endosulfán II, endrín, γ -HCH, heptacloro, y de triadimefon a partir de una matriz acuosa.

La mayor capacidad extractante observada para la fibra de DVB-CAR-PDMS puede deberse a las características de la fibra mixta, ya que el carbón adsorbente poroso (carboxen) y el polímero poroso (divinilbenceno), ofrecen grandes fuerzas de extracción para los OCPs (Li y cols., 2003). Sin embargo, esta fibra fue la que presentó las mayores variaciones, además de que mostró mayores problemas de contaminación entre extracciones, por lo que requirió periodos largos de limpieza entre corridas.

Aunque con una eficiencia menor, el comportamiento de la fibra PDMS-DVB fue similar al observado con la fibra triple. En este caso se obtuvieron además buenas recuperaciones para los HCHs y una recuperación baja para el endrín aldehído, lo cual concuerda con el reporte de Doong y cols. (2001). Esta fibra al igual que la triple, presentó altas variaciones entre análisis y contaminación entre extracciones, lo que

puede ser debido a la alta capacidad extractante del recubrimiento polimérico poroso (DVB) para compuestos volátiles.

Respecto al comportamiento que se observó para la fibra de PDMS, ésta tuvo menor eficiencia de extracción para la mayoría de los analitos de interés. La ventaja que ofrece esta fibra es que las variaciones entre análisis son menores y, ya que no presenta la alta capacidad extractante de los recubrimientos de las fibras mixtas para compuestos volátiles, la probabilidad de aparición de picos adicionales en los cromatogramas de muestras es baja y se disminuye el ruido en la línea base. Cabe mencionar además, que es la fibra empleada en la mayoría de los reportes encontrados en la literatura.

La fibra de PDMS (100 μm) fue la seleccionada para la determinación de OCPs, debido a que presentó las menores variaciones entre análisis, con la excepción del endrín aldehído cuya variación fue muy alta. Además, contrario a lo ocurrido con las fibras mixtas, fue posible establecer un proceso corto de limpieza que consistió en un paso previo de inmersión de la fibra en ACN por 5 min y seguido de una permanencia en el inyector del GC a 250 °C por 30 min.

4.2.2 Optimización de la desorción.

En general, se requieren largos periodos de tiempo y altas temperaturas para asegurar la completa desorción de los analitos a partir de la fibra. Sin embargo, para obtener una mayor eficiencia de separación, se requiere que la desorción térmica se produzca en el menor tiempo posible. Los OCPs presentan un amplio intervalo en sus puntos de ebullición y son inestables a altas temperaturas, por lo que las condiciones de desorción deben ser optimizadas para obtener buenos resultados (Li y cols., 2003). Debido a que se seleccionó la fibra de PDMS (100 μm), con la cual anteriormente se habían trabajado estos analitos en el Departamento, se utilizaron las condiciones establecidas en la tesis de licenciatura de Padilla Alonso (2006), las cuales se muestran en la tabla II-6.

4.2.3 Optimización de la extracción.

De acuerdo a los datos de la literatura, las variables que más influyen en los procesos de extracción por SPME son la cantidad de muestra, el volumen de *headspace*, la temperatura de extracción, el tiempo de equilibrio, el tiempo de extracción, la adición de alguna sal y de solventes orgánicos. Estudiar y optimizar todas estas variables en conjunto, daría como resultado un proceso muy largo y laborioso, por lo cual se decidió plantear un diseño de experimentos de tamizaje para seleccionar solo las variables que influyeran mayormente en este sistema de extracción y optimizarlas posteriormente

mediante el método simplex. El diseño utilizado fue un diseño factorial fraccionado $k-4$ (Plackett-Burmann) de 2 niveles, que incluyó 8 experimentos. Este tipo de diseño permite estimar los factores principales y asume que las interacciones de orden superior son no significativas (Montgomery, 2007); de esta manera, fue posible evaluar las 7 variables realizando un pequeño número de experimentos.

En la literatura existen reportes de la optimización de la SPME mediante diseños experimentales, en los que se ha confirmado que el proceso se agiliza debido a una disminución considerable del número de experimentos a realizar y permite identificar las variables más significativas. La principal limitación de los diseños factoriales fraccionados, es que los efectos principales pueden ser confundidos con interacciones (López y cols., 2007).

Los experimentos planteados para la selección de las variables de mayor influencia y los resultados obtenidos para estos experimentos se muestran en la tabla III-7. El análisis de los resultados se realizó mediante el cálculo del coeficiente de deseabilidad (Carro y cols., 2001), el cual facilita el manejo de la respuesta de todos los analitos. El coeficiente de deseabilidad se calcula asignando un valor de 0,0 para la respuesta menos deseada, es decir, la más baja y un valor de 1,0 para la respuesta más deseada o sea la respuesta más alta y calculando posteriormente un valor integral adimensional para cada experimento (López y cols., 2007).

En la figura III-11 se presenta el diagrama de Pareto resultante del análisis de los resultados de estos experimentos. Este tipo de representación gráfica permite determinar la influencia que tiene cada variable sobre la respuesta de los analitos estudiados, acomodándolos por orden de importancia, lo que permite establecer fácilmente las prioridades de intervención. Los diagramas de Pareto, también incluyen una línea vertical correspondiente a un nivel de confianza del 95 %. Los efectos principales que exceden esa línea pueden considerarse significativos (Fernández-Álvarez y cols., 2008).

El diagrama de Pareto (Figura III-11) mostró que ninguna de las variables tiene un efecto significativo sobre la respuesta (área), pero que las variables de mayor influencia son: el contenido de acetonitrilo, la cantidad de muestra, la temperatura de extracción y el volumen de *headspace*. La influencia observada para el contenido de acetonitrilo y para el volumen de *headspace* fue negativa.

Aunque estos resultados coinciden con lo reportado por Li y cols. (2003), que encontraron que al disminuir el volumen de *headspace* se aumenta la eficiencia de la extracción, en nuestro caso esto se atribuye a la mayor cantidad de OCPs en las muestras.

Por otro lado, se ha reportado que la adición de solventes hidrofílicos, como el acetonitrilo, promueve la liberación de los compuestos orgánicos de las muestras, aunque varios investigadores han demostrado que la presencia de altas concentraciones

de solventes orgánicos provocan una disminución significativa en la eficiencia de extracción de los analitos (Doong y cols., 2001), lo cual concuerda con la influencia negativa observada en este trabajo.

En el caso de la temperatura de extracción y de la cantidad de muestra, la influencia observada fue positiva. La temperatura de extracción tiene un doble efecto, por un lado, el incremento de la temperatura de extracción aumenta la eficiencia de la extracción de OCPs presumiblemente por la disminución del coeficiente de partición entre los OCPs y la matriz y por otro lado, aumenta la transferencia de masa y la tasa de difusión de la matriz a la solución acuosa y de ésta a la fase gaseosa (Chang y cols., 2006). En este trabajo, se observó que las temperaturas mayores favorecieron la extracción de los OCPs.

La influencia positiva observada para la cantidad de muestra contrasta con lo reportado por Doong y cols. (2001), donde al utilizar una mayor cantidad de muestra sólida disminuía la eficiencia de la extracción de los OCPs. El efecto esperado es que al aumentar la cantidad de muestra se aumente la recuperación de los analitos; sin embargo, un incremento en la cantidad de muestra, sobre todo en el caso de muestras sólidas o muy densas, impide la adecuada transferencia de los analitos al *headspace*, lo cual disminuye la eficiencia de la extracción de los mismos.

El tiempo de extracción, el contenido de cloruro de sodio y el tiempo de equilibrio tuvieron una menor influencia, siendo negativa en el caso del contenido de cloruro de sodio y del tiempo de equilibrio y positiva para el tiempo de extracción. Los resultados obtenidos en este trabajo para el contenido de cloruro de sodio son similares con los reportados por Fernandez-Álvarez y cols. (2008), que no encontró una mejora en la eficiencia de la extracción, a partir de leche entera, de los plaguicidas estudiados, los autores lo explican por la influencia negativa de la sal en la cinética del proceso de la SPME como consecuencia del aumento de la viscosidad y densidad de la muestra. En general, existe controversia sobre el efecto de la adición de cloruro de sodio, ya que se esperaría que al aumentar la fuerza iónica de la muestra, disminuyera la solubilidad de los analitos favoreciendo su paso a la fase gaseosa, aumentando así la cantidad extraída, pero los resultados reportados en la literatura no siempre lo demuestran.

Por otro lado, con la finalidad de mantener los tiempos de extracción razonablemente cortos se ha sugerido trabajar en condiciones diferentes al equilibrio, ya que las bases del modelo dinámico de HS-SPME indican que existe una relación proporcional entre la cantidad de analito extraído y su concentración inicial en la matriz (Huang y cols., 2007), por lo que no es necesario alcanzar el punto de equilibrio para un análisis preciso por SPME (Torres y cols., 2006). Así pues, al no ser una variable que tuviera una influencia mayor, se decidió seguir trabajando con las condiciones iniciales.

