



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

Determinación y cuantificación del isotiocianato de metilo  
(*MITC*) bajo diferentes parámetros de operación mediante  
cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR)

**TESIS MANCOMUNADA  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
QUÍMICO DE ALIMENTOS**

**PRESENTAN:  
FLORES SANTILLÁN BEATRIZ ALEJANDRA  
PÉREZ CORDERO VIVIAN AIDEE**

MÉXICO, D.F. 2013





Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

Jurado asignado:

Presidente	Dr. Pedro Valle Vega
Vocal	M. en C. Lucía Cornejo Barrera
Secretario	Dra. Marisela Bernal González
Primer suplente	M. en C. Argelia Sánchez Chinchillas
Segundo suplente	Dra. María del Carmen Durán Domínguez de Bazúa

Sitio donde se desarrolló el tema:

Laboratorios 301, 302, 303 de Ingeniería Química Ambiental y de Química Ambiental  
Departamento de Ingeniería Química. Facultad de Química, UNAM. Ciudad  
Universitaria, México D. F.

Asesor del tema

---

Dra. Marisela Bernal González

Supervisor técnico

---

Dra. María del Carmen Durán Domínguez de Bazúa

Sustentantes

---

Beatriz Alejandra Flores Santillán

---

Vivian Aidee Pérez Cordero

Índice	Página
<b>Glosario y abreviaturas</b>	<b>Viii</b>
<b>Resumen</b>	<b>1</b>
<b>Capítulo I Problemática</b>	<b>2</b>
1.1. Introducción	2
1.2. Planteamiento del problema	3
1.3. Justificación	4
1.4. Hipótesis	4
1.5. Objetivo general	4
1.5.1. Objetivos particulares	5
<b>Capítulo II Marco teórico</b>	<b>6</b>
2.1. La caña de azúcar	6
2.2. Composición de la caña de azúcar	6
2.3. Deterioro del jugo de caña	6
2.3.1. Bacterias lácticas	8
2.3.1.1. <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	9
2.3.2. Levaduras	9
2.3.3. Mohos	10
2.4. Plaguicidas	10
2.4.1. Clasificación de plaguicidas	12
2.4.2. Plaguicidas y alimentos	17
2.4.2.1. Contaminación de alimentos	17
2.4.2.2. Rechazo de alimentos de exportación	20
2.4.3. Plaguicidas y nutrición	21
2.5. Carbamatos	22
2.6. Ditiocarbamatos	23
2.6.1. Ditiocarbamato de sodio (MS)	24
2.7. Isotiocianato de metilo ( <i>MITC</i> )	25
2.7.1. Métodos para determinar <i>MITC</i>	26
2.8. Cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR)	28
2.8.1. Clasificación de la cromatografía líquida	29
2.8.1.1. Cromatografía de adsorción (líquido-sólido)	29
2.8.1.2. Cromatografía de reparto/adsorción	29
2.8.1.3. Cromatografía de intercambio iónico	30
2.8.1.4. Cromatografía de exclusión molecular	30
2.8.2. Cromatografía de fase normal	30
2.8.3. Cromatografía de fase reversa (Inversa)	30
2.8.4. Instrumentación de CLAR	30
2.8.4.1. Bomba	31
2.8.4.2. Sistema de mezcla de fase móvil	31
2.8.4.3. Dispositivo de inyección	32
2.8.4.4. Conducciones y conexiones	33
2.8.4.5. Detector y registrador	33
2.8.4.6. Columna	34

<b>Capítulo III Metodología</b>	<b>35</b>
3.1. Diagrama de bloques	36
3.2. Procedimiento	36
3.2.1. Lavado y preparación de material	36
3.2.2. Preparación de la solución madre, diluciones y fase móvil	36
3.2.3. Condiciones cromatográficas para determinar <i>MITC</i>	36
3.2.4. Tiempo de retención ( $t_R$ )	38
3.2.5. Límites de detección ( $L_d$ )	38
3.2.6. Elaboración de diseño experimental	38
3.2.7. Cuantificación del <i>MITC</i>	39
3.2.8. Precisión	40
3.2.9. Determinación de la vida media del <i>MITC</i> en agua y metanol	40
3.2.10. Tratamiento de la muestra	40
3.2.11. Cinética de degradación del <i>MITC</i> en jugo de caña	41
3.2.12. Extracción líquido-líquido (ELL) del jugo de caña	41
3.2.13. Porcentaje de recobro (%R)	41
3.2.14. Análisis estadístico	42
3.3. Equipo	42
3.4. Reactivos	42
<b>Capítulo IV Resultados y discusión</b>	<b>45</b>
4.1. Determinación de condiciones cromatográficas óptimas	45
4.1.1. Tiempo de retención del <i>MITC</i>	45
4.1.2. Límites de detección	46
4.2. Curvas de calibración en agua, metanol y jugo de caña	46
4.3. Precisión	46
4.4. Determinación de la constante de velocidad de formación ( $k$ )	47
4.4.1. Determinación de la constante de velocidad de formación ( $k$ ) en agua	48
4.4.2. Determinación de la constante de velocidad de formación ( $k$ ) en metanol	48
4.5. Determinación de la constante de velocidad de degradación ( $k$ ) en jugo de caña	49
4.6. Porcentaje de recobro	50
4.7. Análisis estadístico de la influencia de los factores en la degradación	51
<b>Capítulo V Conclusiones y perspectivas</b>	<b>53</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>56</b>
<b>Anexo 1.</b> Curvas de calibración en agua, metanol y jugo de caña a pH=6.8 a 25°C	<b>60</b>
<b>Anexo 2.</b> Curvas de cinética de formación del MITC del diseño experimental en agua y metanol	<b>63</b>
<b>Anexo 3.</b> Curvas de cinética de degradación del MITC del diseño experimental en jugo de caña	<b>66</b>
<b>Anexo 4.</b> Análisis estadístico	<b>69</b>
<b>Anexo 5.</b> Tratamiento de residuos	<b>78</b>

<b>Índice de figuras</b>	<b>Página</b>
Fig. 1. Reacción de degradación de MS en soluciones neutras (LAINCO, 2012)	<b>24</b>
Fig. 2. Reacción de degradación de MS en soluciones alcalinas diluidas (LAINCO, 2012)	<b>24</b>
Fig. 3. Reacción de degradación de MS en soluciones ácidas (LAINCO, 2012)	<b>25</b>
Fig. 4. Diagrama de bloques de la metodología	<b>35</b>
Fig. 5. Cromatógrafo de líquidos de alta resolución (CLAR)	<b>37</b>
Fig. 6. Cromatograma del <i>MITC</i> en agua; Columna: Hypersil SA 150 x 4.6 mm (5µm); fase móvil: CTAB a un pH= 6.8; flujo: 1.4 mL min <sup>-1</sup> ; volumen de inyección: 20 µL; detector: UV a λ 247 nm	<b>45</b>

<b>Índice de tablas</b>	<b>Página</b>
Tabla 1. Componentes del jugo de caña de azúcar (Rodríguez, 2005)	<b>7</b>
Tabla 2. Microorganismos presentes en el jugo de caña (Rodríguez, 2005)	<b>8</b>
Tabla 3. Clasificación de los plaguicidas según su toxicidad (WHO, 2009)	<b>12</b>
Tabla 4. Clasificación de los plaguicidas según su vida media de efectividad (INECC, 2009)	<b>12</b>
Tabla 5. Clasificación de los plaguicidas según la familia química (Ramírez y Lacasaña, 2001)	<b>15</b>
Tabla 6. Clasificación de los plaguicidas según su concentración (INECC, 2009)	<b>15</b>
Tabla 7. Límites máximos residuales para DTC de acuerdo con la FAO/OMS (Codex Alimentarius, 2013)	<b>18</b>
Tabla 8. Límites máximos de residuos de DTC en alimentos de acuerdo a la (Unión Europea, 2013)	<b>20</b>
Tabla 9. Ficha técnica de <i>MITC</i> (INECC, 2012)	<b>27</b>
Tabla 10. Métodos analíticos utilizados para la determinación MS y <i>MITC</i>	<b>28</b>
Tabla 11. Condiciones de operación de la cromatografía líquida de alta resolución (CLAR)	<b>36</b>
Tabla 12. Diseño experimental	<b>39</b>
Tabla 13. Condiciones de la extracción líquido-líquido (ELL)	<b>42</b>
Tabla 14. Equipo utilizado en la metodología	<b>43</b>
Tabla 15. Reactivos utilizados en la metodología	<b>44</b>
Tabla 16. Coeficientes de las curvas de calibración en metanol, agua y jugo de caña	<b>46</b>
Tabla 17. Valores de media, desviación estándar y coeficiente de variación del punto medio de cada curva de calibración	<b>47</b>
Tabla 18. Formación del <i>MITC</i> en cada combinación del diseño experimental	<b>47</b>
Tabla 19. Degradación del <i>MITC</i> en jugo de caña	<b>49</b>
Tabla 20. Porcentaje de recobro	<b>50</b>
Tabla 21. Contribución porcentual de los 5 factores en la degradación del plaguicida	<b>52</b>

## Glosario y abreviaturas

<b>AP</b>	Aplicación del plaguicida para determinar el % de recobro
<b>b</b>	Ordenada al origen
<b>C</b>	Carbamatos
<b>C<sub>o</sub></b>	Concentración inicial
<b>C<sub>f</sub></b>	Concentración final
<b>C<sub>18</sub></b>	Carbono dieciocho
<b>CH<sub>3</sub>NH<sub>2</sub></b>	Metilamina
<b>C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>NaS<sub>2</sub></b>	Ditiocarbamato de sodio
<b>C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>NS</b>	Isotiocianato de metilo
<b>CENICAÑA</b>	Centro de Investigación de la Caña de Azúcar de Colombia
<b>CICOPLAFEST</b>	Comisión Intersecretarial para el Control del Proceso y Uso de Plaguicidas, Fertilizantes y Sustancias Tóxicas
<b>CL<sub>50</sub></b>	Concentración letal media, expresada en mg kg <sup>-1</sup>
<b>CLAR</b>	Cromatografía de líquidos de alta resolución
<b>cm</b>	Centímetros
<b>COVECA</b>	Comisión Veracruzana de Comercialización Agropecuaria
<b>CS<sub>2</sub></b>	Disulfuro de carbono
<b>CTAB</b>	Siglas en inglés para el bromuro de hexadeciltrimetilamonio
<b>CV</b>	Coefficiente de variación
<b>d.i.</b>	Diámetro interno
<b>DDT</b>	Diclorodifeniltricloroetano
<b>DL<sub>50</sub></b>	Dosis letal media, expresada en mg kg <sup>-1</sup>
<b>DTC</b>	Ditiocarbamatos
<b>ELL</b>	Extracción en fase líquido-líquido
<b>ETU</b>	Etilentiourea
<b>FAO</b>	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Por sus siglas en inglés ( <i>Food and Agriculture Organization</i> )
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Agua
<b>HPLC</b>	Siglas en inglés para la cromatografía de líquidos de alta resolución ( <i>High Performance Liquid Chromatography</i> )
<b>HNO<sub>3</sub></b>	Ácido nítrico
<b>Hz</b>	Hertz
<b>IDA</b>	Ingesta Diaria Recomendable
<b>INECC</b>	Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático
<b>Ingenio azucarero</b>	Nombre dado en México y otros países latinoamericanos a las fábricas que procesan la caña de azúcar
<b>k</b>	Constante de cinética de formación
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	Fosfato de potasio monobásico
<b>kg</b>	Kilogramos
<b>L</b>	Litro
<b>LMR</b>	Límite máximo de residuos
<b>L<sub>d</sub></b>	Límite de detección
<b>m</b>	Valor de la pendiente

<b>M</b>	Concentración molar
<b>MeOH</b>	Metanol
<b>mg</b>	Miligramos
<b>min</b>	Minutos
<b>MITC</b>	Siglas en inglés para el isotiocianato de metilo (methyl isothiocyanate)
<b>mL</b>	Mililitro
<b>mm</b>	Milímetros
<b>mmHg</b>	Milímetros de mercurio
<b>MS</b>	Ditiocarbamato de sodio o “Metam sodio”
<b>nm</b>	Nanómetros
<b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	Fosfato dibásico de sodio
<b>Na<sub>2</sub>S</b>	Sulfuro de sodio
<b>n.d.</b>	No determinado
<b>obpa</b>	Siglas en inglés para el plaguicida 10,10'-oxibisfenoloxarsina
<b>OC</b>	Organoclorados
<b>ODS</b>	Octadecilsilano
<b>OF</b>	Organofosforados
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>P</b>	Piretroides
<b>pH</b>	Potencial de iones hidrógeno
<b>ppm</b>	Partes por millón (mg kg <sup>-1</sup> )
<b>PTU</b>	Propileno-tiourea
<b>R<sup>2</sup></b>	Coefficiente de correlación
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>S</b>	Desviación estándar
<b>SAGARPA</b>	Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, Poder Ejecutivo Federal, Estados Unidos Mexicanos (México)
<b>SH</b>	Bisulfuro de hidrógeno
<b>t<sub>½</sub></b>	Tiempo de vida media
<b>t<sub>R</sub></b>	Tiempo de retención
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>UV-V</b>	Ultravioleta visible
<b>v/v</b>	Volumen/Volumen
<b>WHO</b>	Siglas para la <i>World Health Organization</i>
<b>X</b>	Concentración
<b>X</b>	Media
<b>Y</b>	Área bajo la curva

#### Letras griegas

<b>µg</b>	Microgramos
<b>µL</b>	Microlitro
<b>µm</b>	Micrómetro
<b>ρ</b>	Densidad

## Otros símbolos

°C	Grados centígrados
°HPLC	Abreviatura para reactivos y agua grado cromatográfico
%	Porcentaje
%R	Porcentaje de recobro

**Nota: Esta tesis usa el punto decimal**

## RESUMEN

Los agentes biocidas aplicados en los ingenios azucareros deben estar aprobados por la normativa vigente de regulación en alimentos, ser relativamente económicos y de fácil aplicación, no deben ser volátiles y funcionar a las temperaturas que se presenten en el proceso. El fungicida N-metil ditiocarbamato de sodio (MS) es utilizado para la eliminación del microorganismo *Leuconostoc mesenteroides* que hidroliza la sacarosa y forma dextranas durante el proceso de extracción de jugo de caña para la obtención de azúcar. El empleo de este fungicida genera subproductos tóxicos formados durante su degradación, tales como el isotiocianato de metilo (*MITC*), por lo cual se propone en esta investigación la implementación de una metodología que permita determinar y cuantificar el *MITC* que pudiera formarse y contaminar los subproductos del procesamiento de la caña de azúcar. Éste es uno de los compuestos de degradación más importantes del MS. Por ello, el objetivo de esta investigación fue determinar el *MITC* por medio de un análisis cromatográfico de líquidos de alta resolución (CLAR) e identificarlo en una muestra real de jugo de caña de azúcar, además de evaluar su posible degradación, bajo diferentes condiciones: luz, oscuridad, temperatura (2, 25°C) y matriz (agua, metanol y jugo de caña). Los resultados obtenidos en esta investigación revelan que en la matriz de agua, la constante de velocidad de formación ( $k$ ) varía de 0.14 a 0.43 días<sup>-1</sup>, encontrando que el valor más bajo se presenta a 2°C en oscuridad y obteniendo un tiempo de vida media,  $t_{1/2}$ , de 4.99 días, mientras que el máximo valor se presentó en las condiciones de 25°C en presencia de luz con  $t_{1/2}$  de 1.63 días; en tanto que, para la matriz metanol los resultados obtenidos para la constante de formación ( $k$ ) van de 0.07 a 0.65 días<sup>-1</sup>, el valor más bajo se da en la condición 2°C en oscuridad, con un tiempo de vida media,  $t_{1/2}$ , de 10.61 días y en la condición a 25°C en presencia de luz se obtuvo el valor más alto con un tiempo de vida media,  $t_{1/2}$ , de 1.07 días. Por último para la matriz de jugo de caña los resultados alcanzados para la constante de degradación ( $k$ ) van de 0.0054 a 0.0364 min<sup>-1</sup>, registrándose un valor alto en la condición de luz a 25°C con un tiempo de vida media,  $t_{1/2}$ , de 19.04 min. y el valor más bajo para la condición de 2°C en oscuridad con un tiempo de vida media,  $t_{1/2}$ , de 128.36 min.

## Capítulo I Problemática

### 1.1. Introducción

La industria azucarera es una actividad relevante en México. En el país se cuenta con 62 ingenios, aunque algunos están inactivos. En ellos se generan aproximadamente 300 mil empleos. Actualmente México se encuentra entre los 10 principales productores y consumidores de azúcar a nivel mundial. Su producción se realiza en los llamados ingenios azucareros a partir de los jugos de la caña de azúcar y, para otros países a partir de la remolacha, dando origen a una agroindustria que participa directamente en la economía nacional (COVECA, 2009; SAGARPA, 2013).

En términos generales, el nivel de productividad de la industria azucarera en México es alto, los rendimientos de campo y en fábrica están por arriba del promedio mundial; no obstante, sus costos de producción son superiores a los considerados como eficientes (COVECA, 2009). Uno de los mayores problemas en la industria azucarera es la pérdida de sacarosa durante el procesamiento de la caña de azúcar, que se relacionan con la formación de productos metabólicos no deseados por la actividad de la microbiota presente en la caña. Las pérdidas de azúcar corresponden a un 16% debido a inversión química; un 22% debido a inversión enzimática y un 62% para llevar a cabo los procesos metabólicos de los microorganismos (Villa, 2008).

Varios estudios han intentado determinar las pérdidas de sacarosa por microorganismos, estableciendo una relación entre la cantidad de ácidos producidos (de azúcares reductores) y la cantidad de sacarosa degradada. Desde el momento en que la caña es cortada hasta que se clarifica el jugo extraído, la sacarosa está expuesta a la acción enzimática de varios microorganismos. Entre estos microorganismos se han identificado 3 grupos importantes de bacterias: *Leuconostoc sp.*; *Bacillus sp.* y *Escherichia coli*. (Serrano, 2006).

Los polisacáridos formados en el jugo, especialmente las dextranas y levanas, afectan el proceso obstruyendo los equipos, siendo *Leuconostoc sp.* el

principal responsable de la formación de estos polisacáridos, produciendo también ácidos láctico y acético, provocando un aumento en la acidez del jugo (Subirós, 1995).

Los polisacáridos se presentan en molinos de caña donde se da poca atención a la limpieza. Estos deben lavarse con vapor a intervalos regulares y ser totalmente sanitizados cuando la molienda se detenga para evitar la proliferación de microorganismos. Sin embargo, el jugo permanece desprotegido durante el proceso de molienda y, por esta razón, se han realizado estudios con el fin de encontrar compuestos que puedan emplearse en los ingenios azucareros y que posean actividad bactericida o bacteriostática ante los grupos de microorganismos con mayor incidencia en el proceso de extracción (Serrano, 2006). Por ello, el control bacteriano se realiza mediante la adición de agentes biocidas. Uno de los más comunes es el ditiocarbamato de sodio (MS) que, bajo ciertos factores como son: pH, temperatura, humedad y luz, se ve afectado en su actividad. El empleo de este producto químico genera subproductos tóxicos por lo cual, en este trabajo, se propone la implementación de una metodología que permita determinar y cuantificar el isotiocianato de metilo (*MITC*), uno de los compuestos de degradación más importantes del MS.

## **1.2. Planteamiento del problema**

Durante el proceso de extracción de jugo de caña para la obtención de azúcar, éste es susceptible de ser atacado por *Leuconostoc mesenteroides* que hidroliza la sacarosa y forma dextranas. Se ha utilizado el fungicida N-metil ditiocarbamato de sodio (MS) para la eliminación de este microorganismo.

El empleo de este producto químico genera subproductos tóxicos por lo que se propone en esta investigación la implementación de una metodología que permita determinar y cuantificar el isotiocianato de metilo (*MITC*), uno de los compuestos de degradación más importantes de MS, por medio de un análisis cromatográfico de líquidos de alta resolución (CLAR). También se propone su identificación en una muestra real de jugo de caña de azúcar.

### **1.3. Justificación**

El proceso de extracción del jugo de caña es el punto de mayor contaminación en los ingenios azucareros, observándose un bajo rendimiento en la producción de sacarosa debido a la presencia de microorganismos tales como *Leuconostoc mesenteroides* que utilizan la sacarosa para realizar sus funciones metabólicas, por lo que se añade ditiocarbamato de sodio, un bactericida de amplio espectro, para inhibir el crecimiento de este microorganismo causante de la formación de polisacáridos y evitar las pérdidas económicas de esta industria. El plaguicida después de ser añadido se ve afectado por las diversas condiciones del proceso, degradándose a *MITC*, por lo que es importante investigar cuáles son los factores que influyen en su formación y después en su degradación.

### **1.4. Hipótesis**

La primera hipótesis es que el ditiocarbamato de sodio (MS) se descompone a las condiciones en estudio en isotiocianato de metilo o metil isotiocianato (*MITC*).

La segunda hipótesis es que el isotiocianato de metilo (*MITC*) se ve afectado por los siguientes factores: fotólisis, temperatura y matriz en la que se encuentra, provocando que la vida media del compuesto dependa de dichos factores.

### **1.5. Objetivos generales**

De acuerdo con las hipótesis planteadas, los objetivos de esta investigación son:

- Determinar la degradación del MS, plaguicida usado en el proceso de elaboración de azúcar de caña, a *MITC* como principal producto de su degradación, mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR)

- Determinar el efecto de dos diferentes condiciones de laboratorio, temperatura (con dos niveles), fotólisis (luz y oscuridad) y el efecto de la matriz (agua, metanol, jugo de caña) en la degradación del *MITC*.

#### **1.5.1. Objetivos particulares**

- Proponer e implementar una metodología analítica mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR), que permita determinar y cuantificar el isotiocianato de metilo o metil isotiocianato (*MITC*) formado por la descomposición del metam sodio (MS)
- Elaborar curvas de calibración en matrices de agua, metanol y jugo de caña
- Evaluar la vida media del *MITC* bajo las condiciones planteadas
- Determinar la velocidad de formación del *MITC* partiendo de la degradación del MS en medio ácido y neutro bajo diferentes condiciones de proceso: luz, oscuridad, temperatura y matriz (agua y metanol)
- Aplicar esta metodología en una matriz real de jugo de caña de azúcar

## Capítulo II Marco teórico

### 2.1. La caña de azúcar

La caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) es una gramínea tropical, un pasto gigante emparentado con el sorgo y el maíz, en cuyo tallo se forma y acumula un jugo rico en sacarosa. Este compuesto, al ser extraído el jugo de los tallos y cristalizado en una fábrica que, como ya se mencionó, se conoce en México como ingenio azucarero, forma el azúcar<sup>1</sup>. Es un cultivo plurianual, se corta cada 12 meses y la plantación dura aproximadamente 5 años. Tiene un tallo macizo de 2 a 5 metros de altura con 5 ó 6 cm de diámetro (COVECA, 2009).

