



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

DESARROLLO DE UNA METODOLOGIA PARA LA
DETERMINACION DE ESTERES DE FTALATO EN LECHE Y
DERIVADOS

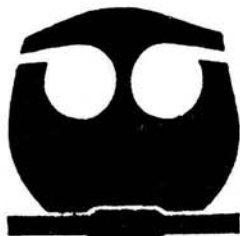
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO DE ALIMENTOS

P R E S E N T A :

MIGUEL ANGEL LUNA MARTINEZ



MEXICO, D. F.



2004

EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado asignado:

Presidente	Lucia Hernández Garcíadiego
Vocal	José Mariano García Garibay
Secretario	Araceli Patricia Peña Álvarez
1 ^{er} Suplente	Laura Patricia Pérez Cacep
2 ^o Suplente	Carlos Manuel Shelly Álvarez-Tostado

Lugar donde se desarrollo el tema: Laboratorio 101 DEPg, Edificio B de la Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México.

Asesor del Tema: Araceli Patricia Peña Álvarez



Supervisor Técnico: Reyna del Carmen Labastida Rubio



Sustentante: Miguel Angel Luna Martínez



*Para Gloria, Cuca y Lucila
por enseñarme que las cosas
más bellas en el mundo no pueden
verse ni tocarse... pero se sienten
en el corazón*

AGRADECIMIENTOS

- ❖ A **Dios** ya que el sentimiento religioso cósmico es la motivación más fuerte y noble para la investigación científica.
- ❖ A mis padres **Gloria** (mamá 1) y **Sergio** por entregarme su amor, comprensión y apoyo en cada momento de mi existencia..
- ❖ A mis hermanos **Julio Cesar, Luis Enrique y Oscar** las personas que más amo, y a **Inés** por hacer mas grande la familia con **Cesar**.
- ❖ A mis abuelos **Cuca** (mamá 2) y **Juan** por ser las personas más nobles que he conocido, de igual manera a **Estela** y a mi bisabuela **Rosita**
- ❖ A mi tía **Lucila** (mamá 3) por todo el apoyo que he recibido de ella así como a mi tíos **Felipe** y **Patricia** a mis primos **Juan Felipe, Alejandra y Filiberto** por ser una familia.
- ❖ Al **H. Jurado** por su disponibilidad y por sus atinados comentarios que contribuyeron de gran manera para enriquecer este trabajo.
- ❖ A la Dra. **Araceli** por su constancia, disciplina y paciencia ya que creo deberle lo mejor de mi experiencia profesional. Por ello, ante todo, mi reconocimiento a la doctora **Araceli**, bajo cuya dirección he logrado avanzar en el cumplimiento de una etapa más.
- ❖ A la Maestra **Carmen** por ser la persona más dulce que comparte su experiencia con todo aquel que pasa por el laboratorio 101 y por tener siempre alguna palabra de aliento cuando las cosas parecen ir mal.
- ❖ A los integrantes del **H. Laboratorio 101 Andrés, Laura, Thalina, Alejandra, Mario, Nacho, Hipócrates, Jilda, Claudia, Roció** por su compañerismo y por compartir su tiempo.
- ❖ A mis profesores de la facultad con especial énfasis en Francis, Alejandro, los Juanes, Yolanda, Patricia, Juan, Lucy, Lulú, Zoila.
- ❖ A mis amigos Toño, Manuel, Genaro, Marco, francisco, Chucho, Benjamín, Polo, William Liliana, Cata, Patricia, Adriana, Selene, Tania, Isela, Elizabeth, Francia, Faviola, Elena por compartir momentos muy agradables.

A cada uno de ustedes y a ti que sin intención olvide gracias



INDICE

RESUMEN

RESUMEN	2
---------	---

CAPITULO I

INTRODUCCIÓN

1.1 INTRODUCCIÓN	4
------------------	---

CAPITULO II

ANTECEDENTES

2.1 POLÍMEROS Y PLASTIFICANTES	7
2.1.1 El plástico en la industria de los alimentos	7
2.1.2 Plastificantes	7
2.1.3 Interacciones Producto-Envase	9
2.2 FTALATOS	9
2.3 LECHE Y PRODUCTOS LACTEOS	12
2.3.1 Leche	12
2.3.2 Yoghurt	13
2.3.3 Yakult	14
2.4 EXTRACCIÓN	14
2.5 MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA (MEFS)	15
2.5.1 Variables que afectan al proceso de MEFS	19
2.5.2 Fibras utilizadas en MEFS	20

CAPITULO III

PARTE EXPERIMENTAL

3.1 MATERIALES Y REACTIVOS	24
3.2 MUESTRAS	25
3.3 LIMPIEZA DEL MATERIAL DE VIDRIO	25
3.4 DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES CROMATOGRAFICAS	26



3.5 ACONDICIONAMIENTO DE LAS FIBRAS	27
3.6 DETERMINACIÓN DE FTALATOS EN LECHE	27
3.7 DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE FTALATOS EN YOGHURT	33
3.8 DETERMINACIÓN DE FTALATOS EN YAKULT	35

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 DETERMINACION DE LAS CONDICIONES CROMATOGRAFICAS	38
4.2 TIEMPO DE DESORCION	39
4.3 DETERMINACIÓN DE FTALATOS EN LECHE	41
4.4 DETERMINACIÓN DE FTALATOS EN YOGHURT	56
4.5 DETERMINACIÓN DE FTALATOS EN YAKULT	63

CAPITULO V

CONCLUSIONES

5.1 CONCLUSIONES	67
------------------	----

CAPITULO VI

BIBLIOGRAFÍA

6.1 BIBLIOGRAFÍA	70
------------------	----

ANEXOS	74
--------	----

RESUMEN



RESUMEN

Los plásticos o polímeros forman parte de nuestra vida cotidiana; sus aplicaciones no cesan de crecer, entre éstas se encuentran los empaques y los envases, los cuales son utilizados en la industria alimentaria. Entre los aditivos que se añaden a los plásticos para conferirles elasticidad se encuentran los plastificantes, y los más comunes son los ftalatos. Sin embargo, al no estar químicamente ligados los ftalatos a la matriz plástica pueden abandonar el material plástico. Varios estudios indican que los ftalatos pueden estar asociados con propiedades carcinogénicas y con disrupción endócrina.

Este trabajo consistió en desarrollar una metodología para la determinación de ftalatos en leche y algunos derivados. El método que se propuso fue por Microextracción en Fase Sólida- Cromatografía de Gases- Espectrometría de Masas (MEFS-CG-EM). Se optimizó la técnica de Microextracción en Fase Sólida; la optimización consistió en establecer los parámetros de temperatura de extracción, tiempo de desorción y tiempo de extracción. Se analizaron diferentes muestras de leche y derivados identificándose el dibutil ftalato en todas las muestras, así como la presencia del dietil-hexil ftalato en algunas de ellas. La identificación de los ftalatos en las muestras se realizó por espectrometría de masas y por comparación con estándares. Se cuantificaron los ftalatos presentes en las muestras encontrándose que la concentración determinada está por debajo de los límites reportados.

CAPITULO I

INTRODUCCIÓN



1.1 INTRODUCCION

El consumo de plástico como material de empaque, envase y embalaje, se ha venido incrementando a nivel mundial por razones muy sencillas, como el costo, que es generalmente más económico que otros materiales de empaque utilizados tradicionalmente, resistencia de envasado a altas temperaturas, barrera a gases como O_2 y CO_2 , etc. En ocasiones los productos o alimentos pueden ser alterados por el mismo envase, si bien es cierto que los materiales que se utilizan con este propósito han sido aprobados por los organismos oficiales de cada nación; aún así, es conveniente saber que en cada tipo de material se presentan diferentes elementos que migran o pueden migrar al producto. Es en los plásticos donde se presenta un mayor número de posibles interacciones de migración, ya que en los procesos de polimerización y en los procesos de formación de los envases son utilizados diferentes compuestos con el fin de impartirles características especiales; de entre los diferentes compuestos que pueden migrar al producto se encuentran: monómeros residuales, antioxidantes, lubricantes, catalizadores, modificadores de la viscosidad, retardadores a la flama y plastificantes^{1, 2} entre otros. Estas migraciones suelen impartir olor y sabor a los productos y en otros casos ponen en riesgo la salud del consumidor, ya que algunos de estos elementos son considerados cancerígenos y algunos pueden estar asociados con disrupción endócrina³⁻⁵ cuando se presenta una migración excesiva de éstos.



Los ftalatos, comúnmente utilizados como plastificantes, son solubles en matrices con alto contenido de grasa como la leche y algunos derivados, y si los envases que se emplean para contener estos productos utilizan este tipo de plastificantes, es probable que éstos migren del envase al alimento.

Existen varios estudios que han indicado que los ftalatos podrían estar relacionados con diferentes alteraciones observadas en el sistema endócrino y reproductor de algunos seres vivos³⁻⁵. En consecuencia, algunos de los ftalatos más utilizados han sido incluidos en las listas de contaminantes prioritarios de algunos organismos de protección ambiental, por ejemplo, la Agencia Americana de Protección Ambiental⁶ (EPA) y la Unión Europea⁷ (UE). Hasta el momento sólo se han realizado investigaciones para la determinación de estos compuestos en agua⁸⁻¹², por lo que es importante realizar su determinación en alimentos.

CAPITULO II

ANTECEDENTES



2.1 POLÍMEROS Y PLASTIFICANTES

2.1.1 El plástico en la industria de los alimentos

El uso del plástico como material de envase y empaque ha aumentado a nivel mundial en gran parte debido a que su costo es mucho más económico que otros materiales de empaque y envase utilizados tradicionalmente. El desarrollo de diferentes materiales plásticos, con características físicas de resistencia mecánica, apariencia y barrera a gases ha permitido que cada vez un mayor número de productos recurran a su utilización haciendo énfasis en la industria de los alimentos. Los envases de plástico en comparación con los de vidrio o las latas, ofrecen resistencia de envasado a altas temperaturas, alta barrera de humedad y barrera a gases como O_2 , CO_2 y brindan más beneficios al consumidor final, como un manejo más seguro del producto en comparación a la fragilidad del vidrio o la posible degradación o descomposición de los alimentos sin la posibilidad de verificar su vigencia sólo hasta abrir el envase, como es el caso de las latas.

2.1.2 Plastificantes

Los polímeros pueden ser clasificados en dos tipos de acuerdo a sus propiedades mecánicas: hules y termoplásticos. Los primeros son polímeros suaves y elásticos, en cambio, los termoplásticos son plásticos rígidos.

Los termoplásticos al ser calentados alcanzan un punto a partir del cual se vuelven hules. Esta temperatura es llamada temperatura de transición vítrea (T_g).



Existe una alternativa para obtener polímeros con propiedades intermedias a las del termoplástico y del hule; ésta consiste en añadir al termoplástico cierta cantidad de moléculas entre las cadenas poliméricas, lo que provoca el aumento en su movilidad. Estas pequeñas moléculas de aditivo son llamadas plastificantes.

Un plastificante es aquella sustancia no reactiva que se le añade al termoplástico para aumentar su flexibilidad. Un plastificante tiene como efecto principal abatir la temperatura de Tg. Los plastificantes son moléculas orgánicas de bajo peso molecular y que presentan una Tg próxima a los -50°C . Dos requisitos que una sustancia debe cumplir para ser utilizada como plastificante son baja Tg y miscibilidad completa o al menos parcial en el plástico huésped. El problema con los plastificantes de alta eficiencia es que normalmente no son completamente solubles en la matriz y tienden a difundirse en tiempos relativamente cortos. A los plastificantes que son susceptibles de migrar se les llama de baja permanencia. La migración del plastificante produce dos problemas: problemas ambientales y a la salud; y pérdida de las propiedades plásticas del material¹³.

Entre los plastificantes se encuentran los del tipo de ésteres de ácido ftálico o ftalatos, diéster alifático, trimetilato de trialquilo, fosfato de trialquilo. Los más utilizados son los ftalatos debido a que su precio es en comparación a los otros plastificantes más bajo.



2.1.3 Interacciones Producto-Envase

En ocasiones los productos pueden ser alterados por el mismo envase seleccionado o por una falta de protección del mismo. Se debe partir del hecho de que son varios los elementos que pueden interactuar entre sí, estos son: el producto mismo, el envase, el aire contenido en el envase y finalmente el medio ambiente. Estas interacciones pueden clasificarse en tres grupos básicamente: permeación, absorción y migración. Los materiales que se utilizan para envase han sido aprobados por los organismos oficiales de cada nación, por ejemplo la Administración para Alimentos y Medicamentos (FDA) de los Estados Unidos encargada de establecer regulaciones para los productos alimenticios y sus derivados; aun así, es conveniente saber que en cada tipo de material se presentan diferentes elementos que pueden migrar al producto.

2.2 FTALATOS

Los ftalatos consisten en pares de ésteres sobre un anillo de benceno; estos compuestos se utilizan como plastificantes en la manufactura de muchos plásticos, sobre todo del cloruro de polivinilo (PVC), por lo que su uso actualmente está muy extendido¹⁴. Otros usos de los ftalatos son: tintas, barnices, aditivos de aceites lubricantes, en la industria cosmética, como ingredientes inertes en plaguicidas, perfumes, jabones, detergentes, durante el proceso de manufactura del papel y en películas fotográficas.



Los ftalatos principalmente utilizados como plastificantes en la fabricación de envases para alimentos son: dietil-hexil ftalato (DEHF), dibutil ftalato (DBF), butilbencil ftalato (BBF), di-isononil ftalato (DINF).

