



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Química.

Determinación e identificación de pesticidas en
productos frutícolas consumidos por poblaciones no
expuestas a condiciones de fumigación.
“Fragaria: Fresa”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUÍMICO DE ALIMENTOS.

P R E S E N T A:

DEMETRIO ELIEZER MORALES TREJO.



MÉXICO, D.F.

2009



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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: Humberto Ramón Gómez Ruiz.

Vocal: Francisca Aída Iturbe Chiñas.

Secretario: Josefina Elizalde Torres.

1er suplente: Hermilo Leal Lara.

2do suplente: Lucia Hernández Garciadiego.

Sitio donde se desarrollo el tema:

Laboratorio 108 de Química Analítica Ambiental. Departamento de Química Analítica. División de Estudios de Posgrado. Facultad de Química, UNAM.

Asesor de tema:

M. en C, Humberto R. Gómez Ruiz.

Sustentante:

Demetrio Eliezer Morales Trejo.

Dedicatorias.

Para Estela y para Demetrio. Papás gracias por estar conmigo, su esfuerzo, su apoyo, sus enseñanzas, sus palabras y sobre todo su amor me han permitido ser una persona que buscare siempre alcanzar sus sueños y metas. Gracias por apoyarme para que finalizara con éxito esta etapa de mi vida.

Para Alfonso y Verónica. Hermanitos, gracias por estar siempre conmigo, gracias por su apoyo, sus palabras de aliento y todos sus consejos, este trabajo también es de ustedes.

Para Aurelia y Cristóbal. Gracias Tíos, con sus palabras, sus consejos y su apoyo han sido forjadores muy importantes para que yo sea una persona comprometida en todo lo que emprendo. Gracias Nenita por acompañarme todos los días de mi vida, Gracias tío Cristobal donde quiera que estés, siempre te llevare conmigo.

Agradecimientos.

A la universidad Nacional Autónoma de México por la educación de excelencia y gratuita otorgada durante todo este tiempo.

A la Facultad de química porque fue el espacio donde recibí una educación profesional de excelencia y formativa.

Al Maestro Humberto Gomez Ruiz, por abrirme un espacio en su laboratorio y darme la oportunidad de superarme. Gracias

A la maestras Francisca Iturbe y Josefina Elizalde por el tiempo dedicado y los comentarios hechos durante la revisión de la tesis.

A todos mis amigos por su amistad, con ustedes he vivido tantas cosas, Nidia, Ricardo, Sergio, Ernesto, Carlos Alberto, Juana, Lilia, Heriberto, Edson, Ángel, Diego, Ana, Enrique, Luis Humberto, Luz, Jacqueline, Víctor, Aida, Norma, Israel, Barbará, Nancy, Rosa etc, etc. Con ustedes he pasado inolvidables momentos que siempre guardare.

A Toby, fuiste mi compañero durante todo este trayecto, gracias por acompañarme durante las muchas horas en las noches en las que estaba ocupado.

Índice.

	Página
Introducción.	1
Objetivo.	3
Capítulo I. Antecedentes.	4
1.1 Pesticidas o plaguicida.	4
1.1.1 Definición de pesticida.	4
1.1.2 Clasificación.	4
1.1.3 Formas de aplicación y formulaciones de pesticidas	5
1.1.4 Distribución de los plaguicidas en las plantas.	6
1.2 Toxicidad de los pesticidas.	8
1.2.1 Órganoclorados.	10
1.2.2 Organofosforados.	10
1.2.3 Carbamatos.	11
1.2.4 Límite Máximo Residual.	11
1.3 Fresa.	12
1.3.1 La fresa en México.	13
1.3.2 Clasificación taxonómica de la fresa.	14
1.3.3 Límites Máximos Residuales Cicloplafest y EPA en fresas.	15
1.4 Métodos de análisis para pesticidas en alimentos.	17
1.4.1 Muestreo.	17
1.4.2 Métodos de análisis.	19
1.4.3 Preparación de la muestra.	20
1.4.4 Limpieza.	21
1.4.4.1 Extracción.	21
1.4.4.1.1 Extracción líquido-Líquido.	22
1.4.4.1.2 Extracción en fase sólida.	22
1.4.4.1.3 Microextracción en fase sólida.	23
1.4.4.1.4 Purga y trampa.	24
1.4.4.2 Limpieza	25
1.4.4.3 Concentración.	26

1.4.4.3.1	Kuderna Danish.	27
1.4.4.3.2	Evaporador con corriente de nitrógeno.	28
1.4.4.3.3	Rotavapor.	28
1.4.4.4	Separación.	30
1.4.4.5	Detección.	30
1.5	Métodos Multiresiduos para análisis de Alimentos (MRM).	31
1.5.1	Métodos Multiresiduos.	31
1.5.2	Ventajas de los métodos multiresiduos multiclase sobre métodos multiresiduos selectivos.	32
1.6	Cromatografía.	33
1.6.1	Teoría cromatografica.	34
1.6.1.1	Constante de distribución. K	34
1.6.1.2	El cromatograma.	34
1.6.1.3	Factor de capacidad. K	35
1.6.1.4	Factor de separación. α	36
1.6.1.5	Resolución. R_s	37
1.6.1.6	Eficiencia de la columna.	38
1.6.1.7	Número de platos teóricos. N	39
1.6.1.8	Altura equivalente a un plato teórico. H	39
1.6.2	Instrumento: Cromatógrafo de Gases.	42
1.6.2.1	Gas portador.	42
1.6.2.2	Control de flujo.	44
1.6.2.3	Sistemas de inyección de muestras.	44
1.6.2.4	Horno.	47
1.6.2.5	Columnas.	48
1.6.2.5.1	Fases estacionarias.	49
1.6.2.6	Detectores.	50
1.7	Detector del espectrómetro de Masas.	54
1.7.1	Instrumento: Espectrómetro de Masas.	56
1.7.1.1	Sistemas de Introducción de muestra.	56
1.7.1.2	Fuentes de iones.	57

1.7.1.2.1	Métodos de ionización de uso frecuente.	58
1.7.1.3	Analizadores de masas.	59
1.7.1.4	Detectores.	60
1.7.1.5	Sistema de vacío.	62
1.8	Sistema Acoplado Cromatografía de Gases- Espectrometría de Masas.	63
1.8.1	Instrumento: Sistema acoplado CG/EM.	63
1.8.1.1	Interfases: GC/MS.	64
1.8.1.2	Métodos de Adquisición de Resultados.	65
1.8.1.3	Ventajas del CG/EM.	66
1.8.1.4	Desventajas de CG/EM.	66
Capítulo 2.	Desarrollo experimental.	67
	Instrumental y Material.	68
2.1.	Optimización del proceso de separación de pesticidas.	71
2.1.1.	Optimización del cromatógrafo de gases.	71
2.1.1.1.	Selección de la técnica de inyección.	71
2.1.1.2.	Optimización del programa de temperatura.	72
2.1.1.3.	Optimización del espectrómetro de masas.	72
2.1.2.	Determinación de límite de detección y cuantificación Instrumental.	73
2.2.	Desarrollo del Método de Preparación de Muestras.	75
2.2.1.	Optimización del Método de preparación de muestras.	75
	Diagrama de flujo. Método MOG Modificado para frutos con alto contenido de humedad.	76
	Diagrama de flujo. Método DEMA-HGR, para alimentos con alto contenido de humedad (> 80% de humedad), lípidos (<1.5 %).	77
2.3.	Porcentaje de Recobro.	78
2.4.	Determinación e identificación de pesticidas en fresas.	80
Capítulo 3.	Resultados y Análisis de resultados.	81

3.1	Optimización del proceso de separación de pesticidas.	81
3.1.1	Optimización del cromatógrafo de Gases.	81
3.1.1.1	Selección de la técnica de Inyección.	81
3.1.1.2	Establecimiento del programa de temperatura.	92
3.1.1.3	Optimización del espectrómetro de Masas.	95
3.1.2	Límites de detección y cuantificación instrumental.	98
3.2	Desarrollo del método de preparación de muestras.	105
3.2.1	Optimización del Método de preparación de Muestras.	105
3.2.2	Porcentaje de Recobro.	112
3.3	Determinación e identificación de pesticidas en fresas.	114
	Capítulo 4. Conclusiones.	118
	Bibliografía.	119
	Anexo I. Identificación de Pesticidas.	
	Anexo II. Curvas de Calibración.	
	Anexo III. Espectros de Masas de los pesticidas, E.I. y Surrogado.	
	Anexo IV. Muestras de fresa: Cromotogramas y Espectros de Masas.	

INTRODUCCIÓN.

Un pesticida se define de acuerdo a la Food Environmental Protection (Act FEPA 1985); como una sustancia, preparación u organismo preparado para destruir cualquier organismo indeseable o peste en un cultivo. Este término cubre a un amplio espectro de compuestos biológicamente activos, que incluyen herbicidas, fungicidas, insecticidas, etc.

El consumo mundial de pesticidas se ha mantenido constante durante las últimas dos décadas; se estima que tan solo en el año 2007, el consumo total ascendió a 2,000,000 toneladas de estos productos, los cuales se distribuyeron de la siguiente manera: Los Estados Unidos consumieron el 24%, en Europa el 45% y el resto lo consumieron los demás países; pero se ha observado una ligera tendencia a la baja en esta última década, debido a que se han identificado nuevos ingredientes activos, los cuales se ha comprobado son cada más potentes, por lo tanto las dosis empleadas han sido menores cada vez. Sin embargo el consumo de pesticidas aun sigue siendo dominado por pesticidas desarrollados en décadas anteriores, como el malation, paration, etc. ⁽¹⁾

En la actualidad los productores de frutas y hortalizas en nuestro país disponen de una amplia variedad de productos para usar en sus cultivos; que se presenta en varias presentaciones: soluciones (de varias viscosidades), emulsiones, suspensiones, polvos mojables, polvos, "pellets", hojuelas, gránulos, aerosoles, etc.

Debido a esta abundancia ha generado que productores que trabajan el campo únicamente para un mercado reducido o local, un desconocimiento sobre el uso adecuado de estos productos; Sin embargo esto no solo es originado en una región; es importante mencionar que en nuestro país la distribución de las áreas agrícolas se encuentran bajo el esquema de parcelas, ejidos, etc. que divide las superficies cultivables en terrenos que generalmente no superan los 10,000m² y que en su mayoría consisten en terrenos de tan solo 1,000 a 5,000m² o aún menores, lo que dificulta aún más el poder estudiar el impacto del uso de agroquímicos en el campo .

Además en nuestro territorio existen diferentes poblaciones autóctonas con lenguajes propios este grupo se compone de los agricultores con recursos mas limitados; al no comprender el español, y por lo tanto no saber leer ni escribir, y menos el idioma en el que regularmente se encuentran etiquetados estos productos, provocan que los pesticidas no se empleen en forma

correcta, ya que solo dependen de lo que les recomiende en su momento la refaccionaria agrícola.

Estos serían solo algunos de los factores que propiciarían la presencia de los residuos de pesticidas en los productos que llegan a los mercados establecidos, temporales (sobre ruedas) y centrales mayoristas; Esto nos vuelve consumidores potenciales de residuos de pesticidas de los alimentos que se consumen; ya que el distribuidor final desconoce a que plaguicidas pudieron haber estado expuestos los productos que comercializa.

México, es productor y exportador de frutas y hortalizas, y crecen dentro de este territorio algunos de los frutos que se caracterizan por su alto contenido de agua, bajo contenido de grasa y contenido medio de azúcares; para los cuales la presencia de plagas es constante a lo largo del año, debido al clima donde estos se producen, ya que son lugares donde es templado-tropical todo el año; por lo tanto es de suma importancia el contar con programas continuos de monitoreo de pesticidas en alimentos; que lamentablemente en nuestro país no existen aun este tipo de programas o simplemente no existe la intención de hacerlo publico a los consumidores.⁽²⁾

Dada la diversidad de plaguicidas disponibles a los agricultores, cualquier procedimiento de control debe contemplar metodologías analíticas que permitan la detección simultánea del mayor número posible de estos compuestos. Esto a pesar de que el uso de los plaguicidas se recomienda y es específico para cada tipo de fruto y hortaliza.

Dentro de los frutos y hortalizas que se producen en el país uno de los cultivos más importantes desde el punto de vista económico es la producción de fresas ya que una buena parte de este producto se exporta.

El desarrollo de esta nueva metodología multiresiduos contribuirá con el desarrollo de nuevos métodos diseñados específicamente para alimentos, que no solo se caracterizaran por realizar el cálculo preciso de los pesticidas, sino que estas también lo harán porque serán identificados plenamente, lo que antes era casi imposible debido a la complejidad que caracteriza a los alimentos y que en el pasado solo se hacia en función de los tiempos de retención; y finalmente se todo este desarrollo se traducirá en la practica en una reducción de tiempo neto en el análisis de muestras.

OBJETIVO.

Implementar un método de análisis multiresiduos adecuado para el monitoreo de pesticidas en fresas. Frutos con un contenido de lípidos <1.5%, con bajo contenido de carbohidratos y con una humedad >85%.

Objetivos particulares.

- Implementar el procedimiento de extracción y concentración de los plaguicidas presentes en fresas.
- Implementar el proceso de separación, identificación y cuantificación empleando un sistema acoplado cromatografía de gases/espectrometría de masas (CG/EM). Esto implica que se realice:
 - Optimización de la separación cromatográfica
 - Optimización de las técnicas de inyección disponibles en el instrumento.
 - Optimización de la detección por espectrometría de masas en sus dos modos de operación SCAN (barrido completo del espectro) y SIM (monitoreo selectivo de iones). El primero permite la identificación inequívoca de los plaguicidas presentes y el segundo permite un análisis cuantitativo de alta sensibilidad.
- Determinar la cantidad de residuos presentes en muestras de fresas, para con ello poder evaluar la ingesta de una población no expuesta ocupacionalmente a plaguicidas, como lo es la población de la ciudad de México.

ANTECEDENTES.

1.1 Pesticidas o plaguicida.

1.1.1 Definición de plaguicida.

“Plaguicida es cualquier sustancia o mezcla de sustancias que se destinan a controlar cualquier tipo de plaga, incluidos los vectores de enfermedades y los animales, así como las especies no deseadas que causen perjuicio o que interfieran con la producción agropecuaria y forestal; y las que interfieren con el bienestar del hombre y los animales.”⁽⁴⁾

1.1.2 Clasificación.

Los pesticidas se han clasificado de muchas maneras, estos son algunas formas de clasificarlos:

- Por modo de acción: de contacto, ingestión, sistémico, fumigante, repelente y defoliante.
- Por actividad biológica: Insecticidas, acaricidas, nematocidas, molusquicidas, rodenticidas, fungicidas y herbicidas.
- Por su persistencia en el ambiente: Es el tiempo que transcurre entre la aplicación y la degradación ambiental del compuesto. *Tabla 3.1.*

Tabla 1.1. Clasificación de los plaguicidas según su persistencia ⁽⁴⁾

Clasificación	Persistencia
Ligeramente persistentes	Menos de cuatro semanas.
Poco persistentes	De cuatro a veintiséis semanas.
Medianamente persistentes	De veintiséis a cincuenta y dos semanas.
Altamente persistente	Más de un año.
Permanentes	Más de veinte años.

- Por el uso al que se destinan: Agrícolas, forestales, urbanos, para jardinería, pecuarios, domésticos e industriales.

- Por familia de compuestos: Organoclorados, Organofosforados, Carbamatos, Piretroides, de origen botánico, de cobre, Tiocarbamatos, Ftalamidas, Carboxamidas, Carboximidias, Guanidinas y Naftoquinonas, Organoestánicos, orgánicos con azufre, Clorofenoxi, Dinitrofenoles, derivados de urea, Triazinas, derivados de los ácidos Tricloroacético y Tricloropicolinico, Bipiridílicos y otros mas. ⁽⁴⁾

1.1.3 Formas de aplicación y formulaciones de los pesticidas.

Los pesticidas generalmente se aplican sobre los cultivos a través de dos sistemas principales:

1. Empleando el producto químico tal cual, sin formulación alguna.
2. Utilizando el producto debidamente acondicionado en un vehiculo adecuado (formulación), como mezclas de insecticidas con fertilizantes, agua, polvos, en forma de gránulos, suspensiones, micro-encapsulados, etc.

Formulaciones sólidas: Polvos espolvoréales.

Polvos solubles.

Polvos mojables.

Micro-encapsulados.

Gránulos.

Formulaciones líquidas: Solubles en agua.

Emulsionables.

Suspensiones fluidas.

Su aplicación varía según el tipo de plaguicida y de la formulación de que se trate; la aplicación de estos en general se clasifica por el tamaño de la partícula. *Tabla 1.2*

Tabla 1.2. Tipos de aplicación de formulaciones.

Diámetro volumétrico mediano de las gotas (μm)	Clasificación del tamaño de las gotas
< 50	Aerosol
51-100	Niebla
101-200	Aspersión fina
201-400	Aspersión mediana
>400	Aspersión gruesa

La aplicación de polvos ha venido declinando debido a los riesgos de arrastre e inhalación de partículas finas de menos de $30\mu\text{m}$. En contraste el número de plaguicidas formulados como gránulos se ha incrementado, su aplicación es por espolvoreo (tipo salero). Mientras que algunos plaguicidas volátiles se inyectan o entierran en el suelo. ^(5,6)

1.1.4 Distribución de los pesticidas en las plantas.

Las características de la planta tratada influirán en la distribución y en la posterior evolución de los residuos; la estructura física de la epidermis (rugosidad, pilosidad, etc.) de la que depende el tamaño de área expuesta, así como su composición química (recubrimiento poroso, etc.) serán los factores que la determinen, ya que la mayor parte de los plaguicidas son no polares por lo que se pueden solubilizar en la parte cerosa, reteniéndose en ella y alargando su persistencia.

Los plaguicidas pueden presentar actividad translaminar (es decir pasan a través de la epidermis a las hojas pero no se mueven más allá), actividad sistémica, que puede ser acropetal (se mueve de las raíces a las hojas) o basipetal (se mueve de las hojas a las raíces). ^(7,8)

Los plaguicidas se depositan sobre la planta, para después penetrar en ella. Se denomina “*deposito*” a la cantidad de plaguicida que queda sobre la planta o vegetal inmediatamente después de un tratamiento y se expresa en miligramos de plaguicida por kilogramos de vegetal (mg/Kg).

La cantidad depositada de plaguicida que queda sobre un vegetal tras una aplicación depende principalmente de los siguientes factores:

- a) Dosis de plaguicida aplicado: A mayor dosis, mayor depósito, se expresa en kilogramo de materia activa por hectárea, es decir, cantidad de plaguicida por unidad de superficie cultivada.
- b) Naturaleza química del plaguicida: Su estructura molecular (ejemplo: la polaridad, determina su retención).
- c) Naturaleza de la formulación: la presencia de coadyuvantes (adherentes, mojantes, etc.) puede aumentar la retención en la planta.
- d) Características de la aplicación: Si el tamaño de la gota (en las aplicaciones de pulverización) o partícula (espolvoreo) es grande, mayor será el riesgo de deriva y evaporación, y los factores climáticos tomarán una mayor importancia.
- e) Morfología y naturaleza de la superficie vegetal: en especial la relación superficie/peso vegetal y los recovecos que presenta.
- f) Condiciones climáticas en el momento de aplicación: a mayor velocidad del viento, mayor deriva, a mayor temperatura, mayor evaporación; secundariamente también pueden influir la humedad relativa, presencia de rocío, etc.
- g) Tiempo de aplicación: La aplicación deberá realizarse cuando la plaga o enfermedad se encuentre en su estado más vulnerable, pero siempre que el tiempo transcurrido entre la aplicación y la recolección sea el suficiente para que la cantidad de residuos disminuya a un nivel aceptable⁽⁷⁾

Mientras que los principales factores que determinan la penetración de un plaguicida en un órgano vegetal, son los siguientes:

- Liposolubilidad del plaguicida: aumenta la facilidad de penetración en función de la lipofilia del sustrato vegetal.
- Volumen y estructura molecular.
- Formulación del plaguicida: normalmente los tensoactivos favorecen la penetración.
- Grado de esparcimiento del plaguicida: cuanto más extendido éste, mayor superficie de penetración tiene.
- Factores ambientales.

1.2 Toxicidad de los pesticidas.

Los efectos tóxicos o adversos de un agente químico sobre un sistema biológico no se producen a menos que el agente o los productos de su metabolismo alcancen el sitio apropiado del organismo, a una concentración y por un tiempo suficiente que les permita producir las manifestaciones tóxicas. El que un efecto tóxico ocurra o no, dependerá de las características del agente, el ambiente y el huésped. ⁽⁹⁾

En la toxicidad de los plaguicidas los factores que intervienen en su afectividad se deben principalmente a: su estructura molecular (relación estructura-actividad), sus propiedades fisicoquímicas; de las que depende su afinidad por sistemas biológicos específicos; la de exposición a los mismos, así como la intensidad y duración de esta, la vía de penetración, etc.

Es frecuente que los efectos tóxicos de éstos se aumenten por los ingredientes de la formulación con que se mezclan.

Los métodos empleados para medir la toxicidad son la dosis letal media (DL_{50}) expresada en miligramos de plaguicida por kilogramo de peso corporal (mg/Kg), esta evalúa la toxicidad aguda; también se puede expresar por el concepto de potencial de toxicidad (pT), que es la dosis tóxica en términos de concentración y se expresa en moles de plaguicida por kilogramo de peso corporal (mol/kg). Siendo el primero el que más se usa.

Los resultados de DL_{50} para cada sustancia sirven de base para los sistemas de clasificación de toxicidad de los plaguicidas. La toxicidad de los plaguicidas presenta varios conceptos. En primer lugar se distingue entre toxicidad aguda y toxicidad crónica: La toxicidad aguda puede ser oral, dérmica, o por inhalación *Tabla 1.3*

Toxicidad oral aguda se denomina a la muerte del 50% de la población de ensayo con solo una o varias dosis administradas del agente tóxico en un período de 24 horas y se expresa a través del DL_{50} .

La toxicidad dérmica corresponde a los riesgos por el contacto y penetración a través de la piel y se mide como DL_{50} dérmica aguda, que es la cantidad de toxico expresada en mg/Kg que en

contacto por la piel del animal ensayado durante 24 horas es capaz de producir la muerte por penetración del 50% de los animales de ensayo en un plazo de 14 días.

La toxicidad por inhalación debida a una atmósfera contaminada como en el caso de los fumigantes, espolvoreos, nebulizaciones, etc. Se mide por la concentración letal que es capaz de producir la muerte del 50% de los animales ensayados (CL_{50}) que se expresa en miligramos de sustancia por metro cúbico de aire. ^(5,10)

Tabla 1.3 Clasificación de los plaguicidas conforme a su peligrosidad.

Categoría	DL ₅₀ mg/Kg. de masa corporal				CL ₅₀ Aguda por inhalación mg/L Exposición: 1hr Mas de - hasta
	Aguda oral		Aguda dérmica		
	Estado físico		Estado físico		
	Sólido	Líquido	Sólido	Líquido	
	Mas de - hasta	Mas de - hasta	Mas de - hasta	Mas de - hasta	
I Extremadamente Tóxico	-- 5.0	-- 20	-- 10.0	-- 40	-- 0.2
II Altamente tóxico	5 50	20 200	10.0 100	40 400	0.2 2
III Moderadamente tóxicos	50 500	200 2000	100 1000	400 4000	2.0 20
IV Ligeramente tóxicos	500 --	2000 --	1000 --	4000 ---	20 --

(4)

Desde el punto de vista de los residuos interesa más su toxicidad a corto y mediano plazo (toxicidad subcrónica) y largo plazo (toxicidad crónica). Entre los factores de interés destacan los siguientes.

- Posibilidades cancerígenas.
- Efectos mutagénicos.
- Efectos teratogénicos.
- Metabolismos de los plaguicidas en el organismo con las características toxicológicas de los metabolitos y los mecanismos de eliminación de estas sustancias.
- Neurotoxicidad.
- Posibles efectos retardados.
- Potenciación por los efectos de otros tóxicos. ⁽¹¹⁾

1.2.1 Órganoclorados ^(10,11):

Algunas reacciones bioquímicas específicas de los compuestos organoclorados son la inhibición de la enzima ATPasa, la elevación de la fosfatasa alcalina y la transaminasa seroglútamica. Tanto el DDT como sus análogos actúan sobre la corteza suprarrenal, en donde causan efectos antiesteroidales y alteraciones en el metabolismo de la vitamina A. En el sistema nervioso central y periférico, también causan cambios en el movimiento de los iones sodio y potasio a través de la membrana axonal; además alteran las concentraciones de norepinefrina y otros neurotransmisores tales como el ácido gama-amino butírico (GABA).

Se ha observado que estos compuestos suelen tener potencial carcinogénico y, en algunos casos teratogénico y embriotóxico.

Su toxicidad aguda suele ser baja, pero se presentan efectos adversos a largo plazo (en muchos casos no se manifiestan en el organismo sino en su descendencia) por lo que contaminan el medio ambiente.

1.2.2 Órganofosforados ^(10,11):

Estos actúan inhibiendo la acción de la acetilcolinesterasa (ACE). Este enzima realiza la hidrólisis de la acetilcolina (AC) que se genera en las terminales nerviosas y que actúa como transmisora del impulso nervioso. Por hidrólisis bajo la acción de la acetilcolinesterasa la AC se convierte en colina, la cual permanece en estado iónico activo. En el primer paso de esta reacción la acetilcolinesterasa se combina con la acetilcolina para formar un complejo reversible que acetila la enzima y libera la colina. Después, el agua del medio permite liberar la enzima del producto acetilado y deja en libertad a la enzima.

Los efectos de la intoxicación por pesticidas organofosforados se deben a la fosforilación de la enzima acetilcolinesterasa, esto produce la acumulación de la acetilcolina en la sinapsis del nervio, lo que produce que los impulsos nerviosos no se transmitan normalmente.

Su toxicidad crónica es difícil de evaluar, ya que estudios epidemiológicos sobre efectos crónicos de los pesticidas organofosforados en el hombre ha sido difícil de relacionar los efectos

observados con agentes causales específicos; aunque se ha encontrado una correlación importante entre la incidencia de efectos neurológicos y el tiempo de exposición de estos plaguicidas.

1.2.3 Carbamatos⁽¹¹⁾.

Al igual que los organofosforados, los carbamatos actúan inhibiendo la actividad de la acetilcolinesterasa pero, a diferencia de ellos, la unión con la enzima es reversible. Las principales diferencias entre carbamatos y organofosforados son las siguientes: (a) la unión a la esterasa es reversible, por lo tanto, las manifestaciones son de menor duración; (b) penetran poco al sistema nervioso central, por lo que en general no hay manifestaciones en ese nivel; (c) el intervalo que existe entre la dosis efectiva y la dosis letal es mayor para los carbamatos y (d) los niveles de actividad de la colinesterasa retornan rápidamente a la normalidad.

1.2.4 Limite máximo residual.

Un parámetro relacionado con los alimentos es llamado limite máximo residual (LMR), que es de amplio uso en la aplicación de plaguicidas. Estos limites máximos residuales representan el contenido máximo residual de la sustancia analizada que se permite que este presente en un determinado alimento o grupo de alimentos; y es el resultado de estudios experimentales de acuerdo a las “Buenas Practicas Agrícolas “(BPA).

De otra manera puede definirse como la concentración permitida de un residuo, en o sobre un alimento, que puede aceptarse para el consumo humano o animal a largo plazo. Se expresa en miligramos de plaguicida por kilogramo de peso del alimento fresco (mg/Kg o ppm).

Existen dos criterios para la fijación del límite máximo de residuos (LMR's), el toxicológico y el agronómico *Figura 1.1*, en el primero se pretende que la ingestión diaria del plaguicida a lo largo de toda una vida no provoque efectos adversos a la salud de los consumidores, mientras que, el segundo las dosis empleadas de los plaguicidas deben ser las adecuadas para proteger los cultivos de plagas y/o enfermedades y minimizar los riesgos toxicológicos y ambientales: Esto se logra haciendo uso de buenas practicas agrícolas, eligiendo las alternativas menos contaminantes,

tratando sólo cuando sea necesario, no superando las dosis recomendadas, respetando los plazos de seguridad tras la aplicación, etc.⁽⁷⁾

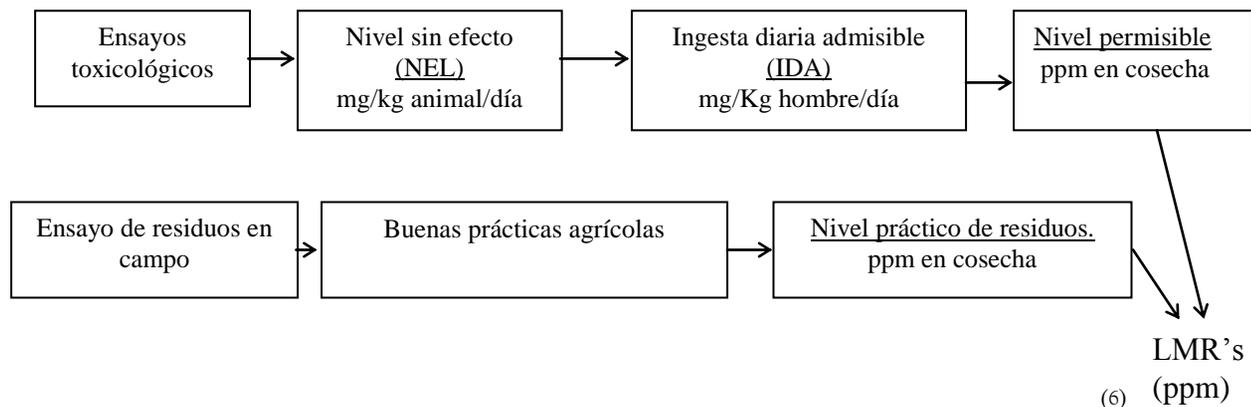


Figura 1.1. Criterios para la fijación del límite máximo de residuos.

En México los encargados de fijar los límites máximos de residuos son la Secretaría de Agricultura Ganadería y Desarrollo Rural (SAGARPA) y la Comisión Intersecretarial para el Control y uso de Plaguicidas, Fertilizantes y Sustancias Tóxicas. (CICOPLAFEST). Basándose principalmente en los datos reportados por la Agencia de Protección del ambiente (Environmental Protection Agency; EPA nombre y siglas en inglés y la Organización Mundial de la Salud (OMS).⁽⁴⁾ *Tablas 1.4 y 1.5*

1.3 Fresa.

La fresa (*fragaria ananassa*) es un fruto no estacional altamente perecedero debido a su elevada tasa de respiración (Manning, 1993). Su vida poscosecha es muy corta y son muy susceptibles al ataque por microorganismos y al daño físico durante su manejo, almacenamiento y comercialización (Sistrunk y Morris, 1985). Muchos mercados para la comercialización de la fresa se encuentran bastante alejados del lugar de su producción, por lo que se requiere un manejo efectivo para prevenir su deterioro excesivo. México ocupa la séptima posición en producción a nivel mundial y los principales Estados productores son: Michoacán (69, 699 ton), Baja California (57, 913 ton) y Guanajuato (20, 258 ton) (SAGARPA, 2007)⁽³⁸⁾.

1.3.1 La fresa en México.

Debido a la importancia que tiene el cultivo de fresas en nuestro país, ya que ocupa a un gran número de jornales al año, es una área que genera ingresos importantes para todos los que se encuentran involucrados en su producción, basta decir que en el año 2007 se cosecharon 177,500 toneladas de fresa en una extensión 6,148 hectáreas cultivadas, en el que sobresalen por su participación los estados de México, Michoacán, Baja California y Guanajuato. Durante ese ciclo agrícola (2007), más del 70 por ciento de la producción nacional de fresa tanto fresca como congelada se destinó a la exportación, con 125 mil 856 toneladas con un valor cercano a los 2,100 millones de pesos.

Son 12 los estados que participan en la producción de fresa, entre los que destacan Michoacán donde se cultiva la mitad de la producción total, Baja California y Guanajuato también destacan por su producción, pero también existen producciones mas limitadas en: Aguascalientes, Chihuahua, Durango, Jalisco, Estado de México, Morelos, Nayarit y Querétaro.

Se consume principalmente en fresco, pero también ofrece una gran variedad de posibilidades dentro de la agroindustria, como es su utilización en productos de conserva como mermeladas.

Con el lema “las fresas mexicanas sí te caen bien”, esta campaña pretende dar a conocer las cualidades medicinales y nutricionales de la fresa, como son la presencia de antioxidantes, ácido ascórbico, lecitina y pectina, medicinales como los son: diuréticas, antirreumáticas, astringentes, laxantes, calmantes y antibióticos.

La Coordinación General de Promoción Comercial y Fomento a las Exportaciones, de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, destacó que otros mercados internacionales, además del estadounidense, que demandan fresa mexicana son Alemania, Canadá, Italia y Reino Unido.⁽¹²⁾

1.3.2 Clasificación Taxonómica de la fresa ⁽¹³⁾.

Este fruto pertenece a la familia Rosaceae: Esta familia esta compuesta aproximadamente por 100 géneros de plantas, repartidas en más de 3000 especies de flores. Entre las que se encuentran frutos como la manzana, pera, durazno (melocotón), ciruela, cereza, zarzamora, frambuesa, fresa etc.

La fresa pertenece al genero *Fragaria spp.* Y se conocen a más de 20 especies de este género, que varían en cuanto al número de cromosomas. Las especies más comunes son diploides, exhibiendo dos juegos de siete cromosomas. Existen otras que son tetraploides, hexaploides e híbridos más resistentes que son octaploides y aun decaploides, que se mostraran a continuación.

Especies diploides:

Fragaria daltoniana

Fragaria iinumae

Fragaria nilgerrensis

Fragaria nipponica

Fragaria nubicola

Fragaria vesca (fresa salvaje, frutilla de los bosques)

Fragaria viridis

Fragaria yezoensis

Especies e híbridos octoploides:

Fragaria x ananassa (fresón, frutilla ananá)

Fragaria chiloensis (fresa o frutilla chilena)

Fragaria iturupensis

Fragaria virginiana (fresa escarlata)

Especies tetraploides:

Fragaria moupinensis

Fragaria orientalis

Especies hexaploides:

Fragaria moschata (fresa de Alemania)

Especies e híbridos decaploides

Fragaria × Potentilla

Fragaria × vescana

1.3.3 Límites Máximos Residuales Cicloplafest y EPA en fresa.

En el cultivo de la fresa de acuerdo a la legislación de EUA, expedida por la EPA, se recomienda el uso 65 pesticidas que se pueden aplicar solos o en mezclas; mientras que solo 48 de estos pesticidas son permitidos en nuestro país. Tabla 1.4

Tabla 1.4. Pesticidas autorizados en cultivos de fresa en México y EUA.

Pesticida	LMR(ppm) México	LMR(ppm) EPA (EUA)	Intervalo de Seguridad. (días)
Avermectina β 1 y β isómeros	0.02	0.02	10
Anilazina	10	NR	5
Azadiractina	Exento	NR	S/Límite
Azinfos Metílico	2	2	5
Azoxistrobin	10	10	No/def.
Azufre	Exento	NR	S/Límite
Benomilo	5	5	S/L
Bifentrina	0.5	3	7
Captan	25	25	S/Límite
Carbarilo	10	10	4
Carbofuran	-	0.5	-
Carfentrazone- etil	NP	1	
Ciprodinil	NR	5	
Cloropicrina	NP	25	
Cletodim	NP	3	
Clopiralid	NR	1	
Clortal dimetil (DCPA)	2	2	-
Clorpirifos	NP	0.2	
Diazinon	0.5	0.5	5
Diclobenil	NR	0.1	
Dicofol	5	5	2
Dodine	NR	5	
Endosulfan	2	2	4
Etridiazol	NP	0.2	
Etion	2	NP	2
Fenamifos	NP	0.6	
Fenhexamid	3	3	1
Fenpropatrin	2	2	2
Fludioxonil	NP	2	
Fluor	NR	7	
Folpet	25	25	S/Límite
Fonofos	0.5	0.1	
Fosetil-al	20	75	S/ Límite
<i>Trietil fosfonato de aluminio</i>			

Glifosato	NP	0.2	
Hexakis	NR	10	
Hexitiazox	3	3	3
Hidróxido de cobre	Exento	NR	S/ Límite
Imidacloprid	NP	0.5	
Iprodiona	15	15	S/Límite
Malation	8	8	3
Metalaxil	-	10	-
Metaldehido	NP	0	
Metomilo	2	2	15
Mevinfos	1	1	15
Metalaxil	P	10	
Metoxifenoazide	NP	1.5	
Miclobutanil	NP	0.5	
Naled	1	1	1
Napropamida	0.1	NP	-
Oleato cuprico	Exento	NP	S/Límite
Oxicloruro de cobre	Exento	NP	S/L
Oxidemeton metil S-[2-(etil sulfinil)etil]-O,O- Dimetil fosforotioato	2	2	3
Oxido de fenbutatin	10	NR	2
Paraquat	NP	0.25	
Metil Paration	No act.	NP	21
Propargite	7	NP	15
Pirimetanil	NP	3	
Piriproxifeno	NP	0.3	
R=Quintozeno		NP	////
Setoxidim	10	10	////
Simazina	0.25	0.25	////
Sulfato de cobre	Exento	NP	S/L
Spinosad	NP	1	
Sulfentrazone	NP	0.6	
Terbacil	NP	0.1	
Tetradifon	NR	5	
Tiram	7	7	3
Tiabendazol	0.5	5	S/Límite
Tiametoxan	NP	0.3	
Tiofenato metilo	5	5	1
Tricoderma Harzianum	Exento		S/Límite
Triflumizol	2	2	1
O-3,5,6-tricloro-2-piridilo metobilito clorpirofos	NR	0.2	
Triforine	2	2	14
Vinclozolin	10	10	8
Ziram	NP	7	
Sal de sodio de acifluorfenó	NR	0.05	

NR: No registrado NP: No permitido ⁽⁴⁾

⁽¹³⁾

1.4 Métodos de Análisis para pesticidas en alimentos.

El daño que han producido los pesticidas ha sido descrito ampliamente y existe evidencia irrefutable de haberlos encontrado en todos los sistemas biológicos: en cuerpos de agua, en suelos, en el cuerpo humano, animales, en frutas etc.; dada la importancia que reviste la determinación de plaguicidas en los ecosistemas, obliga a incorporar en los métodos de análisis de pesticidas todos los nuevos desarrollos analíticos que se han alcanzado; Esto con dos objetivos principales: mejorar la calidad de la información que se genera tanto cualitativa como cuantitativa y poder abaratar y acelerar los procesos analíticos. Cualquier estudio sistemático de pesticidas en alimentos involucra una cantidad enorme de muestras que deben ser analizadas con lo que el bajo costo y la velocidad se vuelven de máxima importancia, pero sin sacrificar precisión y exactitud. Es por ello que continuamente se mejoran y adecuan los métodos preexistentes.

El desarrollo actual de los métodos para la determinación de pesticidas se ha enfocado principalmente en el empleo de tecnologías que permitan identificar y cuantificar la mayor cantidad de plaguicidas en un solo análisis. Dado que los plaguicidas pertenecen a diferentes familias de compuestos químicos (con propiedades físicas y fisicoquímica diferentes) esto siempre ha representado un reto desde el punto de vista analítico; los procesos de extracción, separación y medición de compuestos no polares no son eficientes para compuestos polares; de manera que si un cultivo ha sido fumigado con dos tipos de plaguicidas de familias químicas diferentes, usualmente es necesario realizar dos análisis, lo que encarece y limita el número de muestras que se pueden analizar. De manera que actualmente lo que se busca es el desarrollo de métodos multiclases o multiresiduos, que sean capaces de medir a niveles de partes por billón (ppb o $\mu\text{g}/\text{kg}$) o menores la mayor cantidad de plaguicidas en un solo un análisis.

1.4.1 Muestreo.

El muestreo puede ser un proceso complejo dependiendo del producto muestreado y los componentes por los cuales el producto es analizado, además, desde el momento en que se

efectúa el muestreo hasta que se realiza el análisis no se debe agregar ningún componente a la muestra, ni perder ningún componente de la muestra.

Los principales objetivos del muestreo son asegurar que las muestras sean representativas del material que se analiza, deberán estar homogéneas cuando estas lleguen al laboratorio, para ello debe tomarse en cuenta el tamaño del lote que se va a muestrear, el estado físico de la fracción que se va analizar y las propiedades químicas del material que se va ensayar.

Para tomar muestras representativas y en el caso particular cuando los residuos a analizar tengan límites legales, la muestra final debe ser representativa del lote original; para ello se deben emplear métodos de muestreo adecuados; como el muestreo aleatorio, el cual consiste en que todos los miembros de la población tendrán la misma probabilidad de ser incluidos en la muestra; u otro, que es el llamado muestreo a granel, que fue creado para muestras: rocosas, polvos, gases y líquidos, los cuales no están constituidos por elementos discretos, donde las muestras serán divididas en celdas que se muestran aleatoriamente.⁽¹⁷⁾

Pero por otra parte; existen diversos procedimientos de muestreo en los alimentos los cuales fueron implementados por la Administración de Alimentos y Drogas (FDA por sus siglas en inglés), Organización de Alimentos y Agricultura/Organización Mundial de la Salud (OMS) y la comisión del Codex Alimentarius.

El muestreo de alimentos puede llevarse acabo en el campo o en el mercado, en el primero se recomienda muestrear directamente en el campo o un poco después de la cosecha y para efectuarlo se realiza una cuadrícula imaginaria que estaría constituida de 100 cuadros; de los cuales se seleccionaran sólo 10 aleatoriamente.

Los alimentos crudos o parcialmente procesados son vendidos en el mercado a granel por peso o volumen e incluyen a frutas, vegetales, arroz, frijoles, legumbres, huevos, pescados, mariscos, aceite vegetal, etc. cada uno de estos productos puede ser muestreado en lotes a granel teniendo en mente el tamaño del lote en el mercado.

El AOAC y el Codex recomiendan usar la siguiente *Tabla 1.6* para determinar el número de porciones que deben ser tomadas por muestra y recomiendan los siguientes tamaños mínimos de muestra para los productos indicados.

- Vegetales y frutas (se debe tomar en cuenta el tamaño de éstos):
 1. Para alimentos compuestos de piezas pequeñas con pesos de 25g o menores (por ejemplo: cerezas, chícharos, perejil), tomar 1Kg como mínimo.
 2. Para alimentos compuestos de piezas de tamaño mediano con pesos de 25-250g (por ejemplo: manzanas, naranjas, zanahorias, papas, etc.) tomar 1Kg como mínimo (o al menos 10 unidades).
 3. Para alimentos compuestos de piezas grandes con pesos mayores a 250g (por ejemplo, coles, melones, pepinos), tomar 2Kg como mínimo (con al menos 5 unidades)
 4. Arroz, frijoles, leguminosas, etc. 1Kg mínimo.
 5. Huevos. 10 huevos mínimos.
 6. Pescados y mariscos. 1kg mínimo.
 7. Aceites vegetales. 0.5Kg mínimo.

Tabla 1.6 Registro del muestreo para todos los alimentos a granel, excepto carne y sus derivados.⁽¹⁶⁾

Peso del lote (Kg)	Número de porciones tomadas
50 o menos	3
51 – 500	5
501-2000	10
> 2000	15

(16)

1.4.2 Métodos de análisis:

En la actualidad se reconocen dos clases de métodos multiresiduos, los cuales se diferencian únicamente en que unos solo determinan un solo residuo y a sus principales metabolitos, y los segundos, que fueron diseñados para detectar y cuantificar múltiples clases de residuos. Los cuales fueron denominados como métodos selectivos y métodos multiresiduos, respectivamente.

La mayoría de los métodos selectivos, se implementaron con el objeto de servir de apoyo en la solicitud legal para el registro del pesticida; Y los métodos multiresiduos son diseñados para ser suficientemente precisos y confiables a nivel de los residuos y por debajo de los límites máximos permitidos para diferentes clases de pesticidas .⁽¹⁵⁾

Los métodos multiresiduos, al igual que los métodos selectivos normalmente siguen la misma secuencia de preparación de muestra, que básicamente esta compuesta por las etapas siguientes:

Preparación de la muestra: En esta etapa la muestra es separada en dos partes, la comestible y la no comestible, para ser en seguida cortada, molida o macerada.

Extracción: En esta etapa los pesticidas son removidos de la mayoría de los constituyentes de la muestra, extrayéndolos con un disolvente adecuado. Esta etapa por lo regular se encuentra incluida la homogenización de la muestra por molienda o picado con un solvente, para ser posteriormente filtrada.

Limpieza: El extracto crudo es purificado para remover los componentes que podrían interferir con la determinación de los analitos (componentes co-extraídos).

Separación: En esta etapa los componentes del extracto crudo purificado son separados en la columna por diferencia en sus coeficientes de distribución.

Detección y cuantificación: En esta etapa los analitos pasan a través del detector, donde la señal esta relacionada directamente con la cantidad del analito que estaba presente en la muestra.⁽¹⁵⁾

1.4.3 Preparación de la muestra.

Es la serie de pasos necesarios para convertir la muestra en una forma adecuada para su análisis. Esta puede incluir pasos de disolución de la muestra, la extracción de una analito de una muestra compleja, la concentración de una analito diluido hasta un nivel que pueda ser medido, la conversión química del analito a una forma detectable, y la eliminación o enmascaramiento de especies interferentes.⁽¹⁸⁾

1.4.4 Limpieza.

El propósito de esta etapa es la de remover de la muestra a la mayoría de los residuos de los pesticidas con una mínimo de contaminación. Esto se logra dividiendo la muestra en partículas más pequeñas (homogenizarla), para aumentar el área superficial de la muestra que se encuentra en contacto con el disolvente, este disolvente deberá disolver a los pesticidas, y disolver la menor cantidad de otros componentes de la muestra. El extracto obtenido es finalmente separado del material insoluble por filtración al vacío y este es recolectado posteriormente.

Los pesticidas que permanecen sobre la superficie por lo regular pueden extraerse en pocos minutos con acetonitrilo y/o acetona, en tanto, los pesticidas que se encuentran dentro de la célula requieren ser procesados con alguna forma de homogenización que rompa los tejidos de la planta y exponga a los pesticidas que penetraron en el interior de la muestra y entren en contacto con el disolvente.

Cuando se extraen residuos de pesticidas de productos que tienen gran cantidad de humedad, se deben usar disolventes que sean miscibles con el agua ya que estos logran extraer mejor los analitos al estar en contacto directo con la muestra durante la homogenización. Los disolventes usados para este fin son el acetonitrilo, acetona y el metanol, este ultimo para métodos que involucran CLAE, y en menor proporción el acetato de etilo.

Es esencial que los disolventes usados en estas metodologías sean de alta pureza, ya que si contienen impurezas también serán concentradas al evaporarlo, también debe tomarse en cuenta que el disolvente no deberá responder al detector y generar una señal que interfiera con el análisis. ⁽¹⁶⁾

1.4.4.1. Extracción

Casi siempre el extracto crudo es parcialmente purificado antes de inyectarlo en un cromatógrafo. La necesidad y el grado de limpieza de un extracto dependerán en gran medida del detector que se utilizara y en menor medida al tipo de cromatografía que se ocupara. En esta etapa los analitos se separaran de los componentes de la muestra que pudieran interferir en la cuantificación y en la detección de los analitos. ⁽¹⁵⁾

Sin embargo, en cierto grado los procedimientos de limpieza adsorben, destruyen o remueven algunos de los residuos de analitos del extracto; como sucede con la mayoría de los pesticidas polares.

Existen distintos métodos para este fin, los hay para muestras sólidas, líquidas y gaseosas,⁽¹⁵⁾ los siguientes son algunos de los métodos que se ocupan en muestras de alimentos, principalmente para compuestos volátiles. En la que la fase orgánica se seca y se reduce el volumen a un punto específico; los residuos se purificarán con un procedimiento de cromatografía en columna.

○ 1.4.4.1.1 Extracción líquido-líquido.

El extracto crudo (agua-acetona o agua-acetonitrilo) es puesto en contacto con un disolvente no polar e inmiscible. Las combinaciones más usadas para alimentos son:

Para Frutas y vegetales con un contenido mayor a 3% de grasas se utiliza acetonitrilo-éter de petróleo-agua.

Para frutas y vegetales en contenido menores al 30% de grasa se utilizan acetona-cloruro de metileno-éter de petróleo-agua.

NOTA: Los disolventes usados deben ser poco tóxicos, de bajo punto de ebullición, no afectar el detector usado y minimizar la extracción de componentes polares extraídos con la muestra.⁽¹⁶⁾

○ 1.4.4.1.2 Extracción en fase sólida (SPE).

Desde hace algunos años se introdujo una nueva técnica de preparación de muestras, esta permite concentrar en un volumen pequeño a los analitos de una muestra muy diluida. Los hay en cartuchos de polipropileno o de vidrio, estos contienen una pequeña cantidad de un material empacado con diámetros de 30-40µm, y que puede contener de 30mg a 10g de material absorbente, o ser discos con un material absorbente. Estos no solo son útiles para purificar muestras, también los son para concentrar y algunas veces para derivatizar los analitos antes de inyectarlos al cromatógrafo.⁽¹⁵⁾

Los mecanismos de separación en un cartucho o disco de extracción basan su funcionamiento en interacciones entre las moléculas de analito y los grupos funcionales del adsorbente, mediante interacciones, polares (puentes de hidrógeno, dipolo-dipolo, dipolo-dipolo inducido y dipolo inducido-dipolo inducido), no polares (fuerzas hidrofóbicas), de exclusión o iónicas.⁽¹⁹⁾

Los absorbentes para extracción en fase sólida pueden ser:

De Fase reversa; estas son donde el adsorbente es menos polar que la fase móvil o la solución que porta la muestra, donde el grupo funcional unido a la sílica es de: octadecilo, octilo, ciclohexilo, butilo, fenilo o etilo.

De Fase normal; estas son donde el adsorbente es más polar que la fase móvil o la solución que porta la muestra, donde el grupo funcional unido a la sílica es de ciano (CN), amino (NH₂) o diol (COHCOH).

De adsorción; entre las que se encuentran el florisil, la alumina, el carbón grafitado y la sílica gel.

De intercambio iónico; Estas fases son usadas para extraer ácidos y bases de muestras acuosas de acuerdo a la teoría clásica de intercambio iónico, donde están químicamente unidas a la sílica los grupos funcionales NH₂, NH y N⁺, COOH, (SO₂OH) o (ArSO₂OH).

De exclusión; estos cartuchos o discos separan a las moléculas de acuerdo a su tamaño, las moléculas más grandes pasarán más rápidamente que las moléculas más pequeñas, ya que ingresarán en los poros donde estos puedan introducirse.⁽¹⁹⁾

o 1.4.3.2.3 Micro-extracción en fase sólida (SPME).

Esta técnica emplea una fibra de sílice fundida que está recubierta en su exterior por una fina película, de 10 a 100 μm de un líquido no volátil, semejante a las fases estacionarias utilizadas en cromatografía de gases.

EL análisis por SPME se realizar exponiendo la fibra dentro del extracto acuoso o mantenido dentro del espacio libre (headspace) sobre un líquido, donde los analitos difunden hacia la fibra recubierta; donde una fracción del analito se extrae de la muestra. Después de que la fibra llega al equilibrio, la fibra es retirada y es transferida al cromatógrafo, donde el analito se desorbe térmicamente de la fibra, o mediante el uso de un disolvente en una cámara especial de desorción previo al análisis en un cromatógrafo de líquidos. ⁽²⁰⁾

Esta técnica se emplea para extraer compuestos orgánicos volátiles o compuesto orgánicos semivolátiles de muestras acuosas, que por lo general son muestras biológicas, ambientales y de alimentos, aunque también es útil con muestras sólidas y gaseosas.

En una microextracción. La cantidad de analito ($m, \mu g$) absorbido en una fibra recubierta esta definida por la siguiente ecuación:

$$\text{Masa de analito extraído} \quad m = \frac{KV_f C_0 V_s}{KV_f + V_s}$$

Donde V_f es el volumen de la película de la fibra, V_s es el volumen de la disolución de la que se extrae, y C_0 es la concentración inicial ($\mu g/ml$) de la disolución. K el coeficiente de reparto del soluto entre la película y la disolución. ⁽¹⁸⁾

o 1.4.3.2.4 Purga y trampa.

Es un método para separar analitos volátiles de líquidos o sólidos (como agua subterránea o suelos), concentra los analitos y posteriormente se introducen en un cromatógrafo de gases. ⁽¹⁸⁾

En esta técnica una muestra líquida o sólida se coloca en un recipiente cerrado y se hace burbujear un gas inerte (He o N_2) a través de ella, con opción de ser calentada. Este gas acarrea los compuestos orgánicos volátiles que se encuentran presentes, estos pasan a un tubo de adsorción, que contiene tres capas de compuestos absorbentes; de poder adsorbente cada vez mayor, como son la sílica gel, el tenax y el último y mas fuerte, los tamices moleculares de carbón. Los analitos retenidos son desorbidos al calentar rápidamente la trampa y purgarla con un gas inerte cierto tiempo, los analitos desorbidos son transferidos y analizados con la técnica instrumental requerida. ⁽²¹⁾

A diferencia de la microextracción, que solo aísla una porción del analito que hay en la muestra, el objetivo de este método es aislar el 100% de los analitos de la muestra. ⁽¹⁸⁾

1.4.4.2 Limpieza.

La mayoría de los procedimientos de limpieza involucran a la cromatografía ya sean en columnas o en cartuchos; el tipo de absorbentes y disolventes de elución dependerá de la características químicas de los compuestos que se desea recobrar.

Los procedimientos limpieza que se utilizaron durante mucho tiempo y que se desarrollaron a la par de métodos de extracción como el líquido-líquido, ocuparon principalmente métodos de cromatografía en columna, los cuales se empacaban regularmente con los siguientes absorbentes:

- *Florisil*. Esta columna es útil para la limpieza de pesticidas no polares en alimentos grasos, es muy eficiente en remover compuestos interferentes cuando eluyen con solvente no polares.
- *Carbón-celita-oxido de magnesio*. Esta columna es útil para la limpieza de pesticidas no polares, debido a que el oxido de magnesio adsorbe compuestos polares.
- *Celita silanizada con carbón*. Esta columna es útil para la limpieza de pesticidas polares, medianamente polares y no polares, y por lo general esta se selecciona para carbamatos. ⁽¹⁶⁾

Al transcurrir el tiempo este tipo de limpieza fue reemplazada por métodos que redujeron significativamente la cantidad de absorbente que estos contenían, y en consecuencia sucedió lo mismo con la cantidad de muestra que era necesaria para este tipo de análisis, este tipo de limpieza incorporo los nuevos desarrollos que se realizaron durante los años setenta y ochenta, y que consistieron en empacarlos en cartuchos o en discos; que al igual que los anteriores son métodos de adsorción.

Las técnicas de adsorción son las fases estacionarias que generalmente se utilizan para realizar la limpieza de las muestras de componentes que por lo regular se extraen con los analitos de interés durante la extracción, a continuación recopilamos las características generales que estas poseen:

- ***Florisil (60-100mesh)***; son adecuadas para la limpieza de pesticidas no polares en alimentos grasos.
 1. Es muy eficiente para remover compuestos interferentes cuando son eluidos con solventes no polares.
 2. Son menos eficientes en la limpieza de pesticidas polares en frutas y verduras.
 3. La actividad varía de lote a lote.
 4. Puede acelerar la oxidación de ciertos esteres de los organofosforados
- ***Silica gel***
 1. Es usado para el aislamiento de compuestos polares y pero es medianamente eficiente en la limpieza de pesticidas no polares.
 2. No es suficientemente bueno para extraer compuestos de la muestra que pueden interferir con la elusión de algunos pesticidas.
- ***Alumina***
 1. Este material tiende a ser más básico y puede descomponer ciertos organofosforados.
 2. No es suficientemente bueno para extraer compuestos de la muestra que pudieran interferir con la elusión de algunos pesticidas.
- ***Carbon:***
 1. Absorbe preferentemente compuestos no polares y pesticidas con pesos moleculares grandes.
 2. Es muy eficiente para remover clorofilas de las plantas, pero no ceras de extractos vegetales.
 3. El pre-tratamiento de este material es muy fuerte, y se afecta la absorción de los compuestos. ⁽¹⁵⁾

1.4.4.3 Concentración.

Aún en la actualidad esta etapa sigue ocupándose y la alternativa existente siempre será la de concentrar o evaporar la muestra.

En esta etapa la muestra fue extraída y los pesticidas fueron ya separados de la mayoría de los componentes que se extrajeron con ellos, sin embargo, es común que los analitos que están presentes en el extracto se encuentren muy diluidos para una determinación directa, o simplemente, el disolvente que se uso para la extracción o la elución de los pesticidas en la columna no es compatible con la técnica instrumental con la que se cuenta.

Las técnicas instrumentales diseñadas para este fin, deben remover el disolvente para incrementar hasta cierto punto la concentración de los analitos, sin que esto cause la perdida de los analitos.

Es importante señalar que por ninguna causa los extractos se deben evaporar hasta sequedad, ya que de ser así se perderían algunos pesticidas. Ejemplo de esto, se debe a la existencia de estudios que han demostrado que hay grandes perdidas del pesticida α -BHC cuando los extractos se evaporan casi a sequedad en el concentrador Kuderna-Danish. Concentrar a sequedad solo se realiza, cuando el disolvente interfiere en la determinación, como lo hace el cloruro de metileno en determinaciones de pesticidas organoclorados, cuando estos son analizados en un detector de captura de electrones.

Las técnicas instrumentales que se disponen para concentrar / evaporar la muestra, además del concentrador Kuderna-Danish, pueden ser el rotavapor y el concentrador con corriente de nitrógeno.

o 1.4.4.3.1 Concentrador KD.

Este es el instrumento mas usado y mas efectivo para evaporar grandes volúmenes de disolvente, este equipo consta de tres partes básicas, un tubo colector colocado en la parte inferior, sobre el un matraz invertido asegurado a el, y en la parte superior una columna de condensación (Snyder). *Figura 1.2*



Figura 1.2. Concentrador Kuderna- Danish.

El instrumento se deja sobre un baño de vapor con el colector dentro de agua caliente, el solvente calentado es rápidamente evaporado en la parte más amplia del matraz, debido a que el flujo de vapor circula desde la parte inferior del matraz hasta la parte mas ancha.

La columna Snyder permite que el solvente se evapore, pero retiene cualquier pesticida que se haya alcanzado a vaporizar, por acción del reflujo. ⁽¹⁶⁾

o 1.4.4.3.2 Evaporador con corriente de nitrógeno.

Este instrumento es usado para evaporar pequeñas cantidades de disolvente, por ejemplo, en la determinación de algunos herbicidas (fenilureas) donde es necesario reducir el volumen a 2ml, estos son volúmenes que los otros métodos no pueden efectuar, ya que para recuperaciones cuantitativas estas no tienen un nivel de confianza adecuado. ⁽¹⁶⁾



Figura 1.3. Evaporador con Corriente N₂

El instrumento esta compuesto por un baño caliente; a 30-40°C, por un suministro de nitrógeno y el nitrógeno, el cual debe ser de alta pureza, el suministro puede ser desde una pipeta Pasteur hasta agujas de acero inoxidable. La punta del suministro del nitrógeno, se coloca sobre la superficie del extracto, la presión del gas es controlada solo para que no se salpique el extracto en las paredes del recipiente que lo contiene. *Figura 1.3*

o 1.4.4.3.3 Rotavapor.

Este es otro instrumento utilizado para evaporar volúmenes grandes de disolvente, esta constituido por un evaporador rotatorio, un baño caliente, un baño frío, una unidad de refrigeración, un manómetro y una bomba de vacío. El evaporador rotario esta compuesto por dos matraces de bola, un tubo rotatorio hueco, un motor y un condensador. Donde los cerca de 200-250ml del extracto se colocan en el matraz de bola de 500ml donde se adjunta al tubo hueco rotatorio.



Figura 1.4. Rotavapor

El extracto se coloca en el matraz que se encuentra parcialmente sumergido en el baño caliente, el aparato completo se conecta al vacío el cual aumenta gradualmente, mientras continúa la concentración, finalmente el disolvente evaporado se recoge en el segundo matraz. *Figura 1.4*

La evaporación en este aparato es rápida, ya que en el matraz en el que se encuentra la muestra gira de tal manera que el disolvente forma una película delgada en las paredes internas del matraz, aumentando el área superficial del mismo facilitando su evaporación.

Sin embargo las tendencias actuales apuntan hacia la eliminación de este paso o simplificarlo hasta cierto punto, ya que la técnicas de preparación de muestras mas actuales, solo usan pequeñas cantidades de disolventes, por lo que el evaporador con corriente de nitrógeno aun es muy socorrido y se acoplara a muchos mas métodos en el futuro. ⁽¹⁶⁾

○ 1.4.4.4 Separación.

Los requerimientos básicos para una adecuada separación en un sistema cromatográfico son: (1) los extractos en los que se encuentren los analitos deberán estar limpios para no reportar la presencia de falsos residuos, (2) no cuantificar residuos que están enmascarados por otro componente, y (3) que los disolventes utilizados no dañen la columna cromatográfica.

La selección de las columnas en cromatografía de gases y líquidos depende en gran medida de la naturaleza química de los pesticidas que serán separados, por ejemplo, si lo que se pretende separar son compuestos no polares como los pesticidas organoclorados o piretroides u organofosforados se elegirá un columna no polar, y por el contrario, cuando los pesticidas son polares, la selección mas adecuada será una columna con fase polar; sin embargo, con métodos multiresiduos es preferible usar fases estacionarias no polares o medianamente polares.⁽²²⁾

○ 1.4.4.5 Detección.

Durante el análisis de las muestras el detector deberá encontrarse todo el tiempo en el rango lineal del detector, que es, el intervalo donde la señal del detector es proporcional a la concentración del analito; también deberá confirmar la presencia de los pesticidas, para no caer en errores de interpretación o de medición.

La elección del detector se realizara en función directa del tipo de pesticidas que se van analizar, ya que no todos los detectores responden a todas las clases de pesticidas, son solo dos o tres los detectores que responden al amplio espectro de pesticidas que se han desarrollado, todos ellos variaran en cuanto a sensibilidad, selectividad y especificidad.

Para confirmar la identidad de cualquier residuo encontrado durante una prueba, la FDA, recomienda un espectrómetro de masas, para ello, siempre se debe contar con un sistema acoplado CG/EM, o simplemente confirmarlos con los residuos previamente reportados con otras técnicas cromatográficas, CG o CLAE, con diferentes columnas, fases móviles o detectores.

Los detectores para cromatografía de gases de uso común tanto para métodos multiresiduos como selectivos, son el detector de captura de electrones, fotométrico de flama, termoiónicos (nitógeno-fosforo), de conductividad electrolítica y los sistemas acoplados CG/EM y CLAE/EM, donde estos dos últimos, han tomado mas importancia, ya que detectan y confirman simultáneamente la estructura de los pesticidas y otros componentes que llegan al detector. ^(22, 23)

1.5 Métodos multiresiduos para análisis de alimentos (MRM).

Un método multiresiduos es un método capaz de detectar y cuantificar a más un grupo de pesticidas, a más de una muestra de alimentos o a más de muestra ambiental. Los MRM son usados particularmente por organismos o agencias federales para supervisar, monitorear y cuantificar los pesticidas que están presentes en las muestras de análisis. ⁽²⁴⁾

Como se menciona anteriormente, existen métodos que analizan un solo plaguicida o sus familias, y métodos que son capaces de determinar diferentes clases de pesticidas simultáneamente.

1.5.1 Métodos multiresiduos.

Las metodologías mas usadas en la actualidad son las que han reportado diversos organismos internacionales, gubernamentales, nacionales, etc. como la AOAC, EPA, Cicloplafest etc. Estos organismos, publican estos métodos de acuerdo a la siguiente clasificación: selectivos y multiclase, donde los primeros se derivan de las características químicas de los pesticidas y los segundos a los alimentos que analizan.

Métodos multiresiduos selectivos:

- ❖ Métodos para N-Metilcarbamatos.
- ❖ Métodos para ácidos y fenoles.
- ❖ Métodos para herbicidas del tipo fenilurea.
- ❖ Métodos para bencimidazoles.

Métodos multiresiduos multiclase:

- ❖ Método I para alimentos no grasos.
- ❖ Métodos II para alimentos no grasos.
- ❖ Métodos para alimentos grasos.

Los métodos multiresiduos generales que cubren el mayor número de residuos de pesticidas son los que fueron emitidos por la AOAC, y que comparte muchas similitudes con los métodos de la FDA.

1. Método Mills-Olney-Gaither (MOG): Método frutas y vegetales no grasos, con alto contenido humedad ($>30\%$ H₂O o $<30\%$ y menores de 5% de azúcares).
2. Método Mills-Olney-Gaither (MOG): Método frutas y vegetales no grasos, con alta humedad ($>30\%$ de H₂O y un contenido de azúcar del 5-15% y otro con mas del 15%).
3. Método de Luke: Método para frutas y vegetales no grasos, en dos variantes, con alimentos que tenga $>30\%$ de humedad.
4. Método para carbamatos: Krause: Extracción con acetona y determinación por cromatografía de líquidos
5. Métodos para alimentos $>2\%$ de grasa descrito por Mills-Olney-Gaither.⁽¹⁶⁾

1.5.2 Ventajas de los métodos multiresiduos multiclase sobre métodos multiresiduos selectivos.

Como fue descrito antes, los métodos multiresiduos multiclase tienen la finalidad de monitorear la mayor cantidad de pesticidas simultáneamente, mientras los métodos selectivos fueron diseñados para el registro de un pesticida para los fines legales que así lo requirieron.

El tiempo empleado en los análisis multiresiduos multiclase es menor, ya que con solo una extracción será suficiente para determinar una numerosa cantidad de pesticidas.

Ya que prácticamente son iguales los procedimientos requeridos para la obtención de las muestras, tanto con métodos multiresiduos multiclase como en los métodos selectivos, la cantidad de disolvente necesario se dobla o triplica en los segundos, esto hace que se generen más desechos, y su vez que estos sean más costosos.

Con métodos multiresiduos multiclase se reduce significativamente la exposición del operador a la presencia de los disolventes en su entorno, ya que la mayoría de los disolventes que utilizan producen efectos adversos a la salud.

1.6 Cromatografía.

Esta es una técnica de separación física que se basa en la distribución de la muestra entre dos fases: la móvil y la estacionaria. La fase estacionaria puede encontrarse en forma líquida depositada sobre la superficie interior de un capilar o sobre un cuerpo sólido empacado; o solo ser un cuerpo sólido; en tanto, la fase móvil puede ser un gas, líquido o un fluido supercrítico. La separación selectiva de los analitos obedecerá a las diferencias en los coeficientes de distribución de los distintos componentes de la muestra, y será el resultado de las repetidas etapas de adsorción y desorción de los analitos a lo largo de la fase estacionaria.

Es más familiar que a las técnicas cromatograficas se conozcan por el estado físico en el que se encuentra la fase móvil, de esta se desprende la clasificación más ampliamente conocida; el siguiente diagrama detalla cada una de las formas que existen: *figura 1.5*

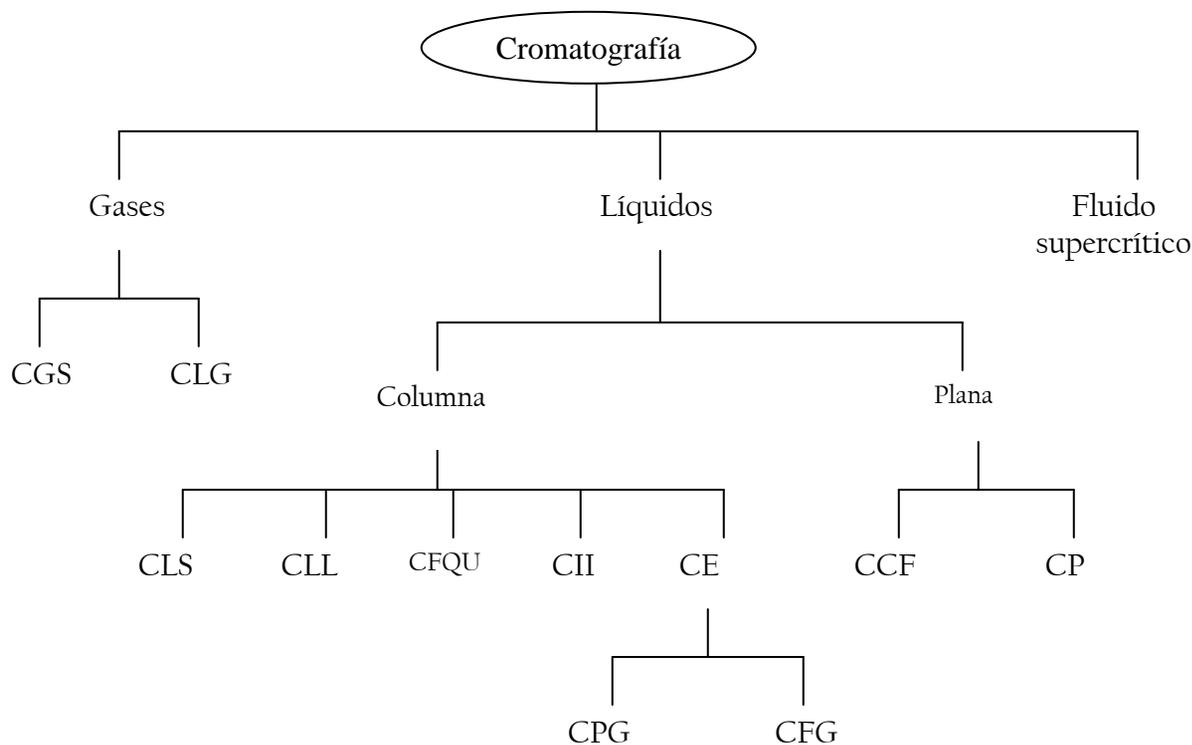


Figura 1.5 Clasificación de los métodos cromatográficos; CGS: Cromatografía Gas-Sólido; CLG: Cromatografía Gas-Líquido; Cromatografía Líquido-Sólido; CLL: Cromatografía líquido – líquido; CFQU: Cromatografía de fase químicamente unida; CII: Cromatografía de intercambio

ionico; CE: Cromatografía de exclusión; CCF: Cromatografía de capa fina; CP: Cromatografía de papel; CPG: Cromatografía de permeación en gel; CFG: Cromatografía de filtración en gel. ⁽²⁵⁾

1.6.1 Teoría cromatografica.

1.6.1.1 Constante de distribución. K

Al moverse los solutos a través de la columna, estos se distribuirán (particionan) en la fase estacionaria y en la móvil; si este proceso de distribución ocurriera rápido y la concentración de los solutos fuera baja, las concentraciones en ambas fases alcanzarían el equilibrio, este cuasi-equilibrio si ocurrirá en la mayoría de los procesos cromatograficos por cuestiones practicas. Por lo tanto todos los solutos que interactúen con la fase estacionaria se expresaran en términos de su constante de distribución (coeficiente de partición) K ; que esta definido como el cociente de concentraciones en el equilibrio del soluto en la fase estacionaria y en la fase móvil durante su distribución en la columna, y esta dada por la siguiente ecuación:

$$K = C_e / C_m$$

Donde C_e y C_m son las concentraciones en la fase estacionaria y en la móvil en el equilibrio. Esta constante esta en función de la temperatura, la fase estacionaria, la fase móvil y por el tipo de componentes; Siendo los valores grandes de K , la de los componentes que más fuertemente estén retenidos en la fase estacionaria. ⁽²⁶⁾

1.6.1.2 El Cromatógrama.

Es el grafico usado para ilustrar los resultados de un proceso de separación, por tanto solo es el registro grafico de un análisis cromatográfico; que es la respuesta del detector en función del tiempo de elusión, en este se indicaran los componentes y el grado de concentración en que están presentes en determinado tiempo. Cuando únicamente eluye el gas portador, aparecerá dibujada solo una línea recta, la línea base; cuando eluyan los picos de la muestra, se dibujaran los perfiles de concentración de cada uno de los componentes, para que finalmente se obtengan dos importantes parámetros: el tiempo de retención y el área del pico. *Figura 1.6*

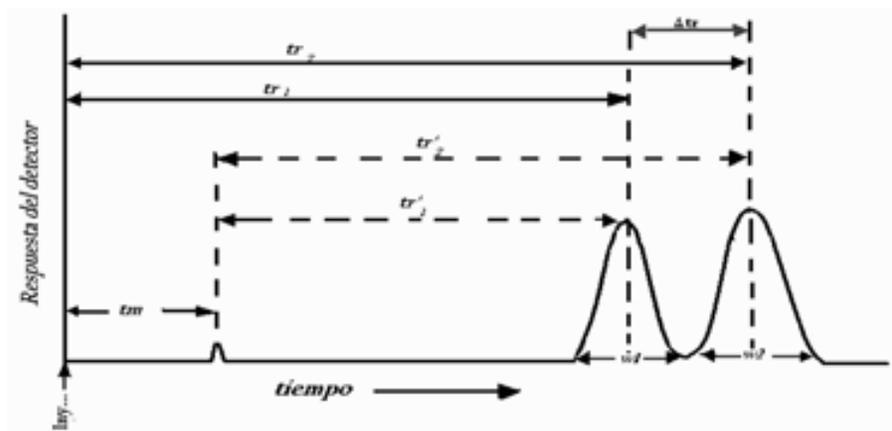


Figura 1.6. Esquema de un cromatograma típico.

El tiempo de retención tr ; es el tiempo necesario que requiere un componente desde la inyección hasta que alcanza el máximo del pico, o el tiempo para que este llegue al detector. La fase móvil no retenida a traviesa la columna en un tiempo mínimo posible, que es denominado como tiempo muerto tm , El tiempo de retención corregido tr' de un soluto, es el tiempo que permaneció solo en la fase estacionaria. ⁽²⁵⁾

Tiempo de retención ajustado: $t'r' = tr - tm$

1.6.1.3 Factor de capacidad k .

La retención de un soluto se expresa también en términos del factor de retención o factor de capacidad, k , el cual esta definido por la relación de la cantidad de analito que hay en las dos fases, y esta expresado por la relación del tiempo que permanece un soluto en la fase estacionaria, y el tiempo que permanece en la fase móvil:

$$\text{Factor de capacidad o retención: } k = \frac{t'r}{tm}$$

Este factor es independiente a la velocidad lineal de gas portador, aunque este valor sea alto o bajo; no cambiara el tiempo que permanecen los solutos en la fase estacionaria, así como tampoco en la fase móvil; por lo tanto, el factor de retención de cada soluto proporciona un valor conveniente de los tiempos de retención de los picos, que es independiente de la velocidad de flujo. Este valor solo cambiará si modificamos la temperatura, la fase estacionaria y la química de la fase estacionaria. ⁽²⁶⁾

Como se menciona previamente también la cantidad de fase estacionaria afectara el valor del factor de retención, ya que, aunque estas sean idénticas, y donde únicamente varié el grosor de la fase estacionaria, esta cambiara; esto está expresado por una constante llamada: relación de fase β . Que esta definida por dos constantes en una relación de volúmenes:

$$\beta = \frac{V_g}{V_E}$$

Donde V_E significa; volumen de la fase estacionaria (cm^3) y V_g el volumen de la fase móvil. Esta establece que valores bajos de β , incrementaran el factor de retención de los picos, y esto conducirá a que los tiempos de retención de los picos sean mayores.

Estas dos constantes estarán íntimamente relacionadas con el coeficiente de distribución, en la siguiente ecuación:

$$K = \beta * k$$

En la práctica, el grosor de la película se selecciona dentro de un intervalo practico en el cual los picos que eluyen, deberá estar entre el tiempo de retención del pico no retenido ($k=1$) y del minuto 45. Porque si todos los solutos no eluyen dentro de este periodo, es conveniente cambiar aun grosor de película mas pequeño (β 's altos) para reducir los tiempos retención; por el contrario, si todos los picos eluyen rápidamente y no se alcanzan a separar completamente, es conveniente aumentar el grosor de la película (β 's bajos).⁽²⁶⁾

1.6.1.4 Factor de separación.

Este término describe, la distancia relativa que guardan dos picos adyacentes, y esta definido por el cociente del tiempo en la que dos picos permanecen en la fase líquida, esto significa que entre más selectiva sea la fase líquida para un soluto que para otro, mayor será el tiempo que permanezca en la fase líquida. Por lo tanto la separación de los picos obedecerá a la interacción selectiva con la fase estacionaria, y no el tiempo que en emplean en recorrer la columna a la velocidad de la fase móvil. Este término expresa la selectividad de la fase líquida para dos picos

adyacentes, y es conocido por el símbolo α ; y esta relacionado directamente con el coeficiente de distribución.

$$\alpha = \frac{K_2}{K_1} = \frac{k_2}{k_1} = \frac{t'r_2}{t'r_1} = \frac{tr_2 - tm}{tr_1 - tm}$$

Donde K , es el coeficiente de distribución de cada soluto, k son los factores de retención y $t'r$ son lo tiempos de retención ajustados. Por definición, $t'r_2 > t'r_1$ y los valores siempre serán mayores o iguales a una unidad; cuando esto último ocurra los dos picos presentaran la misma interacción con la fase estacionaria, y será imposible su separación. ^(26, 27, 28)

1.6.1.5 Resolución.

Sin embargo el factor de separación no proporciona información real sobre la separación de los picos, esto solo depende de lo puntiagudos que sean los picos, “eficiencia de la columna”. El concepto de resolución, relaciona estas dos variables; ya que mide la calidad separativa de dos picos adyacentes. Y esta definido por el cociente de la diferencia de los tiempos de retención de los picos entre el promedio de la anchura de la base del pico.

$$Rs = \frac{t_{r2} - t_{r1}}{(W_{b1} + W_{b2})/2} = \frac{2 * (t_{r2} - t_{r1})}{W_{b1} + W_{b2}}$$

La relación entre la resolución con el número de platos teóricos de una columna esta dada por la ecuación general de la resolución.

$$Rs = \frac{\sqrt{N}}{4} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{k'_2}{1 + k'_{pr}} \right)$$

Donde N es el número de platos teóricos de la columna, α es el factor de separación, k'_2 es el factor de capacidad del pico mas retenido y k'_{pr} es el promedio de los factores de capacidad de ambos componentes.

Esta ecuación señala que la resolución es directamente proporcional a \sqrt{N} . Por tanto, duplicando la longitud de la columna la resolución aumentara $\sqrt{2}$, nos dice también que la resolución aumenta al incrementar α , al igual que k'_2 . Para modificar el factor de separación α ; hay que cambiar la fase estacionaria en cromatografía de gases y la fase móvil y la fase estacionaria en cromatografía de líquidos; y al aumentar el factor de retención al cambiar la

columna o el espesor de la misma, es equivalente a aumentar la fracción de tiempo que pasa el soluto en la fase estacionaria. ^(18, 28)

1.6.1.6 Eficiencia de la columna.

Son dos los parámetros que evalúan la eficiencia de una columna, y están definidos por el número de platos teóricos y la altura equivalente a un plato teórico, los cuales están definidos en base a la anchura del pico.

Cada pico del cromatograma posee un grado de ensanchamiento, en relación directa a la cantidad de soluto que este presente, esta se mide en tres zonas del pico. La primera, consiste en medirla en el punto intermedio del pico máximo; que es el ancho de pico a la mitad de su altura, w_h . El segundo consiste en hacerlo en la base del pico; el pico base esta definido como el punto donde interceptan las tangentes del pico con la línea base del cromatograma (w_b). Finalmente, también puede medirse donde se encuentra los puntos de inflexión del pico, w_i , que corresponde al 60.7% del total de la altura. ⁽²⁷⁾ figura 1.7

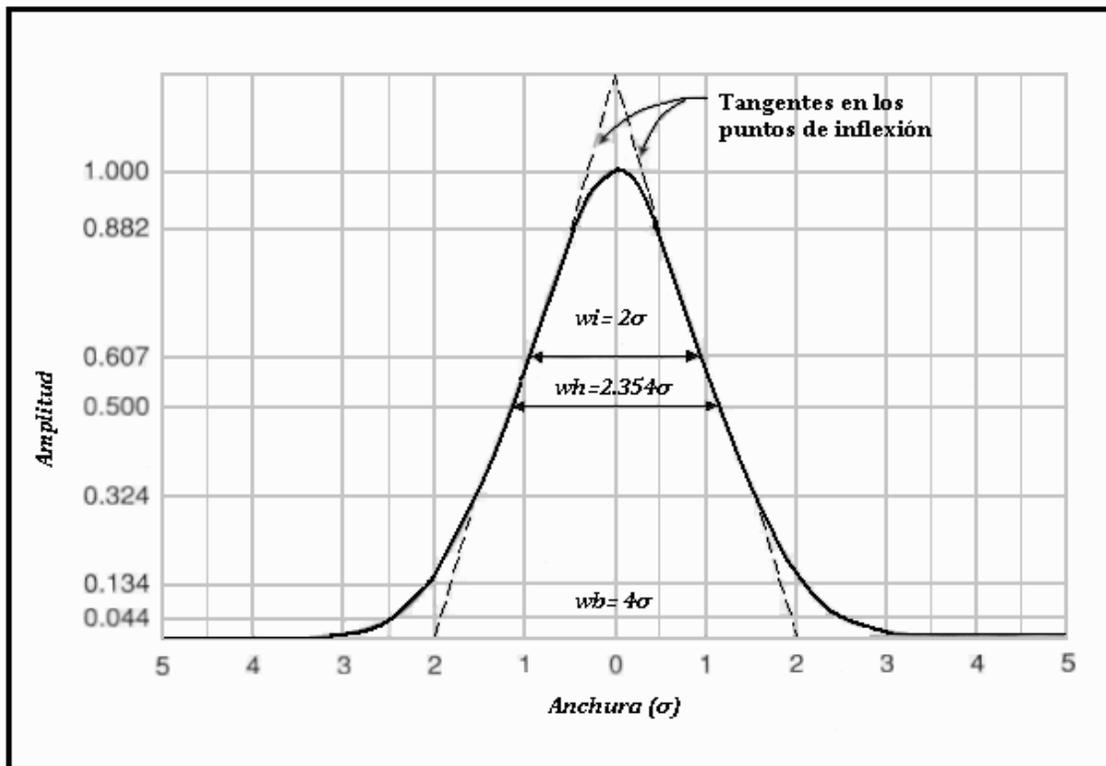


Figura 1.7. Características de la anchura de un pico de un pico de Gauss.

1.6.1.7 Número de platos teóricos.

N mide el ensanchamiento de la banda del soluto a medida que pasa a través de la columna. Donde cada plato teórico está definido como un equilibrio transitorio entre las dos fases. Este se evalúa a partir del tiempo de retención y la anchura de la base del pico (w_b), en la anchura a la mitad del pico (w_h), o en la anchura del pico en los puntos de inflexión (w_i); Los cuales están expresados en función directa con la desviación estándar:

$$N = \left(\frac{t_R}{\sigma} \right)^2 \dots\dots\dots \text{Ecuación (1)}$$

Sustituyendo σ , con las expresiones que la representan, se obtienen las ecuaciones que miden los platos teóricos (número de platos).

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{w_b} \right)^2 \dots\dots\dots \text{Ecuación (2)}$$

$$N = 5.545 \left(\frac{t_R}{w_h} \right)^2 \dots\dots\dots \text{Ecuación (3)}$$

$$N = 4 \left(\frac{t_R}{w_i} \right)^2 \dots\dots\dots \text{Ecuación (4)}$$

De las tres ecuaciones la que más frecuentemente es utilizada es la ecuación 3, debido a que la medición en este punto es menos sensible al coleo o cabeceo de los picos.

Muchos son los factores que afectan el número de platos teóricos como la longitud de la columna, el tiempo de retención, la temperatura de la columna, soluto, caudal, tamaño de la muestra, o la técnica de inyección. ^(25, 27)

1.6.1.8 Altura equivalente a un plato teórico.

Este es el segundo parámetro que describe la eficiencia de una columna, y está relacionado con el número de platos teóricos por la ecuación:

$$H = L/N$$

Donde L es la longitud de la columna expresada en centímetros o milímetros; y N el número de platos. H indica la longitud de la columna para generar un plato. Esta ecuación describe que estos dos valores son inversamente proporcionales, por lo tanto al aumentar el número de platos el valor de la altura disminuirá, y la columna será más eficiente. ⁽²⁵⁾

La ecuación de Van Deemter relaciona estos dos parámetros, con los parámetros operacionales de la columna, y nos dice como influye la columna y el caudal en la altura del plato.

$$H = A + \frac{B}{u_x} + C\bar{u}_x$$

Donde:

A es el efecto de caminos múltiples o difusión parasita. Dado que en la columna algunos de los caminos son mas largos que otros, las moléculas que entran en la columna a un mismo tiempo por la entrada, se eluyen a diferentes tiempos por la salida. Producto de que las moléculas se mueven a diferente velocidad lineal produciendo el ensanchamiento de los picos, y reduciendo así la eficiencia de la columna. Este valor con el desarrollo de las columnas capilares se redujo a cero. ⁽²⁵⁾

A partir de ello se describió la ecuación que solo expresaba a las dos últimas constantes, y fue descrita por Golay et al. En la actualidad se refiere a ella con el nombre Van Deemter-Golay. ⁽²⁵⁾

$$H = \frac{B}{u_x} + C\bar{u}_x$$

Donde:

B es la difusión molecular longitudinal. Hay difusión en la fase móvil cuando el soluto emigra de las zonas de alta concentración a las zonas de menor concentración, que resulta en una dispersión gaussiana que disminuye la eficiencia de la columna.

La difusión es inversamente proporcional a la velocidad lineal del gas, y significa que a flujos más rápido el tiempo de difusión será más corto. ⁽²⁵⁾

C es la resistencia a la transferencia de masa. Se debe al tiempo finito que necesita el soluto para alcanzar el equilibrio entre las fase móvil y estacionaria. Aunque algo de soluto se queda en la fase estacionaria, el resto, que se encuentra en la fase móvil, avanza, y de ahí resulta un ensanchamiento de toda la zona; esto es, conforme la fase móvil se mueve más rápido a través de la columna y más lenta sea la transferencia de masa, más ancha será la banda del soluto que eluye de la columna.

La variable C es dependiente de la fase estacionaria, del peso molecular, de la temperatura, de la densidad de la fase estacionaria y de sus propiedades químicas, espesor de la fase estacionaria, factor de capacidad y la velocidad de flujo. ^(18,25)

\bar{u} . Es la velocidad lineal promedio del gas portador, esta se calcula a partir del tiempo del compuesto no retenido, o muerto, y la longitud de la columna (cm).

$$\bar{u} = L/t_m$$

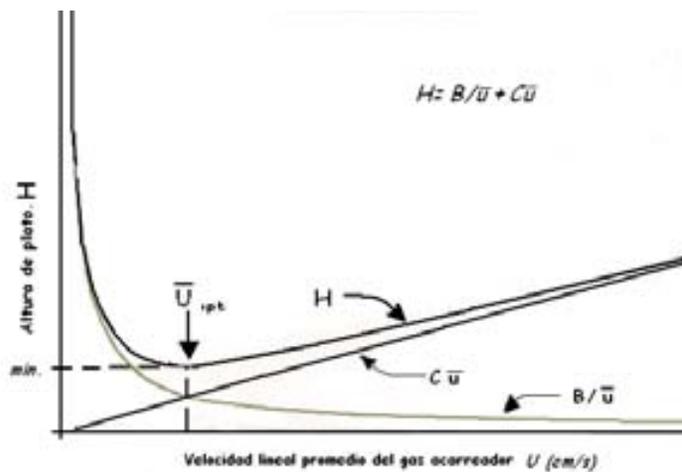


Figura 1.8. Altura de plato teórico vs. Velocidad lineal media del gas en una columna tubular ⁽²⁵⁾

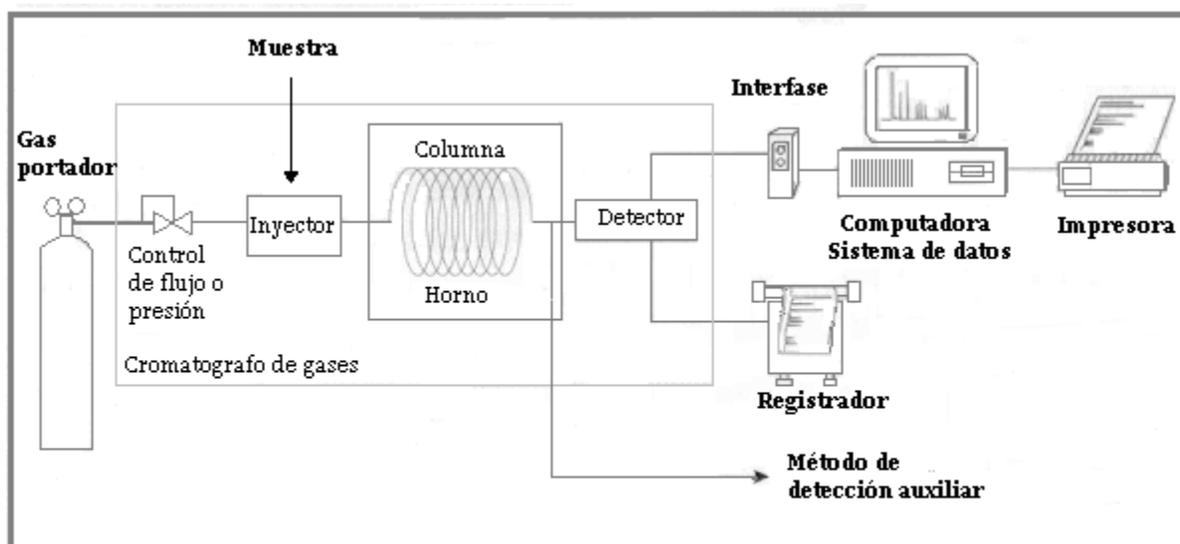
Este es el grafico que se obtiene de la ecuación Van Deemter-Golay, que relaciona la altura de un plato teórico con la velocidad lineal media, y que nos indica los elementos que contribuyen al ensanchamiento de la bandas. Y señala que existe un punto donde la velocidad del flujo es optimo y H es mínimo, que es el punto donde más eficiente es una columna. ⁽²⁵⁾

1.6.2 Instrumento: Cromatógrafo de gases.

Esta es una técnica que permite la separación de mezclas que contienen compuestos orgánicos volátiles, que fluyen en una corriente gaseosa a través de una fase estacionaria fijada a un tubo largo y fino.

Cuando el soluto es introducido en la columna, este entra como un paquete infinitamente pequeño en forma gaseosa, que inmediatamente comenzara a moverse a través de la columna; a medida que el soluto se reparte en la dos fases y es arrastrado, este se extenderá hasta alcanzar un perfil en forma gaussiana o de campana.

Los componentes básicos de un sistema cromatografico son; el gas portador, el control de flujo, el inyector, la columna, control de temperatura por zonas (horno), el detector y el registrador de datos. Figura 1.9.



Sistema simplificado de un cromatógrafo de gases.

Figura 1.9. Esquema general de un cromatógrafo de Gases.

1.6.2.1 Gas portador.

El principal propósito del gas portador es la de arrastrar los componentes volátiles a través de la columna. Este deberá ser inerte y no reaccionar con la muestra ni con la fase estacionaria; los gases que generalmente son utilizados son el helio, hidrógeno y nitrógeno.

