



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

**ANÁLISIS DE PESTICIDAS ORGANOFOSFORADOS EN MUESTRAS BIOLÓGICAS POR
MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA (SPME) Y CROMATOGRAFÍA DE GASES
ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS (GC-MS)**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO

PRESENTA

Roberto Antonio Mejía Esquivel



CIUDAD UNIVERSITARIA, CD.MX.

Enero 2017



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: FRANCISCO ROJO CALLEJAS
VOCAL: JOSEFINA ELIZALDE TORRES
SECRETARIO: SILVIA CITLALLI GAMA GONZALEZ
1er. SUPLENTE: ALLAN NOE DOMINGUEZ ROMERO
2° SUPLENTE: ELIZABETH REYES LOPEZ

Esta tesis fue realizada en el Laboratorio 102 del Departamento de Química Analítica de la División de Estudios de Posgrado, Edificio B, Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México.

ASESOR DEL TEMA: M. EN C. FRANCISCO ROJO CALLEJAS

SUSTENTANTE: ROBERTO ANTONIO MEJÍA ESQUIVEL

CONTENIDO

1. RESUMEN.....	1
1.1 INTRODUCCIÓN.....	1
2. OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN.....	2
2.1 Objetivo General.....	2
2.2 Objetivos particulares.....	2
2.3 Justificación.....	2
3. ANTECEDENTES.....	3
3.1 Pesticidas.....	3
3.1.1 Historia.....	3
3.1.2 Clasificación.....	4
3.1.3 Contaminación por pesticidas.....	6
3.2 Pesticidas organofosforados.....	8
3.2.1 Generalidades.....	8
3.2.2 Características fisico-químicas.....	8
3.2.3 Legislación sobre pesticidas en México.....	10
3.2.4 Usos.....	11
3.2.5 Metabolismo.....	12
3.2.6 Efectos en la salud humana.....	12
3.2.7 Análisis de plaguicidas.....	13
3.3 Microextracción en fase sólida (SPME).....	15
3.3.1 Fundamentos de la técnica.....	15
3.3.2 Tipos de extracción.....	16
3.3.3 Fibras.....	18
3.3.4 Procedimiento.....	20
3.3.5 Optimización del proceso de Micro-extracción en fase sólida.....	21
3.3.6 Análisis de pesticidas organofosforados.....	23
3.4 Tamiz neonatal y muestras de sangre.....	25
3.5 Cromatografía de gases-Espectrometría de masas (CG/EM).....	27
4. DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	30
4.1 Reactivos, materiales y equipos.....	30
4.1.1 Reactivos.....	30
4.1.2 Materiales.....	30
4.1.3 Equipos.....	31
4.2 Preparación de las disoluciones.....	31
4.3 Preparación de muestras de sangre enriquecidas.....	31
4.4 Condiciones cromatográficas.....	32

4.5 Condiciones óptimas de extracción.....	32
4.5.1 SPME, selección de la fibra y velocidad de agitación.....	33
4.5.2 Temperatura de extracción.....	34
4.5.3 Tiempo de extracción.....	34
4.5.4 Tiempo de desorción.....	34
4.6 Evaluación de parámetros estadísticos y validación del método.....	34
4.6.1 Linealidad.....	34
4.6.2 Limite de detección y de cuantificación.....	34
4.6.3 Recobro.....	35
4.6.4 Evaluación de la repetibilidad.....	36
4.6.5 Reproducibilidad intermedia.....	36
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	37
5.1 Método cromatográfico y separación de los compuestos.....	37
5.2 Optimización de los parámetros para las microextracciones SPME.....	38
5.2.1 Optimización de la velocidad de agitación.....	39
5.2.2 Optimización de la temperatura de extracción.....	41
5.2.3 Optimización del tiempo de extracción.....	43
5.2.4 Optimización del tiempo de desorción.....	45
5.3 Procedimiento optimizado.....	47
5.4 Intervalo lineal.....	49
5.5 Curvas de calibración.....	49
5.6 Sensibilidad del método y límites de detección.....	49
5.7 Cuantificación de las extracciones.....	51
5.8 Evaluación de la repetibilidad.....	52
5.9 Cálculo de la reproducibilidad intermedia.....	53
6. CONCLUSIONES.....	55
7. PERSPECTIVAS.....	56
8. REFERENCIAS.....	57
ANEXO A. Curvas de calibración estandares OPP´s.....	61

Listado de abreviaturas

- **BTEX** benceno, tolueno, etilbenceno y xileno
- **CAR** Carboxen
- **CAR/PDMS** Carboxen/polidimetilsiloxano
- **CV** Coeficiente de variación
- **CW** Polientilenglicol
- **CW/DVB** Polientilenglicol/divinilbenceno
- **CW/TPR** Polietilenglicol/resina templada
- **DOF** Diario Oficial de la Federación (México)
- **^aDL₅₀** Se denomina DL50 (abreviatura de Dosis Letal, 50%) a la dosis de una sustancia o radiación que resulta mortal para la mitad de un conjunto de animales de prueba
- **EIM** Errores Innatos del Metabolismo
- **EPA** Agencia de Protección del Medio Ambiente de los USA, por sus siglas en inglés (Environmental Protection Agency)
- **fg** Femtogramo = 10⁻¹⁵ g
- **GC** Cromatografía de Gases, por sus siglas en inglés (Gas Chromatography)
- **GC/MS** Cromatografía de Gases acoplada a espectrometría de masas, por sus siglas en inglés (Gas Chromatography/Mass Spectrometry).
- **GC/MS-SIM** Cromatografía de Gases acoplada a espectrometría de masas con monitoreo selectivo de iones, por sus siglas en inglés
- **HPLC** Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia, por sus siglas en inglés (High Performance Liquid Chromatography)
- **log Pow** Coeficiente de reparto agua-octanol
- **LD** Límite de Detección
- **LC** Límite de cuantificación
- **LLE** Extracción Líquido-Líquido, por sus siglas en inglés (Liquid-liquid extraction)
- **LSE** Extracción Líquido-Sólido, por sus siglas en inglés (Liquid-solid extraction)
- **MS** Espectrometría de masas, por sus siglas en inglés (Mass spectrometry)
- **ng** Nanogramos = 10⁻⁹ g
- **OPP'S** Compuestos Organofosforados
- **PA** Poliacrilato
- **PAHs** Hidrocarburos policíclicos aromáticos (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons)
- **PDMS/DVB** Polimetilsiloxano/divinilbenceno
- **pg** Picogramos = 10⁻¹² g
- **R** Porcentaje de Recobro
- **rpm** Revoluciones por minuto
- **RN** Recién Nacido

- **RSD** Desviación estándar relativa
- **SCAN** Barrido total de iones
- **SIM** Monitoreo selectivo de iones, por sus siglas en inglés (Selected ion monitoring)
- **SPE** Extracción en fase sólida, por sus siglas en inglés (Solid phase extraction)
- **SPME** Micro-extracción en fase sólida, por sus siglas en inglés (Solid phase microextraction)
- **SPME/DE** Micro-extracción en fase sólida Extracción Directa, por sus siglas en inglés (Direct extraction)
- **SPME/HS** Micro-extracción en fase sólida/Headspace
- **SPME/MP** Micro-extracción en fase sólida/Extracción Protegida con Membrana, por sus siglas en inglés (Membrane-protected)
- **tr** Tiempo de retención
- **TMN** Tamiz Metabolico neonatal
- **VOCs** Compuestos orgánicos volátiles (por sus siglas en inglés Volatile Organic Compounds)

Índice de figuras

Figura 1. Transporte y transformación de contaminantes.

Figura 2. Estructuras básicas de los plaguicidas organofosforados.

Figura 3. Esquema del dispositivo de Micro-extracción en fase sólida (SPME).

Figura 4. Tipos de extracción para SPME.

Figura 5. Relación entre tipos de fibra y analitos de interés.

Figura 7. Toma de muestra de sangre.

Figura 8. Ejemplo de tamiz metabólico Neonatal (TMN), utilizado para la recolección de la muestra de sangre.

Figura 9. Esquema de una columna para cromatografía de gases.

Figura 10. Esquema de un Cromatograma de gases.

Figura 11. Esquema de la instrumentación para cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

Figura 12. Extracción head-space, la muestra líquida o sólida se encuentra en la parte de abajo y los compuestos se extraen por la fibra al volatilizarse.

Figura 13. Cromatograma obtenido de la mezcla del estándar de OPP's 10 µg/mL por inyección directa en modo SCAN.

Figura 14. Cromatograma obtenido de la mezcla del estándar de OPP's 10 µg/mL por inyección directa en modo SIM.

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

Figura 16. Coeficiente de variación para las microextracciones por SPME a 600 rpm.

Figura 17. Coeficiente de variación para las microextracciones por SPME a 800 rpm.

Figura 18. Coeficiente de variación para las microextracciones por SPME a 1000 rpm.

Figura 19. Efecto de la temperatura en la extracción de OPP's

Figura 20. Coeficiente de variación para las microextracciones por SPME a 45°C.

Figura 21. Coeficiente de variación para las microextracciones por SPME a 55°C.

Figura 22. Coeficiente de variación para las microextracciones por SPME a 65°C.

Figura 23. Efecto del tiempo en la extracción de OPP's

Figura 24. Coeficiente de variación para las microextracciones por SPME a 10min de extracción.

Figura 25. Coeficiente de variación para las microextracciones por SPME a 15min de extracción.

Figura 26. Coeficiente de variación para las microextracciones por SPME a 20min de extracción.

Figura 24. Efecto del tiempo de desorción en OPP's.

Figura 28. Coeficiente de variación para las microextracciones por SPME a 1min de desorción.

Figura 29. Coeficiente de variación para las microextracciones por SPME a 3min de desorción.

Figura 30. Coeficiente de variación para las microextracciones por SPME a 5min de desorción.

Figura 31. Reproducibilidad intermedia

Figura 32. Coeficiente de variación de la reproducibilidad intermedia

Índice de tablas

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

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

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

Tabla 4. Coeficientes de partición octanol-agua para algunos de la mezcla de OPP's.

Tabla 5. Relación de plaguicidas prohibidos para su importación, fabricación, formulación, comercialización y uso en México publicada en el diario oficial de la federación el 3 de enero de 1991.

Tabla 6. Pesticidas restringidos en México.

Tabla 7. Aplicaciones para los diversos tipos de fibras.

Tabla 8. Aplicaciones de la Micro-extracción en fase sólida (SPME).

Tabla 9. Iones característicos en el espectro de masas para la identificación de los OPP's que se utilizan para el monitoreo selectivo de iones (SIM) con respecto a su tiempo de retención (t_r) y relación masa carga (m/z) de los iones seleccionados.

Tabla 10. Cálculo del límite de detección utilizando las curvas de calibración de estándares OPP's.

Tabla 11. Cálculo del límite de detección en muestras de sangre fortificada utilizando las curvas de calibración.

Tabla 12. Cálculo de los recobros.

Tabla 13. Repetibilidad del método.

1. RESUMEN

En este trabajo se desarrolló un método por micro-extracción en fase sólida del vapor sobrenadante (HS-SPME, por su nombre en inglés, Head Space Solid Phase Micro Extraction) y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas para la cuantificación de plaguicidas organofosforados en sangre.

La optimización se llevó a cabo tanto en las condiciones de separación en el sistema cromatográfico, así como en la técnica de extracción. Para realizar la microextracción en fase sólida en modo de extracción de vapor sobrenadante se utilizó una fibra de Polimetilsiloxano/divinilbenceno (PDMS-DVB), la cual se seleccionó para extraer plaguicidas organofosforados, obteniendo los mejores resultados con agitación a 1000 rpm, a una temperatura de $(55 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C})$ durante 15 min de extracción y 3 min de desorción de la fibra en el equipo. La cuantificación se realizó por Cromatografía de Gases acoplada a espectrometría de masas, (CG/EM) e identificando cada compuesto mediante la comparación con estándares y los espectros de masas con la base de datos del NIST (*National Institute of Standard and Technology de los Estados Unidos de Norteamérica*).

1.1 INTRODUCCIÓN

A nivel mundial, miles de productos químicos son usados diariamente y también nuevos productos se sintetizan cada año. Muchos de ellos son utilizados en actividades agrícolas, o se incorporan a las cadenas tróficas por el inadecuado tratamiento de residuos urbanos y por otras actividades antropogénicas. Entre estos compuestos se encuentran los plaguicidas, algunos plastificantes de uso muy común como el bisfenol A, los ftalatos, compuestos organofosforados, compuestos fenólicos e hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs), etc. La mayoría de estos compuestos han sido detectados tanto en aguas superficiales como subterráneas, lo que ha incrementado la preocupación sobre el impacto en el medio ambiente así como en la salud de personas y animales.

Los pesticidas organofosforados (OPP's, por sus siglas en inglés), debido a su persistencia, se acumulan en diferentes eslabones de la cadena alimenticia y al ingerirlos o estar expuestos a los pesticidas organofosforados 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.

Por lo tanto estas sustancias son capaces de afectar a un recién nacido si durante su gestación la madre se expuso a niveles suficientemente altos de ellos. Desde la etapa de gestación y hasta los primeros meses de vida, el cuerpo humano es altamente susceptible a contaminantes y pueden presentarse problemas a largo plazo, debido a estas exposiciones tempranas.

Por todo esto se pretende desarrollar una forma de medir los niveles de OPP's en recién nacidos y así brindar oportunamente la atención necesaria a aquellos niños que lo requieran. Actualmente existen métodos para detectar OPP's en muestras de sangre de adultos, pero es difícil implementarlos en recién nacidos por su frágil condición y limitado volumen de sangre. Debido a eso, se busca desarrollar una técnica para cuantificar estas sustancias en muestras de sangre seca de tamiz neonatal, un análisis rutinario aplicado a bebés en sus primeros días de vida. Esta tesis es un estudio preliminar que busca aportar información acerca de la presencia de OPP's en sangre de niños recién nacidos, desarrollando y optimizando un método analítico para la identificación y cuantificación de estos compuestos.

2. OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN

2.1 Objetivo General

Desarrollar un método para detectar y cuantificar compuestos Organofosforados, por medio de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas utilizando la técnica de microextracción en fase sólida, para posteriormente realizar pruebas mediante un tamiz metabólico neonatal con muestras de sangre seca, del sujeto no expuesto para fortificar sus muestras con compuestos organofosforados y observar la influencia del método bajo estas condiciones con muestras de sangre.

2.2 Objetivos particulares

Los objetivos particulares de este trabajo son los siguientes:

- Establecer una metodología de análisis por cromatografía de gases y espectrometría de masas para la identificación y cuantificación de OPP's.
- Desarrollar un método de microextracción en fase sólida de OPP's.
- Determinar las condiciones óptimas de desorción de los analitos en muestras de sangre seca fortificadas.
- Aplicar la técnica de extracción a muestras de sangre seca fortificadas.
- Evaluar el porcentaje de recobro de los solutos.
- Validar diversos parámetros del método, entre ellos: intervalo lineal, límite de detección, repetibilidad y reproducibilidad intermedia.

2.3 Justificación

Al desarrollar un método rápido y eficiente, se logrará crear una herramienta práctica que ayudará a los médicos a diagnosticar intoxicaciones por OPP's en recién nacidos y con ello facilitar la prescripción de un tratamiento oportuno.

3. ANTECEDENTES

3.1 Pesticidas

Desde 1950 la producción agrícola comenzó a acelerarse asociada al aumento de la población. Este incremento se ha conseguido no con nuevas tierras de cultivo, sino aumentando el rendimiento por superficie. Este 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 más especializada.

De acuerdo con el código internacional sobre la conducta en la distribución y uso de pesticidas publicado por la organización de las naciones unidas para la alimentación y la agricultura (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”. Este término incluye las sustancias destinadas a utilizarse como reguladores del crecimiento de las plantas, defoliantes, desecantes, agentes que reducen 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.

3.1.1 Historia

Los pesticidas 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, plomo, etcétera. Los plaguicidas han sido utilizados desde tiempos muy remotos.¹

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 la miel. Por otro lado, el uso de compuestos de cobre como fungicidas se conoce desde 1807.² Hasta mediados de los años treinta, los pesticidas utilizados eran de origen natural o bien compuestos inorgánicos. La nicotina del tabaco fue y es 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 y todavía hoy son utilizados con frecuencia estos pesticidas de azufre dada su baja toxicidad comparada con otro tipo de compuestos como los que contienen mercurio. El cloruro de mercurio fue ampliamente utilizado como fungicida a partir de 1891 y fue gradualmente reemplazado por otros compuestos como el fenilmercurio, alquiloimercurio y alquilmercurio. Los grandes envenenamientos que se dieron 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.³

Durante la segunda guerra mundial fue diseminado en cantidades enormes para erradicar la fiebre amarilla, elefantiasis, dengue, tifoidea y principalmente el paludismo y malaria.⁴ 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, debido a esto se le llamo la 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.

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. Actualmente el grupo de pesticidas más importante de reciente introducción son los piretroides o piretrinas sintéticos, muchos de los cuales se encuentran de forma natural presentes en las flores del crisantemo y otras plantas.⁵

3.1.2 Clasificación

Actualmente la clasificación de los pesticidas se puede hacer en función de diferentes criterios como lo son su campo de acción, estructura química, persistencia, toxicidad, concentración, estado físico, etcétera. A continuación se muestra en la (Tabla 1) algunos ejemplos de pesticidas de acuerdo a su tiempo de vida media que pueden durar en los seres vivos.

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

Clase	Vida media	Ejemplo
No persistentes	0-12 semanas	Malation
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 el uso diario es la generada atendiendo al objetivo o campo de acción al que están destinados (Tabla 2). Siguiendo este criterio, la agencia de protección ambiental (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	Micoorganismos
Fumigantes	Plagas de edificios, suelos, etc.
Fungicidas	Hongos
Hervicidas	Plantas
Insecticidas	Insectos
Larvicidas	Larvas de insectos
Molusquicidas	Caracoles
Nematocidas	Nematodos
Ovicidas	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 (oral y tópica o dermal).

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 (Tabla 3). Cuando el valor de la $^{a}DL_{50}$ dermal de un compuesto se encuentre en una clase más restrictiva que el valor de la $^{a}DL_{50}$ oral, el compuesto siempre se clasificara en la clase más restrictiva.⁶

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.

3.1.3 Contaminación por pesticidas.

Hoy en día 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, 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.⁷ 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 y animales (tanto vida silvestre como especies domesticadas) 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 como se puede observar en la (Figura 1).⁸

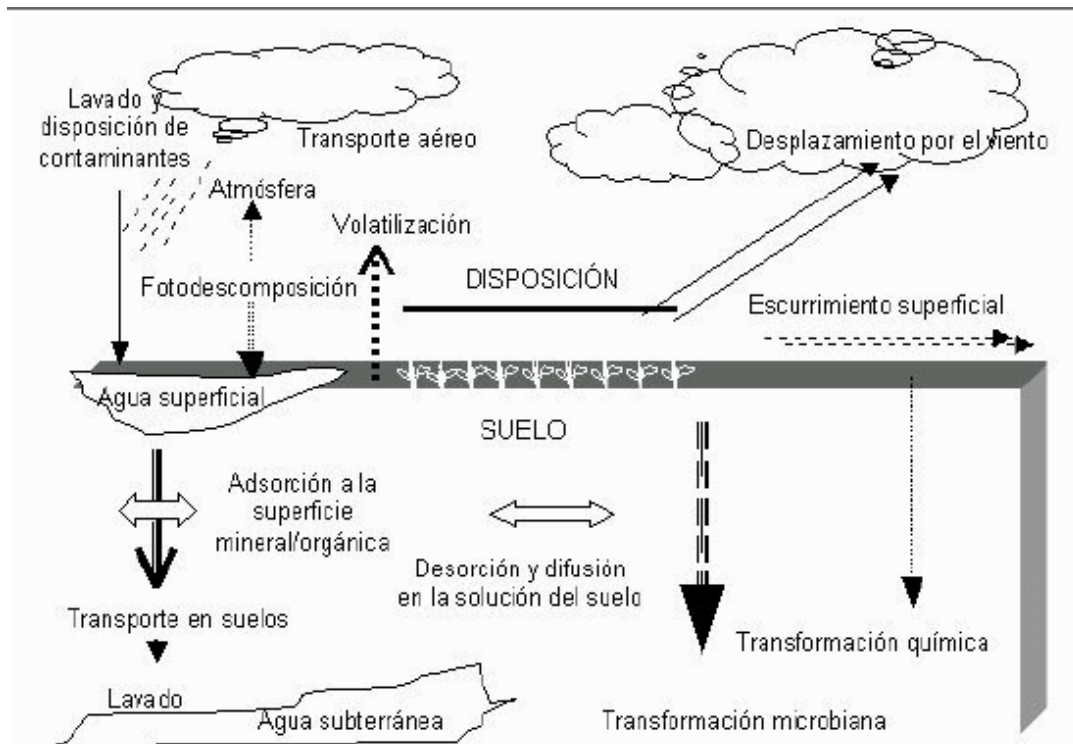


Figura1. Transporte y transformación de contaminantes.