La utilización de algunos de los ftalatos está en controversia debido a que varios estudios han indicado que podrían estar relacionados con diferentes alteraciones observadas en el sistema endocrino y reproductor de algunos seres vivos. En la Agencia Americana de Protección Ambiental (EPA) se establece que la concentración máxima admisible (MAC) en agua de consumo para el DEHF, el ftalato más utilizado, es de 6 µg/L. La Unión Europea en cambio, aún no ha establecido ninguna concentración máxima permitida para esta familia de compuestos, aunque ya ha incluido algunos de ellos en la lista de contaminantes prioritarios.

Se ha estudiado la toxicidad de los ftalatos sólo en animales de laboratorio; estos compuestos han mostrado ser tóxicos principalmente por su acción carcinogénica y su capacidad de producir disrupción endócrina masculina debido a su acción antiandrogénica que actúa directamente sobre la testosterona^{4,15}; pero actualmente no hay evidencia contundente que permita concluir sobre su toxicidad en seres humanos.

Como consecuencia de esto ha habido controversia sobre el uso de ftalatos; a principios de 1999 la Comisión Europea pidió a los estados miembros que prohibieran la comercialización de determinados juguetes y artículos de puericultura hechos con PVC¹⁶ (hasta conocer la cantidad de ftalatos que pudieran



migrar de los juguetes y demostrar los efectos que ocasionan los ftalatos en la salud) esto impulsado porque habría la posibilidad de que los niños se metieran los juguetes a la boca y al chuparlos podrían desprenderse los ftalatos de la matriz plástica; En Estados Unidos sucedió lo mismo y las grandes jugueterías han retirado del mercado los juguetes hechos con PVC. En México, la Secretaría de Salud recibió recomendaciones de organizaciones no gubernamentales para modificar la norma relacionada con la fabricación de juguetes.

La Consumer Product Safety Comisión (CPSC) estableció un nivel internacional de ingesta diaria de ftalatos que como mediada de seguridad fue de 100 veces más bajo del que no causa ningún problema en animales de laboratorio siendo de 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso/día y 70 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso/día para efectos carcinogénicos y endocrinos respectivamente¹⁷.

Sin embargo, la exposición a ftalatos por la vía de los alimentos contenidos en envases plásticos también es posible, debido a que se favorece la migración en medios orgánicos.

En la Tabla I se muestra las estructuras químicas de los ftalatos más comunes y utilizados en la investigación

TABLA I. FTALATOS

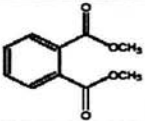
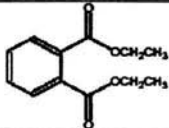
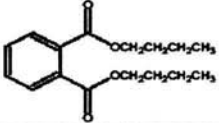
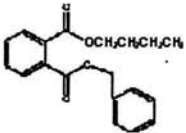
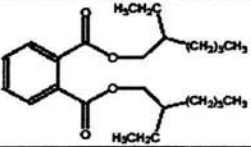
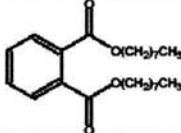
NOMBRE	ESTRUCTURA	IONES CARACTERÍSTICOS (m/z)
Dimetil ftalato (DMF) PM:194 $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_4$		163,194



TABLA I. FTALATOS

NOMBRE	ESTRUCTURA	IONES CARACTERÍSTICOS (m/z)*
Dietil ftalato (DEF) PM:222 C ₁₂ H ₁₄ O ₄		149,177
Dibutil ftalato (DBF) PM:278 C ₁₆ H ₂₂ O ₄		205, 223
Butilbencil ftalato (BBF) PM:318 C ₁₉ H ₂₆ O ₄		149,91
Dietil-hexil ftalato (DEHF) PM:390 C ₂₄ H ₃₈ O ₄		149,167
Diocil ftalato (DOF) (DEHF) PM:390 C ₂₄ H ₃₈ O ₄		149,279

*La Espectrometría de masas es una técnica analítica basada en la posibilidad de separar especies moleculares según su masa, o más propiamente, de acuerdo con la razón masa a la carga m/z. En la ionización por impacto electrónico, se bombardea la molécula con un haz de electrones de alta energía. Un electrón de este tipo puede arrancar un electrón de un enlace, creando un catión radical.

2.3 LECHE Y PRODUCTOS LACTEOS

2.3.1 Leche

La leche se define como la secreción de la glándulas mamarias de las vacas sin calostro, que se obtiene del ordeño manual o mecánico de una o mas



vacas¹⁸. Cuando la leche provenga de otra especie distinta a la vaca se debe de indicar el nombre de la especie.

La leche es uno de los pilares de la dieta del ser humano porque tiene un alto contenido de proteínas de alta calidad que proporcionan los diez aminoácidos esenciales, contribuye a la ingesta calórica diaria total, como también, aporta ácidos grasos esenciales, inmunoglobulinas, y otros micronutrientes¹⁹.

En la Tabla II se muestra la composición de la leche por cada 100 gramos.

TABLA II. COMPOSICIÓN DE LA LECHE

NUTRIENTE	POR CADA 100g DE LECHE
Agua(g)	88
Proteína(g)	3.2
Grasa(g)	3.4
Lactosa(g)	4.7
Minerales(g)	0.7
Energía, Kcal.	61

2.3.2 YOGHURT

El yoghurt natural se define como el producto lácteo preparado a partir de leche entera, parcial o totalmente descremada, enriquecida en extractos secos por medio de la concentración de ésta o agregando leche en polvo, tratada térmicamente y coagulada biológicamente por la fermentación obtenida de la siembra en simbiosis de los fermentos lácteos *Lactobacillus delbruekii subsp. bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*²⁰.

En la Tabla III se muestra las especificaciones físicas y químicas que tiene que cumplir el yoghurt según la norma NMX-f-444-1983.



TABLA III. CARACTERÍSTICAS DEL YOGHURT

ESPECIFICACIONES	Subtipo a Leche entera		Subtipo b Leche parcialmente descremada		Subtipo c Leche descremada	
	Min	Max	Min	Max	Min	Max
Grasa %	2.5	—	1.0	—	—	0.5
Sólidos no grasos de leche %	10.5	—	12.0	—	12.5	—
Acidez en ácido láctico %	0.8	1.8	0.8	1.8	0.8	1.8
Proteína %	3.2	—	3.4	—	3.6	—
Humedad %	—	87	—	87	—	87
pH menor de	4.5		4.5		4.5	

2.3.3 YAKULT

En 1930 el Doctor Minoru Shirota aisló lactobacilos a partir del intestino humano y tras varias investigaciones y selecciones logró fortalecerlos, haciéndolos resistentes a los jugos gástricos y biliares, los nombró *Lactobacillus casei* Shirota en honor a su nombre, siendo éste un lactobacilo que puede sobrevivir en el tracto digestivo e inhibir el crecimiento de bacterias nocivas. Posteriormente, el Doctor Minoru Shirota se dedicó a desarrollar una bebida láctea a la que le pudiera adicionar el *L. casei* Shirota; así, en 1935 surgió la bebida láctea fermentada Yakult; este producto contiene cepas de *Lactobacillus casei* que han mostrado su eficacia frente a infecciones intestinales en niños producidas por rotavirus, y tienen efectos antitumorales en ratón²¹.



2.4 EXTRACCIÓN

Para poder llevar a cabo el análisis de un determinado analito muchas veces es necesario realizar una serie de pasos para poder tener el analito de interés libre de otros compuestos para su análisis. Frecuentemente esto se lleva a cabo efectuando un paso de extracción que puede ser extracción líquido-líquido, extracción en fase sólida o extracción por fluido supercrítico entre otros, en el cual se utilizan disolventes orgánicos que pueden resultar tóxicos y de alto costo; por otro lado estas técnicas de extracción requieren de largos tiempos de preparación. Hoy en día una técnica para la extracción de compuestos volátiles y semivolátiles, en muestras líquidas, sólidas o gaseosas, para análisis por cromatografía de gases (CG), cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-EM), o cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE) es la Microextracción en Fase Sólida (MEFS)²².

2.5 MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA

La MEFS se basa en la extracción de los analitos de la matriz de la muestra mediante una fibra de sílice fundida que está recubierta de un adsorbente, en la mayoría de los casos polimérico, seguida de la desorción de los analitos mediante temperatura o un disolvente orgánico²³. El pequeño tamaño de la fibra y su geometría cilíndrica permiten incorporarla en una jeringa.



De esta forma, se facilita su manipulación y al mismo tiempo se protege la fibra cuando no se utiliza, ya que ésta permanece dentro de la aguja de la jeringa. Un esquema del dispositivo comercial de MEFS se muestra en la Figura 1.

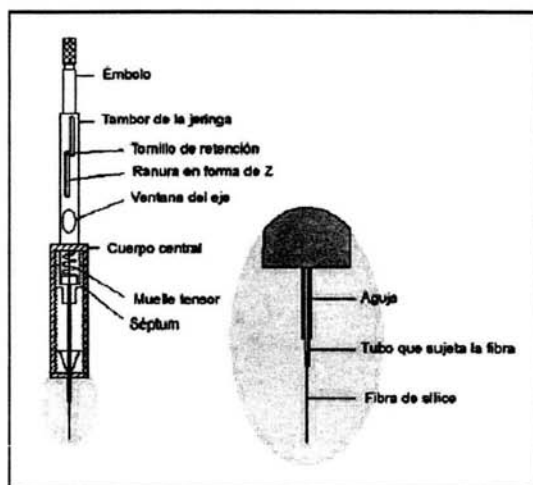


Figura 1. Dispositivo comercial para la MEFS

El principio en el que se basa la MEFS generalmente es la partición de los analitos entre la matriz de la muestra y el recubrimiento de la fibra²². Así, el transporte de los analitos desde la matriz de la muestra hasta la fibra comienza cuando la fibra entra en contacto con la muestra y la extracción se considera completa cuando la concentración del analito ha alcanzado el equilibrio de distribución entre la muestra y la fibra.

Existen básicamente dos modos de extracción posibles en MEFS, introduciendo la fibra directamente en la muestra o bien en el vapor sobrenadante o Head Space (HS); en la Figura 2 se muestran estos tipos de extracción.

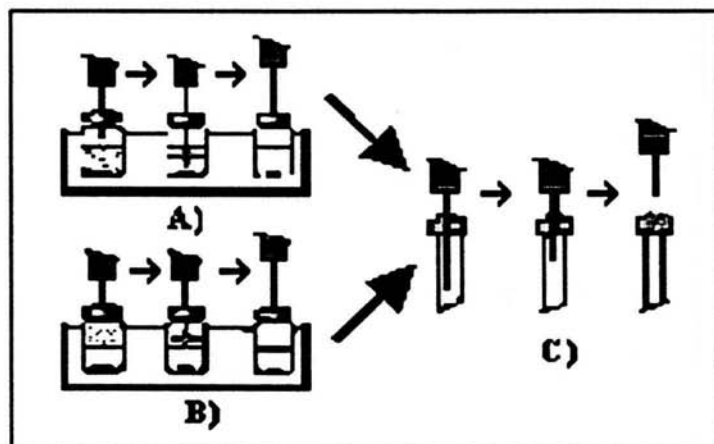


Figura 2. Esquema del proceso MEFS-CG, A) Inmersión directa, B) MEFS-HS, C) Desorción térmica en CG

La MEFS puede llevarse a cabo mediante el fenómeno de absorción y/o adsorción, esto dependerá de la fibra que se utilice para realizar la MEFS. El modelo matemático que explica la dinámica del proceso de absorción cuando la fibra se introduce directamente en la muestra fue desarrollado por Louch *et al.*²⁴ y en él se confirma la relación lineal que existe entre la cantidad de analito absorbida por la fibra en el estado de equilibrio y la concentración de éste en la muestra. Esta afirmación se muestra reflejada en la siguiente ecuación:

$$n = \frac{K_{fs} V_f C_o V_s}{K_{fs} V_f + V_s} \quad (1)$$

donde n son los moles de analito absorbidos por la fibra, V_f y V_s son los volúmenes de fibra y de muestra respectivamente, K_{fs} es el coeficiente de partición del analito entre la fibra y la muestra y C_o es la concentración inicial de analito en la muestra.



En la ecuación (1) se asume que la matriz de la muestra es una única fase homogénea y no se considera el efecto del HS. El modelo matemático del proceso de MEFS cuando los analitos se extraen del HS, las ecuaciones y conclusiones a las que se llega, son similares a las de la extracción por inmersión pero teniendo en cuenta una tercera fase gaseosa^{22,24-26}. En las condiciones de trabajo de la MEFS, generalmente se cumple que $V_s \gg K_{fs} V_f$ ya que en la mayoría de los casos V_f es mucho más pequeño que V_s por lo que la ecuación (1) se simplifica en la ecuación (2).

$$n = K_{fs} V_f C_o \quad (2)$$

La extracción sin embargo, puede también llevarse mediante un proceso de adsorción por lo que en estos casos el modelo matemático que explica el proceso de extracción es ligeramente diferente. La ecuación que define el proceso de adsorción es la (3).

$$n = \frac{K_{fs}^D V_f C_o V_s (C_{f \max} - C_f)}{K_{fs} V_f + V_s (C_{f \max} - C_f)} \quad (3)$$

donde K_{fs}^D es el coeficiente de distribución del analito entre la muestra y la superficie de la fibra, C_f es la concentración final del analito en la superficie de la fibra y $C_{f \max}$ es la concentración máxima de analito en la superficie de la fibra, los demás parámetros son los mismos que aparecen en la ecuación (1).



2.5.1 Variables que afectan al proceso de MEFS

El proceso de MEFS se puede ver afectado por una serie de variables experimentales que pueden ser modificadas para incrementar la eficacia del proceso de extracción.

Entre estas variables se encuentra la agitación de la muestra, que incrementa la difusión de los analitos desde la matriz de la muestra a la fibra, o al HS por lo que se disminuye el tiempo requerido para llegar al equilibrio.

