

39  
29.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

**FACULTAD DE QUIMICA**



**EXAMENES PROFESIONALES  
FAC. DE QUIMICA**

**"ESTANDARIZACION DE LA TECNICA DE  
EXTRACCION Y CUANTIFICACION DEL PLAGUICIDA  
CLORPIRIFOS EN ALGUNOS CEREALES  
PROCESADOS PARA BEBES"**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
QUIMICA DE ALIMENTOS  
P R E S E N T A :  
ERIKA ALEJANDRA POLANCO FRIAS**



**MEXICO, D. F.**

**1998.**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

259810



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.

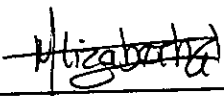
## JURADO ASIGNADO

|               |                                    |
|---------------|------------------------------------|
| PRESIDENTE    | Prof. PEDRO VALLE VEGA             |
| VOCAL         | Prof. MIGUEL ÁNGEL HIDALGO TORRES  |
| SECRETARIO    | Prof. HILDA E. CALDERÓN VILLAGÓMEZ |
| 1ER. SUPLENTE | Prof. VÍCTOR MANUEL LUNA PABELLO   |
| 2DO. SUPLENTE | Prof. LETICIA GIL VIEYRA           |

### SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Laboratorio 201 de Tecnologías más Limpias, edificio "B"; laboratorio 301 del PIQAYQA, edificio "E", Facultad de Química, UNAM.

ASESOR DEL TEMA

  
M. en C. HILDA E. CALDERÓN VILLAGÓMEZ

SUPERVISOR TÉCNICO

  
Dra. Ma. CARMEN DURÁN DOMÍNGUEZ

SUSTENTANTE

  
ERIKA ALEJANDRA POLANCO FRÍAS

Esta tesis está dedicada muy especialmente a:

Mis muy Amados Padres, **Guadalupe y Víctor**, los cuales me han dado Siempre todo su Amor, Apoyo y Confianza. Ésta va por ustedes.

A *Dios*..... gracias por permitirme cumplir con una de mis metas sana, llena de alegría y amor.

A mis hermanos *Víctor, Karyna y Alejandra*.....por estar siempre al pendiente de mí, e impulsarme con sólidos argumentos para la terminación de esta tesis.

A *Huber*.....quién ha estado a mi lado ayudándome a ir hacia adelante con Amor, Cariño y Ternura.

A *Kitty* y a *Catita*.....por su dulzura y consejos.

A *Pepe Luis Sanchez*.....por su amistad y ayuda incondicional.

A *toda mi familia y amigos*, especialmente a: Isa Román<sup>o</sup> y Rafael Polanco<sup>o</sup>; Fam. Contreras Frias; Fam. Polanco Valverde; Benito, Juan Carlos y Virginia Polanco Román; Elena, Patricia y Alan Burke; Lucy e Hilario Taboada; Fam. Vergara Motufar, Fam. Becerril; Manuel Saavedra; Leonardo Flores; Haydeé Vielma; Mónica Heras; Jaqueline Saenz; Martha Ortiz; Patricia Severiano y Dacef.

A *Hilda*.....quién siempre me guió y orientó con una sonrisa.

Al *Ing. Luis Mendoza*.....por su ayuda y comprensión.

Al TEMAL, al PIQAYQA, a FACULTAD DE QUÍMICA y a la UNAM.

GRACIAS

El presente trabajo fue realizado bajo la supervisión académica y técnica de la M. en C. Hilda Elizabeth Calderón Villagómez y la Dra. Ma.Carmen Durán Domínguez, a quienes agradezco infinitamente su atención y tiempo dedicado.

Esta tesis fue realizada gracias al apoyo económico brindado por parte del proyecto UNAM-GTZ(Alemania) de Residuos Peligrosos, cuyo representante en México es el Dr. Bertram Nágel.

# ÍNDICE

---

|   | <i>Página</i> |
|---|---------------|
| RESUMEN   | i             |
| ABSTRACT  | ii            |
| INTRODUCCIÓN  | iii           |
| <b>CAPÍTULO 1 GENERALIDADES</b>   | <b>1</b>      |
| 1.1 <i>Plaguicidas organofosforados: Características generales</i>            | 1             |
| 1.1.2 <i>Mecanismos de acción</i>   | 2             |
| 1.1.3 <i>Mecanismos de degradación</i>  | 5             |
| 1.2 <i>Métodos de análisis</i>  | 7             |
| 1.3 <i>Plaguicidas en la industria</i>  | 13            |
| 1.4 <i>Legislación</i>  | 14            |
| <b>CAPÍTULO 2 MATERIALES Y MÉTODOS</b>  | <b>16</b>     |
| 2.1 <i>Diagrama general de trabajo</i>  | 17            |
| 2.2 <i>Materiales: muestras, extracción, limpieza y cuantificación</i>        | 17            |
| 2.3 <i>Métodos</i>  | 21            |
| 2.3.1 <i>Curva de calibración en el cromatógrafo de gases</i>                 | 21            |
| 2.3.2 <i>Análisis de las muestras comerciales (análisis químico proximal)</i> | 21            |
| 2.3.3 <i>Técnica de extracción del clorpirifos</i>                            | 22            |
| 2.3.4 <i>Técnicas de limpieza</i>   | 24            |

|                   |  |    |
|-------------------|--|----|
| 2.3.5             | <i>Técnica de cuantificación</i>   | 29 |
| 2.3.6             | <i>Cuantificación de clorpirifos (adición del estándar)</i>  | 29 |
| 2.3.7             | <i>Cuantificación de clorpirifos (sin la adición del estándar)</i>   | 30 |
| <b>CAPÍTULO 3</b> | <b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>  | 32 |
| 3.1               | <i>Curva de calibración en el cromatógrafo de gases</i>  | 32 |
| 3.2               | <i>Análisis de las muestras comerciales (análisis químico proximal)</i>  | 33 |
| 3.3               | <i>Eficiencia de la extracción. Volumen y tiempos de elución, eficiencia y costos para la limpieza con: a) columna empacada con florisil del manual alemán y b) cartuchos de extracción en fase sólida</i> | 34 |
| 3.4               | <i>Recuperación de clorpirifos en muestras de cereales adicionadas con estándar</i>  | 37 |
| 3.5               | <i>Recuperación de clorpirifos en muestras de cereales sin adición de estándar</i>   | 39 |
| 3.6               | <i>Resultados de la confirmación del pico del clorpirifos por gases-masas</i>  | 41 |
|                   | <b>CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</b>  | 43 |
|                   | <b>APÉNDICES</b>   | 46 |
|                   | Apéndice 1. Características generales del clorpirifos  | 46 |
|                   | Apéndice 2. Análisis de las muestras comerciales (análisis proximal). Técnicas   | 48 |
|                   | Apéndice 3. Cálculos   | 53 |
|                   | Apéndice 4. Glosario de términos   | 55 |
|                   | Apéndice 5. Método utilizado en el CG  | 56 |
|                   | Apéndice 6. Lista de figuras   | 57 |
|                   | Apéndice 7. Lista de tablas  | 58 |
|                   | <b>BIBLIOGRAFÍA</b>  | 59 |

## RESUMEN

Actualmente la sociedad tiene que enfrentar un gran problema de contaminación ambiental derivada de las actividades del hombre, las cuales han sobrepasado el poder autodepurador que tiene la naturaleza para mantener un equilibrio. Dentro de los muchos problemas ambientales existentes, se encuentra la contaminación de alimentos, suscitada por factores como el uso de agroquímicos o plaguicidas en los medios de cultivo. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo consistió en desarrollar un procedimiento analítico alternativo al propuesto en la literatura para el análisis del clorpirifos en cereales comerciales para bebés con la técnica de cromatografía de gases, materiales y equipos fáciles de conseguir en México, minimizando costos y tiempo de realización. Se eligió estudiar al plaguicida organofosforado clorpirifos, pues es uno de los compuestos utilizados principalmente en cultivos de cereales para el control de plagas como mosquitos, cucarachas, larvas acuáticas, follaje plaga, entre otros; además, es un compuesto clasificado como altamente tóxico, y uno de los residuos de plaguicidas que más se encuentran en los alimentos, según los estudios que se han realizado en otros países. Por otro lado, el análisis se condicionó únicamente para este plaguicida, por la complejidad de la matriz (cereal) y el alto costo de los estándares. La metodología de extracción y limpieza se llevó a cabo con la ayuda de cartuchos de extracción en fase sólida y la cuantificación se realizó por medio de la cromatografía de gases. Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran la presencia del plaguicida clorpirifos en las muestras analizadas en concentraciones mayores a la ingesta diaria admisible (0.01mg/ kg), proporcionada por el catálogo oficial de plaguicidas, por lo cual se concluye que la técnica desarrollada en este trabajo debe aplicarse bajo un muestreo representativo por lotes para obtener un conocimiento real del grado de contaminación con plaguicidas organofosforados en cereales procesados para bebés.



## ABSTRACT

Current society has to face the enormous problem of the environmental pollution caused by the man activities, which have surpassed nature power of selfpurificatio that manteins an equilibrium. Among those many environmental problems, it is found food pollution, due to the use of agricultural chemicals or insecticides in farming. For that reason, the objetive of this work was to develop an analytical proceeding as an alternative to that one suggested in the literature for the analysis of chlorpyriphos, in marketing baby cereals with gas chromatography technique, materials and equipment easy to get in México, minimizing costs an reducing time. The organophosphate insecticide was chosen because it is one of the compounds mainly used in cereals cultivation to control plague like mosquitoes, cockroachs, aquatic larvae, foliage plague, among others; furthermore it is a compound clasified as highly toxic, and one of the plague residuals more commonly found in food, according to other countries studies. On the other hand, the analysis was done only for this insecticide, due to the complexite of the cereal matrix and the high cost of the standard. The extraction methodology and cleanning was carried out with the support of cartridge in solid phase extraction and the quantification was done by gas chromatography. The results obtained in this work show the presence of the insecticide cholrpyrifos in the samples analized in concentrations higher than the mexican acceptable daily intake (0.01mg/kg) given by the official plague catalog, and so it's concluded that the technique developed in this work should be applied under representative samples to obtain a real knowledge of pollution level of the organophosphates insecticides in processed baby cereals.

## INTRODUCCIÓN

Los plaguicidas son sustancias químicas cuya finalidad es controlar la proliferación de plagas y enfermedades de los cultivos; para reducir o evitar las pérdidas en la producción de alimentos. También contribuyen al control de vectores causantes de diversas enfermedades, protegiendo así al hombre y a sus animales domésticos (2,12,15,16,65).

Existen varias formas de clasificar a los plaguicidas; entre las más comunes, están las siguientes:

- a) Por su naturaleza química; orgánicos e inorgánicos.
- b) Por su modo de acción; contacto, ingestión, fumigante, sistémicos.
- c) Por su composición; organoclorados, organofosforados, carbamatos, piretroides, ciclodienos, etcétera.
- d) Por su uso y tipo de organismos que afectan; insecticidas, ya que los insectos son los organismos más diversos entre toda la fauna de la tierra, los más adaptables y los más prolíficos, estos rasgos los hacen perfectamente capaces de resistir, a largo plazo, un producto químico (58), acaricidas, herbicidas, fungicidas.
- e) De acuerdo a su persistencia en el ambiente como: ligeramente persistentes (menos de 4 semanas), poco persistentes (de 4-26 semanas), medianamente persistentes (27-52 semanas), altamente persistentes (más de un año y menos de 20) y permanentes (más de 20 años) (2,12,15,16,65).

El uso incorrecto de estos compuestos suele provocar daños mayores en comparación con los beneficios. Con el tiempo, las plagas logran hacerse inmunes a los plaguicidas y los agricultores se ven en la necesidad de utilizar mayores

cantidades de dichas sustancias. Por consiguiente, se da pie al surgimiento de plagas más difíciles de controlar. Este fenómeno lo explica Iván Restrepo de la siguiente manera (58): *"El uso inadecuado de los plaguicidas para combatir una sola especie de insecto tiene el poder de destruir una agroindustria, lo cual sigue un proceso predecible ya que el patrón de comportamiento siempre es el mismo: primero, hay un periodo durante el cual disminuyen las pérdidas en el cultivo debido al uso innovador de agroquímicos; esto es, a corto plazo hay una ganancia concreta para el agricultor. Por lo general, se aplica un compuesto organoclorado. Después, empieza la resistencia, ya sea en la plaga primaria o en la secundaria. Esto provoca que el agricultor añada mayor cantidad de plaguicidas o nuevos plaguicidas a sus cultivos. Cominmente, el cambio se orienta hacia un organofosforado o un carbamato que no dañe tanto al ecosistema. Sin depredadores ni parásitos, las especies que no tenían importancia como plagas se convierten en dañinas. Y para combatir las se recurre a la aplicación de más compuestos químicos. De este modo se gesta lo que muchos investigadores llaman el círculo vicioso de los plaguicidas "* (58).

Antiguamente, los plaguicidas más utilizados eran los organoclorados (OC), especialmente por su bajo costo; pero el abuso de estos, su prolongada acción residual en el ambiente y su alto grado de bioacumulación, provocaron que se restringieran en varios países, sobre todo desarrollados. Estos optaron por utilizar plaguicidas organofosforados (OF) y carbamatos; los cuales, siempre que se utilicen de manera adecuada, tienen una menor acción residual y bajo grado de bioacumulación (15, 17, 24, 26, 36-37, 60-61), pues de suceder lo contrario, es fácil encontrarlos como residuos en el ambiente provocando intoxicaciones agudas en las poblaciones expuestas directa e indirectamente (2, 12, 15, 16, 65).

Este es el caso del plaguicida OF clorpirifos, considerado altamente tóxico; eficaz contra insectos y ácaros; utilizado regularmente en el cultivo de cereales, frutas y verduras; que ha sido detectado como residuo en varios de los estudios realizados en los EEUU (3-6, 10-11, 28, 31-33, 60, 64, 67-68).

En ese país, se han preocupado por determinar el grado de contaminación con plaguicidas en varios tipos de matrices como agua, suelo y aire (14); resultando de particular interés para el presente trabajo, el análisis de alimentos procesados para bebés, ya que los infantes conforman una de las partes más vulnerables de la población.

En las investigaciones realizadas, se ha encontrado que las frutas como materia prima en distintos productos para bebés, contienen altos niveles de plaguicidas. Analizando un total de 72 muestras, obtenidas de las compañías Gerber, Heinz y Beech-Nut (que tienen las mayores ventas de ese país), se encontró que más de la mitad de las muestras (53%), presentaron niveles detectables de plaguicidas (de 16-53 ppb), mientras el 18% de las muestras contenían dos o más plaguicidas.

Entre los plaguicidas más detectados están el iprodione, tiabendazole, botran, permetrin, fosalone, clorpirifos, paratión y DDT; los cuales están clasificados como posibles carcinógenos humanos (23, 32).

Por tales razones, crearon estrictas normas de control, además de metodologías analíticas para la detección de dichos plaguicidas.

Desafortunadamente, en países "en vías de desarrollo" como México, el uso de plaguicidas OC, OF y carbamatos, se ha dado de forma indiscriminada. Esto se debe a la falta de cultura y conciencia de los riesgos que se corren al utilizar estos compuestos químicos de forma incorrecta; riesgos que constituyen una amenaza

latente para el hombre, manifestándose por intoxicaciones de grado diverso y por efectos nocivos que pueden presentarse a mediano o largo plazo, tales como carcinogénesis, teratogénesis, mutagénesis y esterilidad, entre otros.

Aunado a lo anterior, hay que agregar la falta de leyes o normas específicas para los plaguicidas más utilizados, que rijan *estrictamente* el uso y límite residual de los plaguicidas (7-9, 13, 18-22, 38-55).

En México, la legislación cuenta con el catálogo oficial de plaguicidas (CICOPLAFEST), en el que se aprueba el uso de 97 insecticidas, 70 herbicidas, 71 fungicidas, 8 fumigantes, 12 rodenticidas y 3 nematocidas; además, establece la "ingesta diaria admisible" (IDA), la clasificación toxicológica, los tipos de cultivos en los que se aplican y el límite máximo residual (LMR) para cada uno de estos compuestos (12).