El segundo propósito es la de obtener una matriz adecuada para que el detector mida los componentes de la muestra. La selección del gas portador puede influir tanto en la en la separación como en la velocidad del análisis.

Se podrá elegir entre optimizar la eficiencia de una columna (número de platos) o el tiempo de análisis. Un gas con peso molecular más elevado generara más platos teóricos; como lo es el nitrógeno, donde la menor altura de plato se encuentra a 11cm/s, en cambio la menor altura de plato para Helio se encuentra en 20cm/s. Si ambos gases se desplazaran en el mismo valor de H₂, el nitrógeno generaría alrededor de un 15% más platos, pero con un tiempo de análisis 2.4 veces mayor que con el helio. (Figura 2.0)

El helio y el hidrogeno darán mejor resolución (menor altura de plato) que el N₂ en velocidades lineales mas altas.

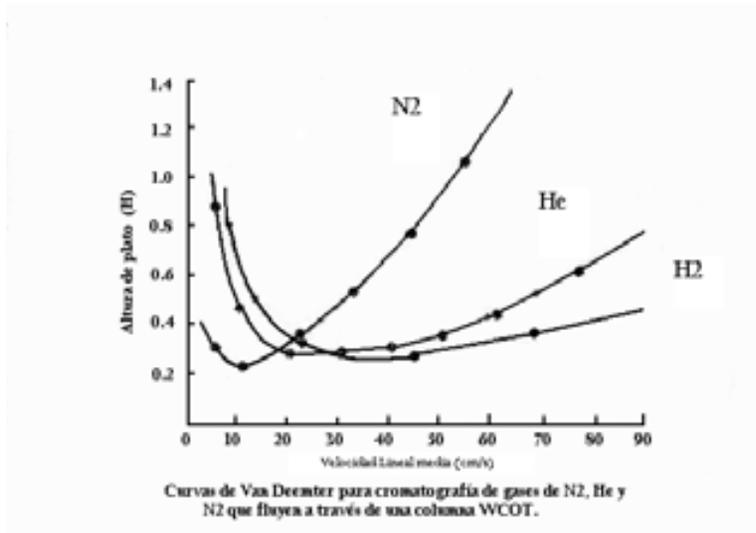


Figura 2.0. Curvas de Van Deemter para cromatografía de Gases de N₂, He y N₂.

Respecto a la eficacia de una columna y la rapidez de los análisis, el H₂ es el mejor gas portador, sin embargo; no puede ser utilizado con un detector de espectrometría de masas, debido a que el H₂ deteriora el aceite de la bomba de vacío.

Es muy importante que el gas portador sea de alta pureza. La impurezas, como lo son el oxígeno y el agua, pueden alterar químicamente la fase líquida y por ende, modificar lo tiempos de retención, como le ocurre frecuentemente a las columnas constituidas por poliésteres,

poliglicoles o poliamidas, donde se llega a producir un número indeterminado de señales de fondo en el detector y picos fantasma. ⁽²⁵⁾

1.6.2.2 Control de flujo. ⁽²⁵⁾

El control y la medición de la velocidad lineal del gas portador son esenciales tanto para la eficiencia de la columna como para los análisis cualitativos. La eficiencia de una columna dependerá de una propiedad: velocidad lineal, el cual es fácilmente calculado en el punto donde se logra el mayor número de platos, y que puede observarse en una curva de Van Deemter para una columna en particular.

El primer punto de control en cualquier sistema de flujo de gases, esta compuesto por un regulador de dos etapas que esta conectado directamente al cilindro del gas portador, este reducirá la presión del gas de 2500psig a un nivel utilizable (20-60psig). Esto por lo regular se mide con un rotámetro situado en la cabeza de la columna o por medio de burbujómetro.

Para una separación isoterma a presión constante donde la velocidad lineal es constante (esto supone que la caída en la presión es constante). Que supone a cromatógrafos sencillos la segunda etapa de control de flujo por lo regular es una válvula de aguja.

Cuando un CG es de temperatura programada a presión de entrada constante, la velocidad de flujo disminuirá a medida que aumente la temperatura de la columna; ya que la viscosidad de los gases portadores aumentara al aumentar la temperatura. Por lo tanto estos equipos y aun con las mejores unidades isotérmicas, utilizan por lo regular un controlador diferencial de flujo.

Actualmente los cromatógrafos de gases están provistos con medidores electrónicos controlados por un ordenador para mantener el caudal deseado.

1.6.2.3 Sistemas de inyección de muestras.

En cromatografía de gases, los líquidos se inyectan mediante una jeringa a través de un disco (septo o diafragma) de silicón, hacia un inyector caliente que contiene un tubo silanizado (este generalmente se encuentra unos 50°C por encima del punto de ebullición del componente

menos volátil de la muestra), este es el sitio donde se realiza la volatilización de la muestra. En cromatografía analítica, el volumen de muestra que se inyecta suele ser de 0.1 a 2 μ L. En tanto para gases, estos suelen inyectar, con una jeringa hermética, con el mismo tipo de lazo que se usa para muestras en cromatografía de líquidos. (18, 25)

Si los analitos que interesan constituyen $>0.1\%$ de la muestra, es preferible hacer una inyección con división de flujo (split injection) *Figura 2.1* para introducir la muestra en la columna. En trabajos que requieren gran resolución es más conveniente hacerlos con la mínima cantidad de muestra ($\leq 1\mu$ l) que pueda detectarse bien, preferentemente con ≤ 1 ng de cada componente. Una inyección con división introduce solo entre 0.2 y 2% de la muestra en la columna. El flujo del gas portador arrastrará rápidamente la muestra a la cámara de mezcla, donde tiene lugar su completa vaporización y homogenización. En el punto de división una pequeña fracción de vapor entra en la columna cromatográfica, mientras la mayor parte se desecha. (25)

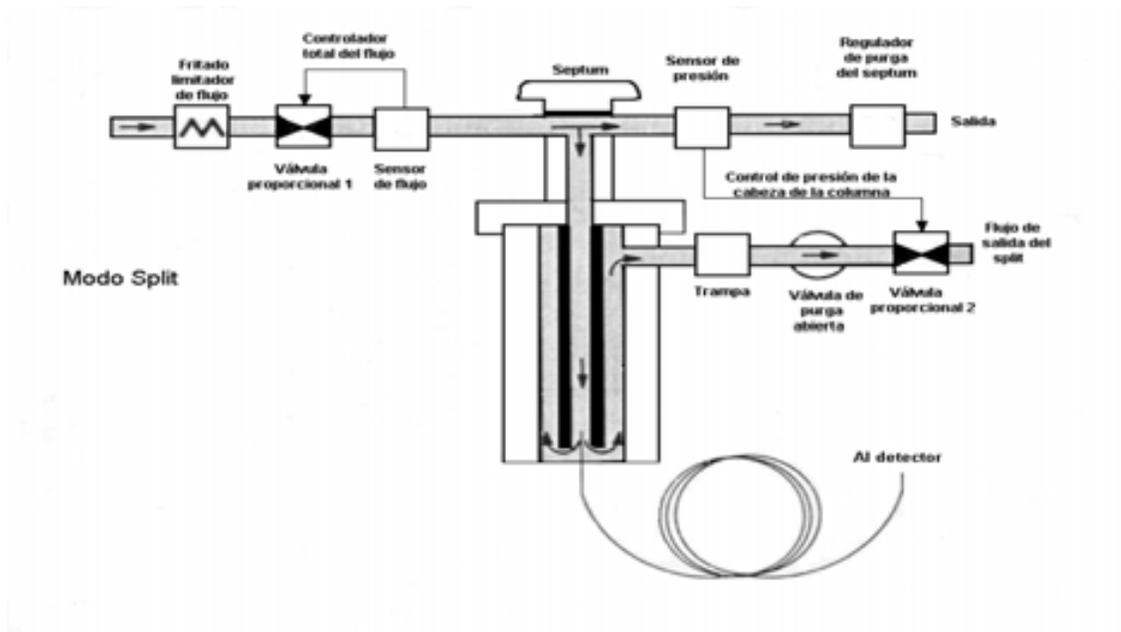


Figura 2.1. Diagrama de inyección en SPLIT

La proporción de muestra que entra en la columna se denomina, *razón de división (split ratio)*; y la establece el operador previamente. Normalmente la proporción de flujo de purga es 100 veces más que el flujo de la columna, por lo tanto 1/100 del total de la muestra entra en la columna (29)

Otra técnica inyección disponible, y que es apropiada para el análisis de trazas de analitos que constituyen menos del 0.01% de la muestra, se denomina: *inyección sin división. (Splitless)*. *Figura 2.2*. Esta técnica aumenta la sensibilidad del método, ya que casi toda la muestra entra en

la columna. En esta se introduce dentro del inyector un volumen grande de disolución diluida en un disolvente de bajo punto de ebullición, con la válvula de purga cerrada. La temperatura del inyector en una inyección sin división de flujo es menor que en la inyección con división, porque la muestra pasa mucho más tiempo en el inyector, con el fin de evitar que se descomponga térmicamente la muestra. Después de que la muestra se vaporiza en el inyector y pasa a la columna la válvula vuelve abrirse para purgar el inyector.⁽¹⁸⁾

La temperatura inicial del horno se fija 40°C por debajo del punto de ebullición del disolvente, que condensa por tanto en la cabeza de la columna; por lo que, los solutos van quedando atrapados en la porción de disolvente condensado, formando una estrecha banda al principio de la columna, que conforme la temperatura de la columna aumenta vaporiza el disolvente permitiendo que los componentes de la muestra se separen.

Durante la inyección y separación cromatográfica se mantiene un pequeño caudal a través de la purga del septo, para eliminar los vapores que se pueden escapar de la guía de inyector en las dos técnicas de inyección.⁽¹⁸⁾

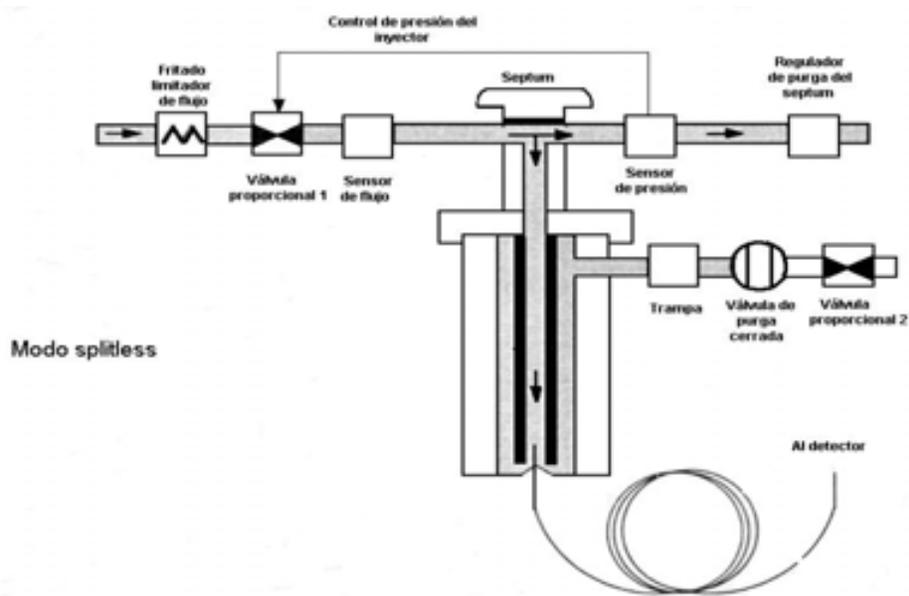


Figura2.2. Inyección splitless.

Al igual, que las técnicas de inyección descritas brevemente antes, existen dos técnicas agregadas a estas, que funcionan de la misma forma “*Split pulse* y *Splitless pulse*”; en la que solo la variación se debe aun aumento en la presión en el inyector justo antes del comienzo del análisis

y la devuelve al valor normal después de un tiempo especificado. Los pulsos de presión aceleran el traslado de la muestra desde el inyector hasta la columna facilitando el ingreso de una muestra más grande (hasta 10 μ L) y además evita la degradación de los compuestos en este sitio.

Figura 2.3

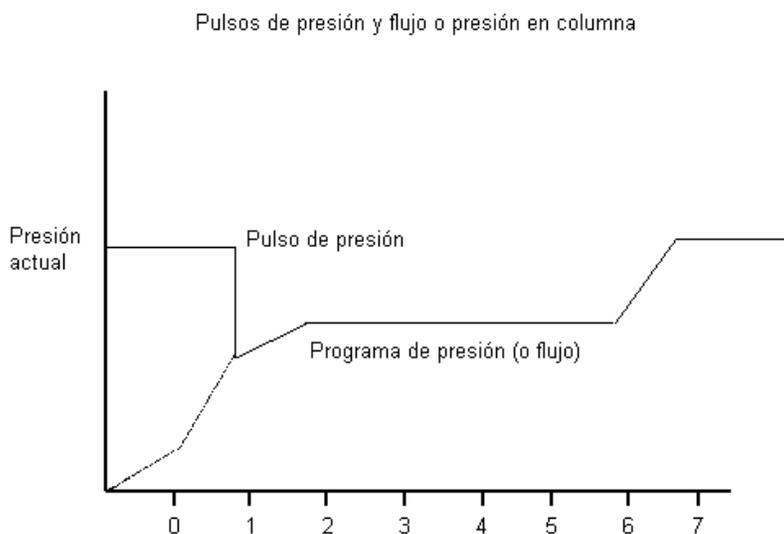


Figura 2.3. Pulsos de presión y flujo o presión en columna.

La tercera forma de introducir una muestra es la que se denomina, **inyección en columna**, esta se usa para muestras que se descomponen por encima de su punto de ebullición. La disolución se inyecta directamente en la columna, sin pasar por un inyector caliente. La temperatura inicial es lo suficientemente baja para que condensen los solutos en una banda estrecha. La cromatografía inicia aumentando la temperatura de la columna.⁽¹⁸⁾

1.6.2.4 Horno.

El horno del cromatógrafo es un horno de calentamiento, cuyo diseño debe permitir controlar la temperatura tanto en calentamiento programado como isotermico hasta aproximadamente 400°C con una precisión de $\pm 0.1^{\circ}\text{C}$, así como un enfriamiento rápido hasta temperatura ambiente al finalizar el ciclo análisis. Para determinados requerimientos el horno debe permitirse asimismo acoplarse a un crioscopio para trabajar a temperaturas subambientales. Para que pueda ser operado de dos formas básicas: **Isotérmica o programada.**⁽³⁰⁾

Sin embargo, la operación isotérmica limita el análisis de cromatografía de gases a solo muestras con punto de ebullición poco amplio. A temperatura constante, los picos iniciales, que representarían a los componentes de bajo punto de ebullición, salen con tal rapidez que varios picos se superpondrían, mientras que los componentes mayor punto de ebullición salen con mucho retraso como picos anchos, o simplemente no salen.

Con temperatura programada, se utiliza una temperatura inicial baja, así los picos iniciales quedan bien resueltos. A medida que aumenta la temperatura, cada componente de mayor punto de ebullición es eluido debido al aumento de la temperatura. Los compuestos con punto de ebullición elevado salen más pronto y como picos bien definidos, de perfil similar al de los picos iniciales. Y el tiempo total de análisis es más corto. ⁽²⁵⁾

1.6.2.5 Columnas.

La columna es en realidad el cerebro de un cromatógrafo de gases, y es el elemento principal durante el proceso de separación. Tres son las clases de columnas en las que se han clasificado.

- Columnas empacadas: se han caracterizado por su alta capacidad, pero por una pobre resolución cromatográfica.
- Columnas capilares; en contraste con las columnas empacadas, estas tienen baja capacidad de muestra, pero tienen alta resolución, al igual de ser eficientes para el análisis de trazas.
- Columnas 530 μ m, estas se encuentran entre columnas empacadas y las columnas capilares.

Las columnas empacadas tienen diámetros internos que van de 3.18 a 6.35mm y son de 1 a 3 metros de largo. Estas se construyen principalmente de acero inoxidable, aluminio, cobre, vidrio, níquel y teflón. Y se empacan con material granular (que tiene un tamaño de partícula entre 100 y 200 μ m); estas poseen una superficie de contacto muy amplia con la fase móvil. El relleno puede ser un material poroso natural: tierras de diatomeas, un material poroso artificial (perlas de sílica), o no poroso: perlas de vidrio, polvo de teflón o carbón grafitado.

Las columnas 530 μ L son fabricadas con tubo silica de 0.53mm de diámetro interno, y son de 5 a 50m de largo, a este tipo de columnas se le conoce como megacapilares “wide bore capillary” y dependiendo del fabricante, esta llevan nombres como: Megabore, Ultrabore o Macrobore. Estas poseen alta capacidad de muestra y buenas propiedades de separación.

Las columnas capilares generalmente tienen un diámetro interno entre 0.05 a 0.35mm, y tienen de 10 a 100m de largo. La fase estacionaria puede estar extendida sobre la superficie interna del capilar o sobre una capa delgada de material poroso, que esta revistiendo el interior del capilar. Estas columnas se fabrican por extracción de sílice de alta pureza a altas temperaturas. ⁽³¹⁾

Las columnas capilares abiertas se dividen en tres clases:

- WCOT “Wall Coated Tubular column” columna tubular abierta con pared recubierta; Son tubos de silica fundida, en el que la fase líquida recubre la pared interior, la película tiene por lo regular un tamaño de 0.05 a 3nm.
- SCOT “Support coated open tubular column” columna tubular abierta con soporte impregnado; Son tubos de silica fundida, en el que la fase estacionaria líquida esta impregnada en un soporte que cubre la parte interior
- PLOT “Poruos Layer Open tubular”, Columna tubular abierta con fase porosa; donde un material absorbente esta cubriendo la parte interna del tubo. ⁽³¹⁾

Estas columnas se construyeron en un principio con varios materiales: las hubo de acero inoxidable, aluminio, cobre, plástico, vidrio; hasta que finalmente se desarrollaron las columnas de sílica fundida. Estos capilares tienen las paredes mucho más delgadas que sus equivalentes en vidrio. ⁽³¹⁾

1.6.2.5.1 Fases estacionarias.

Las propiedades que debe tener una fase líquida inmovilizada son: que tenga baja volatilidad, ser térmicamente estable, químicamente inerte.

La retención de los analitos dependerá: de las interacciones físicas con la fase estacionaria “dipolo-dipolo, fuerzas de van der Waals, puentes de hidrógeno, fuerzas electrostáticas” y

además el punto de ebullición. Ya que cuando la polaridad de la fase estacionaria y de los analitos sean muy similares, el orden de elusión esta determinado por el punto de ebullición de los compuestos al eluir. ^(29, 33)

Existen varias clases de columnas:

- Líquidas: normalmente estas son fabricadas a partir de polisiloxanos, (Si-O) y están sustituidas por diversos grupos funcionales metilos, fenilos, cianopropilos; estos determinaran la selectividad de la columna.
- Adsorbentes sólidos: estas son fabricadas a partir de polímeros porosos entrecruzados, como acrilonitrilo-copolímero de divinilbenceno, polivinil pirrolidona, estireno-copolímero de divinilbenceno, etc, o naturales, como la alumina, sílica gel o zeolitas.
- Entrecruzadas: En estas columnas las moléculas están unidas covalentemente, por lo que aumenta su tiempo de vida y su temperatura límite.
- Enlazadas: En estas columnas la fase líquida está unida en un enlace covalente con la paredes de la sílica fundida, por lo tanto estas son mas estables en temperaturas elevadas y conservan por mas tiempo las propiedades cromatográficas de las fases líquidas originales. ⁽³²⁾

Para elegir una u otra ante un problema determinado se utiliza la regla “semejante disuelve a lo semejante”. Las columnas no polares son la más indicadas para solutos no polares. Las columnas de polaridad intermedia son las mejores para solutos de polaridad intermedia, y las muy polares para solutos asimismo muy polares. ⁽²²⁾

1.6.2.6 Detectores.

El detector cromatográfico es un dispositivo que mide la concentración de cada uno de los componentes de la muestra y genera una señal eléctrica proporcional a dicha concentración.

Las características deseables en un detector generalmente son:

1. *Sensibilidad.* Denota la cantidad de señal generada para determinada concentración de una muestra. Un detector sensible generara una señal eléctrica grande para un determinado tamaño de muestra. La sensibilidad también puede medirse como la pendiente de la grafica de la respuesta del detector en función de la concentración de la muestra.

2. *Ruido*. Se refiere a la respuesta del detector de corta duración y al azar determinada por las propiedades eléctricas, la temperatura o la sensibilidad al caudal. Generalmente esta se define como cantidad mínima detectable aquella muestra lo suficientemente grande para generar una señal dos veces mayor que su nivel de ruido.
3. *Respuesta universal*. Significa que el detector generara una respuesta para todos los componentes de la muestra, exceptuando el gas portador.
4. *Respuesta selectiva*. Significa que el detector solo responde a determinado tipo de compuestos.
5. *Intervalo lineal*. Es la región sobre la cual la señal de detector es directamente proporcional a la señal de la muestra. Que en un grafico logarítmico de la respuesta del detector en función de la concentración, es el intervalo lineal en el cual la curva es lineal y tiene un pendiente de $1 \pm 5\%$.⁽²⁵⁾

Los detectores pueden ser sensibles a la concentración, es decir, que su respuesta depende solo de la concentración del analito; o sensibles a la masa, responden a la masa del analito que entra en el detector por unidad de tiempo.⁽²⁹⁾

Detector de conductividad térmica (DCT). Este se fundamenta en dos propiedades físicas; cuando un gas se mezcla con otra sustancia gaseosa, su conductividad térmica varía respecto a lo que tendría si este estuviese puro; y la segunda, cuando se varia la temperatura de un filamento metálico, este modifica su valor de resistencia.

Ya que este mide la capacidad de una sustancia para transmitir calor de una región caliente a una fría. Si el interior de una celda se mantiene a temperatura constante, donde se encuentra un filamento calentado eléctricamente y por dicha celda circula a flujo constante un gas puro, la disipación de calor por parte del filamento es constante, y en consecuencia, también lo será su temperatura y resistencia; en el momento que aparezca un vapor de diferente naturaleza, junto con el gas, en el interior de la celda, producirá una variación de la conductividad térmica del gas, y la disipación térmica del filamento será distinta, y modificara inherentemente la temperatura, y producirá que su resistencia también cambie. La variación de esta resistencia produce una señal eléctrica, que es proporcional a la cantidad de muestra que entro en la celda.

El helio y el hidrogeno son lo gases preferentemente usados en este tipo de cromatografía, debido a que, son los gases que mayor conductividad poseen.^(18, 33)

Detector de ionización de flama (DIF). El principio general de este detector bajo el cual opera es el siguiente. La energía térmica que existe en una flama de hidrogeno es suficiente para ionizar a las moléculas. El gas portador fluye desde la columna hasta una flama de hidrogeno-aire, la cual ioniza algunas de las moléculas orgánicas presentes en la corriente gaseosa. La presencia de partículas cargadas (iones positivos, iones negativos y electrones) en el espacio entre dos electrodos origina una corriente de ionización que fluye en este y a través de una resistencia que los mide. La magnitud de esta resistencia estará determinada por el número de partículas cargadas que contiene. Con un flujo constante de gas portador puro habrá entre los electrodos una concentración muy baja de partículas cargadas, originándose así una corriente constante. Esta corriente constante se llama corriente de fondo, y se establece al someter la flama a una diferencia de potencial. Cuando un componente orgánico entra en la flama, se quema y se forman partículas cargadas, lo cual produce un aumento de la corriente de fondo que se traduce en una señal amplificada y dibujada como un pico en un registrador grafico. ⁽³³⁾

El hidrogeno puede servir como gas portador, aunque es más común utilizar nitrógeno, en cuyo caso el hidrogeno se alimenta dentro de la corriente del gas justo antes de llegar al quemador. ⁽¹⁸⁾

Detector de captura de electrones (DCE). El gas que sale de la columna pasa a través de una celda que contiene una fuente de partículas β (emitidos por una lámina que contiene ^{63}Ni radioactivo). Las colisiones de las moléculas del gas acarreador (que con frecuencia es una mezcla de N_2 y CH_2) con estas partículas producen iones y electrones secundarios, que migran hacia un electrodo positivo, originando una cierta corriente. Cuando sale de la columna un soluto que es capaz de capturar electrones; hay una caída en esta corriente, y el detector responde modificando la frecuencia de los impulsos de voltaje entre el ánodo y el cátodo para mantener constantemente la corriente. Lo cual es base para la detección. ⁽¹⁸⁾

Detector Nitrógeno-fósforo (DNF). Este se fundamenta en la reacción termoiónica del nitrógeno y el fósforo contenido en los compuestos orgánicos con una fuente calentada eléctricamente de rubidio o cesio contenidos en un bloque de cerámica. Esta reacción catalítica producirá electrones que se colectaran en el detector y serán amplificados como en un FID. El proceso ocurre de la siguiente manera; Cuando estos compuestos se ponen en contacto con una

bola de Rb_2SO_4 y esta en la punta de un mechero, se producen iones que crean una corriente que se puede medir. ⁽¹⁸⁾

Detector de fotoionización (DFI). Utiliza una fuente de ultravioleta de vacío para ionizar compuestos aromáticos y no saturados. Los componentes de la muestra son excitados por los fotones provenientes de una lámpara de UV y se ionizan, las partículas cargadas son medidas entre dos electrodos con potenciales de 50-200V. El tipo de lámpara usada determina la energía del fotón, por lo tanto los compuestos son detectados de acuerdo a su potencial de ionización. ⁽³⁴⁾

Detector de conductividad electrolítica (DCEL); En este detector, se mezcla el eluyente con un gas de reacción en un tubo de níquel en donde se lleva a cabo una reacción de oxidoreducción provocando cambios en la conductividad de la mezcla de reacción. En el caso de los halógenos, el eluyente es reducido con H_2 a 850°C , produciendo ácidos fuertes tales como el HCL. Los gases producidos se disuelven en propanol y se determina el cambio en su conductividad. ⁽³⁴⁾

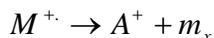
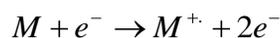
Tabla 1.7. Características generales los detectores más comunes en CG ⁽³⁴⁾

Detector	Tipo	Selectivo	Rango dinámico lineal
DIF	Selectivo	Materiales ionizables por una flama de H_2 /aire	10^7
DCT	Universal	Cualquier muestra de conductividad diferente a la del gas portador	10^6
DCE	Selectivo	Halógenos, carbonilos conjugados, nitrilos, nitratos, etc.	10^4
DNF	Selectivo	N, P y hidrocarburos u heteroátomos	$10^3(\text{N})-10^4(\text{P})$
DFI	Selectivo	Compuestos acromáticos e insaturados	10^7
DCEL	Selectivo	Halógenos, N, S	$10^4(\text{S})-10^3(\text{X})$

1.7 Detector de espectrómetro de masas.⁽³⁴⁾

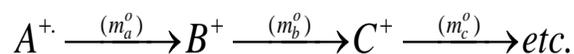
El principio bajo el cual operan los EM es el de promover la ionización de las moléculas de un compuesto, posteriormente separar y cuantificar los distintos iones que se han producido.

Cuando a una molécula la hacemos interaccionar con una fuente de alta energía (70eV), provocamos la salida de un electrón del orbital molecular, con ello se genera un ion que se denomina ion molecular (M^+); si el ion queda con exceso de energía que no es capaz de estabilizar, se fragmentara expulsando un fragmento neutro (m_x) y formando un Ion fragmento (A^+) de menor masa, como a continuación se presenta



Proceso de ionización.

Si el ion fragmento A^+ aun posee un exceso de energía que no pueda estabilizar, este continuara fragmentándose, expulsando más fragmentos neutros y produciendo iones de masa cada vez menores, como a continuación se muestra:



Mecanismo de fragmentación.

Cualquiera de los iones formados puede seguir distintos mecanismos de fragmentación y esto solo dependerá de la cantidad de energía que reciba la molécula durante la ionización, todos los mecanismos de fragmentación que pueda seguir una molécula constituyen un patrón de fragmentación y este es característico y único para una molécula.

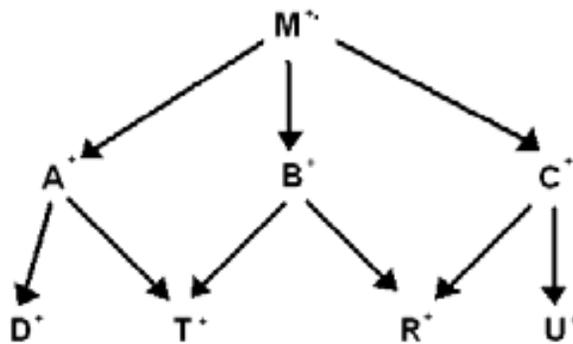


Figura 2.4. Patrón de Fragmentación

En espectrometría de masas los procesos son unimoleculares, consecutivos y competitivos, esto quiere decir que cada molécula de un compuesto se comportara en forma distinta e independiente de las demás. En la ionización, cada molécula podrá adquirir una energía diferente que la conducirá, a través de diferentes mecanismos de fragmentación, y a la producción de diferentes iones. Sin embargo, para un compuesto determinado, existirán ciertas estructuras iónicas que serán más estables y por ende generaran iones fragmentos preferentes. Esto dará lugar a la formación de un mayor número de iones de una masa determinada.

Si después de la ionización, separamos los iones formados en función de sus masas, no solo tendremos información de la masa de la molécula original (definida por el valor M^+) sino que también se registrarán los distintos pedazos de dicha molécula.

Los EM están diseñados para separar los iones de distinta masa que se producen en la ionización según su relación masa/carga (m/z); sin embargo la mayoría de los iones producidos en este tipo de ionización se forman con una sola carga ($z=1$), por lo que la relación masa/carga es igual a la masa ($m/z=m$) y se tiene una relación másica. El otro valor que registran los EM, es el del número de iones de un mismo valor m/z que se generan y se define como la intensidad de las señales; el valor de intensidad está en relación directa con la estabilidad del ion formado y esto es un reflejo de la estructura del mismo, donde una señal intensa deberá corresponder a un Ion estable. Lo que implicaría una estructura estable.

Por lo que un espectro de masas estará compuesto por una serie de señales en un sistema de dos ejes, uno en la escala másica o de valores m/z , y el otro corresponde a una escala de intensidad de la señales.

La interpretación de un espectro de masas puede compararse al proceso de armado de un rompecabezas, el tamaño o marco del mismo esta definido por el valor m/z del ion molecular M^+ y las distintas piezas la constituyen los iones fragmento A^+ , B^+ , C^+ , etc. a sus respectivos valores de m/z . La diferencia radica en que en un espectro de masas, las piezas se traslapan. En dichos espectros, la importancia de las piezas estará dada por la intensidad y su posición en la escala másica, tomando la consideración de que siempre será mas significativa una señal de baja intensidad a un valor de m/z alto que una señal intensa a una valor bajo de m/z .

1.7.1 Instrumento: Espectrómetro de Masas.

Los componentes que comprende cualquier espectrómetro de masas son.

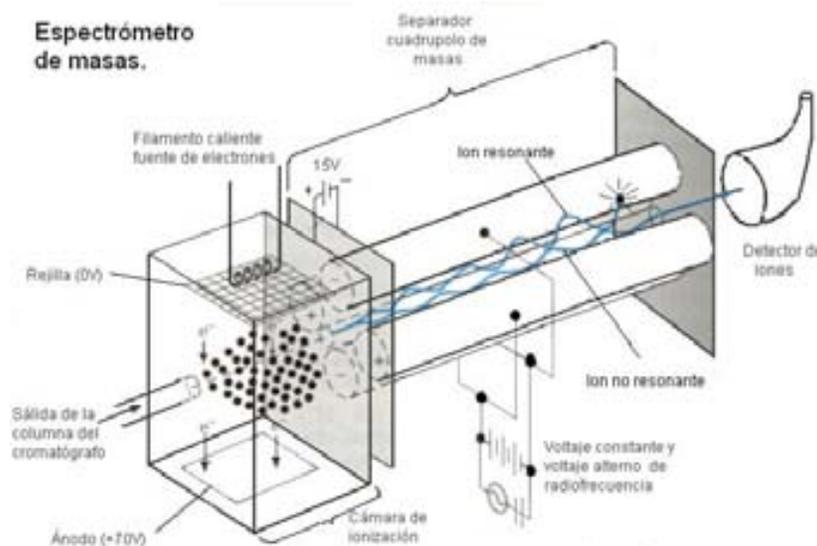


Figura 2.5. Esquema de un equipo de un Equipo de Espectrometría de Masas Cuadrupolo⁽¹⁸⁾

1.7.1.1 Sistemas de introducción de muestra.

La finalidad del sistema de entrada es permitir la introducción de una muestra representativa en la fuente de iones con la mínima pérdida de vacío.⁽²⁹⁾

Cuando los compuestos son gases o líquidos muy volátiles y puros, estos se inyectan directamente dentro de la cámara de ionización, por lo tanto no requiere de un equipo o aparato especial, por lo que es muy parecido a una inyección en el GC, este tipo de sistema se denomina estático.⁽¹⁵⁾

Otro sistema que también es aplicable en muestras gaseosas y líquidas, las cuales tienen puntos de ebullición de hasta aproximadamente 500°C, es el llamado: sistema indirecto de introducción de muestras, en este las muestras gaseosas son recogidas en un pequeño reservorio entre dos válvulas colocadas en una área específica que después se expande en un recipiente contenedor. En caso de los líquidos, en estos se introduce en un depósito una cantidad pequeña de la muestra. En ambos casos, el sistema de vacío se usa para alcanzar una presión en el equipo de 10^{-5} a 10^{-4} torr.

Para líquidos y sólidos no volátiles, se ocupa una técnica denominada entrada por sonda directa, en la que se introduce la muestra en la región de ionización poniéndolo en la superficie de un vidrio o en un tubo capilar de aluminio, con un alambre fino o con una copa pequeña. ⁽²⁹⁾ Estos tres métodos son adecuados cuando las muestras se encuentran puras.

Cuando en los análisis se trata de muestras complejas, estas técnicas resultan ser limitadas; por lo tanto, el sistema debe ser un método dinámico en el cual la muestra debe ser separada en componentes individuales, para posteriormente ser trasladados al EM. Esto ocurre con los sistemas acoplados, CG-EM, CLAE-EM, en donde la interfase removerá el exceso de gas portador en CG o exceso de solvente en el caso del CLAE. ⁽¹⁵⁾

1.7.1.2 Fuentes de iones.

Este es el principal elemento de un EM, ya que el aspecto de los espectros de masas para distintas especies moleculares, depende en gran medida del método utilizado para la formación de los iones.

Todos los métodos de ionización pertenecen a dos categorías principales; *Fuentes de fase gaseosa* y *Fuentes de desorción*. En las primeras, primero se volatiliza la muestra y luego se ioniza. En las segundas, las muestras sólidas o líquidas, se transforman directamente en iones gaseosos. Una ventaja de las fuentes de desorción es que son aplicables a muestras no volátiles y térmicamente inestables.

Las fuentes de fase gaseosa están generalmente restringidos a compuestos térmicamente estables que tengan puntos de ebullición menores de aproximadamente 500°C. En la mayoría de los casos, estos requerimientos limitan la utilización de fuentes de fase gaseosa a compuestos con pesos moleculares menores de aproximadamente 10^3 Daltons. Las fuentes de desorción, en las que no se requiere volatilización de las moléculas de analito, son aplicables a aquellos compuestos que tienen pesos moleculares mayores de 10^5 daltons. ⁽²⁹⁾

Las fuentes de iones pueden ser:

- *Fuentes duras*: estas comunican energía suficiente para producir iones fragmentados con una relación masa/carga menor que la del ion molecular, provee información estructural y la naturaleza de los grupos funcionales, aunque una desventaja que puede ocurrir es que desaparezca el pico del ion molecular, impidiendo establecer el peso molecular de analito.
- *Fuentes blandas*: dan lugar a poca fragmentación, por lo que el espectro de masas resultante, consta del pico del ion molecular y solo algunos o ningún otro pico, por lo que sirve para la determinación exacta del peso molecular. ⁽²⁹⁾

1.7.1.2.1 Métodos de ionización molecular de uso frecuente.

Fuente de impacto de electrones: En este los electrones son emitidos por un filamento caliente de wolframio o de renio y se aceleran mediante un potencial (70V) que se aplica entre el filamento y el ánodo, las trayectorias de los electrones y las moléculas, están en ángulo recto y se cruzan en el centro donde colisionan y tiene lugar la ionización. El producto primario son iones de una única carga positiva que se forman cuando los electrones de elevada energía se acercan suficientemente a las moléculas como para causarles la pérdida de electrones por repulsión electrostática. Los iones positivos producidos en un impacto de electrones son atraídos a través de una rendija hacia una placa de aceleración, mediante una pequeña diferencia de potencial (5V) que se aplica entre esta placa y las placas repulsoras, que los llevan al separador. ⁽²⁹⁾

Fuente de ionización química: En la ionización química, los átomos gaseosos de la muestra (tanto del sistema de entrada indirecto como de una sonda caliente) se ionizan al colisionar con los iones producidos al bombardear con electrones un exceso de gas reactivo. Es de uso generalizado los que producen iones positivos, aunque la ionización química de iones negativos se utiliza ocasionalmente en aquellos analitos que contienen átomos muy electronegativos.

Este tipo de ionización produce menos iones fragmento y mas iones moleculares (M^+) y iones protonados $(M+1)^+$ o $(M-1)^+$, estos son importantes para el análisis cualitativo pues sirven para identificar el peso molecular de la muestra.

Son tres los gases que se utilizan más en este tipo de espectrometría de masas: metano, isobutano y el amoníaco. Cada uno de ellos produce un espectro diferente del mismo analito. El metano produce iones reactivos como: CH_4^+ , CH_5^+ , C_2H_5^+ , estos interactúan con las moléculas de analito por cuatro mecanismos básicos: (1) transferencia de carga, (2) transferencia de protón, (3) abstracción del hidruro y (4) adición.⁽²⁹⁾

1.7.1.3 Analizadores de masas.

Este instrumento tiene la función de separar el haz iónico en todos sus componentes según su relación masa/carga.

Analizador de sector magnético; Estos analizadores utilizan un imán o un electroimán para hacer que el haz procedente de la fuente de iones se desplace con una trayectoria semicircular por el tubo analizador. Aplicando un pequeño potencial positivo a la placa de repulsión se consigue que los iones entren en el tubo analizador, y mediante un pequeño potencial aplicado a las placas de enfoque se enfoca el haz de iones. Al aplicar un alto voltaje (4000volts) entre las placas del acelerador de iones, los cationes adquieren una gran velocidad y son expulsados desde el fondo del cañón de iones.

Los cationes que migran a través del tubo analizador encuentran un campo magnético perpendicular a la dirección de su trayectoria, este campo desvía los iones hacia el detector que se encuentra al final del tubo. Las moléculas más pesadas no son desviadas suficientemente, y las moléculas más ligeras se desvían demasiado, esto produce que solo lleguen los iones dentro de un pequeño intervalo, el barrido de los iones de diferente masa se llevara acabo variando la fuerza del campo del imán o el potencial de aceleración.^(18, 32)

Analizador de cuadrupolo. Este consiste en cuatro barras metálicas paralelas a las que se le aplica un voltaje constante y un voltaje oscilante de radiofrecuencia. El campo eléctrico desvía los iones, haciéndoles seguir trayectorias diversas a medida que van desde la cámara de ionización hacia el detector, permitiendo que solo lleguen al detector los que tienen una relación (m/z) determinada. Los demás iones (iones no resonantes) chocan con los cilindros, y se pierden antes de llegar al detector. Variando rápidamente los voltajes aplicados, se seleccionan los iones de diferentes masas que llegan al detector.⁽¹⁸⁾

Analizador de tiempo de vuelo. Los cationes que fueron convertidos en la cámara de ionización, son acelerados al aplicar un voltaje de rejilla de 300V, de 3000 a 20000 veces por segundo, esta energía los lanza a un tubo de deriva con una energía cinética constante. Los iones que tienen la misma energía cinética pero diferentes valores de m/z adquieren distinta velocidad. Los iones ligeros circulan más rápidos y llegan al detector antes que los iones pesados. El espectro de masas representa la corriente del detector en función del tiempo. ⁽¹⁸⁾

Analizador de trampa iónica. En este, a los cationes producidos se les aplica un voltaje oscilante de radiofrecuencia a un electrodo central, esto les obliga a que circulen trazando una trayectoria estable dentro de una cavidad. Al aplicar un campo de radiofrecuencia entre las placas situadas en un extremo, expulsaran a los iones que tienen un valor determinado de m/z , imponiéndoles trayectorias inestables que les obliga a pasar a través de los agujeros de las tapas (inferior e superior). Los iones que pasan por los agujeros de la tapa inferior los captura un multiplicador electrónico y son detectados por un registrador.

Su principal desventaja es que tienen una menor resolución y reproducibilidad que los separadores de masas magnéticos y cuadrupolares; aunque dentro de sus ventajas están, que son de fácil acceso a la fuente de iones, un intervalo de masas virtualmente ilimitado y rapidez en la adquisición de datos.

Los espectrómetros de masas de sector magnético y cuadrupolo son los más populares dada la facilidad de su acoplamiento con CG y su simple control a través de computadoras. Ambos permiten una resolución unitaria, eso significa que pueden distinguir un $m=1$ (entre $m/z= 100$ y $m/z= 101$); sin embargo existen equipos que permiten resoluciones de $m= 0.00001$, los cuales se denominan equipos de alta resolución. ⁽³⁵⁾

1.7.1.4 Detectores:

Es el corazón de la mayoría de los espectrómetros de masas, los detectores de iones son generalmente del tipo multiplicador de electrones

Los multiplicadores de electrones son en esencia amplificadores de muy alta ganancia, que aumentan señales muy pequeñas (de 10^{-15} a 10^{-9} amperios) hasta un nivel procesable por un

equipo convencional; desde la introducción de la muestra en la interfase EM hasta la salida de la señal que se recoge como cromatograma. Los multiplicadores de electrones conforman el núcleo del sistema de detección; sin ellos no podríamos utilizar un espectrómetro de masas como dispositivo detector. ⁽³⁶⁾

Canal multiplicador de dínodo continuo (figura 2.7 b). Este consiste en un tubo de vidrio especialmente formulado y procesado para presentar conductividad eléctrica y la propiedad de emisión secundaria. Se les conoce también como “cuerno”, debido a su forma física. Es el más común de los detectores, cuando un ion choca con la cubierta de oxido de plomo en la pared del detector, se emiten electrones, estos electrones son enviados a otra zona del detector donde ellos también chocan con la pared emitiendo más electrones; el efecto neto será una cascada donde un ion producirá hasta un millón de electrones, la cual producirá una señal. ⁽³⁶⁾

Canal multiplicador de electrones de dínodos discreto (figura 2.7a). Estos consisten en una pila de placas dínodo metálicas con un recubrimiento especial conectadas por medio de una cadena de resistores de película gruesa y montado todo ello en una carcasa de material cerámico y de acero inoxidable. A través del detector se aplica un alto voltaje positivo, generalmente en el rango de 1000 a 3000 voltios.

Los resistores y dínodos están distribuidos de forma “continua” a lo largo del tubo de vidrio, mientras que la estructura de dínodo discreto consta de componentes “discretos”. Cada dínodo se mantiene a un potencial mayor que al anterior. El cátodo y los distintos dínodos tienen superficies de Cobre-berilio, las cuales emiten ráfagas de electrones cuando son alcanzadas por iones o electrones de elevada energía.

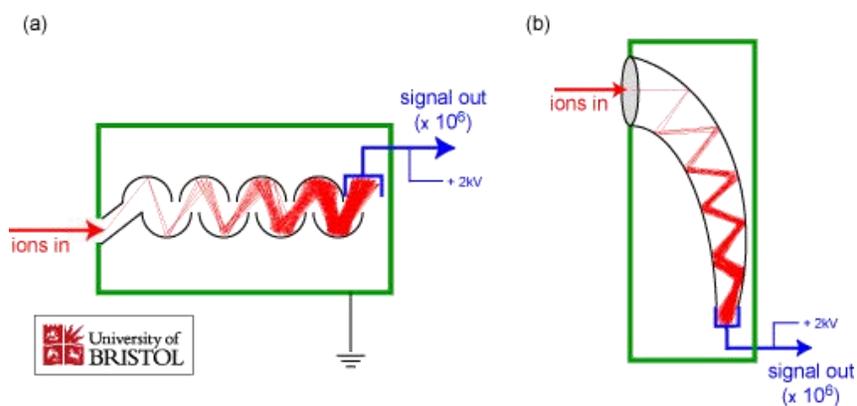


Figura 2.7. (a) Dinodos discretos; (b) Dinodo continuo.

Cada ión, al incidir en la superficie de entrada del detector, libera más de un electrón secundario. Los electrones secundarios, atraídos por el voltaje positivo, inciden entonces en la siguiente superficie dínodo, liberando electrones secundarios adicionales. El proceso se repite a lo largo de toda la estructura para producir, a la salida, un pulso de entre 10^3 y 10^8 electrones.

Dependiendo del instrumento y el detector, los multiplicadores de electrones pueden operar como amplificadores analógicos (la carga de salida es linealmente proporcional a la señal de entrada) o como contadores de pulsos (un pulso de idéntica amplitud para todos y cada uno de los iones de entrada).⁽³⁶⁾

Copa de Faraday. El detector está alineado de manera que los iones que salen del analizador incidan sobre el electrodo colector. La carga de los iones positivos que incidan en la placa es neutralizada por un flujo de electrones procedentes de tierra y la caída potencial resultante es amplificada para producir una señal.⁽³²⁾

1.7.1.5 Sistema de vacío.

Todo el proceso requiere que los iones que se produzcan puedan llegar hasta el detector sin haber sufrido cambios, para esto se requiere que no exista otro gas presente que pueda dar lugar a colisiones ion-molécula. Esto se logra con el alto vacío (1×10^{-6} a 1×10^{-7}) y es por ello que los EM cuentan con bombas mecánicas y bombas turbomoleculares o de difusión que permiten alcanzar esos niveles de vacío.⁽³⁵⁾

Sistema de colección de datos: Como cualquier instrumento, se requiere de un registro permanente de los eventos, en el caso de la espectrometría de masas, donde la velocidad de adquisición de datos es muy rápida por lo tanto es necesario el uso de computadoras las cuales agilizan la entrega de resultados y reportes.⁽³⁵⁾

1.8 Sistema acoplado Cromatografía de gases-Espectrometría de masas.

La cromatografía de gases es una técnica que posee una alta capacidad separativa en muestras complejas de compuestos, sin embargo, la identificación de los picos únicamente se basa en los tiempos de retención, por lo tanto, no se obtiene información que confirme la identidad de los componentes. Por otro lado, precisa que esta es la cualidad que caracteriza a un espectrómetro de masas, sin embargo, resultaría inútil cuando estos se encontrarian en una mezcla, ya que es muy poca o nula la información que se obtiene de la estructura molecular de un solo componente. Por lo que fueron inagotables los esfuerzos realizados para acoplar estos dos instrumentos. ya que siempre resultaron complementarias estas dos técnicas. Cuando finalmente esto se logro, se obtuvo una técnica muy poderosa y versátil para la separación, cuantificación e identificación de los componentes de muestras complejas.

Con el acoplamiento se obtuvo una técnica, muy específica, muy sensible, de alta rapidez y aplicable a un amplio grupo de compuestos: orgánicos, inorgánicos y bioquímicos. Además de que la cantidad de muestra necesaria es muy pequeña, ya que solo bastan 0.5µg, de material desconocido para identificarlo.

1.8.1 Instrumento: Sistema Acoplado CG/EM.

El instrumento esta compuesto por un cromatógrafo de gases y un espectrómetro de masas y el sistema de cómputo. (Figura 2.8)

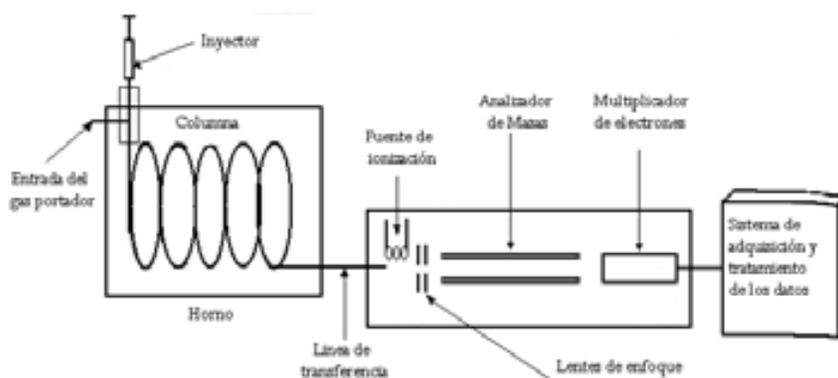


Figura2.8. Sistema combinado Cromatografía de gases- espectrometría de Masas.

Los componentes adicionales que se agregaron a este sistema combinado fueron:

1.8.1.1 Interfases: CG/MS.

La causa principal que retraso la introducción de estos sistemas, se asocio directamente a un problema; la diferencia de presiones en las que trabajan cada uno de los equipos, mientras la presión en una columna cromatografica era regularmente -1atm , en el espectrómetro de masas el trabajo se realiza a una presión de -10^{-5} torr. Por lo que la introducción de una interfase era esencial para remover el gas portador y reducir la presión 10^{-5} a 10^{-6} torr.

Estas interfases fueron llamadas separadores moleculares, estos removían selectivamente el gas portador; El principio bajo el cual funcionan, era el separarlos mediante diferencias en las propiedades fisicoquímicas entre el gas portador y las moléculas de la muestra. El rendimiento de la separación siempre dependió de los parámetros operativos (velocidad lineal del gas, temperatura intervalo de masas moleculares, etc.). Por otro lado, también algunas de las pérdidas de los solutos se debieron al diseño de los separadores de masas. Algunas de las interfases mas usadas fueron las que diseñaron Biemman-Watson, Llewellyn y el Ryhage.⁽³⁷⁾

Acoplamiento directo del sistema CG/MS

Con el desarrollo de las columnas capilares de sílice fundida, fue posible la introducción de la columna a la fuente de ionización del EM, esto facilito notablemente la construcción de estos equipos; porque el flujo es comparativamente muy pequeño en columnas capilares ($1-5\text{ml min}^{-1}$) que en columnas empacadas, el cual puede ser manejado por la alta capacidad de las bombas de difusión que poseen los espectrómetros masas actuales, que bombean con una velocidad de 500L s^{-1} o mas.

Las columnas capilares se acoplan a la fuente de ionización de dos maneras: directa o por “conexión con difusor abierto” (open-split connection). Cuando esta es directa, la columna es dirigida desde el horno del CG a través de una zona caliente “interface region” a la fuente de ionización del EM; de este modo se transfiere toda la muestra a la fuente de ionización. La optimización de la sensibilidad se logra manteniendo al mínimo los sitios activos en la interfase

“interface-related active sites”, ya que las pérdidas se producen por la adsorción de los componentes.

El otro dispositivo para introducir la muestra del CG al EM es el llamado difusor abierto “open-split device” introducido por Henneberg *et al.* (1975). En este dispositivo se encuentra una abertura muy estrecha entre lo que sería el final de la columna del CG y el inicio de la línea de transferencia que los dirige hacia la cámara de ionización, esta se mantiene a presión atmosférica para ajustar el flujo del gas portador (He) (Stan y Abraham, 1978; Wetzel *et al* 1982).

Este tipo de interfase tiene como ventaja, que la cromatografía no resulta afectada por el vacío del espectrómetro de masas, por lo tanto, los tiempos de retención de los cromatogramas en el CG y el CG-EM son fácilmente comparables.⁽³⁷⁾

1.8.1.2 Métodos de adquisición de resultados.⁽³¹⁾

Son tres las técnicas de adquisición de datos que se aplican en un sistema de espectrometría de masas acoplado a un cromatógrafo de gases.

Modo SCAN. En el modo SCAN, se obtiene el espectro de masas completo de los analitos, por barridos repetidos rápidos entre dos masas (m/z) en dos puntos extremos (33-500umas). Este método de obtención de datos requiere de una gran cantidad de muestra, a excepción del analizador de trampa de iones, en el, los iones de diferente relación m/z no son analizados secuencialmente. Otra función del modo SCAN es que puede ser comparado el registro experimental del análisis (espectro de masas) con una librería que contiene los registros de una cantidad considerable de espectros de masas (Wiley, NIST, etc).

Modo SIM (LR (low Resolution) y HR(High Resolution)). Cuando el objetivo principal del análisis es la detección y la cuantificación de sustancias específicas, donde se conocen perfectamente las características espectrales, se selecciona el modo: monitoreo selectivo de iones (SIM: selected-ion monitoring). Donde solo las masas de los iones seleccionados son registradas; con SIM se incrementa la sensibilidad de un analizador cuádruplo y de un analizador de sector magnético. Estos registros pueden realizarse con el modo de baja

resolución o con el modo de alta resolución, que solo es posible con instrumentos de doble foco. Con estos equipos se obtienen límites de detección del orden de ng/kg o ng/L (ppt).

Modo SRM. Esta técnica incrementa la selectividad y la relación señal-ruido, con el modo monitoreo selectivo-reactivo (SRM: selected reaction-monitoring) se necesita al menos dos analizadores de masas puestos en tándem. Estos equipos suelen ser doble o triple cuádruplo o equipos híbridos. Este método es usado principalmente en la identificación y la cuantificación de residuos en matrices muy complejas; los límites de detección que alcanzan estos sistemas son del mismo orden, del que se obtiene con el modo HR-SIM, que es de ppt.

1.8.1.3 Ventajas del CG/ EM.

Es un detector universal, posee una alta sensibilidad 10^{-12} en el modo SCAN y 10^{-15} en el modo SIM, SRM, es muy específico para compuestos desconocidos, ya que este los confirma, mediante comparación directa con bibliotecas o mediante la identificación de los fragmentos producidos, etc. ⁽³¹⁾

1.8.1.4 Desventajas del CG/EM.

Tiene un costo alto, el operador necesita tener conocimientos de los instrumentos, es difícil igualar la precisión y exactitud obtenida en otros detectores, etc.

Capítulo 2. Desarrollo experimental.

El desarrollo experimental se encuentra constituido en tres etapas:

2. I Optimización del proceso de separación de pesticidas.

- Optimización del cromatógrafo de gases.

1. Selección de la técnica de inyección: Split, splitless, split pulsado y splitless pulsado.
 - Evaluación de los parámetros cromatográficos; factor de capacidad, selectividad, número de platos teóricos, resolución y altura equivalente a un plato teórico.
2. Establecimiento del programa de temperatura para 14 pesticidas y para 20 pesticidas.

- Optimización del espectrómetro de masas.

- I. SCAN y SIM.

- II. Determinación de los límites de detección y cuantificación instrumental.

2. II Desarrollo del método de preparación de muestras.

- Optimización del método de preparación de muestras
- Porcentaje de recobro.

2. III Determinación e identificación de pesticidas en fresas consumidas en zonas urbanas

Instrumental y material.

Instrumental

Sistema acoplado GC/MS:

Cromatógrafo de gases Hewlett Packard HP6890.

Detector de masas Hewlett Packard HP5973.

Inyector automático Agilent 7683.

Dispositivos:

Evaporador con corriente de Nitrógeno.

Material:

Micropipetas:

Wilson 50-200 μ L.

Finnpipette 200-1000 μ L.

Viales Headspace de 10 y 20mL con sellos de aluminio y septas de TFE/silicon.

Viales de vidrio de 2ml con septas de TFE Agilent.

Microviales de vidrio de 100 μ L Agilent.

Cartuchos de extracción en fase sólida de vidrio para rellenado manual.

Estándares:

Plaguicidas:

Órganoclorados .

- BHC PolyScience Analytical Standar 95%
- Aldrin PolyScience Analytical Standar 99%
- Dieldrin PolyScience Analytical Standar 99%
- Endrin PolyScience Analytical Standar 99%
- Heptacloro PolyScience Analytical Standar 99%
- Endosulfan, PolyScience Analytical Standar 96+%
- DDT , PolyScience Analytical Standar 99%
- Mirex, Chem Service 99.4%
- Metoxicloro, PolyScience Analytical Standar 99%

Órganofosforados

- DDVP, PolyScience Analytical Standar 99%
- Metil Paration PolyScience Analytical Standar 99%
- Malation. Chem Service 98.2%
- Paration, Chem Service 98%
- Etion, PolyScience Analytical Standar 99%
- Co-Ral o Coumaphos PolyScience Analytical Standar 99%
- Zolone. PolyScience Analytical Standar 99%
- Di-Syston o Disulfoton. PolyScience Analytical Standar 99%

Carbamicos.

- Carbarilo, Chem Service 99%
- Carbofuran. PolyScience Analytical Standar 99%
- Metomilo , PolyScience Analytical Standar 99%

Estándar Interno:

- 4,4-Dibromobifenilo Aldrich 99% Lote PZ No. 02111

Surrogado:

- 4-Clorodifenileter Aldrich 99% Lote. KZ No. 05721PY

Reactivos:

Sulfato de sodio Anhidro (Na_2SO_4) J.T. Baker® ACS Lote T13C02

Sal común, Elefante

Florisil. (60-100mesh) JT Baker Chemical Co.

Cartucho de Extracción en fase sólida: Silica Gel JT Baker

Disolventes grado HPLC:

Acetonitrilo:

JT Baker HPLC Lotes C03C51, C33C58

Mallinckrodt Lote 0043 T32D51,

Mallinckrodt ChromAR Lote H076 M51E93

Cloruro de Metileno:

JT Baker; Ultra Resi-Analyzed Lote T50E05

JT Baker; Analyzed®HPLC Solvent A30822

Metanol:

JT Baker HPLC Lote C34C07

Hexano:

Mallinckrodt Nanograde Lote 4159 T43E93

Columna:

HP5 5% fenil metil siloxano, 25m (L) X 320µm (di) X 0.52 (espesor de película)

Disoluciones:

Solución madre de pesticidas I, II, 200ppm.

Se pesó con precisión aproximadamente 0.005g de cada pesticida, uno a uno hasta completar cada elemento y se aforó hasta 25ml con acetonitrilo.

Solución estándar de 4-clorodifenil eter II (surrogado S) de 370ppm.

Se pesó con precisión aproximadamente 0.016g de 4-clorodifenil eter y se aforó hasta 10ml con acetonitrilo.

Solución estándar de 4,4-Dibromobifenilo I (estándar interno) de aproximadamente 220ppm.

Se pesó con precisión aproximadamente 0.0022g de 4,4-Dibromobifenilo y se aforó hasta 10ml con acetonitrilo.

Solución saturada de cloruro de sodio.

Esta se preparó agregando cloruro de sodio (sal común) gradualmente hasta alcanzar la saturación del agua.

“Disoluciones estándar de pesticidas para las curvas de calibración”.

A partir de la solución madre de 200ppm, se tomaron las alícuotas siguientes 375, 250, 125 y 50µL; y se agrega la alícuota de 463µL y de 320µL de las soluciones estándar de EI y del surrogado respectivamente, y se aforaron en 5ml de cloruro de metileno.

Nota: Todas las soluciones se mantuvieron a 4°C hasta que se usó.

2.1 Optimización del proceso de separación de pesticidas.

2.1.1 Optimización del cromatógrafo de gases.

2 Para optimizar el funcionamiento del cromatógrafo de gases se realizaron dos estudios: selección de la técnica de inyección y el programa de temperatura, para llevarlo a cabo se utilizó una disolución estándar de pesticidas de aproximadamente 10ppm, con una columna de polaridad intermedia: 5% fenil metilsiloxano.

2.1.1.1 El cromatógrafo de gases está provisto con un control automático de presión, este controla con precisión la presión en el inyector, por lo tanto además de las técnicas split y splitless; este cuenta con dos técnicas más: split pulsado y splitless pulsado. En la búsqueda de las mejores condiciones de inyección se realizó una inyección con cada técnica para determinar cuál era la más adecuada:

Los siguientes dos estudios se realizaron para seleccionar la mejor técnica de inyección.

1. Se calcularon los siguientes parámetros cromatográficos: Número de platos teóricos (N), altura equivalente a un plato teórico (H), selectividad (α) y resolución (R_s) y el factor de capacidad (k'). De acuerdo a las siguientes ecuaciones.

Factor de capacidad:

$$k = \frac{tr - tm}{tm}$$

Selectividad (α):

$$\alpha = \frac{tr'B}{tr'A} = \frac{tr_2 - t_0}{tr_1 - t_0}$$

Número de platos teóricos (N).

$$N = 5.545 \left(\frac{tr'}{w_{1/2}} \right)^2$$

Altura equivalente a un plato teórico (H)

$$H = \frac{L}{N}$$

Resolución:

$$R_s = \frac{tr'_2 - tr'_1}{\frac{1}{2}(w_2 + w_1)}$$

2. Se realizó un análisis a cada cromatograma para determinar el efecto de la inyección sobre la respuesta del detector.

Las condiciones de análisis que el cromatógrafo de gases tenía para seleccionar la técnica de inyección fueron las siguientes: *Tabla: 1*

Tabla 1: Condiciones de análisis para seleccionar la técnica de inyección.

Cromatógrafo de gases (6890)	
Columna Capilar	(WCOT) HP5. 5% fenil metil siloxano 25m (L) x 0.32mm di. X 0.52µm de espesor de fase Estacionaria.
Programa de temperatura	130 °C(2min.)-300°C(2min) 8°C/min
Gas portador	Helio 1.2ml/min
Temperatura del inyector	275 °C
Relación de Split	1:30
Split pulsado	40psi 0.5min.
Splitless	0.5min
Splitless pulsado	40psi 0.5min.
Volumen inyectado	1µL

El tiempo muerto para la columna HP-5 se determino inyectando 1µl del acetonitrilo.

2.1.1.2 Optimización el programa de temperatura hasta encontrar las mejores condiciones de separación de los pesticidas.

Esta optimización se realizo modificando la velocidad de barrido, con el objeto de mejorar la resolución de los pesticidas.

2.1.1.3 Optimización del espectrómetro de masas.

Para optimizar la detección de los pesticidas, además del método SCAN, que analiza la corriente total de iones; el espectrómetro de masas cuenta con un método de detección selectivo denominado monitoreo selectivo de iones (SIM). Con el se hará más sensible la detección de los pesticidas, ya que solamente analizara el ion seleccionado de cada pesticida.

El ion seleccionado de cada pesticida para la detección con el modo SIM, *tabla 2*, fue el ion característico para cada uno de los diferentes compuestos. El desarrollo la metodología se realizo en función del ion seleccionado y su tiempo de retención.

Tabla 2: Iones seleccionados para la detección por SIM

Pesticida	Ion (m/z)
DDVP	109
Metomilo	105
4-Clorodifenil eter (S)	204
BHC	183
Carbofuran	164
Disulfoton	88
Metil paration	263
Heptacloro	272
Carbarilo	144
Aldrin	263
Malation	173
Paration	291
4,4-Dibromobifenilo (EI)	152
Endosulfan	195
Dieldrin	79
Endrin	263
Etion	231
p,p-DDT	235
Metoxicloro	227
Zolone	182
Mirex	272
Coumafos	362

Nota: En el anexo 3 pueden consultarse los espectros de masas de cada uno de los pesticidas y el ion seleccionado debidamente señalado con un asterisco. La confirmación de cada espectro de masas fue comparada con la biblioteca de espectros de masas Wiley y NIST.

2.1.2 Determinación del Límite de detección y cuantificación instrumental.

Para la determinación matemática-estadística del límite de detección y el límite de cuantificación de cada componente se considero la curva de calibración y los intervalos de confianza; de acuerdo al método propuesto por Miller y Miller.

Se realizaron tres inyecciones de las disoluciones estándar de pesticidas; cada solución tenía una concentración de pesticidas: 2, 5, 10, y 15ppm aproximadamente, de 10ppm el Estándar Interno (Cuantificación) y 10ppm del surrogado (elemento de calidad).

Tabla 3: Condiciones de análisis optimizadas para el análisis de pesticidas.

Cromatógrafo de gases (6890)	
Columna Capilar	(WCOT) HP5. 5% fenil metil siloxano 25m (L) x 0.32mm di. X 0.52µm de espesor de fase estacionaria.
Programa de temperatura	100°C (2min)-300°C(2min) 7°C/min.
Gas portador	Helio 1.7ml/min.
Temperatura del inyector	275 °C
Splitless pulsado	40psi 0.5min.
Volumen inyectado	1µL
Espectrómetro de masas (5973)	
Tipo de ionización	Impacto electrónico
Analizador	Cuadrupolo
Fuente de impacto electrónico	70eV
Barrido masico m/z	33-550uma
Tiempo de encendido (solvent delay)	2.5min

Se efectuaron con los dos modos de operación que posee el espectrómetro de masas: SCAN y SIM, con el primero se analizo la corriente total de iones, con el que se obtiene el espectro de masas y con ello la identificación de cada elemento, y con el segundo se analiza solo el ion seleccionado; y con ello la cuantificación positiva de todos los elementos. Por lo tanto se realizaron seis inyecciones por cada punto de las curvas.

Al registrar todos los resultados de los cromatogramas se realizaron las curvas de calibración, siendo el eje de las abscisas el que corresponde a la relación de concentraciones (pesticida/EI) y el eje de las ordenadas a la relación de áreas (pesticida/ EI).

El criterio que se debió considerar antes de estimar los valores LD Y LC en el caso del Endosulfan y el BHC, se debe a que estos pesticidas no solo originan una señal, aunque sean estándares analíticos siempre estarán presentes su isómeros, los cuales son dos y tres respectivamente, y que son separados selectivamente por la columna, por lo tanto su área total no correspondería solo a un pico, ya que no existe duda que cada uno de los isómeros, solo se origina del endosulfan y el BHC, a partir de esta consideración se definió que todos los picos a los que pertenecientes a estos pesticidas tienen el mismo factor de respuesta, por lo tanto se realizo la suma de los picos para cada pesticida.

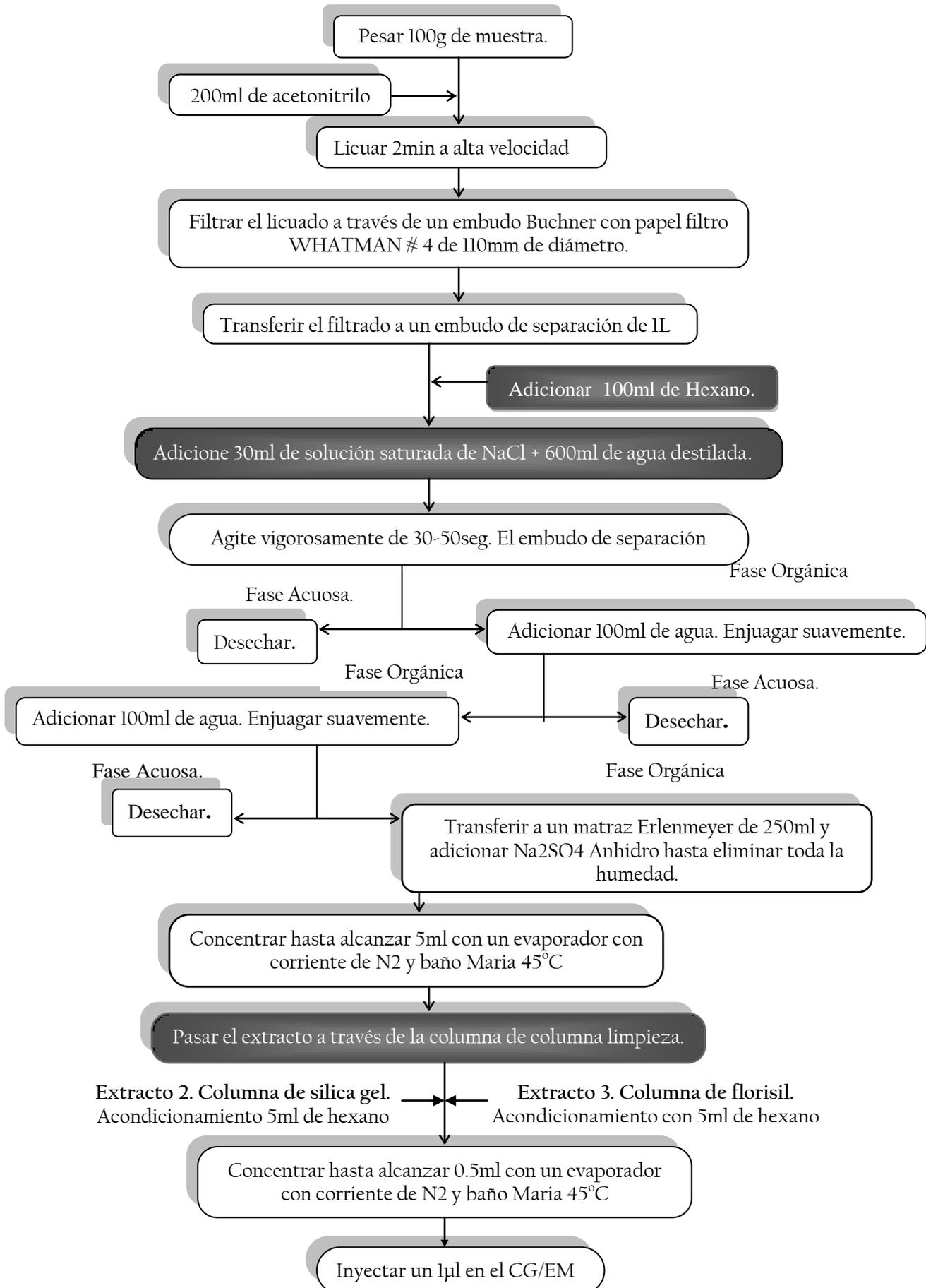
2.2 Desarrollo del método de preparación de muestra.

2.2.1 Optimización del método de preparación de muestras.

Inicialmente se preparo un extracto de fresa fortificado siguiendo lo mas posible la metodología MOG propuesta por la AOAC, este método fue llamado; MOG modificado, este tuvo como particularidades el no haber sido sometida a la limpieza y el haber cambiado el disolvente de partición, A partir de este extracto, se prepararon la segunda y la tercera muestra, en las que si se agregaría la etapa de limpieza, con estos resultados tendríamos una perspectiva de lo que posteriormente se convertiría en un nuevo método. A continuación se mostraran a detalle los cambios que se efectuaron al método MOG; y en el Diagrama de flujo 1 se muestra a detalle este método y las etapas donde se realizaron las modificaciones al método, los cuales se resaltan en color gris sombreado.

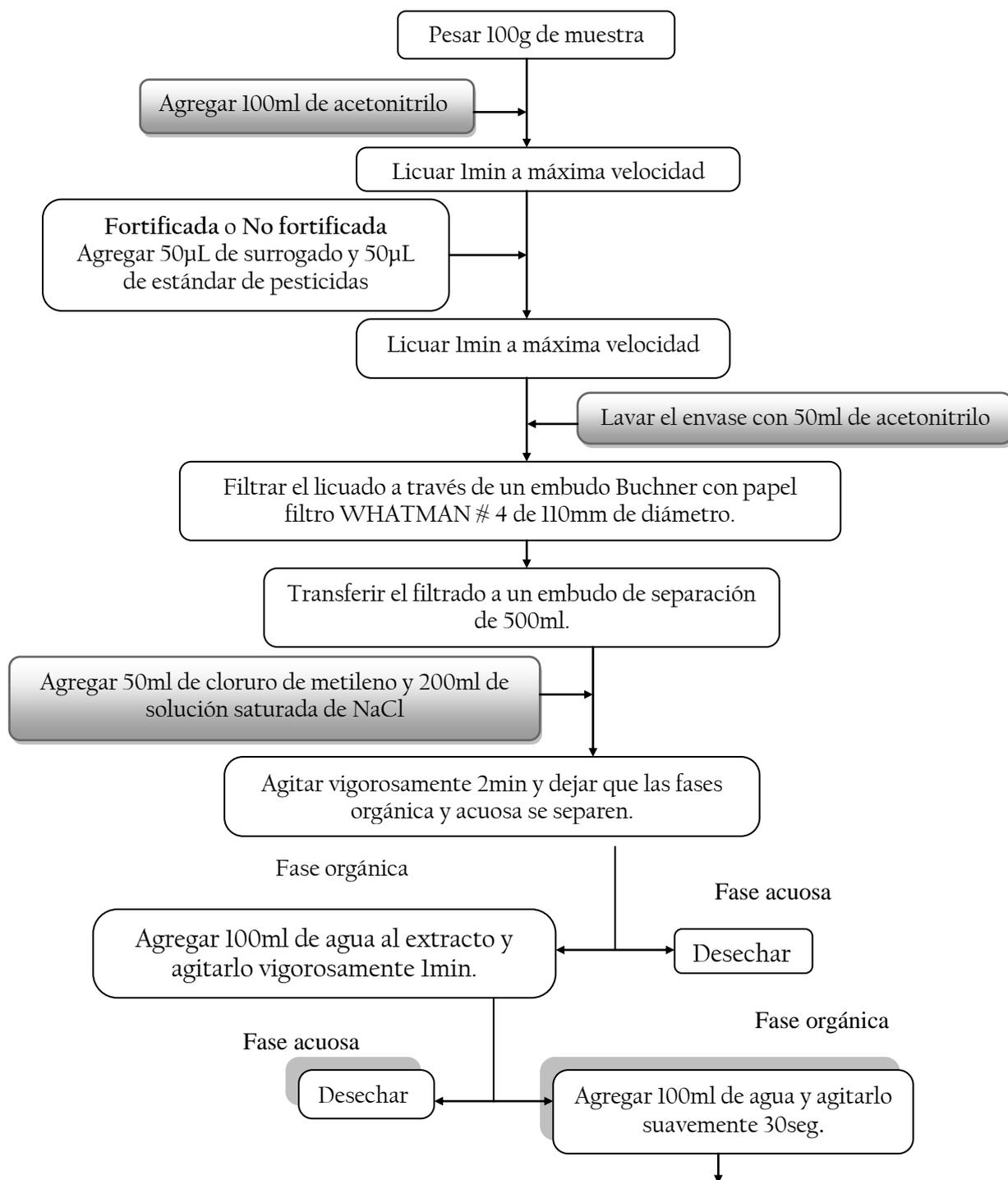
1. Disolvente de partición: MOG: éter de petroleo; MOG modificado: hexano.
2. Limpieza. MOG. Columna de separación empacada de florisil; MOGmod. No definido, se probaron dos Cartuchos de extracción en fase sólida empacados de florisil y de silica gel.
3. Concentración: MOG: Kuderna Danish; MOG modificado. Evaporador con corriente de nitrogeno.
4. Detección. MOG. No definido; MOG modificado. Sistema acoplado CG/EM

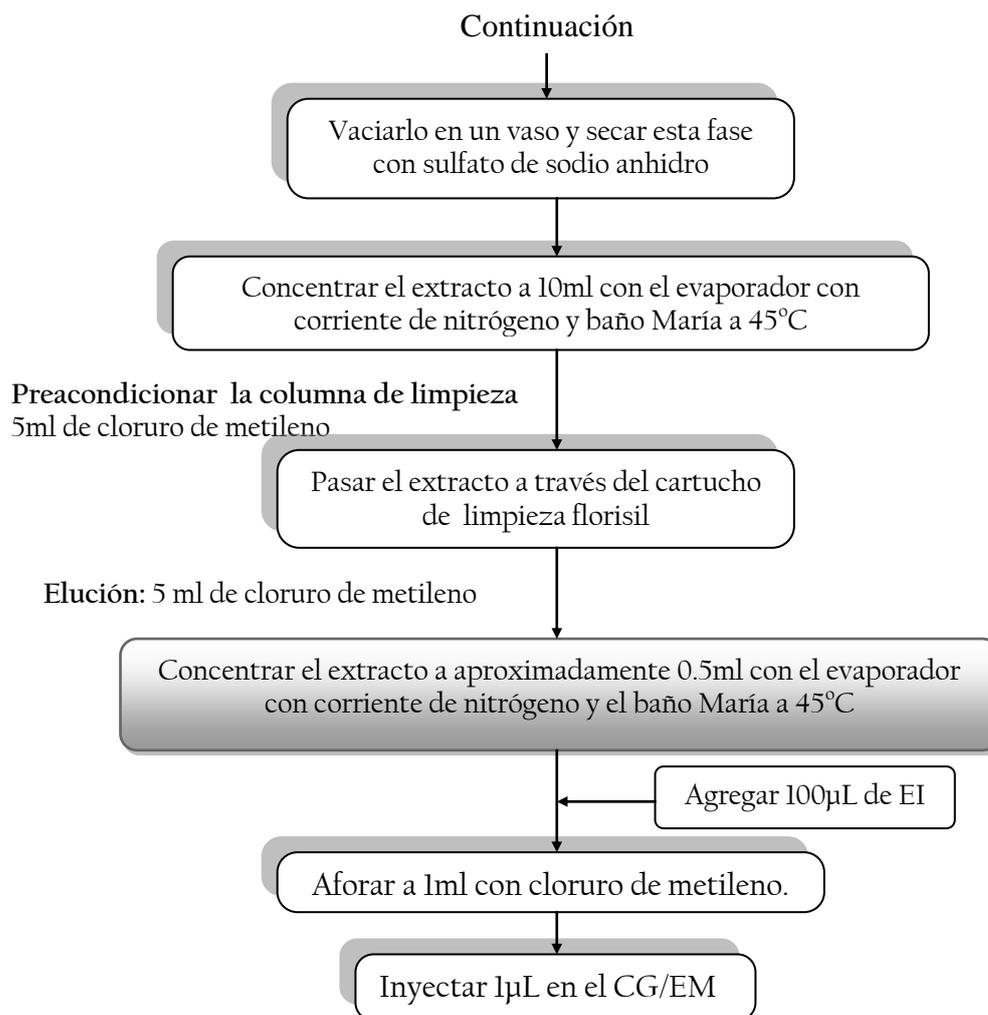
Diagrama de flujo 1; Método MOG modificado para Frutos con alto contenido de Humedad > 30%



Posteriormente al obtener los resultados de estos extractos, fue propuesta la metodología que reemplazaría al método MOG modificado. El siguiente diagrama de flujo (2) muestra el método que se obtuvo después de realizar los cambios, las modificaciones se muestran en el siguiente diagrama en color gris.

Diagrama Flujo 2. Método DEMA-HGR, para alimentos con alto contenido de Humedad (>80%), lípidos (<1.5%).





2.3 Porcentaje (%) de recuperación de pesticidas.

El cálculo del porcentaje de recobro de los pesticidas se realizó con el objeto de no realizar una curva de calibración de método, sino que se evaluó el recobro de los pesticidas fortificando muestras con pesticidas, la cantidad que se añadió de pesticida fue constante, la del estándar interno y el surrogado también. En el procedimiento se incluirían una muestra fortificada y una no fortificada; La presencia de la muestra no fortificada constantemente en esta etapa se justifica porque aún en la actualidad aun no existe un organismo u institución pública o privada en México donde puedan ser adquiridas muestras estándar de frutas, y que también estén libres de cualquier componente exógeno del producto.

Las alícuotas que se agregaron en las muestras fueron las siguientes: Estándar Interno (EI: 108ppm) 93µL, de surrogado (So: 156ppm) 64µL y de estándar pesticidas fue de (STd:

200ppm) 50 μ L; y a la muestra no fortificada, solo se agregaron el Su y el EI, con el mismo volumen.

Las alícuotas del surrogado y del estándar de pesticidas se agregaron en los extractos antes de iniciar el procedimiento, durante la etapa de molienda; y el Estándar interno se agregó cuando el extracto había alcanzado poco menos de un lml; después estos aforarían aun lml, para que al finalizar todo el procedimiento de preparación de muestras, los pesticidas tuvieran concentraciones de 10ppm aproximadamente, la cual sería una concentración cercana a la parte central de la curva de calibración del pesticida.

Las curvas de calibración que se utilizaron para hacer la estimación de las concentraciones en las muestras y para la posterior evaluación del porcentaje de recobro fueron las que se produjeron en la etapa preliminar a este punto del trabajo: las curvas de calibración que utilizaron para estimarlos tuvieron concentraciones de 2-15ppm, estos valores equivaldrían si estas estuvieran en la fresa a 0.02-0.15mg de pesticida/Kg de muestra; estas serían concentraciones muy debajo donde se encuentran los límites máximos permisibles que establece nuestra legislación.

Relativo a los pesticidas organoclorados, los cuales en su gran mayoría ya no se encuentran permitidos desde hace varias décadas salvo el Endosulfan, dicofol y otros, y que por ende no existen registros de los límites máximos residuales, las muestras se fortificaron con 0.11 ppm en promedio de estos pesticidas, en el límite superior fue de 0.22ppm.

La determinación de los pesticidas se realizó con un estándar interno, el cálculo de la concentración se realizó a partir del área de cada pesticida, del área del estándar interno y de la ecuación de la recta obtenida de la curva de calibración independiente para cada pesticida, donde el valor de la gráfica corresponderá a la interpolación del área del pesticida con el eje de las concentraciones; posteriormente se multiplicó por la concentración del EI, y finalmente se corrigió por el factor de concentración el cual fue de 100; siendo esta la concentración de la muestra.

Cuando se encontraban pesticidas en las muestras no fortificadas y que correspondían a los de los pesticidas seleccionados se realizó la resta de la concentración que tenían y se calculaba el recobro con los valores corregidos.

2.4 Determinación e identificación de pesticidas en fresas.

La metodología implementada DEMT-HGR, se utilizó en diferentes lotes de fresa y se emplearon los dos modos de operación del espectrómetro de masas SCAN para identificarlos y SIM para cuantificarlos.

Las muestras de fresa fueron adquiridas en la central de abastos, en mercados públicos y en recauderías. Estas se almacenaron en refrigeración y se procuró procesarlas dentro de las primeras 48 horas.

A las fresas no les realizamos ninguna operación de limpieza; solo retiramos la parte no comestible del fruto (el tallo y las hojas), al finalizar esta operación, continuamos con un procedimiento de muestreo, el cual se realizó por cuarteo; para seleccionar las fresas se utilizó una tabla de números aleatorios.

La presencia del surrogado en las muestras tiene como objeto estimar la pérdida de los analitos en las muestras durante la preparación de muestras, al agregar una cantidad conocida de surrogado en las muestras antes de iniciar el tratamiento de la muestra, se da por hecho que la relación del surrogado-analito se mantendrá constante durante la preparación de la muestra, por lo que la cantidad que se pierda del surrogado es directamente proporcional a lo que se pierda del pesticida durante el procedimiento.¹⁸

El ejemplo de los cálculos realizados para determinar la cantidad de pesticidas en las muestras puede observarse en el anexo II.

Capítulo 3. Resultados y análisis de resultados.

La optimización del sistema cromatográfico se estableció durante el desarrollo de la metodología en dos etapas. Estas dos etapas permitieron la identificación y la cuantificación de los pesticidas seleccionados.

- La primera etapa consistió en la optimización de la separación de catorce pesticidas, el estándar interno y el surrogado.
- La segunda etapa consistió en la optimización de la separación de veinte pesticidas, el estándar interno y el surrogado.

3.1 Optimización del proceso de separación de pesticidas.

3.1.1 Optimización del cromatógrafo de gases.

3.1.1.1 Selección de Técnica de inyección.

Para establecer que técnica de inyección era la mejor y seleccionar la mas adecuada, habría que indicar previamente que el inyector del cromatógrafo esta provisto con un control automático de presión, este controla con precisión variaciones en la presión de corta duración y al final la lleva de nuevo a la presión de operación, esto produce el ingreso de mayor cantidad de muestra a la columna; por lo que además de las técnicas típicas: Split y splitless; este sistema permite obtener dos técnicas complementarias Split pulsado y Splitless pulsado, a partir de este conocimiento era necesario definir desde el principio el efecto que produciría en la respuesta del detector (los picos), la cantidad de muestra que se introducía en la columna; y partir de estos resultados elegir la técnica mas eficiente para detectar a los pesticidas, esto consistiría en la identificación y la cuantificación de los pesticidas a nivel residual. La primera evaluación para seleccionar la técnica de inyección consistió en realizar los cálculos de los parámetros cromatograficos.

A continuación se presentan los resultados que se obtuvieron de la evaluación de los parámetros cromatograficos con las cuatro técnicas de inyección, posteriormente se discutirán brevemente estos resultados.

Tiempo muerto determinado para acetonitrilo: 0.696 min

Tabla 3.1 *Parámetros cromatográficos, Split.*

Compuesto	Tr	k'	A	Rs	N	H
DDVP	2.58	2.71			8911.2	0.00281
BHC						
BHC	8.47	11.17	4.12		220068.5	0.00011
Disulfoton	8.99	11.91	1.07	13.84	293916.1	0.00009
Metil Paration	10.08	13.48	1.13	28.31	290090.1	0.00009
Aldrin	10.97	14.76	1.10	22.82	426988.7	0.00006
DDE	13.36		1.23	59.75		
Dieldrin						
Endrin	13.87	18.93	1.04	13.10	784771.2	0.00003
Etion	14.44	19.75	1.04	16.61	905533.7	0.00003
DDT	15.16	20.78	1.05	21.00	1002048.0	0.00002
Metoxicloro	16.47	22.66	1.09	31.57	573827.0	0.00004
Zolone.						
Guthion						
Co-Ral						

Tabla 3.2 *Parámetros cromatográficos, Split pulsado.*

Compuesto	Tr	k'	α	Rs	N	H
DDVP						
BHC	7.93	10.39			266071.72	9.40E-05
BHC	8.74	11.56	1.11	21.6	203164.27	1.23E-04
Disulfoton	9.27	12.32	1.07	13.0	254540.41	9.82E-05
Metil Paration	10.43	13.98	1.14	31.7	481821.40	5.19E-05
Aldrin	11.28	15.2	1.09	25.0	506418.07	4.94E-05
DDE	13.69		1.23	58.7		
Dieldrin						
Endrin	14.21	19.42		13.4	988485.80	2.53E-05
Etion	14.77	20.22	1.04	15.7	721465.63	3.47E-05
DDT	15.49	21.26	1.05	19.5	990061.84	2.53E-05
Metoxicloro	16.81	23.15	1.09	38.7	1320464.96	1.89E-05
Zolone.	17.53		1.04			
Guthion						
Co-Ral						

	No detectado
	Coelución

Tabla 3.3 *Parámetros cromatograficos, Splitless.*

Compuesto	Tr	k'	A	Rs	N	H
DDVP						
BHC	8.01	10.51			160412.8	0.00016
BHC	8.81	11.66	1.11	18.93	216869.2	0.00012
Disulfoton	9.31	12.38	1.06	12.76	284809.2	0.00009
Metil Paration	10.53	14.12	1.14	28.88	252937.2	0.00010
Aldrin	11.31	15.25	1.08	18.64	432053.0	0.00006
DDE	13.68		1.22	55.81		
Dieldrin						
Endrin	14.22	19.42	1.04	12.44	665686.4	0.00004
Etion	14.76	20.21	1.04	15.19	1006521.6	0.00002
DDT	15.48	21.25	1.05	21.24	988991.5	0.00003
Metoxicloro	16.8	23.14	1.09	39.88	1495043.7	0.00002
Zolone.						
Guthion						
Co-Ral						

Tabla 3.4 *Parámetros cromatograficos, Splitless pulsado.*

Compuesto	Tr	k'	A	Rs	N	H
DDVP						
BHC	7.96	10.44			96608.8	0.00026
BHC	8.76	11.58	1.11	14.66	123483.2	0.00020
Disulfoton	9.28	12.33	1.06	10.55	201587.8	0.00012
Metil Paration	10.46	14.03	1.14	16.30	52837.6	0.00047
Aldrin	11.28	15.21	1.08	11.62	369252.8	0.00007
DDE	13.69		1.23			
Dieldrin						
Endrin	14.21	19.42		11.56	665194.1	0.00004
Etion	14.77	20.22	1.04	14.93	846720.1	0.00003
DDT	15.49	21.26	1.05	18.54	687635.9	0.00004
Metoxicloro	16.80	23.14	1.09	32.72	995217.4	0.00003
Zolone.	17.56		1.05			
Guthion						
Co-Ral	19.19	26.57	1.10	27.01	397948.0	0.00006

	No detectado
	Coelución

Discutiremos la evaluación de los parámetros cromatográficos, Iniciaremos con el factor de capacidad k' . Como puede observarse en las tablas 3.1, 3.2, 3.3 y 3.4 en tres técnicas de inyección (**split pulsado**, **splitless** y **splitless pulsado**) resultaron ser casi iguales los valores, las diferencias solo se encontraban dentro de un intervalo de diez centésimas, que finalmente no serían significativas; por lo tanto en base a estos resultados se propondría la siguiente hipótesis: la permanencia de los solutos en la fase estacionaria no dependerá del método de inyección. Sin embargo, una duda surgiría, esta se presentó con la técnica que faltaba: **split**, en la que los valores se salieron del patrón observado en las otras técnicas de inyección, ya que estos valores de k' en esta técnica eran valores de treinta a cincuenta centésimas más bajos que en las otras tres técnicas; lo cual en principio descartaría la hipótesis propuesta.

Las cosas que explicarían estas diferencias en el caso de las tres técnicas en las que los valores son similares se podrían atribuir a las siguientes dos causas, la primera consistiría en que solo la operación de introducir la muestra implicaría pequeñas variaciones en la velocidad de flujo del gas dentro del inyector por causa misma de la técnica de inyección; ya que en principio se debe considerar que ambas técnicas fueron diseñadas para distintos propósitos: la primera fue diseñada para muestras concentradas: **split**, el cual basa su funcionamiento en eliminar una fracción muy importante de la muestra, cercana al 98%; y la segunda, fue diseñada para muestras muy diluidas: **splitless**, esta se diseñó para introducir toda la muestra. La segunda causa se atribuiría que las variaciones serían producidas por las técnicas con pulso, que aun siendo estas complementarias a las técnicas previamente mencionadas, y en las que solo se suministra una presión adicional al inyector también produciría diferencias; por lo que a las cuatro técnicas presentarían diferencias inherentes debidas al diseño del equipo.

Para finalizar la discusión de k' puedo concluir que aun estando presentes estas diferencias en todas las técnicas de inyección, y que principalmente se debieron a la técnica de inyección **Split**, en la que eran más notables las diferencias; fue finalmente descartada, ya que esta diferencia no fue significativa y entrarían dentro de un intervalo donde no se considera que se haya modificado el tiempo de retención por causa del estado del equipo. Por lo tanto la hipótesis que establecí previamente resultó ser correcta.

En segundo lugar discutiremos los valores de selectividad α , en las tablas 3.1, 3.2, 3.3 y 3.4 se indica que los resultados son prácticamente iguales en las cuatro técnicas de inyección, esto era previsible,

ya que la afinidad de los analitos por la fase líquida solo depende de las interacciones con ella y no de la forma en que los inyectamos ni del disolvente, esto pudo comprobarse con la técnica de inyección **Split**, en la que los analitos estando ya la columna, y habiendo eluido en promedio casi medio minuto antes que las otras tres técnicas, puede observarse que la separación de todos los analitos expresados en términos de α son iguales.