Otros parámetros importantes son el tiempo y la temperatura de extracción, pH y fuerza iónica.

La forma más habitual de llevar a cabo la desorción de los analitos es térmicamente en el inyector de un cromatógrafo de gases, de forma que al aumentar la temperatura la afinidad de los compuestos por la fibra disminuye y los analitos son introducidos en la columna analítica por el flujo del gas portador. En la ecuación (4) se puede observar cómo disminuye en forma logarítmica el coeficiente de partición al aumentar la temperatura²²:

$$\log K_{fs} = a(1/T) + b \quad (4)$$

donde K_{fs} es el coeficiente de partición del analito entre la fibra y la muestra líquida, a y b son dos constantes y T es la temperatura.

La microextracción en fase sólida se puede combinar muy fácilmente con la cromatografía de gases de forma que la desorción se produce térmicamente en un inyector *split/splitless*²².



De este modo, esta técnica no precisa del uso de disolventes orgánicos para llevar a cabo la extracción y la desorción de los analitos, siendo ésta una de las mayores ventajas que presenta la técnica.

2.4.2 Fibras utilizadas en la MEFS

Actualmente hay fibras comerciales con diferentes recubrimientos de manera que la MEFS puede usarse para determinar un amplio grupo de compuestos.

Los primeros recubrimientos comercializados fueron los de poldimetilsiloxano (PDMS) y poliacrilato (PA) pero los tipos de recubrimientos han ido aumentando progresivamente y actualmente cubren un amplio conjunto de aplicaciones. Las fibras de PDMS, que es un polímero líquido, son las más utilizadas ya que fueron las primeras fibras introducidas para MEFS. Estas fibras son las más adecuadas para los analitos apolares aunque, en algunos casos, también pueden ser usadas para la determinación de analitos con cierta polaridad. Las fibras de PA, en cambio, son adecuadas para analitos polares y, aunque el recubrimiento es un polímero sólido, su baja densidad hace que los analitos sean absorbidos por la fibra al igual que en las fibras de PDMS.

Las fibras de PA y PDMS cubren un amplio conjunto de compuestos y son las utilizadas en la mayoría de las aplicaciones de la MEFS. No obstante, en algunos casos la interacción entre los analitos y las fibras comerciales no es



muy elevada o bien aparecen problemas de contaminación debidos al proceso de fabricación así como problemas de repetibilidad entre las fibras³⁰⁻³¹.

También hay que tomar en cuenta que compuestos de elevado peso molecular como proteínas, que pueden estar presentes en la matriz de la muestra, pueden interferir en la extracción de los analitos de interés y/o disminuir la vida de la fibra²², el pH es otro factor que hay que considerar en el desgaste de la fibra, cuando la extracción se realiza por inmersión no es recomendable trabajar a $\text{pH} \leq 2$.

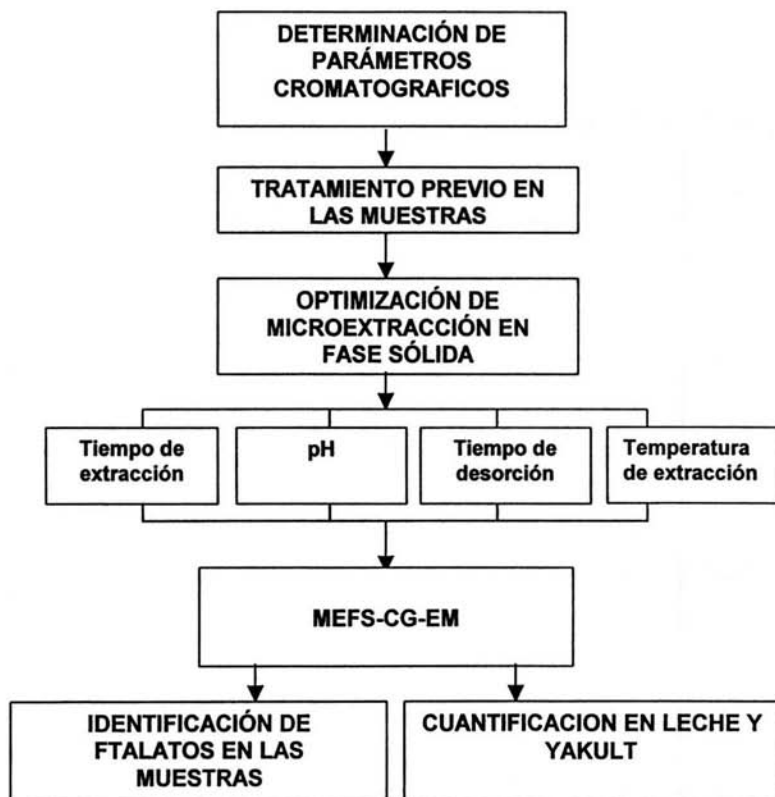
CAPITULO III

PARTE EXPERIMENTAL



ESQUEMA ANALITICO

DETERMINACION DE FTLATOS EN LECHE Y DERIVADOS





3.1 MATERIALES Y REACTIVOS

Se utilizó una mezcla estándar de ftalatos: dimetil ftalato (DMF), dietil ftalato (DEF), dibutil ftalato (DBF), butilbencil ftalato (BBF), dietil-hexil ftalato (DEHF) y dioctil ftalato (DOF) en una concentración de 2000 $\mu\text{g/mL}$ en metanol (Supelco Park, Bellefonte USA).

Como estándar interno se utilizó Dipropil ftalato (DPF) grado analítico (Sigma-Aldrich, Steinheim Alemania).

Para la extracción de los compuestos a analizarse se utilizó un dispositivo de Microextracción en Fase sólida con fibras de polidimetilsiloxano-divinilbenceno (PDMS-DVB, 65 μm) y de polidimetilsiloxano (PDMS, 100 μm). (Supelco Park, Bellefonte USA).

Además se utilizaron los siguientes reactivos, materiales y equipos:

- Ácido Clorhídrico y metanol grado analítico (J.T Baker, México).
- Viales de capacidad de 4 y 10 mL con tapón de rosca de baquelita horadada y septum de teflón (Supelco Park, Bellefonte USA).
- Termómetro -5 a 100 °C (Marca BCR, UK).
- Horno (J.M. Ortiz, México).
- Microagitadores de 8 mm X 3 mm (Supelco Park, Bellefonte USA).
- Parrilla de calentamiento con agitador magnético modelo 04644 (Cole Parmer, USA).
- Centrifuga modelo A3076X24 (International instrument, USA).



3.2 MUESTRAS

TABLA IV. MUESTRAS

PRODUCTO	MARCA	PRESENTACIÓN	POLIMERO QUE INTERACTUA CON EL ALIMENTO
Leche ultrapasteurizada parcialmente descremada	Alpura 2000	Tetra brik, un litro	Polietileno baja densidad
Leche ultrapasteurizada descremada	Alpura 2000	Tetra brik, un litro	Polietileno baja densidad
Leche pasteurizada entera	Al-Día	Envase rígido de un litro	Polietileno alta densidad
Yoghurt	Activia (Danone)	Envase rígido de 250g	Polietileno alta densidad
Producto lácteo fermentado	Yakult	Envase rígido de 80 mL	Poliestireno de impacto

3.3 LIMPIEZA DEL MATERIAL DE VIDRIO

Los ftalatos muchas veces están presentes en el medio ambiente y en diferentes disolventes orgánicos. Para evitar contaminación del material de vidrio con ftalatos y prevenir falsos positivos en el análisis, se lavó el material de vidrio con detergente libre de fosfatos (Extran) y abundante agua; se cubrió con papel aluminio y se colocó en un horno a 100 °C durante 24 horas; exceptuando el material volumétrico que no se introdujo al horno.



3.4 DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS

El propósito de establecer condiciones cromatográficas, se debe básicamente a dos factores: primero obtener una buena separación (resolución) de los picos cromatográficos y segundo llevar a cabo el análisis en el menor tiempo posible.

Se utilizó un cromatógrafo de gases HP 5880A equipado con un sistema de inyección de división de flujo y sin división de flujo (split/splitless) y detector de ionización de flama (FID). La columna utilizada fue de sílice fundida HP 5% metilfenil-silano (30 m X 0.25 mm X 0.25 μ m). El modo de inyección fue split, el gas acarreador fue hidrógeno con un flujo de 1 mL/min, en todos los casos se inyectó 1 μ L de una disolución estándar de ftalatos en metanol a una concentración de 1 mg/mL. La temperatura del inyector fue de 250 °C y la del detector 280 °C.

Programas de temperatura estudiados:

Programa 1. Temperatura inicial 70 °C, durante 1 min, incrementándose la temperatura a 20 °C/min hasta una temperatura final de 280 °C y manteniéndola durante 5 min.

Programa 2. Temperatura inicial 70 °C, durante 1 min, incrementándose la temperatura a 10 °C/min hasta una temperatura final de 280 °C y manteniéndola durante 8 min.



3.5 ACONDICIONAMIENTO DE LAS FIBRAS

Antes de utilizar por primera vez la fibra hay que acondicionarla, para eliminar trazas de contaminantes que pudiera tener. El acondicionamiento se basa en realizar la desorción de los analitos por efecto de la temperatura durante un determinado tiempo; tanto el tiempo como la temperatura la establece el proveedor dependiendo del tipo de fibra a utilizar.

El acondicionamiento consiste en colocar el dispositivo de MEFS en el sistema de inyección del CG y dejar expuesta la fibra dentro del inyector. En el caso de la fibra PDMS/DVB permanece introducida durante 60 min en el inyector a 260 °C, y en el caso de la fibra PDMS permanece introducida durante 60 min en el inyector a 250 °C; una vez que se llevó a cabo el acondicionamiento de la fibra es conveniente realizar un blanco de ésta en el CG para asegurarnos que la fibra está limpia.

3.6 DETERMINACIÓN DE FTALATOS EN LECHE

3.6.1 Preparación de la muestra de leche

Con la finalidad de eliminar las proteínas de la leche para evitar que disminuya la vida de la fibra ²² y además prevenir reacciones de Maillard que pudieran interferir en el análisis (la reacción de Maillard en la leche se inicia con el grupo aldehído de la lactosa y con el grupo ϵ -amino de la lisina provocada por el calentamiento²⁹), se le dio un tratamiento previo a la leche, el cual consistió en



ajustar el pH de la leche y aplicarle un tratamiento térmico, posteriormente se centrifugó.

Para realizar cada uno de los análisis en la determinación de ftalatos en leche; se utilizaron 10 mL de leche, los cuales se transfirieron a un tubo de ensayo ajustando el pH a 4 con HCl al 10 % y se calentó a una temperatura de 80 ± 2 °C durante 3 min; posteriormente se centrifugó a una velocidad de 3600 rpm durante 5 min y se transfirieron 3 mL del suero de leche y un microagitador a un vial de 4 mL de capacidad, el vial se cerró con un tapón de rosca de bakelita horadado con septum de teflón.

3.6.2 OPTIMIZACIÓN DE LA MEFS

La leche utilizada para la optimización de MEFS fue leche bronca, debido a que al no estar en recipientes o contenedores plásticos no presenta contaminación con ftalatos y se le adicionó la mezcla estándar de ftalatos a una concentración de 1 mg/mL, antes de realizarle el tratamiento previo (ver sección 3.6.1).

En la MEFS es muy importante utilizar agitación porque así se logra disminuir el efecto causado por la zona estática que se forma alrededor de la fibra y que disminuye la velocidad de extracción, ya que los analitos deben ser transportados desde la matriz de la muestra hasta el HS y de allí hacia la fibra; o bien, de la matriz a la fibra en el caso de inmersión y por ello es necesario utilizar



un sistema de agitación que facilite la difusión de los analitos hacia la superficie de la fibra²². Debido a lo anterior todos los experimentos se realizaron con agitación constante a 1200 ± 20 rpm.

En todos los análisis realizados antes de llevar a cabo la MEFS, con el objetivo de igualar la temperatura del baño a la del vial, el tiempo de equilibrio fue de 10 minutos a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Todos los análisis realizados en la optimización de la MEFS se llevaron a cabo por CG y la MEFS se llevó a cabo por inmersión (Figura 3).

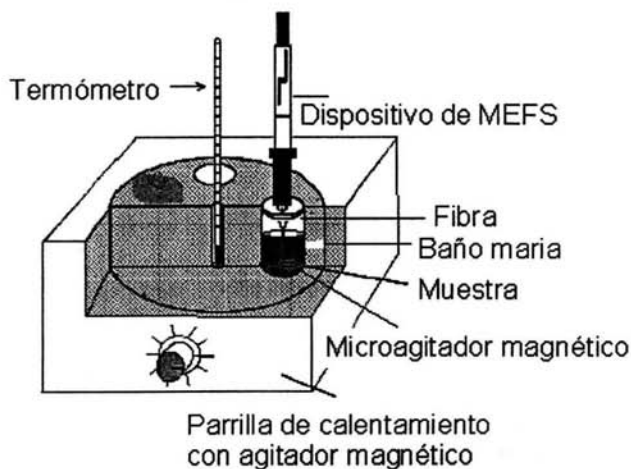


Figura 3. Equipo utilizado para la MEFS por inmersión



3.6.2.1 Tiempo de desorción

Es importante determinar el tiempo de desorción de los analitos, el tiempo debe ser el adecuado para que la desorción de los analitos de la fibra sea completa y no se presente el efecto memoria (carry-over effect).

Los tiempos de desorción estudiados fueron 5 y 10 min; la MEFS se realizó durante 20 min a 40 °C. Finalizado el tiempo de desorción estudiado; la aguja del dispositivo de MEFS se introdujo dentro de un vial (de tapa de rosca de bakelita horadada con septum de teflón) perfectamente limpio durante el tiempo que duro el análisis cromatografico; posteriormente se volvió a inyectar la aguja en el puerto de inyección y se dejo expuesta la fibra dentro del inyector durante 5 min y nuevamente se llevó acabo el análisis cromatografico.