### 2.2. Composición de la caña de azúcar

La caña está constituida principalmente por agua, fibra y sólidos solubles, entre otros compuestos que, por las cantidades en que aparecen, se consideran elementos menores. Tal es el caso de los minerales, proteínas, ceras, grasas y ácidos que pueden estar en forma libre o combinada. Entre los sólidos solubles de la caña sobresale la sacarosa como azúcar principal; los otros glúcidos o hidratos de carbono o azúcares que se encuentran en concentraciones bajas son la glucosa y la fructosa conocidos como azúcares reductores o invertidos (Rodríguez, 2005). Las proporciones de los compuestos varían de acuerdo con la variedad (familia) de la caña, edad, madurez, clima, suelo, método de cultivo, abonos, lluvias, riesgos, etc. (Villa, 2008). En la Tabla 1 se muestra la composición del jugo de caña de azúcar.

### 2.3. Deterioro del jugo de caña

Desde el momento que se corta la caña hasta que se clarifica el jugo extraído a altas temperaturas, la sacarosa está expuesta a la acción enzimática de una multitud de microorganismos que pueden provenir del suelo que se adhiere a tallos y hojas de la caña o del aire contaminante. Estos organismos se ven

---

<sup>1</sup> Del árabe hispánico *assúkkar* y éste del árabe clásico *sukkar*, a su vez del griego σάκχαρι, que vino del pelvi *šakar*. Sustantivo ambiguo. Cuerpo sólido cristalizado, perteneciente al grupo químico de los hidratos de carbono o glúcidos, de color blanco en estado puro, soluble en el agua y en el alcohol y de sabor muy dulce. Se obtiene de la caña dulce, de la remolacha y de otros vegetales. Según su estado de pureza o refinación, se distinguen diversas clases (RAE, 2013)

favorecidos por factores como las operaciones de quema, corte, condiciones de temperatura, humedad alta y tiempos entre corte y molienda (Serrano, 2006).

<b>Tabla 1. Componentes del jugo de caña de azúcar (Rodríguez, 2005)</b>	
<b>Componentes</b>	<b>Cantidad (%)</b>
Agua	75-78
Azúcares o hidratos de carbono	17-21
-Sacarosa	10-20
-Glucosa	2-4
-Fructosa	2-4
Sales	1-3
Ácidos orgánicos libres	1.5-5.25
Componentes orgánicos menores	0.5-0.6
Otros	3-5

El deterioro del jugo de caña de azúcar presenta un carácter diferente dependiendo del tipo de cambio que intervenga: cambios no microbianos internos o externos o cambios producidos por microorganismos, además del estado de madurez de la caña y las condiciones sanitarias del suelo. La alteración del jugo de caña se produce por reacciones enzimáticas de biodegradación y oxidación de la polifenol-oxidasa y las reacciones no enzimáticas de Maillard, caramelización y oxidación de ácido ascórbico, las cuales dependen de la temperatura, del oxígeno del aire, del pH, de los glúcidos o azúcares reductores contenidos en el jugo, de la luz y de la presencia de compuestos nitrogenados en el bagazo (Rodríguez, 2005).

La presencia de microorganismos causa entonces la mayoría de las pérdidas por inversión, disminuyendo la producción de azúcar blanco y aumentando la producción de melazas. Los microorganismos encuentran en la sacarosa un buen sustrato para su crecimiento y excretan la enzima invertasa (Serrano, 2006). También tienen factores ambientales que influyen en su desarrollo: la temperatura, el pH, actividad de agua y oxígeno. Entre estos microorganismos

que encuentran el medio ideal para su crecimiento en el jugo de caña se han identificado 3 grupos principales de bacterias: las productoras de exopolisacáridos, aerobios espora-formadores y aerobios no espora-formadores; las levaduras que son igualmente importantes, sobre todo las osmofílicas; también se encuentran en menor proporción ciertas especies de mohos (Serrano, 2006). En la Tabla 2 se encuentran algunos microorganismos presentes en el jugo de caña.

<b>Tabla 2. Microorganismos presentes en el jugo de caña (Rodríguez, 2005)</b>				
<b>Tratamiento</b>	<b>T °C</b>	<b>pH</b>	<b>Microflora</b>	<b>Microorganismos</b>
Post- Recolección	28	5.5-7.7	Mesófila	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
Extracción del jugo	28	5.0-5.6	Mesófila	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> <i>Enterobacter</i> Levaduras

### **2.3.1. Bacterias lácticas**

Las bacterias lácticas proliferan en medios con altas concentraciones de azúcares o glúcidos fermentables, alta humedad (mayor a 80%) y temperatura (entre 30 a 45°C) (Villa, 2008). Las bacterias incrementan la viscosidad del jugo de caña debido a que durante su metabolismo producen exopolímeros que producen turbiedad y aumentan las características viscoelásticas de toda la masa del jugo. Las reacciones producidas en el jugo de caña como consecuencia de este metabolismo de las bacterias incluyen el desdoblamiento hidrolítico de los hidratos de carbono en otros más sencillos, desdoblamiento hidrolítico de las proteínas en polipéptidos, aminoácidos y amoníaco o aminas. Las reacciones de óxido-reducción utilizadas por las bacterias para obtener energía de los alimentos originan ácidos orgánicos, alcoholes, aldehídos, cetonas, gases, etc. (Rodríguez, 2005). En este grupo destacan los bacilos que tienen la capacidad de formar endosporas y sobrevivir cuando las condiciones del medio no son favorables, y son importantes productores de lévanos y otros heteropolisacáridos (Serrano, 2006).

Las principales especies que se encuentran en el jugo de caña de azúcar son: *Bacillus subtilis*, *Bacillus lincheniformis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium*,

*Bacillus pulmius*, *Bacillus stereotermophilus*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Leuconostoc dextranicum*, *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Citobacter freundii*, *Pseudomonas sp*, *Klebsiella sp*, *Corynebacterium sp*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus fragilis* y *Clostridium sp* (Serrano, 2006).

#### **2.3.1.1. *Leuconostoc mesenteroides***

El género *Leuconostoc mesenteroides* perteneciente a la especie mesenteroides, es una bacteria Gram-positiva, anaerobia facultativa. Es el principal microorganismo causante del deterioro de la caña de azúcar a lo largo de su proceso para la fabricación de azúcar (Villa, 2008). Su presencia es atribuida a un deficiente control de temperatura; producen ácido láctico y ácido acético que aumentan la acidez del jugo. Son responsables de la biosíntesis de las dextranas, además de otros productos químicos. Todo lo anterior conduce a la disminución de la pureza del jugo y a la descomposición de la molécula de sacarosa y, por tanto, bajan la recuperación de ésta (Subirós, 1995).

Las dextranas son polisacáridos constituidos por unidades de glucosa unidas en forma de cadena recta mediante enlaces  $\alpha$ -1,6. Pueden presentar diferentes ramificaciones en su cadena molecular, dependiendo de la clase de bacteria que las produzca, lo cual causa diferencias estructurales en el polímero. Se ha demostrado que las poblaciones de *Leuconostoc* se elevan rápidamente cuando la caña se quema y se troza durante la cosecha mecanizada, produciéndose altos niveles de dextranas. También se ha observado que la quema excesiva, aunque facilita la cosecha, también remueve la cubierta serosa de los tallos, causando aberturas o fisuras por donde aparecen exudaciones ricas en azúcares, que son un buen medio de cultivo para *Leuconostoc* y otros microorganismos (Larrahondo, 1995).

#### **2.3.2. Levaduras**

Las levaduras que contiene el jugo de caña de azúcar producen los siguientes cambios: formación de turbidez y aumento del pH, aromas y sabores no agradables debido a su actividad metabólica. Las levaduras para su crecimiento utilizan oxígeno, fuentes de carbono (sacarosa) y nitrógeno orgánico (proteínas). Sintetizan todos los sustratos carbonosos por vía

fermentativa y en menor proporción por vía oxidativa. Las levaduras en cuestión de horas empiezan a duplicarse y cuando se dan condiciones anaerobias producen etanol, dióxido de carbono, ácidos y otros compuestos orgánicos que afectan las propiedades fisicoquímicas y organolépticas del jugo de caña (Rodríguez, 2005).

La mayoría de las levaduras encontradas en la caña de azúcar se generan a las 24 horas posteriores a la quema (Villa, 2008). Las especies de levaduras presentes en el jugo de caña son: *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces rouxii*, *Saccharomyces pombe*, *Candida tropicalis*, *Candida micoderma*, *Candida intermedia*, *Kloeckera apiculata*, *Pichia membranofaciens*, *Pichia farinosa*, *Kluyvoromyces fragilis* y *Hansenula anómala* (Serrano, 2006).

### **2.3.3. Mohos**

Entre las especies de mohos presentes en el jugo de caña están: *Penicillium citrovorus*, *Penicillium funiculosum*, *Aspergillus variatum*, *Aspergillus niger*, *Trichoderma viride* y *Monilia sitophila* (Serrano, 2006).

Este gran número de especies demuestra la diversidad de la microbiota presente en los jugos de caña; sin embargo, hay algunas especies que se desarrollan en el jugo con más frecuencia que otras y que, por lo tanto, adquieren una gran importancia económica (Serrano, 2006). Por tanto, la aplicación de bactericidas para evitar pérdidas en la fábrica parece justificable. La producción de dextranas aumenta las dificultades para clarificar los jugos, además de interferir en la cristalización de la sacarosa. El principal problema de las refinerías en relación con los microorganismos es la acción de estos, así como de que cierto número de ellos permanece en el producto final y resulta insatisfactorio para el consumidor industrial del azúcar (Blanco, 1995).

## **2.4. Plaguicidas**

Los plaguicidas sintéticos surgen entre 1930 y 1940 como resultado de investigaciones enfocadas al desarrollo de armas químicas que originalmente fueron probadas en insectos. Uno de los primeros compuestos, el diclorodifeniltricloroetano (DDT) fue sintetizado en 1874 y hasta 1939 se

describieron sus propiedades. Éste fue utilizado en la segunda guerra mundial para proteger a los soldados estadounidenses. Con el aumento de la industrialización, los intereses económicos de los grandes productores de plaguicidas, así como la necesidad de controlar químicamente las plagas favoreció su fabricación y su consumo a escala mundial. Se originó, a su vez, una carrera incesante en la búsqueda de compuestos análogos menos tóxicos al ser humano y más efectivos y selectivos con las plagas. Sin embargo, al paso de los años se han hecho evidentes los efectos indeseables de los plaguicidas sobre la salud del ser humano y sobre el ambiente. Independientemente de sus beneficios, es evidente que los plaguicidas son sustancias deliberadamente tóxicas, creadas para interferir en algún sistema biológico en particular que carecen de selectividad real. Afectan simultáneamente y, en mayor o menor grado, tanto a la “especie blanco” como a otras categorías de seres vivos, particularmente al ser humano. Actualmente, miles de productos se comercializan en todo el mundo, sin que sus efectos nocivos sean obstáculos que limiten su producción (Ramírez y Lacasaña, 2001).

El Código Internacional de Conducta Sobre la Distribución y Uso de Plaguicidas de la FAO de las Naciones Unidas establece que un plaguicida “Es la sustancia o mezcla de ellas, destinada a prevenir, destruir o controlar plagas, incluyendo los vectores de enfermedad humana o animal; las especies no deseadas de plantas o animales que ocasionan un daño duradero u otras que interfieren con la producción, procesamiento, almacenamiento, transporte y comercialización de alimentos; los artículos agrícolas de consumo, la madera y sus productos, el forraje para animales o los productos que pueden administrárseles para el control de insectos, arácnidos u otras plagas corporales”. El término incluye las sustancias destinadas a utilizarse como reguladoras del crecimiento de las plantas, agentes defoliantes y desecantes, agentes para reducir la densidad de fruta o agentes para evitar la caída prematura de la fruta y las sustancias aplicadas a los cultivos antes o después de la cosecha para proteger el producto contra el deterioro durante el almacenamiento y transporte (FAO, 2002).

### 2.4.1. Clasificación de plaguicidas

Los plaguicidas se clasifican en función de algunas de sus características principales, como son la **toxicidad** aguda, la **vida media**, la **estructura química** y su uso. La Organización Mundial de la Salud (por sus siglas en inglés *WHO, World Health Organization*) estableció una clasificación basada en su peligrosidad o grado de toxicidad aguda, definida ésta como la capacidad del plaguicida de producir un daño agudo a la salud a través de una o múltiples exposiciones, en un periodo de tiempo relativamente corto. **La toxicidad** se mide a través de la dosis letal media ( $DL_{50}$ ) o de la concentración letal media ( $CL_{50}$ ). Ambos parámetros varían conforme a múltiples factores como la presentación del producto (sólido, líquido, gel, gas, polvo, etc.), la vía de entrada (oral, dérmica, respiratoria), la temperatura, la dieta, la edad, el sexo, etc. (Ramírez y Lacasaña, 2001). En la Tabla 3 se encuentra la clasificación de los plaguicidas de acuerdo con su toxicidad.

Tabla 3. Clasificación de los plaguicidas según su toxicidad (WHO, 2009)		
Clase	Toxicidad	Ejemplos (nombres comerciales)
Clase IA	Extremadamente peligrosos	Paratión, dieldrín
Clase IB	Altamente peligrosos	Eldrín, diclorvós
Clase II	Moderadamente peligrosos	DDT, clordano
Clase III	Ligeramente peligrosos	Malatión, <b>Carbamatos</b>

Por su **vida media**, se presenta en la Tabla 4 la clasificación de los plaguicidas en permanentes, persistentes, moderadamente persistentes y no persistentes (INECC, 2009).

Tabla 4. Clasificación de los plaguicidas según su vida media de efectividad (INECC, 2009)		
Persistencia <sup>a</sup>	Vida media <sup>b</sup>	Ejemplos
No persistente	De días hasta 12 semanas	Malatión, diazinón, carbarilo, diametrín, <b>carbamatos</b>
Moderadamente persistente	De 1 a 18 meses	Paratión, Iannate
Persistente	De varios meses a 20 años	DDT, aldrín, dieldrín
Permanentes	Indefinidamente	Productos hechos a partir de mercurio, plomo, arsénico

<sup>a</sup> Capacidad de una sustancia o un compuesto de permanecer en un sustrato del ambiente en particular, después de que han cumplido el objetivo por el cual se aplicó

<sup>b</sup> Lapso de tiempo necesario para que se degrade la mitad del compuesto o mezcla aplicada

De acuerdo con su **estructura química**, los plaguicidas se clasifican en diversas familias que incluyen desde los compuestos organoclorados y organofosforados hasta compuestos inorgánicos (Ramírez y Lacasaña, 2001).

Los organoclorados (OC), son los plaguicidas más ampliamente utilizados. Su estructura química corresponde a la de los hidrocarburos clorados, lo que les confiere una alta estabilidad física y química, haciéndolos insolubles en agua, no volátiles y altamente solubles en disolventes orgánicos. Estas características favorecen su persistencia en el ambiente y su lenta biodegradabilidad. Su vida media es de 5 años, aunque varía según el producto, por ejemplo para el aldrín es de 6 años y para el DDT es de 30 años. El compuesto como tal o sus metabolitos son contaminantes ubicuos de varios tejidos en humanos y de los mamíferos en general. Poseen una alta lipofilia, por lo cual, tienden a acumularse principalmente en tejido celular subcutáneo, en el componente graso de la leche materna y de la sangre (Ramírez y Lacasaña, 2001).

Los compuestos organofosforados (OF), que son ésteres, amidas o tioles derivados de los ácidos fosfóricos, fosfónico, etc., forman otro grupo. Se descomponen con mayor facilidad y se degradan por oxidación o hidrólisis, dando origen a productos solubles en agua, tentativamente menos persistentes y poco acumulables en el organismo humano. Pertenecen a este grupo el paratión, el malatión y el diazinón (Ramírez y Lacasaña, 2001).

Los carbamatos (C), son un grupo de plaguicidas que pueden ser de tres tipos principales: a) derivados de ésteres carbámicos, comúnmente usados como insecticidas; b) derivados del ácido tiocarbámico, utilizados como fungicidas, en donde se encuentra clasificado el MS y c) carbamatos propiamente dichos, que se emplean como herbicidas. Todos ellos son relativamente inestables. Se les atribuye un tiempo corto de persistencia ambiental y cuentan con cierta selectividad. Su degradación se realiza por oxidación y sus metabolitos finales son insolubles pudiéndose excretarse por la orina y las heces fecales. Entre los más comunes se encuentran el lannate, el carbarilo y el carbyl (Ramírez y Lacasaña, 2001).

Los piretroides (P) son plaguicidas obtenidos por secado, molienda y pulverización de la flor del crisantemo, cuyo polvo contiene del 1 al 3% del principio activo. Los principales piretroides son las cinerinas I y II, las jasmolinas I y II y las piretrinas I y II, consideradas estas últimas como las de efecto más potente. Tienen una relativa selectividad, por lo que su toxicidad es baja en organismos no blancos. Las moléculas de piretrinas son neuroactivas de baja absorción dérmica, con un metabolismo rápido y no dejan residuos en la atmósfera. Los piretroides son piretrinas sintéticas que surgen en los años cincuenta y se consideran más efectivos que las piretrinas. Se dividen en dos tipos a) sin grupo alfaciano y b) con grupo alfaciano. Todos son metabolizados por hidrólisis, oxidación y conjugación, con poca tendencia a acumularse en los tejidos. Además, son rápidamente degradados en el ambiente pues, aunque se absorben por el suelo, se eliminan fácilmente con el agua (Ramírez y Lacasaña, 2001).

La clasificación según la composición química de los plaguicidas de acuerdo con la CICOPLAFEST (2013) es la siguiente:

- a) **Compuestos inorgánicos:** Estos son los compuestos que carecen de carbono. Solamente se consideran los derivados de cobre, azufre, zinc y aluminio.
- b) **Compuestos orgánicos:** Son aquellos que contienen carbono en su estructura química. La mayoría son de origen sintético, fabricados a partir de compuestos químicos básicos, algunos son extraídos de plantas por lo que se conocen como botánicos. Los compuestos orgánicos sintéticos utilizados como plaguicidas pertenecen a distintos grupos o familias químicas. Cada uno de estos grupos tiene algunas características comunes y en cualquiera de ellos puede haber insecticidas, acaricidas, herbicidas, fungicidas u otros tipos de plaguicidas.
- c) **Plaguicidas biológicos:** Se llama así a los virus, microorganismos o sus metabolitos, formulados como insumos, que pueden controlar una plaga en particular. La Tabla 5 presenta la clasificación de los plaguicidas de acuerdo con su familia química.

<b>Tabla 5. Clasificación de los plaguicidas, según la familia química (Ramírez y Lacasaña, 2001)</b>	
<b>Familia química</b>	<b>Ejemplos</b>
Organoclorados	DDT, aldrín, endosulfán, endrín
Organofosforados	Bromophós, diclorvós, malatión
Carbamatos	Carbaryl, methomyl, propoxur
<b>Tiocarbamatos</b>	<b>Ditiocarbamato, mancozeb, maneb</b>
Piretroides	Cypermethrin, fenvalerato, permethrin
Derivados biperidilos	Cloromequat, diquat, paraquat
Derivados del ácido fenoxiacético	Dicloroprop, picram, silvex
Derivados cloronitrofenólicos	DNOC, dinoterb, dinocap
Derivados de triazinas	Atrazina, ametryn, desmetryn, simazina
Compuestos orgánicos del estaño	Cyhexatin, dowco, plictrán
Compuestos inorgánicos	Arsénico pentóxido, <i>obpa</i> (10,10'-oxibisfenoloxarsina), fosfito de magnesio, cloruro de mercurio, arsenato de plomo, bromuro de metilo, antimonio, mercurio, selenio, talio y fósforo blanco
Compuestos de origen botánico	Rotenona, nicotina, aceite de canola

En México, los plaguicidas también pueden clasificarse de acuerdo con la CICOPLAFEST (2013) de la siguiente manera:

- d) **Concentración.** Por la cantidad de ingrediente activo que contenga la formulación (Tabla 6).

<b>Tabla 6. Clasificación de los plaguicidas, según su concentración (INECC, 2009)</b>	
<b>Tipo de plaguicida</b>	<b>Formulación</b>
Ingrediente activo	Compuesto químico que ejerce la acción plaguicida
Plaguicida técnico	La máxima concentración del ingrediente activo obtenida como resultado final de su fabricación, de la cual se parte para preparar un plaguicida formulado
Plaguicida formulado	Mezcla de uno o más plaguicidas técnicos, con uno o más ingredientes conocidos como "inertes", cuyo objeto es dar estabilidad al ingrediente activo o hacerlo útil y eficaz; constituye la forma usual de aplicación de los plaguicidas

- e) **Organismo que controla**

Insecticida	Control de insectos como larvas de insectos, hormigas, pulgas, piojos y pulgones
Acaricida	Control de ácaros y garrapatas

Fungicida	Control de hongos y levaduras
Bactericida	Control de bacterias
Antibiótico	Control de bacterias
Herbicida	Control de hierba y maleza
Nematicida	Control de nemátodos
Rodenticida	Control de roedores
Molusquicida	Control de moluscos
Avicida	Control de aves (palomas)

**f) Modo de acción**

De contacto	Actúa principalmente al ser absorbido por los tejidos externos de la plaga
Sistémico	Al aplicarse en plantas o animales, se absorbe y traslada por su sistema vascular a puntos remotos del lugar en que se aplica y en los cuales actúa
Repelente	Impide que las plagas ataquen
De ingestión	Debe ser ingerido por la plaga para su acción efectiva
Fumigante	Se difunde en estado gaseoso o de vapor y penetra por todas las vías de absorción
Defoliantes	Causa la caída del follaje de las plantas

**g) Uso al que se destinan**

Agrícolas	Uso en diversas extensiones, en sistemas de producción agrícola y en productos y subproductos de origen vegetal para el control de plagas
Forestales	Uso en bosques y maderas
Pecuarios	Uso en animales o instalaciones de producción intensiva o extensiva cuyo producto será destinado al consumo humano o a usos industriales. Incluye al uso en animales domésticos. La existencia de numerosas especies de ecto- y endoparásitos de gran impacto sanitario y económico, ha motivado el uso de plaguicidas en el campo pecuario como antiparasitarios internos y externos. Entre los antiparasitarios externos están los garrapaticidas,

antimiásicos, antisárnicos y piojicidas; entre los endoparasitarios, están los antihelmínticos, que también actúan contra las moscas y otros artrópodos

Jardinería	Uso en jardines y plantas de ornato
Urbanos	Uso exclusivo de áreas urbanas, industriales, áreas no cultivadas, drenes, canales de riego, lagos, presas, lagunas y vías de comunicación. Su aplicación tiene como objetivo la salud pública. Entre las enfermedades que representan un serio problema de salud pública entre los países de América Latina y el Caribe merecen destacarse la malaria, la enfermedad de Chagas y otras tripanosomiasis, el dengue, la oncocercosis, la filariasis, la esquistosomiasis, la leishmaniasis y la fiebre amarilla. Estas enfermedades son transmitidas por vectores o por medio de huéspedes intermedios. Para controlarlas, la mayor parte de los programas sanitarios de lucha anti-vectorial, utilizan plaguicidas
Domésticos	Uso en el interior del hogar
Industriales	Se utilizan como materia prima en el proceso industrial para la formulación de plaguicidas o productos de uso directo.

