



UNIVERSIDAD DE CHILE -FACULTAD DE CIENCIAS -ESCUELA DE PREGRADO

**“IMPLEMENTACIÓN Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO
PARA LA DETERMINACIÓN DE CONTAMINANTES ORGÁNICOS
PERSISTENTES (COPs) EN LECHE MATERNA.”**

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de:

Químico Ambiental

JAVIER IGNACIO VERA MALDONADO

Director de Seminario de Título: Sr. Mauricio Araya Quijada.
Profesor Patrocinante: M. Cs. Sylvia Copaja

2017
Santiago – Chile

ESCUELA DE PREGRADO – FACULTAD DE CIENCIAS – UNIVERSIDAD DE CHILE



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por el candidato:

JAVIER IGNACIO VERA MALDONADO

“IMPLEMENTACIÓN Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE CONTAMINANTES ORGÁNICOS PERSISTENTES (COPS) EN LECHE MATERNA.”

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de dos requisitos para optar al Título de Químico Ambiental

COMISIÓN DE EVALUACIÓN

Sr. Mauricio Araya Q.
Director Seminario de Título

M. Cs. Sylvia Copaja C.
Profesor Patrocinante

Dra. Inmaculada Vaca C.
Presidente

Dr. Pablo Richter D.
Corrector

Se muestran cuatro firmas manuscritas en azul sobre líneas horizontales. A la derecha de las firmas se encuentra un sello circular de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, con el texto "FACULTAD DE CIENCIAS", "BIBLIOTECA CENTRAL" y "U. DE CHILE".

Santiago de Chile, 2017

*Dedicado a mi familia, en
especial a mi madre que ha
apoyado cada paso que he
dado en mi vida.*

*A mi Chinita, por ser mi
inspiración y mi poesía.*

*Al Tío Marcelo
por su apoyo incondicional.*

*Y a mi compañera de estudio
Daisy...*

AGRADECIMIENTOS

Mis más profundos agradecimientos al Sr. Mauricio Araya y la Sección Química Ambiental del Instituto de Salud Pública, por la acogida, el apoyo, y amabilidad, en el culmino de esta etapa académica. Gracias a la Profesora Sylvia Copaja por su sugerencia, ideas y ayuda. Además agradecer la valiosa colaboración y apoyo recibido a quienes estuvieron vinculado de alguna manera a este trabajo, a:

Mauricio Araya Q.
Natalia Torrejón B.
Lab. Química Ambiental

M.Cs.Sylvia Copaja.
Profesora Patrocinante

Q.F.Sonia Rojas R.
Q.F.Boris Duffau G.
Lab. Illicitos

Q.A. Gabriela Rocco R.
Lab. Residuos
Veterinarios

Ing.A. Marcelo Soto
Q.F. Pablo Carmona A.
Lab. Residuos de
Plaguicidas

INDICE

I - INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Antecedentes Generales.....	1
1.1.1. Propiedades que debe reunir una sustancia para ser considerado un contaminante orgánico persistente	1
1.1.2. Propiedades físicas y químicas que determinan el destino de los COPs en los ambientes	7
1.1.3. Convenio de Estocolmo sobre Contaminantes Orgánicos Persistentes	11
1.2. Antecedentes Específicos	13
1.2.1. Pesticidas	13
1.2.2. Plaguicidas Organoclorados	14
1.2.3. Matriz Biológica de monitoreo.....	18
1.2.4. Metodología analítica	20
1.3. Técnicas de extracción y preparación de muestras.....	24
1.3.1. Extracción Líquido-líquido	24
1.3.2. Extracción fase sólida.....	25
1.3.3. Extracción por método QuEChERS	26
1.4. Parámetros de validación del método analítico	27
1.4.1. Selectividad	28
1.4.2. Linealidad	29
1.4.3. Límites	30
1.4.4. Precisión	32
1.4.5. Exactitud (Veracidad)	35
1.5. Objetivos	37
1.5.1. Objetivo General	37
1.5.2. Objetivos Específicos	37
II - MATERIALES Y MÉTODOS	38
2.1. Materiales	38
2.2. Equipos	38
2.3. Reactivos	39
2.3.1. Estándar pesticidas organoclorados	40

2.3.2. Estándar bifenilos policlorados y bifenilos policlorados como dioxinas (DL-PCB)	40
2.4. Preparación de soluciones estándar	41
2.5. Condiciones cromatograficas	41
2.5.1. Condiciones de CG-DCE para pesticidas organoclorados y bifenilos policlorados	41
2.6. Condiciones cromatográficas para pesticidas organoclorados y bifenilos policlorados por GC-DSM.	42
2.7. Selección del método analítico	45
2.7.1. Método Oficial de extracción Líquido-líquido.....	46
2.7.2. Métodos alternativos de extracción de COPs.....	47
2.8. Optimización del método analítico seleccionado	50
2.8.1. Optimización del método QuEChERS para la determinación de OCPs en leche materna.....	51
2.8.2. Optimización de la extracción líquido-líquido y etapa de limpieza Florisil para la determinación de PCBs y DL-PCBs en leche materna.....	51
2.9. Estudio del efecto matriz en la determinación de COPs	52
2.10. Plan de validación del método analítico	53
2.10.1. Selectividad	54
2.10.2. Linealidad y sensibilidad.....	54
2.10.3. Precisión intermedia.....	55
2.10.4. Límites.....	55
2.10.5. Veracidad	56
III - RESULTADOS Y DISCUSION	57
3.1. Evaluación de los métodos de extracción de COPs en leche materna	58
3.1.1. Evaluación de la recuperación de los pesticidas organoclorados fortificados en leche materna.....	61
3.1.2. Evaluación de la recuperación de los bifenilos policlorados fortificados en leche de vaca.	61
3.1.3. Optimización de los métodos	64
3.1.4. Efecto de la matriz en el análisis de COPs por cromatografía de gases con detector de captura de electrones.	68
3.2. Evaluación de los parámetros de validación	71
3.2.1. Selectividad	71

3.2.2. Linealidad y sensibilidad.....	72
3.3. Límites de detección y cuantificación	77
3.3.1. Precisión del método	77
3.3.2. Veracidad	79
IV - CONCLUSIONES.....	83
V - REFERENCIAS.....	85
VI - ANEXOS	88
5.1. Pesticidas Organoclorados	88
5.2. Bifenilos policlorados.....	90
5.3. Preparación de muestra.....	95

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Propiedades físicas que caracterizan a los COPs	10
Tabla 2. Clasificación de los COPs en 6 anexos, elaborada por el Convenio de Estocolmo.....	12
Tabla 3. Compuestos vigentes en el Convenio de Estocolmo sobre contaminantes orgánicos persistentes.	12
Tabla 4. Composición kits QuEChERS de acuerdo a las característica de la matriz.	27
Tabla 5. Interpretación del valor de la razón de conformidad	32
Tabla 6 Límite máximo del coeficiente de variación, aceptable para análisis de impurezas en función de la concentración del analito.....	35
Tabla 7. Valores aceptables de recuperación de acuerdo a la concentración del analito.....	36
Tabla 8. Condiciones cromatográficas para la determinación de COPs por GC-DCE/DSM	42
Tabla 9. Tiempo de retención y Iones utilizados para el detector selectivo de masas en el desarrollo del método SIM para pesticidas organoclorados.	43
Tabla 10. Tiempo de retención y Iones utilizados para el detector selectivo de masas en el desarrollo del método SIM para determinación de bifenilos policlorados.....	44
Tabla 11. Variables del método de extracción líquido-líquido, en la determinación de COPs en leche de vaca.	48
Tabla 12. Acondicionamiento cartuchos para la extracción en fase sólida	49
Tabla 13. Diseño experimental del método QuEChERS; niveles y factores empleados	51
Tabla 14. Diseño experimental del método de Extracción líquido-líquido; niveles y factores empleados	52
Tabla 15. Elaboración de curva en matriz para plaguicidas organoclorados.	53
Tabla 16. Elaboración de curva en matriz para bifenilos policlorados	53
Tabla 17. Parámetros de validación analíticas	54
Tabla 18. Concentración utilizada para los niveles de curvas.	55
Tabla 19. Numero de muestras analizadas para la validación de OCPs en leche materna.	56

Tabla 20. Numero de muestras analizadas para la validación de PCBs en leche materna.	56
Tabla 21. Recuperación obtenida para los diferentes métodos de extracción en la determinación de OCPs en leche de vaca. (ICV en %)	60
Tabla 22. Recuperación obtenida (R%) y (CV%), para los diferentes métodos de extracción en la determinación de bifenilos policlorados en leche vaca.	63
Tabla 23. Resultados de los parámetros de validación del método QuEChERS para la determinación de OCP en leche materna.	73
Tabla 24. Resultados de los parámetros de validación del método ELL para la determinación de PCBs en leche materna.	75
Tabla 25. Prueba de Distribución t-student para el estudio de distribución normal de una muestra.	91
Tabla 26. Matriz del diseño experimental de optimización para la determinación de OCPs por método QuEChERS.....	92
Tabla 27. Matriz del diseño experimental de optimización para la determinación de PCBs por método extracción líquido-líquido.	93

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Propiedades que reúnen los Contaminantes Orgánicos Persistentes.	2
Figura 2. Vida media vs bioacumulación de los COPs .Una elevada vida media de los contaminantes está altamente relacionada con la bioacumulación. Los contaminantes que se encuentra al interior de la línea roja corresponden a los primeros 12 COPs del Convenio de Estocolmo.....	3
Figura 3. Ejemplo de la biomagnificación de PCBs en la cadena alimenticia acuática. Se observa que la proporción de PCBs en los huevos de gaviota en el “Great Lake” Ottawa Canadá, fue 50.000 veces mayor que en el fitoplancton..	4
Figura 4. Diagrama del equilibrios dinámicos en diferentes fases. La combinación de la estabilidad de los COPs y la tendencia a existir en la fase gaseosa hace que los COPs estén sujetos al transporte de larga distancia y que se acumulen en la cadena alimenticia	6
Figura 5. Movilidad de los COPs a diferentes latitudes. La deposición de los contaminantes se manifiesta más que la evaporación, en zonas de mayor latitud y temperaturas más bajas. (Wania & Mackay, 1996).....	7
Figura 6. Molécula de Diclorodifeniltricloroetano (DDT).....	15
Figura 7. Fotografía de la Segunda Guerra Mundial, soldado Estadounidense rociado con DDT. (Foto: Centers for disease control and prevention).....	15
Figura 8 . Molécula de hexaclororobbenzo (HCB).....	16
Figura 9. Cloración de la molécula de bifenilo	17
Figura 10. Etiqueta adosada a transformadores de potencia, condensadores, intercambiador de calor, sistemas hidráulicos, donde se señala un manejo y eliminación especial de los PCBs	18
Figura 11. Vías de ingreso de COPs desde la madre al feto o aun recién nacido atreves de la lactancia.....	20
Figura 12. Esquema del funcionamiento del detector de captura de electrones, y la emisión de partículas β.	21
Figura 13. Etapas para la medición de masa de un analito en un detector selectivos de masa.....	22
Figura 14. Extracción líquido-líquido entre una fase orgánica inmiscible por una fase acuosa	25
Figura 15. Etapas de la técnica de extracción en fase sólida (Martins y col., 2013).	26
Figura 16. Parámetros analíticos empleados para la validación del método analítico implementado para la determinación de COPs en leche materna. ...	28

Figura 17. Evaluación de la precisión con respecto a la repetibilidad y la reproducibilidad.....	33
Figura 18. Métodos desarrollados para la determinación de OCPs y PCBs en leche materna.....	45
Figura 19. Método extracción líquido-líquido con etapa de limpieza en cartuchos instalados sobre filtración manífor.	49
Figura 20. Cromatograma de multiestándar de pesticida organoclorados de concentración de 150 µg/L leídos por GC-ECD.	57
Figura 21. Cromatograma de multiestándar de bifenilos policlorados de concentración de 150 µg/L leídos por GC-ECD.....	58
Figura 22. Moléculas de Pesticidas organoclorados.	61
Figura 23. Resultados de la recuperación de los diferentes métodos de extracción de OCPs de una muestra de leche de vaca fortificada a 150 ng/L	59
Figura 24. Resultados de la recuperación porcentual de los diferentes métodos de extracción de PCBs de una muestra de leche de vaca fortificada a 150 ng/L. .	64
Figura 25. Gráficos de efectos principales en la optimización del método QuEChERS para la determinación de OCPs.....	65
Figura 26. Interacción de los diferentes factores evaluados en la optimización del método QuEChERS para la determinación de OCPs.	66
Figura 27. Gráficos de efecto principales en la optimización del método ELL para la determinación de PCBs.	67
Figura 28. Interacción de los diferentes factores evaluados en la optimización del método ELL para la determinación de PCBs.	68
Figura 29. Evaluación de la respuesta instrumental bajo tres tipos de curvas C.S= curva en solvente para el PCB# 81. C.M.I= curva en matriz interna, C.M.E= curva en matriz externa.	69
Figura 30. Fortificado de OCPs en matriz, evaluado mediante diferentes curvas.	70
Figura 31. Fortificado de PCBs en matriz, evaluado mediante diferentes curvas..	70
Figura 32. Estudio de la selectividad: Determinación de la capacidad del método para discriminar sin interferencia entre los analitos y la matriz de leche materna.....	71
Figura 33. Precisión del método M5: técnica QuEChERS en la determinación de OCPs en leche materna.	78
Figura 34. Precisión del método M3A: Extracción líquido-líquido con éter de petróleo y limpieza con cartucho Florisil en la determinación de PCBs en leche materna.....	78

Figura 35. Resultados de recuperación obtenido para el método QuEChERS en la determinación de OCPs en leche materna, evaluada a dos niveles de concentración.	80
Figura 36. Resultados de recuperación obtenido para el método ELL clean-up florisil en la determinación de PCBs en leche materna, evaluada a dos niveles de concentración.	81
Figura 37. Estructura molecular de los pesticidas organoclorados estudiados como contaminantes orgánico persistente en el biomonitoreo de leche materna.	89
Figura 38. Estructura molecular de los bifenilos policlorados estudiados como contaminantes orgánico persistente en el biomonitoreo de leche materna	90
Figura 39. Gráfico de Horwitz, En el se puede ver el coeficiente de variación % aceptable en términos de recuperación, de acuerdo a la concentración del analito en la muestra.....	92

LISTA DE ABREVIATURAS.