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 en concentraciones de decenas o cientos de veces más altas es decir, en los tramos finales de la cadena trófica.⁹

3.2 PESTICIDAS ORGANOFOSFORADOS

3.2.1 Generalidades

Los pesticidas organofosforados se utilizan para controlar las plagas, que atacan los cultivos y para eliminar insectos que actúan como portadores o productores de enfermedades. Estos compuestos se desarrollaron durante la Segunda Guerra mundial.¹⁰

La primera molécula sintetizada fue el tetraetilpirofosfato, era muy efectivo como insecticida, pero poco apropiada para su uso agrícola debido a su rápida degradación en el medio ambiente, inconveniente que se resolvió con la introducción del paratión y su análogo oxigenado el paraxón. A partir de los 80's, el *paratión* se convirtió en el organofosforado más utilizado en todo el mundo.

Los plaguicidas organofosforados se aplican en formulaciones que contienen aditivos y adyuvantes como surfactantes, aceites, emulsificantes y sales para incrementar su efectividad, adsorción, transmisión, inmovilización y desintoxicación, lo cual provoca la disminución de la tensión superficial y por lo tanto la superficie de contacto del herbicida con la hoja aumenta. Entre 1945 y 1955 se introdujeron al mercado, pero en la actualidad son los plaguicidas de mayor uso debido a que son aceptados por su especificidad, rápida degradación después de la aplicación, acumulación esporádica en la cadena trófica y bajo potencial carcinogénico.¹⁰

3.2.2 Características físico-químicas

Los plaguicidas organofosforados son ésteres orgánicos del ácido fosfórico, se reconocen compuestos diferentes que pueden clasificarse en base al tipo de grupo funcional que sustituye a uno o más átomos de hidrógeno (*Figura. 2*). Las características de cada grupo pueden variar de manera sustancial y le confiere la especificidad para reaccionar contra un tipo de organismo u otro.¹¹

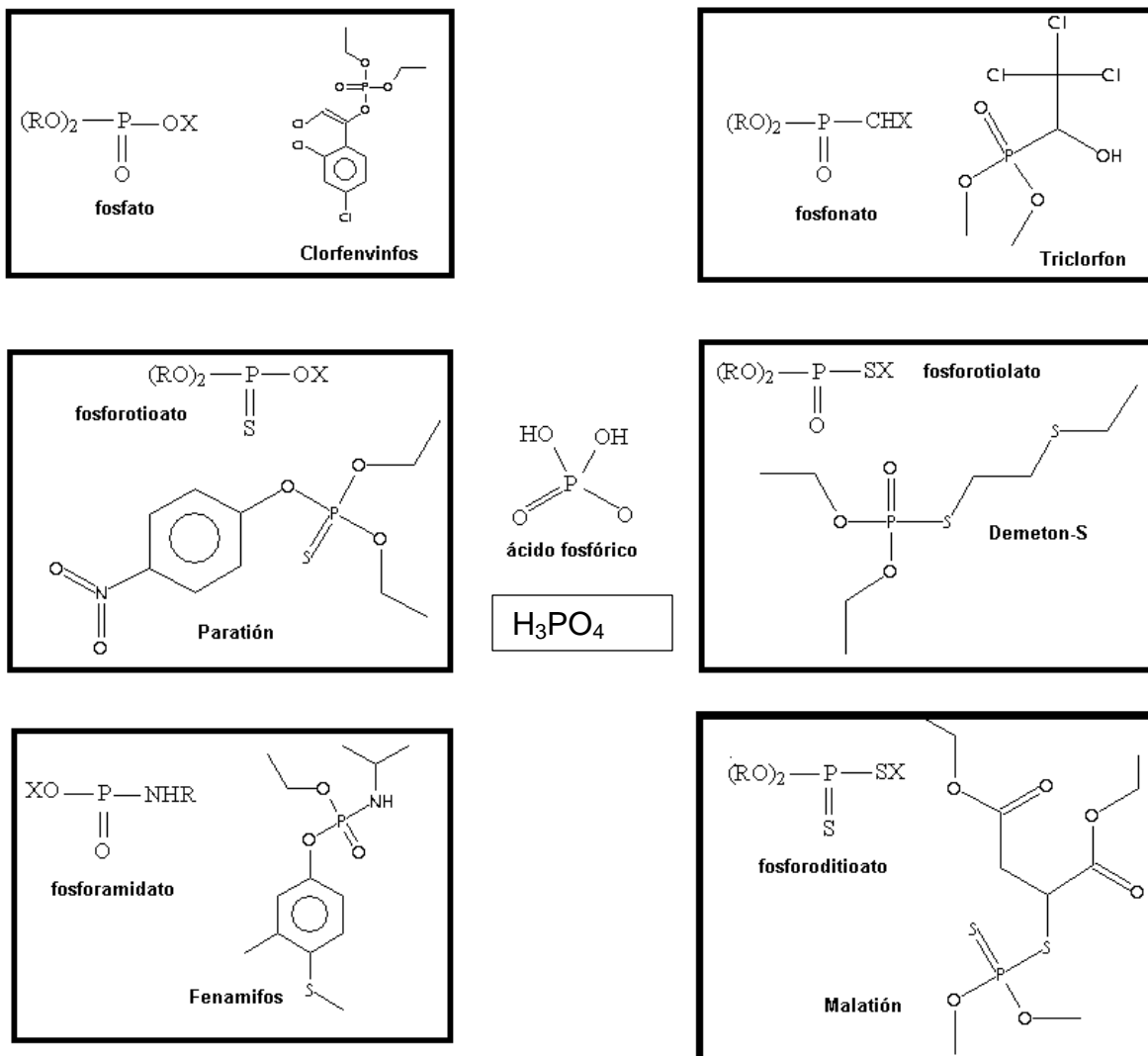


Figura 2. Estructuras básicas de los plaguicidas organofosforados.¹¹

Los compuestos pertenecientes a este grupo de plaguicidas, dadas las diferencias en cuanto a estructura, presentan gran diversidad en características como polaridad, solubilidad en agua, presión de vapor, coeficiente de reparto agua-octanol, ionización ácido-base y vida media. Estos ésteres fosforados, como cualquier otro éster, se hidrolizan en mayor o menor proporción, dependiendo de su estructura química. El fragmento fosfato, tio o ditioposfato de la molécula le imparte algo de polaridad y por tanto tienen diferentes grados de liposolubilidad.

La solubilidad, movilidad y volatilidad de los plaguicidas en el ambiente dependen en su mayoría de sus constantes de ionización ácido-base (pK_a); sin embargo, la polaridad, que puede estimarse a través de su solubilidad en agua y/o su coeficiente de reparto agua-octanol ($\log K_{ow}$ o $\log P_{ow}$), como indicador del grado de hidrofobicidad del plaguicida y su tendencia a la acumulación en agua, organismos, suelo y sedimentos. La clasificación

general para indicar la polaridad de los plaguicidas es: si los valores de $\log P_{ow}$ son mayores a 4, son no polares o liposolubles, mientras que si $\log P_{ow}$ son menores de 3, los compuestos son polares o no liposolubles. Los valores que se tienen entre 3-4 se consideran compuestos moderadamente polares y de acuerdo a los coeficientes de los compuestos organofosforados (Tabla 4), se puede observar que tenemos de ambos casos por sus valores de $\log K_{ow}$. En general, los pesticidas organofosforados pueden clasificarse como compuestos de polaridad media o baja, aunque varía de acuerdo a su estructura.¹²

Tabla 4. Coeficientes de partición octanol-agua para algunos de la mezcla de OPP's.

OPP's	Log K_{ow}	OPP's	Log K_{ow}
Diclorfos	1.43	Fention	4.09
Fosfodrin	0.13	Tricloronato	5.23
Pofos	3.59	Tetraclorvinfos	3.53
Forate	3.56	Tukotion	5.67
Dameton-s	0.74	Butifos	5.7
Diazinon	3.81	Fensulfation	2.23
Disulfuton	4.02	Sulprofos	5.48
Fenclorofos	5.07	Gution	2.75
Metil Paration	2.86	Coornafos	4.13
Clorpirifos	4.96		

La mayor parte de los compuestos organofosforados son líquidos incoloros que poseen un aroma característico pero bastante fuerte. La gran mayoría son solubles en agua y dada su naturaleza son altamente solubles en disolvente orgánicos. Poseen un alto coeficiente de reparto aceite/agua y una presión de vapor baja que los hace que sean poco volátiles y de fácil absorción. Son altamente degradables, es decir, sufren hidrólisis en un medio alcalino en tierra y en líquidos biológicos, no siendo persistentes en el ambiente. Son liposolubles, facilitan su absorción por que atraviesan fácilmente las barrera biológicas (piel y mucosas), también penetran en el sistema nervioso central. Algunos pueden almacenarse en el tejido graso, lo que puede provocar una toxicidad retardada debido a su liberación tardía. Este tipo de compuestos deben mantenerse alejados del calor y del fuego como también mantenerse en áreas ventiladas.¹²

3.2.3 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 del 3 de enero de 1991 en el Diario Oficial de la Federación (DOF), se puede observar en la (Tabla 5) los plaguicidas que en el decreto se prohíbe la importación, fabricación, formulación, comercialización y uso en nuestro país.¹⁰

Tabla 5. Relación de plaguicidas prohibidos para su importación, fabricación, formulación, comercialización y uso en México publicada en el DOF el 3 de enero de 1991.

Compuestos prohibidos en México		
Triamifos	Erbon	DBCP
Mercurio	Formotión	Dialiafor
Acido 2,4,5-T	Scradan	Dieldrin
Aldrín	Fumisel	Dinoseb
Cianofos	Kepone/Clordecone	Endrin
Cloranil	Mirex	Monuron
Nitofen	HCH	EPN
Paration etílico	Toxafeno	Sulfato de talio
Fluoroacetato de sodio	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 (Tabla 6). Su manejo y aplicación se efectuaran bajo la responsabilidad y supervisión del técnico autorizado que los haya recomendado.

Tabla 6. Pesticidas restringidos en México

Pesticidas restringidos en México		
1,3 Dicloropropeno	Fosfuro de aluminio	Alaclor
Aldicarb	Isocianato de metilo	Aldicarb
Lindano	Bromuro de metilo	Metam sodio
Clordano	Metoxicloro	Paraquat
Cloropicrina	Mevinfos	Dicofol
Forato	Pentaclorofenol	Clorotalonil
Pentaclorofenol	Clorotalonil	
Metamidofos	Quintozeno	

3.2.4 Usos

Los OPP'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 y se siguen utilizando en muchos países desarrollados para el control de enfermedades transmisibles.¹³

3.2.5 Metabolismo

Los OPP's entran en el organismo por inhalación, ingestión, y absorción dérmica. Es peligroso que el compuesto se encuentra disuelto en algún aceite o disolvente orgánico, debido a que se absorbe fácilmente a través de la piel y constituye un peligro considerable.

Después de la exposición, una parte importante de la dosis absorbida se almacena en el tejido graso, como el compuesto principal inalterado.

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

Debido a esta tendencia lipofílica, los OPP'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.¹⁴

3.2.6 Efectos en la salud humana

Estos compuestos se absorben por inhalación, ingestión y vía cutánea. El mecanismo de acción es por inhibición de la actividad de la acetilcolinesterasa; el fenómeno ocurre en las sinapsis nerviosas, en donde el neurotransmisor acetilcolina actúa sobre la membrana post-sináptica a la que despolariza. De esta manera, excita a las células efectoras: glándula, fibras musculares lisas, fibras musculares estriadas y a otras neuronas. Por lo tanto, se genera gran cantidad de impulsos a las células efectoras y esta estimulación continua causa las manifestaciones de esta intoxicación:

- a) Síndrome muscarínico: vómito, sudoración profusa, diarrea, salivación excesiva, lagrimeo y abundante secreción bronquial; característicamente, las pupilas están contraídas "como punta de alfiler" (miosis). Estos síntomas son causados por estimulación de las glándulas y fibras musculares lisas.
- b) Síndrome nicotínico: calambres de los músculos abdominales y de las extremidades, temblores y trastornos del ritmo cardíaco, debido a la acción sobre las fibras musculares estriadas.
- c) Síndrome neurológico: irritabilidad, conducta psicótica, pérdida brusca de la conciencia y convulsiones. La muerte ocurre por depresión respiratoria, edema pulmonar o bradicardia extrema. Dichos síntomas dados por la sobre estimulación de otras neuronas.

Algunos compuestos organofosforados tienen efectos diferentes a los mencionados anteriormente, tal es el caso del dimetoato que se caracteriza por tener un efecto tardío: prácticamente no hay síntomas muscarínicos y, después de una aparente mejoría, aparecen síntomas acentuados de neuropatía periférica. Al igual que el *dimetoato*, el *paratión etílico* y el *metílico*, después de una mejoría aparente, pueden causar manifestaciones agudas caracterizadas por una parálisis parcial de los músculos de la respiración, debilidad de los músculos faciales, del paladar y de las extremidades inferiores, con alteraciones electromiográficas que muestran alteración de la transmisión neuromuscular. El primer síndrome de neurotoxicidad tardía se ha relacionado con la inhibición de una estearasa diferente a la acetilcolinesterasa.¹⁰

En caso de intoxicación, se utilizan como antidotos específicos oximas. La obidoxima (toxogonin) y la pralidoxima (protopam) actúan reactivando la acetil colinesterasa inhibida, lo que ocurre lentamente, por lo que su empleo debe ser simultáneo a la atropina. Ambos están disponibles en nuestro país. Se administran por vía intravenosa en dosis de 25 a 50 mg/kg en niños y 1 g en adultos (dosis total), en forma lenta, durante 50 minutos (la administración rápida puede causar espasmo laríngeo) cada 6 a 8 horas. Se administran, por goteo endovenoso, dosis subsecuentes similares por un mínimo de 48 horas (intervalo crítico).

La gravedad de la intoxicación por organofosforados obliga a su sospecha clínica y manejo médico inmediato. En ningún caso se debe esperar a obtener la cuantificación de colinesterasa para iniciar el tratamiento de estos pacientes. Cuando el estudio es factible, es útil para ratificar el origen de la intoxicación; el seguimiento permite valorar la efectividad del tratamiento. Cualquiera que sea la técnica empleada para la cuantificación, la actividad de la colinesterasa proporciona datos de inhibición de la enzima; en los casos graves es común encontrar cifras de cero. La reactivación se inicia con el empleo de las oximas.¹²

3.2.7 ANÁLISIS DE PLAGUICIDAS

Actualmente, se requiere de niveles de detección analítica de los contaminantes ambientales cada vez más bajos (ng, pg ó fg), estos niveles requieren del desarrollo de métodos con bajos límites de detección (LD), simples, rápidos y de bajo costo para detectar y cuantificar estos contaminantes no solo en el agua, sino en otras muestras ambientales como el suelo, fluidos biológicos y productos agrícolas.¹⁵

El análisis de compuestos traza como los pesticidas en muestras ambientales requiere de la aplicación de procedimientos de preparación de muestras adecuados. En general, el análisis consiste en varias etapas, las cuales podemos enumerar como sigue:

- a) Pre-tratamiento de la muestra: para garantizar el tamaño y forma adecuada, por ejemplo algunos vegetales deben ser cortados o molidos.

- b) Extracción: mediante distintas técnicas se puede obtener al o los analitos de la muestra, obteniéndose un extracto crudo.
- c) Limpieza: después de realizar la extracción es posible que todavía se tengan interferencias para la determinación del analito obteniendo un extracto purificado, o bien las técnicas de análisis instrumental requieren de tener un extracto totalmente libre de interferencias que puedan alterar parte de su instrumentación, por ejemplo columnas en Cromatografía de Gases o HPLC. También es posible realizar una concentración en este paso, dado que al eliminar las interferencias sólo nos quedamos con el analito de nuestro interés.
- d) Determinación: después de obtener el extracto purificado, se realiza el análisis instrumental por alguna técnica analítica como Cromatografía de Gases, Cromatografía de líquidos y Electroforésis Capilar las cuales son de las técnicas más utilizadas.
- e) Resultados analíticos: al obtener resultados, se realizan cálculos para determinar Límites de detección (LD) y de cuantificación (LC), porcentajes de recobro (R) y coeficientes de variación (CV).

La preparación de la muestra es uno de los pasos críticos en muchos procesos analíticos. El principal problema se encuentra durante la separación de los analitos en estudio desde la matriz ambiental, esto causa extracciones ineficientes, pérdida de analitos y por lo tanto concentraciones bajas en los extractos. El desarrollo de procedimientos de extracción y preconcentración son importantes en las determinaciones analíticas de compuestos a nivel de trazas, por lo que han sido estudiados en las décadas recientes.¹⁶

Los procesos de extracción, limpieza y concentración pueden realizarse mediante extracción líquido-sólido (Extracción Soxhlet o LSE, por sus siglas en inglés), extracción líquido-líquido (LLE, por sus siglas en inglés) o extracción en fase sólida (SPE, por sus siglas en inglés) y dependiendo del tipo de matriz puede utilizarse una o varias técnicas. La LSE y LLE son técnicas muy utilizadas en los métodos de *United States Environmental Protection Agency* (US EPA) pero tienen como inconveniente el uso de cantidades grandes de solventes que a menudo son tóxicos y flamables, sobre todo la LLE, además de que los tiempos de análisis son largos. La SPE consume menos solventes y tiempo de análisis en comparación con la LLE, no obstante, tiene como “desventaja” que en ocasiones se requiere de solventes tóxicos para la elución de los analitos. También se emplea la extracción por líquido presurizado (PLE, por *pressurized liquid extraction*) en una técnica en la cual se combina la temperatura elevada y la alta presión, utiliza menor cantidad de solventes que la LLE y también emplea menor tiempo de análisis.^{17,18} La Micro-extracción en fase sólida (SPME, por sus siglas en inglés *Solid phase microextraction*) tiene algunas ventajas sobre las técnicas de extracción convencionales, como LLE o SPE anteriores, como el nulo uso de solventes, lo cual minimiza el costo de solventes de alta pureza, fácil y rápida de usar, y se emplean volúmenes de muestra pequeños además, la Cromatografía de Gases (GC) y la Cromatografía de Líquidos (HPLC), son las técnicas instrumentales más utilizadas para el análisis de residuos de

plaguicidas en muestras ambientales, empleando como técnicas de preparación a las antes mencionadas.^{17,19}

3.3 Microextracción en fase sólida (SPME)

La Micro-extracción en fase sólida (SPME) fue empleada por primera vez por Pawliszyn y colaboradores en 1990. Ésta técnica analítica consiste en dos procesos: una extracción y pre-concentración de los analitos a partir de diferentes muestras. En primera instancia, una fibra de sílica unida generalmente a una fase estacionaria polimérica es expuesta a la muestra donde existen equilibrios entre la muestra y la fase estacionaria. En la segunda etapa, la fibra con el analito adsorbido es transferida al instrumento para su desorción, separación y cuantificación.