Es importante mencionar que al realizar estos experimentos con yogurt fue prácticamente imposible cuantificar al endrín aldehído. Este comportamiento es

explicable por la baja eficiencia de extracción de este analito observada para la fibra de PDMS (Figura III-10). Sin embargo, no se consideró necesario realizar más estudios para mejorar la recuperación de este analito ya que es un producto de la descomposición térmica del endrín que se forma durante el análisis y su formación debe ser mantenida por debajo del 15 % (EPA, 8180), por lo que las concentraciones esperadas son muy bajas. Por lo anterior, se decidió excluir al endrín aldehído del resto del trabajo.

En la segunda etapa de optimización de la extracción, se evaluó la influencia de: el contenido de acetonitrilo, la cantidad de muestra, la temperatura de extracción y el volumen de *headspace*; como se mencionó anteriormente, esto se realizó utilizando el método simplex modificado, el cual permite alcanzar los valores óptimos con menor cantidad de experimentos y con movimientos de las variables con pasos de mayor amplitud que en un método simplex básico.

Para el desarrollo de esta etapa, se mantuvieron fijas las variables que de acuerdo a los resultados tienen menor influencia en el rendimiento de la extracción. El análisis de los resultados obtenidos se realizó empleando el software Multisimplex (2.1.3, Grabitech) y se estableció la misma prioridad para todos los analitos. El diseño simplex planteó 5 experimentos iniciales y la evolución del mismo generó 7 experimentos más, todos ellos mostrados en la tabla III-8, además de las respuestas obtenidas para cada uno. Para asegurar un adecuado comportamiento del sistema de extracción y considerando las limitaciones operacionales, se tomaron como límites los valores mostrados en la tabla II-9. Durante la evolución del diseño, el programa planteó

experimentos que sobrepasaban estos límites, por lo que se les asignaron valores correspondientes a una baja respuesta.

Como puede observarse en la tabla III-8, las mejores recuperaciones se obtuvieron con los experimentos 6, 7, 8 y 12. La tendencia observada fue hacia 3 gramos de muestra, temperatura de extracción alta y volumen de *headspace* también alto; en el caso del contenido de acetonitrilo no se observó una tendencia clara.

Durante la optimización por el método simplex, contrario a lo que la teoría dice, la mayor eficiencia de extracción se observó al aumentar el volumen de *headspace*, este efecto ha sido reportado anteriormente por Padilla Alonso (2006) y Garza Tapia (2008) al analizar OCPs por HS-SPME en diferentes matrices. La mejora en la eficiencia observada al aumentar el volumen de *headspace* puede deberse a que una mayor proporción de líquidos disminuye la concentración de los analitos e incrementa la barrera de difusión de los OCPs (Doong y cols., 2001). Además, a menores volúmenes de *headspace* se favorece la condensación del vapor de agua sobre la fibra, debido a la cercanía con la superficie del líquido (Huang y cols., 2007).

De acuerdo con los resultados del diseño de experimentos simplex, las mejores condiciones de extracción fueron las que se muestran en la tabla III-9.

Aunque de acuerdo a los resultados del simplex la cantidad óptima de muestra es de 3 g, debido a que se esperan niveles bajos de los OCPs en el yogurt, se decidió evaluar la posibilidad de subir la cantidad de muestra a 4 g y con esto aumentar la probabilidad de que estos analitos sean detectados y cuantificados en muestras reales. Para ello, se realizaron extracciones utilizando 3 y 4 g de yogurt adicionando una cantidad fija de 50 μg de OCPs; los resultados obtenidos se muestran en la tabla III-10 y en la figura III-12. Para ninguno de los analitos se encontró una diferencia significativa entre las respuestas obtenidas al usar 3 o 4 g, por lo que se decidió seguir trabajando con la mayor cantidad de muestra.

Por otro lado, debido a que cuando se tiene que analizar una cantidad considerable de muestras, el tiempo de análisis se torna un factor crítico, se analizó la posibilidad de disminuir el tiempo de extracción. Para ello, se realizaron experimentos con tiempos de extracción de 45 y 60 min. Los resultados obtenidos (Figura III-13) muestran una mayor eficiencia de extracción para todos los analitos con 45 min de extracción. Como puede verse en la tabla III-11, la comparación de medias de estos experimentos mostró una diferencia significativa en la eficiencia de extracción para el heptacloro epóxido, el endosulfán I, el endrín, el p,p'-DDE, el p,p'-DDD y el p,p'-DDT. La menor eficiencia de extracción con 60 min puede deberse a que a este tiempo la contribución del proceso de desorción de los analitos ya es importante.

Las condiciones finales de extracción establecidas se muestran en la tabla III-12. La figura III-14 muestra un cromatograma obtenido para una muestra de yogurt adicionada con OCPs a un nivel de 6,25 ng/g utilizando el método de SPME-GC-MS desarrollado. En este cromatograma puede observarse que entre los 20 y 22 min se detecta una señal importante proveniente de la matriz, por lo que la cuantificación se realizó por la extracción de los cromatogramas individuales de los iones principales de cada analito.

4.3 Sensibilidad del Método de análisis de OCPs.

Aunque el método desarrollado no se validó completamente, para evaluar la aplicabilidad del método desarrollado al análisis de los OCPs de interés en yogurt, se establecieron los límites de detección y cuantificación; los resultados se muestran en la tabla III-13. Los valores obtenidos son menores a los límites máximos de residuos (LMR) recomendados por la OMS para OCPs en productos lácteos con un contenido graso mayor o igual al 2 % (Tabla I-4), lo que hace aplicable al método para el análisis de OCPs en muestras reales de yogurt.

CAPÍTULO IV**82****DISCUSIÓN****82**

4.1 Cromatografía de Gases-Masas (GC-MS). 82

4.1.1 Optimización de las condiciones de separación cromatográfica. 82**4.1.2 Validación del sistema.** 85

4.2 Microextracción en Fase Sólida. 86

4.2.1 Selección de la fibra para SPME. 87**4.2.2 Optimización de la desorción.** 90**4.2.3 Optimización de la extracción.** 90

4.3 Sensibilidad del Método de análisis de OCPs. 98

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

5.1 Conclusiones.

Se desarrolló un procedimiento de SPME-GC-MS para determinación de OCPs en yogurt cuyos límites están por debajo de los LMR establecidos por la OMS.

El método cromatográfico desarrollado permite obtener una adecuada resolución de los OCPs estudiados.

El procedimiento de SPME-GC-MS logró disminuir el tiempo y el costo de análisis por muestra para la determinación de OCPs.

Los diseños experimentales fueron una herramienta que permitió agilizar el proceso de optimización de la SPME.

5.2 Perspectivas.

Validar el método desarrollado para la determinación de OCPs en yogurt, evaluando los parámetros de linealidad, precisión, exactitud.

Probar tratamientos de muestra alternativos para eliminar interferencias de matriz.

Incluir un estándar interno adicional que presente mayor tiempo de retención y ayude a corregir el comportamiento de los analitos que eluyen al final del cromatograma.

CAPÍTULO 5	99
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	99
5.1 Conclusiones.	99
5.2 Perspectivas.	100

BIBLIOGRAFÍA

AOAC, Official Methods Analysis of AOAC International, 16 ed, 3a rev, EUA, 1997.

Capítulo 10:1-8

Albert L.; Rendon-von Osten J., Contaminación por compuestos organoclorados en algunos alimentos procedentes de una región de México, Revista Saúde Pública, 1988, 500-506.

ATSDR, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Toxicological Profile Information Sheet, Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service. Fecha de ultima actualización: Diciembre 2008. <http://www.atsdr.cdc.gov/toxpro2.html#bookmark05>

Beceiro-González E.; Concha-Graña E.; Guimaraes A.; Goncalves C.; Muniategui-Lorenzo S; Alpendurada M.F., Optimisation and validation of a solid-phase microextraction method for simultaneous determination of different types of pesticides in water by gas chromatography-mass spectrometry. Journal of Chromatography A, 2007, 1141: 165-173

Blasco, C.; Fernández, M.; Pena, A.; Lino, C.; Silveira, M. I.; Font, G.; Picó, Y., Assessment of Pesticide Residues in Honey Samples from Portugal and Spain. J. Agric. Food Chem., 2003, 51 (27): 8132–8138.

Brondi, Silvia, Lancas, Fernando., Optimization of a Methodology for the Determination of Organochlorine Pesticides in Surface Water by SPME-GC/MS, Journal of Environmental Science and Health, Part B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes, 2005, B40(4): 513-523.

Carro, A. M.; Lorenzo, R. A., Simultaneous optimization of the solid-phase extraction of organochlorine and organophosphorus pesticides using the desirability function, Analyst, 2001, 126(7): 1005-1010.

CEPIS/OPS Centro Panamericano de Ingeniería Sanitaria y ciencias del Ambiente. Curso de Autoinstrucción en diagnóstico, tratamiento y prevención de intoxicaciones agudas causadas por plaguicidas. Fecha de consulta: Mayo 2008.