COPs	Contaminantes Orgánicos Persistentes
OCPs	Pesticidas Organoclorados
PCBs	Bifenilos Policlorados
HCB	Hexaclorobenceno
DDT	Diclorodifeniltricloroetano
DDE	Diclorodifenildicloroetileno, metabolito del DDT
DDD	Diclorodifenil dicloroetano, metabolito del DDE
PNUMA	Programa de la Naciones Unidas para el Medio Ambiente (UNEP por sus siglas en inglés)
TIC	Iones Cromatógrafo Totales
C.V%hor	Coefficiente de variación de Horwitz
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
R	Razón de conformidad
QuEChERS	Acrónimo en inglés de Quick Easy Cheap Effective Rugged Safe (rápido, fácil, económico, efectivo, sólido y seguro)

RESUMEN

El propósito del presente seminario de título, fue implementar y validar un método para la determinación de contaminantes orgánicos persistentes (COPs), incluyendo 23 pesticidas organoclorados (OCPs) y 19 bifenilos policlorados (7PCBs + 12 dl-PCBs) en muestras de leche materna, con el objetivo de determinar variaciones en el tiempo de la exposición de la población a COPs.

Como primera etapa se fortificó una muestra de leche entera de vaca con una solución multiestándar, y se evaluó la recuperación mediante diferentes métodos de extracción, entre ellas; extracción líquido-líquido (ELL), extracción en fase sólida (EFS) y el método de extracción QuEChERS para muestras con contenido graso.

La cuantificación se llevó a cabo mediante cromatografía de gases con detector de captura de electrones (GC-DCE) y confirmación por cromatografía de gases con detector selectivo de masa (GC-DSM). Una vez obtenido los resultados de las extracciones, se concluyó que la mejor extracción de OCPs de la matriz leche de vaca fue el método QuEChERS, mientras que para los PCBs fue el método de ELL con éter de petróleo, utilizando cartuchos Florisil en su etapa de limpieza.

Los estudios posteriores de la optimización del método fueron realizados utilizando un diseño factorial que permitió estudiar los efectos de varios factores sobre la recuperación de los COPs en la muestra de leche de vaca fortificada. La elección de las condiciones óptimas se realizó en base a los analitos con menor recuperación correspondiente a Aldrin y el PCB #180, logrando valores de recuperación de un 50% y un 62% respectivamente.

El método QuEChERS utilizado para la validación de OCPs en leche materna, resultó adecuado para la cuantificación de 23 pesticidas organoclorados. El límite de detección del método (LD) para pesticidas organoclorados es de 1,2 ng/mL, mientras el límite de cuantificación del método (LC) es sobre los 6,7 ng/mL. La precisión expresada

como coeficiente de variación relativa, en base a la repetibilidad fue menor a 10,7 CV%, mientras la reproducibilidad fue menor a 6,8 CVR%.

La exactitud del método desarrollado, se evaluó en base a una muestra enriquecida OCPs a una concentración de 30 ng/mL, obteniendo valores de recuperación en la extracción de un 94% - 119%, con una desviación estándar relativa inferior a un 7,2%.

En tanto, la repetibilidad de la extracción líquido-líquido con éter de petróleo, utilizando cartuchos de Florisil en su etapa de limpieza, se alcanzó un límite de detección (LD) en un intervalo de 3,4 - 5,5 ng/mL, por consiguiente el límite de cuantificación del método (LC) es de un 10,6 ng/mL.

La precisión expresada como coeficiente de variación relativa, en base a la repetibilidad fue menor a 11,6 CV%, mientras que la reproducibilidad fue menor a 9,8 CV%.

Los parámetros se establecieron de acuerdo al criterio para la validación basado en AOAC y en Codex alimentario, dando como resultado que las características de desempeño de los métodos cumplen con los requisitos para las aplicaciones analíticas previstas.

ABSTRACT

The purpose of this work, was to implement and validate a method for the determination of persistent organic pollutants (POPs), including 23 organochlorine pesticides (OCPs) and 19 polychlorinated biphenyls (7 PCBs + 12 dl-PCBs) in samples of breast milk with the objective to determine variations in time of exposure of the population to POPs, in conformity with the Stockholm Convention.

As a first step a sample of whole cow's milk was fortified with a multistandard solution, and the recovery was evaluated by different extraction methods, between them; Liquid-Liquid extraction (ELL), solid phase extraction (EFS) and the extraction method QuEChERS for fatty samples.

Quantification was performed by gas chromatography with electron capture detector (GC-ECD) and confirmation by gas chromatography with mass selective detector (GC-MS).

Once obtained the results of the extractions, it was concluded that the best extraction of OCPs matrix milk was the QuEChERS method, while for PCBs was the method of ELL with petroleum ether, by using Florisil cartridges in cleaning step. The optimization of methods was performed using a factorial design which allowed studying the effects of various factors on the recovery of POPs in the sample of fortified milk.

The election of the optimal conditions was carried out based on the analyte with lower recovery, Aldrin and PCB# 180, obtaining recovery values 50% and 62% respectively. The QuEChERS method used for validation of OCPs in breast milk, proved to be adequate for quantification of 23 organochlorine pesticides. The limits of detection (LOD) method for organochlorine pesticides is between 1.2 to 2.2 ng/mL, while the quantification limit of the method (LOQ) is about 6.7 ng/mL.

The precision expressed as relative coefficient of variation, based on the repeatability was less than 10.7 CV% while reproducibility was less than 6.8 CV%.

The accuracy of the method was based on the recovery, getting values between 94 and 119% of a fortified sample at a concentration of 30 ng / mL with a relative standard deviation less than 7.2%.

With respect for to ELL repeatability with petroleum ether, with using Florisil cartridges in at the cleaning step, the limit of detection (LOD) was reached in the range of 3.4 ng / mL and 5.5 ng / mL, therefore the LOQ of the method is 10.6 ng / mL.

The precision expressed as relative coefficient of variation, based on the repeatability was less than 11.6 CV% while reproducibility was less than 9.8% CV. The parameters were established according to the criteria for validation based on AOAC and Codex Alimentarius, resulting in the performance characteristics of the methods satisfy the requirements provided for analytical applications.

I - INTRODUCCIÓN

1.1. Antecedentes Generales

Los Contaminantes Orgánicos Persistentes (COPs), conocidos internacionalmente por su acrónimo en inglés POPs (Persistent Organic Pollutants), comprenden una amplia variedad de compuestos que tienen en común la resistencia a la degradación, semi-volatilidad y carácter lipófilico (Albert, 2002).

Los COPs se empezaron a introducir de forma importante en el medio ambiente alrededor de los años 1940-1950, después de la Segunda Guerra Mundial (EPA, 2015), destinado a combatir plagas y maleza, con la finalidad de aumentar el rendimiento en los diferentes tipos de cultivos. Además pueden ser producto de reacciones que ocurren espontáneamente a altas temperaturas, ya sea durante procesos industriales, en incineradores industriales o a causa de incendios accidentales (Albert, 2002).

Estos compuestos se han distribuido por los ecosistemas, estando presentes en los compartimientos ambientales (aire, agua, lluvia, nieve, sedimentos, y suelos), de todas las regiones del mundo, incluyendo océanos, desiertos y zonas polares, muy remotas al sitio original de su liberación al ambiente (United Nations Environment Programme, 2013; Albert, 2002).

1.1.1. Propiedades que debe reunir una sustancia para ser considerado un contaminante orgánico persistente

Los contaminantes orgánicos deben reunir cuatro propiedades (Figura 1) para considerarse sustancias persistentes y de esta forma distinguirlos de otras sustancias orgánicas (EPA, 2002).

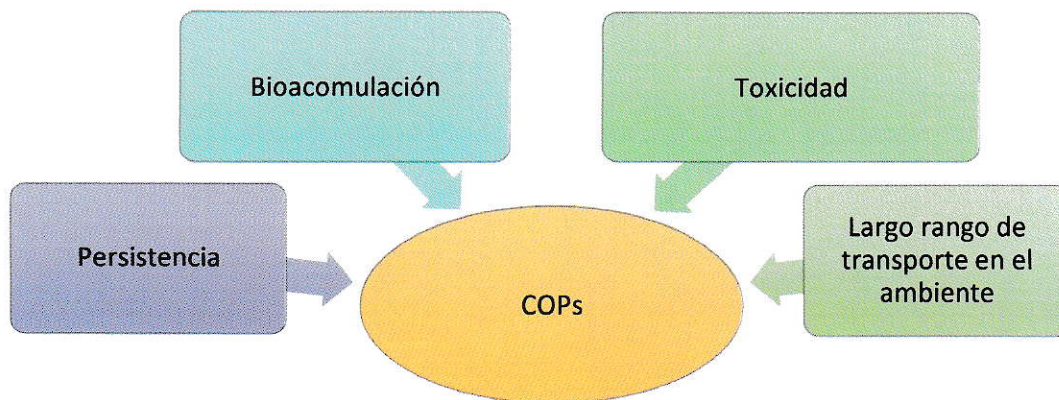


Figura 1. Propiedades que reúnen los Contaminantes Orgánicos Persistentes.

1.1.1.1. Persistencia

Es la capacidad de una sustancia para permanecer en el ambiente, sin ser degradado o transformado por agentes físicos, químicos o biológicos.

La persistencia se mide a menudo como vida media, y se define como el tiempo (horas, días, meses o incluso años) necesarios para que ocurra la degradación del compuesto químico. La vida media es evaluada en diferentes matrices tales como; aire, suelo, agua y sedimentos. De acuerdo al Convenio de Estocolmo, una sustancia es persistente si su degradación es mayor a los dos meses en agua, o seis meses en sólidos o sedimentos (EPA, 2002).

En la Figura 2, se grafica el tiempo de vida media de algunos contaminantes, y la correlación existente con la bioacumulación en los organismos. Un mayor tiempo de vida media, traerá como consecuencia mayor capacidad de bioacumulación de estos compuestos en los organismos, además de la capacidad de transportarse a largas distancias, debido a su lenta degradación.

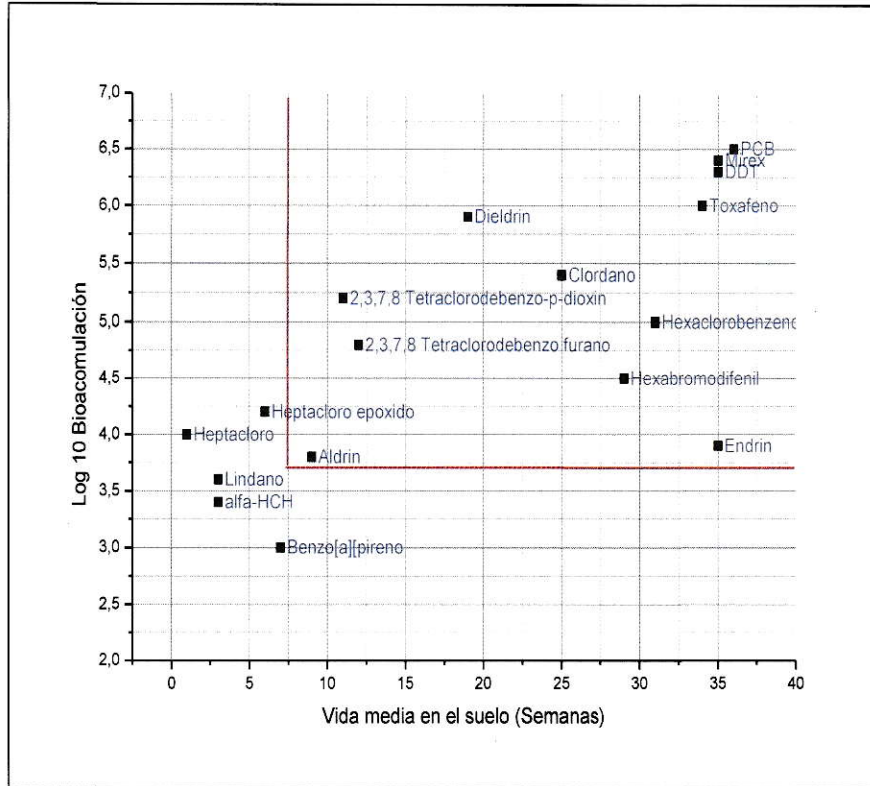


Figura 2. Vida media vs bioacumulación de los COPs .Una elevada vida media de los contaminantes está altamente relacionada con la bioacumulación. Los contaminantes que se encuentra al interior de la línea roja corresponden a los primeros 12 COPs del Convenio de Estocolmo (Rodan, 2000).

1.1.1.2. Bioacumulación

La bioacumulación es el proceso por el cual una sustancia química alcanza una gran concentración en el tejido de un organismo, adquirido a través del ambiente o de los alimentos (EPA, 2002).

La bioacumulación se define como la suma de los procesos de **bioconcentración** y **biomagnificación**. El primero corresponde a la acumulación gradual, de químicos en el organismo durante el tiempo. Esto ocurre cuando las sustancias químicas son absorbidas rápidamente, pero su tasa de metabolización es lenta o nula. Mientras la biomagnificación es el proceso en el que las sustancias químicas se concentran más en cada nivel trófico superior. Tales sustancias tienden a ser difíciles de eliminar de los

tejidos animales y vegetales, por lo que el mayor consumidor de la cadena trófica, tiene niveles más altos de la sustancia en sus tejidos. A menudo, estos altos niveles causan mutaciones, cáncer y eventualmente la muerte (Baird & Cann, 2008).

En la Figura 3 se muestra la biomagnificación ocurrida en el “Great Lake” en Ottawa ,Canadá, en el cual la concentración de PCBs alcanza los 124 mg/kg en huevos de gaviota (Baird & Cann, 2008; EPA, 2002).