## **2.4.2. Plaguicidas y alimentos**

### **2.4.2.1. Contaminación de alimentos**

Los contaminantes orgánicos persistentes son un grupo heterogéneo de sustancias químicas incluyendo plaguicidas, los contaminantes industriales y subproductos de los procesos de fabricación no intencionales. Estos compuestos comparten propiedades como la persistencia a largo plazo, la difusión por el ambiente y la bioacumulación en la cadena alimentaria. Por esta razón no es sorprendente que en la población la principal vía de exposición sea a través de la dieta (Fattore *et al.*, 2000).

Debido a sus propiedades físicas, estos productos químicos: pueden persistir en el ambiente durante muchos años; concentrarse en los tejidos grasos y

bioacumularse a medida que avanzan en la cadena alimentaria; viajar largas distancias en corrientes de aire y de agua mundiales, etc. Por lo general, pasan de las regiones tropicales y templadas a concentrarse en las latitudes del norte y sur y se han relacionado con efectos graves para la salud en los seres humanos y otros organismos vivos, incluso a niveles de exposición muy bajos. Una vez liberados a la atmósfera, agua y suelo, estos productos químicos no se descomponen fácilmente por procesos naturales. Algunos tienen vidas medias que se miden en décadas y que permanecen en el agua y el suelo donde son absorbidos por las plantas y animales que, en última instancia, sirven de alimento para los seres humanos. No es de extrañar, pues, que estos compuestos químicos están presentes en los alimentos de consumo directo, así como en los peces y la vida silvestre (Shafer y Kegley, 2002).

El tipo de plaguicida, la frecuencia en la aplicación de los cultivos y la cantidad utilizada, son factores que determinan el grado de contaminación de los productos cosechados. Se puede afirmar que, en la actualidad, es frecuente identificar residuos de plaguicidas en los alimentos y que, en muchos casos, se detectan concentraciones de éstos por encima de los límites máximos residuales (LMR), recomendados por la FAO/OMS (Codex Alimentarius, 2013). En la Tabla 7 se muestran los límites máximos permitidos para residuos (LMR) de ditiocarbamatos (DTC).

<b>Tabla 7. Límites máximos residuales, LMR, de ditiocarbamatos, DTC, de acuerdo con la FAO/OMS (Codex Alimentarius, 2013)</b>	
<b>Producto básico</b>	<b>LMR (mg kg<sup>-1</sup>)</b>
Ajo	0.5
Almendras	0.1
Arándanos agrios	5.0
Banano	2.0
Berza común acéfala	15
Calabaza común	0.2
Calabaza de invierno	0.1
Calabaza de verano	1.0
Carne (de mamíferos, no marinos)	0.05
Carnes de aves	0.1
Cebada	1.0
Cebolla, bulbo	0.5
Cebolleta	10
Cerezas	0.2
Coles arrepolladas	5.0
Cáscara de almendras	20
Despojos comestibles (mamíferos)	0.1

Tabla 7. Continuación	
Despojos comestibles (aves de corral)	0.1
Espárragos	0.1
Forraje seco de maní	5.0
Forraje seco de maíz	2.0
Fresas	5.0
Frutas de hueso	7.0
Frutas pomáceas	5.0
Grosellas rojas, negras, blancas	10
Huevos	0.05
Leches	0.05
Lechuga alargada	10
Lechuga arrepollada	0.5
Lúpulo desecado	30
Mandarinas (incluidos híbridos)	10
Mango	2.0
Maní	0.1
Maíz dulce (maíz en la mazorca)	0.1
Melones, excepto sandías	0.5
Naranjas dulces, agrias (híbridos incluidos)	2.0
Pacanas	0.1
Paja y forraje seco de cebada	25
Paja y forraje seco de trigo	25
Papaya	5
Patatas (papas)	0.2
Pepinos	2
Peppers Chili, dried	10
Pimientos dulces (incluido pimiento morrón)	1.0
Puerro	0.5
Remolacha azucarera	0.5
Sandía	1.0
Tomate	2.0
Trigo	1.0
Uvas	5.0
Zanahorias	1.0

A efectos de cumplimiento con los LMR y la ingesta diaria alimentaria (IDA) para los productos vegetales y animales, el contenido total de DTC, determinados como CS<sub>2</sub>, son transformados durante la digestión ácida (como la que ocurre en el estómago de los seres humanos). Se expresan como mg CS<sub>2</sub>/kg. Los LMR se refieren a todos los residuos derivados del uso de cualquiera o todos los grupos de DTC. (1) IDA de grupo: ferbam y ziram, 0.003 mg/kg de masa corporal (1996); tiram, 0.01 mg/kg de masa corporal (1992); mancozeb, maneb, metiram y zineb, 0.03 mg/kg de masa corporal (solos o en cualquier combinación) y propineb, 0.007 mg/kg de masa corporal (Codex Alimentarius, 2013).

La Unión Europea fijó los límites máximos de residuos de plaguicidas en alimentos (plantas azucareras) de DTC, como se observa en la Tabla 8.

<b>Tabla 8. Límites máximos de residuos de ditiocarbamatos, DTC, en alimentos (Unión Europea, 2013)</b>	
<b>Plantas azucareras</b>	<b>Ditiocarbamatos expresados en CS<sub>2</sub></b>
Remolacha azucarera (raíz)	0.01 mg/kg
Caña de azúcar	0.01 mg/kg
Raíces de achicoria	0.01 mg/kg
Otros	0.01 mg/kg

#### **2.4.2.2. Rechazo de alimentos de exportación**

En los últimos años ha aumentado de manera significativa en el mundo entero la demanda de los consumidores por productos saludables e inocuos. Esto desde luego incluye productos que cumplan con los límites máximos de residuos de plaguicidas. Debido a esto, los países mantienen normas al respecto y programas para su control. Tal es el caso del *US Pesticide Data Program* y la Unión Europea. Ambos cuerpos gubernamentales realizan un análisis de diferentes muestras de alimentos para determinar la presencia de plaguicidas. Si encuentran residuos de plaguicidas a niveles preocupantes para los consumidores se transmite la información y se adoptan medidas para la protección de los consumidores. Como consecuencia, los países de América Latina suelen tener más rechazos de sus productos en Estados Unidos o en Europa. El rechazo de productos de exportación por parte de los países desarrollados conlleva no solamente problemas del tipo económico en el precio del producto y cierre temporal de mercados, sino también de salud pública, pues en varias oportunidades se ha reportado la comercialización de los alimentos rechazados en el exterior, dentro del mismo país exportador (Achipia, 2011).

Existen tres tipos principales de riesgos por los que pueden contaminarse las frutas y hortalizas y los alimentos en general en las diferentes etapas, desde la producción primaria hasta su consumo. Estos riesgos son: físicos, biológicos y químicos. Estos últimos se presentan cuando los productos agrícolas están contaminados por restos de plaguicidas en concentraciones por encima de los LMR, lo que supone que constituyen un riesgo para la salud. Para evitar esto se recomienda utilizar productos autorizados para cada tipo de cultivo, seguir

siempre las instrucciones, seguir el código de buenas practicas agrícolas en la realización de tratamientos con plaguicidas, llevar un control de los tratamientos que se realizan: fecha, producto, dosis, persistencia, estado vegetativo de la planta; respetar el tiempo de seguridad entre la realización de dos tratamientos teniendo en cuenta la persistencia de los productos, evitando así las acumulaciones excesivas en el suelo. En la elección del producto debe tenerse en cuenta su persistencia y toxicidad, cumplir con los plazos de seguridad establecidos para cada producto y cultivo, nunca reutilizar los envases para almacenar agua potable o alimentos, eliminar los envases de acuerdo con las normas legales establecidas, lavar los equipos adecuadamente después de realizar un tratamiento y mantener a los animales alejados de los cultivos tratados (FAO, 2002).

#### **2.4.3. Plaguicidas y nutrición (PNUMA, 2004)**

Es importante recordar que una dieta equilibrada contribuye a proteger en una u otra forma al organismo contra los efectos de los productos químicos. La mala nutrición puede aumentar la vulnerabilidad de los organismo a diversos contaminantes ambientales. Ciertas carencias dietéticas en aminoácidos, vitaminas y minerales pueden influir sobre el efecto tóxico de un agente químico. Estas deficiencias pueden alterar el proceso de biotransformación de las sustancias tóxicas mediante la inhibición de enzimas. Las deficiencias cualitativas y cuantitativas de proteínas en la dieta producen una disminución de estas enzimas; lo cual puede tener un efecto adverso en la biotransformación de los xenobióticos, al producirse sustancias más tóxicas que las originales.

Durante la infancia temprana, los niños también están en contacto con plaguicidas persistentes y bio-acumulables a través de la leche materna. Ésta puede ser una importante fuente de exposición debido a que la leche materna es la mejor fuente de alimentación. A medida que crecen, los niños beben más agua que los adultos. Los niños consumen más alimentos por masa corporal con respecto a los adultos y, como se sabe, la presencia de plaguicidas puede estar en altas concentraciones en la carne, huevos, leche y pescado. También los plaguicidas presentes en las frutas y vegetales pasan a los niños en altas

concentraciones, incluso en los alimentos procesados. Los niños pueden tener patrones de alimentación completamente diferentes a los de los adultos, lo que hace una exposición a plaguicidas más desproporcionada. Su dieta es menos diversa, resultando el consumo de grandes cantidades de ciertos alimentos.

Por ejemplo, en los Estados Unidos los niños consumen muchas más frutas, como manzanas, por masa corporal en comparación con los adultos. Como consecuencia, la dieta puede ser una importante fuente de exposición a plaguicidas para los niños y en relación mayor en comparación por masa corporal que para los adultos. Debido a que los niños tienen un metabolismo diferente al de los adultos, pueden tener distinta capacidad para descomponer o metabolizar, excretar, activar o desactivar los plaguicidas. Estos procesos cambian drásticamente desde el nacimiento hasta la madurez.

Dichos factores pueden provocar que los plaguicidas tengan efectos tóxicos más pronunciados en los niños o posiblemente presentar distintos síntomas de intoxicación de los que manifiestan los adultos. La pobreza puede poner a los niños en varias situaciones de alto potencial de riesgo. Los niños pueden ayudar en el trabajo rural familiar donde se aplican plaguicidas. Pueden trabajar trasladando cosas tratadas o contaminadas con plaguicidas. El resultado puede ser una mayor exposición a plaguicidas.

## **2.5. Carbamatos**

Los carbamatos están entre los plaguicidas más usados en el mundo, comercializándose desde 1950. Son muy utilizados en el hogar, jardines y agricultura. Químicamente, los carbamatos son ésteres N-metil carbámicos. Al igual que los plaguicidas organofosforados, los carbamatos inhiben la enzima acetilcolinesterasa que hidroliza el neurotransmisor acetilcolina. Los neurotransmisores son moléculas segregadas por una célula nerviosa para activar una célula adyacente. El neurotransmisor se difunde a través del espacio entre dos células, denominado sinapsis y se une a los receptores de la segunda célula. Existen muchos tipos de neurotransmisores, pero la acetilcolina es el único responsable de activar el motor de las células nerviosas. Una vez que la acetilcolina se une al receptor la célula nerviosa se mantiene

activada hasta que la acetilcolinesterasa, presente en la sinapsis, degrada a la acetilcolina. Si se inhibe la actuación de la enzima, el nervio se mantiene activo en forma incontrolada, originando parálisis y muerte. La toxicidad de los carbamatos es menor que la de los gases nerviosos, pero mayor que la de los insecticidas organoclorados. Los carbamatos de N-metilo se absorben por inhalación, ingestión y algunos penetran por la piel, aunque esta última tiende a ser la ruta menos tóxica. Los carbamatos de N-metilo son hidrolizados enzimáticamente por el hígado y los productos de degradación se excretan por los riñones y el hígado (EPA, 2006).

## **2.6. Ditiocarbamatos (DTC)**

Los ditiocarbamatos son un grupo de sustancias activas que tienen una estructura química similar, pero que tienen diferentes propiedades toxicológicas. Son compuestos orgánicos importantes de azufre, que actúan como inhibidores de enzimas dependientes de metal y sulfhídrido, teniendo serias consecuencias en los sistemas biológicos. Poseen una gran variedad de aplicaciones en la agricultura como fungicidas, así como en la industria del hule o caucho como aceleradores de la vulcanización y antioxidantes. De esta manera, los DTC son el grupo principal de los fungicidas utilizados para el control de aproximadamente 400 agentes patógenos de más de 70 cultivos y están registradas en todos los estados miembros de la UE y en otros países. Etilentiourea (ETU) y propileno-tiourea (PTU) son los productos de transformación más importantes de los DTC. Se sospecha que pueden causar varios efectos adversos (por ejemplo carcinogénicos, mutagénicos, teratogénicos). En los últimos años, se ha expresado la preocupación por su presencia en los alimentos, las bebidas y el ambiente. Los métodos predominantes para la determinación de los DTC y metabolitos se basan en su descomposición a disulfuro de carbono ( $CS_2$ ) en un medio ácido, seguido principalmente por espectrometría de masas y cromatografía de gases (Blasco *et al.*, 2004).

### 2.6.1. Ditiocarbamato de sodio o Metam sodio (MS)

Es un derivado del ácido carbámico en el cual los dos átomos de oxígeno son reemplazados por átomos de azufre. Estudios realizados muestran que su degradación está en función de la concentración en solución acuosa. A concentraciones de 20 y 200 mg mL<sup>-1</sup> se conserva el 98% del compuesto original después de 20 horas, mientras que a concentraciones bajas de 2 mg mL<sup>-1</sup>, sólo el 68% del compuesto se presenta después de 20 horas y, finalmente, a concentraciones trazas de 0.2 mg mL<sup>-1</sup>, el 32.3% del compuesto está presente (Gorozieta-Rosales *et al.*, 2011).

La difusión y descomposición del metam sodio en el suelo es un proceso complejo que depende de varios factores; el pH del suelo afecta de manera considerable la descomposición del MS, el cual es un producto estable en soluciones alcalinas concentradas mientras que en soluciones diluidas se descompone rápidamente. La velocidad de descomposición del MS a MITC aumenta considerablemente al elevar la temperatura. En soluciones neutras, el MS se descompone en MITC e hidrogenosulfuro de sodio (Fig. 1) (LAINCO, 2010).

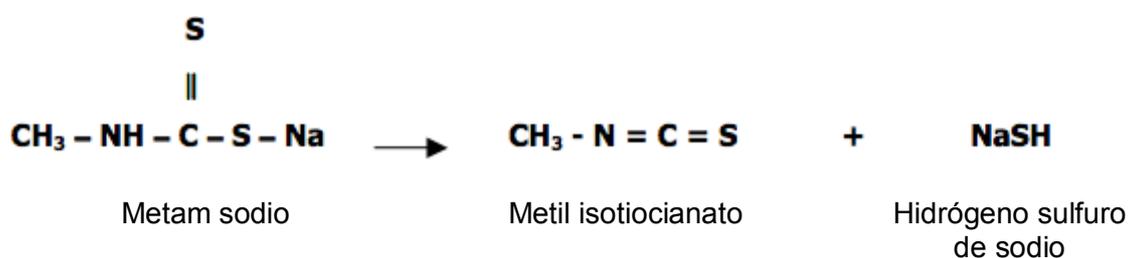


Fig. 1. Reacción de degradación de MS en soluciones neutras (LAINCO, 2010)

En soluciones alcalinas diluidas se produce una reacción de oxidación, caracterizada por la formación de azufre elemental y MITC (Fig. 2)

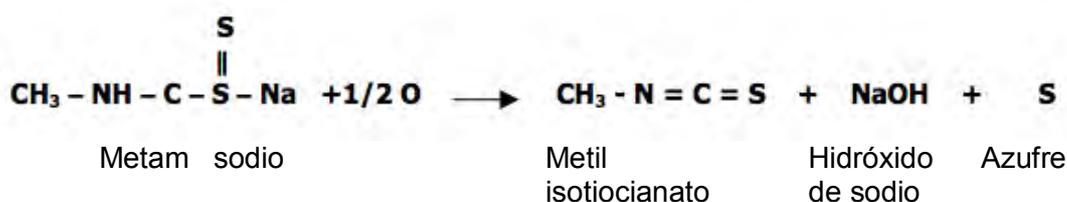
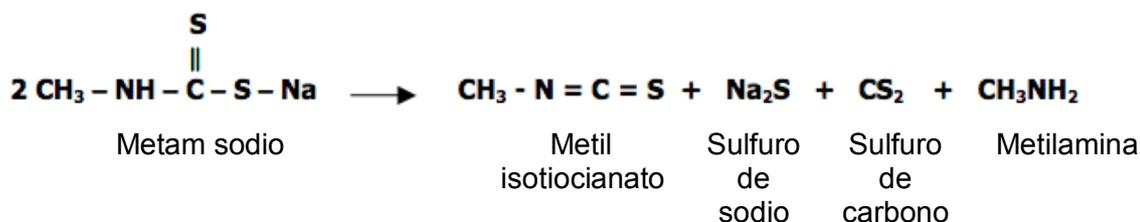


Fig. 2. Reacción de degradación de MS en soluciones alcalinas diluidas (LAINCO, 2010)

En soluciones ácidas se produce una descomposición no oxidativa que inicialmente produce la mitad de *MITC* que el que se forma en la descomposición oxidativa (Fig. 3).



**Fig. 3. Reacción de degradación de MS en soluciones ácidas (LAINCO, 2010)**

De igual forma, la velocidad de descomposición del MS a *MITC* y la desaparición de éste último aumenta considerablemente al aumentar la temperatura. El intervalo ideal de temperatura se encuentra entre 10 y 25°C. A temperaturas superiores y si el suelo está demasiado seco, el vapor difunde muy rápidamente y escapa con gran facilidad. Por otro lado, a temperaturas bajas, la difusión queda muy limitada y no se consiguen las concentraciones mínimas necesarias (LAINCO, 2010).

### **2.7. Isotiocianato de metilo (*MITC*) (Wales, 2002)**

Principal producto de degradación del MS en condiciones neutras. En aire existe únicamente como vapor, el cual se degrada en la atmósfera mediante reacciones con radicales hidroxilo, con un tiempo de vida media igual a 118 días, ya que es susceptible a la fotólisis directa. En suelo tiene una movilidad muy alta y es degradado por acción de los microorganismos (vida media estimada de 0.5 a 50 días).

En agua es eliminado por hidrólisis, presentando una vida media entre 65 a 178 días a pH 7, de 0.7 a 10 días a pH 10 y de 15 a 67 días a pH 5. Su potencial de bioconcentración en organismos acuáticos es bajo. Este compuesto, además de ser liberado directamente al ambiente al usar el metam sodio, también es generado a partir de la degradación de otros plaguicidas, como el conocido como dazomet.

En cuanto a su toxicidad, es altamente tóxico para los seres humanos y los animales, causando daño de tejido, los síntomas de la exposición aguda a altas concentraciones de *MITC* en el aire incluyen edema pulmonar, falta de respiración, asma, dolor de pecho, lesiones de piel y ojos y, finalmente, la muerte. No hay muertes en ninguna especie a concentraciones menores de  $2400 \mu\text{g L}^{-1}$ , pero desde concentraciones de  $4000 \mu\text{g L}^{-1}$  ( $4 \text{ mg L}^{-1}$ ) los síntomas de la irritación comienzan a ser marcados.

Para determinar la concentración inicial de *MITC* y con base a la reacción de degradación en condiciones neutras citada en el punto anterior, un mol de MS produce un mol de *MITC*. Tomando en cuenta que, para esta investigación, donde se evaluará el efecto de la matriz, la solución madre es preparada en dos matrices diferentes: agua y metanol. Por ello, se emplea la densidad de los diluyentes para obtener la masa en mg que contiene dicha solución. Por lo tanto, si 129,170 mg de MS equivalen a 73,110 mg de *MITC* hay 28.29 mg de *MITC* en 50 mg de MS en la matriz de agua, siendo ésta la concentración inicial del compuesto en estudio. Para la matriz de metanol la concentración inicial de *MITC* es de 35.73 mg.

En el caso de la matriz de jugo de caña se toma en cuenta la reacción de degradación del MS en condiciones ácidas debido al pH del jugo, cuyo valor es de 5.5. Por tanto, por cada 2 moles de MS se produce una mol de *MITC*, es decir, que 258,340 mg de MS equivalen a 73,110 mg de *MITC* en 50 mg de la solución madre, por lo que la concentración inicial de *MITC* en jugo de caña es de 17.89 mg.

En la Tabla 9 se muestra la información general del compuesto.

### **2.7.1. Métodos para determinar *MITC***

Los métodos analíticos más empleados para la determinación del MS y *MITC* se encuentran descritos en la Tabla 10.