CFR Part 136 Fed. Regist. Electronic Code of Federal Regulations. Fecha de última actualización: Febrero, 2009.

Chang, Sue-Min; Doong, Ruey-An., Concentration and fate of persistent organochlorine pesticides in estuarine sediments using headspace solid-phase microextraction, Chemosphere, 2006, 62(11): 1869-1878

CICOPLAFEST, Comisión Intersecretarial para el Control del Proceso y uso de Plaguicidas, Fertilizantes y Sustancias Tóxicas. Catálogo de Plaguicidas 2004.

Doong R.-A.; Liao P., Determination of organochlorine pesticides and their metabolites in soil samples using headspace solid-phase microextraction, Journal of Chromatography A, 2001, 918(1): 177-188.

EPA, Method 8081 A, 1era revision, diciembre, 1996.

EU European Comission, DG Health and Consumer Protection, Draft Annexes to Regulation 396/2005: Anexos I, II, III and IV. Fecha de consulta: Agosto 2008.
http://ec.europa.eu/sanco_pesticides/public/index.cfm

FAO/OMS, Codex Alimentarius, Residuos de los plaguicidas en los alimentos, Mayo 2008. http://www.codexalimentarius.net/mrls/pestdes/jsp/pest_q-s.jsp

Fernandez-Alvarez, M.; Llompart, M.; Lamas, J.P.; Lores, M.; Garcia-Jares, C.; Cela, R.; Dagnac, T., Development of a solid-phase microextraction gas chromatography with microelectron-capture detection method for a multiresidue analysis of pesticides in bovine milk, Analytica Chimica Acta, 2008, 617(1-2): 37-50.

Fernández-Bremauntz, A.; Yart- Ramírez, M.; Castro-Díaz, J., Las sustancias tóxicas persistentes en México, INE, SEMARNAT, México 2004. pp 17-53.

Fidalgo-Used, N.; Centineo, G.; Blanco-Gonzalez, E.; Sanz-Medel, A., Solid-phase microextraction as a clean-up and preconcentration procedure for organochlorine pesticides determination in fish tissue by gas chromatography with electron capture detection, Journal of Chromatography A, 2003, 1017(1): 35-44.

Fidalgo-Used, N.; Blanco-Gonzalez, E.; Sanz-Medel, A., Sample handling strategies for the determination of persistent trace organic contaminants from biota samples. Analytica Chimica Acta, 2007, 590(1): 1-16.

García, J., Estado actual de la contaminación por metales pesados y pesticidas organoclorados en el Parque natural de Monfragüe, Tesis Doctoral, Universidad De Extremadura, 2002.

Garza Tapia, M.; Desarrollo de un procedimiento de microextracción en fase sólida para el análisis de Plaguicidas Organoclorados en Leches, Tesis de Licenciatura, Universidad Autónoma de Nuevo León, 2006.

González-Rodríguez M.; Arrebola Liébanas F.; Garrido Frenich A.; Martínez Vidal J.; Sánchez López F., Determination of pesticides and some metabolites in different kind of milk by solid-phase microextraction and low-pressure gas chromatography-tandem mass spectrometry. Analytical Bionalytical Chemistry, 2005, 382: 164-172.

Harvey D. Química Analítica Moderna, Editorial McGraw Hill, España, 2002.

Herbert, P.; Morais, S.; Paiga, P.; Alves, A.; Santos, L, Development and validation of a novel method for the analysis of chlorinated pesticides in soils using microwave-assisted extraction-headspace solid phase microextraction and gas chromatography-tandem mass spectrometry, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2006, 384(3): 810-816.

Huang Y.; Yang Y.; Yuen Shu Y., Analysis of semi-volatile organic compounds in aqueous samples by microwave-assisted headspace solid-phase microextraction coupled with gas chromatography-electron capture detection, Journal of Chromatography A, 2007, 1140: 35-43.

Hwang B. H.; Lee M. R., Solid-phase microextraction for organochlorine pesticide residues analysis in Chinese herbal formulations, Journal of Chromatography A, 2000, 898(2): 245-256.

ICH Harmonised Tripartite Guideline, Validation Of Analytical Procedures: Methodology Q2B, Noviembre, 1996.

INE, Instituto Nacional de Ecología, Lo que usted debe saber sobre los plaguicidas.

Fecha de consulta: Mayo 2008.

Instituto Nacional de Seguridad e Higiene. Ministerio de Trabajo e Inmigración. Fichas Internacionales de Seguridad Química FISQ. Fecha de consulta: Enero 2006.
www.mtas.es/insht/ipcsnspn/Introducci.htm

Lambropoulou, D.; Konstantinou, I.; Albanis, T.; Coupling of headspace solid phase microextraction with ultrasonic extraction for the determination of chlorinated pesticides in bird livers using gas chromatography, Analytica Chimica Acta, 2006, (573-574): 223-230.

Li H.P.; Li G.C.; Jen J.-F., Determination of organochlorine pesticides in water using microwave assisted headspace solid-phase microextraction and gas chromatography, Journal of Chromatography A, 2003, 1012(2): 129-137.

Lopez, R.; Goni, F.; Etxandia, A.; Millan, E., Determination of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in human serum using headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-electron capture detection, Journal of Chromatography, B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 2007, 846(1-2): 298-305.

Lord H.; Pawliszyn J., Evolution of solid-phase microextraction technology, Journal of Chromatography A, 2000, 885(1): 153-193.

Mezcua, M.; Repetti, M. R.; Aguera, A.; Ferrer, C.; Garcia-Reyes, J. F.; Fernandez-Alba, A. R., Determination of pesticides in milk-based infant formulas by pressurized liquid extraction followed by gas chromatography tandem mass spectrometry, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2007, 389(6): 1833-1840.

Miller J. N.; Miller J. C., Estadística y Quimiometría para Química Analítica, 4ª ed. Editorial Prentice Hall, España, 2002.

Montgomery D. Control Estadístico de la Calidad, 3a ed. Editorial Limusa Wiley, México, 2007.

Montgomery D. Diseño y Análisis de Experimentos, 2a ed. Editorial Limusa, México, 2004.

NIST, National Institute of Standards and Technology, Mass Spectral Libraries, Rev.D.04.00, Octubre, 2002.

Noa M.; Pérez, N.; Gutiérrez, R.; Escobar, A., Los residuos químicos en la leche: importancia y problemática actual en México y en el mundo, N.31, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, México 2001. pp 52-59 y 129-135.

- Padilla Alonso, D., Determinación de Plaguicidas Organoclorados en tabaco por Microextracción en Fase Sólida-Cromatografía de Gases (SPME-CG), Tesis de Licenciatura, Universidad Autónoma de Nuevo León, 2006.
- Pérez-Trujillo J.P.; Frias S.; Conde J.E.; Rodriguez-Delgado M.A., Comparison of different coatings in solid-phase microextraction for the determination of organochlorine pesticides in ground water, Journal of Chromatography A, 2002, 963(1): 95-105.
- Pérez-Trujillo, J. P.; Frías, S.; Sánchez, M. J.; Conde, J. E.; Rodríguez-Delgado, M. A., Determination of organochlorine pesticides by gas chromatography with solid-phase microextraction, Chromatographia, 2002, 56(3/4): 191-197.
- Pitarch, E.; Desarrollo de metodología analítica para la determinación de plaguicidas organofosforados y organoclorados en muestras biológicas humanas, Tesis Doctoral, Universitat Jaume I, 2001.
- Prado, G.; Díaz G., Gutiérrez, R.; Vega y León, S.; Noa, M.; Chávez, E., Residuos de plaguicidas organoclorados en leche de cabra de Querétaro, Querétaro, México. Veterinaria México, 2007, 38(003): 291-301.

Prado G.; Díaz G.; Vega y León S.; González M.; Pérez N.; Urban G.; Gutiérrez R.; Ramírez A.; Pinto M., Residuos de plaguicidas organoclorados en leche pasteurizada comercializada en Ciudad de México, Archivos de Medicina Veterinaria, 1998, 30(1): 55-66.

Psillakis, E.; Kalogerakis, N., Developments in single-drop microextraction, Trac - Trends in Analytical Chemistry, 2002 , 21(1): 54-64.

Raposo Junior, J.; Re-Poppi, N., Determination of organochlorine pesticides in ground water samples using solid-phase microextraction by gas chromatography-electron capture detection, Talanta, 2007, 72(5): 1833-1841.

Routt Reigart, J.; Roberts J., Reconocimiento y manejo de los envenenamientos por pesticidas, 5a Ed., USEPA 1999.

Rubinson, K. A.; Rubinson, J. F., Análisis Instrumental, Pearson, Prentice Hall, España, 2001.

Schenck, F.; Donoghue, D., Determination of Organochlorine and Organophosphorus Pesticide Residues in Eggs Using a Solid Phase Extraction Cleanup, J. Agric. Food Chem., 2000, 48 (12): 6412–6415.