Respecto a los valores de resolución de los pesticidas que se separaron, fueron valores grandes, ya que eran de dos dígitos prácticamente, lo cual significaría en principio que la separación habría sido muy eficiente con estos pesticidas, sin embargo, hubo también pesticidas que coeluyeron, por lo que el resultado de estos pesticidas sería de cero; que es simplemente lo contrario a los pesticidas que si se separaron, esto indicaría claramente que la columna no sería eficiente y tendríamos que cambiar la columna. En otro sentido y de acuerdo al equipo que se dispone; se podría decir que el resultado de la técnica que presento los valores más altos sería la técnica **split** pulsado y la que presento los resultados más bajos habría sido **splitless** pulsado, esto en principio nos indicaría que solo por estos resultados serían mejores la técnicas **split**; lo que nos llevaría finalmente a una selección equivocada, por lo que el análisis solo tenía como fin determinar que técnica de inyección optimizaba mejor la respuesta del detector, y como consecuencia determinar como eran afectados a los parámetros cromatográficos.

Como se describió previamente con este método no se logro la separación de cuatro pesticidas, aun cuando la resolución para los demás pesticidas fue muy buena, eso significaría que el método de separación ocupado no es el adecuado, por lo que la alternativa sería la de cambio de columna.

Ahora se discutirán los resultados del número de platos teóricos, como se observa en las tablas 3.1,3.2, 3.3 y 3.4 siguen la misma tendencia que se vio en la evaluación de la resolución, ya que al igual que la resolución los mejores valores también se obtuvieron con las dos técnicas **split**, esto en principio nos indica que los picos más estrechos se obtuvieron con estas dos técnicas, contrarios a las técnicas **splitless**; en consecuencia de esto podríamos atribuir lo siguiente, que los tres pesticidas que no habían sido detectados con las cuatro técnicas, se debió claramente a la cantidad de muestra que se introdujo en la columna. Por esta variable no pudieron ser detectados; ya que no solo se deben generar picos estrechos, sino que también debe haber suficiente cantidad de analitos para generar los picos. A partir de esto se pudo establecer que a medida que aumenta la cantidad de muestra que se introduce en la columna será necesario mayor

tiempo de interacción con la fase estacionaria, por lo que eluirán en un tiempo mayor, y los picos serán cada vez mas anchos; como sucedió con los resultados con las técnicas splitless.

En tanto los valores de altura equivalente a un plato teórico muestran que al igual que la resolución y el número de platos teóricos, los mejores resultados fueron los obtenidos con la dos técnicas split, en comparación con las técnicas splitless. Ya que este valor es inversamente proporcional a N , y de acuerdo a esto el resultado sería lo que se esperaba de este parámetro.

A partir de los resultados expuestos se concluye que el factor de capacidad (k') y la selectividad (α) son constantes expresadas en función de los tiempos de retención únicamente, por lo que no nos dicen cual verdadera posición que guarda un pico respecto a otro. No así, los parámetros cromatograficos (R_s y N), he indirectamente H , las cuales son constantes que se expresan también en función del tiempo de retención, pero también lo hacen por la anchura de los picos, siendo esta anchura de los picos el parámetro mas relacionado con la detección de los pesticidas, lo cual se discute también en esta evaluación.

Por lo tanto, los parámetros cromatograficos evaluados en función de las técnicas de inyección dejan dos conclusiones a la vista, la primera es que se confirma que la permanencia de los solutos en la fase estacionaria solo depende de lo que ocurre en la columna (k' y α). Y la segunda, es que la cantidad de muestra que entra en la columna si afectaría la evaluación de los parámetros cromatograficos (N , H y R_s).

La segunda parte de esta evaluación consistió en hacer el análisis a los cromatogramas. Como se describió durante la evaluación de los parámetros cromatograficos, no se pudieron realizar los cálculos con tres pesticidas, ya que no fueron detectados siempre; por lo que una de la conclusiones de esta evaluación, es que no solo haciendo la evaluación de los parámetros cromatograficos se puede establecer que técnica de inyección es la mas adecuada. En principio hay que considerar la forma de operar de la técnica Split, en la hay muy poca introducción de muestra, hay discriminación de los compuestos mas ligeros y una concentración de los compuestos mas pesados, cosa contraria a lo que ocurre con la técnica splitless en la que se puede asumir que toda la muestra entra en el sistema, ya que no hay reparto de la muestra al inyectarlo, por lo tanto resultara en cromatogramas distintos. También al aumentar la presión en la cabeza de la columna en ambas técnicas podremos producir que aumente la cantidad de muestra

que ingrese a la columna, por lo que también deberá considerarse la capacidad del detector para generar señales en función de las técnicas de inyección, que fue lo siguiente que se discutió.

Las características que determinan la cantidad mínima detectable (c.m.d.) de un componente; son la sensibilidad y el ruido del dispositivo de detección, la c.m.d esta definida como aquella cantidad de analito lo suficientemente grande para generar una señal tres veces mayor que su nivel de ruido. Un parámetro que se utiliza para evaluar la señal y el ruido de un cromatograma es descrito por una constante denominada relación señal-ruido, sin embargo este cálculo no era necesario debido a que las diferencias eran significativas en todas las técnicas. Por lo que únicamente se realizo un análisis sobre los cromatogramas. Los siguientes cuatro cromatogramas muestran los resultados que se obtuvieron de las inyecciones con las cuatro técnicas de inyección.

Split.

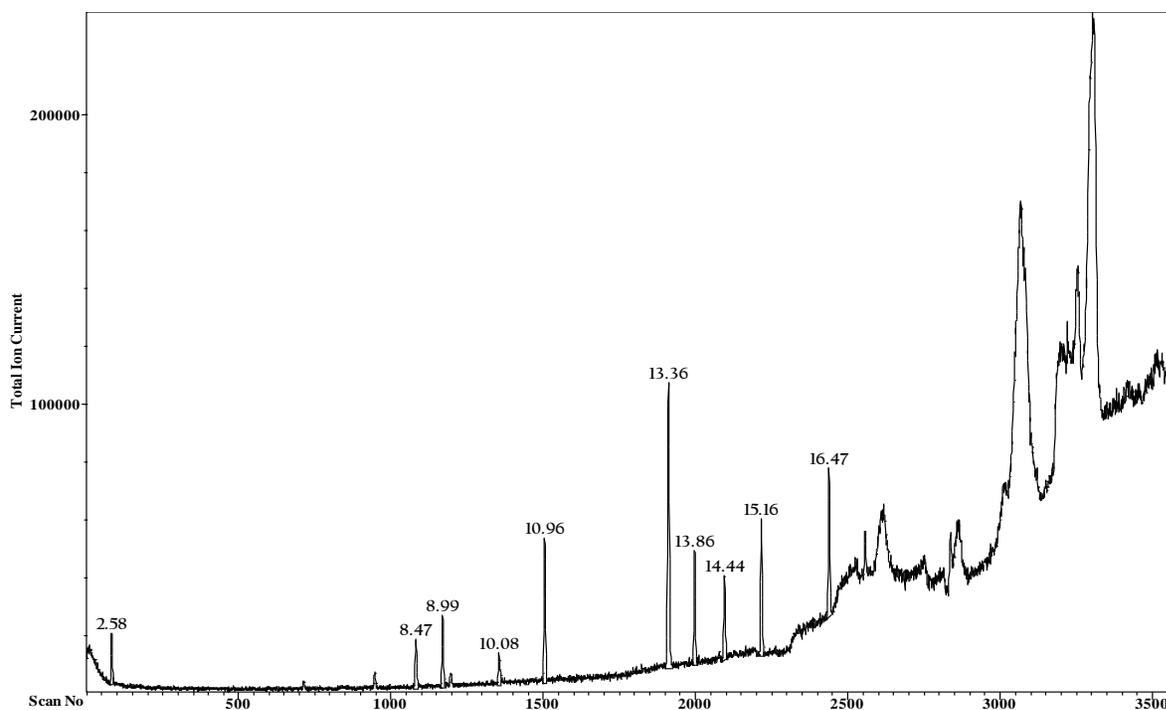


Figura. 3.1 Pesticidas Inyección. Split, Split ratio 30:1 Vol 1 μ L

Split pulsado.

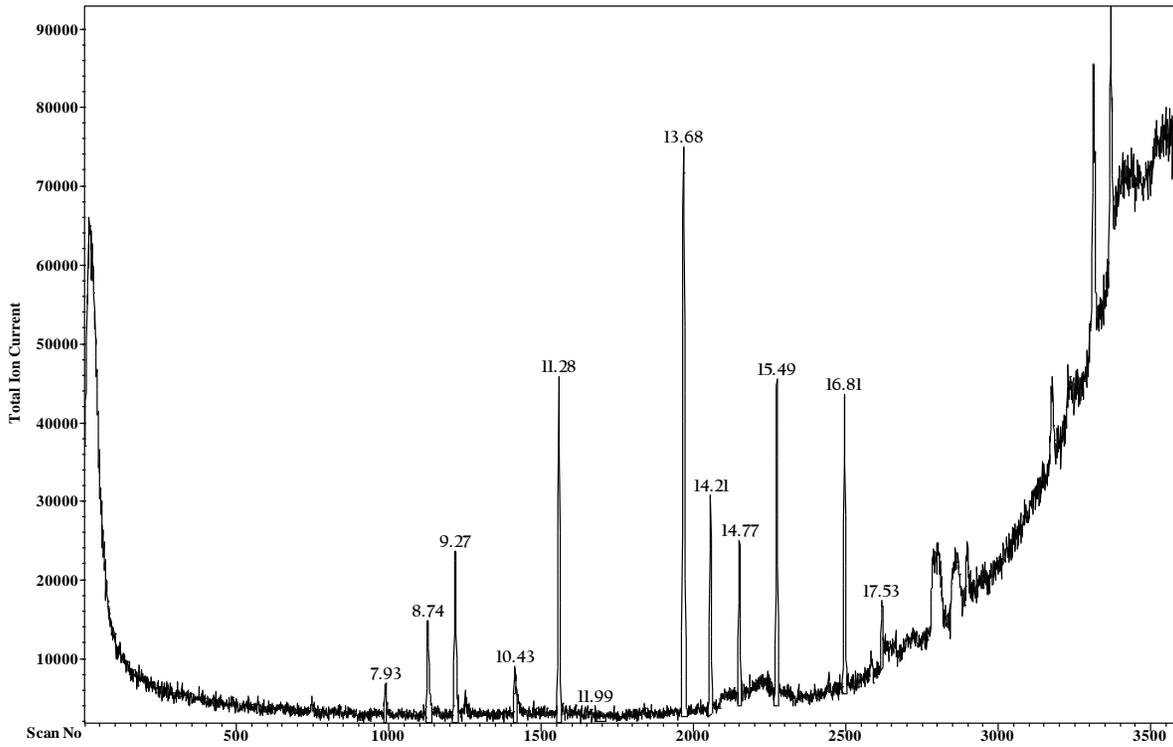


Figura 3.2 Pesticidas Iny. Split pulsado 40psi, Split ratio 30:1 Vol. 1 μ L t. pulso 0.5min

Splitless

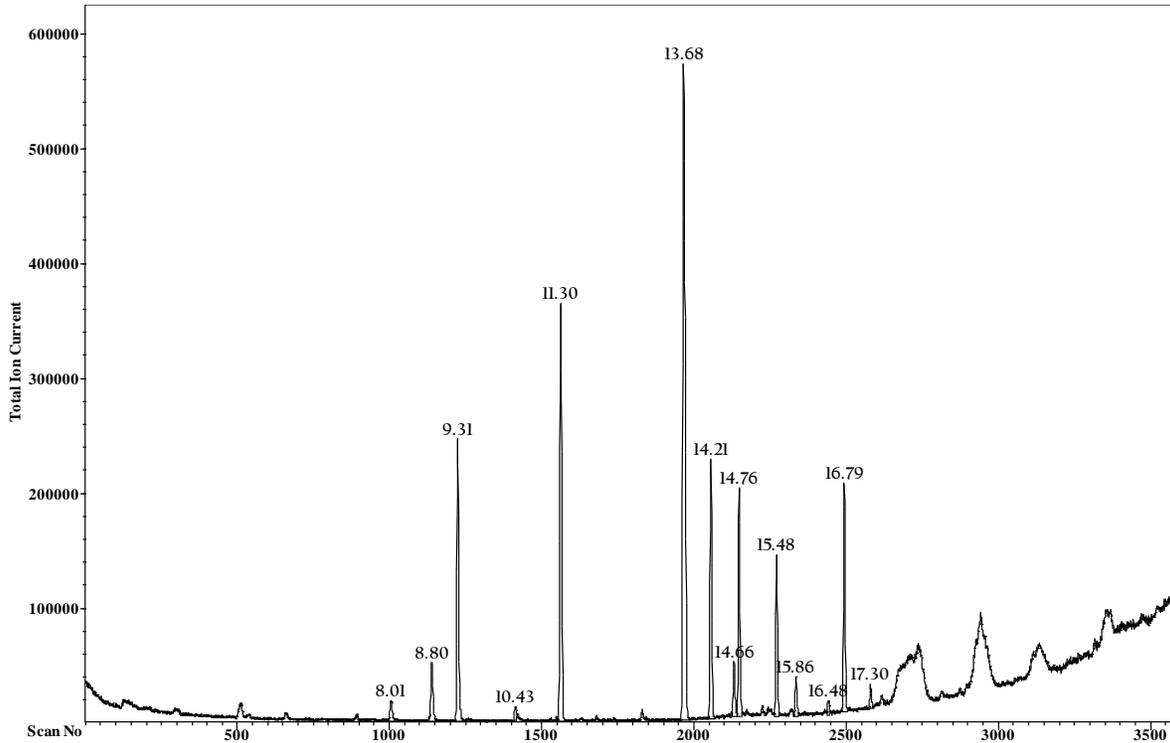


figura 3.3 Pesticidas. Iny. Splitless 0.5min vol. 1 μ

Splitless pulsado.

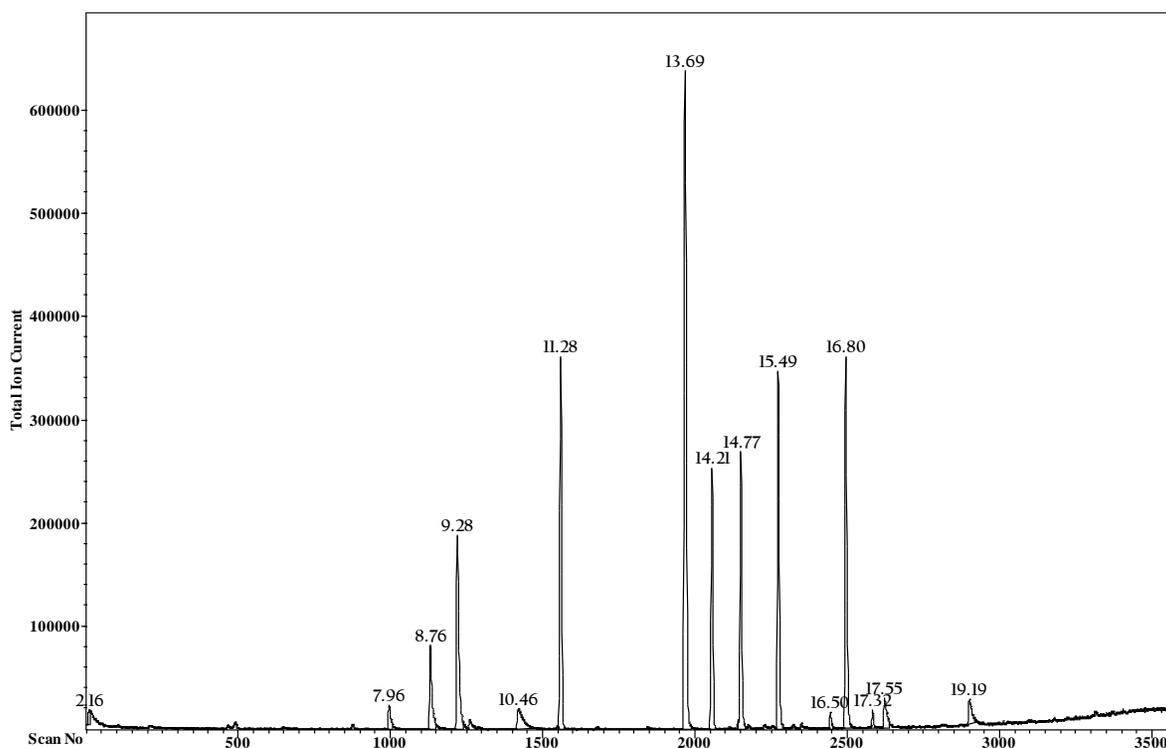


Figura 3.4 Splitless pulsado 40psi 0.5min vol. 1 μ L

Como se observa en los cromatogramas (fig. 3.1, 3.2, 3.3 y 3.4) y en las tablas correspondientes, los resultados fueron variables en cada inyección y las respuestas de los pesticidas también fueron distintas, esto lo provocan principalmente dos variables: la primera sería debido a la cantidad de muestra que se introduce en la columna, lo cual tiene que ver directamente con la técnica de inyección; como anteriormente se dijo, para la concentración de 10ppm al aumentar la cantidad de muestra que ingresa al cromatografo, aumentamos la sensibilidad del detector; y la segunda causa que lo produciría serian los factores de respuesta que posee cada pesticida, sin embargo sobre este factor no tenemos control, ya que se debe a la interacción de los solutos con la columna, y en consecuencia, las respuestas de los pesticidas no serían similares aun cuando los analitos tuvieran la misma concentración.

Estas dos variables darán a los cromatogramas el aspecto final que observamos regularmente; tal como se observo era muy claro en los gráficos que obtuvimos, por lo tanto podemos atribuir a la primera causa el aspecto general del cromatograma y a la segunda, la respuesta que tiene cada pesticida, ambas fueron determinantes para seleccionar la técnica de inyección.

Como puede observarse en las tablas 3.1, 3.2, 3.3 y 3.4 no se detectaron cuatro picos, el DDVP al inicio del análisis en las técnicas split pulsado, splitless y splitless pulsado, y el: Zolone, Gution y Co-Ral al final del análisis en las técnicas split, split pulsado y splitless. Inicialmente se discutirá que produjo que el DDVP no se registrara en todas estas técnicas, la causa principal se atribuiría a la temperatura, ya que desde el principio era ya muy alta, además al tener un factor de capacidad y tener un factor de respuesta pequeños, produjeron que el pesticida al eluir ya no estuviera en la columna o ya no fuera detectable en el momento en que encendió el detector, lo que finalmente produjo que no fuera detectado este pico.

En el caso de Zolone, Gution y Co-ral los cuales no fueron detectados al final de los cromatogramas fue por causa de ambas variables. Sin embargo, antes se debe mencionar una variable que se origina por las condiciones de operación del equipo y que por lo tanto es posible controlar, y que al final quedaría como una variable clave para seleccionar la técnica; se debió al nivel de ruido que se presentaron los cromatogramas, el cual fue muy grande con las técnicas split en comparación que el se observa con las técnicas splitless, como puede observarse en los cromatogramas la línea base en las técnicas split, split pulsado y splitless y he incluso también en la técnica splitless pulsado, no se mantenía horizontal durante todo el análisis, esta se desplazaba hacia abajo al inicio del análisis y hacia arriba al final del análisis, sin embargo este comportamiento era más notable en ambas técnicas split, contrario a lo observado con las técnicas splitless; pero antes concluir mencionare una cosa más que pudo observarse en los cromatogramas, el desplazamiento de la línea base fue el mismo en las cuatro técnicas de inyección, lo único que los diferencio era que en las técnicas Split, la señales producidas por los pesticidas eran significativamente mas chicas que las que se obtuvieron con las técnicas splitless; ya eran de seis a ocho veces mas chicas, por lo tanto el ruido se incrementaría notablemente con las técnicas Split, ya que para esa cantidad de muestra solo así pudo detectarlo el espectrómetro masas. Lo que a la postre esto no nos permitiría detectar a concentraciones aun mas bajas.

Al contar con esto datos se puede establecer porque no se detectaron los últimos tres pesticidas y no solamente considerar al ruido para descartar esas técnicas, como puede observarse en el cromatógrama splitless pulsado (*fig 3.4*), los tres pesticidas que no se detectaron en las otras técnicas si se detectaron con esta técnica, pero estos picos eran pequeños, por lo tanto las dos variables que describimos anteriormente tendrán un efecto notable en este resultado, esto nos conduciría a establecer que estos tres pesticidas (Zolone, Gución y Co-Ral) al tener un factor de

respuesta muy pequeño en esta columna, comparándolos con los otros pesticidas, era previsible esperar que las señales obtenidas con las técnicas split, las cuales eran de siete a ocho veces mas pequeñas que la obtenidas con las técnicas splitless, estos pesticidas no fueran detectados, ya que al igual que con estos tres pesticidas, las señales de los otros pesticidas que tienen factores de respuesta mejores también son mas pequeñas que sus pares en las técnicas Splitless, ya que de hecho con el procedimiento Split, la muestra prácticamente se perdió mas del noventa y cinco por ciento, por lo tanto solo los componentes mas pesados se concentrarían mas y los mas ligeros se perderían.

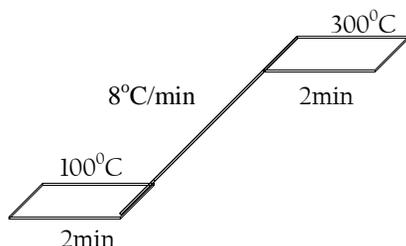
Antes de finalizar este análisis se debe describir a que se debe el desplazamiento de la línea base, el cual ocurrió en los cuatro cromatogramas, la principal hipótesis sería que esto se debe a la descomposición de la columna; sin embargo esto no es cierto del todo en este caso, porque este desplazamiento suele deberse a un proceso físico que ocurre en los gases a temperaturas altas y que se magnifican aun más cuando más alta es la temperatura, ya que un gas al encontrarse dentro de un capilar, en estas condiciones de calor extremo a medida que aumenta la temperatura, aumenta la viscosidad del gas portador, esto provoca un aumento en la presión en el capilar, lo cual hace que el gas circule a través de el cada vez mas lento, por lo que cambiara la velocidad lineal del gas; este fenómeno se observara en los cromatogramas, como el desplazamiento en la línea base, tal como se observo. Por lo tanto sabiendo que este desplazamiento siempre iba ocurrir, tuvimos que considerarlo como una variable importante al seleccionar la mejor técnica de inyección.

También se discutirá brevemente lo que sucedió con la técnica splitless con los tres últimos pesticidas, los cuales tampoco fueron detectados, como se observa en el cromatógrama Splitless (fig 3.3), y al igual que también se presento en las otras dos técnicas Split. Esto se debió a la elución de compuestos que no estaban presentes en la solución, que son por lo regular compuestos que no eluyeron en inyecciones anteriores, porque probablemente en inyecciones previas no se alcanzaba la temperatura en la que realizamos estas nuevas inyecciones, por lo que probablemente permanecieron en la columna hasta que nuevamente se volvió a subir la temperatura del horno hasta donde estos compuestos podían salir de la columna, por lo tanto son componentes desconocidos, estos picos se denominan picos fantasma, lo cual ocurrió con esa técnica.

Finalmente al complementar los dos estudios se selecciono la técnica mas adecuada, y se pudo definir cual fue la característica que definió a la técnica que elegimos, la técnica que se eligió fue la que género los picos de mayor tamaño, esto es un índice claro de la cantidad de muestra que ingreso a la columna; que como puede observarse en los cromatogramas de ambas técnicas Splitless cumplieron por mucho con esta característica. Por lo tanto la conclusión es que ambas técnicas splitless son adecuadas para nuestros propósitos. Sin embargo en términos del ruido equivalente en estas dos técnicas fue mejor con la técnica splitless pulsado, porque es mas bajo el nivel de ruido que con la técnica splitles.

3.1.1.2 Establecimiento del programa de temperatura.

Como fue descrito en la etapa anterior el primer programa de temperatura que se utilizo no era el correcto, esto causo que DDVP no fuera detectado inicialmente; por lo tanto esta primera modificación pretendía que el siguiente programa el DDVP fuera detectado. Por lo que solo se modifiko la rampa de temperatura, ampliándola más; esta quedo de la siguiente manera:

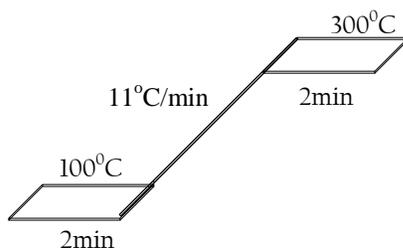


Antes de continuar habría que definir lo siguiente, lo que habría sido antes en relación a la separación de los pesticidas en el CG, ha dejado de ser fundamental pero no importante, ya que esto solo puede ocurrir cuando el CG esta equipado con un detector selectivo, lo que nos proporcionaría un equipo de espectrometría de Masas, ya que es posible hacer la determinación de los analitos con ambos métodos de detección que este posee; SIM, seleccionando el ion (m/z) mas abundante, y con el método SCAN analizando la corriente total de iones.

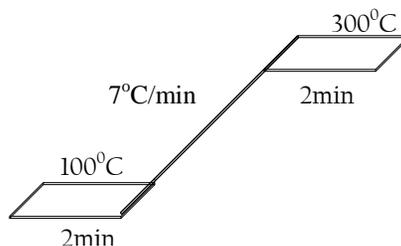
Por lo que ya no era indispensable hacer el análisis de los compuestos que coeluan o que salían muy cerca, por lo que no se volvió a realizar el cálculo de resolución en la solución multi-componentes de los pesticidas que coeluyeron; y solo se agregaron las rampas de temperatura que optimizaron mejor la separación de los pesticidas.

Sin embargo inicialmente por esta causa, de la solución madre uno fueron eliminados dos compuestos: Gution y DDE, al coeluir con zolone y Dieldrin respectivamente; ahora al describir esto el resultado sería no relevante, y la decisión que se debió tomar en ese momento era conservarlos, sin embargo estos fueron reemplazados, he inmediatamente después se adicionaron dos pesticidas clorados para sustituirlos: Endosulfan y Heptacloro, el primero aun es permitido por la ley y el segundo, que ya no lo es; por lo que debimos incluirlos a estos y conservar los otros; porque aun los clorados tienen importancia toxicológica debido a su persistencia en el ambiente.

Al agregar estos dos compuestos se presento la coelución del Heptacloro con el Metil paratión, por lo que no olvidando la importancia de hacer todo lo posible por optimizar la resolución de los pesticidas se realizaron modificaciones al programa de temperatura; finalmente con la que se lograría la separación de los catorce pesticidas, el surrogado y el estándar interno, fue con la siguiente rampa de temperatura:



Posteriormente en la segunda etapa, al agregar seis pesticidas mas, volvería a complicarse la separación, ya que fueron seis compuestos los que coeluyeron: Metil paration con Heptacloro, Paration con el Estándar interno y Mirex con Zolone; por lo tanto en busca de las mejores condiciones de separación fue necesario optimizar nuevamente la rampa de temperatura, de estas optimizaciones se obtuvo el siguiente programa de temperatura:



Esta rampa fue la que finalmente se selecciono ya que fue la que mejores resultados tuvo, sin embargo, esta rampa solo se pudo optimizar en cierto grado la separación del estándar interno y el paratión, en tanto, la coelución del Metil paration y heptacloro no se mejora y en el caso de zolone con mirex solo se mejoro un poco; este era un punto donde habríamos tenido que cambiar

la columna irremediablemente, ya que operando el EM en su forma SCAN no podríamos resolver estas coeluciones; sin embargo, fue también el punto donde la importancia del método de detección por SIM fue decisivo, ya que la determinación de los analitos se podía realizar sobre los picos que coeluián, porque el registro de cada uno de los analitos se realiza por canal iónico diferente, y donde cada uno estos canales corresponde solo un compuesto. Esto fue lo que finalmente evito que fuera cambiada la columna.

Una modificación mas efectuada a los métodos de separación establecidos que resulto obligada para el análisis de las fresas, se debió a la composición química de la fresa, sin embargo esto no implicaría una variación en el proceso de separación de los pesticidas, ya que esta modificación sería solo después de que los pesticidas eluyeran, a aumentar el tiempo del análisis ocho minutos mas (figura 3.9), ya que solo dos minutos a 300°C no fue suficiente tiempo para que eluyeran todos los componentes extraídos de las fresas; por lo tanto, la columna no quedaba limpia para posteriores inyecciones; el problema no era que no salieran, lo que sucedía era que los componentes que no eluían en la primera inyección, si lo hacían en la segunda; sin embargo estos se descomponían y ya no lo hacían a 300°C, sino a menor temperatura, lo cual provocaba que estos interfirieran en el intervalo de temperatura donde eluían los pesticidas principalmente, porque eluían como picos fantasma, por lo tanto afectaban la detección de los pesticidas en muestras fortificadas y no fortificadas.

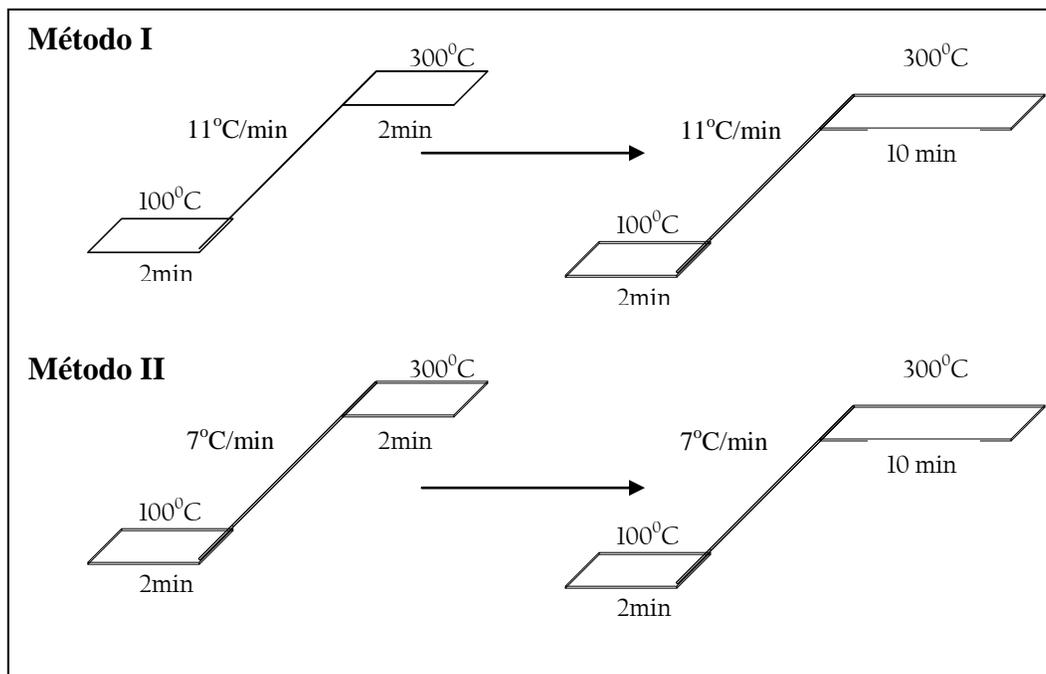


Figura 3.5. Cambio de las rampas de temperatura para el análisis de las muestras (fresas).

3.1.1.3 Optimización del espectrómetro de masas

Las condiciones de análisis que optimizaron el funcionamiento del espectrómetro de masas y el cromatografo gases y en la que se obtuvo la mejor resolución de los componentes durante la implementación del método en la primera etapa con 14 pesticidas se describen en la tabla (3.5) y en la figura (3.6) con el método SCAN y en la figura (3.7) con el método SIM.

SCAN *Tabla 3.5. Condiciones de Operación del CG/EM SCAN y SIM, etapa I.*

<i>Cromatógrafo de gases (6890).</i>	
Columna Capilar	(WCOT) HP5. 5% fenil metil siloxano 25m (L) x 0.32mm di. X0.52µm de espesor de fase estacionaria.
Gas portador	Helio 1.7ml/min.
Temperatura del inyector	275 °C
Técnica de inyección	Splitless pulsado 40psi 0.5min.
Volumen inyectado	1µL
<i>Espectrómetro de masas (5973).</i>	
Tipo de ionización	Impacto electrónico
Analizador	Cuadrupolo
Fuente de impacto electrónico	70eV
Barrido masico m/z	33-550uma
Tiempo de encendido (solvent delay)	2.5min

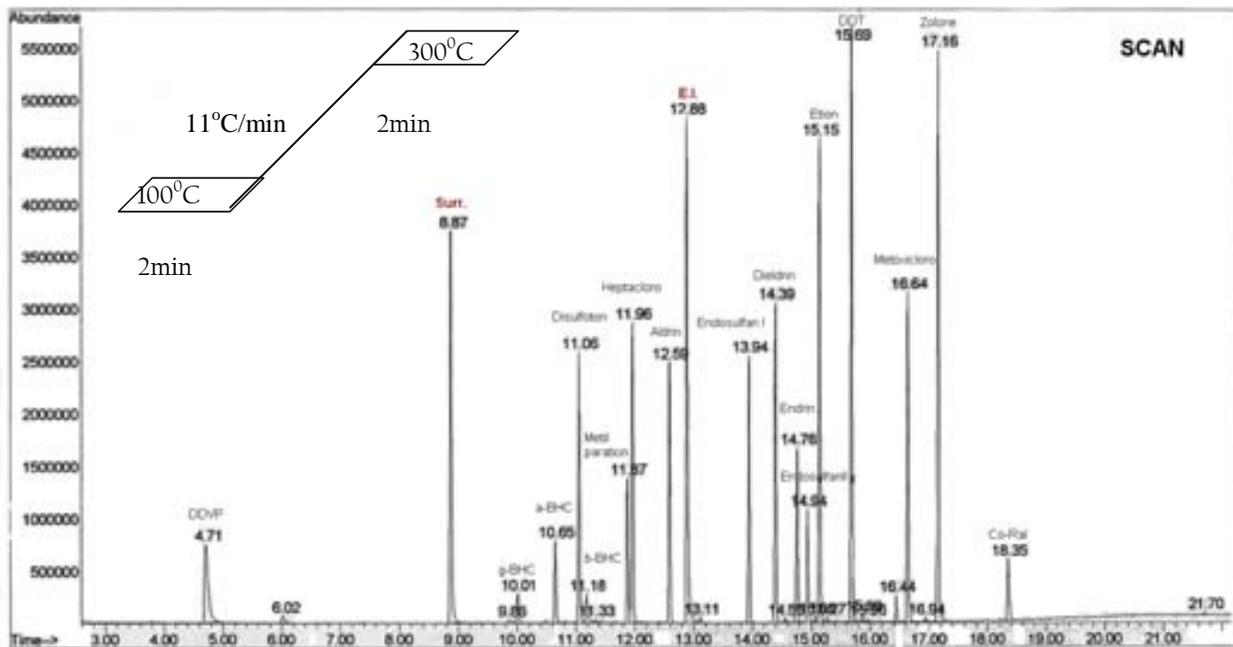


Figura 3.6 Cromatograma que ilustra un análisis SCAN con las condiciones optimizadas y la rampa de temperatura mostrada sobre el cromatograma.

Nota: Los espectros de masas correspondientes a cada elemento de la mezcla se encuentran en el anexo III, donde se identifican con un asterisco los iones seleccionados para el establecimiento del método SIM.

SIM.

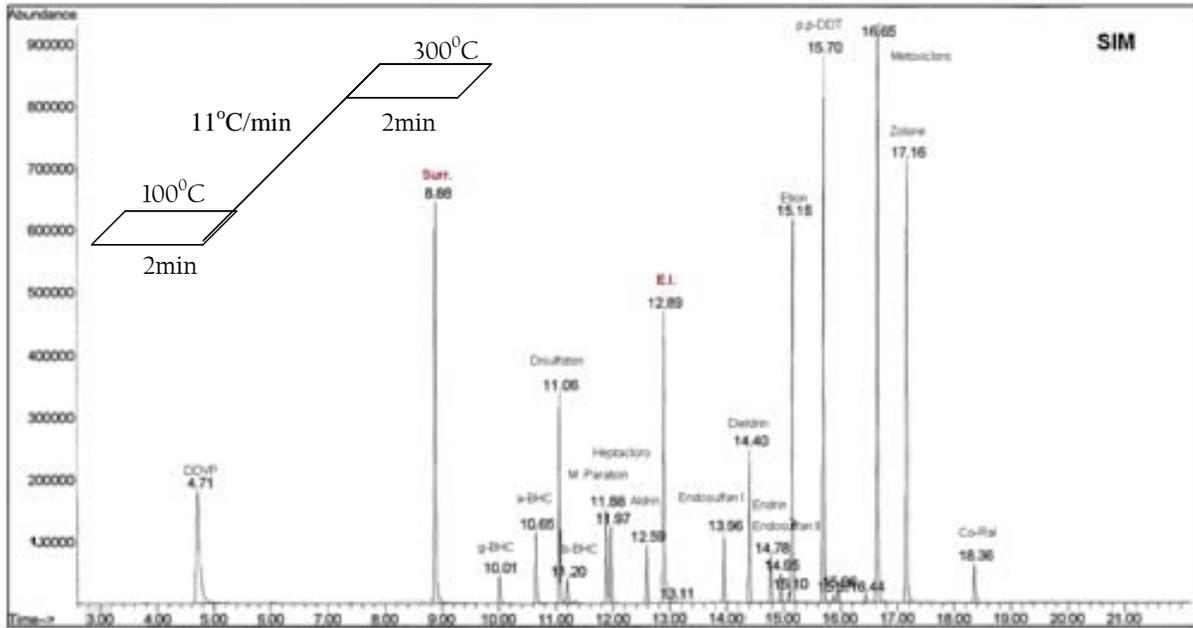


Figura 3.7. Cromatograma que ilustra un análisis SIM con las condiciones optimizadas y la rampa de temperatura mostrada sobre el cromatograma.

Las condiciones de análisis que optimizaron el funcionamiento del espectrómetro de masas y el cromatografo gases en la que se obtuvo la mejor resolución de los componentes durante la implementación del método en la segunda etapa con 20 pesticidas se describen en la tabla (3.6) y en las figuras (3.8) con el método SCAN y en la figura (3.9) con el método SIM.

SCAN. Tabla 3.6. Condiciones de Operación del CG/EM SCAN y SIM Etapa II.

<i>Cromatógrafo de gases (6890)</i>	
Columna Capilar	(WCOT) HP5. 5% fenil metil siloxano 25m (L) x 0.32mm di. X 0.52µm de espesor de fase estacionaria.
Gas portador	Helio 1.7ml/min.
Temperatura del inyector	275 °C
Técnica de inyección	Splitless pulsado 40psi 0.5min.
Volumen inyectado	1µL
<i>Espectrómetro de masas (5973)</i>	
Tipo de ionización	Impacto electrónico
Analizador	Cuadrupolo
Fuente de impacto electrónico	70eV

Barrido masico m/z	33-550uma
Tiempo de encendido (solvent delay)	2.5min

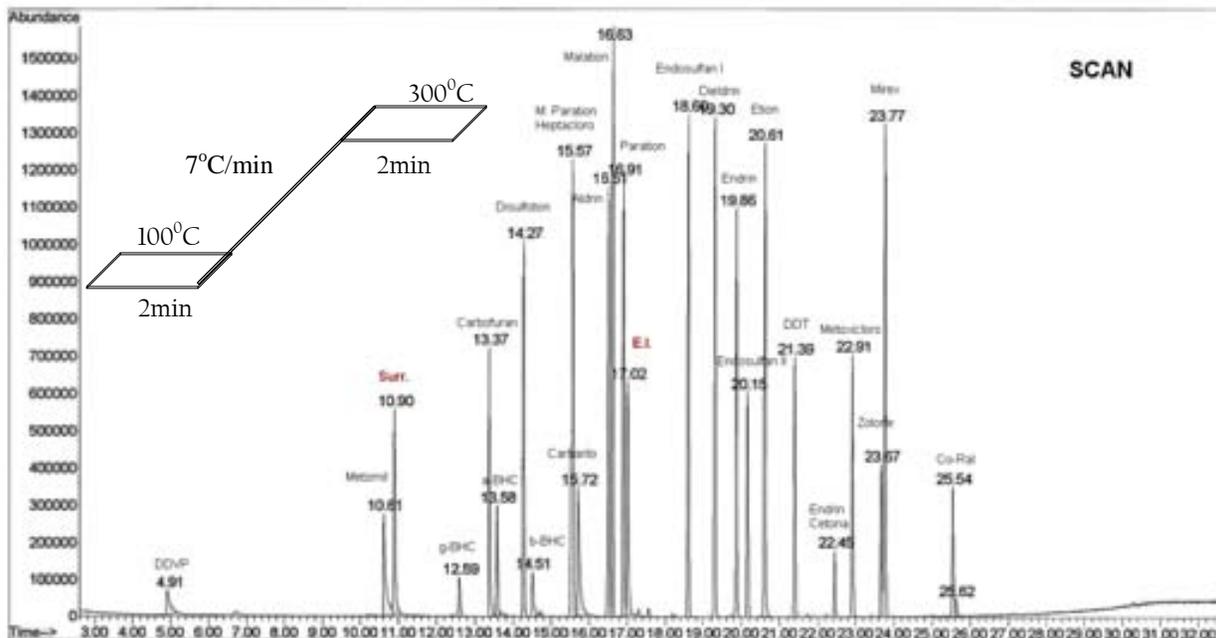


Figura 3.8. Cromatograma que ilustra un análisis SCAN con las condiciones optimizadas y la rampa de temperatura mostrada sobre el cromatograma.

Nota: Los espectros de masas correspondientes a cada elemento de la mezcla se encuentran en el anexo III, donde se identificaron con un asterisco los iones seleccionados para el establecimiento del método SIM.

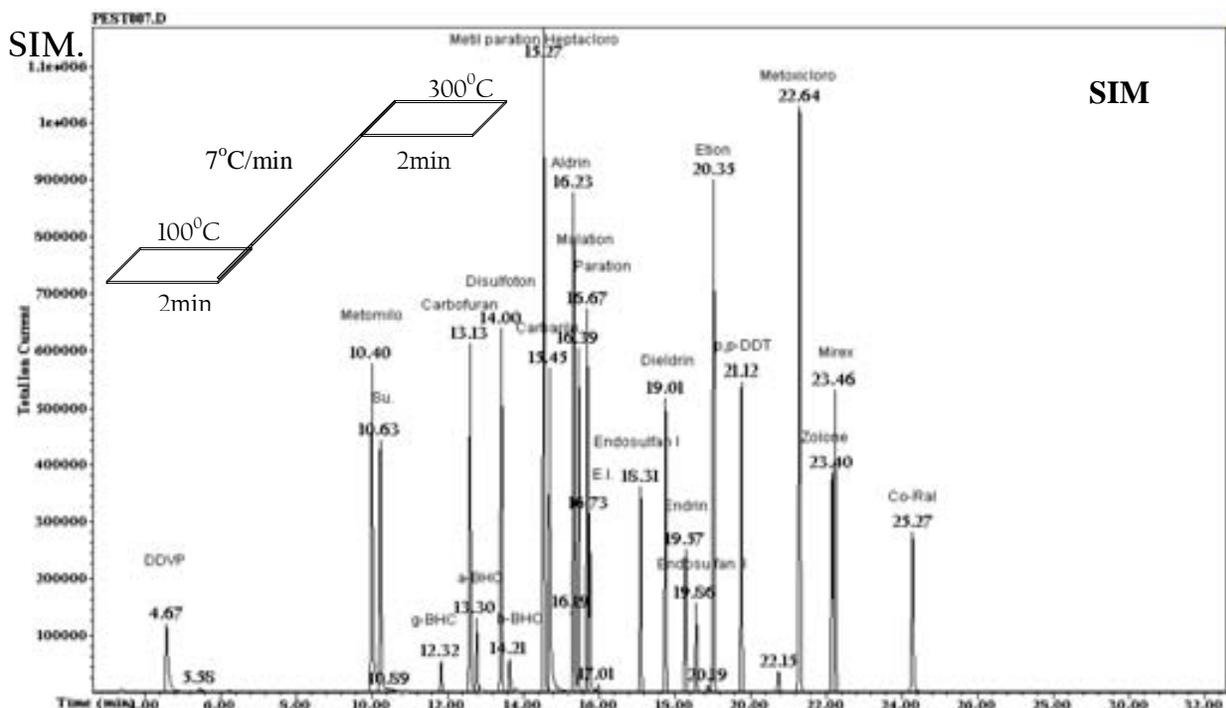


Figura 3.9. Cromatograma que ilustra un análisis SIM con las condiciones optimizadas y la rampa de temperatura mostrada sobre el cromatograma.

El establecimiento de la segunda etapa del proyecto obedeció a que en muestras analizadas hasta ese momento se encontraron pesticidas que no habían sido considerados, como el Malation, el cual se encontró en varias ocasiones, por lo tanto añadirían este y otros cinco pesticidas más: el Carbofuran, Carbarilo, Metomilo, Paration y Mirex; de estos seis pesticidas cuatro están permitidos para el cultivo de la fresa, solo el Paration y el Mirex, con la inclusión de estos pesticidas se completo la lista de pesticidas.

3.1.2 Límites de detección y cuantificación Instrumental.

Las curvas de calibración que se obtuvieron al finalizar las inyecciones que correspondían a las soluciones para la determinación el límite de detección y cuantificación instrumental en las condiciones óptimas descritas en la tabla 3.6 son las siguientes. Las disoluciones estándar de pesticidas tenían concentraciones aproximadas de 2, 5, 10 y 15 ppm. Con el modo SCAN de es obtuvieron las siguientes curvas:

SCAN:

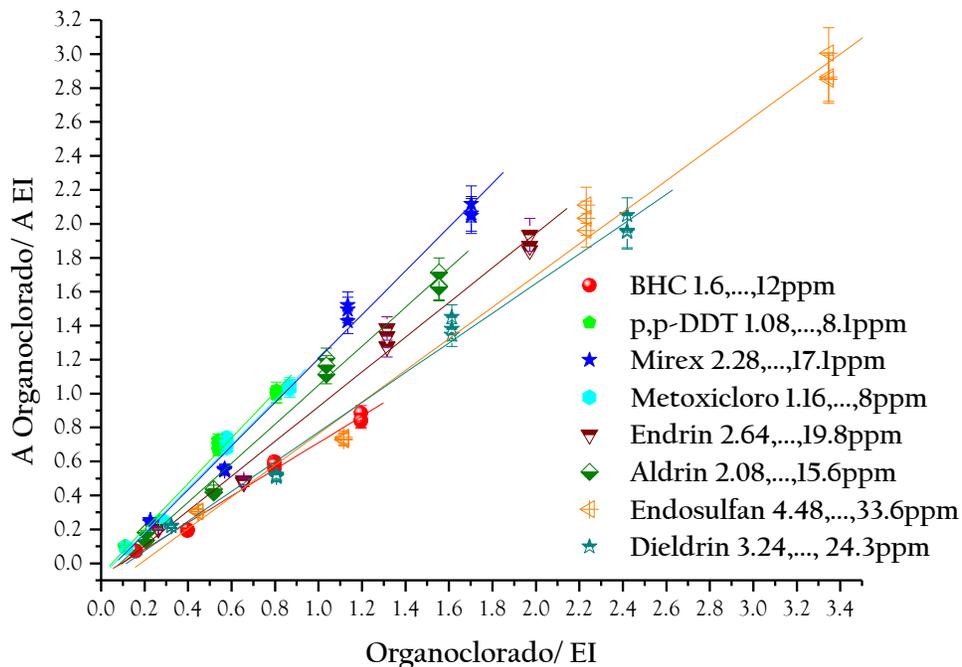


Figura 3.9. Curvas de calibración multicomponeente de pesticidas organoclorados para determinar LD y LC instrumental en SCAN.

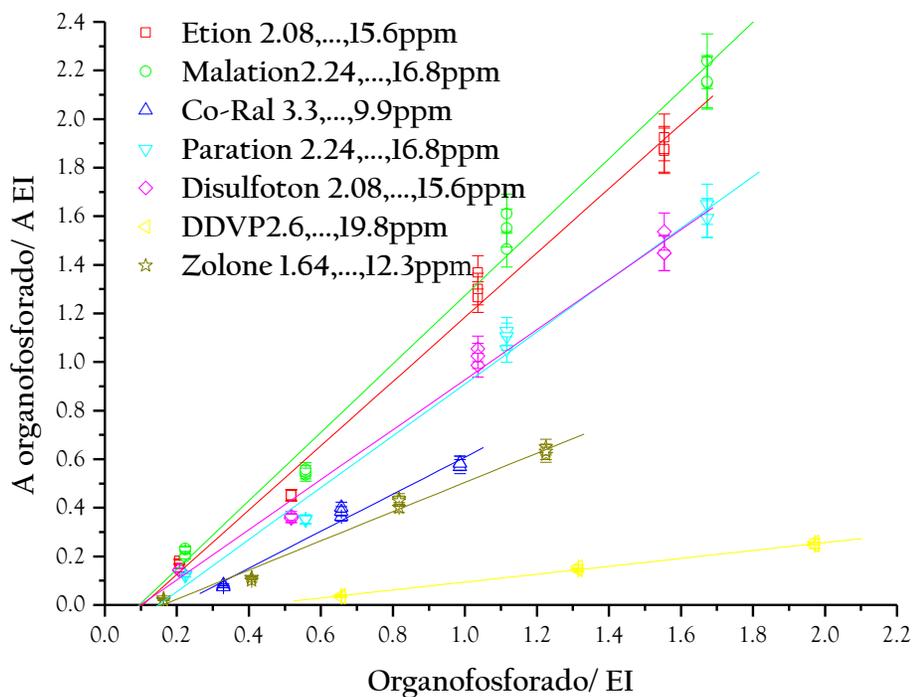


Figura 3.10. Curvas de calibración multicomponente de pesticidas organofosforados para determinar LD y LC instrumental en SCAN.

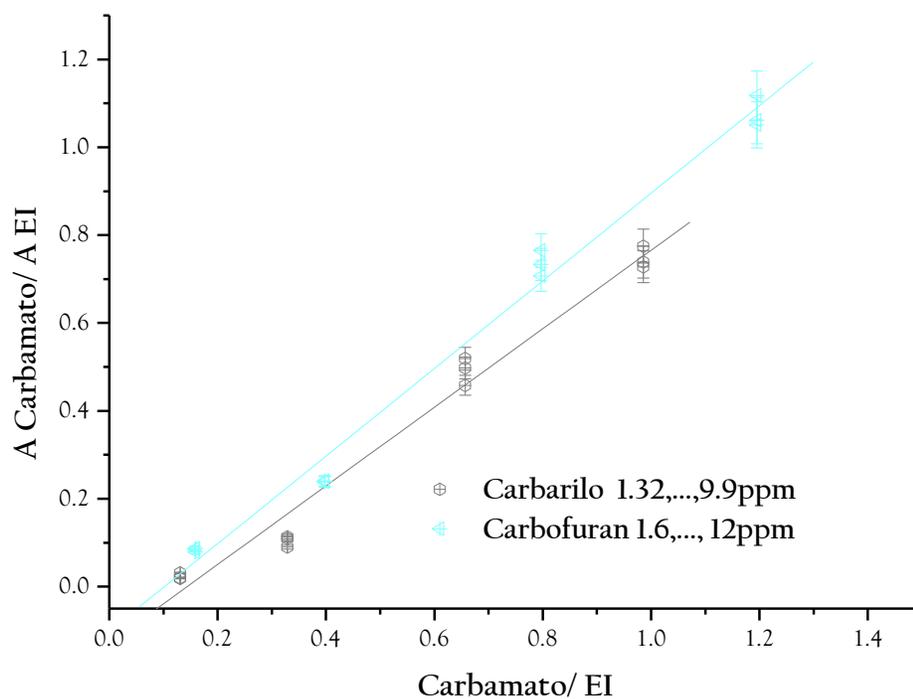


Figura 3.11. Curvas de calibración multicomponente de pesticidas tipo carbamató para determinar LD y LC instrumental en SCAN.

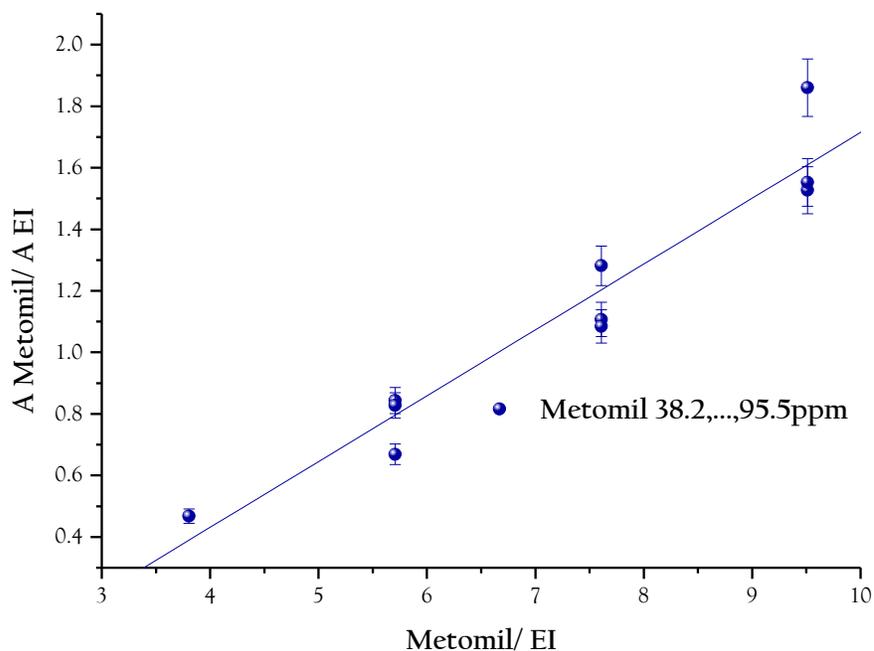


Figura 3.12 Curva de calibración para Metomil para determinar LD y LC instrumental en SCAN.

Todos los valores de regresión y las curvas de calibración se encuentran en el Anexo II parte I. Al analizar estas curvas se puede observar que cada elemento tiene un factor de respuesta distinto por lo que de manera simple podemos deducir que los LD y LC serán distintos para cada uno de los pesticidas. Los límites de detección y cuantificación Instrumental SCAN que se obtuvieron con el modo de detección SCAN fueron los siguientes:

Tabla 3.9. Límites de Detección y Cuantificación Instrumentales SCAN.

Pesticida	L. D.(ppm)	L.C.(ppm)
DDVP	1.39	3.19
Metomilo	15.75	30.30
Carbofuran	1.78	3.51
BHC	1.56	3.07
Disulfoton	1.94	3.82
Carbarilo	2.18	4.27
Aldrin	1.99	3.92
Malation	2.56	5.05
Paration	2.26	4.41
Endosulfan	3.40	6.71
Dieldrin	2.54	5.02
Endrin	2.38	4.69
Etion	2.09	4.12
DDT	1.89	3.68
Metoxicloro	1.72	3.38

Zolone	1.69	3.33
Mirex	2.23	4.39
Co-Ral	2.68	5.07

Los resultados en primera instancia mostrarían que algunos de estos valores se encontrarían por arriba de los límites máximos residuales (LMR), y otros apenas debajo de los LMR pero muy cercanos a los mismos valores, sin embargo, estas concentraciones de pesticidas en las muestras ambientales generalmente se llevan a un nivel detectable por el equipo de análisis; Por lo tanto los valores que se presentan son concentraciones presentes en una muestra concentrada 100 veces, y los valores que en realidad correspondería a las concentraciones en las muestras serían las siguientes.

Tabla 3.10. Límites de Detección y Cuantificación Instrumentales SCAN equivalentes en la fresa.

Pesticida	LD (ppm)	LC (ppm)
DDVP	0.014	0.032
Metomilo	0.157	0.303
Carbofuran	0.018	0.035
BHC	0.016	0.031
Disulfoton	0.019	0.038
Carbarilo	0.022	0.043
Aldrin	0.020	0.039
Malation	0.026	0.050
Paration	0.023	0.044
Endosulfan	0.034	0.067
Dieldrin	0.025	0.050
Endrin	0.024	0.047
Etion	0.021	0.041
DDT	0.019	0.037
Metoxicloro	0.017	0.034
Zolone	0.017	0.033
Mirex	0.022	0.044
Co-Ral	0.027	0.051

Los resultados con el método de detección SCAN muestran que los valores de LDI y LCI de los pesticidas se encuentran muy por debajo de los límites máximos residuales (LMR). Por lo tanto tendríamos buenas condiciones de operación que nos permitirían detectarlos a nivel de trazas, sin embargo para cuantificar sería un tanto incierto, ya que las señales de fondo en algunos casos afectaría a las señales de los pesticidas. Pero aun siendo valores muy por debajo los LMR estos pueden optimizados a un mas con el método de detección SIM.

Las curvas de calibración para la determinación del LDI y LCI con el método de detección SIM son las siguientes:

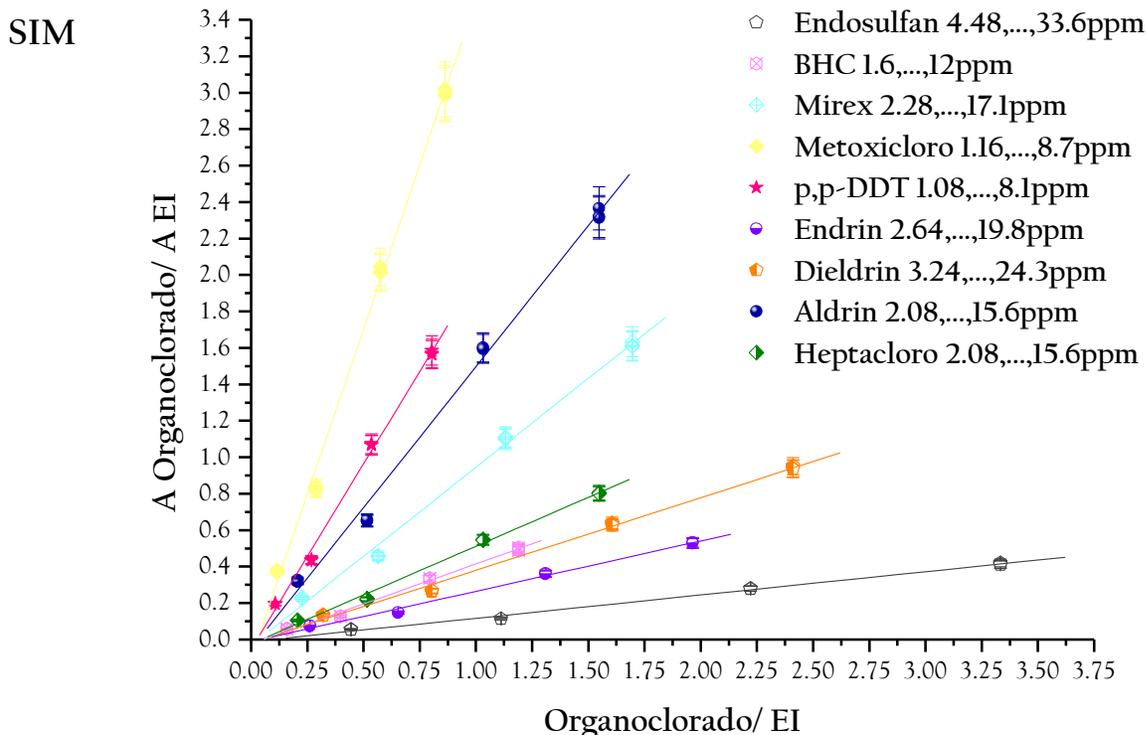


Figura 3.13. Curvas de calibración multicomponente de pesticidas clorados para determinar LD y

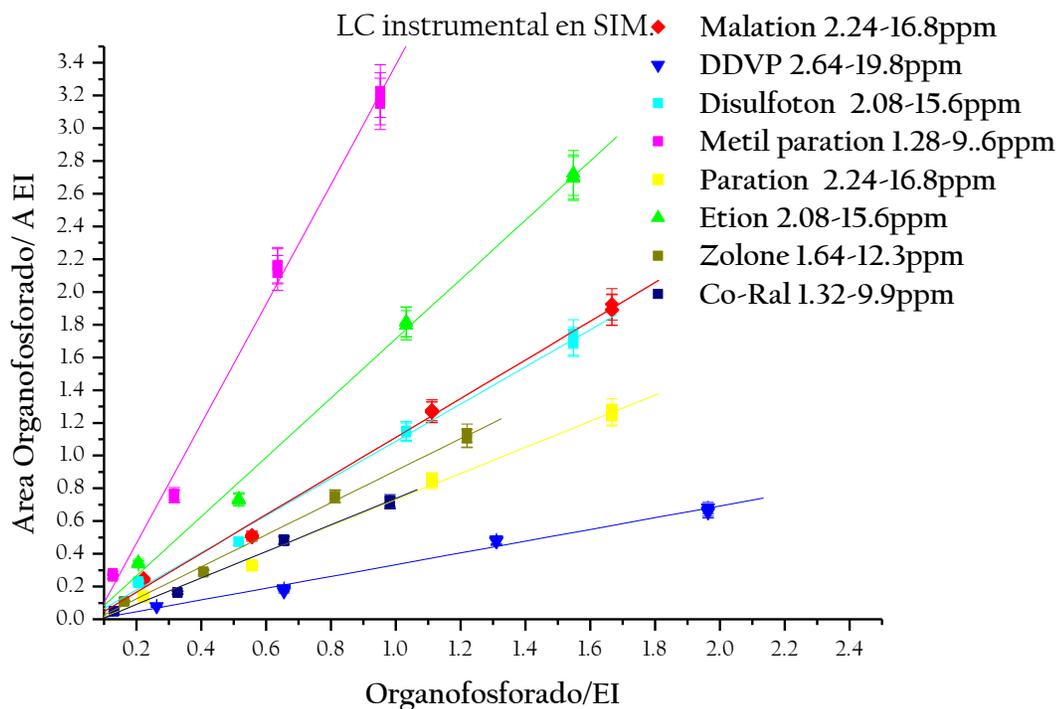


Figura 3.14. Curva de calibración multicomponente de pesticidas fosforados para determinar LD y LC instrumental en SIM.

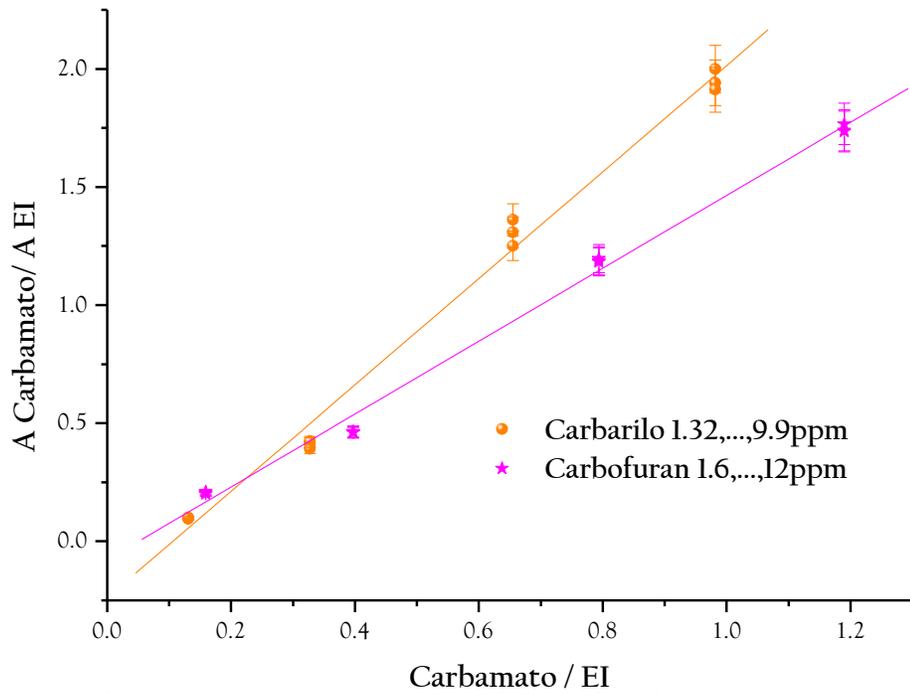


Figura 3.15. Curva de calibración multicomponente de pesticidas carbamatos para determinar LD y LC instrumental en SIM.

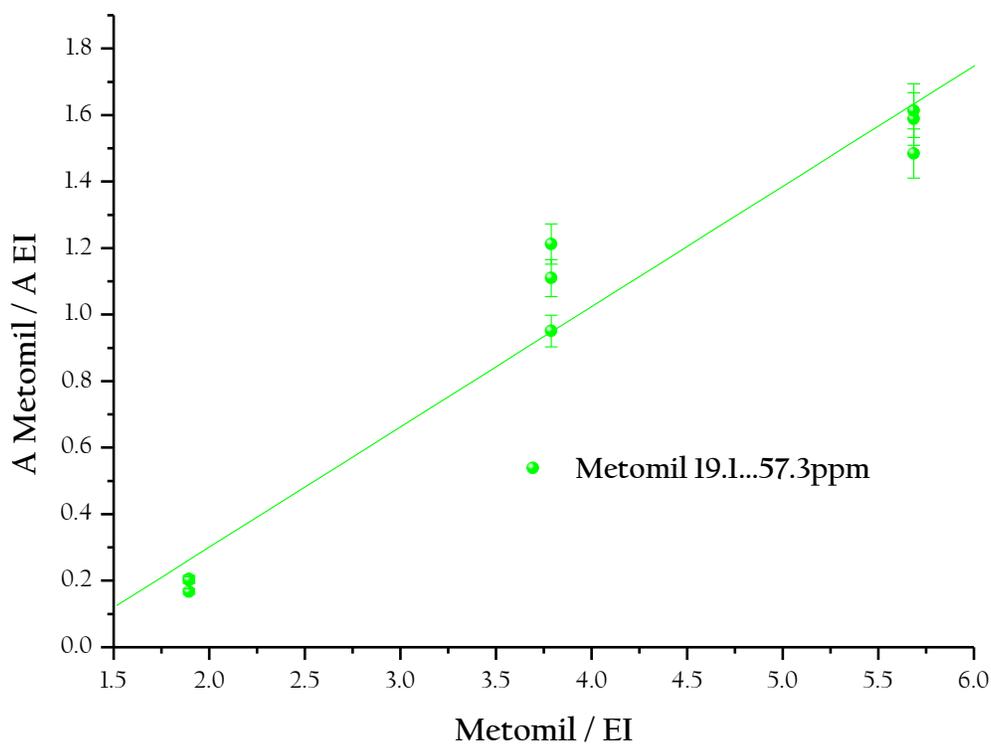


Figura 3.16. Curva de calibración para Metomil para determinar LD y LC instrumental en SIM.

Las concentraciones que tenían las disoluciones para hacer las inyecciones con el método de detección SIM fueron de 2, 5, 10 y 15ppm. Los parámetros de regresión y las curvas de calibración se encuentran en el Anexo II parte 2. Al analizar las curvas de calibración por SIM se observa que los factores de respuesta de los pesticidas es distinta, sin embargo, la de otros pesticidas es similar por lo tanto estos tendrán LD Y LC similares o iguales. A continuación se presentan los límites de detección y de cuantificación por SIM:

Tabla 3.11. Límites de Detección y Cuantificación Instrumentales SIM equivalentes en al fresas.

Pesticida	L. D.(ppm)	L.C.(ppm)
DDVP	0.021	0.042
Metomilo	0.114	0.220
Carbofuran	0.015	0.030
BHC	0.011	0.023
Disulfoton	0.014	0.027
Mparation	0.029	0.055
Carbarilo	0.023	0.045
Heptacloro	0.012	0.025
Malation	0.015	0.030
Aldrin	0.016	0.032
Paration	0.014	0.027
Endosulfan	0.023	0.045
Dioldrin	0.017	0.033
Endrin	0.014	0.029
Etion	0.016	0.031
DDT	0.017	0.033
Metoxicloro	0.024	0.047
Zolone	0.012	0.023
Mirex	0.015	0.029
Co-Ral	0.012	0.024

Estos resultados muestran que los valores de LDI y LCI son mejores con SIM, la sensibilidad del equipo mejora; sin embargo son solo ligeramente menores respecto a los obtenidos con el método SCAN, pero con la clara ventaja de que estos valores por SIM, serán menos afectados por las señales de fondo que no siempre se eliminan en un proceso de preparación de muestras. También puede observarse que con SIM la sensibilidad del método para las tres familias de pesticidas es similar, salvo en el caso de Metomil. Esto permitirá que identifiquemos y cuantifiquemos a los pesticidas por debajo de los LMR, ya que al menos son diez veces más bajo estos valores que el LMR del pesticida más restringido que permite nuestra legislación. De esta manera contaríamos con un instrumento funcional y en el que se obtendrían buenas condiciones de operación.

3.2 Desarrollo del método de preparación de muestras.

3.2.1 Optimización del método de preparación de muestras.

El cambio inmediato del disolvente de partición, el cual era éter de petróleo se debió a que este disolvente es inflamable, es muy volátil, y tiene poca estabilidad, por lo que su almacenamiento sería de cuidado, también se aceleraría el proceso de degradación de la columna, ya que por lo regular este disolvente tiene alta concentración. Otra cosa también este disolvente afectaría una adecuada detección, porque el éter de petróleo es muy difícil obtenerlo puro, ya que por lo regular contiene más de un componente, los cuales a la postre contribuirían con más picos, esto resultaría indeseable si lo que se busca es la eliminación de los componentes interferentes, incluidos los que provienen de los reactivos que se utilizan durante la preparación de la muestra, ya que por las características del detector no sería posible mantenerlo.

El primer extracto se realizó de acuerdo a lo establecido, siguiendo lo más posible el método MOGmod (Diagrama 1, Cap. 2), este extracto tenía dos particularidades, la primera fue con el disolvente de partición, el cual era éter de petróleo y se cambió por Hexano, y la segunda consistía en no realizar la limpieza del extracto; de manera que observaríamos el tipo de componentes que eluirían del extracto; para que partiendo de esto eligiéramos el método de limpieza. El cromatograma del extracto de fresa que se encontraba fortificado y sin limpieza se muestra en la figura 3.17

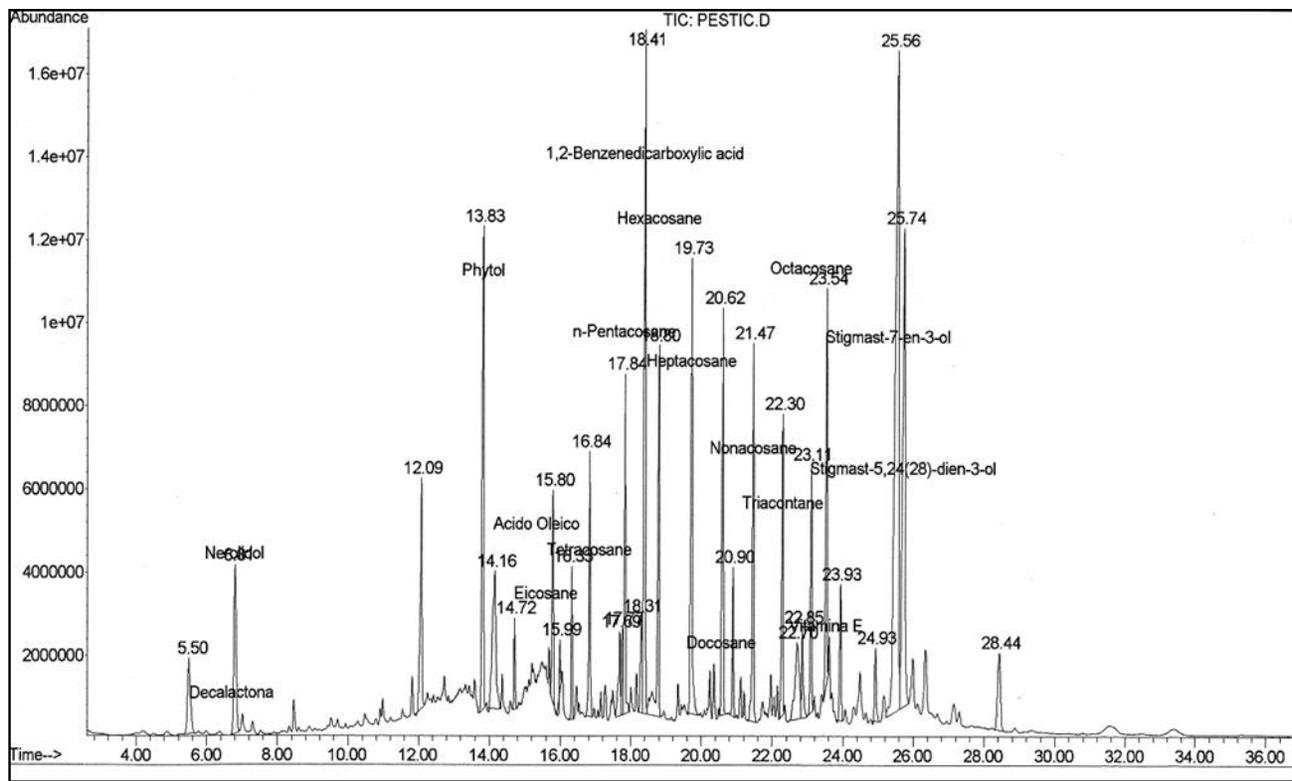


Figura 3.17 Cromatograma del extracto de Hexano de la fresa sin limpieza.

Como puede observarse el cromatograma del extracto de hexano en la fresa es muy complejo, se observa que los pesticidas en el extracto no son los componentes predominantes, además son difícilmente identificables, sino hasta imposibles de hacerlo. La presencia de ceras, ácidos grasos y carbohidratos complejos no permiten que sean detectables, mención notable la merecen este tipo de azúcares, ya que estos al someterlos a altas temperaturas se descomponían, y esto se observaba en el cromatograma en el desplazamiento de la línea base durante el análisis, ya que esta solo se observa al inicio y al final del análisis. Como antes se había mencionado solo era posible observar los picos de los componentes más concentrados: la ceras y los ácidos grasos; lo que finalmente no nos permitiría realizar el análisis de los pesticidas por SCAN, al no poder identificarlos plenamente el método así solamente perdería como tal el objeto para el que se pretendía implementarlo; y solo estaría diseñado para analizar muestras solo por SIM, porque el ruido no sería un obstáculo. Por lo tanto para cumplir que el objetivo se debía adicionar el proceso de limpieza.

Los siguientes dos extractos se efectuaron para incorporar al método MOG modificado la etapa de limpieza, esto se realizo con dos tipos de columnas: la silica gel y el florisil; la silica gel es eficiente en la limpieza de pesticidas polares y los ligeramente polares y un poco menos eficiente para los pesticidas no polares, pero al tener cierta capacidad para eliminar compuestos no polares de alto peso molecular, y que parte de estos integran a la fresa, ya que solo los sólidos de la fresa representan menos del 15% por lo tanto muchos de los componentes son estructurales y de protección; el cromatograma Silica gel del extracto de fresa se muestra en la figura 3.8 :

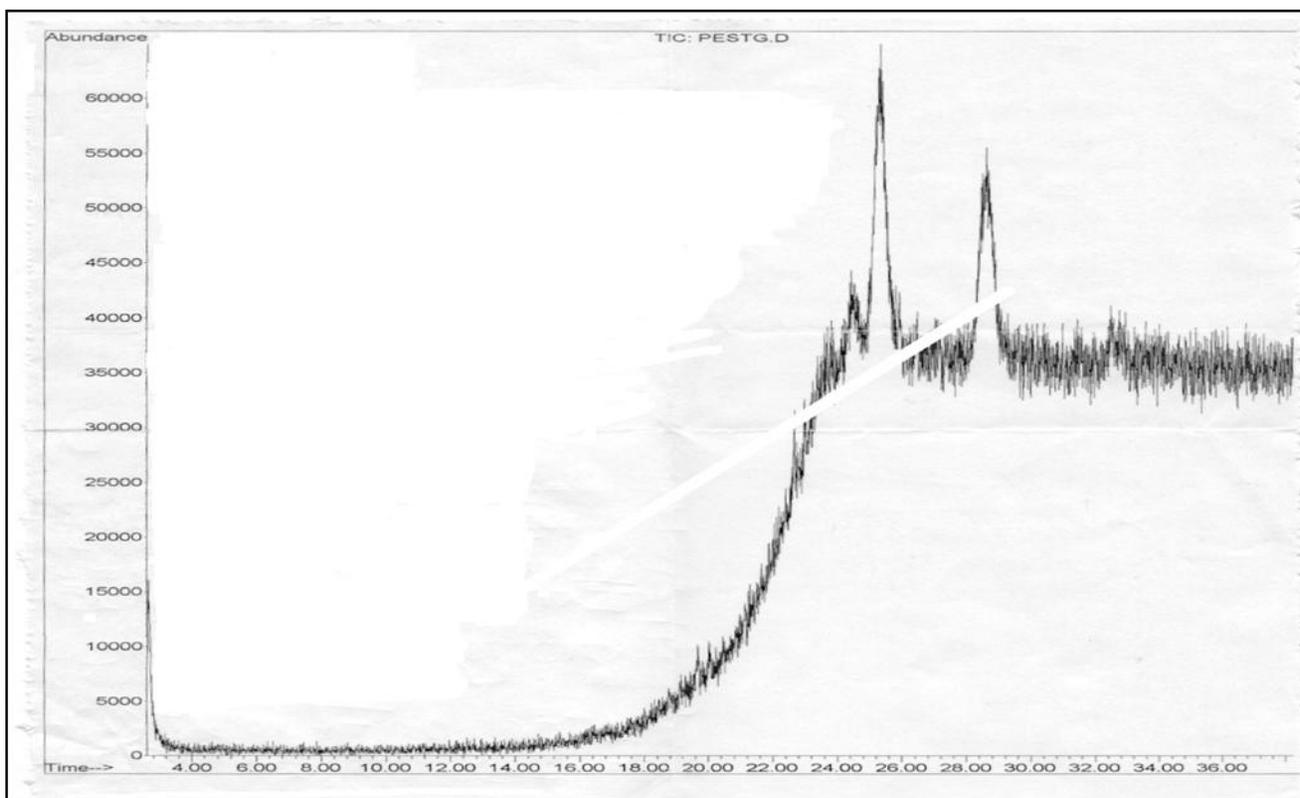


Figura 3.18. Cromatograma del extracto de Fresa, limpieza Silica Gel.

El resultado es claro, al aluir el extracto de la columna de limpieza con hexano no eluyeron los pesticidas y ningún componente de la fresa, todos permanecieron en la columna; a partir de este resultado se puede deducir que las fuerzas de atracción que mantenía a los componentes eran fuertes en la columna de silica gel, por lo tanto el hexano con el que se intento la elusión de los pesticidas no tenía suficiente fuerza de elusión para permitir que estos salieran; por lo tanto a partir de este resultado tendríamos que utilizar otro disolvente, el cual debería tener mayor fuerza de elusión como el cloroformo o el acetato de etilo u otro, si así lo hubiéramos decidido.

Como se describió antes, el siguiente extracto se realizo con la columna de limpieza florisil; el cual es muy eficiente para el aislamiento de pesticidas no polares y remueve bien compuestos no polares de alto peso molecular, por estas características se realizo el extracto de fresa con florisil. El cromatograma del extracto de fresa florisil se presenta en la figura 3.19:

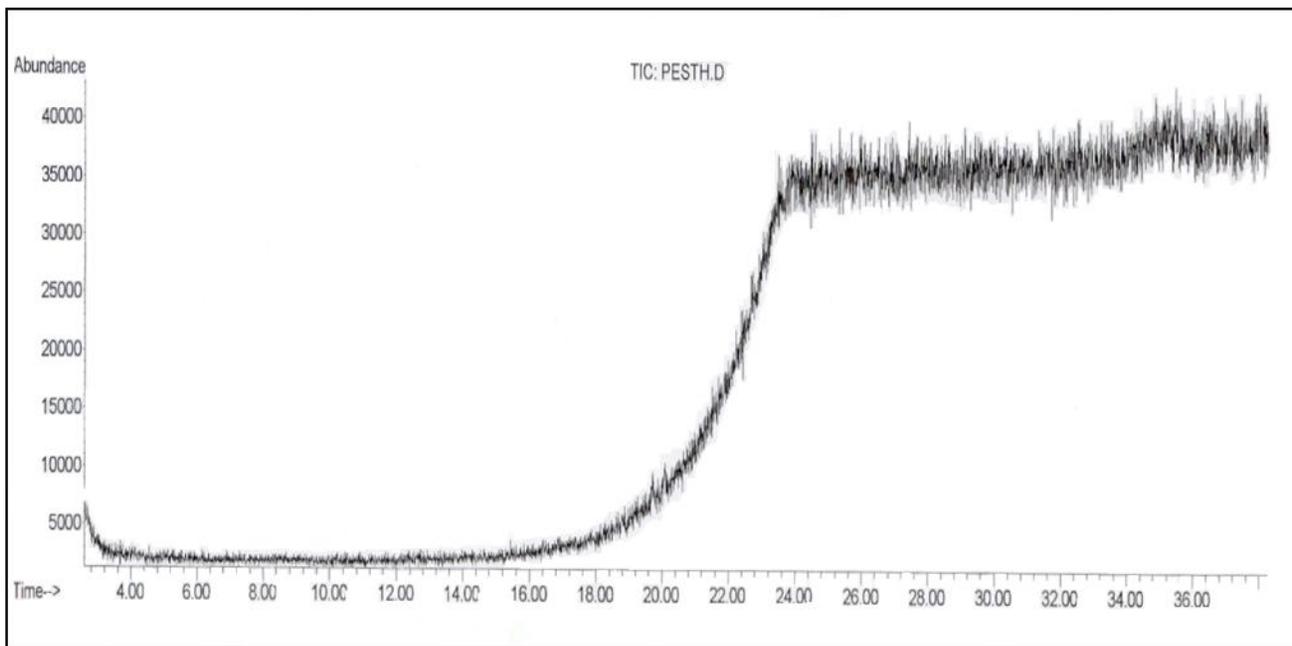


Figura 3.19. Cromatograma del extracto de Fresa. Limpieza florisil.

Con el segundo extracto sucedió prácticamente lo mismo, al atravesarlo en la columna de florisil y al eluirlos con hexano nuevamente permanecieron todo los componentes del extracto dentro de la columna de limpieza, esto dejo claro que el hexano no tenia suficiente fuerza de elusión para ser utilizado en el proceso de extracción, de esta manera de haber continuado con el hexano, habría sido necesario ocupar otro que tuvieran mayor fuerza de elusión para lograr que los pesticidas eluyeran; sin embargo, otro inconveniente podría producirse, el cual podría tratarse que al eluir el extracto de la columna de limpieza solo con otro disolvente no podríamos obtener buenas recuperaciones de los pesticidas, ya que no solo eluirian los pesticidas también lo harían componentes de la fresa, lo cual nos obligaría a encontrar un disolvente mas específico para la distintas familias de pesticidas, porque tendría que realizarse en fracciones, lo cual sería inaceptable, ya que aumentaríamos la cantidad de disolvente.

Respecto al hexano también se sumo otra fuente que lo descartaría, ya que al inyectar hexano solamente en el sistema, no solo se observo la línea base como era esperado, sino que también

eluyeron otros componentes que contenía el hexano, los cuales no eran muchos ni muy concentrados pero era muy posible que interfirieran con la elusión de alguno de los pesticidas, o podría contribuir con mas componentes durante un análisis de la fresa; por lo tanto el Hexano quedo definitivamente descartado.

Otra modificación realizada desde el principio y que se ocupo desde los primeros extractos fue que en la etapa de concentración se utilizo el evaporador con corriente de nitrógeno, en el método inicial no estaba definido claramente, pero señalaba que se podía ocupar el rotavapor y el aparato Kuderna Danish, el cambio efectuado permitió solo utilizar una técnica de concentración, ya que de haber elegido una de la técnicas mencionada previamente no podríamos concentrarlos hasta 0.5ml, esto finalmente significaba que posteriormente necesitaríamos mas material de laboratorio y también mas trabajo neto, lo cual se buscaba evitar también.

Con todos estos resultados era el momento en que se procedería a efectuar modificaciones al método MOG modificado y a partir de esos cambios ya no se llamaría de esa forma, el método ahora llevaría el nombre de: *Método DEMENT-HGR, para alimentos con alto contenido de Humedad (>80%), lípidos (<1.5%)*, por lo tanto a partir del extracto que seguía se realizaría de esa forma, Las modificaciones efectuadas fueron las siguientes:

Tabla 3.5. Método DEMENT-HGR:

1. Los volúmenes de los disolventes para las muestras se redujeron a la mitad.
2. Disolvente de partición: MOGmod: Hexano; Metodo DEMENT-HGR: no definido.
3. Lavado: MOG mod. 30ml de solución saturada de NaCl; Método DEMENT-HGR 200ml de solución saturada de NaCl.
4. Limpieza. MOGmod no definido; DEMENT-HGR. No definido.
5. Detección. MOGmodificado. No definido; Método DEMENT. Sistema acoplado CG/EM.

Al definir que el Hexano no era adecuado para la implementación de la metodología y al haber incluido las modificaciones, lo siguiente que se debía hacer era definir otro disolvente de partición, por lo tanto iniciamos la búsqueda de un nuevo disolvente de partición, entonces inmediato se propuso al cloruro de Metileno, tomado en cuenta que este disolvente también es volátil, también tomamos en cuenta que es mas estable al almacenamiento, se realizo un nuevo

extracto y se fortifico con estándares de pesticidas. El cromatograma del extracto fresa con el cloruro de metileno se muestra en la figura 3.19:

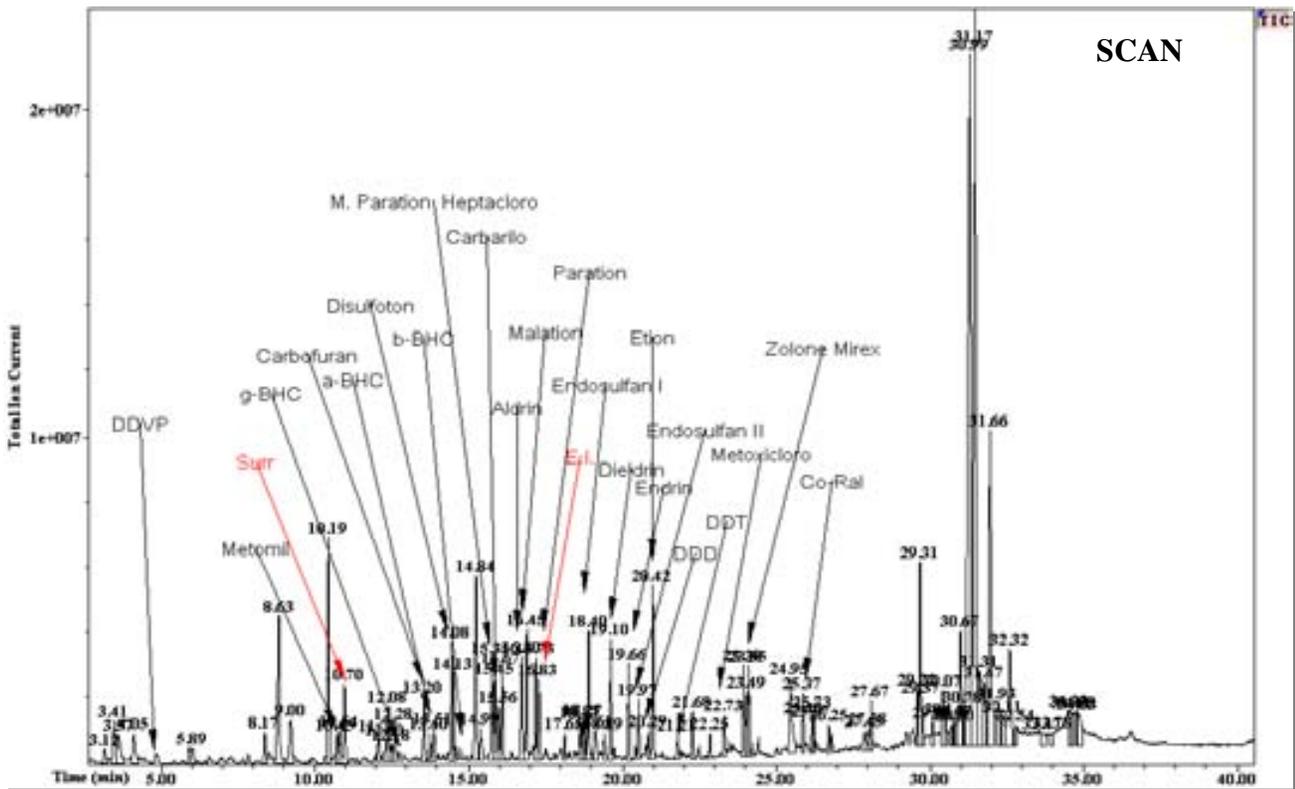


Figura 3.20. Cromatograma del extracto de Fresa SCAN. Cloruro de metileno, limpieza. Florisil.

El resultado que se obtuvo de este extracto con el nuevo disolvente partición y con la limpieza con florisil fue adecuado en todos sentidos, el cromatograma es menos complejo, se simplifican notablemente las señales de otros componentes, hay menos interferencia, por lo tanto no solo sería posible identificar a todos los pesticidas seleccionados, también podría hacerse con otros pesticidas. La combinación del cloruro de metileno con columna de limpieza florisil resulto adecuada. Con el florisil se eliminaron los carbohidratos complejos, ceras, ácidos grasos y algunos pigmentos como las clorofilas y los carotenos; que con el uso del cloruro de metileno estos componentes pudieron retenerse en la columna de limpieza y los pesticidas solo la atravesarían, y no reteniéndose en la columna, por lo tanto, solo fue necesario un volumen de 3ml para hacer la extracción completa de los pesticidas, esto no permitiría ahorrar disolvente, ya que no era necesario un volumen mayor para eluirlos de la columna, ni tampoco era necesario otro disolvente. Finalmente este resultado permitió implementar el método en su forma cualitativa, ya que era importante hacer la identificación positiva de los pesticidas, y eso significaba obtener los espectros de masas de cada uno de los componentes.

Al tener el resultado positivo por SCAN la muestra se inyectaría por SIM, por lo tanto se procedió a inyectar la misma muestra pero ahora con este modo de operación, en la observaremos la ventaja que se obtiene cuando se realiza el análisis de esta forma. El cromatograma del extracto de fresas con el cloruro de metileno se muestra en la figura 3.21

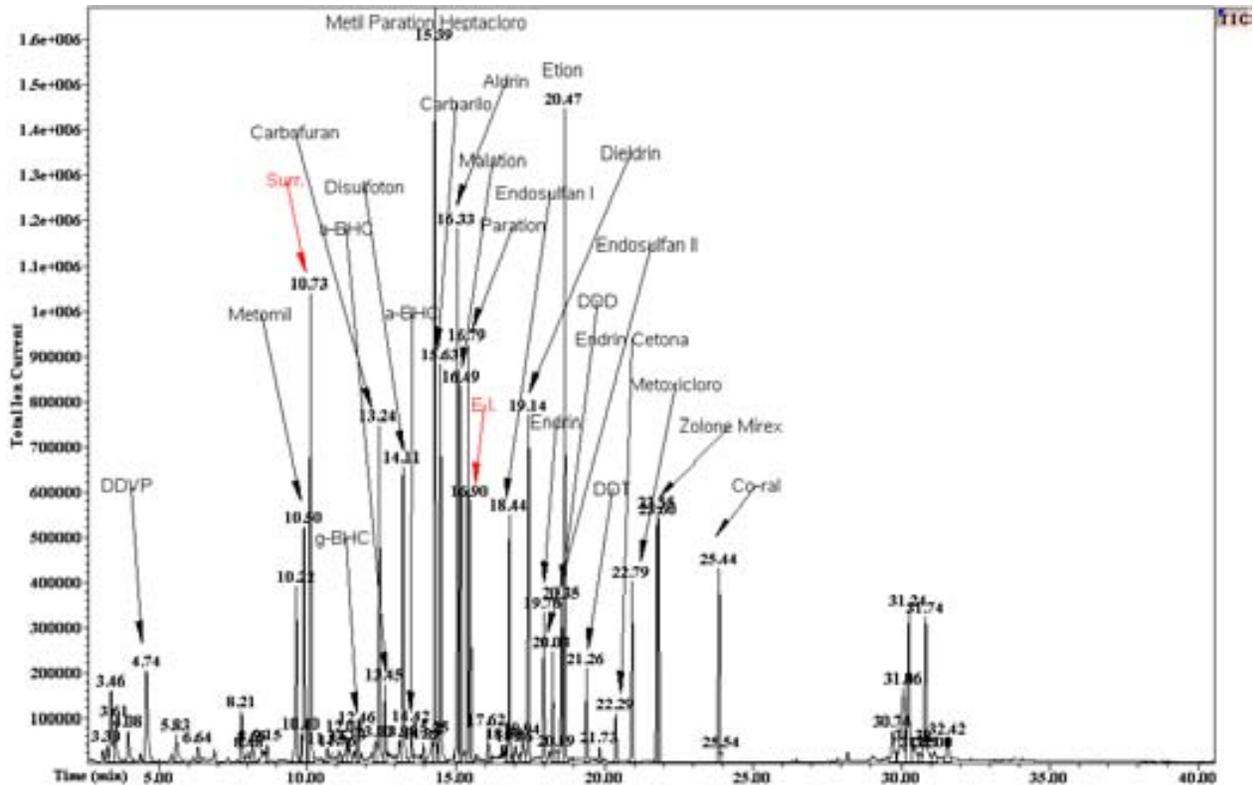


Figura 3.21. Cromatograma del extracto de Fresa SIM. Cloruro de metileno, limpieza Florisil.

