



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

Análisis de pesticidas organoclorados en muestras de sangre por microextracción en fase sólida y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (MEFS-CG-EM)

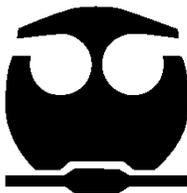
T É S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIOLÓGO

P R E S E N T A:

HÉCTOR CABRERA GARCÍA



México, D.F.

2010



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: Liliana Virginia Raquel Saldivar y Osorio

Vocal: Ernestina Cervera Flores

Secretario: Francisco Rojo Callejas

1^{er.} Suplente: Araceli Patricia Peña Álvarez

2^{do.} Suplente: Ricardo Rodriguez Sáenz

Lugar donde se realizó la tesis:

Laboratorio 102, División de estudios de Posgrado, Facultad de Química, UNAM.

ASESOR DE TESIS:

M. en C. Francisco Rojo Callejas

SUSTENTANTE:

Héctor Cabrera García

AGRADECIMIENTOS

A toda mi familia por su apoyo, esfuerzo, comprensión y dedicación

Al maestro Francisco Rojo Callejas por el apoyo, paciencia y ejemplo brindados durante el desarrollo de esta tesis.

A las maestras Ernestina Cervera Flores y Liliana Saldivar y Osorio por el tiempo y conocimiento dedicados a la revisión de esta tesis.

A las maestras Elba Rojas Escudero y Patricia Elizalde Galván por permitirme trabajar en su laboratorio.

A Sandra por su apoyo, cariño y todos los momentos compartidos.

A mis amigos y compañeros.

DEDICATORIAS

A mi madre Francisca García Sánchez

A mis hermanos Hipólito y Fernando

A la memoria de mi padre Hipólito Cabrera Alfaro porque esto es parte de su trabajo y esfuerzo.



" WE THANK YOU FOR THIS FOOD
AND ASK YOU TO PROTECT US FROM
PESTICIDES, ADDITIVES AND
PRESERVATIVES. "

INDICE

CAPITULO 1. INTRODUCCION Y OBJETIVOS

1.1 INTRODUCCION.....	1
1.2 OBJETIVOS.....	3
1.2.1 Objetivo general.....	3
1.2.2 Objetivos particulares.....	3

CAPITULO 2. ANTECEDENTES

2.1 Pesticidas.....	4
2.1.1 Historia.....	4
2.1.2 Clasificación.....	6
2.1.3 Contaminación por pesticidas.....	8
2.1.4 Pesticidas en México.....	11
2.1.5 Legislación sobre pesticidas en México.....	11
2.2 Pesticidas organoclorados.....	13
2.2.1 Propiedades.....	13
2.2.2 Usos.....	14
2.2.3 Metabolismo.....	14
2.2.4 Toxicología.....	15
2.2.4.1 OCP´s en diferentes tejidos, sangre y orina.....	16
2.2.4.2 OCP´s y embarazo.....	16
2.3 Tamiz Metabólico Neonatal.....	18
2.4 Métodos analíticos para el monitoreo de exposición a pesticidas.....	20
2.4.1 Elección de la matriz.....	22
2.4.2 Monitoreo biológico de OCP´s.....	23
2.5 Cromatografía de gases.....	24
2.6 Espectrometría de masas.....	25
2.7 Microextracción en fase sólida.....	26

2.8 Ultrasonido.....	31
----------------------	----

CAPITULO 3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Reactivos, Material y Equipo.....	34
3.2 Preparación de disoluciones.....	35
3.3 Preparación de muestras de sangre enriquecidas.....	35
3.4 Condiciones cromatográficas.....	36
3.5 Identificación de OCP's.....	36
3.6 Microextracción en fase sólida (SPME).....	37
3.6.1 Optimización de parámetros para SPME.....	37
3.6.1.1 Posición de la fibra.....	37
3.6.1.2 Tiempo de extracción.....	37
3.6.1.3 Tiempo de desorción.....	38
3.6.1.4 Velocidad de agitación.....	38
3.6.1.5 Temperatura de extracción.....	38
3.7 Optimización de la extracción asistida por ultrasonido (EAU).....	38
3.7.1 Disolventes.....	38
3.7.2 Volumen de disolvente.....	39
3.7.3 Tiempo de extracción.....	39
3.7.4 Temperatura de extracción.....	39
3.8 Soxhlet.....	39
3.9 Ensayos de recuperación.....	40

CAPITULO 4. RESULTADOS

4.1 Condiciones cromatográficas.....	41
4.2 Optimización de la SPME.....	42
4.2.1 Posición de la fibra.....	42
4.2.2 Tiempo de extracción.....	43

	44
4.2.3 Tiempo de desorción.....	
4.2.4 Velocidad de agitación.....	44
4.2.5 Temperatura de extracción.....	45
4.3 Optimización de la EAU.....	46
4.3.1 Elección del disolvente.....	46
4.3.2 Tiempo de extracción.....	47
4.3.3 Temperatura de extracción.....	47
4.4 Ensayos de recuperacion.....	48
4.5 Soxhlet.....	49
CAPITULO 5. CONCLUSIONES.....	51
REFERENCIAS.....	52
Anexo A. Características de los estándares de los plaguicidas.....	56
Anexo B. Tiempo de retención (tr) y relación masa carga (m/z) para la identificación de OPC's.....	65

1. INTRODUCCION Y OBJETIVOS

1.1 INTRODUCCION

La amplia presencia de compuestos químicos en el medio ambiente tiene efectos profundos en la salud pública. Todas las sustancias químicas, incluyendo las antropogénicas como son los pesticidas organoclorados, producen efectos deseables e indeseables.

Los compuestos persistentes con volatilidad intermedia, como el DDT y sus metabolitos, tienden a distribuirse uniformemente en regiones tropicales debido a las temperaturas. Estos residuos han sido detectados en todos los niveles de la cadena alimenticia, incluyendo seres humanos y en todos los rincones del planeta.

Los pesticidas son comúnmente utilizados para incrementar la producción agrícola al prevenir pérdidas debido a las plagas. Sin embargo, algunos de estos compuestos son altamente persistentes, tóxicos y bioacumulables. Estos compuestos llegan a los seres humanos por la cadena alimenticia, provocando serios problemas de salud.

Diversos estudios han demostrado la contaminación con pesticidas en alimentos de diferentes partes del mundo. El crecimiento de la urbanización, el cambio en los hábitos alimenticios y el crecimiento acelerado de la población son los factores contribuyentes y responsables del incremento de la demanda de alimentos, provocando el uso de más pesticidas y fertilizantes.

Algunos pesticidas son resistentes a la biodegradación, lo que produce una bioacumulación significativa. Por esta razón, el análisis de residuos de pesticidas en muestras ambientales ha recibido especial atención en las últimas décadas, lo que ha resultado en diversos programas de monitoreo ambiental en varios países para un amplio rango de pesticidas.



Los pesticidas organoclorados (OCP's, por sus siglas en inglés), debido a su persistencia, se acumulan en diferentes eslabones de la cadena alimenticia y provocan intoxicaciones elevadas en seres humanos. El análisis de tejido adiposo materno, suero sanguíneo materno, suero sanguíneo del cordón umbilical, calostro y leche materna indican que estos compuestos se encuentran en circulación en todos los compartimentos del cuerpo materno, incluyendo el cruce por la barrera placentaria.

Esta tesis es un estudio preliminar que busca aportar información acerca de la presencia de OCP's en sangre de niños recién nacidos, desarrollando y optimizando un método analítico para la identificación y cuantificación de estos compuestos.



1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo general:

- Desarrollar y optimizar un método analítico para la determinación simultánea de OCP's en sangre de niños recién nacidos.

1.2.2 Objetivos particulares:

- Establecer una metodología de análisis por cromatografía de gases y espectrometría de masas para la identificación y cuantificación de OCP's.
- Desarrollar un método apropiado para la extracción de OCP's provenientes del papel filtro utilizado para realizar el tamiz metabólico neonatal por extracción asistida por ultrasonido.
- Desarrollar un método de microextracción en fase sólida de OCP's.

2. ANTECEDENTES

2.1 Pesticidas

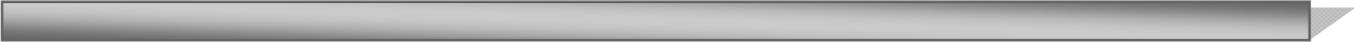
Desde 1950 la producción agrícola se ha acelerado debido al aumento de la población. Este incremento se ha conseguido no con nuevas tierras de cultivo, sino aumentando el rendimiento por superficie. Dicho aumento de la productividad se ha desarrollado con la difusión de nuevas variedades de cultivos de alto rendimiento, unido a nuevas prácticas agrícolas que utilizan grandes cantidades de fertilizantes y plaguicidas, así como maquinaria especializada.

De acuerdo con el código internacional sobre la conducta en la distribución y uso de pesticidas publicado por la FAO se entiende por pesticida “cualquier sustancia destinada a prevenir, destruir, atraer, repeler, o combatir cualquier plaga, incluidas especies indeseadas de plantas o animales que afecten la producción”. El término incluye las sustancias destinadas a utilizarse como reguladores del crecimiento de las plantas, defoliantes, desecantes, agentes para reducir la densidad de la fruta o inhibidores de la germinación, y las sustancias aplicadas a los cultivos antes o después de la cosecha para proteger el producto contra su deterioro durante el almacenamiento y transporte. El término no incluye normalmente los fertilizantes, nutrientes de origen vegetal o animal, aditivos alimentarios ni medicamentos para animales.

2.1.1 Historia

Los plaguicidas se han dividido en generaciones, entre los llamados de primera generación se encuentran: cenizas, azufre, compuestos de arsénico, tabaco molido, ácido cianhídrico, compuestos de mercurio, zinc y plomo, etcétera.

Los plaguicidas han sido utilizados desde tiempos muy remotos [14]. El papiro de Ebers, escrito sobre el año 1550 A. C. reporta la utilización de ciertos preparados médicos o farmacéuticos que se utilizaban para repeler insectos de las casas.



La evidencia más antigua que se tiene del uso de plaguicidas en occidente data de 1669, cuando se utilizaron arsenicales como insecticidas para eliminar plagas de hormigas en mieles. Por otro lado, el uso de compuestos de cobre como fungicidas se conoce desde 1807, mientras que el ácido cianhídrico, se utilizaba como un potente veneno para fumigar los museos que guardaban colecciones de insectos [15].

Hasta mediados de los años treinta, los pesticidas utilizados eran de origen natural o bien compuestos inorgánicos. La nicotina del tabaco ha sido utilizada en muchos países como insecticida. El azufre se empezó a utilizar con bastante frecuencia a principios del siglo XIX, época en la que conocían sus propiedades como pesticida y a pesar de la aparición de pesticidas organosulfurados, todavía hoy es utilizado con frecuencia dada su baja toxicidad comparada con otro tipo de compuestos. El cloruro de mercurio fue ampliamente utilizado como fungicida a partir de 1891 y fue gradualmente reemplazado por otros compuestos como el fenilmercurio, alquinoximercurio y de alquimercurio. Los grandes envenenamientos acaecidos en lugares como Irak por consumo de cereales que contenían estos productos de mercurio hicieron que se prohibiera su uso.

Los plaguicidas de segunda generación se clasifican según su estructura química:

- Organofosforados
- Carbamatos
- Organoclorados

El primer insecticida sintetizado de la 2^{da} generación, fue el DDT [2,2-bis-(p-clorofenil)-1,1,1-tricloroetano], en 1874. Pero fue hasta 1939 cuando el químico suizo Paul Müller descubrió sus propiedades como insecticida, y recibió el Premio Nobel en 1948. Así en los 50's fue presentado al mundo como la solución para todas las plagas sin efectos negativos para el hombre [16].

Durante la segunda guerra mundial fue diseminado en cantidades enormes para erradicar la fiebre amarilla, elefantiasis, dengue, tifoidea y principalmente el paludismo

y malaria [17]. Su fácil obtención, aplicación, rapidez de resultados y su costo reducido extendieron rápidamente su uso, el cual está estrechamente vinculado con los cambios introducidos en los modelos de producción y cultivo (monocultivos) que duplicaron la productividad de la agricultura respecto al resto de la economía. Los plaguicidas por sí solos son responsables de al menos el 30% de ese aumento de producción de alimentos, la llamada "revolución verde" que ha permitido alimentar cada vez mejor a una población mundial que ha ido creciendo continuamente. El uso de los plaguicidas aumentó 32 veces de 1950 a 1986 [18].

Por otro lado a mediados del siglo XX aparecieron los compuestos organofosforados y los carbamatos, que presentan menor persistencia medioambiental que los anteriores y que han sido utilizados hasta nuestros días. Quizás, el grupo de pesticidas más importante de reciente introducción sean los piretroides o piretrinas sintéticos, muchos de los cuales se encuentran de forma natural presentes en las flores del crisantemo y otras plantas.

2.1.2 Clasificación

Actualmente la clasificación de los pesticidas se puede hacer en función de diferentes criterios como lo son su campo de acción, su estructura química, su persistencia, su toxicidad, su concentración, su estado físico, etcétera [19].

Tabla 1. Clasificación de pesticidas según su persistencia (SEMARNAT).

CLASE	VIDA MEDIA	EJEMPLO
No persistentes	0-12 semanas	Malatión
Moderadamente persistentes	1-18 meses	Atrazina 2,4-D
Persistentes	Menos de 20 años	DDT
Permanentes	Más de 20 años	Arsenicales y mercuriales

Una clasificación bastante extendida en su uso diario es la generada atendiendo al objetivo o campo de acción al que están destinados. Siguiendo este criterio, la EPA, entre otros organismos, clasifica a los pesticidas de acuerdo con su campo de acción.

Tabla 2. Clasificación de los pesticidas de acuerdo con su campo de acción.

TIPO DE PESTICIDA	ORGANISMO QUE CONTROLAN
Acaricidas	Ácaros
Antibióticos	Microorganismos
Alguicidas	Algas
Avicidas	Pájaros
Bactericidas	Bacterias
Defoliantes	Hojas de plantas
Desinfectantes	Microorganismos
Fumigantes	Plagas en edificios, suelos, etc.
Fungicidas	Hongos
Herbicidas	Plantas
Insecticidas	Insectos
Larvicidas	Larvas de insectos
Molusquicidas	Caracoles
Nematocidas	Nematodos
Ovicida	Huevos de insectos
Piscicidas	Peces

La organización mundial de la salud (OMS) recomienda clasificar a los plaguicidas en función de su toxicidad, atendiendo a dos posibles vías de contacto (dermal y tópica).

El riesgo al que se refiere esta clasificación es el riesgo agudo para la salud (es decir, el riesgo de exposiciones únicas o múltiples en un periodo relativamente corto de tiempo) al que puede estar expuesta cualquier persona que maneje el producto de acuerdo con las instrucciones de manipulación por parte del fabricante o de acuerdo con las normas establecidas para el almacenamiento y transporte por los organismos internacionales competentes.

La clasificación distingue entre las formas más peligrosas y las formas menos peligrosas de cada compuesto, en las que se basa en la toxicidad de los compuestos técnicos, que son la máxima concentración del ingrediente activo obtenida como resultado final de su fabricación y sus formulaciones.

En particular los sólidos se consideran como menos peligrosos en comparación con los líquidos. La clasificación se basa principalmente en la toxicidad aguda oral y cutánea en ratas debido a que estas determinaciones son los procedimientos estándar en toxicología. Cuando el valor de la DL₅₀ dermal de un compuesto se encuentre en una clase más restrictiva que el valor de la DL₅₀ oral, el compuesto siempre se clasificara en la clase más restrictiva.

Tabla 3. Clasificación de pesticidas recomendada por la OMS de acuerdo con su toxicidad

Clase	Clasificación	^a DL ₅₀ en ratas (mg/kg de peso del animal)			
		Vía oral		Vía tópica	
		Sólidos	Líquidos	Sólidos	Líquidos
Ia	Extremadamente tóxicos	5	20	10	40
Ib	Altamente tóxicos	5-50	20-200	10-100	40-400
II	Moderadamente tóxicos	50-500	200-2000	100-1000	400-4000
III	Ligeramente tóxicos	500	2000	1000	4000

^aDL₅₀ es un valor estadístico que indica la cantidad de un compuesto que es capaz de provocar la muerte del 50% de la población de los animales de prueba.

2.1.3 Contaminación por pesticidas.

En el pasado el problema de las plagas se había resuelto sin una apreciación completa sobre los efectos en plantas, animales y el medio ambiente y algunos de sus efectos han sido desafortunados. Hoy los científicos concuerdan que la primera regla en el control de plagas es reconocer que es un problema complejo, que involucra a sus depredadores naturales, a otras plagas y la relación de otros factores como el agua, aire, suelo, variedad de plantas, prácticas culturales, gente y vida silvestre. En general es deseable tener plaguicidas disponibles específicos para el control de cada plaga, pero el costo aumenta debido a que el intervalo de aplicación llega a ser muy limitado y es claro que las diferentes especies responden de diferente manera a la variedad de formas y concentraciones de los pesticidas [20].



La calidad del ambiente se ha convertido en un problema grave y por ello la urgencia de proteger a éste y a sus habitantes. Una gran cantidad de personas que utilizan pesticidas los consideran una forma de preservar el ambiente, pero otros los citan al inicio de una lista de principales contaminantes, es difícil distinguir el punto en el cual un plaguicida es considerado una herramienta benéfica o un contaminante. En general los pesticidas son un problema cuando se dispersan fuera del área de interés, cuando no son biodegradables y cuando son acumulables, lo que ha enfatizado el problema en el caso de derrames, falta de cuidado de las reservas acumuladas, mala disposición de los contenedores vacíos, abuso y falta de información sobre el uso de estos.

Existen seis áreas principales a parte del ser humano que requieren atención: suelo, aire, insectos, plantas, vida silvestre y agua.

Generalmente los pesticidas son aplicados en estado líquido en forma de rocío sobre el cultivo y/o suelo, aunque algunas veces se incorporan directamente como sólidos o a través del tratamiento de semillas.