- Sherma, J.; Pesticide residue analysis (1999-2000): A review, Journal of AOAC International, 2001, 84(5): 1303-1312.
- Torres Padrón, M.; Sosa Ferrera, Z.; Santana Rodríguez, J.; Optimisation of solid-phase microextraction coupled to HPLC-UV for the determination of organochlorine and their metabolites in environmental liquid samples, Analytical Bioanalytical Chemistry, 2006, 386: 332-340.
- Vega, D.; Sosa, Z.; Santana, J., Sample Extraction Method Combining Micellar Extraction-SPME and HPLC for the Determination of Organochlorine Pesticides in Agricultural Soils, J. Agric. Food Chem., 2006, 54 (20): 7747-7752
- Waleszewski S.; Pardo V.; Waleszewski K.; Chantiri J.; Infazon R.; Rivera J., Niveles de plaguicidas organoclorados en carne y grasa de bovino procedentes de Veracruz México, Revista Internacional de Contaminación Ambiental, 1996, 12(02): 53-59.
- Yagüe, C.; Bayarri, S.; Lázaro, R.; Conchello, P.; Ariño, A.; Herrera, A., Multiresidue determination of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in milk by gas chromatography with electron-capture detection after extraction by matrix solid-phase dispersion, Journal of AOAC Internacional, 2001, 84(5): 1561-1568.

Yagüe, C.; Herrera, A.; Ariño, A.; Lázaro, R.; Bayarri, S.; Conchello, P., Rapid method for trace determination of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in yogurt, Journal of AOAC International, 2002, 85(5): 1181-1186.

Ye, C.; Zhou, Q.; Wang, X.; Improved single-drop microextraction for high sensitive analysis, Journal of Chromatography A, 2007, 1139(1): 7-13.

Zhang, M.; Huang, J.; Wei, C.; Yu, B.; Yang, X.; Chen, X., Mixed liquids for single-drop microextraction of organochlorine pesticides in vegetables. Talanta, 2008, 74: 599-604.

APÉNDICE A

A.1 Contraste F para la comparación de desviaciones estándar.

Este tipo de contraste considera la razón de las dos varianzas muestrales, es una prueba realizada para comparar si dos desviaciones estándar difieren significativamente.

El estadístico F se calcula:

$$F = \frac{s_1^2}{s_2^2}$$

Donde:

s^2 es la varianza de cada tratamiento

1 y 2 se disponen en la ecuación de modo que F sea siempre ≥ 1 .

El número de grados de libertad del numerador y del denominador se calculan:

$$gl_1 = n_1 - 1 \qquad gl_2 = n_2 - 1$$

Donde:

n_1 es el número de observaciones del tratamiento 1

n_2 es el número de observaciones del tratamiento 2

Se considera que no hay diferencia significativa si $F_{cal} < F_{crit}$

A.2 Prueba t para la comparación de medias experimentales con varianzas iguales.

Para decidir si la diferencia entre dos medias muestrales es significativa, se calcula el estadístico de t_{cal} , aplicando la siguiente ecuación:

$$t_{cal} = \frac{\bar{x}_a - \bar{x}_b - 0}{s_p \sqrt{\frac{1}{n_a} + \frac{1}{n_b}}}$$

Donde:

n_a y n_b son el número de observaciones por tratamiento.

\bar{x}_a y \bar{x}_b son las medias de cada tratamiento realizado.

s_a^2 y s_b^2 son las varianzas de cada tratamiento.

s_p viene dado por:

$$s_p = \sqrt{\frac{(n_a - 1)s_a^2 + (n_b - 1)s_b^2}{n_a + n_b - 2}}$$

Los grados de libertad se calcularon en base a la siguiente ecuación:

$$gl = n_a + n_b - 2$$

Se considera que no hay diferencia significativa entre los experimentos si $-t_{crit} < t_{cal} < t_{crit}$.

A.3 Prueba t para la comparación de medias experimentales con varianzas diferentes.

Para decidir si la diferencia entre dos medias muestrales es significativa, se calcula el estadístico de t_{cal} , aplicando la siguiente ecuación:

$$t_{cal} = \frac{\bar{x}_a - \bar{x}_b - 0}{\sqrt{\frac{s_a^2}{n_a} + \frac{s_b^2}{n_b}}}$$

Donde:

n_a y n_b son el número de observaciones por tratamiento

\bar{x}_a y \bar{x}_b son las medias de cada tratamiento realizado

s_a^2 y s_b^2 son las varianzas de cada tratamiento

Los grados de libertad se calcularon en base a la siguiente ecuación:

$$gl = \left[\frac{\left(\frac{s_a^2}{n_a} + \frac{s_b^2}{n_b} \right)^2}{\frac{\left(\frac{s_a^2}{n_a} \right)^2}{n_a + 1} + \frac{\left(\frac{s_b^2}{n_b} \right)^2}{n_b + 1}} \right] - 2$$

Se considera que no hay diferencia significativa entre los experimentos si $-t_{crit} < t_{cal} < t_{crit}$.

APÉNDICE B. Comparación de los espectros de masas de los 16 OCPs de estudio con lo reportado en literatura.

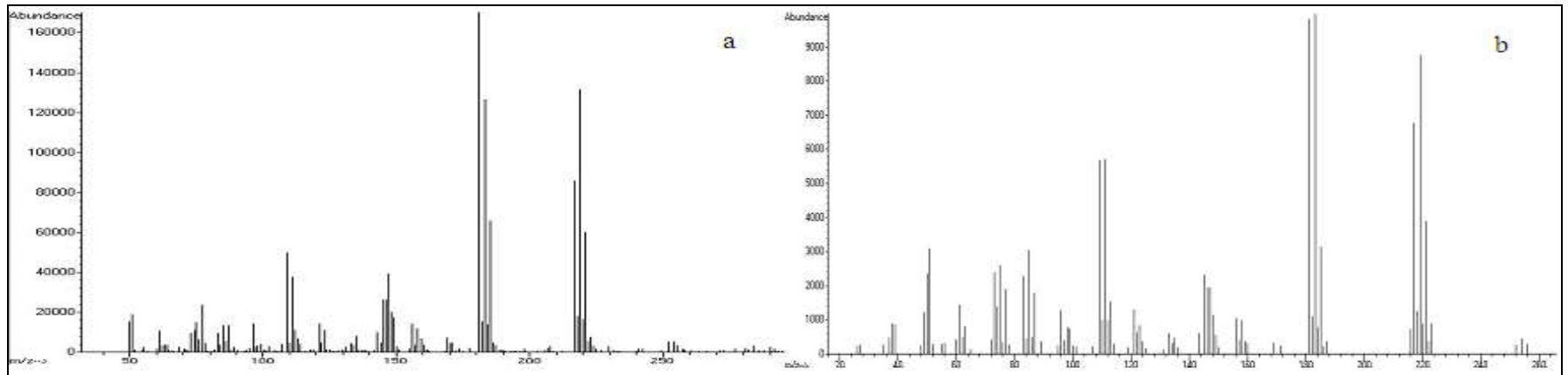


Figura B- 1. α -HCH. a) Espectro obtenido a partir del estándar de 0,5 $\mu\text{g/mL}$, b) Espectro obtenido de la biblioteca NIST.

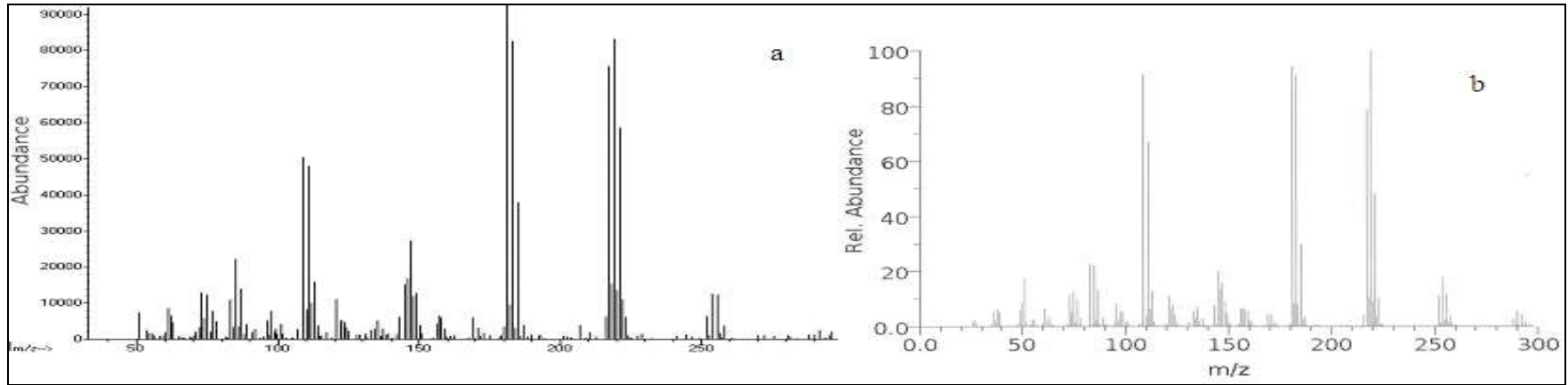


Figura B- 2.β-HCH. a) Espectro obtenido a partir del estándar de 0,5 µg/mL, b) Espectro obtenido de la biblioteca NIST.