Ésta técnica se ha empleado principalmente en la extracción de compuestos orgánicos volátiles y semi-volátiles de muestras acuosas, generalmente ambientales, biológicas y alimentos, aunque es útil también en muestras sólidas y gaseosas. La primera aplicación de la SPME para el análisis de residuos de herbicidas fue reportada en 1995 por Boyd-Boland y Pawliszyn para la determinación de herbicidas que contienen grupos nitrógeno, las muestras trabajadas fueron suelo, agua y vino. Desde 1995, los métodos de SPME han sido utilizados ampliamente en diferentes clases de herbicidas en numerosas muestras ambientales (suelo y agua) y biológicas (sangre, orina y suero).²⁰

3.3.1 Fundamento de la técnica

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:

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

donde:

n son los moles de analito absorbidos por la fibra, V_f y V_s son los volúmenes de fibra y de muestra respectivamente, 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 de menos de 5 microlitros.

La Micro-extracción en fase sólida se basa en los equilibrios de reparto de los analitos entre la muestra y una fase estacionaria polimérica que es la fibra. El transporte de los analitos desde la matriz hasta la fibra inicia desde que la fibra entra en contacto con la muestra y termina cuando la concentración de analito ha alcanzado el equilibrio de distribución entre la fibra y la muestra.²¹

La cuantificación por SPME asume una relación directamente proporcional entre la concentración del analito en la muestra y la cantidad de analito adsorbida por la fibra antes de alcanzar el equilibrio de reparto. La SPME no es una técnica de extracción exhaustiva, tiene un máximo de sensibilidad en el equilibrio de reparto de los analitos. Se obtiene una relación proporcional entre la cantidad de los analitos adsorbidos por la fibra y la concentración inicial en la matriz de la muestra antes de alcanzar el equilibrio de partición. Por lo tanto el equilibrio completo no es necesario para el análisis cuantitativo por SPME.²²

El dispositivo para SPME consiste en un contenedor de fibra parecido a una jeringa, éste contiene una barra de acero inoxidable semejante a una aguja dentro de la cual está la fibra de sílice fundida, la cual puede ser expuesta o retraída dentro de la aguja por medio de un émbolo (*Figura 3*). La fibra de sílice fundida está recubierta con una capa relativamente delgada de alguna de las fases estacionarias poliméricas, en la cual los analitos orgánicos son adsorbidos o absorbidos desde la matriz de la muestra.

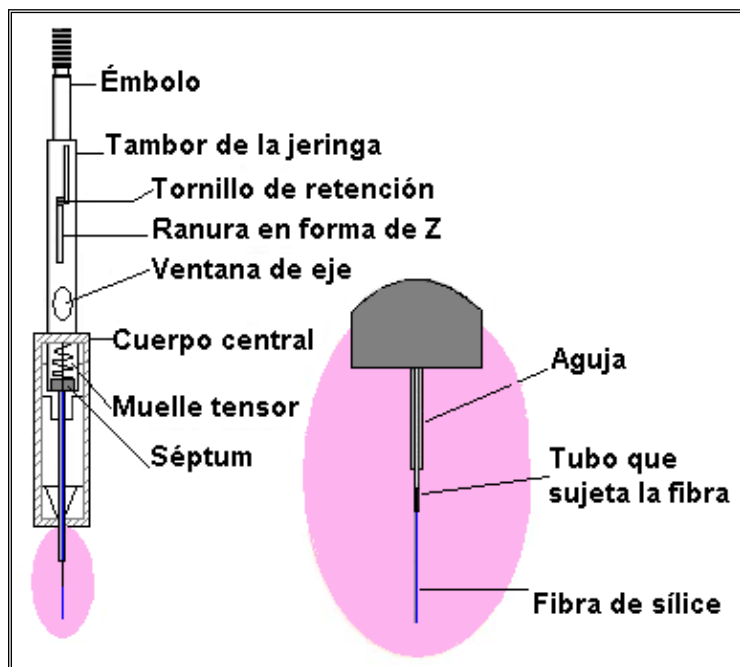


Figura 3. Esquema del dispositivo de Micro-extracción en fase sólida (SPME).²³

3.3.2. Tipos de extracción

Existen tres tipos o modos de trabajo en la SPME: Extracción directa (SPME/DE), Headspace (SPME/HS) y Extracción Protegida con Membrana (SPME/MP) (*Figura 4*). En el modo SPME/Extracción Directa la fibra se sumerge directamente en muestras líquidas y los analitos son transportados directamente de la matriz de la muestra hacia la fase polimérica (fibra). En el modo SPME/Headspace la fibra se expone en la fase vapor que existe sobre una muestra, los analitos son transportados a través del aire enriqueciendo hacia la fibra, este modo se utiliza para extracción de compuestos volátiles, de tal manera que la fibra se encuentra protegida de interferencias como compuestos de alto peso y/o de compuestos no volátiles presentes en la muestra.

En el modo SPME/Extracción Protegida con Membrana, la fibra se protege utilizando una membrana que le sirve como barrera para aquellas muestras con muchas interferencias, utilizándola para aquellos compuestos con baja volatilidad para ser analizados por SPME/Headspace. Si la membrana es elaborada de un material adecuado puede incrementar la selectividad en proceso de extracción por ejemplo PDMS (Polidimetilsiloxano) es para extraer compuestos no polares. La cinética de extracción con membrana es sustancialmente más lenta que en SPME-DE porque los analitos necesitan difundir a través de la membrana para dirigirse hacia la fibra y ser extraídos ya que la fibra está sumergida en la muestra.^{21,23} Usando la membrana e incrementando la temperatura la extracción se puede realizar en tiempos cortos.

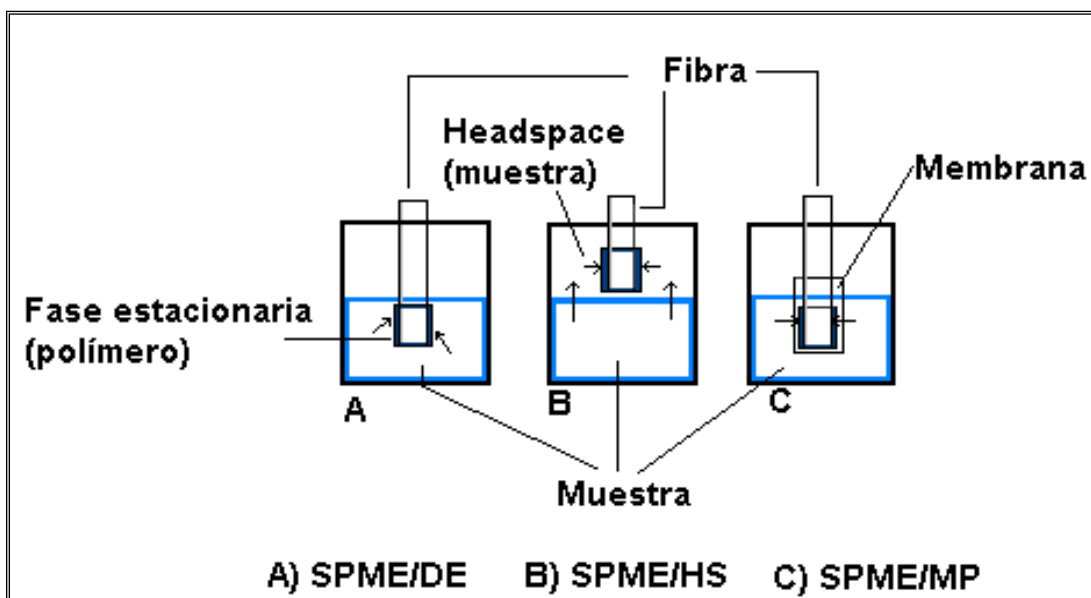


Figura 4. Tipos de extracción para SPME.²¹

3.3.3 Fibras

Actualmente existen fibras con diversos recubrimientos y diferentes espesores, que proporcionan un intervalo amplio de polaridades (*Figura 4*), de tal forma que la SPME puede emplearse para determinar un amplio grupo de compuestos (*Tabla 2*). Los primeros recubrimientos comercializados fueron los de polidimetilsiloxano (PDMS) y poliacrilato (PA) pero los recubrimientos han ido aumentando progresivamente y actualmente cubren un amplio conjunto de aplicaciones, destacando: PDMS, la cual se considera de aplicación general, poliacrilato, polimetilsiloxano/divinilbenceno (PDMS/DVB), Carboxen (CAR o carbón activado poroso), polietilenglicol/divinilbenceno (CW/DVB), polietilenglicol/resina templada (CW/TPR), carboxen/polidimetilsiloxano (CAR/PDMS), hasta fibras con materiales especializados como fibras de intercambio iónico para remover iones metálicos y proteínas en disoluciones acuosas.

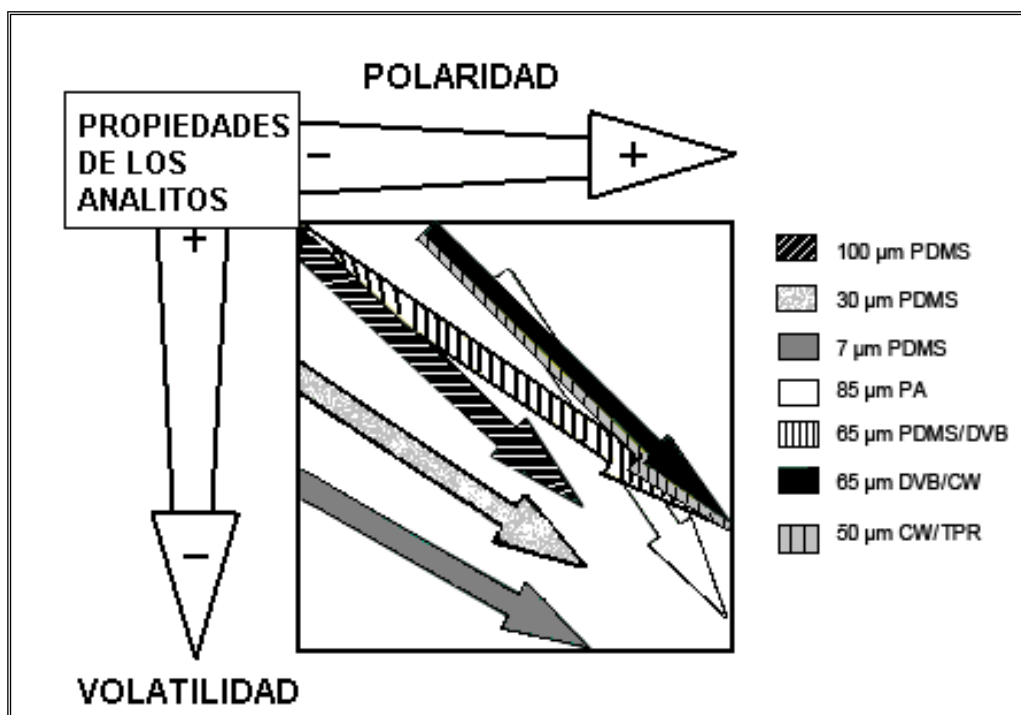


Figura 5. Relación entre tipos de fibra y analitos de interés.²¹

La (Figura 5) representa una guía para elegir el tipo de fibra a utilizar de acuerdo a dos características básicas como la volatilidad y polaridad de los analitos. Por ejemplo, la fibra PDMS puede utilizarse para aquellos analitos de tendencia no polar, pero al escoger diferente grosor se pueden analizar tanto analitos volátiles (100 µm) como poco volátiles (7 µm). Mientras que las fibras de poliacrilato (PA) y las combinaciones con carbowax (CW) se utilizan para analitos polares. La fibra PDMS/DVB puede ser utilizada para compuestos polares y no polares, con analitos de mediana y alta volatilidad, por lo que es una fibra que puede ser utilizada para el análisis de una amplia gama de compuestos.

Tabla 7. Aplicaciones para los diversos tipos de fibras.

Tipo de fibra	Polaridad de los analitos
PDMS (Polidimetilsiloxano)	No polares (VOCs, PAHs, plaguicidas y BTEX)
PA (Poliacrilato)	Polares (triazinas y fenoles)
PDMS/DVB (Polimetilsiloxano/divinilbenceno)	Polares-No polares (Hidrocarburos aromáticos y analitos volátiles pequeños como solventes)
CW/DVB (Polietilenglicol/divinilbenceno)	Polar (Alcoholes y éteres.)
CW/TPR (Polietilenglicol/resina templada)	Polar de bajo peso molecular (Surfactantes aniónicos)
CAR/PDMS (Carboxen/polidimetilsiloxano)	Polares-No polares (VOCs e hidrocarburos)

3.3.4 Procedimiento

La fibra, en primer lugar debe acondicionarse previo al análisis para remover contaminantes que pueden estar adsorbidos y que pueden interferir con los analitos de interés, esto se realiza en el inyector del Cromatógrafo de Gases de acuerdo a las indicaciones del proveedor (SUPELCO). La muestra es colocada dentro de un vial el cual se sella con un septum, el émbolo se baja hasta dónde se necesario para que la fibra (*Figura 6a*) entre en contacto con la muestra (*Figura 6b*), dependiendo el modo de extracción; presentándose la migración de los analitos desde la matriz de la muestra hacia la fase estacionaria (fibra).²¹ La muestra es agitada para aumentar la velocidad de transferencia de analito, evitándose bajos coeficientes de difusión; generalmente se emplea una barra magnética o por sonicación. Después de un tiempo apropiado de extracción, la fibra se retrae dentro de la aguja y ésta se remueve, posteriormente (*Figura 6c*) es insertada directamente en el inyector de un cromatógrafo de gases (*Figura 6d*) o dentro de la cámara de desorción de la interfase SPME-HPLC. La desorción del analito de la fase polimérica se lleva a cabo por calentamiento de la misma en el puerto de inyección del GC (*Figura 6e*) o por dilución con disolventes dentro de la cámara de desorción de la interfase SPME-HPLC, donde los analitos son transferidos a la columna cromatografía para su análisis y finalmente se retrae la fibra y se saca del inyector el dispositivo de microextracción (*Figura 6f*).

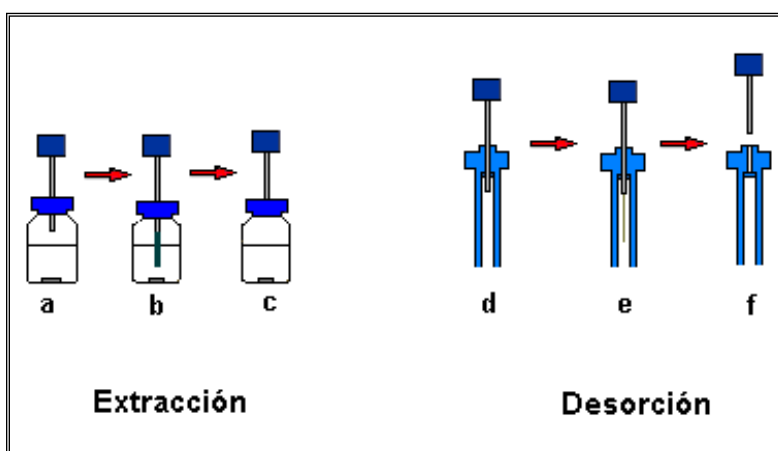


Figura 6. Esquema del proceso de extracción (por inmersión directa) y desorción térmica en el GC.²¹

3.3.5 Optimización del proceso de SPME

En SPME los analitos son extraídos directamente de la muestra hacia la fibra, para ello deben optimizarse las condiciones de extracción, y asegurar la máxima sensibilidad del analito por la fibra y la eficiencia de la extracción. A continuación se presentan los puntos de optimización para la extracción.

a) Modo de extracción

La selección del modo de extracción debe hacerse considerando la complejidad de la muestra, la volatilidad de los analitos y la afinidad de éstos por la muestra. Por lo anterior tenemos que la SPME/DE, generalmente se utiliza para analitos de media a baja volatilidad y las muestras deben ser líquidos simples, para la SPME/HS se pueden manejar líquidos complejos y sólidos, pero los analitos deben ser de alta a media volatilidad, mientras que la SPME/MP se utiliza para muestras complejas y con analitos de baja volatilidad.²¹

De este modo la técnica más adecuada de extracción deberá seleccionarse considerando la naturaleza de la matriz en la muestra. SPME/DE es más sensible que SPME-HS para analitos presentes en un líquido sin embargo, existe daño en la fibra y disminución en la eficiencia de la extracción debido a la adición de sales, pH de la disolución o la presencia de compuestos en una matriz compleja los cuales interfieren en la extracción de los analitos.²⁴ SPME-HS presenta menor ruido de fondo debido a que la fibra no está en contacto directo con la muestra y por lo tanto prolonga su tiempo de vida, y es adecuada para la extracción de analitos muy volátiles en la mayoría de las muestras complejas sólidas, líquidas y gaseosas.

b) Tipos de fibra

Como ya se mencionó, existen diferentes tipos de fibras y la afinidad del analito por la fibra depende de las interacciones moleculares entre el analito y las distintas fases estacionarias que recubren las fibras, además debe considerarse el espesor de la fase polimérica, y por tanto la selección depende de los analitos a extraer.²² Así, la fibra de PDMS es de uso común para analitos no polares (*Tabla 6*). Mientras que las fibras con fase polimérica gruesa requieren más tiempo para alcanzar el equilibrio de extracción, pero la ventaja de éstas es que extraen una mayor cantidad de analito, por ello proporciona mayor sensibilidad. Las fibras con cubierta de espesor grueso suelen utilizarse para analitos volátiles y las cubiertas delgadas para compuestos semivolátiles.

Los analitos polares de bajo peso molecular, pueden ser extraídos con fases estacionarias mixtas como PDMS/DVB, CAR/DVB, Carbowax y CW/TPR, porque presentan mayor capacidad de retención debido al efecto potencial de adsorción.²⁰

c) Técnica de agitación

La agitación se utiliza para acelerar la transferencia de analitos desde la matriz de la muestra hacia la fibra; a su vez determina el tiempo de equilibrio en matrices acuosas debido a que el tiempo de equilibrio decrece con el aumento en la velocidad de agitación, una agitación incontrolable puede causar baja reproducibilidad en este tiempo de equilibrio.²¹ La agitación magnética es la más común, pero existen diferentes tipos de agitación: por ultrasonido, movimiento de la fibra y mediante vortex, entre otros.

d) Tiempo de extracción

El tiempo de extracción está determinado principalmente por la velocidad de agitación y el coeficiente de partición del analito entre la fase polimérica de la fibra y la matriz de la muestra.²⁴ Y generalmente es corto para extracciones en SPME/HS. Para extraer la máxima cantidad de analito, el tiempo de equilibrio debe ser alcanzado, pero este puede ser demasiado para algunos analitos, y aunque la SPME tiene una mayor sensibilidad en el punto de equilibrio, el equilibrio total no es necesario para un análisis preciso, dada la relación lineal entre la cantidad de analito adsorbido por la fibra y su concentración inicial en la matriz de la muestra.²²

El tiempo de extracción debe ser constante durante todo el análisis, es decir debe mantenerse controlado con la finalidad de obtener resultados precisos, la precisión también depende del uso de la misma cantidad de muestra y por tanto igual tamaño del vial de extracción durante todo el análisis.

d) Temperatura de extracción

Generalmente, el incremento de la temperatura de la muestra proporciona una mayor extracción, debido a que se produce un aumento en la velocidad de extracción y simultáneamente un efecto sobre la constante de distribución que depende del analito y del intervalo de temperatura de trabajo. En agua los coeficientes de difusión son altos y el tiempo de extracción es corto, pero el coeficiente de reparto puede ser bajo. Una temperatura adecuada aporta mayor sensibilidad y velocidad de extracción de los analitos.²¹

e) El pH

El pH de la muestra es importante para compuestos con propiedades ácido-base, afecta el equilibrio de disociación de los analitos en medio acuoso, por ello el ajuste del pH puede mejorar la sensibilidad de la extracción. Al incrementar o disminuir el pH, por medio de la adición de un buffer, puede aumentar la cantidad de analito extraído.