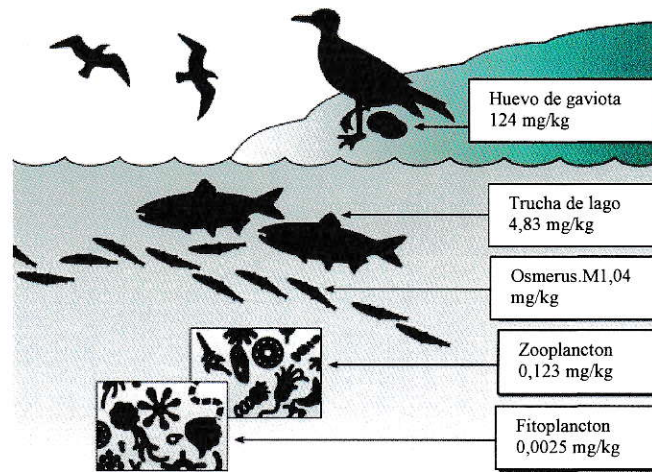


Figura 3. Ejemplo de la biomagnificación de PCBs en la cadena alimenticia acuática. Se observa que la proporción de PCBs en los huevos de gaviota en el “Great Lake”Ottawa Canadá, fue 50.000 veces mayor que en el fitoplancton (Baird & Cann, 2008).

1.1.1.3. Toxicidad en el ser humano

Los seres humanos están expuestos a los COPs a través de los alimentos, siendo los más importantes los que son ricos en grasa (carne, pescado, lácteos, etc.). Como resultado de estudios realizados en los Estados Unidos se han encontrado pesticidas clorados por ejemplo, en hamburguesas, helados, pizzas, entre otros (Martins y col., 2013).

Los efectos tóxicos de estos contaminantes pueden ser muy sutiles y desencadenarse a bajas concentraciones, presentándose después de varios años de la

exposición, llegando en ocasiones a presentarse en las subsecuentes generaciones. Esto hace que su diagnóstico sea difícil de realizar y dificulta la evaluación de los problemas potenciales de salud pública (Martins y col., 2013).

Evidencias científicas demuestran que la exposición a largo plazo, para algunos compuestos y escenarios, incluso a bajos niveles de concentración, puede conducir a patologías tales como; (Martins y col., 2013)

- Cáncer y tumores, incluyendo sarcoma de tejidos blandos, Linfoma no-Hodgkin (LNH), cáncer de mama, cáncer de páncreas y aparición de leucemia en adulto.
- Trastornos neurológicos, incluyendo trastorno de déficit de atención, problemas de conducta como la agresividad y la delincuencia, problemas de aprendizaje y problemas de memoria.
- Supresión inmune.
- Trastornos reproductivos, incluyendo espermatozoides anormales, abortos involuntarios, parto prematuro.
- Otras enfermedades, incluyendo aumento de la incidencia de diabetes tipo II, endometriosis, hepatitis y cirrosis.

1.1.1.4. Transporte en el ambiente

En el medio ambiente existe un equilibrio dinámico constante por lo cual los COPs están en movimiento por las diferentes fases. Su proporción en cada fase dependerá de parámetros físico-químicos. Estos contaminantes poseen características hidrófobas, por lo que en los suelos tienden a unirse a la materia orgánica, y en ambientes acuáticos, tienden a unirse fuertemente a partículas sólidas por lo cual sólo se detectan en bajas concentraciones en la fase disuelta. En la Figura 4 se describe las fases de equilibrio en los distintos sistemas (Patterson y col., 2014).

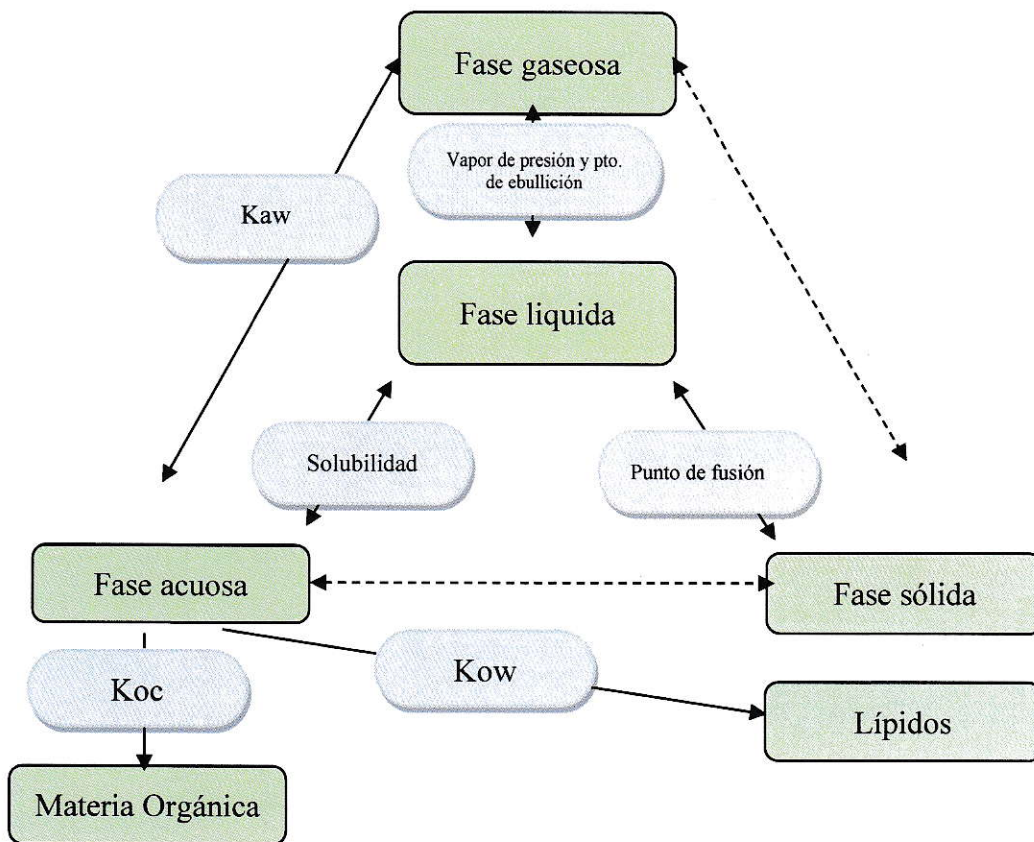


Figura 4. Diagrama del equilibrio dinámico en diferentes fases. La combinación de la estabilidad de los COPs y la tendencia a existir en la fase gaseosa hace que los COPs estén sujetos al transporte de larga distancia y que se acumulen en la cadena alimenticia (Patterson y col., 2014).

Una propiedad importante de los COPs es la **semivolatilidad**. Esta confiere un grado de movilidad a través de la atmósfera que es suficiente para permitir que cantidades relativamente grandes puedan entrar en la atmósfera y ser transportadas a largas distancias (Sullivan & Megson, 2014). Además pueden fraccionarse durante su viaje hacia los polos porque migran a diferentes velocidades (Ritter y col., 2015; Wania & Mackay, 1996).

Las temperaturas cálidas favorecen la evaporación desde la superficie de la Tierra en las regiones tropicales y subtropicales (Figura 5), mientras que a bajas

temperaturas se favorece la deposición en suelos y aguas. Los COPs pueden migrar a latitudes más altas mediante una serie de saltos relativamente cortos, denominado **“Grasshopping”** o **"efecto saltamontes"**. Los compuestos migran, se depositan, y migran de nuevo en sintonía con los cambios de temperatura estacional en latitudes medias (Wania & Mackay, 1996).



Figura 5. Movilidad de los COPs a diferentes latitudes. La deposición de los contaminantes se manifiesta más que la evaporación, en zonas de mayor latitud y temperaturas más bajas (Wania & Mackay, 1996).

1.1.2. Propiedades físicas y químicas que determinan el destino de los COPs en los ambientes

El comportamiento y destino final de los productos químicos en el medio ambiente está determinado por sus propiedades químicas, físicas y por la naturaleza de su entorno. Las propiedades químicas y físicas son determinadas por la estructura de la

molécula y la naturaleza de los átomos presentes en la molécula (Wania & Mackay, 1996).

1.1.2.1. Propiedades Químicas

Los COPs son a menudo halogenados y más frecuentemente clorados. El enlace carbono cloro es muy estable, y entre mayor sea el grado de sustituciones cloradas o grupos funcionales, mayor es la resistencia a la degradación biológica o fotolítica del compuesto. Además, el cloro unido a un anillo bencénico es más estable a la hidrólisis que un cloro dentro de una estructura alifática (Baird & Cann, 2008; Mattice, 2010). En virtud de su alto grado de halogenación, los COPs tienen muy baja solubilidad en agua y alta solubilidad en lípidos, lo que lleva a pasar fácilmente a través de las membranas biológicas, acumulándose en el tejido adiposo (Albert, 2002; Ramirez, 2006).

1.1.2.2. Propiedades Físicas

Para entender cómo se comportan los COPs en el ambiente, es necesario conocer ciertas propiedades físicas, que determinaran su mecanismo de transporte en el ambiente. En la Tabla 1 se resumen estas propiedades.

- **Presión de vapor** es una medida de la volatilidad de una sustancia, es decir la capacidad de pasar de un estado líquido o sólido a uno estado gaseoso. La mayoría de los COPs tienen presiones de vapor relativamente bajas lo que se traduce en un flujo mínimo a la atmósfera. Sin embargo, son muy resistentes a la degradación ya pesar de que el flujo es bajo, el transporte atmosférico es una vía importante distribución mundial (Semarnat, 2013).
- **Solubilidad en agua (S_w)** es el grado en que un compuesto se disuelve en agua a una presión y temperatura dada. Los COPs tienen una baja solubilidad acuosa y como resultado rara vez se encuentran en altas concentraciones en muestras de agua. Estos contaminantes tienden a migrar a las partículas de suelo o sedimento del mismo lugar (Sullivan & Megson, 2014).

- **Coefficiente de partición Octanol/Agua (Log K_{ow}).** El Log K_{ow} proporciona un valor de la polaridad de una sustancia química, que es frecuentemente utilizado en modelos para determinar como un compuesto puede distribuirse en tejido graso. Es importante considerar estos términos puesto que, los COPs con una vida media larga y un Log K_{ow} alto pueden acumularse en tejidos grasos y bioacumularse a lo largo de la cadena alimenticia (Sullivan & Megson, 2014).
- **Constante de la Ley de Henry (H).** También conocido como coeficiente de reparto aire/agua (K_{aw}), es una medida de la distribución de equilibrio de una sustancia entre el aire y el agua, o aire y suelo húmedo. Es decir, una medida de la capacidad de volatilización de una sustancia (Sullivan & Megson, 2014).

Los COPs no se encuentran a menudo en altas concentraciones en la fase acuosa o en la atmósfera, por lo que este no es una vía principal, sin embargo, se produce algo de flujo entre las dos fases (Sullivan & Megson, 2014).

Un valor alto de la Ley de Henry, indica que un compuesto tiene un potencial elevado para volatilizarse del suelo húmedo; un valor bajo predice un mayor potencial de lixiviación del contaminante(Sullivan & Megson, 2014).

Tabla 1. Propiedades físicas que caracterizan a los COPs

Propiedades físicas	Nivel	Rango de valor	Características
Presión de Vapor	Volátiles	mayor a 10^{-3} mm de Hg a 25°C	Tienen gran movilidad y se dispersan hacia la atmosfera.
	Ligueramente Volátiles	entre 10^{-6} - 10^{-8} mm de Hg a 25 °C	Menos móviles.
	No Volátiles	menor a los 10^{-7} mm de Hg a 25 °C.	Son más persistentes en suelos y aguas.
Coeficiente de partición Octanol/Agua (Log Kow)	Alto	$8.0 > \log Kow > 4,3$	El COPs puede fijarse con firmeza a materia orgánica, sedimento y biota.
	Moderado	$4,3 > \log Kow > 3,5$	Los COPs puede bioacomularse en grasas corporales de animales. La vía de exposición de los COPs puede ser por la cadena alimenticia.
	Bajo	$3,5 > \log Kow$	Los COPs pueden no fijarse en materia orgánica. Los COPs pueden moverse en aguas superficiales, acuíferos y aire. La vía de exposición del COPs puede ser la inhalatoria.
Nivel de volatilidad de acuerdo a la constante de Henry	No Volátil	Menor a 3×10^{-7} atm m ³ /mol	Constante de (H) baja, presión de vapor baja Alta solubilidad ,tiene potencial para lixivarse Los COPs puede disolverse en agua
	Baja volatilidad	3×10^{-7} a 1×10^{-5} atm m ³ /mol	
	Volatilidad moderada	1×10^{-5} a 1×10^{-3} atm m ³ /mol	Constante (H) Alta, presión de vapor alta Solubilidad baja Tiene potencial alto para volatilizarse del suelo húmedo Los COPs puede evaporarse
	Alta volatilidad	Mayor a 1×10^{-3} atm m ³ /mol	

1.1.3. Convenio de Estocolmo sobre Contaminantes Orgánicos Persistentes

El Convenio de Estocolmo fue adoptado en 2001 por una gran mayoría de los países del mundo con el fin de proteger a los ambientes expuestos frente a los COPs mediante la reducción o eliminación (Baird & Cann, 2008), comprometiéndolo a cada país miembro a la aplicación de medidas para:

- a) Eliminar o restringir la producción y el uso de los COPs producidos intencionalmente.
- b) Eliminar en forma ambientalmente adecuada, las existencias de los COPs fuera de uso, deteriorados, vencidos o prohibidos.
- c) Minimizar la generación de los COPs que se forman y liberan de manera no intencional, tomando medidas de prevención relativas a las mejores técnicas disponibles y las mejores prácticas ambientales.
- d) Elaborar un Plan Nacional de Implementación del Convenio de Estocolmo (PNUMA, 2007).

El Convenio de Estocolmo clasifica las sustancias en seis anexos, en función de las medidas que se han decidido adoptar sobre ellas (eliminación, restricción o reducción de emisiones) o en fase de evaluación de riesgos (Tabla 2) (Stockholm Convention, 2008).

Desde la cuarta a la séptima Conferencias de las Partes (año 2009, 2011, 2013 y 2015), se han adoptado modificaciones del anexo A, B y C, en la que se han incorporado nuevas sustancias químicas como causantes de efectos adversos en los seres humanos y el ecosistema. En la Tabla 3 se resumen los 21 compuestos vigentes en el Convenio hasta la fecha.

El hexabromobenceno y los naftalenos clorados se encuentran en el anexo A, debido a que no está permitida la elaboración industrial de esta sustancia, pero se pueden generar por reacciones involuntarias motivo por el cual se encuentran vinculadas al anexo C.