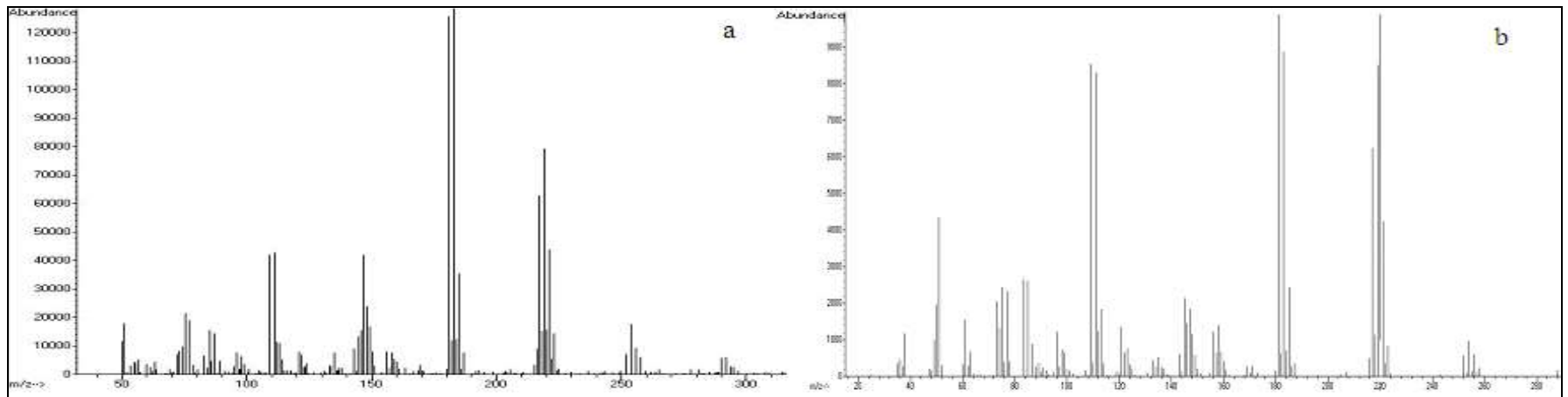


Figura B- 3. γ-HCH. a) Espectro obtenido a partir del estándar de 0,5 µg/mL, b) Espectro obtenido de la biblioteca NIST.

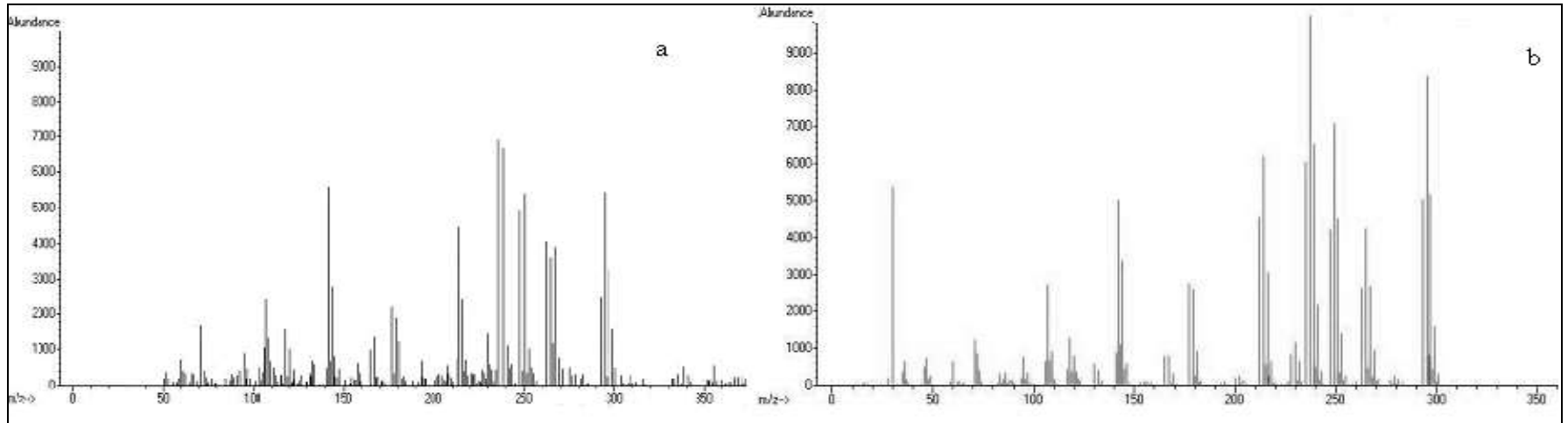


Figura B- 4. PCNB. a) Espectro obtenido a partir del estándar de 0,5 µg/mL, b) Espectro obtenido de la biblioteca NIST.

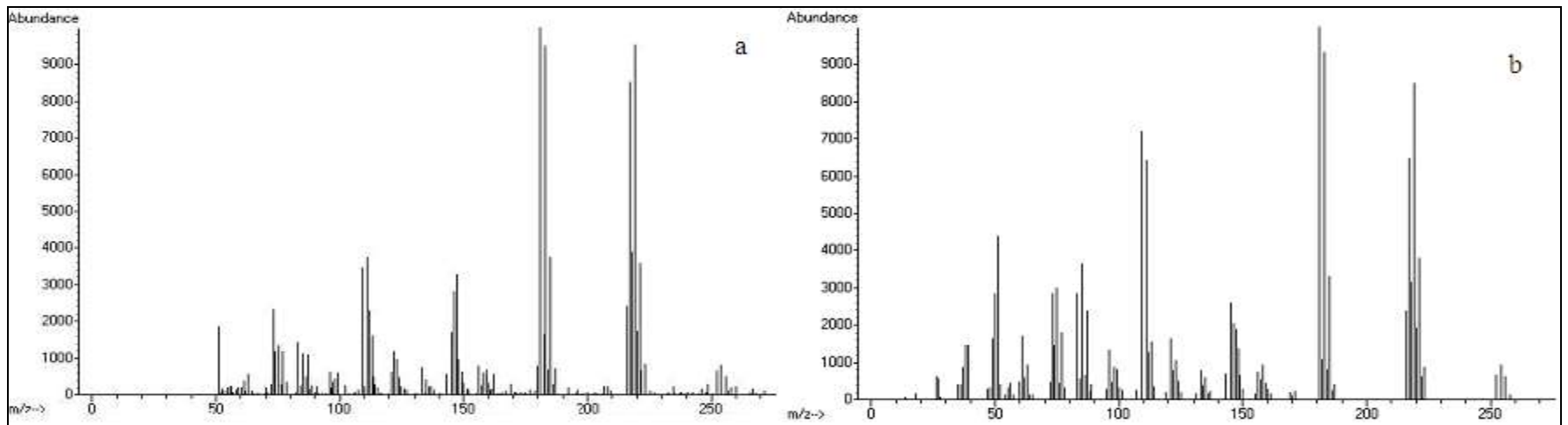


Figura B- 5. δ-HCH. a) Espectro obtenido a partir del estándar de 0,5 µg/mL, b) Espectro obtenido de la biblioteca NIST.

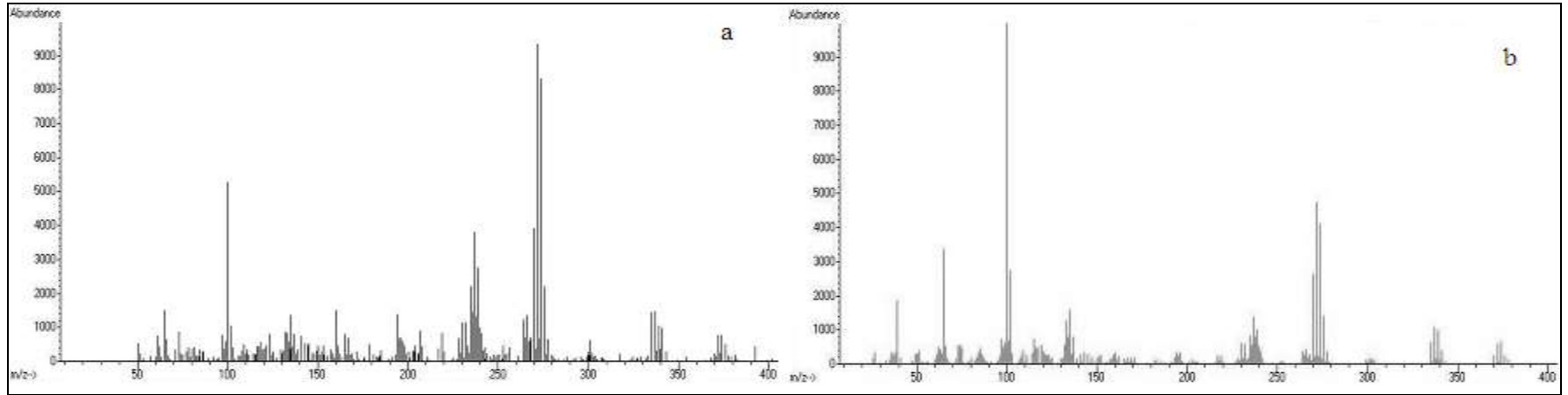


Figura B- 6. Heptachloro. a) Espectro obtenido a partir del estándar de 0,5 µg/mL, b) Espectro obtenido de la biblioteca NIST