El resultado que se observa en el cromatograma SIM es mucho mejor que el SCAN: el nivel de ruido se reduce notablemente, la mayoría de los componentes del extracto que estaban fueron eliminados, esto facilito que las señales de los pesticidas fueran los picos mayoritarios del cromatograma, además los compuestos que interferían con algunos pesticidas se eliminaron. Por lo tanto ya no era necesario realizar el extracto con Silica Gel, y finalmente la tabla 3.5 quedaría completa con la inclusión de estas dos modificaciones y el método ya estaría apto para su evaluación.

3.2.2 Porcentaje de recuperación (%).

Para evaluar la capacidad del método de extracción de pesticidas, se evaluaría el recobro para no realizar la curva de calibración de método de cada uno de los pesticidas, sino que solo se fortificarían muestras de fresas con una cantidad conocida de pesticidas, para ver cuanto se recuperaría del proceso de extracción. Los resultados que se obtuvieron de la estimación del porcentaje de recobro en las muestras se presentan en la tabla 3.11. .

Tabla 3.12. Recobros obtenidos en muestras de fresa fortificadas con 0.1ppm de pesticidas.

Pesticida	SCAN	SIM
DDVP	NR	96.74±11.54
Metomilo	92.64±16.38	93.74±13.47
Carbofuran	130.7±40.27	114.89±21.41
BHC	123.17±42.97	120.62±19.89
Disulfoton	109.52±78.19	84.8±8.73
Mparation	NR	124.21±21.57
Heptacoloro	NR	86.73±14.53
Carbarilo	126.43±35.96	123.47±22.46
Aldrin	141.18±8.89	115.15±14.52
Malation	110.61±21.61	117.80±23.19
Paration	118.57±23.27	121.12±22.49
Endosulfan	124.18±19.01	132.19±20.76
Dieldrin	118.42±21.67	117.70±20.06
Endrin	113.10±24.29	114.14±22.92
Etion	136.20±33.20	125.76±23.28
DDT	107.41±24.90	93.10±17.3
Metoxicloro	72.31±30.47	37.19±10.82
Zolone	NR	131.44±23.99
Mirex	NR	91.28±17.18
Co-Ral.	198.57±28.40	135.69±23.51

NR. No recobrado.

Para considerar que el método de extracción implementado era capaz de realizar esa función los valores de recobro debían ser mayores al 70% para cada pesticida; como puede observarse en la tabla 3.12 el recobro de los pesticidas, salvo el caso de Metoxicloro se encuentran por arriba de este valor, por lo tanto el método implementado es adecuado para la determinación de las distintas clases de pesticidas; y solo en el caso del metoxicloro tendríamos problema ya que solo se podría detectar por SCAN, porque la cuantificación por SIM sería incierta.

Los intervalos de confianza que tiene cada valor de recobro son relativamente grandes, sin embargo la evaluación de recobro se diseño de distinta forma a lo establecido, ya que no solo evaluaríamos una muestra de fresas, sino que se iba evaluar el método de extracción de pesticidas en fresas de las distintas regiones productoras de este fruto; por esa causa aumentarían algunos factores que podrían afectar la capacidad del método de extracción, por lo que era previsible que se obtuvieran esos intervalos de confianza; pero de esa forma estableceríamos que el método implementado estaría preparado para distintas condiciones de operación y pruebas posteriores.

Los valores obtenidos con el modo SIM que evaluarían al método de extracción para cuantificar a los pesticidas, en algunos casos los resultados con varios pesticidas fueron muy similares a los obtenidos con el modo SCAN, esto nos indica que el proceso de extracción para todos estos pesticidas fue bueno, porque se retiro a todos los compuestos que hubieran interferido con estos pesticidas, por lo que se esperaba que prácticamente los valores fueran iguales. Sin embargo, también había compuestos en los que el recobros obtenido por SIM eran mas bajos que los obtenidos por SCAN, por lo tanto ocurriría lo contrario ya que en esas zonas aunque los resultado son buenos no fue muy eficiente la eliminación de los componentes de la fresa, así como ocurrió en el caso del DDVP que ni siquiera pudo recobrase por SCAN, en cambio con otros pesticidas la presencia de estos componentes contribuyeron con su área para que el recobro de estos pesticidas fuera mayor. Finalmente también había pesticidas en los cuales el resultado de los recobros fueron mayores por SIM que con SCAN, esto podríamos explicarlo de la siguiente forma, aunque esta limpio el extracto, ya que no eran mucho mas grande los valores, aun en estas zonas del cromatograma pueden estar presentes microcomponentes de la fresa, los cuales aportarían el iones que se sumarian también al áreas de los pesticidas. Por lo que puede concluirse que aun a pesar de que la fresa es fruto muy complejo, la combinación de los dos tipos de detección proporcionara la identificación de los pesticidas y la cuantificación de los mismos.

Como se observo en el cromatograma 3.17 la muestra de fresa esta constituida por una considerable cantidad de componentes que al someterse al procedimiento de limpieza se logran eliminar en su mayoría, sin embargo en el transcurso del proyecto se observo que otro tipo de compuestos ajenos se presentaban en la fresas, los cuales se agregan s intencionalmente, porque se pudo comprobar la presencia de eftalatos, los cuales eluian en una zona considerable del

cromatograma, ya que eluían en un intervalo de tiempo largo, ya que las señales eran picos o bandas muy anchas que eluían desde el minuto 24 hasta el minuto 30, por lo que sería imposible la detección de los tres últimos pesticidas, el Mirex, Zolone y el Co-Ral y solo se podrían verificar su presencia solo por el tiempo de retención. Sin embargo mejorar la limpieza implicaría aumentar el costo y las operaciones de limpieza, que también podría ir en perjuicio de la recuperación completa de los pesticidas, ya que al pertenecer a distintas clases de pesticidas cada uno tiene características químicas diferentes, por lo que podría perderse en un segundo proceso de limpieza, como ejemplo se sabe bien que el florisil causa oxidación de los pesticidas organofosforados. Por lo tanto no se realizó ninguna modificación más al método. Sin embargo no deja importar la presencia de eftalatos ya que se ha documentado en distintos estudios que estos tienen efectos cancerígenos, muta génicos y tóxicos, por lo tanto es indispensable que se implementen medidas para advertir su peligrosidad, y prohibirlos definitivamente.

3.3 Determinación e identificación de pesticidas en fresas.

En nuestro país aun en la actualidad no se posible garantizar que los frutos estén libres de componentes exógenos a la fresa, como pudimos comprobarse no solo son agregados pesticidas, también se agregan otras cosas para preservar el producto o hacerlos mas atractivos al consumidor. Por lo que nunca fue garantía que nos afirmarán los vendedores que las fresas estarían limpias; Por lo tanto era muy probable que no solo encontráramos pesticidas en una cantidad reducida, sino cualquier otra cosa.

Con la metodología implementada (Diagrama 2, Capítulo 2) se prepararon distintos lotes de fresa, los cromatogramas de los distintos lotes de fresas se encuentran en el anexo 4; y para estimar las concentraciones que estas tenían de pesticidas se considero el porcentaje de recuperación del surrogado La tabla 3.13 muestra los resultados que se obtuvieron en fresas de procedencias diferentes:

Tabla 3.13. Concentraciones encontradas en distintos lotes de fresa.

Procedencia de la muestras	Pesticidas identificados	Concentración (ppm)
Lote 1; Mercado Xochimilco, origen: desconocido	- Dicofol	D
	- Captan.	D
	- Triclosan	D
	- Endosulfan	D
	- Etion	D
	- DDT	0.449
	- Metoxicloro	0.243
Lote 2; Mercado Xochimilco Origen, desconocido	- Captan	D
Lote 3; Mercado Xochimilco, origen: desconocido	- Malation	0.459
	- Zolone	0.265
Lote 4; Mercado Xochimilco, origen: desconocido.	- Malation	0.133
	- DDT	0.065
	- Zolone	0.104
	- Metoxicloro	0.030
	- Etion	0.052
Lote 5; Mercado Xochimilco, origen: Desconocido.	- Dimetoato	D
Lote 6; Central de Abastos, origen: Irapuato Gto.	- Etion	0.066
Lote 7; Central de abastos, origen, Edo. De México	- Etion	0.064
Lote 8; Central de abastos, origen, Zitacuaro Michoacán	- Etion	0.101
	- DDD (DDT)	0.049
Lote 9; Central de abastos, origen, Baja California	- Etion	0.065
Lote 10; Central de abastos, origen, Baja California	- Etion	0.064
	- DDD (DDT)	0.031
Lote 11; Central de abastos, origen, Zamora, Michoacán	- Carbofuran	0.096
	- Metil Paration	0.126
	- Malation	0.159
	- Paration	0.169
	- Dicofol	D
	- Dieldrin	0.157
	- Endrin	0.093
	- Endosulfan y Endosulfan sulfato	0.312
	- DDD (DDT)	0.057
	- Etion	0.122
	- Rospan	D

Procedencia de la muestras	Pesticidas identificados	Concentración (ppm)
Lote 12; Central de abastos, origen, Camalú Baja California	-Etion -DDD (DDT)	0.102 0.050
Lote 13; Central de abastos, origen, Irapuato	-Etion -DDD (DDT)	0.088 0.044
Lote 14; Central de abastos, Origen, Baja California	-Etion -DDD (DDT)	0.070 0.035

Los resultados que se obtuvieron en las muestras son considerablemente más bajos que cualquier límite máximo residual aun permitido en la fresa, sin embargo también podemos observar que en ocasiones es posible ingerir distintos pesticidas al fresa, lo cual en la practica se encuentra permitido, pero que apenas ha comenzado a ponerse en consideración en distintos países, en los que ya inician a establecer LMR para mezclas bien definidas. Que en el caso de la fresa sería adecuado ya que es muy amplia la lista de pesticidas autorizados para su siembra y porque no solo se realiza una fumigación al año.

Aunque podemos concluir que los productores cumplen con las especificaciones relativo a lo LMR, no se debe dejar de mencionar que pudo observarse una deficiencia en sus buenas prácticas agrícolas, aunque estos respetaron el intervalo entre la ultima aplicación de pesticidas y la cosecha, no lo hicieron con los pesticidas que se encuentran legalmente autorizados, como lo son el Paration, Triclosan, Dimetoato y Rospan que fueron identificados por SCAN.

Resulta también extraño la presencia de los pesticidas organoclorados: DDD, DDT, Metoxicloro, Dieldrin, Endrin y Metoxicloro; los cuales no se utilizan y tampoco se fabrican desde hace mas de dos décadas, lo cual confirmaría que la presencia durara muchos años mas. Su origen puede deberse a dos factores, uno fundamentalmente y el otro menos probable, el primero consistiría en que por causa de la alta persistencia que tienen estos pesticidas y aunque ya hayan pasado varios años de dejarlos de utilizar, aun los suelos podrían encontrarse contaminados con residuales de aquellas fumigaciones. La segunda hipótesis se referiría a que aun en la actualidad se desconociera la reglamentación, ya que es muy diverso el sector productivo de la fresa. Por lo tanto es importante que exista una campaña global en la que participen todos los productores y se necesitarían técnicas de biorremediación de suelos para eliminarlos completamente.

También se pudo comprobar que la producción de la fresa en nuestro país participan muchos productores y varias empresas, ya que la fresa que se produce en nuestro país, tiene mucha variabilidad en su contenido de pesticidas, ya que en nuestro país existen productores de fresa que la venden en canastos en las orillas de la carreteras, otras que son llevadas a la centrales de abastos y otras que se destinan a exportación. Ya que muchos de los productores de nuestro país aun la producen con las técnicas implementadas en el pasado, en las que ocupan una gran cantidad de agua, y empresas nacionales y otras internacionales que ya no lo hacen de esa forma y que poseen los procesos productivos mas actuales y usan las tecnologías mas modernas, lo que finalmente se traduce en un producto de mejor calidad. Por lo tanto al estar más controlados estos últimos en comparación a los pequeños productores, se incrementa la posibilidad de que estos no cumplan con la legislación, ya que no solo por fumigaciones puede deberse la presencia de pesticidas, también existe migración de pesticidas vía área y vía acuosa; porque los pesticidas generalmente vienen en vehículos que facilitan su solubilidad en el agua.

Sin embargo podemos establecer que la fresa que se consume en nuestro territorio no representaría un riesgo importante para la salud del consumidor, ya que todas las muestras no los contienen por arriba de los límites máximos residuales.

Por lo tanto se recomendaría implementar acciones y programas más decididos para que los productores los manejen de manera adecuada, como se había comentado las fresas proceden de muy diversos sitios, ya que al menos son diez los estados que la producen.

CAPITULO 4. Conclusiones.

- El método desarrollado fue adecuado. Los recobros son excelentes y los límites de detección y de cuantificación alcanzados nos indican que se obtienen buenas condiciones de trabajo, ya que se alcanzan valores 10 veces mas bajo que el límite máximo residual del pesticida mas restringido.
- Todos los pesticidas que fueron identificados en los distinto lotes de fresa ninguno rebaso los límites máximos residuales que establece nuestra legislación, por lo tanto, sería el índice de que lo agricultores en nuestro país realizan adecuadamente los tratamientos con pesticidas.
- La presencia de algunos pesticidas que no fueron contemplados al inicio del proyecto y que se pensaba que no eran utilizados por los agricultores, como el rospan, triclosan, paration y el Dimetoato que se identificaron en la fresas por SCAN, será necesario incluirlos en futuros estudios que se efectúen para determinar su contenido exacto.
- A pesar de que el consumidor mexicano puede esta confiado de que el producto que esta ingiriendo cumple con las especificaciones, causa extrañes y tampoco deja de preocupar la presencia del DDT, del Metoxicloro, del Dieldrin y el Endrin en la fresas, ya que estos pesticidas son bioacumulables.

Bibliografía.

- 1) <http://www.rsc.org/Education/EiC/Restricted/2007/May/PesticidesKeepingOneStepAhead.asp>. Pesticide- Keeping one step ahead. 2007
- 2) Amendola, Ricardo et al. Perfiles por País del recurso pastura/ Forraje: México <http://www.fao.org/ag/AGP/AGPC/doc/pasture/forage.htm>.
- 3) Producción e importación: altas y bajas. Consejo estatal de productores de fresa. Estado de Michoacán. <http://www.producemich.org.mx/editorial/Numero4/9.html>. Septiembre del 2004
- 4) Catálogo Oficial de plaguicidas. SAGARPA-CICOPLAFEST, México; 2004
- 5) Barbera, Claudio. Pesticidas agrícolas. 4ª edición, Editorial OMEGA. Barcelona; 1989.
- 6) Matthews G.A. “Métodos para la aplicación de pesticidas”; 2ª reimpresión. Compañía Editorial Continental S.A. de C.V. México, 1987.
- 7) Coscolla, Ramón. Residuos de plaguicidas en los alimentos vegetales; Editorial: Madrid-España, 1993
- 8) Ishaaya, Isaac and Degheele Danny. “Insecticides with novel modes of action, mechanism and application”. Springer. India, 1998.
- 9) Klaassen C. D., Watkins J.B. III, “Casasertt y Dull Toxicology Manual”. Editorial Mc Grow Hill; USA, 1999.
- 10) Alpuche, Leticia. “Plaguicidas y sus efectos en el ambiente y la salud”. Centro de Ecodesarrollo de México; México, 1990.
- 11) Wayland J. Hayes Jr, Edward R Laws Jr. “Handbook of pesticide toxicology”. Vol, I, II, III. Academic Press. Inc USA, 1991.
- 12) Redacción, Mi Morelia.com. Proyecto para la promoción al consumo de la fresa en México. 9 de abril 2008.
- 13) PROEXANT. Manual frutilla: Cultivo de la Frutilla o Fresa. Promoción de exportaciones agrícolas. http://www.proexant.org.ec/Manual_Frutilla.html
- 14) EPA. Office of pesticide program. www.epa.com 2002.
- 15) Nielsen, S. Suzanne. Food Analysis, 3th Edition; Kiuwer Academic/Plenum. 2003
- 16) Meloan, Clifton E. “Pesticides Laboratory Training Manual”. AOAC INTERNATIONAL.
- 17) Mendez de Jesus, Ma. Rocio. Analisis de pesticidas en espinacas por cromatografía de gases/espectrometría de masas. Tesis Fac. Química UNAM 2004.
- 18) Harris, Daniel, C. “Análisis Químico Cuantitativo”; 2ª edición; Edit Reverte, España 1999.

- 19) Zief, Morris, Kiser Ruthann. "Solid Phase Extraction for Sample Preparation". Publisher J.T. Baker USA, 1997.
- 20) Kataoka H., Lord, H.L. Pawliszyn J. "Applications of solid-phase microextraction in food analysis". Journal of chromatography A, 2000.
- 21) Rubinson and Rubinson. "Química Analítica contemporánea". Pearson Education, México. 2000
- 22) Van der Hoff, G.R. and Van Zoonen. Review Trace Analysis of pesticides by gas chromatography. Journal of Chromatography A. Piet Vol 843 pp 301-322, 1999.
- 23) Mollet Leo, M. L. Handbook of Food Analysis, Vol. 2. Residues and other food component analysis. Marcel Dekker, Inc. USA; 1996
- 24) Fong W. G., Moye H. A., Seiber J.N., Toht J. P. Pesticide Residues in Foods: Methods, Techniques and Regulations. John Wiley and Sons. New York, USA, 1999.
- 25) McNair, Harold M. Cromatografía de gases. Secretaria General de la Organización de los Estados Americanos. Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico, 1981.
- 26) Hinshaw, John V., Ettre, Leslie S. Introduction to Open-Tubular Column, Gas Chromatography; ADVANSTAR Communications, USA, 1994.
- 27) Ettre, Leslie S, Hinshaw, Jonh V. Basic Relationships of Gas Chromatography; ADVANSTAR Communications, USA, 1993.
- 28) Yost, R.W., Ettre, L.S., Conlon R.D. "Introducción a la Cromatografía líquida Práctica". Perkin-Elmer; USA, 1980.
- 29) Skoog, D.A., Holler, F.J., Nieman, T.A. "Principios de Análisis Instrumental". 5ª edición, McGraw Hill. España 2001.
- 30) Noa Pérez, Mario et al. "Cromatografía de Gases y Líquidos de Alta resolución". UAM Unidad Xochimilco, México 2005.
- 31) O'Keeffe, Michael. "Residues Analysis in food, Principles and Applications". Hardwood Academic, USA 2000.
- 32) Willard, Hobart, H et al. "Métodos Instrumentales de análisis". 7ª edición, Grupo Editorial Iberoamericana, México, 1991.
- 33) Dabrio Bañuls, M.V. et al. "Cromatografía de Gases", 1ª Edición, Tomo 1, Editorial Alhambra España 1971.
- 34) Mc Lafferty F. and Ture F. "Interpretation of Mass Spectra". 4th edition John Wiley and Sons, USA 1993.

- 35) Gomez Ruiz, Humberto R. ¿Qué son? y ¿Para que sirven? Los Equipos Acoplados de Cromatografía de gases/ Espectrometría de Masas. Fac. Química , UNAM 1997.
- 36) Jade Antonio, Multiplicadores de Electrones: Desvelamos el Misterio. SGE, <http://www.truepr.com/news/SGEE/0606/001.asp?> 2006.
- 37) Gordon, M. H. Principles and Applications of Gas Chromatography in food Analysis, Ellis Horwood, USA, 1990.
- 38) G. Martínez Soto, J. Mercado Flores. “Propiedades fisicoquímicas de seis variedades de fresa (fragaria anassa) que se cultivan en Guanajuato”. Instituto de ciencias Agrícolas. Universidad de Guanajuato. 2007

Anexo I

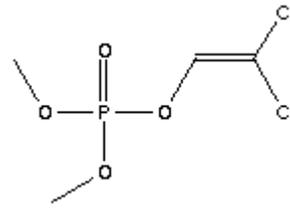
Identificación de Pesticidas.

DDVP.

CAS. 62-73-7 $C_4H_7Cl_2O_4P$ PM: 220.1g/mol.

Nombre IUPAC: 2,2-diclorovinil dimetil fosfato.

Otros nombres: Diclorvos, diclorfos, lindan, Herkal, etc.



Características y propiedades: Líquido incoloro (técnico color ámbar y con olor parecido a los aromaticos, p. eb. 231.1°C, presión de vapor (25°C): 2.1 Pa, solubilidad en agua: 8g/L (25°C); completamente miscible en disolventes aromáticos hidrocarbonados, hidrocarbonados clorados y alcoholes; moderadamente miscible en diesel, keroseno, hidrocarburos isoparafínicos y aceites minerales. Estable al calor, lentamente hidrolizado en agua y medios ácidos, rápidamente hidrolizado en medios alcalinos, en dimetil fosfato y dicloroacetaldehido.

Compatibilidad: con la mayoría de los plaguicidas, pero incompatible con medios alcalinos, chinometionato, y diclofluanid.

Usos: Insecticida y acaricida.

Modo de acción: Acción dentro del sistema respiratorio, estomacal y por contacto, inhibiendo la colinesterasa.

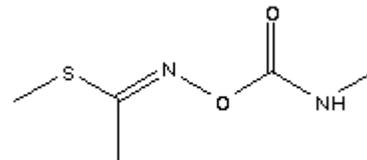
Toxicología: DL_{50} oral para ratas 25mg/ Kg.

Metomilo.

CAS. 16752-77-5 $C_5H_{10}N_2O_2S$ P.M. 162.21g/mol

Nombre IUPAC. S-metil- N-[[[(Metilamino) carbomoi]oxi] tioacetimidato.

Otros nombres: Mesomilo®, Lannato®, Lanox®, Nudrin®



Características y propiedades: Cristales blancos con un ligero olor a azufre, p. fusión. 78-79°C, presión de vapor (25°C) 5E-5 mmHg. Solubilidad: 3% tolueno, 5.8% en agua, 22% en isopropanol, 42% en etanol, 73% en acetona y 100% en metanol, es estable en forma sólida a temperatura ambiente, en soluciones acidas de pH 7 o menores, se descompone rápidamente en soluciones básicas y la mayoría de los suelos.

Usos: Insecticida.

Modo de acción, insecticida de contacto y estomacal, inhibiendo la colisneterasa.

Toxicología: DL₅₀ oral rata macho y hembra 12-48mg/kg

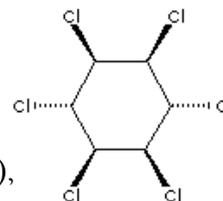
DL₅₀ dermico rata: >1080mg/kg

BHC.

CAS. 608-73-1 C₆H₆Cl₆ P.M. 280.93g/mol

Nombre IUPAC. 1,2,3,4,5,6-hexaclorohexano (mezcla de iómeros),

Otros nombres: HCH, hexacloroetano, Aparasin®, Ben Hex®, Hexamul® etc.



Características y propiedades. Copos entre blancos y marrones dependiendo de su composición isomérica; que esta formado por 8 estereo-isómeros separables, uno de los cuales esta presente junto a su enantiomero: α -BHC y β -BHC, tiene olor desagradable, es estable al calor, luz, aire, CO₂ y ácidos. Se descloroniza en soluciones alcalinas. La mezcla es moderadamente soluble en acetona, benceno, en solventes clorados; y es ligeramente soluble en aceites y grasa; es prácticamente insoluble en agua. El punto de fusión, de ebullición de vapor depende de la composición isomérica.

Usos: Insecticida.

DL₅₀ oral ratas: 100mg/Kg.

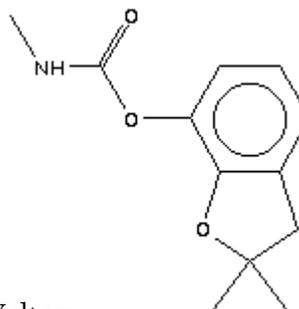
Carbofuran.

CAS. 1563-66-2 C₁₂H₁₅NO₃ P.M. 221.25g/mol

Nombre IUPAC: 2,3-dihidro-2,2-dimetil-7-benzofuranil

-N-metil carbamato.

Otros nombres: Brifur®, Crisfuran®, Cristofuran®, Furadan, Yaltox.



Características y propiedades: Cristales blancos con un ligero olor a

Aromáticos, p. fusion. 150-153°C, presión de vapor (33°C) 2.5E-5 mmHg, (50°C) 1.1x10⁴ mmHg.

Solubilidad: (peso/peso a 25°C) 0.07% en agua, 4% en benceno y etanol, 9% ciclohexanona, 14% en acetonitrilo, 27% en dimetil formamida, etc. Es inestable en soluciones básicas y a temperatura por arriba de 130°C.

Uso: insecticida sistémico y de contacto

Modo de acción: Es inhibidor de la acetilcolinesterasa.

DL₅₀ oral ratones 2mg/Kg.

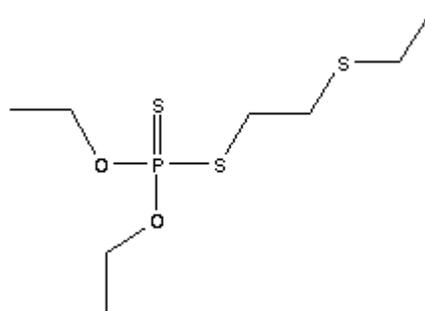
DL₅₀ oral ratas: 5.3-12mg/Kg

Disulfoton.

CAS. 298-04-4 C₈H₁₉O₂PS₃ P.M. 274.45g/mol

Nombre IUPAC. Ácido fosforoditioato O,O-dietil S-[2-(etiltio) etilo] ester.

Otros nombres: Tiodemeton®, Ditiodemeton®, Disyston®, Frumin®, Solvirex®, etc.



Características y propiedades: aceite incoloro con un olor característico, p. eb 0.01 mmHg 108°C, p. eb. 1.5 mmHg 132-133°C, d_4^{20} 1.44 n_D^{20} 1.5358, presión de vapor (20°C) 1.8E-4mmHg. Insoluble en agua.

Usos: Insecticida.

Modo de acción: Inhibidor de la colinesterasa.

DL₅₀ oral en ratas: 2.63mg/kg.

DL₅₀ dérmica en ratas: 6mg/Kg

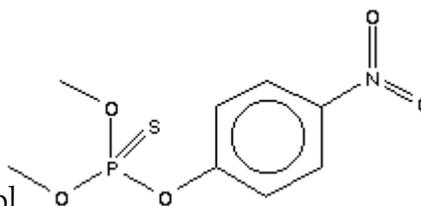
IDA para el hombre 0.002mg/Kg.

Metil Paration.

CAS. 298-00-0 C₈H₁₀NO₅PS M.P. 263.21g/mol

Nombre IUPAC: O,O-dimetil O,p-nitrofenil fosforotioato.

Otros nombres: Metafos®, Folidol®, M-paration®, Meptox®, Paratox®, Azofos®, etc.



Características y propiedades: Cristales o polvo blanco, con un olor a ajo y pungente, punto de fusión 33-36°C, presión de vapor (20°C) 1.3mPa. Solubilidad (25°C) 55-60mg/L, ligeramente soluble en petróleo. En grado técnico es un líquido en color claro a oscuro requemado. Es hidrolizado en medio básico y se isomeriza al analogo O,S-dimetil.

Usos: Como insecticida con acción fumigante, generalmente se recomienda de 15-25g/100L. No es persistente.

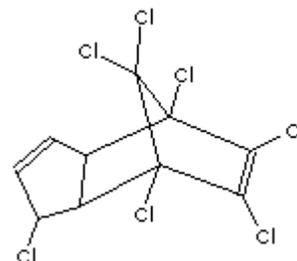
DL₅₀ oral (agudo) en ratas macho: 14mg/Kg, en hembras: 25mg/kg.

Heptacloro.

CAS. 76-44-8 C₁₀H₅Cl₇ P.M. 373.32g/mol

Nombre IUPAC: 1,4,5,6,7,8,8-Heptacloro-3 α .4,7,7-tetrahidro-4,7-metanoindeno.

Otros nombres: E-3314, Velsicol®, Drinox®, Heptox®, LatKa®, etc.



Características y propiedades. Cristales blancos, punto de fusión 95-96°C, presión de vapor (25°C) 3E-4 mmHg. Solubilidad en g/100ml de disolvente a 27°C: 75 en acetona, 106 en benceno, 112 en tetracloruro de carbono, 119 en ciclohexanona, 4.5 en alcohol, 102 en xileno. Es susceptible a epoxidación.

Usos: Insecticida, restringido.

DL₅₀ oral en ratas: 100mg/Kg.

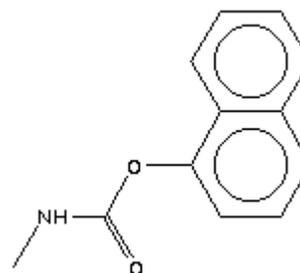
IDA para el hombre: 0.0005mg/Kg.

Carbarilo.

CAS. 63-25-2 C₁₂H₁₁NO₂ P.M. 201.22g/mol

Nombre IUPAC. 1-naftil N-metilcarbamato.

Otros nombres: Servin (USSR), Atoxan®, Caprolin®, Derbac®, Carbarilum®, Carmbamine®, etc.



Características y propiedades: Cristales blancos con un olor parecido a los fenoles, punto de fusión 142°C, presión de vapor (26°C) 4E-5mmHg, Moderadamente soluble en la mayoría de los disolventes orgánicos, como dimetil formalidad DMF, dimetil sulfoxido; ligeramente soluble en hexano, benceno y metanol. Es estable al calor, a los ácidos y la luz y es rápidamente hidrolizado a pH de 10 o superiores.

Usos: Insecticida de contacto.

Modo de acción: Inhibidor de la colinesterasa, carcinogénico declarado.

DL₅₀ ratas: 250mg/Kg.

DL₅₀ ratones: 108-650mg/Kg

IDA para el hombre: 0.01mg/Kg

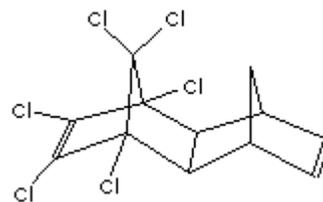
Aldrin.

CAS. 309-00-2 C₁₂H₈Cl₆ P.M. 364.91g/mol

Nombre IUPAC: 1,2,3,4,10,10-Hexacloro-1,4,4 α ,5,8,8 α -

hexahidro-*endo*,*exo*-1,4:5,8- dimetanonaftaleno.

Otros nombres: HHDN, Aldrex[®], Altox[®], Dinox[®], Octalano[®], Drinox[®], Aldrite[®], etc.



Características y propiedades. Cristales incoloros e inodoros, punto de fusión 104-104.5°C, presión de vapor 7.5E-5mmHg. Soluble en la mayoría de los solventes orgánicos, en parafinas, aromáticos, halogenados, ésteres y cetonas, prácticamente insoluble en agua. Es estable en soluciones alcalinas, y en presencia de sales oxidantes, es ligeramente estable en soluciones ácidas muy diluidas, no así en soluciones ácidas muy concentradas. No es inflamable y es compatible con la mayoría de los pesticidas y fertilizantes. Se epoxida a dieldrin en organismos vivos.

Usos. Insecticida.

Modo de acción: afecta el sistema nervioso.

DL₅₀ oral en ratas hembras: 39mg/Kg, machos: 60mg/Kg

IDA para humanos: 0.0001mg (aldrin y dieldrin)/Kg

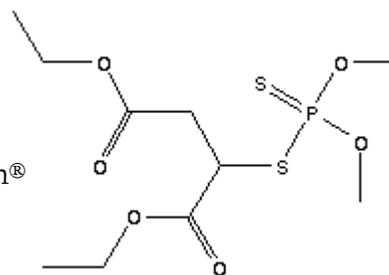
Malation.

CAS: 121-75-5 C₁₀H₁₉O₆PS₂ P.M.330.36g/mol

Nombre IUPAC: dietil(dimetoxitiofosforiltio)succinato.

Otros nombres: Madison[®], Malaton[®], Carbofos[®], Mercaptotion[®]

Lucation[®], etc.



Características y propiedades: El malatión técnico (95.5% de pureza) es un líquido ámbar claro; punto de fusión 2.85°C, presión de vapor (30°C) 5.3mPa; d_4^{25} 1.23; d_D^{25} 1.4985 Solubilidad a temperatura ambiente; 145mg/L agua, miscible en la mayoría de disolvente orgánicos,

incluyendo,: ésteres, cetonas, éteres y aceites vegetales. Se hidroliza a pH > 7.0 o <5.0; es estable en buffer acuosos a pH 5.26. Se metaboliza por hidrólisis a éster carboxílico y un fosforoditioato; o por oxidación del fosforoditioato a fosforotioato (malaoxon).

Usos: Insecticida y acarida.

Modo de acción. Inhibidor de la acetilcolinesterasa

DL₅₀, oral en ratas: 1000mg/Kg.

DL₅₀ cutánea en conejo: 4100mg/Kg.

IDA para el hombre: 0.02mg/Kg.

Paration.

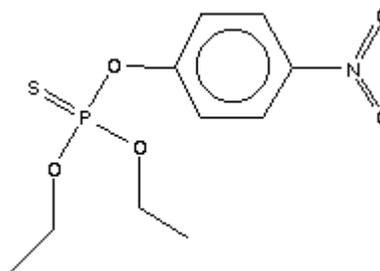
CAS. 56-38-2 C₁₀H₁₄NO₅PS P.M. 291.26g/mol

Nombre IUPAC: Éster de ácido O,O-dietil O-(4-nitrofenil)

Fosforotioico.

Otros nombres S.N.P.[®], ENT-15108[®]m ALKron[®], Folidol[®],

Fostox E[®], Tiofos[®], Rhodiatox[®].



Características y propiedades: Es un líquido amarillo pálido a marrón oscuro (técnico), Líquido amarillo (estándar), con un ligero olor a ajo. Punto de ebullición (25°C) 375°C a 760mmHg, p. fusión 6°C, d_4^{25} 1.26; d_D^{25} 1.5370; p. vapor (20°C) 3.781E-5mmHg. Viscosidad (25°C) 15.30cp. Soluble en alcoholes, ésteres, cetonas, éteres e hidrocarburos aromáticos. Prácticamente insoluble en agua (20ppm), éter de petróleo, keroseno. Incompatible con sustancias que tienen pH > 7.5. Se isomeriza por completo en su análogo O,S-dietilo... Es muy toxico porque se metaboliza en su análogo oxigenado formando después dietil-4-nitrofenilfosfato.

Usos. Insecticida y acaricida.

DL₅₀ oral, ratas: 13mg/Kg.

DL₅₀ cutánea, ratas: 21mg/Kg.

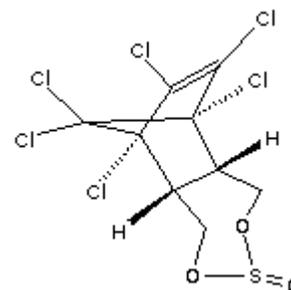
IDA para el hombre: 0.005mg/Kg.

Endosulfan.

CAS. 115-29-7 C₉H₆Cl₆O₃S P.M.406.92g/mol

Nombre IUPAC: 6,7,8,9,10,10-hexacloro-1,5,5 α ,6,9,9 α -hexahidro-6,9-metano-2,4,3-benzodioxatiopin.

Otro nombres: Clortiopin[®], Malix[®], Thiodan[®], Thionex[®], etc.



Características y propiedades. Producto técnico: cristales café con p. f. 70-100°C (p.f. para el compuesto). Prácticamente insoluble en agua. Soluble en mayoría de solventes orgánicos. Es estable en ácidos inorgánicos diluidos, hidrolizado rápidamente por bases, de dioles y también por oxido de sulfuro. El producto comercial es una mezcla de α -isomero (endosulfan I 64-67%), p.f. 108-109°C y β -isómero (endosulfan II 29-32%) p.f. 208-210°C.

Usos: Insecticida.

DL₅₀ oral, ratas: 43mg/Kg.

IDA para el hombre: 0.008mg/Kg..

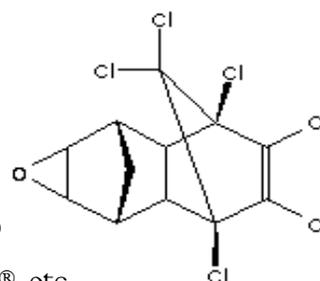
Dieldrin.

CAS. 60-57-1 C₁₂H₈Cl₆O P.M. 380.91g/mol

Nombre IUPAC. 1,2,3,4,10,10-Hexaclaro-6,7-epoxi-

1,4,4 α ,5,6,7,8,8 α -octahidro-*endo*, *exo*-1,4:5,8-dimetanonaftaleno

Otros nombres: HEOD, Alvit®, Octalox®, Panoram®, Quintox®, etc.



Características y propiedades. Cristales blancos, carecen de olor; p. f. 176-177°C, presión de vapor (20°C) 3.1E-6mm Hg, (25°C) 1.8E-5. Es moderadamente soluble en aceite mineral y alcoholes, ligeramente soluble en acetona, solventes halogenados y compuestos aromáticos. Es estable en soluciones básicas y en soluciones de baja acidez, a la luz; Reacciona con ácidos inorgánicos, con compuestos ácidos oxidantes y fenoles.

Usos. Insecticida de amplio espectro, restringido.

DL₅₀ oral, ratas: 46mg/Kg Guines

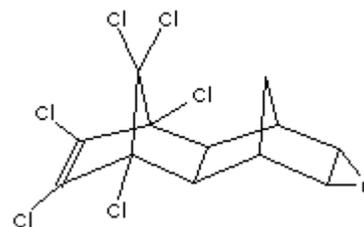
Endrin.

CAS. 72-20-8. C₁₂H₈Cl₆O P.M. 380.91g/mol.

Nombre IUPAC: 1,2,3,4,10,10-Hexaclaro-6,7-epoxi-

1,4,4 α ,5,6,7,8,8 α -octahidro-*endo*, *endo*-1,4:5,8-dimetanonaftaleno

Otros nombres: Mendrin®, Nendrin®, Hexadrin®, ENT-17251®, Mendrin®, etc.



Características y propiedades. Cristales color blanco carente de olor, se descompone a 245°C, p. vapor (25°C) 2E-7mm Hg, Solubilidad en g/100ml del solvente a 25°C: acetona 17, benceno 13.18, tetracloruro de carbono 3.3, hexano 7.1, xileno 18.3.

Usos: Insecticida.

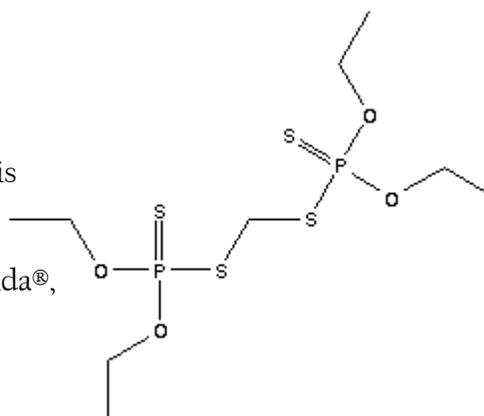
DL₅₀ oral, ratas: 7.5mg/Kg.

Etion.

CAS. 563-12-2 C₉H₂₂O₄P₂S₄ P.M. 384.94g/mol

Nombre IUPAC. O,O,O',O'-tetraetil-S,S'-metilen bis (fosforoditioato).

Otros nombres: Niagara 1240®, Tafetion®, Rhodocida®, Bladan®, Nialato®, etc.



Características y propiedades. Líquido aceitoso color amarillo o ligeramente embar, p. fusión -12 a -13°C, p. eb. 164-165°C a 0.3mm Hg, d_4^{20} 1.22, d_D^{20} 1.55, p. de vapor 1.5E-6mm Hg. Es soluble en xileno, cloroformo, acetona, naftaleno metilado, keroseno, metil etil cetona, acetona, ligeramente soluble en agua. Esta sustancia se descompone al calentarse o al arder.

Usos. Insecticida y Acaricida, No sistémico.

Modo de acción. Inhibe a la colinesterasa.

DL₅₀ oral, ratas hembras, machos: 27mg/Kg, 65mg/Kg.

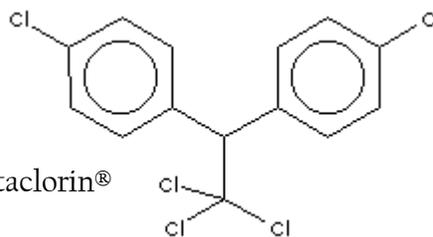
DL₅₀ dérmica, en ratas hembras, machos: 62mg/Kg, 245mg/Kg.

p,p-DDT

CAS. 6088-51-3 C₁₄H₉Cl₅ P.M. 354.98g/mol

Nombre IUPAC. 1,1,1-tricloro-2,2-bis(4-clorofenil)etano.

Otros nombres: Clorofenotano®, Anofex®, Anofex®, Pentaclorin®, Agritan®, Genitox®, etc.



Características y propiedades. Cristales blancos carentes de olor, p. fusión 108.5-109°C, p. vapor (20°C) 1.5E-5mm Hg. Prácticamente insoluble en agua. Solubilidad en g/100ml de solvente a 25°C: acetona 58, benceno 78, benzil benzoato 42, tetracloruro de carbono 45, clorobenceno 74, ciclohexanona 116, xileno 18.3. Se convierte en DDE por catálisis de Fe (III) y cloruros de aluminio. Puede sufrir dehidrocloración a temperaturas mayores a 50°C.

Usos: Insecticida.

DL₅₀ oral, ratas: 43mg/Kg.

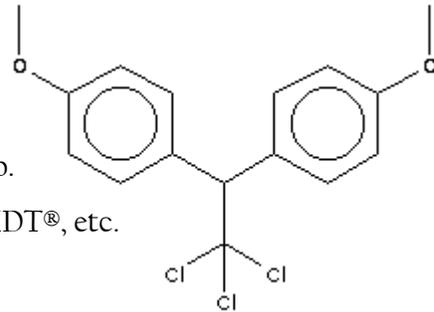
IDA para el hombre: 0.02mg/Kg.

Metoxicloro.

CAS. 72-43-5 $C_{16}H_{15}Cl_3O_2$ P.M. 345.65g/mol

Nombre IUPAC 1,1,1-tricloro-2,2-bis(4-metoxifenil)etano.

Otros nombres: Marlato®, Metoxi-DDT®, Prentox®, DMDT®, etc.



Características y propiedades. Cristales dimorfitos color blanco con un ligero olor picante, p. fusión 89°C (puro), 77°C (grado técnico), p. vapor no definida, ya que es muy baja, Prácticamente insoluble en agua; soluble en alcohol, la solubilidades son aproximadamente la mismas que las del DDT.

Usos: Insecticida.

DL₅₀ oral en ratas: 5.0mg/Kg.

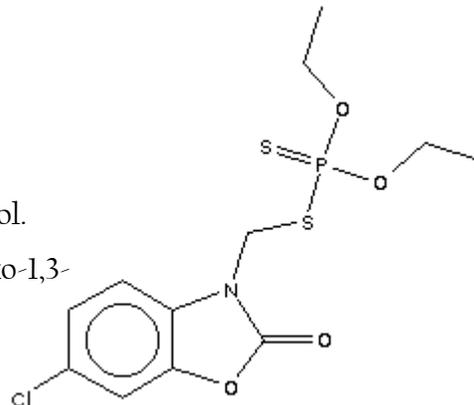
IDA para el hombre: 0.1mg/Kg.

Fosalone.

CAS. 2310-17-0 $C_{12}H_{15}ClNO_4PS_2$ P.M. 367.81gmol.

Nombre IUPAC. O,O'-dietil-S-(6-cloro-2,3-dihidro-2-oxo-1,3-Benzoxazol-3-ilmetil)-fosforoditioato.

Otros nombres. Zolone®, Rubitox®, Rusia: Benzofos, Azonfene®, etc.



Características y propiedades. Cristales blancos con un ligero olor a ajo; p. fusión 47.5-48°C p. de vapor. No definido porque a temperatura ambiente es insignificante; es soluble en acetona, acetonitrilo, benceno, cloroformo, dioxano, etanol, metanol, tolueno, xileno, es insoluble en agua y disolventes hidrocarbonados. Es estable bajo condiciones normales de almacenamiento. Es compatible con la mayoría de los pesticidas y no es corrosivo; no es compatible con compuestos inorgánicos básicos, como el arseniato de calcio.

Usos: Insecticida y acaricida.

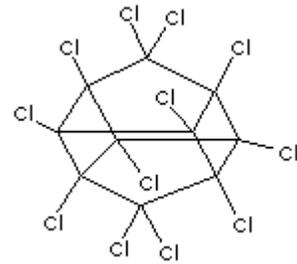
DL₅₀, ratones hembras, machos: 180-205mg/Kg. 135-170mg/Kg.

Mirex.

CAS. 2385-85-5 $C_{10}Cl_{12}$ P.M. 545.55g/mol

Nombre IUPAC. 1,1 α ,2,2,3,3 α ,4,5,5,5 α ,5 β ,6-dodecaclorooctahidro-1,3,4-metano-1H-ciclorburta [cd]pentaleno.

Otros nombres: Hexacloropentadieno, CG-1283,



Características y propiedades. Cristales blancos carentes de olor, p. fusión 485°C, se descompone a 525°C, p. de vapor 3E-7 mmHg, es prácticamente insoluble en agua, es soluble a temperatura ambiente en 15.3% dioxano, 14.3% en xileno, benceno 12%, tetracloruro de carbono 7.2%, etilmetilcetona 5.6%, tetrahidrofurano 30%, cloroformo 17%. Es extremadamente estable no reacciona con el ácido nítrico, sulfúrico; no reacciona con compuestos básicos y el ozono.

Usos: Insecticida, rodenticida y fungicida (prohibido); retarda el fuego en plásticos y papel (permitido).

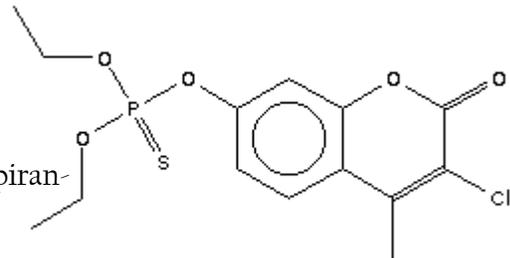
DL₅₀ oral, ratas: 600mg / Kg.

DL₅₀ cutánea, ratas: >2000mg/Kg.

Cumafos.

CAS. 56-72-4 $C_{14}H_{16}ClO_5PS$ P.M. 362.97g/mol

Nombre IUPAC. O-(3-cloro-4-metil-2-oxo-2H-benzopirano-7-il) O,O-dietilfosforoditioato.



Otros nombres: Asuntol®, Baymix®, Co-ral®, Meldano®, Muscatox®, Agridip®, etc.

Características y propiedades. Cristales de color beige con un olor ligeramente azufrado, p. fusión 91°C, p. de vapor (20°C) 9.7E-8mm Hg; es prácticamente insoluble en agua, es soluble en acetona, cloroformo, etanol y aceites. Es estable en agua, se descompone al calentarse, reacciona lentamente con bases para hidrolizarse.

Usos: Insecticida, nematocida y antihelmintico.

Modo de acción: Es inhibidor de la acetilcolinesterasa.

DL₅₀ oral, ratas: 16.45mg/ Kg.

n_D^{20} Índice de refracción 20°C.

d_4^{20} Gravedad específica a 20°C

The merck Index. Thirteen Edition 2001 USA.

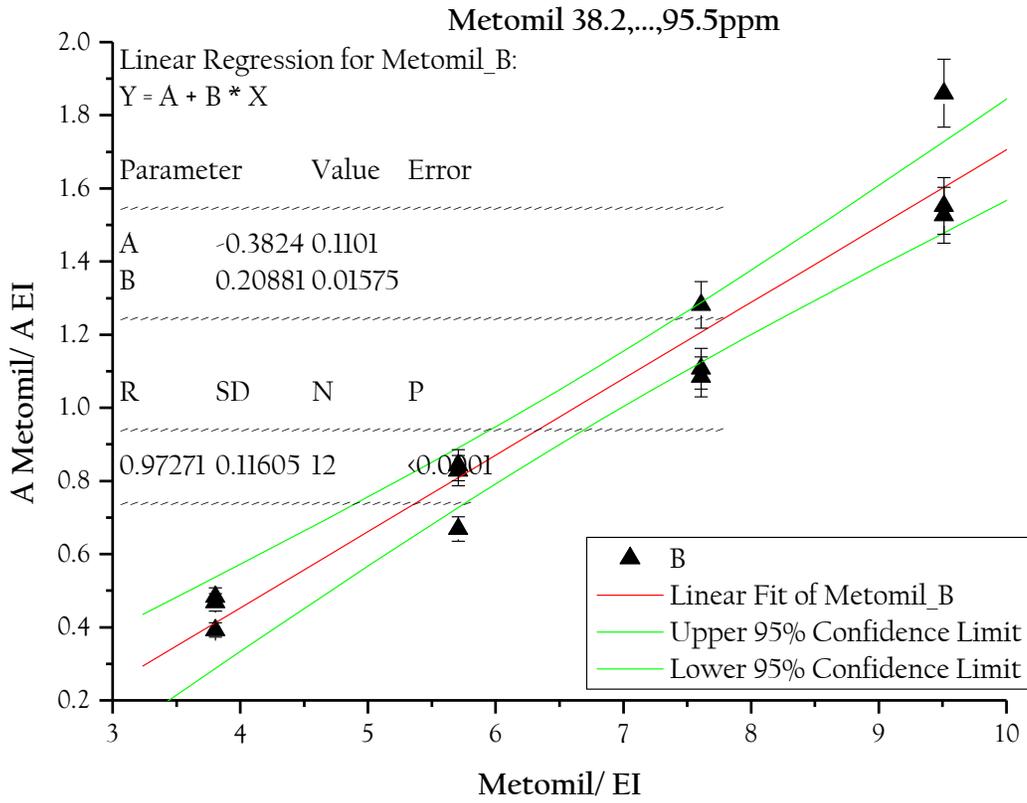
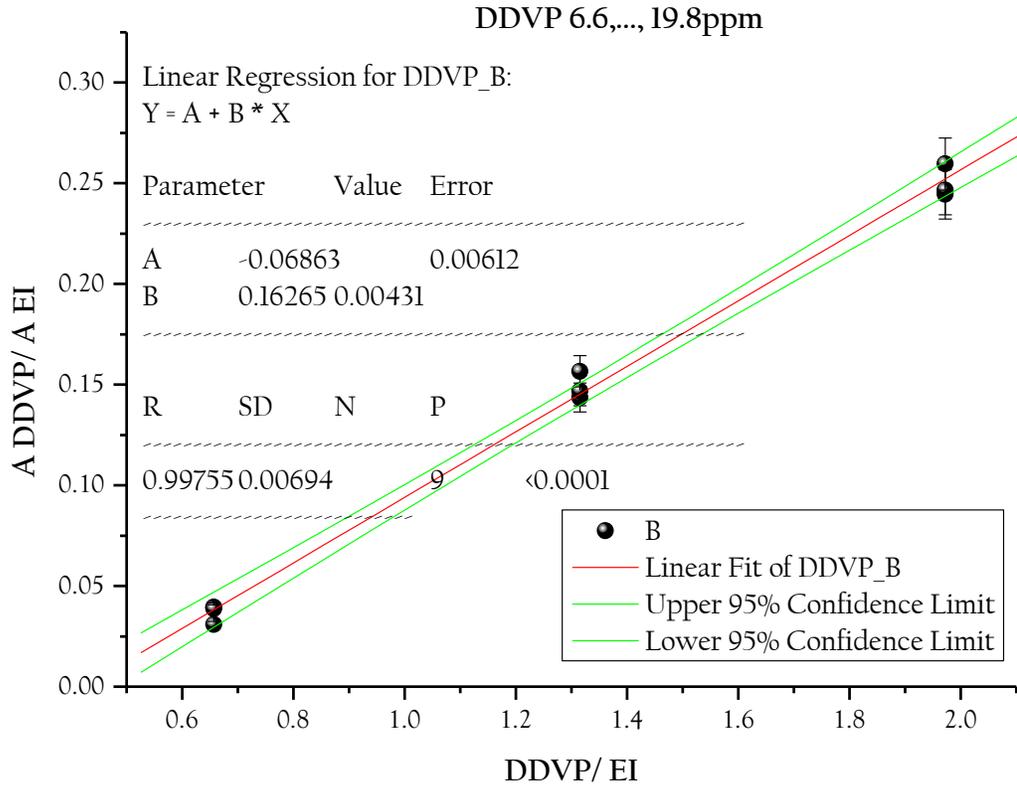
Whorthing and Walker. 1987. The pesticide manual. A world compendium. Published by the british Crop Protection Council 8th edition. Great Britain.

Wayland J. Hayes Jr, Edgard R Laws Jr. Handook of pesticide toxicology Vol, I, II, III. Academic Press. Inc 1991. USA.

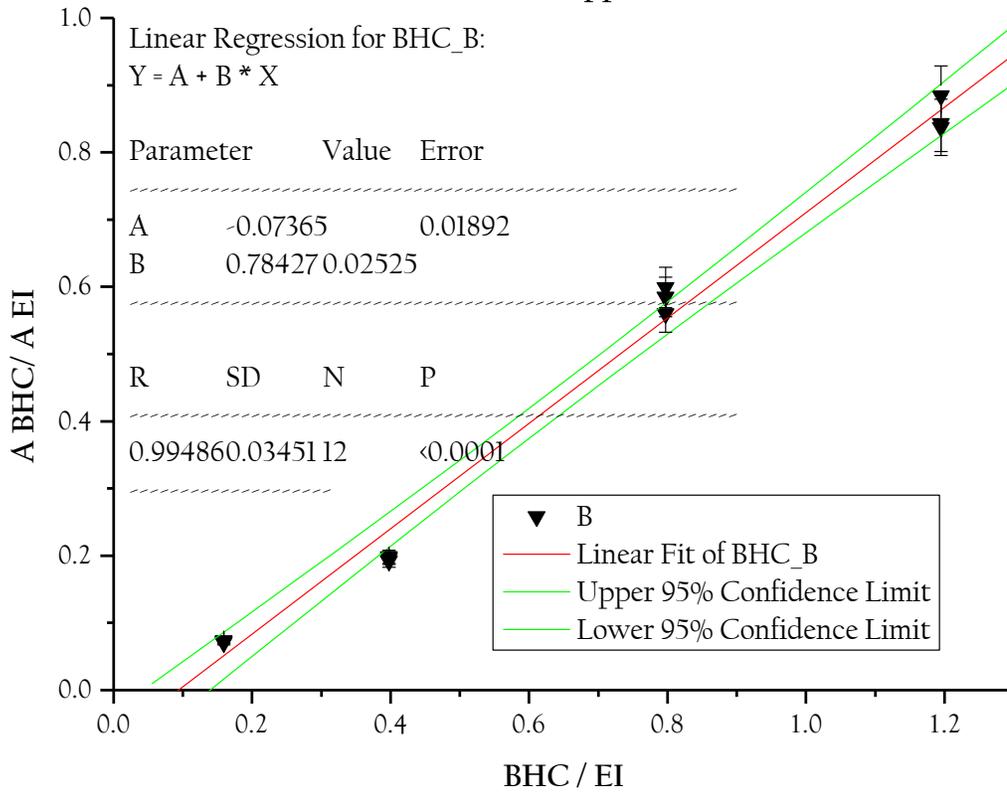
Anexo II.

Curvas de calibración.

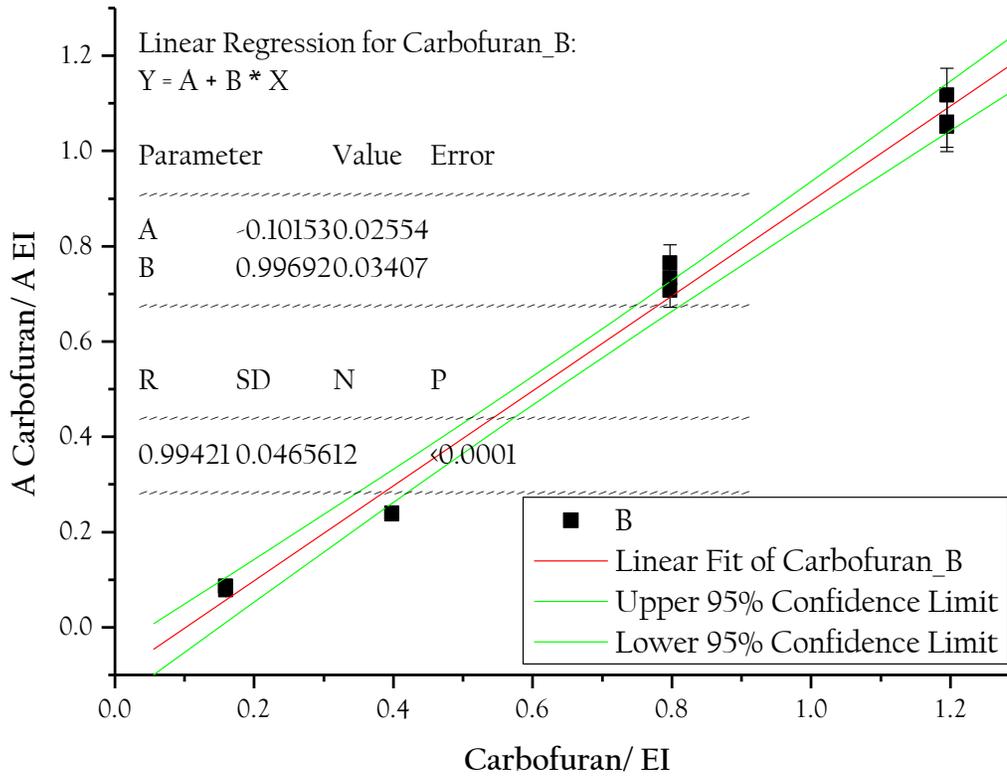
Curvas de Calibración SCAN .

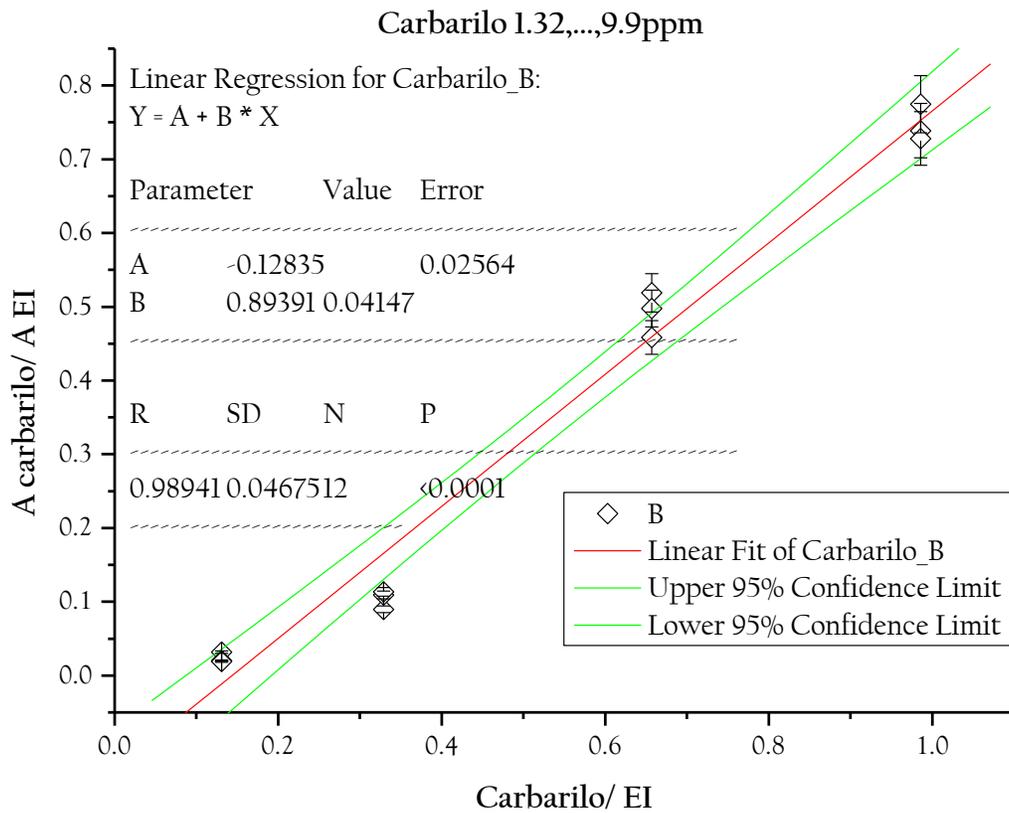
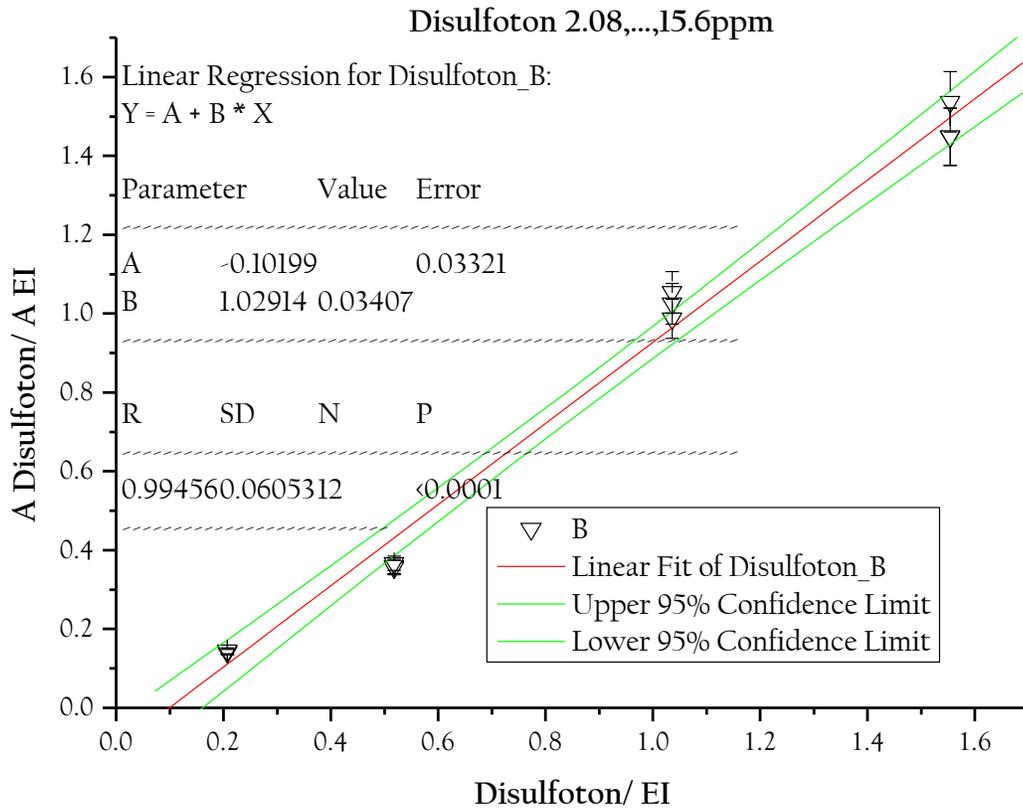


BHC 1.6,...,12ppm

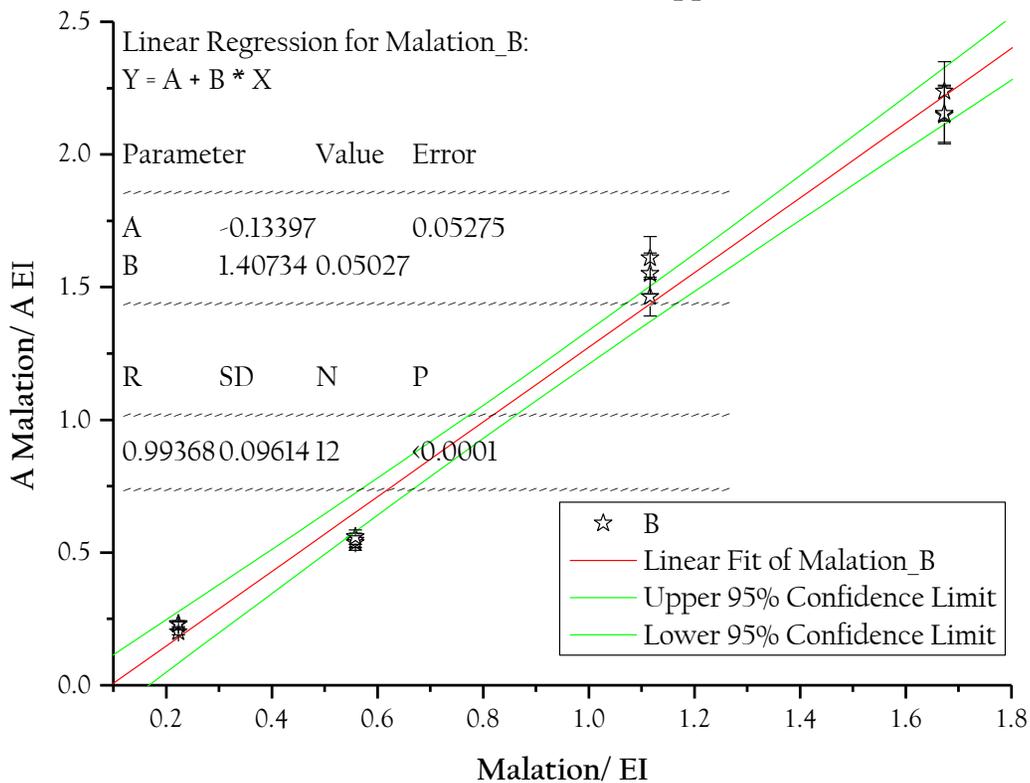


Carbofuran 1.6,...,12ppm

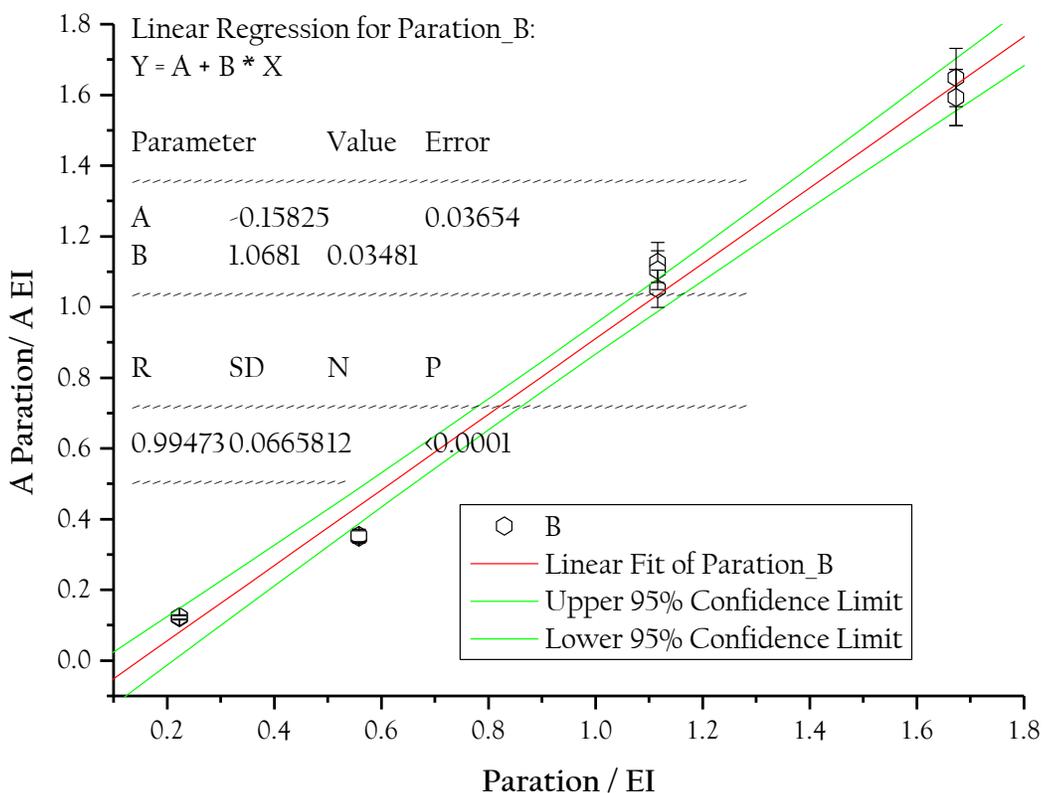




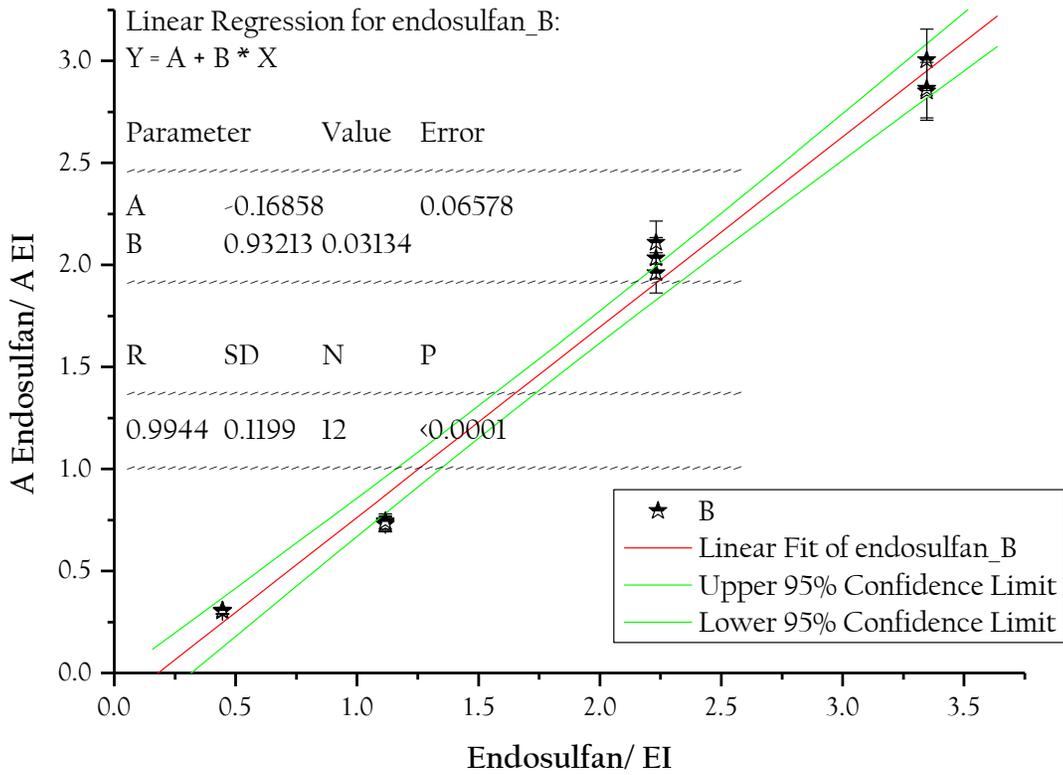
Malation 2.24, ..., 16.8 ppm



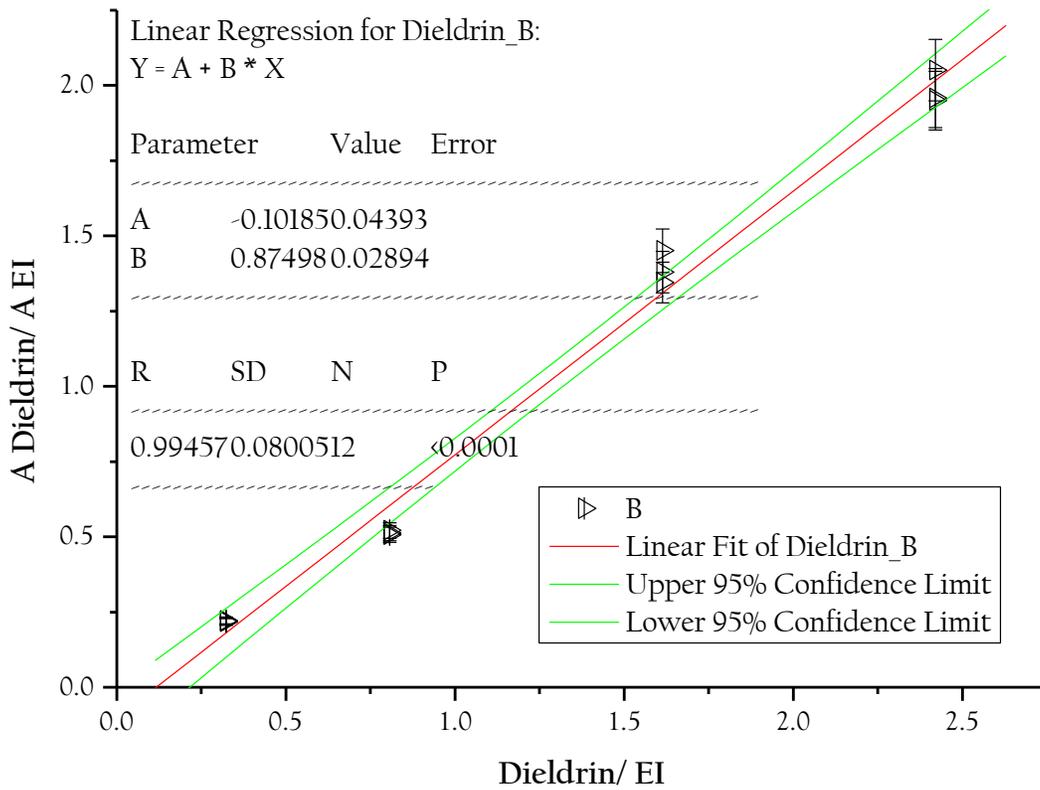
Paration 2.24, ..., 16.8 ppm



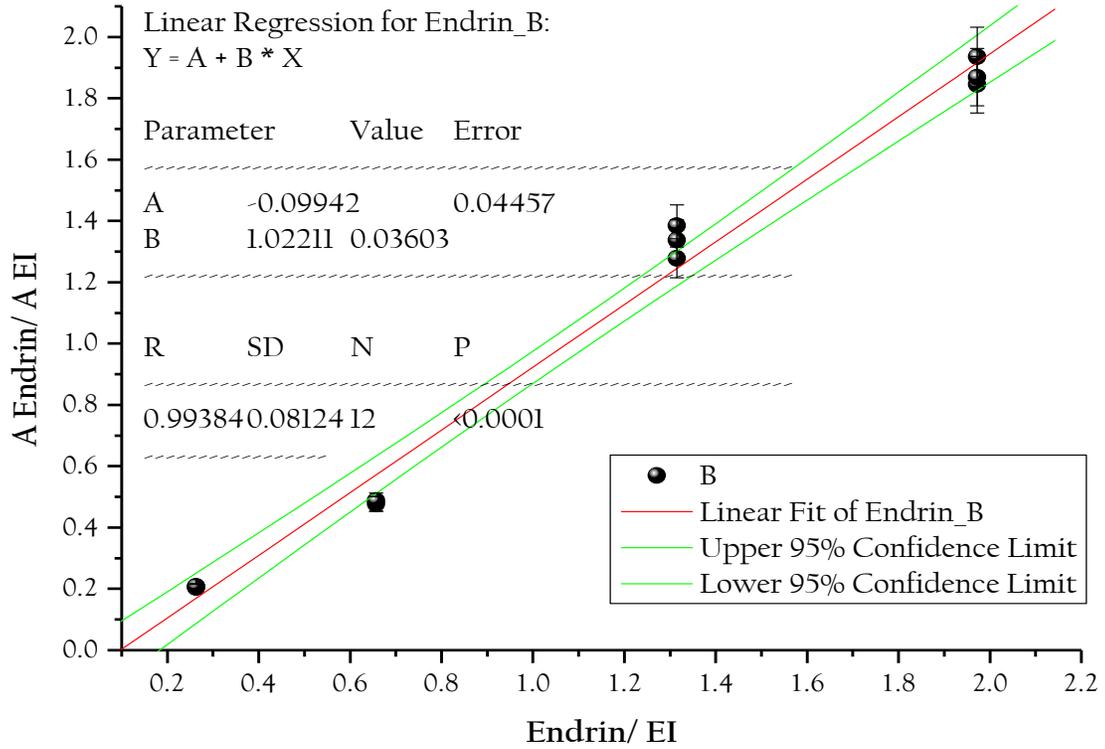
Endosulfan 4.48,...,33.6ppm



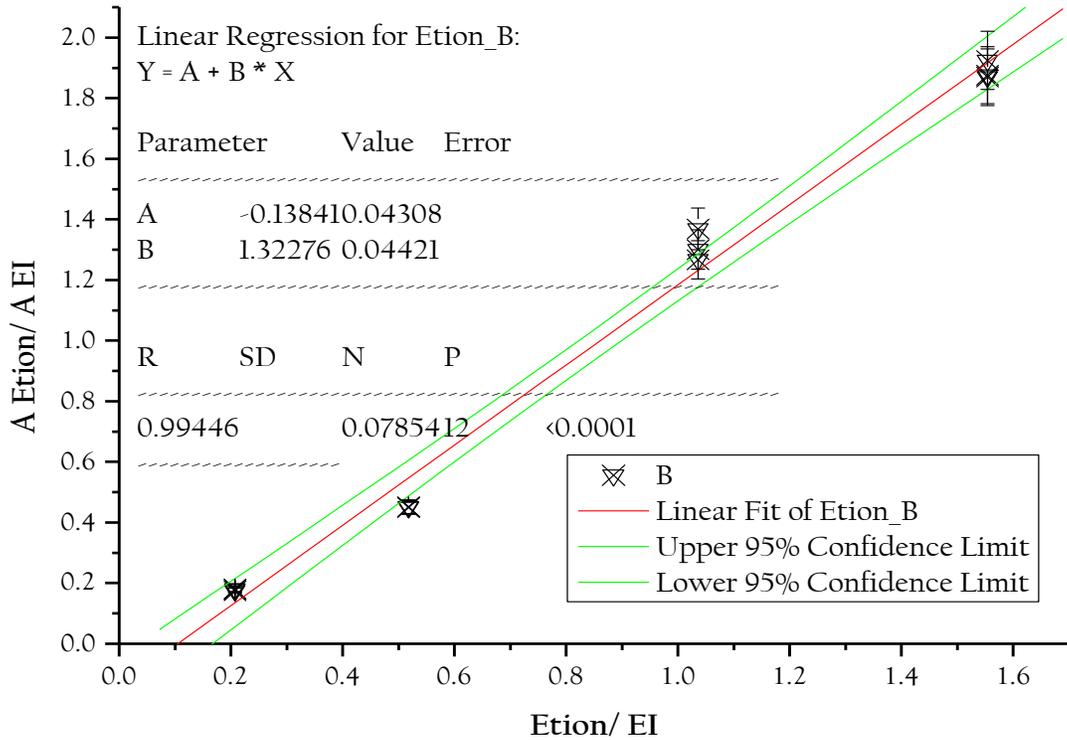
Dieldrin 3.24,...,24.3ppm



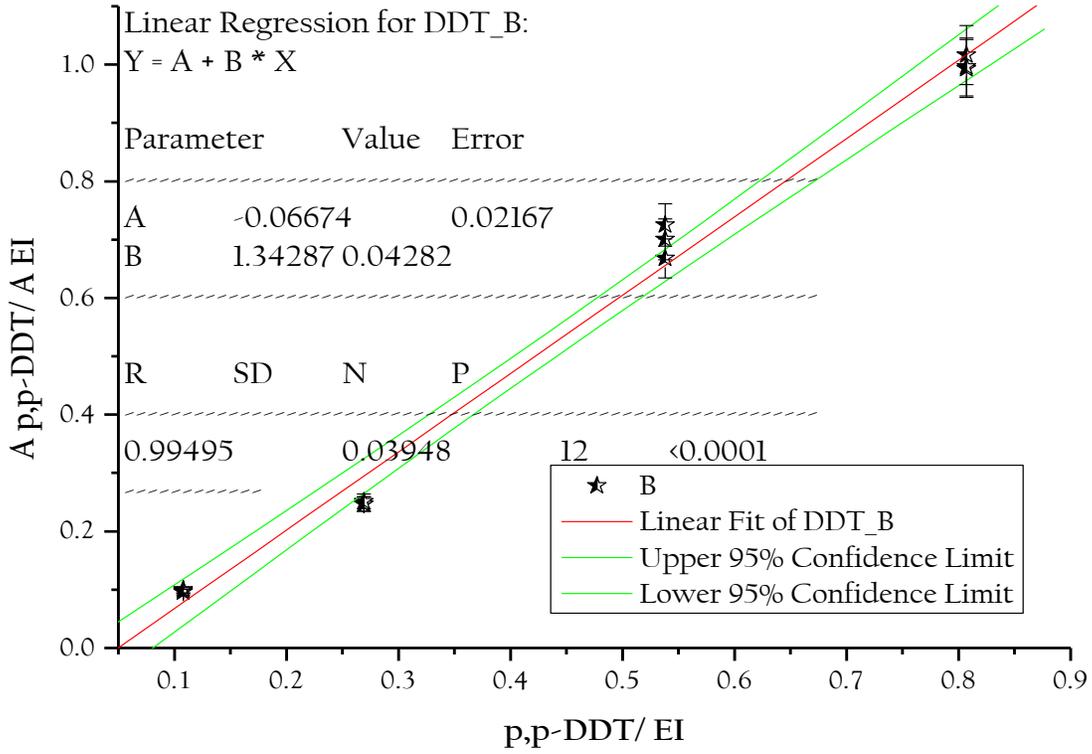
Endrin2.64,...,19.8ppm



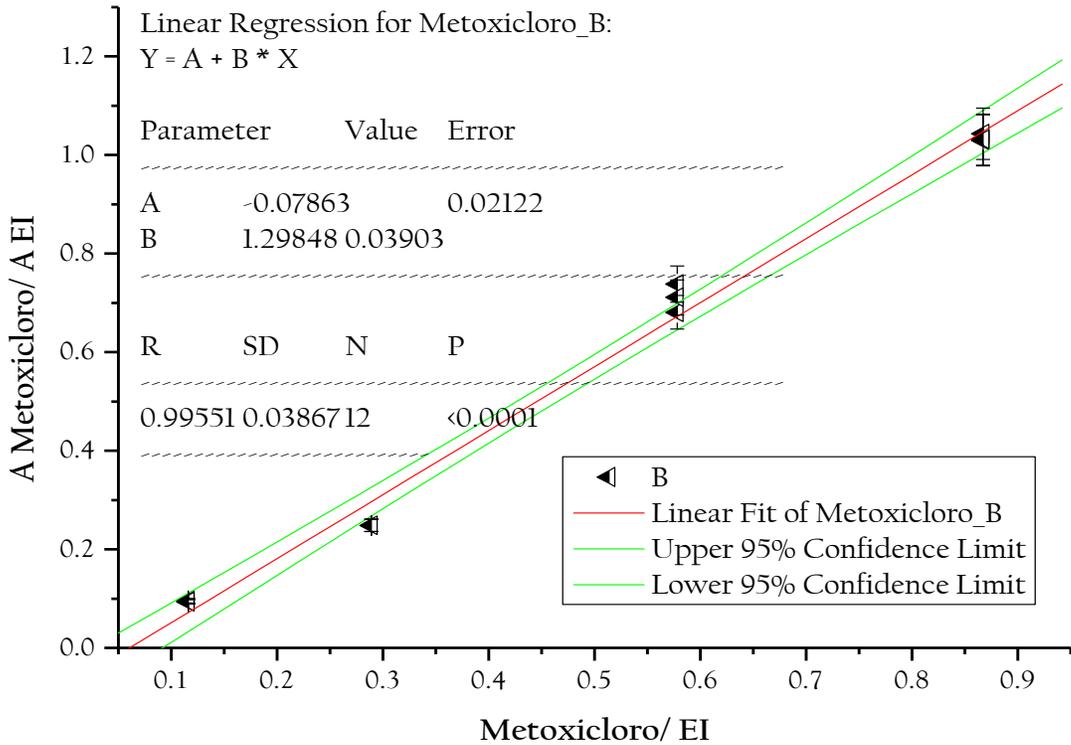
Etion2.08,...,15.6ppm



p,p-DDT 1.08,...,8.1ppm



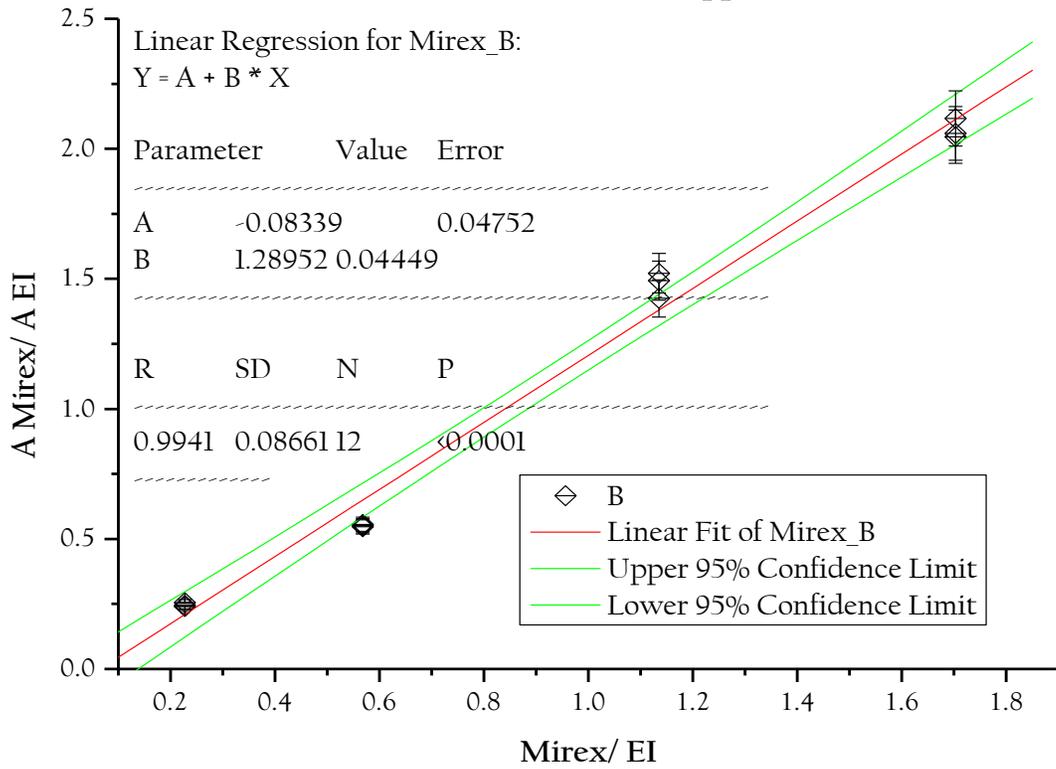
Metoxicloro 1.16,...,8.7ppm



Zolone 1.64, ..., 12.3ppm



Mirex 2.28, ..., 17.1ppm



Co-Ral o Cumafos 3.3,...,9.9ppm

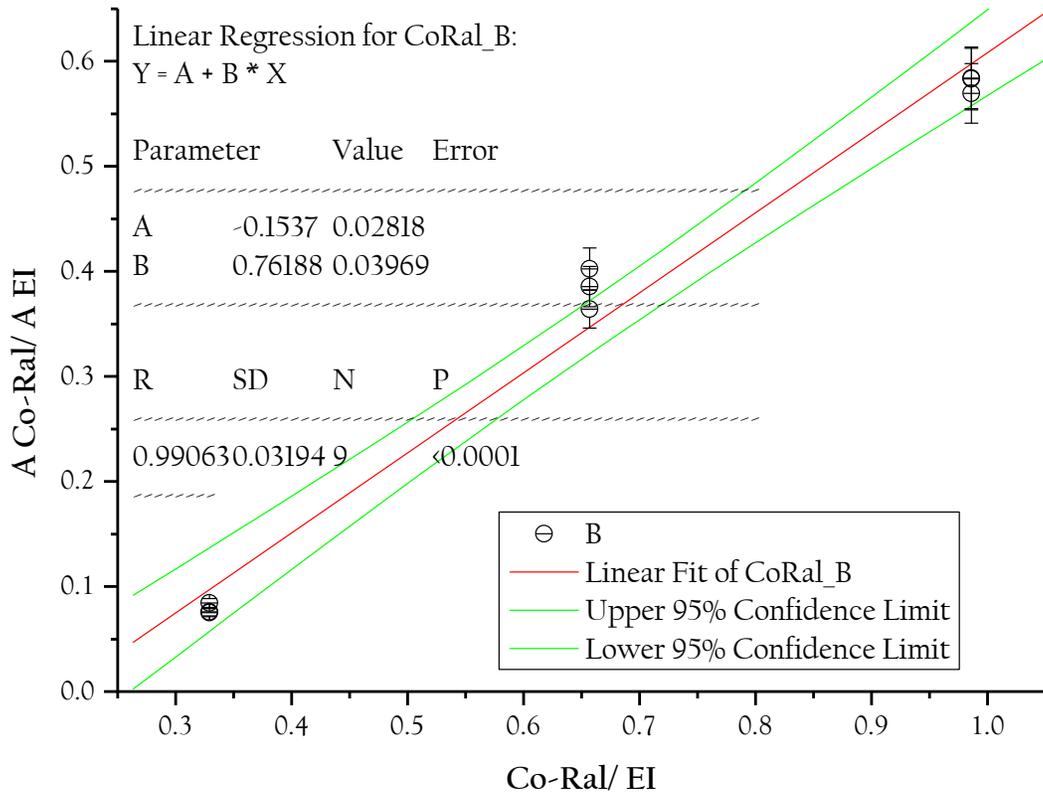
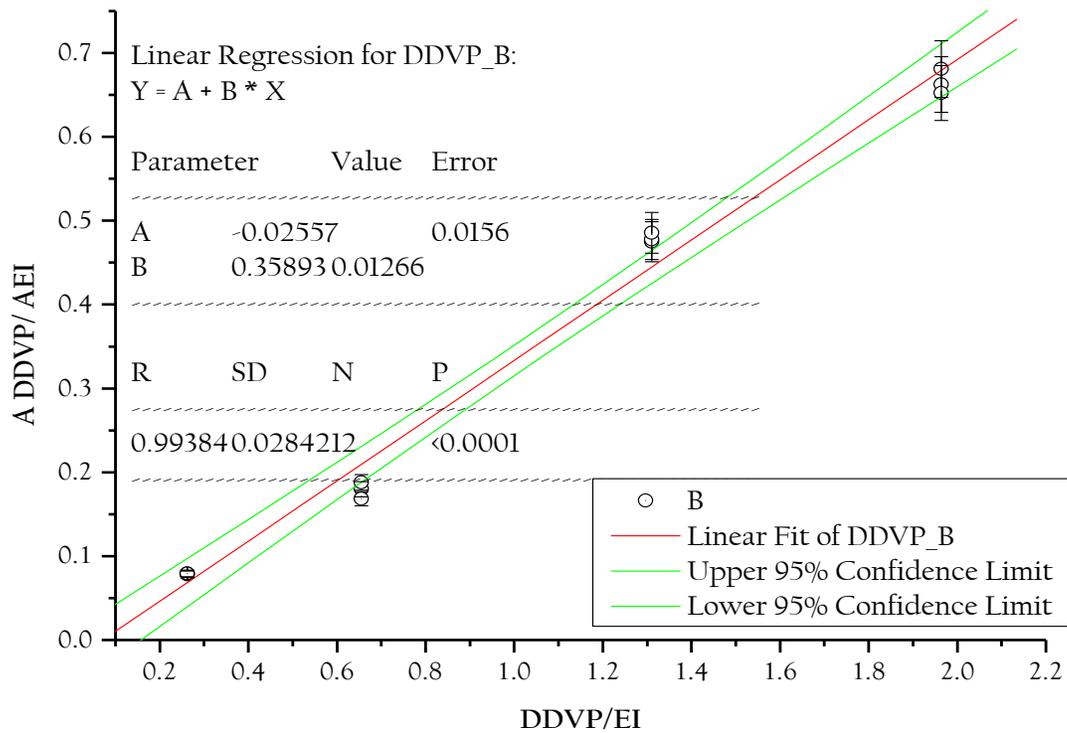


Tabla I Anexo II. Parámetros de regresión SCAN

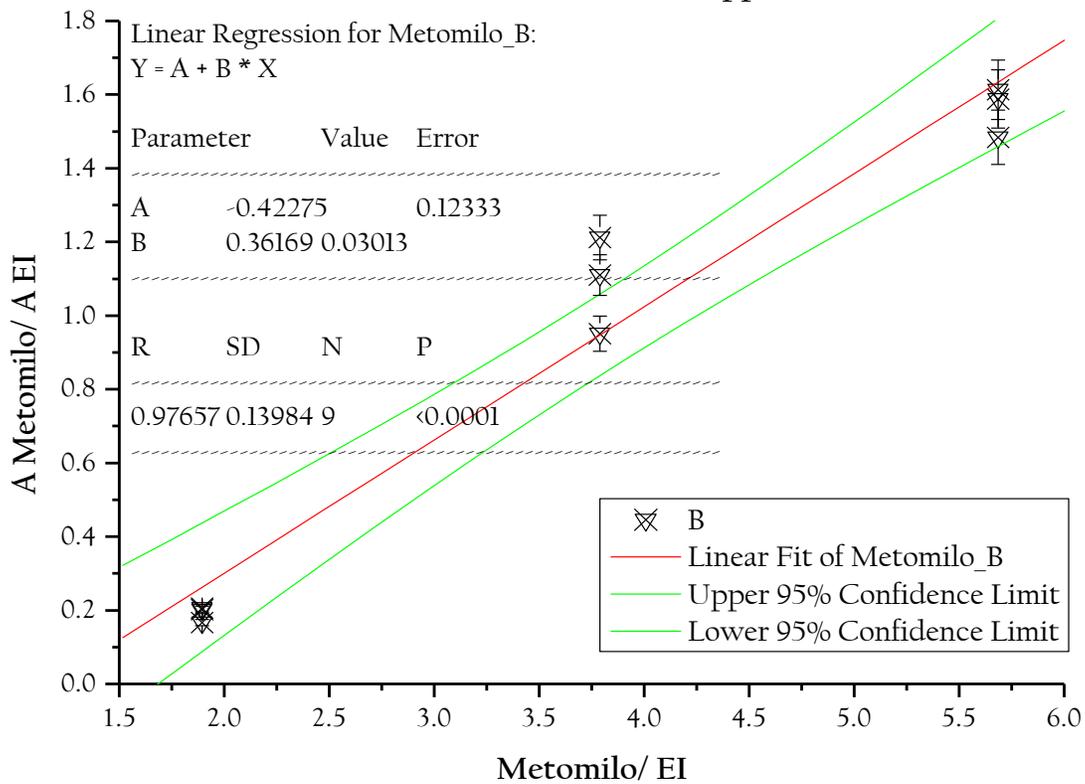
Pesticida	Pendiente	Ordenada	Coef. Corr
DDVP	0.163	-0.069	0.998
Metomilo	0.209	-0.382	0.973
Carbofuran	0.997	-0.102	0.994
BHC	0.784	-0.074	0.995
Disulfoton	1.029	-0.102	0.995
Carbarilo	0.894	-0.129	0.990
Aldrin	1.149	-0.099	0.995
Malation	1.407	-0.134	0.994
Paration	1.068	-0.147	0.995
Endosulfan	0.932	-0.169	0.994
Dieldrin	0.875	-0.102	0.995
Endrin	1.022	-0.099	0.994
Etion	1.323	-0.139	0.994
DDT	1.343	-0.066	0.995
Metoxicloro	1.299	-0.078	0.995
Zolone	0.602	-0.097	0.993
Mirex	1.289	-0.083	0.994
Co-Ral	0.762	-0.154	0.991

Curvas de calibración SIM.