3.6.2.2 Determinación de la temperatura de extracción

Para la determinación de la temperatura de extracción se realizaron experimentos a 40, 50 y 60 °C \pm 2 °C, la MEFS se realizó durante 30 min y tiempo de desorción de 10 min.

3.6.2.3 Perfil de extracción

Los tiempos de extracción estudiados fueron 10, 20, 30,40, 50 y 60 min, la temperatura de extracción fue de 60 °C y el tiempo de desorción fue de 10 min.



3.6.2.4 Influencia del pH en la extracción

El pH en la preparación de la muestra fue de 4, 5 y 7, la leche fue preparada como se indica en la sección 3.6.1 ajustando el pH al de estudio; la MEFS se realizó durante 30 min, con una temperatura de extracción de 60 °C y tiempo de desorción de 10 min.

3.6.3 LINEALIDAD DEL MÉTODO

Para realizar la linealidad del método se utilizó leche bronca preparada de la misma forma como se indica en la sección 3.6.1 y la MEFS se realizó bajo las condiciones optimizadas. Para ello se adicionó la mezcla estándar de ftalatos en la leche bronca a concentraciones de 30, 60, 90, 120, 150, 180 y 210 µg/mL respectivamente utilizando como estándar interno al dipropil ftalato (DPF) a una concentración de 120 µg/mL.

La MEFS se realizó durante 30 min, a una temperatura de extracción de 60 °C y tiempo de desorción de 10 min.

Para el análisis se utilizó un cromatógrafo HP modelo 5890 equipado con un inyector split/splitless, la temperatura del inyector fue de 250 °C. La columna capilar utilizada fue de sílice fundida HP 5 % metil-fenil-silano (30 m X 0.25 mm X 0.25 µm). El programa de temperatura utilizado: temperatura inicial 70 °C, durante 1 min, incrementándose la temperatura a 10 °C/min hasta una temperatura final de 280 °C y manteniéndola durante 7 min.



El modo de inyección fue splitless (1 minuto), el gas acarreador fue He con flujo de 1 mL/min, El cromatógrafo está acoplado a un detector selectivo de masas HP 5971. La temperatura de la línea de transferencia fue de 280 °C, la de la fuente de ionización 175 °C, analizador (cuadrupolar) 150 °C y el detector 75 °C. Los análisis se realizaron por impacto electrónico (70 eV). Se utilizó el modo "Monitoreo Selectivo de Iones" (SIM), los iones fragmento utilizados para el análisis se muestran en la Tabla I, en el caso del DPF los iones fragmento utilizados fueron 149 y 191 a 2.8 ciclos s⁻¹.

3.6.4 Identificación y cuantificación de los ftalatos en las muestras de leche

La identificación de ftalatos en las muestras de leche estudiadas se realizó por CG-EM. Las muestras de leche fueron preparadas de la misma forma como se indica en la sección 3.6.1; posteriormente se realizó la MEFS, utilizando las mismas condiciones de extracción de la sección 3.6.3.

La identificación se realizó comparando los tiempos de retención de los ftalatos obtenidos de las muestras con los tiempos de retención de la mezcla estándar de ftalatos así como sus espectros de masas con los de la biblioteca NIST (National Institute of Standard and Technology) del espectrómetro de Masas.

Para la cuantificación, las muestras de leche estudiadas fueron preparadas de la misma forma como se indica en la sección 3.2 a las cuales se les adiciono el estándar interno (DPF) a una concentración de 120 µg/mL; la MEFS se realizó



utilizando las mismas condiciones de extracción de la sección 3.6.3. Se realizó por triplicado la cuantificación para cada una de las muestras.

3.7 DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE FTALATOS EN YOGHURT

Para la determinación de ftalatos en yoghurt; la MEFS se realizó por HS (Figura 4), la fibra utilizada fue de PDMS y las extracciones se llevaron a cabo con agitación constante a 1200 ± 20 rpm.

Los análisis realizados para el perfil de extracción y la influencia de la temperatura de la extracción se llevaron a cabo por CG-EM.

En todos los casos se transfirieron 4 g de yoghurt; al cual se le adicionó la mezcla estándar de ftalatos a una concentración de 1 mg/mL, junto con un microagitador a un frasco vial de 10 mL de capacidad, el vial se cerró con un tapón de rosca de bakelita horadado con septum de teflón y se calentó en un horno a 80 °C durante 10 min.

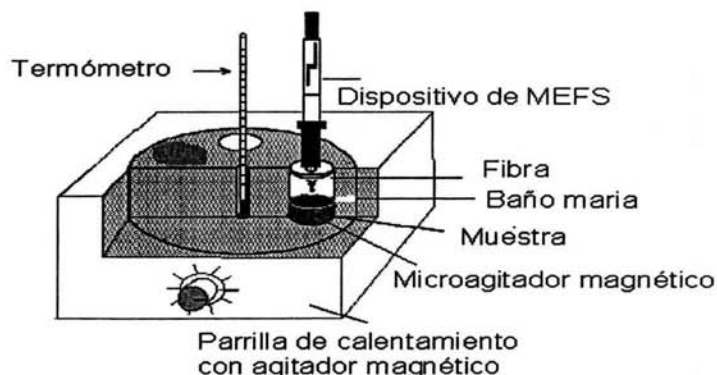


Figura 4. Equipo utilizado para la MEFS por HS



3.7.1 OPTIMIZACIÓN DE LA MEFS

3.7.1.1 Determinación de la temperatura de extracción

Para la determinación de la temperatura de extracción se realizaron experimentos a 40, 60 y 80 ± 2 °C; la MEFS se realizó durante 30 min y el tiempo de desorción fue de 10 min.

3.7.1.2 Perfil de extracción

Los tiempos utilizados para realizar el perfil de extracción fueron 10, 20, 30 y 40 min, a una temperatura de extracción de 80°C y el tiempo de desorción fue de 10 min.

3.7.2 IDENTIFICACIÓN DE LOS FTALATOS EN YOGHURT

Se transfirieron 4 g de yoghurt junto con un microagitador a un frasco vial de 10 mL de capacidad y se calentó en un horno a 80 °C por 10 minutos; posteriormente se realizó la MEFS con las condiciones optimizadas: tiempo de extracción de 30 min, temperatura de extracción de 80 °C y tiempo de desorción de 10 min. La identificación se realizó comparando los tiempos de retención de los ftalatos obtenidos de las muestras con los tiempos de retención de la mezcla estándar así como sus espectros de masas con los de la biblioteca NIST del espectrómetro de Masas.



3.8 DETERMINACIÓN DE FTALATOS EN YAKULT

En la determinación de ftalatos en Yakult; la MEFS se realizó por HS, la fibra utilizada fue de PDMS y las extracciones se llevaron a cabo con agitación constante a 1200 ± 20 rpm. Los análisis se llevaron a cabo por CG-EM.

En todos los análisis realizados antes de llevar a cabo la MEFS, el tiempo de equilibrio fue de 10 min a $80\text{ }^{\circ}\text{C}$, con el objetivo de igualar la temperatura del baño a la del vial.

3.8.1 Perfil de extracción

Se transfirieron 4 mL de Yakult en el cual se le adicionó la mezcla estándar de ftalatos a una concentración de $500\text{ }\mu\text{g/mL}$ junto con un microagitador a un frasco vial de 10 mL de capacidad y se cerró con un tapón de rosca de baquelita horadado con septum de teflón.

Los tiempos de extracción estudiados fueron 5, 10, 20, 30, 40, 50 y 60 min, a una temperatura de extracción de $80 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ y el tiempo de desorción fue de 10 min.

3.8.2 Identificación de los ftalatos en Yakult

La identificación de ftalatos se realizó por CG-EM, se transfirieron 4 mL Yakult junto con un microagitador a un frasco vial de 10 mL de capacidad y la MEFS se llevo a cabo durante 40 min, a una temperatura de extracción de $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ y un tiempo de desorción de 10 min.



La identificación se realizó comparando los tiempos de retención de los ftalatos obtenidos de las muestras con los tiempos de retención de la mezcla estándar así como sus espectros de masas con los de la biblioteca NIST del espectrómetro de Masas.

3.8.3 Cuantificación de ftalatos en Yakult

La cuantificación se realizó por curva de adición patrón, con el siguiente procedimiento. Se homogeneizaron 6 botellas de Yakult (aproximadamente 480 mL) y se transfirieron 4 mL de Yakult junto con un microagitador a un vial de 10 mL de capacidad y se procedió a realizar las adiciones de la mezcla estándar de ftalatos, éstas fueron 0, 10, 20, 30, 40, 50 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente; se utilizó al DPF como estándar interno a una concentración de 25 $\mu\text{g/mL}$. La determinación se realizó por triplicado.

La MEFS se realizó utilizando las mismas condiciones de extracción de la sección 3.8.2.

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN



4.1 DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS

Los programas de temperatura que se evaluaron se muestran en la Tabla V; en ella se muestra las condiciones de cada uno de los programas de temperatura estudiados.

El tiempo total de análisis del programa de temperatura I es más rápido en comparación con el programa II sin embargo, al realizar el análisis la resolución de los picos cromatográficos no era muy buena en comparación a la obtenida en el programa II.

Tabla V. PROGRAMAS DE TEMPERATURA

Condiciones	Programa de temperatura	
	I	II
Temperatura inicial (°C)	70	70
Tiempo inicial (min)	1	1
Rampa de temperatura (°C/min)	20	10
Temperatura final	280	280
Tiempo final (min)	5	8
Tiempo total de análisis (min)	16.5	30

Debido a lo anterior se optó por utilizar el programa de temperatura II para el análisis de los compuestos en estudio.



4.2 TIEMPO DE DESORCIÓN

El objetivo de determinar el tiempo de desorción es el de encontrar el tiempo adecuado en el cual se desorban de la fibra los analitos extraídos, de no ser así puede ocurrir lo que se denomina efecto memoria, lo cual afectaría a la siguiente extracción donde pueden aparecer compuestos que no pertenecen al análisis que se está llevando a cabo sino al análisis anterior.

En la figura 5 se muestran los cromatogramas obtenidos para los diferentes tiempos de desorción, los cuales fueron realizados como se indica en la sección 3.6.2.1.

El cromatograma B corresponde al tiempo de desorción de 5 minutos y el cromatograma C al tiempo de desorción de 10 minutos. En el cromatograma B, se observa que no son suficientes 5 minutos para llevar a cabo la desorción ya que el DEF, el DBF y el DEHF todavía están presentes en la fibra; en cambio en el cromatograma C, se aprecia que con 10 minutos de desorción el DEF y el DEHF han sido desorbidos de la fibra pero no así el DBF; esto se debe a que la fibra presenta una pequeña contaminación del DBF, la cual se observa en el blanco de la fibra (Cromatograma A). Con base en los resultados obtenidos se decidió realizar la desorción de los analitos extraídos durante 10 min, en toda la investigación.

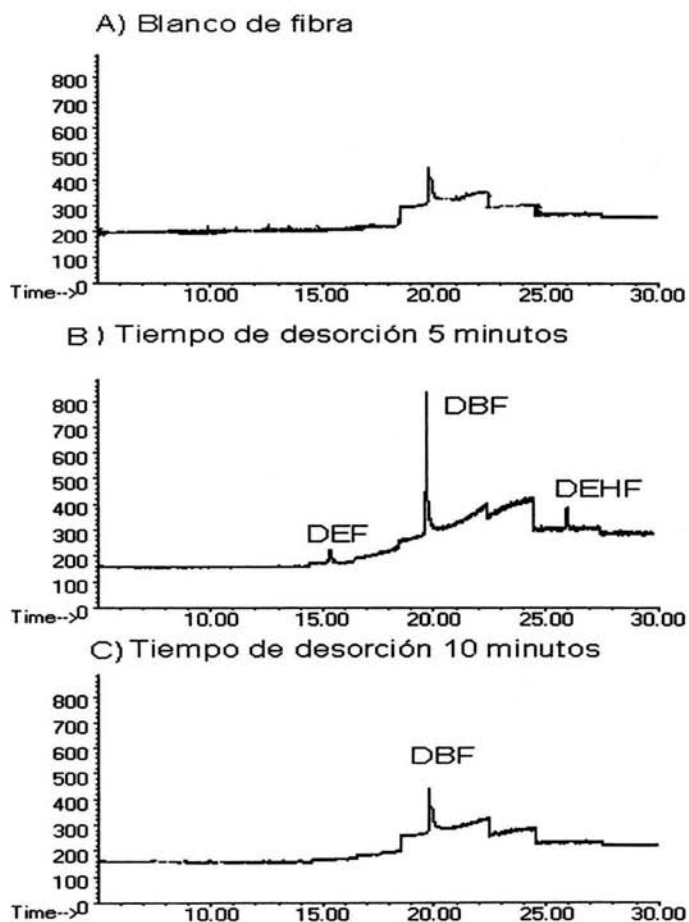


Figura 5. Cromatograma, A) Blanco de fibra B) 5 min de desorción, C) 10 min de desorción.



4.3 DETERMINACIÓN DE FTALATOS EN LECHE

4.3.1 OPTIMIZACIÓN DE LA MEFS

4.3.1.1 Determinación de la temperatura de extracción

Los resultados obtenidos para la determinación de la temperatura de extracción se muestran en la Figura 6, donde se grafican el % de área en función de la temperatura de extracción para cada uno de los ftalatos. Como puede observarse a medida que se incrementa la temperatura el % de área aumenta, apreciándose que con una temperatura de 60 °C se logra una mejor extracción de los ftalatos.