El cambio de pH en SPME/ED no resulta ventajoso, porque el contacto de la fibra con disoluciones con altos o bajos valores de pH pueden dañarla.^{20,21}

f) Efecto de la adición de una sal

La adición de sales, generalmente cloruro de sodio o carbonato de sodio, en la muestra aumenta el coeficiente de distribución de los analitos no ionizados por lo que la cantidad de analito aumenta; sin embargo, para analitos ionizados se observa una disminución de la eficiencia de la extracción.^{20,25} La extracción de analitos volátiles es favorecida con la adición de sales, por lo que la adición de NaCl, Na₂SO₄ es preferible en la SPME/HS. Una desventaja de la adición de sales es que puede existir pérdida de selectividad de la fibra.²⁴

g) Desorción

La temperatura, tiempo de desorción y la posición de la fibra en el inyector del GC son factores que afectan la desorción completa de los analitos adsorbidos. Por otra parte, también afectan la volatilidad de estos la velocidad del flujo del gas alrededor de la fibra, así como del espesor de la fase polimérica.^{26,27} La temperatura óptima de desorción, en general es aproximadamente igual al punto de ebullición del analito menos volátil. El inyector del cromatógrafo de gases debe tener un inserto de diámetro angosto para asegurar un flujo lineal alto. La profundidad de la exposición de la aguja debe ajustarse para colocar la fibra en el centro de la zona caliente del inyector. El tiempo de desorción generalmente es corto pues el coeficiente de difusión de los analitos en la fibra aumenta y la constante de distribución gas/fibra disminuye rápidamente con el aumento de la temperatura.

3.3.6 Análisis de plaguicidas organofosforados.

La extracción líquido-líquido o la extracción en fase sólida seguidas del análisis por Cromatografía de Gases o por Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia son métodos tradicionales para la determinación de residuos de plaguicidas organofosforados en muestras ambientales.

Los plaguicidas organofosforados han sido determinados por micro-extracción en fase sólida en diversas matrices como se muestra en la (Tabla 8). La micro-extracción en fase sólida, como ya se ha mencionado, tienen ventajas sobre las técnicas tradicionales, pero entre las ventajas más importantes se encuentra la concentración de los analitos en la fase polimérica. Esto es muy importante para el análisis de residuos de plaguicidas, porque además de concentrar, se integra la extracción y la introducción de la muestra (en el equipo analítico) en un solo proceso ininterrumpido, por tanto aumentan los porcentajes de recobro de los analitos. Con esto puede determinarse la presencia de dichos plaguicidas en niveles bajos de concentración del orden de ng/L.^{26,28,29}

Tabla8. Aplicaciones de la Micro-extracción en fase sólida (SPME).¹⁷

ANALITO	MUESTRA/FIBRA	MODO DE EXTRACCIÓN	DETECCIÓN
Triazinas	Suelo CW/TPR	Inmersión directa (DE)	HPLC/MS
Plaguicidas	Agua PDMS (7µm), PDMS/DVB	Inmersión directa (DE)	GC/ECD GC/NPD
Compuestos orgánicos volátiles y semivolátiles	Agua PDMS	Headspace (HS)	GC/FID GC/MS
Fungicidas	Suelo PA (85µm)	Inmersión directa (DE)	GC/FID GC/MS
Metilmercurio	Pescado y agua de río PDMS (100µm)	Headspace (HS)	GC/MS
Explosivos	Agua CW/TPR (50µm) PDMS/DVB (60µm) PA (85µm)	Inmersión directa (DE)	HPLC/UV-VIS
Paratión	Sangre y Orina CW/DVB (65µm)	Inmersión directa (DE)	GC/MS-SIM
Fenoles	Agua Nano-tubos de Carbón	Inmersión directa (DE)	HPLC/UV-VIS
Dimetilamina	Surfactantes catiónicos PDMS/PDPS (polidifenilsiloxano)	Inmersión directa (DE)/In- tube SPME con derivatización	HPLC/UV-VIS
Plaguicidas organofosforados	Sangre PDMS (100µm)	Headspace (HS)	GC/MS-SIM
Plaguicidas organofosforados	Pescado, agua, papas, guayaba y café PDMS (100µm)	Inmersión directa (DE)	GC/NPD

Las fibras más utilizadas en el análisis de los pesticidas organofosforados son PDMS y PA.^{17,18} Los autores de los trabajos indican que son las fibras que proporcionan mejores resultados para la extracción de los pesticidas organofosforados. Las fibras PDMS y PA, son de polaridades diferentes la primera es no polar, mientras que la segunda es de tipo polar, es necesario conocer el tipo de pesticidas organofosforados ya que estos compuestos presentan variedad de polaridad, mientras que los otros son moderadamente polares; para estos últimos la fibra de poliacrilato es la ideal para la extracción.^{21,30} Algunos autores consideran el uso de la fibra de PDMS/DVB para pesticidas organofosforados, así como para una mezcla de organofosforados y organoclorados.^{31,32,33}

Dentro de los parámetros controlados, se encuentran el tiempo de equilibrio o tiempo de extracción, temperatura de extracción, el pH del medio, fuerza iónica y tiempo de desorción.^{17,20,34} En otros casos se encuentra un estudio del efecto de la presencia de ácidos húmicos.³⁵ En todos los casos, logran la extracción de los plaguicidas organofosforados con precisión de 1-31%.^{17,23,36}

3.4 Tamiz neonatal y muestras de sangre

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.

Las muestras de sangre se obtienen por punción en el talón del recién nacido, la sangre se coloca en un papel filtro (Figura 7). 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 8).

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.³⁷



Figura 7. Toma de muestra de sangre.

TAMIZAJE NEONATAL		No.
TARJETA PARA RECOLECCION DE MUESTRAS		
Institución: _____ Fecha: _____		
Nombre de la Madre: _____		
Identificación de la Madre: _____ H. Clínica No _____		
Dirección: _____ Tel.: _____		
Fecha de nacimiento: _____ Peso: _____ g Género: F__ M__		
Tipo: Cordón ____ Talón ____ Fecha de muestra _____		

Figura 8. Ejemplo de tamiz metabólico Neonatal (TMN), utilizado para la recolección de la muestra de sangre.

3.5 CROMATOGRAFÍA DE GASES-ESPECTROMETRÍA DE MASAS (GC/MS)

Una de las técnicas instrumentales que más se utilizan, es la Cromatografía de Gases (GC por sus siglas en inglés) acoplada a un Espectrómetro de Masas (MS por sus siglas en inglés).

La GC se emplea para separar, aislar e identificar los componentes de una mezcla de compuestos, el principio está sustentado en la distribución de los componentes de la mezcla entre dos fases, una móvil (gas) y una estacionaria (sólida o líquida), la fase móvil transporta a los componentes a través de la fase estacionaria (fig. 9). Cada componente se distribuirá de modo distinto dependiendo de su afinidad con la fase estacionaria debido a de las interacciones de los componentes con ésta, aquellos que sean más a fines son mayormente retenidos y tardan más en eluir, es decir se mueven lentamente con el flujo de la fase móvil. Por el contrario, los componentes que se unen débilmente a las fase estacionaria eluyen más rápido. La Cromatografía de Gases es utilizada para el análisis de compuestos relativamente volátiles y no termolábiles.

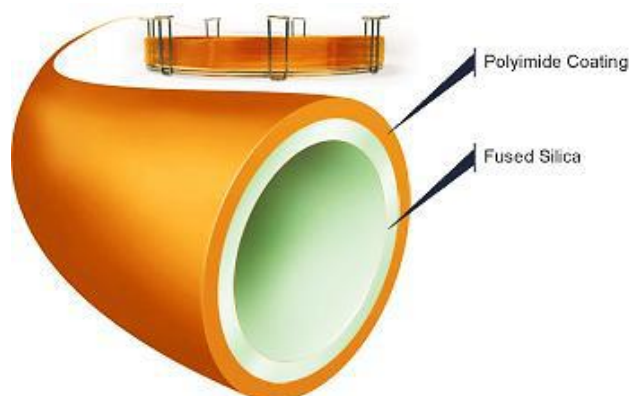


Figura 9. Esquema de una columna para cromatografía de gases.

Un cromatógrafo de gases consiste básicamente en un inyector split/splitless, un horno en el cual se encuentra una columna capilar, un detector y un ordenador.³⁸ El detector de un cromatógrafo de gases puede ser un detector de ionización de flama (FID). Al tener como detector un espectrómetro de masas, existe cierta ventaja en comparación con los demás ya que permite identificar cada analito que va eluyendo de la columna.

Los solutos que eluyen de la columna cromatográfica son registrados por el detector y la representación gráfica de las señales de este detector a través del tiempo constituye un cromatograma. En un cromatograma (fig. 10) se observan curvas en forma de picos y cada pico representa a un analito cuando la separación de la mezcla fue completa. El tiempo en el que se registra la señal más intensa de cada pico se conoce como el tiempo de retención del analito y es característico para cada compuesto. Para asignar las señales a los solutos correspondientes es necesario primero utilizar disoluciones de estándares. De esta forma, es posible identificar los compuestos en un cromatograma según su tiempo de retención.

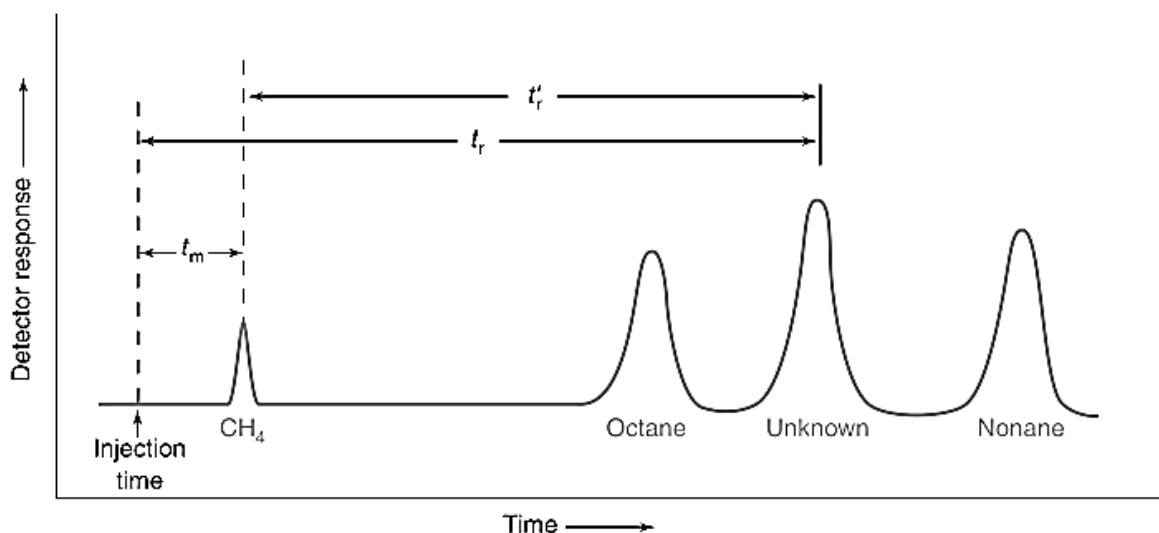


Figura 10. Representación de un Cromatograma.

En cromatografía de gases se pueden utilizar diferentes tipos de columnas, como por ejemplo columnas empacadas y columnas capilares. Actualmente las columnas capilares de sílice fundida son las más utilizadas. De éstas, las que cuentan con un diámetro interno de 0.2 a 0.25 mm y las de 0.32 mm continúan siendo las más populares, aunque las de diámetro interno de 0.10 a 0.18 mm permiten análisis más rápidos y ofrecen una mejor sensibilidad. Entre las fases estacionarias más populares se encuentran: 100% metilsilicón, 5% fenilmetilsilicón, polietilenglicol (WAX) y 50% fenilmetilsilicón. Estas fases cuentan con diferentes niveles de polaridad y su elección dependerá de los analitos que se pretendan estudiar.

La viscosidad de la película de la fase estacionaria bajo las condiciones térmicas utilizadas en cromatografía de gases es una consideración importante, pues ésta se relaciona con la eficiencia y la estabilidad del recubrimiento. La popularidad de fases no polares de polisiloxano se debe en parte al hecho de que su viscosidad es casi independiente de la temperatura. Sin embargo, al introducir fenilos y grupos funcionales más polares a la estructura de polisiloxano se reduce la viscosidad del polisiloxano a temperaturas elevadas, lo que resulta en inestabilidad térmica.^{39,40,41,42,43}

La espectrometría de masas es una técnica analítica que permite identificar diversas sustancias al fragmentarlas y producir espectros de los fragmentos resultantes. Y frecuentemente se encuentra acoplada a la cromatografía de gases y este arreglo permite estudiar una amplia variedad de compuestos químicos. Entre sus ventajas se encuentran su buena sensibilidad, bajos límites de detección, velocidad de análisis y diversidad de aplicaciones.⁴⁴

Un espectrómetro de masas consiste en una cámara de ionización y un analizador de masas por la relación masa carga (m/z), en este último se tienen varias opciones siendo los más usados como analizadores de masas, el cuádruplo o el de trampa de iones, el primero es el más utilizado, además de un detector y un sistema de adquisición de datos.

El funcionamiento del espectrómetro de masas consiste en que los analitos de interés entran a la cámara de ionización donde son ionizados y fragmentados, en el caso de la ionización electrónica por un bombardeo de un haz de electrones cuya energía es de 70eV. Los iones fragmento generados se dirigen hacia el analizador para que se realice una selección en función de la relación masa/carga (m/z), y posteriormente son detectados y procesados para así obtener la información deseada.

El acoplamiento GC/MS consiste en primer lugar en la separación de los analitos de una mezcla en el cromatógrafo de gases y después de ser separados los compuestos por el cromatógrafo entran a la cámara de ionización del espectrómetro de masas. Esta técnica es muy sensible puede alcanzarse límites de detección muy bajos (ng/L) y puede ser muy selectiva, dado que puede realizarse diversos tipos de ionización y por los distintos modos de adquisición de los datos; generalmente se utilizan dos, el barrido de iones (SCAN, por sus siglas en inglés) y el monitoreo selectivo de iones (SIM, por sus siglas en inglés). En el modo SIM se alcanza una mayor selectividad y sensibilidad en el análisis, pero puede incrementarse aún más cuando se aplican técnicas de ionización selectivas.⁴⁵

El procesador nos proporciona un cromatograma y para cada analito un espectro de masas y éste es característico para cada compuesto.

En las técnicas cromatográficas la identificación de cada compuesto se realiza mediante la comparación de los tiempos de retención respecto a un estándar y en el sistema acoplado GC/MS (fig. 11) se suma la comparación con el espectro de masas obtenido por el mismo método de ionización, generalmente se emplea una base de datos del *NIST (National Institute of Standards and Technology)*.

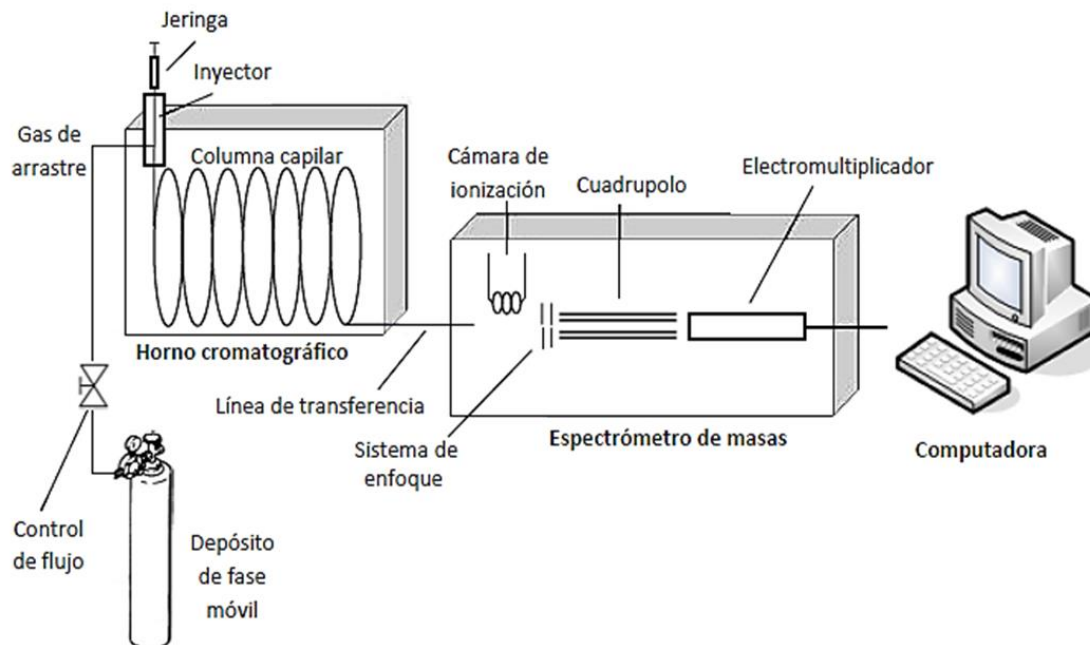


Figura 11. Esquema de la instrumentación para cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas.

4. Desarrollo Experimental

Esta sección de este trabajo fue realizada en el posgrado localizado en el sótano del edificio b de la facultad de química en el laboratorio 102 supervisado por el Maestro en ciencias Francisco Rojo Callejas, el cual se desarrolló con los reactivos, materiales y equipos siguientes y se realizaron las pruebas necesarias para el desarrollo de este trabajo.

4.1 Reactivos, Material y Equipo

4.1.1 Reactivos

- 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
- Agua desionizada ultrapura (resistencia específica mayor de 12 Mohm/cm)

4.1.2 Materiales

- Viales roscados de vidrio de 5mL con fondo cónico (Supelco) y con válvula minert.
- Viales de ámbar de 7mL con tapón.
- Jeringas Hamilton de 1µL.
- 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 triangulares.
- 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 organofosforados de ampollitas de 1mL (10 µg/mL) (M-622-SET AccuStandard).

4.1.3 Equipos

- Cromatógrafo de gases, Hewlett Packard Agilent 5890 Plus Series II acoplado a un espectrómetro de masas cuadrupolar Hewlett Packard 5971A.
- Columna capilar termo TR-5MS, 20m x 0.18mm x 0.18 μ m de película de fase estacionaria, 95% dimetilarileno-pilissiloxano 5% fenilpolisilfenilensiloxano.⁴⁶
- Balanza analítica, Ohaus AP250D.
- Micropipeta repetidora Multipette Plus (Eppendorf).
- Vortex IKA (lab dancer) 2800 rpm.
- Parrilla de calentamiento magnética Barnstead/Thermolyne Super-Nuova.
- Dispositivo de punción, lancetas Accu-Chek (Softclix).

4.2 Preparación de las disoluciones

Para la preparación de las disoluciones se partió de un estándar de una mezcla de compuestos Organofosforados de 10 μ g/mL (M-622-SET AccuStandard) en hexano. Se preparó una disolución stock de 1 μ g/mL de una mezcla de pesticidas Organofosforados, de la disolución estándar se tomó una alícuota correspondiente a 0.5mL de la mezcla y se colocó en un matraz volumétrico de 5mL, se evaporó el disolvente con nitrógeno y se llevó al aforo con metanol. De esta disolución se partió para preparar el resto de las posteriores disoluciones.

4.3 Preparación de muestras de sangre enriquecidas

Debido a que no se tienen muestras de sujetos expuestos, se prepararon muestras enriquecidas de sangre del analista. 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 lancetas y un dispositivo de punción, una vez hecha la punción, se colocó la sangre en los círculos de papel tamiz hasta que quedaran totalmente impregnados con sangre. Se llenaron los círculos marcados en cada tarjeta y se dejaron secar durante 24 horas en una caja petri.