Tabla 2. Clasificación de los COPs en 6 anexos, elaborada por el Convenio de Estocolmo

COP (Anexo A)	Sustancias COP a eliminar.
COP (Anexo B)	Sustancias COP sujetas a restricciones de uso.
COP (Anexo C)	Sustancias COP cuyas emisiones han de reducirse.
Candidato COP (Anexo D)	Sustancias que reúnen los criterios de selección para ser considerada COP por sus propiedades intrínsecas.
Candidato COP (Anexo E)	Sustancias que además de reunir los criterios de selección como COP, la evaluación de riesgos que ponen de manifiesto que pueden ser transportadas a larga distancia en el medio ambiente, pueden tener efectos adversos en la salud humana y/o en el medio ambiente.
Candidato COP (Anexo F)	Sustancias COP que requieren acción global (han pasado las etapas previas de evaluación de los Anexos D y E) y que están en fase de evaluar las medidas globales a adoptar: eliminación, reducción de emisiones o restricción.

Tabla 3. Compuestos vigentes en el Convenio de Estocolmo sobre contaminantes orgánicos persistentes.

Anexo A (eliminación)	Aldrin [●] , clordano [●] , clordecona [●] , dieldrin [●] , endrin [●] , heptacloro [●] , hexabromobifenilo [▲] , hexabromociclodecano (HBCD) [▲] , éter de hexabromodifenilo y éter de heptabromodifenilo [▲] , hexaclorobenceno (HCB) ^{▲●} , hexaclorobutadieno [▲] , alfa-hexaclorociclohexano [●] , beta-hexaclorociclohexano [●] , lindano [●] , mirex [●] , pentaclorobenceno [●] , pentaclorofenol y sus sales y esteres [●] , bifenilos policlorados (PCB) [▲] , naftalenos policlorados [▲] , endosulfal técnico y sus isómeros afines [●] , éter de tetrabromodifenilo y éter de pentabromodifenilo [▲] , toxafeno [●]
Anexo B (Restricciones)	DDT [●] , Ácido sulfónico de perfluorooctano, sus sales y el fluoruro de sulfonilo perfluorooctano [▲]
Anexo C (Producto no intencional)	Hexaclorobenceno [■] (HCB), Pentaclorobenceno [■] , bifenilopoliclorados [■] (PCB), Dibenzo-p-dioxinas policloradas [■] , Dibenzofuranos policlorados [■] (PCDD / PCDF), naftalenos policlorados [■] .
● Pesticidas ▲ Químicos Industriales ■ Productos no intencionales	

El Convenio de Estocolmo, a través del artículo 16, exige un proceso para evaluar su eficacia, en particular, el progreso hacia la reducción y eliminación de los COPs a nivel mundial. La eficacia de la Convención se evalúa periódicamente sobre la base de la información científica, ambiental, técnica y socioeconómica disponible (United Nations Environment Programme, 2015). Por eso se crea el “**Plan de Vigilancia Mundial**” (PVM) de los COPs, que tiene como objetivo proporcionar un marco organizativo armonizado para la recolección de datos de vigilancia comparables sobre la presencia de los COPs registrados en los anexos A, B y C del Convenio de Estocolmo, a fin de determinar tendencias en los niveles a lo largo del tiempo, así como para proporcionar información sobre su transporte regional y mundial en el medio ambiente (United Nations Environment Programme, 2015).

Como se ha mostrado anteriormente, los COPs son una amplia familia de sustancias químicas, que actualmente comprende 23 tipos. De acuerdo a los objetivos planteados en este trabajo que pretende determinar en medida los pesticidas organoclorados y químicos industriales en leche materna, se entrega una breve reseña de estos contaminantes.

1.2. Antecedentes Específicos

1.2.1. Pesticidas



La Agencia Estatal de Protección del Ambiente de los Estados Unidos (EPA) define los pesticidas como cualquier sustancia o mezcla de sustancias químicas, de origen natural o sintético, destinadas a matar, repeler, atraer, regular o interrumpir el crecimiento de seres vivos considerados como plagas (EPA, 2015).

Los pesticidas han sido utilizados por la sociedad desde hace miles de años. Los primeros vestigios del uso de pesticida remontan alrededor del año 1000 A.C, y se trata del uso de azufre, que era quemado para fumigar las casas griegas (Baird & Cann, 2008).

El uso de insecticidas ha reducido en gran medida las incidencias de enfermedades transmitidas por insectos y roedores (vectores), como son: la malaria, la fiebre amarilla, peste bubónica, enfermedad del sueño. Otra motivación principal para el uso de insecticidas es evitar que los insectos ataquen los cultivos alimentarios. Sin embargo, incluso con el uso extensivo de pesticidas, alrededor de un tercio del rendimiento del cultivo total del mundo es destruido por plagas o malezas durante el crecimiento, cosecha y almacenamiento (Baird & Cann, 2008).

1.2.2. Plaguicidas Organoclorados

Los **plaguicidas organoclorados (OCPs)** fueron desarrollados durante y después de la Segunda Guerra Mundial, reemplazando en gran medida los plaguicidas de primera generación (plaguicidas inorgánicos) (Baird & Cann, 2008).

Dentro de las propiedades de los OCPs se destacan las siguientes:

- Estabilidad frente a la degradación en el medio ambiente.
- Baja solubilidad en agua, a menos que el oxígeno o nitrógeno está presente también en las moléculas.
- Alta solubilidad en presencia de moléculas apolares.
- De acuerdo a las dosis resulta una alta toxicidad para los insectos, pero una baja toxicidad para los seres humanos (Baird & Cann, 2008; Mattice, 2010).

El **dicloro difenil tricloroetano**, comúnmente conocido como **DDT**, (Figura 6), desarrollado fue el primer insecticida. Se sintetizó originalmente en 1874 y fue redescubierto por el químico suizo Paul Hermann Müller en 1939, al notar el efecto tóxico del DDT contra varios insectos. Fue utilizado inicialmente en la Segunda Guerra Mundial entre los soldados como piojicida (Figura 7), aunque generó muchas intoxicaciones agudas entre las tropas (Mattice, 2010). No obstante, el DDT mostró gran eficacia para combatir a los mosquitos que transmiten la malaria, el tifus y otras enfermedades humanas propagadas por insectos. En igual medida se valoró su eficacia en el control de plagas de los cultivos (Mattice, 2010; Baird & Cann, 2008).

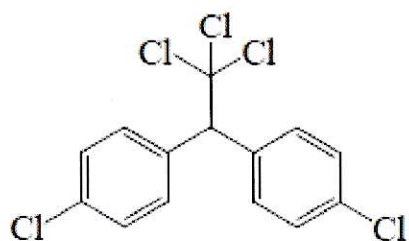


Figura 6. Molécula de Diclorodifeniltricloroetano (DDT).

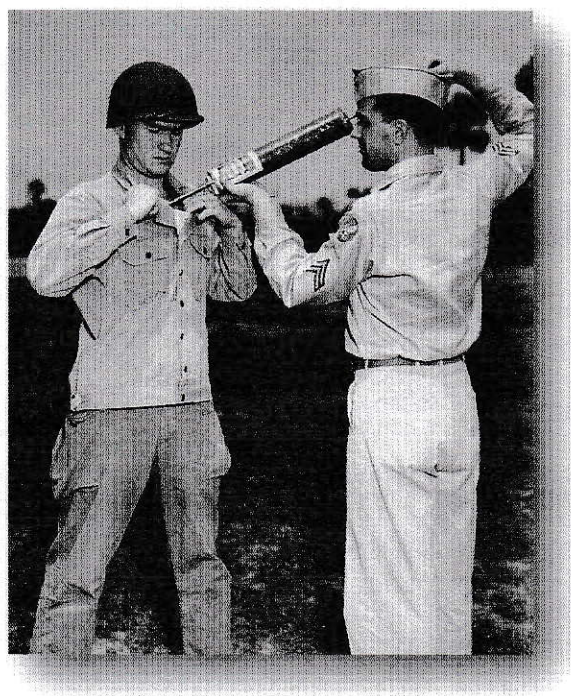


Figura 7. Fotografía de la Segunda Guerra Mundial, soldado Estadounidense rociado con DDT (Fotografía: Centers for disease control and prevention).

El **hexaclorobenceno (HCB)** (Figura 8), es estable, fácil de preparar, a partir de cloro y benceno. Después de la Segunda Guerra Mundial se utilizó masivamente como fungicida agrícola para cultivos de cereales, puesto que es extremadamente persistente. Además aún se emite como un subproducto en las industrias químicas y en los procesos

de combustión, siendo considerado como un contaminante ambiental generalizado (Baird & Cann, 2008).

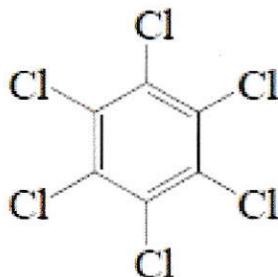


Figura 8 . Molécula de hexaclororobbenzo (HCB).

Si bien los OCPs fueron muy útiles para controlar plagas, en los años 1960 comenzaron a aparecer algunos antecedentes negativos adjudicado al uso del DDT, que desataron la actividad de los primeros ecologistas en su contra. Rachel Carson, científica naturalista escribió "La Primavera Silenciosa" (1962) donde denunciaba la ausencia del "canto de los pájaros" en los campos de Ohio (EE UU) y responsabilizaba de ello al uso del DDT. Este hito fue el primer paso de una gigantesca campaña que logró la prohibición del DDT para uso agrícola (Baird & Cann, 2008).

1.2.2.1. Bifenilos Policlorados

Los **bifenilos policlorados** (PCBs), son un grupo de productos químicos industriales organoclorados, cuya estructura consta de dos anillos de benceno unidos por un enlace simple formado entre dos átomos de carbonos (Figura 9). La producción se genera a partir de la molécula de bifenilo con cloro molecular en presencia de cloruro ferroso como catalizador, en el cual algunos átomos de hidrogeno son reemplazados por los átomos de cloro.

El principal período de fabricación tuvo lugar entre 1930 y finales de 1970 en los Estados Unidos (Programa de Vigilancia y Evaluación del Ártico, 2000).

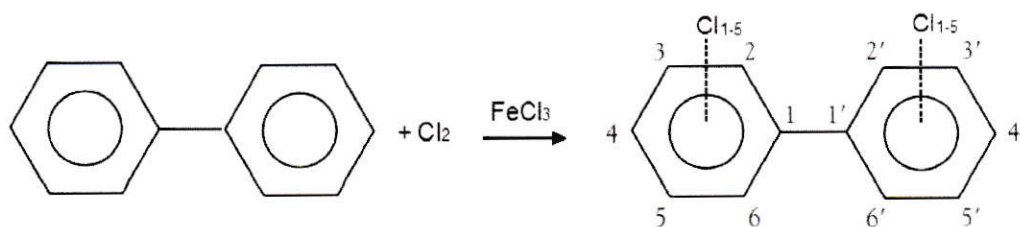


Figura 9. Cloración de la molécula de bifenilo

Los PCBs se convirtieron en una importante preocupación entre los años 1980 y 1990, debido a su potencial impacto en el medio ambiente y en la salud humana, especialmente en materia de crecimiento y desarrollo (Baird & Cann, 2008).

1.2.2.2. Fuentes de Bifenilos Policlorados

Debido a sus propiedades fisicoquímicas y bajo costo de producción, se utilizaron ampliamente como fluidos refrigerantes en los transformadores de potencia, condensadores, intercambiadores de calor, sistemas hidráulicos (Figura 10).

Más tarde se emplearon como plastificantes, en papel de copia sin carbón, como disolventes en el reciclaje de papel de periódico, como fluidos de transferencia de calor en maquinaria, y en agentes impermeabilizantes (Baird & Cann, 2008).

Debido a su estabilidad y su uso extenso, junto con la eliminación descuidada, se convirtieron en contaminantes ambientales generalizados y persistentes, en el Mundo (Ritter y col, 1995). A partir de la década de los 1970, los productores reducen o detienen la producción de PCBs. Sin embargo, siguen siendo motivo de gran preocupación ambiental debido a las cantidades almacenadas en numerosos sitios, las fugas de los vertederos y rellenos sanitarios, deposición atmosférica, la persistencia y toxicidad de los metabolitos de PCB y la falta de conocimiento respecto de sus efectos toxicológicos, sobre todo después de la exposición crónica (Wiberg, 2002).

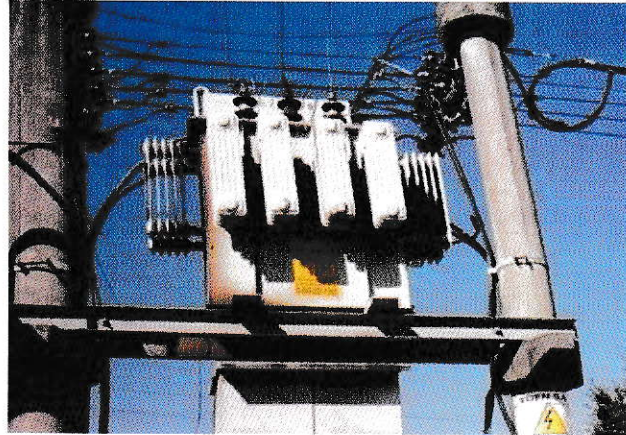


Figura 10. Etiqueta adosada a transformadores de potencia, condensadores, intercambiador de calor, sistemas hidráulicos, donde se señala un manejo y eliminación especial de los PCBs (Baird & Cann, 2008).

1.2.3. Matriz Biológica de monitoreo

Los análisis de COPs pueden ser ejecutados sobre una amplia variedad de matrices, pero las concentraciones en las muestras pueden diferir a través de muchos órdenes de magnitud (Inecc, 2013).

El **biomonitoreo** se ha convertido es una herramienta indispensable para el estudio ocupacional y ambiental a la exposición de químicos, incluyendo los COPs. El uso del biomonitoreo sirve para entender la exposición potencial de fuente específica o para la identificación histórica de los niveles de exposición de un contaminante. Para ello se requiere la consideración de algunos factores, como; las diferentes propiedades toxicocinéticas, problemas en la determinación analítica y la medición de la concentración de los contaminantes en matrices biológicas humanas.