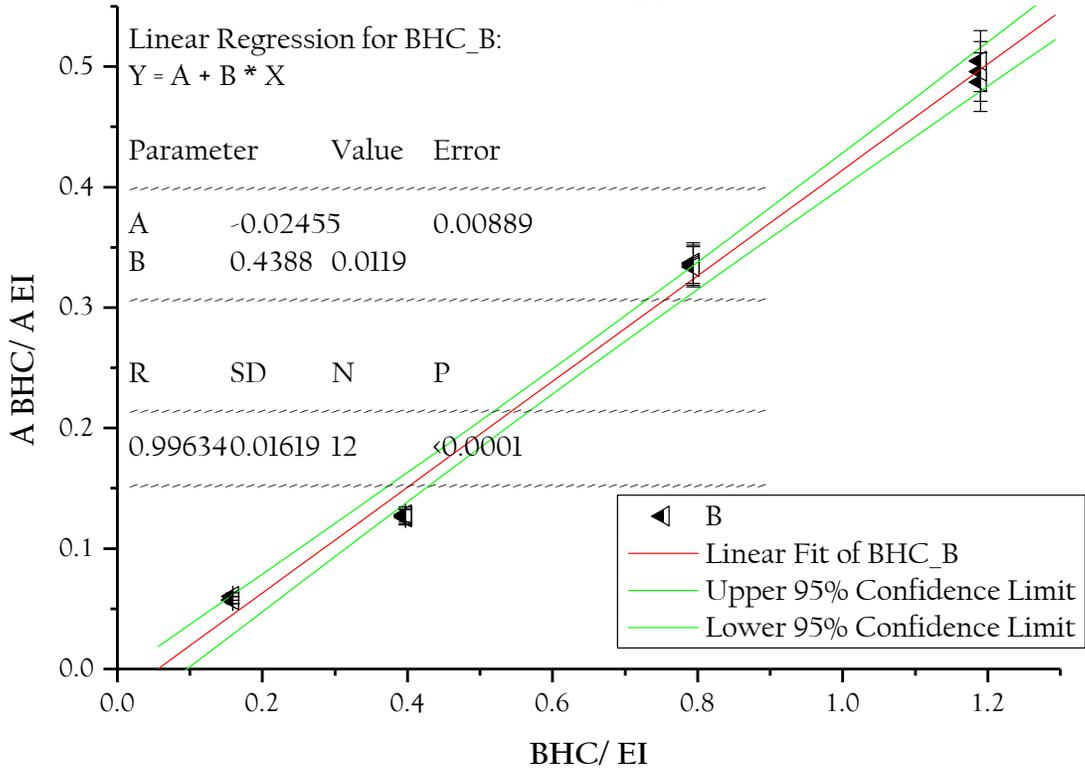
DDVP 2.64....19.8ppm



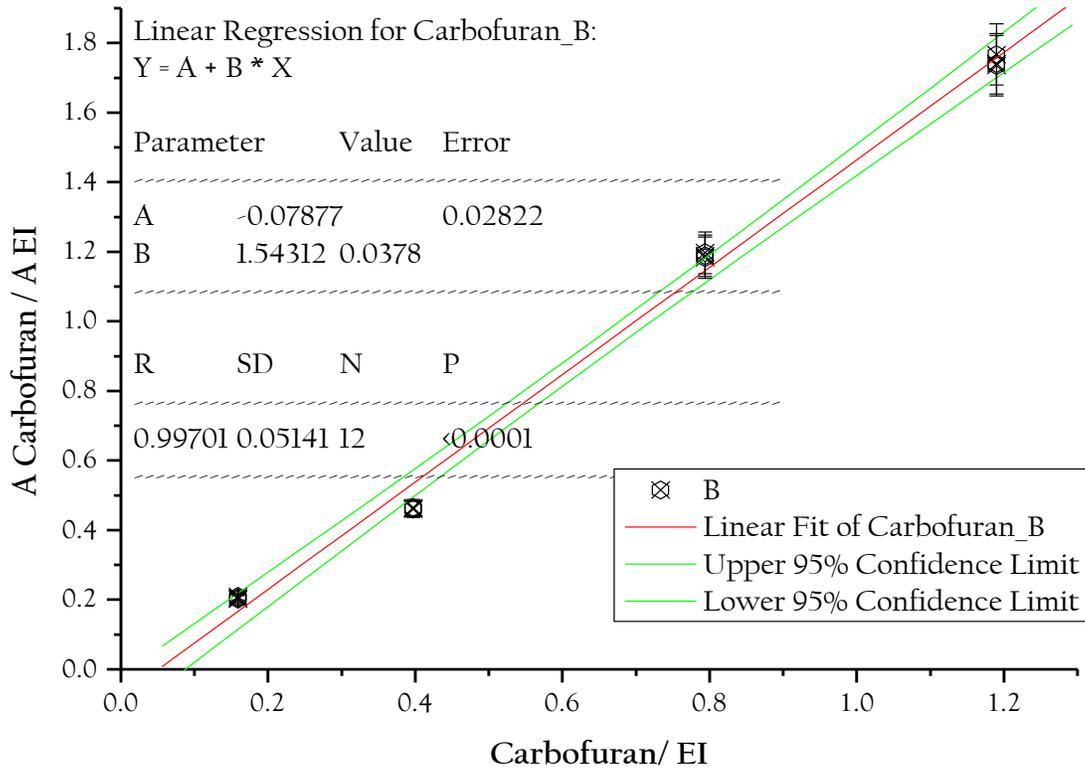
Metomilo 19.1... 57.3ppm



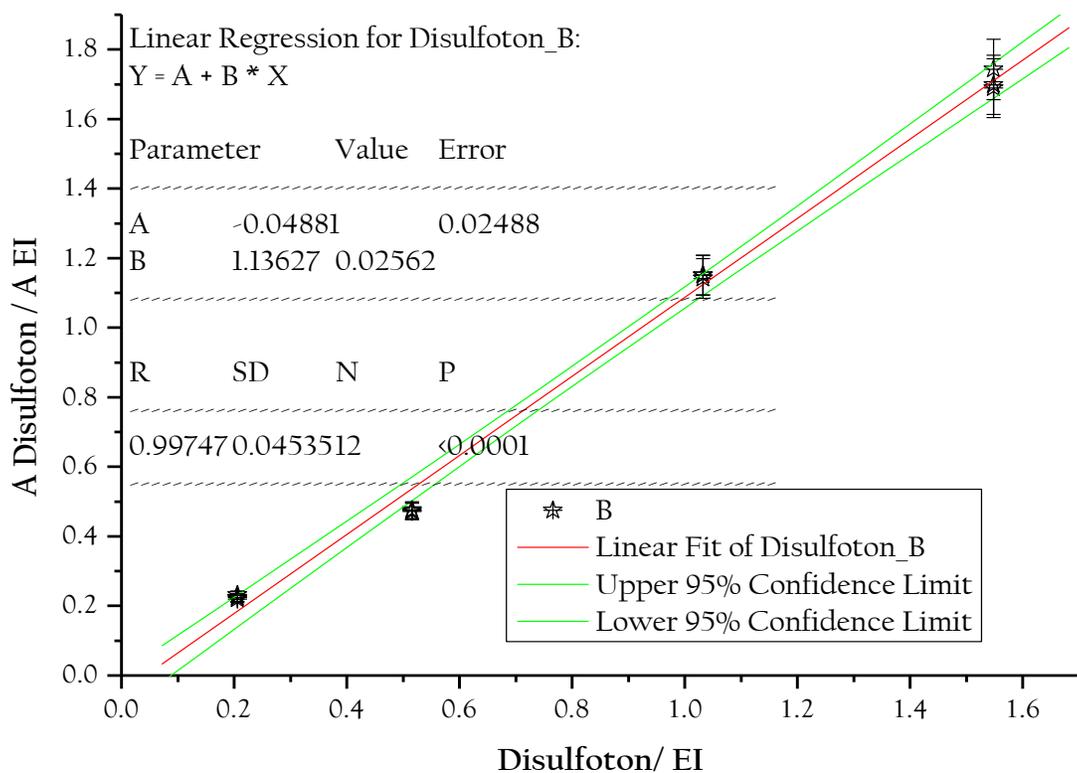
BHC 1.6...12ppm



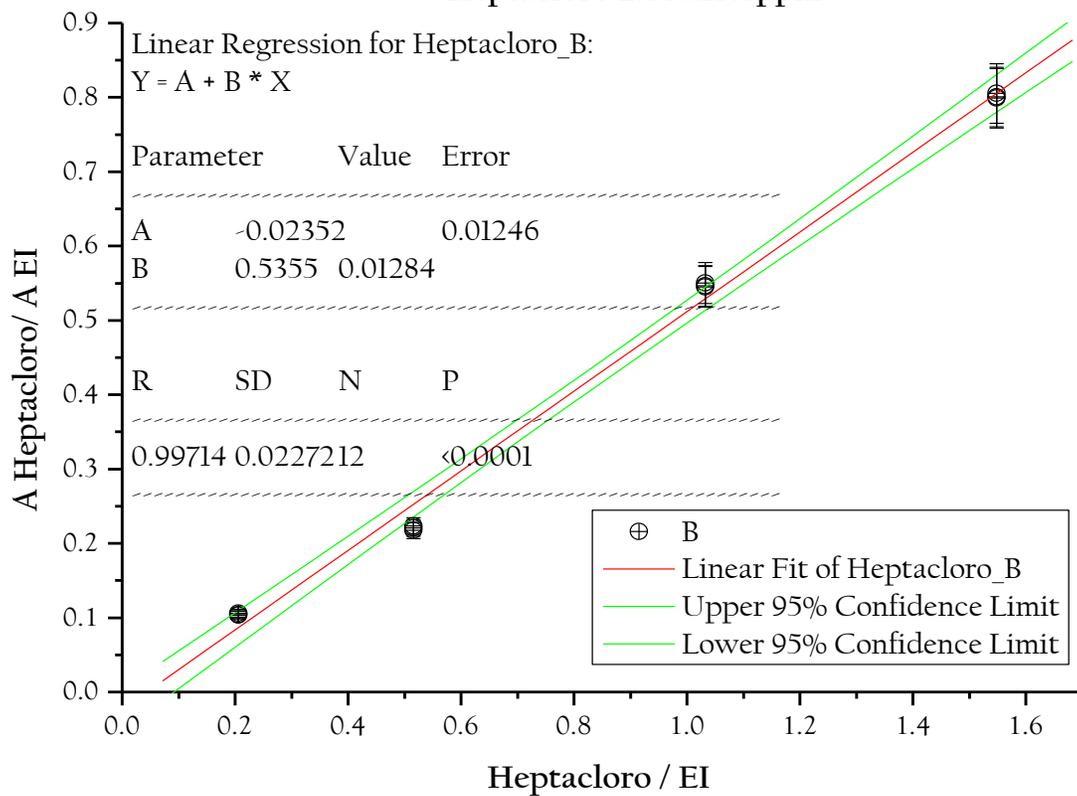
Carbofuran 1.6...12ppm



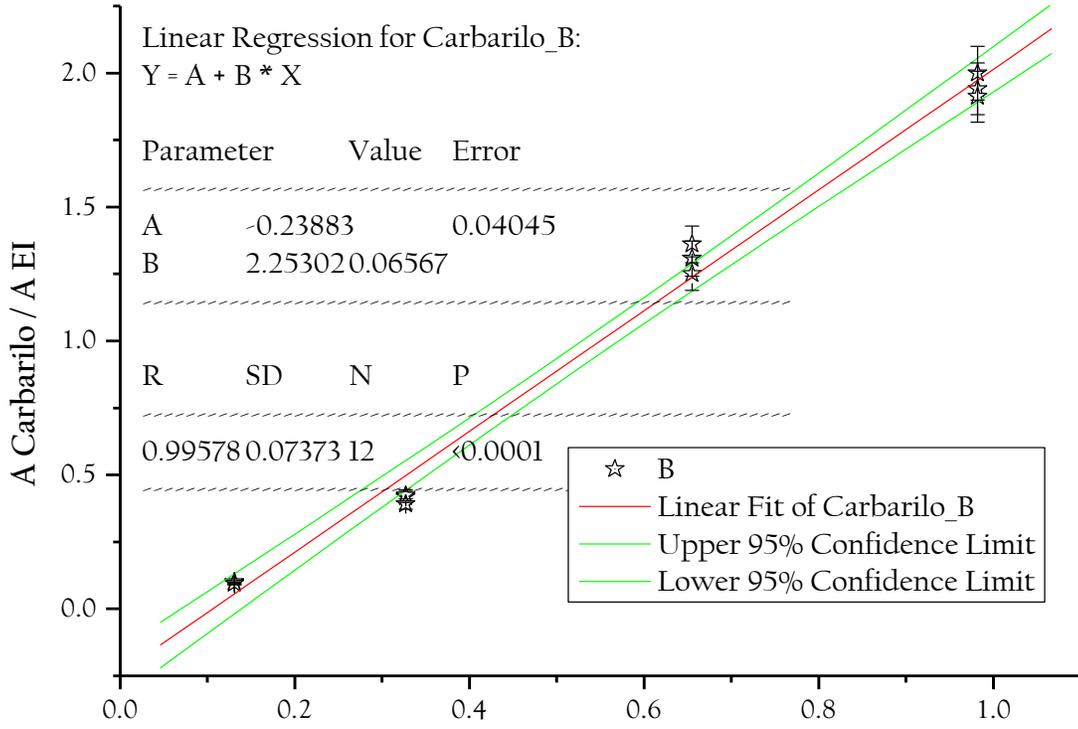
Disulfoton2.08....15.6ppm



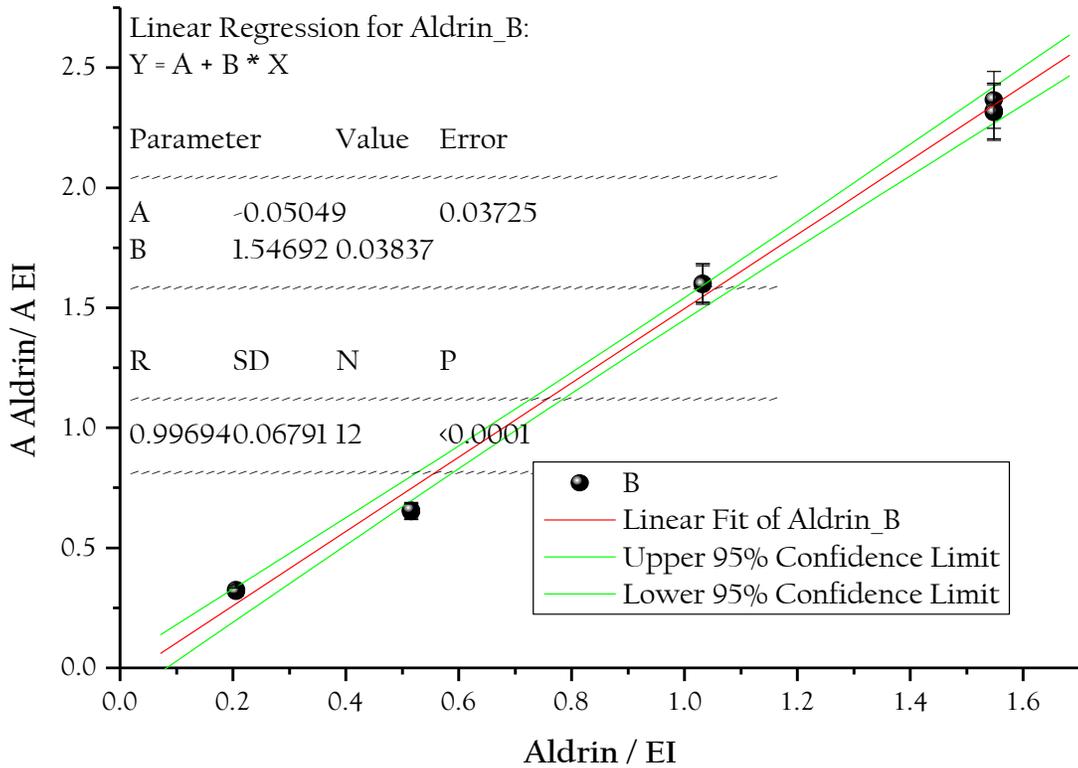
Heptachloro 2.08...15.6ppm

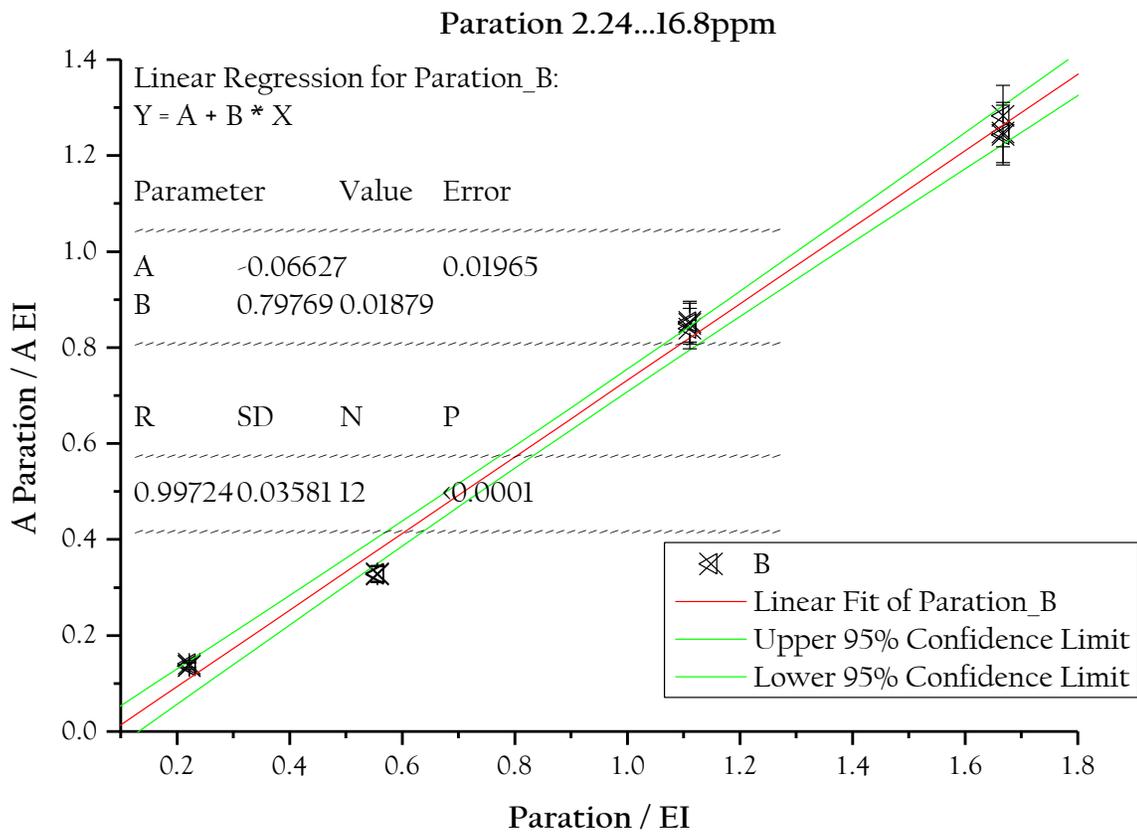
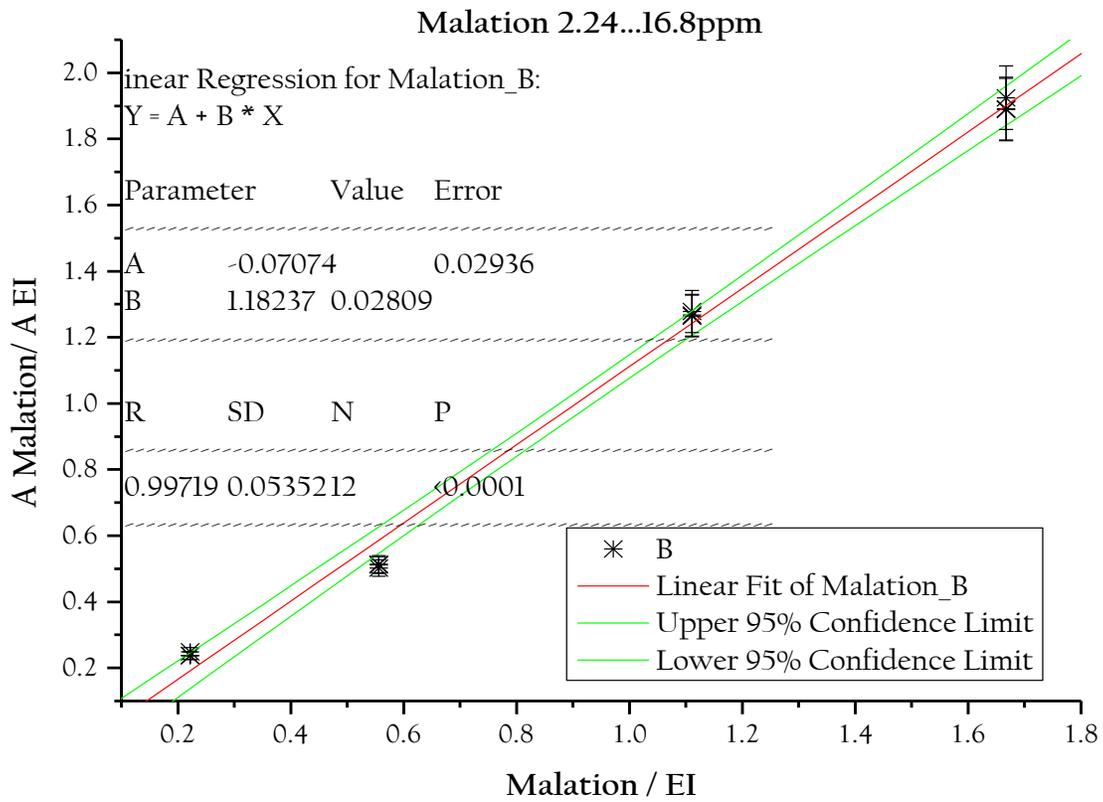


Carbarilo 1.32,...,9.9ppm

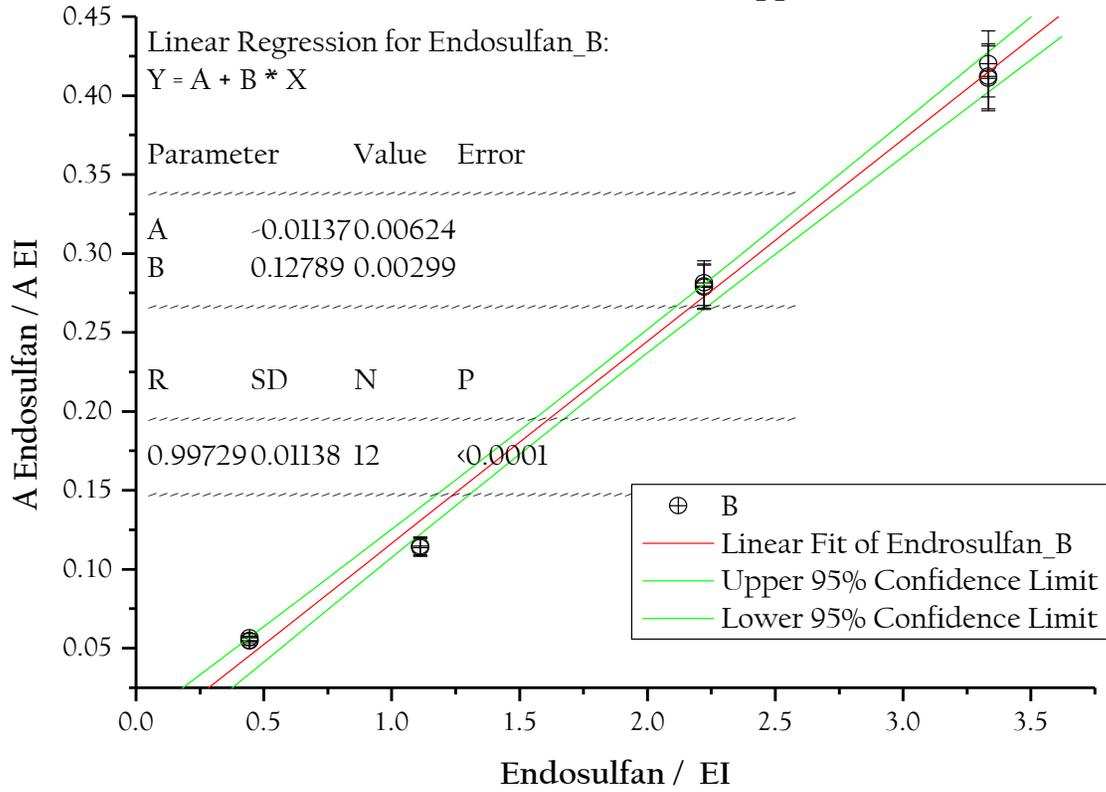


Aldrin 2.08...15.6ppm

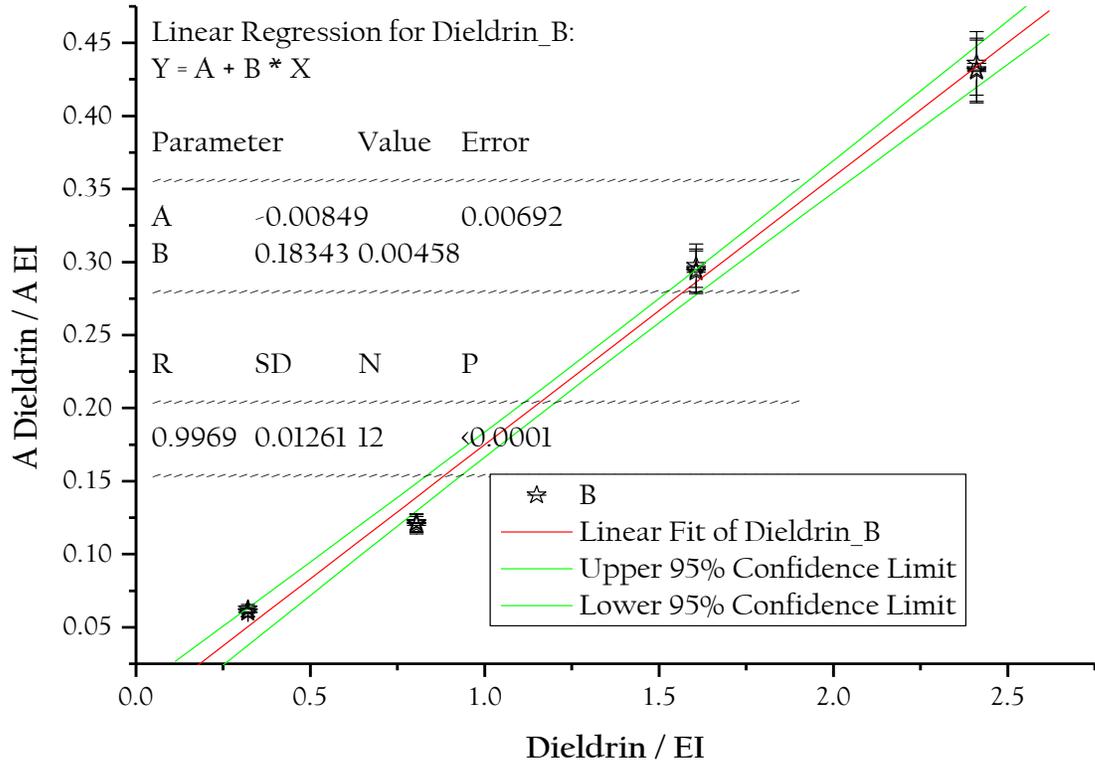




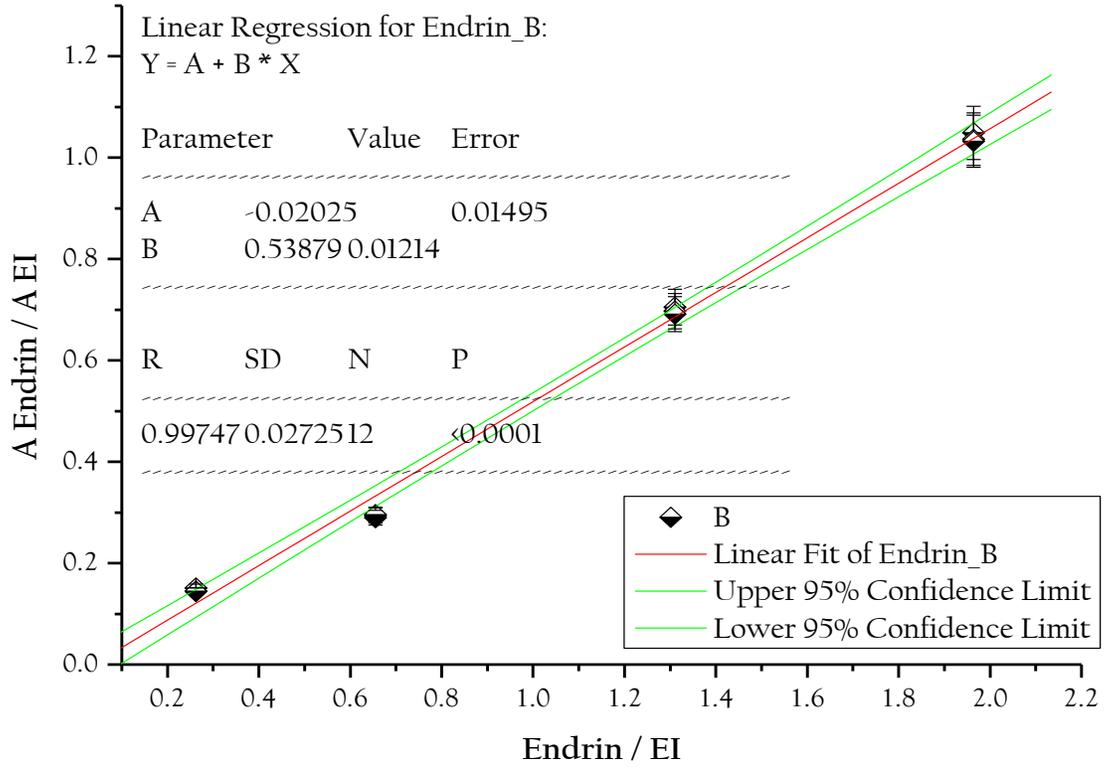
Endosulfan 4.48...33.6ppm



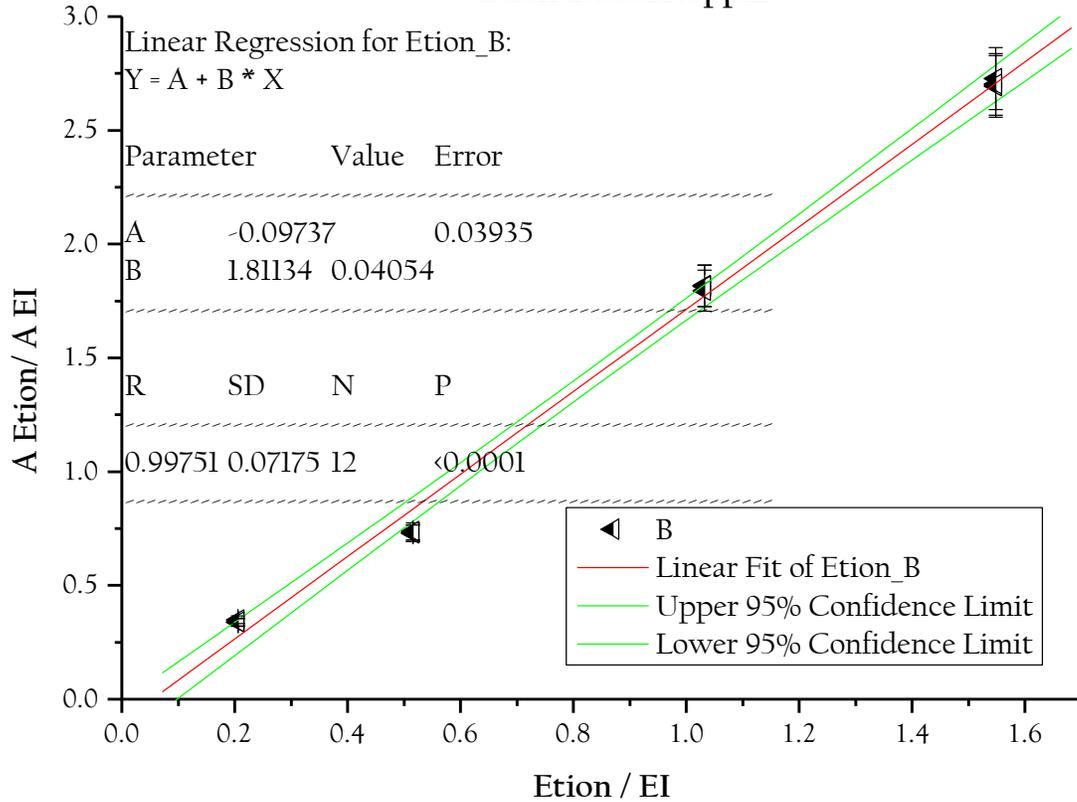
Dieldrin 3.24...24.3ppm



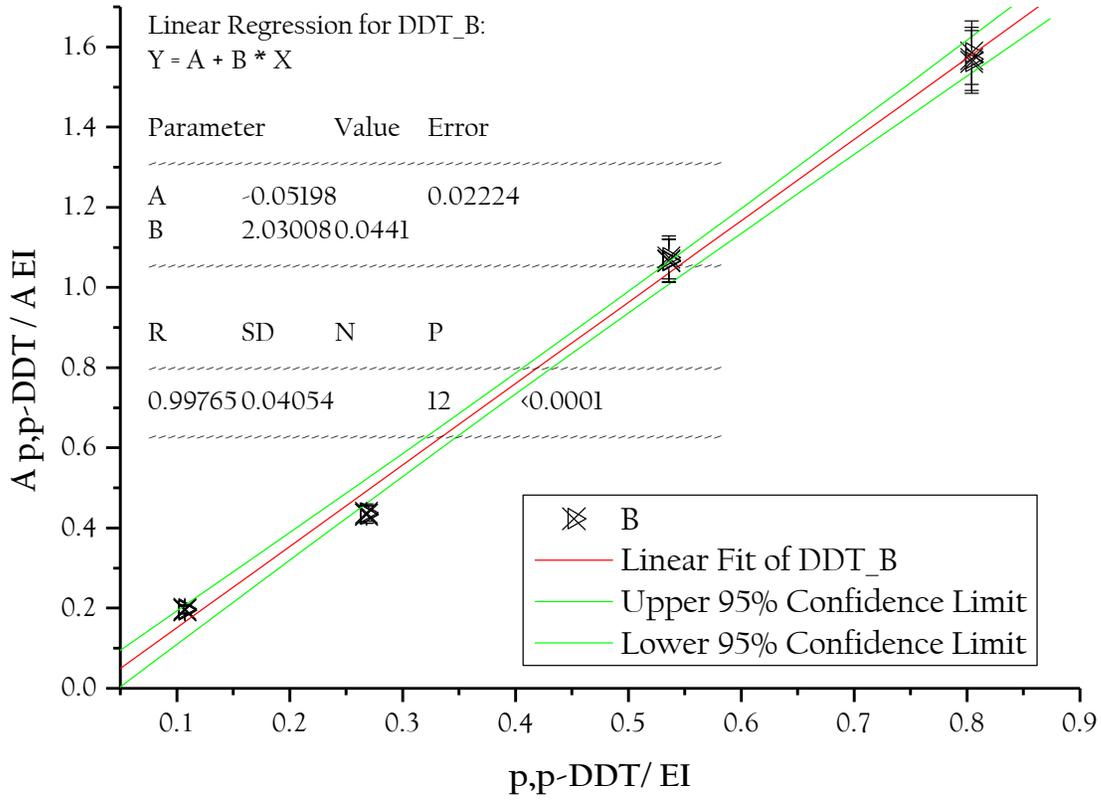
Endrin 2.64...19.8ppm



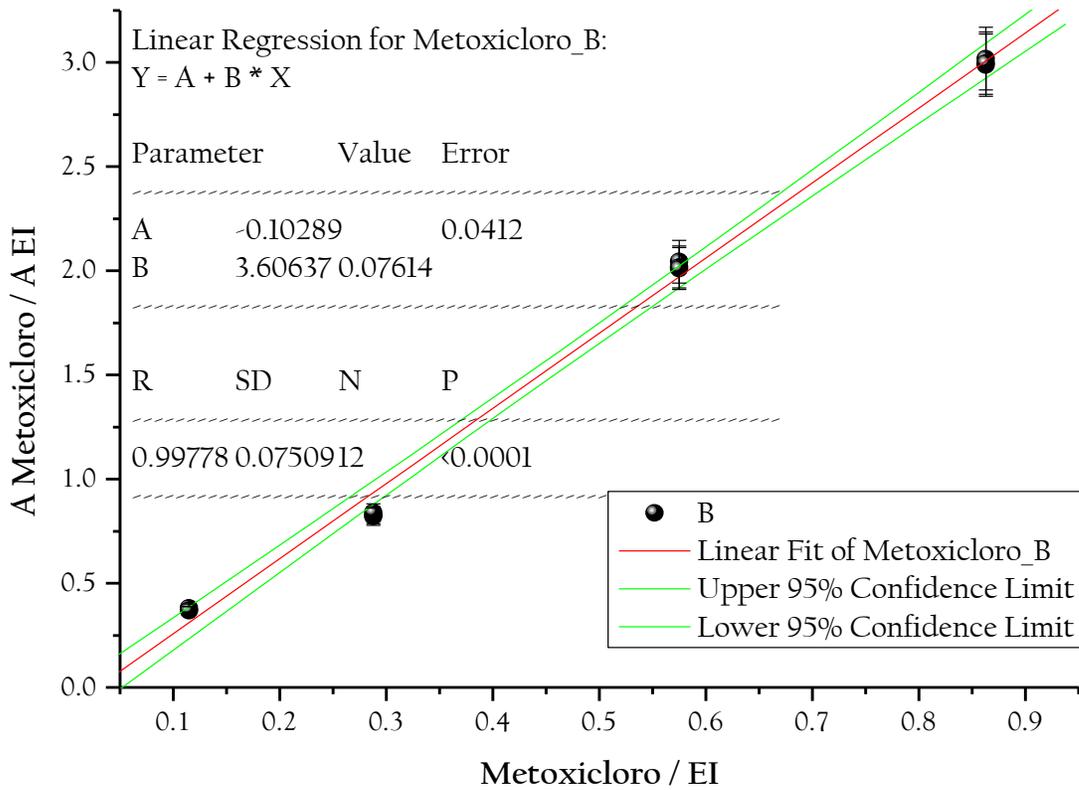
Etion 2.08...15.6ppm



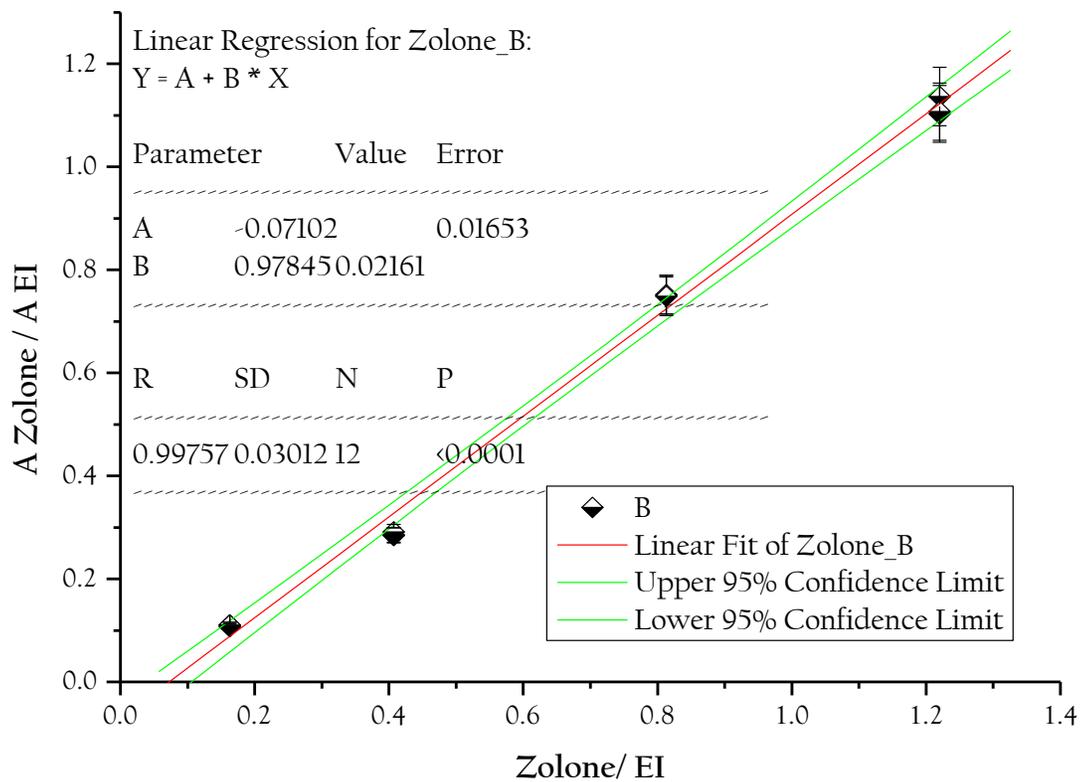
p,p-DDT 1.08...8.1ppm



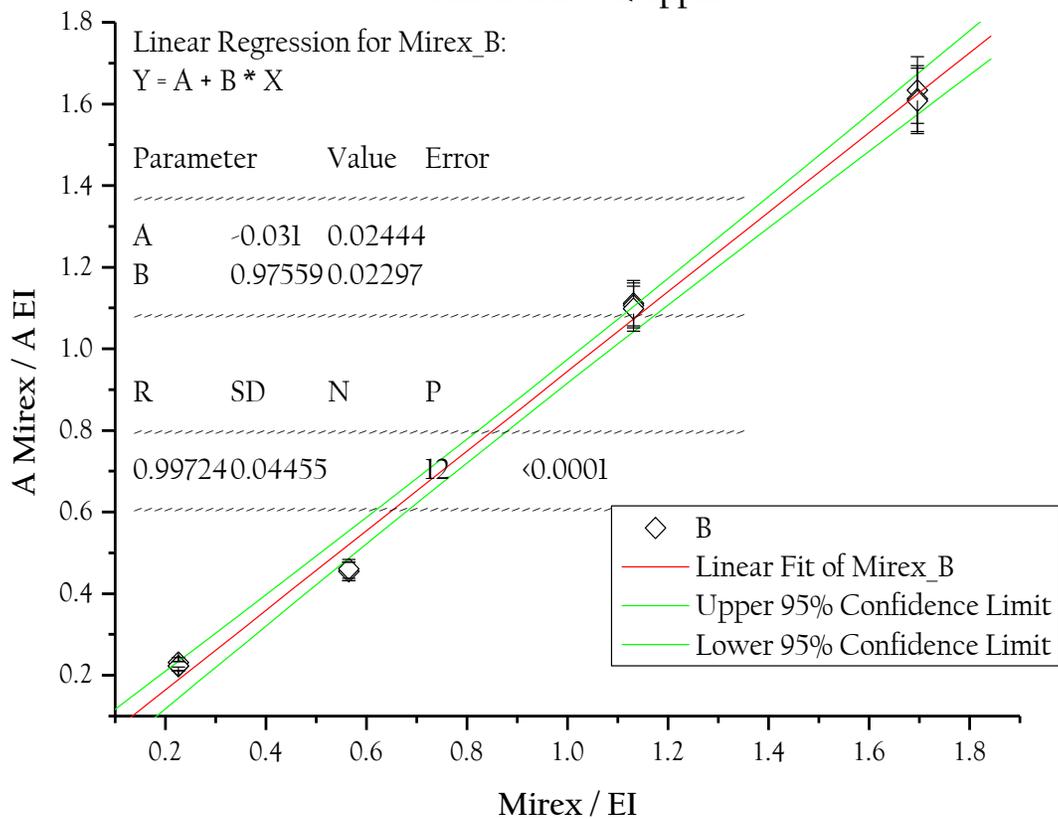
Metoxicloro 1.16...8.7ppm



Zolone 1.64...12.3ppm



Mirex 2.28... 17.1ppm



Co-Ral 1.32ppm...9.9ppm

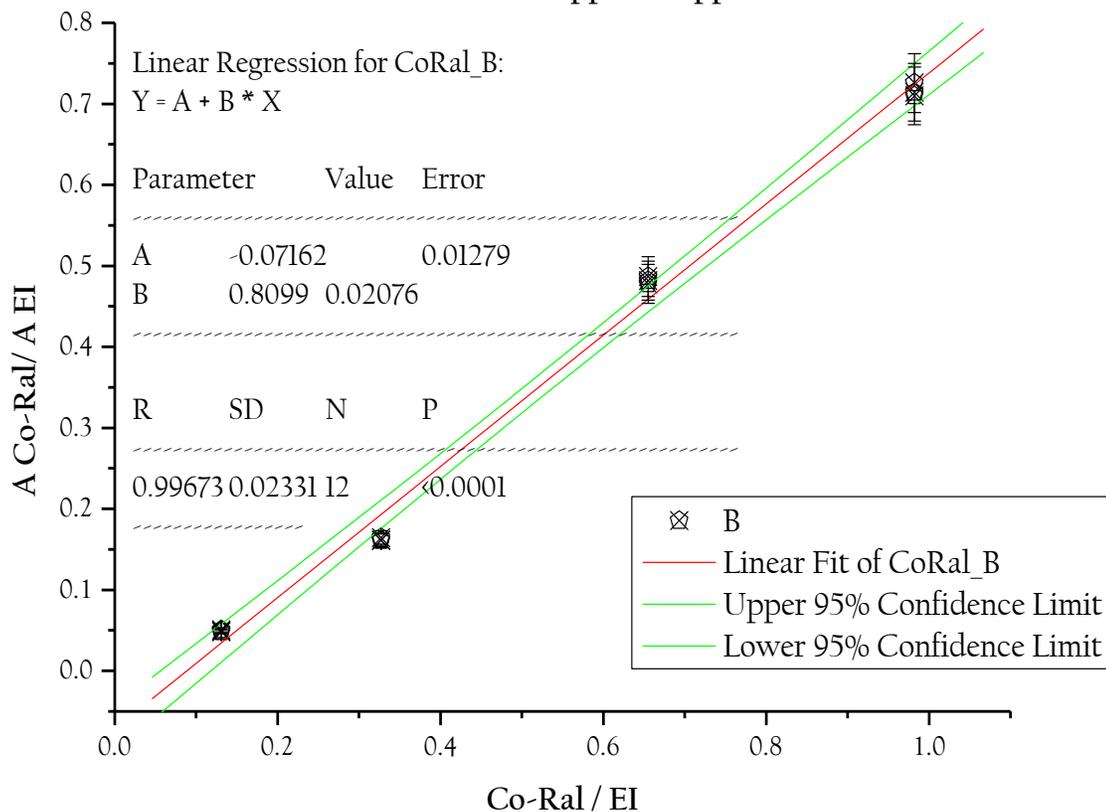


Tabla 2 Anexo II. Parámetros de regresión SIM.

Pesticida	Pendiente. B	Ordenada A	Coef. Corr R
DDVP	0.359	-0.025	0.994
Metomilo	0.362	-0.423	0.977
Carbofuran	1.542	-0.078	0.997
BHC	0.439	-0.024	0.996
Disulfoton	1.137	-0.049	0.997
Mparation	3.650	-0.265	0.997
Carbarilo	2.253	-0.239	0.996
Heptacloro	0.536	-0.024	0.997
Malation	1.183	-0.071	0.997
Aldrin	1.548	-0.051	0.997
Paration	0.798	-0.066	0.997
Endosulfan	0.128	-0.011	0.997
Dieldrin	0.398	-0.018	0.997
Endrin	0.276	-0.011	0.997
Etion	1.812	-0.098	0.998
DDT	2.032	-0.052	0.998
Metoxicloro	3.605	-0.103	0.998
Zolone	0.978	-0.071	0.998
Mirex	0.976	-0.031	0.997
Co-Ral	0.810	-0.072	0.997

Cálculos para determinar LDI y LCI usando el método matemático.

Si existe una relación entre la señal analítica (y) y la concentración del analito (x), la “mejor línea recta que pasa a través de los puntos de la curva de calibración se calcula con el método de los mínimos cuadrados.

Cada uno de los puntos de la grafica está sujeto a un error experimental. El método de mínimos cuadrados supone que todos los errores se encuentran en (y), lo que provoca que haya desviaciones en esta dirección entre los puntos experimentales y la recta calculada. Algunas de esas desviaciones (conocidas como los residuos de (y)) serán positivas y otras negativas, por lo que si intenta minimizar la suma de los cuadrados de los residuos. La recta se calcula basándose en el principio de que la línea debe pasar por el centro de gravedad de los puntos (x, y)

$$y = a + bx \quad (\text{EC1-2})$$

$$b = \frac{\sum_i \{(x_i - X)(y_i - Y)\}}{\sum_i (x_i - X)^2} \quad (\text{EC2-2})$$

$$a = \bar{y} - b\bar{x} \quad (\text{EC3-2})$$

Para calcular lo errores aleatorios de los valores de la pendiente y de la ordenada al origen, primero se calcula el valor de $S_{y/x}$ (desviación estándar sobre la regresión) con la relación:

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_i (y_i - y_{calc})^2}{n - 2}} \quad (\text{EC4-2})$$

Las desviaciones estándar sobre la pendiente (b) y sobre la ordenada al origen (a) están dadas por:

$$S_b = \frac{S_{y/x}}{\sqrt{\sum_i (x_i - X)^2}} \quad (\text{EC5-2})$$

$$S_a = S_{y/x} * \sqrt{\frac{\sum_i x_i^2}{n \sum_i (x_i - X)^2}} \quad (\text{EC6-2})$$

Para estimar si los puntos experimentales se ajustan bien o no a una línea recta, se calcula coeficiente de correlación momento-producto, r :

$$r = \frac{\sum_i \{(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})\}}{\sqrt{\left[\sum_i (x_i - \bar{x})^2 \right] \left[\sum_i (y_i - \bar{y})^2 \right]}} \quad (\text{EC7-2})$$

Límite de detección.

Para calcular el límite de detección es necesario conocer los intervalos de confianza sobre la recta calculada:

$$y_{\pm} = \bar{y} + b(x_i - \bar{x}) \pm tS_{y/x} \sqrt{1 + \frac{1}{n} + \frac{(x_i - \bar{x})^2}{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}} \quad (\text{EC8-2})$$

En donde t es el valor de la “t de student”, a dos colas, con un nivel de confianza s para $n-2$ grados de libertad.

Se calcula primero el valor de y , para $x_i = 0$. Con este valor se calcula el valor correspondiente de x en la recta (y). Para despejar el valor de x de las ecuaciones de la recta (y_{\pm}) se utiliza un término auxiliar C :

$$C = b^2 - \frac{(t * S_{y/x})^2}{\sum_i (x_i - \bar{x})^2} \quad (\text{EC9-2})$$

Por lo que despejando x_i en la ecuación EC8-2 para la recta (y_i) se obtiene:

$$x_1 = \bar{x} - \frac{b}{C}(\bar{y} - y_0) - \frac{tS_{y/x}}{C} \sqrt{\left(1 + \frac{1}{n}\right)C + \frac{(y_0 - \bar{y})^2}{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}} \quad (\text{EC10-2})$$

y para la recta (y):

$$x_2 = \bar{x} - \frac{b}{C}(\bar{y} - y_0) + \frac{tS_{y/x}}{C} \sqrt{\left(1 + \frac{1}{n}\right)C + \frac{(y_0 - \bar{y})^2}{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}} \quad (\text{EC11-2})$$

Entonces, el límite de detección se obtiene sustituyendo el valor calculado de (y_*) para $x=0$ en la ecuación (ECII-2).

Para calcular el límite de cuantificación, se calcula ahora el valor de (y_*) para $x=LD$, y nuevamente con este valor se calcula el valor de (x) en la recta (y). Este valor corresponde al límite cuantificación

Cálculos de recobro y de determinación de pesticidas.

Formulas empleadas para el cálculo del recobro y cuantificación de pesticidas en las muestras:

Ecuación de la recta: $y = a + bx$ es decir: $\frac{A_p}{A_{EI}} = a + F_{rr} \frac{C_m}{C_{EI}}$

Concentración del pesticida en un lml de extracto (C_{lml}):

$$C_{lml} = \left[\frac{\left(\frac{A_p}{A_{EI}} \right) - a}{F_{rr}} \right] * C_{EI} = mgP / L$$

Concentración del pesticida en la muestra (C_M):

$$C_M = \frac{C_{lml} \frac{mg}{l}}{[100]} = \frac{mg \text{ de pesticida}}{Kg \text{ de muestra}}$$

Donde [100] = es el factor concentración

Calculo del recobro (%R)

$$\%R = \frac{C_M}{C_T} * 100$$

En el siguiente ejemplo se mostrara los cálculos que se realizaron para estimar la concentración de los pesticidas en las muestras de fresa.

$$C_{EI} = 10.04 \text{ ppm}$$

$$\text{Malation. } C_T = 11.2 \text{ ppm}$$

Frr	1.183
ord	-0.071

Archivos	Areas		% Recobro Surr =100%		
	Malation	E.I	A_p / A_{EI}	C_{1ml}	$C_{1ml} \text{ Corr.}$
PEST093	25119270	18990026	1.322761	11.831	11.831
PEST094	25845899	18915071	1.366418	12.20162	12.20162
PEST095	24680740	18580242	1.328333	11.8783	11.8783
				C_M	11.97
				<i>Desv std</i>	0.201718
				<i>Int conf</i>	0.500787

Concentración en la muestra:

$$C_M = \frac{11.97 \frac{mg}{L}}{[100]} = 0.12 \frac{mg \text{ de pesticida}}{Kg \text{ de muestra}}$$

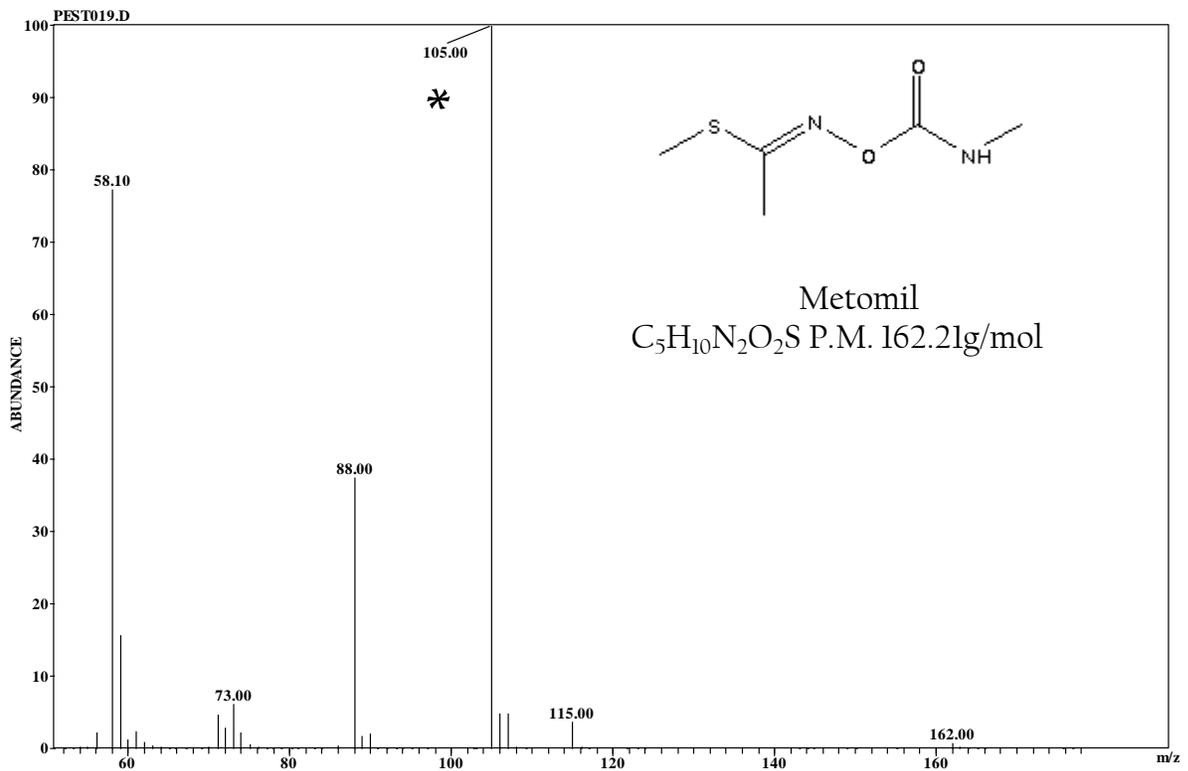
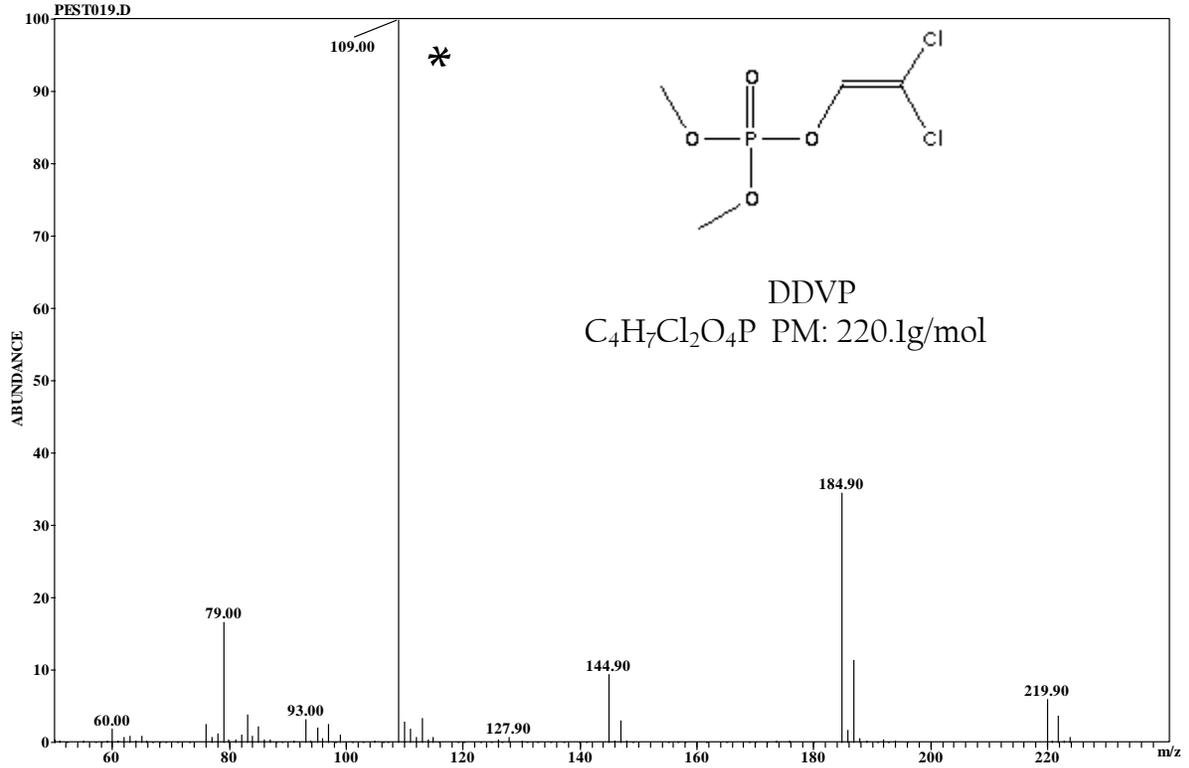
% de recobro:

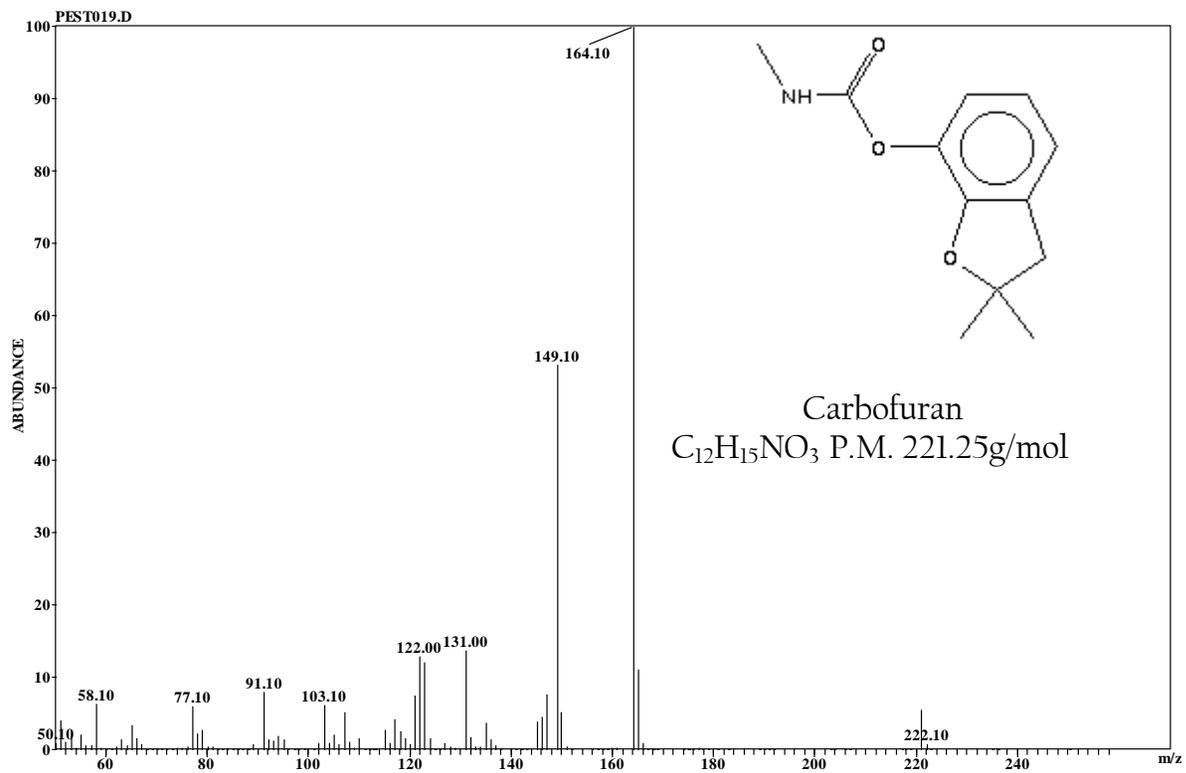
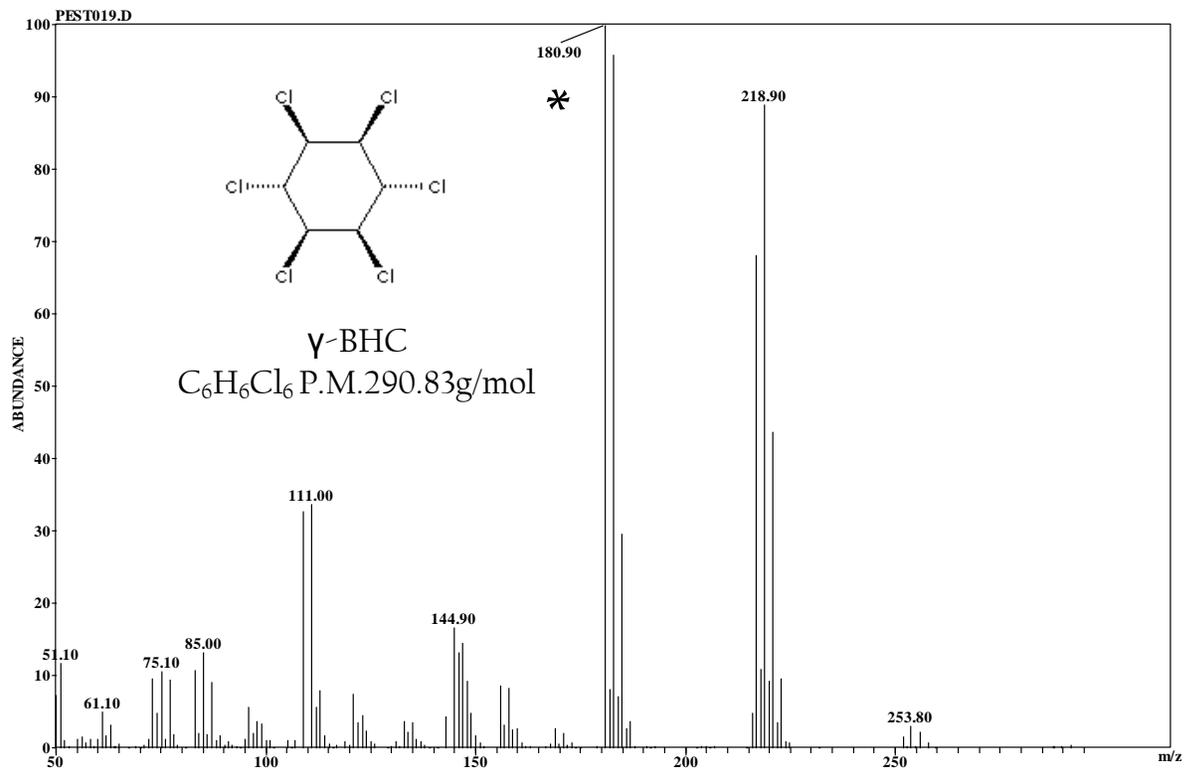
$$\%R = \frac{11.97}{11.2} * 100 = 106.87$$

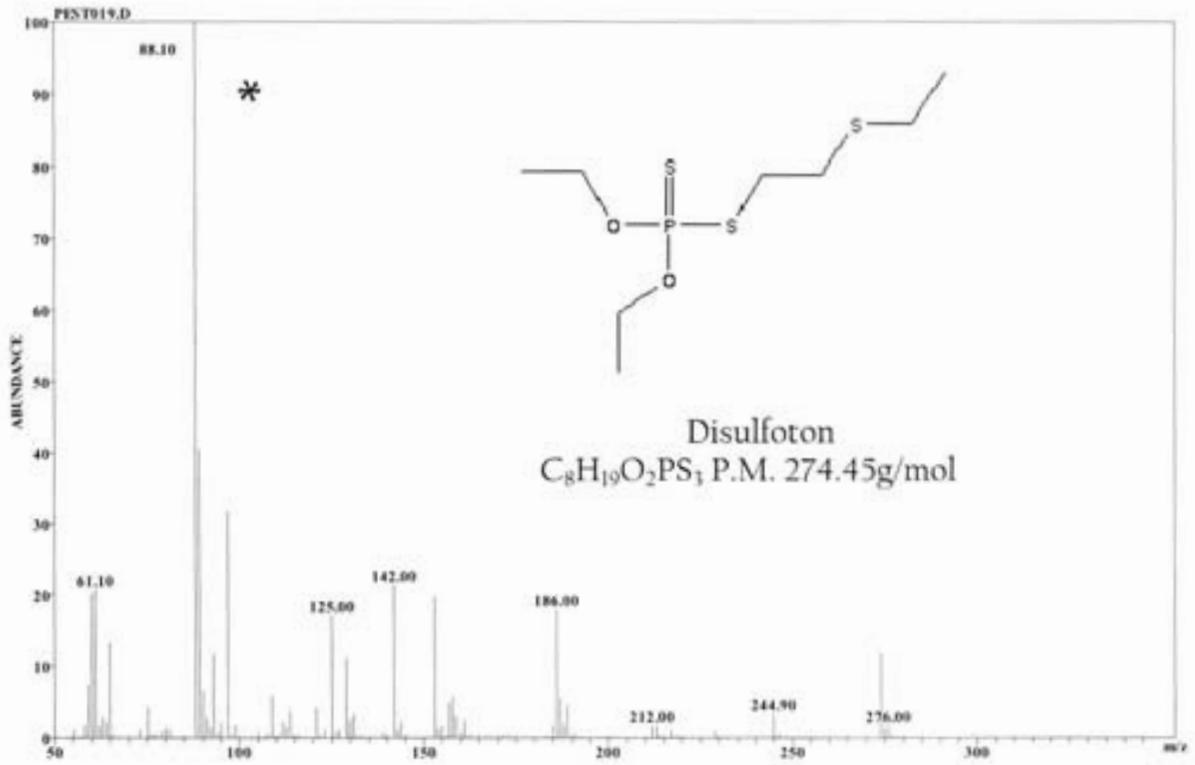
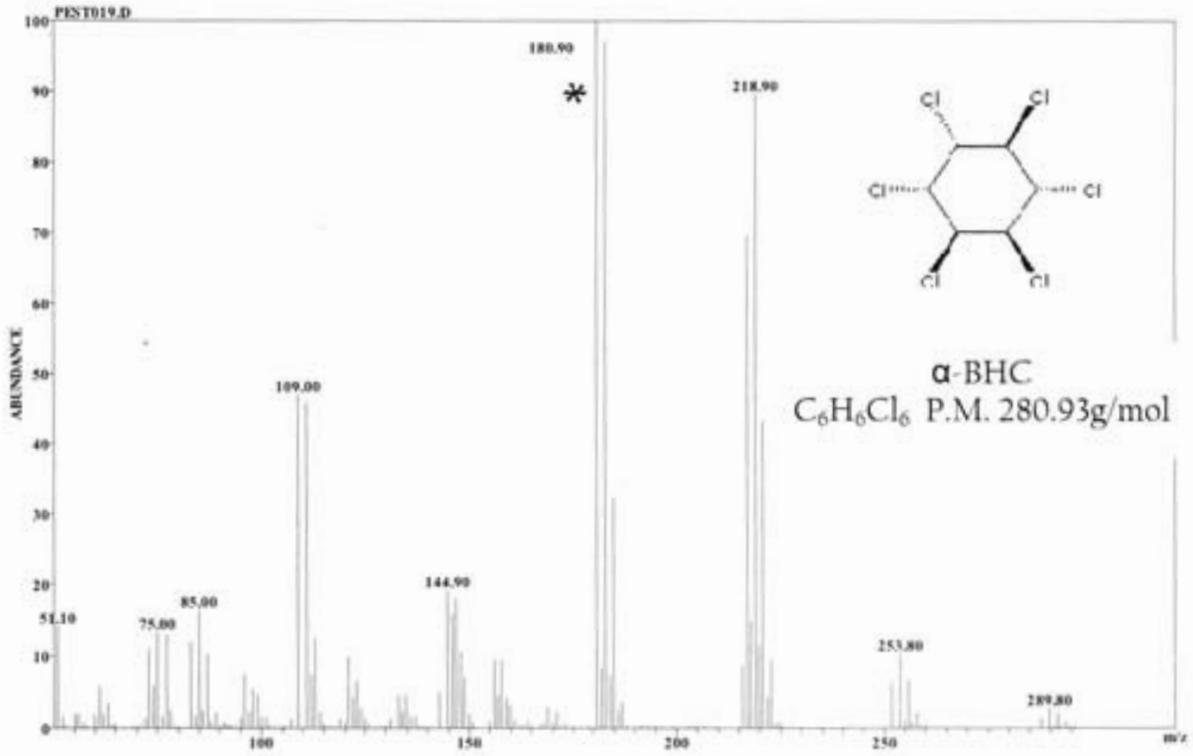
Anexo III:

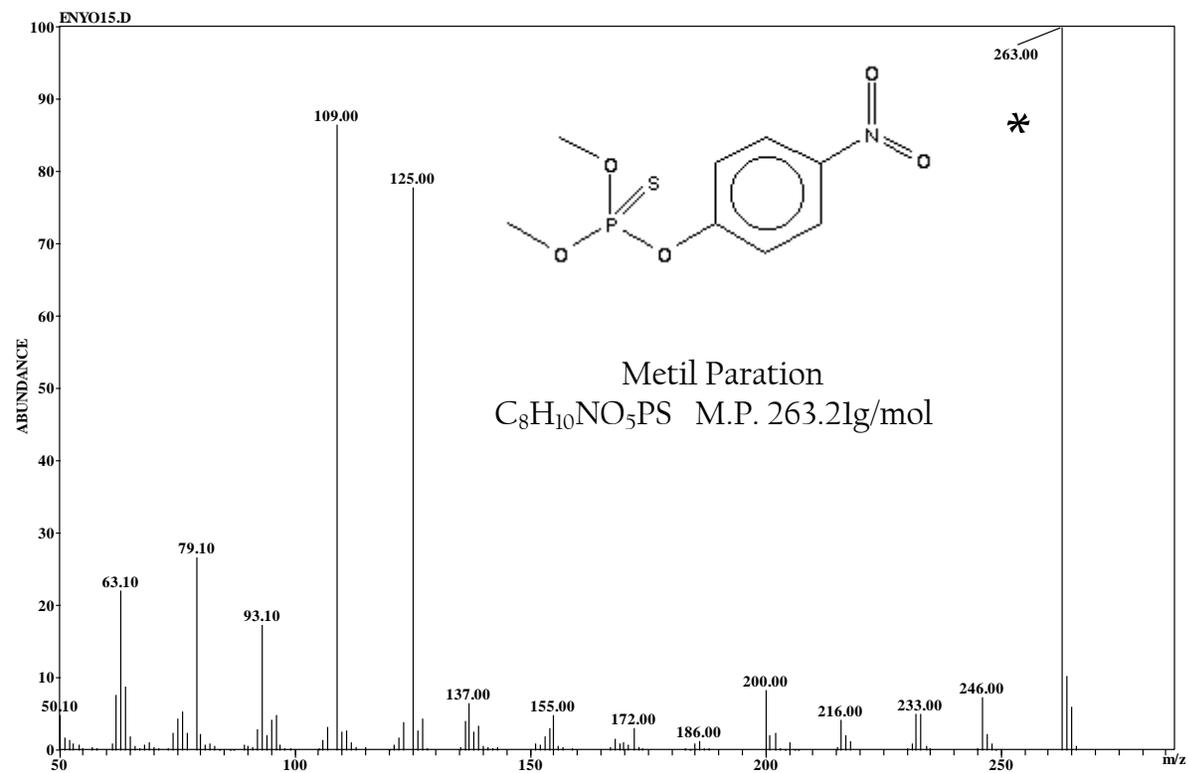
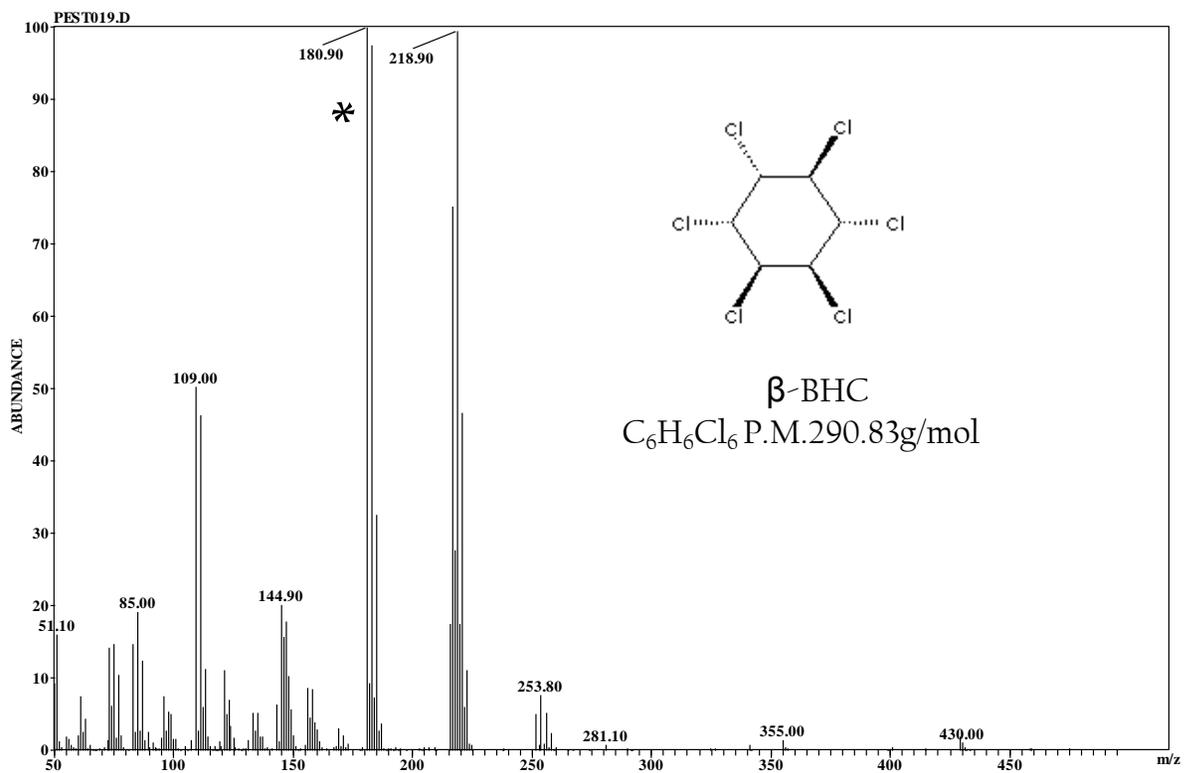
Espectros de masas: Pesticidas, EI y Surr.

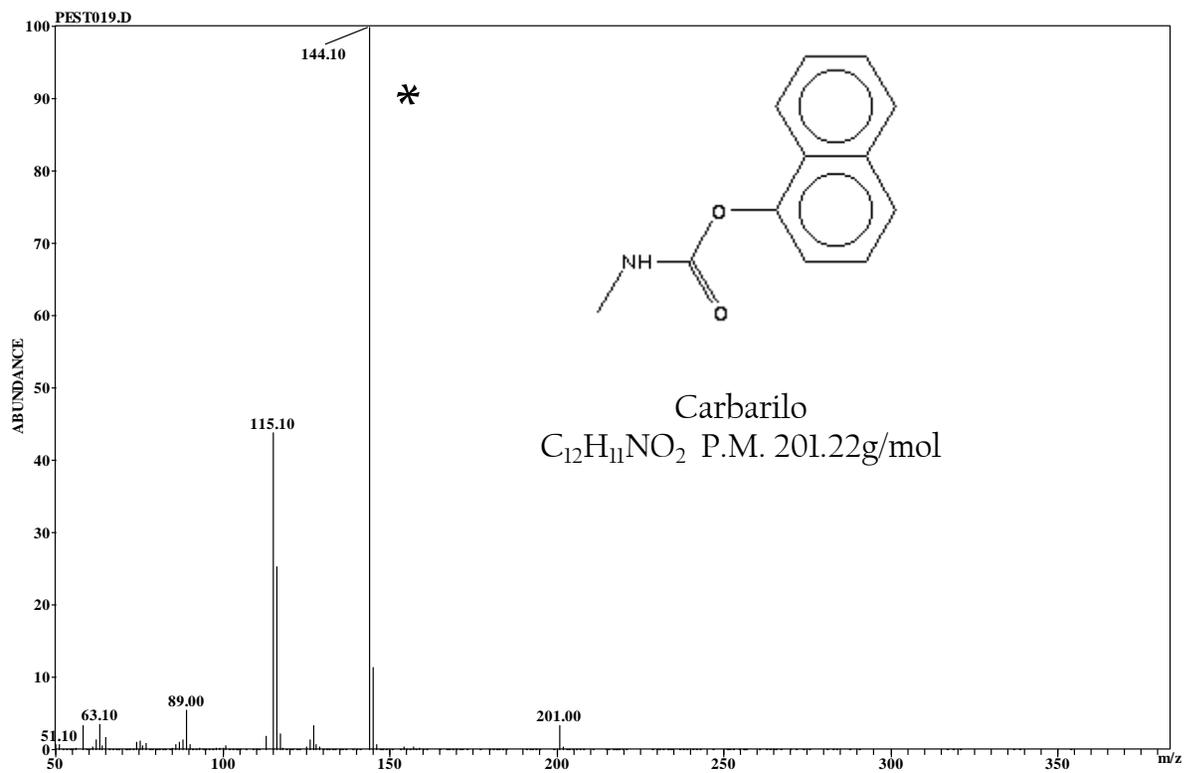
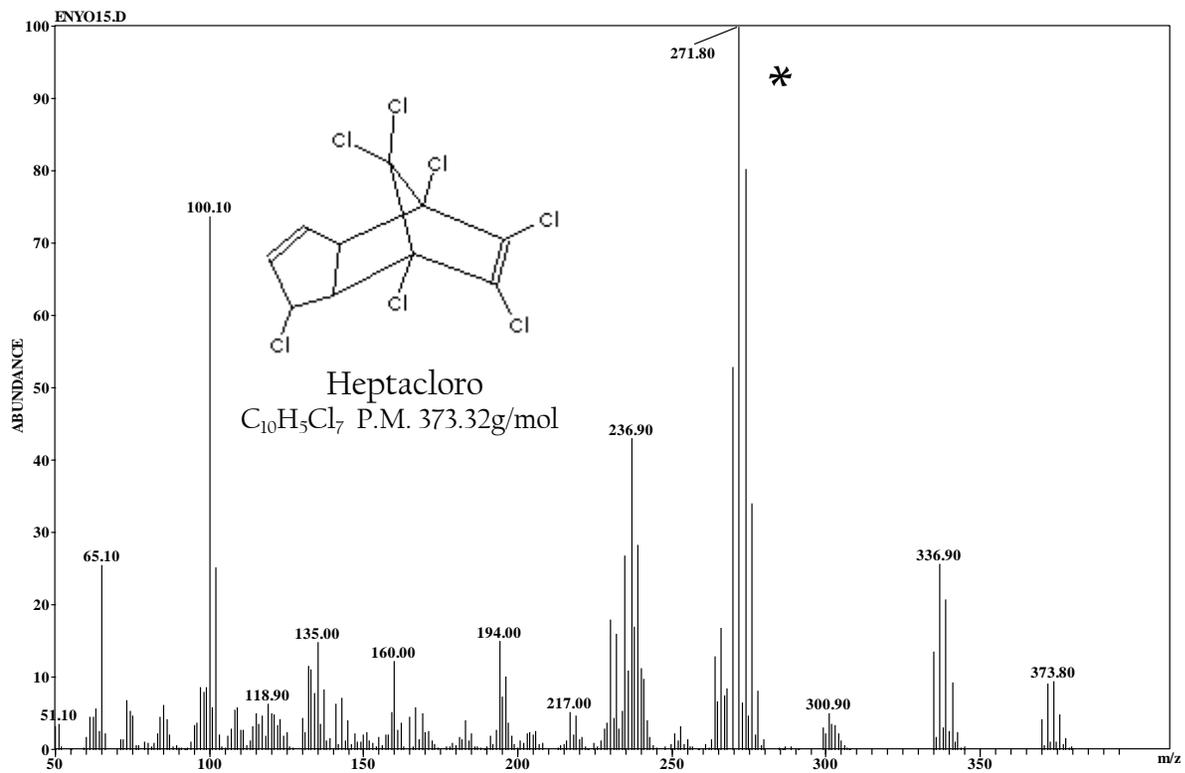
Pesticidas.