A su vez, también existen algunas normas y metodologías para el análisis de ciertos OC en agua potable (como el malatión, paratión, aldrin, etc.) y en alimentos (Codex Alimentario), lo que no ocurre para varios OF. Esta ausencia de normas y metodologías analíticas para su correcta detección, hace difícil que en la práctica se implementen técnicas documentadas existentes y, sobre todo, que se desarrollen nuevas. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo es desarrollar un procedimiento analítico para el plaguicida organofosforado clorpirifos en cereales procesados para bebés (la investigación se enfoca en este plaguicida por su gran uso en los cultivos de cereales, influyendo también la complejidad de la matriz y el alto costo de los estándares), alternativo al documentado por el manual alemán de análisis de residuos de plaguicidas. Este método a desarrollar incluirá el uso de reactivos y equipos fáciles

de conseguir en México, así como innovaciones a las ya obsoletas, técnicas de limpieza y cuantificación mencionadas en dicho manual.

Esta nueva técnica permitirá elucidar las concentraciones reales del plaguicida en cereales procesados para bebés; proporcionándole a las compañías que manufacturan dichos productos, una herramienta indispensable para mejorar el control de calidad en la materia prima que procesan.

## CAPÍTULO 1

---

### GENERALIDADES

#### 1.1 *Plaguicidas organofosforados: Características generales*

De acuerdo al catálogo de plaguicidas, editado en 1994 por la Comisión intersecretarial para el control del proceso y uso de los plaguicidas, fertilizantes y sustancias tóxicas; conocida como CICOPLAFEST, los plaguicidas organofosforados (OF), son compuestos sintéticos derivados del ácido fosfórico, en donde uno o más de los oxígenos del ácido pueden encontrarse sustituidos por azufre y sus radicales oxhidrilos por diferentes radicales orgánicos, encontrándose diversas combinaciones. Los sustituyentes de este ácido pueden ser grupos alquilo, alcoxi, o alquiltio de cadena corta, o bien, grupos amida o átomos de azufre (15, 16, 26, 36).

La mayoría son insecticidas genéricos, aunque también hay algunos acaricidas. En su mayor parte actúan contra los insectos y los ácaros por contacto y por ingestión; otros son sistémicos y algunos tienen acción fumigante. Muchos de ellos son tóxicos a los peces, abejas y a la vida silvestre. (12, 15, 56-58).

Los plaguicidas son degradados con relativa facilidad en el ambiente por hidrólisis por lo que algunos son muy solubles en agua. Los compuestos con una solubilidad en el agua mayor a 500 ppm son muy móviles en los suelos y en los otros elementos del ecosistema; su mayor concentración se encuentra en los ecosistemas acuáticos. Por otro lado, los compuestos con una solubilidad en agua mayor de 25 ppm no son persistentes en los seres vivos, situando en este caso a los compuestos

organofosforados, en tanto que aquéllos con una solubilidad en agua menor a 25 ppm (como, por ejemplo, los plaguicidas organoclorados) tienden a inmovilizarse en los suelos y a concentrarse en los organismos (15, 48).

Los plaguicidas organofosforados (OF) poseen ventajas sobre los organoclorados, entre ellas, su baja persistencia en el ambiente, su no acumulación en el organismo y bajo potencial de carcinogenicidad; sin embargo, su toxicidad aguda es mayor. Su estructura química puede ser muy variada y de ella dependerá su toxicidad. Se absorben bien por inhalación, por ingestión y vía cutánea (12, 15, 53, 56-58).

El plaguicida organofosforado clorpirifos está clasificado como tóxico al contacto con la piel y por inhalación. Es un insecticida de amplio espectro especialmente útil en el control de mosquitos e insectos domésticos, moscas, muchos tipos de follaje plaga y larvas acuáticas. Su vida media en solución metanólica a pH 6 es de 1930 días, a pH 9.96 es de 7.2 días y se utiliza en el almacenaje de los cereales y otros tipos de materia primas. En el anexo I se presentan más características del clorpirifos (12, 36).

### 1.1.2 *Mecanismo de acción*

El mecanismo de acción de los OF se da por inhibición de la actividad de la acetilcolinesterasa; el fenómeno ocurre a nivel de las sinapsis nerviosas, en donde el neurotransmisor acetilcolina actúa sobre la membrana postsináptica a la que despolariza; de este modo, excita a las células efectoras: glándulas, fibras musculares lisas, fibras musculares estriadas y otras neuronas. Una vez conseguido su objetivo, la



función de este neurotransmisor debe terminar, lo que ocurre por acción de la acetilcolinesterasa, enzima que rápidamente hidroliza a la acetilcolina, con lo que ésta deja de actuar y las células efectoras entran en reposo para volverse a reactivar cuando el organismo lo demande. Los OF actúan inhibiendo la actividad de la acetilcolinesterasa en el sitio preciso en donde rompe la molécula de acetilcolina (los OF compiten con la acetilcolina por la acetilcolinesterasa. El átomo central de fósforo de estos plaguicidas tiene una deficiencia de electrones y esta configuración favorece la atracción hacia el sitio estérico de la acetilcolinesterasa que posee un excedente de electrones. El fósforo forma una unión covalente con el grupo nucleofílico de la enzima) (12, 15, 16, 36-37, 56-58). Por lo tanto, se genera una gran cantidad de impulsos a las células efectoras y esta estimulación continua causa las siguientes manifestaciones de intoxicación:

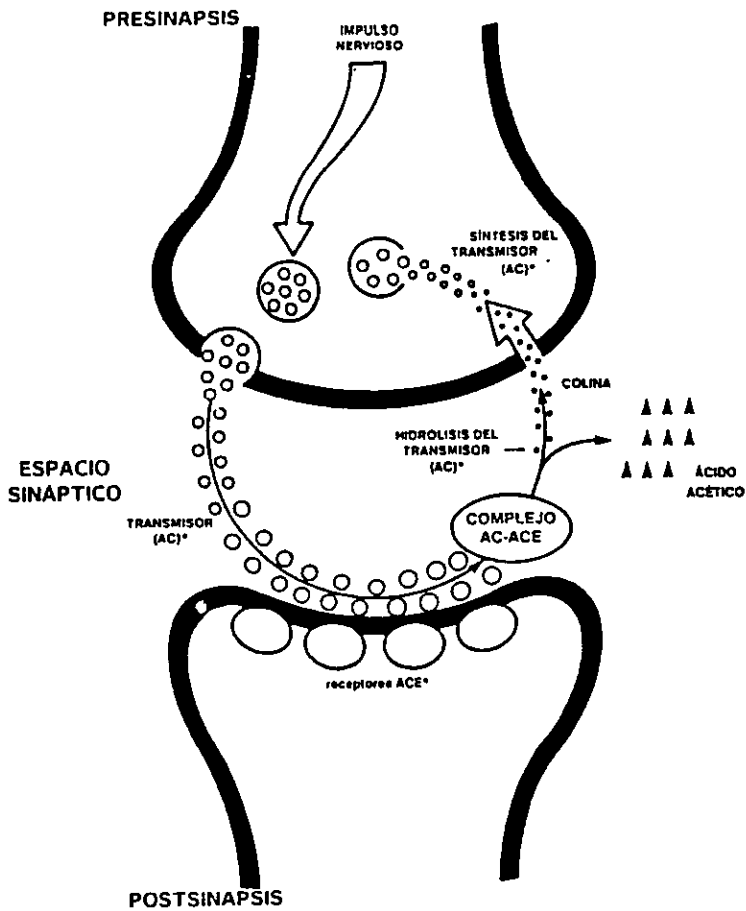
a) *Síndrome muscarínico*, se genera por estimulación de las glándulas y fibras musculares lisas, lo que causa vómitos, sudoración, diarrea, salivación, lagrimeo y abundantes secreciones bronquiales; característicamente, las pupilas están contraídas “como puntas de alfiler” (miosis).

b) *Síndrome nicotínico*, se genera por acción sobre las fibras musculares estriadas: presión en el tórax, calambres de los músculos abdominales y de las extremidades, temblores, bradicardia y trastornos del ritmo cardíaco.

c) *Síndrome neurológico*, se genera por sobrestimulación de otras neuronas y se caracteriza por: irritabilidad, conducta psicótica, pérdida brusca de la conciencia y convulsiones. En casos extremos conduce a la muerte, que ocurre por depresión respiratoria, edema pulmonar o bradicardia extrema (12, 15).

En la figura 1.1 se presenta de manera esquemática el mecanismo de acción de la acetilcolinesterasa.

Figura 1.1 Esquema del proceso fisiológico neuromuscular durante la estimulación (15)



\* AC = acetilcolina  
 \*\* ACE = acetilcolinesterasa

Los signos y síntomas de intoxicación por compuestos organofosforados aparecen durante la exposición o en un lapso no mayor de 12 horas después de la última exposición y, dependiendo de la dosis y de la vía de absorción, pueden variar (12, 15, 62).

Se ha descubierto que el clorpirifos administrado en cantidad suficiente a animales de laboratorio, produce signos que no se pueden distinguir de los presentados por otros plaguicidas organofosforados, y la velocidad de acción es aproximadamente la misma a otros compuestos que contienen al grupo =S dietoxi. La toxicidad aguda es de grado moderado (36).

### 1.1.3 *Mecanismos de degradación*

Todos los plaguicidas OF se degradan por hidrólisis en el hígado y en otros tejidos, generalmente durante las horas en las que ocurre la absorción. Su biotransformación se hace mediante enzimas oxidasas, hidrolasas y transferasas, principalmente hepáticas. Los productos de la degradación o metabolitos son de baja toxicidad y se excretan en su mayoría en la orina y en menor cantidad en heces y aire expirado. Su máxima excreción se alcanza a los 2 días y luego disminuye rápidamente. Sin embargo, algunos se convierten en productos intermedios que son, inclusive, más tóxicos que el compuesto original (31, 35, 36, 57, 60, 66).

La depresión de la actividad de la colinesterasa en la sangre, en el plasma o en los glóbulos rojos, es la mejor evidencia de que ha habido una absorción excesiva de plaguicidas OF. La depresión de la colinesterasa en el plasma persiste con frecuencia de 1 a 3 semanas y la depresión de la colinesterasa en los glóbulos rojos persiste hasta

12 semanas. Los metabolitos que producen los OF comúnmente se detectan en la orina de los pacientes entre las 12 y 48 h después de una absorción considerable del compuesto tóxico. La determinación de los niveles de colinesterasa hepática constituye una guía de primer orden para conocer la efectividad de las prácticas de higiene industrial y de aplicación de estos plaguicidas (12, 15, 62).

En el caso del clorpirifos, una sola dosis administrada de [<sup>36</sup>Cl]clorpirifos a las ratas, les produce una rápida absorción del mismo, excreción en la orina (90%) y heces (10%). Los productos excretados son 3,5,6-tricloro-2-piridil fosfato (75-80%), 3,5,6-tricloro-2-piridinol y trazas de material no metabolizado. En la distribución inicial en los tejidos, el clorpirifos se alberga en la grasa, el cual es movilizado y excretado lentamente, con una vida media de alrededor de 62h (36).

Los efectos neuropáticos retardados se presentan en los humanos de 3-4 semanas después de una intoxicación aguda con algunos OF; por ejemplo, mipafós, leptofós, metamidofós y clorpirifos, entre otros. Los primeros síntomas sensoriales (sensación de hormigueo y quemadura), luego debilidad y ataxia en miembros inferiores pudiendo progresar a parálisis acentuada y, en casos graves, comprometer a los miembros superiores. La recuperación es lenta y rara vez completa en adultos, los niños presentan un cuadro menos grave (62).

Por todas las afecciones a la salud que causan este tipo de compuestos, es necesario contar con métodos de análisis adecuados para diferentes clases de matrices como los que se presentan a continuación.

## 1.2 Métodos de análisis

Existen varios métodos *multirresiduos* de análisis para plaguicidas organofosforados en distintos tipos de matrices (agua, suelos, alimentos), como los presentados en: 1) manual alemán de análisis de residuos de plaguicidas (25), para muestras de alimentos de diferentes clases (alto, medio y bajo contenido de agua), los cuales utilizan a la cromatografía de gases como técnica de cuantificación (25); 2) manual de la Asociación Oficial de Químicos Analíticos, conocida como AOAC (Association of Official Analytical Chemists), para muestras de manzanas y frijoles verdes, por medio de la CG (1a); y 3) manual de la Agencia de Protección al Ambiente conocida como EPA (Environmental Protection Agency), para muestras acuosas por medio de la CG (14).

Como se observa, todas son metodologías multirresiduos, ninguna es específica para un solo plaguicida (lo cual se debe a que los análisis son muy caros y peligrosos). Además, ninguna de estas metodologías toma en cuenta a una matriz tan compleja como el cereal, a excepción del manual alemán editado en 1987, que presenta técnicas actualmente obsoletas (como en la limpieza y la cuantificación), por lo cual hay que hacer muchas variaciones y que constituyen el método del presente trabajo (1, 12, 14, 25, 29).

Existen una gran variedad de métodos analíticos que son usados para detectar residuos de plaguicidas. Todos están constituidos por dos pasos básicos para su aplicación:

- 1) preparación de la muestra
- 2) separación analítica

La *preparación de la muestra* consiste de tres etapas. En la primera se eliminan todos aquellos constituyentes que no sean sujetos de interés para el análisis y se homogeneiza la muestra, ya sea por picado o pulverizado y se toma una parte representativa de ésta.

La segunda etapa, o etapa de *extracción* se realiza la remoción de residuos de plaguicidas a partir de los constituyentes de la muestra.

En la tercera etapa se realiza la *limpieza o aislamiento* de los constituyentes que interfieren con el análisis de residuos de los plaguicidas de interés, este paso incluye la separación y purificación (24, 34, 37).

Para la limpieza se pueden utilizar cartuchos de extracción en fase sólida, conocidos como EFS. Esta es una técnica económica que ahorra tiempo en comparación con los métodos de extracción líquido- líquido (método tradicional usado para limpieza y concentración de muestras analíticas). Además, los métodos EFS reducen significativamente el volumen de los disolventes orgánicos peligrosos requeridos para una típica preparación de muestra. No hay formación de emulsiones y la limpieza de los extractos proveen un mayor tiempo de vida a la columna, utilizada en cromatografía de gases y líquidos, además de que mejoran las condiciones de detección y cuantificación.

Para preparar muestras analíticas, los cartuchos pueden ser utilizados de dos formas. En la primera, los analitos de interés son retenidos en el material de empaque, mientras que la mayoría de los compuestos interferentes presentes en la muestra, no son retenidos al pasar a través del cartucho. Los compuestos interferentes que llegan a quedarse en el material empacado con el analito de interés son lavados selectivamente, con el uso de disolventes de distintas polaridades. Finalmente, los

analitos de interés son eluidos en volúmenes pequeños de un disolvente apropiado. Después de la limpieza y concentración de la muestra, se pueden aplicar técnicas analíticas como cromatografía de gases (CG) y cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR). El segundo modo de utilizar los cartuchos involucra sólo la limpieza de la muestra, la cual es aplicada al cartucho de extracción en fase sólida, en el que el analito de interés no es recolectado cuando pasa a través del adsorbente. Los compuestos interferentes son retenidos en el empaque y pueden ser dispuestos posteriormente con el cartucho (27, 30, 65).

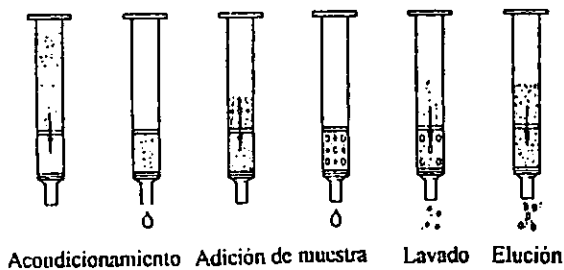
En la figura 1.2 se presentan las diferentes formas de uso de los cartuchos de extracción en fase sólida.

Figura 1.2 Cartuchos de extracción en fase sólida (EFS)

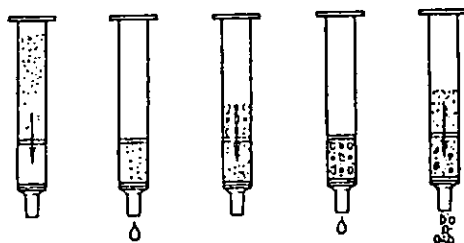
*Formas de uso (65)*

1. Retiene a los compuestos de interés dejando pasar impurezas

- Contaminante
- Compuestos de interés



2. Retiene impurezas dejando pasar a los compuestos de interés



En la extracción en fase sólida, los mecanismos de interacción entre la matriz, analitos y materiales empacados son similares a los de cromatografía líquida. Estos pueden efectuarse de los siguientes modos:

Modo de absorción: Éste no requiere de fases químicamente unidas, pero depende de los grupos funcionales presentes en el material adsorbente por sí mismo. Típicamente, éste es el modo de uso para condiciones de fase normal.