1.2.3.1. Leche Materna

Los datos del monitoreo a través de la leche materna, pueden proporcionar información sobre la exposición de la madre y también del lactante. Además, estos datos pueden indicar la necesidad de tomar medidas para disminuir las concentraciones de estas sustancias en los alimentos, que son la principal fuente de exposición para la

mayoría de las personas (United Nations Environment Programme UNEP, 2012). Recientemente se ha reconocido que la leche humana es una matriz ideal para vigilar las concentraciones de contaminantes orgánicos en el medio ambiente en general, por tener algunas ventajas importantes: (PNUMA, 2007)

- La recolección de leche humana, es un método de muestreo no invasivo. (United Nations Environment Programme UNEP, 2012).
- Proporciona importante información en materia de exposición relativa a la transferencia de los contaminantes desde la madre al lactante, por medio de la lactancia (PNUMA, 2007).
- Los niveles de lípidos de la leche materna son aproximadamente diez veces más altos que los niveles de lípidos de la sangre (PNUMA, 2007). Esto permite que el método de extracción sea mas idóneo para el propósito y la precisión de las mediciones más altas (United Nations Environment Programme ,UNEP, 2012).

Por otra parte, la incorporación de estos productos químicos por el niño a través de la leche es de gran relevancia toxicológica (Figura 11) (Stockholm Convention, 2008), porque en el periodo de lactancia son vulnerables (Ritter y col., 1995). Ellos no tienen un mecanismo de desintoxicación totalmente desarrollado, su sistema inmune es inmaduro y sus órganos están en el proceso de crecimiento rápido (Stockholm Convention, 2008).

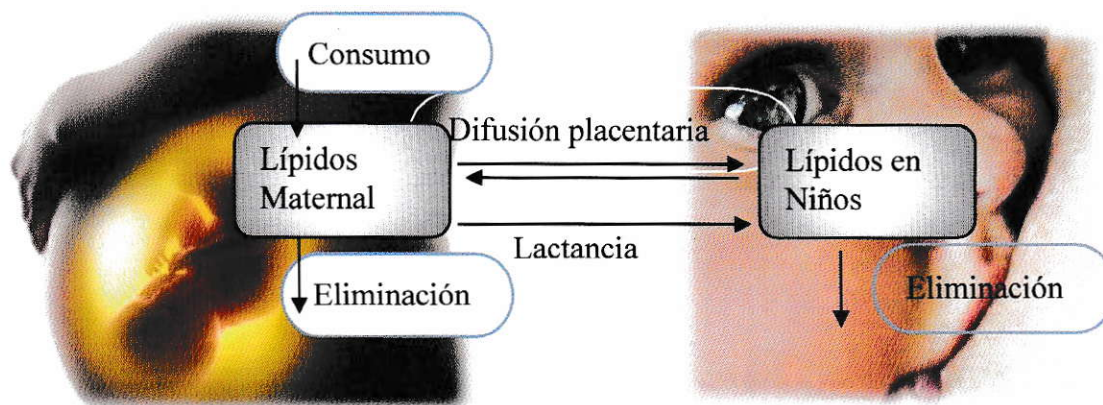


Figura 11. Vías de ingreso de COPs desde la madre al feto o aun recién nacido a través de la lactancia (Stockholm Convention, 2008).

1.2.4. Metodología analítica

1.2.4.1. Cromatografía de gases

La cromatografía de gases (CG) ha demostrado ser un método versátil, y sensible para el análisis de residuos de COPs (Mattice, 2010). En los últimos 30 años, la mayoría de los análisis de rutina de residuos de organoclorados se han realizado mediante CG combinada con detección por captura de electrones (DCE).

Ha habido ciertas dificultades en la confirmación de los resultados, debido a complejidad de las muestras, por lo que es necesario utilizar más de un tipo de columna o detector. El Detector Selectivo de Masa (DSM) ha permitido la determinación simultánea y confirmación de contaminantes orgánicos en una serie de análisis, mejorando la precisión analítica y acortando los tiempos de análisis. Esto es debido a una base de datos uniforme de la ionización electrónica (IE), lo que permite obtener una biblioteca única de espectros (Baird & Cann, 2008).

1.2.4.2. Detector de Captura de Electrones

El DCE ha llegado a ser ampliamente utilizados para el análisis de muestras ambientales, ya que es sensible a compuestos orgánicos que contienen halógenos, como son los plaguicidas y los bifenilos policlorados (Martins y col., 2013).

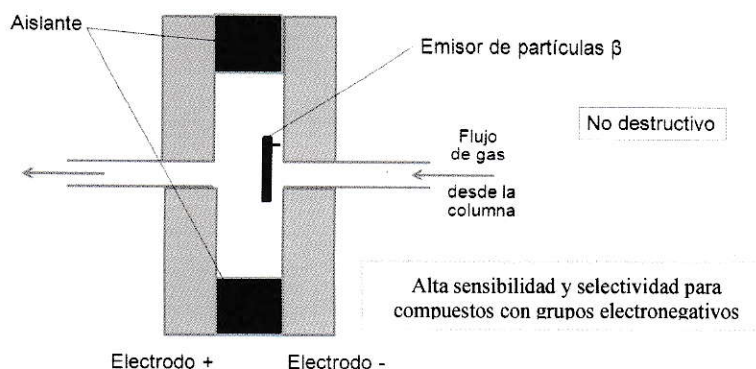
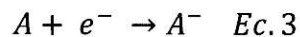
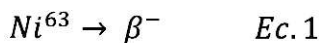


Figura 12. Esquema del funcionamiento del detector de captura de electrones, y la emisión de partículas β (Skoog y col., 2008).

Su funcionamiento se basa (Figura 12), en un isótopo radiactivo, por lo general Ni^{63} , que emite una partícula beta desde la célula del detector (Ecuación 1). Un electrón del emisor provoca la ionización del gas portador, con frecuencia nitrógeno, produciendo electrones de energía más altos (Ecuación 2), y la producción de una ráfaga de electrones.

Cuando no hay especies orgánicas se forma una corriente constante entre un par de electrodos a causa de este proceso de ionización. En cambio cuando una molécula con grupos funcionales electronegativos entra en la celda, captura algunos electrones (Ecuación 3), por lo la corriente recogida disminuye de manera notable (Skoog y col., 2008), siendo proporcional la señal a la cantidad de moléculas presentes.



Este tipo de detector es de respuesta selectiva. Identifica compuestos como halógenos, peróxidos, quinonas y grupos nitro; en cambio, es insensible a grupos funcionales como aminas, alcoholes e hidrocarburos (Agilent Technologies, 2002; Skoog y col., 2008).

1.2.4.3. Detector selectivo de Masa

La cromatografía acoplada a detector selectivo de masa (DSM) se basa en la producción de iones a partir de moléculas neutras y en el examen de la posterior descomposición de estos iones. Los iones obtenidos para cada sustancia son característicos y nos pueden proporcionar información cualitativa y cuantitativa a la vez de la misma estructural.

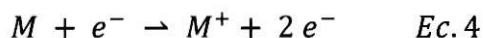
La espectrometría de masa es una gran herramienta analítica, con la cual es posible alcanzar una elevada sensibilidad, incluso hasta niveles de pg/L, debido a su altísima especificidad. Además, presenta la habilidad única de medir los iones con masa exacta, proporcionando información de la composición elemental, permitiendo establecer las rutas de fragmentación (Skoog y col., 2008).

Un espectrómetro de masa consta básicamente de tres partes básicas que son: la fuente de ionización, el analizador de masas y el transductor/detector (Figura 13).



Figura 13. Etapas para la medición de masa de un analito en un detector selectivos de masa (Mattice, 2010).

• **Fuente de Ionización:** Principalmente existen dos métodos para producir la ionización de la muestra en estado gaseoso; la ionización por impacto o bombardeo electrónico, que es el más utilizado, y la ionización química. El Impacto Electrónico (Electron Impact EI) o comúnmente llamado Ionización Electrónica (Electron Ionization EI) es un método clásico de generación de iones en espectrometría de masas utilizado aún en muchas aplicaciones. El analito es introducido dentro de la fuente de ionización que esta al vacío ($< 10^{-6}$ mbar) y subsecuentemente ionizado por colisiones con un flujo de electrones (a 70 eV) (Skoog y col., 2008).



• **Analizador de masas:** lleva a cabo la separación de los iones producidos por diferentes métodos en una fuente de iones, de acuerdo a su relación masa/carga (m/z) para que puedan llegar al detector. En los experimentos de espectrometría de masas aparecen dos clases principales de iones, el ion molecular, que es la molécula completa del analito, y fragmentos iónicos, los cuales contienen solo una parte de la estructura. La masa molar de una molécula puede ser calculada de la razón m/z del ion molecular, si la carga (z) es conocida, la información estructural se obtiene a partir de las m/z de los fragmentos del ion (Plascencia Villa, 2003; Skoog y col., 2008).

• **Medida, amplificación y creación de espectros de masas:** Un espectrómetro de masas contiene un transductor que convierte el haz de iones en una señal eléctrica que pueda ser procesada, almacenada en la memoria de una computadora y mostrada en una pantalla o almacenada en otros medios. Para que la amplificación se desarrolle correctamente requieren un complejo sistema de vacío para mantener una presión baja en todos los componentes, excepto en los sistemas para procesar la señal y la lectura. La presión baja asegura colisiones no frecuentes en el

espectrómetro de masas para producir y conservar iones y electrones libres (Skoog y col., 2008).

1.3. Técnicas de extracción y preparación de muestras

En general, los métodos analíticos implican procesos como la toma de muestras, preparación de muestras, separación, detección y análisis de datos. Más de 80% del tiempo de análisis se consume en el muestreo y preparación de las muestras, tales como extracción, concentración, fraccionamiento y aislamiento de los analitos. A continuación se describe los métodos de extracción líquido-líquido, extracción fase sólida y el método QuEChERS, aunque se puede emplear varios otros métodos de extracción y preparación de muestras (Skoog y col, 2008).

1.3.1. Extracción líquido-líquido

La extracción líquido-líquido (ELL), consiste en la extracción de un soluto de un líquido a otro líquido (Figura 14), Por lo general es deseable que los dos líquidos sean parcialmente miscible o inmiscibles (Martins y col., 2013). Es necesario utilizar una cantidad adecuada de disolvente de extracción para capturar todos los analitos de la muestra original (CHROMacademy, 2015).

Para muestras de leche líquida, la extracción líquido-líquido sigue siendo el método preferente para la extracción de OCPs, este proceso consiste en agitar la muestra de leche líquida por un tiempo, en selección de un solvente orgánico para extraer los residuos de pesticidas desde el volumen de leche (Watson, 1999).

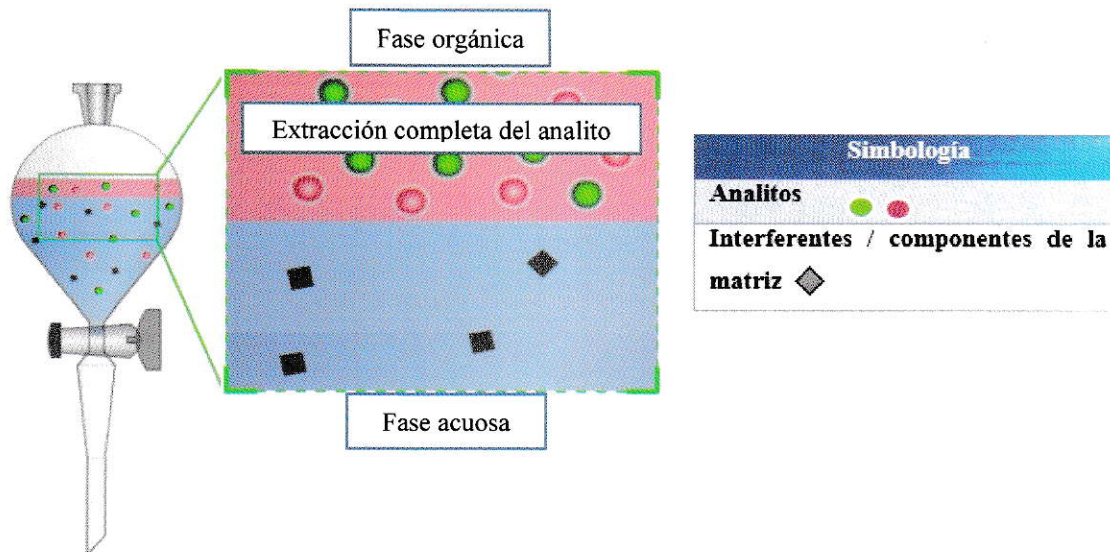


Figura 14. Extracción líquido-líquido entre una fase orgánica inmisible con una fase acuosa (CHROMAcademy, 2015).

1.3.2. Extracción fase sólida

La extracción en fase sólida (EFS) es una técnica muy popular, actualmente disponibles para la preparación rápida y selectiva de muestras. La versatilidad de la EFS permite el uso de esta técnica para muchos propósitos, tales como la purificación, el enriquecimiento de trazas, la desalinización, la derivatización, etc (Martins y col., 2013). El principio es similar a la extracción líquido-líquido (ELL), que implica una partición de los solutos entre dos fases. Sin embargo, en lugar de dos fases líquidas inmiscibles, como en la ELL, la EFS implica una partición entre un líquido (matriz de la muestra o disolvente con analitos) y una fase sólida (adsorbente). El procedimiento general es cargar una solución sobre la fase sólida, lavar los componentes no deseados, y luego eluir los analitos deseados con otro disolvente en un tubo de recogida (Figura 15).

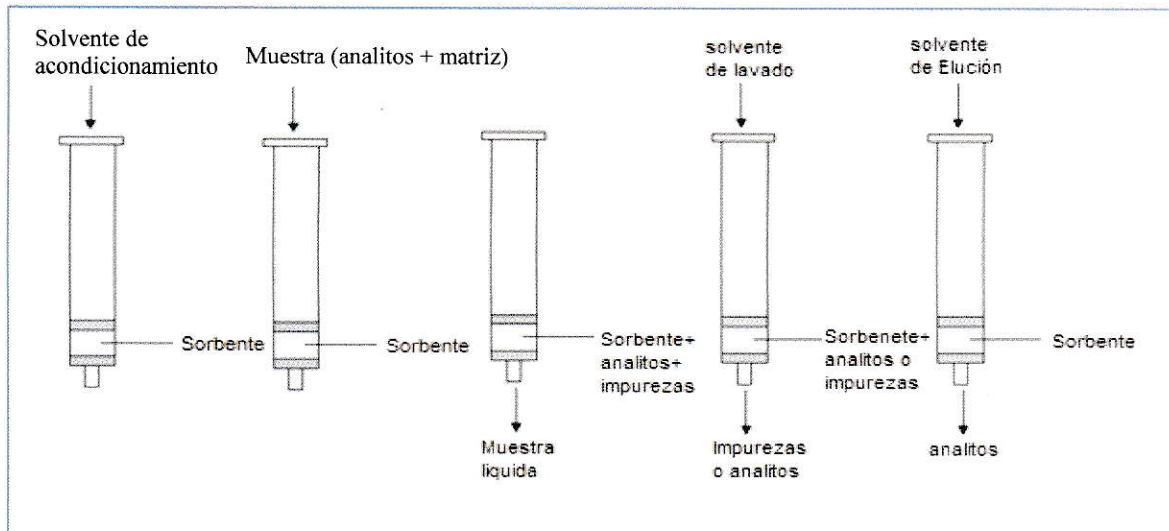


Figura 15. Etapas de la técnica de extracción en fase sólida (Martins y col., 2013).