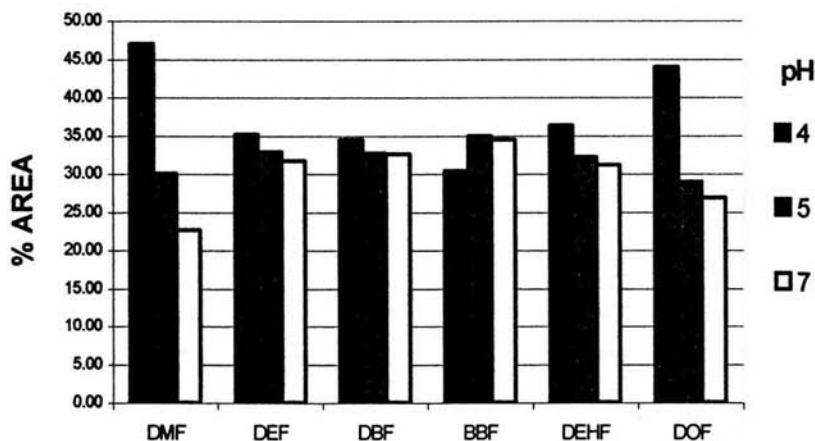


Figura 6. Influencia de la temperatura en la extracción de ftalatos en leche Dimetil ftalato (DMF), Dietil ftalato (DEF), Dibutil ftalato (DBF), Butilbencil ftalato (BBF), Dietil hexil ftalato (DEHF), Dioctil ftalato (DOF).



4.3.1.2 Determinación del perfil de extracción

El tiempo de extracción en MEFS es un parámetro muy importante a tener en cuenta. Al desarrollar un método analítico basado en MEFS se debe determinar el tiempo necesario para llegar al estado de equilibrio que es característico de cada analito-fibra e intentar trabajar en esas condiciones. Sin embargo, para algunos compuestos el tiempo necesario para llegar a esta situación es muy elevado por lo que generalmente se opta por trabajar en condiciones de no equilibrio y se seleccionan tiempos de extracción inferiores para no alargar el tiempo de análisis, en esta situación se requiere controlar estrictamente el tiempo de extracción ya que pequeñas oscilaciones en la medida del tiempo pueden variar de forma considerable la cantidad de analito extraída^{22, 30-31}.

En la Figura 7 se muestra el perfil de extracción obtenido para los ftalatos en leche. Como se observa en la figura, a medida que se incrementa el tiempo de extracción el % de área de los ftalatos incrementa y se llega a un valor de área en el cual ya no varía con respecto al tiempo porque la cantidad de analito extraído se mantiene constante, es entonces cuando se ha llegado al equilibrio. Por lo tanto en la mayoría de los ftalatos estudiados se alcanza el equilibrio en un intervalo de tiempo entre 30 y 45 minutos.

Debido a estos resultados se eligió un tiempo de 30 minutos de extracción, para realizar la determinación de ftalatos en la leche.

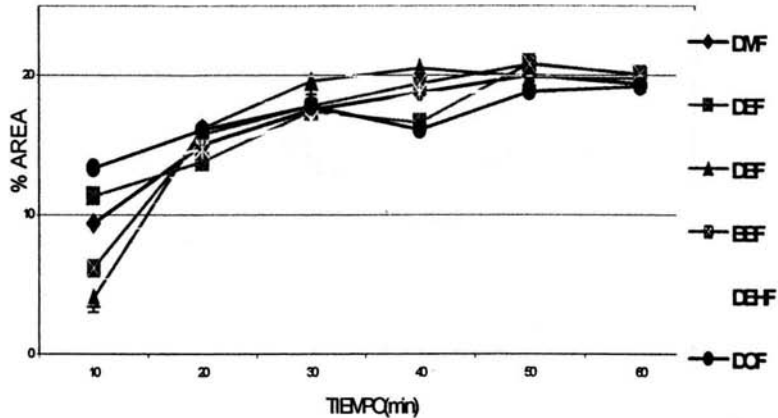


Figura 7. Perfil de extracción de ftalatos en leche
Dimetil ftalato (DMF), Dietil ftalato (DEF), Dibutil ftalato (DBF), Butilbencil ftalato (BBF),
Dietil hexil ftalato (DEHF), Dioctil ftalato (DOF).

4.3.1. Influencia del pH en la extracción

En la Figura 8 se muestra la relación que guarda el % de área en función del pH de preparación de las muestras de leche. Como puede observarse a medida que se incrementa el pH el % de área disminuye. De acuerdo a estos resultados se decidió utilizar el pH de 4 para realizar la microextracción.

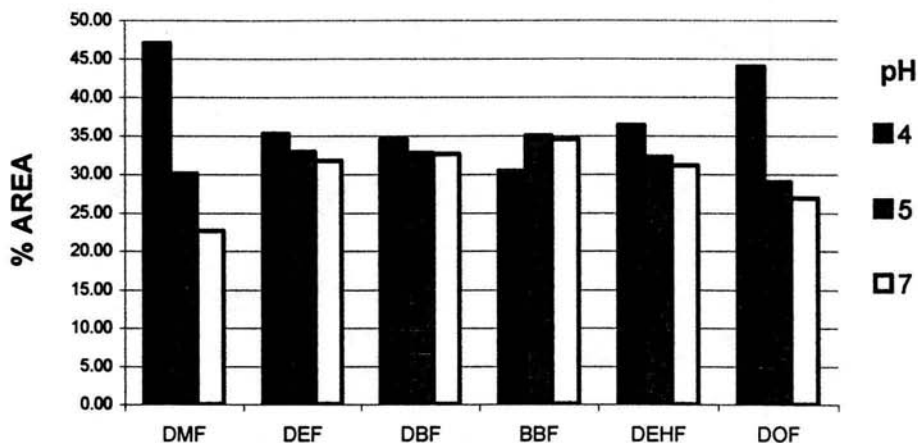


Figura 8. Determinación del pH de extracción
Dimetil ftalato (DMF), Dietil ftalato (DEF), Dibutil ftalato (DBF), Butilbencil ftalato (BBF), Dietil hexil ftalato (DEHF), Dioctil ftalato (DOF).

4.3.2 Metodología propuesta para la determinación de ftalatos en leche

Con base en los resultados obtenidos de la optimización de la MEFS, en la Figura 9 se muestra la metodología que se propone para la determinación de ftalatos en leche. Con ésta metodología se realizó la identificación y cuantificación de los ftalatos en las muestras de leche por CG-EM.

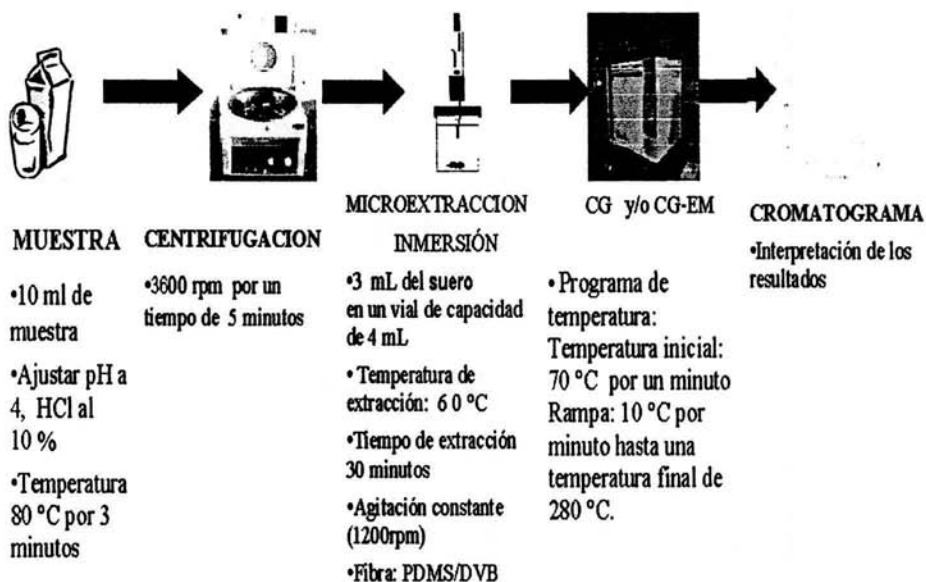


Figura 9. Metodología para la determinación de ftalatos en leche

4.3.3 IDENTIFICACIÓN DE FTALATOS EN LECHE

Es muy importante realizar un blanco de fibra y del sistema cromatografico antes de las determinaciones, esto se debe a que en la actualidad, el uso de algunos de estos compuestos está muy extendido y pueden aparecer problemas de contaminación. Para realizar la identificación se compararon los tiempos de retención de la mezcla estándar de ftalatos con los de la muestra y con los espectros de la biblioteca (NIST) que tiene acoplada el equipo de CG-EM.



Para el análisis se utilizó el equipo de CG-EM en modo "SIM" (monitoreo de iones), las señales adquiridas fueron el ión molecular y los iones fragmento característicos de cada uno de los ftalatos³² (Tabla II) y del estándar interno (iones fragmento característicos 149,191³²), el monitoreo de las señales para cada uno de los ftalatos se realizó un minuto antes de su tiempo de retención y un minuto después de éste.

4.3.3.1 Leche bronca

La Figura 10 muestra el blanco del sistema cromatográfico (cromatograma A); el blanco de fibra PDMS/DVB (cromatograma B) y el análisis de la leche bronca sin adición del estándar de ftalatos (cromatograma C). Como puede observarse, en el blanco de fibra se identifica al DBF lo cual se debe a una probable contaminación ó impureza presente en la fibra, la cual resulta mínima y no se pudo eliminar con el acondicionamiento previo.

Al comparar el pico correspondiente al DBF de la fibra con el de la leche bronca se observa que la abundancia es la misma, por lo que la leche bronca está exenta de ftalatos, lo cual permitió utilizarla como matriz para la optimización de la metodología.

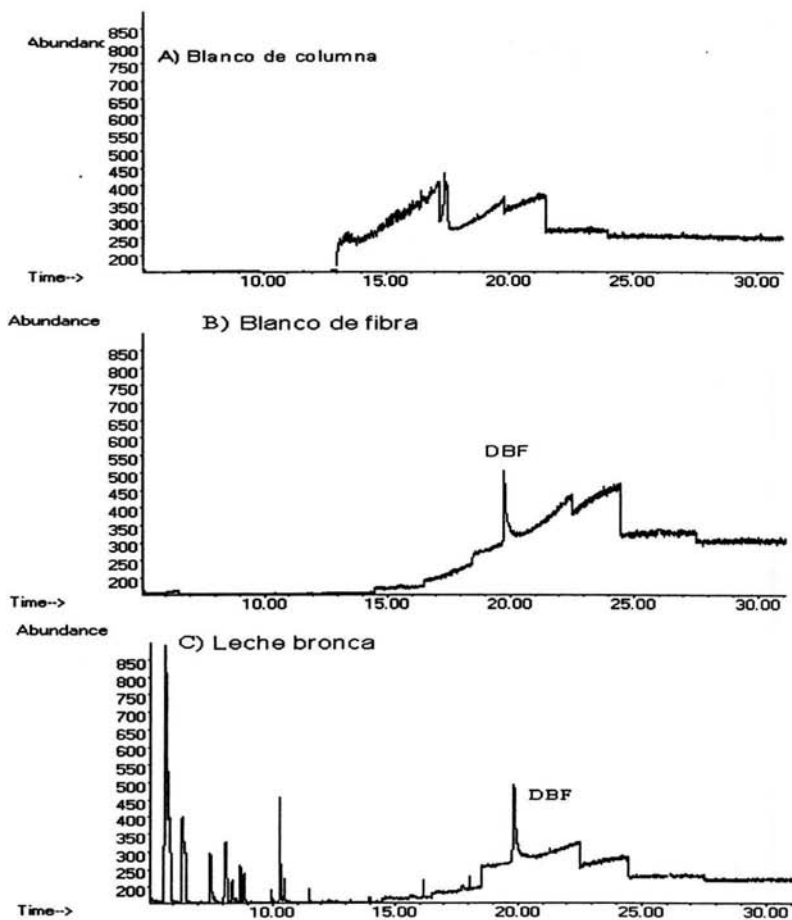


Figura 10. Cromatograma, A) Blanco del sistema cromatografico; B) Blanco de fibra PDMS/DVB
C) Análisis de leche bronca sin adición del estándar de ftalatos.



4.3.3.2 Leche ultrapasteurizada parcialmente descremada.

En la Figura 11, se muestra el cromatograma (A) del blanco de fibra antes de realizar la extracción así como el cromatograma (B) del análisis de la leche parcialmente descremada (B). Al comparar ambos cromatogramas se observa, un aumento en la abundancia del DBF en el cromatograma B; lo cual muestra que efectivamente el DBF migra del envase de leche hacia el alimento. La presencia del DBF se comprobó con su espectro de masas mostrado en la Figura 12.

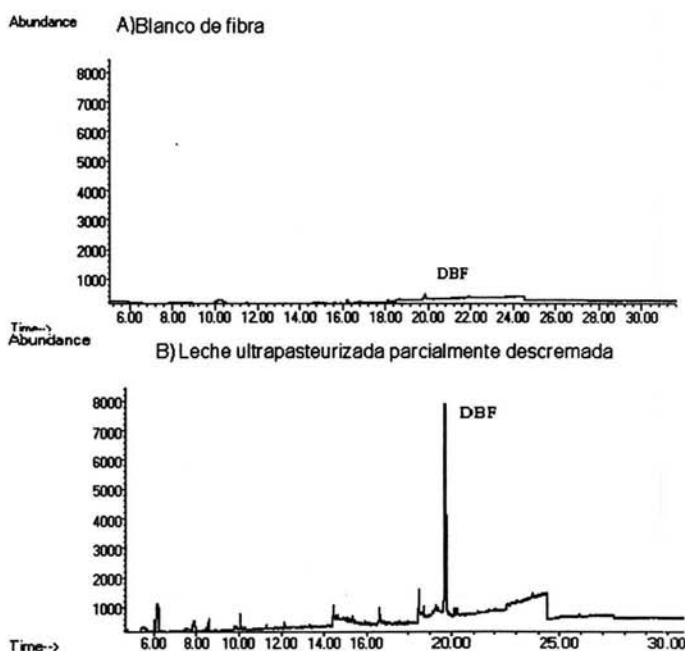


Figura 11. Cromatograma, A) Blanco de fibra PDMS/DVB;
B) Análisis de leche ultrapasteurizada parcialmente descremada.