Al día siguiente se guardaron en una bolsa de plástico hermética con un desecante. Antes de la obtención de la muestra de sangre se cortaron círculos de 6 mm de diámetro del papel tamiz neonatal con una perforadora manual para las pruebas de desorción después se fortificaron dichos círculos con sangre con 10 μ L de disolución madre de OPP's 1 μ L/mL con la micropipeta repetidora con puntas de 0.1 mL. Los círculos se colocaron dentro de una caja de Petri y se dejaron secar durante cinco minutos después de secarse, cada círculo se colocó al mismo tiempo en su vial correspondiente, que contenía 2.0 mL metanol (desorción simultánea). Posteriormente, se desorbieron agitando con un vortex a 2800 rpm por 1 minuto después, se retiró el círculo de papel para evitar que los analitos se volvieran a adsorber y los viales se utilizaron para los análisis.

4.4 Condiciones cromatográficas

El Inyector y la línea de transferencia se fijaron a 300°C. Rampa de temperatura: 60°C un minuto, 20°C/min hasta 160°C tres minutos, 10°C/min hasta 300°C y 1 min. Inyección en modo splitless, flujo de helio 0.500 mL/min. El espectrómetro de masas con cuadrupolo se utilizó con ionización electrónica (70 eV) en modo scan para las pruebas iniciales en un intervalo de 50 a 400 uma y posteriormente en modo SIM. El voltaje del detector se fijó en ~1.3 kV. La generación de datos comenzó a los 4.50 minutos de cada análisis. La temperatura de la fuente de ionización se mantuvo en 230°C y la del cuadrupolo en 150°C. Los iones que se utilizaron en el modo SIM para detectar a cada compuesto correspondieron al ion molecular en todos los casos y fueron los indicados en la (Tabla 9).

Tabla 9. Iones característicos en el espectro de masas para la identificación de los OPP's que se utilizan para el monitoreo selectivo de iones (SIM) con respecto a su tiempo de retención (*tr*) y relación masa carga (*m/z*) de los iones seleccionados.

OPP's	<i>tr</i> (min)	<i>m/z</i>	OPP's	<i>tr</i> (min)	<i>m/z</i>
Diclorovos	4.5	109, 145, 185	Fention	13.2	153, 169, 278
Fosdrin	6.4	127, 192, 224	Tricloronato	13.3	269, 297
Profos	8.4	158, 200, 242	Tetraclorovinfos	14.6	240, 331, 333
Forato	9.2	121, 260	Tokution	14.9	162, 267, 309
Demeton-S	9.9	88, 171, 258	Butifos	15.7	169, 202, 314
Diazinon	10.6	152, 179, 304	Fensulfotion	15.9	265, 293, 308
Disulfoton	10.9	186, 274, 142	Sulprofos	16.3	188, 312, 354
Fenclorofos	12	125, 285, 287	Gution	18.5	132, 160
Metil paration	12.1	246, 263	Coumafos	19.5	109, 226, 362
Clorpirifos	12.8	197, 258, 314			

4.5 Condiciones óptimas de extracción

La técnica de Microextracción en Fase sólida en el modo de vapor sobrenadante se eligió porque los analitos de interés son compuestos semivolátiles, y dicha técnica es utilizada para este tipo de compuestos en muestras acuosas y con base a reportes previos del análisis de plaguicidas organofosforados y otros compuestos por las condiciones que afectan la extracción de los analitos en estudio son el tipo de fibra, la temperatura de extracción, velocidad de agitación del sistema y tiempo de extracción (equilibrio). Para la optimización del análisis se utilizó disoluciones con concentración de 0.1 µg/mL de la mezcla de OPP's.

17,21

4.5.1 SPME, selección de la fibra y velocidad de agitación

Técnica de SPME

Esta técnica se propuso por sus distintas características:

- Técnica de enriquecimiento usada para análisis de trazas
- Técnica de extracción libre de solvente para análisis de cualquier tipo de muestra o matriz
- Técnica alternativa a análisis por (head-space) y extracción en fase solida (SPE)
- Interface directo con el GC
- No destructivo
- Reusable (100+ veces)

Debido a que se necesita escoger una fibra para utilizar esta técnica se procede a utilizar una con la cualidad de ser no polar y polar, debido a que la mezcla de OPP's son de ambas polaridades entonces escogimos la fibra 65 μm PDMS-DVB tipo adsorbente puede ser utilizada para la extracción de dichos OPP's. La fibra fue acondicionada antes de cada análisis, durante 20 min a 200 °C. Las condiciones iniciales de extracción fueron: 2 mL de muestra 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 65 \pm 2 °C durante 30 min de extracción y con una desorción durante 3 min.^{17,35,36}

La técnica que se utiliza para el análisis fue la de head-space la cual tiene las siguientes consideraciones analíticas considerando lo siguiente:

- Volatilidad de la muestra
- Tiempo de extracción es relevante
- Matriz de la muestra
- Selectividad de los analitos

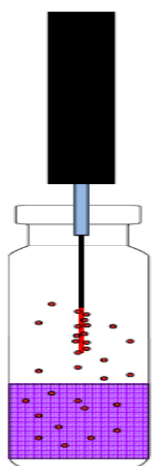


Figura 12. Extracción head-space, la muestra líquida o sólida se encuentra en la parte de abajo y los compuestos se extraen por la fibra al volatilizarse.

La velocidad de agitación de 600, 800 y 1000 rpm, para determinar la velocidad de agitación óptima.

4.5.2 Temperatura de extracción

Para evaluar la temperatura de extracción se probaron tres diferentes temperaturas, 45°C, 55°C y 65°C, velocidad de agitación 1000rpm, tiempo de adsorción 15 min y tiempo de desorción 3 minutos.

4.5.3 Tiempo de extracción

Los Tiempos que se propusieron para una mejor extracción de los OPP's, se evaluaron al exponer la fibra a la muestra a varios tiempos 10,15 y 20 min con agitación de 1000 rpm, temperatura de 55 ± 2 °C y desorción de 3 min.

4.5.4 Tiempo de desorción

Las condiciones de extracción fueron a 55 ± 2 °C, 1000 rpm por 20 min, y el tiempo de desorción se realizaron experimentos exponiendo la fibra en el inyector a diferentes tiempos 1, 3 y 5 min.

4.6 Evaluación de parámetros estadísticos y validación del método

4.6.1 Linealidad

La prueba se realizó a partir de la mezcla de OPP's 1µg/mL. Con la que se prepararon disoluciones de 0.1 µg/mL en metanol hasta llegar a la concentración de 1µg/mL.

4.6.2 Limite de detección y de cuantificación

Se determinó el límite de detección para los analitos realizando siete pruebas con cirulos de (TMN) con solo estándar de OPP's, a los cuales se adicionaron 100µL disolución estándar a 1 ppm (10 µL cada 30 segundos). Considerando que se dejó evaporar el disolvente y que el volumen de cada gota de sangre es de 50 µL la concentración final se calcula con la ecuación 1:

$$1 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \times \frac{100\mu\text{L}}{50\mu\text{L}} = 2\mu\text{g/mL} \quad \text{Ecuación 1}$$

Para realizar el cálculo del límite de detección se utilizaron la siguiente ecuación:

$$LD_{\text{Area}} = 2t_{\alpha=0.95}^{\phi=6} \frac{\sigma = des\ std}{\sqrt{n}} \quad \text{donde}$$

t = valor para t de studet para seis grdos de libertad y 95% de confiabilidad

n = es el numero de repeticiones **Ecuación 2** ⁴⁶

Donde el factor de cobertura se utilizó como 95% con seis grados de libertad. El factor de respuesta se obtuvo al dividir el área promedio de las siete repeticiones entre la concentración de estándar utilizada. Obteniendo como primer dato el límite de detección en función del área obtenida de cada pico.

$$Factor\ de\ respuesta = \frac{Area\ promedio}{Concentración\ utilizada} \quad \text{Ecuación 3}$$

El límite de detección en función de la concentración se obtuvo dividiendo el límite de detección en función del área obtenida para cada compuesto entre el factor de respuesta calculado.

$$LD_{concentración} = \frac{LD_{area}}{Factor\ de\ respuesta} \quad \text{Ecuación 4}$$

Finalmente el límite de cuantificación se obtiene de la siguiente ecuación, el cual nos da el resultado de la cantidad más pequeña que podemos reportar con una determinada variación máxima la cual se fijó en un 10%.

$$LC_{cuantificación} = 10t_{\alpha=0.95}^{\theta=6} \frac{\sigma = des\ std}{\sqrt{n}} \quad \text{Ecuación 5}$$

4.6.3 Recobro

Para calcular el recobro relativo, se tomaron como referencia los resultados de la inyección directa de OPP's 1 µL con una concentración de 0.5 µg/mL, contra las microextracciones de estándares OPP's con la misma concentración y también contra ellos se compararon los resultados de las microextracciones con sangre fortificada a esa misma concentración, considerando que la cantidad adicionada debe extraerse totalmente y por ello representa el 100%, así al cuantificar cada una de las muestras se realiza la comparación entre la concentración adicionada y la concentración obtenida, para ésta última se calcula el porcentaje al cual corresponde.

$$\%R_{estándar} = \frac{Área\ en\ el\ cromatograma\ del\ OPP's\ obtenido\ por\ SPME\ estándar}{Área\ en\ el\ cromatograma\ del\ OPP's\ obtenido\ de\ inyección\ directa} * 100 \quad \text{Ecuación 6}$$

$$\%R_{sangre} = \frac{Área\ en\ el\ cromatograma\ del\ OPP's\ obtenido\ por\ SPME\ en\ sangre\ fortificada}{Área\ en\ el\ cromatograma\ del\ OPP's\ obtenido\ de\ inyección\ directa} * 100 \quad \text{Ecuación 7}$$

$$\%R_{relativo} = (\%R_{sangre} + \%R_{estándar})/2 \quad \text{Ecuación 9}$$

4.6.4 Evaluación de la repetibilidad

La repetibilidad de cada punto se calculó dividiendo la desviación estándar (s) de cada grupo de áreas de cada OPP's correspondiente a una concentración determinada dentro de la curva de calibración entre el promedio de las áreas y el resultado entonces se expresó como un porcentaje.

$$(\%)RDS = \frac{\text{Desviación estándar}}{\text{Promedio áreas}} * 100 \quad \text{Ecuación 5}$$

4.6.5 Reproducibilidad intermedia

Se determinó con la ayuda de un compañero de laboratorio, quien realizó el método analítico por triplicado luego de recibir instrucciones detalladas paso a paso de las condiciones y del método optimizado que se desarrolló en este trabajo. Posteriormente, se compararon sus resultados con otros efectuados anteriormente con disoluciones de la misma concentración y calculando las diferencias de la abundancia absoluta y de los coeficientes de variación.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Método cromatográfico y separación de los compuestos

La separación obtenida en el análisis por cromatografía de gases se llevó a cabo en el programa de temperatura que se muestra a continuación:

- Temperatura inicial de 60°C
- 20°C/min hasta 160°C 3 minutos
- 10°C/min hasta 300°C 1 minuto
- Inyector y línea de transferencia a 300°C

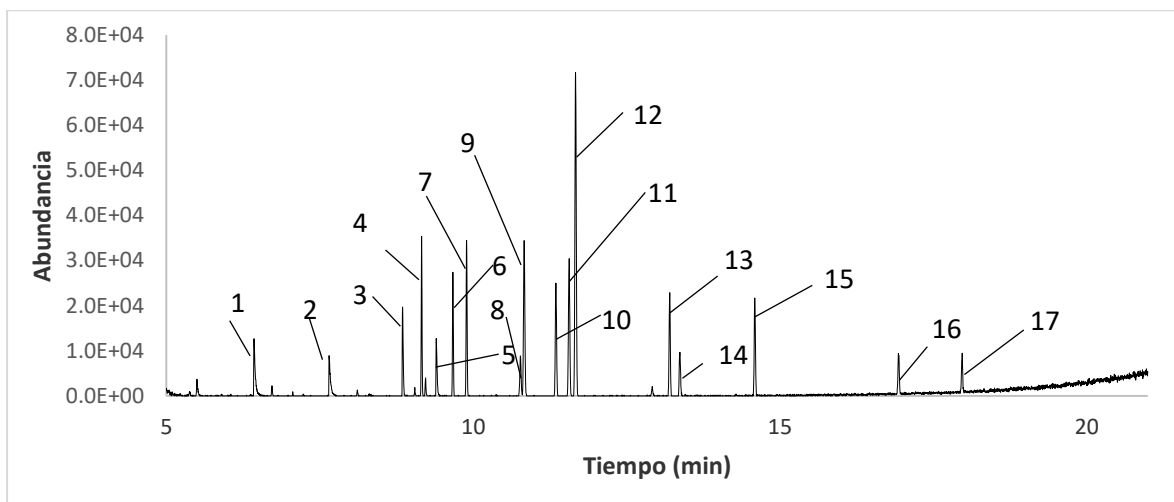


Figura 13. Cromatograma obtenido de la mezcla del estándar de OPP's 10 µg/mL por inyección directa en modo SCAN.

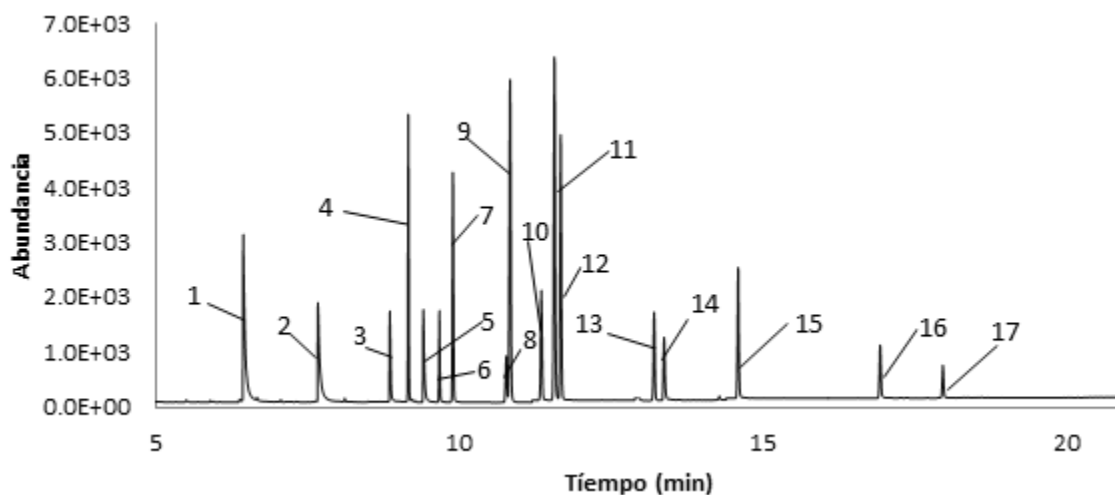


Figura 14. Cromatograma obtenido de la mezcla del estándar de OPP's 10 µg/mL por inyección directa en modo SIM.

Los OPP's según su orden de elución y su identificación correspondiente, para los cromatogramas obtenidos (*Figuras 13 y 14*) son los siguientes: 1)Dichlorvos, 2)Phosdrin, 3)Prophos, 4)Phorate, 5)Demeton-S, 6)Diazinone, 7)Disulfoton, 8)Methyl parathion, 9)Fenchlorfos, 10)Chlorpyrifos, 11)Fenthion, 12)Trichloronat, 13)Tokution, 14)Tributyl, 15)Sulprofos, 16)Guthion, 17)Coumaphos.

Como se puede observar en la (*Figura 13 y 14*), muestran los cromatogramas obtenidos para la mezcla de OPP's y se puede observar que algunos compuestos coeluyen al realizar la detección por modo SCAN donde se realizó un barrido completo en el cromatograma y se observó que con la mezcla del estándar en inyección directa una buena respuesta del equipo para poder observar los compuestos organofosforados e identificarlos por medio del espectrómetro de masas y después se realizó un barrido de nueva cuenta por inyección directa del equipo pero esta vez por el método SIM donde se realizó previamente la identificación de los compuestos de interés para que el equipo pudiera detectar principalmente los compuestos organofosforados de interés, estos analitos se encuentran a concentraciones similares, pudiéndose observar una diferencia significativa en los factores de respuesta dado que en la (*Figura 14*) se encuentran más definidos los picos para cada compuesto. En el caso del 8)Methyl Paration/9)Fenchlorfos, 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.

La identificación de cada uno de los OPP's fue mediante sus características químicas, espectro de masas y posteriormente la confirmación con la biblioteca de Espectros de Masas del NIST (Mass Spectral Search Program for the NIST/EPA/HHH Mass Spectra Library, 2001).

5.2 Optimización de los parámetros para las microextracciones SPME

En Esta sección se realizaron varias pruebas, para optimizar la técnica de microextracción en fase sólida para los compuestos organofosforados, que se observaron en nuestro previo análisis de la mezcla de organofosforados, en donde se realizaron varias pruebas de optimización las cuales se seleccionaron previamente como las principales para el desarrollo dado los conocimientos previos obtenidos de acuerdo a la bibliografía.

5.2.1 Optimización de la velocidad de agitación

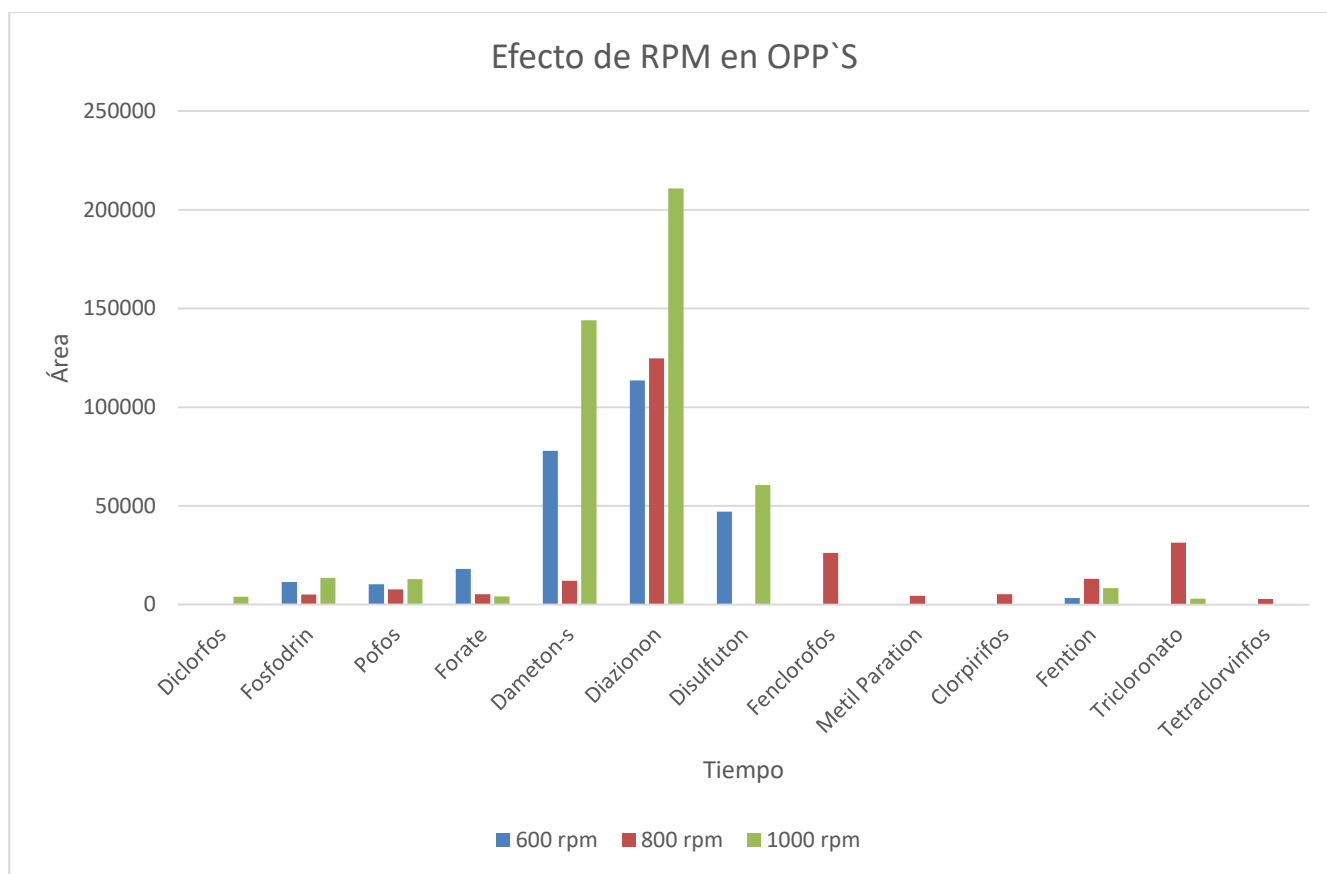


Figura 15. Efecto de la velocidad de agitación en la extracción de OPP's.