1.3.3. Extracción por método QuEChERS

El método de extracción QuEChERS, acrónimo en inglés que significa rápido, fácil, económico, efectivo, sólido y seguro (**Quick Easy Cheap Effective Rugged Safe**). Se ha vuelto muy popular, ya que ha sido demostrado ser una metodología potente en el análisis de residuos de plaguicidas en los productos alimenticios. Este método permite la extracción simultánea de compuestos polares y no polares con adecuadas recuperaciones, y por lo tanto puede ser adecuado para la extracción de una amplia gama de compuestos (J.T.Baker, 2012).

QuEChERS es un método rápido y conveniente reemplazo para ELL, suministrando resultados de alta calidad en un número mínimo de pasos y con bajo consumo de solvente y material de vidrio. El método se basa en dos etapas, el primero de extracción y el segundo de purificación mediante la Extracción en Fase Sólida Dispersiva (EFSd). En la primera etapa se adiciona un estándar interno (EI), acetonitrilo y las sales buffer a una pequeña muestra homogenizada, el que permite extraer los analitos de interés en la capa orgánica. La segunda etapa se emplea EFSd apropiado en función del tipo de matriz que vaya a analizar y el método empleado. En este paso, se añade una alícuota del extracto obtenido de la muestra en la primera etapa, a una

pequeña cantidad de sorbente EFSd y $MgSO_4$. El sorbente retira impurezas de la matriz que puedan interferir, mientras que el $MgSO_4$ ayuda a eliminar el exceso de agua y mejora el reparto de los analito (Agilent Technologies, 2011).

Las fases de EFSd que se han usado hasta ahora como sorbente en el método QuEChERS son: amina primaria-secundaria (PSA) para la eliminación de ácidos, pigmentos polares y azúcares; C18 para la eliminación de lípidos y componentes no polares y Carbón grafitado (GCB) para la eliminación de pigmentos de color como la clorofila (Tabla 4).

Tabla 4. Composición kits QuEChERS de acuerdo a las característica de la matriz (Agilent Technologies, 2011).

Característica de las frutas o verduras	$MgSO_4$ (mg)	Sorbente PSA (mg)	C18 (mg)	Carbón grafitado (GCB) (mg)
Alto contenido acuoso	150	25		
Alto contenido lípidos	150	25	25	
Alto contenido en clorofila/carotenoides	150	25		2,5-10

1.4. Parámetros de validación del método analítico

La validación es el establecimiento de la evidencia documentada, de que un procedimiento analítico conducirá, con un alto grado de seguridad, a la obtención de resultados precisos y exactos, dentro de las especificaciones y los atributos de calidad previamente establecidos (Martins y col., 2013).

Las razones que justifican el método analítico son:

- Demostrar que los métodos son adecuados a los análisis propuestos en condiciones descritas.

- Trabajar con métodos que entreguen confianza y seguridad en los resultados, lo que a su vez minimizará el número de fallas y repeticiones, permitiendo un importante ahorro de costos.

Los métodos cualitativos y cuantitativos de análisis de COPs exigen la definición de una serie de parámetros cuyo cumplimiento es necesario para la validación. En la Figura 16 se muestran los parámetros para la validación del método analítico en la determinación de COPs en leche materna.

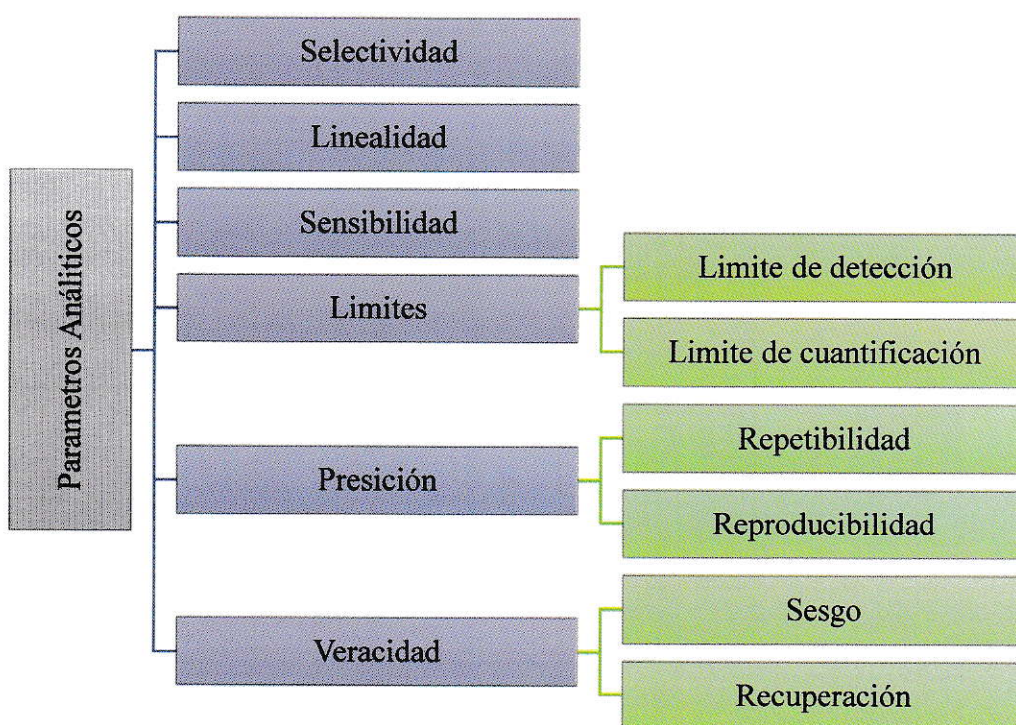


Figura 16. Parámetros analíticos empleados para la validación del método analítico implementado para la determinación de COPs en leche materna.

1.4.1. Selectividad

La selectividad es la capacidad de un método analítico para medir y/o identificar simultáneamente o separadamente a los analitos de interés, de forma inequívoca, en presencia de otras sustancias químicas que puedan estar presentes en la muestra.

La selectividad de un método analítico se debe determinar antes de iniciar el estudio de cualquier otro parámetro de validación. Como norma general, se comparan los resultados del análisis de muestra con o sin analitos en presencia o ausencia de impurezas, producto de degradación, sustancias relacionadas (A.E.F.I, 2001; SANCO, 2010).

1.4.2. Linealidad

La linealidad se define como la capacidad del método para proporcionar resultados que son directamente proporcionales a la concentración del analito en la muestra dentro de un rango establecido.

Frecuentemente se utiliza como criterio de la linealidad:

- El coeficiente de determinación como índice (r^2) elevado, $r^2 > 0,98$.
- Evaluación de curva de calibración global, constituida con más de una curva calibración de las mismas características, el que debe presentar un r^2 promedio mayor a 0,98 evaluada estadísticamente con prueba t-Student.

La evaluación estadística de la linealidad no implica solamente una representación gráfica, sino que es necesario realizar una comprobación estadística (A.E.F.I, 2001).

1.4.2.1. Ecuación de la recta

La pendiente de la recta se encuentra relacionada con la sensibilidad del método de forma que mayor pendiente mayor sensibilidad. El termino independiente, es indicativo del error sistemático, no difiriendo estadísticamente de cero en caso que no existe sesgo.

1.4.2.2. Coeficiente de correlación (r) y determinación (r^2)

El coeficiente de correlación indica el grado de relación entre la variable X y la variable Y. Este se evalúa estadísticamente mediante la prueba t-student, como indicador

del modelo lineal. Se calcula el valor t con n-2 grados de libertad (Tabla 25, Anexo) y se compara con el valor tabulado de t para el nivel de confianza requerido $\alpha=0,05$, para un valor "n" que depende de los niveles de calibración (Ecuación 5).

$$t_r = \frac{|r|\sqrt{(n-2)}}{\sqrt{(1-r^2)}} \text{ Ec. 5}$$

donde t_r es el valor estimador t-student obtenido para el coeficiente de correlación, $|r|$ es el valor absoluto del coeficiente de correlación, n-2 es el numero grados de libertad, r^2 es el valor del coeficiente de determinación.

1.4.3. Límites

Es la cantidad mínima de analito requerida para obtener un resultado significativo. Está relacionada con los términos límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC) del método (A.E.F.I, 2001).

1.4.3.1. Límite de detección del método

Es la concentración más baja de un compuesto analizado en una matriz tal que, cuando se somete a todos los pasos de un método completo, incluida la extracción química y el tratamiento previo, produce una señal detectable con una fiabilidad, estadísticamente diferente de la producida por un "blanco" en las mismas condiciones (Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec, 2015).

La determinación LD se realiza de acuerdo a los siguientes pasos:

- Estimar el LD.
- Establecimiento del LD.
- Evaluación de la relación de cumplimiento.

La estimación del límite de detección del método (LM) se puede realizar de acuerdo a los siguientes parámetros:

- La concentración se muestra en la literatura para un método equivalente.
- La concentración correspondiente a una relación señal / ruido de 3: 1 en la matriz apropiada.
- La concentración correspondiente al límite de detección (LD).
- La concentración equivalente a 3 veces la desviación estándar de un estándar de nivel bajo en un disolvente adecuado.

La validación del método para la determinación de COPs se lleva de acuerdo al cuarto punto nombrado.

$$LM = 3 \times s \text{ Ec. 6.}$$

donde LM es el límite de detección del método, y *s* es la desviación estándar de las réplicas evaluado en el punto más bajo de la curva.

1.4.3.2. Método de cálculo razón de conformidad (R)

El cálculo de la razón de conformidad permite determinar la validez de un enfoque para establecer un límite de detección. En general, si el resultado del cálculo de una relación R que se utiliza para establecer un límite de detección no es mayor que 4, debe repetirse el procedimiento para establecer el límite de detección, con una muestra que tiene una concentración más alta. Si este valor es mayor a 10, se debe repetir el procedimiento, con una muestra de concentración más baja. (Tabla 5) (Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec, 2015).

$$R = \frac{x}{LDM_{calculado}} = \frac{x}{3s} \text{ Ec. 7}$$

dónde: R = razón de conformidad, X: Promedio de las réplicas, S: desviación estándar de las réplicas, LDM: Limite de detección del método.

Tabla 5. Interpretación del valor de la razón de conformidad

Valor de R	Interpretación
4 < R < 10	La concentración utilizada es adecuada.
R < 4	Esta relación indica que el límite real del método de detección es mayor que el estimado límite de detección cuando se prueba.
R > 10	Esta relación indica que el límite real del método de detección es menor que el estimado límite de detección cuando se prueba.

1.4.3.3. Límite de cuantificación del método

El límite de cuantificación de un método es la concentración mínima que puede ser cuantificado por un método analítico con una fiabilidad definida. Es la concentración equivalente a 10 veces la desviación estándar obtenida en el establecimiento de la MDL (Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec, 2015).

$$LC = 10 \times s \quad \text{Ec. 8}$$

donde LC: límite de cuantificación del método y s la desviación estándar.

1.4.4. Precisión

Es la capacidad de un método para proporcionar resultados próximos entre sí. Se puede estudiar dos niveles de acuerdo a la Figura 17.

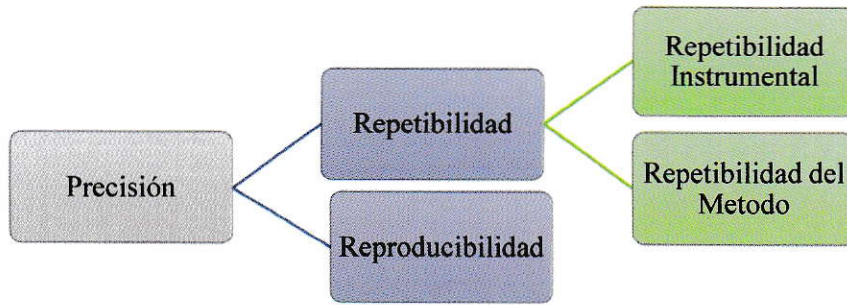


Figura 17. Evaluación de la precisión con respecto a la repetibilidad y la reproducibilidad.

1.4.4.1. Repetibilidad

La repetibilidad (r) es la coincidencia entre los resultados de mediciones sucesivas realizadas bajo las mismas condiciones de medición, en el mismo laboratorio por el mismo operador, utilizando el mismo equipamiento dentro de intervalos cortos de tiempo. Se puede determinar registrando a lo menos 6 mediciones bajo las mismas condiciones de un analito en un material de referencia (A.E.F.I, 2001). Se calcula de acuerdo a la Ecuación 9.

$$CV_r\% = \frac{\sigma}{|x|} \times 100 \quad \text{Ec. 9}$$

donde σ es la desviación estándar de la concentración y $|x|$ es el valor promedio absoluto de la concentración.

La evaluación de la repetibilidad se acepta si el coeficiente de variación obtenido en la experiencia es menor al coeficiente de variación de Horwitz en condiciones de repetibilidad, Ecuación 10.

$$CV_r\% < CV_{r-h}\% \quad \text{Ec. 10}$$

La determinación del coeficiente de variación Horwitz se determina mediante la Ecuación 11 (Instituto de Salud Pública., 2010).

$$CV_h \% = 2^{(1-0.5 \log c)} \quad \text{Ec. 11}$$

en donde $CV_h \%$ es el coeficiente de variación de Horwitz y c es la concentración expresada en potencia en base 10.