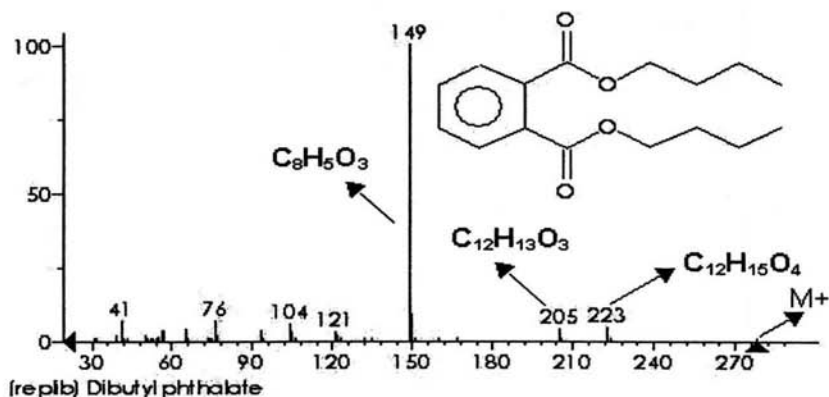


Figura 12. Espectro de masas del DBF

4.3.3.3 Leche ultrapasteurizada descremada

En la leche ultrapasteurizada descremada se identificó el DBF. En la Figura 13 se presenta el cromatograma (A) para el blanco de fibra así como el cromatograma (B) del análisis de la leche ultrapasteurizada descremada.

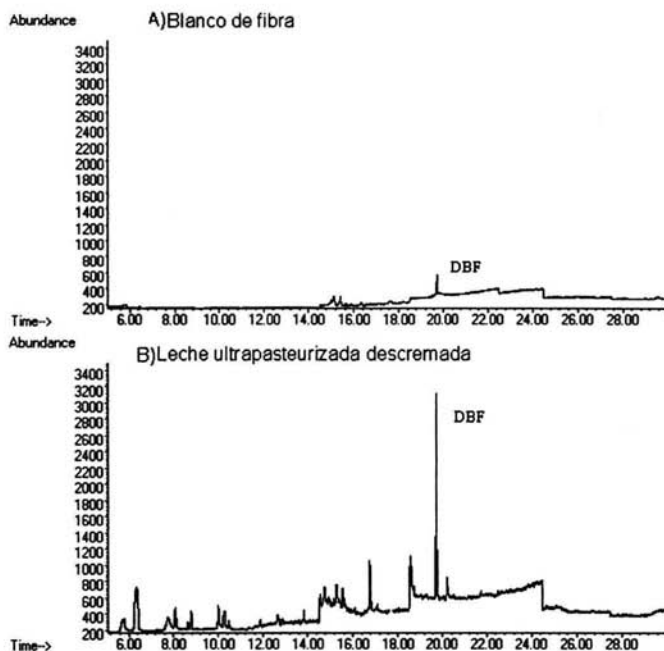


Figura 13. Cromatograma, A) Blanco de fibra PDMS/DVB;
B) Análisis de leche ultrapasteurizada descremada

4.3.3.4 Leche pasteurizada entera

En la leche pasteurizada entera se identificaron el DBF y el DEHF; en la Figura 14 se muestra el cromatograma (A) para el blanco de fibra antes de la extracción así como el cromatograma (B) del análisis de la leche entera. Como se observa, en este tipo de leche hay presencia del DEHF, lo cual se comprueba con su espectro de masas mostrado en la Figura 15.

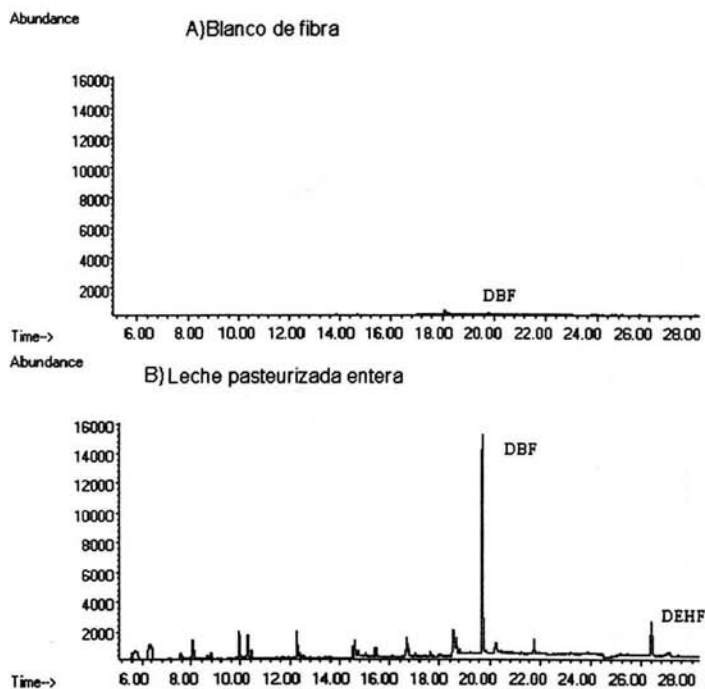


Figura 14. Cromatograma, A) Blanco de fibra PDMS/DVB;
B) Análisis de leche pasteurizada entera

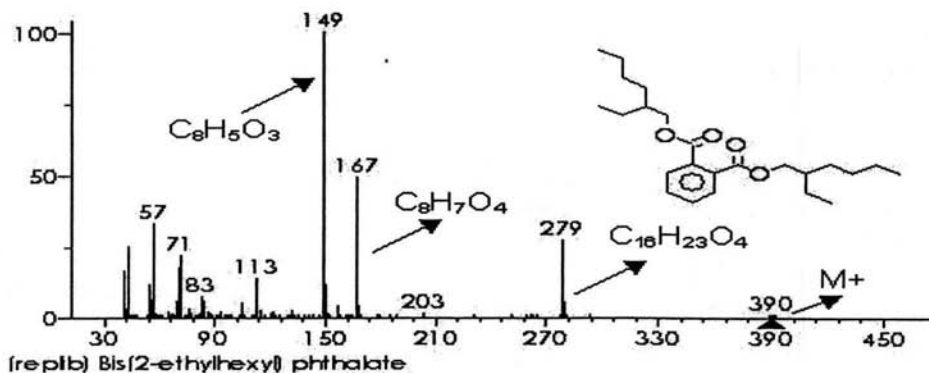


Figura 15. Espectro de masas del DEHF



En todas las muestra de leche analizadas, se identificó el DBF y sólo en la leche pasteurizada entera se identificó el DEHF; esto podría deberse al tipo de material plástico que se utiliza para contenerlas, ya que en el caso de las leches ultrapasteurizadas tanto descremada como parcialmente descremada el envase utilizado para contenerlas es Tetrabrik y el polímero con el que están en contacto es con una película de polietileno de baja densidad; en cambio el envase utilizado para contener a la leche pasteurizada entera esta fabricado con polietileno de alta densidad y posiblemente en la fabricación de este polímero se utilizan como plastificantes tanto el DBF como el DEHF; los cuales migran del material plástico hacia la leche.

4.3.4 CUANTIFICACIÓN DE FTALATOS EN LAS MUESTRAS DE LECHE

En la Figura 16; se muestra el cromatograma obtenido en la realización de la linealidad, el cual corresponde a la mezcla estándar de ftalatos a una concentración de 120 µg/L y al estándar interno a una concentración de 120 µg/L.

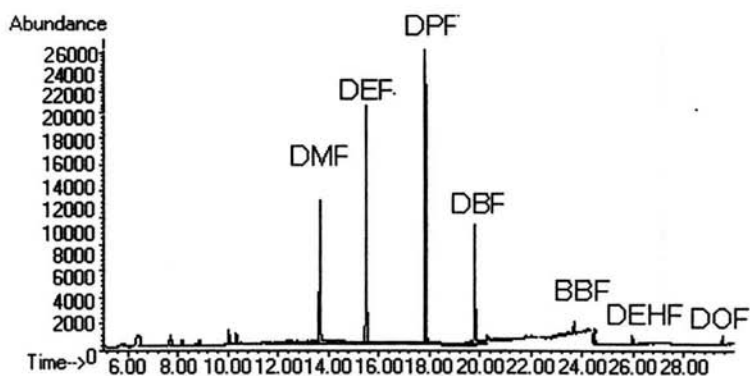


Figura 16. Cromatograma de la mezcla estándar de ftalatos a una concentración de 120 $\mu\text{g/L}$ y estándar interno a una concentración de 120 $\mu\text{g/L}$

En la Figura 17, se muestra el cromatograma de la leche pasteurizada entera con el estándar interno a una concentración de 120 $\mu\text{g/L}$.

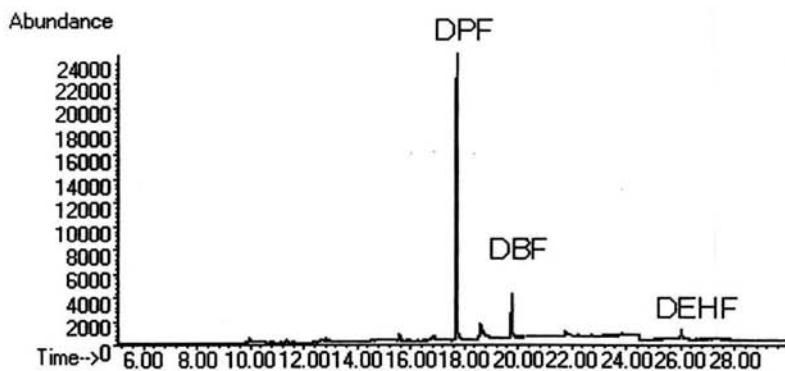


Figura 17. Leche pasteurizada entera con el estándar interno a una concentración de 120 $\mu\text{g/L}$

En la tabla IV se muestra los coeficientes de correlación obtenidos de las curvas, así como el intervalo lineal de cada uno de los ftalatos estudiados.



TABLA IV COEFICIENTES DE CORRELACIÓN

FTALATO	INTERVALO LINEAL ($\mu\text{g/L}$)	COEFICIENTE CORRELACIÓN (r)
DMF	30-180	0.9887
DEF	30-180	0.9948
DBF	30-210	0.9475
BBF	30-210	0.9874
DEHF	90-210	0.9041
DOF	90-210	0.9203

Como puede observarse, la linealidad es aceptable para el DMF, DEF y BBF sin embargo, para el DBF y DEHF se obtuvo una r de 0.9475 y 0.9041 respectivamente lo cual no es aceptable. Con las curvas obtenidas no es posible calcular con precisión la concentración de los ftalatos encontrados en la leche, ya que los valores calculados de éstos se encuentran en el límite inferior de la curva.

La tabla V muestra las concentraciones aproximadas del DBF y DEHF en las leches analizadas.

TABLA V. CONCENTRACIÓN ($\mu\text{g/L}$) de FTALATOS EN MUESTRAS DE LECHE

LECHE	DBF ($\mu\text{g/L}$)	DEHF ($\mu\text{g/L}$)
Ultrapasteurizada parcialmente descremada	< 30	—
Ultrapasteurizada descremada	< 30	—
Pasteurizada entera	< 30	< 90

La abundancia del DBF en la leche ultrapasteurizada descremada es menor que en las leches pasteurizada entera y ultrapasteurizada parcialmente descremada. Probablemente debido a que la migración de los ftalatos del envase



hacia la leche descremada no se ve favorecida por la grasa, ya que la cantidad de grasa en la leche descremada es del 0.5 %, a diferencia de la leche parcialmente descremada que es del 2.8 % y en la leche entera es del 3 %.

Este trabajo es una propuesta de una metodología para la determinación de ftalatos en leche; pero todavía falta afinar algunas pruebas, así como validar la metodología.

En trabajos futuros es necesario realizar una prueba de recobro, esto con los objetivos de:

1. Verificar que en el tratamiento previo dado a la leche la cantidad de ftalatos en el suero sea la que se añadió.
2. Ver si la cantidad de grasa en la leche es una variante que afecte la cantidad de recobro.

Si se quiere validar la metodología lo mínimo que debe tener la validación es límite de detección, reproducibilidad, repetibilidad, intervalo lineal, robustez y prueba de recobro. Sin embargo, la metodología propuesta permite una identificación cualitativa.



4.4 DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE FTALATOS EN YOGHURT

El yoghurt analizado fue natural, para evitar interferencias en el análisis debido a aditivos del mismo como son edulcorantes y colorantes artificiales.

Para el análisis en yoghurt se empleó la técnica de MEFS-HS, debido básicamente a que con inmersión directa se disminuye la vida media de la fibra, en este caso para realizar la MEFS se utilizó la fibra PDMS, porque también presenta buenos resultados en la determinación de ftalatos¹².

4.4.1 OPTIMIZACION DE LA MEFS

4.4.1.1 Influencia de la temperatura en la extracción

La temperatura de extracción juega un papel muy importante en la cinética de reparto de los analitos entre la fibra y la muestra, un aumento de temperatura incrementa los coeficientes de difusión de los analitos en la muestra, por lo que aumenta la cantidad de analitos extraídos²².