En la (Figura 15) se muestra el efecto de la velocidad de agitación en la extracción de OPP's, se observa que a 800 rpm la cantidad de pesticidas extraídos es mayor que a 600rpm y que a 1000rpm. En general la agitación acelera la transferencia de los analitos hacia el polímero de la fibra. Cuando se trata de matrices líquidas compensa sus bajos coeficientes de difusión. 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. Se observó que a velocidades altas rpm 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.

Sin embargo, también se calcularon los coeficientes de variación (CV) para los resultados de todas las velocidades. Al poder observar diferencias más notables en esta gráficas (Figuras 16, 17 y 18), debido a estos resultados se escogió la velocidad de agitación que presentaba CV menores, que corresponde a 1000 rpm.

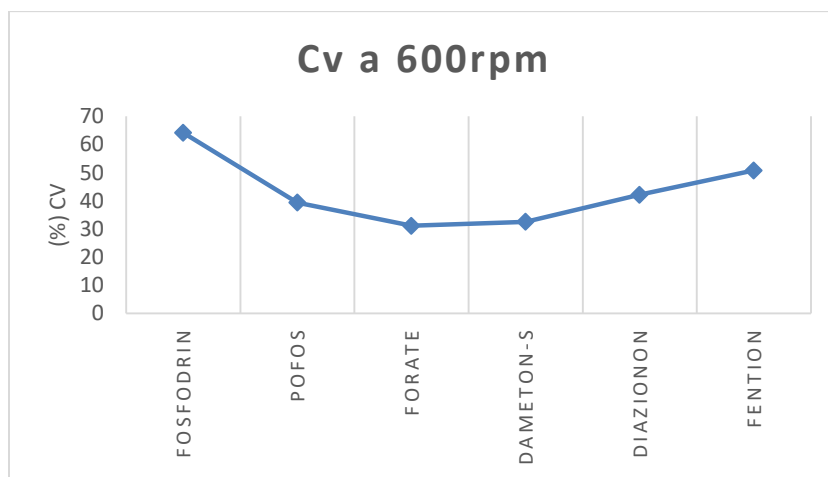


Figura 16. Coeficiente de variación para las microextracciones por SPME a 600 rpm.

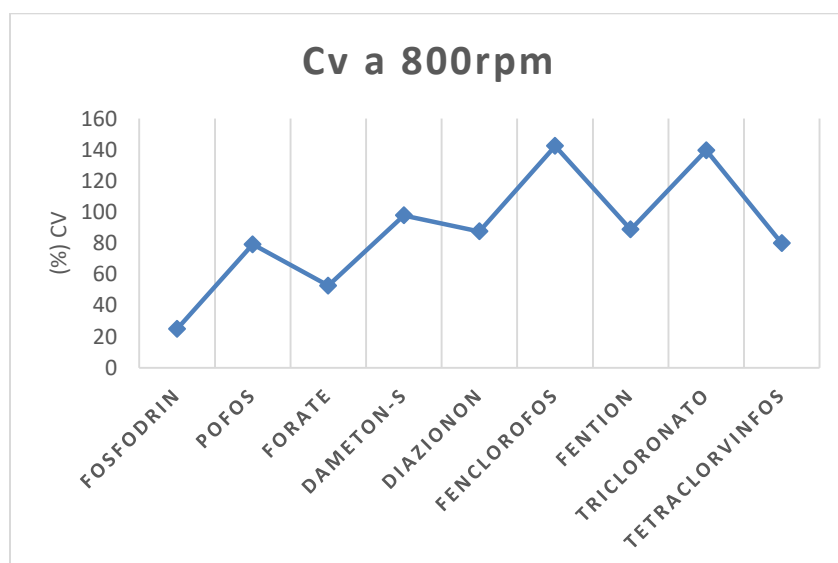


Figura 17. Coeficiente de variación para las microextracciones por SPME a 800 rpm.

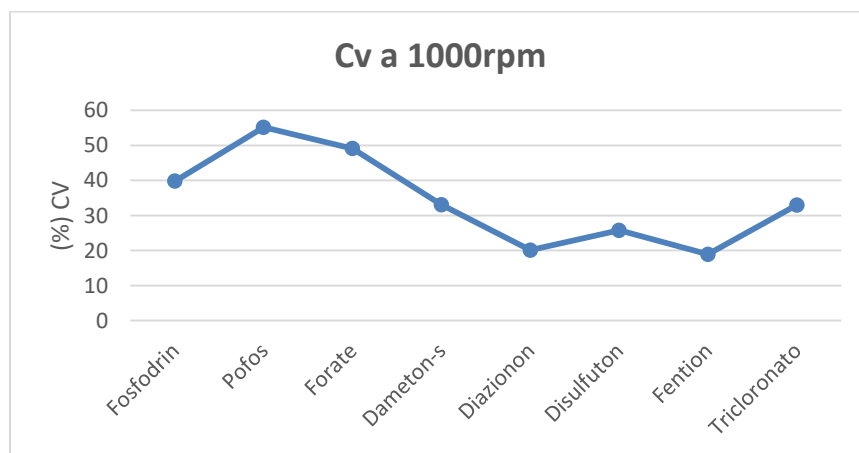


Figura 18. Coeficiente de variación para las microextracciones por SPME a 1000 rpm.

5.2.2 Optimización de la temperatura de extracción

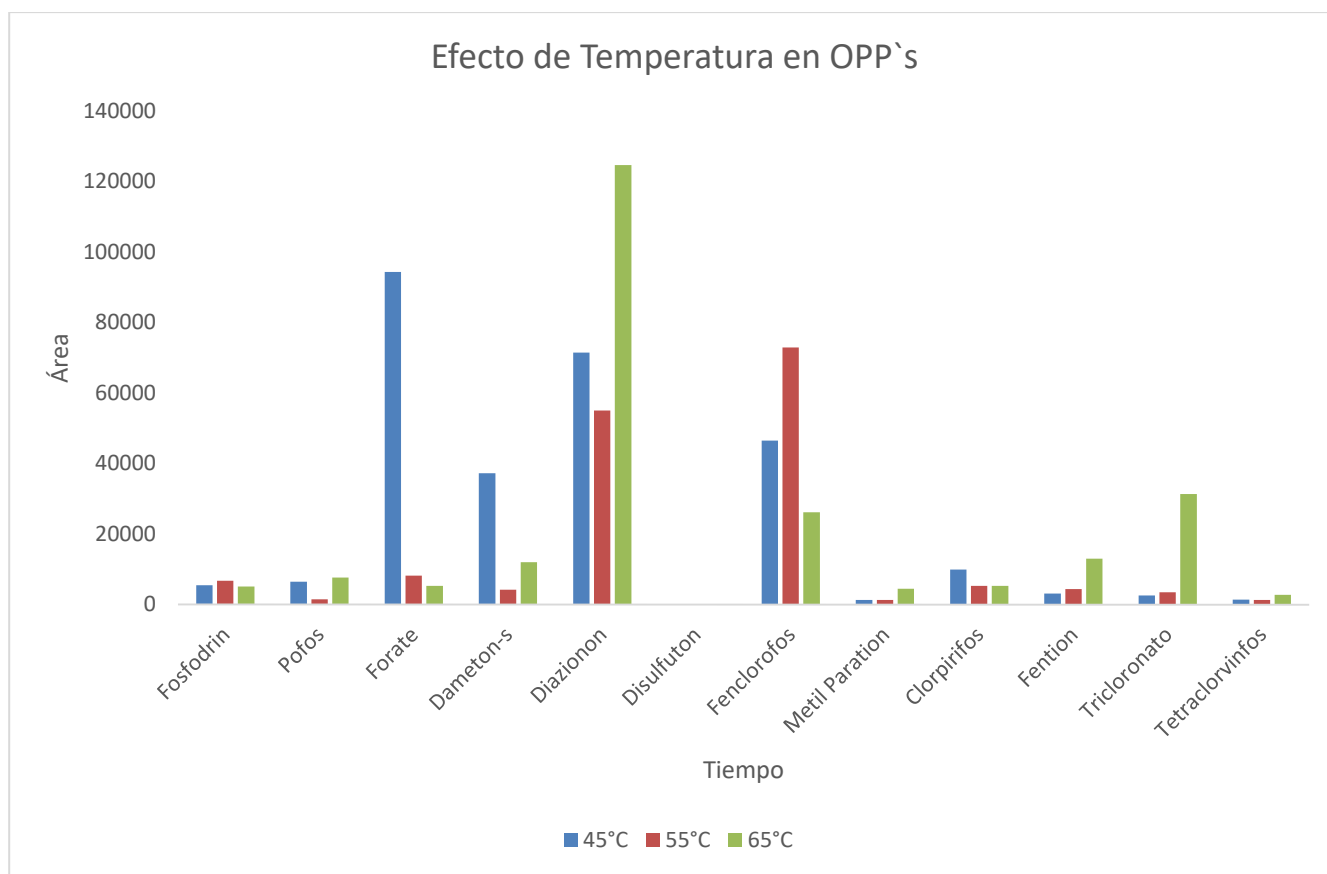


Figura 19. Efecto de la temperatura en la extracción de OPP's

En la (Figura 19) se observa que para varios compuestos, al incrementar la temperatura la cantidad extraída aumenta, en los casos de Forate y Demeton-s por el contrario, disminuye.

Un aumento en la temperatura de extracción provoca un incremento en la concentración de analito extraída, como se observa en los resultados.

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 65°C para que la cantidad extraída de los OPP's fuera la más adecuada.

De acuerdo a las Figuras 21,21 y 22), la temperatura cuyo coeficiente de variación fue el más bajo en general corresponde a 55°C. A esta temperatura las abundancias corresponden a una menor cantidad de las observadas a 65°C pero los resultados son más repetibles.

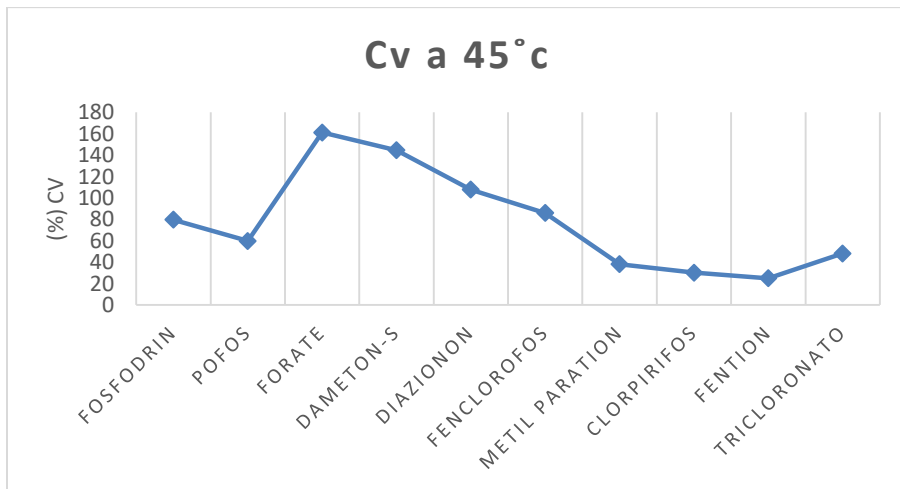


Figura 20. Coeficiente de variación para las microextracciones por SPME a 45°C.

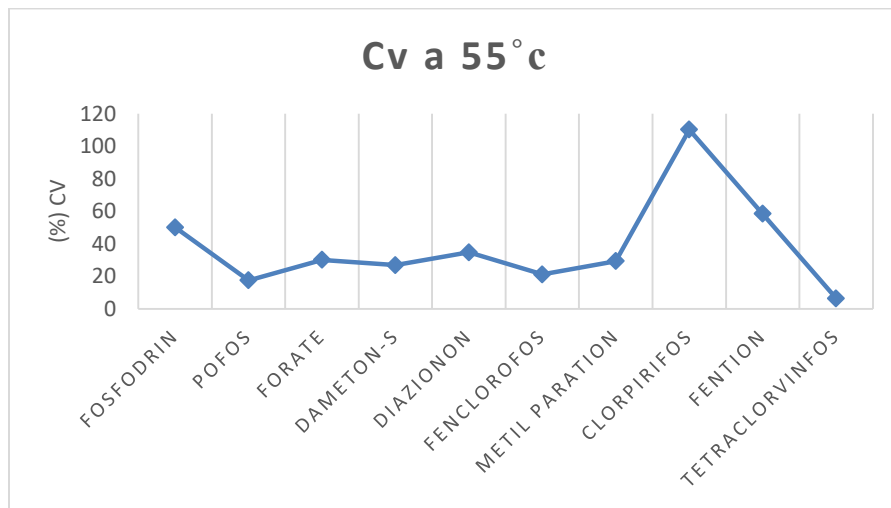


Figura 21. Coeficiente de variación para las microextracciones por SPME a 55°C.

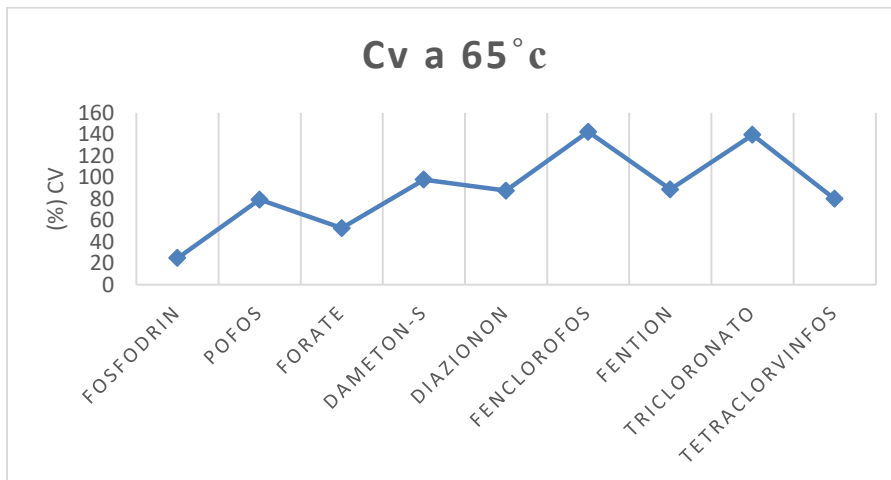


Figura 22. Coeficiente de variación para las microextracciones por SPME a 65°C.

5.3.3 Optimización del tiempo de extracción

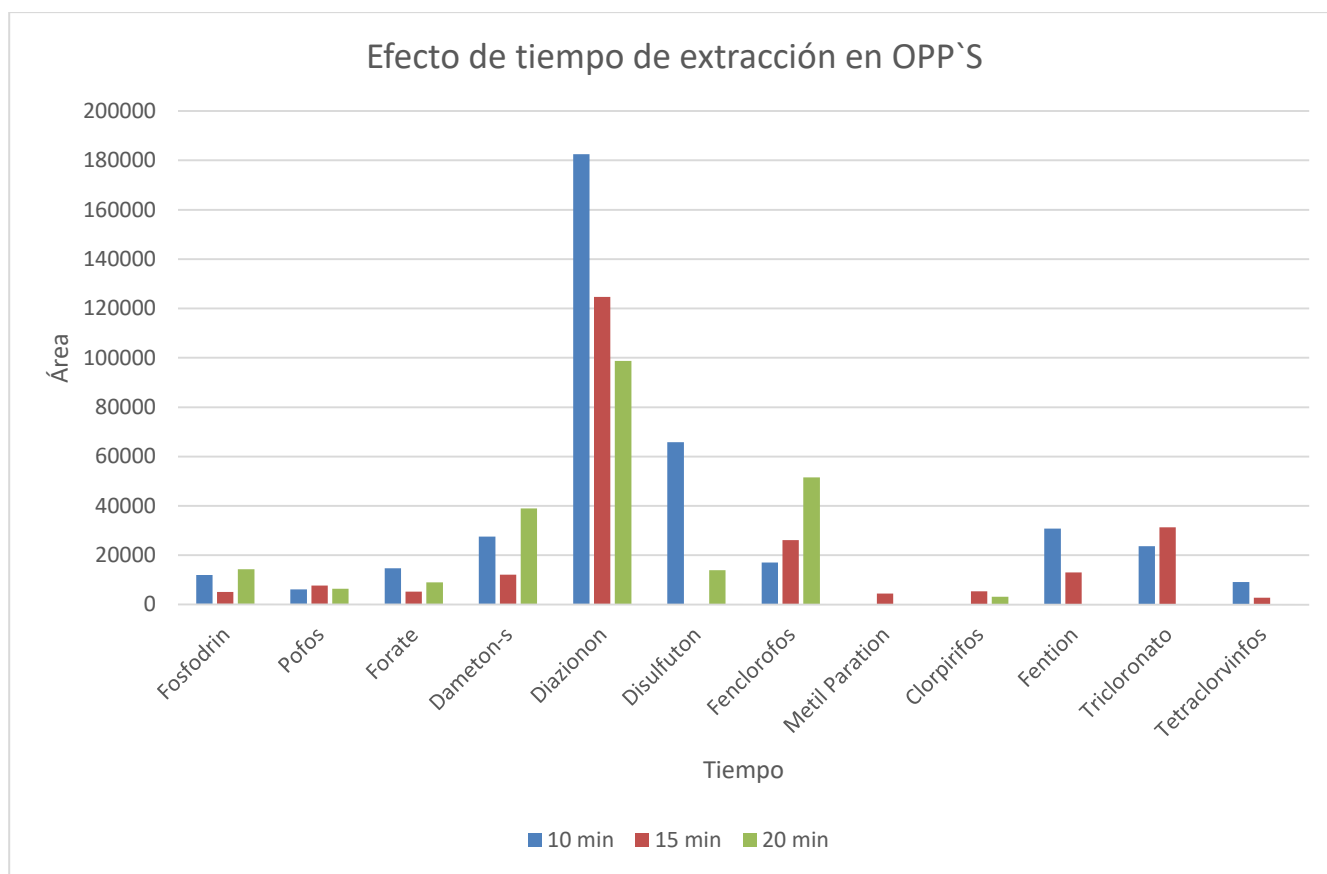


Figura 23. Efecto del tiempo en la extracción de OPP's

En las pruebas para optimizar el tiempo de extracción (Figura 23) se probaron intervalos de tiempo desde los 10, 15 y 20 minutos. Se observó que la abundancia de las extracciones aumentaba con el paso del tiempo hasta llegar a un máximo y posteriormente disminuía. El tiempo con el que se logró el mejor recobro fue a los 15 min idea acuerdo a su coeficiente de variación, el que tuvo el más bajo fue de 20 minutos (Figuras 25, 25 y 26), por lo que ése es el tiempo que se tomó el tiempo de 15 minutos debido a que se extraía un mayor número de OPP's para realizar las extracciones posteriores.