La contaminación del medio ambiente por plaguicidas se produce por aplicaciones directas en los cultivos agrícolas, derrames accidentales, lavado inadecuado de tanques o contenedores, filtraciones en los depósitos de almacenamiento y residuos descargados o depositados en el suelo. Una vez en el suelo, los pesticidas pueden pasar a aguas superficiales y subterráneas por lixiviación, dependiendo de sus características químicas tales como solubilidad en agua, capacidad de adsorción sobre el suelo, capacidad de ionización, etc., así como del tipo de suelo y de las características topográficas o climáticas. En general, la ausencia de luz hace que la degradación de los pesticidas en aguas subterráneas sea lenta. Por otro lado, existe una fracción del producto de aplicación que se volatiliza y pasa a la atmósfera, de forma que son transportados por el viento y a su vez pueden volver a la superficie terrestre con las lluvias o por deposición sólida [21].

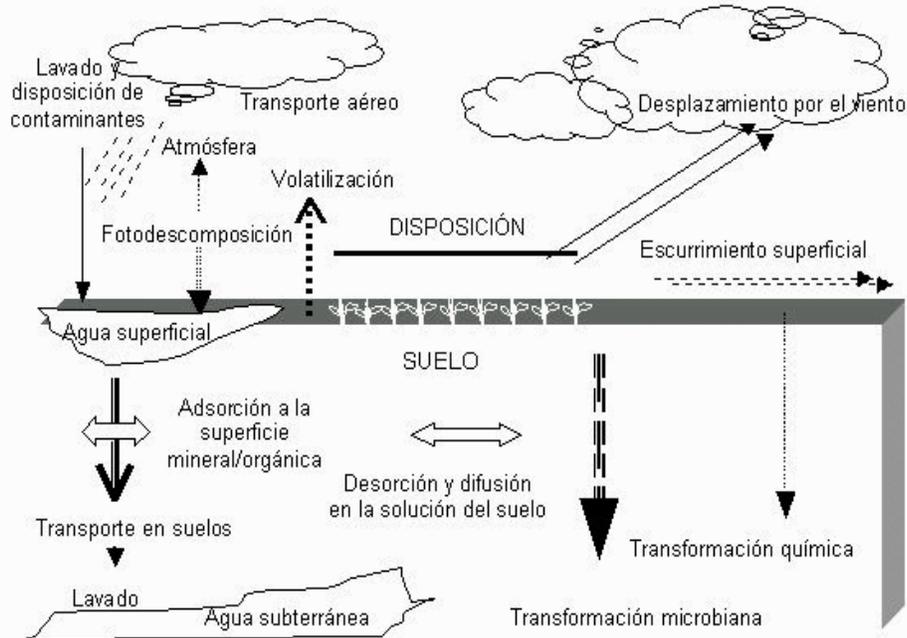


Figura 1. Transporte y transformación de contaminantes

La llamada resistencia genética se produce porque entre los individuos de la población de una plaga algunos poseen genes resistentes a la toxicidad, estos individuos soportan la acción del pesticida sin morir. Como en general en los organismos que conforman las plagas, las generaciones se suceden unas a otras con rapidez y el tamaño de las poblaciones aumenta, la resistencia genética se extiende en pocos años. El número de especies de plagas con resistencia a los plaguicidas se ha incrementado de unas pocas (menos de diez hace 50 años), a más de 700 en la actualidad.

Las alteraciones en el ecosistema se dan cuando la plaga desaparece lo que deriva en la desaparición de los enemigos naturales de ésta o provocan que se trasladen a otros lugares y, después de un periodo, la plaga surge nuevamente en mayor cantidad al no tener enemigos naturales. También hay organismos que por desaparición de otras especies como polinizadores, degradadores, productores de nitrógeno, etc. que mantenían controlado su número, se convierten en nuevas plagas.

Como se mencionó algunos pesticidas tardan años en descomponerse y son difíciles de eliminar ya que se acumulan en el tejido graso del animal. Esto se refiere al proceso en el cual la concentración de los plaguicidas aumenta de manera progresiva a lo largo de la cadena alimenticia, principalmente en especies depredadoras

(concentraciones en decenas o cientos de veces más altas) es decir, en los tramos finales de la cadena trófica [22].

2.1.4 Pesticidas en México

Actualmente en México se utilizan cada año cerca de 54,678.96 toneladas de plaguicidas. Muchos de ellos presentan una alta toxicidad así como una gran persistencia y movilidad medioambiental, lo que los convierte en uno de los grupos de contaminantes más importantes.

Se han detectado residuos de plaguicidas en alimentos, aguas, suelos, organismos acuáticos, fluidos biológicos, etcétera, y en lugares tan remotos como la antártica y el ártico [23]. Se han utilizado cifras tan impactantes, como que en algunos casos se calcula que anualmente se consume medio kilo de plaguicidas por persona. La peligrosidad de estos compuestos presenta varios aspectos: durante la fabricación y formulación, para el agricultor que entra en contacto con ellos, peligrosidad ecológica, asociada a desequilibrios en el medio ambiente y peligrosidad para el consumidor. A pesar de todos los inconvenientes que plantean, difícilmente se puede prescindir de su uso en el estado actual de desarrollo de nuestra agricultura. El riesgo que plantea su aplicación puede verse reducido considerablemente si se aplican correctamente a los cultivos para los que han sido elaborados, siguiendo las correspondientes medidas de seguridad.

En México se usan catorce de los veintidós pesticidas considerados como perjudiciales para la salud y el medio ambiente. De ellos el 42% se fabrican en el país. De noventa pesticidas que han sido cancelados o restringidos en Estados Unidos, treinta se usan actualmente en México.

2.1.5 Legislación sobre pesticidas en México

En 1987 se publicó el Decreto de Creación de la CICOPLAFEST, en la que toman parte las Secretarías de Salud (a través de la COFEPRIS), SEMARNAT, SAGARPA y la Secretaría de Economía.

En el marco de las actividades que desarrolla la CICOPLAFEST, se publicó el 23 de diciembre de 2004 el Reglamento en Materia de Registros, Autorizaciones de Importación y Exportación y Certificados de Exportación de Plaguicidas, Nutrientes Vegetales y Sustancias y Materiales Tóxicos o Peligrosos, instrumento a través del cual se regula el ingreso al comercio de estos productos.

Asimismo, se publica y actualiza regularmente el Catálogo Oficial de Plaguicidas, que contiene información relevante al manejo seguro y ambientalmente adecuado de los productos que cuentan con registro. Cabe mencionar en este contexto, la publicación el 3 de enero de 1991 en el DOF, del Decreto que prohíbe la importación, fabricación, formulación, comercialización y uso de plaguicidas.

Tabla 4. Relación de plaguicidas prohibidos para su importación, fabricación, formulación, comercialización y uso en México publicada en el DOF el 3 de enero de 1991.

• Triamifos	• Erbon	• DBCP
• Mercurio	• Formotión	• Dialiafor
• Acido 2,4,5-T	• Scradan	• Dieldrin
• Aldrin	• Fumisel	• Dinoseb
• Cianofos	• Kepone/Clordecone	• Endrin
• Cloranil	• Mirex	• Monuron
• Nitrofen	• HCH	• EPN
• Paration etílico	• Toxafeno	• Sulfato de talio
• Fluoroacetato de sodio	• Acetato o propionato de fenil	

Los siguientes pesticidas solo podrán ser adquiridos en las comercializadoras mediante la presentación de una recomendación escrita de un técnico oficial o privado que haya sido autorizado por el Gobierno Federal. Su manejo y aplicación se efectuaran bajo la responsabilidad y supervisión del técnico autorizado que los haya recomendado.

Tabla 5. Pesticidas restringidos en México

• 1,3 Dicloropropeno	• Fosfuro de aluminio	• Alaclor
• Aldicarb	• Isotiocianato de metilo	• Aldicarb
• Lindano	• Bromuro de metilo	• Metam sodio
• Clordano	• Metoxicloro	• Paraquat
• Cloropicrina	• Mevinfos	• Dicofol
• Forato	• Pentaclorofenol	• Clorotalonil
• Pentaclorofenol	• Clorotalonil	• Quintozeno
• Metamidofos		

2.2 Pesticidas organoclorados

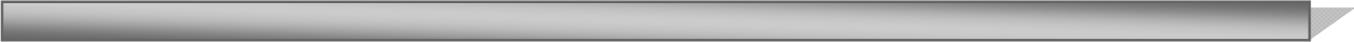
Los OCP's abarcan un amplio rango de estructuras químicas: compuestos de ciclodieno como son el aldrín, dieldrín, endrín, heptacloro, isodrín, endosulfán y clordano, compuestos aromáticos halogenados como el DDT, kelthane, metoxicloro, clorbencilato y clorfenesin, cicloparafinas como hexaclorociclohexano (BHC) y lindano, y terpenos clorados.

El pesticida más conocido de este grupo es el DDT. En 1974 la producción mundial de DDT fue de 60,000 toneladas. La prohibición o restricción de DDT en muchos países se basa en consideraciones ecológicas, sin embargo, en algunos países se sigue utilizando en la agricultura.

Otros OCP's muy persistentes son los compuestos de ciclodieno, particularmente, aldrin, dieldrin y endrin. Esta persistencia en el medio ambiente y la adaptación de las plagas a estos, son las razones principales por las cuales ha disminuido su uso en las últimas dos décadas.

2.2.1 Propiedades

Los OCP's representan un grupo de pesticidas con una amplia variedad de propiedades físicas y químicas. Casi todos son compuestos sólidos (insolubles en agua, pero muy solubles en disolventes orgánicos) y son estables al aire, luz, calor y al dióxido de carbono. Los OCP's no son atacados por ácidos fuertes, pero en medio



alcalino se vuelven inestables y son fácilmente declorados. Los OCP's del ciclodieno son más estables en medio alcalino y son susceptibles a la epoxidación. Agentes oxidantes y ácidos fuertes atacan los anillos no clorados.

2.2.2 Usos

Los OCP's son usados en gran escala en agricultura, bosques y en salud pública. En agricultura actúan como insecticidas, acaricidas, y fumigantes para el control de huertos, campos de vegetales, granos, algodón y tabaco así como viñedos. Algunos de ellos también son utilizados para el tratamiento de semillas y como rodenticidas. En el campo de salud pública juegan un papel decisivo en la erradicación de ciertas enfermedades parasitarias como la malaria. Se siguen utilizando en muchos países desarrollados para el control de enfermedades transmisibles [24].

2.2.3 Metabolismo

Los OCP's entran en el organismo por inhalación, ingestión, y absorción dérmica. El peligro por absorción dérmica es pequeño cuando el compuesto utilizado se encuentra en forma de polvo. Por otro lado si el compuesto se encuentra disuelto en algún aceite o disolvente orgánico, se absorbe fácilmente a través de la piel y constituye un peligro considerable.

Después de la exposición a algunos cloruros orgánicos, una parte importante de la dosis absorbida se almacena en el tejido graso, como el compuesto principal inalterado. Son en cierto grado, desclorados, oxidados y, después conjugados.

El metabolismo en las células involucra varios mecanismos, como la oxidación y la hidrólisis. Los OCP's tienen una amplia tendencia a penetrar las membranas celulares y a almacenarse en el tejido graso.

Debido a esta tendencia lipofílica, los OCP's se fijan en células ricas en lípidos, por ejemplo, células del sistema nervioso central, hígado y riñones. En estos órganos dañan las funciones de importantes sistemas enzimáticos e interfieren con la actividad bioquímica de las células.

La ruta principal de excreción es la biliar, aunque casi todos producen metabolitos urinarios, desafortunadamente el intestino reabsorbe con eficiencia muchos de los pesticidas sin metabolizar.

La distribución metabólica del DDT y DDE (un producto de degradación del DDT), del isómero α -BHC, dieldrín, epóxido de heptacloro y mirex, tiende a ser lenta y conduce a que se almacenen en la grasa corporal. Los compuestos lipofílicos almacenables pueden ser excretados en la leche materna [24,25].

2.2.4 Toxicología

La acción tóxica principal de los OCP's se dirige al sistema nervioso, en donde inducen a un estado de sobre excitación en el cerebro. Las convulsiones causadas por los ciclodienos que son metabolizados con más lentitud, pueden repetirse en períodos de varios días. Agentes tales como el DDT y el metoxicloro tienden a causar efectos menos severos, mientras que los ciclodienos, el mirex y el lindano están asociados con ataques más violentos y muertes [24, 25].

Los niveles elevados de algunos cloruros orgánicos (en especial DDT, DDE y ciclodienos), han demostrado inducir las enzimas microsomales hepáticas que metabolizan medicamentos. Esto tiende a acelerar su excreción pero también puede estimular la biotransformación de sustancias naturales como hormonas esteroidales y medicamentos. La síntesis de proteínas y de lípidos así como funciones de detoxicación y excreción que lleva a cabo el hígado se ven afectadas por los OCP's.

Otro aspecto que cabe mencionar es que los OCP's aumentan la actividad de la fosfatasa alcalina y de la aldolasa lo cual causa daños severos en el hígado.

Algunos estudios han demostrado, que la exposición a OCP's puede provocar una disminución de la fertilidad en animales, provocada por un aumento en el metabolismo de esteroides, como andrógenos, estrógenos y corticosteroides.

Por otro lado se ha reportado que el DDT inhibe la síntesis de anticuerpos modificando la respuesta inmune y disminuyendo la cantidad de α -globulinas en suero.

Estudios en animales han demostrado que el DDT, aldrin, dieldrin, clordano y heptacloro pueden tener efectos carcinogénicos en humanos [24].

2.2.4.1 OCP's en diferentes tejidos, sangre y orina

Como ya se menciona, la absorción y acumulación de OCP's y su metabolismo y excreción, se desarrollan en forma tal que se establece un equilibrio entre el contenido de OCP's en los tejidos y en el ambiente. Los OCP's no se encuentran en una cantidad constante en el tejido graso, ya que existe un equilibrio dinámico con varios órganos mediado por la sangre.

La concentración de OCP's en los riñones, cerebro y glándulas endocrinas es cerca de cien veces menor que en el tejido graso, y diez veces menor que la concentración en el hígado.

2.2.4.2 OCP's y embarazo

Los OCP's pasan a través de la barrera placentaria hacia los tejidos del embrión en donde pueden ser metabolizados. Las cantidades medidas en un gran número de embriones se encuentra dentro de los límites establecidos. Sin embargo se piensa que los OCP's pueden tener un efecto sobre el embrión en los casos de exposición materna más importantes. En la Tabla 6 se muestran los niveles de algunos OCP's en tejidos fetales.

Tabla 6. Concentración (mg/kg) de OCP's en tejidos fetales y niños recién nacidos.

Tejido	DDT	BHC	Dieldrin	Heptacloro epoxido
Tejido embrionario	1.607	-	0.045	0.06
Tejido adiposo	5.68	-	0.17	-
hígado	0.155	-	0.007	-
Riñón	0.085	-	0.005	-
Cerebro	0.005	-	0.005	-
Testículos	0.005	-	-	-
Sangre de recién nacidos	0.008	0.0012	0.0013	0.00006

El UNEP y la OMS organizaron estudios a gran escala para evaluar la exposición humana a OCP's seleccionados a través del control biológico. Once países de cuatro

continentes participaron en el proyecto, Bélgica, Egipto, Alemania, India, Israel, Japón, México, China, Turquía, Estados Unidos y Yugoslavia.

Tabla 7. OCP's en leche materna (mg/kg)

País	DDT	DDE	HCH	PCB's
Bélgica	0.13	0.94	0.2	0.81
China	1.8	4.4	6.6	-
Alemania	0.25	1.2	0.28	2.1
India	1.1	4.8	4.6	-
Japón	0.21	1.5	1.9	0.43
México	0.71	3.7	0.4	-
Estados Unidos	0.1	1.6	0.05	1
Yugoslavia	0.180	1.9	0.28	0.63

Se determinaron algunos OCP's principalmente DDT, sus metabolitos (DDE) y β -HCH así como bifenilos policlorados (PCB's) en leche materna (Tabla 7).

Los resultados relativamente altos en China, México e India, se deben a que aun se utiliza DDT en la agricultura y en el control de vectores.

En contraste a esto, los valores de PCB's en la grasa de la leche materna fueron mayores en los países Europeos y en Japón. La ingestión de OCP's en los lactantes se calculo basándose en el supuesto de que el niño consume al día 130g de leche por kilogramo de peso. La ingesta diaria calculada indica que el consumo de DDT total por algunos de los lactantes supera los límites establecidos (5 μ g por kilogramo de peso). En algunos países el límite se supera varias veces por la mayoría de los niños.

Se han observado cambios en la acumulación de sustancias organocloradas y sus metabolitos durante el embarazo. DDT, sus metabolitos, BHC y dieldrin, están contenidos en el tejido graso de las mujeres embarazadas en cantidades menores que en otras mujeres (Tabla 8). Los investigadores explican este fenómeno por el aumento del metabolismo durante el embarazo. Otros resultados contundentes son los niveles

de OCP's en plasma de mujeres embarazadas los cuales se encuentran disminuidos en comparación con mujeres no embarazadas. Los cambios fisiológicos a los que se pueden atribuir estos niveles de OCP's son: incremento en los niveles de progesterona y estrógenos, incremento de los niveles de agua en el organismo (hipervolemia), y tratamiento con fármacos durante el embarazo [24].

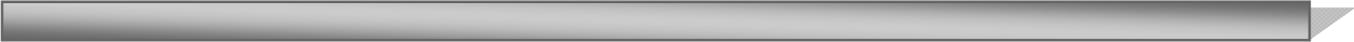
Tabla 8 Concentración (mg/kg) de OCP's en diversos tejidos de mujeres embarazadas.

Tejido	DDT	BHC	Dieldrin	Heptacloro epoxido
Placenta	0.024	0.0012	0.00148	0.0021
Sangre	0.0018	0.00048	0.00026	0.00024
Plasma	0.001	0.001	0.0001	0.0033
Tejido adiposo	12.6	0.035	0.085	-
Útero	0.029	0.010	0.0009	-

2.3 Tamiz Metabólico Neonatal

El tamiz metabólico neonatal (TMN) para la detección de errores innatos del metabolismo (EIM) es una medida de salud pública dirigida a identificar los trastornos con graves consecuencias en el recién nacido (RN). Dada la importancia del diagnóstico oportuno de los EIM, para reducir la morbi-mortalidad y prevenir la presencia de retraso mental, la mayoría de los países desarrollados lleva a cabo programas de TMN.

El tamiz en el recién nacido se inició en 1960 en Estados Unidos, con la utilización de gotas de sangre seca en papel filtro para la detección de fenilcetonuria mediante la prueba de inhibición bacteriana de Guthrie; a partir de entonces ha sido posible reconocer algunos trastornos del metabolismo de aminoácidos como la enfermedad de orina con olor a jarabe de arce, la hipermetioninemia y la tirosinemia. El número y tipo de trastornos que se detectan al nacer varían entre cada país e incluso dentro de una misma nación de acuerdo con la reglamentación o normatividad existentes, recursos económicos y la frecuencia de las enfermedades en cada población.