Método de reparto de las fases químicamente unidas: La superficie del adsorbente ha sido modificada con grupos químicamente funcionales adicionales, lo cual provee el principal modo de interacción. Un método combinado es también posible, por el número limitado de enlaces, pues los sitios secundarios de interacción siguen estando presentes sobre el adsorbente. Este método de interacción puede ser usado bajo las siguientes condiciones:

Fase normal: utiliza una matriz o sustancia problema no polar y una fase estacionaria polar que puede retener analitos polares y permitir el paso a través del cartucho a analitos no polares.

Fase reversa: utiliza una matriz polar y una fase estacionaria no polar que puede retener analitos no polares y permitir el paso a través del cartucho a analitos polares.

Pares de iones: utiliza una matriz polar y una fase estacionaria no polar que contiene analitos iónicos o ionizados, con contraiones agregados a la muestra en solución (los contraiones son grupos de iones que se encuentran en la fase móvil con carga eléctrica opuesta a la de la fase estacionaria de la columna o de la muestra en forma iónica); pueden retener analitos (los cuales ahora son neutros al formar el par iónico), por un mecanismo de fase reversa.



Método de intercambio iónico: En este método, la superficie del adsorbente ha sido modificada con grupos iónicos o ionizables. Utiliza un mecanismo de fase normal o fase reversa, en la que los analitos con cargas iónicas opuestas a las del material empacado, serán retenidos en el cartucho. Los disolventes o soluciones orgánicas con contraiones de gran fuerza iónica son usados para eluir los analitos de interés del cartucho. Hay dos tipos de intercambiadores que son: *a.* Intercambiadores aniónicos fuertes y débiles. *b.* Intercambiadores catiónicos fuertes y débiles (27, 30, 65).

La *separación analítica* de los plaguicidas individuales y compuestos coextraídos, se da de acuerdo al diferencial de reparto entre un sólido y un disolvente no volátil, o un líquido o gas acarreador que se mueve a través de una columna. La producción de una respuesta que mide la cantidad del componente en movimiento a través de la columna, permite la detección y cuantificación de cada plaguicida (10, 11, 24, 34).

*La cromatografía de gases* es la técnica utilizada en el presente trabajo por lo que a continuación se presenta un breve resumen sobre sus características.

Históricamente, la cromatografía de gases (CG) ha sido una técnica de separación dominante con, al menos, 40 años de desarrollo y refinamiento. La mayoría de los métodos multiresiduos (MM) y métodos de un solo residuo (MSR), usados por la Agencia de Alimentos y Medicamentos de los EEUA conocida como FDA (Food and Drug Administration), están basados en la CG. Las separaciones de los plaguicidas y compuestos coextraídos de una misma muestra, ocurren en columnas analíticas en el CG; estas columnas usualmente están hechas a partir de vidrio y contienen diferentes tipos de cubierta interior, abierta de manera tubular. Una

columna que está rellena de partículas, es llamada columna empacada y tiene un diámetro interno de aproximadamente 2mm. Una columna con una delgada capa sobre las paredes y un diámetro interno de aproximadamente 0.1mm es llamada columna capilar. Las columnas empacadas son típicamente de 2 metros o menos de largo, mientras que las columnas capilares son típicamente de 10 metros o más largas (algunas veces hasta de 50 metros). Cuando se introduce la muestra extraída de algún alimento (limpio o no de los contaminantes), en la entrada de la columna (aproximadamente 10 microlitros o menos), el disolvente es evaporado rápidamente junto con el plaguicida, donde un gas, llamado gas acarreador, fluye de manera continua a través de la columna, trasladando al plaguicida a lo largo de ella, mientras ocurren interacciones entre las partículas del empaque de la columna o de la capa delgada del líquido no volátil sobre la pared de la columna, si es capilar. La afinidad relativa de los plaguicidas por las partículas o por la capa delgada, determina el tiempo de elución a través de la columna, generando así una respuesta que es registrada e impresa al tiempo que pasa por el detector. El trazo continuo de cada respuesta es llamado cromatograma. Los picos cromatográficos aparecen sobre el cromatograma y su posición sobre el mismo es llamado tiempo de retención.

La cuantificación se lleva a cabo por la medida del área debajo del pico y la comparación de esta área con la variación de las concentraciones del estándar analítico (34, 59).

Este tipo de análisis se deberían realizar de modo rutinario en las diferentes industrias del país, apoyándose en la teoría de que recibirán un costo-beneficio alto como se explica en seguida.

### 1.3 *Plaguicidas en la industria*

En EEUUA los contratos entre la industria empacadora de frutas y vegetales y los agricultores, incluyen normalmente las estipulaciones acerca del tiempo, tipo, cantidad y residuos de plaguicidas aprobado por las autoridades sanitarias de ese país. De esta forma, el industrial asegura que su producto reunirá las especificaciones relativas a los residuos de plaguicidas. Más aún, la mayoría de estos industriales también contratan los servicios analíticos de laboratorios especializados a fin de evaluar la presencia de estos residuos en sus productos, lo cual, por desgracia no ocurre en México (62-64); siendo que los industriales manufacturadores del país, obtendrían un alto costo-beneficio debido a que: \*podrían darle mayor publicidad a sus productos "Libres de Plaguicidas", \*estarian dentro de las normas que día con día son más estrictas en cuanto a residuos de plaguicidas se trata, etc.

Por otro lado, se sabe que el procesamiento de alimentos, como el enlatado, la congelación, el secado y la preparación culinaria, en la mayoría de los casos disminuye el contenido de los plaguicidas en los alimentos. Así, por ejemplo, los plaguicidas que están presentes en la superficie de un vegetal se pueden reducir mediante pelado, lavado, blanqueado y enlatado. No obstante, existen algunas limitadas excepciones en las que el procesamiento puede incrementar el contenido de plaguicidas en la porción comestible del alimento. Tal es el caso de:

a) La separación de los aceites crudos de las plantas o de las semillas que puede concentrar los plaguicidas. Sin embargo, los procesos subsecuentes de la refinación de aceites, tales como la neutralización o la desodorización, pueden remover estos residuos de manera efectiva.

- b) La deshidratación de alimentos puede concentrar a los plaguicidas no volátiles, como es caso del secado solar de las uvas a pasas.
- c) El horneado no disminuye el residuo de los plaguicidas como el tiabendazol y metoxiclor.
- d) La cocción y el empleo de soluciones ácidas o básicas. En estos casos, el procedimiento causa la degradación del plaguicida a una forma química que es más tóxica que la molécula original. Asimismo, existen situaciones en las cuales el plaguicida es introducido al alimento accidentalmente. Esto ocurre durante la postcosecha y el almacenamiento (62-64).

#### 1.4 Legislación

La legislación en México para el caso de los plaguicidas es muy escasa, aunado a la falta de normas *obligatorias* y técnicas de análisis para varios OC y OF (incluyendo al clorpirifos); las existentes en su mayoría, son indicadas para el análisis de agua potable (7-9, 13, 18-22, 38-55).

La legislación también cuenta con:

1. El catálogo oficial de plaguicidas conocido como CICOPRAFEST (12), donde se mencionan varios puntos como \* plaguicidas: efectos adversos a la salud y al ambiente, \*Ingesta Diaria Admisible (IDA), \*Límite Máximo Residual (LMR) para algunos tipos de cultivos, \*plaguicidas permitidos y restringidos por la legislación mexicana, etc. Afortunadamente, el cambio constante de las normas oficiales mexicanas (NOM), ha traído consigo que los LMR especificados en el CICOPRAFEST, sean obligatorios en ciertos alimentos.

2. El Codex alimentario (7-9,13), en el que se hace mención a \*especificaciones para el lugar de análisis y para el analista, \*formas simples de muestreo, \*notas sobre métodos de análisis de plaguicidas, etc.

Tomando en cuenta estos antecedentes, nuestro país requiere de reglamentos y normas que posibiliten su aplicación, atendiendo los constantes cambios que se registran en lo concerniente a los plaguicidas, abarcando desde la importación, producción local, la transferencia de tecnología, procesos de formulación, transporte de los compuestos y almacenamiento, hasta la comercialización, aplicación y destino final de los desechos (12, 58).

En nuestro país existe la posibilidad de llevar a cabo una sustitución del uso de plaguicidas con un amplio programa de control integrado, gracias a una combinación afortunada de factores. Primero, es uno de los pocos países del Tercer Mundo con los conocimientos y personal adecuado para manejar un programa de este tipo. Segundo, todavía posee un importante sector de agricultura tradicional, donde cientos de miles de pequeños agricultores no han abandonado totalmente los métodos de cultivo que desplaza la agricultura moderna. Tercero, cuenta con una industria nacional y con recursos naturales para satisfacer las necesidades internas de plaguicidas sin depender de las grandes transnacionales. Finalmente, dispone de una infraestructura suficiente para aplicar adecuados reglamentos fitosanitarios que hagan parte de una política articulada y homogénea que garanticen su éxito (58). Por todo lo descrito anteriormente, en el presente trabajo se desarrolló el procedimiento siguiente.

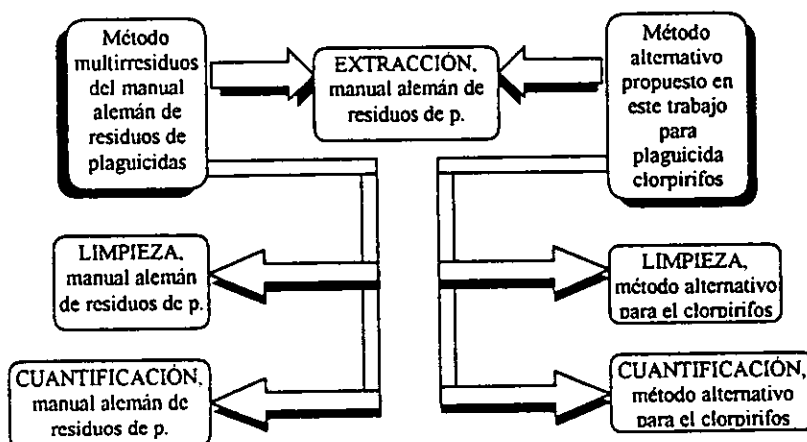
## CAPÍTULO 2

### MATERIALES Y MÉTODOS

A continuación se presenta de forma esquemática, la manera en que se desarrolló el método alternativo propuesto en este trabajo. La extracción, limpieza y cuantificación, están basadas en el manual alemán de análisis de residuos de plaguicidas (25). Para el método alternativo se tiene:

1. Extracción; idéntica a la documentada, pues es adecuada para la extracción del plaguicida en estudio (clorpirifos).
2. Limpieza y cuantificación; se les realizaron las innovaciones correspondientes, ya que las condiciones presentadas por el manual son actualmente obsoletas, por el uso de columnas empacadas.

Figura 2.1 Método alternativo basado en la literatura

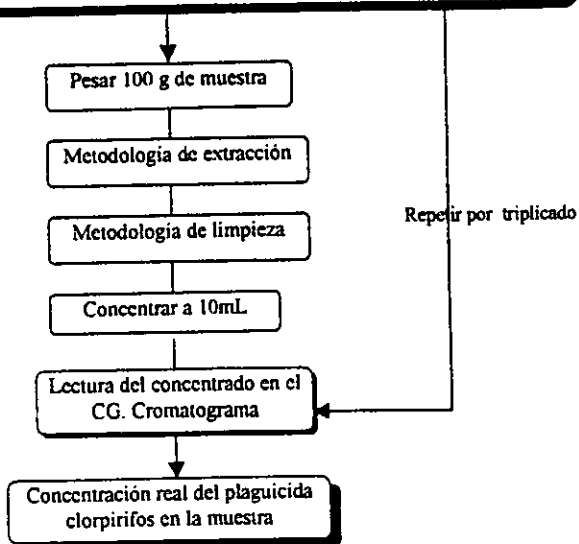


## 2.1 Diagrama general de trabajo

El esquema de la figura 2.2 presenta los pasos generales de la metodología analítica alternativa desarrollada en este trabajo.

Figura 2.2 Diagrama general de trabajo

*Lavado del material:* con detergente neutro al 10%, enjuagar con agua corriente. Agregar agua desionizada, enjuagar. Agregar acetona (de preferencia de grado cromatográfico), meter a la estufa a 100°C por 10min aprox. Colocar en el material un poco de acetona y agitar; posteriormente, tomar una fracción e inyectar en el CG para verificar la ausencia de residuos de plaguicidas.



## 2.2 Materiales: muestras, extracción, limpieza y cuantificación

### a) Compra de muestras

Se compraron cereales para bebés de dos diferentes marcas (las más populares en el país) en un centro comercial al azar, esto debido a que su uso fue restringido a determinar la eficiencia de la técnica propuesta de extracción y limpieza en muestras

de cereales, por lo que los resultados no son estadísticamente representativos. Las muestras de cereales fueron:

**Muestra 1: avena marca 1;** para consumirse por infantes desde los 4 meses de edad.

Ingredientes de acuerdo a la etiqueta del producto: harina de avena, azúcar, extracto de malta, carbonato de calcio, fosfato de sodio, vitaminas, amilasa, fumarato ferroso y vainillina. Presentación granular, bote contenido neto: 300 g.

**Muestra 2: avena marca 2;** Ingredientes de acuerdo a la etiqueta del producto: harina de avena, fosfato dicálcico, harina de malta, vitamina C, hierro electrolítico, niacina, acetato de  $\alpha$ -tocoferol (vit. E), vitamina D-3, vitamina A, palmitato, tiamina (vitamina B-1) y riboflavina (vit. B-2). Presentación en hojuelas, bote contenido neto: 300 g.

**Muestra 3: 5 cereales marca 1;** para consumirse por infantes desde los 6 meses. Ingredientes de acuerdo a la etiqueta del producto: harina de trigo, harina de maíz, harina de arroz, harina de cebada, azúcar, extracto de malta, harina de avena, fosfato disódico, carbonato de calcio, sal yodatada, amilasa, vitaminas, fumarato ferroso y vainillina. Presentación granular, bote contenido neto: 300 g.

**Muestra 4: cereal lacteado trigo marca 2;** Ingredientes de acuerdo a la etiqueta del producto: leche descremada en polvo, harina de trigo, azúcar, aceite de soya, niacina, acetato de  $\alpha$ -tocoferol (vit. E), vitamina D-3, vitamina A, palmitato, tiamina (vitamina B-1) y riboflavina (vit. B-2). Presentación en hojuelas, caja contenido neto: 300 g.

NOTA: Las marcas 1 y 2 son producidas por los líderes en ventas de productos para bebés en México.



b) Material para la EXTRACCIÓN

- 1) Estándar clorpirifos marca *Chemwin* en polvo (frasco con 1 g).
- 2) Rotavapor marca "Sistemas y equipos SEV", con matraces de 500 mL para concentrar.
- 3) Acetato de etilo grado cromatográfico marca Mallinckrodt (presentación un galón).
- 4) Diclorometano grado cromatográfico marca Mallinckrodt (presentación un galón).
- 5) Sulfato de sodio anhidro marca Mallinckrodt (frasco con 500 g).
- 6) Papel filtro Whatman # 42, 125 mm diámetro y # 41, 90 mm diámetro.

c) Material para la LIMPIEZA

Comparando el método alemán (25) con el uso de cartuchos de extracción en fase sólida, se utilizó lo siguiente:

I. *Método de limpieza presentado en el manual alemán para el análisis de residuos de plaguicidas*

- 1) Columna de vidrio con diámetro interno de 4 cm y 25 cm de largo, llave de teflón.
- 2) Fibra de vidrio marca Perkin (caja con 500 g).
- 3) Sulfato de sodio anhidro marca Mallinckrodt (frasco con 500 g).
- 4) Florisil marca J.T. Baker (60-100 mallas), frasco con 500 g. *Pretratamiento:* Antes de utilizarse debe introducirse en la mufla a 550°C por 4 horas; posteriormente, dejar enfriar a 100°C aproximadamente y agregar 3% de agua para desactivar al florisil. Si no se usa de inmediato, antes de utilizarse meter en la estufa a 130+/- 5°C por 5 horas y después agregar 3% de agua.
- 5) Éter de petróleo grado cromatográfico marca Mallinckrodt (presentación un galón).

- 6) Acetato de etilo grado cromatográfico marca Mallinckrodt (presentación un galón).