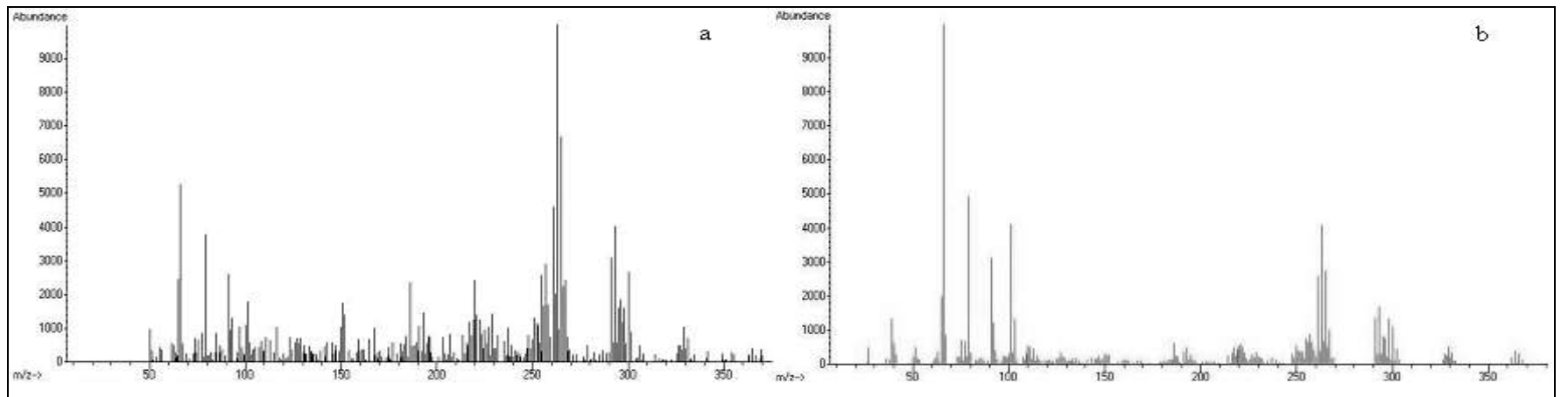


Figura B- 7. Aldrin. a) Espectro obtenido a partir del estándar de 0,5 µg/mL, b) Espectro obtenido de la biblioteca NIST.

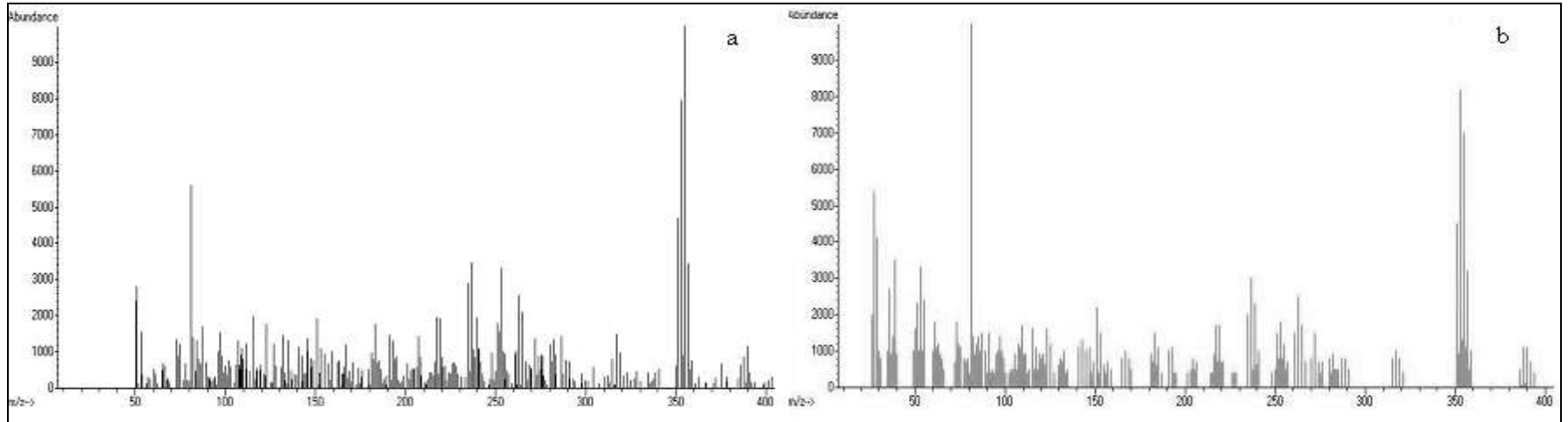


Figura B- 8. Heptacloro epóxido. a) Espectro obtenido a partir del estándar de 0,5 µg/mL, b) Espectro obtenido de la biblioteca NIST.

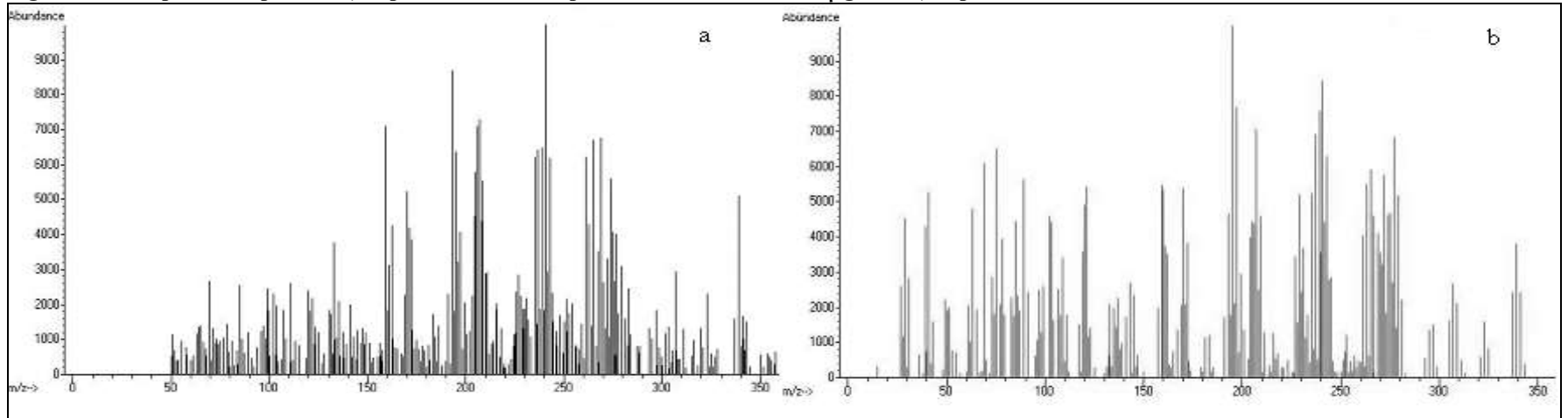


Figura B- 9. Endosulfán I. a) Espectro obtenido a partir del estándar de 0,5 µg/mL, b) Espectro obtenido de la biblioteca NIST.

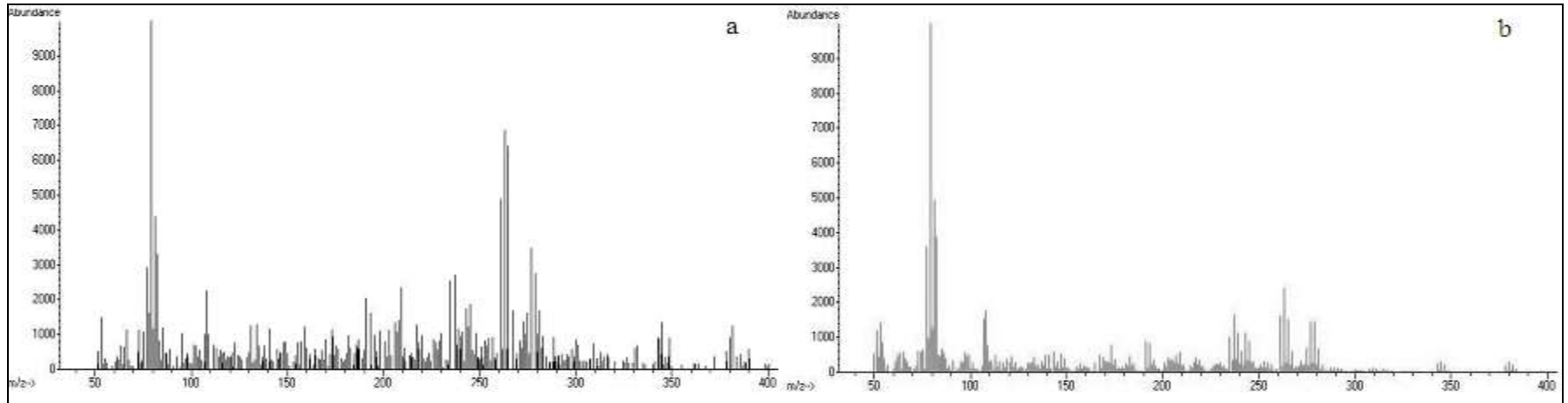


Figura B- 10. Dieldrín. a) Espectro obtenido a partir del estándar de 0,5 µg/mL, b) Espectro obtenido de la biblioteca NIST.