Cuando se pretende introducir un programa de tamizaje neonatal, se deben seguir los criterios de Wilson y Jungner que publicó la OMS y en los cuales se establece que la enfermedad debe tener una incidencia elevada, posibilidad de un tratamiento médico efectivo, existencia de una prueba de tamizaje barata con alta sensibilidad y especificidad para un gran volumen de muestras y una relación costo-beneficio razonable para identificar y tratar de forma oportuna estos trastornos.

Cuando no se dispone de la información sobre la incidencia de los padecimientos en la población, es importante iniciar un programa piloto con la finalidad de incluir una muestra poblacional grande y analizar el mayor número de enfermedades posible. De manera inicial, la metodología empleada para el tamizaje de estas enfermedades era económica pero muy lenta y ello llevó al desarrollo de técnicas más sensibles y rápidas, como el radioinmunoensayo, inmunoensayo enzimático, enfoque isoelectrico, cromatografía de líquidos de alta resolución, fluorimetría y ensayos enzimáticos directos. Sin embargo, estas pruebas se enfocan en el reconocimiento de un solo trastorno metabólico, de tal manera que su empleo para los programas de tamiz neonatal ampliado no resulta eficiente en términos del costo.

Las muestras de sangre se obtienen por punción en el talón del recién nacido, la sangre se coloca en un papel filtro (Figura 2). El papel filtro debe ser de 100% algodón puro de calidad controlada para absorción (peso básico 185 g/m², grosor 0.545mm, absorción en agua 4.7ml/100cm², cenizas 0.06% y densímetros 3.0seg) (Figura 3). Posteriormente con una perforadora se obtienen discos de un diámetro determinado, los cuales contienen un volumen conocido de sangre (del orden de µl), dichos discos son utilizados para realizar el TMN [26].



Figura 2. Toma de muestra de sangre

Medical Record Number

Infant's Name - Last Name, First Name

Infant's Date of Birth: Month, Day, Year

Time of Birth

Birth Weight (in Grams)

Multiple Births (Birth Order: A, B, C, etc.)

Gestational Weeks (Wks.)

Sex (F or M)

Infant's Race or Ethnicity:

- White
- Asian
- Black
- Hispanic
- Native American
- Other

Risk Factors:

- Sick Baby: Yes No
- Diagnosed Anemia: Yes No
- Diagnosed Sibling: Yes No
- Maternal Pregnancy Complications (eg: AFLP, HELLP): Yes No
- Other: Yes No

Date of First Feeding: Month, Day, Year

Time of First Feeding

Type of Feeding:

- Breast
- TPN
- FORMULA - Trade Name:

Date of Collection: Month, Day, Year

Time of Collection

Special Circumstances:

- Second Birth
- Home Birth
- Antibiotics
- Transfused

Date of Transition: Month, Day, Year

Mother's Name - Last Name, First Name

Mother's Date of Birth: Month, Day, Year

Mother's Address - Street Address, City, State

Mother's Phone Number: Area Code, Number

Submitter's Name

Physician Responsible for Infant Follow Up

Submitter's Phone Number: Area Code, Number

Physician's Phone Number: Area Code, Number

Physician's Fax Number: Area Code, Number

HEARING SCREENING - Record Date and Results of Last Screen

Date of Last Screen: Month, Day, Year

Right Ear: Pass Refer

Left Ear: Pass Refer

Screening Method: ABR OAE

Not Screened:

- No Program
- Missed
- Refused
- Delayed
- Equipment Problem
- Transferred (where):

MINNESOTA DEPARTMENT OF HEALTH, Newborn Screening Program, 717 Delaware Street SE, Minneapolis, MN 55414, Phone 612-676-4260, Fax 612-676-5703

Figura 3. Ejemplo del papel filtro utilizado para la recolección de la muestra de sangre.

2.4 Métodos analíticos para el monitoreo de exposición a pesticidas

Los biomarcadores utilizados para monitorear la exposición a sustancias tóxicas, incluidos los pesticidas, se suelen dividir en tres categorías generales que se muestran en la figura 4.

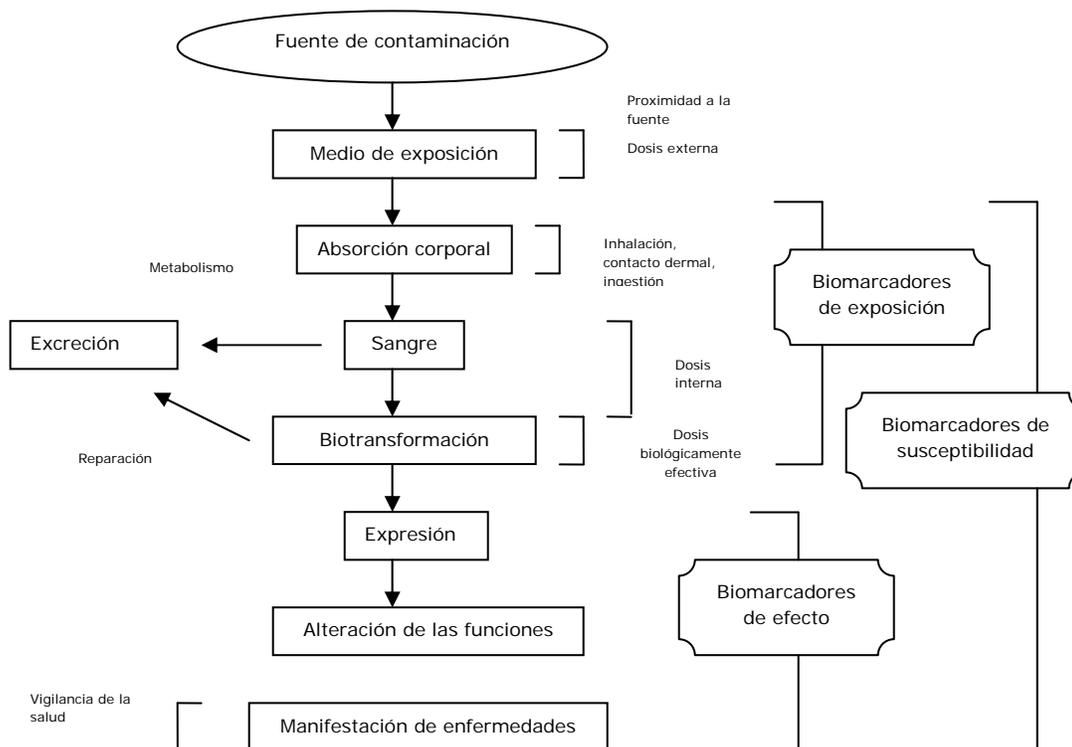


Figura 4. Representación esquemática de la ruta de un pesticida desde su exposición hasta los efectos que produce en la salud.

Los biomarcadores de exposición proporcionan información sobre la dosis de una sustancia tóxica que puede estar relacionada con la exposición a dicha sustancia. Los biomarcadores de susceptibilidad indican las variables que afectan la respuesta de un individuo a una sustancia tóxica en particular. Los biomarcadores de efecto proporcionan información de un evento, por lo general en la etapa preclínica, que ocurre en el sitio blanco de la sustancia después de la exposición, que se correlaciona directamente con la manifestación de una enfermedad.

Los biomarcadores de exposición son los que se pueden monitorear más rápidos y de manera más fácil. Los biomarcadores de exposición se pueden dividir en tres grupos:

- Dosis potencial o dosis externa
- Dosis absorbida
- Dosis biológicamente efectiva

Debido a que la exposición a estos pesticidas es multirruta y varia con el uso de pesticidas, el monitoreo ambiental de la exposición que determinan la dosis potencial, debe tener en cuenta todos los medios y rutas de la exposición con el fin de calcular con exactitud la exposición individual.

Por el contrario, los biomarcadores de dosis interna, integran a todas las vías de exposición mediante el cálculo de la cantidad de pesticidas que se absorbe en el cuerpo a través de mediciones de los plaguicidas, su metabolito o su producto de reacción en medios biológicos (por ejemplo, sangre, orina, saliva, liquido amniótico, leche materna, etcétera). La dosis biológicamente efectiva es la cantidad de un toxico que ha interactuado con un sitio de acción lo que deriva en modificaciones fisiológicas [27].

2.4.1 Elección de la matriz

La elección de la matriz para hacer el biomonitoreo de pesticidas persistentes usualmente es muy sencilla. La cuantificación de pesticidas persistentes resulta mejor realizarla en suero, plasma o en otras matrices lipofílicas, debido a que el tiempo de vida media de estos es muy prolongado (Figura 5).

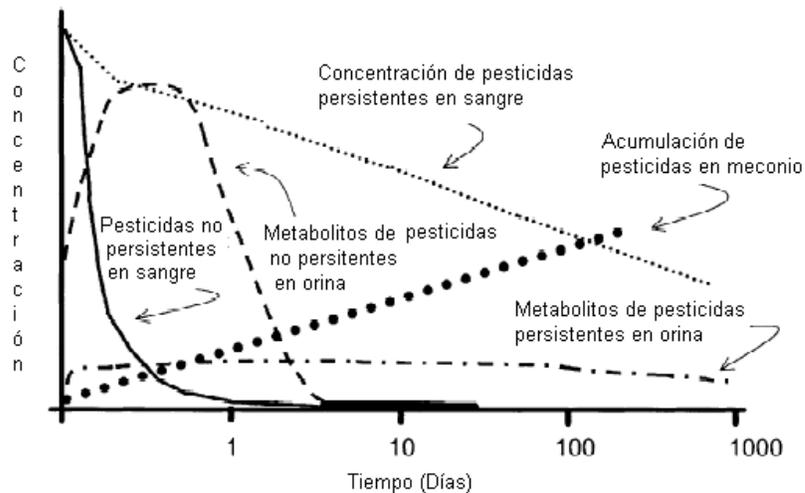


Figura 5. Tiempos de vida media de pesticidas persistente y no persistentes en sangre humana, orina y meconio fetal.

Debido a que estos pesticidas son inherentemente lipofílicos, tienden a almacenarse dentro del tejido graso del cuerpo, su concentración en leche, plasma o leche materna, depende del contenido de lípidos en la matriz.

La medición de la dosis interna de tóxicos en sangre, tiene muchas ventajas sobre las mediciones en orina. Generalmente, el compuesto original y no su metabolito puede ser monitoreado en sangre, plasma o suero, además el diseño de técnicas para la determinación de estos no requiere información detallada de su metabolismo.

Debido a que la sangre es un fluido regulado (el volumen no varía con la ingesta de agua u otros factores), no son necesarias las correcciones por dilución. La concentración de tóxicos en la sangre a menudo alcanza un máximo inmediatamente después de la exposición, por lo que el rango de tiempo preferencial de muestreo puede ser más claro que con la orina. Sin embargo, las concentraciones de tóxicos en sangre puede variar dependiendo de la ruta de exposición, por la vía enteral usualmente se requiere más tiempo para llegar a la sangre que por inhalación o por el contacto dermal. Además las determinaciones en sangre reflejan con mayor exactitud la dosis interna que las determinaciones en orina, debido a que la dosis ingerida no se ha eliminado por completo del cuerpo [27].

2.4.2 Monitoreo biológico de OCP's

Aunque algunos metabolitos de OCP's son monitoreados en orina, las especies que se miden con mayor frecuencia son los pesticidas intactos o sus metabolitos en sangre, suero o plasma o en otras matrices ricas en lípidos. Estos métodos se describen en la Tabla 8. Generalmente el suero o plasma son extraídos por partición líquida o por extracción en fase sólida (EFS), cabe señalar que la microextracción en fase sólida (SPME) se empieza a utilizar para la extracción de OCP's. El extracto obtenido se analiza por medio de cromatografía de gases (GC) con un detector de captura de electrones (ECD). Estos métodos son fiables y el uso de los instrumentos es relativamente sencillo. Sin embargo, los análisis por medio de GC-ECD tienen un alto riesgo de detectar componentes que interfieren con el análisis, por lo que también

se utilizan técnicas de análisis más selectivas. Una de esas técnicas es la espectrometría de masas (MS) y la espectrometría de masas de alta resolución. Los análisis suelen ser más selectivos y sensibles que los análisis por GC-ECD, sin embargo el alto costo de los instrumentos, la compleja operación y el mantenimiento de los instrumentos a menudo son factores que impiden el uso de estos en la mayoría de los laboratorios [27, 28].

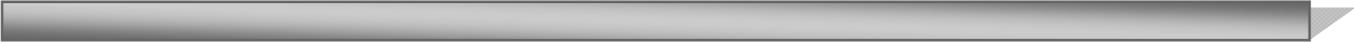
Tabla 8. Métodos de análisis de OCP's en sangre y suero.

Matriz	Técnica de extracción	Sistema analítico	Referencia
Sangre	EFS	GC-MS	Frenzel, 2000
Sangre	SPME	GC-ECD	Rohrig, 2000
Suero	EFS (C ₁₈)	GC-MS	Pawels, 1999
Suero	EFS (Florisil)	GC-ECD	Lino, 1998
Suero	Partición (n-hexano)	GC-ECD	Luo, 1997
Suero	EFS (C ₁₈ , Florisil)	GC-ECD	Brock, 1996
Suero	Partición (hexano/éter)	GC-ECD	Burse, 1990
Suero	EFS (Florisil)	GC-ECD	Gomez-Catalan, 1987
Sangre	EFS (C ₁₈)	GC-ECD	Guardino, 1996

2.5 Cromatografía de gases

Cada método de análisis involucra varios pasos, dentro de ellos los más importantes son: el muestreo que debe representar la zona o sistema elegido; la preparación de la muestra; concentración de los compuestos a determinar presentes en la muestra; y la determinación cualitativa y cuantitativa que dependiendo de los compuestos a analizar definirá las técnicas instrumentales.

Las técnicas cromatográficas han sido consideradas como el mejor método para la determinación de OCP's en una gran variedad de muestras. La cromatografía es un método físico de separación basado en la distribución de la muestra en dos fases: una estacionaria y una móvil. En la cromatografía de gases, el gas portador se denomina fase móvil (en este caso hidrógeno o helio) que transporta la muestra a través de la columna, fase estacionaria, donde ocurre la separación debido a la retención diferencial de las especies química que forman la muestra. Las ventajas de este tipo



de cromatografía son: alta resolución, velocidad, sensibilidad, sencillez y resultados cuantitativos [30,31].

El detector es un dispositivo que mide la concentración de las sustancias eluidas de la muestra al comparar una propiedad física entre el gas portador puro y el mismo gas portador cuando lleva un componente que fue previamente separado en la columna. Genera una señal eléctrica proporcional a la concentración del componente, que posteriormente se amplificará mediante un registrador gráfico o integrador permitiendo indicar el momento que salen de la columna los componentes.

El registro gráfico que se obtiene de la separación de la muestra en función del tiempo, es un cromatograma. Al eluir la muestra, el perfil del pico obtenido define la concentración a través de su área; y el tiempo de retención (t_r), define el tiempo que tarda en eluir el soluto desde la inyección hasta el registro máximo del pico. Este tiempo se utiliza para identificar compuestos por comparación con un estándar, debido a que es reproducible en condiciones controladas [29,31].

2.6 Espectrometría de masas

Los tres componentes principales para obtener la separación y análisis de una mezcla compleja son cromatógrafo de gases, espectrómetro de masas y sistema de control de datos (GC-MS, por sus siglas en inglés).

El espectrómetro de masas consiste en una cámara de ionización, el analizador de masas y el detector iónico, en un sistema al alto vacío. Un complejo sistema de datos permite a través de una computadora controlar componentes, programas de temperatura, temperaturas de la fuente de ionización, detector y línea de transferencia.

En el espectrómetro de masas de cuadrupolo (Fig. 6) los analitos pasan a través de la línea de transferencia a una cámara de ionización de impacto del espectrómetro, conectada a un bomba que la mantiene a un vacío elevado. Los iones son acelerados

a través de un potencial de 5-15 V antes de penetrar en el separador de masas de cuadrupolo.

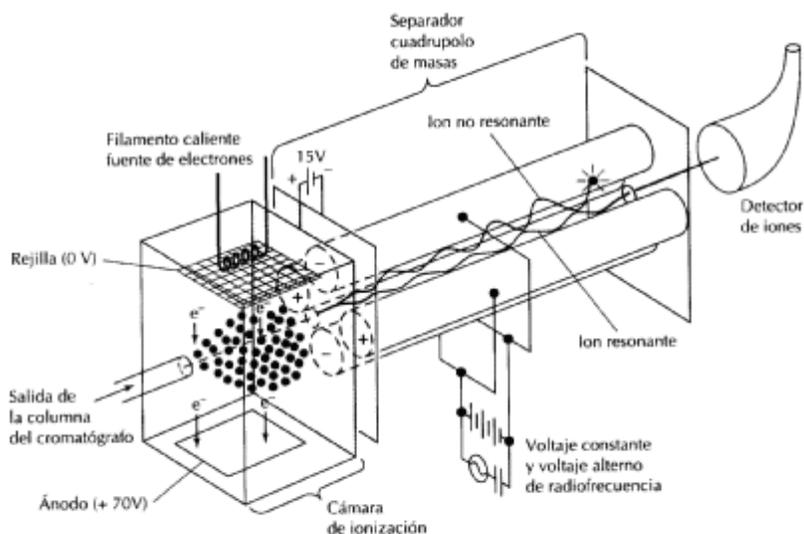
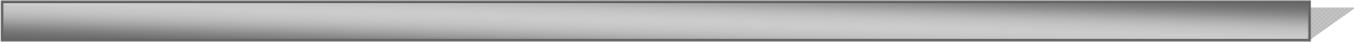


Figura 6. Espectrómetro de masas de cuadrupolo

El separador consiste de cuatro barras metálicas paralelas a las que se aplica un voltaje constante y un voltaje oscilante de radiofrecuencia. El campo eléctrico desvía los iones, haciéndoles seguir trayectorias diversas a medida que van de la cámara de ionización hacia el detector, y permitiendo que solo lleguen al detector los que tienen una relación m/z (masa/carga) determinada. Los demás 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. Con un espectrómetro de masas de cuadrupolo se pueden registrar de dos a ocho espectros por segundo, de 800 unidades de masa cada uno. La señal procesada de un espectrómetro de masas puede ser del tipo de monitoreo selectivo de iones (SIM, por sus siglas en inglés) o bien la corriente total de iones.