En la Figura 18 se muestra la relación del % de área en función de la temperatura de extracción. Como se puede apreciar en la figura, un incremento en la temperatura favorece la cantidad de ftalatos extraídos; esto se observa en el % de área, ya que a la temperatura de 40 °C el % de área es menor en comparación al % de área obtenida a 80 °C. Con base en los resultados obtenidos se eligió la temperatura de 80 °C para llevar a cabo la extracción, porque a esta temperatura la cantidad de analitos extraídos es mayor.

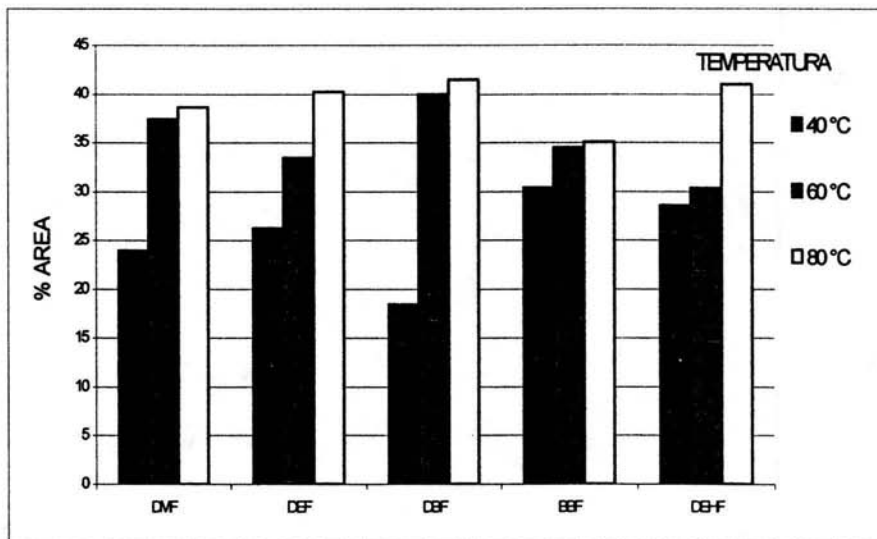


Figura 18. Relación del área en función de la temperatura de extracción Dimetil ftalato (DMF), Dietil ftalato (DEF), Dibutil ftalato (DBF), Butilbencil ftalato (BBF), Dietil hexil ftalato (DEHF).

4.4.1.2 Perfil de extracción

En la Figura 19 se muestra el perfil de extracción para el yoghurt, puede observarse en la figura que el tiempo necesario para que el sistema llegue al equilibrio en algunos de los ftalatos no se alcanza, por lo cual se decidió trabajar en condiciones de no equilibrio; el tiempo de extracción que se eligió fue de 30 min, para no alargar el tiempo de análisis.

En el caso del yoghurt no se realizó el perfil de extracción hasta 60 minutos debido a que al pasar más de 40 minutos el yoghurt empieza a coagularse por efecto de la temperatura por esta razón la agitación ya no resulta homogénea lo que trae como consecuencia datos dudosos.

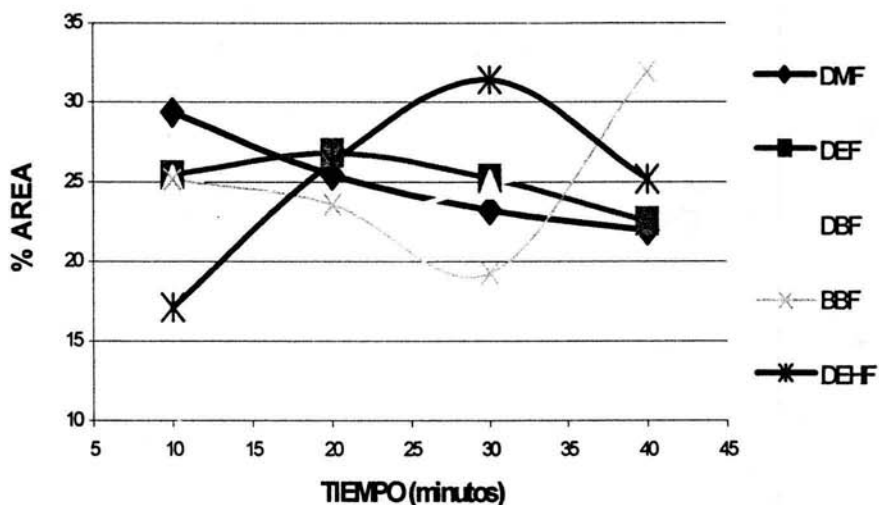


Figura 19. Perfil de extracción
Dimetil ftalato (DMF), Dietil ftalato (DEF), Dibutil ftalato (DBF), Butilbencil ftalato (BBF),
Dietil hexil ftalato (DEHF).

4.4.3 Metodología propuesta para la determinación de ftalatos en yoghurt

En la Figura 22 se muestra la metodología propuesta para la determinación de ftalatos en yoghurt. Con esta metodología se realizó la identificación de los ftalatos en la muestra de yoghurt por CG-EM.

No obstante, el DOF no logró extraerse; esto se podría deber a que el DOF no logra volatilizarse ó bien es muy poca la cantidad que volatiliza, por lo cual la metodología propuesta no podrá ser aplicable para el DOF.

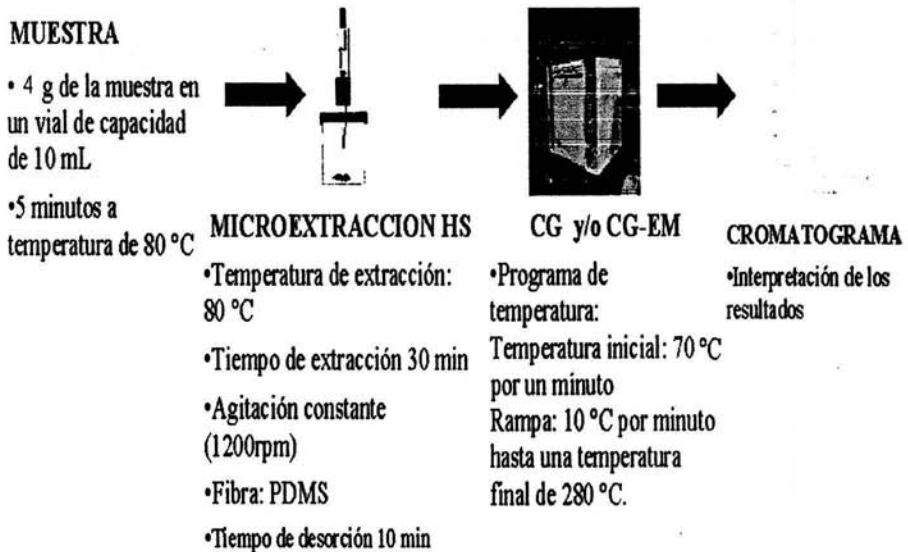


Figura 20. Metodología para la determinación de ftalatos en yoghurt

4.4.4 IDENTIFICACIÓN DE FTALATOS EN YOGHURT

En la Figura 21 se presenta el cromatograma del blanco de la fibra (A) y del análisis de yoghurt (B). Los ftalatos que se identificaron en esta muestra fueron el DBF y DEHF.

Al igual que en la leche pasteurizada entera, en el yoghurt se encontró la presencia del DEHF, esto se puede deber a que el material plástico con el que están en contacto estos dos productos es del mismo material (polietileno de alta densidad); lo que sugiere, que dependiendo del tipo de polímero del que está hecho el envase dependerá el tipo de plastificante que se utiliza para su elaboración.

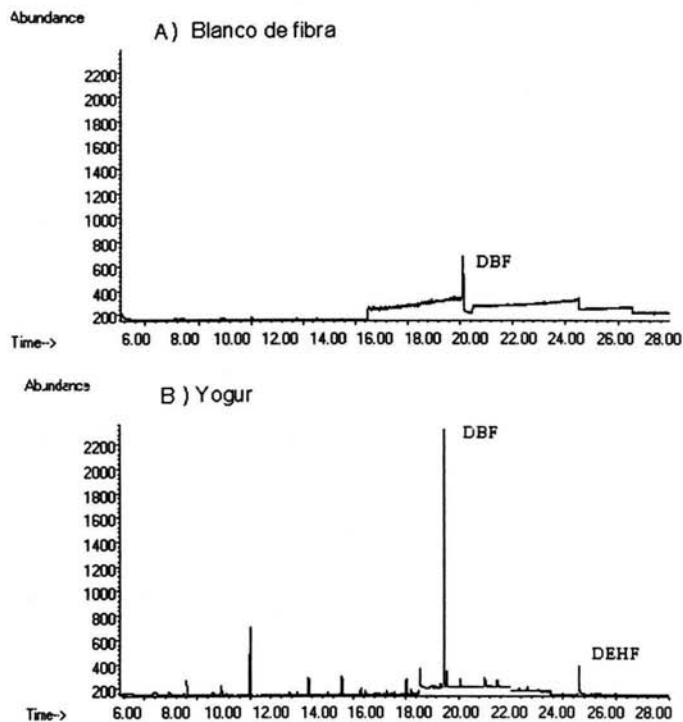


Figura 21. Cromatograma, A) Blanco de fibra PDMS; B) Análisis de yoghurt.

En este caso sólo se realizó la identificación de los ftalatos en el yoghurt, debido a que la agitación de la muestra no era la adecuada, por lo tanto había variación en los resultados.



4.5 DETERMINACIÓN DE FTALATOS EN YAKULT

Al igual que en yoghurt la MEFS se realizó por HS y se utilizó la fibra de PDMS para realizar la MEFS. En este caso no se optimizó la temperatura de extracción porque se observó en el análisis de yoghurt que a 80 °C se logra una buena extracción de los ftalatos, por lo que se utilizó esta temperatura para realizar los análisis.

4.5.1 Perfil de extracción

En la Figura 22 se muestra el perfil de extracción de los ftalatos en Yakult. El tiempo que se escogió para llevar a cabo la extracción fue de 40 minutos debido a que en ese tiempo algunos ftalatos alcanzan el equilibrio.

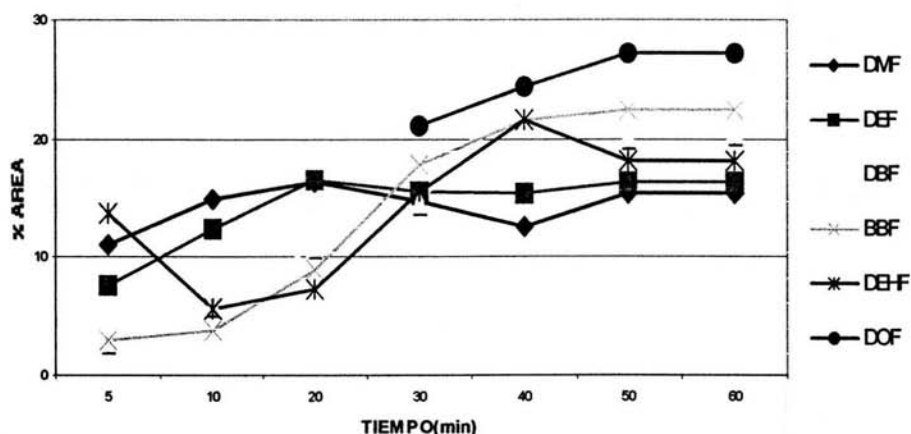


Figura 22. Perfil de extracción
Dimetil ftalato (DMF), Dietil ftalato (DEF), Dibutil ftalato (DBF), Butilbencil ftalato (BBF),
Dietil hexil ftalato (DEHF), Dioctil ftalato (DOF).



4.5.2 Metodología propuesta para la determinación de ftalatos en yakult

En la figura 23 se muestra la metodología que se propone para la determinación de ftalatos en yakult. Con esta metodología se realizó la identificación y cuantificación de ftalatos en yakult por CG-EM.

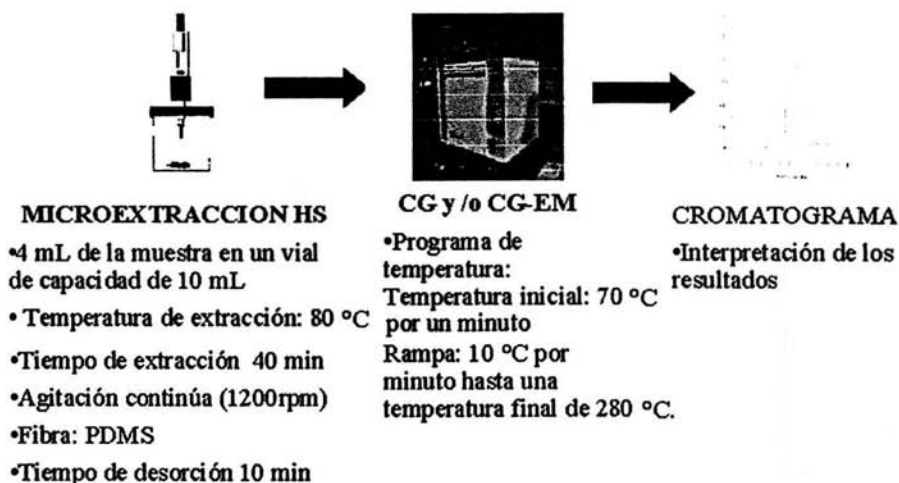


Figura 23. Metodología para la determinación de ftalatos en Yakult

4.5.3 IDENTIFICACIÓN DE FTALATOS EN YAKULT

En la Figura 24 se muestran los cromatogramas para el blanco de la fibra PDMS (A) y para el análisis de Yakult (B), la identificación se realizó de la misma forma que en la leche y yoghurt. El ftalato que se identificó corresponde al DBF como puede observarse en la Figura 21.