**Tabla 9. Ficha técnica del MITC (INECC, 2012)**

<b>Información general</b>	
Nombre químico: Isotiocianato de metilo	Estructura química: $S=C=N-CH_3$
Sinónimos: Isotiocianatometano, ácido isotiocianico metil éster, Isotiocianato de metano, metilisotiocianato, MIT, MITC, Trapex, Vorlex	Masa molecular: 73.11
	Punto de ebullición: 119°C
	Punto de fusión: 36°C
	Solubilidad: 7600 mg L <sup>-1</sup> a 25°C
	Presión de vapor: 3.54 mm Hg a 25°C
	Densidad relativa: 1.0619 a 37°C
Fácilmente soluble en disolventes orgánicos como: etanol, metanol, acetona, ciclohexona, diclorometano, cloroformo, tetracloruro de carbono, benceno, xileno, éter de petróleo, etil éter y aceites minerales	
<b>Peligrosidad</b>	
	
Tóxico      Corrosivo      Ambiente	
<b>Destino en el ambiente</b>	
En el aire existe únicamente como vapor, el cual se degrada en la atmósfera mediante reacciones con radicales hidroxilo, con un tiempo de vida media igual a 118 días. Este compuesto es susceptible a la fotólisis directa en el aire. En el suelo tiene una movilidad muy alta y es degradado por acción de los microorganismos (vida media estimada de 0.5 a 50 días). En el agua es eliminado por hidrólisis, mostrando vidas medias de 65 a 178 días a pH 7, de 0.7 a 10 días a pH 10 y de 15 a 67 días a pH 5. La volatilización es un destino ambiental importante para este plaguicida, tanto en el agua (vida media de 12 horas a 8 días) como en suelo. Este compuesto, además de ser liberado directamente al ambiente por su uso como plaguicida, es generado a partir de la degradación de otros plaguicidas (dazomet y metam-sodio)	

<b>Tabla 10. Métodos analíticos utilizados para la determinación MS y MITC</b>				
<b>Condiciones cromatográficas por CLAR</b>	Metil-ditiocabamato de sodio (MS)  (Arvizu y Ramos, 2010)	Isotiocianato de metilo (MITC)  (Waggott <i>et al.</i> , 1988)	Isotiocianato de metilo (MITC)  (Draper y Wakeham 1993)	Isotiocianato de metilo (MITC)  (Mullins y Kirkbright, 1987)
<b>Columna</b>	ODS (C <sub>18</sub> ) de 10 cm de longitud, 4.6 mm de d. i. y partículas esféricas de 5 µm	ODS (C <sub>18</sub> ) de 10 cm de longitud, 3 mm de d.i. y partículas esféricas de 5 µm	Supelco LC-18 de 25 cm de longitud, 4.6 mm de d.i. y partículas esféricas de 5 µm	ODS (C <sub>18</sub> ) de 25 cm de longitud, de 5 mm de d.i. y partículas esféricas de 5 µm
<b>Fase móvil</b>	30:70 (v/v) acetonitrilo:agua	50% de CTAB a 0.01M MeOH: 50% Buffer de fosfatos KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> en agua 0.01M a pH 6.8	Agua/metanol (4:1 v/v)	50% de CTAB a 0.01M, MeOH: 50%, a pH 6,8 (0.010 M fosfatos)
<b>Velocidad de flujo</b>	1.1 mL min <sup>-1</sup>	0.7mL min <sup>-1</sup>	1.5 mL min <sup>-1</sup>	1.4 mL min <sup>-1</sup>
<b>Detector</b>	ultravioleta (UV)	ultravioleta (UV)	ultravioleta (UV)	ultravioleta (UV)
<b>Longitud de onda (λ)</b>	200 nm	218-247 nm	240 nm	247 nm
<b>Volumen de inyección</b>	20 µL	20 µL	20 µL	20 µL
<b>Concentración muestra</b>	50 mg L <sup>-1</sup>	200 µg L <sup>-1</sup>	50 mg L <sup>-1</sup>	50 mg L <sup>-1</sup>
<b>Matriz de la dilución</b>	Agua/ metanol	Agua	Agua/ metanol	Agua/ metanol

mm: Milímetros; µm: Micrómetros; mL: Mililitros; µL: Microlitros; d.i.: Diámetro interno; nm: nanómetros, L: Litros, µg: Microgramos, cm: Centímetros, mg: Miligramos, min: minutos, ODS: Octadecilsilano, CTAB: Siglas en inglés para bromuro de hexadeciltrimetilamonio

## 2.8. Cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR)

La cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) es la técnica analítica de separación más ampliamente utilizada en la actualidad debido a su estabilidad, a su adecuación para realizar determinaciones cuantitativas exactas y a su gran aplicabilidad a diferentes tipos de sustancias (aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, hidrocarburos, hidratos de carbono, fármacos, plaguicidas, antibióticos, especies organometálicos y sustancias orgánicas).

En las cromatografías líquidas clásicas en las que la fase móvil es un líquido que fluye a través de un sólido por el solo efecto de gravedad (a veces con una pequeña succión o presión) para alcanzar alta resolución sería necesario emplear o columnas excesivamente largas o empaquetamientos demasiado compactos con rellenos de grano muy fino, lo que se traducirá en un desarrollo muy lento de los cromatogramas; estos inconvenientes se han resuelto con la cromatografía de alta resolución, en la que se trabaja con pequeñas columnas, muy empaquetadas y forzando el paso de la fase móvil mediante elevadas presiones, con lo que se consiguen separaciones muy efectivas en un plazo muy corto de tiempo. La cromatografía líquida de alta eficacia se incluye dentro de la cromatografía de elución. En ésta, un líquido (fase móvil) circula en íntimo contacto con un sólido y otro líquido inmisible (fase estacionaria); al introducir una mezcla de sustancias (analitos) en la corriente de fase móvil, cada analito avanzará a lo largo del sistema con una velocidad diferente que dependerá de su afinidad por cada una de las fases. Esto supone que después de terminado el recorrido de la muestra por la columna, cada una de las sustancias introducidas en el sistema eluirá con un tiempo diferente, es decir, estarán separadas (Burriel *et al.*, 2008).

### **2.8.1. Clasificación de la cromatografía líquida (Skoog *et al.*, 2008)**

Los diferentes tipos de cromatografía líquida se pueden clasificar de diferentes maneras, pero la forma más habitual de clasificación es la realizada con base en la naturaleza de la fase estacionaria, ya que es ésta la que impone fuertemente el mecanismo de separación. De este modo, se pueden enumerar cuatro tipos de técnicas.

#### **2.8.1.1. Cromatografía de adsorción (líquido-sólido)**

La fase estacionaria es un adsorbente y la separación se basa en repetidas etapas de adsorción-desorción.

#### **2.8.1.2. Cromatografía de reparto/adsorción (fases ligadas químicamente)**

La separación en este caso, se basa en un reparto del soluto entre la fase móvil y la fase estacionaria.

### **2.8.1.3. Cromatografía de intercambio iónico**

Este tipo de cromatografía se da cuando la fase estacionaria presenta en su superficie grupos ionizados capaces de retener selectivamente a iones signo contrario que circulan en la fase móvil.

### **2.8.1.4. Cromatografía de exclusión molecular**

La fase estacionaria, en este caso, es un material poroso de tamaño de poro controlado, que permite la entrada de ciertas moléculas de manera selectiva, dejando fuera otras de mayor tamaño.

El mecanismo de retención en los dos primeros casos es similar, variando únicamente el tipo de interacciones que se producen y cuál de ellas es la predominante. Por esta razón, en la práctica, se realiza otra división de los dos primeros tipos de cromatografía atendiendo la polaridad de la fase estacionaria.

### **2.8.2. Cromatografía de fase normal**

La fase estacionaria presenta puntos activos de alta polaridad y las interacciones que se producen con el soluto son específicas del grupo activo. La fase estacionaria puede ser un sólido adsorbente (sílice o alúmina), o bien, un soporte al que se unen químicamente moléculas orgánicas que presentan grupos funcionales de alta polaridad (ciano, amino, etc.).

### **2.8.3. Cromatografía de fase reversa (inversa)**

La fase estacionaria tiene una naturaleza apolar (cadenas hidrocarbonosas, grupos fenilo) y las interacciones que se producen son inespecíficas (efecto solvóforo).

### **2.8.4 Instrumentación de CLAR**

Si bien es cierto que para realizar una cromatografía líquida solamente es necesario disponer de las dos fases implicadas en el proceso y de la columna, la moderna cromatografía de líquidos de alta eficacia, debido al pequeño diámetro de las partículas de fase estacionaria que utilizan, requiere de la utilización de unos dispositivos que constituyen el cromatógrafo.

Los componentes básicos de un cromatógrafo de líquidos son:

#### **2.8.4.1. La bomba**

La misión de la bomba es la de suministrar un caudal constante y libre de pulsos de la fase móvil a través de la columna, sin que el flujo sea influido por la presión en la cabeza de la columna, ya que ésta puede variar por obstrucción de las líneas de conducción, del filtro de la cabeza de la columna, etc. Un sistema de bombeo ideal debe cumplir con las siguientes características:

- Estar construido con materiales químicamente inertes frente a la fase móvil
- Ser capaz de trabajar a presiones elevadas
- Proporcionar un flujo libre de pulsaciones o llevar asociado un amortiguador de éstas, ya que las pulsaciones aunque no afectan a la separación en sí, pueden contribuir al ruido de fondo del detector y, por lo, a disminuir la sensibilidad
- Suministrar flujos adecuados para los diferentes tipos de columnas. El intervalo de caudales para las columnas que se utilizan habitualmente varía desde los 10  $\mu\text{L min}^{-1}$  hasta los 10  $\text{mL min}^{-1}$  (columnas *microbore*, analíticas y semipreparativas)
- El caudal que suministran debe ser constante a lo largo del tiempo, ya que de él depende la reproducibilidad de los tiempos de retención.

#### **2.8.4.2. Sistemas de mezcla de fase móvil**

En cromatografía de líquidos es posible trabajar en dos modalidades, isocrático cuando la fase móvil mantiene la misma composición durante la elución y en gradiente, cuando la composición de la fase móvil cambia según una función dependiente del tiempo. Para trabajar la modalidad de gradiente es necesario que el equipo cromatográfico tenga un dispositivo capaz de realizar mezclas de disolventes con un control preciso y reproducible. Los dos principales métodos de mezclado de los componentes de la fase móvil se conocen como mezclado a alta presión y mezclado a baja presión.

#### **2.8.4.3. Dispositivo de inyección**

El método de introducción de la muestra de CLAR es importante pues un mal sistema de inyección puede dar lugar a ensanchamientos de la banda cromatográfica que deterioran la eficacia del sistema cromatográfico. Un inyector ideal debe tener las siguientes características:

- introducir la muestra en la columna como una banda lo más estrecha posible
- Ser de fácil manejo
- Dar lugar a resultados reproducibles, tanto en la cantidad de muestra inyectada como en el ensanchamiento que origina en la banda cromatográfica
- Ser capaz de trabajar a presiones elevadas

Fundamentalmente existen dos tipos de inyectores manuales: los de jeringa y los de válvula. En los inyectores del tipo jeringa, la introducción de la muestra en la columna se realiza por medio de una jeringa cuya aguja entra en el sistema cromatográfico a través de una membrana ("septum"), lo que permite depositar la muestra en la cabeza de la columna. Las ventajas de este tipo de inyector radican en su facilidad de construcción y en que permiten sacar todo el partido a la eficacia ofrecida por la columna; por el contrario, son inyectores que presentan una gran falta de reproducibilidad, tienen una presión de trabajo limitada y son de gran dificultad de manejo.

Los inyectores de válvula consisten en una válvula de tres vías, dos de las cuales están conectadas entre sí, por medio de una espiral o "bucle" ("loop"). Esta espiral es un tubo de volumen conocido, cuya misión es la de contraer la muestra antes de efectuarse la inyección. La introducción de la muestra en la columna se lleva a cabo en dos etapas; la primera se realiza a presión atmosférica y consiste en cargar la muestra en la espiral con ayuda de una jeringa; en la segunda mediante un giro de la válvula, se hace pasar el eluyente a través de la espiral hacia la columna. La inyección con las válvulas es con mucho la más utilizada, ya que reúne prácticamente todas las características exigibles a un inyector.

#### **2.8.4.4. Conducciones y conexiones**

Como ya es conocido, la presencia de volúmenes muertos es uno de los problemas más grandes de los equipos de cromatografía de líquidos, ya que éstos dan origen a pérdidas en la eficacia del sistema y, por lo tanto, en la capacidad de separación. En particular, todas las conducciones y conexiones entre inyector y columna, y entre columna y detector son de la máxima importancia.

El tubo de conducción puede considerarse como un volumen muerto del sistema y, por lo tanto, es de vital importancia la utilización para esta finalidad de tubos capilares en los que el diámetro interno sea pequeño y evitar al máximo posible la utilización de grandes longitudes de tubo de conexión. De este modo, se consigue reducir en la medida de lo posible el volumen muerto del sistema. Es posible calcular la pérdida de eficiencia producida por el volumen muerto de la conducción. También es importante conocer la naturaleza del tubo utilizado, ya que éste debe ser inerte frente a la fase móvil y a las sustancias a separar.

Las conexiones tienen la misma importancia que el tubo, ya que en ellas es también necesario lograr eliminar la presencia de volúmenes muertos. Existen dos tipos de conexiones: las uniones, que se emplean para conectar los tubos del mismo diámetro, y las reducciones que se emplean para modificar el diámetro de la conducción encontrándose, por lo general, las reducciones únicamente en los extremos de la columna. En ambos casos, es imprescindible la eliminación de los volúmenes muertos.

#### **2.8.4.5. Detector y registrador**

Un detector para cromatografía es un dispositivo que permite medir, a la salida de la columna, una propiedad física del eluyente, que deberá depender de la composición de éste. La detección en cromatografía se realiza, habitualmente, en continuo, aunque es posible la utilización de colectores de fracciones para la identificación y cuantificación de pequeñas fracciones del eluyente.

Los detectores para cromatografía de líquidos son de dos tipos básicos. Los detectores basados en una propiedad de la solución son sensibles a una propiedad de la fase móvil, como el índice de refracción, la constante dieléctrica o la densidad, la cual es modulada por la presencia de solutos. En cambio, los detectores basados en una propiedad del soluto, responden a alguna de las propiedades del soluto, como la absorbancia en el UV, fluorescencia o corriente por difusión, que no son inherentes a la fase móvil.

Durante esta experimentación se trabajó con un detector de ultravioleta y/o visible. En este caso cuando se hace pasar una radiación electromagnética a través de compuestos que presentan determinados grupos funcionales, éstos experimentan una excitación electrónica a causa de la absorción de energía, a una longitud de onda que será específica para cada grupo funcional.

#### **2.8.4.6. Columna**

La columna es el elemento fundamental de un cromatógrafo de líquidos, puesto que es en ella donde tiene lugar la separación; por lo tanto, resulta fundamental una correcta elección de la columna adecuada para cada separación, ya que con una columna inadecuada o de mala calidad nunca se obtendrán buenos resultados aunque se disponga del mejor instrumental. Las características de la columna que influyen sobre su capacidad de separación son: diámetro interno (depende de la cantidad de muestra a separar, las hay con diámetros de 1-6 mm o de 10 mm o superiores), longitud (que va desde 20 a 30 cm para tamaños de partícula de 10 a 3  $\mu\text{m}$ ), conexiones, relleno y empaque (generalmente son de sílice, pero también hay rellenos de polímeros sintéticos) y tamaño de partícula de relleno (éstos se encuentran entre 10 y 3  $\mu\text{m}$  de diámetro).

Además de los dispositivos anteriormente mencionados se pueden incorporar en el sistema otros que pueden simplificar el trabajo o mejorar algún aspecto concreto de la técnica cromatográfica, como pueden ser: Inyectores automáticos, colectores de fracciones, hornos termostatzados para las columnas y sistemas de tratamientos de datos.

## Capítulo III Metodología

### 3.1. Diagrama de bloques

En la Fig. 4 se presenta el diagrama de bloques con la metodología empleada en esta investigación

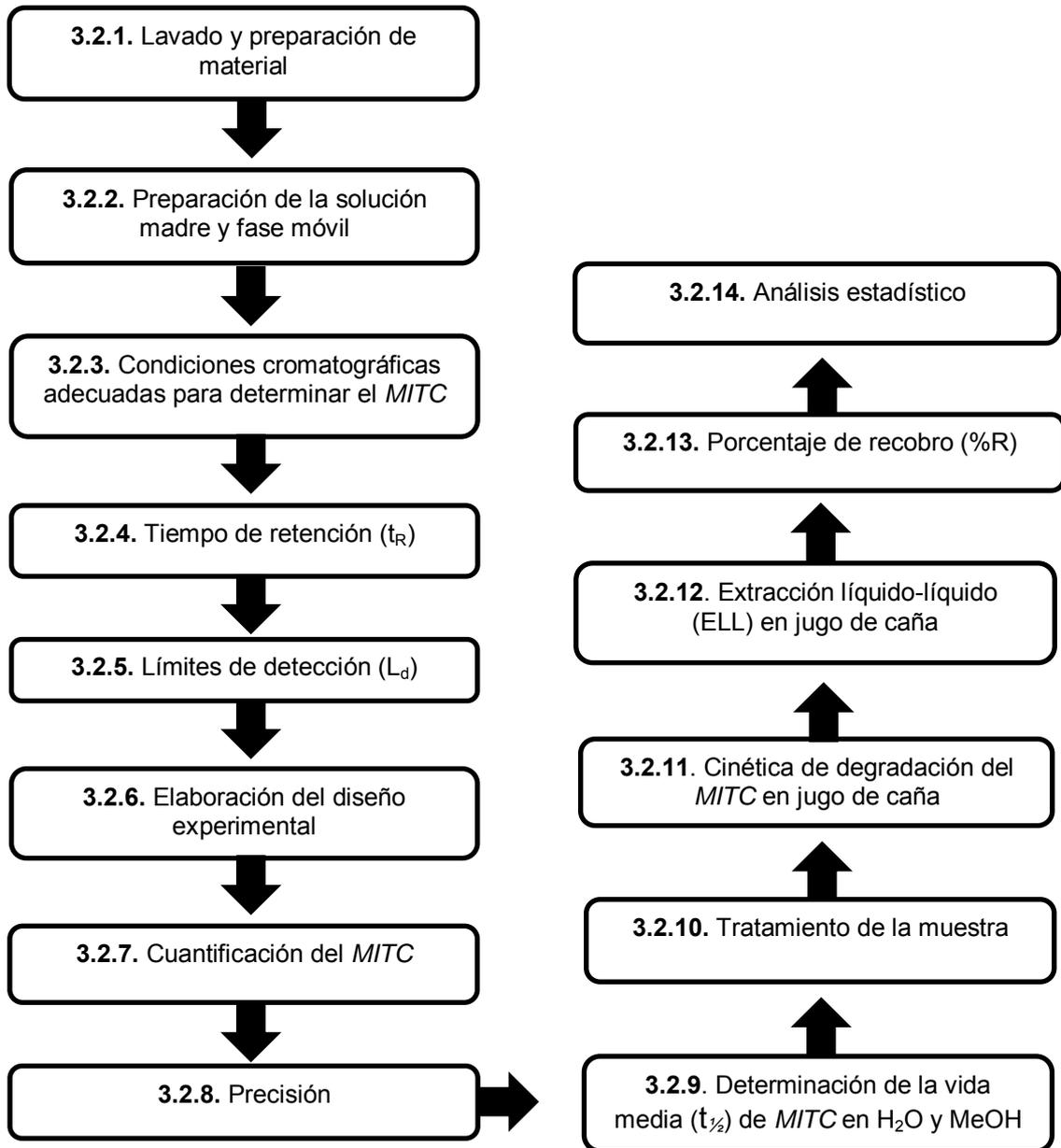


Fig. 4. Diagrama de bloques de la metodología

### 3.2. Procedimiento

#### 3.2.1. Lavado y preparación de material

Se lleva a cabo un lavado de todo el material utilizado (viales de vidrio con tapa de silicón de 8 mm y capacidad de 2 mL, frascos Duran de 250 mL, 500 mL y de 1000 mL) (Cortés-Zamora y Magaña-Paredes, 2005).

#### 3.2.2. Preparación de la solución madre y fase móvil

La solución madre fue preparada a partir del MS a una concentración de 50 mg L<sup>-1</sup> en dos matrices, agua y metanol. Se utilizan 20 viales para cada matriz los cuales son forrados con papel aluminio. Se preparó la fase móvil a partir de agua de alta pureza (°HPLC), adicionada con 0.3639 g de CTAB (siglas en inglés para el bromuro de hexadeciltrimetilamonio) para obtener un volumen total de 100 mL y una concentración de 0.01M. Posteriormente se adicionan 100 mL de metanol y se ajusta el pH a 6.8 con una solución de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. Antes de ser usada dicha fase debe ser desgasificada en baño ultrasónico marca Brasonic Mod. 3210, 0-60 Hz, durante 10 minutos.

**Nota:** Tanto el metanol como el agua ultra pura deben ser filtradas antes de usarse mediante un equipo de filtración al vacío Millipore, utilizando una membrana *Titan 47* mm de *Nylon* previamente acondicionada, cuyo tamaño de poro es de 0.20 µm.

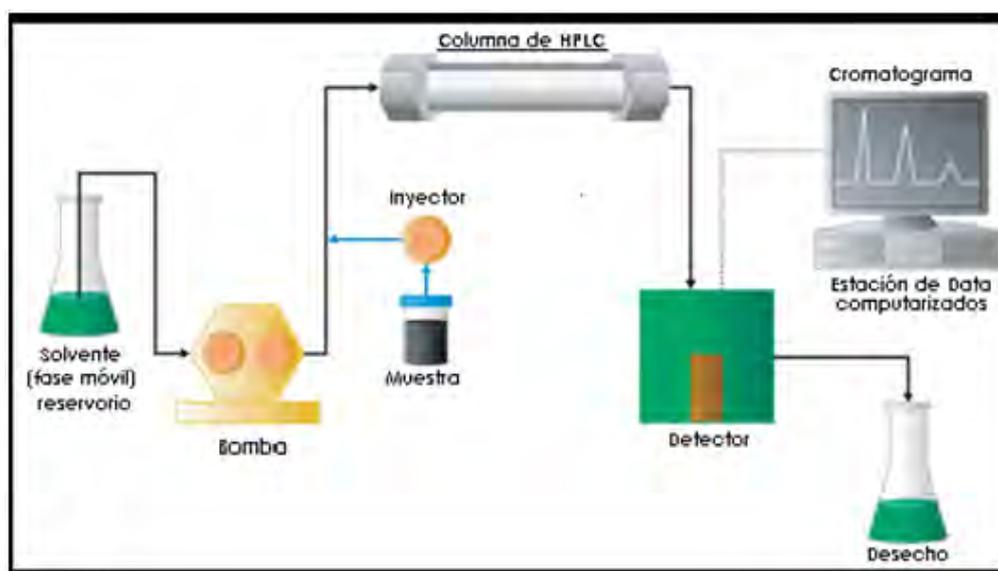
#### 3.2.3. Condiciones cromatográficas adecuadas para determinar el MITC

Se establecieron según lo reportado por Mullins y Kirkbright (1987) y Draper y Wakeham (1993) y se adecuaron al CLAR utilizado durante la investigación. Los resultados se presentan en la Tabla 11.