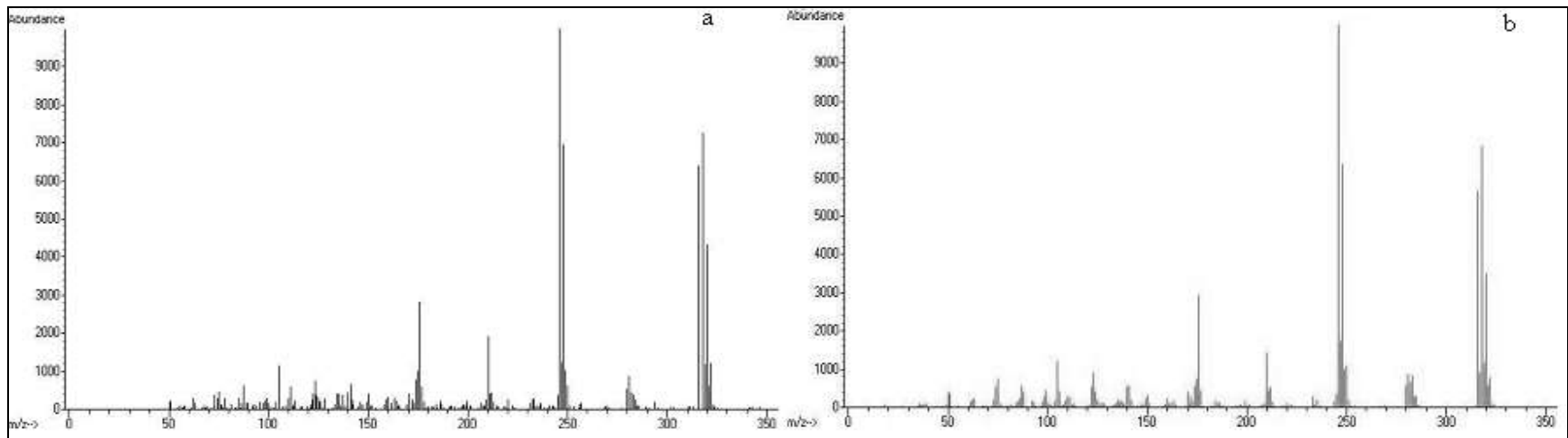


Figura B- 11. p,p'-DDE. a) Espectro obtenido a partir del estándar de 0,5 µg/mL, b) Espectro obtenido de la biblioteca NIST.

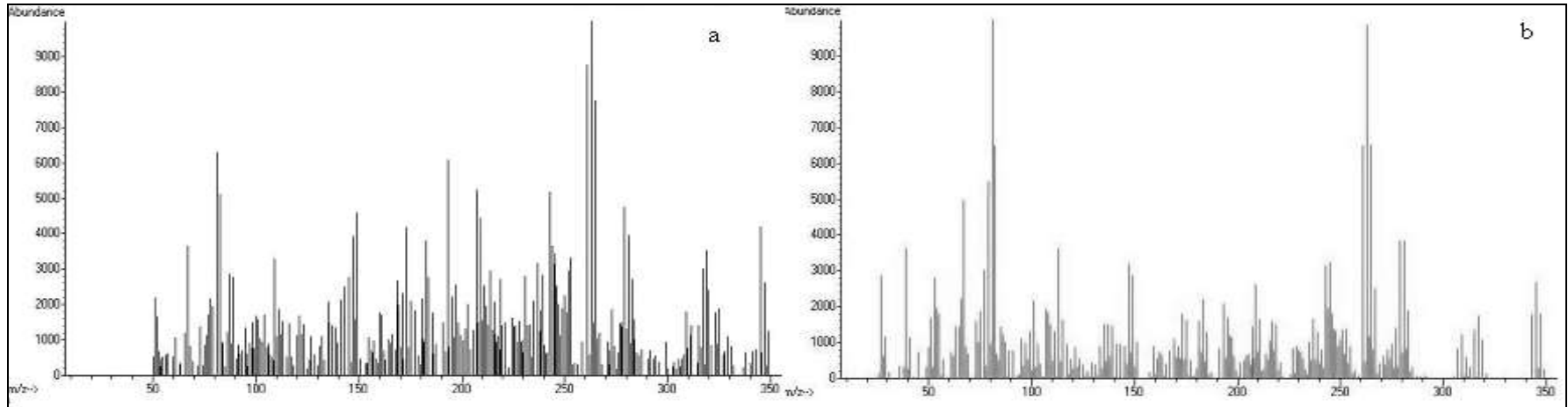


Figura B- 12. Endrín. a) Espectro obtenido a partir del estándar de 0,5 µg/mL, b) Espectro obtenido de la biblioteca NIST.

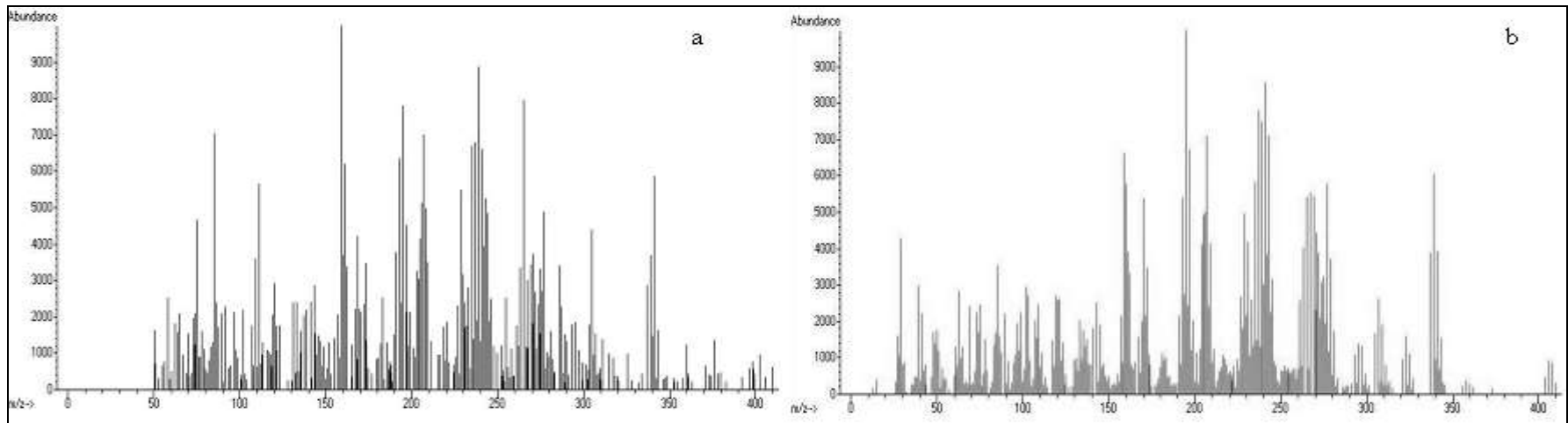


Figura B- 13. Endosulfán II. a) Espectro obtenido a partir del estándar de 0,5 µg/mL, b) Espectro obtenido de la biblioteca NIST.