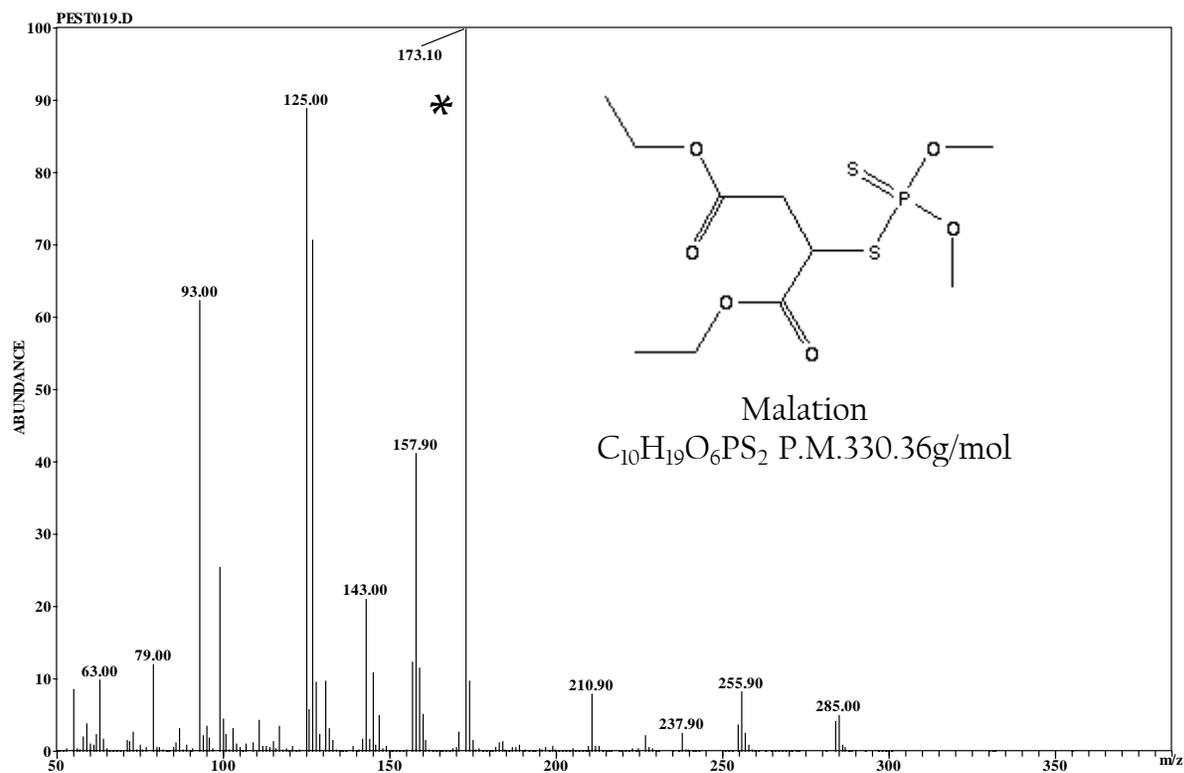
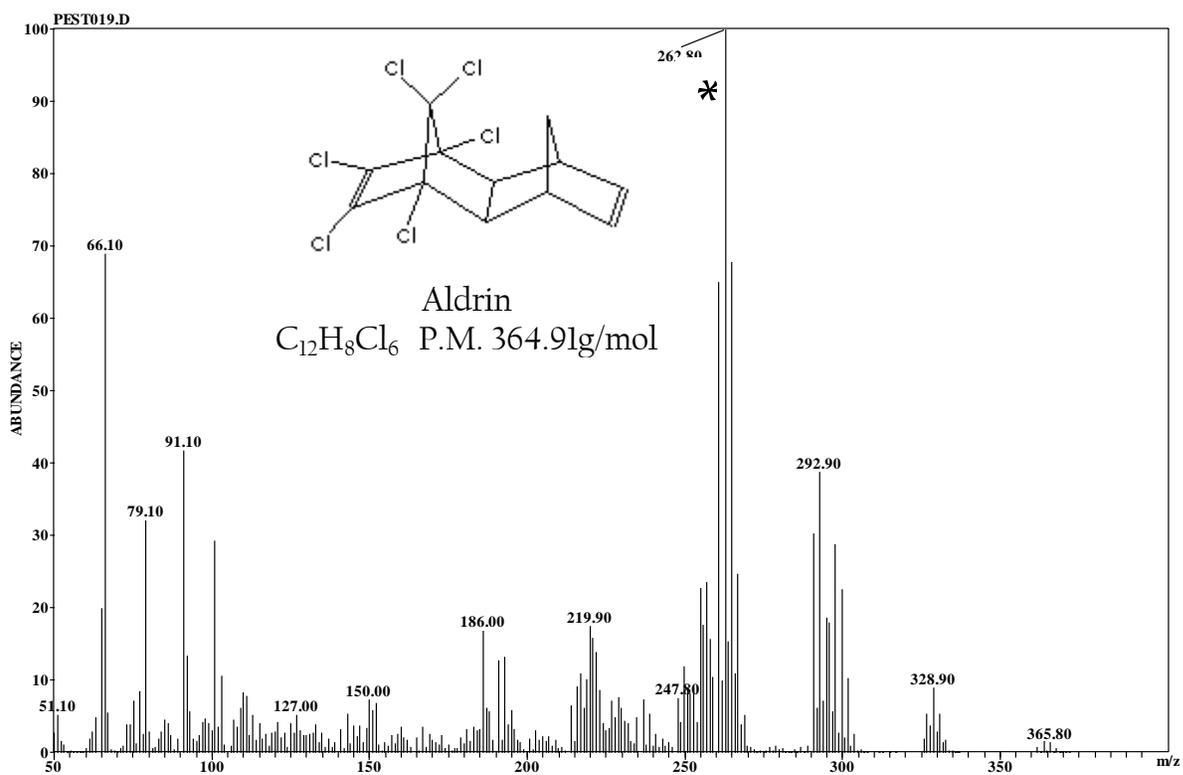


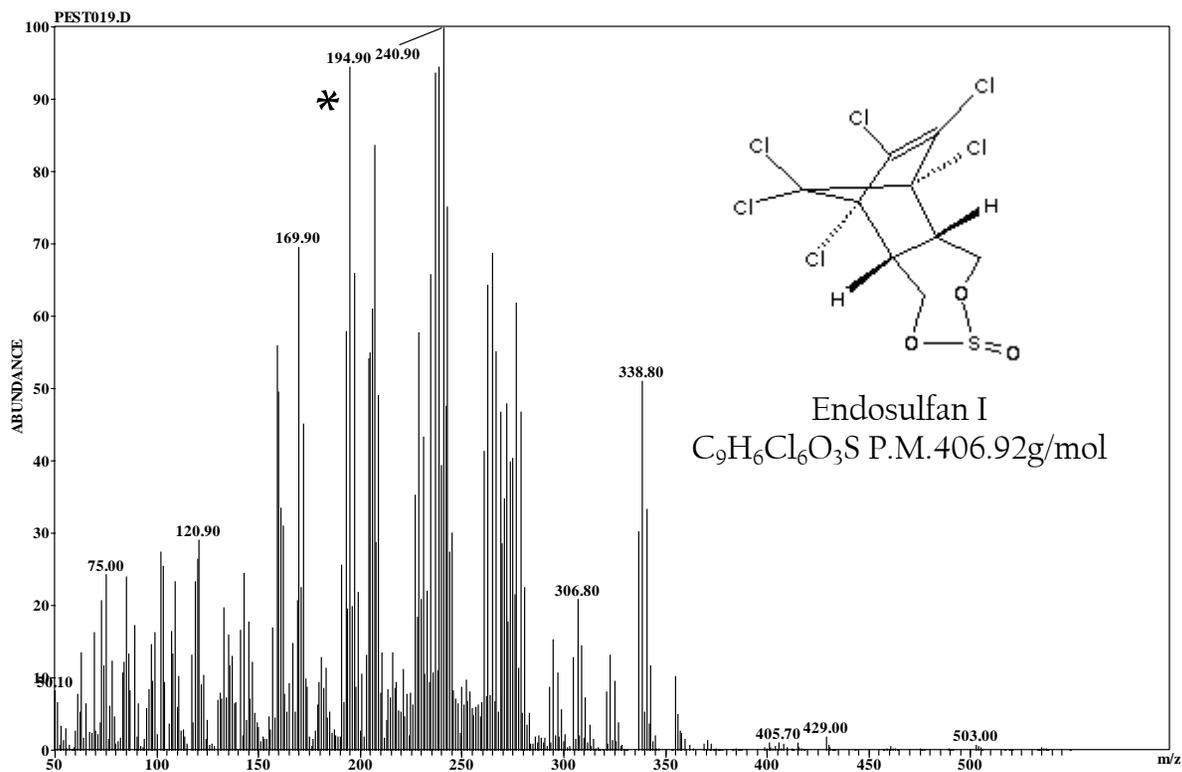
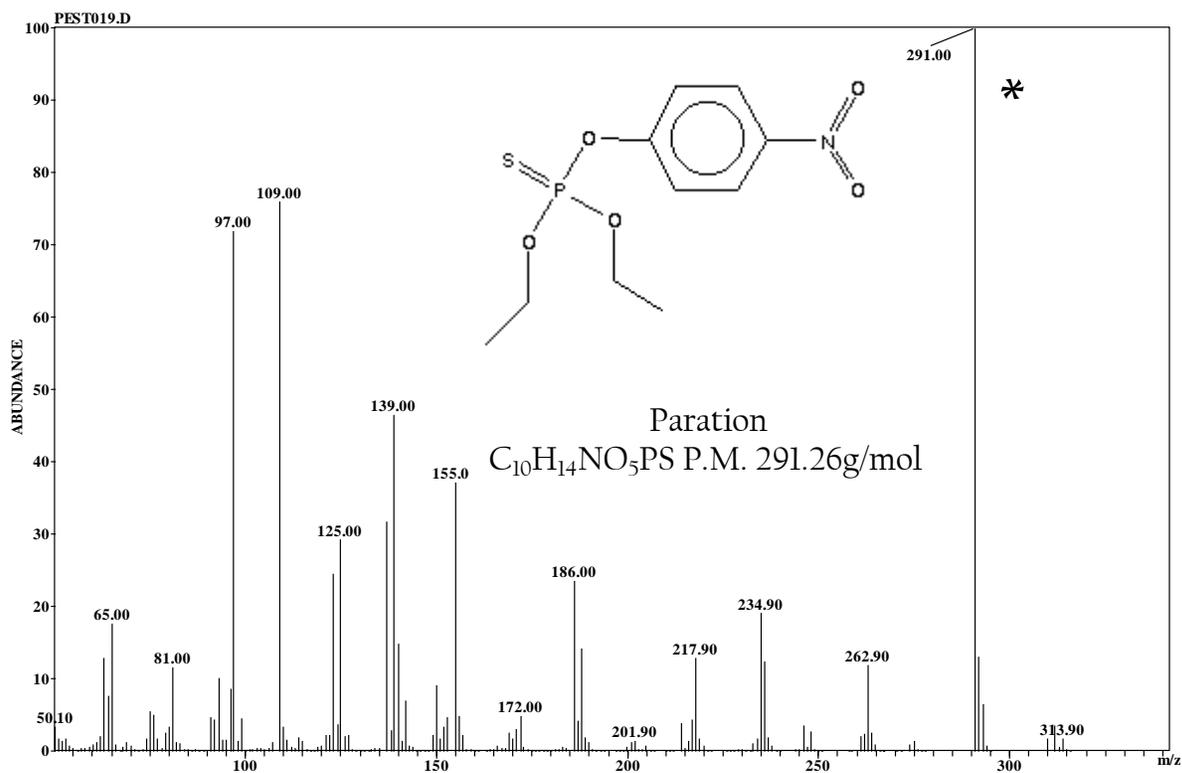


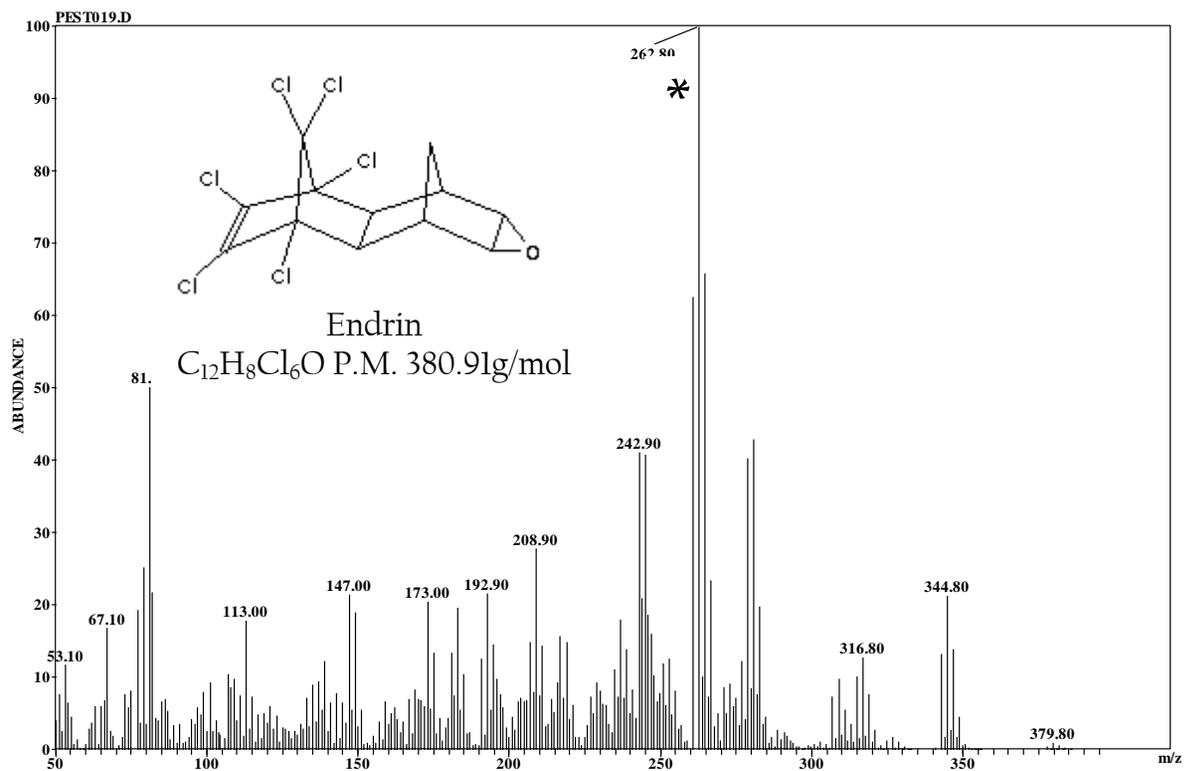
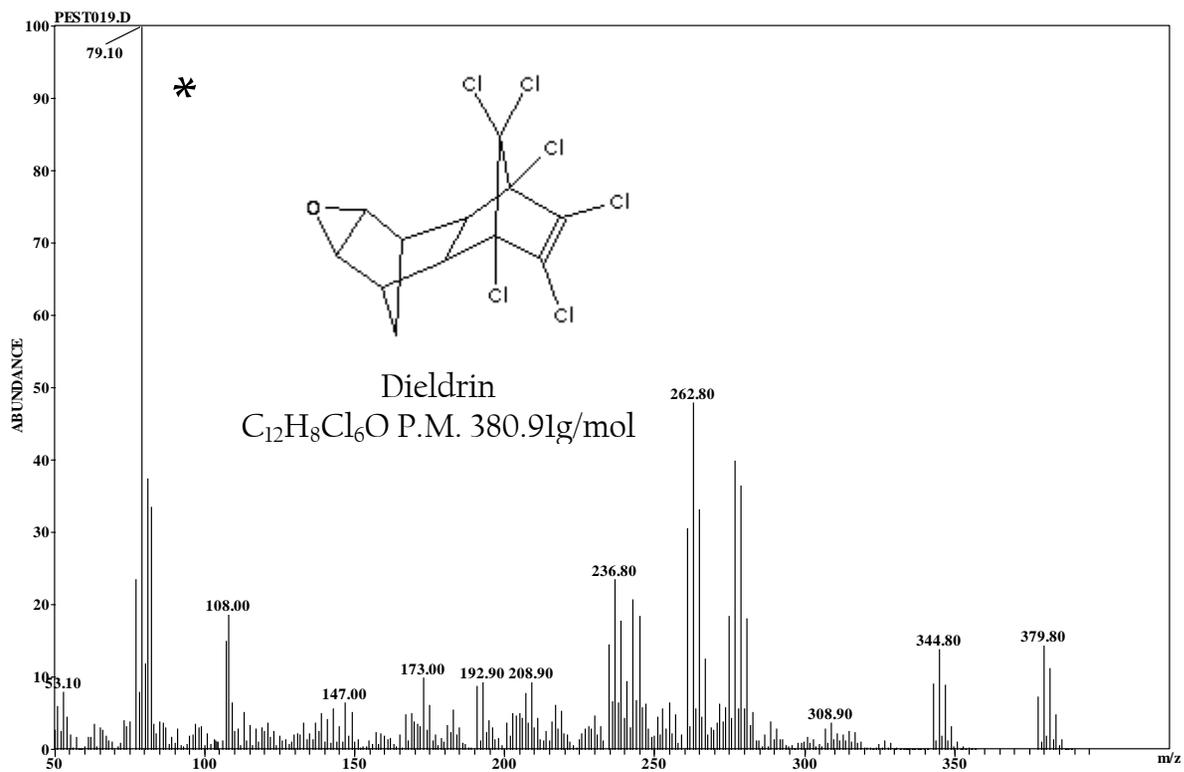


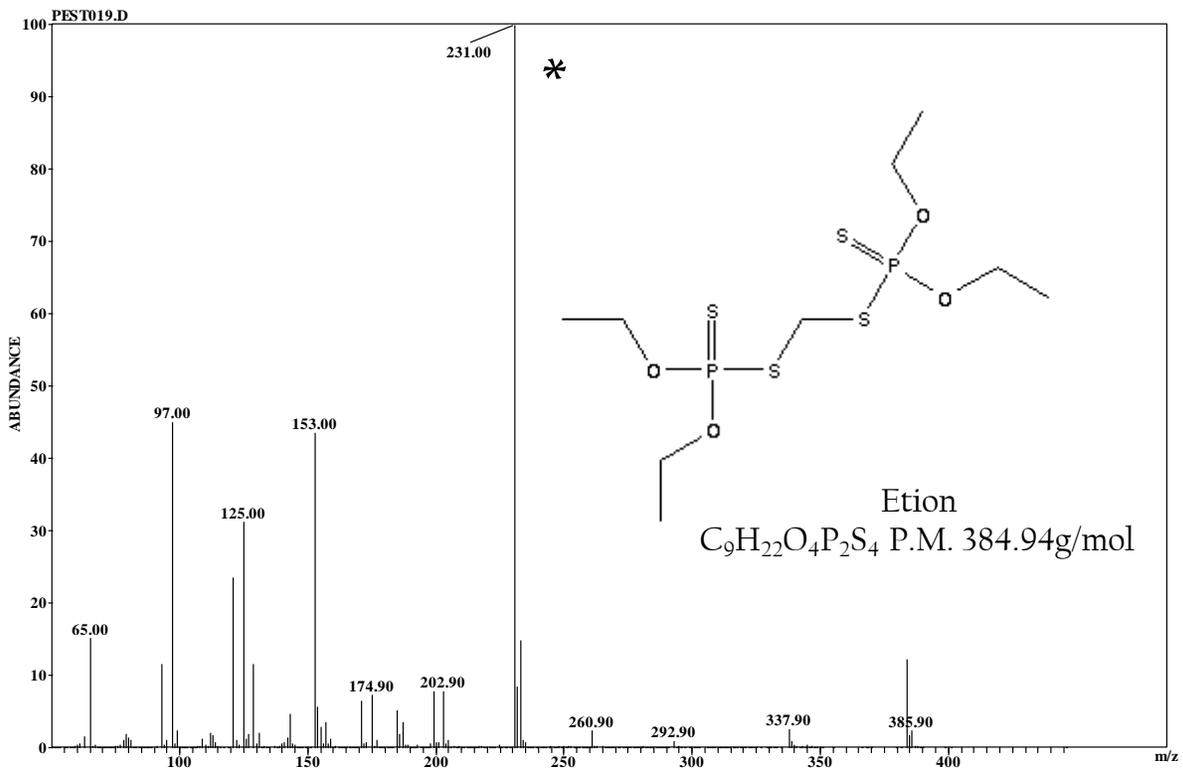
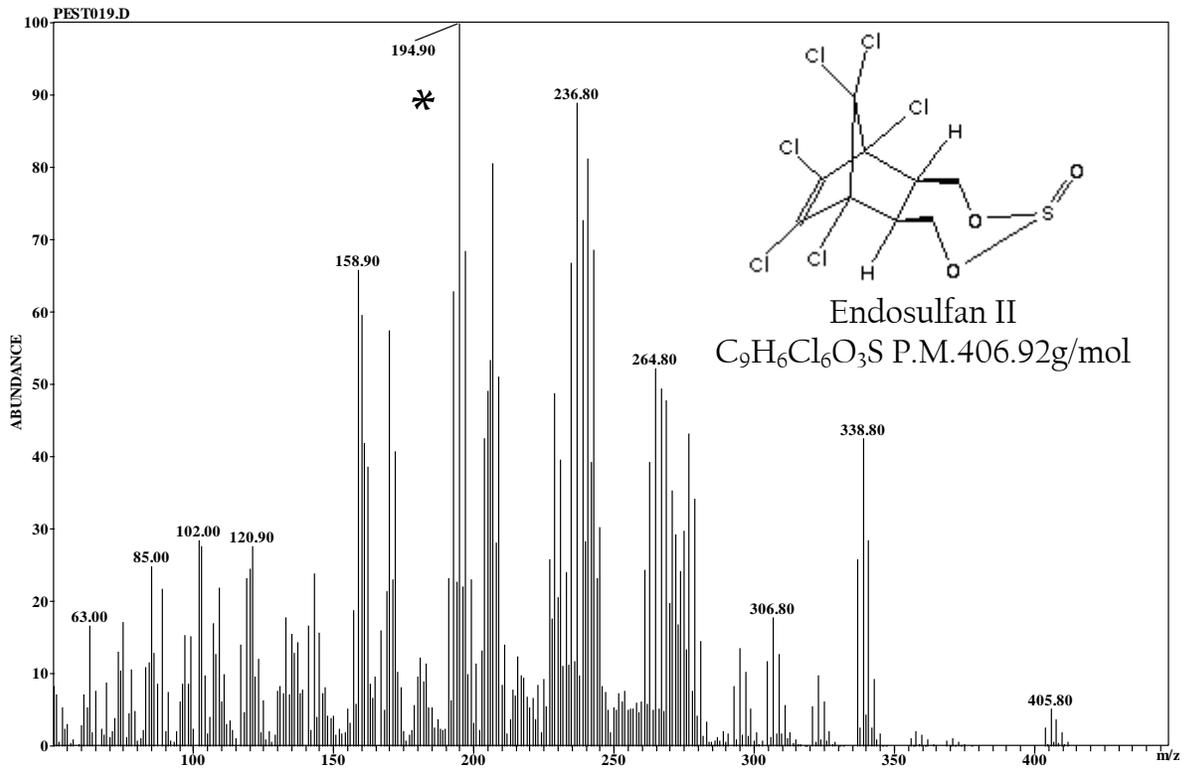


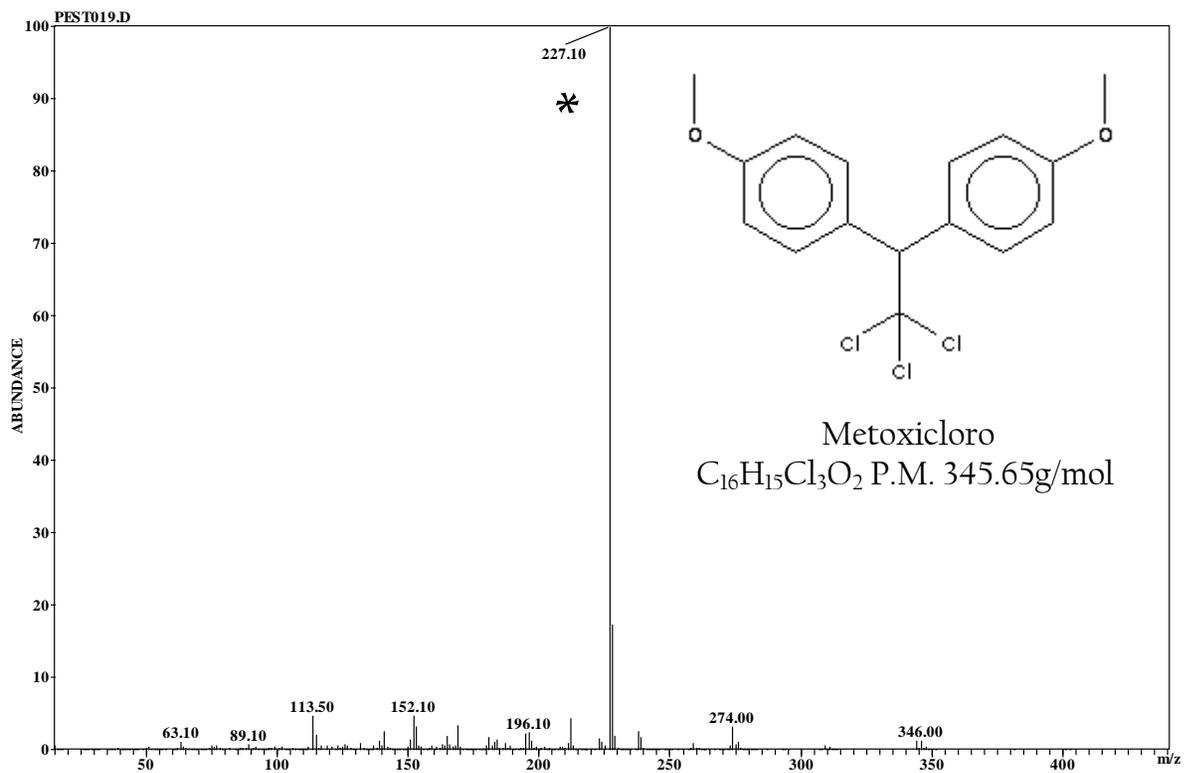
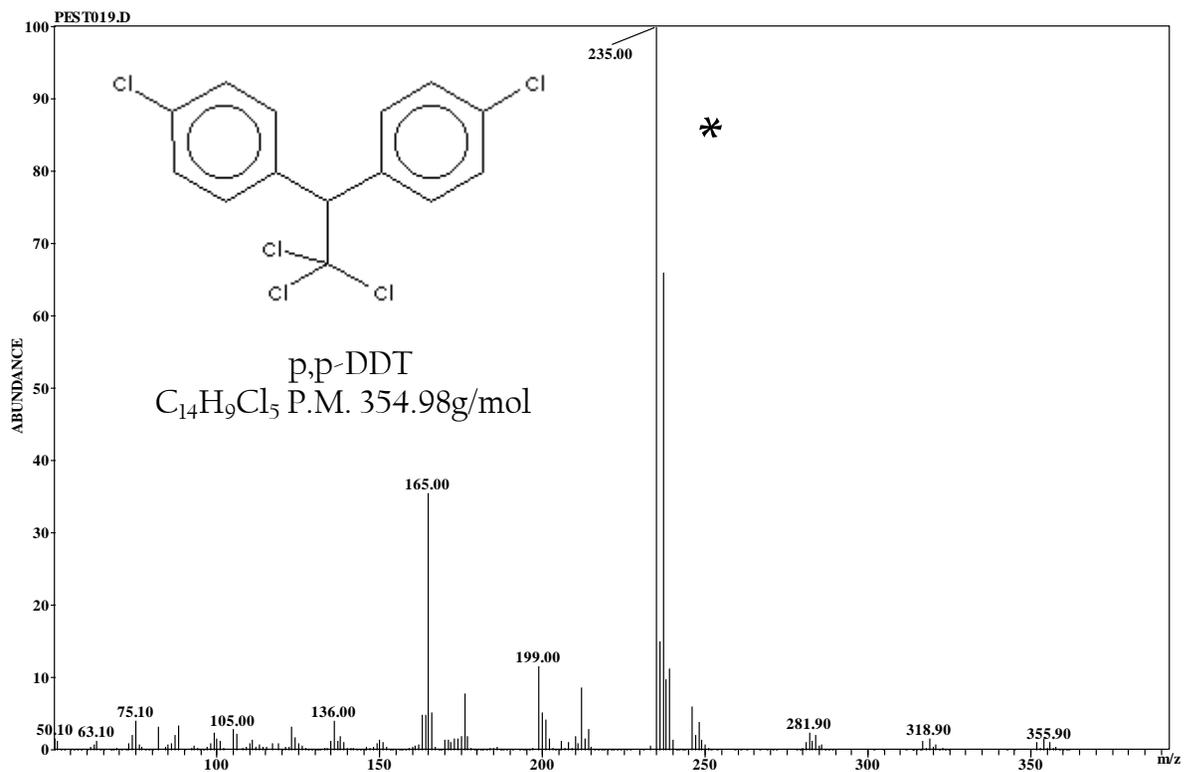


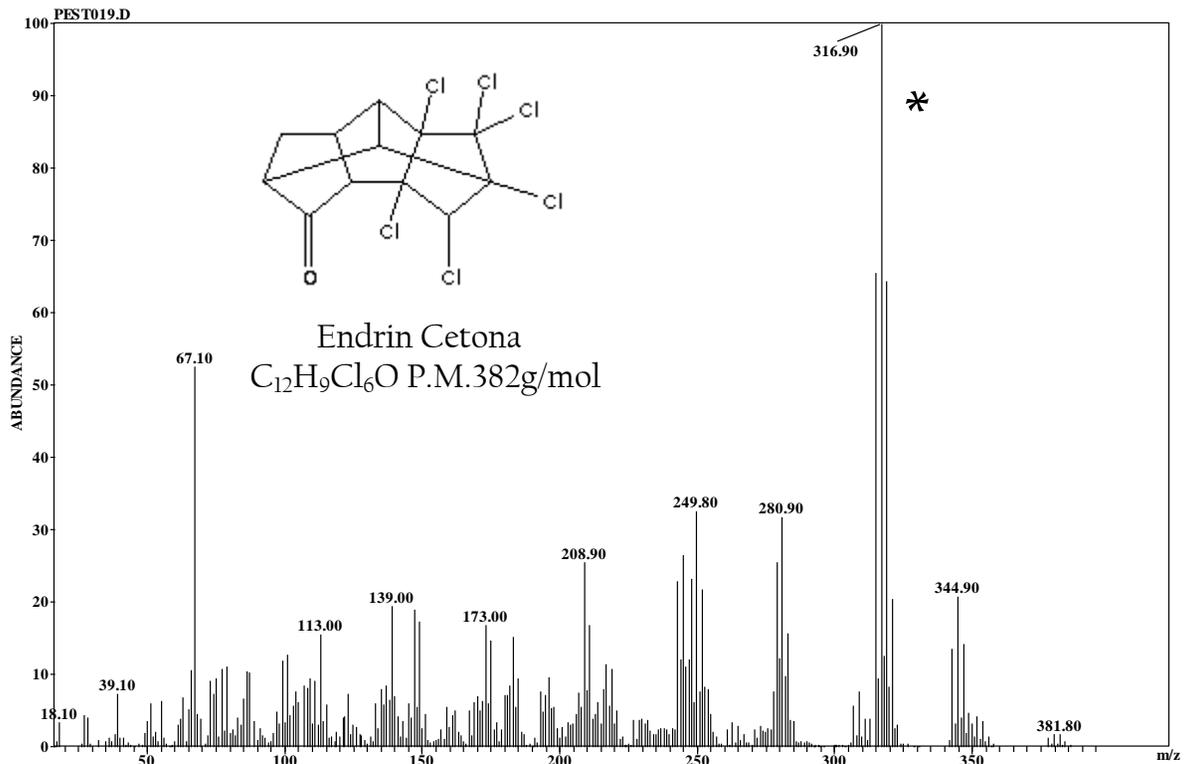
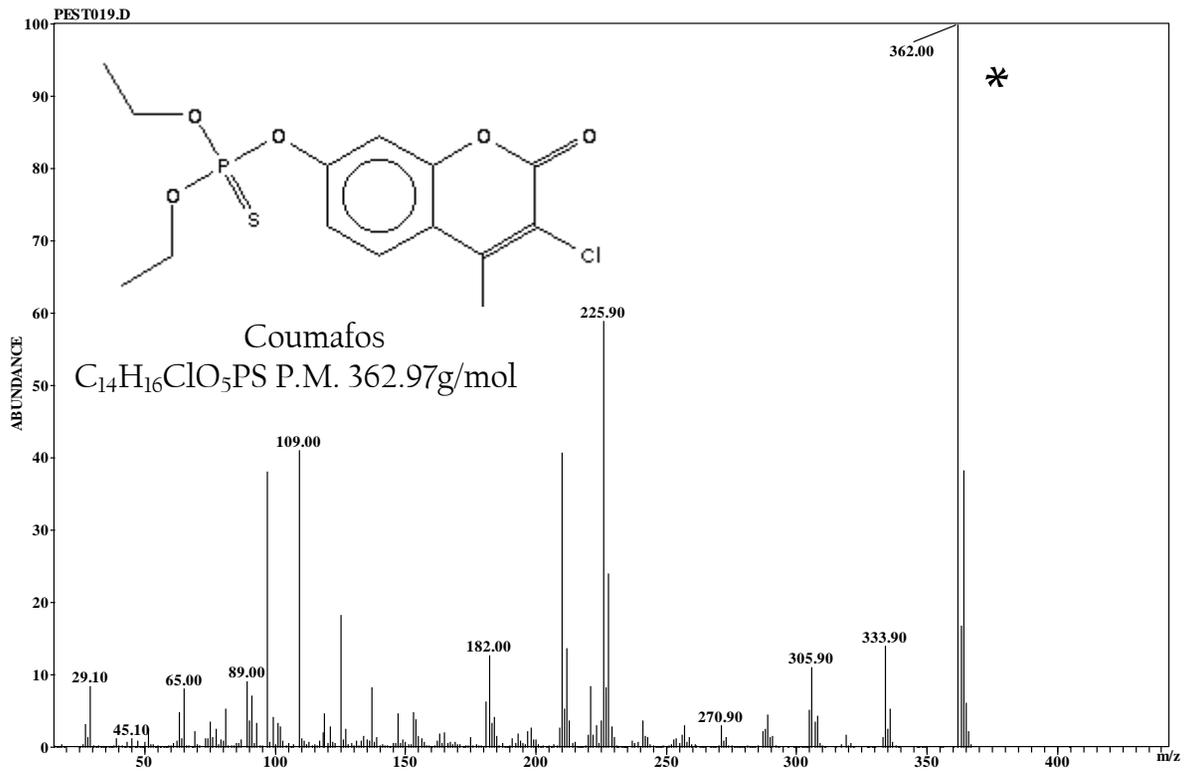




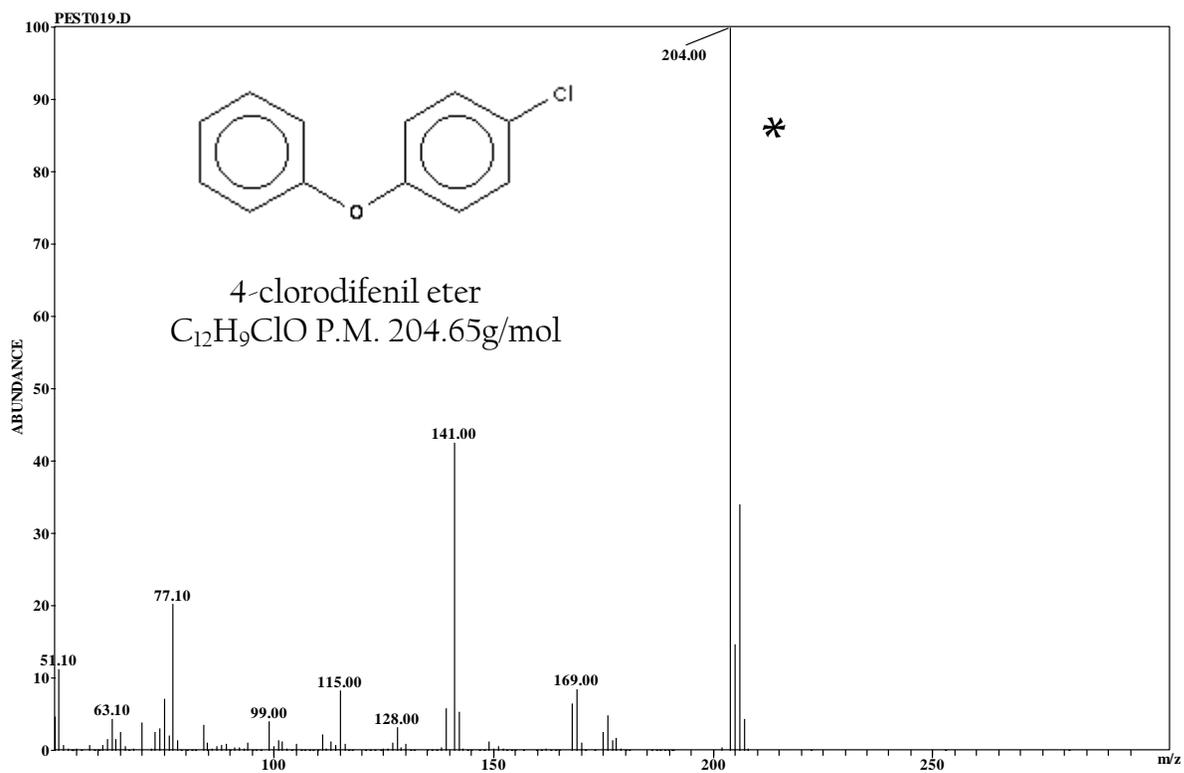




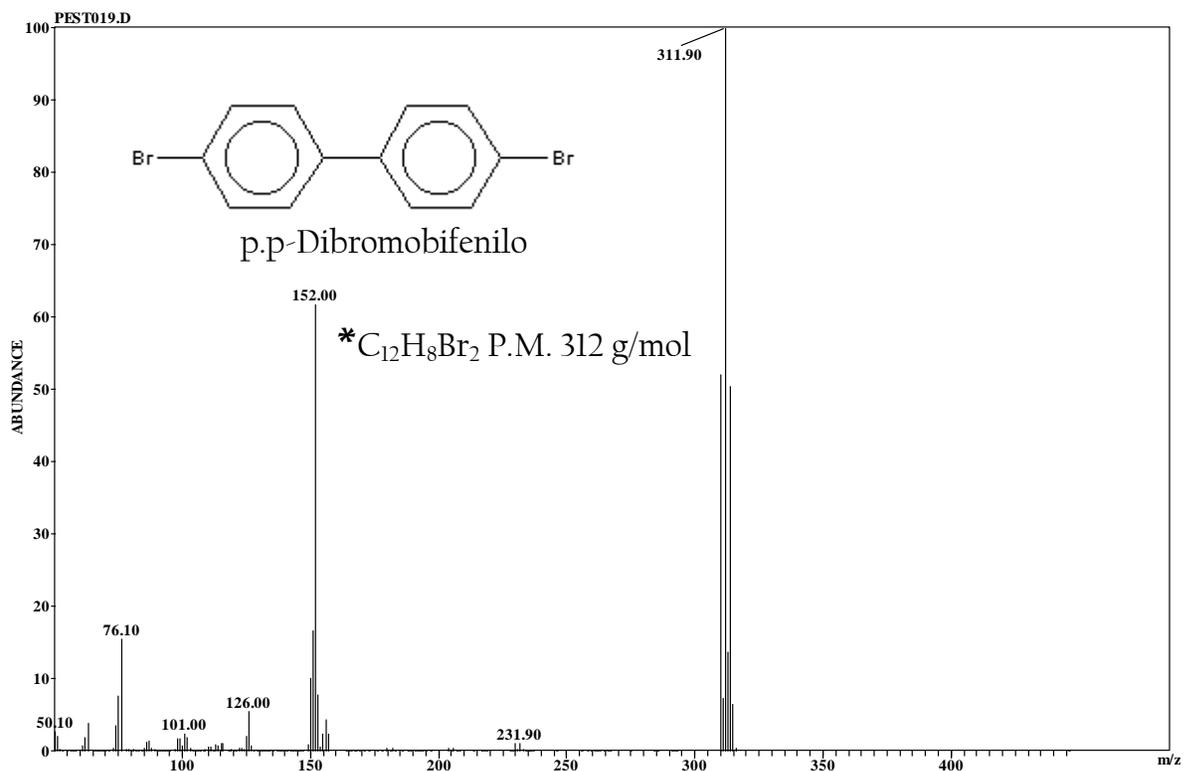




Surrogado.



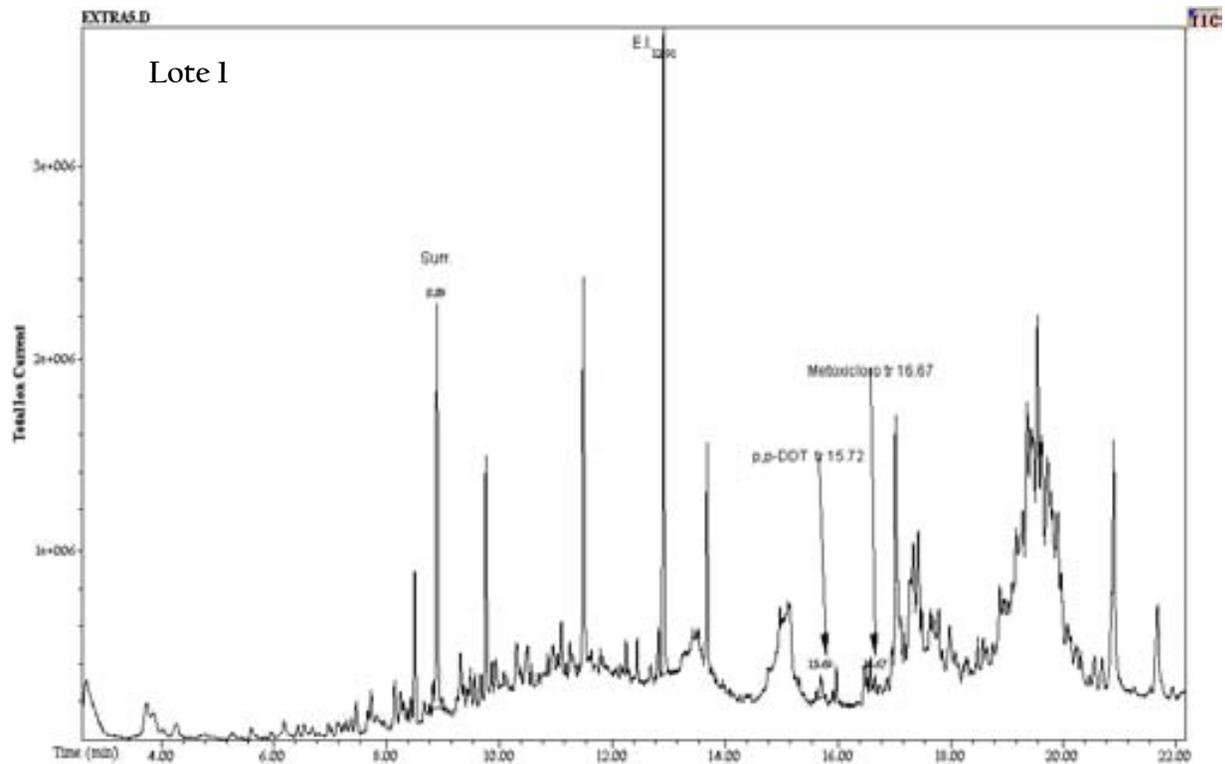
Estándar Interno.



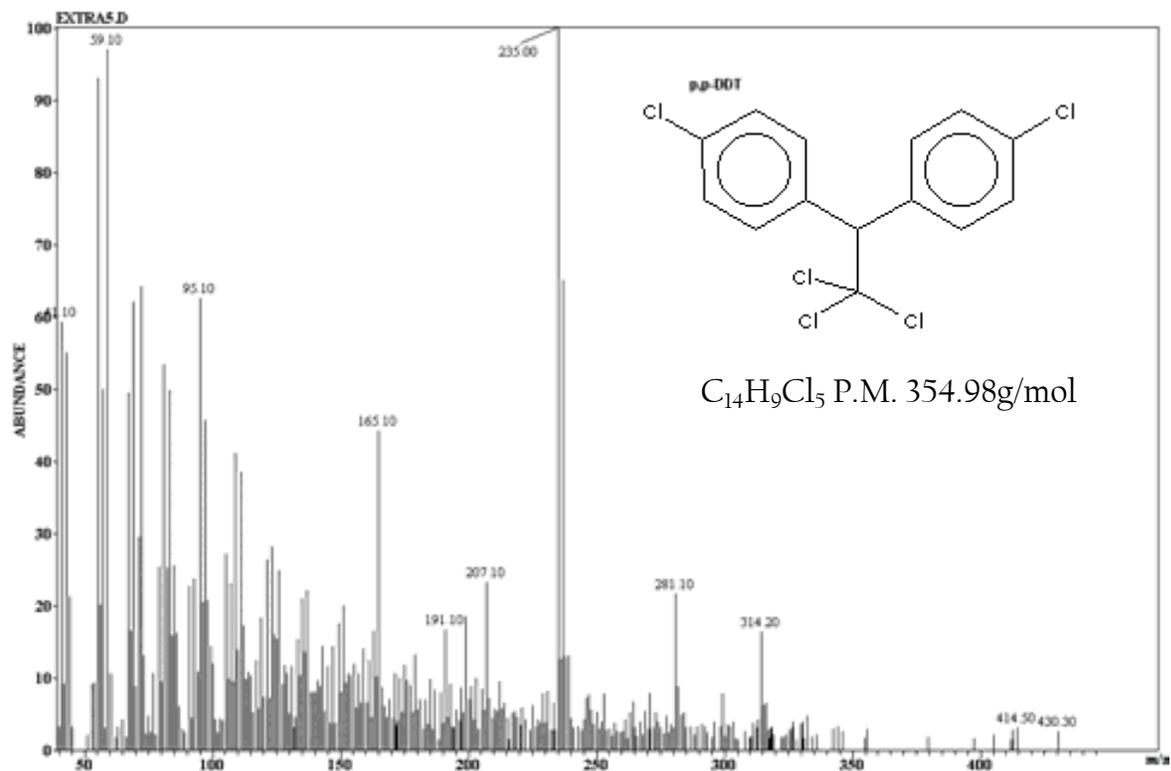
Anexo IV

Muestras: Fresas.

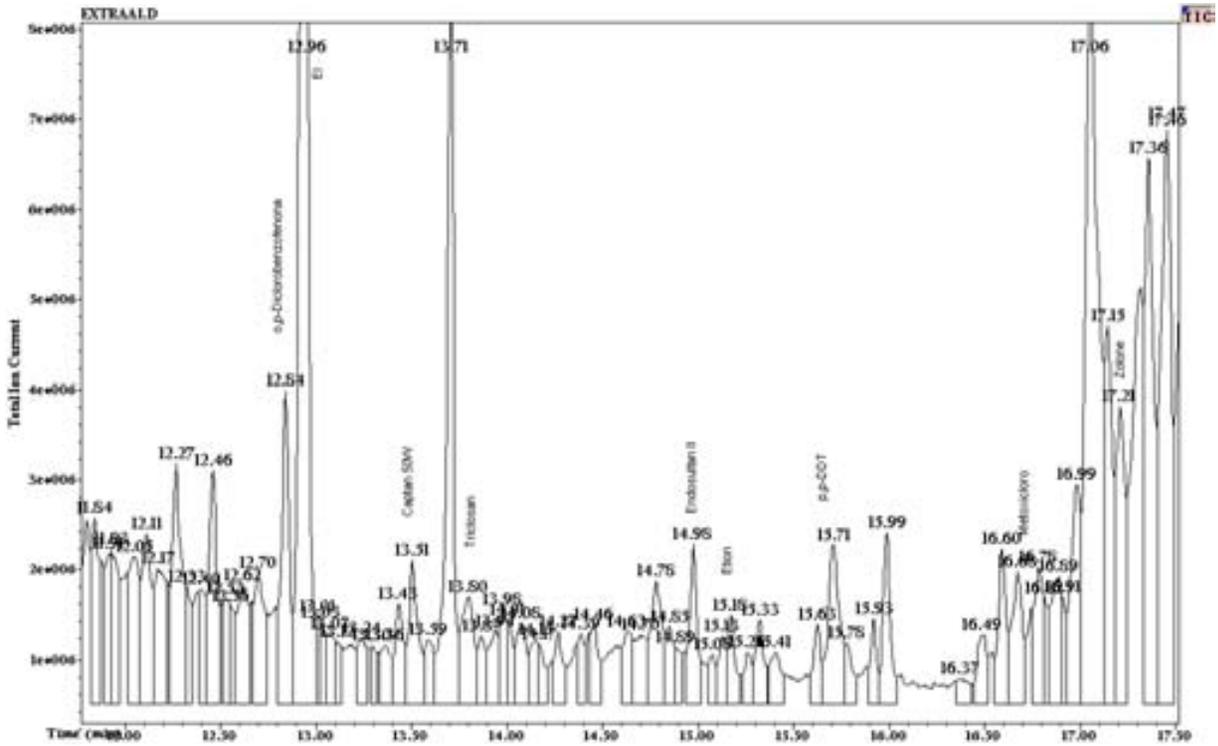
Cromatogramas y Espectros de masas.



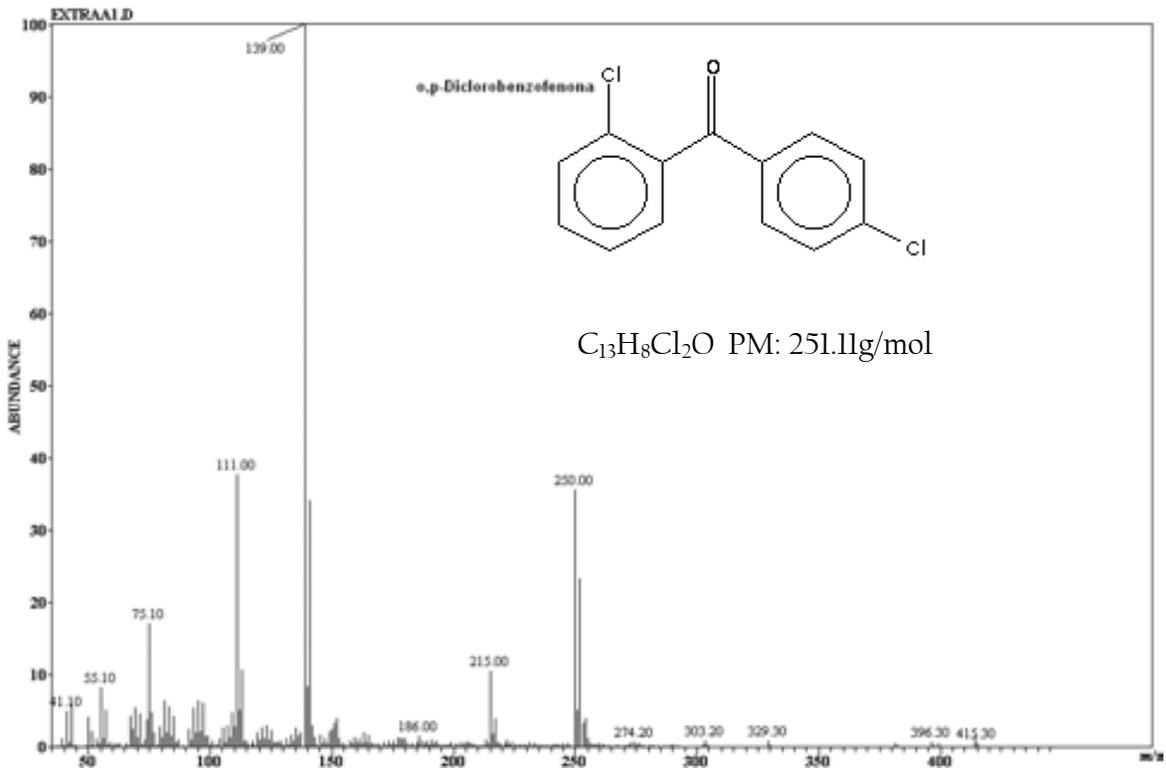
Cromatograma AIV-LI SCAN. Fresas adquiridas en Mercado del Centro de Xochimilco Procedencia: desconocida. Donde se ubicaron p,p-DDT y Metoxicloro.

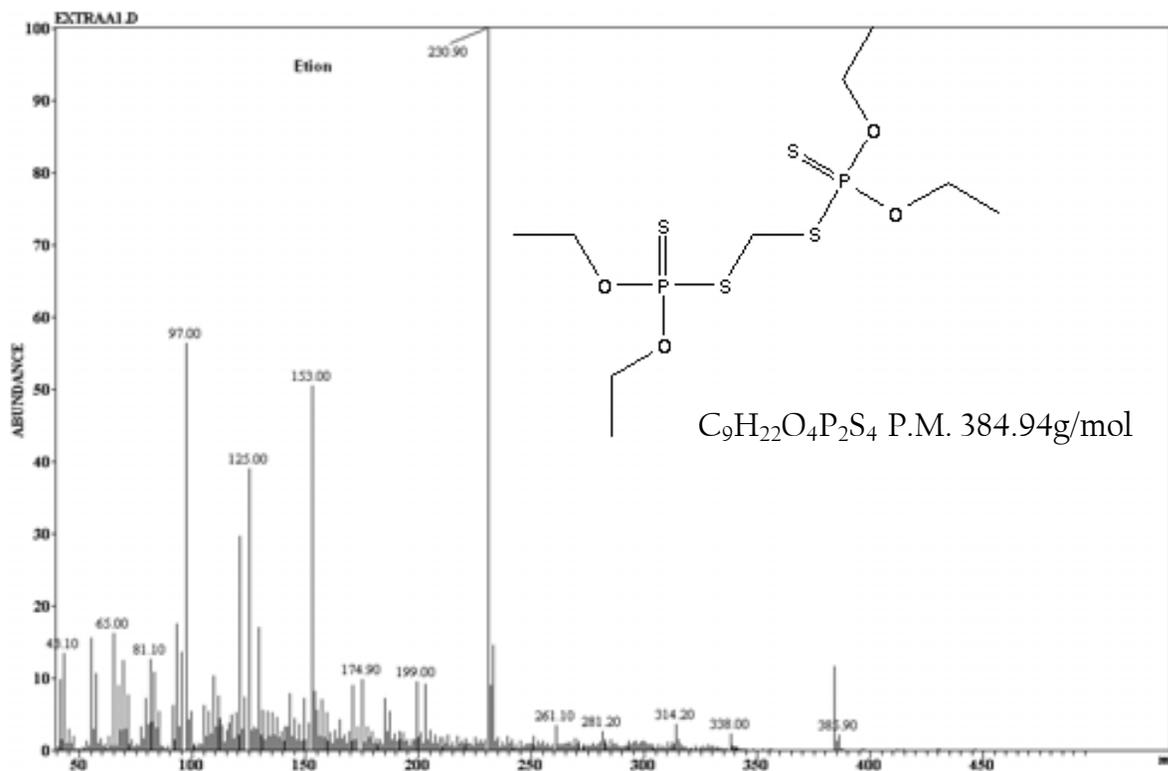
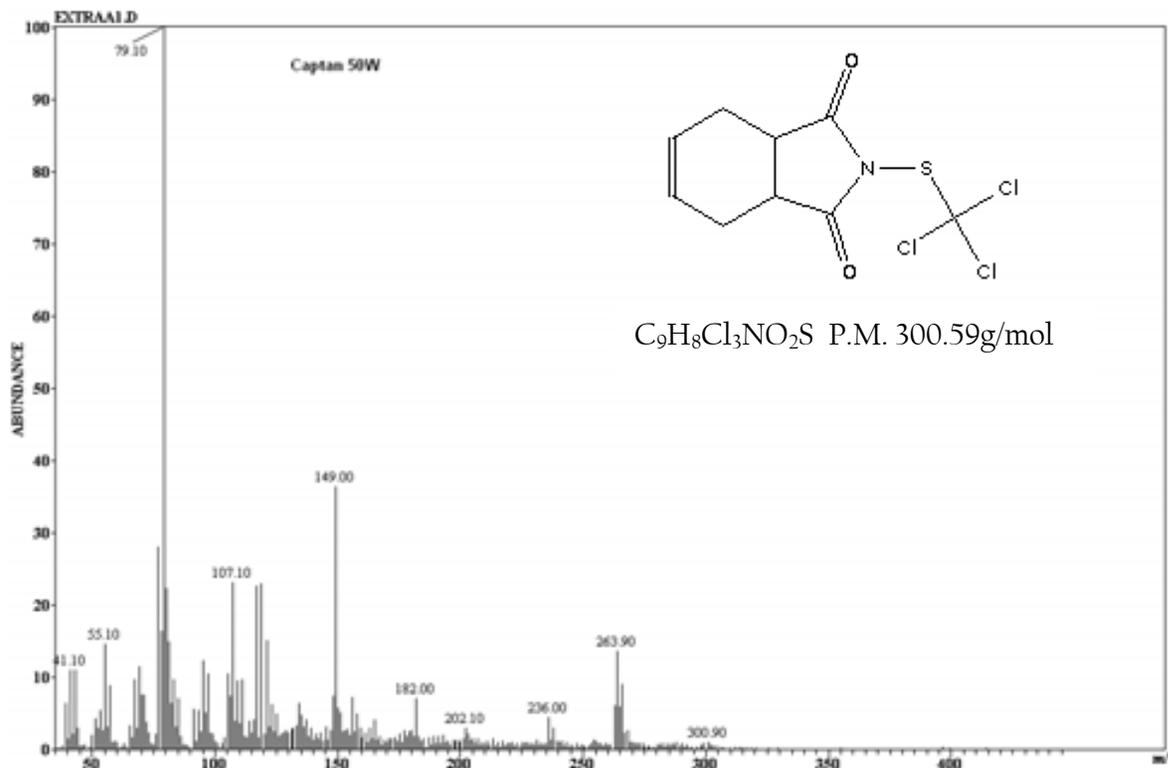


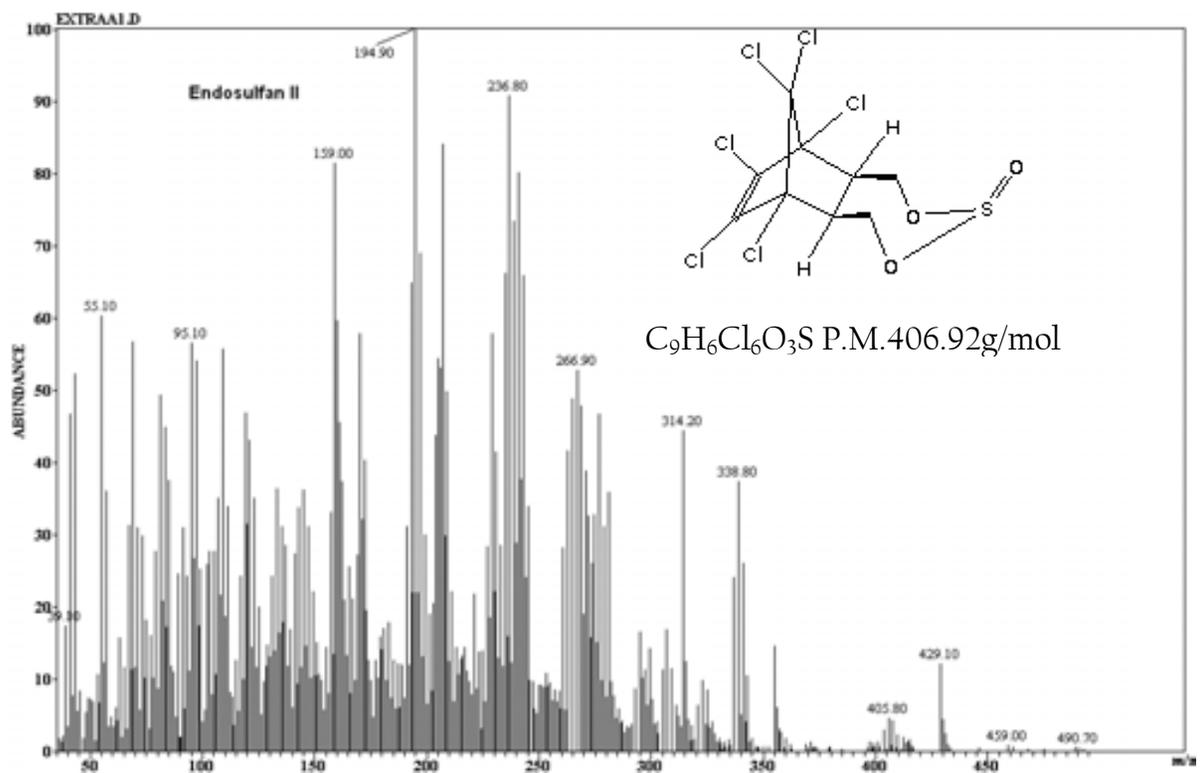
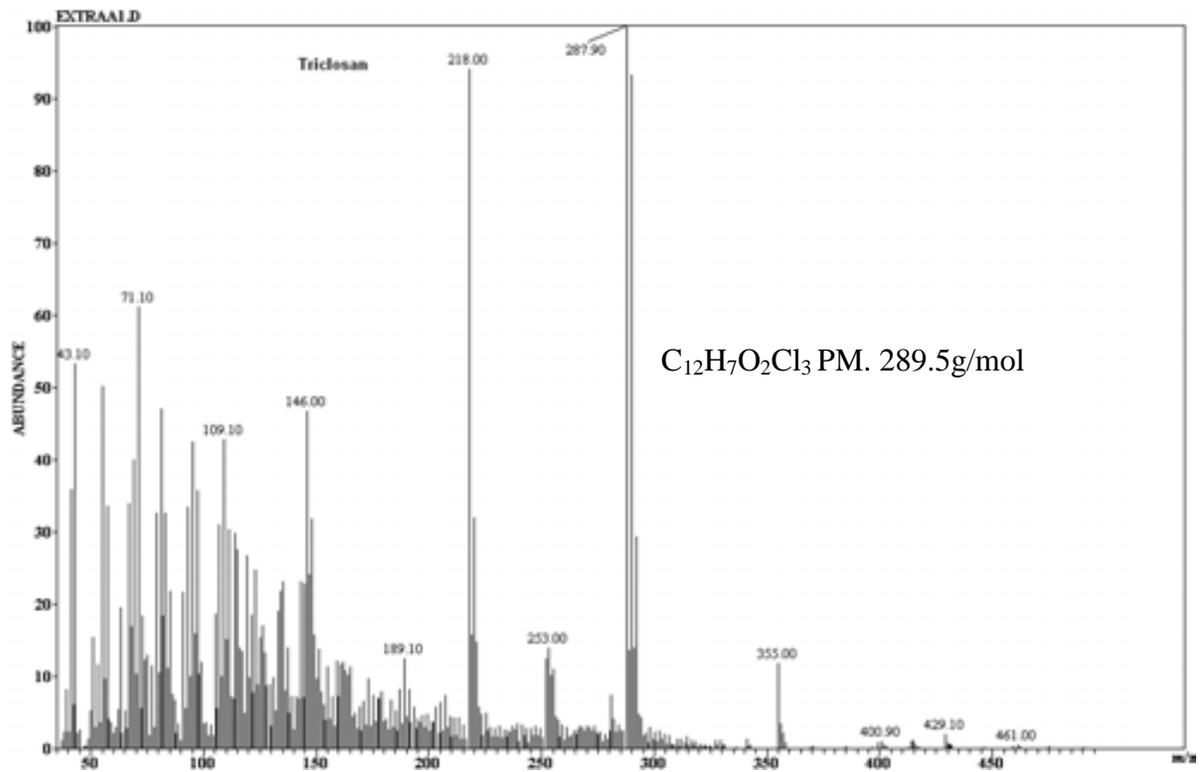
Ampliación del cromatograma AIV-L1-1, picos de los pesticidas identificados:

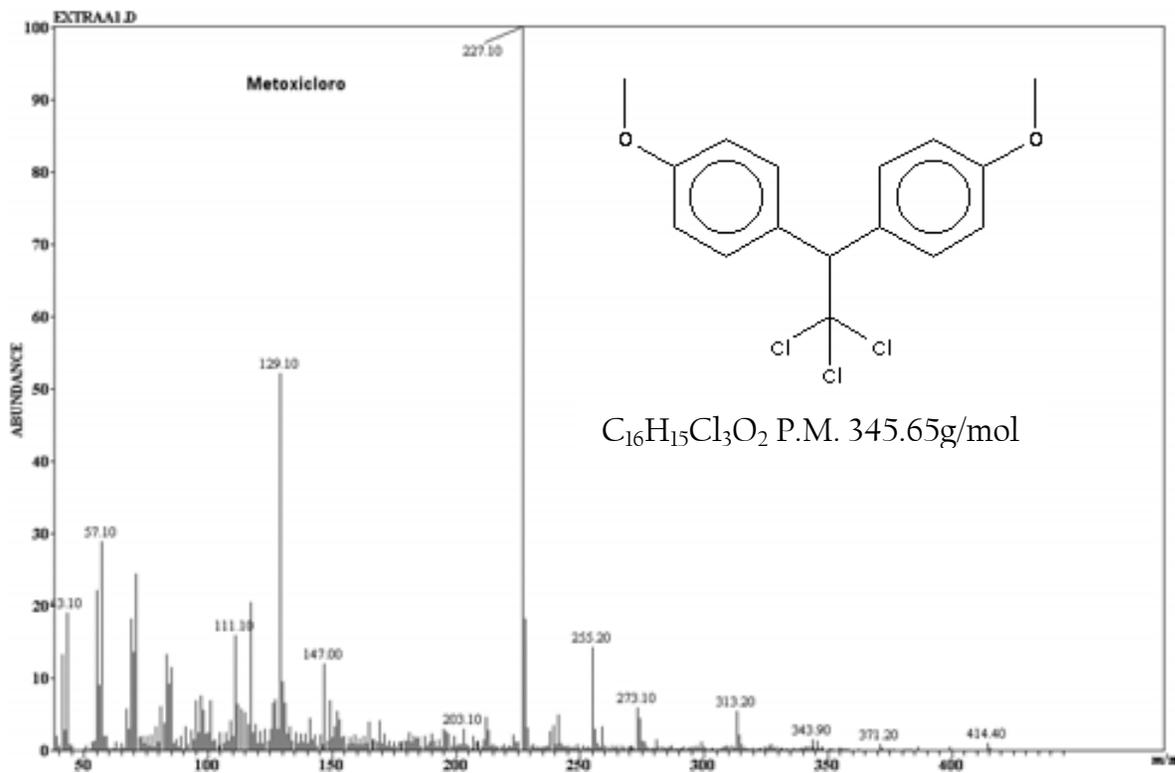
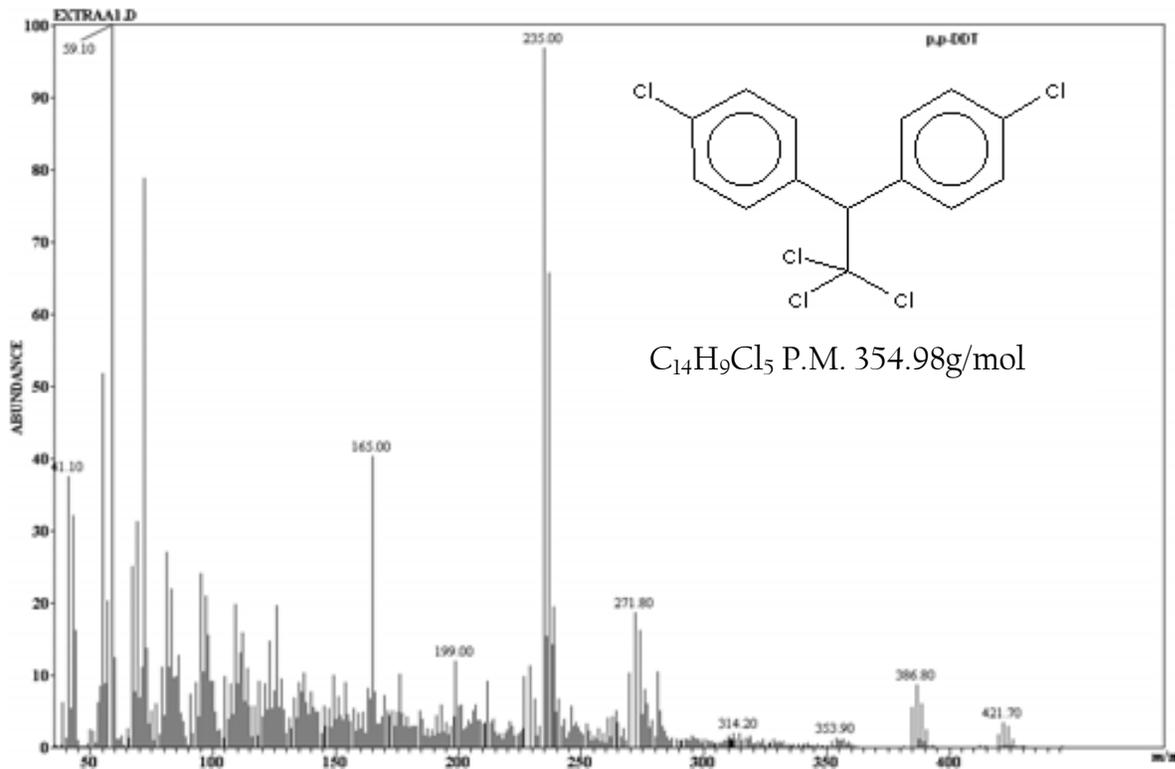


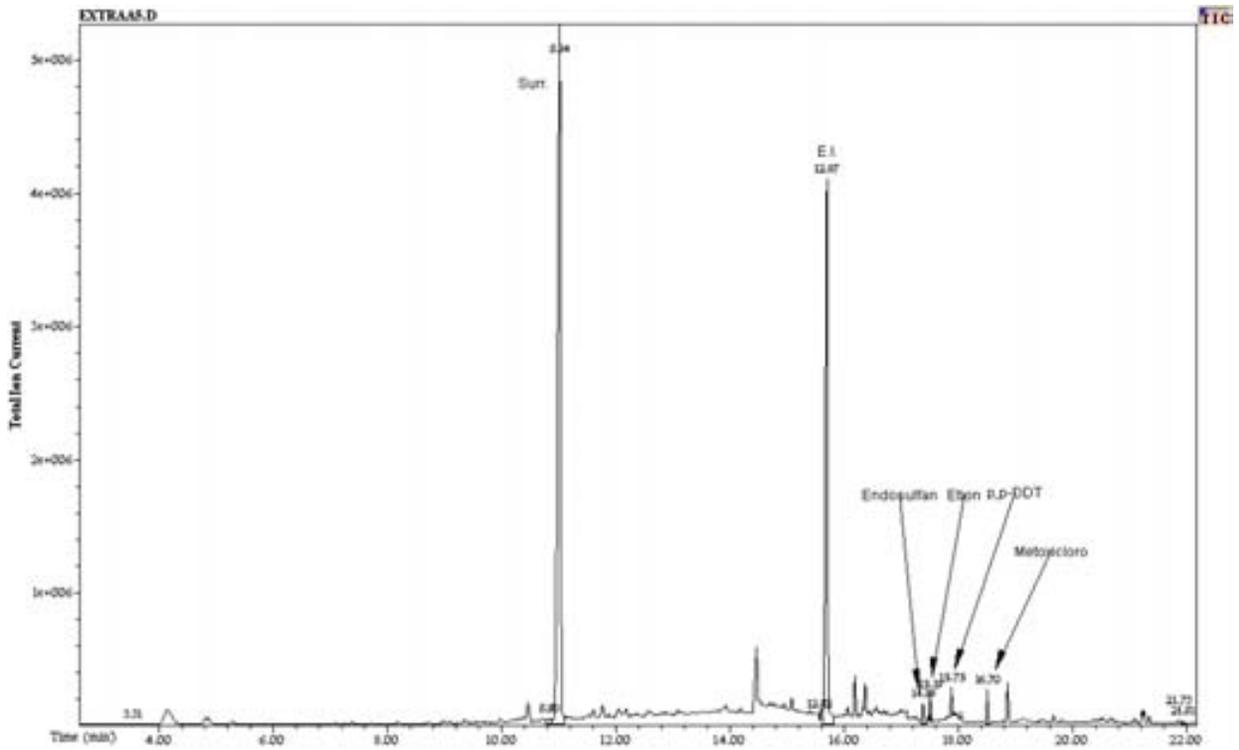
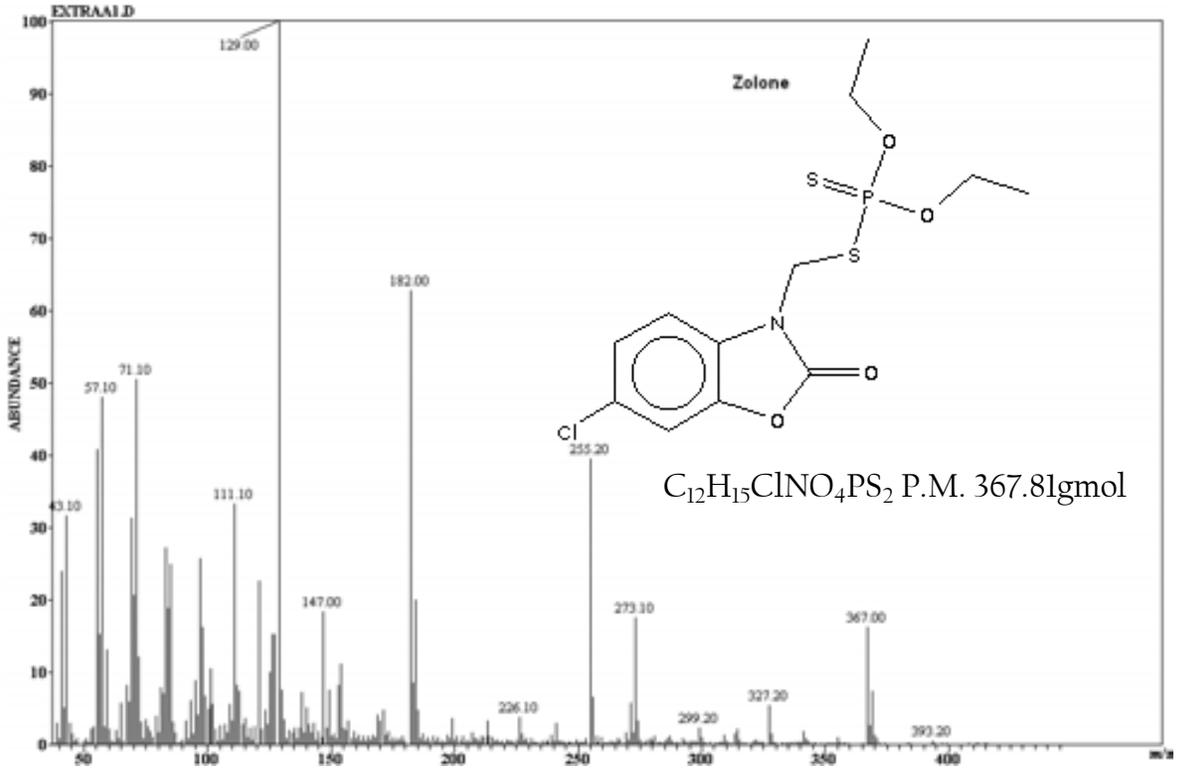
Espectro de masas de los pesticidas identificados en el cromatograma AIV-L1-I.



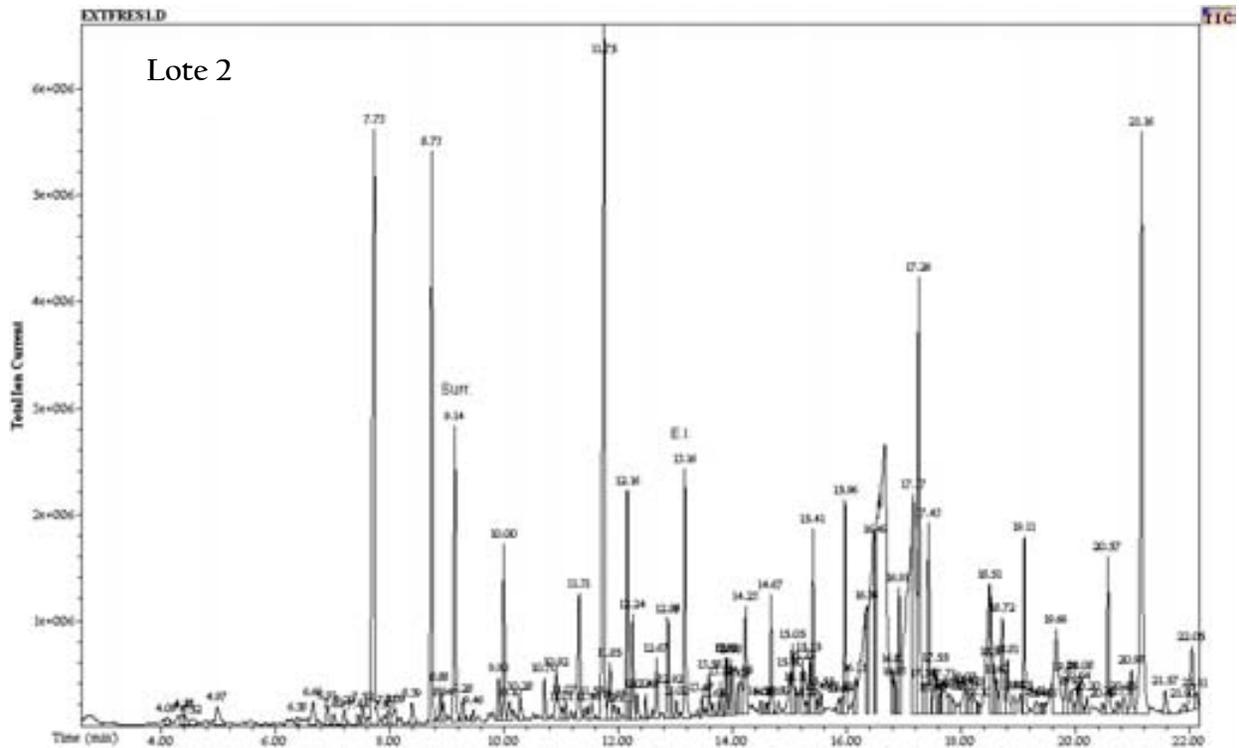




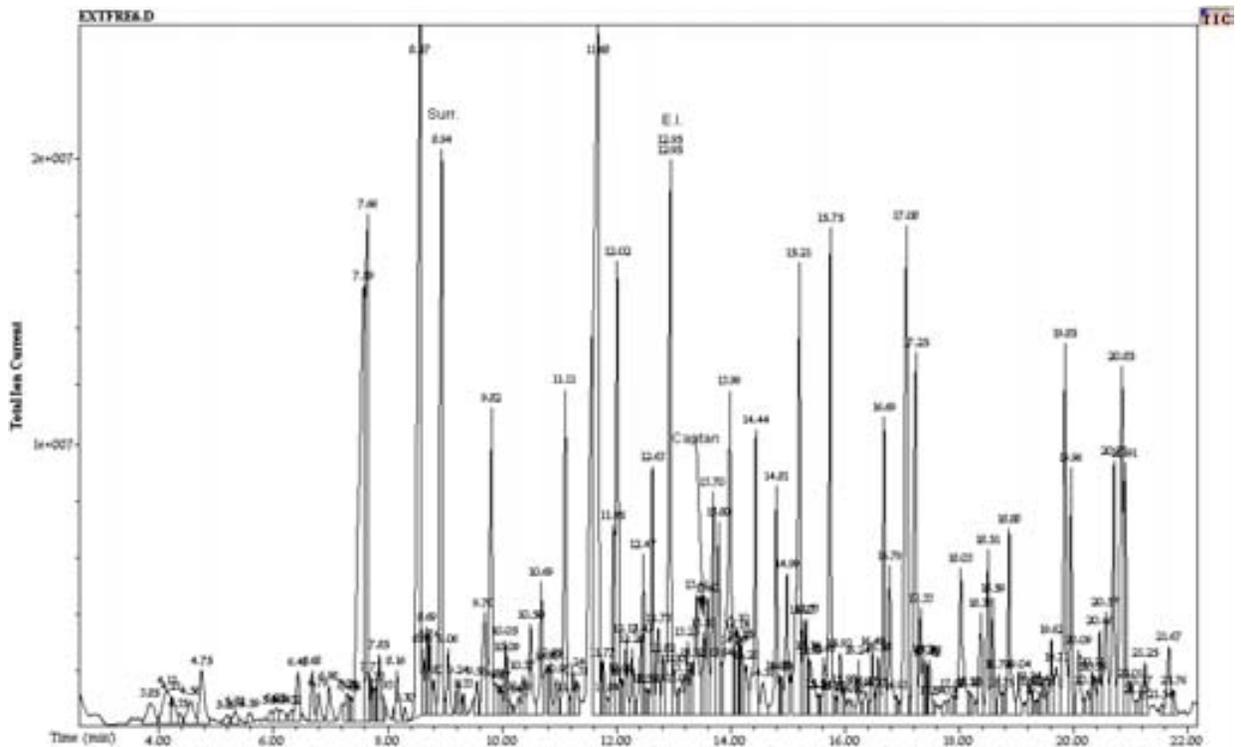




Cromatograma AIV-LI-2, 100 μ L (SIM).

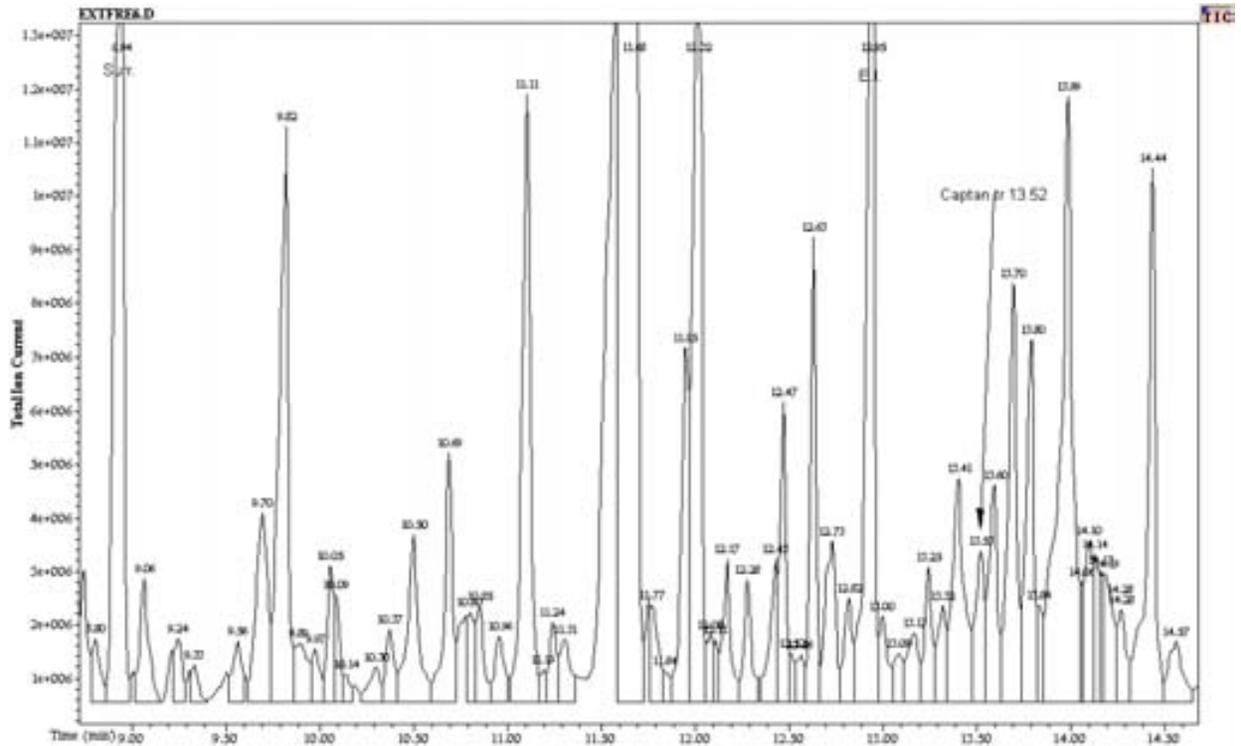


Cromatograma AIV-L2 (SCAN). Fresas adquiridas en Mercado del Centro de Xochimilco Procedencia: desconocida; Donde no fueron ubicados pesticidas

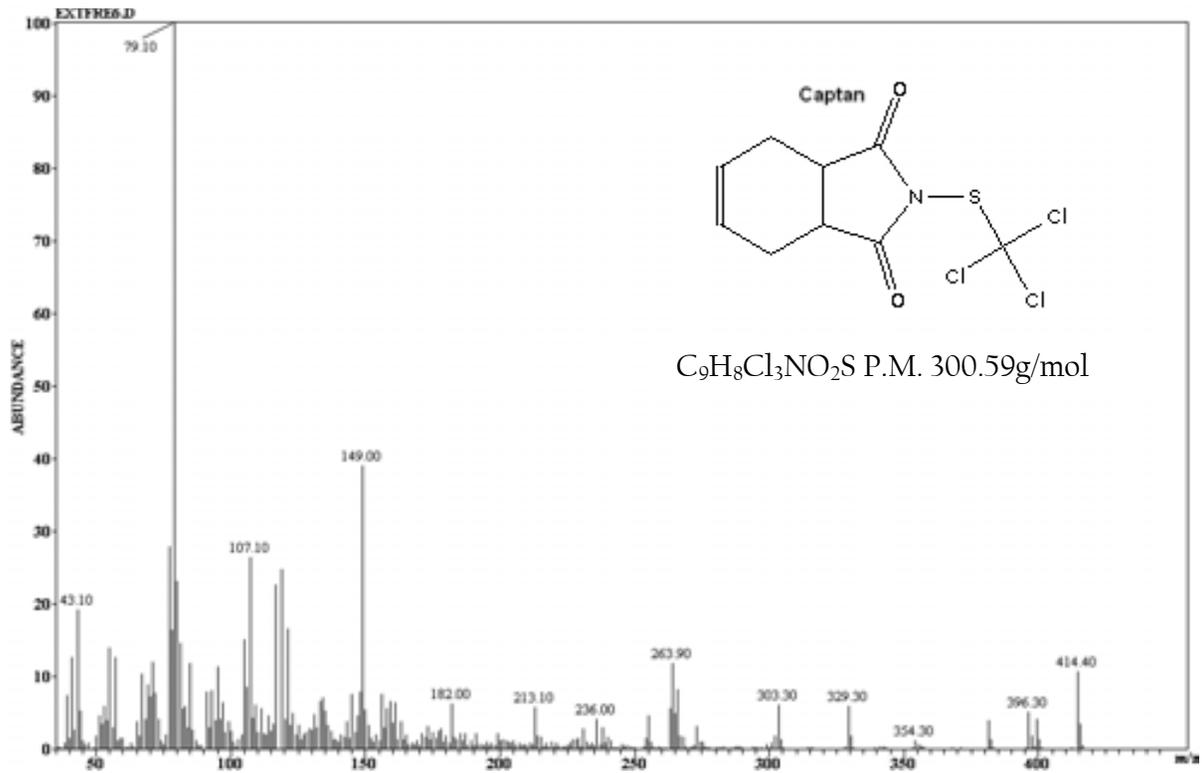


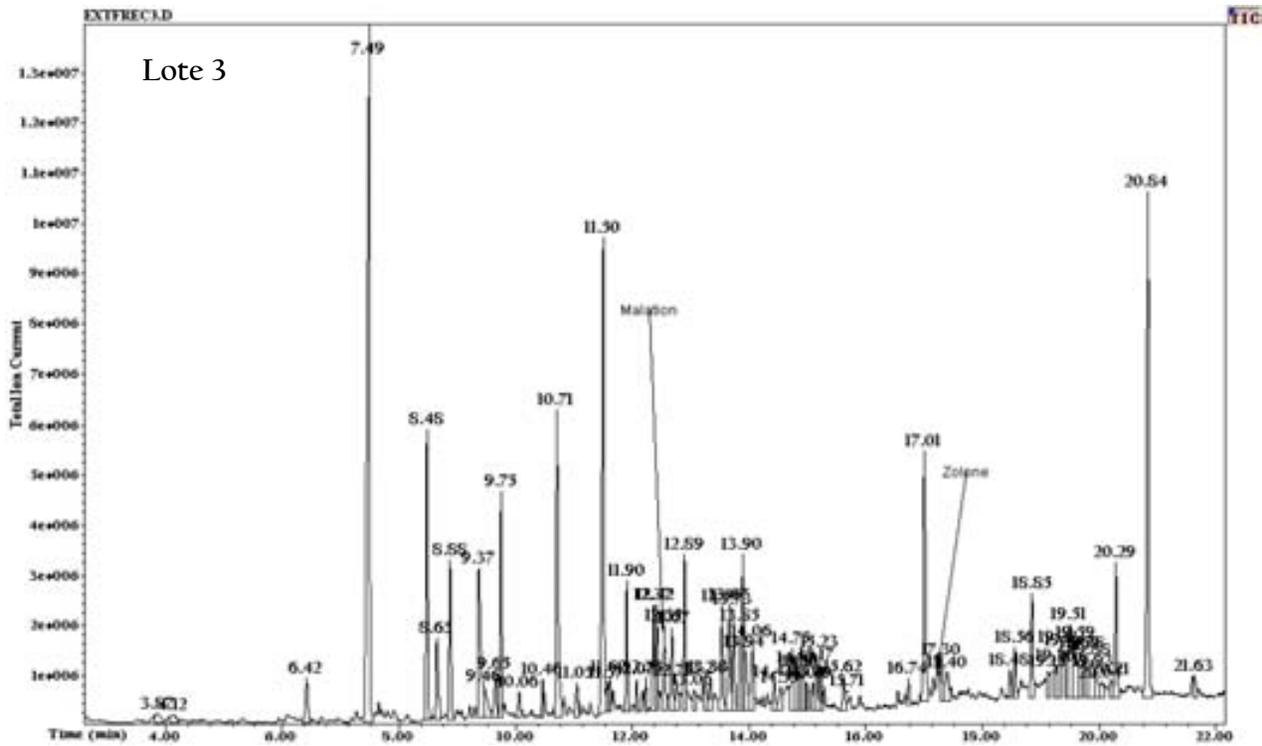
Cromatograma AIII-L2-1 SCAN (aprox. 100µL). Fresas adquiridas en Mercado del centro de Xochimilco, Procedencia desconocida; donde se ubico Captan.

Ampliación del cromatograma, pico del pesticida encontrado: Captan.