El coeficiente de variación de Horwitz para la repetibilidad ($CV_{r-h} \%$) se determina a partir de la Ecuación 12 (Instituto de Salud Pública., 2010).

$$CV_{r-h} \% = \frac{CV_h \%}{2} \quad \text{Ec. 12}$$

A medidas que se trabaja a concentración baja, coeficiente de variación de Horwitz es mayor. Esto se puede ver graficado en la Figura 39 (Anexo).

1.4.4.2. Reproducibilidad

La reproducibilidad (R) indica el grado de acuerdo entre resultados mutuamente independientes de un ensayo obtenidos con el mismo método, en condiciones analíticas diferentes tales como, diferentes operadores, usando distintos equipos, entre otros. Para determinar la precisión de la reproducibilidad, se puede realizar 3 mediciones de un material de referencia o material control. El coeficiente de variación de reproducibilidad se calcula de acuerdo a la Ecuación 13.

$$CV_R \% = \frac{\sigma}{|x|} \times 100 \quad \text{Ec. 13}$$

en donde σ es la desviación estándar de la concentración y $|x|$ es el valor promedio absoluto de la concentración.

La evaluación de la repetibilidad se acepta si el coeficiente de variación obtenido en la experiencia es menor al coeficiente de variación de Horwitz en condiciones de reproducibilidad (Ecuación 14).

$$CV_R \% < CV_{R-h} \% \quad \text{Ec. 14}$$

La determinación del coeficiente de variación Horwitz se determina mediante la Ecuación 15 (Instituto de Salud Pública., 2010).

$$CV_h\% = 2^{(1-0.5 \log c)} \quad \text{Ec. 15}$$

donde $CV_h\%$ es el coeficiente de variación de Horwitz y c es la concentración expresada en potencia en base 10. En la Tabla 6 se muestra el $CV_h\%$ en función de las diferentes concentraciones del analito, con los valores orientativos aceptable para los métodos.

El coeficiente de variación de Horwitz para la repetibilidad ($CV_{R-h}\%$) se determina a partir de la Ecuación 16 (Instituto de Salud Pública., 2010).

$$CV_{R-h}\% = \frac{2CV_h\%}{3} \quad \text{Ec. 16}$$

Tabla 6. Límite máximo del coeficiente de variación, aceptable para análisis de impurezas en función de la concentración del analito (A.E.F.I, 2001).

Concentración % del analito	Relación (base 10)	Unidades de concentración	CV (%)
10	10^{-1}	10%	2,8
1	10^{-2}	1%	2,7
0,1	10^{-3}	0,1%	3,2
0,01	10^{-4}	100 mg/L	5,2
0,001	10^{-5}	10 mg/L	7,3
0,0001	10^{-6}	1 mg/L	11
0,00001	10^{-7}	100 µg/L	15
0,000001	10^{-8}	10 µg/L	31
0,0000001	10^{-9}	1 µg/L	30

1.4.5. Exactitud (Veracidad)

La exactitud de un procedimiento analítico expresa la proximidad entre el valor que es aceptado convencionalmente como valor verdadero o un valor de referencia y el valor experimental encontrado. Este valor se puede determinar por recuperación (A.E.F.I, 2001).

1.4.5.1. Recuperación

Es el grado de conformidad entre el resultado y el valor de referencia aceptado. En la práctica, las muestras de control son las más utilizadas para la adición de analito en una concentración generalmente equivalente al medio del rango de trabajo. Se calcula de acuerdo a la Ecuación 17

$$R = \frac{C_e - C_0}{C_a} \times 100 \quad \text{Ec. 17}$$

donde C_e es la media de los resultados de la muestra con adición de analito, C_0 es la media de los resultados de la muestra y C_a es la cantidad agregada de analito. Al igual que el caso anterior, se debe realizar una prueba de t-Student, en el cual el valor esperado corresponderá al 100%.

La recuperación esperada depende del tipo de matriz, del procedimiento de la preparación de la muestra y de la concentración de la misma. Los valores orientados aceptables según la AOAC en función de la concentración del analito se resumen en la Tabla 7 (A.E.F.I, 2001).

Tabla 7. Valores aceptables de recuperación de acuerdo a la concentración del analito.

Concentración % del analito	Relación (base 10)	Unidades de concentración	Factor % Recuperación
100	1	100	98-102
≥10	10 ⁻¹	10%	98-102
≥1	10 ⁻²	1%	97-103
≥0,1	10 ⁻³	0,1%	95-105
0,01	10 ⁻⁴	100 mg/L	90-107
0,001	10 ⁻⁵	10 mg/L	80-110
0,0001	10 ⁻⁶	1 mg/L	80-110
0,00001	10 ⁻⁷	100 µg/L	80-110
0,000001	10 ⁻⁸	10 µg/L	60-115
0,0000001	10 ⁻⁹	1 µg/L	40-120

1.5. Objetivos

1.5.1. Objetivo General

Desarrollar y validar un método analítico para determinar variaciones en el tiempo de la exposición de la población a COPs, de acuerdo con el Convenio de Estocolmo.

1.5.2. Objetivos Específicos

- Determinar las condiciones experimentales óptimas para el análisis y cuantificación de COPs mediante cromatografía gaseosa con detector de captura de electrones y detector de masa.
- Evaluar métodos de extracción de Pesticidas Organoclorados y Bifenilos Policlorados en leche de vaca, alternativos al método oficial diseñado por la UNEP.
- Optimizar la extracción cuantitativa de Pesticidas Organoclorados y Bifenilos Policlorados, a partir de muestras enriquecidas, utilizando como matriz leche vaca.
- Establecer parámetros de calidad analítica en términos de sensibilidad, linealidad, límites de detección y cuantificación, Precisión intermedia, para el método a desarrollar, en leche materna.

II - MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Materiales

- Matraz de aforo de 1 y 10 mL clase A.
- Probeta de 10, 50 y 100 clase A.
- Micropipeta Brand 10-200 μ L.
- Micropipeta Eppendorf 100-1000 μ L y de 1000-10000 μ L.
- Pipetas Pasteur de 3 mL.
- Vaso precipitado 100 y 250 mL.
- Tubos polipropilenos para extracción QuEChERS de 50 mL.
- Tubos polipropilenos para clean-up de 15 mL
- Tubos de ensayo de vidrio de 10 mL.
- Recipientes para masar.
- Navecillas de vidrio para masar estándares.
- Viales de 2 mL para autosampler.
- Inserto para viales de 2 mL.
- Envase de vidrio de 500 y 1000 mL con tapa rosca para solventes.
- Espátula y microespátula de acero inoxidable.
- Jeringas desechables de 10 mL.
- Filtro pirinola de 0,45 μ m de teflón o Nylon.
- Columna de vidrio para cromatografía de 20 cm de largo DI. 20 mm.

2.2. Equipos

- Cromatógrafo gaseoso acoplado a detector captura de electrones (GC-DCE) PerkinElmer modelo Clarus 580.
- Cromatógrafo gaseoso Agilent Technologies 7890A acoplado a Detector Selectivo de Masa (GC-DSM) Agilent Technologies 5975 C.
- Refrigerador para almacenar muestras y estándares.

- Campana con extractor de gases.
- Balanza analítica Sartorius TE Talent 210 g de división 0.1mg.
- Centrifuga refrigerada Hermle Z326K.
- Multi vortex digital Heidolph modelo multireax
- Evaporador con corriente de nitrógeno N-Biotek NB-503GBP.
- Baño ultrasonido Elma modelo E 120 H.
- Rotavapor IKA RV 10 Digital, con enfriador Senco DL-2004.
- Sistema de extracción al vacío Manifold.
- Estufa de secado LabTec.
- Generador de nitrógeno Peak Genius 3010.

2.3. Reactivos

- Acetona grado cromatografía LiChrosolv Merck.
- Acetonitrilo grado cromatografía líquida LiChrosolv Merck.
- Ácido fórmico 98-100% de pureza Merck.
- Amina primaria secundario PSA 40-63 μm Selectra UCT.
- Cloruro de sodio para análisis EMSURE.
- Dietil éter grado cromatografía ECD y FID SupraSolv Merck.
- Éter de petróleo Fisher Scientific.
- Isooctano grado cromatografía líquida LiChrosolv Merck.
- Lana de vidrio.
- Metanol grado cromatografía líquida LiChrosolv Merck.
- n-Hexano grado cromatografía LiChrosolv Merck.
- Octadecil 40-60 μm Selectra UCT.
- Óxido de aluminio Merck ácido activo 90 (0.0063-0.200 m.m).
- Sulfato de magnesio anhídrido para análisis EMSURE.

2.3.1. Estándar pesticidas organoclorados

Estándar certificados de pesticidas organoclorados de Aldrin, Cis-clordano, Trans clordano, 4,4'-DDT, 2,4'-DDT, 2,4'-DDE, 4,4'-DDD, Dieldrin, Endrin, Hexaclorobenceno, Heptacloro, Cis-heptacloroepoxido, Tran-heptacloroepoxido, Mirex, Clordecon, α -HCH, β -HCH, γ -HCH, α -endosulfan, β -endosulfan, Endosulfan sulfato, Endrin cetona, Endrin Aldehido, Alaclor D13, marca Dr. Ehrenstofer (Augsburg, Alemania). Los estándar 4,4'-DDE, 4,4'-DDD y 2,4'-DDE marca de Fluka (St Louis, Alemania). Todos con una pureza mayor al 97,0%. (Estructura molecular de los OCPs en la Figura 37, Anexo)

2.3.2. Estándar bifenilos policlorados y bifenilos policlorados como dioxinas (DL-PCB)

Estándar certificado de concentración 10 ng/uL de; 2,4,4'-Triclorobifenil (28)¹, 2,2',5,5'-Tetraclorobifenil (52), 2,2',4,5,5'-Pentaclorobifenil, 2,2',3,4,4',5'-Hexaclorobifenil (138), 2,2',4,4',5,5'-Hexaclorobifenil (153), 2,2',3,4,4',5,5'-Heptaclorobifenil (180), 3,3',4,4'-Tetraclorobifenil (77), 3,4,4',5-Tetraclorobifenil (81), 2,3,3',4,4'-Pentaclorobifenil (105), 2,3,4,4',5-Pentaclorobifenil (114), 2,3',4,4',5-Pentaclorobifenil (118), 2,3',4,4',5'-Pentaclorobifenil (123), 3,3',4,4',5-Pentaclorobifenil (126) marca Dr. Ehrenstofer (Augsburg, Alemania). (Estructuras molecular de los PCBs en la Figura 38, Anexo)

-
- ¹El número ubicado entre paréntesis, corresponde al nombre asignado por la IUPAC para nombrar los PCBs

2.4. Preparación de soluciones estándar

Se prepararon soluciones de pesticidas organoclorados de concentración ≈ 1000 $\mu\text{g/mL}$. Para ello se pesó aproximadamente 10 mg de cada estándar en una balanza analítica mediante navicilla, disolviéndolos posteriormente con acetona grado cromatografía en un matraz de aforo de 10 mL. A partir de la preparación anterior se realizaron soluciones intermedia de concentración 100 $\mu\text{g/mL}$, y subsecuentemente la preparación multiestándar de trabajo de concentración de 10 $\mu\text{g/mL}$.

A partir de los estándares de PCB y dl-PCB, se realizó la preparación multiestándar de trabajo de concentración de 1 $\mu\text{g/mL}$. Para ello se tomó una alícuota de 1000 μL de cada PCB y dl-PCB, y se llevó a un matraz de aforo de 10 mL, aforando con acetona grado cromatografía.

El estándar de Alaclor D13 fue utilizado como estándar subrogante, preparado de manera similar a los anteriores, disponiendo de una solución final de trabajo de 10 $\mu\text{g/mL}$.

Cada una de las soluciones preparadas se almacenó en un vial de 10 mL y se mantuvieron refrigeradas a una temperatura -20°C , hasta su análisis.

2.5. Condiciones cromatográficas

2.5.1. Condiciones de CG-DCE para pesticidas organoclorados y bifenilos policlorados

Para realizar los análisis en el equipo de CG-DCE, se utilizaron diferentes temperaturas para la columna, estableciendo aquellas con las que se obtuviera una óptima separación y menor tiempo de análisis. También se testeó dos temperaturas diferentes en el inyector (250°C y 270°C), concluyendo que la temperatura óptima es de 270°C . Bajo las condiciones de operación establecidas para el equipo de CG-DCE se identificaron los tiempos de retención de los pesticidas organoclorados, y los bifenilos policlorados (Tabla 8).

Tabla 8. Condiciones cromatográficas para la determinación de COPs por GC-DCE/DSM

	Determinación de OCPs	Determinación de PCBs	Determinación de OCPs y PCBs
Detector	Captura de electrones (ECD)	Captura de electrones (ECD)	Selectivo de masas (MSD)
Columna	HP-5MS (0.25mm i.d x 30m x 0.25µm)	HP-5MS (0.25mm i.d x 30m x 0.25µm)	HP-5MS (0.25mm i.d x 30m x 0.25µm)
Temperatura Horno	100 °C (1 min) 20 °C / min 170 °C (0 min) 2 °C / min 215 °C (0 min) 10 °C / min 290 °C	100 °C (1 min) 20 °C / min 190 °C (0 min) 2 °C / min 215 °C (3 min) 7 °C / min 290 °C (0 miin)	80 °C (1 min) 30 °C / min 180 °C (0 min) 3 °C / min 205 °C (4 min) 20 °C / min 290 °C (10 min)
Temperatura inyector	270°C	270°C	250°C
Modo Inyección	Splitless	Splitless	Splitless
Gas Portador	Helio 5.0 flujo constante a 2.5 ml/min	Helio 5.0 flujo constante a 2.5 ml/min	Helio 5.0 flujo constante a 1 ml/min
Volumen Inyección	1 µL	1µL	2µL

2.6. Condiciones cromatográficas para pesticidas organoclorados y bifenilos policlorados por GC-DSM

Las condiciones para la determinación de COPs por cromatografía gaseosa con detector selectivo de masa, se basó en el método EPA 8270C, empleado para la cuantificación de compuestos orgánicos semivolátiles en diferentes matrices. Luego se implementó el modo de monitoreo de iones selectivos, SIM (Selected Ion Monitoring, por sus siglas en inglés), que permitió disminuir el efecto del ruido y aumentar la ganancia de la señal para los analitos. En la Tabla 9 y 10 se resumen los datos de los iones cuantificador y el par de iones verificadores para cada uno de los COPs evaluados.