<b>Tabla 11. Condiciones de operación CLAR</b>	
Fase móvil	50:50 (V/V) CTAB:MeOH a pH 6.8 con Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
Velocidad de flujo	1.4 mL min <sup>-1</sup>
Longitud de onda	247 nm
Detector	Ultravioleta (UV)
Columna	ODS 250 x 150 x 46 mm d.i. Tamaño de partícula de 5 µm
Tiempo de corrida	3 minutos
Volumen de inyección	20 µL

**mm:** Milímetros; **µm:** Micrómetros; **mL:** Mililitros; **µL:** Microlitros; **d.i.:** Diámetro interno; **nm:** nanómetros, **ODS:** Octadecilsilano, **CTAB:** Siglas en inglés para bromuro de hexadeciltrimetilamonio

El equipo de cromatografía de líquidos de alta resolución utilizado fue de la marca Perkin-Elmer empleando una columna Hypersil-ODS 100-5 15 cm de longitud, 4.6 mm de diámetro interno y partículas esféricas de 5  $\mu\text{m}$ . Cuenta con una bomba terciaria la cual suministra la fase móvil según sea el gradiente y flujo necesario; en este caso se llevó a cabo una elución isocrática. Se utilizó un dispositivo de interfase Nelson para el acoplamiento directo entre el detector UV Perkin Elmer y el sistema de cómputo. Un esquema del equipo se presenta en la Fig. 5.



**Fig. 5. Cromatógrafo de líquidos de alta resolución (CLAR) (Aguilera, 2013)**

Es importante mencionar que, en este artículo de referencia, los autores no mencionan condiciones de almacenamiento (tiempo, temperatura, etc.) requeridas para la conversión del MS a *MITC*. Por esta razón, en esta investigación se probaron con las matrices de agua y metanol las condiciones de estudio (temperatura: 25, 2°C; oscuridad, luz), día a día hasta que apareció el pico del *MITC*. Esto ocurrió en el 7º día para ambos casos. Además, con objeto de corroborar la degradación del MS a *MITC* teóricamente se siguieron los experimentos con estas soluciones (agua y metanol) por cinco días más comprobando que se duplicaba la concentración del *MITC* (Anexo 4).

Consecuentemente, para la matriz de jugo de caña ya no se hizo este seguimiento por 7 días más 5 días adicionales sino que solamente se tomaron

los datos de las áreas bajo las curvas obtenidas en los cromatogramas del 7° día, por triplicado. En ese 7° día, considerando los 100 min que, con base en la tesis precedente (Arvizu y Ramos, 2010), ya no había MS porque todo se había degradado, se tomaron muestras cada 20 min y se inyectaron al cromatógrafo para ir viendo en forma objetiva la descomposición del *MITC* hasta su desaparición. En esta investigación no se identificaron ni cuantificaron estos compuestos de degradación del *MITC*, ya que constituyen un nuevo trabajo experimental.

#### **3.2.4. Tiempo de retención ( $t_R$ )**

Al tener las condiciones cromatográficas adecuadas, se procedió a la determinación del tiempo de retención ( $t_R$ ) del estándar. Para ello fue necesario inyectar mediante una jeringa de vidrio Hamilton de capacidad de 100  $\mu\text{L}$  un volumen de 20  $\mu\text{L}$ , tanto para el agua como para el metanol, determinando los tiempos de elución y las posibles interferencias. El pico fue identificado así como su tiempo de retención. Para confirmar dicho resultado es necesario inyectar la solución a diferentes concentraciones.

#### **3.2.5. Límites de detección ( $L_d$ )**

Para determinar la concentración mínima detectable del *MITC* se inyectó a una concentración inicial de 50  $\text{mg L}^{-1}$  y, paulatinamente, se fue disminuyendo hasta que el área bajo la curva fuera tres veces más grande que el ruido de fondo.

#### **3.2.6. Elaboración del diseño experimental**

La formación del *MITC* en las dos matrices (agua y metanol), fue evaluada durante 5 días (Tabla 12), bajo los factores de temperatura, luz y oscuridad, dando como resultado un diseño factorial de  $5^1 \cdot 2^3$  con un total de 40 muestras, las cuales fueron inyectadas por triplicado. Esto dio 120 muestras por matriz, para que los resultados fueran estadísticamente representativos.

Para este diseño experimental, en agua y metanol, aunque para evaluar la formación del *MITC* a partir de la degradación del MS se estudiaron 7 días para que apareciera el pico del *MITC*, se siguieron las inyecciones al

cromatógrafo por 5 días adicionales, los cuales fueron los considerados para evaluar las constantes de velocidad de formación del *MITC*.

Tabla 12. Diseño experimental					
Factores	Niveles				
Tiempo (días)	1	2	3	4	5
Matriz	Agua	Metanol			
Fotólisis	Luz	Oscuridad			
Temperatura (°C)	2	25			

### 3.2.7. Cuantificación del *MITC*

Ésta se realizó mediante curvas de calibración previamente elaboradas bajo las condiciones de trabajo. Se realizaron tres curvas de calibración, en agua, en metanol y en jugo de caña, donde se inyectaron diez diferentes concentraciones del estándar. Estas concentraciones fueron consecutivas y hechas a partir de la solución de 50 mg L<sup>-1</sup> que se obtuvo de la descomposición del MS. Con ella, se diluyeron con la matriz correspondiente, las muestras que se inyectaron como sigue:

El grupo de concentraciones inyectadas para las tres matrices fueron de 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23 y 25 mg L<sup>-1</sup>. Cada una se inyectó por triplicado y la concentración del punto medio (15 mg L<sup>-1</sup>), se inyectó cinco veces. Con esto se puede observar la reproducibilidad de cada inyección.

Antes de realizar la curva de calibración en jugo de caña, éste se centrifuga a 4000 rpm por 15 minutos y se filtra con una membrana de *Nylon* de 0.45 µm, almacenando el filtrado a 2°C. Se preparan las disoluciones de cada punto de la curva en el momento de la inyección con el jugo filtrado a partir de la solución madre. De igual forma que en las dos matrices anteriores cada punto se inyecta 3 veces, excepto el punto medio (15 mg L<sup>-1</sup>) que se inyecta 5 veces. Con la regresión lineal se comprueba la linealidad de la recta, indicando el coeficiente de correlación. Del mismo modo, se obtiene de la ecuación los valores de pendiente (m) y de la ordenada al origen (b), que sirven para calcular la concentración del *MITC* en la matriz de jugo de caña.

**Nota:** Debido a que se partió de una solución madre de MS fue necesario preparar las soluciones con 7 días de anticipación para asegurar que el *MITC* estuviera presente en solución.

### **3.2.8. Precisión**

De la disolución de  $15 \text{ mg L}^{-1}$  preparada para la realización de la curva de calibración se hicieron inyecciones consecutivas de  $20 \mu\text{L}$ . Con los resultados obtenidos se prosiguió a hacer un análisis estadístico para calcular tales parámetros.

### **3.2.9. Determinación de la vida media del MITC en agua y metanol**

Inicialmente, se calcula la concentración de MITC de acuerdo al área bajo la curva durante los cinco días de inyección con respecto de la concentración inicial de MS. Estos valores son graficados con respecto al tiempo. Al graficar el  $\ln(C_f/C_0)$  vs. tiempo y aplicando el análisis de regresión lineal se obtiene una pendiente que es equivalente a la constante de la velocidad o rapidez de formación ( $k$ ), en  $\text{d}^{-1}$ , del MITC.

Con la constante cinética de formación, se calcula el tiempo que se necesita para la degradación completa del MITC. Para ello se realiza una gráfica del  $\ln C_f$  vs.  $(\ln C_0 - kt)$ , donde la variable independiente es el tiempo ( $\ln C_0$  es la ordenada al origen y  $-k$  es la pendiente). Después se calcula el tiempo de vida media ( $t_{1/2}$ ), que equivale al valor de  $\ln 2$  entre la constante de velocidad de formación ( $k$ ).

### **3.2.10. Tratamiento de la muestra**

La caña de azúcar empleada en esta experimentación fue obtenida en un mercado público. Fue recolectada en el mes de enero del 2013. Las cañas de azúcar se almacenaron en refrigeración a  $2^\circ\text{C}$ , envueltas en papel tipo *kraft* dentro de una bolsa de plástico sellada herméticamente.

Después del almacenamiento de la caña de azúcar se realizó la extracción del jugo para realizar las determinaciones correspondientes con un extractor marca Moulinex tipo casero. El jugo se recolecta en un frasco de vidrio Duran de  $50 \text{ mL}$  y se conserva en refrigeración hasta su utilización.

### **3.2.11. Cinética de degradación del *MITC* en jugo de caña**

Se prepara una muestra de jugo de caña filtrado adicionada con *MITC* para tener una concentración de  $50 \text{ mg L}^{-1}$ . Se inyecta una muestra cada 20 minutos bajo las condiciones planteadas en el diseño experimental hasta que ya no se presente el pico del compuesto en el detector. El área bajo la curva de cada inyección se cuantifica mediante la curva de calibración para jugo de caña realizada en el punto 3.4.5, obteniendo así la concentración de cada punto de la muestra.

Al graficar el logaritmo natural de la concentración ( $C_f$ ) entre la concentración inicial ( $C_0$ ) contra el tiempo y aplicando el análisis de regresión lineal se obtiene la pendiente que es equivalente a la constante de la velocidad de degradación del *MITC* presente en el jugo de caña bajo el diseño experimental planteado en el punto 3.2.6. Después se calcula el tiempo de vida media ( $t_{1/2}$ ).

### **3.2.12. Extracción Líquido-Líquido (ELL) del jugo de caña**

Se toman 10 mL de la muestra de jugo de caña adicionada con el plaguicida en estudio; posteriormente, fueron agregados 10 mL de metanol grado cromatográfico; la muestra fue sometida a un baño ultrasónico durante 10 minutos, antes de ser centrifugada a 4000 rpm por 15 minutos. Finalmente, la muestra es filtrada utilizando una membrana *Nylon* de  $0.45 \mu\text{m}$ . Ésta fue inyectada en el cromatógrafo de líquidos por triplicado (Arvizu y Ramos, 2010).

### **3.2.13. Porcentaje de recobro (%R)**

Se determinó en la extracción del jugo de caña con la adición del MS después de que se dejó en las diferentes etapas durante 7 días para permitir su descomposición a *MITC* a una temperatura controlada de  $2^\circ\text{C}$  (refrigeración) y oscuridad. El porcentaje de recobro del *MITC* se cuantificó al aplicar una solución madre del plaguicida MS en las diferentes etapas de la ELL, como se presenta en la Tabla 13. Este tiempo de 7 días se obtuvo tomando como base lo mencionado para agua y metanol, ya que en pruebas preliminares (cada día) se encontró en los cromatogramas que no aparecía el pico del *MITC*, sino hasta el séptimo día (inciso 3.2.6).

La concentración original al tiempo cero del MS era de 50 mg L<sup>-1</sup> en la solución madre. Se supuso que después de 7 días ésta se habría descompuesto completamente, de acuerdo con la ecuación de la Figura 3 del Capítulo II.

<b>Tabla 13. Condiciones de la ELL para calcular el recobro de MITC</b>					
<b>Etapas</b>	<b>Blanco</b>	<b>AP1</b>	<b>AP2</b>	<b>AP3</b>	<b>AP4</b>
1. Extracción del jugo de caña	√	AP1	√	√	√
2. Baño ultrasónico durante 10 min	√	√	AP2	√	√
3. Centrifuga a 400 rpm y 10°C	√	√	√	AP3	√
4. Filtración con un acrodisco	√	√	√	√	AP4
5. Muestra lista para inyectar	√	√	√	√	√

Se aplicaron 3 mL de esta solución madre a 7 mL del jugo de caña

**Blanco:** Jugo de caña sin adición de plaguicida; **AP1:** Adición del plaguicida inmediatamente después de la extracción del jugo; **AP2:** Adición del plaguicida después del baño ultrasónico del jugo; **AP3:** Adición del plaguicida después de la centrifugación; **AP4:** Adición del plaguicida después de la filtración

**Nota:** Es considerada la muestra AP4 como el 100% de recobro del plaguicida, ya que no hay un proceso externo que teóricamente lo afecte

### 3.2.14. Análisis estadístico

Se realiza el análisis de la media, la desviación estándar y el porcentaje del coeficiente de variación para cada factor del diseño experimental, con el fin de determinar si existe diferencia significativa en la degradación del MITC bajo los diferentes parámetros. En el Anexo 4 se muestra el análisis de los resultados obtenidos en cada una de las matrices (agua, metanol y jugo de caña) en esta investigación.

### 3.3. Equipo

Las características del equipo de cromatografía utilizado durante esta investigación se presentan en la Tabla 14.

### 3.4 Reactivos

En la Tabla 15 se presentan los reactivos utilizados para la preparación de la fase móvil y la solución madre utilizada durante la investigación.

<b>Tabla 14. Equipo utilizado en la metodología</b>	
<b>Equipo</b>	<b>Especificaciones</b>
Cromatógrafo de líquidos con bomba terciaria	Modelo 250 Perkin Elmer
Interfase	PE Nelson Series 900
Detector de índice de UV	Perkin Elmer 785 <sup>a</sup>
Software de control y procesamiento de datos	Varian Star Workstation, versión 4.5 1989-1990, Varian Associates. Inc
Columna analítica de acero inoxidable	Thermo Hypersil-key ODS 250 x 150 x 46 mm d.i. Tamaño de partícula de 5 µm
Jeringa Hamilton	Capacidad de 0-100 µL Hamilton 81065, 1710RNR SYR(22S/2"/3), REVD, Lot#449139, 8/10/11
Equipo Millipore	Millipore Glass 47 mm Filter Holder XX1004700, Teflon®-faced Glass 47 mm Filter Holder XX1004720, Stainless Screen Glass 47 mm Filter Holder XX1004730
Membrana de filtración	Titan 47 mm, Material: Nylon Tamaño de poro de 0.20 µm
Baño ultrasónico para desgasificar soluciones y fase móvil	Bransonic Mod. 3210, 0-60 Hz
Micro pipeta Transferpette	Capacidad de 100-1000 µL
Micro pipeta Transferpette	Capacidad de de 10-100 µL
Balanza Analítica Mettler Toledo	Mod. AG-245 0-200 g.
Kit de viales	Viales de vidrio con tapa de silicón de 8 mm y capacidad de 2.0 mL
Frascos de vidrio	Duran de 250 mL, 500 mL y 1000 mL de capacidad
Potenciómetro	Thermo Electron Corporation Orion 720A+ advanced ISE/pH/mV/ORP
Centrifuga	Eppendorf 5810R
Horno Felisa	Modelo F-293D Temperatura (0 -250°C)

mm: Milímetros; d.i.: Diámetro interno; µm: Micrómetros; mL: Mililitros; Hz: Hertz

Tabla 15. Reactivos utilizados en la metodología	
Equipo	Especificaciones
Agua de alta pureza grado cromatográfico	J.T Baker: Agua de alta pureza y estéril para la preparación de reactivos analíticos, para emplearse en equipos de alta precisión (HPLC, Absorción atómica, UV), como blanco en análisis de agua, para calibrar instrumentos de alta precisión, resistencia eléctrica 18 MΩ en SiO <sub>2</sub> < 3 ppb, TOC < 50 ppb, Na 1 ppb, Cl ppm, longitud de onda 220 nm < 0.001
Metanol	J.T Baker: CH <sub>3</sub> OH (by GC, Corrected for Water) 99.97%, Ultraviolet Absorbance (1.00 cm cell vs water) 400-254 nm (0.003), 225 nm (0.110), UV cut-off, nm 204.5, gradient elution test (a·v) 254 nm (0.001), Fluorescence trace impurities, in ppb measured us quinine base: at 450 nm emission 0.05 at emission maximum of impurities 0.07, acetone 0.001%, residue after evaporation 0.5 ppm, titrable acid (μeq/g) 0.30 titrable base (μeq/g) 0.04, water (by KF, coulometric) 0.02%
CTAB	Bromuro de hexadeciltrimetilamonio Pureza 99 % Sigma-Aldrich, lot-050M01711V
Metam-sodio	Chem service 250 mg, purity 99.5%, lot: 452-33B, Stench
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> anhidro	Producto químicos Monterrey; pureza: 84.1%
Jabón Dextrán	MA03, Merck lot# 8015, exento de fosfatos, concentrado detergente líquido para lavado manual. Hycil-Plus de Hycel de México S.A. de C.V.
HNO <sub>3</sub>	J.T Baker: PM 63.01 ensayo 65.4%
Agua desionizada	Suministrada por el Lab. 204 del Departamento de Bioquímica

nm: nanómetros; mg: miligramos, ppm: partes por millón (mg L<sup>-1</sup>), μeq: microequivalentes

## Capítulo IV Resultados y discusión

### 4.1. Determinación de las mejores condiciones cromatográficas

Como se mencionó, existen diferentes metodologías para la identificación y cuantificación del *MITC*. Las condiciones cromatográficas que se tomaron como referencia para este proyecto fueron las propuestas por Mullins y Kirkbright (1987) y Draper y Wakeham (1993). Como las condiciones analíticas existentes eran diferentes, se modificaron para poder analizar el *MITC* con la instrumentación disponible en el laboratorio. En la Tabla 11 del capítulo anterior se presentaron las condiciones bajo las cuales se llevó a cabo la metodología investigada, tomando en cuenta las propiedades físico-químicas del *MITC* (Punto 2.7). Algunas de estas son la masa molecular, polaridad, solubilidad, así como la densidad y reactividad química.

#### 4.1.1. Tiempo de retención del *MITC*

Al seleccionar las condiciones cromatográficas adecuadas para esta investigación, se logró identificar al plaguicida en estudio en las tres diferentes matrices estudiadas (agua, metanol y jugo de caña), así como determinar su tiempo de retención ( $t_r$ ). El pico que corresponde al *MITC* se observó a los 2.5 minutos en la matriz agua, 2.45 minutos en metanol y 2.3 minutos en jugo de caña. En la Fig. 6 se presenta el cromatograma del compuesto en agua. Se tomaron como comparación los resultados obtenidos por Mullins y Kirkbright (1987), donde reportan que el primer compuesto en salir era el *MITC* y, posteriormente, el MS.

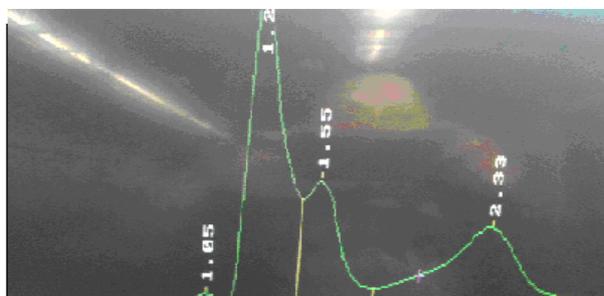


Fig. 6. Cromatograma del *MITC* en agua; Columna: Hypersil SA 150 x 4.6 mm (5 $\mu$ m); fase móvil: CTAB a un pH= 6.8; flujo: 1.4 mL min<sup>-1</sup>; volumen de inyección: 20  $\mu$ L; detector: UV a  $\lambda$  247 nm

#### 4.1.2. Límites de detección

Como ya se mencionó en el capítulo anterior, para determinar el límite de detección obtenido en el CLAR con detector de UV se partió de una concentración de 50 mg L<sup>-1</sup> hasta llegar a una concentración de 6 mg L<sup>-1</sup>, siendo ésta la mínima concentración detectada. De ésta se parte para realizar las correspondientes curvas de calibración en las tres diferentes matrices.

#### 4.2 Curvas de calibración en metanol, agua y jugo de caña

Para realizar la cuantificación se hicieron 3 curvas de calibración del plaguicida en las tres diferentes matrices: metanol, agua y jugo de caña, con concentraciones que van de 7 a 25 mg L<sup>-1</sup>. Los valores se presentan en la Tabla 16, tanto para la pendiente (*m*), como para la ordenada al origen (*b*) y el coeficiente de correlación lineal (*R*<sup>2</sup>). En el Anexo 1 se presentan las 3 curvas de calibración del producto de reacción en estudio del plaguicida para las 3 matrices.

<b>Tabla 16. Coeficientes de las curvas de calibración en metanol, agua y jugo de caña</b>			
<i>y=mx+b</i>	Pendiente	Ordenada al origen	Coeficiente de correlación
	( <i>m</i> )	( <i>b</i> )	( <i>R</i> <sup>2</sup> )
Matriz			
Agua	197.64±171.8	200.24±27.69	0.9926
Metanol	46.93±465	-10.751±74	0.9965
Jugo de caña	2125.1±1420	-6121.8±1269	0.9930

*y*: Área bajo la curva; *x*: Concentración; *m*: Pendiente; *b*: Ordenada al origen; *R*<sup>2</sup>: Coeficiente de correlación

#### 4.3. Precisión

En la Tabla 17 se presentan los valores de la media (*X*), desviación estándar (*S*) y coeficiente de variación (*CV*), obtenidos de las áreas del pico correspondientes a la concentración de 15 mg L<sup>-1</sup> para cada curva de calibración, el cual corresponde al punto medio de la curva. Los coeficientes de variación están entre 0.109 y 0.023 considerados adecuados para el análisis de trazas de contaminantes (Unión Europea, 2009).

Tabla 17. Valores de media, desviación estándar y coeficiente de variación del punto medio de cada curva de calibración			
Matriz	Media (X)	Desviación estándar (S)	Coeficiente de variación (CV)
Agua	3447.4114	375.9445	0.1090
Metanol	1128.5958	222.0367	0.1967
Jugo de caña	15744.8	3.18	0.023

X: Media; S: Desviación estándar; CV: Coeficiente de variación

#### 4.4. Determinación de la constante de velocidad de formación (k)

Como ya se mencionó anteriormente, para conocer la influencia de los parámetros seleccionados se calcula la constante de la velocidad de formación, que es el valor de la pendiente que se obtiene al graficar el  $\ln(C_f/C_0)$  vs tiempo. En el Anexo 2 se encuentran las gráficas de la cinética de formación del MITC bajo las diferentes condiciones que se estudian: luz, oscuridad, temperaturas (2 y 25°C), matriz (agua y metanol). Con la constante cinética de formación (k), se determinó la concentración inicial ( $C_0$ ) y la concentración final ( $C_f$ ) y se realizó una gráfica de  $\ln C_1$  vs  $(\ln C_0 - kt)$  donde la variable independiente es el tiempo en el que tardó en desaparecer el compuesto. Se llevó a cabo durante 5 días bajo el diseño experimental planteado en la Tabla 12 del capítulo sobre metodología. En la Tabla 18 se muestran los resultados de la vida media ( $t_{1/2}$ ) del MITC en las dos matrices bajo diferentes condiciones.