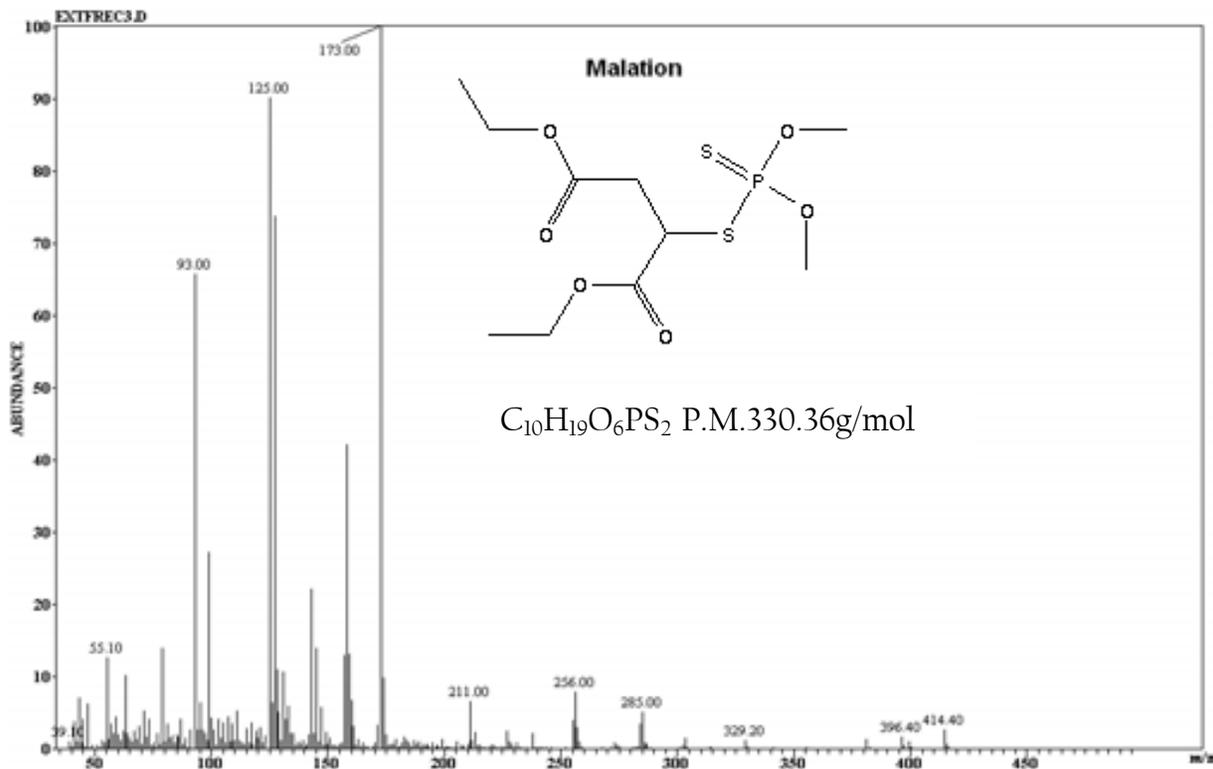
Espectros de masas del pesticida identificado en el lote 2:

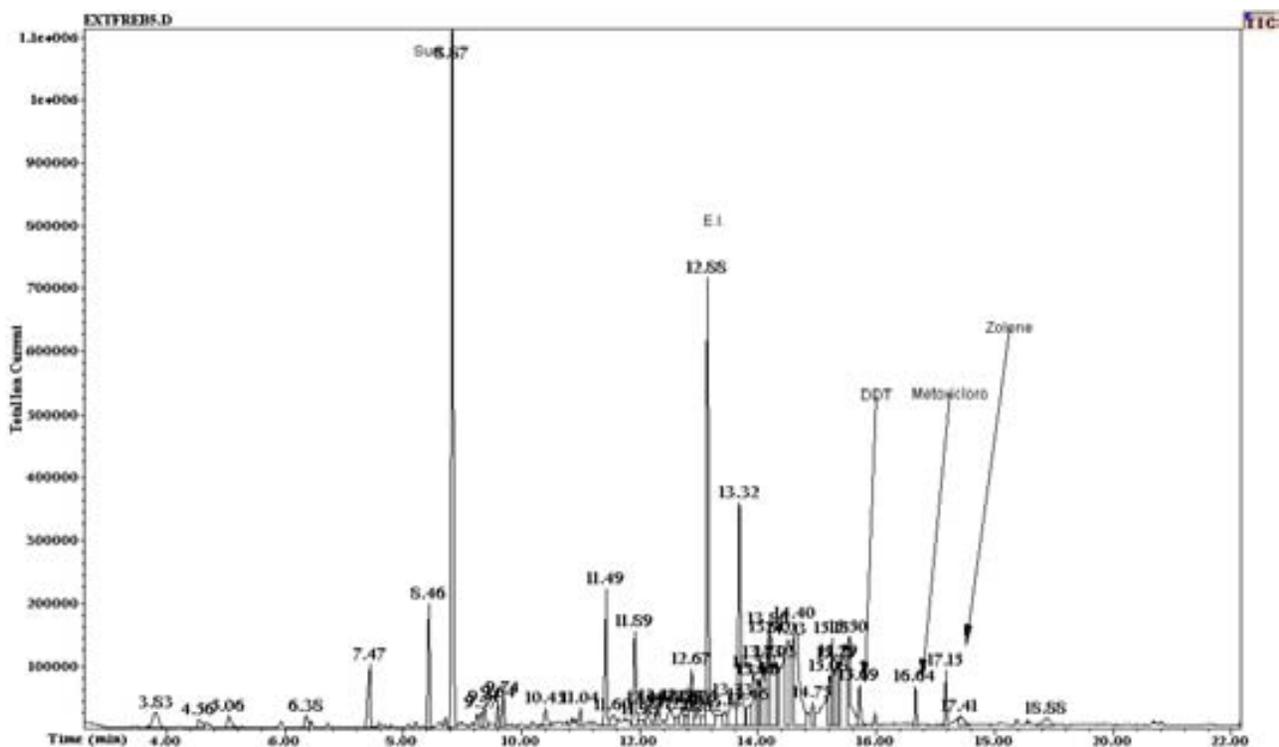
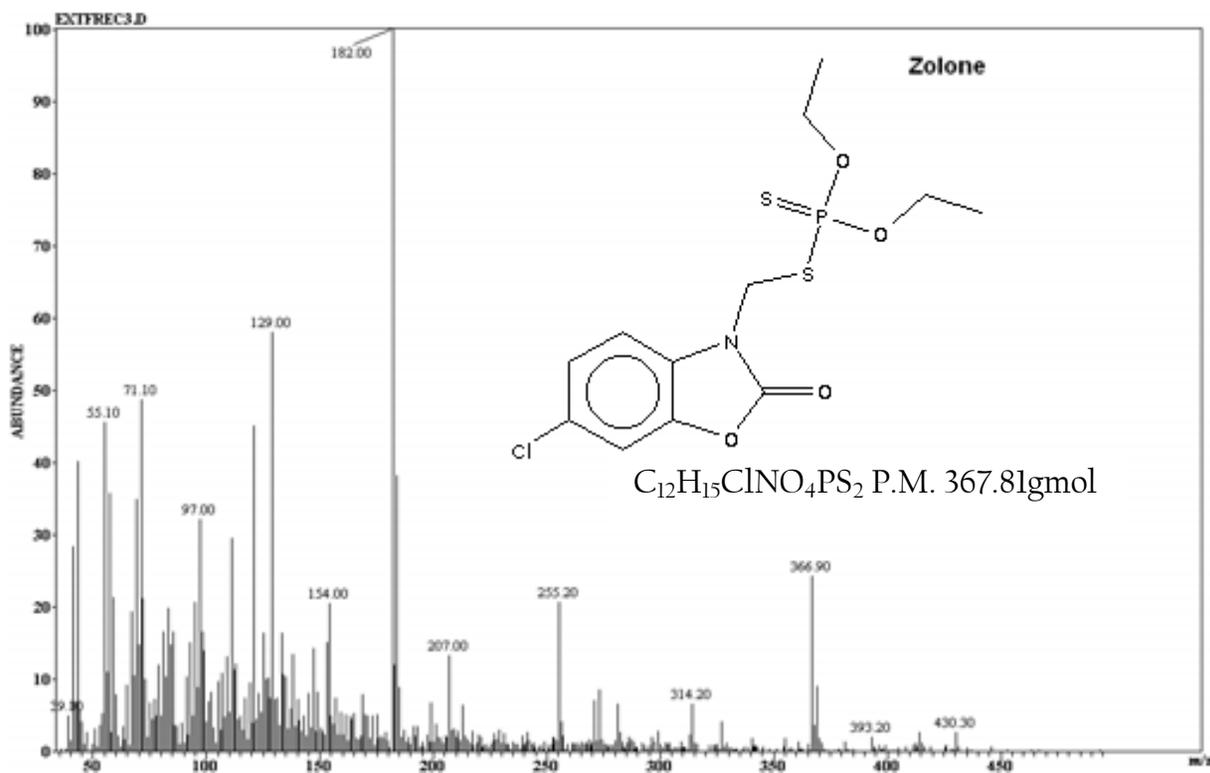




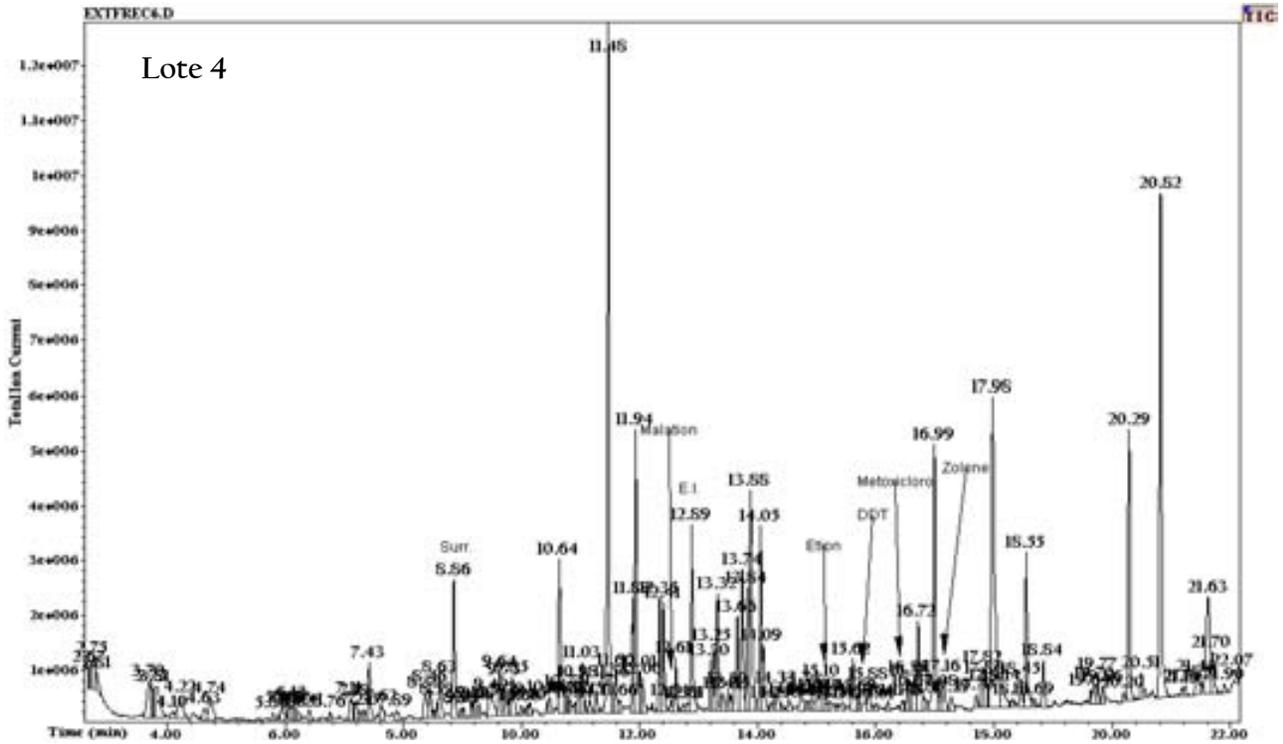
Cromatograma AIV-L3 (SCAN). Fresas adquiridas en Mercado del Centro de Xochimilco Procedencia: desconocida; Donde se ubicaron Malation y Zolone.

Espectros de masas de malation y del zolone en el lote 3.

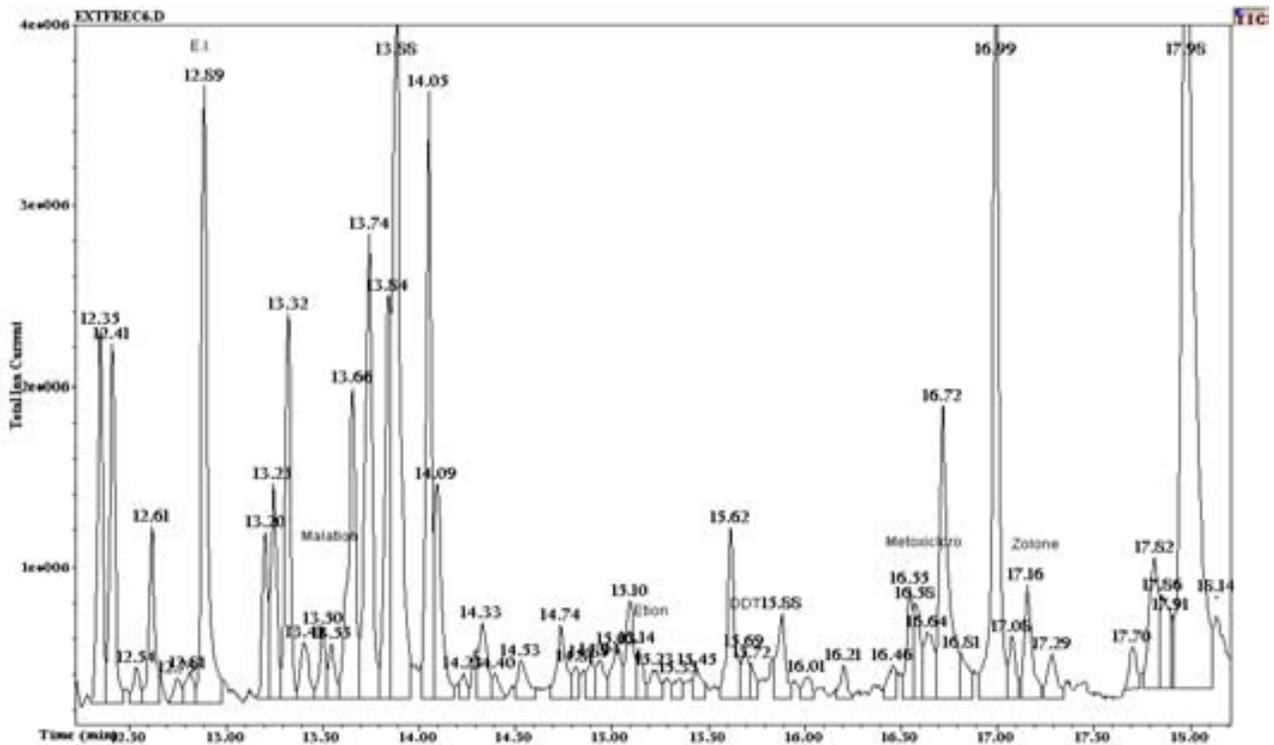




Cromatograma AIV-L3 (SIM). Fresas adquiridas en Mercado del Centro de Xochimilco
 Procedencia: desconocida; Donde se ubicaron Malation, DDT, Metoxicloro y Zolone.

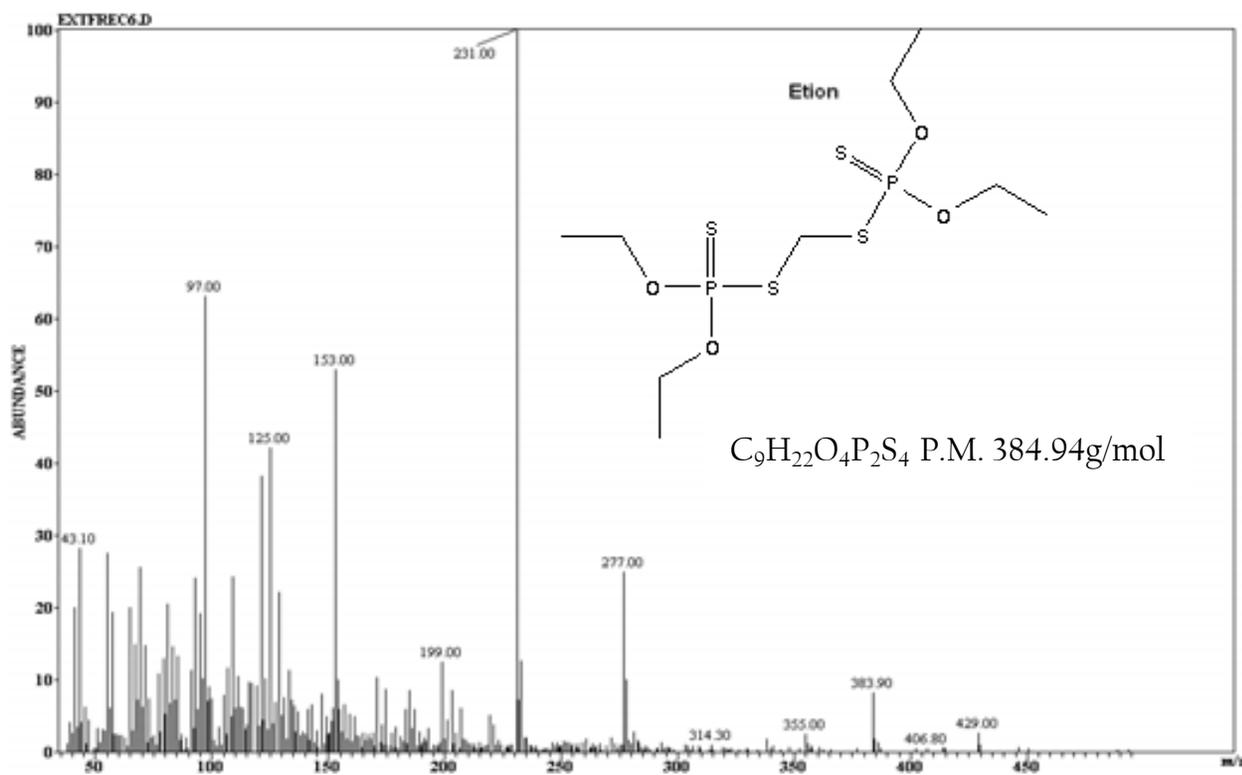
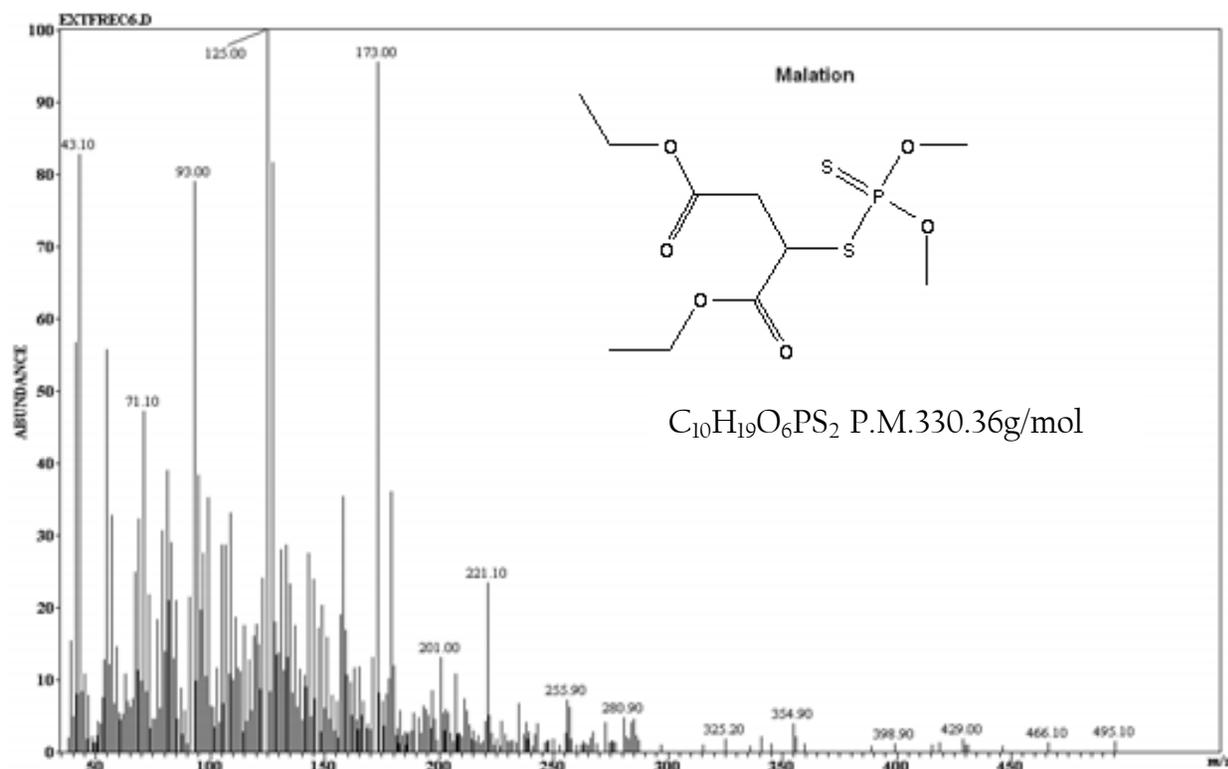


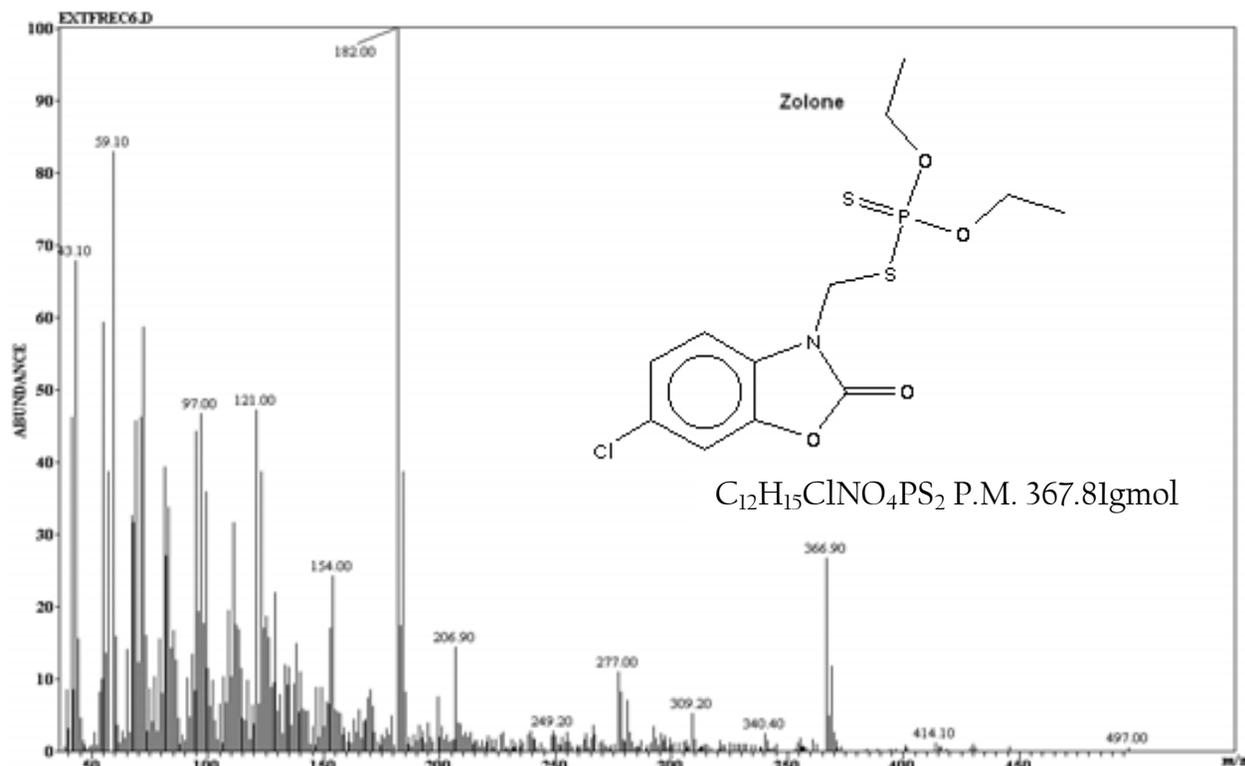
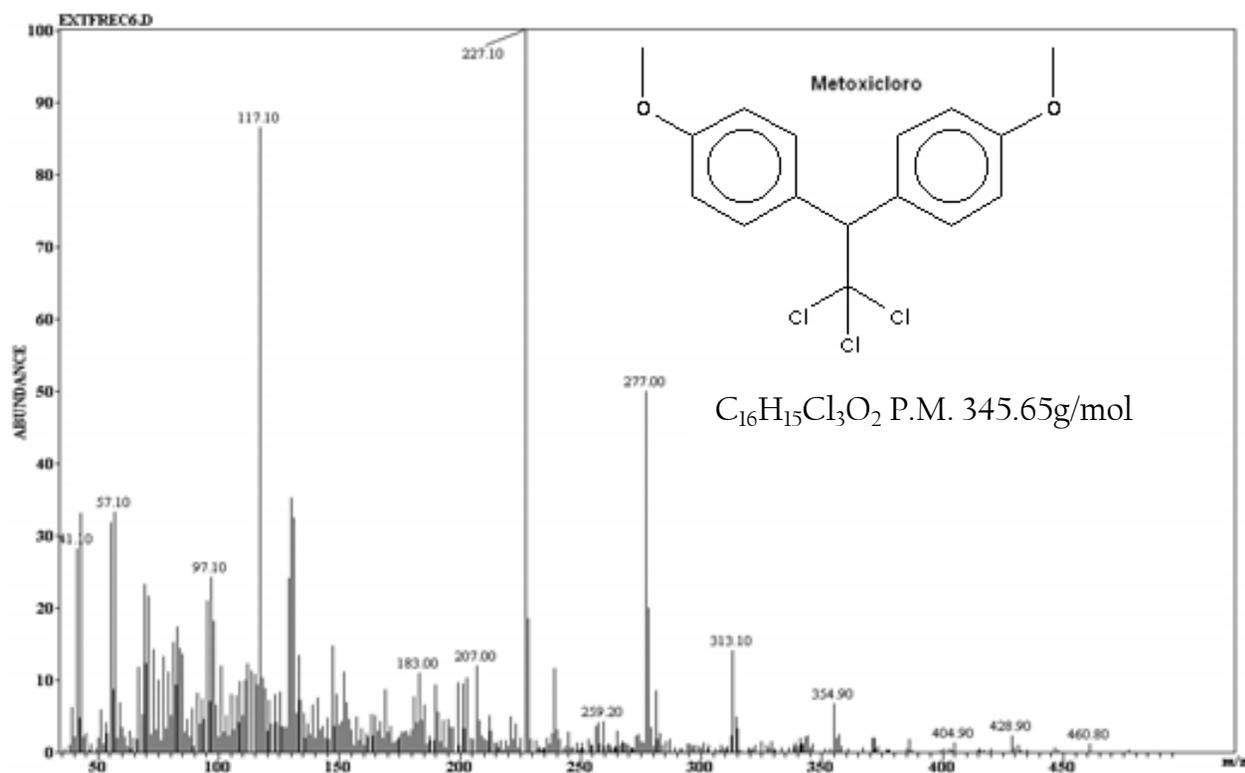
Cromatograma AIV-L4 (SCAN). Fresas adquiridas en Mercado del Centro de Xochimilco
 Procedencia: desconocida; Donde se ubicaron Malation, Etion, DDT, Metoxicloro y Zolone.

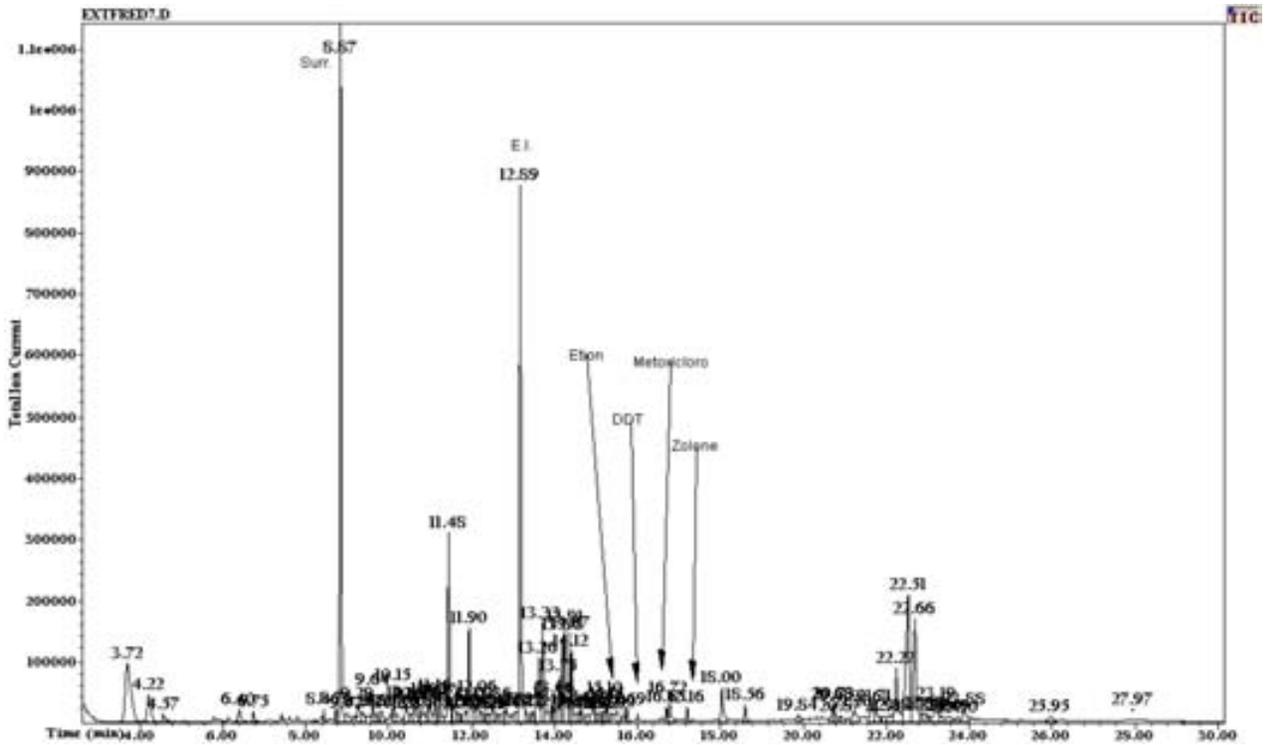


Ampliación del Cromatograma AIV-L4 (SCAN).

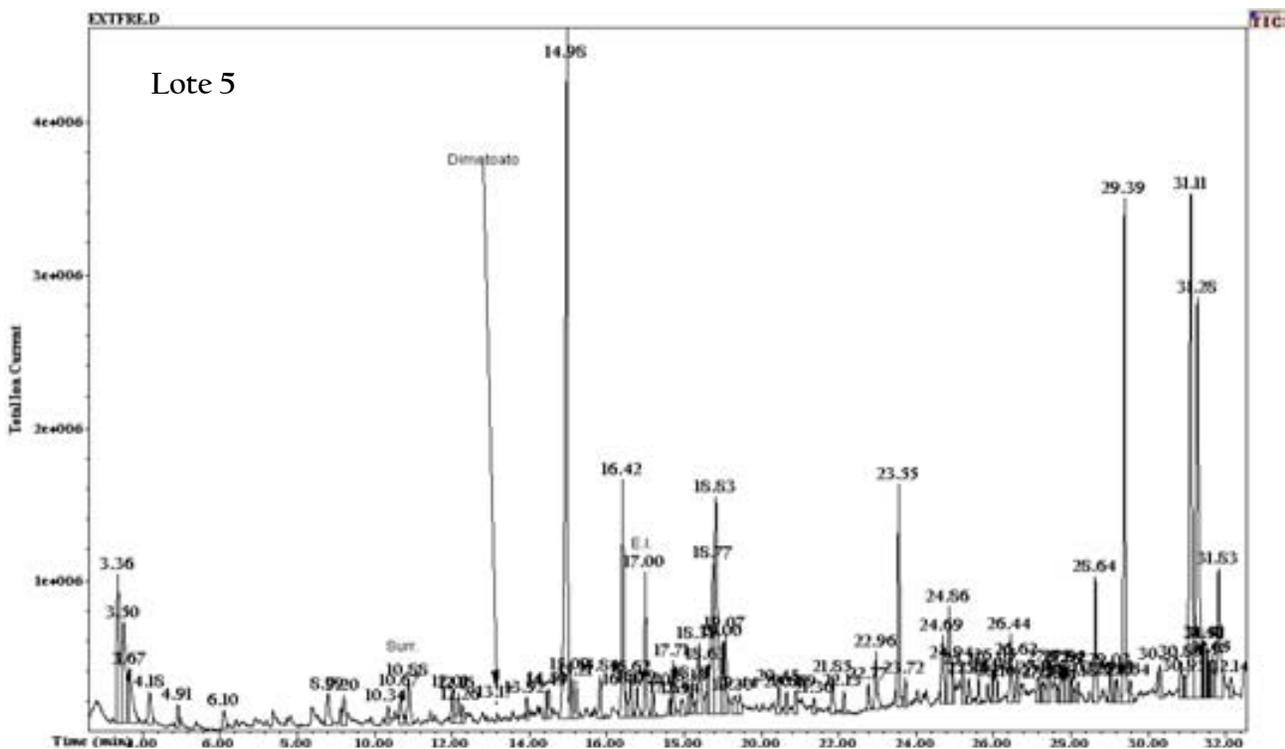
Espectros de masas de los pesticidas identificados en el lote 4:





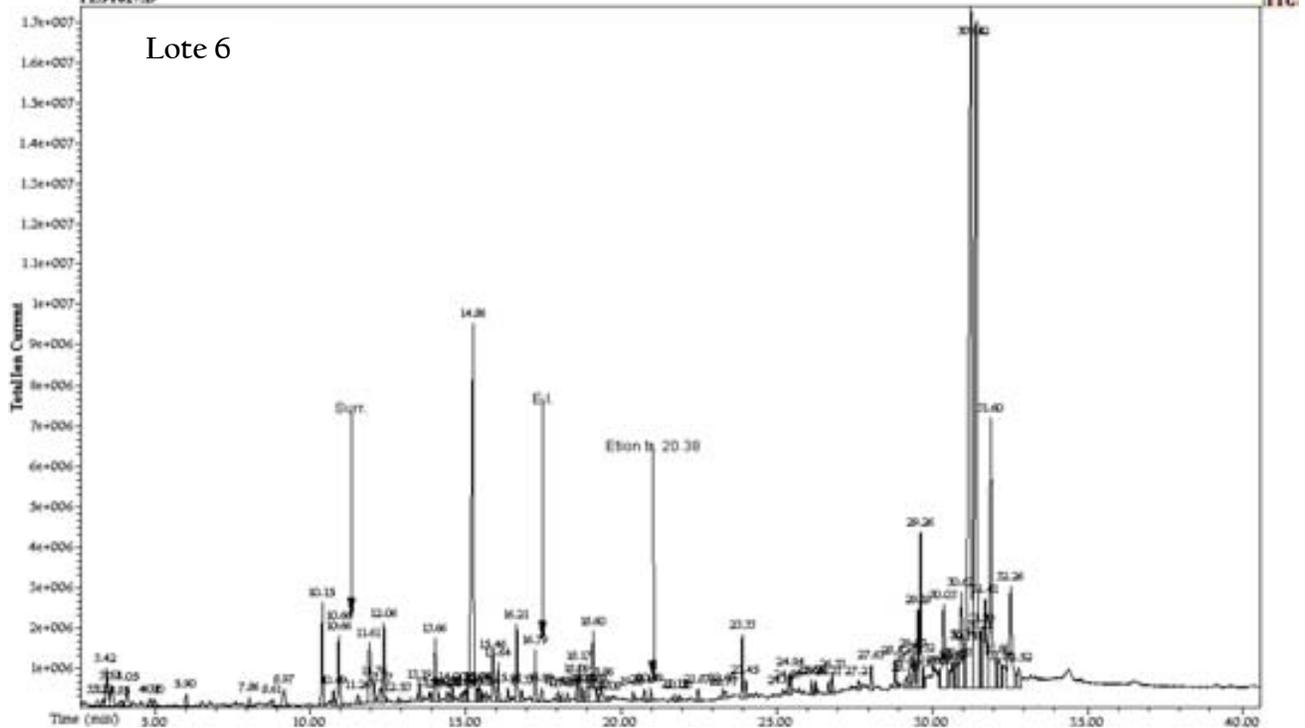
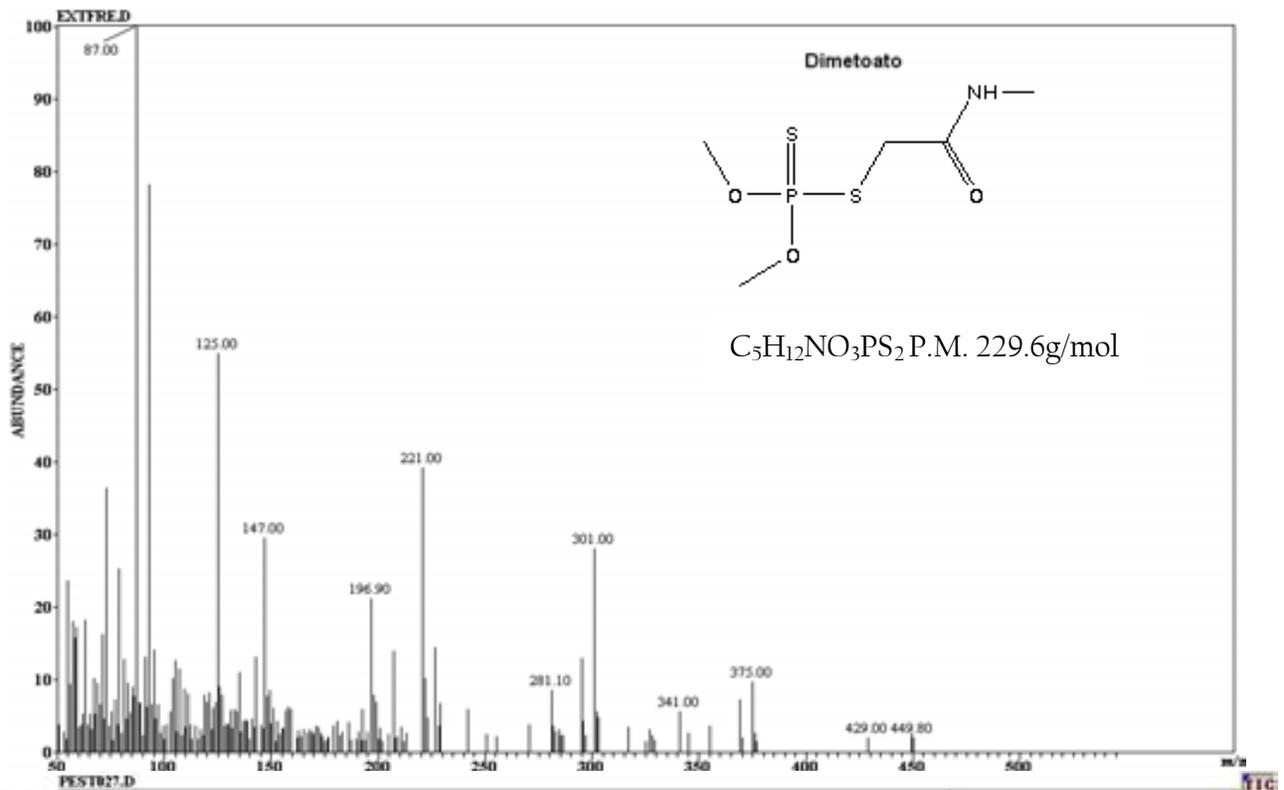


Cromatograma AIV-L4 (SIM). Fresas adquiridas en Mercado del Centro de Xochimilco
 Procedencia: desconocida; Donde se ubicaron Malation, Etion, DDT, Metoxicloro y Zolone



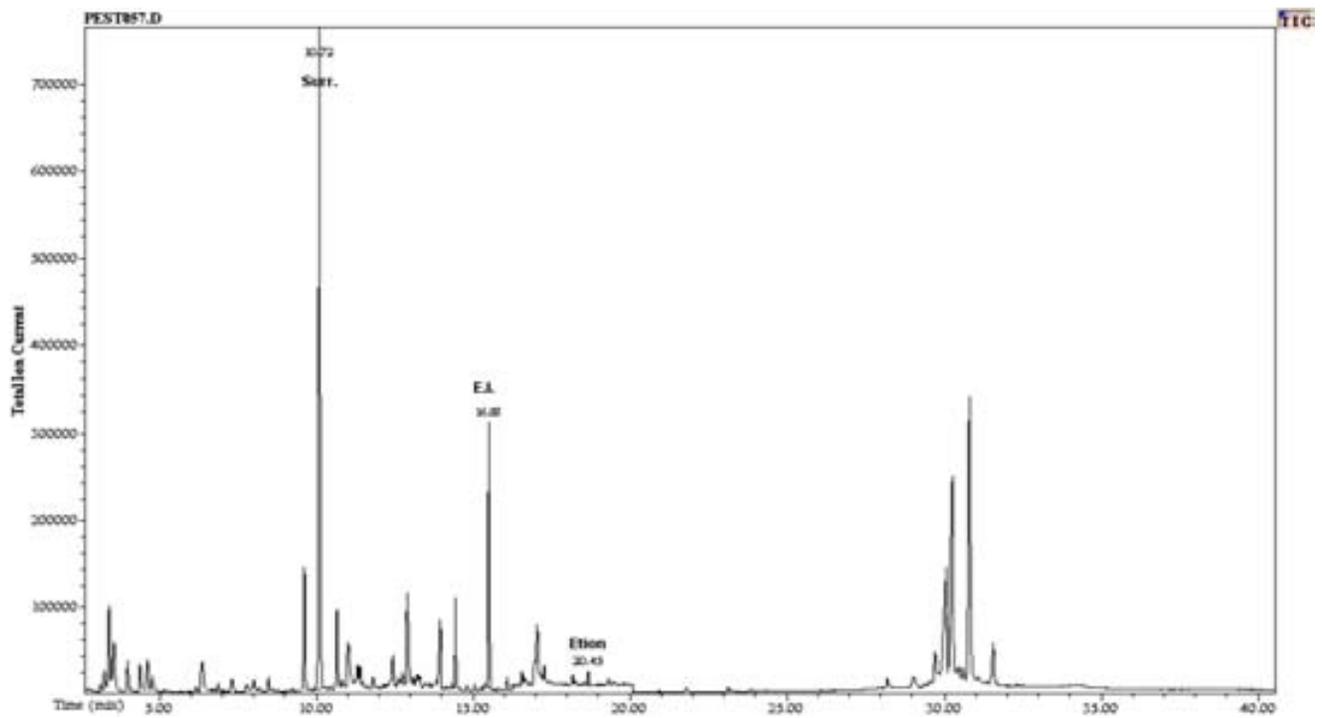
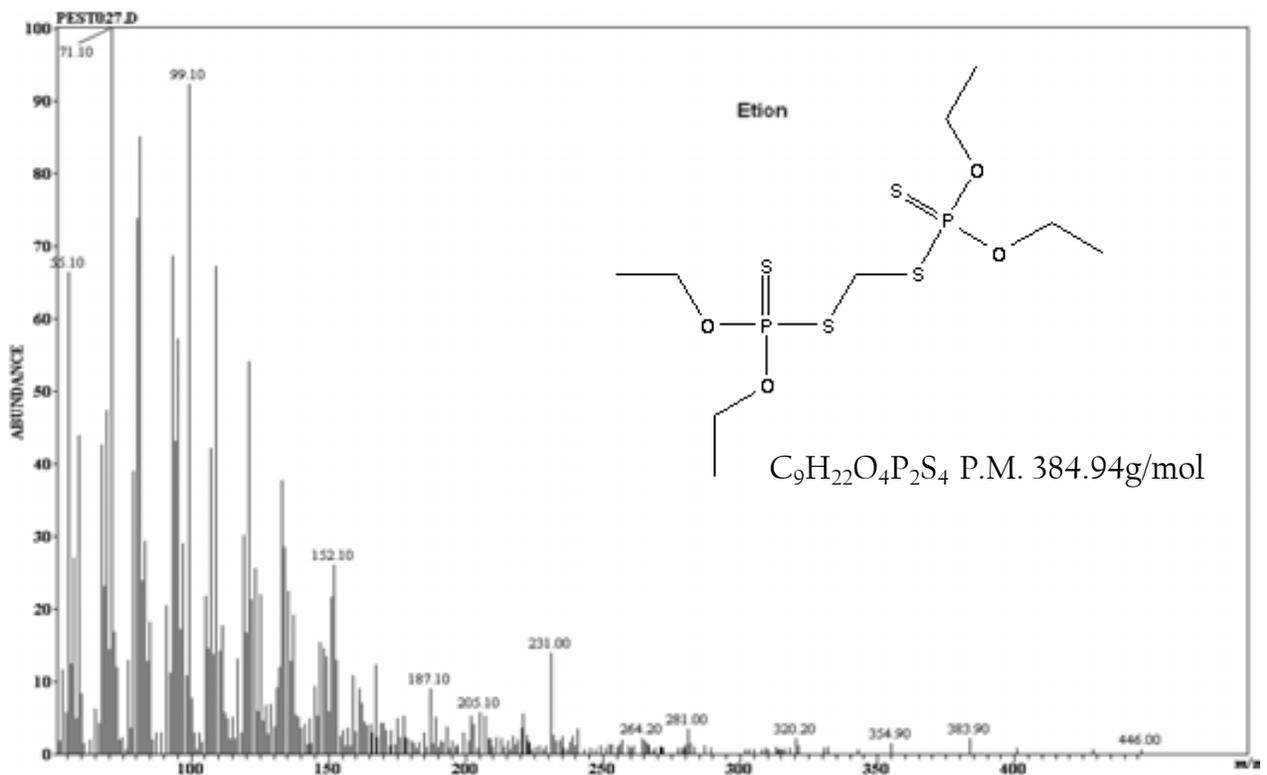
Cromatograma AIV-L5 (SCAN). Fresas adquiridas en Mercado del Centro de Xochimilco.
 Procedencia: desconocida; Donde se ubico a Dimetoato.

Espectro de masas de los pesticidas identificados en el lote 5:

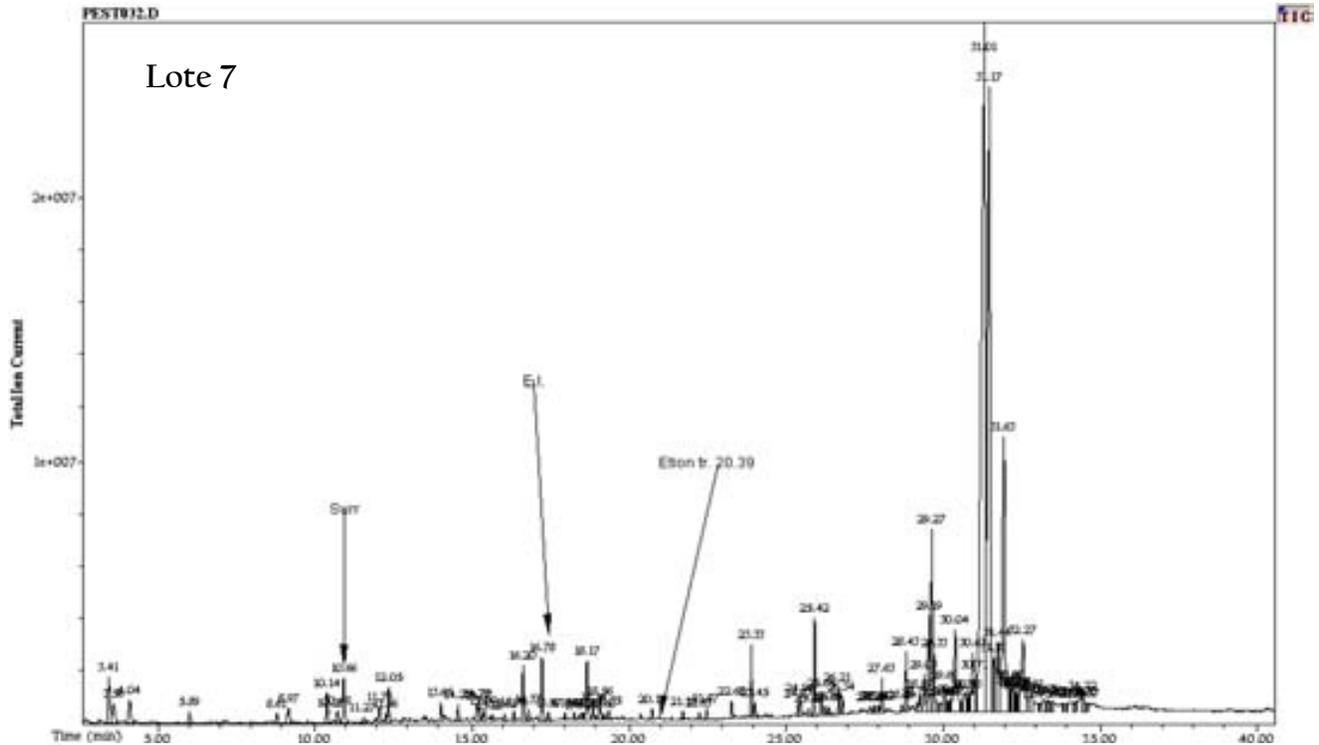


Cromatograma AIV-L6 (SCAN). Fresas adquiridas en la central de abastos, México D.F. Procedencia: Irapuato. Donde se ubico Etion.

Espectros de masas del pesticida identificado en el lote 6:

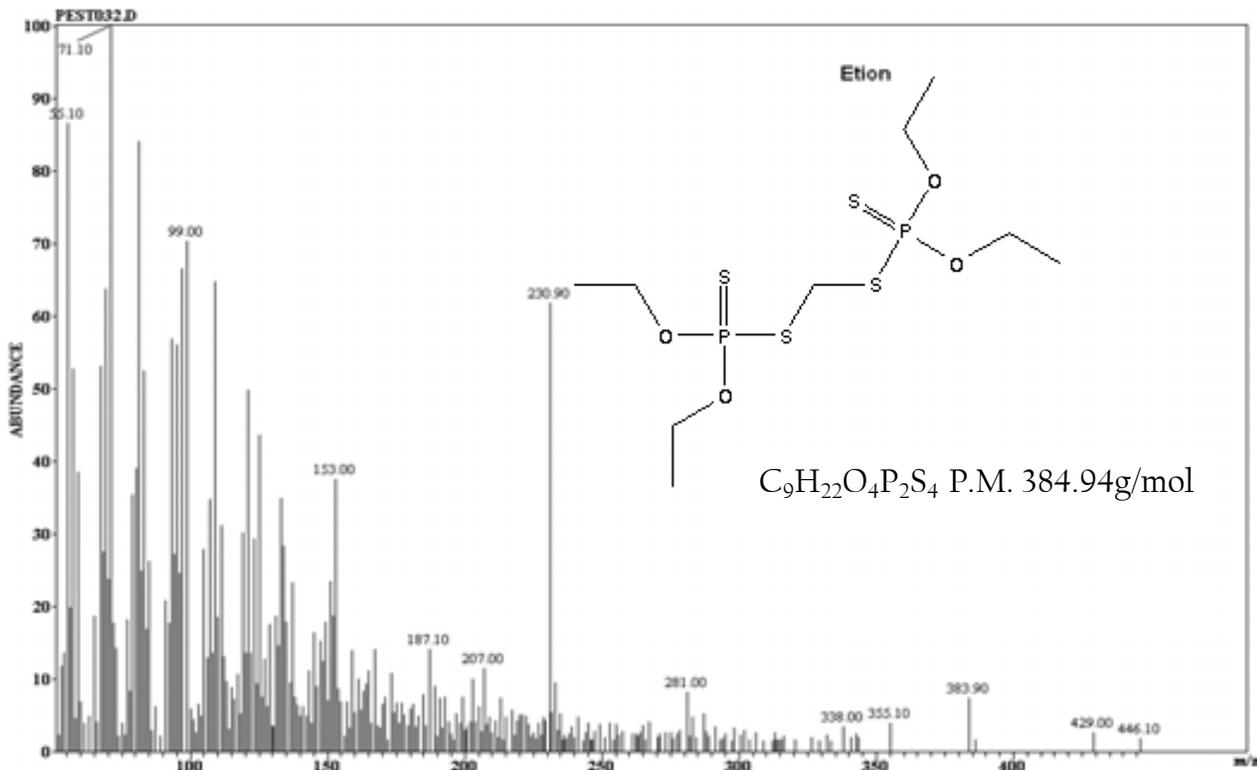


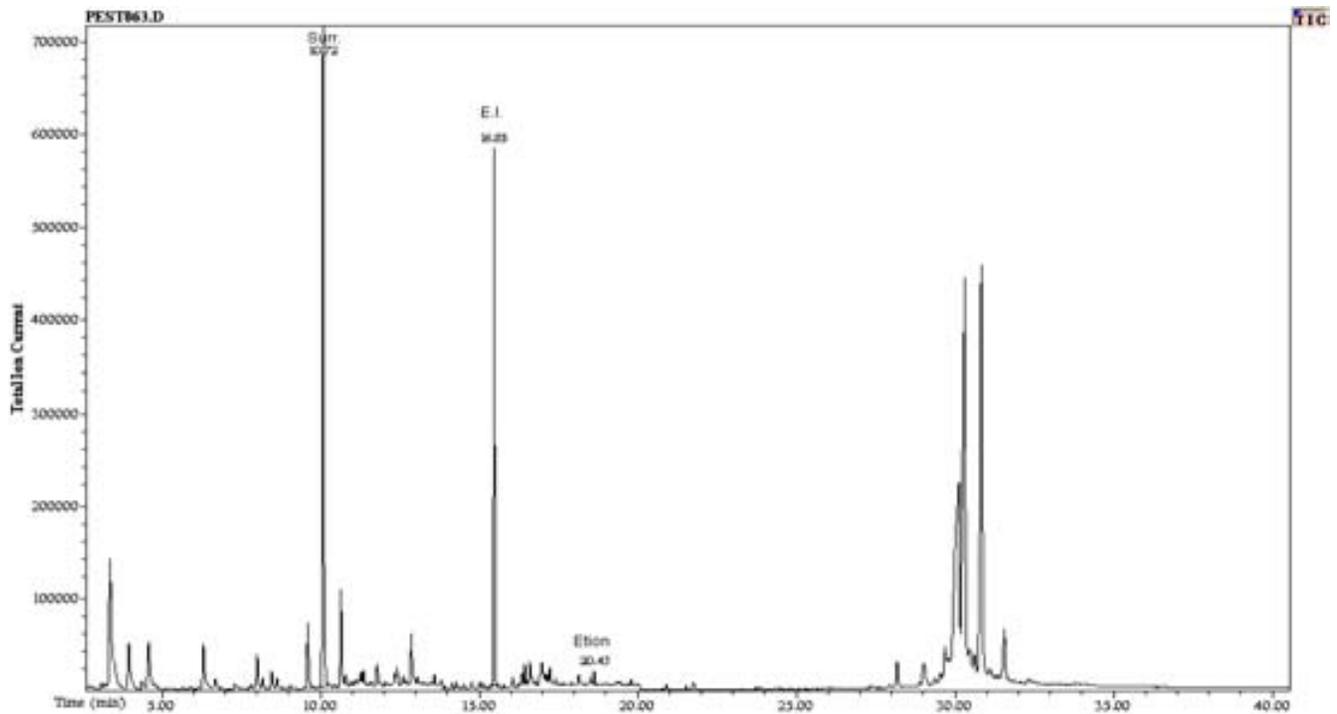
Cromatograma AIV-L6 (SIM). Fresas adquiridas en la central de abastos. Procedencia: Irapuato Gto. Donde se ubico al pesticida Etion.



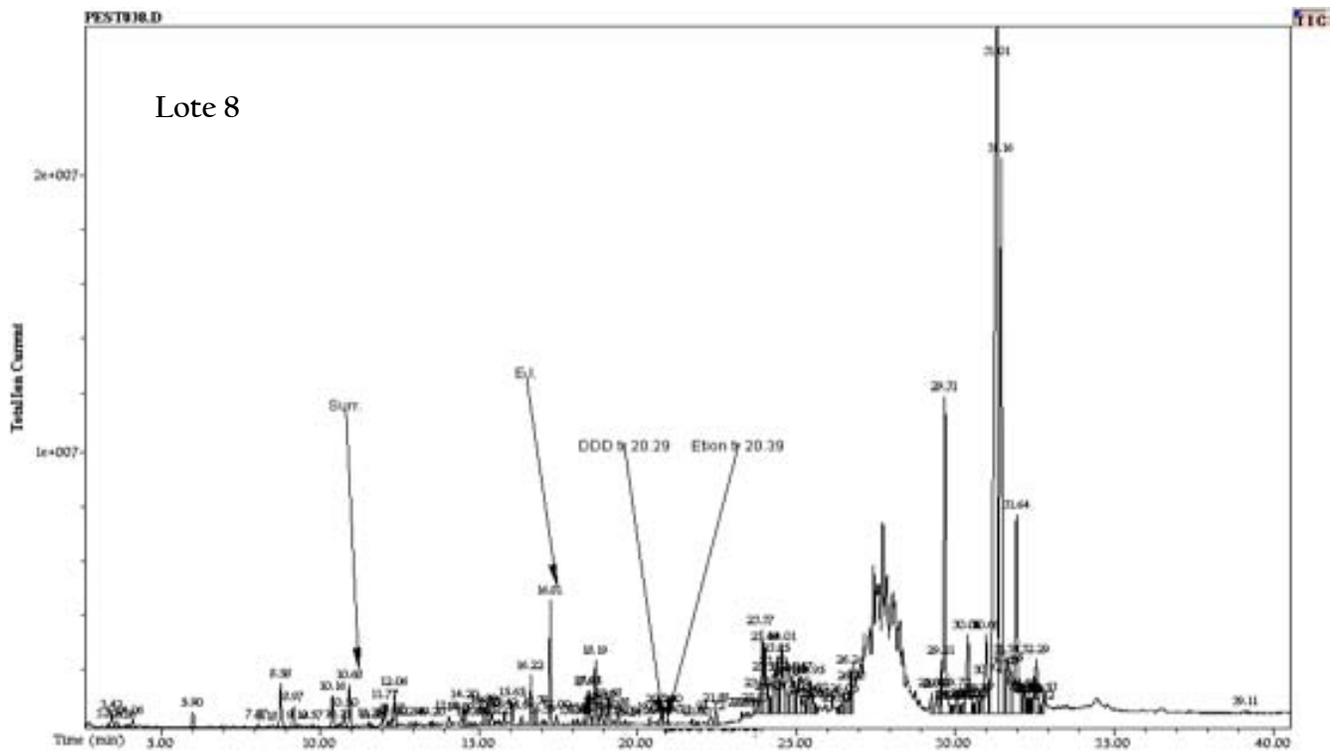
Cromatograma AIV-L7 (SCAN). Fresas adquiridas en la central de abastos, México D.F. Procedencia: Estado de México. Donde se ubico Etion.

Espectro de masas del pesticida identificado en el lote 7:



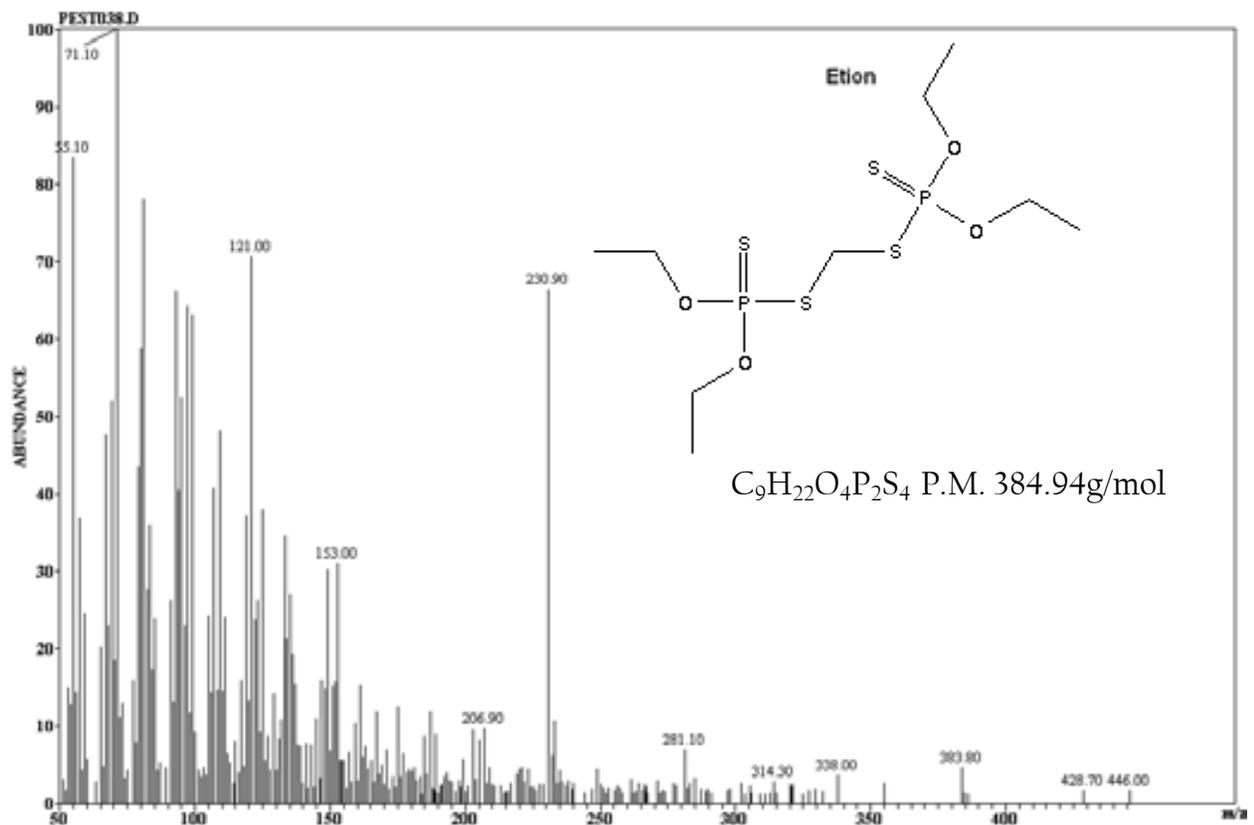
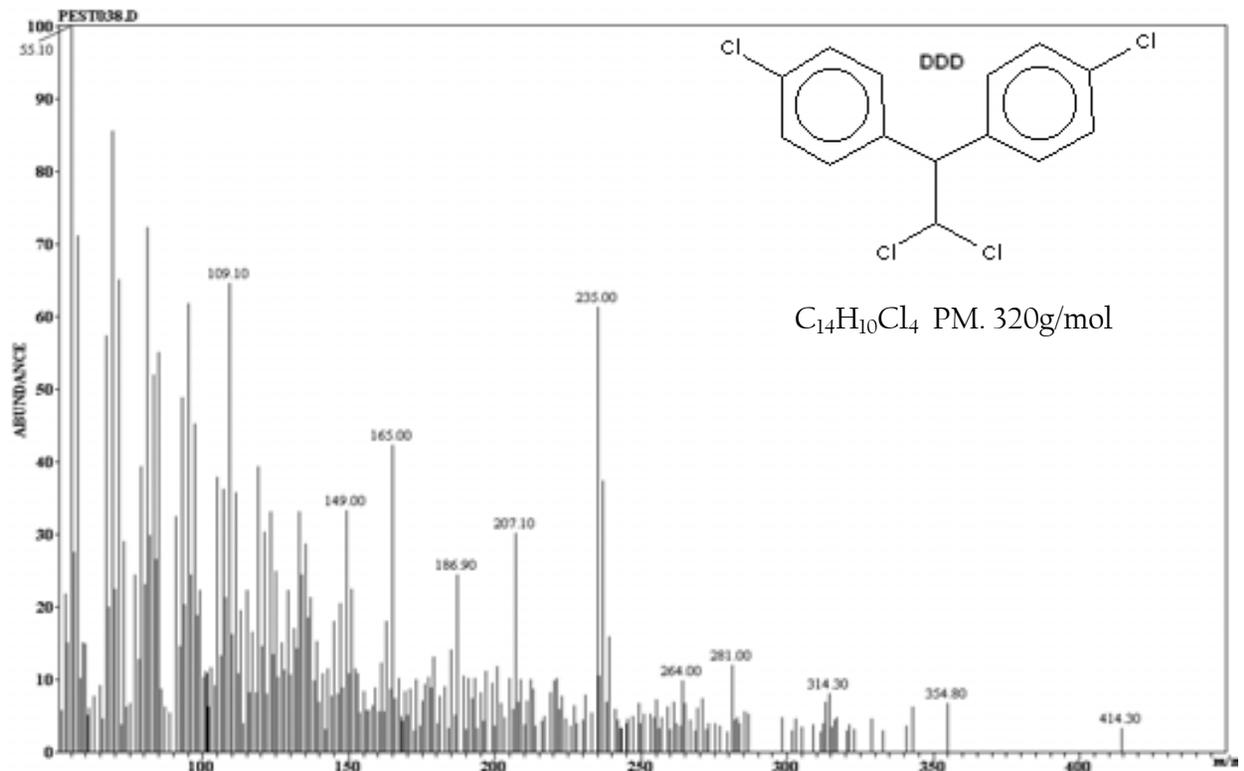


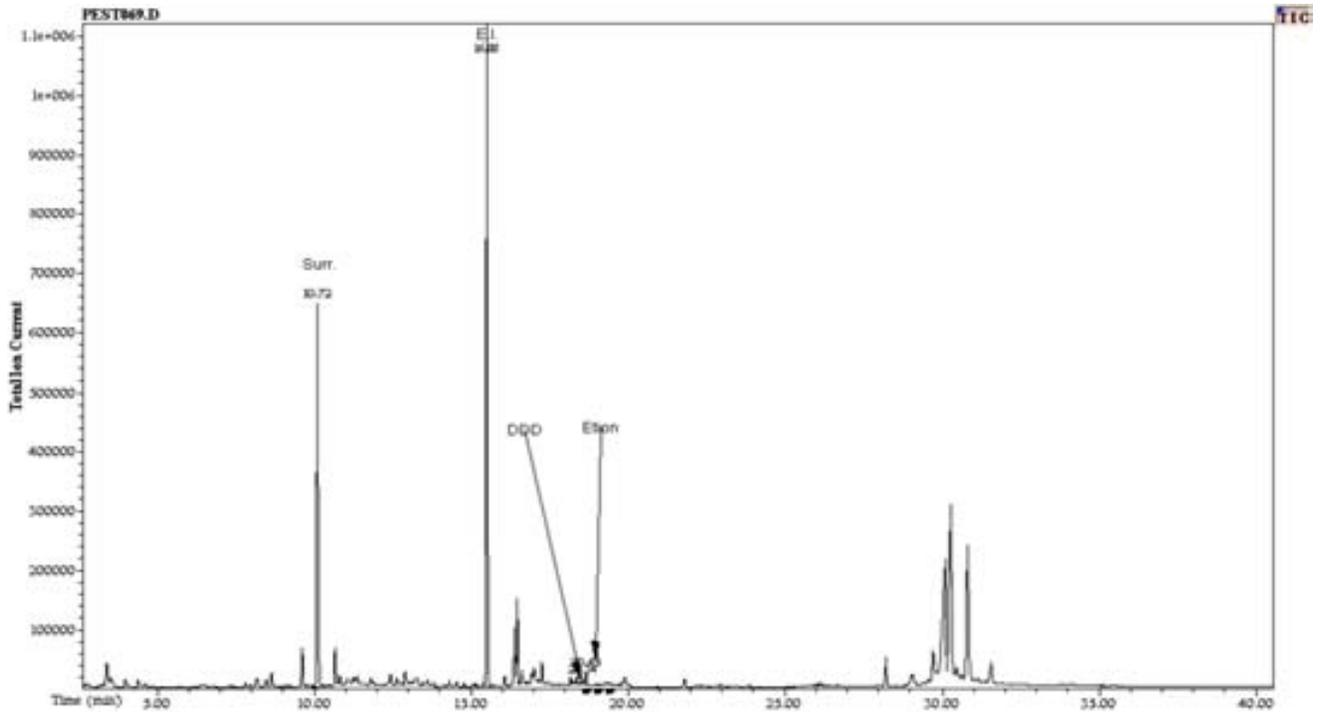
Cromatograma AIV-L7 (SIM). Fresas adquiridas en la central de abastos. Procedencia: Estado de México. Donde se ubico al pesticida Eton.



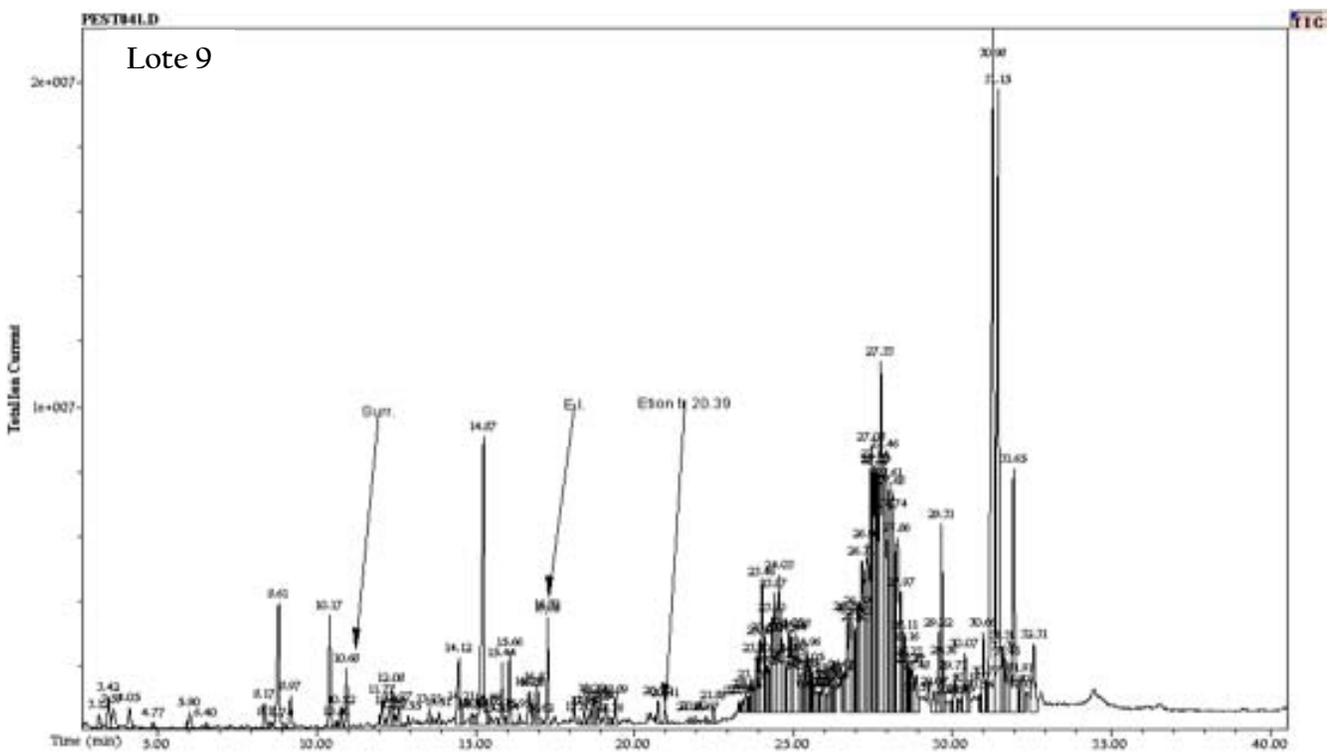
Cromatograma AIV-L8 (SCAN). Fresas adquiridas en la central de abastos, México D.F. Procedencia: Zitacuaro Mich . Donde se ubico DDD y Eton.

Espectro de masas de los pesticidas identificados en el lote 8:



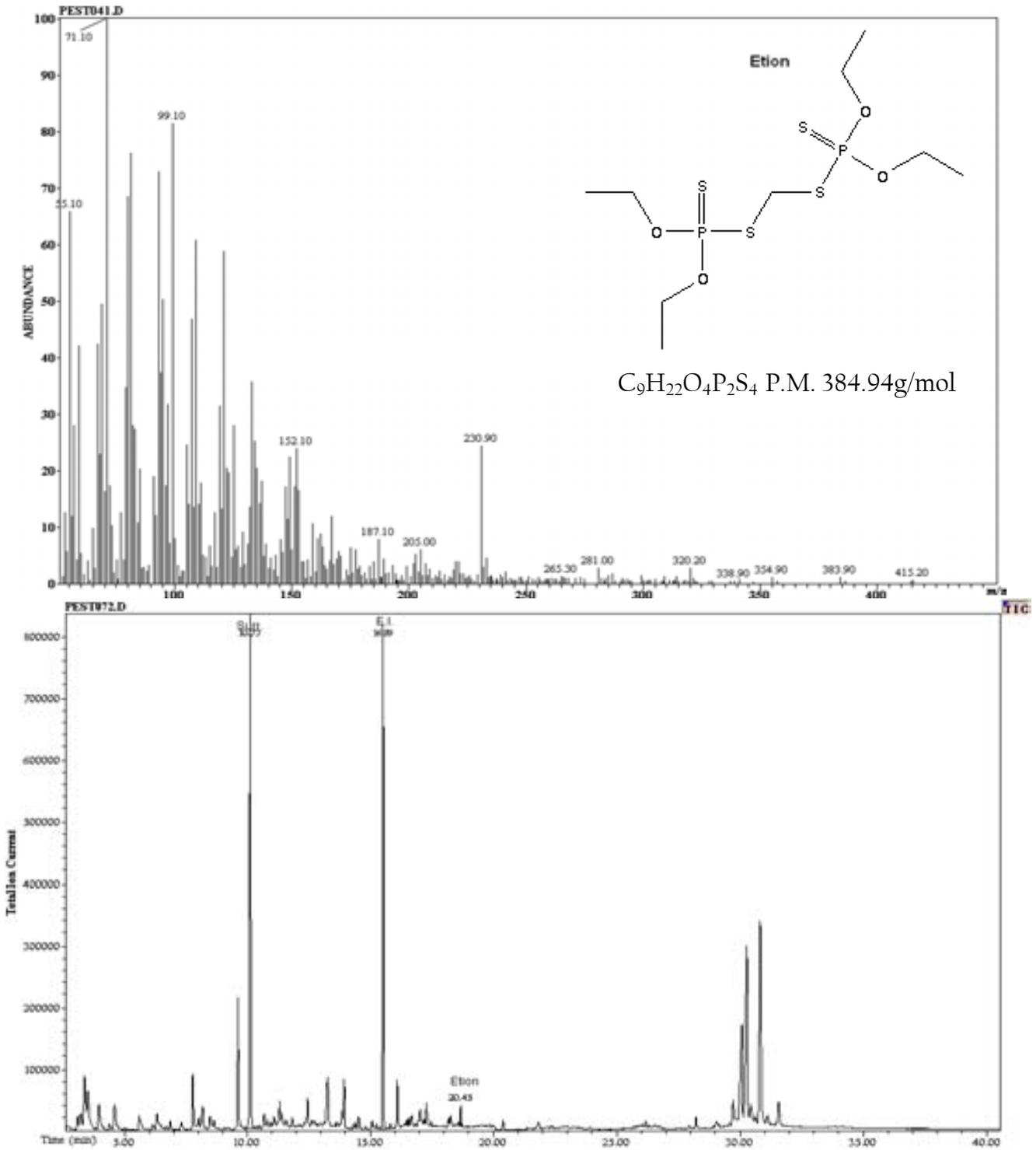


Cromatograma AIV-L8 (SIM). Fresas adquiridas en la central de abastos. Procedencia: Zitacuaro Mich. Donde se ubicaron los pesticidas DDD y Etion.

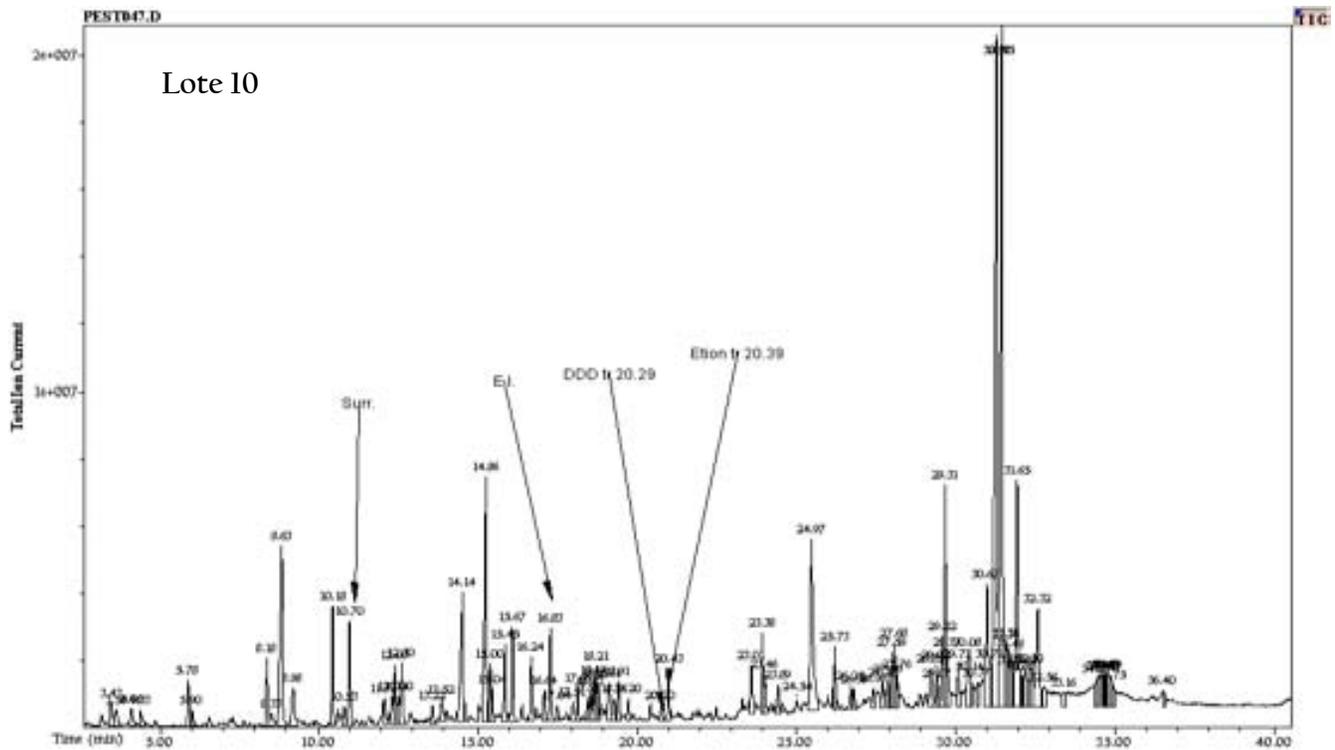


Cromatograma AIV-L9 (SCAN). Fresas adquiridas en la central de abastos, México D.F. Procedencia: Baja California. Donde se ubico Etion.

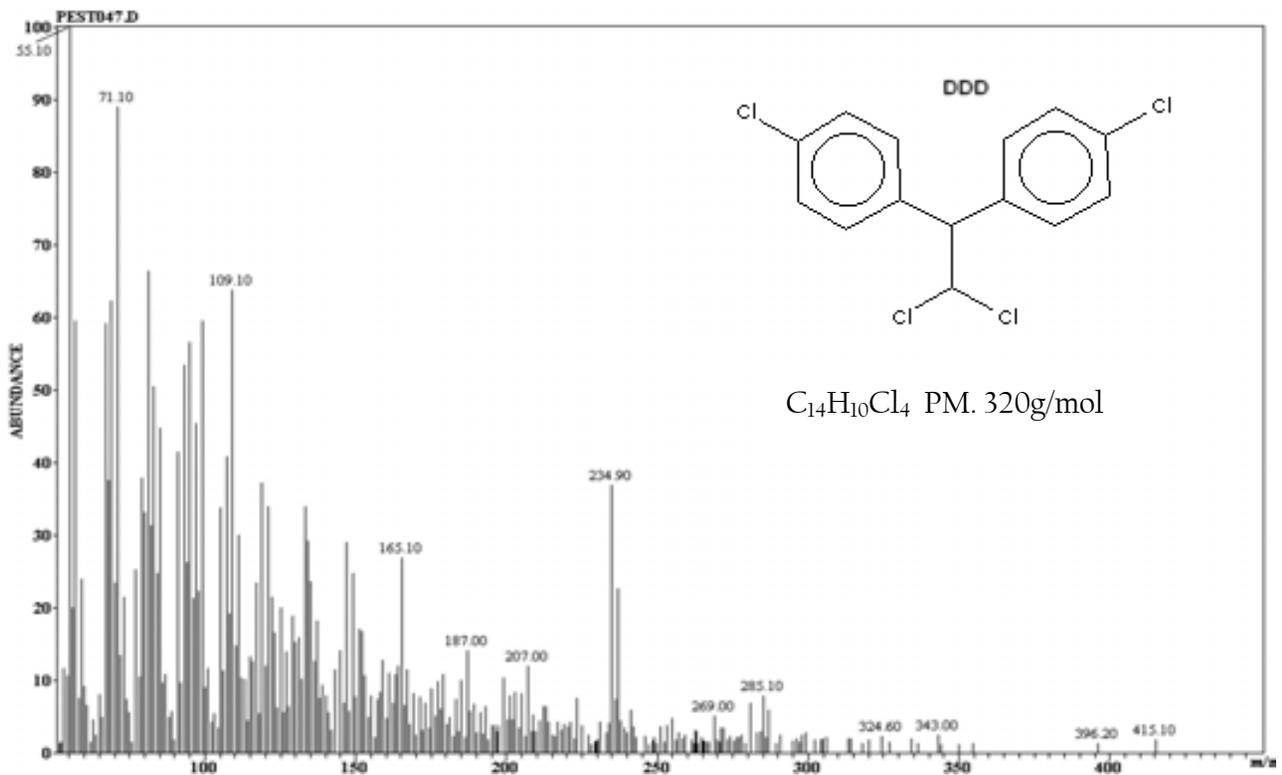
Espectro de masas del pesticida identificado en el lote 9:

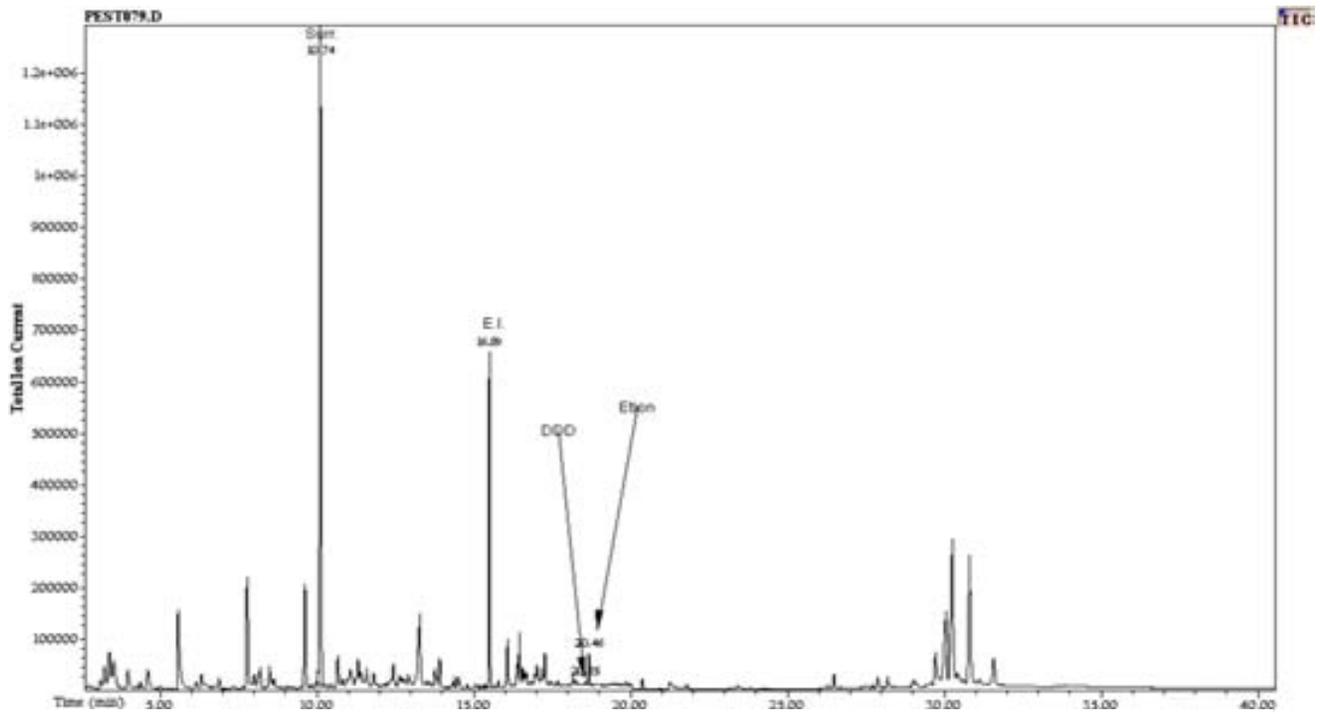
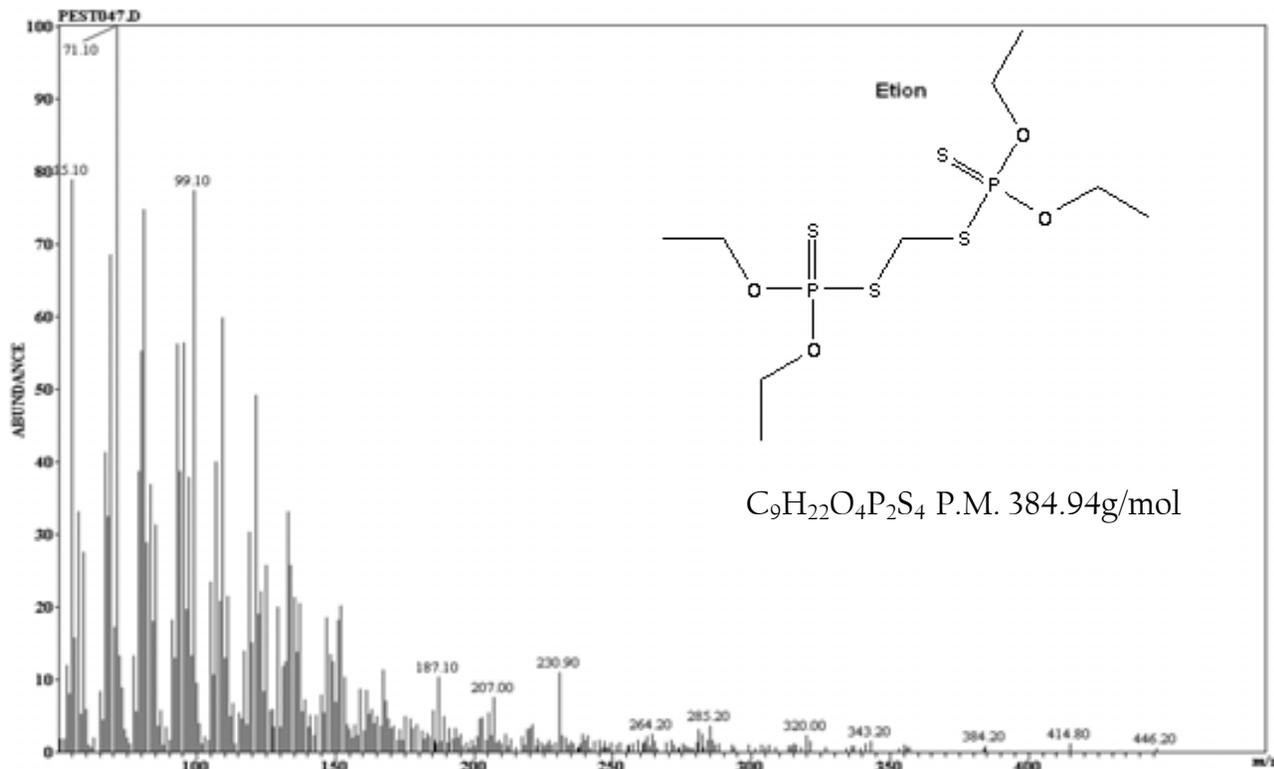


Cromatograma AIV-L9 (SIM). Fresas adquiridas en la central de abastos. Procedencia: Baja California. Donde se ubico al pesticida Eton.

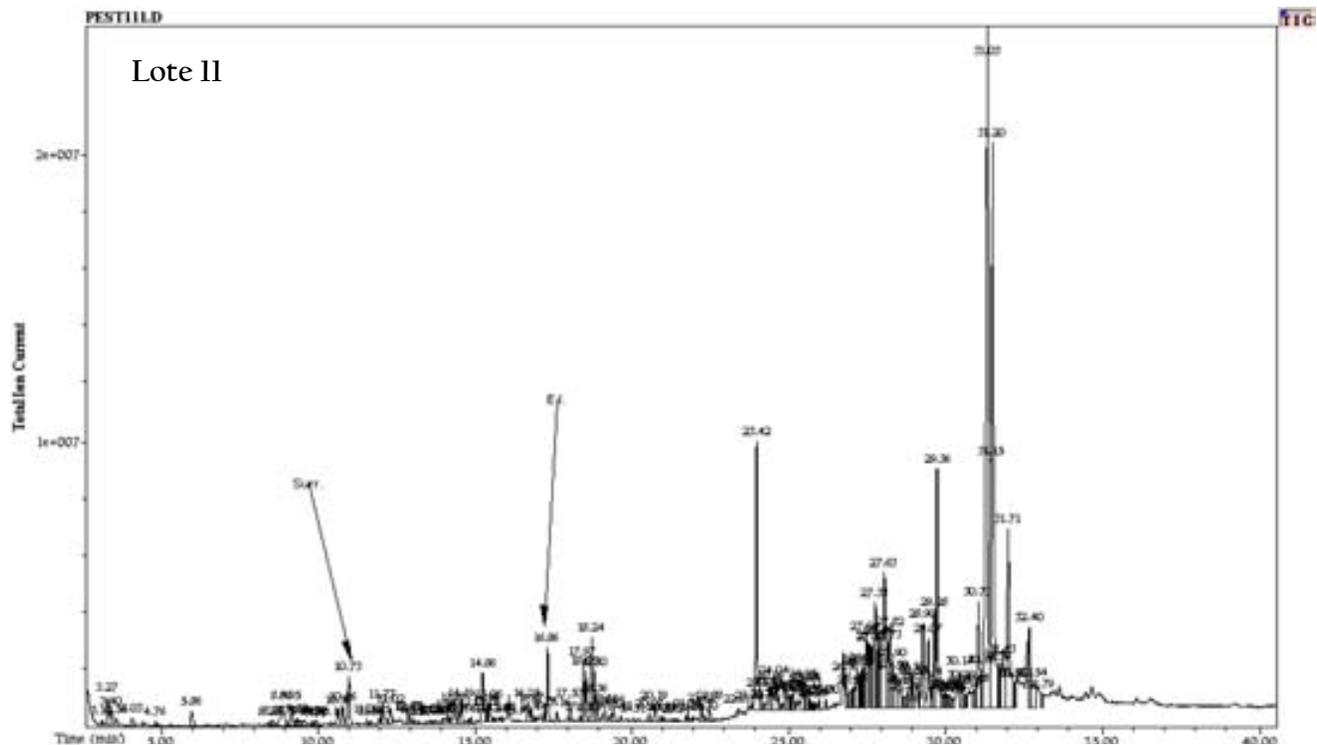


Cromatograma AIV-L10 (SCAN). Fresas adquiridas en la central de abastos, México D.F. Procedencia: Baja California. Donde se ubicaron DDD y Etion.



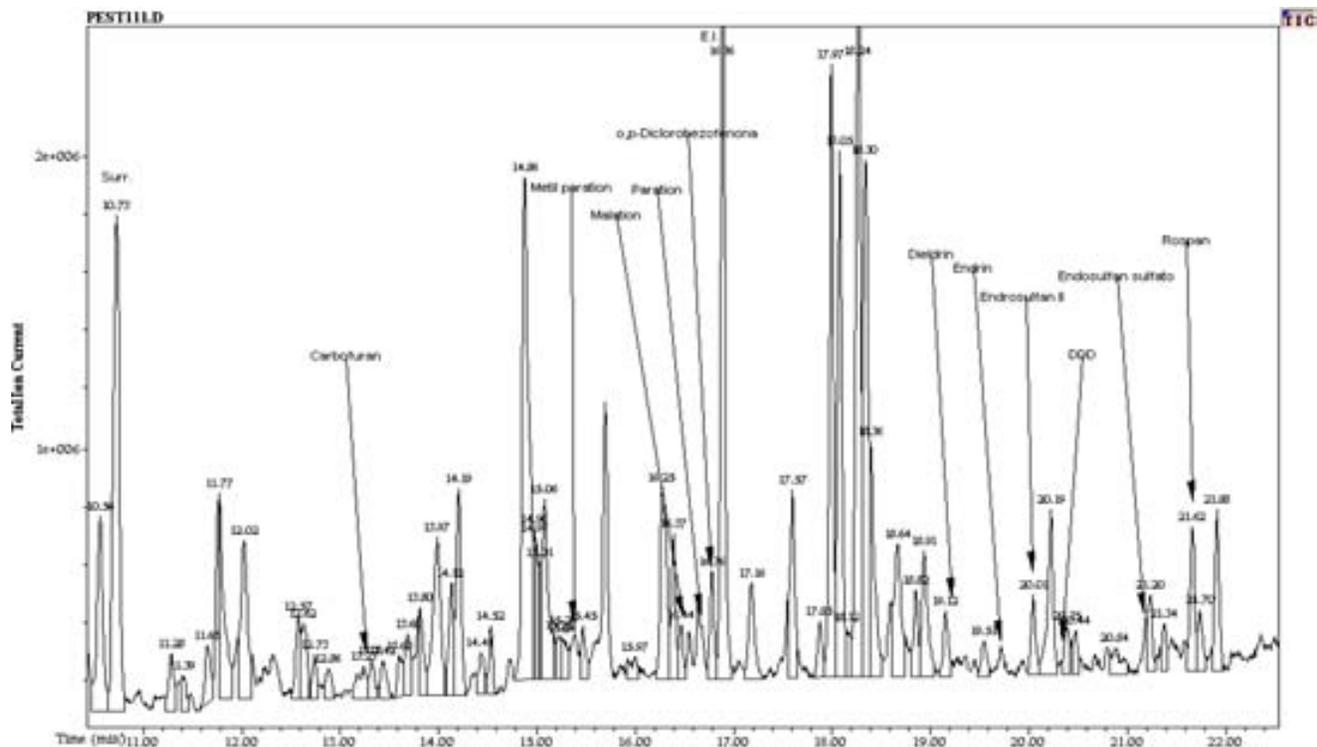


Cromatograma AIV-L10 (SIM). Fresas adquiridas en la central de abastos. Procedencia: Baja California. Donde se ubicaron los pesticidas DDD y Eton.