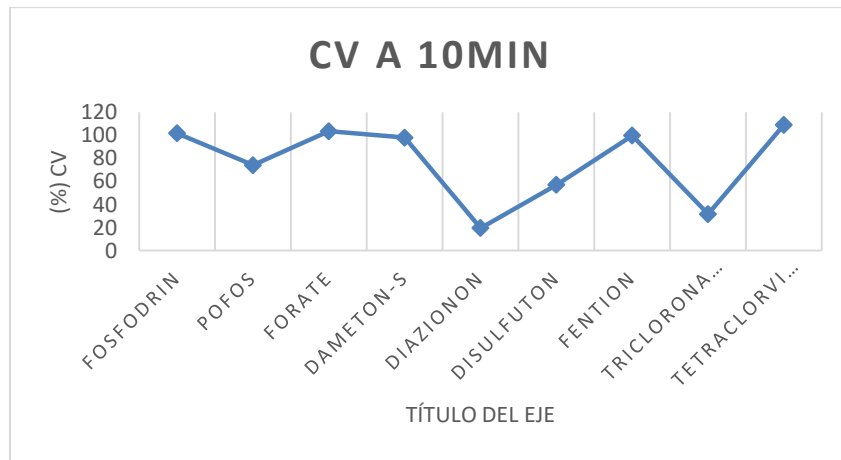


Figura 24. Coeficiente de variación para las microextracciones por SPME a 10min de extracción.

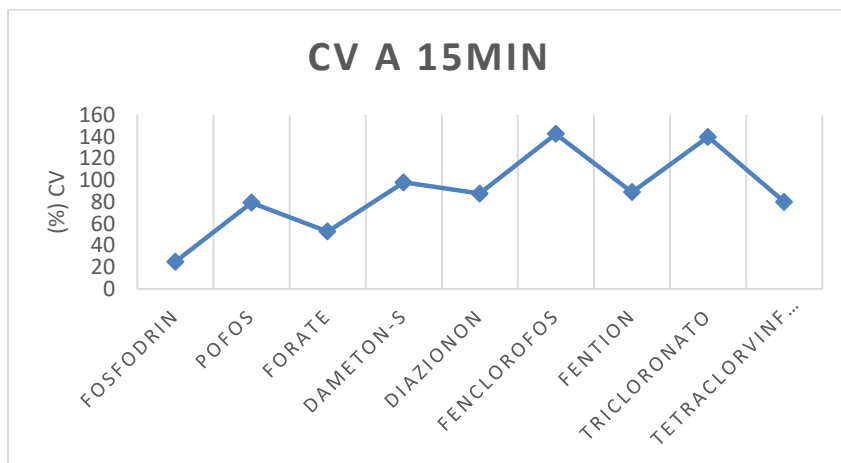


Figura 25. Coeficiente de variación para las microextracciones por SPME a 15min de extracción.

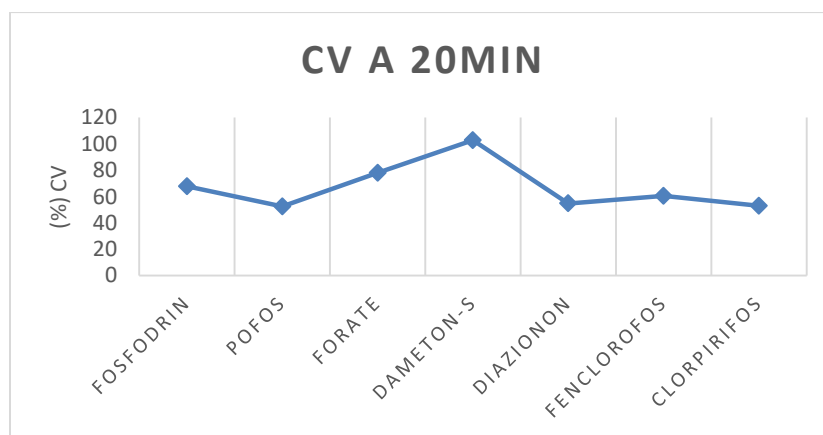


Figura 26. Coeficiente de variación para las microextracciones por SPME a 20min de extracción.

5.2.4 Optimización del tiempo de desorción

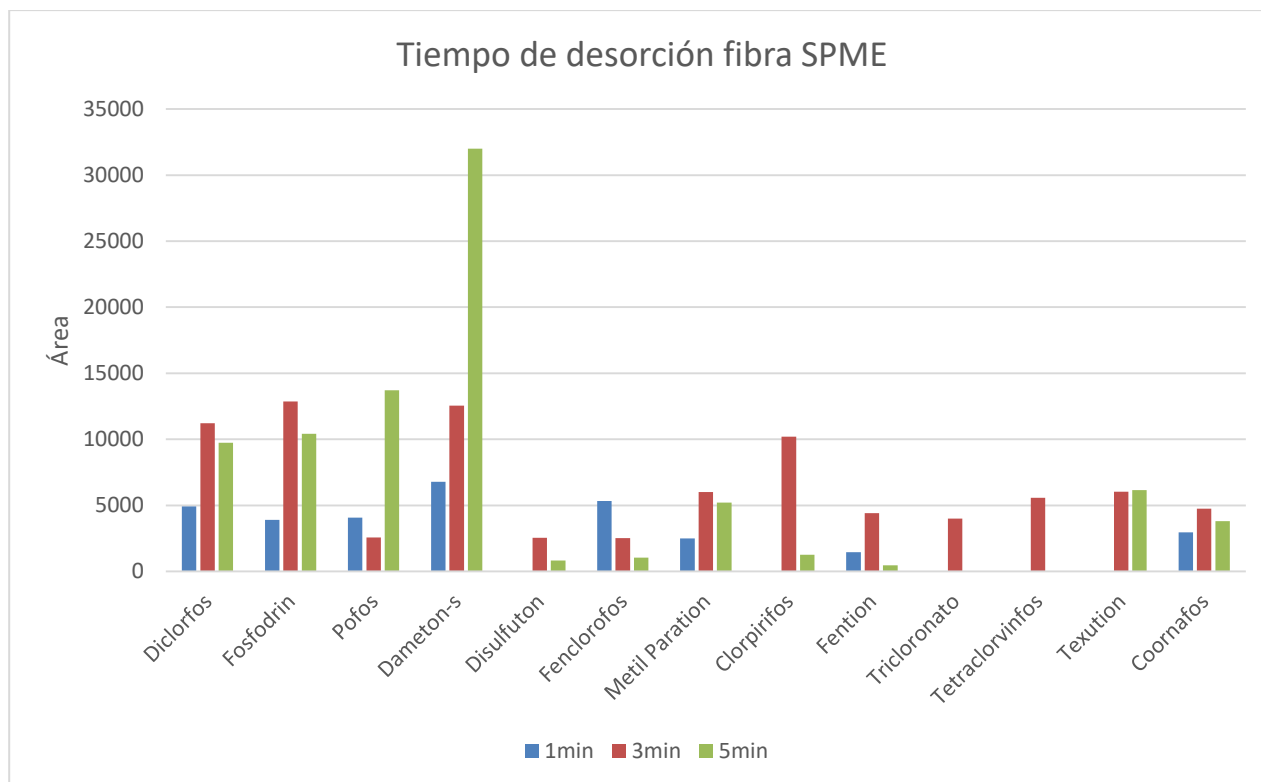


Figura 24. Efecto del tiempo de desorción en OPP's.

En la (Figura 27) Se pueden observar los distintos tiempos 1,3 y 5 minutos de desorción en el equipo de los OPP's y se observó que al aumentar el tiempo de desorción de la fibra en el equipo se obtiene una mayor detección de OPP's a los 3 minutos y al llegar a los 5 disminuía el número de OPP's detectados por el equipo y de acuerdo a su coeficiente de variación (Figuras 28,29 y 30) se puede observar que el más bajo se encontró en las pruebas de 3 minutos por lo que se seleccionó como el tiempo de desorción.



Figura 28. Coeficiente de variación para las microextracciones por SPME a 1min de desorción.



Figura 29. Coeficiente de variación para las microextracciones por SPME a 3min de desorción.

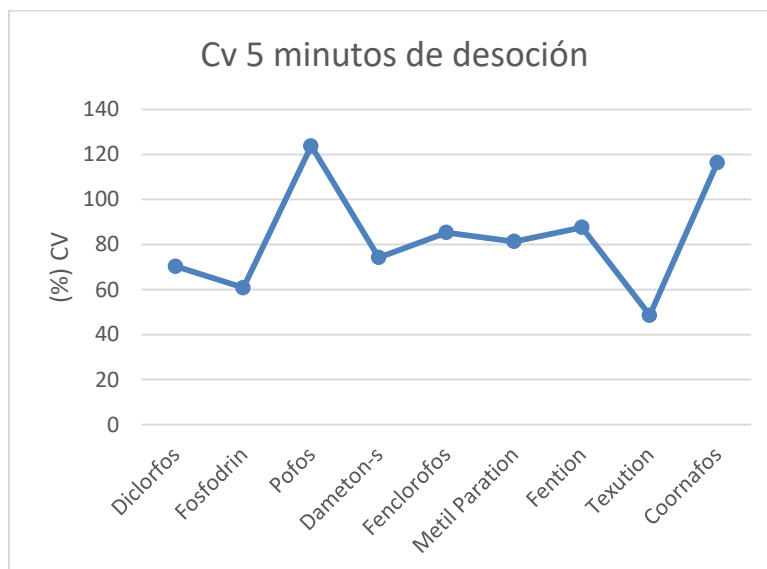


Figura 30. Coeficiente de variación para las microextracciones por SPME a 5min de desorción.

5.3 Procedimiento optimizado

Como parte de los resultados experimentales, a continuación se describe el procedimiento detallado al que se llegó para realizar las microextracciones a partir de muestras de sangre fortificadas por SPME.

1. Preparar la disolución madre a partir del estándar analítico y redissolver la disolución en el disolvente que se adapte mejor a las condiciones de trabajo.
2. Agregar la fase acuosa a los viales donde se vayan a realizar las microextracciones un volumen de 2 mL.
3. Para realizar una prueba con el tamiz metabólico neonatal, cortar los círculos del tamiz de las pruebas se vayan a realizar y asegurarse saturar de la muestra de sangre el círculo del TMN y colocar los círculos en una caja de Petri y dejar secar durante un día.
4. Agitar la disolución madre de 1 mg/mL de OPP's de 30 a 45 segundos, asegurar que la disolución genera un vórtice al agitarse para su mejor agitación y su mejor homogeneidad, esta parte se realiza siempre que se vaya a ocupar la disolución madre.
5. Fortificar las muestras con la micropipeta y verificar que la disolución madre llegue al ras de la punta de la micropipeta, después colocar la micropipeta en posición vertical sobre el círculo de sangre seca para capturar las gotas que salen proyectadas al presionar el émbolo, se debe ejercer una presión firme y breve sobre el papel y cuidar que cada aplicación sea lo más parecida posible a las demás, en el caso de los estándares solo se fortifica el TMN con estándar de OPP's.
6. Dejar secar las muestras durante cinco minutos.
7. Colocar cada muestra de tamiz metabólico neonatal en su vial correspondiente y taparlos.
8. Agitar cada vial durante dos minutos, el cual debe contener el disolvente y el círculo del TMN. Asegurar que se forme un vórtice dentro del vial. Al final de cada agitación se debe retirar el círculo de papel de la disolución. Luego de retirarlo, se deben limpiar las pinzas utilizadas con acetona para evitar contaminación cruzada entre muestras.
9. Colocar el agitador magnético y tapar el vial. Asegurar que los agitadores se encuentran limpios. Para ello, colocarlos en una disolución de H_2O_2 y luego limpiarlos con un papel con acetona.
10. Colocar el vial en el baño de agua a $55^{\circ}C$ y 1000 rpm. Procurar que el agua cubra lo más posible al vial y colocarlo de tal forma que se evite la formación de vórtices alrededor del mismo.

11. Esperar 15 minutos a que la disolución alcance equilibrio térmico con el baño de agua debido a que no es recomendable excederse de tiempo porque la sangre puede comenzar a descomponerse.

12. Proceso para SPME:

a) Optimizar la fibra para ello se acondiciona a una temperatura de 200°C durante 20 minutos antes de cada análisis para que elimine los posibles residuos de los compuestos anteriores.

b) Colocar el dispositivo de SPME en las pinzas de tres dedos, introduciendo la fibra en el vial de la disolución que contiene la muestra. Este movimiento debe ser rápido para evitar que se escapen algunos compuestos al volatilizarse y evitar que la fibra toque la disolución.

c) Realizar los pequeños ajustes necesarios para mover la fibra a su posición correcta dentro del vial. La fibra debe quedar a una altura intermedia y en una posición intermedia entre las paredes y el centro del vial, colocada en el modo de vapor sobrenadante (headspace).

13. Después del tiempo establecido para la extracción, retraer el émbolo para introducir la fibra en la aguja del dispositivo SPME y retirarla de las pinzas y al final del procedimiento se termine inyectando 1 μL de disolvente orgánico que se encontraba dentro de la fibra.

14. Inyectar la muestra al sistema GC-MS.

15. Retirar la fibra y retraer el émbolo hasta introducir la fibra en la aguja del dispositivo de SPME al terminar el tiempo de desorción de la fibra.

16. Realizar la prueba por triplicado y analizar los resultados. En este procedimiento existen algunos pasos críticos que afectan de manera importante los resultados. Éstos son:

- La manera en que se realiza la fortificación de las muestras de sangre, ya que si se mantiene presionada la punta de la micropipeta sobre el papel durante más tiempo del necesario, éste puede absorber más disolución de la especificada.
- Se debe retraer del vial o del septum del cromatógrafo totalmente la fibra con el embolo de sistema de SPME debido a que la fibra es muy frágil.
- La posición de la fibra dentro del vial debe ser siempre la misma para lograr la mejor repetibilidad.

5.4 Intervalo lineal

Para delimitar el intervalo lineal del método se realizaron curvas de calibración con concentraciones de OPP's entre 0 y 1 $\mu\text{g/mL}$. Es posible que en algunos casos los OPP's especialmente en los que se detectaban al último en los cromatogramas no fueron detectados correctamente por el equipo a bajas concentraciones. Es por ello que el intervalo lineal del método tuvo más variaciones de los resultados obtenidos para los primeros OPP's que se detectan en el equipo.

5.5 Curvas de calibración

Se realizaron curvas de calibración con estándares de OPP's, en ellas se observa una tendencia ascendente en la detección de OPP's debido a que a medida que aumentaba la concentración hasta 1 $\mu\text{g/mL}$ se detectaba un mayor número de OPP's.

Las curvas de calibración con muestras de sangre seca fortificadas se realizaron de la misma manera que las curvas con estándares acuosos. Las microextracciones de igual forma se utilizaron concentraciones que variaron desde 0.1 $\mu\text{g/mL}$ hasta 1 $\mu\text{g/mL}$. Los resultados se pueden observar en el anexo A.

5.6 Sensibilidad del método y límites de detección

De los resultados, se observa que el método es más sensible para los compuestos de masa mediana. El Metil Pataration es el OPP's para el cual el método es menos sensible y ello puede explicarse por las elevadas pérdidas de masa en el proceso de sublimación. La mayor sensibilidad se logró para el penúltimo pico cromatográfico y esto se puede explicar porque con este pico se cuantifican conjuntamente dos compuestos que no pudieron separarse. El OPP's que presenta la mejor sensibilidad es el pireno.

Para calcular los límites de detección, se utilizó la ecuación 2, empleando un valor de 2.3646 para la t de Student. Los resultados de estos cálculos se encuentran en la (Tabla 10).

Los límites de detección de los estadares OPP's (Tabla 10) varían desde 0.027 $\mu\text{g/mL}$ para el coornafos hasta 0.116 $\mu\text{g/mL}$ para el diclorfos. Aunque se trata de límites bajos, los límites de detección que se utilizarán en la práctica son aquellos calculados a partir de los datos de muestras de sangre fortificadas.

Esto puede considerarse como un buen resultado, especialmente tomando en cuenta que se parte de un tamaño de muestra muy pequeño. Sin embargo, no es posible afirmar que es suficiente para cuantificar estos OPP's en recién nacidos, ya que no fue posible conseguir muestras reales de recién nacidos de zonas afectadas y la vida media de algunos de estos compuestos dentro del organismo varía desde horas y hasta algunos meses.

Tabla 10. Cálculo del límite de detección y cuantificación utilizando las curvas de calibración de estándares OPP's.

OPP's	Límite de detección (µg/mL)	Límite de cuantificación (µg/mL)
Diclorfos	0.116	2.32
Fosfodrin	0.076	1.52
Forate	0.093	1.86
Dameton-s	0.088	1.76
Fenclorofos	0.041	0.82
Metil Paration	0.047	0.94
Clorpirifos	0.066	1.32
Fention	0.099	1.98
Tetraclorvinfos	0.065	1.3
Coornafofos	0.027	0.54

En la mayoría de los casos se observa una distribución aleatoria de los puntos aceptable de acuerdo con su desviación estándar, lo cual sugiere que en general, los resultados no fueron afectados de manera importante por errores sistemáticos, es posible que otras fuentes de error pero, no se observó una influencia significativa para los resultados del límite de detección.

5.7 Cuantificación de las extracciones

Para cuantificar el porcentaje de las extracciones primero se seleccionó la concentración de 0.5 µg/mL por encontrarse a la mitad de las curvas de calibración, en donde la confiabilidad de los resultados es mayor.

Se partió de una disolución madre de 1 µg/mL y la concentración de la fase orgánica dentro de la fibra luego de la extracción tiene el mismo valor de la concentración que se eligió. Como se describe en la sección 4.6.4, se debió tomar 1.0 µL para igualar la masa total de los analitos inyectados al sistema GC-MS debido a que ese es el volumen máximo de adsorción de la fibra.

Se inyectó entonces 1.0 µL por triplicado de la disolución madre y se calculó el promedio de las áreas para cada pico. Éste se consideró como el 100% teórico que podrían alcanzar las extracciones y como el 100% de respuesta que el equipo podía generar para esa concentración.

En la (Tabla 12) se encuentran los resultados de extracciones de una disolución de OPP's a 0.5 µg/mL en metanol. Se incluyen los resultados de microextracciones con estándares y con muestras de sangre fortificadas. Se han comparado contra el 100% teórico de la Inyección directa para calcular el rendimiento de la extracción. El naftaleno resultó ser el compuesto que menos se extrae fue el diazionon y esto puede deberse a que tiende a sublimar rápidamente durante el tratamiento de muestra.

Tabla 12. Cálculo de los recobros.

OPP's	(%) Recobro Estándar	(%) Recobro Sangre	(%)Recobro relativo
Diclorfos	36.36	35.35	35.85
Fosfodrin	58.89	51.66	55.27
Pofos	44.57	37.04	40.81
Forate	49.49	31.88	40.68
Dameton-s	46.19	41.32	43.76
Diazionon	28.14	24.98	26.56
Disulfuton	40.96	38.52	39.74
Fenclorofos	36.07	38.01	37.04
Metil Paration	43.62	37.33	40.48
Clorpirifos	32.04	25.99	29.01
Fention	58.63	33.33	45.98
Tricloronato	43.61	37.24	40.42
Tetraclorvinfos	55.054	41.56	48.31
Sulprofos	42.41	40.12	41.26

5.8 Evaluación de la repetibilidad

Para calcular la repetibilidad del método, utilizando las condiciones experimentales donde se obtenían los mejores resultados, utilizando la concentración de 0.5 µg/mL ya que se encuentra dentro de la curva de calibración, se realizó por triplicado donde se promediaron las áreas de los OPP's y se obtuvo su desviación estándar y se obtuvieron los resultados para la repetibilidad con la (Ecuación 5) los cuales se encuentran en la (Tabla 13).

Tabla 13. Repetibilidad del método.

OPP's	% (RDS)	OPP's	% (RDS)
Diclorfos	10.66	Metil Paration	22.44
Fosfodrin	4.21	Clorpirifos	24.86
Pofos	23.38	Fention	4.28
Forate	8.83	Tricloronato	17.98
Dameton-s	29.84	Tetraclorvinfos	6.91
Diazionon	17.18	Sulprofos	14.44
Disulfuton	26.93	Gution	23.05
Fenclorofos	33.92		

Los valores de RSD obtenidos experimentalmente son relativamente elevados. El más elevado correspondió al Fenclorofos. Es importante considerar que una de las fuentes de variabilidad más importante se genera cuando el operador inyecta manualmente la muestra al equipo GC-MS. Es por ello que, si se lograra automatizar esta o alguna otra de las operaciones involucradas en el método desarrollado, no se descarta el alcanzar valores de RSD suficientemente bajos como para que éste sea utilizado con fines médicos. El uso de un estándar interno, por otro lado, aunque aumentaría los costos del análisis, mejoraría notablemente la repetibilidad.