Tabla 18. Formación del MITC en cada combinación del diseño experimental

Condición	Agua			Metanol		
	k (días <sup>-1</sup> )	$t_{1/2}$ (días)	$t_d$ (días)	k (días <sup>-1</sup> )	$t_{1/2}$ (días)	$t_d$ (días)
Luz, T=25°C	<b>0.43</b>	<b>1.63</b>	<b>7.86</b>	<b>0.65</b>	<b>1.07</b>	<b>5.52</b>
Oscuridad, T=25°C	0.26	2.68	12.91	0.56	1.23	6.37
Luz, T=2°C	0.17	4.08	19.68	0.17	4.06	20.97
Oscuridad, T=2°C	0.14	4.99	24.05	0.07	10.61	54.77

K: Velocidad de degradación;  $t_{1/2}$ : Tiempo de vida media,  $t_d$ : tiempo en que tarda el compuesto (MITC) en desaparecer

#### **4.4.1. Determinación de la constante de velocidad de formación ( $k$ ) en agua**

Los resultados de la constante de velocidad de formación ( $k$ ) en la matriz agua varían desde 0.14 a 0.43 días<sup>-1</sup>, encontrando el valor de la constante más baja a 2°C con oscuridad y obteniendo un  $t_{1/2}$  de 4.99 días. El valor más alto de la constante de la velocidad de formación se dio en las condiciones de 25°C con luz, con un  $t_{1/2}$  de 1.63 días.

Esto indica que el factor de oscuridad afecta en menor proporción la formación del *MITC*, ya que a temperaturas bajas la difusión del plaguicida es muy limitada mientras que al aumentar la temperatura incrementa la velocidad de formación de 0.14 a 0.43 días<sup>-1</sup>.

#### **4.4.2. Determinación de la constante de velocidad de formación ( $k$ ) en metanol**

Por otra parte, los resultados de la constante ( $k$ ) en la matriz de metanol varían de 0.07días<sup>-1</sup> a 0.65 días<sup>-1</sup>, teniendo el mayor valor de  $k$ , en la matriz que fue sometida a una temperatura de 25°C bajo condiciones de luz, obteniendo un tiempo de vida media  $t_{1/2}$  de 1.07 días. La  $k$  más pequeña fue para la condición que estuvo a una temperatura de 2°C, en oscuridad, con un tiempo de vida media  $t_{1/2}$  de 10.61 días.

Con base a los resultados obtenidos y a la reacción planteada en la Figura 1, al poner en contacto al plaguicida (MS) en las dos matrices en condiciones neutras se obtienen como principales productos de degradación al *MITC* y al hidrogenosulfuro de sodio (NaSH). Se observa que la solución madre preparada en agua se degrada mayormente debido a que sufre hidrólisis, por lo que la velocidad de formación del *MITC* es menor en comparación con la obtenida en matriz metanol, donde el *MITC* se forma con una mayor velocidad.

En comparación con los valores de la ficha técnica de la vida media del *MITC* en agua que se presentan en la Tabla 9; a un pH de 7 el *MITC* sufre hidrólisis con un tiempo de vida media ( $t_{1/2}$ ) teórico de 65 a 178 días a pH 7, de 0.7 a 10 días a pH 10 y de 15 a 67 días a pH 5 (Wales, 2002). Los valores obtenidos en

esta experimentación son menores, ya que van de 1.63 a 4.99 días a pH de 6.8 lo que quiere decir que hay una mayor degradación debido a que la preparación de la solución madre se realizó en agua grado cromatográfico (°HPLC). Por lo tanto, de acuerdo con lo consultado en la literatura, si el compuesto se encuentra en un medio básico habrá una mayor degradación del MS que en un medio ácido, además de que la temperatura es otro factor que debe tomarse en cuenta.

#### 4.5. Determinación de la constante de velocidad de degradación (*k*) en jugo de caña

En el estudio de la determinación de la velocidad de degradación del *MITC* en la muestra real (jugo de caña) se obtuvieron resultados a partir del minuto 100, debido a que según Arvizu y Ramos (2010), ya se tiene la degradación completa del MS y se forman los productos de degradación, siendo el importante en esta investigación el *MITC*. En el Anexo 4 se muestran los valores obtenidos de la degradación del *MITC* en la muestra real bajo las condiciones estudiadas. La Tabla 19 presenta los valores obtenidos a partir de estos datos para la constante de rapidez de degradación del *MITC*, su tiempo de vida media ( $t_{1/2}$ ) y el tiempo que tardó en desaparecer ( $t_d$ ).

**Tabla 19. Degradación del *MITC* en jugo de caña**

Condición	Jugo de caña		
	$k$ (min <sup>-1</sup> )	$t_{1/2}$ (min)	$t_d$ (min)
<b>Luz, T=25°C</b>	<b>0.0364</b>	<b>19.04</b>	<b>79.24</b>
<b>Oscuridad, T=25°C</b>	0.0134	51.73	215.34
<b>Luz, T=2°C</b>	0.0074	93.67	389.77
<b>Oscuridad, T=2°C</b>	0.0054	128.36	534.12

*K*: Velocidad de degradación;  $t_{1/2}$ : Tiempo de vida media,  $t_d$ : tiempo en que tarda el compuesto (*MITC*) en desaparecer

Con los datos del estudio de la cinética de degradación del *MITC* en el jugo de caña se obtuvo la constante de velocidad de degradación más baja en la condición de oscuridad a una temperatura de 2°C con un tiempo de vida media  $t_{1/2}$  de 128.36 minutos; mientras que la muestra que fue sometida a una temperatura de 25°C en condiciones de fotólisis el valor de tiempo de vida media  $t_{1/2}$  fue de 19.04 minutos. Esto es debido que a mayor temperatura hay

una aceleración de la degradación del compuesto original (MS), además de que, en condiciones ácidas debido al pH del jugo, se produce una reacción no oxidativa así como reacciones enzimáticas de biodegradación y oxidación propias del jugo, que dan como productos de degradación al MITC, al sulfuro de sodio (Na<sub>2</sub>S), sulfuro de carbono (CS<sub>2</sub>) y metilamina (CH<sub>3</sub>NH<sub>2</sub>). Tal vez inicialmente se produzca la mitad del MITC debido a la estequiometría de la reacción:

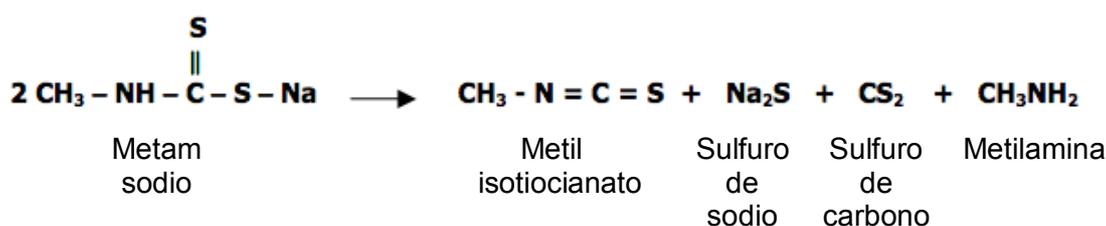


Fig. 3. Reacción de degradación de MS en soluciones ácidas (LAINCO, 2010)

#### 4.6 Porcentaje de recobro (%R) del MITC

En la ELL se observó que el cambio de pasos (Tabla 13 del capítulo anterior) disminuye el porcentaje de recobro de acuerdo con los pasos seguidos tomando las muestras después de 7 días de reposo en refrigeración, considerando que en este tiempo se había descompuesto el MS en MITC (Blanco, AP1, AP2, AP3, AP4). En la Tabla 20 se presentan los resultados de acuerdo con las diferentes condiciones de ELL.

Tabla 20. Porcentaje de recobro

Condición	Paso	% Recobro
Blanco	Jugo de caña sin adición de plaguicida	-
AP1	Adición del plaguicida inmediatamente después de la extracción del jugo	21.71±19.67 <sup>a</sup>
AP2	Adición del plaguicida después del baño ultrasónico del jugo	61.38±5.35 <sup>a</sup>
AP3	Adición del plaguicida después de la centrifugación	75.44±2.66 <sup>a</sup>
AP4	Adición del plaguicida después de la filtración	100

Concentración de la solución madre adicionada, 50 mg L<sup>-1</sup> (3 mL) + 7mL matriz: 15 mg L<sup>-1</sup> plaguicida

<sup>a</sup> valor promedio ± %CV (n=3)

La condición 4 se toma como el 100% de la concentración del *MITC* en la extracción líquido-líquido del plaguicida en el jugo de caña, debido a que en los pasos realizados no se pierde parte del compuesto ya que éste es adicionado hasta el final; por lo que se compara con las demás condiciones en donde el plaguicida fue agregado en diferentes pasos de la extracción. De esta manera se obtuvo en la condición 1 el porcentaje de recobro más grande ya que la pérdida del compuesto es del 78.29% con un coeficiente de variación del 19.67%, seguido de la condición 2 con un porcentaje de 38.62% con coeficiente de variación del 5.35% y, por último, la condición 3 con un porcentaje de 24.56% con coeficiente de variación del 2.66%.

Esto indicaría que este tipo de extracción no es conveniente para la determinación del producto de degradación del plaguicida MS (*MITC*) ya que si éste se encuentra en concentraciones bajas, alrededor de  $6 \text{ mg L}^{-1}$ , la pérdida durante la extracción será considerable. Por lo tanto, no será posible la detección del *MITC* por cromatografía de líquidos de alta resolución, siendo éste un método sensible a concentraciones bajas. Por lo tanto, se recomienda buscar en una continuación de esta investigación, otra metodología para llevar a cabo la extracción del *MITC* que no afecte el recobro del compuesto a estas concentraciones tan bajas. Como en esta investigación la concentración estudiada fue de  $50 \text{ mg L}^{-1}$  no se tuvo este problema.

#### **4.7. Análisis estadístico de la influencia de los factores en la degradación**

Para analizar los factores que influyen en la degradación del plaguicida en las matrices de agua y metanol, se realizó un diseño factorial multinivel con 5 factores experimentales y un número de bloques de 2, los cuales dan un número de 120 datos de corridas de la muestra.

Para el análisis estadístico se llevó a cabo un análisis de varianza (ANDEVA) y como resultado se obtuvo que hay diferencia significativa entre los factores de matriz, fotólisis, temperatura, pH de la matriz y tiempo; así como para las interacciones de matriz-pH (AD), matriz-tiempo (AE), fotólisis-temperaturas (BC), fotólisis-pH (BD), fotólisis-tiempo (BE), temperatura-tiempo (CE) y pH-tiempo (DE), con un nivel de confianza del 95.0%. En la Tabla 21 se presentan

los valores de la contribución porcentual de los factores en la formación del compuesto de interés y las interacciones que presentan diferencia significativa.

Se observa que el factor de mayor influencia en el comportamiento de la formación del plaguicida es el tiempo con una contribución porcentual del 37.1%, seguida del factor matriz con una contribución porcentual del 29.05% y, finalmente, el pH con una contribución del 5.34%. Mediante estos resultados se puede estimar que la degradación del plaguicida MS a MITC es mayor en una matriz de agua, expuesto a luz y a un pH de 6.1.

**Tabla 21. Contribución porcentual de los 5 factores en la degradación del plaguicida**

Factores	Contribución porcentual
Matriz: A	29.05%
Fotólisis: B	2.45%
Temperatura: C	3.88%
pH: D	5.34%
Tiempo: E	37.12%
AD	1.47%
AE	1.51%
BC	0.66%
BD	1.25%
BE	0.62%
CE	1.17%
DE	0.87%

## Capítulo V Conclusiones y perspectivas

Con base en las hipótesis planteadas, que eran: La primera hipótesis de que el metam sodio (MS) se descompone a las condiciones en estudio en isotiocianato de metilo o metil isotiocianato (*MITC*) y la segunda de que el isotiocianato de metilo (*MITC*) se ve afectado por los siguientes factores: fotólisis, temperatura y matriz en la que se encuentra, provocando que la vida media del compuesto dependa de dichos factores, se puede concluir que ambas hipótesis se cumplieron.

Respecto de los objetivos generales y los particulares de esta investigación, siendo los generales: Determinar la degradación del MS, plaguicida usado en el proceso de elaboración de azúcar de caña, a *MITC* como principal producto de su degradación, mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) y determinar el efecto de dos diferentes condiciones de laboratorio, temperatura (con dos niveles), fotólisis (luz y oscuridad) y el efecto de la matriz (agua, metanol, jugo de caña) en la degradación del *MITC* y los particulares: Proponer e implementar una metodología analítica mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR), que permita determinar y cuantificar el isotiocianato de metilo o metil isotiocianato (*MITC*) formado por la descomposición del metam sodio (MS), elaborar curvas de calibración en matrices de agua, metanol y jugo de caña, evaluar la vida media del *MITC* bajo las condiciones planteadas, determinar la velocidad de formación del *MITC* partiendo de la degradación del MS en medio ácido y neutro bajo diferentes condiciones de proceso: luz, oscuridad, temperatura y matriz (agua y metanol) y aplicar esta metodología en una matriz real de jugo de caña de azúcar, puede concluirse lo siguiente:

- ❖ Es posible decir que el método propuesto (CLAR) representa una buena alternativa para la identificación y cuantificación del *MITC* en el jugo de caña formado a partir de la descomposición del MS y, de igual forma, ofrece importantes posibilidades para ser utilizada para diversos alimentos, además del jugo de caña.

- ❖ Con base a la revisión bibliográfica realizada, la metodología propuesta por Waggott y colaboradores (1988), es necesario complementarla con lo mencionado por Draper y Wakeham (1993) y, finalmente, adaptarla a las condiciones del equipo utilizado, igual que lo realizaron Mullins y Kirkbright (1987). Con estas referencias se pudieron obtener las mejores condiciones para trabajar en esta investigación, a pesar de que es necesario optimizar el método para disminuir los límites de detección del compuesto de interés.
- ❖ Las condiciones en las que el *MITC* sufre una mayor degradación, de las dos matrices agua y metanol, son: temperatura 25°C en presencia de luz para la matriz de agua, obteniendo una vida media de 1.63 días, debido a que se llevan a cabo reacciones de hidrólisis (LAINCO, 2010).
- ❖ En el estudio que se llevó en el jugo de caña, la condición que presenta mayor afectación es la muestra que fue sometida a una temperatura de 25°C en condiciones de luz, con un valor de tiempo de vida media  $t_{1/2}$  de 19.04 minutos.
- ❖ En cuanto a las curvas de calibración, se obtuvieron los siguientes coeficientes de correlación y coeficientes de variación respectivamente: para las curvas de calibración: En agua fueron de 0.996 y 0.1090, en metanol de 0.9736 y 0.1967, Para la curva de calibración jugo de caña fueron de 0.9907 y 0.023, los cuales se consideran adecuados para las concentraciones a las cuales se están trabajando.
- ❖ Los porcentajes de recobro resultaron bajos, siendo el mínimo de 21.71% mediante la ELL, ya que se pierde un 78% aproximadamente del plaguicida durante todo el proceso de extracción.
- ❖ El objetivo de la investigación se logró como primera fase para el desarrollo del proyecto global, que constituye la determinación y seguimiento del *MITC* en el jugo de caña que se extrae en el proceso de elaboración de azúcar.

## Perspectivas

De acuerdo con los resultados obtenidos en esta investigación, es importante darle seguimiento a los siguientes puntos:

- ❖ Debido a los resultados obtenidos en el % de recobro se considera que la metodología de extracción líquido-líquido (ELL) no fue óptima, por lo que sería conveniente continuar con la investigación bibliográfica para encontrar o determinar una nueva metodología en la cual no se pierda el *MITC* producto de la descomposición del plaguicida MS durante este proceso.
- ❖ La etapa siguiente de esta investigación sería la identificación y cuantificación de los productos de descomposición del *MITC* usando éste como reactivo analítico adicionándolo a las tres matrices estudiadas y definiendo si estos productos ya son inocuos.
- ❖ Actualmente, el uso del ditiocarbamato es común en México ya que está permitido en otros países a concentraciones pre-establecidas. Sin embargo, no se encontraron en la literatura consultada datos sobre regulaciones para el *MITC*, aunque sí hay para el CS<sub>2</sub> (Codex Alimentarius, 2013). Esto haría aún más interesante la continuación de esta investigación definiendo los compuestos en los que se degrada y su inocuidad.
- ❖ Por último, sería importante realizar los estudios correspondientes así como los ensayos biológicos adecuados para determinar si existe algún riesgo para la salud al ingerir alimentos que estuvieron en contacto con el plaguicida o bien con los productos de la degradación de éste con muestras reales de jugo de caña de un ingenio azucarero cooperante. Naturalmente, este estudio sería costoso pero sus resultados serían fehacientes para garantizar la inocuidad del MS.

## BIBLIOGRAFÍA

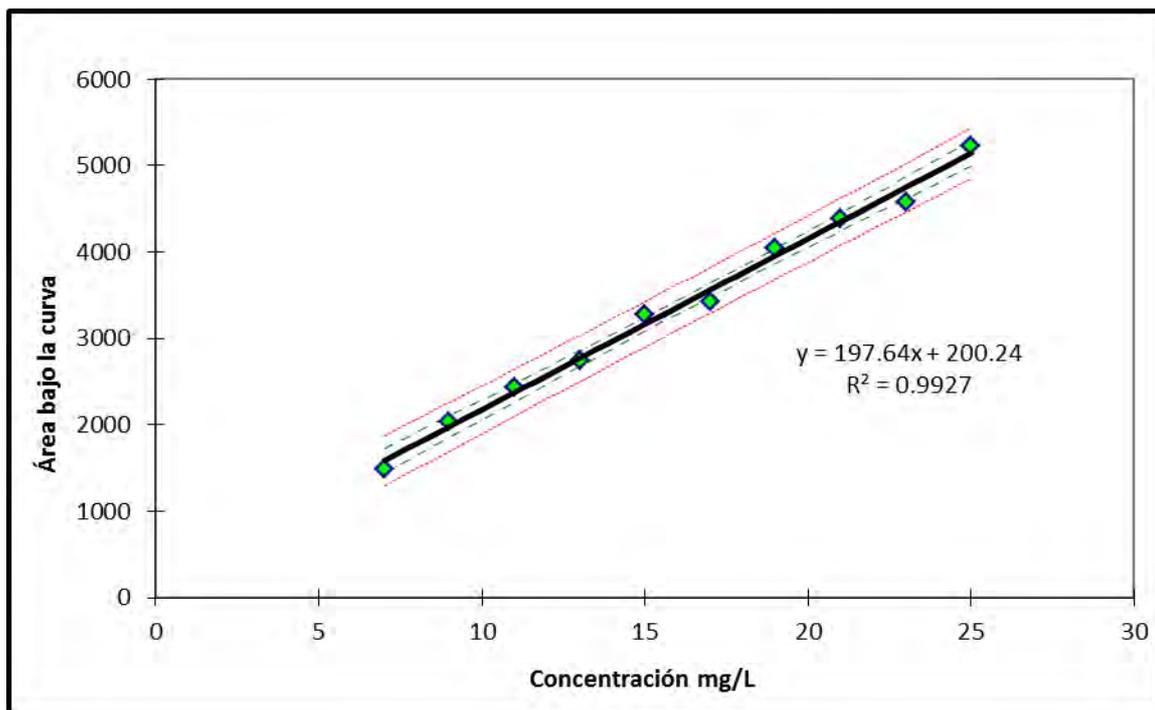
- Achipsa. (2011). Agencia Chilena para la Calidad e Inocuidad Alimentaria Dirección electrónica (consultada el 23 de junio de 2013).  
[http://www.achipsa.cl/prontus\\_achipsa/site/artic/20111118/asocfile/2011118150545/pni\\_plaguicidas\\_2011\\_10\\_26.pdf](http://www.achipsa.cl/prontus_achipsa/site/artic/20111118/asocfile/2011118150545/pni_plaguicidas_2011_10_26.pdf)
- Aguilera, R. (2013). La hemoglobina glicosilada, una prueba para el seguimiento y control en diabetes mellitus. Dirección electrónica (consultada el 25 de julio de 2013).  
<http://bioquiwik1.wikispaces.com/La+hemoglobina+glicosilada>
- Arvizu, D. y Ramos, J. (2010). Degradación del ditiocarbamato de sodio usado como plaguicida en el proceso de elaboración de azúcar en México mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR). Tesis de licenciatura. Facultad de Química, Laboratorios de Ingeniería Química Ambiental y de Química Ambiental. Universidad Nacional Autónoma de México. D.F. México. 95 págs.
- Blanco, B. O. (1995). Implementación del test de rezasurina como prueba rápida para estimar el número de microorganismos presentes en el jugo de caña. Informe de Tesis. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de Guatemala. Guatemala, Guatemala. 32 págs.
- Blasco, C., Font, G., Picó, Y. (2004). Determination of dithiocarbamates and metabolites in plants by liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 1028:267-276.
- Burriel, M. F., Lucena, C. F., Arribas J. S., Hernández M. J. (2008). Química analítica cualitativa. Editorial Paraninfo Thomson Editores. 18ª edición, 5ª impresión. Madrid, España. 326 págs.
- CICOPLAFEST. (2013). Catálogo de plaguicidas. Dirección electrónica (Consultada 20 de junio de 2013).  
<http://www.cofepris.gob.mx/AZ/Paginas/Plaguicidas%20y%20Fertilizantes/CatalogoPlaguicidas.aspx>

- CODEX ALIMENTARIUS (2013). Normas Alimentarias FAO/OMS. Dirección electrónica (consultada 22 de junio de 2013).  
<http://www.codexalimentarius.net/pestres/data/pesticides/details.html?id=105>
- Cortés-Zamora, S. E., Magaña-Paredes, A. (2005). Determinación de plaguicidas organoclorados por cromatografía de gases con captura de electrones (CG/CE) en agua para consumo humano. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F. México. 130 págs.
- COVECA. (2009). Monografías de la caña de azúcar. Gobierno del Estado de Veracruz. Dirección electrónica (consultada el 16 de junio del 2013).  
<http://portal.veracruz.gob.mx/pls/.../2344810B46095091E040A8C0320004C5>
- Draper, W. M., Wakeham, D. E. (1993). Rate constants for metam-sodium cleavage and photodescomposition in water. J. Agric. Food Chem. 41(7):1129-1133.
- EPA. (2006). United States Environmental Protection Agency. Dirección electrónica (consultada el 21 de junio de 2013).  
<http://www.epa.gov/oppfead1/safety/spanish/healthcare/handbook/Spch5.pdf>
- FAO. (2002). Dirección electrónica (consultada el 22 junio de 2013)  
<http://www.fao.org/agriculture/crops/obsolete-pesticides/what-dealing/obs-pes/es/>
- Fattore, E., Fanelli, R., Vecchia, C. L. (2000). Persistent organic pollutants in food: public health implications. Journal of Epidemiology and Community Health. 56(11):831-832.
- Gorozieta-Rosales, K., Bernal-González, M., Durán de-Bazúa, C. (2011). Productos de la degradación del n-metil ditiocarbamato de sodio. Memorias del IV CONGRESO INTERNACIONAL DE LA AMCATH “EL AGUA COMO ELEMENTO DE VIDA Y DE CALIDAD DE VIDA” del 29 junio al 2 de julio 2011. Querétaro Qro., México. Pp. 175-181.
- INECC. (2009). Dirección electrónica (consultada el 16 de junio de 2013).  
<http://www.inecc.gob.mx/sqre-temas/768-sqre-plaguicidas>