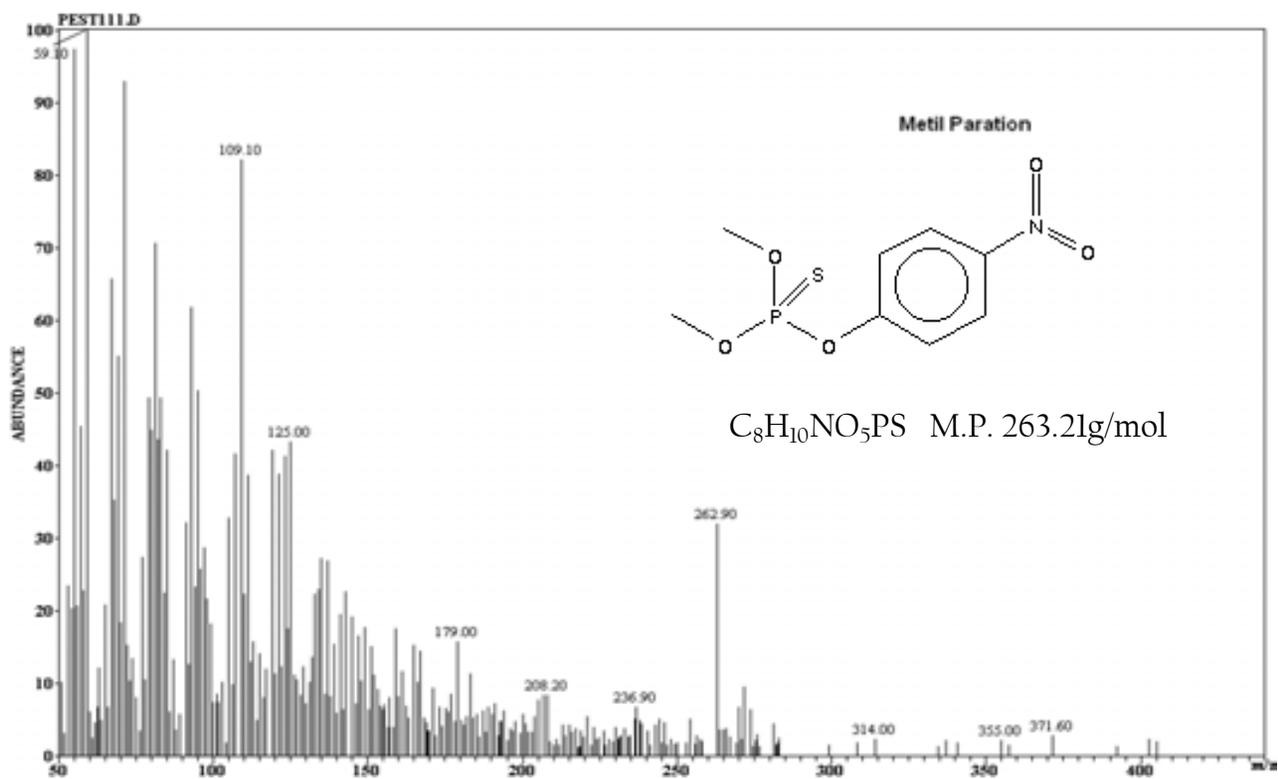
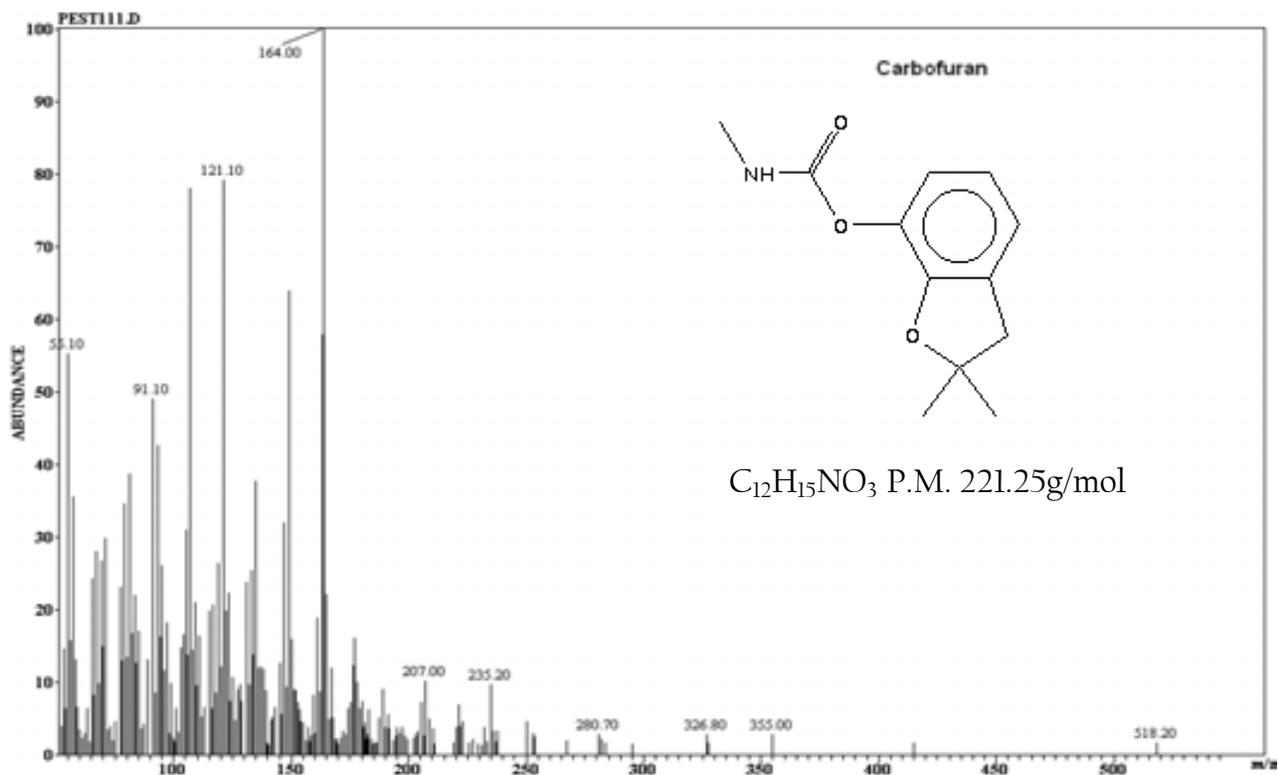


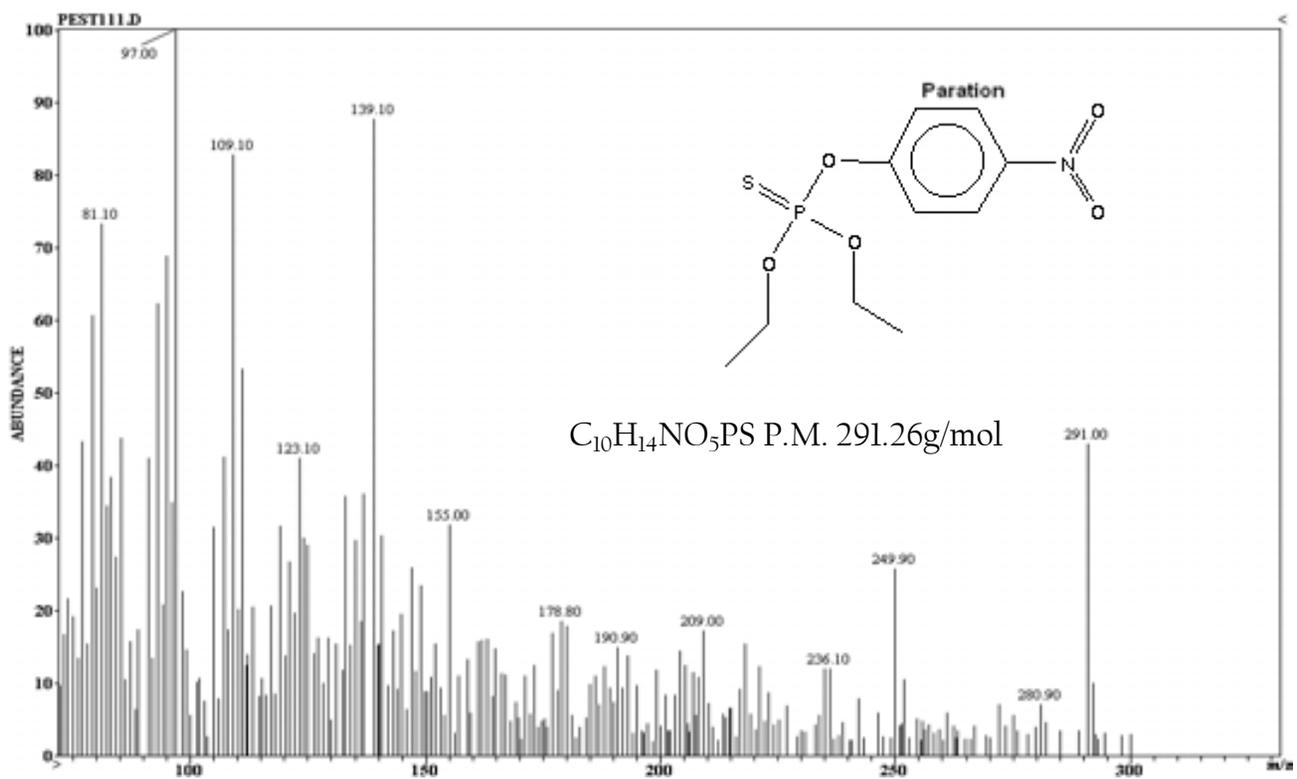
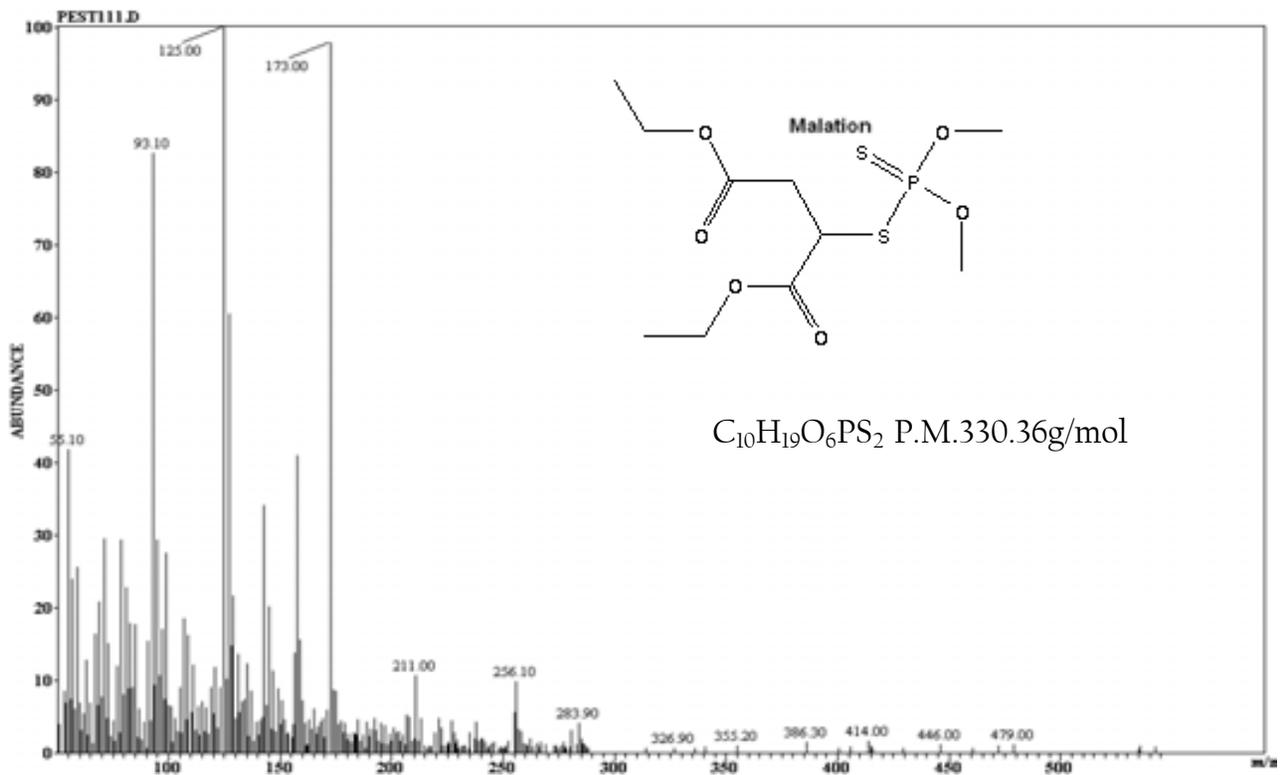
Cromatograma AIV-LII (SCAN). Fresas adquiridas en la central de abastos, México D.F. Procedencia: Zamora, Michoacán. Donde se ubicaron Carbofuran, Metil Paration, Malation, Paration, o,p-Diclorobenzofenona, Dieldrin, Endrin, Endosulfan II, DDD, Etion, Endosulfan Sulfato y Rospan.

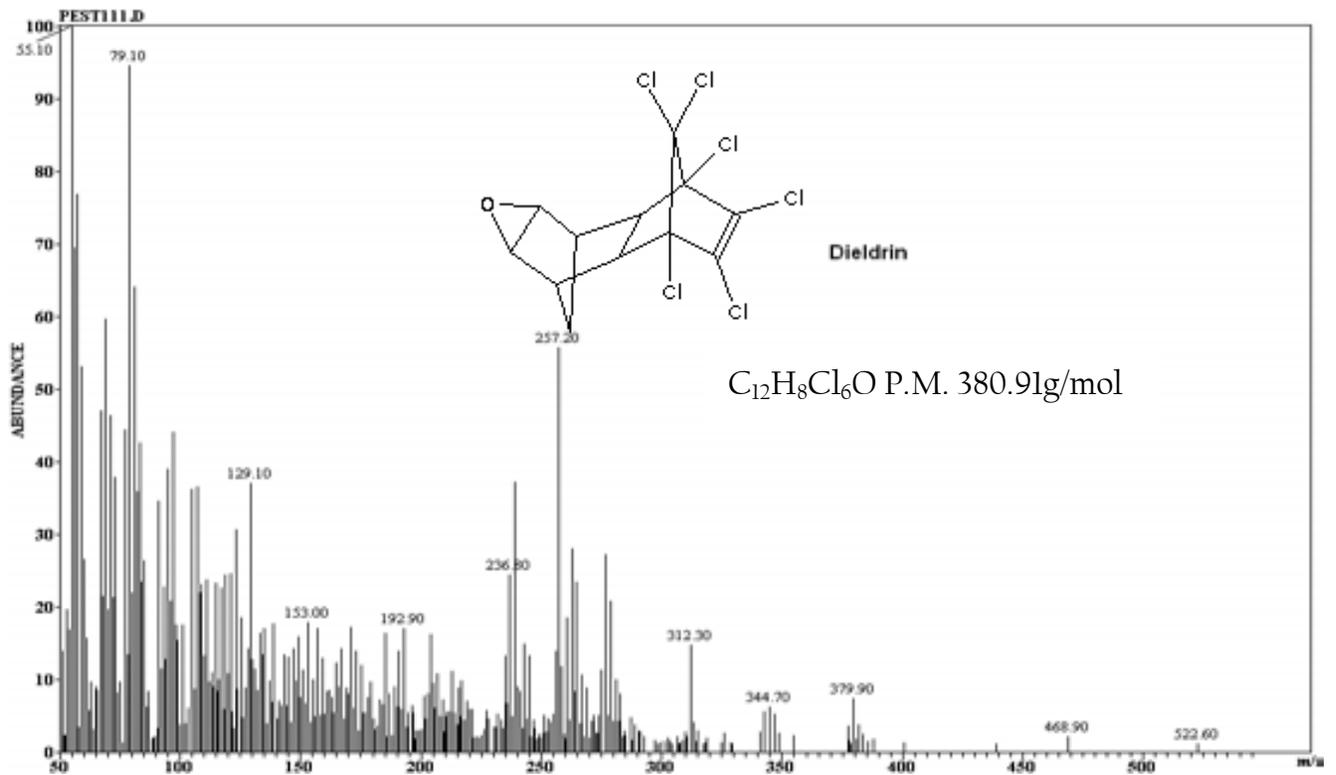
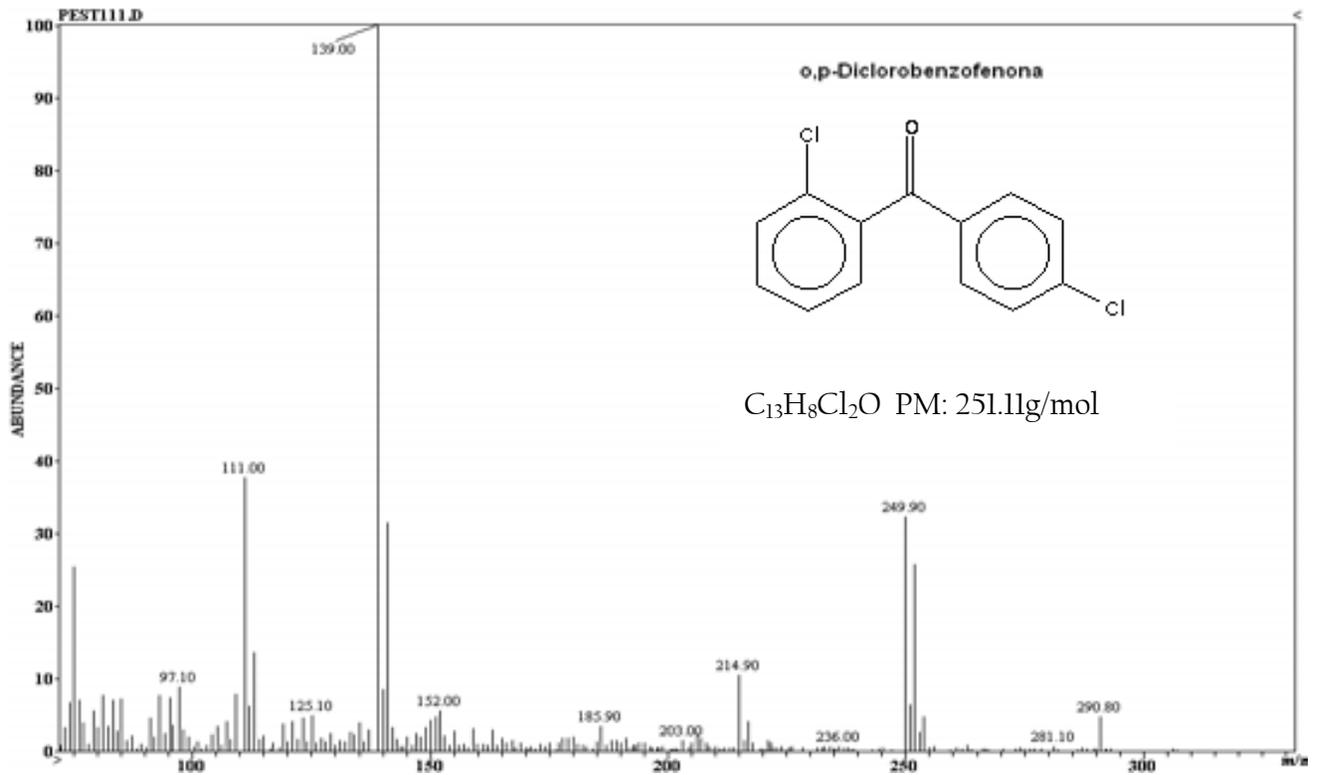
Ampliación del cromatograma AIII-LII, de los picos de los pesticidas identificados:

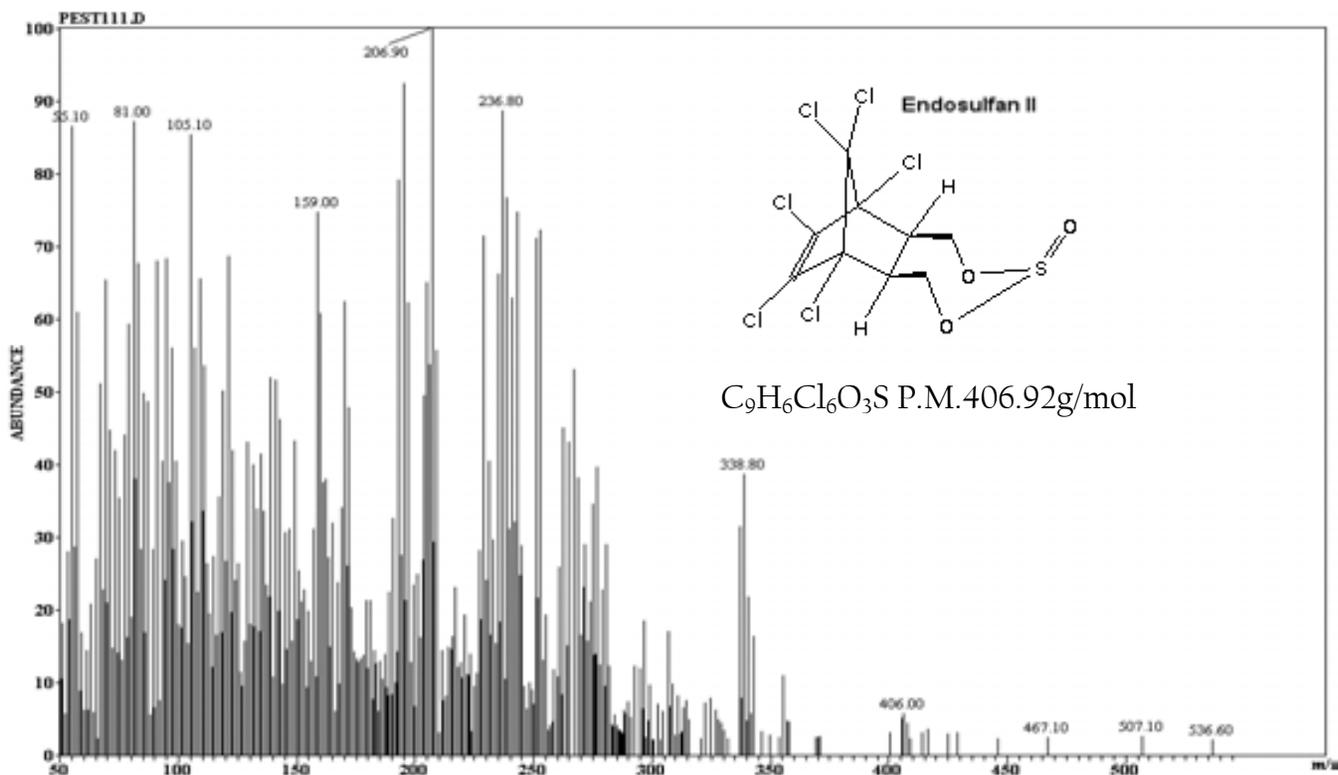
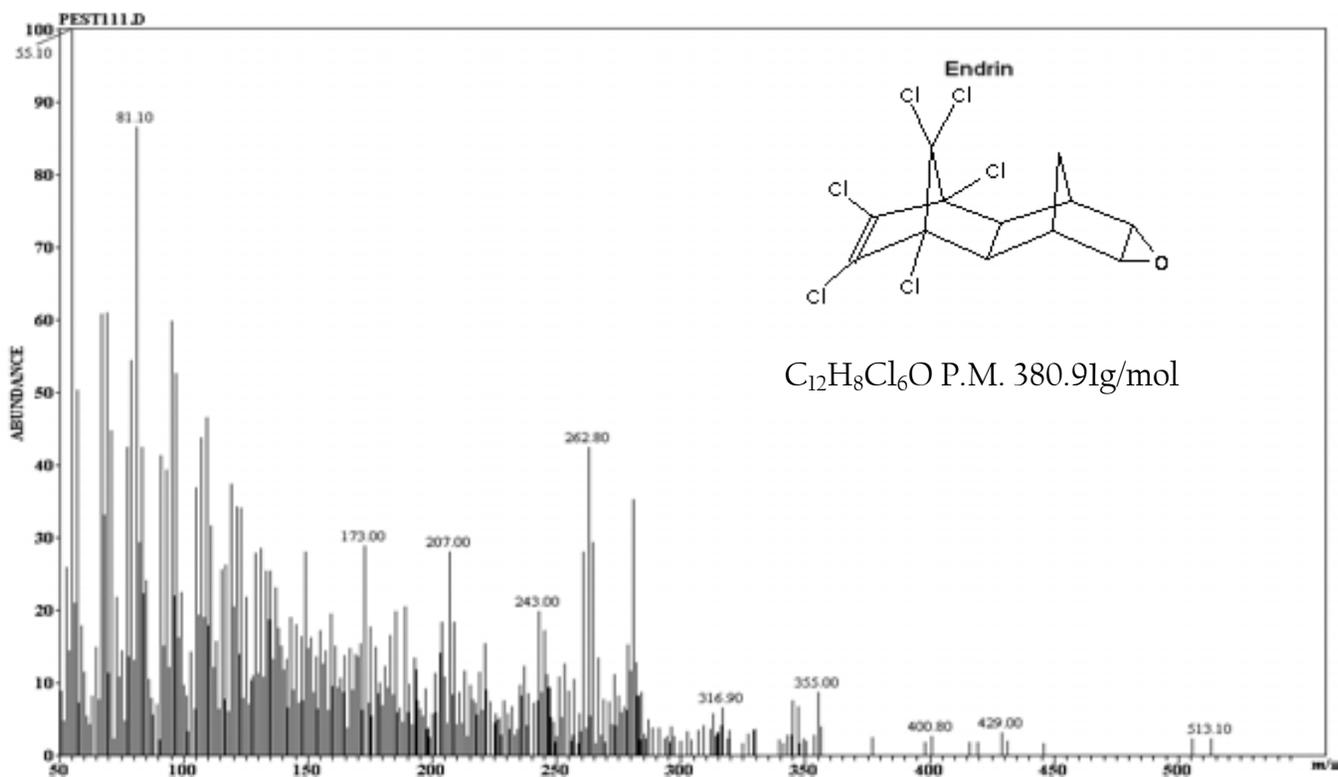


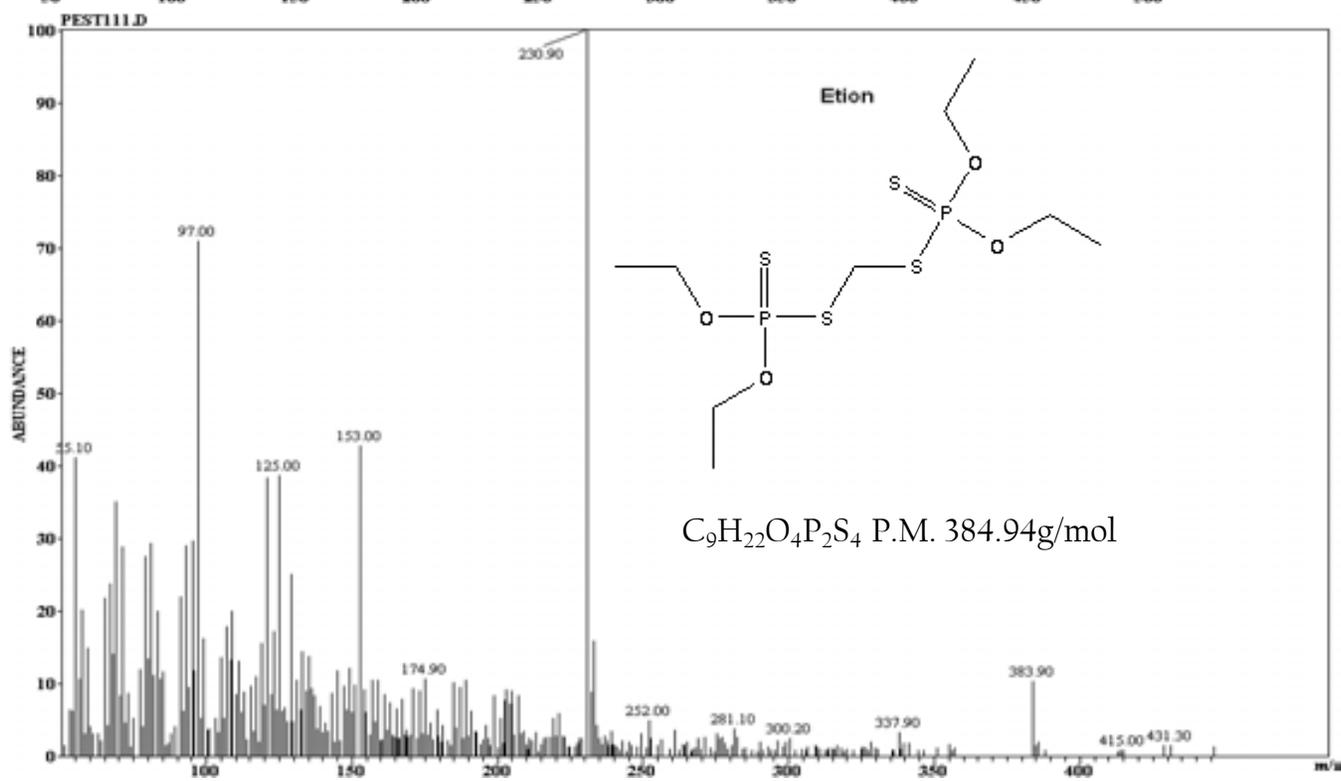
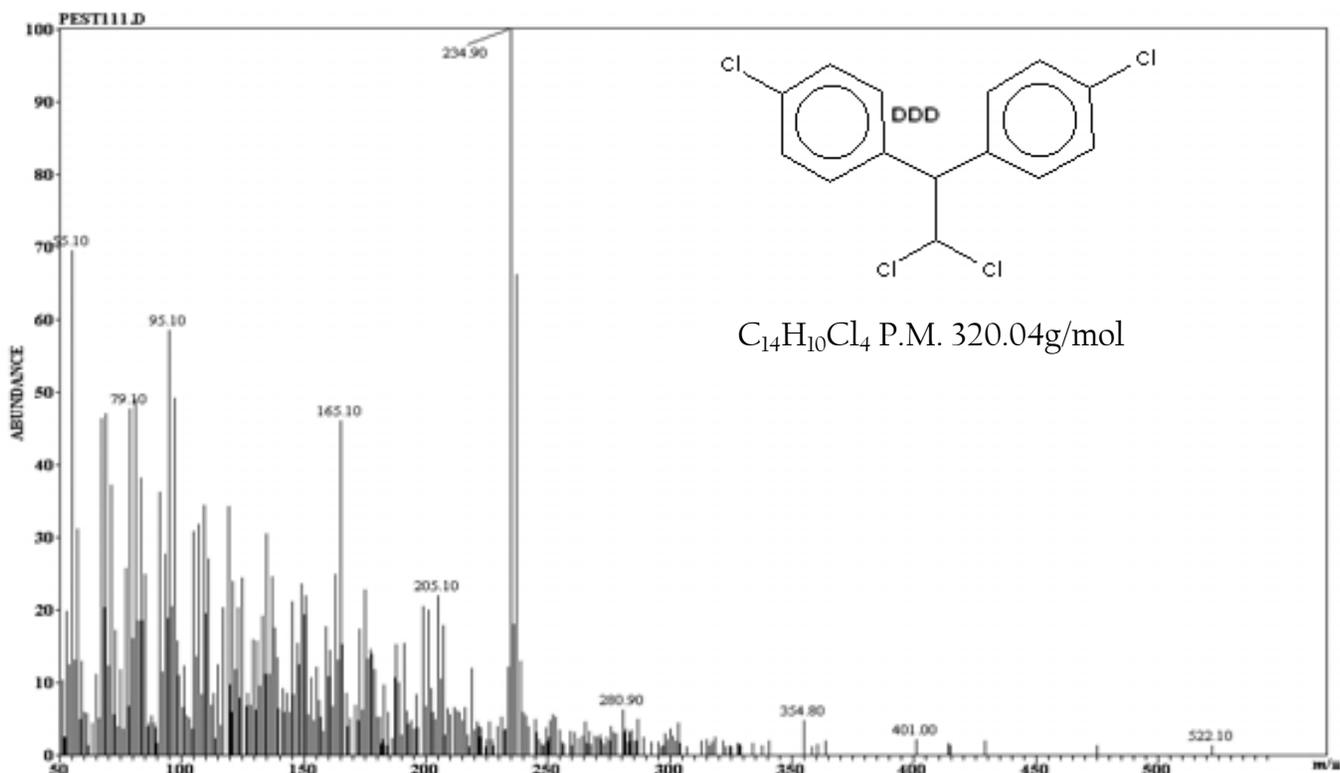
Espectros de masas de los pesticidas identificados en el lote II:

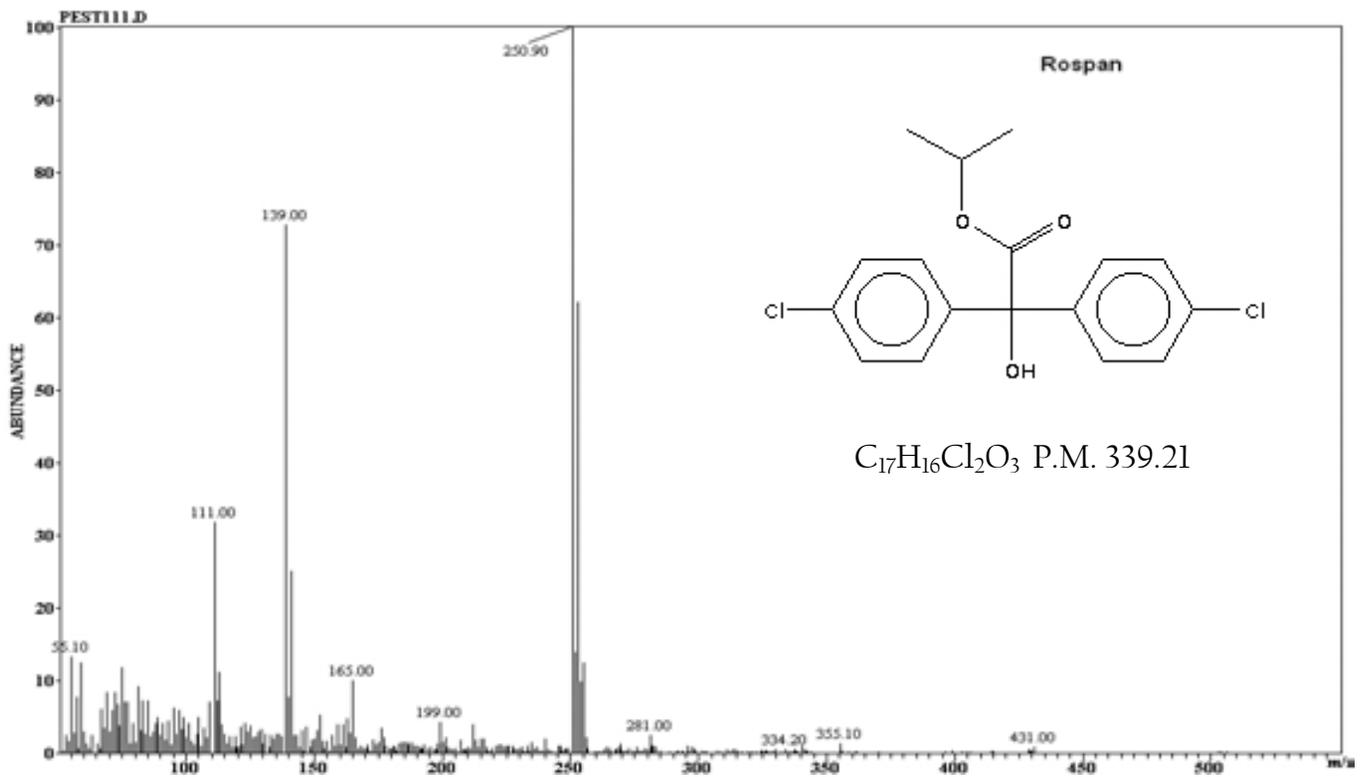
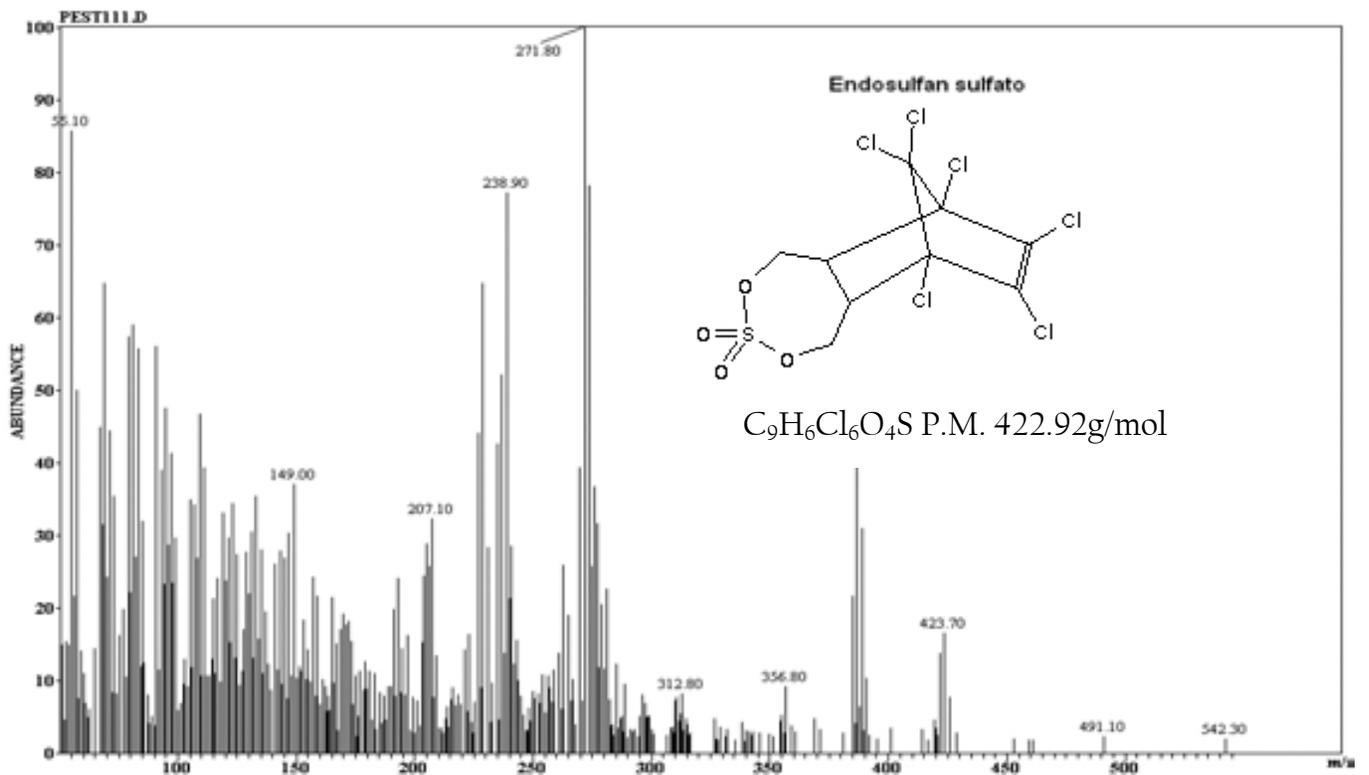


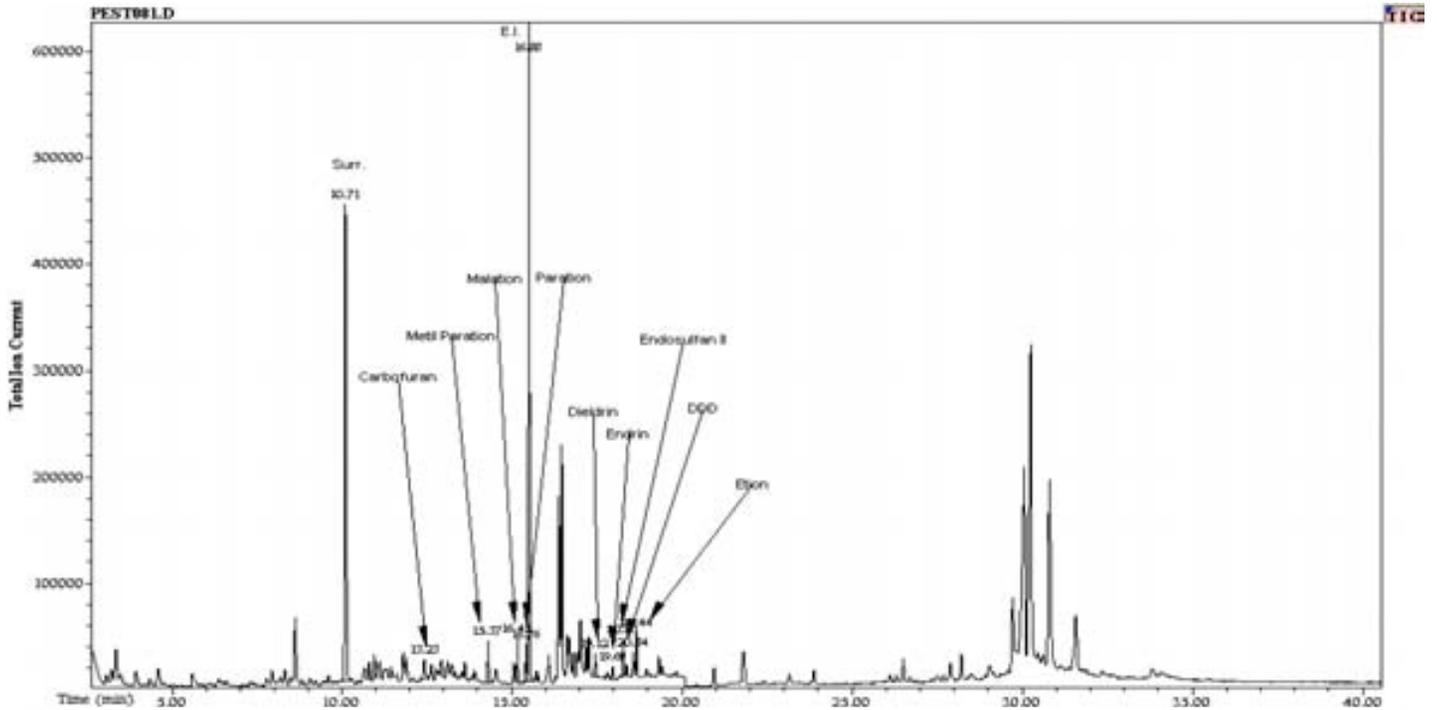




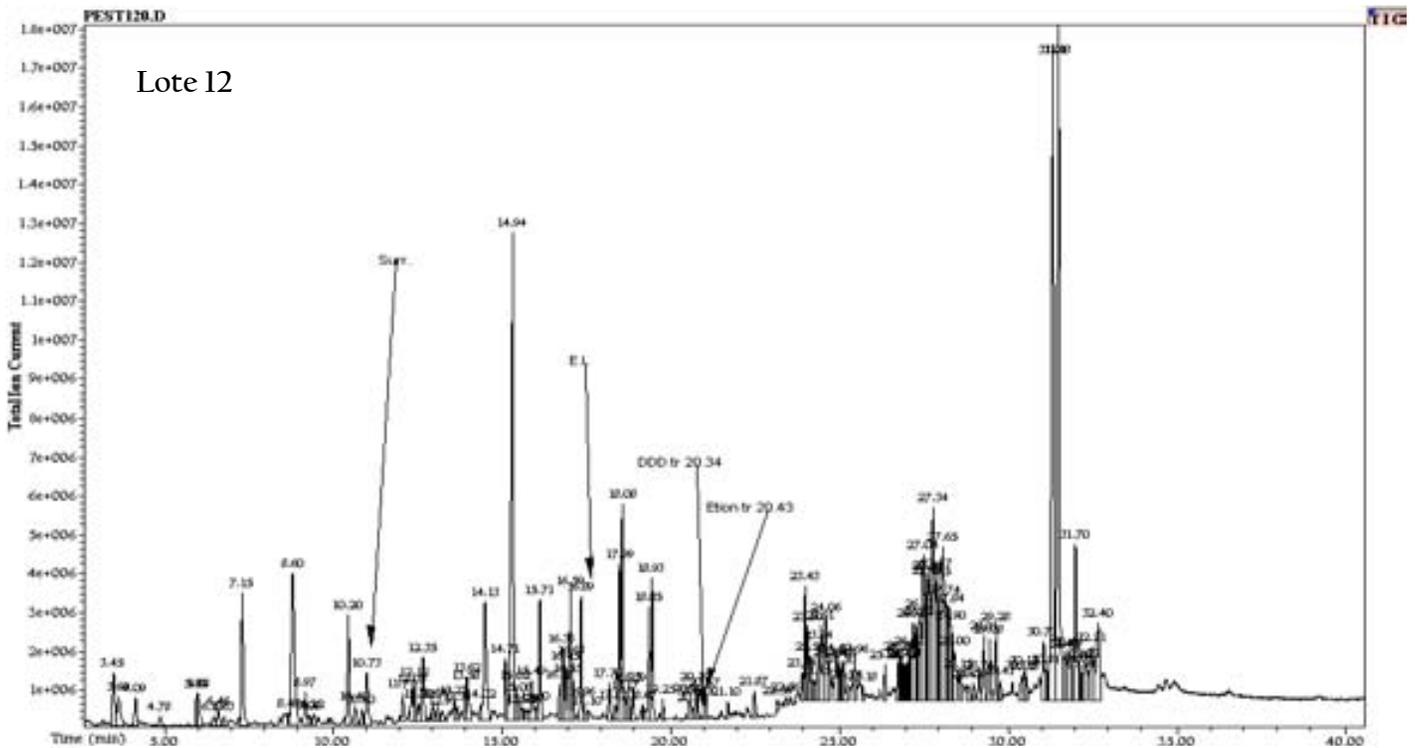






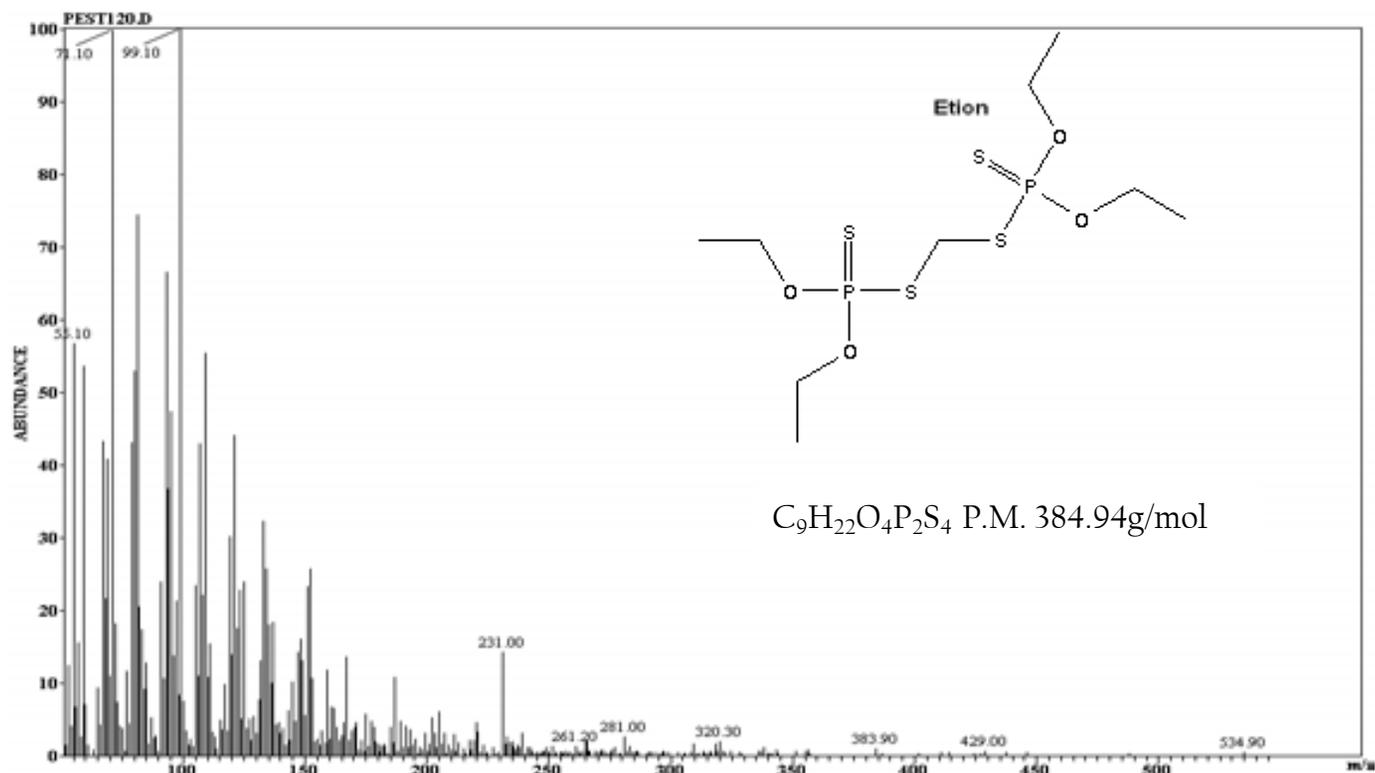
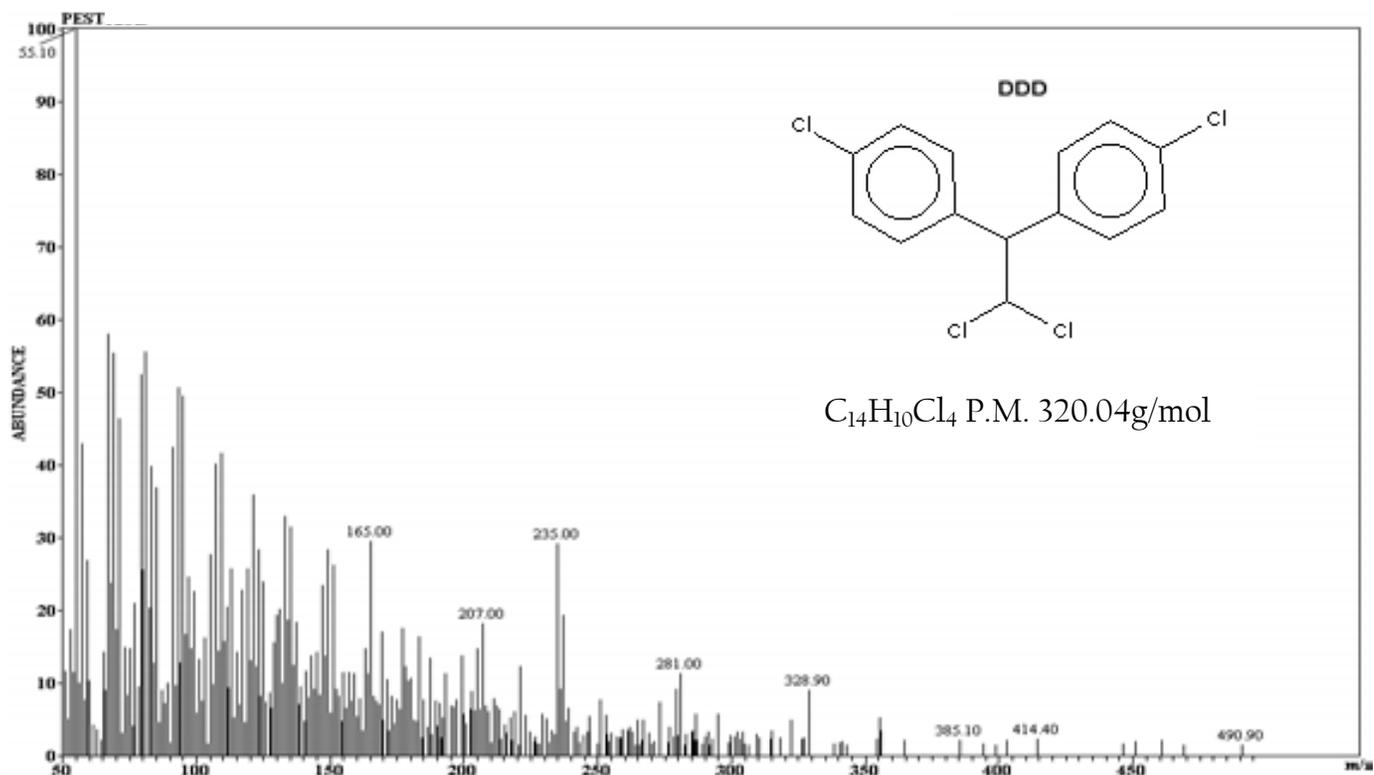


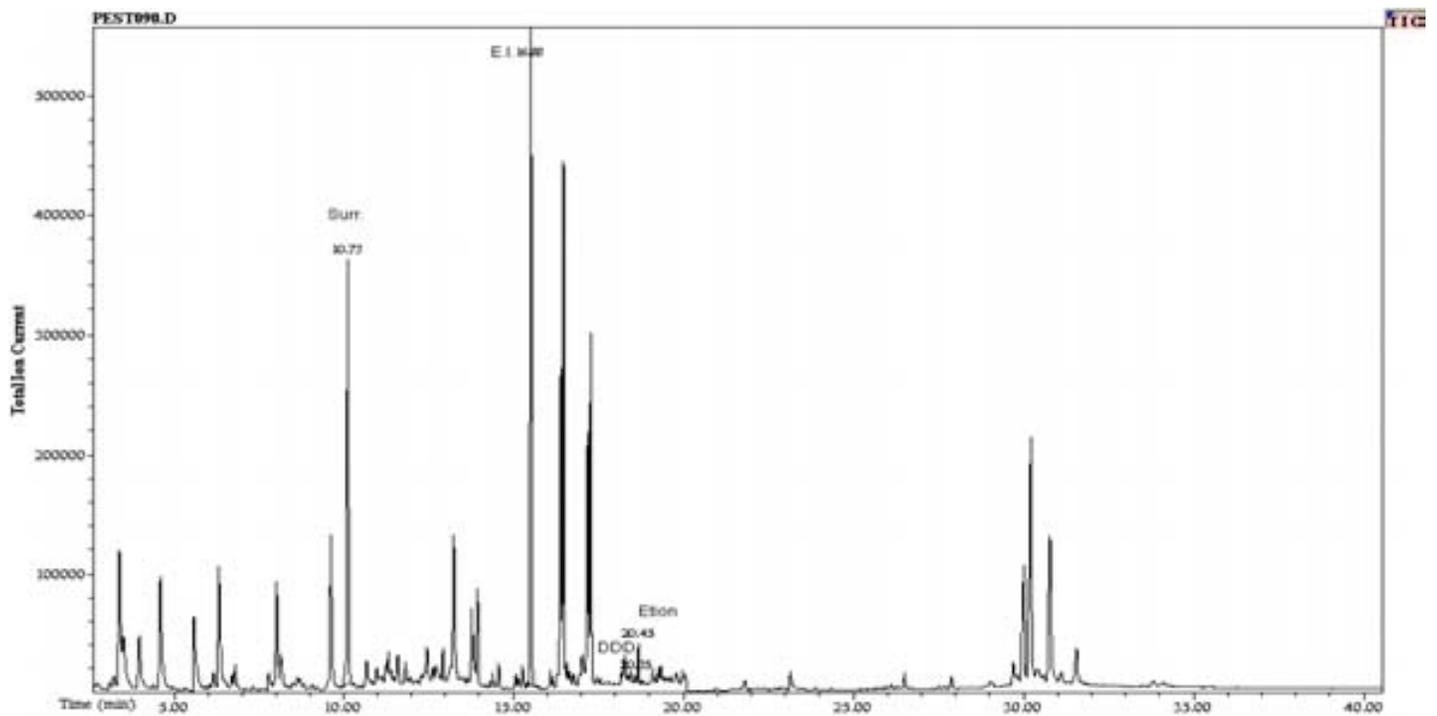
Cromatograma AIV-L11 (SIM). Fresas adquiridas en la central de abastos. Procedencia: Zamora Michoacán. Donde se ubicaron los pesticidas Carbofuran, Metil paration, Malation, Paration, o,p-Diclorobezofenona, Dieldrin, Endrin, Endosulfan II, DDD, Etion, Endosulfan sulfato, rospan.



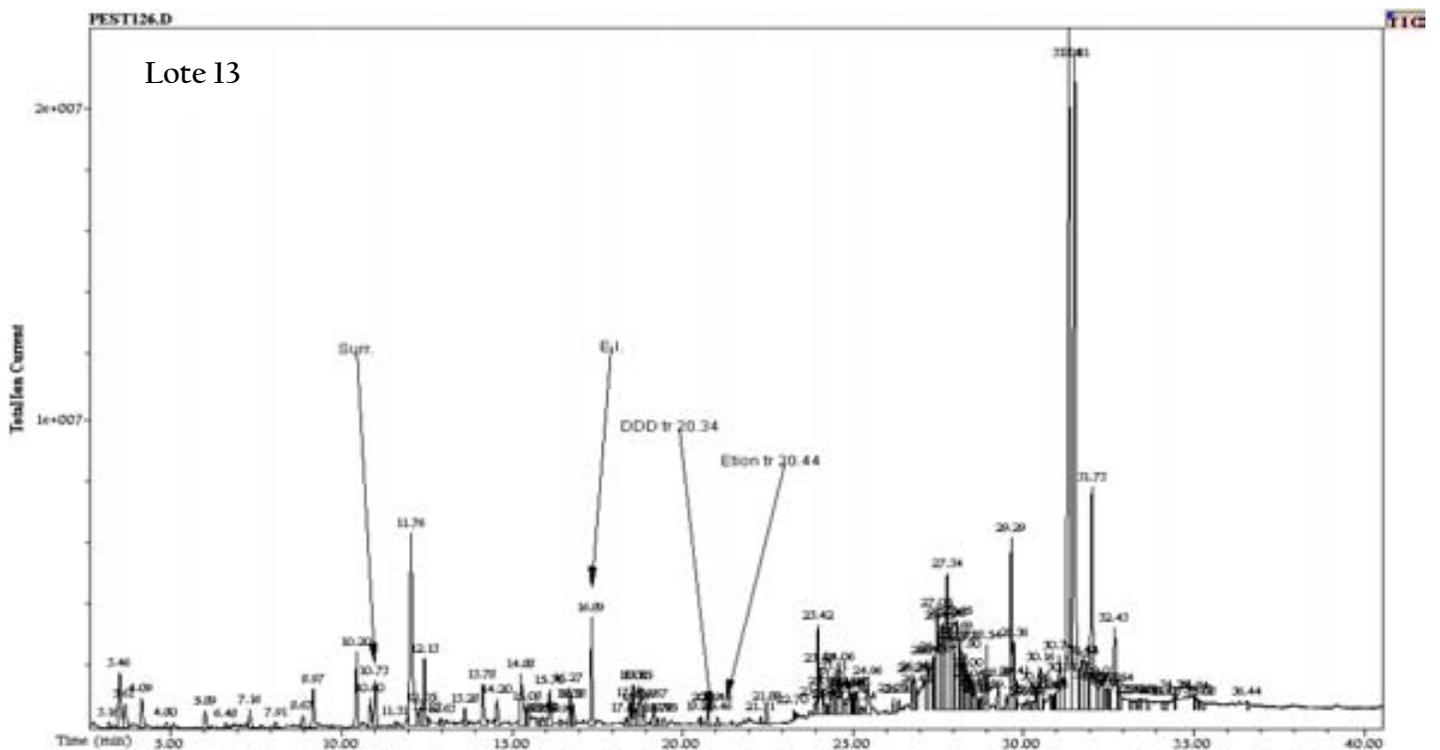
Cromatograma AIV-L12 (SCAN). Fresas adquiridas en la central de abastos, México D.F. Procedencia: Camalú; Baja California. Donde se ubicaron DDD y Etion.

Espectros de masas de los pesticidas identificados en el lote 12:



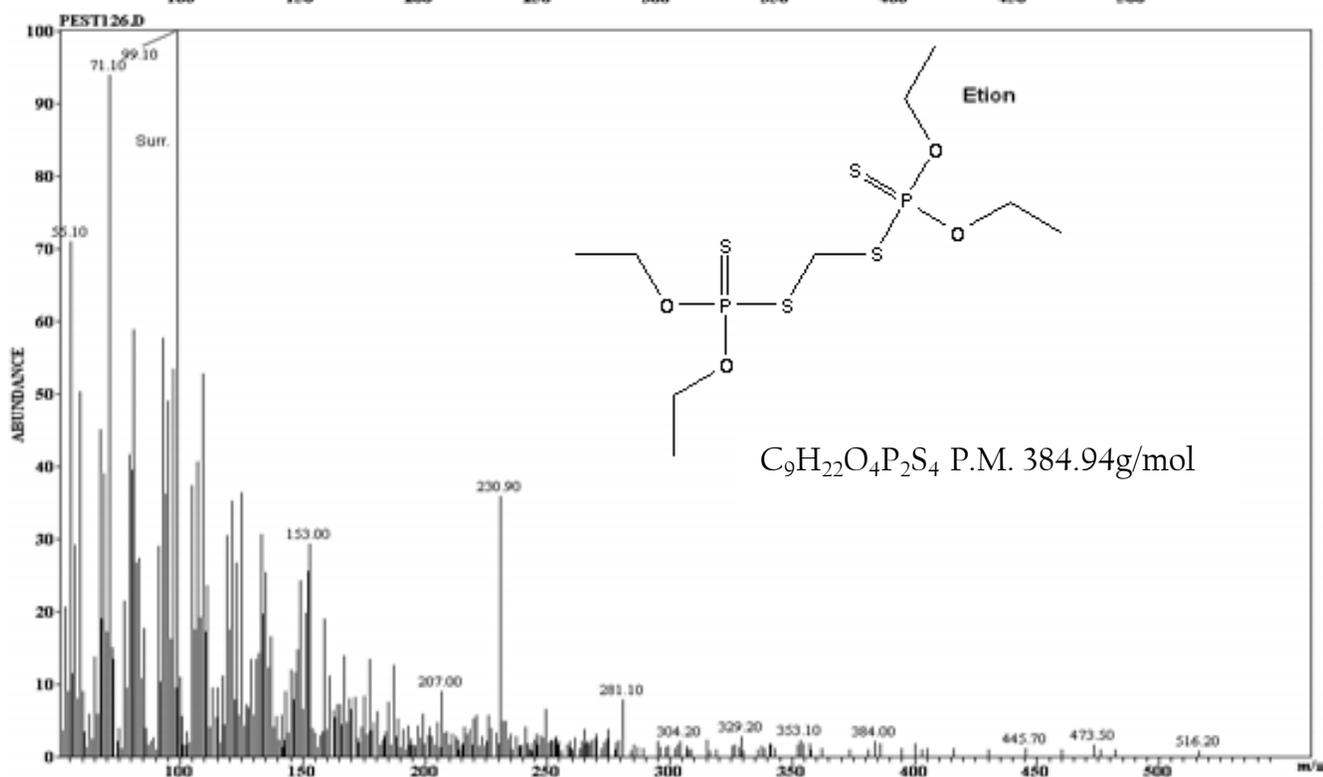
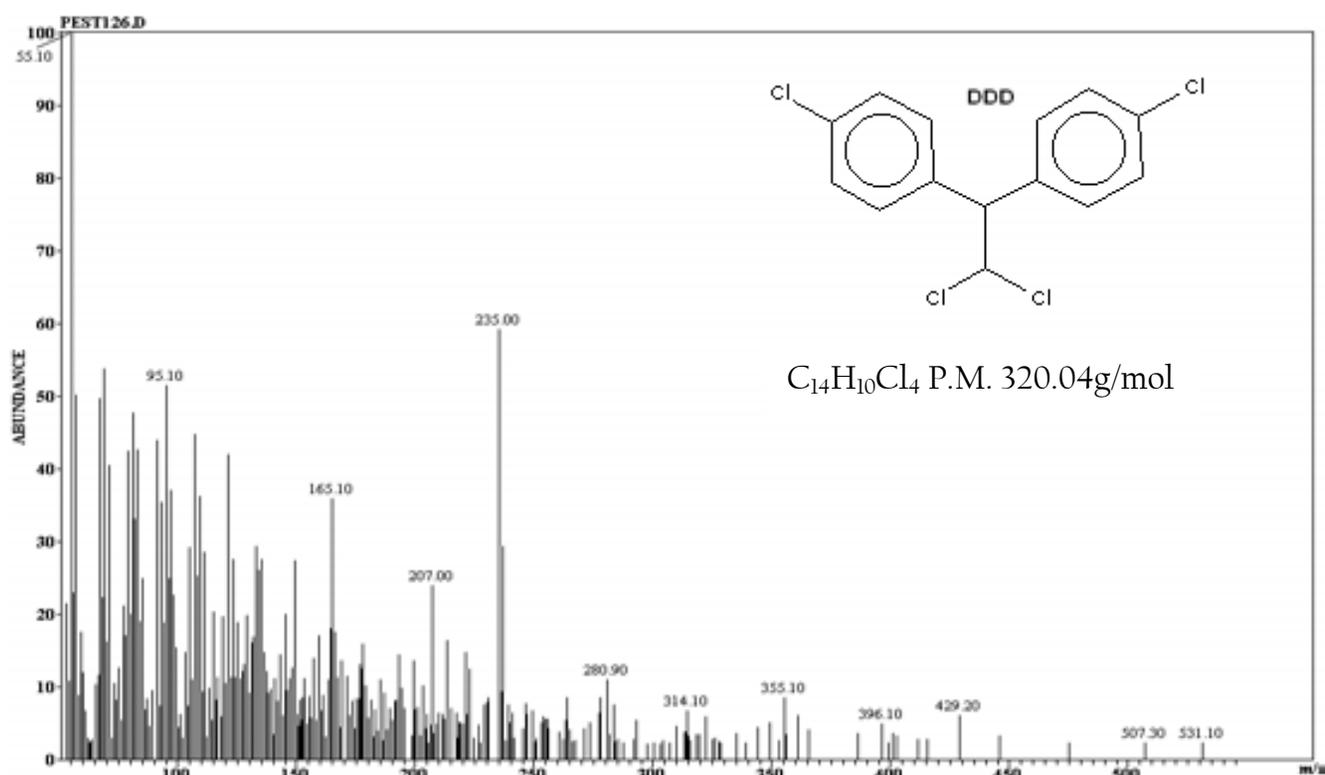


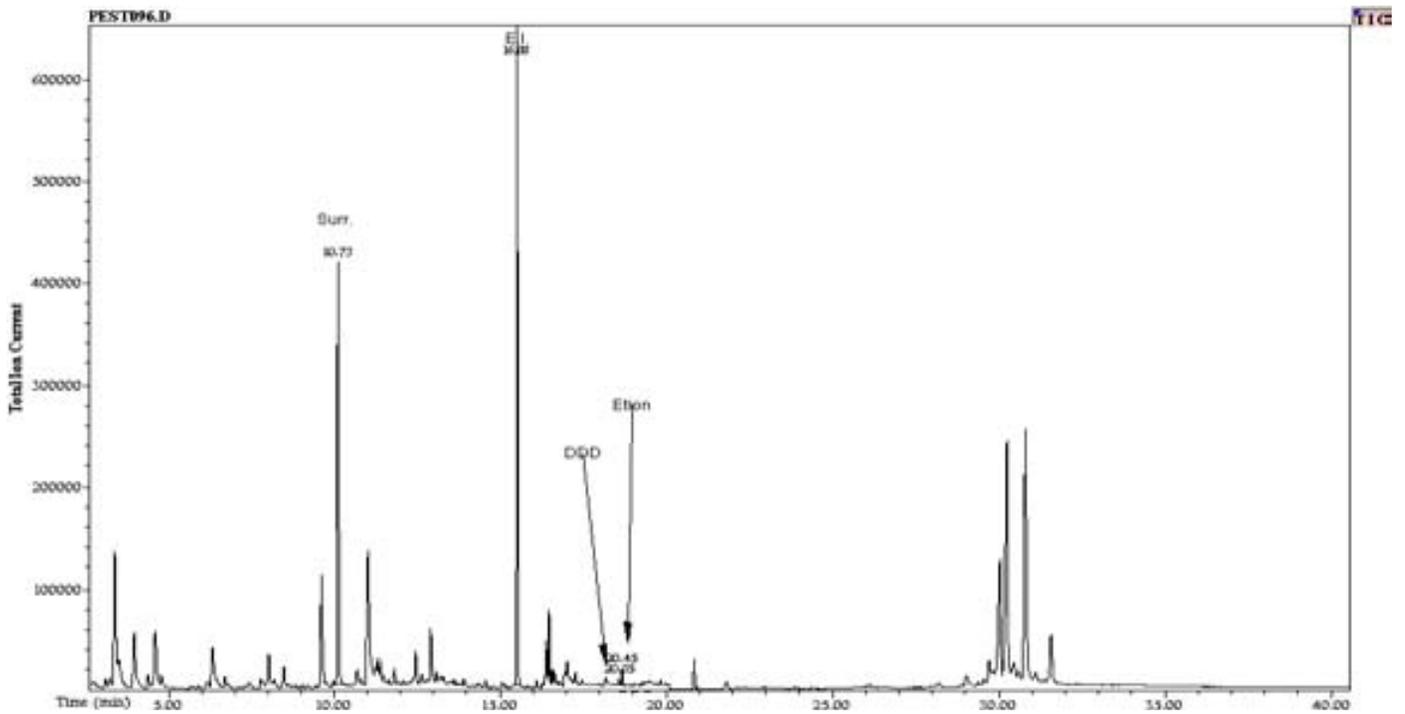
Cromatograma AIV-LI2 (SIM). Fresas adquiridas en la central de abastos. Procedencia: Camalú Baja California. Donde se ubicaron los pesticidas DDD y Etion



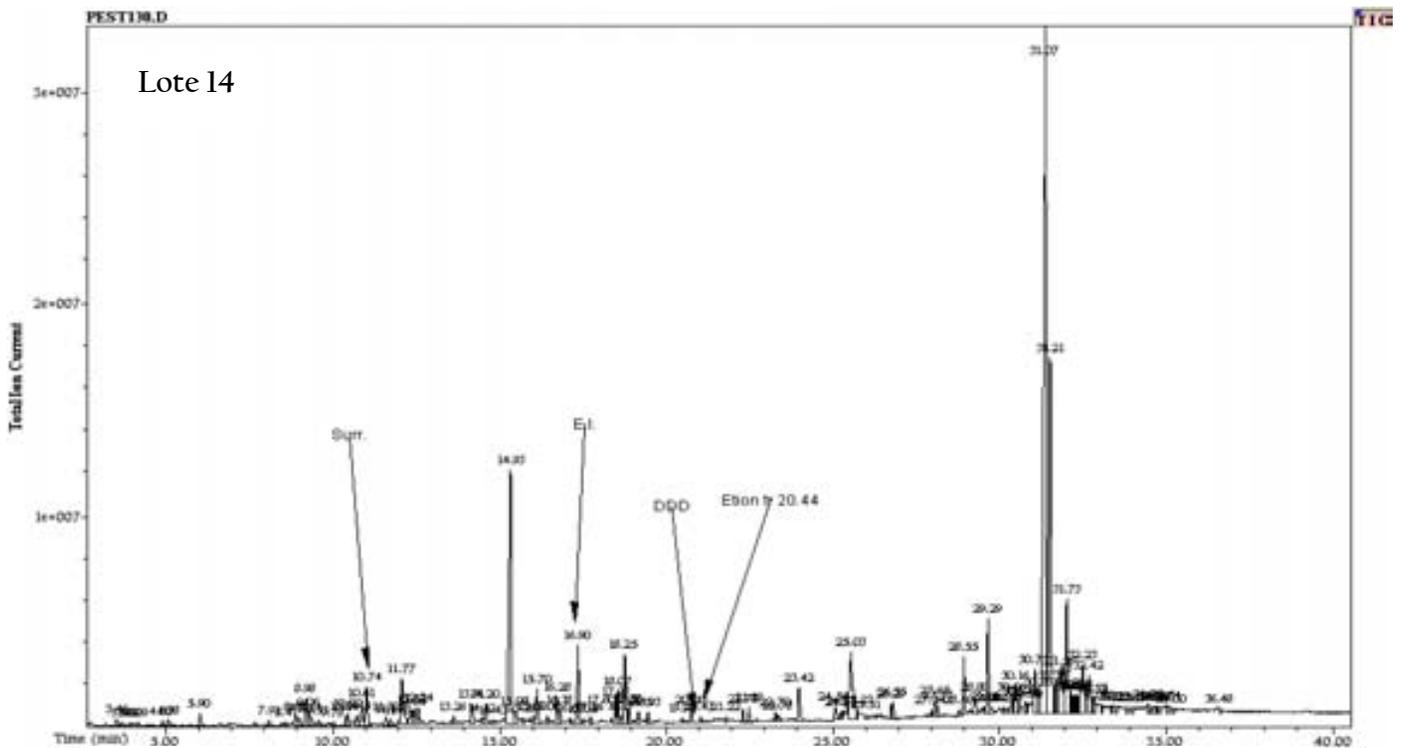
Cromatograma AIV-LI3 (SCAN). Fresas adquiridas en la central de abastos, México D.F. Procedencia: Irapuato Gto. Donde se ubicaron DDD y Etion.

Espectros de masas de los pesticidas identificados en el lote 13:



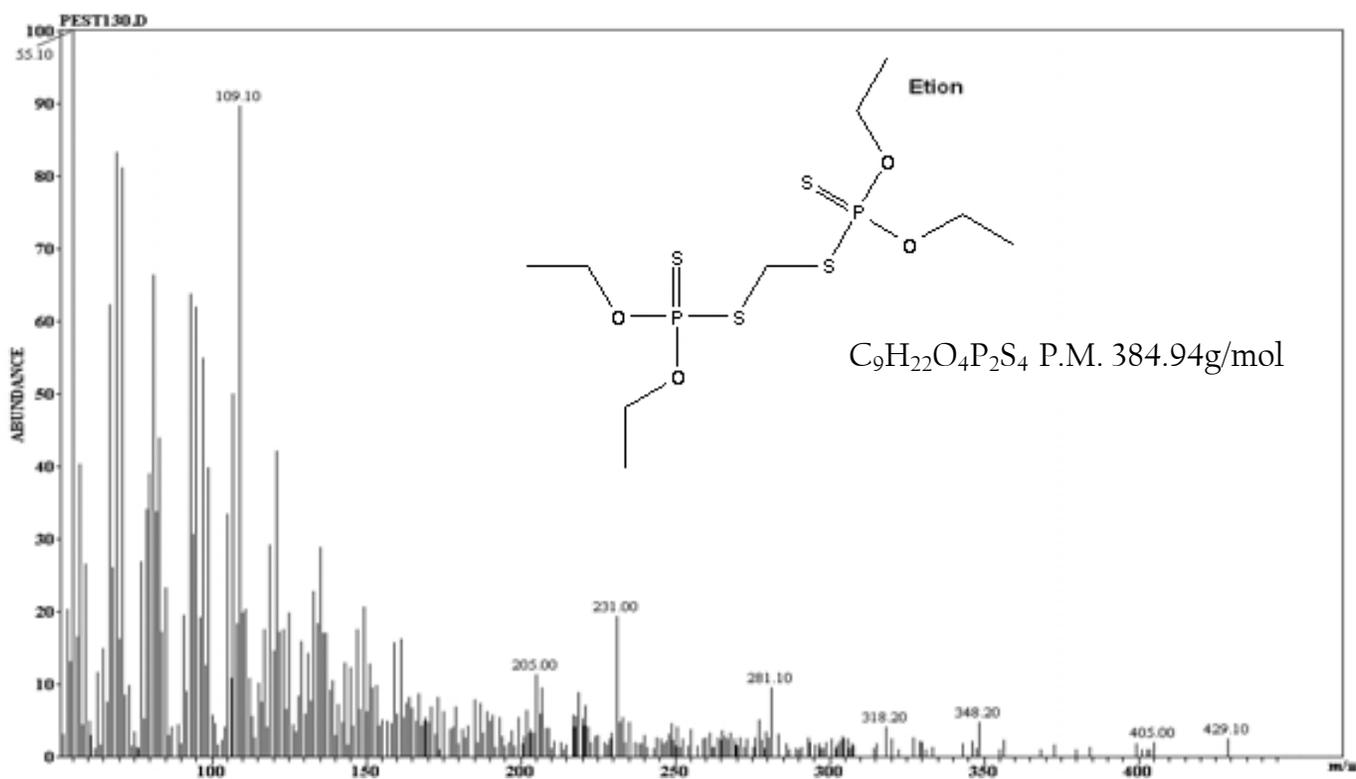
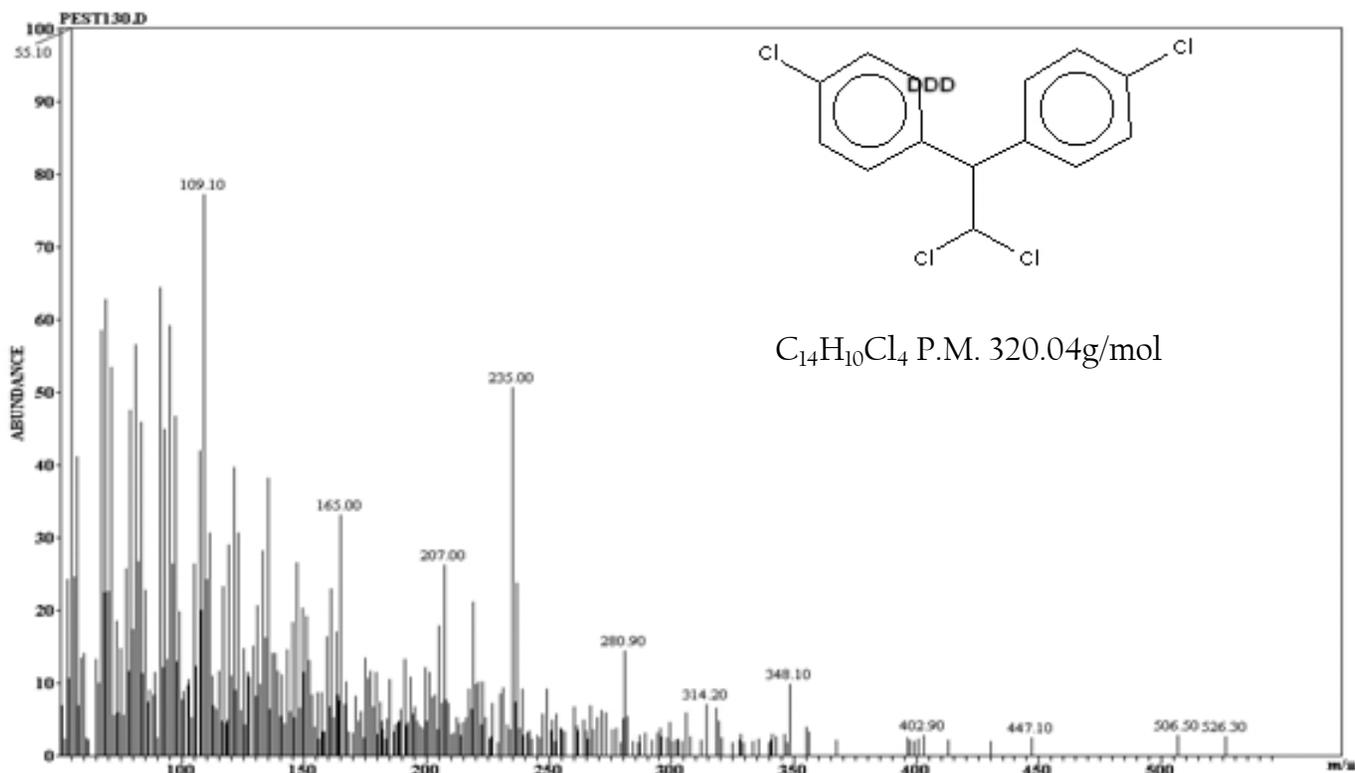


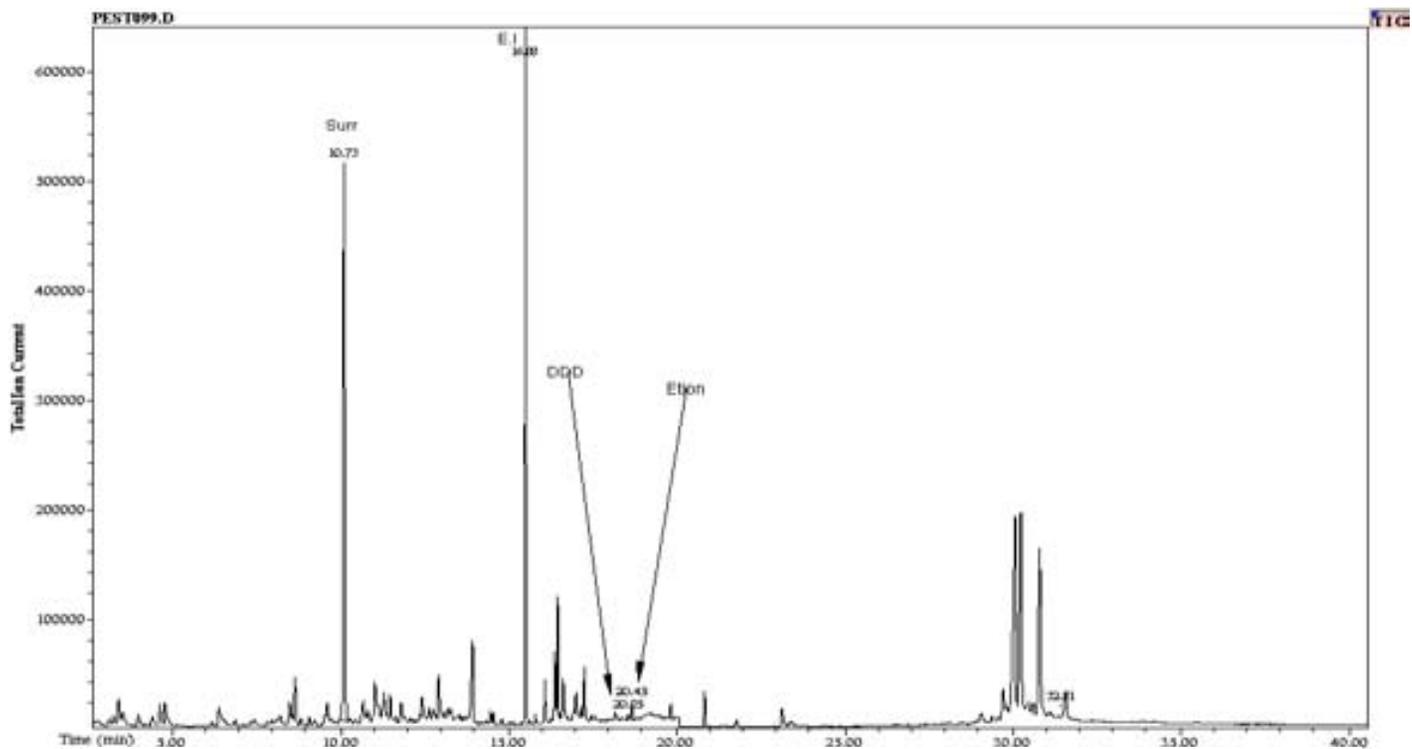
Cromatograma AIV-LI3 (SIM). Fresas adquiridas en la central de abastos. Procedencia: Irapuato Gto. Donde se ubicaron los pesticidas DDD y Eton.



Cromatograma AIV-LI4 (SCAN). Fresas adquiridas en la central de abastos, México D.F. Procedencia: Baja California. Donde se ubicaron DDD y Eton.

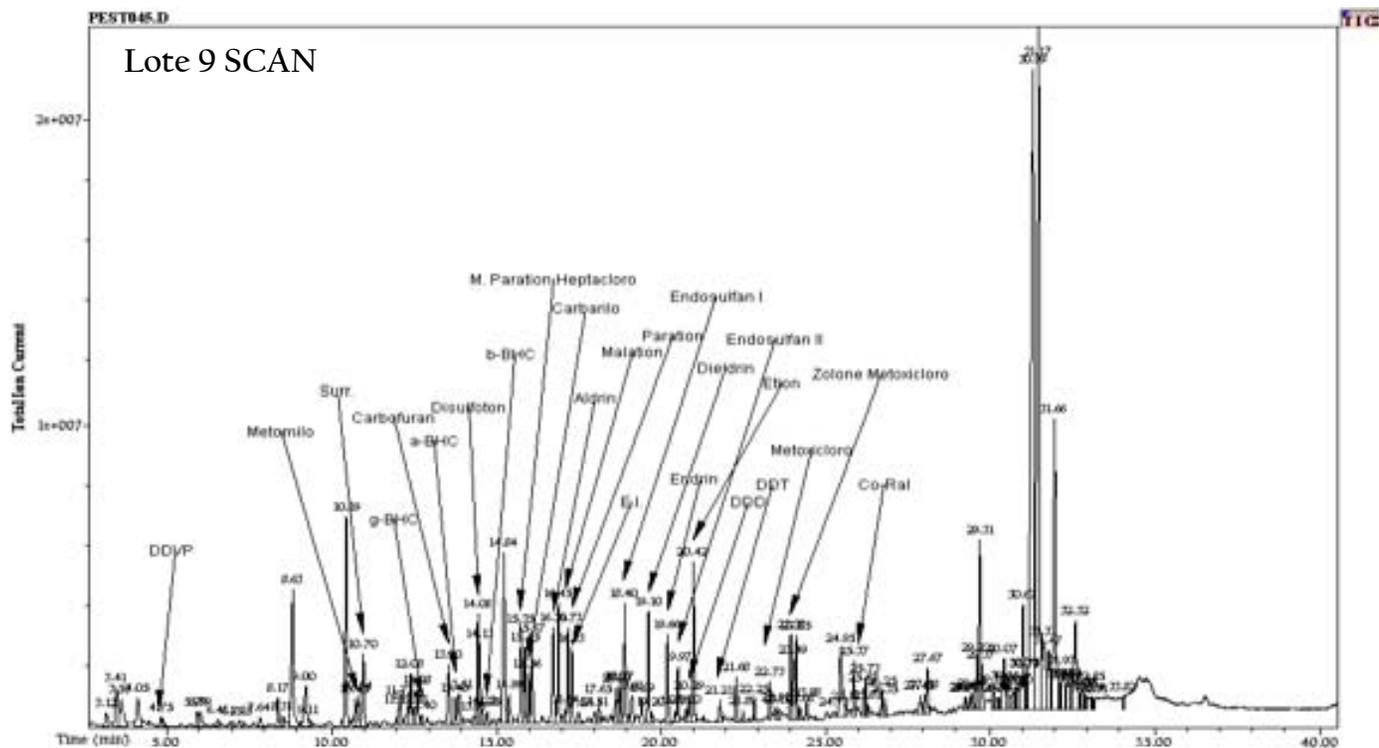
Espectros de masas de los pesticidas identificados en el lote 14:



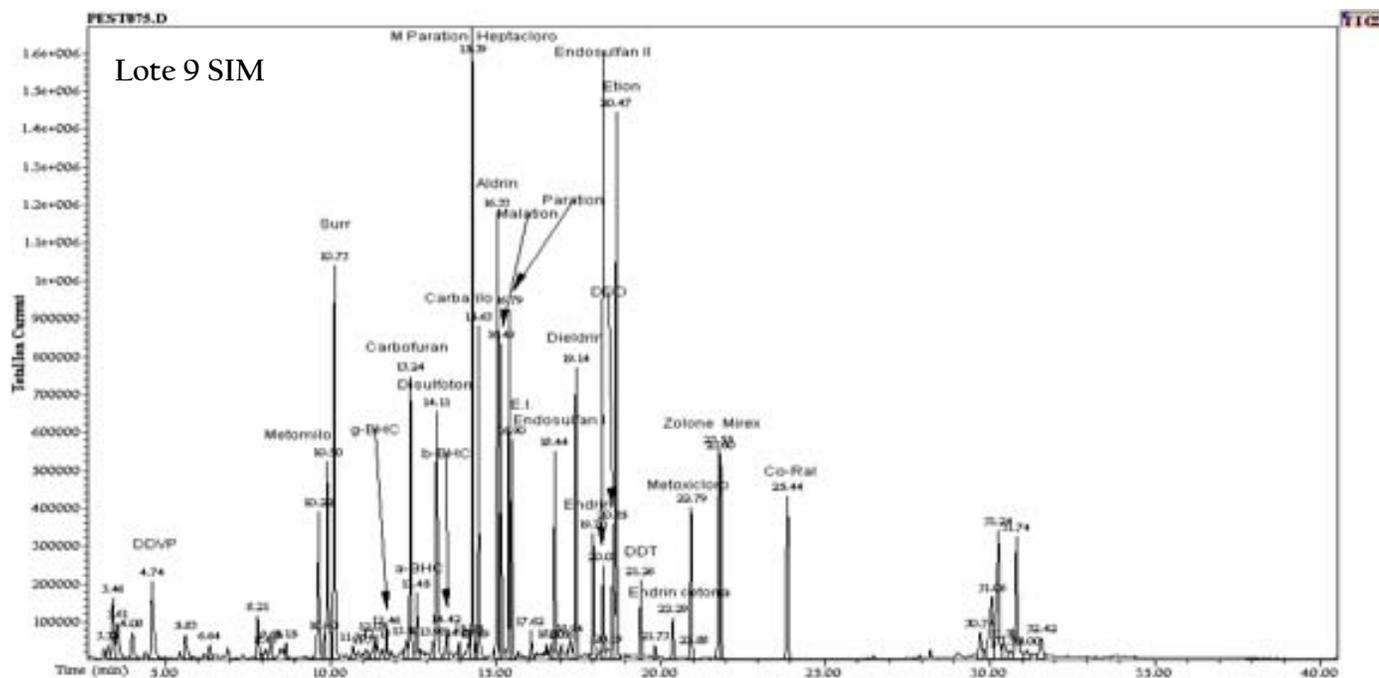


Cromatograma AIV-L14 (SIM). Fresas adquiridas en la central de abastos. Procedencia: Baja California. Donde se ubicaron los pesticidas DDD y Etion.

Cromatograma de una muestra fortificada SCAN y SIM:



Cromatograma AIII-L9 SCAN (fortificada). Fresas adquiridas en la central de abastos. Procedencia: Baja California



Cromatograma AIII-L9 SIM (fortificada). Fresas adquiridas en la central de abastos. Procedencia: Baja California.