2.7 Microextracción en fase sólida

La microextracción en fase sólida (SPME, por sus siglas en inglés) fue patentada en 1991 por Belardi y Pawliszyn, tiene muchas aplicaciones en diferentes campos. Esta



técnica presenta grandes ventajas: no requiere de disolventes, es más rápida, la volatilidad de los compuestos a determinar no es un factor limitante, permite límites de detección muy bajos del orden de partes por billón (ppb) y es menos costosa.

Consiste en una fibra que se retrae dentro de una aguja. Sobre la fibra se comprime una capa de sílice fundida cubierta con la fase estacionaria polimérica. La fibra es expuesta directamente a la muestra (fase líquida o gaseosa), permitiendo la extracción de los analitos afines a ésta [32,34]. Posteriormente la desorción de los analitos se lleva a cabo por calentamiento en el inyector del cromatógrafo de gases. Se analizan cualitativa y cuantitativamente las sustancias de interés.

Esta técnica se enfoca principalmente a la extracción de compuestos orgánicos que se pueden encontrar en diferentes muestras, con pocos tipos de materiales absorbentes y adsorbentes se cubre la totalidad de los analitos a determinar tanto para muestras de aire, como de agua o suelo. Para estas aplicaciones se puede utilizar una fibra de PDMS, o de PA, entre otras, las cuales han sido desarrolladas para que la fibra de sílice fundida sea químicamente inerte y muy estable a altas temperaturas [35,37]. Por su pequeño tamaño y geometría cilíndrica la fibra puede ser utilizada como una jeringa y por lo tanto es de fácil uso en cromatografía [36,37]. La desorción por calentamiento permite la eliminación total de los disolventes orgánicos y la inyección de los analitos de interés, integrando ambos procesos en un solo paso [34,36].

Mecanismo SPME para aplicación en CG

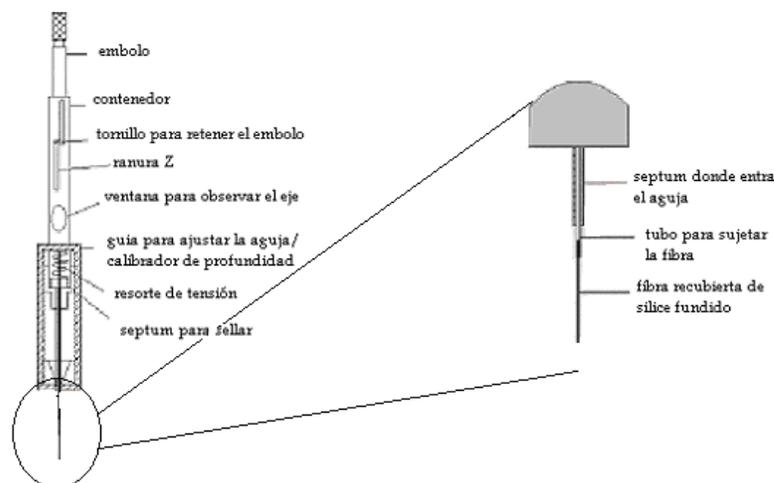


Figura 7. Mecanismo utilizado para llevar a cabo la técnica SPME.

La SPME se puede ejecutar manual o automáticamente. Es importante controlar perfectamente la forma de sumergir la fibra en la muestra y los tiempos de extracción y desorción. También se debe prevenir la pérdida de los analitos al transportarlos de la muestra al cromatógrafo (en caso de ser un tiempo largo se debe enfriar y sellar la jeringa usando una septa). La SPME reduce el tiempo de análisis al combinar el muestreo, la extracción, concentración y la inyección en un solo paso del proceso [36,37]. Esta técnica se puede llevar a cabo por vía directa y vía vapor-sobrenadante (headspace, HS, por sus siglas en inglés).

Extracción vía directa técnica SPME

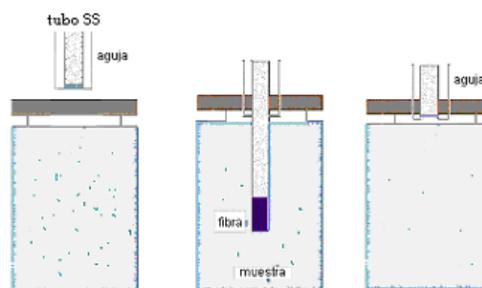


Figura 8. Introducción de la fibra vía directa en una muestra de agua

La principal desventaja es que, hasta ahora, los resultados de reproducibilidad de una fibra a otra no son buenos y el tiempo de vida media de la fibra es impreciso. Las constantes de reparto de los analitos, en la fibra, son diferentes ya que dependen de la afinidad con la fase estacionaria, por lo que se obtienen diferentes límites de detección para cada compuesto.

La implementación de esta técnica normalmente requiere de la optimización de las variables involucradas en los pasos de extracción y desorción.

Para la extracción se debe considerar el tipo de fibra, el tiempo de absorción, temperatura, volumen de muestra, posición de la fibra, contenido salino, velocidad de agitación y forma y tamaño del agitador. En el caso de la desorción se controla la temperatura, el tiempo de desorción del disolvente y de los analitos de interés [35, 36, 37].

El principio de la SPME se basa en la partición de los analitos entre la muestra y el medio de extracción, lo cual inicia al entrar en contacto la muestra y la fibra. La extracción se completa cuando la concentración del analito ha alcanzado el equilibrio de distribución entre ambas fases.

El modelo matemático que explica la dinámica del proceso de absorción lo desarrolló Louch y confirma la relación lineal que existe entre la cantidad del analito absorbido por la fibra en el estado de equilibrio y su concentración en la muestra [34,37,38]. Lo que se muestra en la siguiente ecuación:

$$n = \frac{C_o V_f K_{fs} V_s}{V_f K_{fs} + V_s} \quad \text{donde :} \quad K_{fs} = \frac{C_{fase.estacionaria}}{C_{muestra.agua}}$$

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

relación de concentraciones de equilibrio de un soluto en ambos lados de la interfase. Esta ecuación asume que la matriz de la muestra es una única fase homogénea y que se realiza un proceso de absorción.

En las condiciones de trabajo de la SPME, generalmente se cumple que $V_s \gg K_{fs} V_f$ ya que en la mayoría de los casos V_f es menor que V_s por lo que la ecuación queda de la siguiente manera:

$$n = C_o V_f K_{fs}$$

La cantidad de analito extraída n es directamente proporcional a su concentración en la muestra e independiente del volumen de la muestra. Esta aproximación no es válida en caso de que los analitos tengan valores elevados de K_{fs} (gran afinidad por la fibra) y se utilicen volúmenes pequeños de muestra.

Para la SPME la cinética del proceso es muy importante ya que la velocidad de extracción se controla a través del transporte de masa del analito entre la fibra y la muestra, esta transferencia de masa es determinada por la difusión de los analitos en la fibra hasta obtener el equilibrio en ambas fases, lo cual se puede acelerar si la muestra se agita para disminuir el efecto estático que se forma alrededor de la fibra ayudando a compensar los bajos coeficientes de difusión en matrices líquidas.

Las constantes de reparto de cada analito dependen de la afinidad del analito a la fibra, estos coeficientes de partición dependen de la temperatura y disminuyen si la temperatura de extracción es muy alta ya que la fibra pierde su facilidad de absorber. Se ha demostrado que la SPME es un método válido para la determinación de un gran grupo de compuestos semivolátiles en concentraciones a nivel de trazas ($\mu\text{g/L}$) [32, 34, 36, 37].

Existen varias aplicaciones en el uso de la SPME como por ejemplo: el análisis rápido de explosivos por GC, la determinación de hidrocarburos poliaromáticos (PAH's por

sus siglas en inglés) en agua por GC o cromatografía líquida de alta resolución (, HPLC por sus siglas en inglés), compuestos semipolares en agua por GC, pesticidas clorados en aguas por GC-ECD, pesticidas nitrados en agua por GC-NPD (detector de nitrógeno-fósforo, por sus siglas en inglés), pesticidas fosforados en agua por GC-MS, impurezas orgánicas volátiles en drogas farmacéuticas por GC, combustibles y BTEX (Benceno, Tolueno, Etilbenceno, y Xilenos; por sus siglas en inglés) en agua por GC, detección rápida y exacta de anfetaminas en orina por HS-GC, identificación de variedades de tabaco por GC, monitoreo de sabores y fragancias en alimentos y bebidas por GC [36].

Para optimizar las condiciones de extracción en la técnica de SPME se recomienda la inmersión bajo agitación magnética para lograr una buena extracción, la desorción en un intervalo de temperaturas entre 210 a 280°C desde 5 a 30 min, esto da ventaja de evitar la reducción del desgaste de la fibra aumentando su tiempo de vida media, y reduce la descomposición por temperatura de analitos como el DDT y el endrin en el caso de los OCPs [32,35].

2.8 Ultrasonido

El ultrasonido es una onda acústica cuya frecuencia está por encima del límite perceptible por el oído humano, situada en el rango de los 20KHz hasta los GHz. La región de más baja frecuencia (20-40KHz) es comúnmente empleada en los equipos de laboratorio químico para diversos fines, en esta región la energía ultrasónica es capaz de producir la cavitación fácilmente. Se ha podido producir cavitación a frecuencias cercanas a los 2 MHz [40,41]; sin embargo las aplicaciones son limitadas por la elevada energía requerida. Los usos del ultrasonido se dividen en dos grandes grupos:

- a) El que se utiliza para la medición sin alterar el medio (ultrasonido diagnóstico) y se caracteriza por elevadas frecuencias y baja energía (amplitud).
- b) El utilizado para producir cambios físicos y químicos en el medio, caracterizado por emplear bajas frecuencias y elevada energía.

Por ser una onda acústica, el ultrasonido puede ser transmitido por cualquier sustancia sólida, líquida o gaseosa que posea propiedades elásticas. La onda ultrasónica produce una perturbación en el medio provocando ciclos de expansión-compresión. Los ciclos de compresión agrupan las moléculas, mientras que los ciclos de expansión tienden a separarlas. En un líquido, el ciclo de expansión genera una presión negativa que separa unas moléculas de otras. Si la intensidad del ultrasonido es suficientemente fuerte, el ciclo de expansión puede provocar burbujas o cavidades en el líquido, esto ocurre cuando la presión negativa ejercida excede la fuerza de tensión local del líquido. El proceso durante el cual las burbujas se forman, crecen y colapsan de manera implosiva, es conocido como cavitación (Fig. 9). La utilidad de la cavitación en procesos fisicoquímicos es debida únicamente al colapso de la burbuja y este ocurre en el momento en el cual la burbuja no puede absorber más energía ultrasónica eficientemente; esta rápida compresión adiabática de los gases y vapores dentro de la burbuja produce temperaturas y presiones del orden de 5000°C y 2000atm. El tamaño de las burbujas es muy pequeño comparado con el volumen del líquido por lo que el calor producido es disipado rápidamente, sin producir cambios aparentes en las condiciones del medio [40,41]. Se ha estimado que la tasa de enfriamiento después de la implosión es del orden de 10^{10} °C/s.

Cuando la cavitación ocurre cerca de una superficie sólida, la dinámica del colapso cambia drásticamente. En líquidos puros, las burbujas mantienen una forma esférica durante su colapso debido a la uniformidad del medio que las rodean; en cambio, cerca de una superficie sólida, la burbuja colapsa de manera asimétrica produciendo flujos de líquido que se impactan contra la superficie a velocidades aproximadas de 400km/h [40]. Este fenómeno favorece el impacto entre partículas, beneficiando en ciertos casos su agregación/disgregación.

El mecanismo de extracción de compuestos de matrices sólidas por ultrasonido, se puede generalizar a manera de un proceso de ultra-agitación, facilitando la difusión de los analitos al medio. La elevada presión y temperatura durante la cavitación, producen la formación de radicales libres entre otras especies, lo cual puede favorecer la oxidación de ciertos analitos y por consecuencia la disminución en recobros cuando

el medio es irradiado en exceso; esta es una de las razones por las cuales se deben buscar las condiciones adecuadas entre la selección del período y la potencia de irradiación con ultrasonido [41].



Figura 9. Ciclo cavitativo

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Reactivos, Material y Equipo

Equipo

- Cromatógrafo de gases, Hewlet packard 5890 Series II acoplado a un detector selectivo de masas Hewlet Packard 5971A
- Columna capilar ZB-5 (30m x 0.25mm ID x 0.25µm FT)
- Baño de ultrasonido Sper Scientific
- Balanza analítica, Ohaus AP250D
- Micropipeta de 100-1000µL
- Micropipeta de 20-200µL
- Micropipeta de 10-100µL
- Vortex IKA “lab dancer”
- Parrilla magnética
- Dispositivo de punción, Accu-Check, Roche

Reactivos y material

- Papel filtro Whatman 903
- Perforadora
- Tijeras
- Nitrógeno cromatográfico, INFRA
- Helio grado BIP, INFRA
- Metanol, grado HPLC, Fluka
- Hexano, grado HPLC, Fluka
- Acetona, grado HPLC, Fluka
- Tolueno, grado HPLC, J. T. Baker
- Cloruro de metileno, Mallincrodt
- Agua desionizada ultrapura (resistencia específica mayor de 12 Mohm/cm)

- Viales de vidrio de 4 mL con tapón horadado de polipropileno y septa de PTFE (politetrafluoretileno)
- Viales de vidrio de 7mL con tapón
- Jeringas Hamilton de 1 μ L
- Fibras para SPME de Polidimetilsiloxano/Divinilbenceno (PDMS/DVB)
- Soporte de la fibra para inyección manual (Supelco, Bellafonte, P.A., USA)
- Pipetas Pasteur
- Barras magnéticas de 7mm x 2mm
- Material de vidrio: Matraces volumétricos de 5, 10 y 25 mL, vasos de precipitados de 10, 50 y 100mL. Dispositivo de extracción Soxhlet

Estándares

- Mezcla de pesticidas organoclorados (EPA TCL Pesticides Mix, Supelco, EUA).

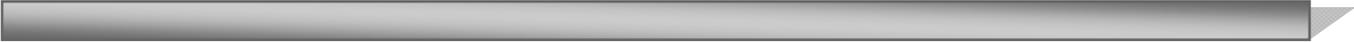
3.2 Preparación de disoluciones

Para la preparación de las disoluciones se partió de una disolución de referencia de 2 mg/mL de cada compuesto (Supelco). Se preparo una disolución stock de 40 μ g/mL de cada pesticida usando hexano como disolvente, de esa disolución se tomo una alícuota correspondiente a 5 μ g de cada pesticida y se coloco en un matraz volumétrico de 5mL, se evaporo el disolvente con nitrógeno y se llevo al aforo con metanol. De esta disolución se partió para preparar el resto utilizando agua como disolvente.

3.3 Preparación de muestras de sangre enriquecidas

Debido a la dificultad de obtener muestras de sujetos expuestos se prepararon muestras enriquecidas a partir de sangre de sujetos no expuestos.

Previo a la obtención de la muestra de sangre se impregno cada disco del papel filtro con 80 μ L de una disolución de OCP's con una concentración de 0.1 μ g/mL. El sujeto previamente lavó su dedo índice con agua y jabón y después con etanol al



70%, posteriormente se obtuvo la muestra de sangre con ayuda de un dispositivo de punción (Accu-Check, Roche), una vez hecha la punción se colocó la sangre en los discos hasta que quedaran totalmente impregnados con sangre.

3.4 Condiciones cromatográficas

Se utilizó helio como gas acarreador, la dinámica de flujo se mantuvo en el modo de flujo constante a 1 mL/min. La inyección de la muestra se realizó en el modo sin división de flujo (splitless) con las siguientes condiciones:

- Volumen de inyección: 1 μ L
- Tiempo de splitless: 1 min
- Temperatura del inyector: 250°C

La temperatura de la interfase entre el cromatógrafo y el detector fue de 320°C. Se realizó una elución por gradiente de temperatura empleando el siguiente programa: 70°C durante 2 min, rampa de temperatura de 8°C/min hasta 260°C durante 2 minutos, después otra rampa de temperatura de 5°C/min hasta 300°C por 5 minutos. El tiempo total de la corrida es de 40.75 min, donde los últimos 5 minutos se emplean para la limpieza de la columna.

3.5 Identificación de OCP's

La identificación se realizó mediante un monitoreo selectivo de iones (SIM por sus siglas en inglés), los iones para la cuantificación y la confirmación se seleccionaron de acuerdo con su respectivo espectro de masas y de acuerdo con el método 8270C de la EPA.. La cámara de ionización se mantuvo apagada 17 minutos después de la inyección con la finalidad de permitir la elución del disolvente.

3.6 Microextracción en fase sólida (SPME)

Para desarrollar el método analítico primero se realizó la optimización de la SPME de los OCP's en agua, para lo cual se empleó una mezcla de estándares.

3.6.1 Optimización de parámetros para SPME

La cantidad de analitos que pueden ser extraídos por SPME está determinada por la constante de equilibrio del analito entre la fase acuosa y la muestra, y por el coeficiente de partición del analito entre la fase acuosa y la fase polimérica de la fibra. Para optimizar la adsorción de los analitos sobre la fibra y las condiciones de extracción, es necesario considerar diversos factores que influyen en estos equilibrios como son el tipo de fibra, posición de la fibra, tiempo de desorción, pH, temperatura de extracción, agitación del sistema y tiempo de extracción, de acuerdo con reportes previos la adición de sales y la variación de pH tiene efectos negativos en la extracción de OCP's, Por esta razón no se modificó la fuerza iónica ni el pH. Para optimizar cada uno de los parámetros de SPME se utilizó una fibra de PDMS/DVB y para cada análisis se colocaron 2mL de una disolución estándar de 18 OCP's con una concentración de 0.01µg/mL en un vial de 4mL.

3.6.1.1 Posición de la fibra

Para determinar la posición de la fibra que proporcione la mejor precisión se realizaron pruebas colocando la fibra en el centro y en el costado del vial que contenía la disolución de los analitos.

3.6.1.2 Tiempo de extracción

Con el objetivo de determinar el tiempo de extracción, se realizó la extracción a temperatura ambiente a diferentes tiempos 15, 30, 45, 60 y 100 minutos.

3.6.1.3 Tiempo de desorción

Para conocer el tiempo óptimo de desorción de la fibra se trabajó con un tiempo de extracción de 15 minutos y se realizaron experimentos exponiendo la fibra en el inyector a diferentes tiempos 5, 10 y 15 minutos.