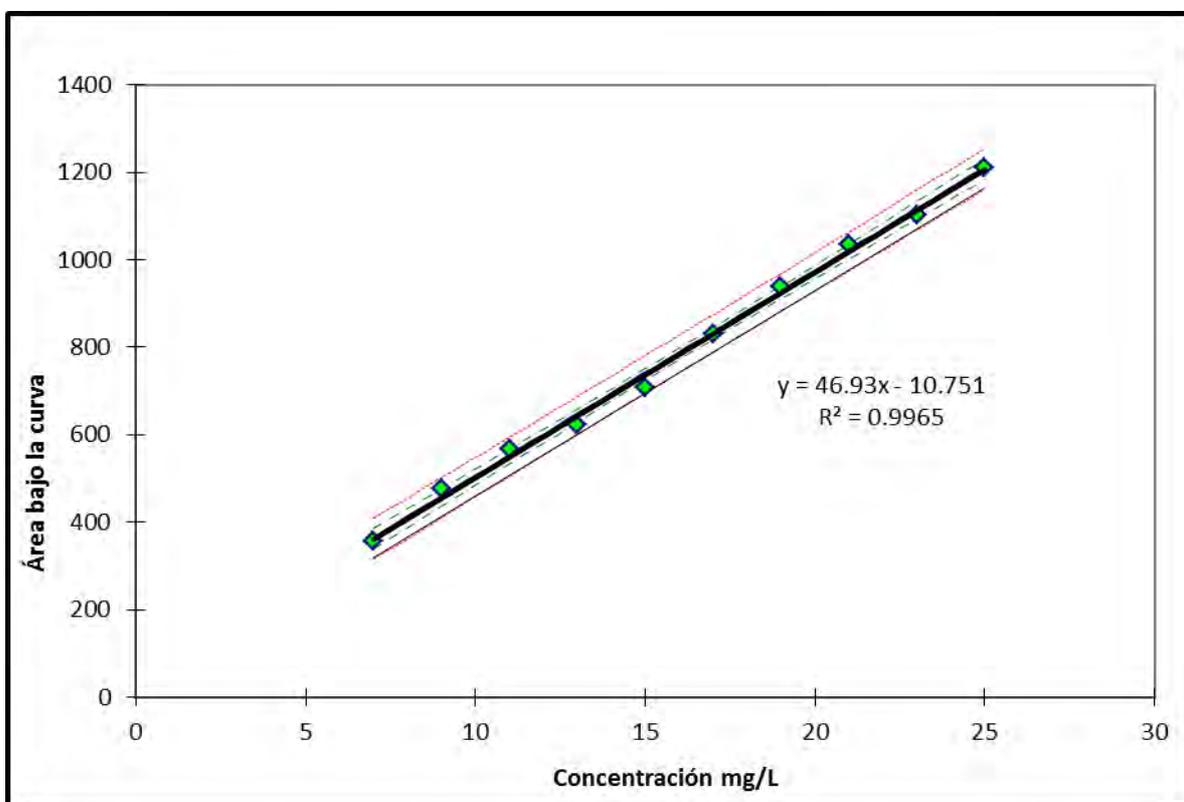
- INECC. (2012). Ficha Técnica Isotiocianato de Metilo. Dirección electrónica (Consultada el día 15 de junio de 2013).  
[http://www2.inecc.gob.mx/sistemas/plaguicidas/pdf/fumigantes/Isotiocianato\\_de\\_metilo.pdf](http://www2.inecc.gob.mx/sistemas/plaguicidas/pdf/fumigantes/Isotiocianato_de_metilo.pdf)
- LAINCO (2010). Dirección electrónica (Consultada el 16 de junio del 2013).  
[www.lainco.es/files/pdf/d543e34ac82716d66e8d23767d8b3427.pdf](http://www.lainco.es/files/pdf/d543e34ac82716d66e8d23767d8b3427.pdf)
- Larrahondo, J. (1995). La calidad de la caña de azúcar. En CENICAÑA, El cultivo de la caña en la zona azucarera de Colombia. Pub. CENICAÑA. Cali, Colombia. Pp. 337-354.
- Mullins, F. G. P., Kirkbright, G. F. (1987). Determination of sodium N-methyldithiocarbamate (Metham sodium) and methyl isothiocyanate in aqueous samples by high-performance liquid chromatography using a micellar mobile phase. *Analyst*. 112:701-703.
- PNUMA. (2004). Intoxicación por plaguicidas en niños. Información para la gestión y la acción. Programa de las Naciones Unidas para el Ambiente. Dirección electrónica (consultada el 23 de junio de 2013).  
<http://www.who.int/ceh/publications/pestipoisson/en/>
- RAE. (2013). Real Academia Española. Dirección electrónica (consultada el 26 de julio de 2013): <http://lema.rae.es/drae/?val=az%C3%BAcar>
- Ramírez, J. A., Lacasaña, M. (2001). Plaguicidas: clasificación, uso, toxicología y medición de la exposición. *Arch. Prev. Riesgos Labor*. 4(2):67-75.
- Rodríguez, G. L. (2005). Establecimiento de un procedimiento para la conservación de jugo de caña de azúcar variedad Poj. Facultad de Ingeniería. Programa de Producción Agroindustrial. Universidad de la Sabana. Chía, Bogotá, Colombia. 78 págs.
- SAGARPA. (2013). Importancia de la Agroindustria de la Caña de Azúcar. Dirección electrónica (consultada el 17 de junio de 2013).  
<http://www.sagarpa.gob.mx/agricultura/Documents/Cultivos%20Agroindustriales/Impactos%20Ca%C3%B1a.pdf>
- Serrano, L. (2006). Determinaciones de las poblaciones microbiológicas en el proceso de extracción de jugo de caña de azúcar en el ingenio Manuelita S.A. Trabajo de grado, Bogotá, D.C. Colombia. 102 págs.

- Skoog, D. A., Crouch, S. R., Holler, F. J. (2008). Principios de análisis instrumental. Cengage Learning Editores, 6º edición, México, D.F. Pp. 823-824.
- Schafer, K. S., Kegley, S. E. (2002). Persistent toxic chemicals in the US food supply. *Journal of Epidemiology and Community Health*. 56(11):813-817.
- Subirós, F. (1995). EL cultivo de la caña de azúcar. Ed. Universidad Estatal a Distancia, San José, Costa Rica. Pp. 321-323.
- Unión Europea. (2009). Dirección electrónica (consultada el 25 de junio de 2013).  
[http://europa.eu/legislation\\_summaries/food\\_safety/contamination\\_environmental\\_factors/mi0026\\_es.htm](http://europa.eu/legislation_summaries/food_safety/contamination_environmental_factors/mi0026_es.htm)
- Unión Europea. (2013). Dirección electrónica (consultada el 19 de junio de 2013).  
[http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/legislation/max\\_residue\\_levels\\_en.htm](http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/legislation/max_residue_levels_en.htm)
- Villa, R. M. (2008). Efectos de microbiocidas y antagonistas microbianos sobre microorganismos causales del deterioro poscosecha de caña y su impacto en las pérdidas de sacarosa en el ingenio. Tesis de Maestría en Tecnología Avanzada. Instituto Politécnico Nacional, IPN. Tlaxcala, Tlaxcala, México. 93 págs.
- Waggott, A., Yates, J.E., Gu, P. (1988). Development of the WRc methods for chlorotoluron, isoproturon, and chlormequat (CG 9896 SLD). Part 3: Metham sodium and methyl isothiocyanate. Final report to the Department of the Environment. Pp. 31-38. WRc Stevenage, Reino Unido.
- Wales, P. C. (2002). Department of Pesticide Regulation of California. Evaluation of methyl isothiocyanate as a toxic air contaminant. California Environmental Protection Agency. Sacramento, California, EEUU.
- WHO. (2009). The WHO Recommended Classification of Pesticides by Hazard and Guidelines to Classification 2009. World Health Organization. Dirección electrónica (consultada el 19 de junio de 2013).  
[http://www.who.int/ipcs/publications/pesticides\\_hazard\\_2009.pdf](http://www.who.int/ipcs/publications/pesticides_hazard_2009.pdf)

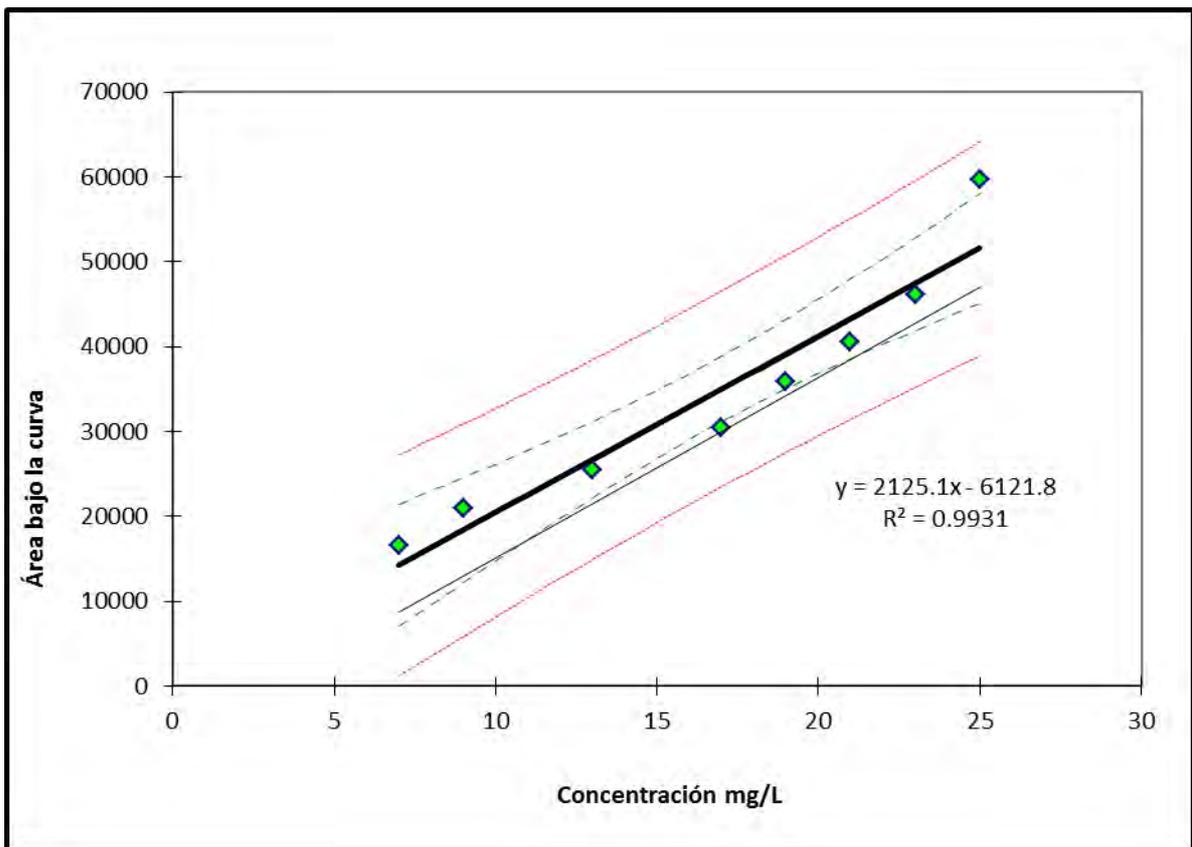
**Anexo 1**  
**Curvas de calibración en agua, metanol y**  
**jugo de caña**



**Fig.1.1. Curva de calibración en agua a 25°C**



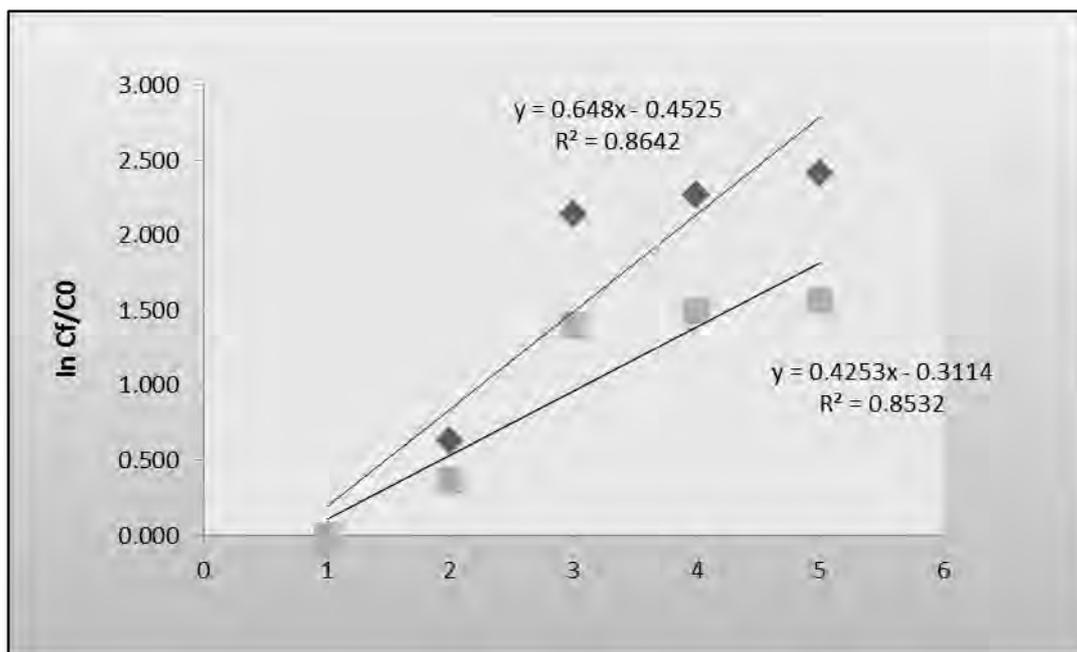
**Fig. 1.2. Curva de calibración en metanol a 25°C**



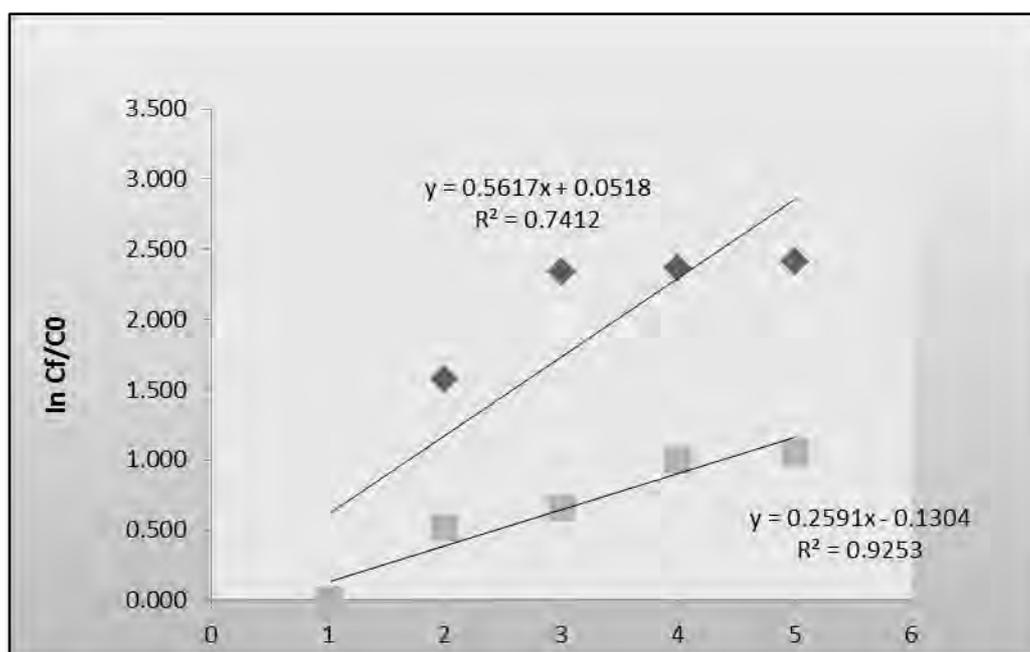
**Fig. 1.3. Curva de calibración en jugo de caña a 25°C**