## II. Método de limpieza desarrollado en el presente trabajo con cartuchos de extracción en fase sólida (EFS)

- 1) Cartuchos empacados con florisil, "Accu Bond, Solid Phase Extraction", marca J&W Scientific, 6mL, 1000 mg.
- 2) Cartuchos empacados con sílice, "Accu Bond, Solid Phase Extraction", marca J&W Scientific, 6mL, 1000 mg.
- 3) Éter de petróleo grado cromatográfico marca Mallinckrodt.
- 4) Acetato de etilo grado cromatográfico marca Mallinckrodt.

### d) Material para CUANTIFICACIÓN

En este paso no se realizó una comparación con el método documentado en el manual alemán, como en el caso de la limpieza, pues la técnica es obsoleta y no fue posible contar con los equipos y materiales requeridos.

#### *I. Método de cuantificación desarrollado en el presente trabajo por medio de la técnica de cromatografía de gases*

- 1) Cromatógrafo de gases (CG) marca "Perkin Elmer" con integrador "PC Nelson".
- 2) Columna capilar marca J&W, 30 m de longitud, d.i. de 0.32mm, DB-1701.
- 3) Jeringa de vidrio con capacidad de 10  $\mu$ L
- 4) Gas helio grado extra puro (99%)
- 5) Gas hidrógeno grado extra puro (90%)
- 6) Aire grado extra seco.

## 2.2 Métodos

Dentro de los siguientes métodos se encuentran la curva de calibración en el cromatógrafo de gases; el análisis de las muestras comerciales (o análisis químico proximal) (1) y las técnicas de extracción, limpieza y cuantificación en las muestras de cereales procesados para bebés.

### 2.3.1 Curva de calibración en el cromatógrafo de gases

En primer lugar se realizaron diferentes pruebas para conocer las condiciones óptimas de trabajo en el cromatógrafo de gases. Además, se determinó el tiempo de retención al cual aparece el pico del plaguicida clorpirifos (11.8min). La curva de calibración se realizó con la ayuda del estándar en polvo del plaguicida clorpirifos marca Chemwin, disuelto en acetato de etilo grado cromatográfico. Se preparó una solución concentrada ("solución madre") de 200ppm, a partir de la cual se hicieron las diluciones correspondientes con acetato de etilo para obtener concentraciones a partir de 1 ppm hasta 200 ppm. Posteriormente, las diferentes diluciones se inyectaron en el cromatógrafo de gases para conocer las concentraciones reales de las mismas con su correspondiente área y altura del pico (los cuales son parámetros del integrador "PC Nelson") y obtener de esta forma la linealidad de la curva estándar.

### 2.3.2 Análisis de las muestras comerciales (análisis químico proximal)

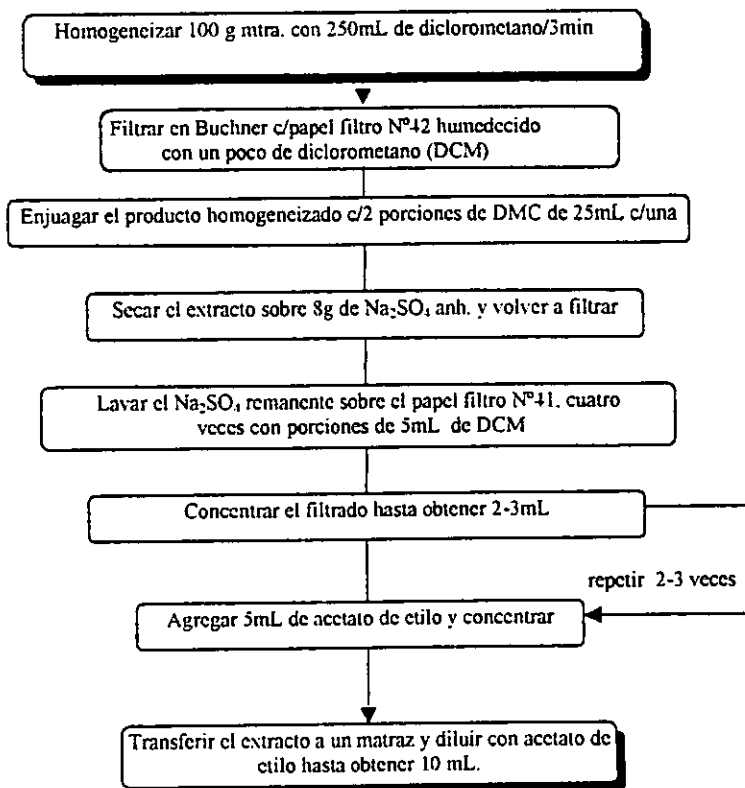
Los análisis se realizaron de acuerdo al método del AOAC (1), con el que se determinaron humedad, cenizas y grasa cruda. El porcentaje de proteínas se determinó con la ayuda del analizador elemental marca CE Instruments, elemental

analizer 1110CHNS-O. Se usó un factor de 6.25 para convertir de % de nitrógeno a % de proteína. Toda esta caracterización provee la información necesaria para determinar la forma de realizar el análisis (i.e., tipos de disolventes a utilizar, clase y cantidad de compuestos interferentes a eliminar para obtener solamente el extracto con el plaguicida de interés, etcétera). En el apéndice 2 se presenta la descripción de la metodología.

### 2.3.3 *Técnica de extracción del clorpirifos*

A continuación en la figura 2.3 se presenta el diagrama de extracción.

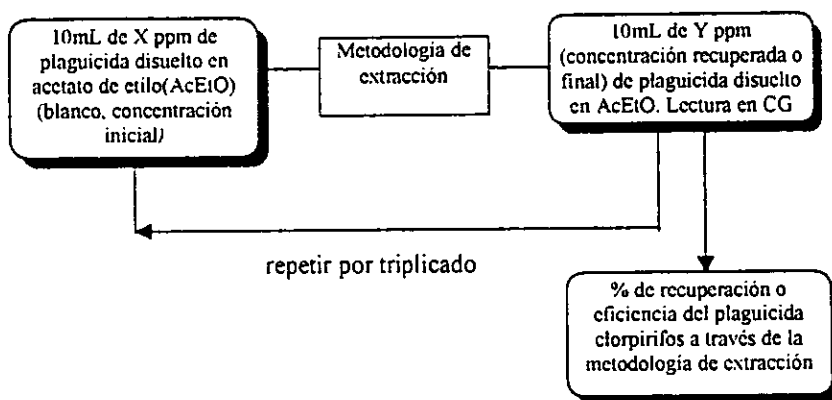
Figura 2.3 Diagrama de extracción (25)



A esta técnica de extracción, se le realizó una prueba de eficiencia (por triplicado), para conocer el porcentaje real de clorpirifos que es capaz de extraer este método. La prueba se llevó a cabo con la ayuda de un blanco (plaguicida disuelto en acetato de etilo, para no ensuciar la columna cromatográfica con grasa y aditivos de la muestra).

En la figura 2.4 se presentan los pasos para determinar el porcentaje de eficiencia en la extracción. Los cálculos correspondientes se encuentran en el apéndice 3.

Figura 2.4 Eficiencia de la extracción

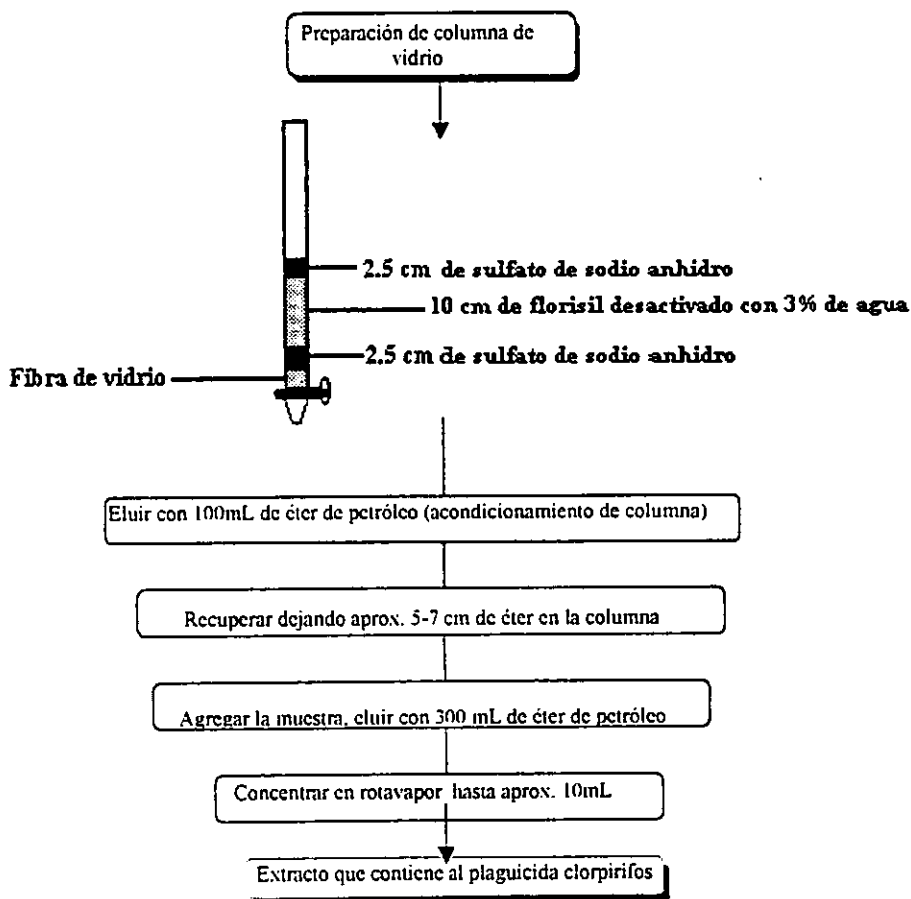


### 2.3.4 Técnicas de limpieza

#### I. Método de limpieza presentado en el manual alemán para el análisis de residuos de plaguicidas

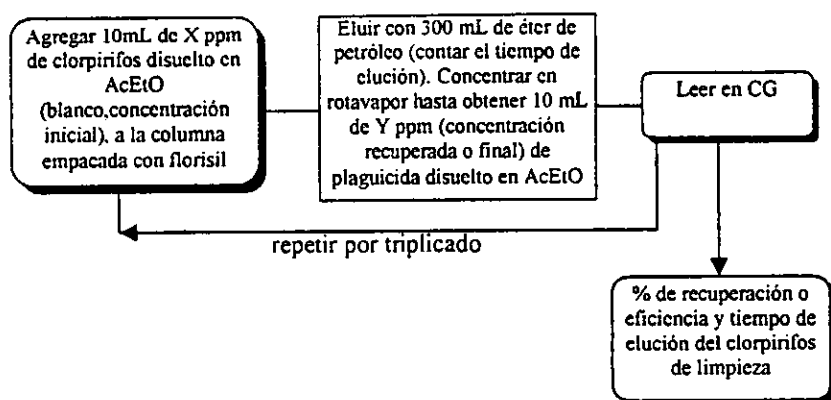
En la figura 2.5 se encuentra el método de limpieza documentado en el manual alemán (25), a partir del cual se basan los métodos alternativos de limpieza propuestos en este trabajo.

Figura 2.5 Diagrama de limpieza (25)



Al método anterior, se le determinó el tiempo de elución y la eficiencia o porcentaje de recuperación, del mismo modo que en la de extracción con el uso de un blanco. En este caso, no se realizó la determinación del volumen de elución pues se encuentra especificado en el método. La figura 2.6 presenta el esquema para determinar la eficiencia y el tiempo de elución con muestra, de la limpieza.

Figura 2.6 Eficiencia y tiempo de elución del método de limpieza del manual alemán

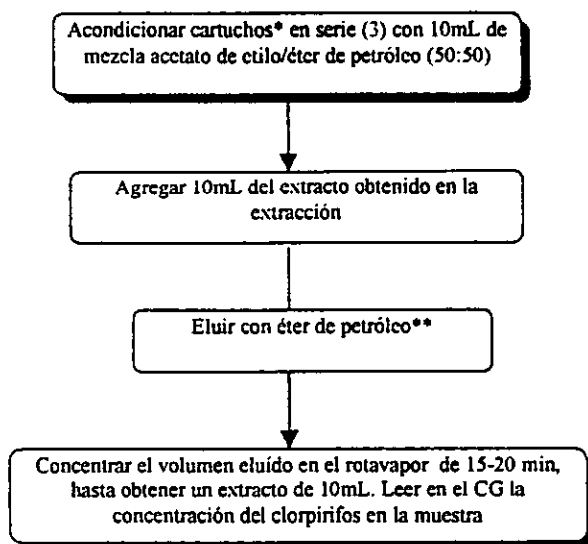


## II. *Método de limpieza desarrollado en el presente trabajo con cartuchos de extracción en fase sólida (EFS)*

A continuación se presenta el esquema de la limpieza alternativa, la cual utiliza cartuchos de extracción en fase sólida, en lugar de una columna de vidrio como en el método de limpieza documentado.

La limpieza se realizó de dos formas 1) con cartuchos de florisil de EFS y 2) con cartuchos de sílice de EFS, para los cuales la técnica es la que se muestra en la figura 2.7

Figura 2.7 Diagrama de limpieza



\*En este paso se varía el tipo de cartuchos; en primer lugar se realiza con cartuchos de florisil. Posteriormente, se lleva a cabo con cartuchos de sílice

\*\*El volumen de elución se determina posteriormente dependiendo del tipo de cartuchos

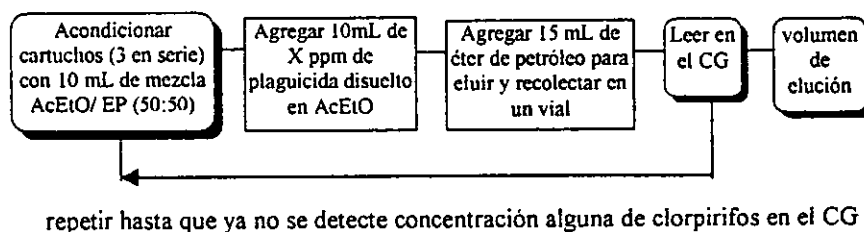
Se utilizaron 3 cartuchos en serie de cada material, por la gran cantidad de interferentes que contiene la muestra (proteínas, carbohidratos, grasas, aditivos y colorantes, entre otros).



Para obtener las condiciones de limpieza, de tal forma que sean reproducibles, se determinó el volumen y tiempo de elución, así como la eficiencia para los cartuchos de florisil y sílice.

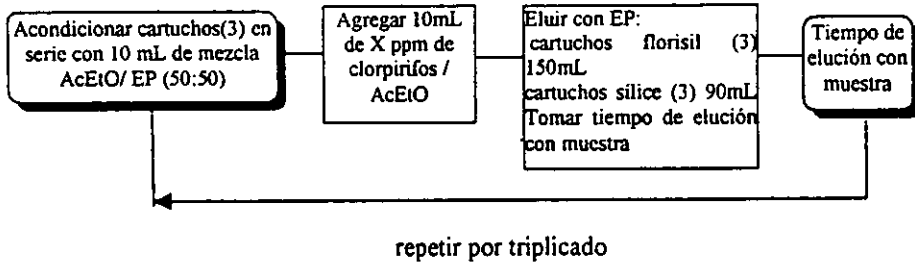
En la figura 2.8 se presenta la metodología para determinar el volumen de elución de los 3 cartuchos en serie de los diferentes materiales (florisil y sílice) por separado. Los cálculos se encuentran en el apéndice 3.

Figura 2.8 Determinación del volumen de elución para los cartuchos (3 en serie) de extracción en fase sólida.



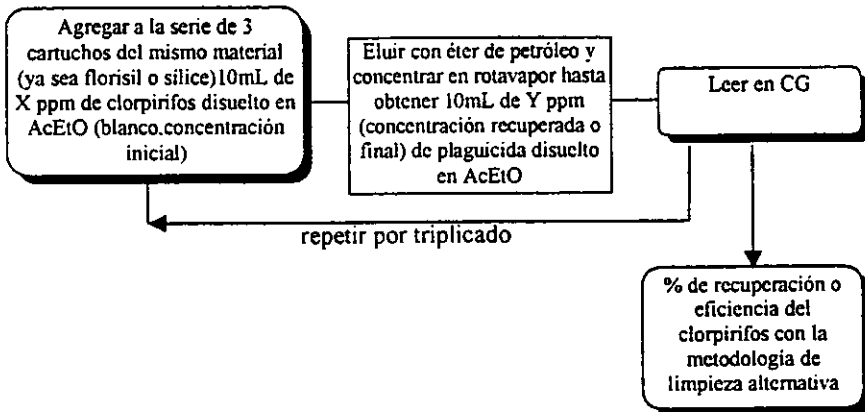
En la figura 2.9 se presenta el método con el cual se determinó el tiempo de elución de la técnica alternativa de limpieza con cartuchos de florisil y sílice. En el apéndice 3 se encuentran los cálculos correspondientes.