3.6.1.4 Velocidad de agitación

Se evaluó la extracción diferentes velocidades de agitación 800rpm, 1000rpm y 1200rpm., usando un tiempo de extracción de 45 minutos.

3.6.1.5 Temperatura de extracción

Para evaluar la temperatura de extracción se probaron tres diferentes temperaturas, 25°C, 45°C y 60°C, se trabajó con un tiempo de extracción de 45 minutos, velocidad de agitación 1000rpm y tiempo de desorción 10 minutos.

3.7 Optimización de la extracción asistida por ultrasonido (EAU)

Para la optimización de la técnica de EAU se probaron las diferentes variables que influyen en la extracción con la finalidad de seleccionar las condiciones óptimas para la extracción de OCP's de muestras de sangre provenientes del papel filtro utilizado en el TMN. La cantidad de muestra con la que se trabajó fue constante debido a que es muy limitada, se trabajó con 2 discos del papel filtro que son equivalentes a $155\mu\text{L} \pm 5\mu\text{L}$ de sangre. Los discos se cortaron con unas tijeras previamente lavadas con hexano y acetona. Se colocaron en un vial de 4mL, se adicionaron 2mL de disolvente y se colocaron en un baño de ultrasonido. Se eliminó el disolvente del extracto obtenido con nitrógeno y se reconstituyó con 2mL de agua. Esta disolución fue sometida a SPME y posteriormente a GC/MS.

3.7.1 Disolventes

Se probaron diferentes disolventes para elegir el más adecuado para la extracción, los disolventes utilizados fueron diclorometano, hexano, metanol y dos mezclas extractantes, acetona-hexano y acetona-diclorometano.

3.7.2 Volumen de disolvente

Se probaron diferentes volúmenes de hexano para hacer la extracción 2mL, 5mL y 8mL.

3.7.3 Tiempo de extracción

Para determinar el tiempo de extracción se probaron diferentes tiempos 8 minutos, 16 minutos y 24 minutos. Se trabajo con un volumen de 2mL de disolvente.

3.7.4 Temperatura de extracción

Se evaluaron 2 temperaturas de extracción 25°C y 50°C durante 24 minutos.

3.8 Soxhlet

Uno de los métodos tradicionales para extraer de matrices sólidas es la extracción con soxhlet. El método 3540 de la EPA es un ejemplo de método validado y usado ampliamente. La principal desventaja reside en el enorme gasto de disolventes que involucra (300mL/muestra), el aumento de costos y la generación de contaminación asociadas a éste. Por esta razón se han desarrollado en los últimos años técnicas como la SPE, SPME y LPME, sin embargo, se decidió evaluar la posibilidad de miniaturizar al máximo esta técnica y evaluarla, pues se trata de una técnica exhaustiva, que garantiza los máximos rendimientos posibles. Existen comercialmente equipos de “micro” extracción soxhlet que utilizan menores volúmenes (30 mL), sin embargo se decidió miniaturizar esta técnica aún más, dado el pequeño tamaño de las muestras. El equipo utilizado fue elaborado en el taller de soplado de vidrio usando juntas Duran (Schott) 5/13 y 7/16, que son las más pequeñas existentes y reduciendo el diseño del equipo a dos componentes (figura 10).



Figura 10. Equipo de microextracción soxhlet de 5 mL de capacidad

Para la micro extracción Soxhlet se colocaron 2 discos de papel filtro enriquecidos, en el matraz de bola se adicionaron 3mL de hexano con un agitador magnético, el dispositivo de extracción se colocó en una parrilla magnética y la extracción se llevó a cabo por 2 horas. El extracto se colocó en un vial de 4mL, se eliminó el disolvente del extracto obtenido con nitrógeno y se reconstituyó con 2mL de agua. Esta disolución fue sometida a SPME y posteriormente a GC/MS.

3.9 Ensayos de recuperación

Para calcular el porcentaje de recuperación del método se preparó una disolución de OPC's de $0.08\mu\text{g/mL}$, que es equivalente a la concentración resultante si fuera extraído el 100% de los analitos después de la EAU. La disolución se sometió a SPME y posteriormente a GC/MS.

4. RESULTADOS

4.1 Condiciones cromatográficas

La figura 10 muestra el cromatograma obtenido a partir de una disolución estándar de los analitos a una concentración de 1 µg/ml. Los tiempos de retención para cada analito se muestran en el anexo B.

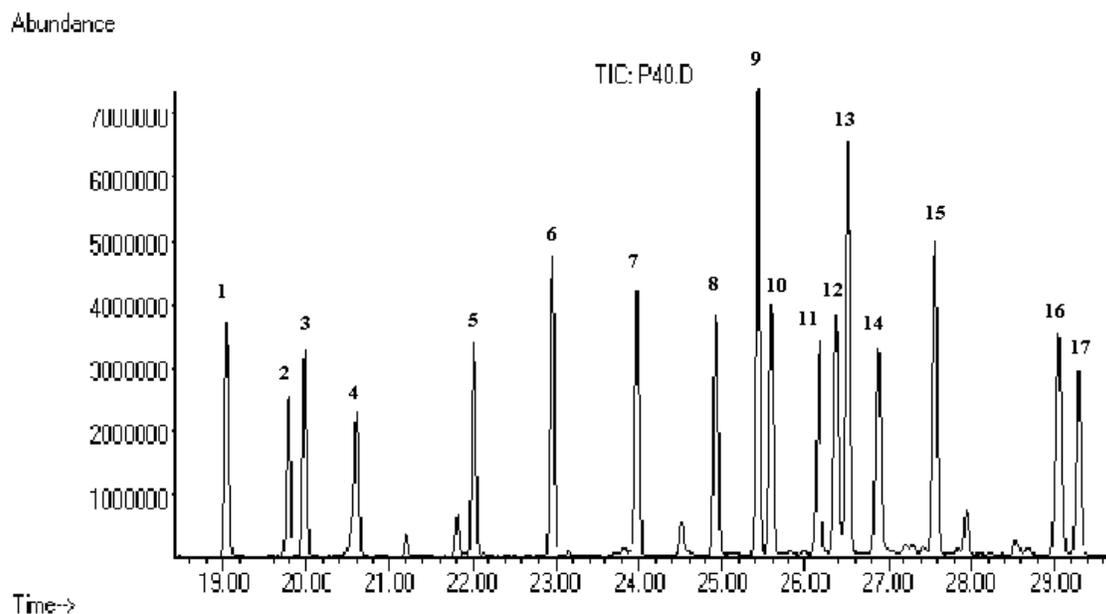


Figura 10. Cromatograma de una disolución estándar de los analitos a una concentración de 1 µg/mL. 1) α -BHC, 2) β -BHC, 3) γ -BHC, 4) δ -BHC, 5) Heptacloro, 6) Aldrin, 7) Heptacloro epóxido, 8) *a*-endosulfán, 9) DDE, 10) Dieldrin, 11) Endrin, 12) *b*-endosulfán, 13) DDD, 14) Endrin aldehído, 15) DDT, 16) Endrin cetona, 17) Metoxicloro..

La figura 11 muestra los cromatogramas extraídos por el ion de cuantificación para los compuestos coeluyentes al realizar la detección por modo SIM. Los analitos se encuentran a concentraciones similares, pudiéndose observar una diferencia significativa en los factores de respuesta. En el caso del DDD/Endosulfán sulfato, los analitos tienen diferentes iones de cuantificación así como diferente abundancia relativa, en este caso puede observarse una adecuada resolución, por lo que no hubo ningún problema para realizar la identificación individual.

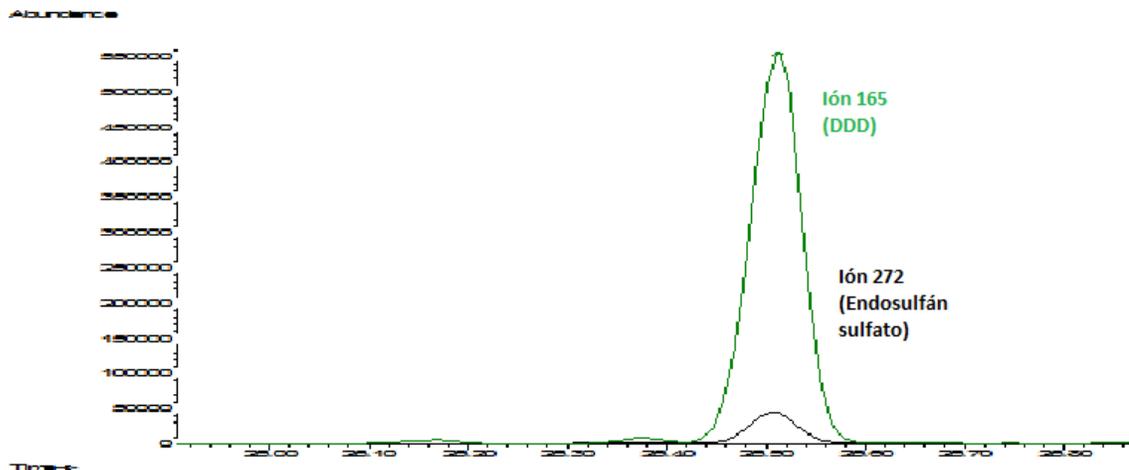


Figura 11. Cromatograma por extracción de los compuestos que coeluyen.

La identificación de los analitos se llevó a cabo utilizando los iones reportados en el método 8270C de la EPA y en los reportados en la bibliografía consultada. Los iones utilizados para la identificación de los OCP's se muestran en el anexo B.

4.2 Optimización de la SPME

4.2.1 Posición de la fibra

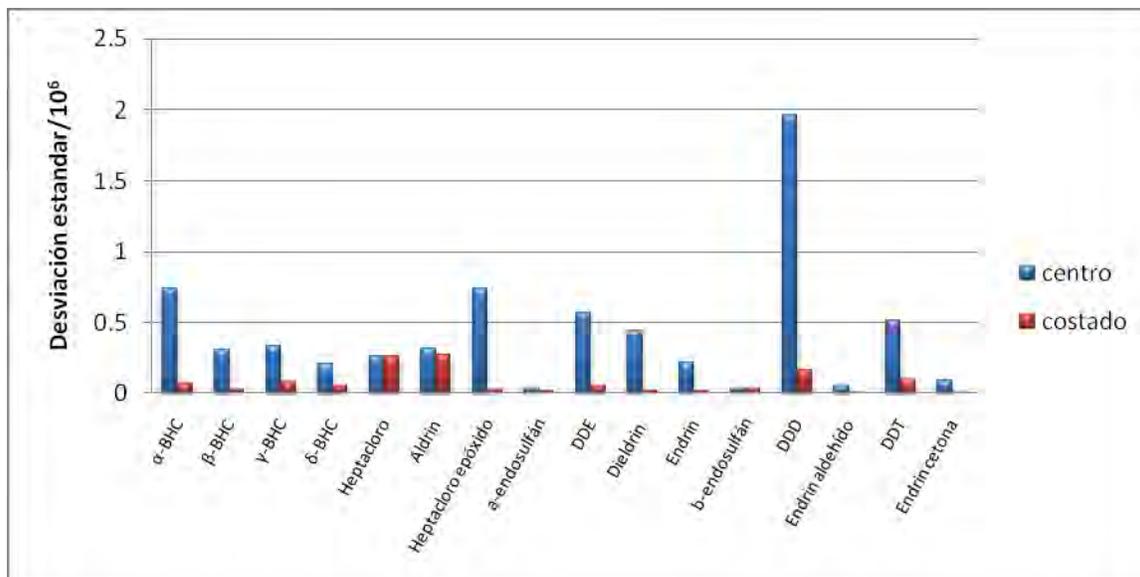


Figura 12. Efecto de la posición de la fibra en la precisión de los resultados.

Como puede observarse en la gráfica, la dispersión es sustancialmente menor cuando la fibra se coloca a un costado que en el centro del vial. Esto puede deberse a que en los costados del vial se tiene un contacto mas uniforme con la solución, debido a que la agitación provoca un vértice en cuyo centro puede tenerse una superficie de contacto variable.

4.2.2 Tiempo de extracción

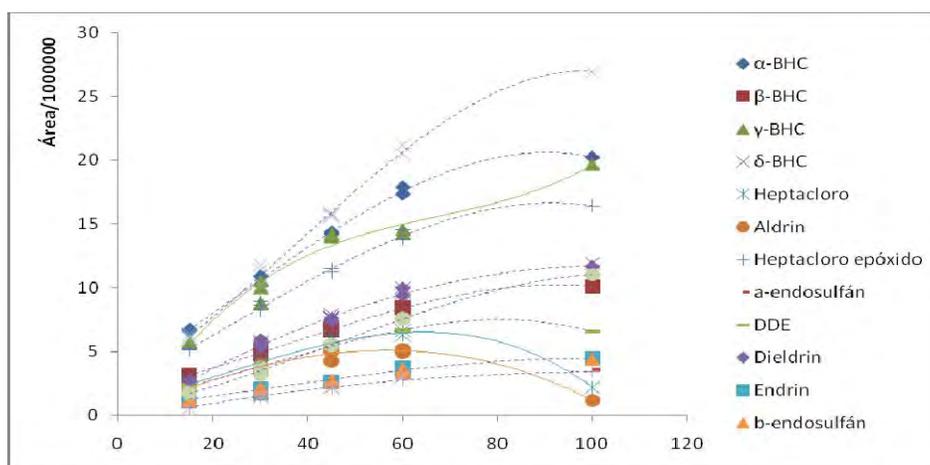


Figura 14. Perfil del tiempo de extracción de la mezcla de 18 OCP's.

En la figura 14 se observa el perfil del tiempo de extracción de los analitos, en general al incrementar el tiempo de extracción se incrementa la concentración de OCP's extraídos, con excepción del aldrin y del heptacloro que disminuyen después de 60 minutos, el γ -BHC presenta un incremento en la extracción a los 45 min, posteriormente permanece constante, incrementándose nuevamente a los 60 min.

Cuando no es posible encontrar un solo tiempo de equilibrio para todos los analitos, se puede trabajar en condiciones de pre-equilibrio, en cuyo caso se debe controlar rigurosamente el tiempo de extracción, dado que pequeñas variaciones en el mismo pueden provocar variaciones importantes en el porcentaje de analito extraído. Por lo anterior se eligió trabajar con un tiempo de extracción de 45 min.

4.2.3 Tiempo de desorción

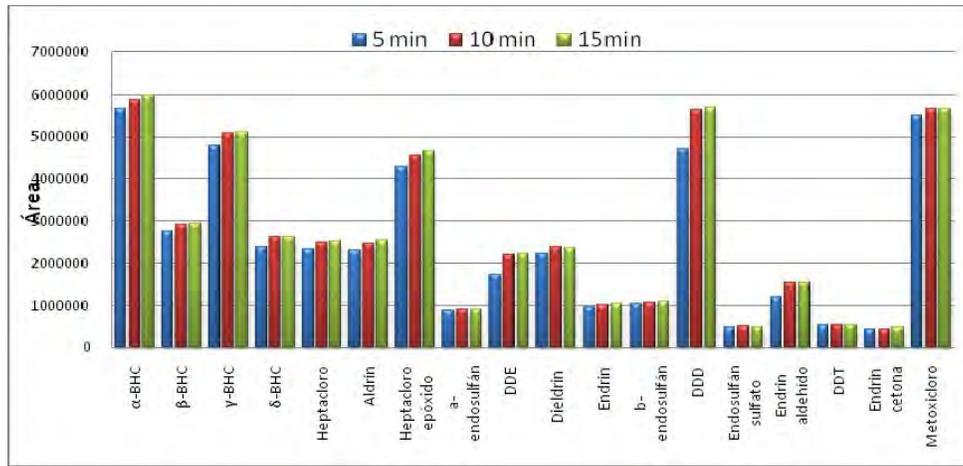


Figura 13. Efecto del tiempo de desorción.

En la figura 13 se muestran los resultados obtenidos en la determinación del tiempo de desorción óptimo de la fibra, donde se observa que 10 minutos son suficientes para desorber todos los compuestos de la fibra.

4.2.4 Velocidad de agitación

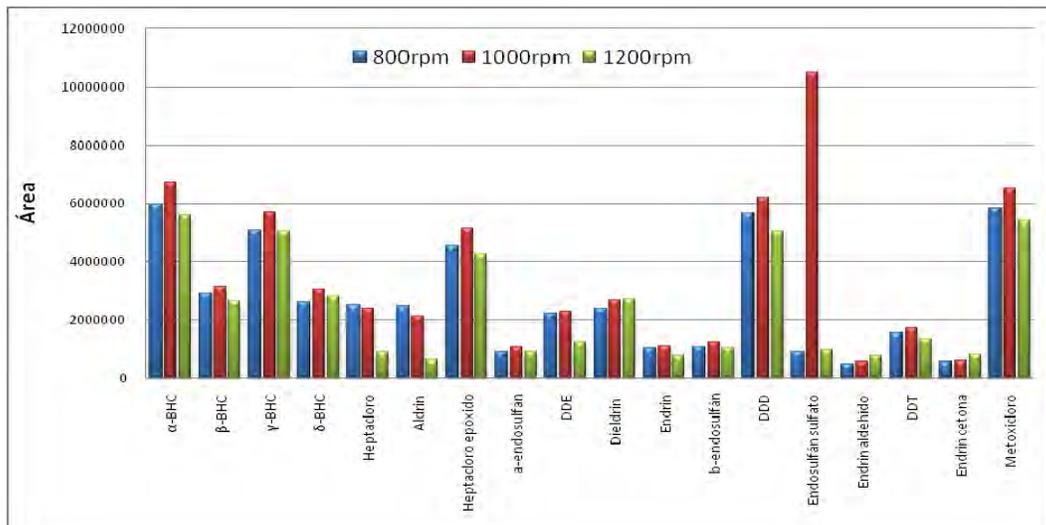


Figura 15. Efecto de la velocidad de agitación en la extracción de OCP's.

En la figura 15 se muestra el efecto de la velocidad de agitación en la extracción de OCP's, se observa que a 1000 rpm la cantidad de pesticidas extraídos es mayor que a 800rpm y que a 1200rpm. En general la agitación acelera la transferencia de los analitos hacia el polímero de la fibra. Cuando se trata de matrices líquidas compensa los bajos coeficientes de difusión de las mismas. El tiempo de equilibrio disminuye al aumentar la velocidad de agitación, pero una agitación muy rápida puede provocar falta de reproducibilidad y de precisión e incluso no permitir que los compuestos queden retenidos. Frecuentemente a velocidades altas la rotación de la barra magnética no es controlable o constante, lo que provoca cambios en las condiciones de agitación y en los tiempos de equilibrio además de provocar una baja precisión.