## **Anexo 2**

**Curvas de cinética de formación del *MITC*  
del diseño experimental en agua y metanol**



**Fig.2.1. Formación del MITC: ■ H<sub>2</sub>O; ♦MeOH; Luz, 25°C**



**Fig.2.2. Formación del MITC: ■ H<sub>2</sub>O; ♦MeOH; Oscuridad, 25°C**

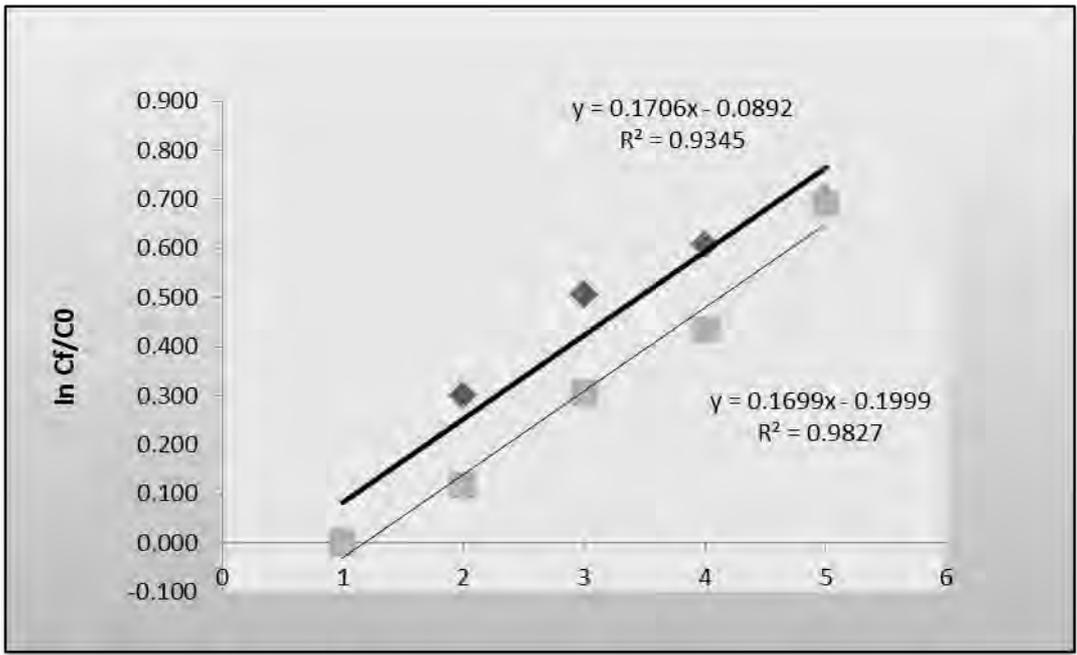


Fig.2.3. Formación del MITC: ■  $H_2O$ ; ♦ MeOH; Luz, 2°C

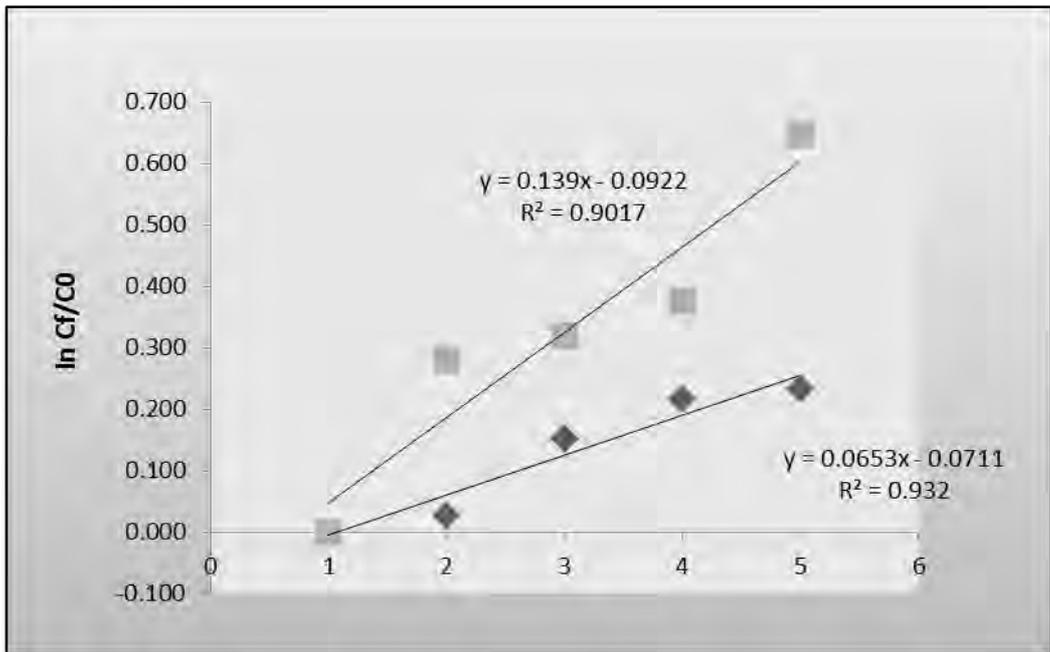


Fig.2.4. Formación del MITC: ■  $H_2O$ ; ♦ MeOH; Oscuridad, 2°C

## **Anexo 3**

### **Curvas de cinética de degradación del *MITC* del diseño experimental en jugo de caña**

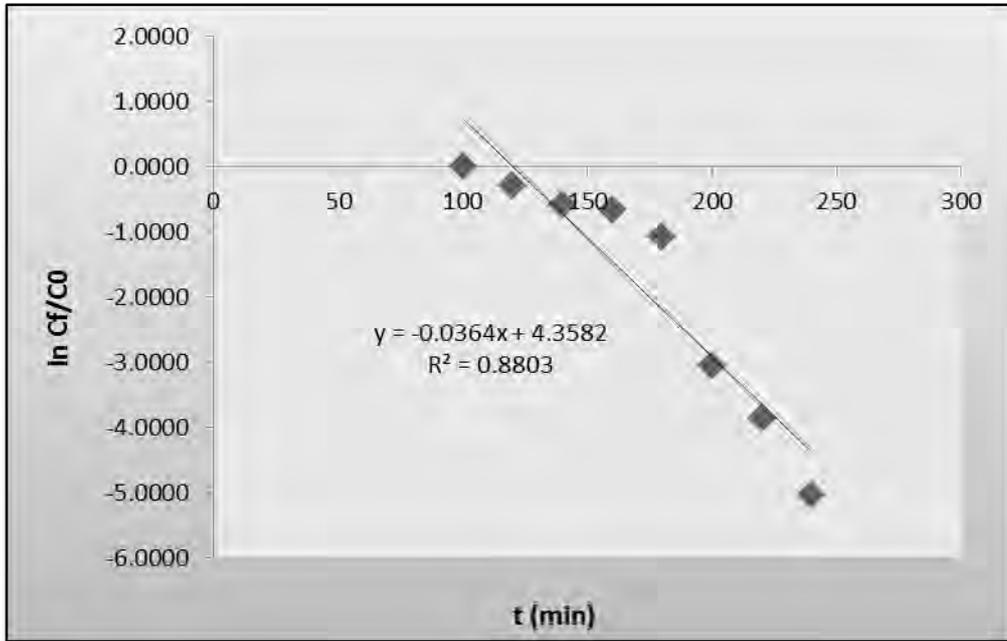


Fig.3.1. Degradación del MITC: ♦Jugo de caña; Luz, 25°C

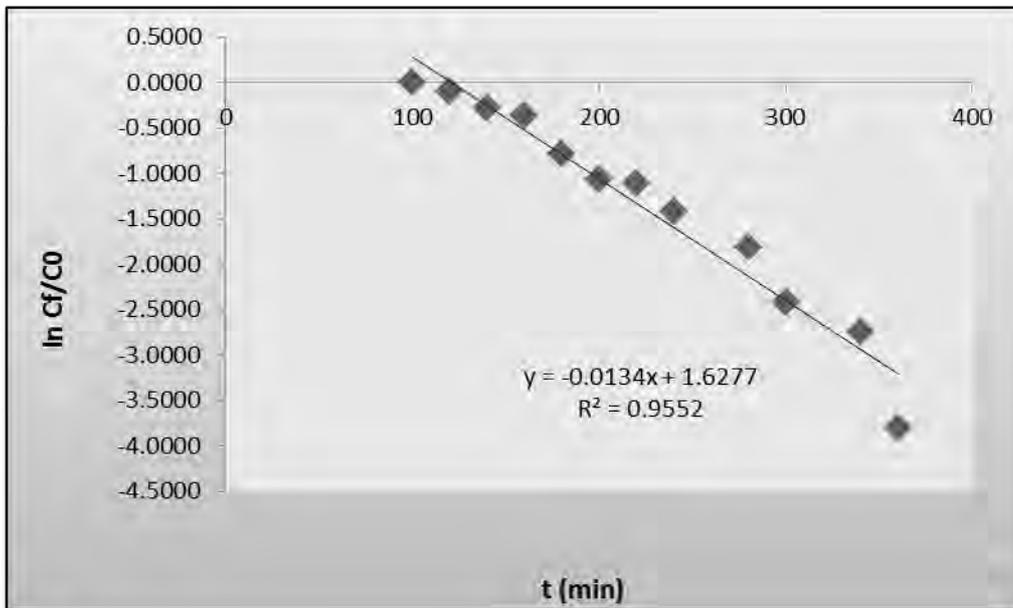


Fig.3.2. Degradación del MITC: ♦Jugo de caña; Oscuridad, 25°C

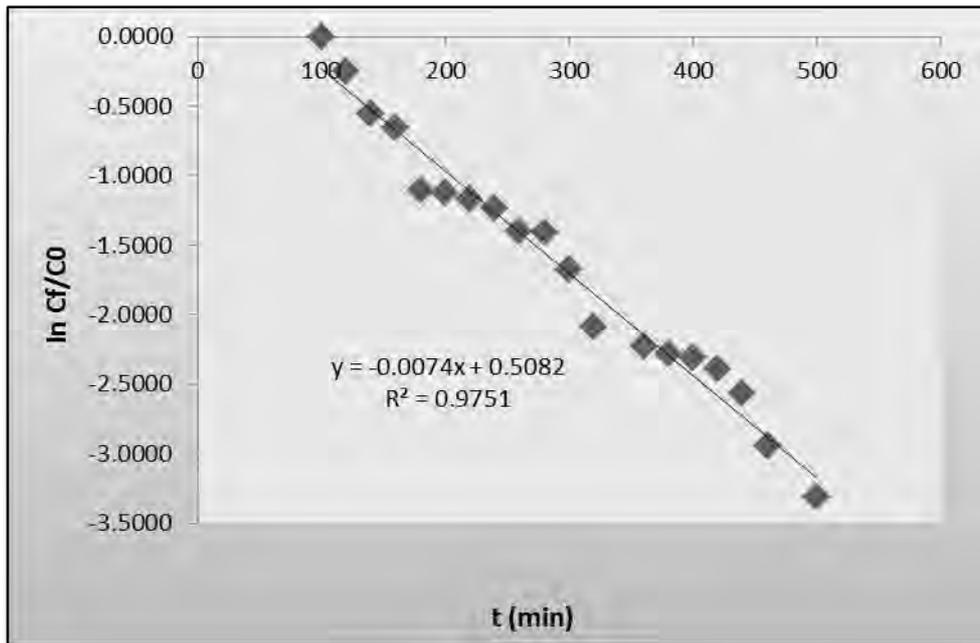


Fig.3.3. Degradación del MITC: ♦Jugo de caña; Luz, 2°C

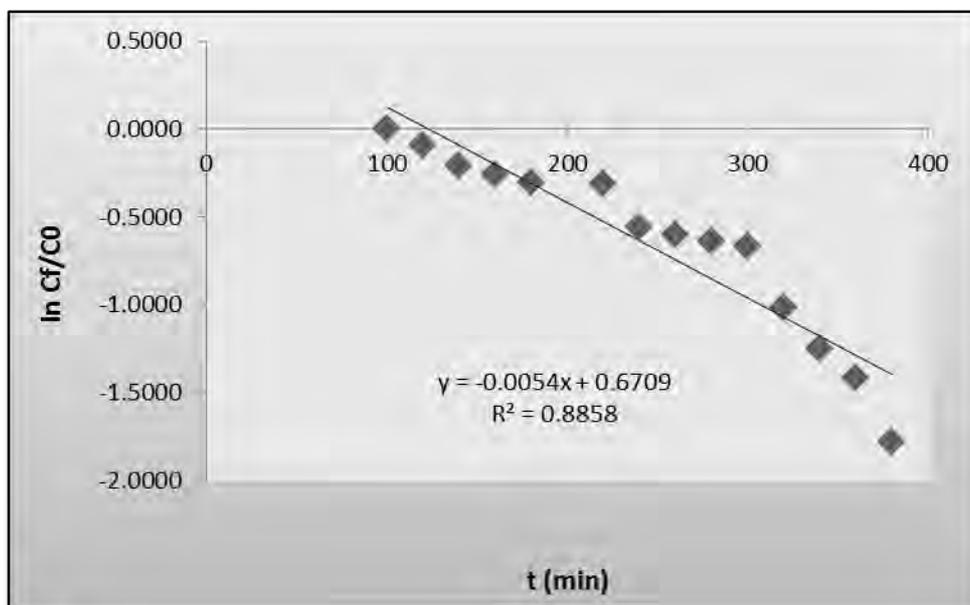


Fig.3.4. Degradación del MITC: ♦Jugo de caña; Osc, 2°C

# **Anexo 4**

## **Análisis estadístico**

### Matriz: Agua

Tiempo (días)	1	2	3	4	5
<b>Condición</b>	Área bajo la curva				
<b>Luz 25 °C</b>	2492	3781	11761	13542	15261
	3081	3497	11076	13252	11518
	2676	4593	10558	10268	12364
Media	2749.67	3957.00	11131.67	12354.00	13047.67
DS	301.3309	568.8023	603.4288	1812.3388	1962.9219
%CV	10.9588	14.3746	5.4208	14.6701	15.0442
<b>Oscuridad 25 °C</b>	3296	5942	6525	10786	10845
	3180	5742	6875	8689	9194
	3535	5125	6031	7678	8740
Media	3337.00	5603.00	6477.00	9051.00	9593.00
DS	181.0166	425.8674	424.0425	1585.3072	1107.7712
%CV	5.4245	7.6007	6.5469	17.5153	11.5477
<b>Luz 2 °C</b>	2891	3114	3628	4251	5350
	2262	3065	3925	4205	5922
	3121	3126	3682	4329	5236
Media	2758.00	3101.67	3745.00	4261.67	5502.67
DS	444.6763	32.3161	158.2056	62.6844	367.5994
%CV	16.1231	1.0419	4.2244	1.4709	6.6804
<b>Oscuridad 2 °C</b>	4725	5942	6271	6103	7626
	4297	5162	5536	5922	9161
	3612	5628	5597	6369	7363
Media	4211.33	5577.33	5801.33	6131.33	8050.00
DS	561.4235	392.4606	407.8852	224.8429	971.0989
%CV	13.3313	7.0367	7.0309	3.6671	12.0633

**Equivalente de las áreas bajo las curvas en concentración, mg L<sup>-1</sup>, en matriz agua**

<b>Condición</b>	<b>t (días)</b>	<b>Área bajo la curva*</b>	<b>Concentración MITC (mg L<sup>-1</sup>)</b>
<b>Luz 25°C</b>	1	2749.67	28.29
	2	3957.00	40.71
	3	11131.67	114.53
	4	12354.00	127.10
	5	13047.67	134.24
<b>Osc 25°C</b>	1	3337.00	28.29
	2	5603.00	47.50
	3	6477.00	54.91
	4	9051.00	76.73
	5	9593.00	81.33
<b>Luz 2°C</b>	1	2758.00	28.29
	2	3101.67	31.82
	3	3745.00	38.41
	4	4261.67	43.71
	5	5502.67	56.44
<b>Osc 2°C</b>	1	4211.33	28.29
	2	5577.33	37.47
	3	5801.33	38.97
	4	6131.33	41.19
	5	8050.00	54.08

\*Es el valor de la media de las tres repeticiones realizadas ésta investigación

### Matriz: Metanol

<b>Tiempo (días)</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
<b>Condición</b>	Área bajo la curva				
<b>Luz 25 °C</b>	3150	5741	28426	29302	33112
	2989	5313	24683	29238	36960
	3189	6417	26161	31930	34580
Media	3109.33	5823.67	26423.33	30156.67	34884.00
DS	106.0204	556.6232	1885.2391	1536.0851	1941.9289
%CV	3.4097	9.5580	7.1348	5.0937	5.5668
<b>Oscuridad 25 °C</b>	3395	15673	31643	31740	36790
	3463	13794	31285	30943	29730
	2242	14245	31651	33926	35015
Media	3033.33	14570.67	31526.33	32203.00	33845.00
DS	686.1577	980.9201	209.0391	1544.4575	3672.5434
%CV	22.6206	6.7322	0.6631	4.7960	10.8511
<b>Luz 2 °C</b>	3241	4248	5315	6641	6329
	2900	4310	5360	5540	6198
	3340	4236	5062	5231	6546
Media	3160.33	4264.67	5245.67	5804.00	6357.67
DS	230.8253	39.7157	160.6435	741.1457	175.7621
%CV	7.3038	0.9313	3.0624	12.7696	2.7646
<b>Oscuridad 2 °C</b>	4126	4226	4535	5360	5413
	3980	3910	5398	5062	5196
	4910	4553	4830	5315	5384
Media	4338.67	4229.67	4921.00	5245.67	5331.00
DS	500.1453	321.5157	438.6377	160.6435	117.8092
%CV	11.5276	7.6014	8.9136	3.0624	2.2099

**Equivalente de las áreas bajo las curvas en concentración, mg L<sup>-1</sup>, en matriz metanol**

<b>Condición</b>	<b>t (días)</b>	<b>Área bajo la curva*</b>	<b>Concentración MITC (mg L<sup>-1</sup>)</b>
<b>Luz 25°C</b>	1	3109.33	35.73
	2	5823.67	66.92
	3	26423.33	303.64
	4	30156.67	346.54
	5	34884.00	400.86
<b>Osc 25°C</b>	1	3033.33	35.73
	2	14570.67	171.63
	3	31526.33	371.35
	4	32203.00	379.32
	5	33845.00	398.66
<b>Luz 2°C</b>	1	3160.33	35.73
	2	4264.67	48.22
	3	5245.67	59.31
	4	5804.00	65.62
	5	6357.67	71.88
<b>Osc 2°C</b>	1	4229.67	35.73
	2	4338.67	36.65
	3	4921.00	41.57
	4	5245.67	44.31
	5	5331.00	45.03

\*Es el valor de la media de las tres repeticiones realizadas ésta investigación

### Matriz: Jugo de caña

Condición	Luz 25°C	Oscuridad 25°C	Luz 2°C	Oscuridad 2°C
t (min)	Área bajo la curva			
<b>100</b>	99182	153679	24679	5088
	120885	156963	23332	3621
	130673	155321	24005	4354
Media	116913.33	155321.00	24005.33	4354.33
DS	16116.80	1642.00	673.50	733.50
%CV	13.79	1.06	2.81	16.85
<b>120</b>	87429	128388	18602	4309
	88179	153679	18706	3569
	88520	141033	18654	4059
Media	88042.67	141033.33	18654.00	3979.00
DS	558.13	12645.50	52.00	376.43
%CV	0.63	8.97	0.28	9.46
<b>140</b>	62090	118024	15748	3048
	71914	117024	12745	3501
	62137	117524	12846	4059
Media	65380.33	117524.00	13779.67	3536.00
DS	5658.37	500.00	1705.37	506.41
%CV	8.65	0.43	12.38	14.32
<b>160</b>	61578	88040	15295	3421
	58311	127857	11240	3295
	59179	107948	10690	3345
Media	59689.33	107948.33	12408.33	3353.67
DS	1692.23	19908.50	2515.01	63.45
%CV	2.84	18.44	20.27	1.89
<b>180</b>	39879	78711	7910	3875
	37648	64716	8014	3773
	40984	67574	7807	2031
Media	39503.67	70333.67	7910.33	3226.33
DS	1699.38	7394.38	103.50	1036.44
%CV	4.30	10.51	1.31	32.12
<b>200</b>	5452	48419	7812	Nd
	5861	58769	7906	-
	5026	53594	7720	-
Media	5446.33	53594.00	7812.67	-
DS	417.53	5175.00	93.00	-
%CV	7.67	9.66	1.19	-
<b>220</b>	2988	50885	7880	4179
	1915	50894	7620	2013
	2366	50878	6805	3354
Media	2423.00	50885.67	7435.00	3182.00
DS	538.77	8.02	560.87	1093.20
%CV	22.24	0.02	7.54	34.36

<b>240</b>		1061	27412	5474	1914
		441	37049	7620	3052
		659	47581	7880	2483
Media		720.33	37347.33	6991.33	2483.00
DS		314.52	10087.81	1320.46	804.69
%CV		43.66	27.01	18.89	32.41
<b>260</b>			Nd	7453	2554
			-	5081	2548
			-	5176	2031
Media			-	5903.33	2377.67
DS			-	1342.89	300.24
%CV			-	22.75	12.63
<b>280</b>			25467	6592	2141
			23989	4438	2460
			26946.5	6599	2301
Media		25467.50	5876.33	2300.67	
DS		1478.75	1245.64	159.50	
%CV		5.81	21.20	6.93	
<b>300</b>			16229	5398	2115
			11334	3822	2367
			13782	4233	2241
Media		13781.67	4484.33	2241.00	
DS		2447.50	817.51	178.19	
%CV		17.76	18.23	7.95	
<b>320</b>			Nd	3070	1455
			-	2849	1442
			-	2959	1833
Media			-	2959.33	1576.67
DS			-	110.50	222.09
%CV			-	3.73	14.09
<b>340</b>			9949	Nd	1164
			9898	-	1078
			9998	-	1514
Media		9948.33	-	1252.00	
DS		50.00	-	230.94	
%CV		0.50	-	18.45	
<b>360</b>			2449	2617	997
			3356	2563	1113
			4626	2590	1055
Media		3477.00	2590.00	1055.00	
DS		1093.53	27.00	82.02	
%CV		31.45	1.04	7.77	

<b>380</b>		979	2447	526
		876	2569	943
		1082	2325	943
Media		979.00	2447.00	734.50
DS		103.00	122.00	294.86
%CV		10.52	4.99	40.14
<b>400</b>			2449	679
			2312	598
			2380	570
Media		2380.33	615.67	
DS		68.50	56.61	
%CV		2.88	9.19	
<b>420</b>			2107	
			2230	
			2255	
Media		2197.33		
DS		79.22		
%CV		3.61		
<b>440</b>			1869	
			1920	
			1756	
Media		1848.33		
DS		83.93		
%CV		4.54		
<b>460</b>			1352	
			1259	
			1134	
Media		1248.33		
DS		109.39		
%CV		8.76		
<b>500</b>			878	
			914	
			842	
Media		878.00		
DS		36.00		
%CV		4.10		

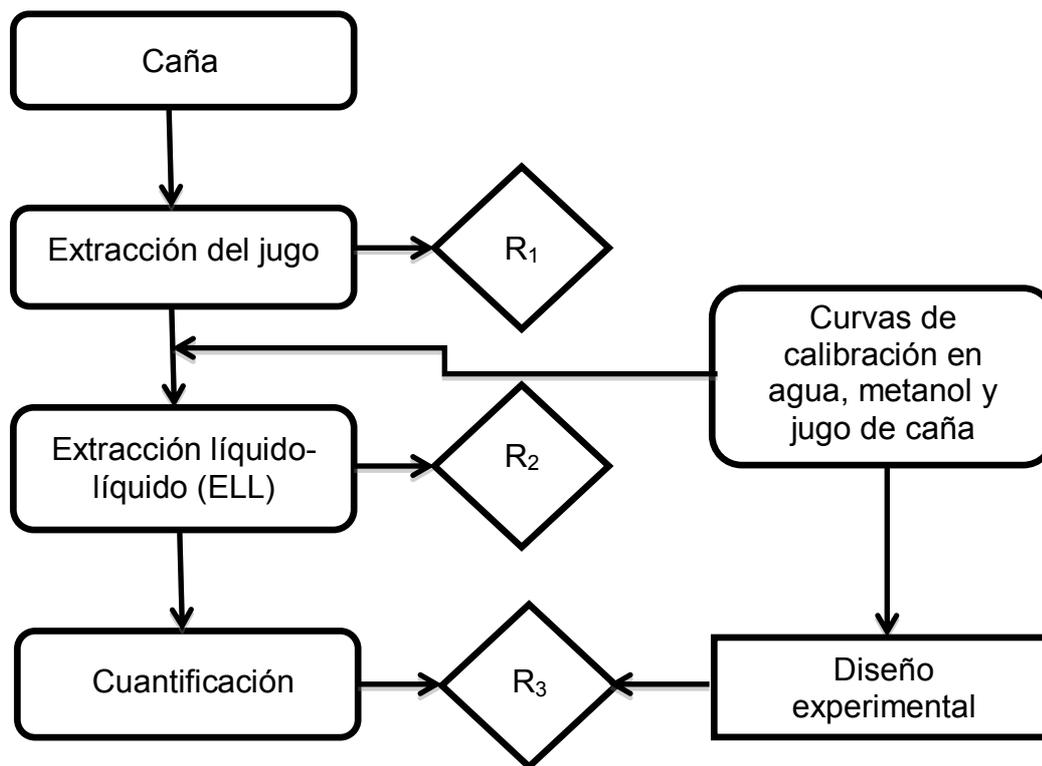
**Equivalente de las áreas bajo las curvas en concentración, mg L<sup>-1</sup>, en matriz juego de caña**

Condición	Luz 25 °C		Osc 25 °C		Luz 2 °C		Osc 2 °C	
	Área bajo la curva*	Conc MITC (mg L <sup>-1</sup> )	Área bajo la curva*	Conc MITC (mg L <sup>-1</sup> )	Área bajo la curva*	Conc MITC (mg L <sup>-1</sup> )	Área bajo la curva*	Conc MITC (mg L <sup>-1</sup> )
100	116913.3	17.890	155539.6	17.890	24005.5	17.890	4354.5	17.890
120	87804	13.436	141033.5	16.222	18654	13.902	3979	16.347
140	65380.3	10.004	117024	13.460	13772.5	10.264	3536	14.527
160	59944.5	9.173	107948.5	12.416	12408.3	9.247	3354	13.780
180	39879	6.102	70333.6	8.090	7910	5.895	3226.3	13.255
200	5452	0.834	53594	6.164	7812	5.822	Nd	Nd
220	2451.5	0.375	50845	5.848	7435.3	5.541	3182	13.073
240	750.5	0.115	37347.3	4.296	6991.3	5.210	2483	10.201
260			Nd	Nd	5903.3	4.399	2377.6	9.768
280			25467.5	2.929	5876.3	4.379	2300.5	9.451
300			13781.5	1.585	4484.3	3.342	2241	9.207
320			Nd	Nd	2959.5	2.206	1576.6	6.477
340			9949	1.144	Nd	Nd	1252	5.144
360			3477	0.400	2590	1.930	1055	4.334
380			979	0.113	2447	1.824	734.5	3.018
400					2380.5	1.774	615.6	2.529
420					2197.3	1.638		
440					1848.3	1.377		
460					1259	0.938		
480					Nd	Nd		
500					878	0.654		

\*Es el valor de la media de las tres repeticiones realizadas ésta investigación, Nd: no determinada

## **Anexo 5**

### **Tratamiento de residuos**



**Fig. 5.1. Disposición de los residuos generados durante la investigación**

R<sub>1</sub> = Corresponde a los desechos orgánicos como bagazo y cáscara de la extracción del jugo de caña.

R<sub>2</sub> = Corresponde a la mezcla de metanol, agua y jugo de caña de las muestras de las extracciones, curvas de calibración y diseño experimental.

R<sub>3</sub> = Corresponde a la mezcla de fase móvil CTAB (Siglas en inglés para el bromuro de hexadeciltrimetilamonio) con metanol, con el agua y el plaguicida.

**Tratamiento:**

R<sub>1</sub> = Se desecha en los residuos orgánicos municipales.

R<sub>2</sub> = Para recuperar el metanol se realiza una destilación simple. Se envía a la UGA\*

R<sub>3</sub> = Se someten a tratamientos como destilación para recuperar metanol y agua, los residuos se enviaron a la UGA\*

\*UGA, Unidad de Gestión Ambiental de la Facultad de Química de la UNAM