5.9 Cálculo de la reproducibilidad intermedia

Para determinar la reproducibilidad intermedia del procedimiento, se instruyó a un compañero de laboratorio para que implementara el método de análisis de OPP's por SPME en muestras de sangre seca fortificadas de tamiz neonatal y la prueba se realizó por triplicado. Comparando los resultados con los obtenidos originalmente a la misma concentración en el punto de calibración correspondiente a $0.5\mu\text{g/mL}$ de las pruebas con sangre fortificada y se calcula la variación entre ambos estos resultados se encuentran a continuación en las (Figuras 31,32).

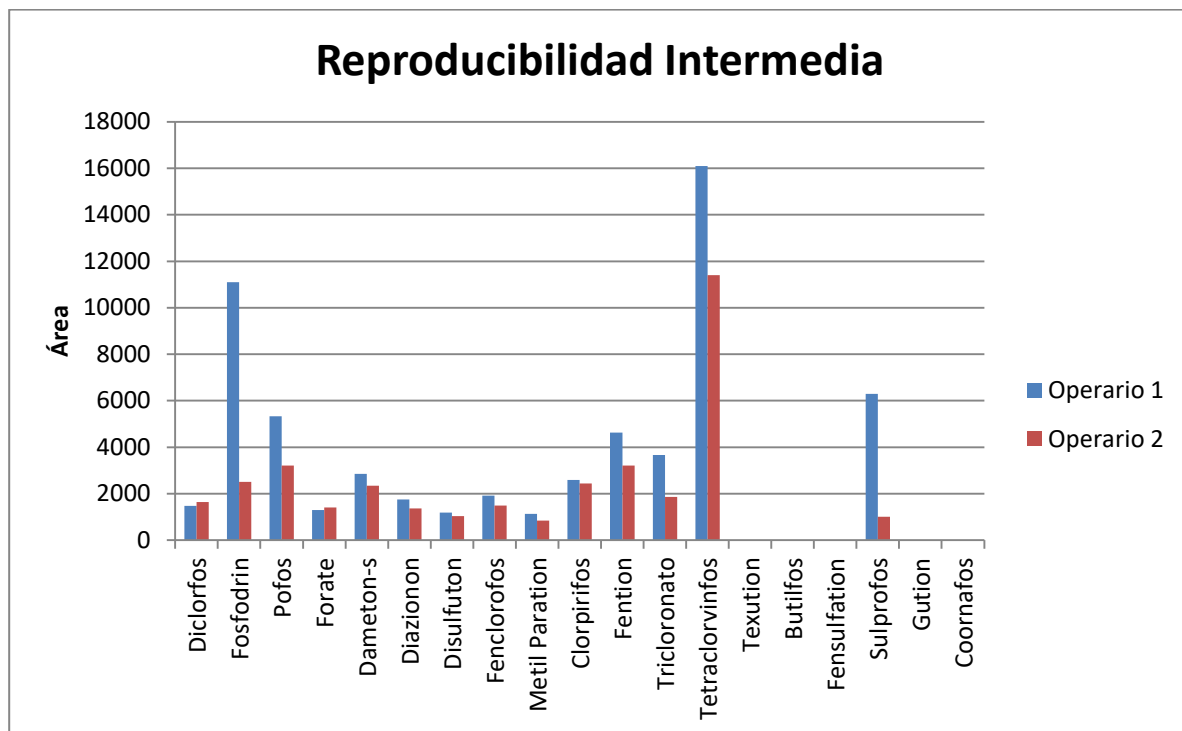


Figura 31. Reproducibilidad intermedia

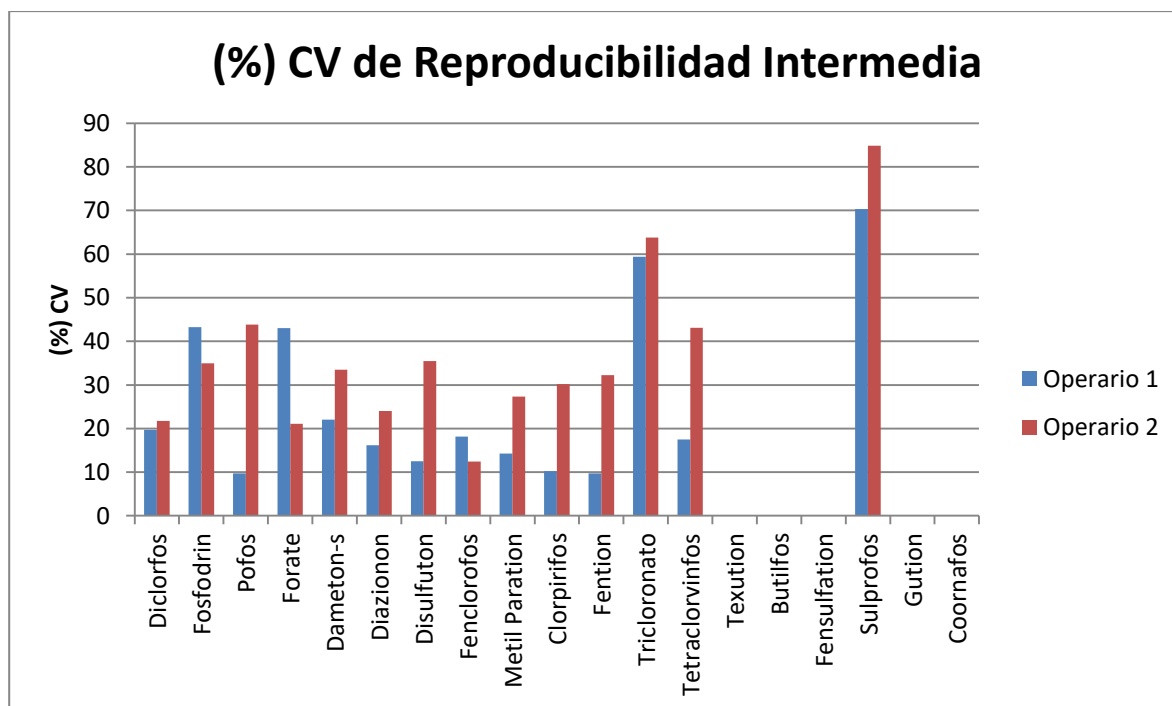


Figura 32. Coeficiente de variación de la reproducibilidad intermedia

Se observa que existen variaciones en las áreas totales de cada compuesto, en la mayoría de los casos al comparar los resultados de los operarios 1 y 2. Esto puede deberse a que, durante la fortificación de la sangre seca, el operario 2 con la punta de la micropipeta no hubiera mantenido presionada contra la tarjeta del tamiz neonatal durante el tiempo del necesario y ello ocasionaría que un menor volumen de disolución madre fuera absorbida por las muestras.

Con respecto a los coeficientes de variación, se observa que la mayoría de ellos no cambia mucho comparada con las pruebas originales. Incluso, en algunos casos, el coeficiente de variación es menor. Esto ayudo a comprobar que el método puede ser reproducible con la instrucción adecuada debido a que los resultados obtenidos por alguien que utiliza el método por primera vez, lo cual es una característica a favor del método y si se tiene un mayor cuidado en los pasos del método, será posible que los resultados generados con el método sean reproducibles y confiables.

6. CONCLUSIONES

SPME es una técnica novedosa y efectiva de preparación de muestras que permite concentrar y analizar sus componentes a nivel de trazas por medio de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Esto le permitiría emplearse en el monitoreo simultáneo de diferentes pesticidas, lo que la puede convertir en una alternativa viable para análisis de laboratorio con costos relativamente bajos.

Se avanzó en el cumplimiento del objetivo general en cuanto a que se desarrolló un método capaz de detectar y cuantificar algunos pesticidas organofosforados, primero en estándares y luego en muestras de sangre seca fortificadas.

La sensibilidad del método es buena para la mayoría de los compuestos y permite cuantificar OPP's a niveles de entre 0.032 y 0.051 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y posiblemente dichos niveles son suficientes para el estudio de estos contaminantes en sangre de recién nacidos y también de niños y adultos. Sin embargo, no es posible afirmar su efectividad en muestras reales pues la dificultad de obtenerlas impidió realizar estas pruebas.

A pesar de las ventajas de la SPME, se trata de una técnica muy susceptible a pequeñas variaciones operativas, lo que dificulta alcanzar valores de coeficiente de variación suficientemente bajos. Esto podría solucionarse si se automatizan algunos pasos de la metodología.

Se obtuvo que el estudio de OPP's en la prueba del tamiz neonatal será una valiosa herramienta que ayudará a los médicos a diagnosticar intoxicaciones con estos compuestos.

7. PERSPECTIVAS

Los resultados logrados en este trabajo representan un avance importante para contar con un método confiable que evalúe la salud de recién nacidos expuestos a OPP's. Sin embargo, aún es posible mejorarlo en algunos aspectos:

- Realizar pruebas con muestras reales de sangre de individuos provenientes de zonas altamente contaminadas por OPP's y ver si el método es efectivo para su análisis.
- Minimizar fuentes de variación del proceso, para lo que se podría automatizar algunas operaciones, como por ejemplo la inyección de la muestra al cromatógrafo de gases y el manejo de la micropipeta.
- Evaluar la reproducibilidad del método aplicándolo en otros laboratorios y verificar los resultados obtenidos para los demás parámetros estadísticos.
- Una vez que esté completa, difundir la técnica para que sea aprovechada en los lugares donde se necesita.
- Adaptar el método por SPME para estudiar otros contaminantes importantes en recién nacidos, por ejemplo pesticidas organoclorados, compuestos fenólicos e hidrocarburos aromáticos policíclicos.

8. REFERENCIAS

1. Costa, L.G., et. al. (1987). Toxicology of pesticides: Experimental, clinical and regulatory perspectives. Springer-Verlag, Berlin.
2. Shepard, H.H. (1939). The chemistry and toxicology of insecticides. Burgess Publ. Co., Minneapolis.
3. Bowler, P.J. (1992). The fontana history of the environmental sciences. Harper Collins Publishers. Londres.
4. Heath, R.G., et. al. (1969). Marked DDE impairment of mallard reproduction in controlled studies. Nature 224, 47-48
5. Angus, W. (1992). The dead of Ramón Gonzalez The Modern Agricultural Dilema. University of Texas Press. Austin.
6. CICOPLAFEST, 2004. <www.sagarpa.gob.mx/cicoplafest/>[Consultado en abril 21, 2016]
7. Bert L., et. al. (1997). The Standard Pesticide User's guide. Prentice-Hall.
8. Ware, G. C. (1983). Pesticide theory and application. W. H. Freeman and Company, San Francisco.
9. Colborn, T., et. al. (1992). Chemically induced alterations in sexual and functional development: the wildlife/human connection. Pricenton, NJ:Pricenton Scientific Publishing.
10. CICLOPLAFEST. Comisión Intersecretarial para el control del proceso y uso de plaguicidas, fertilizantes y sustancias tóxicas. Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. Secretaría del Medio Ambiente, recursos Naturales y Pesca. Secretaría de Salud. Secretaría de Comercio y Fomento Industrial. Catálogo Oficial de plaguicidas, 2004.
11. Hassall, K.A. The biochemistry and uses of pesticidas. Structure, metabolism, mode of action and uses in crop protection. Ed. MacMillan. 2da ed, Hong Kong, 1990.
12. Noble, Alan. Partition coefficients (n-octanol-water) for pesticides. Review. Journal of Chromatography, 642 (1993) 3-14.
13. Kaloyanova, F. (1991). Human toxicology of pesticides. CRC Press. Boca raton, Florida.
14. Cornell University (2008). Toxicity of pesticides. Pesticides fact sheets and tutorial, module 4. Pesticide Safety Education Program.

<<https://www.extension.org/pages/Toxicityofpesticides>> [Consultado en mayo 13, 2016]

15. Beceiro-González E., Concha-Graña E., Muniategui-Lorenzo S., Alpendurada M. F. Optimisation and validation of a solid-phase microextraction method for simultaneous determination of different types of pesticides in water by gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1141 (2007) 165–173.
16. Picó, J. A, Font G. Revisión de los métodos de determinación de residuos de plaguicidas organofosforados en alimentos. *Revista toxicológica*. 20 (2003) 166-175.
17. Beltran J., López F. J., Hernández F. Solid-phase microextraction in pesticides residue analysis. *Journal of Chromatography A*, 885 (2000) 389-404.
18. Hildebrandt A., Lacorte S., Barceló D. Assessment of priority pesticides, degradation products, and pesticide adjuvants in groundwaters and top soils from agricultural areas of the Ebro river basin. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 387(2007) 1459–1468.
19. Aguilar, Peñalver, Pocurull, Marcé, Borrul. Solid-phase microextraction and gas chromatography with mass spectrometric detection for the determination of pesticides in aqueous samples. *Journal of Chromatography A*, 795 (1998) 105–115.
20. Krutz L. J., Senseman S. A., Sciumbato A. S. Solid-phase microextraction for herbicide determination in environmental samples. *Journal of Chromatography A*, 999(2003) 103-121.
21. Pawliszyn, J. *Solid Phase Microextraction: Theory and Practice*. Wiley-VCH Inc, New York, USA, 1997.
22. Pawliszyn, J. *Applications of Solid Phase Microextraction*. The Royal Society of Chemistry. Cambridge, UK, 1999.
23. György Vas, Károly Vékey. Solid-phase microextraction: a powerful sample preparation tool prior to mass spectrometric analysis. *Journal of Mass Spectrometry*, 39 (2004) 233-254.
24. Prosen, Helena. Solid-phase microextraction. *Trends in Analytical Chemistry*, No. 4 Vol. 18 (1999) 272-281
25. Campillo, Natalia. Pesticide analysis in herbal infusions by solid-phase microextraction and gas chromatography with atomic emission detection. *Talanta* 71 (2007) 1417–1423.
26. Fidalgo-Used, Natalia. Determination of organophosphorus pesticides in spiked river water samples using solid phase microextraction coupled to gas chromatography with EI-MS and ICP-MS detection. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 20 (2005) 876–882.

27. Gallardo E., Barroso M., Margalho C., Cruz A. Solid-phase microextraction for gas chromatographic/mass spectrometric analysis of dimethoate in human biological samples. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 20 (2006) 865-869.
28. Magdic S., Boyd-Boland A., Jinno K., Pawliszyn J. Analysis of organophosphorus insecticides from environmental samples using solid-phase microextraction. *Journal of Chromatography A*, 736 (1996) 219-228.
29. Gonçalves C., Alpendurada M. F. Multiresidue method for the simultaneous determination of four groups of pesticides in ground and drinking waters, using solid-phase microextraction–gas chromatography with electron-capture and thermionic specific detection. *Journal of Chromatography A*, 968 (2002) 177–190.
30. Peñalver A., Pocurull E., Borrull F., Marcé R. M. Trends in solid-phase microextraction for determining organic pollutants in environmental samples. *Trends in Analytical Chemistry*, No. 8, Vol. 18 (1999) 557-568.
31. Lambropoulou D., Sakkas, Albanis T. Validation of an SPME method, using PDMS, PA, PDMS–DVB, and CW–DVB SPME fiber coatings, for analysis of organophosphorus insecticides in natural waters. *Analytical Bioanalytical Chemistry*, 374 (2002) 932–941.
32. Chanbasha B., Alnedhary A., Madhava Rao. Determination of organophosphorus pesticides in wastewater sample using binary-solvent liquid-phase microextraction and solid-phase microextraction: A comparative study. *Analytica Chimica Acta*, 605(2007) 147-152.
33. Gonçalves C., Alpendurada M. F. Comparison of three different poly(dimethylsiloxane)-divinylbenzene fibres for the analysis of pesticides multiresidues in water samples: structure and efficiency. *Journal of Chromatography A*, 963 (2002) 19-26.
34. Tsoukali H., Theodoridis G., Raikos N. Grigoratou I. Solid phase microextraction gas chromatographic analysis of organophosphorus pesticides in biological samples. *Journal of Chromatography B*, 822 (2006) 194-200.
35. Lambropoulou D., Sakellarides T., Albanis T. Determination of organophosphorus insecticides in natural waters using SPE-disks and SPME followed by GC/FTD and GC/MS. *Fresenius' Journal of analytical Chemistry*, 368 (2000) 616–623.
36. Flynt E., Dupuy A., Kennedy C., Bennett S. Solid-Phase Microextraction of Organophosphate Pesticides in Source Waters for Drinking Water. Treatment Facilities. *Journal of Chromatographic Science*, 44 (2006) 484-488.

37. 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.
38. Mc Nair, H.M. & Miller, J.M. *Basic Gas Chromatography*. Ed. Jonh Wiley & Sons Inc., New York, USA, 1998
39. Harris, D. C. *Análisis químico cuantitativo*. 619–653 (Grupo Editorial Iberoamérica, S.A. de C.V., 1992).
40. Barry, E. F. & Grob, R. L. *Columns for Gas Chromatography: Performance and Selection*. 94–106, 132–141 (Wiley, 2007).
41. Rojo, F. *Cromatografía de gases - Introducción*. Dirección electrónica:
<http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/5.1CromatografiaIntroduccion_2620.pdf>
[Consultado en agosto 26, 2016]
42. Rojo, F. *Cromatografía de gases - Definiciones*. Dirección electrónica:
<http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/5.2CromatografiaDefiniciones_2621.pdf>
[Consultado en agosto 26, 2016]
43. Rojo, F. *Cromatografía de Gases - Instrumentación*. Dirección electrónica:
<http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/5.3CromatografiadeGasesInstrumentacion_2759.pdf> [Consultado en agosto 26, 2016]
44. Hoffmann, E. De & Stroobant, V. *Mass Spectrometry: Principles and Applications*. 1–296 (John Wiley & Sons, Ltd, 2007).
45. Skoog D. D., Holler F. J., Mieman, T. A. *Principios de análisis instrumental*. Mc Graw Hill, 5ª ed. Madrid, España, 2001.
46. Eurachem Guide *The Fitness for Purpose of Analytical Methods A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics* Second edition 2014, 20-26.

ANEXO A. Curvas de calibración

Curvas de calibración ($y=mx$) utilizando estándares OPP's con concentraciones de 0.1 a 1 $\mu\text{g/mL}$.

Los resultados de estas pruebas con estándares de OPP's, se pueden observar en ellos, se observan tendencias lineales tienen un valor de R^2 mayor a 0.99 y en los resultados obtenidos se observan coeficientes de correlación que varían desde 0.9594 hasta 0.9995. El valor más bajo de R^2 corresponde al coornafos en los estándares OPP's estudiados. Para el resto de los compuestos, las tendencias observadas son mayormente lineales en el intervalo probado desde 0.1 $\mu\text{g/mL}$ hasta 1 $\mu\text{g/mL}$.

OPP's	Pendiente	R^2	[C] $\mu\text{g/mL}$
Diclorfos	2395.7	0.9983	0.4-0.7
Fosfodrin	23408	0.9933	0.1-0.6
Pofos	13642	0.9956	0.4-0.7
Forate	3126	0.9956	0.4-0.7
Dameton-s	9091.5	0.9987	0.3-0.6
Diazionon	12170	0.9966	0.7-0.9
Disulfuton	4939	0.9909	0.6-0.9
Fenclorofos	4264.3	0.9957	0.2-0.4
Metil Paration	9075	0.9995	0.7-0.9
Clorpirifos	19065	0.9958	0.6-0.8
Fention	13781	0.9928	0.2-0.8
Tricloronato	17845	0.9984	0.6-0.8
Tetraclorvinfos	36203	0.9945	0.1-1.0
Texution	No detectado		
Butilfos	No detectado		
Fensulfation	5246.5	0.9960	0.1-0.4
Sulprofos	35749	0.9913	0.6-1.0
Gution	11309	0.9905	0.3-1.0
Coornafos	6217.5	0.9594	0.1-0.3