4.2.5 Temperatura de extracción

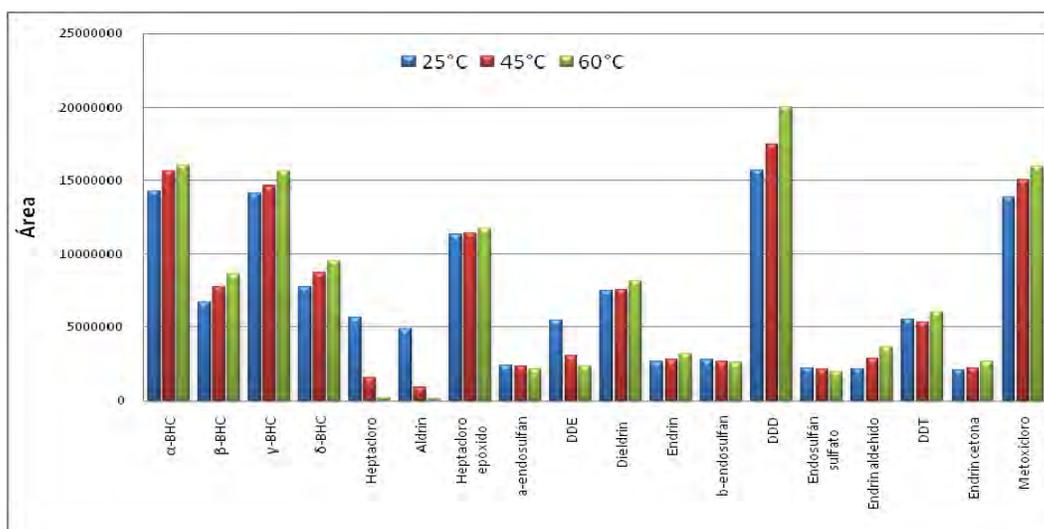


Figura 16. Efecto de la temperatura en la extracción de OCP's.

En la figura 16 se observa que para varios compuestos, al incrementar la temperatura la cantidad extraída aumenta, en los casos de heptacloro, aldrin, α -endosulfán, DDE, β -endosulfán y endosulfán sulfato, por el contrario, disminuye.

Un aumento en la temperatura de extracción provoca un incremento en la concentración de analito extraída, pero simultáneamente una disminución en la constante de distribución.

En general si en la extracción la temperatura máxima provee una buena sensibilidad se puede trabajar a esa temperatura. Por lo anterior se decidió trabajar a 25°C para que la cantidad extraída de los OCP's fuera la más adecuada.

4.3 Optimización de la EAU

4.3.1 Elección del disolvente

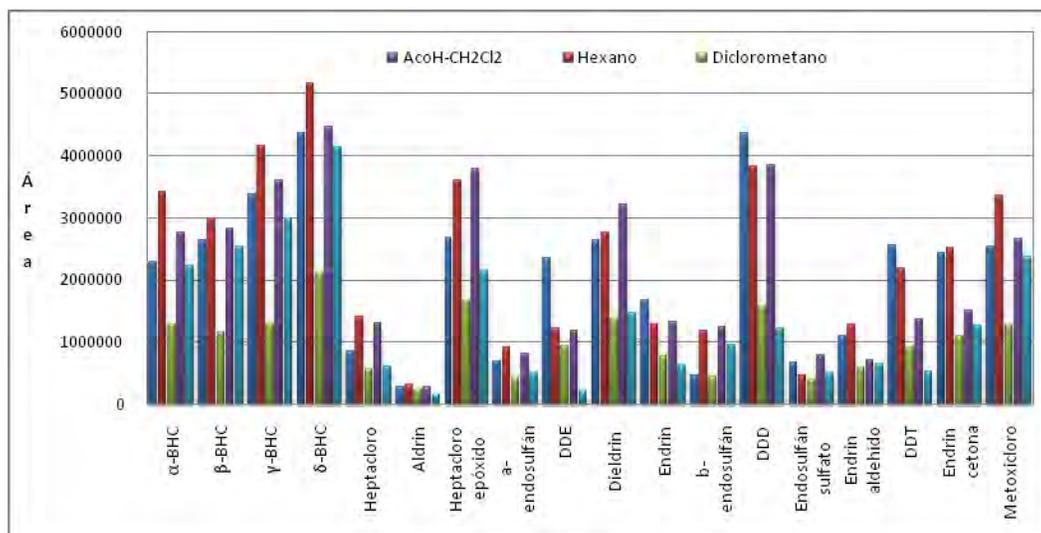


Figura 17. Efecto del disolvente en la EAU de los OCP's.

De acuerdo con los resultados la eficiencia de la extracción de la mayoría de los OCP's se ve favorecida utilizando hexano. La eficiencia del disolvente depende en gran medida de la capacidad de éste de absorber y transmitir la energía producida por el ultrasonido. Además los OCP's deben tener una alta solubilidad en el disolvente empleado, siendo éste el caso del hexano. En el caso del heptacloro epóxido y el dieldrin la mezcla de acetona-hexano fue más eficiente que el hexano sólo para extraerlos, y en el caso del DDE, DDT y DDD el metanol resultó ser el mejor disolvente. Sin embargo la mayoría de los pesticidas se extrajo mejor con hexano por lo que se decidió trabajar con este disolvente.

4.3.2 Tiempo de extracción

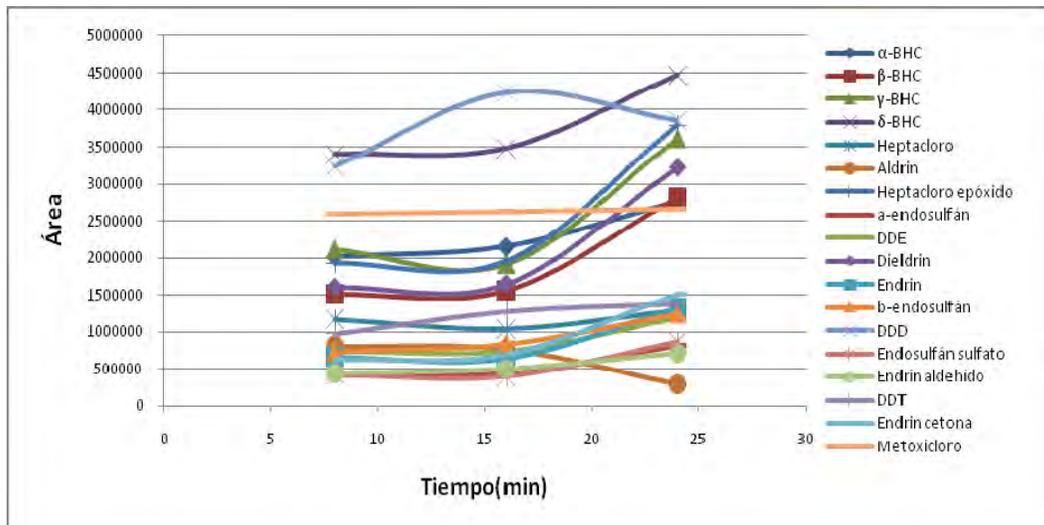


Figura 18. Perfil de tiempo de EAU de OCP's.

En la figura 18 se muestra que al aumentar el tiempo de extracción la cantidad de pesticidas extraídos aumenta. El heptacloro y el aldrin alcanzan un máximo a los 16 min y posteriormente disminuye y el metoxicloro prácticamente permanece constante. Por lo anterior se decidió trabajar con un tiempo de irradiación de 16 min.

4.3.3 Temperatura de extracción

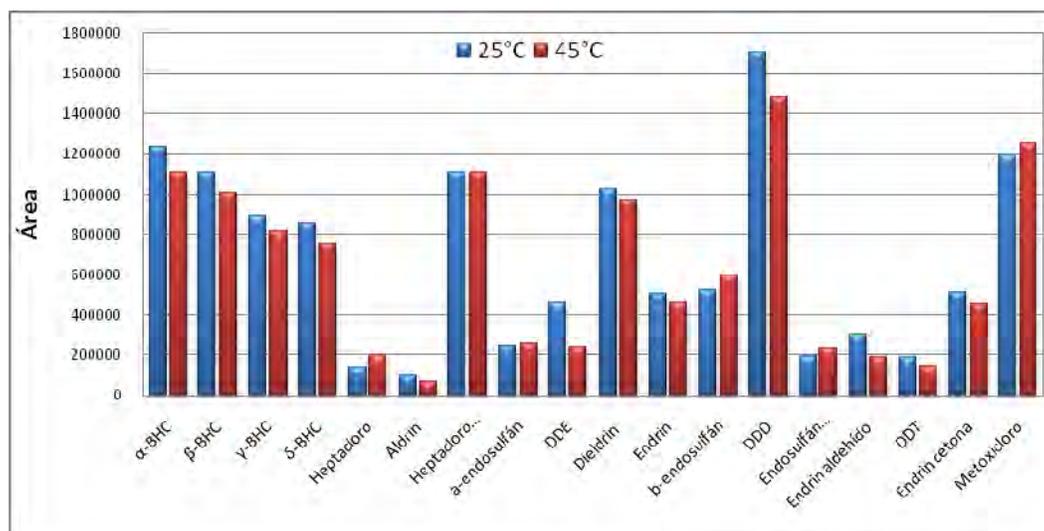


Figura 19. Efecto de la temperatura en la EAU de OCP's.

De acuerdo con los resultados experimentales un aumento en la temperatura no favorece la extracción de los OCP's, esto quizá se deba a que el aumento de temperatura en ocasiones afecta el ciclo cavitativo en el disolvente lo que hace menos eficaz la extracción. Por lo anterior se decidió trabajar a temperatura ambiente ($\approx 25^{\circ}\text{C}$).

4.4 Ensayos de recuperacion

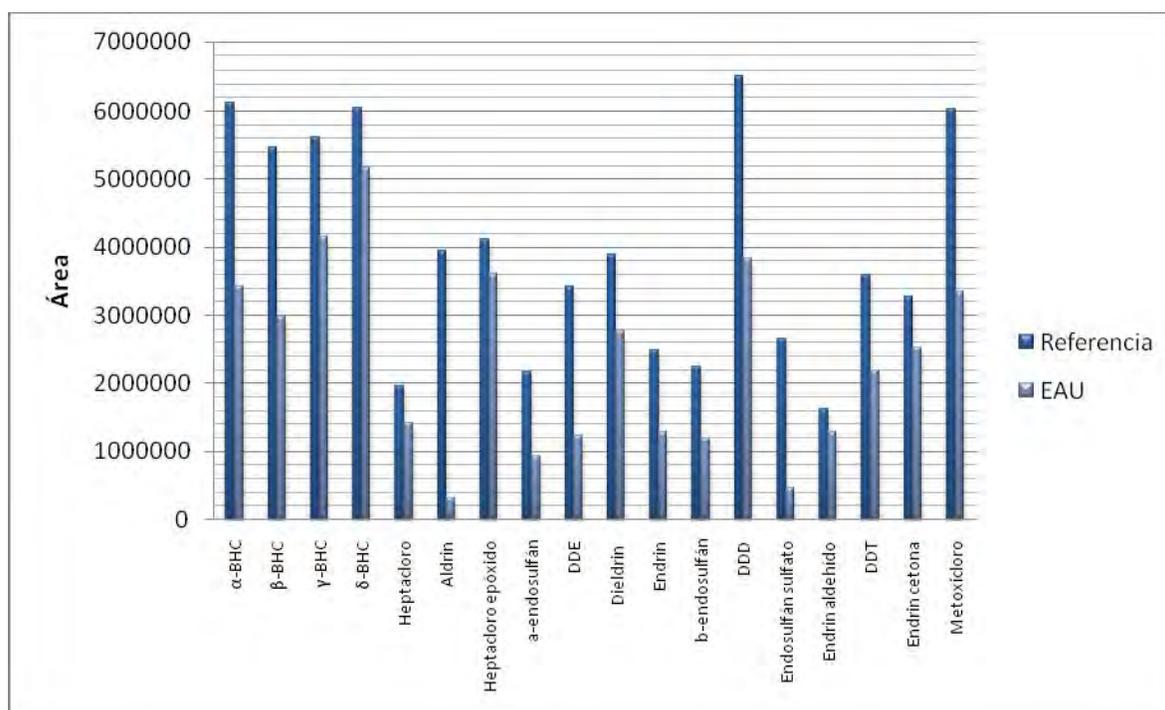


Figura 20. Recobros de los OPC's por EAU

En la figura 20 se observa el perfil de recuperación de los analitos por EAU, en la tabla se observa el porcentaje de recuperacion de los analitos. De acuerdo con estos resultados el γ -BHC, δ -BHC, heptacloro, heptacloro epóxido, dieldrin, endrin aldehído DDT y endrin cetona se encuentran por arriba de 60% que es el límite permisible para concentraciones por debajo de $0.1\mu\text{g/mL}$, el resto de los analitos se encuentran por debajo de ese límite resaltando el aldrin cuyo porcentaje es menor al 10%. Por esta razón se decidió probar otro método de extracción para lograr un mejor rendimiento, el método de eleccion fue la extracción Soxhlet.

4.5 Soxhlet

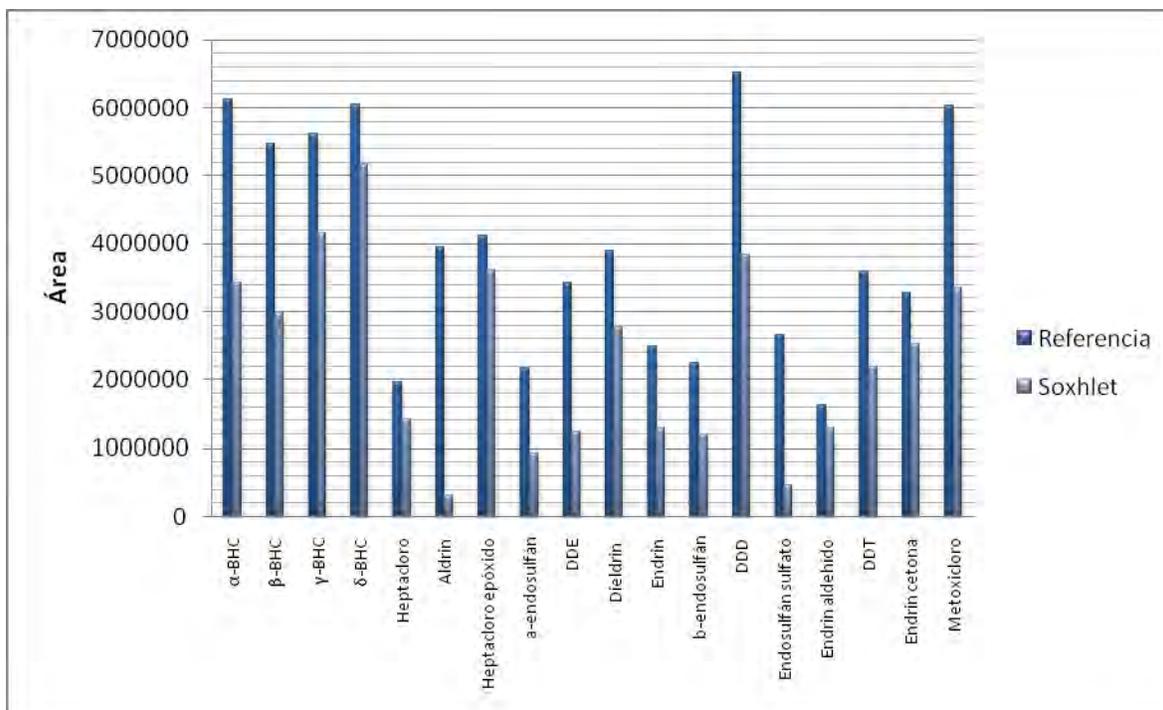


Figura 21. Recobros de los OPC's por Soxhlet

En la figura 21 se observa el perfil de recuperación de los analitos por Soxhlet, en la tabla se muestran los porcentajes de recuperación. De acuerdo con los resultados el aldrin, dieldrin, endrin, b-endosulfan, DDD, endrin aldehído y endrin cetona se encuentran por arriba de 60%.

En general se observa que con la EAU se logra una mejor precisión, con excepción del endrin, b-endosulfan y DDD cuyo coeficiente de variación (%CV) es menor cuando son extraídos con Soxhlet.

Lo anterior puede deberse a que durante la extracción con Soxhlet los tiempos de reflujo no eran constantes y eso provocó que la dispersión de los resultados fuera más grande que con la EAU.

Tabla 9. Precisión y porcentaje de recuperación de OPC's por EAU y Soxhlet.