Figura 2.9 Tiempo de elución de la limpieza alternativa con muestra



En la figura 2.10 se presenta el esquema de la técnica para determinar la eficiencia de la limpieza utilizando los diferentes tipos de cartucho.

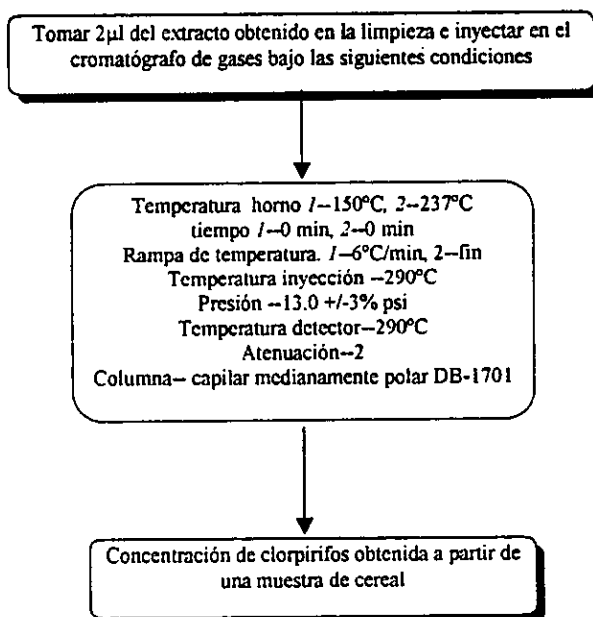
Figura 2.10 Eficiencia v tiempo de elución del método de limpieza del manual alemán



### 2.3.5 Técnica de cuantificación

En la figura 2.11 se presenta la técnica de cuantificación y las condiciones óptimas del CG, que fueron previamente probadas.

Figura 2.11 Técnica de cuantificación



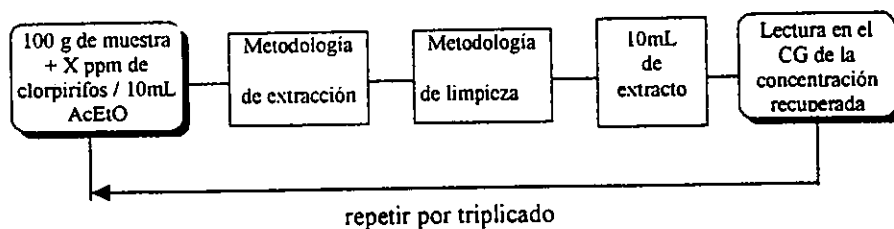
### 2.3.6 Cuantificación de clorpirifos (adición del estándar)

En esta parte se realizó un análisis completo en muestras de cereal, para llevar a cabo una comparación de las técnicas de limpieza (manual alemán, cartuchos de florisil y cartuchos de sílice) con sus respectivos volúmenes, tiempos de elución y

eficiencia (encontrados en los pasos anteriores), comprobando así el funcionamiento de las mismas frente a las muestras; adicionando un estándar para corroborar que los picos encontrados a los 11.8 min, sean del clorpirifos.

En la figura 2.12 se presenta un diagrama con los pasos para conocer la concentración del plaguicida clorpirifos en las muestras de cereales con la ayuda del estándar. En el apéndice 3 se encuentran los cálculos correspondientes.

Figura 2.12 Cuantificación de clorpirifos con adición de estándar



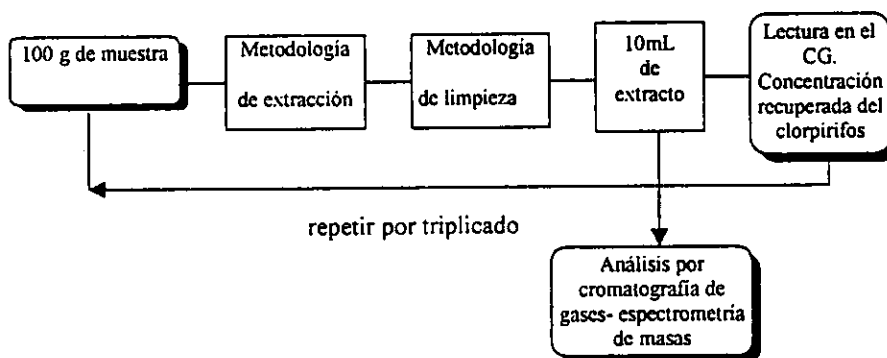
### 2.3.6 Cuantificación del clorpirifos (sin la adición del estándar)

En la figura 2.13 se presenta un diagrama con el procedimiento analítico desarrollado en esta investigación para conocer la concentración del plaguicida clorpirifos a partir de muestras de cereales sin la adición de un estándar. El extracto obtenido en este paso se analizó posteriormente con la técnica confirmativa de cromatografía de gases - espectrometría de masas. El análisis fue realizado por la

USAI (Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación en la Facultad de Química).

En el apéndice 3 se encuentran los cálculos correspondientes.

**Figura 2.13 Cuantificación de clorpirifos sin adición de estándar**



## CAPÍTULO 3

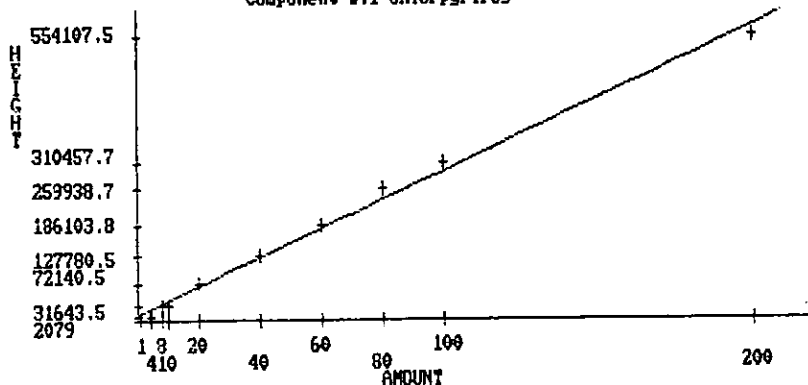
### RESULTADOS y DISCUSIÓN

#### 3.1 Curva de calibración en el cromatógrafo de gases

En la figura 3.1 se presenta un esquema con la curva de calibración obtenida en el integrador "PC Nelson" del cromatógrafo de gases, la cual tiene una buena linealidad (0.9938), lo que proporciona un buen medio para interpolar los resultados obtenidos en las muestras de cereales. El límite de cuantificación que se obtuvo de la inyección de la curva de calibración en el cromatógrafo de gases es de 1ppm, concentración a partir de la cual el integrador "PC Nelson" provee una buena respuesta, desde el punto de vista de integración del pico del clorpirifos.

Figura 3.1 Curva de calibración

Component 8:1 chlorpyrifos



Component 1 = chlorpyrifos  
EXTERNAL STANDARD CALIBRATION  
HEIGHT

| LEVEL | AMOUNT | HEIGHT |
|-------|--------|--------|
| 1     | 1.00   | 2079   |
| 2     | 4.00   | 10294  |
| 3     | 8.00   | 27890  |
| 4     | 10.00  | 31643  |
| 5     | 20.00  | 72141  |
| 6     | 40.00  | 127781 |
| 7     | 60.00  | 186104 |
| 8     | 80.00  | 259939 |
| 9     | 100.00 | 310458 |
| 10    | 200.00 | 554108 |

R squared = 0.9938

### 3.2 *Análisis de las muestras comerciales (análisis químico proximal)*

Este análisis proporcionó resultados muy parecidos a los presentados en las etiquetas de las muestras de cereales (en el apéndice 3 se encuentran los datos incluidos en las etiquetas de las muestras de cereales), con los que se caracteriza a la muestra. En la tabla 3.1 se proporcionan los resultados:

- Porcentaje de grasas y proteínas: En un intervalo del 1.30-6.50% de grasas y del 10.27-17.61% de proteínas, variación que se da por los diferentes tipos de harina. Este resultado influyó en la decisión de utilizar disolventes orgánicos de polaridad media en la extracción, para tratar de eluir únicamente al plaguicida OF clorpirifos (medianamente polar), en lugar de arrastrar compuestos más apolares como grasas, proteínas, vitaminas liposolubles, entre otros, que interfieren en el análisis cromatográfico.

- Porcentaje de humedad: valores relativamente diferentes a los presentados en las etiquetas, lo cual se debe a las condiciones de manejo, transporte y almacenamiento de los empaques anteriores al análisis.

- Porcentaje de cenizas: resultados relativamente altos (en un intervalo de 2.37-5.84%), por la gran cantidad de aditivos inorgánicos adicionados a los cereales, como vitaminas y minerales, los cuales sirven como medio de fortificación.

- Porcentaje de carbohidratos: los valores se encuentran en un intervalo de 6.7052-79.3337%; estos se deben eliminar completamente en la extracción y limpieza para evitar reacciones de caramelización y /o Maillard al analizar la muestra en el CG a altas temperaturas (150-230°C).

En el apéndice 2 se muestran las técnicas de este análisis y se presenta uno de los reportes obtenidos en el analizador elemental para la determinación del porcentaje de proteínas (como % de nitrógeno x factor 6.25). El analizador elemental obtiene un porcentaje más alto de proteínas, aproximadamente 0.25%, en comparación con los que proporcionan las etiquetas de los cereales; en este último equipo se trabaja en línea asegurando la ausencia de fugas, mientras que el tradicional Kjeldahl (método analítico para determinar proteínas utilizado en la mayoría de las industrias), puede tener varios errores por la forma en que se digiere y analiza la muestra.

**Tabla 3.1 Análisis químico proximal**

| <b>PORCENTAJE</b>           | <b>INTERVALO %</b> |
|-----------------------------|--------------------|
| Porcentaje de humedad       | 3.2584 a 4.4597    |
| Porcentaje de cenizas       | 2.3725 a 5.8406    |
| Porcentaje de grasa cruda   | 1.3016 a 6.5013    |
| Porcentaje de carbohidratos | 66.7052 a 79.3337  |
| Porcentaje de proteínas     | 10.2776 a 17.6162  |

**3.3 *Eficiencia de la extracción. Volumen y tiempos de elución, eficiencia y costos, para la limpieza con: a) columna empacada con florisil del manual alemán y b) cartuchos de extracción en fase sólida***

En la extracción se obtuvo una eficiencia o porcentaje de recuperación satisfactorio de 64.445%, debido al manejo de la muestra (homogeneización en mortero, varias filtraciones, etc.), con un tiempo de realización de aproximadamente 1h.

A continuación se presenta la tabla 3.2 con los volúmenes y tiempos de elución, eficiencia y costos para los diferentes métodos de limpieza (1.manual alemán para el



análisis de residuos de plaguicidas (25), con la columna de vidrio empacada con florisil; 2.limpieza alternativa con los cartuchos de florisil y 3. limpieza alternativa con los cartuchos de sílice). Los costos incluyen el precio de los materiales para la limpieza como son: disolventes para el acondicionamiento y elución, además, en el caso de la limpieza alternativa con cartuchos de florisil o sílice, se incluye el precio de los mismos, a diferencia del costo de la columna de vidrio empacada con florisil, pues no se incluye el precio de la columna de vidrio porque se puede utilizar varias veces.

**Tabla 3.2 Comparación de resultados de los diferentes métodos de limpieza**

| Tipo de limpieza                      | Volumen promedio de elución | Tiempo de elución promedio con muestra (min) | Eficiencia promedio (%) | Costo    |
|---------------------------------------|-----------------------------|--|-------------------------|----------|
| Columna de vidrio empacada c/florisil | 300 mL                      | 19.93  | 86.131%                 | \$148.73 |
| Cartuchos florisil (3)                | 150 mL                      | 26.03  | 85.2554%                | \$108.97 |
| Cartuchos sílice (3)                  | 90 mL                       | 27.60  | 90.4312%                | \$94.92  |

La eficiencia o porcentaje de recuperación para la limpieza en columna empacada con florisil registró un 86.131%. Lo anterior se debe a que el florisil presenta las siguientes características:

- \* Es un adsorbente de tierra de diatomeas que retiene selectivamente algunos lípidos; particularmente adecuado para la limpieza de alimentos grasos.
- \* Resulta eficaz en la limpieza de plaguicidas no polares como los hidrocarburos clorados, produce efluentes muy limpios y remueve la mayoría de la interferencias cuando son eluidos con disolventes no polares.

\* No se recomienda su uso en frutas y verduras cuando estén presentes plaguicidas moderadamente polares (a) apolares.

\* Son propensos a variar de un análisis a otro.

\* Algunas veces oxida a los organofosfatos con los enlaces tioéster y absorbe a algunos oxonios irreversiblemente.

\* Es un material ampliamente utilizado en los EEUUA (60).

En comparación, los cartuchos de extracción en fase sólida de florisil, obtuvieron un porcentaje de recuperación de 85.2554%, que no es muy diferente al de la columna empacada, lo que da la pauta para utilizar preferentemente los cartuchos de florisil que son más económicos, más fáciles de usar por su tamaño y utilizan menor cantidad de disolvente orgánico.

Los cartuchos de extracción en fase sólida de sílice, obtuvieron resultados óptimos por su bajo volumen de elución (90mL) y alto porcentaje de recuperación (90.4312%). Lo anterior se debe a las características que proporciona la sílice, a saber:

\* Especialmente eficaz en el aislamiento de algunos plaguicidas polares sin pérdida.

\* Inadecuada para separar a algunos plaguicidas de sus coextractos de plantas.

\* Capaz de separar adecuadamente algunos plaguicidas organoclorados, sobre todo de grasas animales (65). Además los cartuchos por su pequeño tamaño y envase plástico, son más fácil de almacenar y transportar. El único problema en los cartuchos de sílice, es el tiempo de elución, ligeramente mayor al de los cartuchos de florisil y 38% aprox. Mayor que el de la columna de vidrio, pero todo dependerá de las prioridades que tenga el usuario, si quiere menor costo y mayor eficiencia lo recomendable es la

limpieza con cartuchos de sílice, si lo que busca es un menor tiempo de elución, una eficiencia media y un costo razonable, deberá llevar a cabo la limpieza con cartuchos en serie de florisil, pero si lo que quiere es tener un análisis rápido, una eficiencia media, no importando el costo, deberá realizar la limpieza con el uso de una columna empacada con florisil (que se tarda 4h en su preparación).

### 3.4 *Recuperación de clorpirifos en muestras de cereales adicionadas con estándar*

Se realizó el análisis completo por triplicado de las muestras de diferentes marcas de cereales procesados para bebés comprados al azar, usando los tres diferentes tipos de limpieza (columna empacada con florisil, los cartuchos de florisil y los cartuchos de sílice), en la tabla 3.3 se presentan los resultados correspondientes.