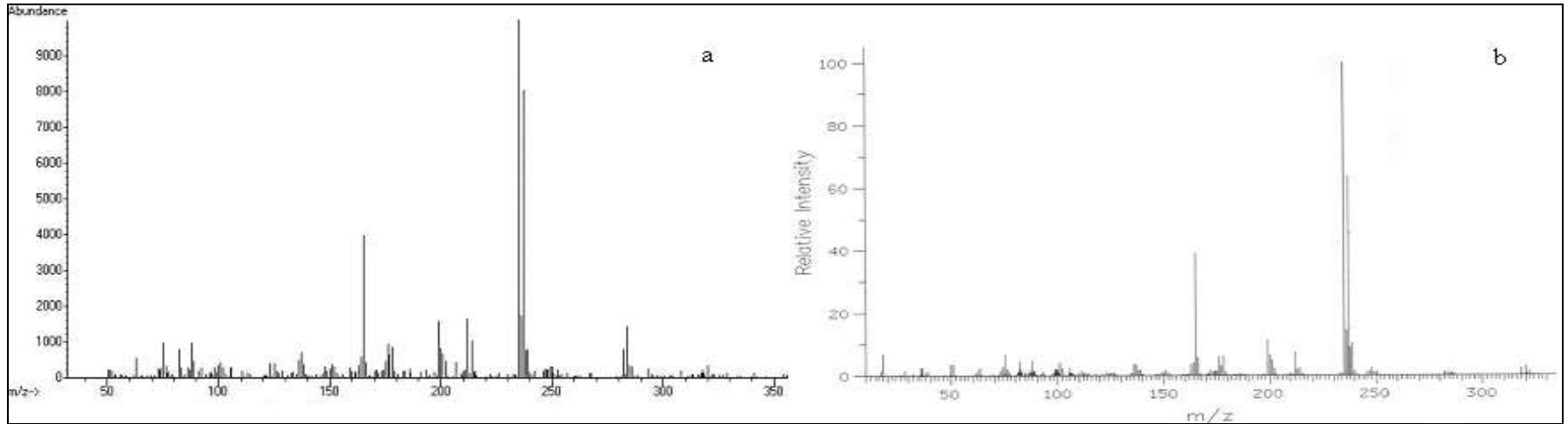


Figura B- 14. p,p'-DDD. a) Espectro obtenido a partir del estándar de 0,5 µg/mL, b) Espectro obtenido de la biblioteca NIST.

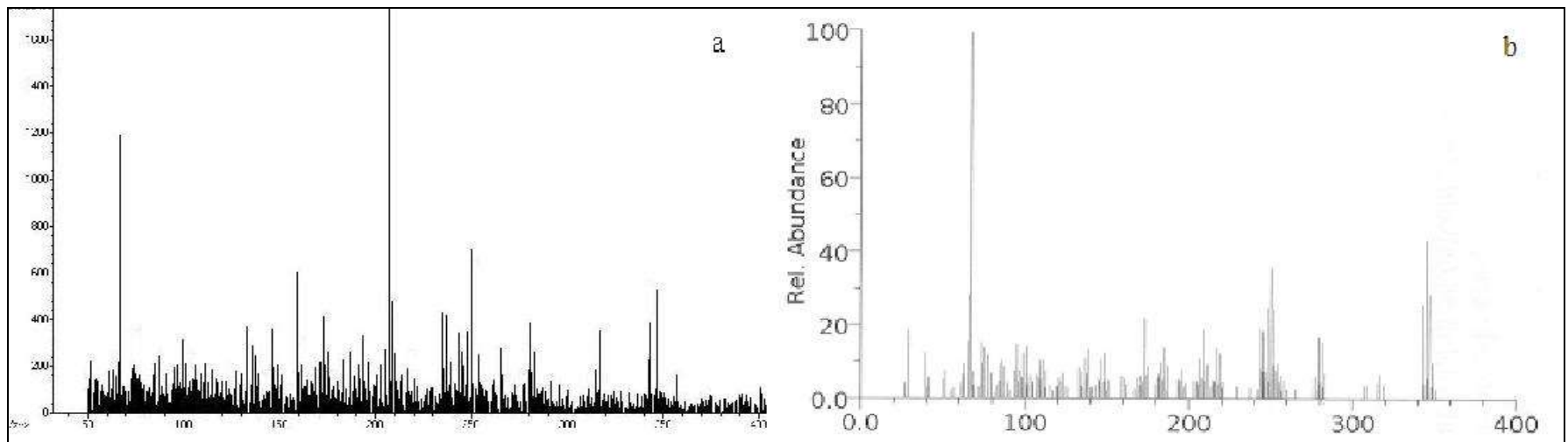


Figura B- 15. Endrín Aldehído. a) Espectro obtenido a partir del estándar de 0,5 µg/mL, b) Espectro obtenido de la biblioteca NIST.

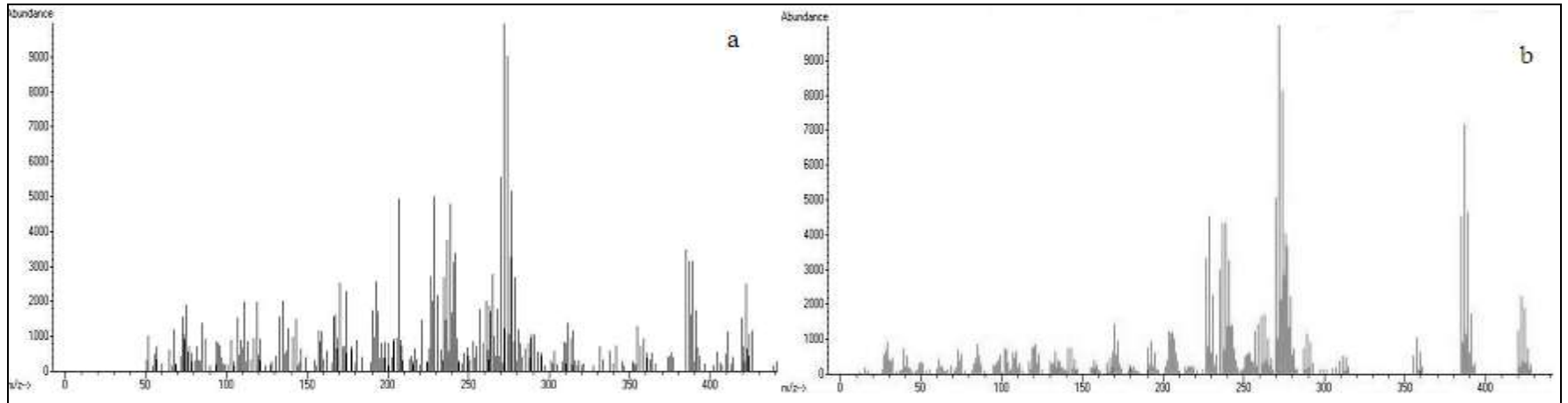


Figura B- 16. Endosulfán sulfato. a) Espectro obtenido a partir del estándar de 0,5 µg/mL, b) Espectro obtenido de la biblioteca NIST.

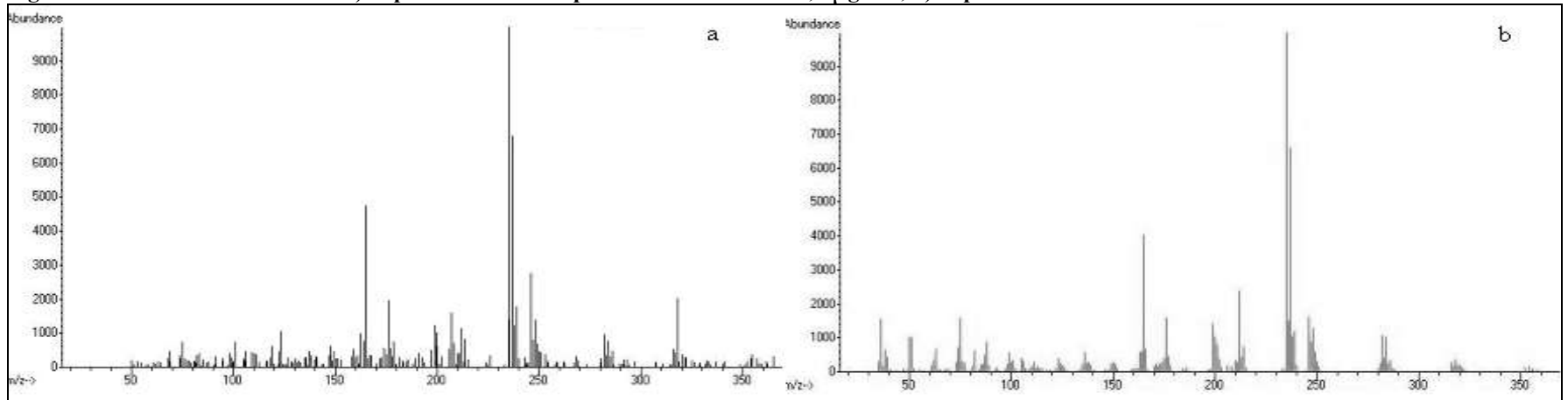


Figura B- 17. p,p'-DDT. a) Espectro obtenido a partir del estándar de 0,5 µg/mL, b) Espectro obtenido de la biblioteca NIST.

*The whole of science is nothing more than a
refinement of everyday thinking.*

Albert Einstein

APÉNDICE A	112
A.1 Contraste F para la comparación de desviaciones estándar.	112
A.2 Prueba t para la comparación de medias experimentales con varianzas iguales.	113
A.3 Prueba t para la comparación de medias experimentales con varianzas diferentes.	114
APÉNDICE B. COMPARACIÓN DE LOS ESPECTROS DE MASAS DE LOS 16 OCPS DE ESTUDIO CON LO REPORTADO EN LITERATURA.	115