Compuesto	% Recuperación (EAU)	%CV (EAU)	% Recuperación (Soxhlet)	%CV (Soxhlet)
<i>α-BHC</i>	56.07	8.21	43.64	9.15
<i>β-BHC</i>	54.55	7.37	58.04	7.43
<i>γ-BHC</i>	73.98	7.95	42.01	10.67
<i>δ-BHC</i>	85.52	5.67	31.63	7.17
<i>Heptacloro</i>	72.27	10.00	34.70	27.13
<i>Aldrin</i>	8.01	2.46	91.16	4.79
<i>Heptacloro epóxido</i>	87.87	8.71	21.68	9.29
<i>a-endosulfán</i>	42.66	7.53	41.79	6.49
<i>DDE</i>	35.69	14.98	48.47	18.36
<i>Dieldrin</i>	71.05	11.46	81.10	11.39
<i>Endrin</i>	51.49	10.41	64.67	7.06
<i>b-endosulfán</i>	53.17	12.09	70.17	3.97
<i>DDD</i>	58.83	20.18	79.52	14.40
<i>Endosulfán sulfato</i>	17.25	12.71	38.59	11.28
<i>Endrin aldehído</i>	79.56	21.70	67.21	20.46
<i>DDT</i>	60.77	8.35	40.74	9.68
<i>Endrin cetona</i>	76.98	4.58	90.76	6.35
<i>Metoxicloro.</i>	55.56	8.62	39.11	9.56

5. CONCLUSIONES

- El gradiente de temperatura del cromatógrafo de gases y las relaciones m/z seleccionadas para cada analito permiten la adecuada discriminación entre sus respuestas en un tiempo no mayor a 40 minutos.
- Se desarrolló y optimizó la SPME de OPC's, el procedimiento reporta una buena precisión (CV< 10%).
- Se desarrollo y optimizo la extracción en conjunto de los analitos de muestras de sangre enriquecidas mediante la técnica de EAU.
- Al evaluar en conjunto las eficiencias de extracción de los diversos grupos de compuestos, la EAU es más eficiente para extraer los compuestos α -BHC, δ -BHC, γ -BHC, heptacloro, heptacloro epóxido, endrin aldehído, DDT y metoxicloro, el Soxhlet es más eficiente para extraer el aldrin, DDE, dieldrin, endrin, b-endosulfán, DDD, endosulfán sulfato y endrin cetona, y para el β -BHC y a-endosulfán no hay una diferencia sustancial entre los métodos.
- Los porcentajes de recobro del método por EAU son adecuados para la extracción de γ -BHC, δ -BHC, heptacloro, heptacloro epoxido, dieldrin, endrin aldehido DDT y endrin cetona debido a que estan arriba de 60%.
- Los porcentajes de recobro por Soxhlet son adecuados para el aldrin, dieldrin, endrin, b-endosulfan, DDD, endrin aldehido y endrin cetona debido a que se encuentran por arriba de 60%.
- Cabe añadir que estos resultados son parte de un estudio preeliminar para el analisis de OPC's de muestras de sangre, por lo que es necesario hacer un estudio más prolongado para mejorar los parámetros de recobro y precisión, debido a que los obtenidos no son adecuados para realizar un análisis confiable, además de que la validación completa del metodo demostrará si es consistente.

6. REFERENCIAS

1. Gillette E., et. al. (1998). An Anthropological Approach to the Evaluation of Preschool Children Exposed to Pesticides in Mexico. *Environmental Health Perspectives*. 106:347-354.
2. Hernandez F., et. al. (2002). Head space solid-phase microextraction in combination with gas chromatography and tandem mass spectrometry for the determination of organochlorine and organophosphorus pesticides in whole human blood. *J. of chromatogr. B*, 769, 65-77.
3. Lopez F., et. al. (2001). Gas chromatographic determination of organochlorine and organophosphorus pesticides in human fluids using solid phase microextraction. *Analytica Chimica Acta*, 433, 217-226.
4. Sirvas K., et. al. (2008). Ultrasonication followed by single-drop microextraction combined with GC/MS for rapid determination of organochlorine pesticides from fish. *J. of Sep. Sci.*, 31, 380-386.
5. Perez-Trujillo J. et. al. (2002). Comparison of different coatings in solid phase microextraction for the determination of organochlorine pesticides in ground water. *J. Chromatogr. A.*, 963, 95-105.
6. Beceiro-Gonzalez E., et. al. (2007). Optimization and validation of a **solid** phase microextraction method for simultaneous determination of different types of pesticides in water by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.*, 1141, 165-173.
7. Martinez-Perreño M., et. al. (2008). Analysis of 51 persistent organic pollutants in soil by means of ultrasonic solvent extraction and stir bar sorptive extraction GC-MS. *J. Sep. Sci.*, 31, 3620-3629.
8. Waliszewski A. et. al. (2001). Organochlorine pesticide levels in maternal adipose tissue, maternal blood serum, umbilical blood serum, and milk from inhabitants of Veracruz, Mexico. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 40, 432-438.
9. Gudrun K., et. al. (2009). Organochlorine and heavy metals in new borns: Results from the Flemish Environment and Health Survey (FLEHS 2002-2006). *Environment International*, 35, 1015-1022.

10. Pawliszyng, J. (1997). Solid phase microextraction: Theory and Practice. Wiley-VHC. N,Y 1997.
11. Castillo A. (2009). Identificación y cuantificación de PPCP's en aguas residuales por microextracción en fase solida-cromatografía de gases-espectrometría de masas (SPME-GC-MS), Tesis de Licenciatura, UNAM.
12. Hernández I. (2005). Pesticidas organoclorados en el agua de los canales de Xochimilco. Tesis de Licenciatura, UNAM.
13. Álvarez P. (2010). Evaluación de tres métodos de extracción de hidrocarburos aromáticos policíclicos y plaguicidas en muestras de sedimento. Tesis de Maestría, UNAM.
14. Costa, L.G., et. al. (1987). Toxicology of pesticides: Experimental, clinical and regulatory perspectives. Springer-Verlag, Berlin.
15. Shepard, H.H. (1939). The chemistry and toxicology of insecticides. Burgess Publ. Co., Minneapolis.
16. Bowler, P.J. (1992). The fontana history of the environmental sciences. Harper Collins Publishers. Londres.
17. Heath, R.G., et. al. (1969). Marked DDE impairment of mallard reproduction in controlled studies. Nature 224, 47-48
18. Angus, W. (1992). The dead of Ramón Gonzalez The Modern Agricultural Dilema. University of Texas Press. Austin.
19. CICOPLAFEST, 2004. www.sagarpa.gob.mx/cicoplafest/
20. Bert L., et. al. (1997). The Standard Pesticide User's guide. Prentice-Hall.
21. Ware, G. C. (1983). Pesticide theory and application. W. H. Freeman and Company, San Francisco.
22. Colborn, T., et. al. (1992). Chemically induced alterations in sexual and functional development: the wildlife/human connection. Pricenton, NJ: Pricenton Scientific Publishing.
23. Ahmed, F. E. (2001). Analyses of pesticides and their metabolites in foods and drinks. Trends Anal. Chem., 20:649.
24. Kaloyanova, F. (1991). Human toxicology of pesticides. CRC Press. Boca raton, Florida.

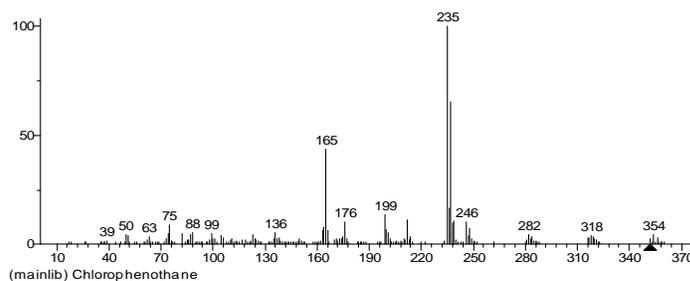
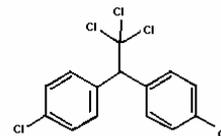
25. Cornell University (2008). Toxicity of pesticides. Pesticides fact sheets and tutorial, module 4. Pesticide Safety Education Program. (www.extension.org/pages/Toxicityofpesticides).
26. Torres-Sepúlveda M., et. al. (2008). Tamiz metabólico neonatal por espectrometría de masas en tándem: dos años de experiencia en Nuevo León, México. *Salud pública de México*, 60, 200-206.
27. Aprea C., et. al. (2002). Biological monitoring of pesticide exposure: a review of analytical methods. *J. Chromatogr. B.*, **769**, 191-219.
28. Barr D., et. al. (2002). Analytical monitoring of exposure to pesticides: a review. *J. Chromatogr. B.*, 778, 5-29.
29. Méndez, J.M.R. (2004). Análisis de pesticidas en espinaca por cromatografía de gases/espectrometría de masas. Tesis Licenciatura. UNAM Facultad de Química. México D.F.
30. Herbert, H.H. (1992). *Detectors for Capillary Chromatography*. Chemical Analysis Series, John Wiley and Sons. 121.
31. McNair. (1981) *Cromatografía de Gases*. Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos. Washington.
32. Bruce, A.T. et. al. (2002) Determination of organochlorine pesticides in ground water using solid-phase microextraction followed by dual-column gas chromatography with electron-capture detection. *J. of Chromatogr. A*, 964, 21-33.
33. Boussahel R., et. al. (2002) Determination of chlorinated pesticides in water by SPME/GC. *Water Research* (2002) 36, 1909-1911.
34. Louch D., et. al. (1992). Dynamics of Organic Compound Extraction from Water Using Liquid-Coated Fused Silica Fibers. *Anal. Chem.* 64, 1187-1199.
35. Beltrán J., et. al. (2000). Solid-phase microextraction in pesticide residue analysis, *J. of Chromatogr. A*, 885, 389-404.
36. Zhang Z., et. al. (1994). A New Solvent-Free Alternative for Sample Preparation. *Anal. Chem.* 66, 844A-853A.
37. Arthur C., et. al. (1990). Solid Phase Microextraction with Thermal Desorption Using Fused Silica Optical Fibers. *Anal. Chem.* **62**, 2145-2148.

- 
38. Alejandra, M.P.H. (2002). Aplicación de la microextracción en fase sólida el análisis medio ambiental. Tesis de doctorado. México DF.
 39. Luque de Castro M.D., Priego Capote F. (2007). Analytical applications of ultrasound. Techniques and instrumentation in analytical chemistry, Vol. 26, Elsevier.
 40. Manson T., et. al. (2002). Applied sonochemistry. The uses of power ultrasound in chemistry and processing. Wiley-VHC. Pp. 25-29.
 41. Kennet S., et. al. (1999). Acoustic cavitation and its chemical consequences. Philosophical Transactions of the Royal Society A, 1-21.
 42. Basheer C., et. al. (2004). Development and application of polymer-coated hollow fiber membrane microextraction to the determination of organochlorine pesticides in water. J. of Chromatogr. A, 1033, 213-220.
 43. Shrivastava K., Wu HF. (2008). Ultrasonication followed by single-drop microextraction combined with GC/MS for rapid determination of organochlorine pesticides from fish. J. Sep. Sci., 2, 380-386.

Anexo A. Características de los estándares de los pesticidas

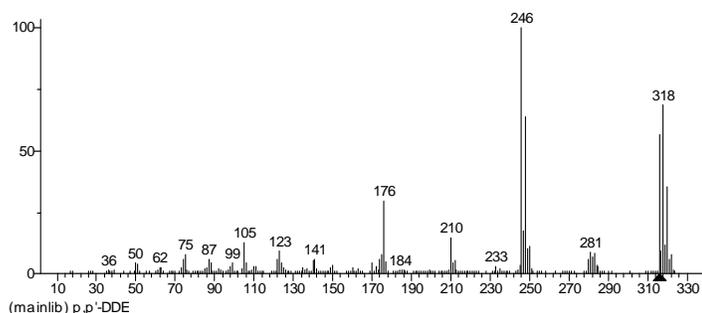
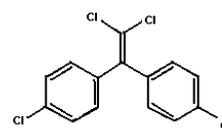
P,P'-DDT (1,1,1-Tricloro-2,2-bis(p-clorofenil)etano; bovidermol; zeidano; didimac; p,p'-diclorodifeniltricloroetano y agritan).

- Fórmula: $C_{14}H_9Cl_5$
- Peso molecular: 354.49 g/mol
- Punto de fusión: 108.5 °C
- Punto de ebullición: 260 °C
- Solubilidad en agua: 0.0055 mg/L 25 °C
ligeramente soluble 1.7×10^{-7} g/100 mL
- Presión de vapor: 1.6E-7 mm Hg 20 °C
- Número CAS: 000050-29-3



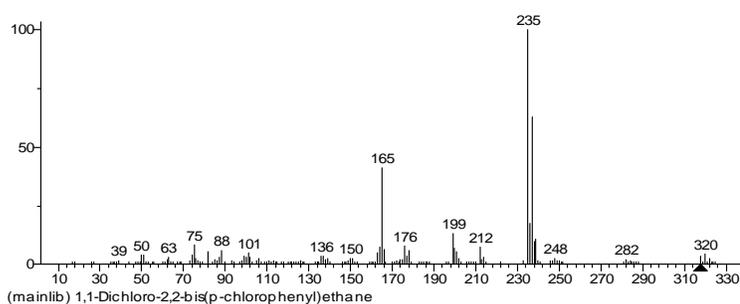
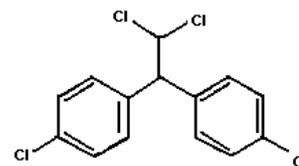
P,P'-DDE (1,1-dicloro-2,2-bis(p-clorofenil)etileno; y 4,4'-DDE; diclorodifenildicloro- etileno).

- Fórmula: $C_{14}H_8Cl_4$
- Peso molecular: 318.03 g/mol
- Punto de fusión: 89 °C
- Punto de ebullición: 336 °C
- Solubilidad en agua: 0.04 mg/L 25 °C
- Presión de vapor: 6E-6 mm Hg 25 °C
- Número CAS: 000072-55-9



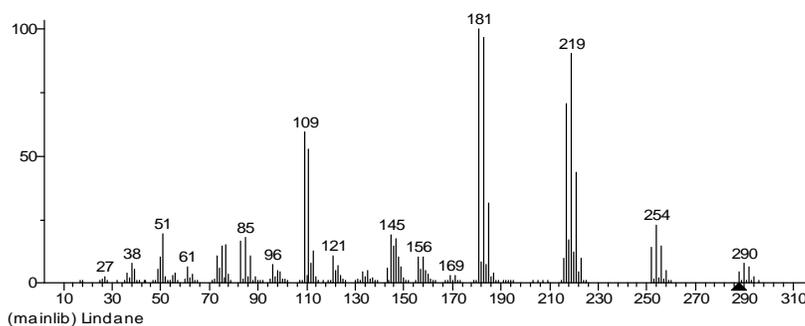
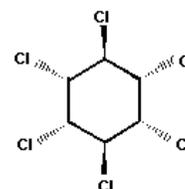
P,P'-DDD (2,2-bis-(4-clorofenil)-1,1-dicloroetan; me-1700; oms 1078; rhothane D-3; rotano; TDE; y tetraclorodifeniletano).

- Fórmula: $C_{14}H_{10}Cl_4$
- Peso molecular: 320.05 g/mol
- Punto de fusión: 109.5 °C
- Punto de ebullición: 350 °C
- Solubilidad en agua: 0.09 mg/L 25 °C
- Presión de vapor: 1.35E-6 mm Hg 25 °C
- Número CAS: 000072-54-8



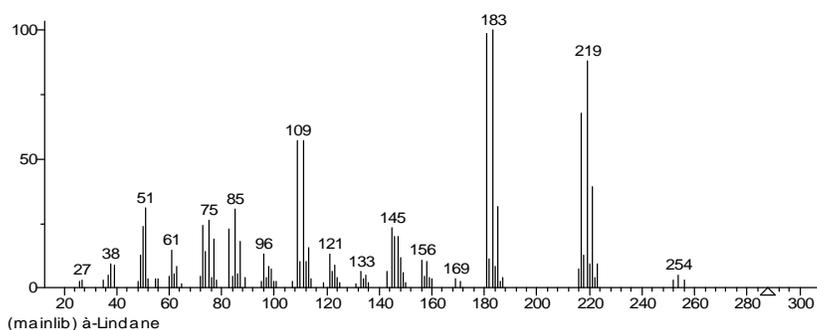
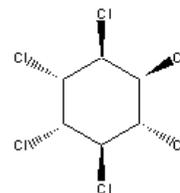
Lindano (α -BHC γ -hexacloran; γ -HCH; Bentox 10; BBH; devorán; y vitón).

- Fórmula: $C_6H_6Cl_6$
- Peso molecular: 290.83 g/mol
- Punto de fusión: 112.5 °C
- Punto de ebullición: 323.4 °C
- Solubilidad en agua: 7.3 mg/L 25 °C
- Descompone: 0.00073 g/100 mL
- Presión de vapor: 4.2E-5 mm Hg 20 °C
- Número CAS: 000058-89-9



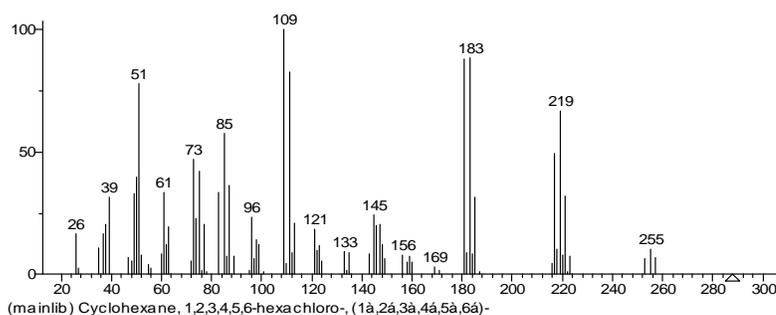
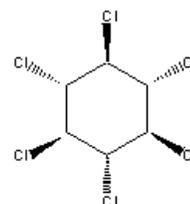
β -BHC (β -HCH; β -Hexaclorociclohexano; y β -lindano).

- Fórmula: $C_6H_6Cl_6$
- Peso molecular: 290.83 g/mol
- Punto de fusión: 159.5 °C
- Punto de ebullición: 288 °C
- Solubilidad en agua: 2 mg/L 25 °C
- Presión de vapor: 4.5E-5 mm Hg 25 °C
- Número CAS: 000319-84-6



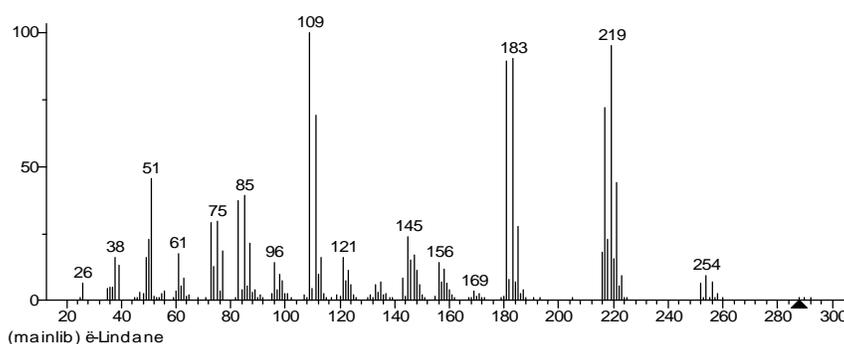
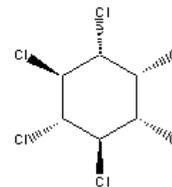
δ -BHC (δ -HCH; Hexaclorociclohexano; y δ -BHC).