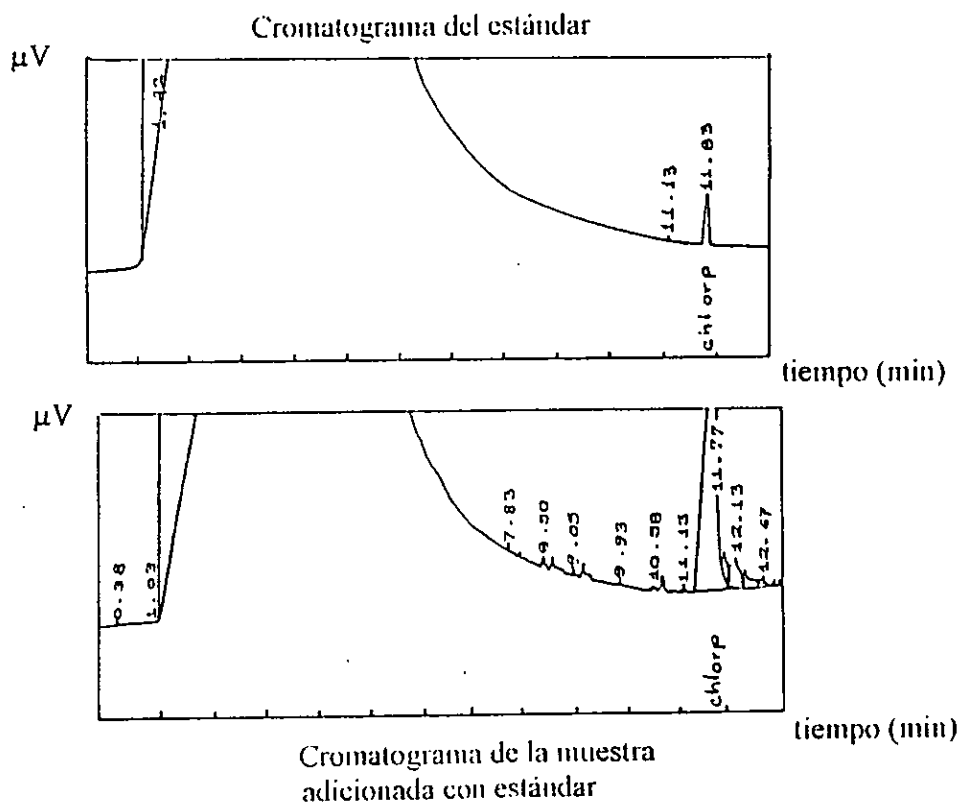
Tabla 3.3 **Resultados de los diferentes métodos de limpieza frente a muestras de cereales procesados**

| Muestra                           | Método de limpieza    | mg de clorpirifos / kg de muestra (ppm) |
|-----------------------------------|-----------------------|---|
| avena marca 1                     | Columna empacada      | 2.9463 ppm                              |
| 5 cereales marca 1                | Cartuchos de florisil | 4.0630 ppm                              |
| cereal lacteado de trigo, marca 2 | Cartuchos de sílice   | 4.3012 ppm                              |

En la figura 3.2, se presentan *algunos* de los cromatogramas obtenidos a partir de las muestras de cereales antes mencionadas con adición del estándar clorpirifos, en los que se puede observar al principio un gran pico del disolvente (tiempo de retención= 1-6 min aprox.), para posteriormente aparecer algunos compuestos

interferentes o impurezas (tiempo de retención= 6-10min) y, por último, el plaguicida clorpirifos (tiempo de retención= 11.8min aprox.), lo que indica un buen trabajo por parte de los 3 métodos de limpieza probados, pues da como resultado una buena separación entre los componentes de la muestra.

Figura 3.2 Cromatogramas obtenidos a partir del análisis de cereales procesados con adición de estándar



Condiciones de trabajo en la figura 2.11

### 3.4 Recuperación de clorpirifos en muestras de cereales sin adición de estándar

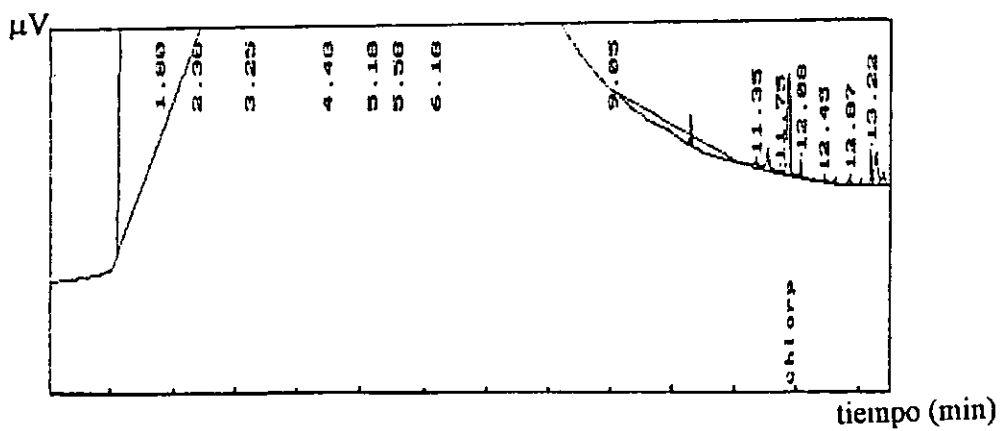
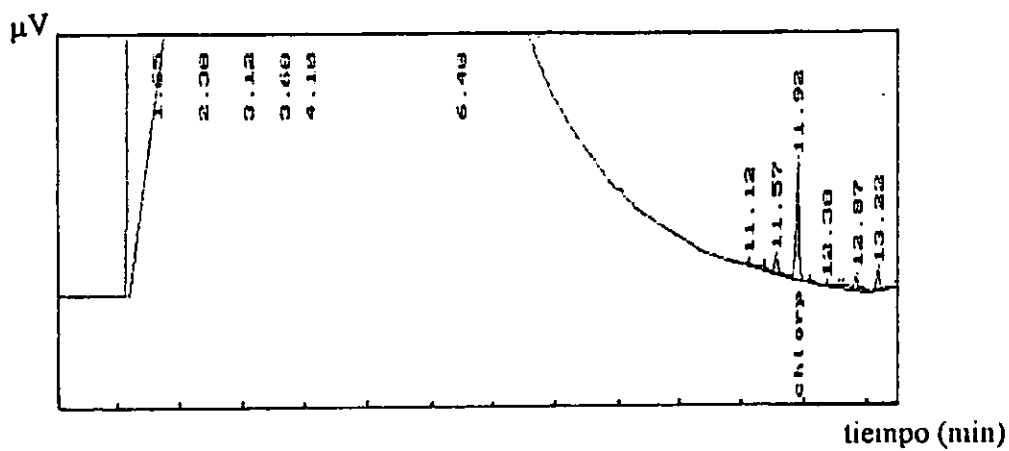
Las muestras de la tabla 3.4 (pertenecientes a lotes distintos de las primeras muestras, paso 3.4), fueron analizadas con el procedimiento analítico desarrollado en esta investigación por triplicado (punto 2.3.6 de la metodología), usando el método de limpieza que utiliza a los cartuchos de sílice en serie, técnica que presentó los mejores resultados en cuanto a eficiencia y costo del análisis.

Tabla 3.4 Concentraciones finales de clorpirifos, obtenidas a partir de muestras de cereales procesados para bebés

| Muestra                           | mg de clorpirifos / kg de muestra (ppm) |
|-----------------------------------|---|
| avena marca <b>1</b>              | 18.3765mg/kg                            |
| 5 cereales <b>1</b>               | 1.577mg/kg                              |
| cereal lacteado de trigo <b>2</b> | 10.118mg/kg                             |
| avena marca <b>2</b>              | 9.6344mg/kg                             |

A continuación en la figura 3.3, se presentan *algunos* de los cromatogramas obtenidos en este análisis.

Figura 3.3 Cromatogramas obtenidos a partir del análisis de cereales procesados sin adición de estándar



Condiciones de trabajo en la figura 2.11

### 3.6 Resultados de la confirmación del pico del clorpirifos por gases-masas

Se llevó a cabo el análisis de los extractos de las muestras obtenidas en el paso anterior, con la ayuda de la técnica confirmativa de cromatografía de gases (CG) acoplada a espectrometría de masas (EM), pues al no adicionar un estándar del plaguicida de interés, se corre el riesgo de tener error al interpretar el cromatograma de gases, ya que existen varios compuestos con el mismo tiempo de retención del clorpirifos.

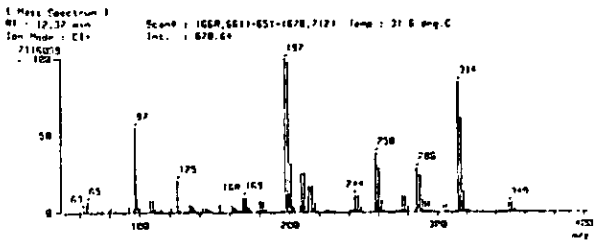
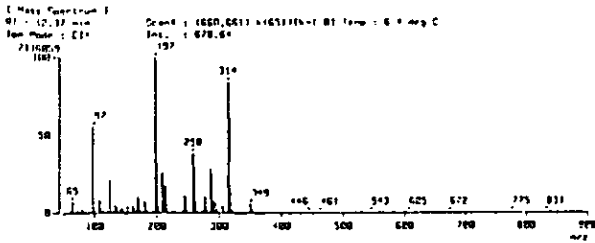
En cambio con la técnica de gases-masas, se separa en principio, al plaguicida clorpirifos de los demás compuestos interferentes por cromatografía de gases; posteriormente, se determina el peso molecular y la fragmentación del mismo con la espectrometría de masas, evitando así errores, pues los pesos moleculares y las fragmentaciones son únicas para cada compuesto. El análisis fue realizado por el laboratorio conocido como la USAI (Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación), en la Facultad de Química de la UNAM, con los siguientes resultados:

a) Las muestras 1 y 4 con concentraciones de 18.3765 y 10.118 mg de clorpirifos /kg de muestra (ppm) respectivamente, presentaron las condiciones características del clorpirifos con la CG a los 11.8 min y a través de la EM un ión molecular con  $m/z$  (masa /carga)=349-350 y pico base de  $m/z$ =197-198, mientras que las muestras 2 y 3 no pudieron ser analizadas por la presencia de compuestos interferentes.

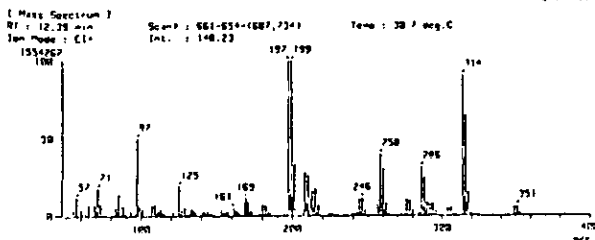
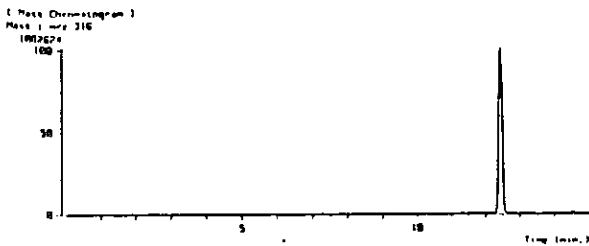
En la figura 3.4 se presenta el cromatograma de gases y el espectro de masas obtenido a partir de 1) el estándar del clorpirifos y 2) una de las muestras.

Figura 3.4 Cromatograma de gases v espectro de masas

### 1) Estándar Clorpirifos



### 2) Una de las muestras





## CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

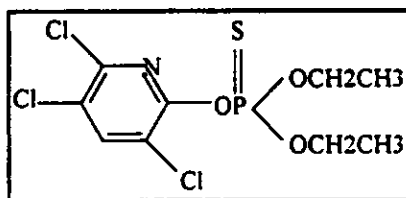
1. En la curva de calibración, al utilizar un estándar de clorpirifos con 99% de pureza, se aseguró una buena linealidad de la misma, lo que permitió que se pudiesen interpolar los resultados obtenidos en el análisis para conocer la concentración de los cereales procesados.
2. El detector de ionización de flama (IF), proporcionó una detección del orden de los  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , lo cual es sensible para compuestos como los plaguicidas que se encuentran a nivel de trazas. Para obtener una mayor sensibilidad y, por lo tanto, un mayor intervalo de detección, se recomienda utilizar un detector de captura de electrones (CE), con el que se pueden alcanzar concentraciones de  $\text{ng}/\text{L}$  o hasta  $\text{pg}/\text{L}$ .
3. Los cartuchos de extracción en fase sólida, presentan varias ventajas para realizar la limpieza de los extractos obtenidos a partir de las muestras de cereales procesados, gracias a su forma de trabajo, almacenamiento, transporte dinámico, menor tiempo de exposición al plaguicida por parte del analista y su bajo costo.
4. Se encontró al plaguicida OF clorpirifos por medio de la CG en todas las muestras, en un intervalo de 1.577-18.3765  $\text{mg}$  de clorpirifos/  $\text{kg}$  de muestra ( $\text{ppm}$ ), valor no representativo estadísticamente. Aún así, los valores residuales son más altos que los reportados por CICLOPLAFEST (12) (0.5 $\text{ppm}$  como límite máximo residual por ejemplo para trigo e  $\text{IDA} = 0.01 \text{ mg}/\text{kg}$ ) (Apéndice 1).

5. A las muestras que no se les adicionó un estándar, se les realizó la prueba confirmativa por medio de la técnica de gases-masas.
6. Con la EM se determinó que las muestras de avena marca 1 y 2, contenían clorpirifos, mientras que en las muestras de 5 cereales marca 1 y cereal lacteado de trigo marca 2, no se pudo confirmar la presencia de clorpirifos, por la presencia de compuestos interferentes presentes en los extractos (los cuales se veían aumentados debido a la sensibilidad del equipo de CG-EM).
7. Se esperaba encontrar al plaguicida clorpirifos en los cereales procesados, ya que es un insecticida muy utilizado en el cultivo y almacenaje de los mismos, además, persiste durante un tiempo considerable (apéndice 1), fenómeno que se ve incrementado por los procesos de manufactura como la deshidratación y cocción.
8. El procedimiento analítico desarrollado en esta investigación, dará la pauta para que se realicen análisis a alimentos como los cereales procesados, de forma rutinaria y sencilla, para el control de la materia prima, presentando un costo-beneficio alto, en virtud del costo y poco tiempo de realización del análisis.
9. Se recomienda que, posteriormente, se realice un *estudio estadístico por lotes* de los cereales procesados, para que se llegue a conocer las verdaderas concentraciones del plaguicida clorpirifos en cereales procesados para bebés y correlacionar el mismo, con la incidencia de enfermedades en infantes.

10. Se deben tener medidas máximas de seguridad al realizar el análisis, esto es, usar mascarilla, guantes, bata, entre otros, para evitar en la medida de lo posible la contaminación del analista; además, el personal se debe hacer un “chequeo médico” regular (aproximadamente cada 6 meses, dependiendo de la exposición) de colinesterasa, a fin de evitar intoxicaciones agudas o crónicas.
  
11. A la vez, se recomienda que poco a poco se sustituya el uso de plaguicidas con el control integral de plagas (15).

## APÉNDICES

### APÉNDICE 1. Características generales del clorpirifos



CLORPIRIFOS

Características principales:

CAS Registro N° 2921-88-2

Sinónimos: O,O-dietil-O-(3,5,6-tricloro-2-piridil)fosforotioato; Lorsban; Dursban; Clorpirifos-etil seco; 3,5,6-tricloro-2-piridil dietil fosforotionato.

Fórmula molecular  $C_9H_{11}Cl_3NO_3PS$

Peso Molecular: 350.59

Usos: Insecticida, acaricida.

Se han encontrado residuos en: tierra, grasas animales y cultivos.

*Propiedades físicas :*

Punto de fusión, 42°C.

Punto de ebullición, 160°C.

Gravedad específica,  $d_4^{20}$  1.308.

Coefficiente de reparto log Pow 5.1.

Volatilidad  $1.87 \times 10^{-5}$  mmHg a 25°C.

Solubilidad: En agua, 2mg L<sup>-1</sup> a 25°C. En solventes orgánicos. isooctano, metanol.

**Exposición ocupacional**

Ingesta Diaria Admisible (IDA) (mg/kg), clorpirifos: etil 0.01

IDA (mg/kg). clorpirifos metil 0.001

límite máximo 0.6 mg; límite mínimo 0.2;

Clasificación: tóxico. Tóxico al contacto con la piel y por inhalación.

Si hay contacto con la piel, lavar inmediatamente con jabón y agua en abundancia.

Usar ropa adecuada y lentes de protección - Si se siente enfermo o mareado, acudir inmediatamente al médico mostrando la etiqueta del envase del producto si es posible.

Usos: Agrícola, pecuario, doméstico, urbano e industrial

Categoría toxicológica del producto técnico: II Altamente tóxico

Tipo de plaguicida: Insecticida organofosforado de contacto.