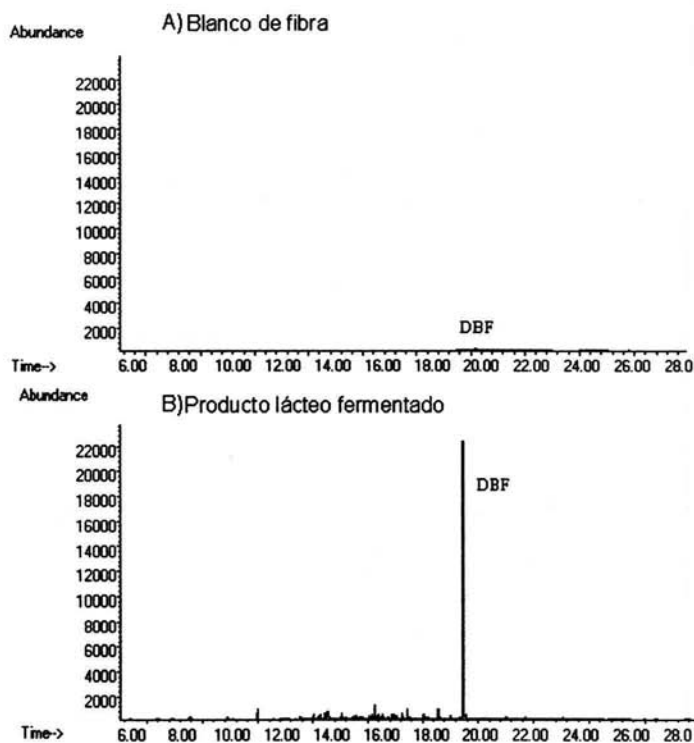


Figura 24. Cromatograma, A) Blanco de fibra PDMS; B) Análisis de Yakult.

4.5.4 CUANTIFICACIÓN DE FTALATOS EN YAKULT

Para el análisis de Yakult no se pudo obtener un blanco de matriz, como en el caso de la leche, debido a que este tipo de producto está contenido en envase de plástico, por lo cual el producto se encuentra en contacto con el material plástico. Debido a lo anterior, la cuantificación se realizó por adición patrón (Figura 25).



Los coeficientes de correlación (r) de los ftalatos, obtenidos de las curvas son: 0.9865 para el DEF; 0.9792 para el DBF, 0.2074 para el BBF y 0.6269 DHEF. Como puede apreciarse la linealidad es aceptable para el DEF y DBF; sin embargo, no se detectaron el DMF y el DOF en la concentración a la cual se realizó la curva.

Para determinar la concentración del DBF en la muestra, se utilizó la ecuación de la recta y se calculó una concentración de $36.7 \pm 4.6 \mu\text{g/L}$ ($n=3$) con un coeficiente de variación del 12.6%. Además se calculó la concentración con la gráfica para lo cual se extrapolaró la línea de tendencia al eje negativo de las "x", obteniéndose una concentración de aproximadamente $37 \mu\text{g/L}$.

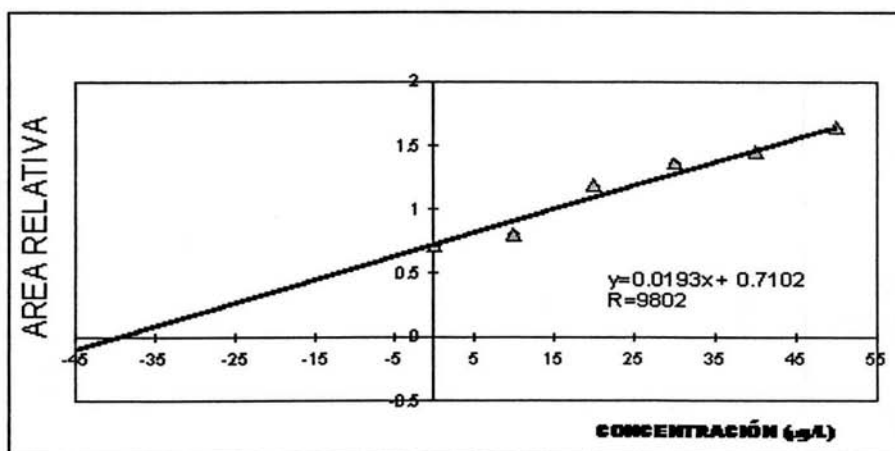


Figura 25. Curva de adiciones patrón del DBF

Se puede observar de la gráfica, que los resultados muestran un comportamiento lineal con un coeficiente de correlación de 0.9802.



La Consumer Product Safety Comisión (CPSC) estableció un nivel internacional de ingesta diaria de ftalatos que como mediada de seguridad fue de 100 veces más bajo del que no causa ningún problema en animales de laboratorio siendo de $150 \mu\text{g}/\text{kg}$ de peso/día y $70 \mu\text{g}/\text{kg}$ de peso/día para efectos carcinogénicos y endocrinos respectivamente.

Con lo que respecta a las concentraciones encontradas de los ftalatos en leche y en Yakult, se puede decir que no excede el límite recomendado por la CPSC, ya que si se toma en cuenta una ración de leche pasteurizada (250 mL), la cantidad de ftalatos que se ingeriría del DBF es menor a $7.5 \mu\text{g}$ y menor de $22.5 \mu\text{g}$ en el caso del DEHF; mientras que , si se consume una ración de Yakult (80 mL) la cantidad ingerida del DBF es de aproximadamente $3 \mu\text{g}$; por lo cual la ingesta proveniente de estas fuentes es baja en relación a la ingesta que se considera segura.

CAPITULO V

CONCLUSIONES



5.1 Conclusiones

De los resultados obtenidos en este trabajo se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1. En la determinación de ftalatos se deben tomar muchas precauciones en la selección del material a utilizar y en su limpieza ya que de lo contrario pueden aparecer problemas de contaminación; así como realizar un blanco de la fibra para cada análisis, para asegurar que no halla ninguna contaminación de ftalatos.
2. La MEFS puede combinarse muy fácilmente con la CG ya que la desorción se produce térmicamente en un inyector split/splitless. De este modo, esta técnica no precisa del uso de disolventes para llevar a cabo la extracción y la desorción de los analitos.
3. La metodología desarrollada por MEFS-CG-EM permite la determinación de ftalatos en leche y derivados, no precisa el uso de solventes, el tiempo del análisis es corto y requiere poca cantidad de muestra.
4. En todas las muestras analizadas de leche y en derivados se identificó el DBF y sólo en la leche entera y el yogur el DEHF.
5. En el análisis cuantitativo de ftalatos en leche se sugiere realizar curvas de adición patrón para obtener resultados dentro del intervalo de concentración encontrado en las muestras.



6. Se encontró que probablemente la cantidad de grasa es un factor que favorece la migración de los ftalatos del envase al alimento.
7. La concentración de ftalatos calculada en la leche y el Yakult esta por debajo del nivel internacional de ingesta diaria de ftalatos.
8. Existe hasta la fecha incertidumbre y controversia sobre los efectos crónicos que pudieran ocasionar los ftalatos en especial el DHEF, por esta razón es de suma importancia adelantarnos al futuro y desarrollar metodologías en la determinación de ftalatos en alimentos, porque es un hecho que existe migración del envase al alimento.
9. Este trabajo es sólo una aportación de lo mucho que queda por hacer en cuestión de ftalatos en alimentos ya que como Químicos de alimentos tenemos la obligación de darle al consumidor un producto inocuo que no atente contra su salud.

TRABAJO FUTURO

Con la finalidad de lograr que el método propuesto sea aplicable para control de calidad, es necesario que sea evaluado y homologado bajo criterios que cumplan con los estándares para este tipo de pruebas. Es por ello que se requiere hacer la validación formal del método.

CAPITULO VI

BIBLIOGRAFÍA



6.1 Bibliografía

1. J. Tarango. Manual de Ingeniería y Diseño de Envase y Embalaje para Industria de los alimentos, farmacéutica, química y de cosméticos, 3ª edición, packagin Ing. Envase y Embalaje, México 2001.
2. A. Oearls. J. Chromatogr. A, 983: 237-246, 1998.
3. M. Castillo, D. Barceló. Trends Anal. Chem., 16: 574-581, 1997.
4. S. Jobling, T. Reynolds, R. White. Environm. Health Pers., 103: 583-588, 1995.
5. P. Nigel. J. Repr. Tox., 14: 183-192, 2000.
6. National primary drinking water regulation. US Environmental Protect Agency, federal register part 12 p. 395, Washington D.C. Julio 1991.
7. Lista de sustancias prioritarias en el ámbito de la política de aguas, Diario Oficial De las comunidades Europeas, Decisión 2455/2001 del Parlamento Europeo y del Consejo, Noviembre 2001.
8. A. Peñalver, E. Pocurrull, B. Borrull. J. Chromatogr. A, 872: 191-201, 2000.
9. A. Peñalver, E. Pocurrull, B. Borrull. J. Chromatogr. A, 922: 377-384, 2001.
10. G. Prokupkova, K. Halodova. Anal. Chimica Acta, 457: 211-223, 2002.
11. E. Psillakis, N. Kalogerakis. J. Chromatogr. A, 999:145-153, 2003.
12. M. T. Kelly, M. Larroque. J. Chromatogr. A, 841: 177-185, 1999.
13. P. Bustamante, B. Limaza. Rev. Int. Amb., 17(4) 204-215, 2001.



14. M. Castillo, D. Barceló. *Anal. Chem.*, 18: 26-37, 1999.
15. NORMA Oficial Mexicana NOM-155-SCFI-2003, Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado-Denominaciones, especificaciones fisicoquímicas, información comercial y métodos de prueba.
16. P. Keating, H. Gauna. *Introducción a la lactología*, Ed. Limusa, España 1992.
17. Secretaría de Comercio y Fomento Industrial Norma Mexicana NMX-f-444-1983 Alimentos- Yoghurt o Leche búlgara.
18. T. Matsuzaki. *Int. J. Food. Microbiol.*, 41: 133-140, 1998.
19. J. Pawliszyn. *Solid Phase Microextraction Theory and Practice*, ed. Wisley-VCH, New York 1997.
20. M.F. Apendurada. *J. Chromatogr. A*, 889: 3-10, 2000.
21. D. Louch, S. Mothangh, J. Pawliszyn. *Anal. Chem.*, 64: 1187-1196, 1992.
22. Z. Zhang, J. Pawliszyn. *Anal. Chem.*, 65: 1843-1851, 1993.
23. Z. Zhang, J. Pawliszyn. *Anal. Chem.*, 66: 444-502, 1994.
24. H. Verhoeven, T. Beuerle. *Chromatographia*, 46: 63-69, 1997.
25. C. Haberhauer-Troyer, E. Rosenberg. *J. Anal. Chem.*, 366: 377-386, 2000.
26. Owel R. Fennema. *Química de los Alimentos*, Ed. Acribia S.A. Zaragoza España 1993.
27. R. Eisert, J. Pawliszyn. *Critical Rev. Anal. Chem.*, 27: 103-110, 1997.
28. R. Eisert, K. Kevsen. *J. Chromatogr. A*, 733: 143-149, 1996.

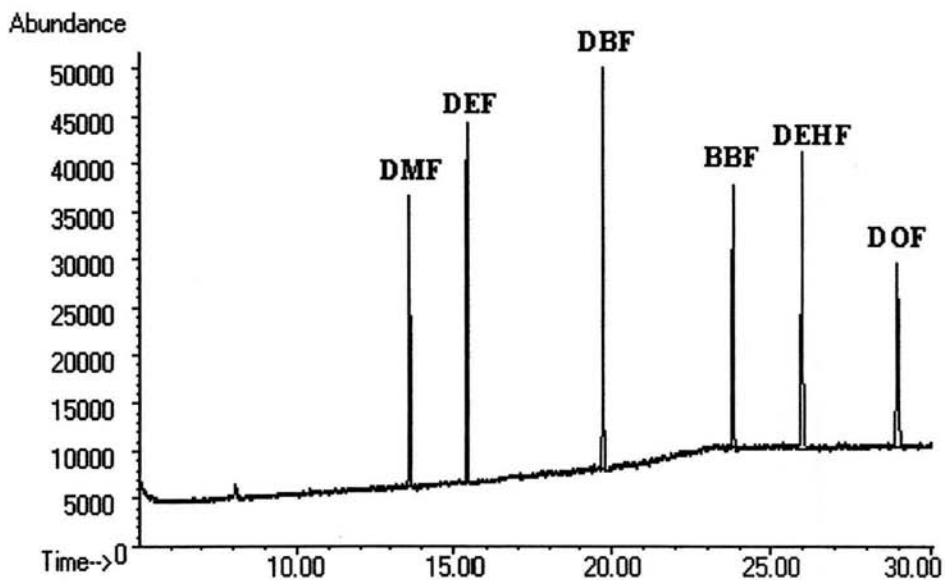


29. R. Alzaga, A. Peña, J. Ma: Bayana. *J. Sep. Sci.*, 26: 87-96, 2003.
30. V.A. Noah, M. Godin. *J. Intraven. Nurs.*, 17:210-213, 1994.
31. Prohibición de la comercialización de juguetes y artículos de puericultura fabricados con PVC, *Diario Oficial De las comunidades Europeas*, Decisión 1999/815/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, diciembre 1999.
32. M.A, Babich. The risk of chronic toxicity associated with exposure to phthalates in children's product. Report of U.S. Consumer Product Safety, Washington DC, Diciembre de 1998.

ANEXO

**ANEXO I**

Cromatograma de la mezcla estándar de ftalatos.



Cromatograma del estándar de Ftalatos. Programa de temperatura; temperatura inicial 70°C durante un minuto, incrementándose 10°C/min hasta 280°C durante 8 min.



ANEXO II

Linealidad del método para la determinación de ftalatos en leche.