- Fórmula: $C_6H_6Cl_6$
- Peso molecular: 290.83 g/mol
- Punto de fusión: 314.5 °C
- Punto de ebullición: 60 °C a 5.80E-01 mm Hg
- Solubilidad en agua: 0.24 mg/L 25 °C
- Presión de vapor: 3.6E-7 mm Hg 25 °C
- Número CAS: 000319-85-7



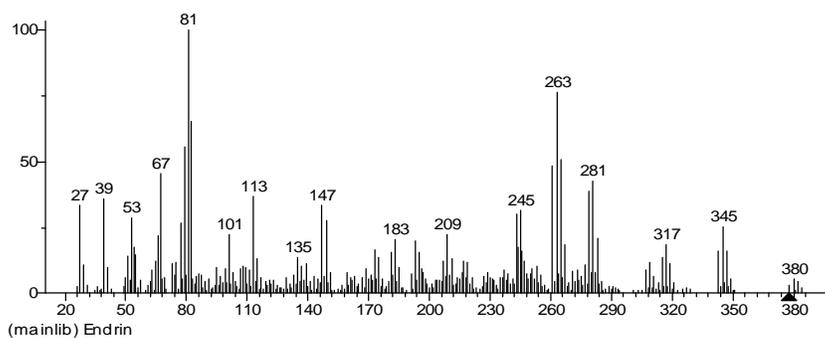
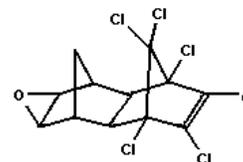
γ -BHC (-1,2,3,4,5,6-hexaclorociclohexano; γ -HCH; y γ -lindano).

- Fórmula: $C_6H_6Cl_6$
- Peso molecular: 290.83 g/mol
- Punto de fusión: 141.5 °C
- Punto de ebullición: 60 °C a 3.40E-01 mm Hg
- Solubilidad en agua: 10 mg/L 20 °C
- Presión de vapor: 3.52E-5 mm Hg 25 °C
- Número CAS: 000319-86-8



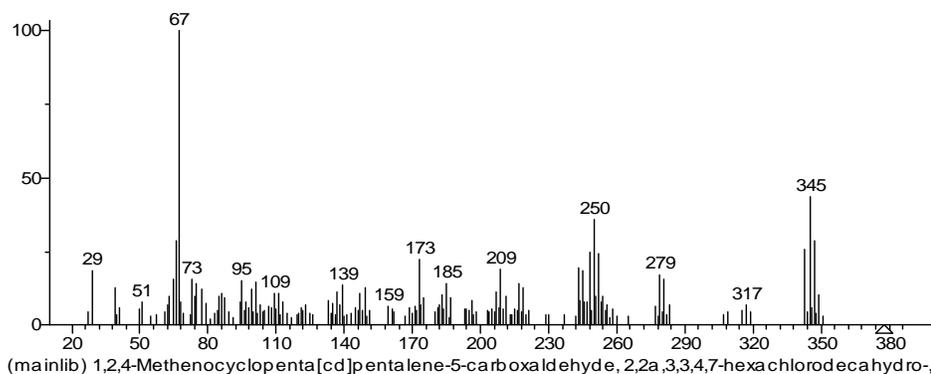
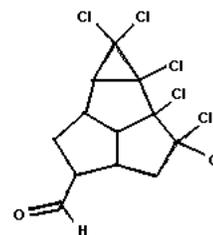
Endrin (Endrex; Hexadrin; Mendrin; Nendrin; y oms 197).

- Fórmula: $C_{12}H_8Cl_6O$
- Peso molecular: 380.91 g/mol
- Punto de fusión: 226-230 °C
- Punto de ebullición: 245 (descompone)
- Solubilidad en agua: 0.25 mg/L 25 °C
- Presión de vapor: 3E-6 mm Hg 20 °C
- Número CAS: 000072-20-8



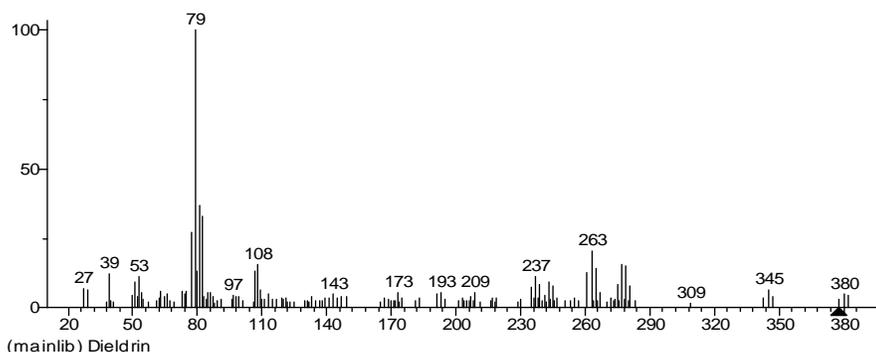
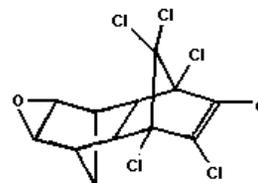
Endrin aldehído

- Fórmula: $C_{12}H_{10}Cl_6O$
- Peso molecular: 382.9284 g/mol
- Punto de ebullición: 65°C
- Solubilidad en agua: 100%
- Número CAS: 7421-93-4



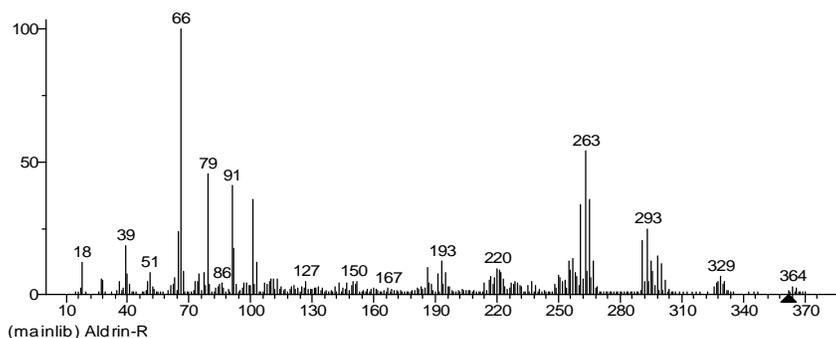
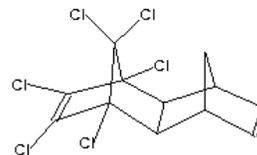
Dieldrin (aldrin epóxido; Alvit; compuesto 497; Oxralox; y Quintox).

- Fórmula: $C_{12}H_8Cl_6O$
- Peso molecular: 380.91 g/mol
- Punto de fusión: 175.5 °C
- Punto de ebullición: 330 °C
- Solubilidad en agua: 0.195 mg/L 25 °C
- Presión de vapor: 5.89E-6 mm Hg 25 °C
- Número CAS: 000060-57-1



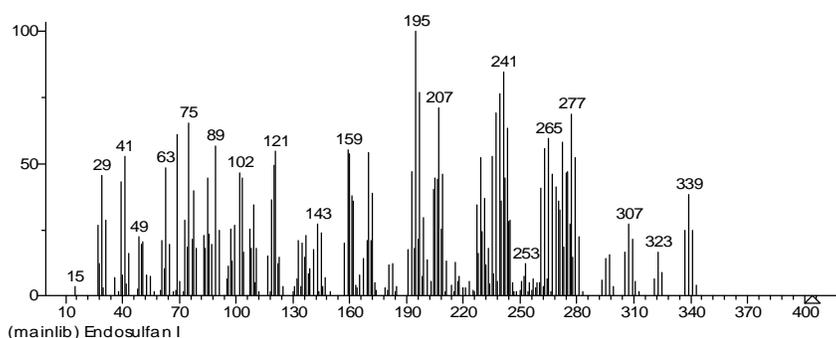
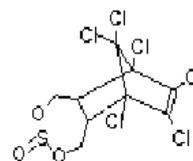
Aldrin (Sedrin; Aldrin-R; Aldrite; OMS-194; y compuesto 118).

- Fórmula: $C_{12}H_8Cl_6$
- Peso molecular: 364.92 g/mol
- Punto de fusión: 104 °C
- Punto de ebullición: 145 °C a 2 mm Hg
- Solubilidad en agua: 0.017 mg/L 25 °C
- Presión de vapor: 1.2E-4 mm Hg 25 °C
- Número CAS: 000309-00-2



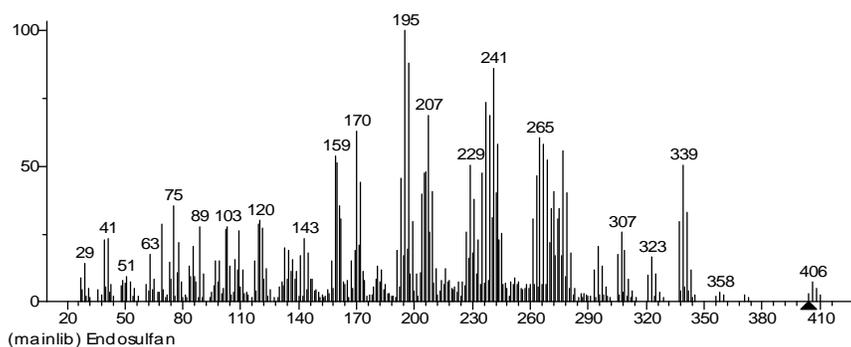
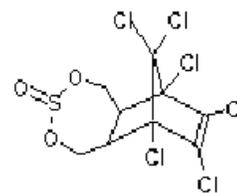
a-endosulfán (Tiodan; Malix; BIO 5462; Benzoepin; ciclodán; endocel; oms 570; tionex; y tiosulfán).

- Fórmula: $C_9H_6Cl_6O_3S$
- Peso molecular: 406.93 g/mol
- Punto de fusión: 106 °C
- Solubilidad en agua: 0.325 mg/L 22 °C
- Presión de vapor: 1.73E-7 mm Hg 25 °C
- Número CAS: 000115-29-7



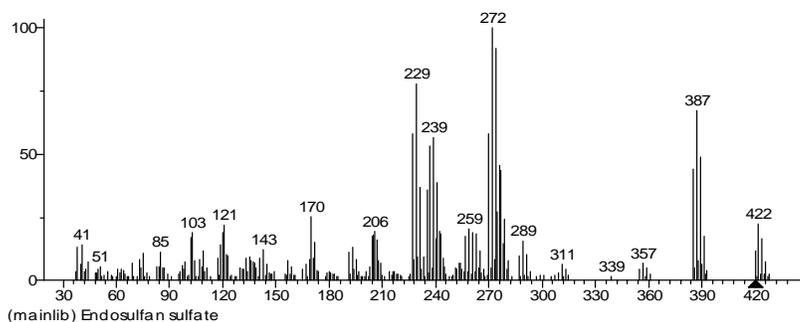
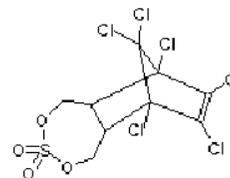
b-endosulfán (endosulfán 2; sulfito cíclico; y tiodán II).

- Fórmula: $C_9H_6Cl_6O_3S$
- Peso molecular: 406.9226 g/mol
- Punto de fusión: 207 °C
- Punto de ebullición: 390 °C
- Solubilidad en agua: insoluble 2.8×10^{-5} g/100 mL
- Número CAS: 33213-65-9



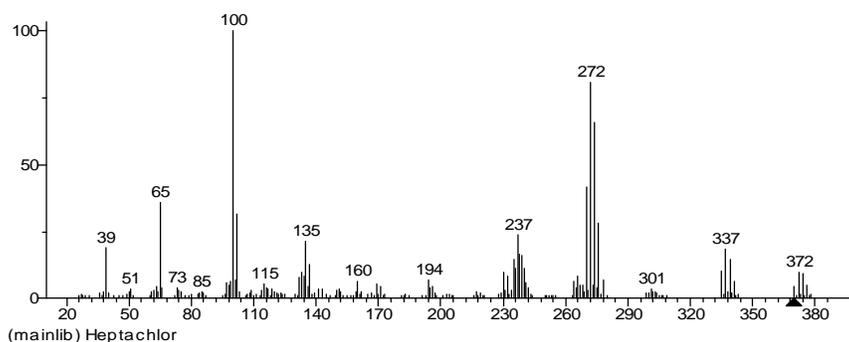
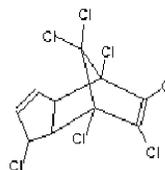
Endosulfán sulfato (Tiodan sulfato).

- Fórmula: $C_9H_6Cl_6O_4S$
- Peso molecular: 422.93 g/mol
- Punto de fusión: 181-182 °C
- Punto de ebullición: 200 °C
- Solubilidad en agua: 0.48 mg/L 20 °C
- Presión de vapor: 2.8×10^{-7} mm Hg 25 °C
- Número CAS: 001031-07-8



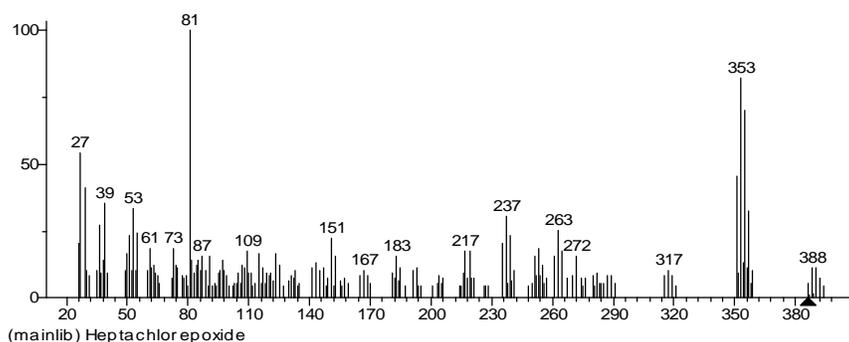
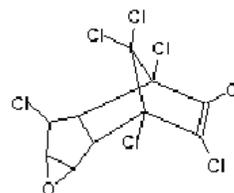
Heptacloro (3-Cloroclordano; drinox H-34; E 3314; y Heptamul).

- Fórmula: $C_{10}H_5Cl_7$
- Peso molecular: 373.32 g/mol
- Punto de fusión: 95.5 °C
- Punto de ebullición: 310 °C
- Solubilidad en agua: 0.18 mg/L 25 °C
- Presión de vapor: 4E-4 mm Hg 25 °C
- Número CAS: 000076-44-8



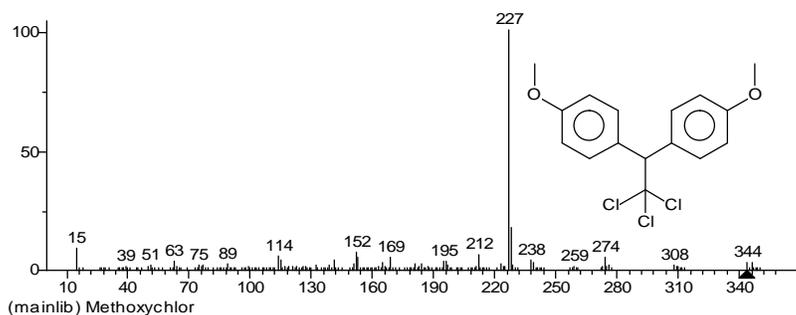
Heptacloro epóxido (epoxiheptacloro; y velsicol 53-cs-17).

- Fórmula: $C_{10}H_5Cl_7O$
- Peso molecular: 389.3199 g/mol
- Punto de fusión: 160 °C
- Punto de ebullición: 200 °C
- Solubilidad en agua: 0.2 mg/L 25 °C
- Presión de vapor: 1.95E-5 mm Hg 30 °C
- Número CAS: 001024-57-3



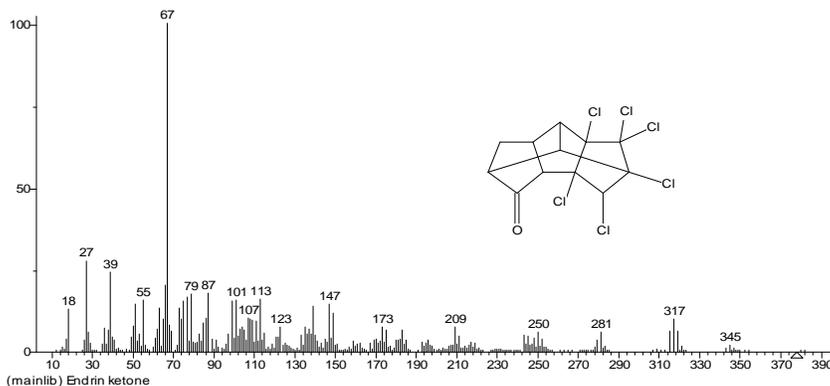
Metoxicloro (Bis(4-metoxibenceno) de 1,1-(2,2,2-tricloroetilo), 1,1,1-Tricloro-2,2-bis(p-metoxifenil)etano)

- Formula: $C_{16}H_{15}Cl_3O_2$
- Peso molecular: 344 g/mol
- Punto de fusión: 89°C
- Densidad: 1.4 g/cm³
- Solubilidad en agua: ninguna
- Presión de vapor, Pa: muy bajo
- Coeficiente de reparto octanol/agua como log Pow: 4.68-5.08
- Numero CAS: 72-43-5



Endrin Cetona

- Formula: $C_{12}H_8Cl_6O$
- Peso molecular: 378
- Descomposición por debajo del punto de ebullición a 245 °C.
- Punto de fusión: 200°C
- Densidad: 1,7
- Solubilidad en agua: g/100 ml a 25°C
- Presión de vapor (Pa a 25°C): despreciable.
- Numero de CAS: 53494-70-5



**ANEXO B. Tiempo de retención (tr) y relación masa carga (m/z)
para la identificación de OPC's**

Compuesto	tr (min)	m/z
<i>α-BHC</i>	19.04	183, 219, 181
<i>β-BHC</i>	19.779	183, 219, 181
<i>γ-BHC</i>	19.978	183, 219, 181
<i>δ-BHC</i>	20.609	183, 219, 181
<i>Heptacloro</i>	22.003	100, 272
<i>Aldrin</i>	22.949	66, 263
<i>Heptacloro epóxido</i>	24.095	81, 353
<i>a-endosulfán</i>	24.917	195, 339
<i>DDE</i>	25.419	79, 246
<i>Dieldrin</i>	25.579	246, 318
<i>Endrin</i>	26.143	81, 263
<i>b-endosulfán</i>	26.358	195, 241
<i>DDD</i>	26.48	235, 165
Endosulfán sulfato	26.48	272, 387
<i>Endrin aldehído</i>	26.854	67, 345
<i>DDT</i>	27.552	165, 235
<i>Endrin cetona</i>	29.026	67, 317
<i>Metoxicloro.</i>	29.35	227, 274