Persistencia: Poco persistente

**Tabla A 1.1 Límite máximo residual e intervalo de seguridad para algunos alimentos (12)**

| Uso autorizado en | Límite máximo residual (ppm) | Intervalo de seguridad (días) |
|-------------------|------------------------------|-------------------------------|
| Alfalfa           | 3.00                         | 21                            |
| Algodonero        | 0.20                         | 21                            |
| Arroz             | 0.10                         | 21                            |
| Chile             | 1.00                         | 7                             |
| Citricos          | 1.00                         | 34                            |
| Frijol ejotero    | 0.05                         | 20                            |
| Jitomate          | 0.50                         | 1                             |
| Maiz              | 0.05                         | 21                            |
| Manzano           | 1.50                         | 30                            |
| Pepino            | 0.05                         | 7                             |
| Sorgo             | 0.75                         | 21                            |
| Soya              | 0.30                         | 21                            |
| Trigo             | 0.50                         | 28                            |

Presentación: líquido técnico, polvo técnico, sólido técnico (15)

## APÉNDICE 2. Análisis de las muestras comerciales (análisis proximal). Técnicas

### *Determinación de humedad*

(Método del AOAC 1980)

Pesar de 2-3g de muestra preparada en pesafiltro con tapa, que ha sido previamente pesado y puesto a peso constante por dos horas a 130+/- 3°C. Secar la muestra 1 hora en la estufa a 130+/-3°C con la tapa del pesafiltro a un lado. Retirar y dejar enfriar dentro de un desecador hasta que se equilibre a temperatura ambiente, pesar. Reportar como pérdida por secado a 130°C. Hacer por duplicado.

$$\% \text{Humedad} = (A - B / M) * 100$$

A= pesa filtro más muestra.

B= pesa filtro más muestra después de secar.

M= peso de la muestra en gramos.

### *Determinación de cenizas*

(Método del AOAC 1980)

Pesar 3-5 gramos de muestra en crisol previamente tratado (pretratamiento para el crisol: pesar crisol y meterlo a la mufla a 550-600°C / 2 horas, sacar y dejar enfriar en desecador a temperatura ambiente, pesar y utilizar a partir de que se equilibre su temperatura), no sobrepasar la mitad del crisol. Calcinar la muestra carbonizando primero con mechero hasta que no se desprendan humos. Meter a la mufla cuidando que la temperatura no pase de 550°C. Se suspende el calentamiento cuando las cenizas estén blancas o grises, aproximadamente 2-3 horas después (si se observan puntos negros, se humedecen con unas gotas de agua destilada secándose

posteriormente en la estufa a 130°C y se vuelven a calcinar). Enfriar en desecador y pesar. Hacer por duplicado.

$$\% \text{Cenizas} = (A - B / M) * 100$$

A= peso crisol con cenizas.

B= peso crisol vacío.

M= peso de la muestra en gramos.

### *Determinación de grasa cruda ( Método de Soxhlet)*

(Método del AOAC 1980)

Pesar un cartucho de celulosa; posteriormente, pesar de 4-5g de muestra, colocarla dentro del cartucho y volver a pesar. Tapar la muestra con algodón y colocar el cartucho en el extractor. Por otro lado, colocar piedras porosas o perlas de vidrio en el matraz para regular la ebullición, llevarlo a la estufa a 100°C durante 2 horas, dejar enfriar y pesar. Conectar el matraz al extractor y éste al refrigerante (no poner grasa en las juntas). Se agrega éter etílico por el refrigerante en cantidad de dos cargas y se calienta el matraz con parrilla aproximadamente 4 horas. Para saber si ya se ha extraído toda la grasa, se depositan unas gotas del éter que resbala del refrigerante sobre un papel filtro para verificar que al evaporarse el éter no queden residuos de grasa. Se saca el cartucho con la muestra desengrasada y se guarda en un frasco, para seguir calentando hasta la casi total eliminación del éter, recuperándolo antes de que se descargue. Quitar el matraz y calentarlo bajo la campana hasta la total evaporación del éter. Secar el extracto a 100°C por 30 min, enfriar y pesar.

$$\% \text{Grasa cruda} = [(A - B) / C] * 100$$

A= Peso matraz con extracto

B= Peso matraz vacío

C= Peso muestra en gramos

### ***Determinación de carbohidratos totales***

(Método del AOAC 1980)

Se determinaron carbohidratos totales por diferencia:

% de carbohidratos totales =  $100 - (\% \text{ humedad} + \% \text{ de cenizas} + \% \text{ de proteína} + \% \text{ de grasa})$

### ***Determinación de proteína cruda***

La determinación de proteína se realizó a través del analizador elemental 1110 CHNS-O, CE Instruments; utilizando como factor de conversión de nitrógeno a proteína, 6.25. Se pesan de 2.5 a 3 mg de muestra en una cápsula de estaño, se cierra perfectamente y se introduce en el inyector automático; todo esto por triplicado.

Se vacían todos los datos en el integrador Eager 2000 del equipo y se dejan correr los espectros correspondientes para obtener el porcentaje de proteína.

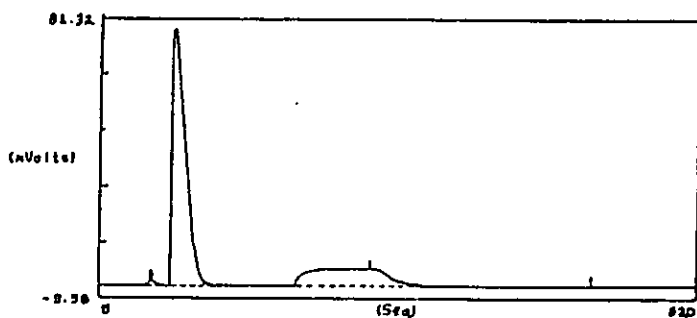
A continuación, en la figura A 2.1, se presenta uno de los espectros que proporcionado por el analizador elemental.



Figura A 2.1 Reporte presentado por el analizador elemental

## EAGER 200 Stripchart.

Sample Ident. : 49 avenanestum      Filename : ago0897  
 Analysed : 08-08-97 17:46:13      Printed : 08-08-1997 17:54:57



## EAGER 200 Peak Integration Report

Instrument name : Instrument #1      Bline drift (uV):-48.7  
 Company Name : gtz      Operator Ident. : EriKa  
 Analysed : 08-08-97 17:46:13      Printed : 08-08-1997 17:55:01  
 Sample Ident. : 49 avenanestum      Filename : ago0897  
 Sample Weight : 2.494      Calc.method: using 'K. Factors'

| No. (#) | Type (#) | Start (Sec) | End (Sec) | Ret Time (Sec) | Height (uV) | Area (uV*Sec) | Area % (%) | Name     |
|---------|----------|-------------|-----------|----------------|-------------|---------------|------------|----------|
| 1       | FU       | 39          | 61        | 46             | 1598.2      | 13778         | 1.06       | Nitrogen |
| 2       | FU       | 61          | 166       | 66             | 75274.8     | 877587        | 67.73      | Carbon   |
| 3       | TL       | 166         | 317       | 237            | 4772.1      | 404228        | 31.20      | Hydrogen |
| 4       | CR       | 407         | 476       | 429            | 1.5         | 198           | 0.02       | Sulphur  |
| 1295791 |          |             |           |                |             |               | 100.00     |          |

## EAGER 200 Unk Report

Instrument name : Instrument #1      Bline drift (uV):-48.7  
 Company Name : gtz      Operator Ident. : EriKa  
 Analysed : 08-08-97 17:46:13      Printed : 08-08-1997 17:55:01  
 Sample Ident. : 49 avenanestum      Filename : ago0897  
 Sample Weight : 2.494      Calc.method: using 'K. Factors'

| PK. (#) | Ret Time (Sec) | Area (uV*Sec) | Element % (%) | Area Ratio  | Name     |
|---------|----------------|---------------|---------------|-------------|----------|
| 1       | 46             | 13778         | 1.554         | .636971E+02 | Nitrogen |
| 2       | 66             | 877587        | 44.203        | .100000E+01 | Carbon   |
| 3       | 237            | 404228        | 6.437         | .217102E+01 | Hydrogen |
| 4       | 429            | 198           | 0.030         | .443114E+04 | Sulphur  |

Protein value = 9.715344 (%)

En la tabla A 2.1 se presenta la composición nutrimental proporcionada por las respectivas compañías manufactureras de las muestras analizadas en este estudio.

Muestra 1: avena marca 1. Presentación granular, bote contenido neto: 300 g.

Muestra 2: avena marca 2. Presentación en hojuelas, bote contenido neto: 300 g.

Muestra 3: 5 cereales marca 1. Presentación granular, bote con 300 g.

Muestra 4: cereal lacteado de trigo, marca 2. Presentación en hojuelas, bote contenido neto: 300 g.

Tabla A 2.1 Composición proporcionada por las compañías en sus empaques  
(composición nutrimental por cada 100g de muestra)

|                              | MUESTRA 1 | MUESTRA 2   | MUESTRA 3 | MUESTRA 4   |
|------------------------------|-----------|-------------|-----------|-------------|
| Grasa (g)                    | 5.3       | 6.5         | 1.2       | 5.9         |
| Proteínas (g)                | 10.3      | 8.5         | 10.2      | 14.8        |
| Carbohidratos (g)            | 72.0      | 74.8        | 79.5      | 72.8        |
| Fibra alimenticia(g)         | 4.7       | 8.0         | 2.8       | 3.0         |
| Humedad (g)                  | 4.5       | 6.7         | 4.0       | 1.2         |
| Minerales (g)                | 3.2       | 3.6 cenizas | 2.3       | 5.3 cenizas |
| Valor energético (Cal)       | 377.0     | 391.0       | 370.0     | 404.0       |
| Vitamina A (UI)              | 700.0     | 666.0       | 700.0     | 666.0       |
| Vitamina D (UI)              | 250.0     | (D-3) 363.0 | 250.0     | 363.0       |
| Vitamina E (UI)              | 5.0       | 5.0         | 5.0       | 5.0         |
| Vitamina C (mg)              | 65.0      | 85.0        | 65.0      | 85.0        |
| Vitamina B <sub>1</sub> (mg) | 0.550     | 0.67        | 0.55      | 0.8         |
| Niacina (mg)                 | 8.0       | 15.0        | 8.0       | 15.0        |
| Ác. fólico (µg)              | 19.0      | 29.0        | 19.0      | 18.1        |
| Biotina (µg)                 | 37.0      | 6.48        | 37.0      | 2.44        |
| Sodio (mg)                   | 340.0     | 86.0        | 430.0     | 238.0       |
| Potasio (mg)                 | 225.0     | 339.0       | -         | 713.0       |
| Calcio (mg)                  | 665.0     | 634.0       | 420.0     | 1000        |
| Fósforo (mg)                 | 555.0     | 528.0       | 350.0     | 780.0       |
| Hierro (mg)                  | 15.0      | 40.0        | 15.0      | 20.0        |
| Vitamina B2                  | -         | 0.25        | -         | 0.92        |
| Vitamina B6                  | -         | 0.12        | -         | 0.11        |
| Vitamina B12                 | -         | -           | -         | 0.58        |

### APÉNDICE 3. Cálculos

1) Cálculos para conocer la eficiencia en la extracción:

(concentración inicial/ concentración recuperada) x 100= % de recuperación.

2) Ejemplo de cálculos para conocer la concentración real de la muestra *con adición de estándar*, a partir de la limpieza en:

a) Columna empacada con florisil:

1) Concentración inicial adicionada a la muestra 0.2880mg/0.01L

2) Concentración recuperada 0.3215mg/0.01L

3) 0.3215mg/64.445% de recuperación en la extracción; 0.4988mg /100%

4) 0.4988mg 86.131% de recuperación en la limpieza; 0.5792mg /100%

5) 0.5792mg/100.1029g pesados de muestra; 0.5786mg/100g de muestra

6) 0.5786mg recuperados- 0.2880mg adicionados = 0.2906mg/100g; 2.90mg/kg

7) Para esta muestra se obtuvieron 2.90mg de clorpirifos/kg de muestra

b) Cartuchos de florisil:

1.) Concentración inicial adicionada a la muestra 0.1817mg/0.01L

2.) Concentración recuperada 0.1263mg/0.01L

3.) 0.1263mg/64.445% de recuperación en la extracción; 0.1959mg /100%

4.) 0.1959mg/85.2554% de recuperación en la limpieza, cartucho1; 0.2298mg /100%

5.) 0.2298mg/85.2554% de recuperación en la limpieza, cartucho2; 0.2696mg /100%

6.) 0.2696mg/85.2554% de recuperación en la limpieza, cartucho3; 0.3162mg /100%

7.) 0.3162/100.3723g pesados de muestra; 0.3150mg/100g de muestra

8.) 0.3150mg recuperados- 0.1817mg adicionados = 0.1333mg/100g; 1.333mg/kg

9.) Para esta muestra se obtuvieron 1.33mg de clorpirifos/kg de muestra

c) Cartuchos de sílice:

- 1.) Concentración inicial adicionada a la muestra 0.4718mg/0.01L
- 2.) Concentración recuperada 0.51164mg/0.01L
- 3.) 0.51164mg /64.445% de recuperación en la extracción; 0.7939mg /100%
- 4.) 0.7939mg /90.4312% de recuperación en limpieza, cartucho1; 0.8779 mg/100%
- 5.) 0.8779mg/90.4312% de recuperación en limpieza, cartucho2; 0.9708 mg /100%
- 6.) 0.9708mg/90.4312% de recuperación en limpieza, cartucho3; 1.0735mg /100%
- 7.) 1.0735mg/101.0279g pesados de muestra; 1.0626mg/100g de muestra
- 8.) 1.0626mg recuperados- 0.4718mg adicionados = 0.5908mg/100g; 5.908mg/kg
- 9.) Para esta muestra se obtuvieron 5.908mg de clorpirifos/kg de muestra

- 3) Ejemplo de cálculos para conocer la concentración real de la muestra *sin adición de estándar*, a partir de la limpieza en cartuchos de sílice:

Cartuchos de sílice:

- 1.) Concentración recuperada a partir de la muestra 0.7141mg/0.01L
- 2.) 0.7141mg/64.445% de recuperación en la extracción; 1.1082mg /100%
- 3.) 1.1082mg/90.4312% de recuperación en limpieza, cartucho1; 1.2254mg /100%
- 4.) 1.2254mg/90.4312% de recuperación en limpieza, cartucho2; 1.3551mg /100%
- 5.) 1.3551mg/90.4312% de recuperación en limpieza, cartucho3; 1.4985mg /100%
- 6.) 1.4985mg/100.625g pesados de muestra; 1.4892mg/100g de muestra
- 7.) Se obtuvieron 14.892mg de clorpirifos/kg de muestra

#### APÉNDICE 4. Glosario de términos

*Plaga*: Cualquier población vegetal o animal que interfiera en el desarrollo de un cultivo y al trabajo de la tierra. Incluye maleza, insectos, microparásitos, hongos, nemátodos, etc.

*Ingesta Diaria Admisible (IDA)*: Cantidad de un producto químico que una persona puede ingerir a diario durante toda la vida sin correr riesgo apreciable a juzgar por los conocimientos existentes en ese momento. Se expresa en miligramos del producto por kilogramo de peso corporal (mg/kg p.c.)

*Límite Máximo Residual (LMR)*: La máxima concentración de un residuo de plaguicida en un producto alimenticio, como consecuencia de su uso intencional sobre dicho producto, que los organismos internacionales recomiendan que sea legalmente permitida. Debe expresarse en miligramos de plaguicida por kilogramo de alimento (ppm).

*Compuestos interferentes*: Se llama así a todo compuesto o material, que interfiera con el análisis del analito de interés.

*Carcinogénesis*: Producción o desarrollo de carcinógenos (agentes que producen cáncer).

*Teratogénesis*: Producción o desarrollo de malformaciones congénitas (de nacimiento).

*Mutagénesis*: Producción o desarrollo de cambios en la secuencia de bases del DNA. Frecuencia de una en cada  $10^6$  divisiones celulares.

### APÉNDICE 5. Método utilizado en el CG

Method File Name: 017BME  
 Default Sample Name: clorpirifos  
 Operator: Erika Date-time: 09-  
 10-1997 13:13:19 Version: 10F

#### ACQUISITION PARAMETERS

|   |          |
|---|----------|
| SINGLE OR DUAL CHANNEL (1 OR 2)   | 1.00     |
| RUN TIME (minutes)  | 13.00    |
| END TIME FOR P.O.S (Default RUN TIME)   | 13.00    |
| SOLVENT DELAY TIME (minutes)  | 0.10     |
| TOXIC DETECTION THRESHOLD (micrograms per liter threshold)                        | 0.10     |
| MAXIMUM PEAK WIDTH (seconds)  | 10.00    |
| TIME FOR ONE SAMPLE (seconds)   | 10.00    |
| NUMBER OF TESTS (NUMBER OF SAMPLES TO RUN) (0-9)                                  | 1.00     |
| PEAK TO CREST TIME (SCALE SET DIFFERENCE) (seconds)                               | 1000.00  |
| PEAK TO CREST TIME (SCALE FOR DUAL CHANNEL) (seconds)                             | 200.00   |
| AREA FOR PEAK TIME PLOT   | NO       |
| AREA FOR PEAK TIME PLOT   | YES      |
| File Analysis Method  | MSD      |
| RECORD AREA TABLES ON DISK  | YES      |
| RECORD RAW DATA   | YES      |
| NUMBER OF CRT LINES FOR REFLECT (1 TO 27)   | 1.00     |
| VERTICAL SCALE FACTOR FOR REFLECT (units of 10 <sup>-1</sup> to 10 <sup>1</sup> ) | 0.10     |
| OFFSET FOR THE REFLECT (millivolts)   | 1.00     |
| PUT NAME ON REFLECT   | YES      |
| PRINT AREA PERCENT REPORT   | NO       |
| PRINT EXTERNAL STANDARD REPORT  | YES      |
| PRINT INTERNAL STANDARD REPORT  | YES      |
| FINAL REPORT AREA TEST (micrograms/liter)   | 0.10     |
| AREA TO USER PROGRAM  | NO       |
| FORCE DROP LINE INTEGRATION   | NO       |
| FORCE COMMON BASE LINE  | NO       |
| FULL SCALE RANGE FOR A.D.C. (0=1VOLT, 1=2VOLT, 2=4VOLT)                           | 3.00     |
| AREA REJECT FOR REFERENCE PEAKS?  | 10000.00 |
| RET TIME WINDOW FOR REFERENCE PEAKS   | 4.00     |
| RET TIME WINDOW IN SECONDS FOR REF. PEAKS   | 11.80    |
| AREA OR PEAK HEIGHT QUANTITATION (0 OR 1)   | 1.00     |
| PRINT GROUP REPORT  | YES      |
| NUMBER OF CALIBRATION LEVELS (1 TO 5)   | 10.00    |
| LIST COMPONENTS NOT FOUND IN SAMPLE?  | NO       |
| INCLUDE UNKNOWN PEAKS IN REPORTS?   | NO       |
| UPDATE RESPONSE FACTORS WITH REPLACEMENT (0) OR AVERAGE (1)                       | 0.00     |
| DEFAULT DILUTION FACTOR   | 1.00     |
| DEFAULT SAMPLE HEIGHT   | 1.00     |
| DEFAULT AMOUNT INJECTED   | 2.00     |
| DEFAULT AMOUNT OF INTERNAL STANDARD   | 1.00     |
| PRINT GPC MW DISTRIBUTION   | YES      |
| PRINT SIMULATED DISTILLATION REPORT   | NO       |

#### APPLICATION PROGRAM PARAMETERS

## APÉNDICE 6. Lista de figuras

- Figura 1.1 Esquema del proceso fisiológico neuromuscular durante la estimulación
- Figura 1.2 Cartuchos de extracción en fase sólida (EFS). Formas de uso
- Figura 2.1 Método alternativo basado en la literatura
- Figura 2.2 Diagrama general de trabajo
- Figura 2.3 Diagrama de extracción
- Figura 2.4 Eficiencia de la extracción
- Figura 2.5 Diagrama de limpieza (manual alemán)
- Figura 2.6 Eficiencia y tiempo de elución del método de limpieza (manual alemán)
- Figura 2.7 Diagrama de limpieza alternativa (propuesta en este trabajo)
- Figura 2.8 Determinación del volumen de elución
- Figura 2.9 Tiempo de elución en la limpieza alternativa con muestra
- Figura 2.10 Eficiencia y tiempo de elución del método de limpieza (manual alemán)
- Figura 2.11 Técnica de cuantificación
- Figura 2.12 Cuantificación de clorpirifos con adición de estándar
- Figura 2.13 Cuantificación de clorpirifos sin adición de estándar
- Figura 3.1 Curva de calibración
- Figura 3.2 Cromatogramas obtenidos a partir del análisis de cereales procesados con adición de estándar
- Figura 3.3 Cromatogramas obtenidos a partir del análisis de cereales procesados sin adición de estándar
- Figura 3.4 Cromatograma de gases y espectro de masas
- Figura A 2.1 Reporte presentado por el analizador elemental

## Apéndice 7. Lista de tablas

Tabla 3.1 Análisis químico proximal

Tabla 3.2 Comparación de resultados de los diferentes métodos de limpieza

Tabla 3.3 Resultados de los diferentes métodos de limpieza frente a cereales procesados

Tabla 3.4 Concentraciones finales de clorpirifos, obtenidos a partir de muestras de cereales procesados para bebés

Tabla A.2.1 Limite máximo residual e intervalo de seguridad para algunos alimentos

Tabla A.2.2 Composición proporcionada por las compañías en sus empaques



## BIBLIOGRAFÍA

- 1.) AOAC. 1980. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists, AOAC. Horwitz, W. 13ª ed. Washington D.C., EEUUA.
- 1ª.) AOAC. 1980. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists, AOAC. Método multiresiduos para plaguicidas organofosforados, pp 237-249. Horwitz, W. 13ª ed. Washington D.C., EEUUA.
- 2.) ALPUCHE, L. 1991. "Plaguicidas organoclorados y medio ambiente". *Ciencia y Desarrollo XVI*, Núm 96: 45-55.
- 3.) BENGSTON, M. y CONNELI, M. 1980. Clorpyrifos-methyl plus bioresmethrin; methacrifos; pirimiphos-methyl; plus bioresmethrin and synergised bioresmethrin as grain protectants for wheat. *Pesti. Sci.*, 11: 61-76.
- 4.) BROCKS, E. 1993. Pesticide report dominates food news. *Food Technol.* Sept.: 26.
- 5.) BUSER, H. R. 1995. DDT, a potential source of environmental tris(4-chlorophenyl) methane and tris(4-clorophenyl) methanol. *Environm. Sci. Technol.*, 29: 2133-2139.
- 6.) BURNS, R. y EDWARDS, J. 1980. Pesticide breakdown by soil enzymes. *Pesti. Sci.*, 11: 506-512.
- 7.) CAC/PR 7-1984. Directrices del Codex sobre buenas prácticas en el análisis de residuos de plaguicidas. Codex Alimentario, pp 1-9. México D.F., México.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- 8.) CAC/PR 5-1984. Método recomendado de toma de muestras para la determinación de residuos de plaguicidas. Codex Alimentario, Julio pp 1-17. México, D.F., México.
- 9.) CAC/PR-1989. Notas sobre Métodos de Análisis de plaguicidas. Codex Alimentario, Octubre pp 8. México, D.F., México.
- 10.)
- 11.) CAI, L. y WEN, R. 1995. Rapid multiresidue screening method of organophosphate pesticides in vegetables. *Chromatographia*, 40 (7/8): 417-420.
- 12.) CAIRNS, T. y BALDWIN, A. 1995. Pesticide analysis in food by MS. *Anal. Chem.* 1: 552 A-557A.
- 13.) CICOPLAFEST. 1994. CATÁLOGO OFICIAL DE PLAGUICIDAS. Comisión intersecretaral para el control del proceso y uso de plaguicidas, fertilizantes y sustancias tóxicas. SARH, Secretaría de Desarrollo Social, Secretaría de Salud, SECOFI, pp 35. México, D.F., México.
- 14.) CL-1995/33-NFSPU. 1995. Comisión del Codex Alimentario. Revisión de normas para alimentos elaborados a base de cereales para lactantes y niños. Agosto. México D.F., México.
- 15.) Compilations of EPA's. 1991. Sampling and analysis methods. Ed. Lawrence H. Keith. Lewis Publishers, pp 585-586, EEUUA.
- 16.) COREY, G. y HENAO S. 1991. Plaguicidas inhibidores de las colinesterasas. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud. Programa de Salud ambiental. Organización Panamericana de la Salud. Organización Mundial de la Salud. Serie Vigilancia 11, Metepec, Edo. de México, México.

- 17.) CREMLYN, R. 1980. Pesticide Preparation and mode of action. Ed. Wiley J. & Sons, pp 80-96, Londres, Inglaterra.
- 18.) DERACHE R. 1990. Toxicología y seguridad de los alimentos. Ediciones Omega, pp 99-100, Barcelona, España.
- 19.) Diario Oficial. 1981. Secretaría de Patrimonio y Fomento Industrial. NOM-AA-3 Aguas residuales - muestreo. Martes 17 feb. México, D.F., México.
- 20.) Diario Oficial. 1981. Secretaría de Patrimonio y Fomento Industrial NOM-AA-14 Cuerpos receptores -muestreo. Martes 17 feb. México, D.F., México.
- 21.) Diario Oficial. 1981. Secretaría de Patrimonio y Fomento Industrial NOM-BB-14 Clasificación y tamaños nominales para utensilios de vidrio usados en el laboratorio. Martes 17 feb. México, D.F., México.
- 22.) Diario Oficial. 1981. Secretaría de Patrimonio y Fomento Industrial NOM-Z-1 Sistema general de unidades de medida. Martes 17 feb. México, D.F., México.
- 23.) Diario Oficial. 1981. Secretaría de Patrimonio y Fomento Industrial NOM-K-370. Plaguicidas clasificación toxicológica (derogada). Martes 17 feb. México, D.F., México.
- 24.) Enviromental working group (EWG). The average baby eats hundreds of those little jars of baby food in his or her first year of life. Guess how many pesticides they eat in that yummy mush. Pesticides in Baby Food. Jul, 26, 1995. Netscape, actualización Nov 21, 1995.
- 25.) FDA. Food and drug administration pesticide program-residues in foods 1989. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 1990, 73, pp 127<sup>a</sup>-146<sup>a</sup>.
- 26.) HANS-PETER T. & HANS Z. working group. Analysis. Manual of pesticide residue analysis (VCH). Volúmenes 1-2. Pesticides commission 1987, pp 7D.

- 27.) HASSALL K. The biochemistry and uses of pesticides. Second edition. Mc Millan Press, 1990.
- 28.) HENNION M-C, SUBRA P. Solid-phase extraction of polar organic pollutants from water. *Intern. J. Environ. Anal. Chem.*, 1989, 42, pp 15.
- 29.) HUSAIN S., NAGESWARA-SARMA P., G.Y.S.K. SWAMI. Determination of chlorpyridine isomers by gas chromatography and high-performance liquid chromatography in chlorpyrifos process development. *J. Chromatogr.*, 1991, 540, pp 331-341.
- 30.) Intercalibración sobre plaguicidas 1995. Determinación de etil clorpirifos (Dursban) en suelos. Red para análisis químicos ambientales en América Latina (RACAL).
- 31.) JERALD S., KARIN E., MILTON L. New polar polysiloxane stationary phases containing cyano, nitrophenyl and 8-quinolinyl units attached to diethylene oxide side groups. *J. Chromatogr.*, 1991, 540, pp 279-291.
- 32.) KENNETH L., DENNIS A. & SHULTZ R. Resistance of chlorpyrifos to enhanced biodegradation in soil. *J. Agric. Food Chem.* 1990, 38, pp 1430-1436.
- 33.) KIM L. & HILLERS V. Consumers trust and Behavior related to pesticides. *Food Technol.*, Jul, 1993, pp 87-89.
- 34.) KLIS, J. NAS Report on pesticides changes needed in testing and regulation, but no in children's diets. *Food Technol.*, Jul, 1993, pp 120-124.
- 35.) LANCASTER-BASEL. Pesticide residues in food. Technologies for detection. Technomic, Publishing Co. Inc., USA, 1989, pp 21-31.

- 36.) LAURENT P., BENOÎT R., GRIL J. The use of grassed buffer strips to remove pesticides, nitrate and soluble phosphorus compounds from runoff water. *Pestic. Sci.* 1997, Vol. 49, pp 243-251.
- 37.) LAWS E. Handbook of pesticide toxicology. Classes of pesticides. Edit. Wayland J. Hayes. 1990, Vol. 2, pp 1065-1067.
- 38.) Mc EWEN F., STEPHENSON G. The use and significance of pesticides in the environment. A Wiley-Interscience publication. Toronto, N.Y. Chichester, Brisbane. 1981.
- 39.) NOM-045-SSA1-1993. Plaguicidas. Productos para uso agrícola, forestal, pecuario, de jardinería, urbano e industrial- etiquetado. México D.F.
- 40.) NOM-046-SSA1-1993. Plaguicidas- productos para uso doméstico- etiquetado. México D.F.
- 41.) NOM-A-15-1978. Norma Oficial Mexicana para papillas de frutas. México.
- 42.) NOM-Y-203-1986. Secretaría de Patrimonio y Fomento Industrial. Plaguicidas Agropecuarios- Determinación del contenido de Paratión etílico- Método Cromatográfico. México D.F.
- 43.) NOM-F-26-1986. Alimentos-lácteos- leche en polvo. México D.F.
- 44.) NOM-DGN-F-228-1972. Etiquetado o rotulación de Alimentos y bebidas alimenticias. México D.F.
- 45.) NOM-AA-71-1981. Análisis de agua. Determinación de plaguicidas organoclorados- método cromatográfico. México D.F.
- 46.) NOM-K-431-1977. Procedimiento de muestreo para plaguicidas agropecuarios. México D.F.

- 47.) NOM-K-374-1972. Norma Oficial para el Almacenamiento y Transporte de Plaguicidas. México D.F.
- 48.) NOM-K-439-1979. Plaguicidas- disolventes aromáticos. México D.F.
- 49.) NOM-Y-264-1984. Productos para uso agropecuario- Plaguicidas- polvos solubles. Determinación de la solubilidad en agua. México D.F.
- 50.) NOM-Y-273-1985. Productos para uso agropecuario-plaguicidas. Determinación de cloruros- Método de Volhard. México D.F.
- 51.) NOM-044-SSA1-1993. Transporte y embalaje de plaguicidas. México D.F.
- 52.) NOM-130-SSA1-1995. Bienes y servicios. Alimentos envasados en recipientes de cierre hermético y sometidos a tratamiento térmico. México D.F.
- 53.) NOM-058-SSA1-1993. Requisitos sanitarios para el trámite de solicitud de licencia sanitaria a los establecimientos que fabrican y formulan plaguicidas y fertilizantes y que procesa sustancias tóxicas o peligrosas. México D.F.
- 54.) NOM-050-SSA1-1993. Requisitos para la regulación y control sanitario de almacenamiento, distribución, venta y aplicación de plaguicidas extremadamente y altamente peligrosos. México D.F.
- 55.) NOM-043-SSA1-1993. Requisitos sanitarios para el almacenamiento de plaguicidas. México D.F.
- 56.) NOM-131-SSA1-1995. "Bienes y servicios, alimentos para lactantes y niños de corta edad. Disposición y especificaciones sanitarias y nutrimentales". México D.F.
- 57.) PARDIO V. Plaguicidas y Alimentos. Conferencia. 1990. México D.F.
- 58.) RICHARDSON M. The dictionary of substances and their effects. Royal Society of Chemistry. 1989.

- 59.) RESTREPO, I. *Naturaleza Muerta. Los plaguicidas en México.* 1988. México D.F.
- 60.) SCHOMBURG, G. *Gas chromatography. A practical course.* VCH, 1990, pp 13,77.
- 61.) SHERMA, J. *Pesticides. Department of Chemistry, Lafayette College, Easton, Pennsylvania. Anal. Chem.* Vol.67, No 12, Jun, 1989, pp1R-20R.
- 62.) STEFAN W., PARDÍO V. *Evaluación de los niveles de DDT y HCH en el tejido adiposo de algunas personas fallecidas en el estado de Veracruz, México. Rev. Int. Contam. Ambient. II (2) 1995, pág 87-93.*
- 63.) STEFAN W., PARDÍO V. *Levels of organochlorine pesticides in mexican butter. J. AOAC Intern., 1996, Vol. 79, No. 3, pp 784-786.*
- 64.) STEFAN W. & PARDÍO V. *Neurotoxicidad tardía de los compuestos organofosforados. Ciencia 1995, 46, pp 103-112.*
- 65.) SUGARMAN, C. *Assesing Risk: A Risky Business. Food Technol., Aug, 1990, pp 60-64.*
- 66.) SUPELCO manual. *Chromathography products 1996, pp 359.*
- 67.) VALLE V., P. *Toxicología de Alimentos. Segunda edición. México D.F., 1991, pp 79-92.*
- 68.) WINTER K, C. *Pesticides in food. Hot Topic. Food Technol., Feb, 1990, pp 44-50.*
- 69.) WINTER K, CARL. *Pesticide Residues and Delaney Clause. Food Technol., 1993, Jul, pp 81-86.*