Tabla 9. Tiempo de retención y Iones utilizados para el detector selectivo de masas en el desarrollo del método SIM para pesticidas organoclorados.

Analito	GC-DSM				GC - DCE
	tr (min)	Ion cuantificador (tg)	Primer ion verificador (q1)	Segundo ion verificador (q2)	tr (min)
alfa-HCH	9,350	181.0	183.0	219.0	10,660
HCB	9,597	284	142	249	10,977
beta-HCH	10,096	181	183	219	11,731
gamma-HCH	10,285	181	183	219	11,984
Alaclor D13	-	-	-	-	15,278
Heptacloro	12,728	100	272	272	15,447
Aldrin	14,181	263	66	79	17,420
Cis-Clordano	18,067	373	237	272	19,911
Trans-heptaclorepoxido	16,203	353	355	273	20,196
Trans-Clordano	17,463	373	237	272	21,473
2.4 DDE	17,685	246	318	176	21,981
alfa-Endosulfan	18,092	195	241	239	22,271
Cis-heptaclorepoxido	16,245	183	237	353	22,511
Dieldrin	18,838	262	108	79	24,077
4,4'-DDE	18,796	246	318	176	24,232
4,4'-DDD	19,053	235	165	199	24,807
Endrin	19,463	263	81	67	25,584
Beta-endosulfan	19,702	195	239	241	26,301
2.4 DDD	19,917	235	165	199	27,280
2.4 DDT	20,003	235	165	199	27,446
Endrin Aldehido	-	-	-	-	27,668
Clordecon	20,287	272	232	143	27,895
Endosulfan Sulfato	20,688	272	387	229	28,964
4,4 DDT	20,742	235	265	212	29,457
Endrin Cetona	21,637	317	67	139	30,819
Mirex	22,840	274	270	277	32,576

Tabla 10. Tiempo de retención y Iones utilizados para el detector selectivo de masas en el desarrollo del método SIM para determinación de bifenilos policlorados.

Analito	GC-DSM				GC - DCE
	t _R (min)	Ion cuantificador (tg)	Primer ion verificador (q1)	Segundo ion verificador (q2)	t _R (min)
PCB # 28	12,157	256	186	258	11,357
Alaclor D13	-	-	-	-	11,665
PCB # 52	13,483	292	220	290	12,602
PCB # 101	17,859	254	326	324	16,585
PCB # 81	18,806	292	220	290	18,064
PCB # 77	18,806	292	220	110	18,622
PCB # 123	19,731	325	256	323	20,106
PCB # 118	19,798	325	254	323	20,264
PCB # 114	20,072	325	254	126	21,048
PCB # 153	20,330	360	145	290	21,833
PCB # 105	20,431	325	253	184	22,057
PCB # 138	20,937	360	290	362	23,414
PCB # 126	21,123	326	254	327	23,870
PCB # 167	21,521	360	290	145	24,820
PCB # 156	21,996	360	290	145	25,810
PCB # 157	22,113	360	289	145	26,045
PCB # 180	22,370	394	324	396	26,502
PCB # 169	22,853	360	290	147	27,303
PCB # 189	23,789	394	324	162	28,619

2.7. Selección del método analítico

De acuerdo a la literatura vigente sobre la determinación de COPs, el protocolo denominado “Procedimiento para el análisis de contaminantes orgánicos persistentes en ambiente y matrices humanas, para implementar un plan de monitoreo global bajo el Convenio de Estocolmo”, señala que método de extracción líquido-líquido es el más idóneo para el análisis. Sin embargo, se obtuvo bajos porcentaje de recuperación en la extracción de los analitos. Por esto, se procede a evaluar otras técnicas, de acuerdo a una búsqueda bibliográfica, con el fin de comparar y seleccionar un método con el nivel de exactitud, bajo consumo de reactivos y tiempo adecuados de extracción, utilizando como matriz leche entera de vaca, en primera instancia.

El diagrama de la Figura 18 muestra los métodos de extracción desarrollados para la obtención de COPs en matriz de leche. Las extracciones descritas se realizaron de manera paralela tanto para OCPs como para PCBs.

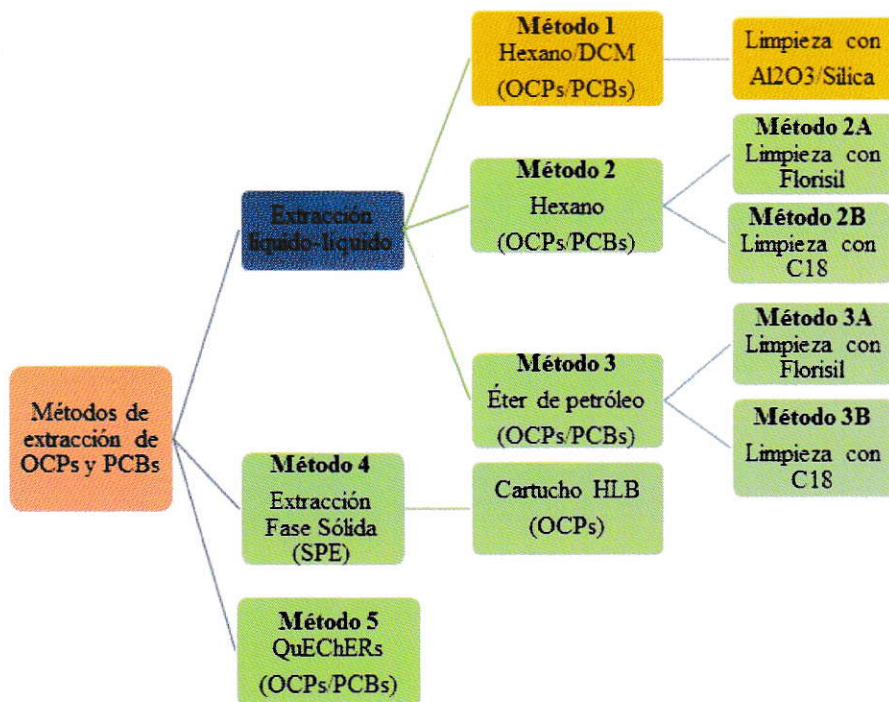


Figura 18. Métodos desarrollados para la determinación de OCPs y PCBs en leche materna.

2.7.1. Método Oficial de extracción Líquido-líquido

2.7.1.1. Método 1: Extracción de la muestra

Se fortificó 5 mL de muestra de leche de vaca con 75 µL de la solución multiestándar de OCPs de concentración 10 mg/L en acetona, obteniendo una concentración final en matriz de 150 µg/L. La muestra con PCBs fue fortificada con 750 µL de una solución de 1mg/L, obteniendo una concentración final en matriz de 150 µg/L. En seguida se agitó en un multivortex durante 10 minutos, se agregó 2 mL de ácido fórmico y 12 ml de hexano / DCM (5: 1, v / v) a la muestra. Posteriormente, se centrifugó durante 10 minutos a 3000 rpm. En aquellos casos en que formó una emulsión, se agregó pequeñas cantidades de NaCl. La capa orgánica superior se transfirió a un tubo de recogida. Posteriormente, se repitió el proceso de extracción con 12 ml de hexano / DCM (5: 1, v / v), y se transfirió la capa orgánica superior al mismo tubo de recogida. Finalmente, se añadió 1 ml de iso-octano al extracto, y se concentró hasta un volumen final de 1 mL bajo corriente de nitrógeno, a una temperatura máxima de 40°C.

De manera preventiva, todo el material antes, durante y al finalizar el proceso, fue lavado con acetona grado p.a. para evitar contaminación cruzada de las muestras.

2.7.1.2. Limpieza de la muestra

Se preparó una columna de vidrio rellena con 15 g de Al₂O₃ desactivado al 8% (m/m), seguido de 2,5 g de Na₂SO₄, acondicionando posteriormente la columna con 20 mL de hexano. Luego el extracto de la muestra se colocó en la columna (Punto 2.7.1.1), y el remanente del tubo de recogida fue lavado 3 veces con 1 mL de hexano, depositando este sobre la columna.

Una vez que la muestra ha sido retenida en la columna, se eluyó con 210 mL de hexano, fracción que fue recolectada en un matraz de fondo redondo. Finalmente, al extracto obtenido se le añadió 1 ml de iso-octano, y 2 perlas de ebullición, y se concentró a un volumen final de 1 mL mediante el uso del rotavapor.

2.7.1.3. Fraccionamiento de la muestra sobre una columna de sílice desactivada

Se preparó una columna rellena con 1,8 g de sílice desactivada al 15% (m/m), seguido de 2,5 g de Na₂SO₄, luego se añadió 6 mL de hexano para acondicionar la columna; y se colocó un tubo de recogida (20 ml) en la columna. Posteriormente, la muestra se ingresó a la columna, lavando el tubo tres veces con 1 mL de hexano.

Los analitos se eluyeron con 11 mL de hexano. De esta etapa se obtendrá una fracción 1 que contiene los PCBs y OCPs no polares. Una vez realizada la elución de los analitos, se procedió a elución con 10 mL dietiléter en hexano (15%, v / v) en un tubo aparte, y así recolectar una fracción 2, que contiene los pesticidas polares. Finalmente se añadió 1 mL de iso-octano a ambos tubos, y se concentró los extractos bajo un flujo de nitrógeno, hasta un volumen final de 1 mL, para luego incorporarlo a un vial de cromatografía para cuantificar su recuperación.

2.7.2. Métodos alternativos de extracción de COPs

2.7.2.1. Pretratamiento de la muestra

De acuerdo a los antecedentes recopilados en la literatura vigente, se realizó el pretratamiento de la muestra de leche de obtener una mayor recuperación del analito desde la matriz. Este paso se llevó a cabo para todos los métodos alternativos de extracción y consistió básicamente en:

- 5 mL de muestra de leche (temperatura ambiente) se depositó en un tubo polipropileno de 50 mL. Se procedió a fortificar la muestra con 75 µL de la solución multiestándar de OCPs de concentración 10 mg/L en acetona y 750 µL de la solución multiestándar de PCBs de concentración 1 mg/L en acetona, obteniendo una concentración final en matriz de 150 µg/L.
- Se agitó en multivortex durante 10 minutos.

- Finalmente, se adicionó 5 mL de solución agua/metanol (1:1) y se puso el tubo en un sonicador ultrasonido por cinco minutos.

2.7.2.2. Métodos 2 y 3: Extracción Líquido – Líquido

Para este tipo de extracción que se utilizaron dos solventes y dos tipos de cartucho para la limpieza del extracto de la muestra, formando 4 métodos diferentes (Tabla 11). La finalidad fue escoger el agente extractante y el cartucho de limpieza más adecuado, con máxima recuperación del analito. Para cada método de extracción se utilizó 10 mL de muestra pretratada (Punto 2.7.2.1), y se agregó 5 mL de solvente de acuerdo a cada uno de los métodos diseñados de acuerdo a la Tabla 11. Luego se agitó en multivortex por un tiempo de 5 minutos a una velocidad de 1800 rpm. Posteriormente, la muestra se centrifugó por 10 minutos a temperatura ambiente, con una velocidad de 4500 rpm. Una vez realizado este paso, se transfirió 1 mL de sobrenadante a un cartucho previamente acondicionado de acuerdo al método (Figura 19). La muestra se eluyó sobre en un tubo de vidrio, el contiene los analitos de interés, mientras que los interferentes quedan retenidos en el adsorbente. Posteriormente, se lavó el cartucho 3 veces con porciones de 1 mL de hexano, los que se mezclaron con el extracto de la muestra, para luego evaporar el solvente bajo una corriente de nitrógeno a una temperatura no superior a los 40°C, hasta sequedad. Finalmente, se reconstituyó la muestra con 1 mL de hexano, y se transfirió a un vial de cromatografía con un inserto.

Tabla 11. Variables del método de extracción líquido-líquido, en la determinación de COPs en leche de vaca.

Método	Solvente	acondicionamiento del cartucho	Cartucho de limpieza	Elución
2A	5 mL de hexano	3 mL de metanol + 3 mL de agua	C18	1 mL de hexano 3 veces
2B		4 mL de hexano	Florisil	
3A	5 mL de éter de petróleo	3 mL de metanol + 3 mL de agua	C18	
3B		4 mL de hexano	Florisil	

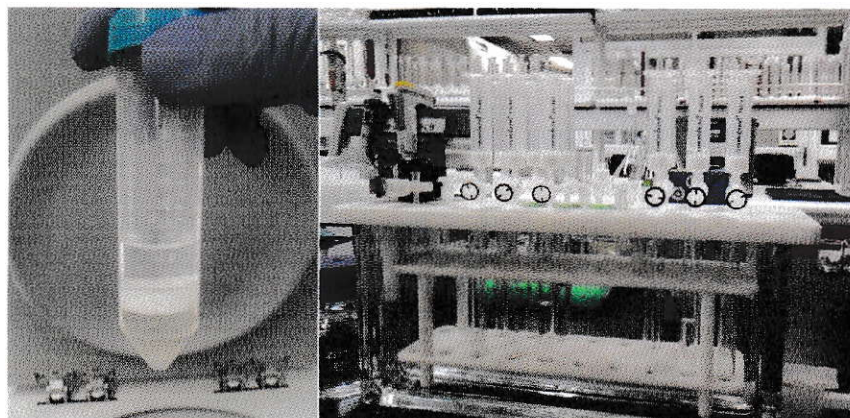


Figura 19. Método extracción líquido-líquido con etapa de limpieza en cartuchos instalados sobre filtración manífor.

2.7.2.3. Método 4: Extracción Fase Sólida con cartridge HLB

Para este tipo de extracción se utilizaron 10 mL de muestra pretratada, la cual se incorporó a un cartucho HLB previamente acondicionado e instalado en un sistema de filtración manifold a un flujo por gravedad (Tabla 12). Una vez eluida toda la muestra, el cartucho HLB se lavó 3 veces con 2 mL de metanol. Luego se extrajeron los analitos retenidos en el cartucho, eluyendo 3 veces con 2 mL de hexano. La fracción de hexano se evaporó bajo una corriente de nitrógeno, a una temperatura no superior a los 40°C, hasta sequedad. Se reconstituyó con 1 mL de hexano, agitando por 2 minutos en multivórtex y luego incorporando la muestra por 2 minutos en un sonicador. Finalmente la muestra fue transferida a un vial para cromatografía con inserto.

Tabla 12. Acondicionamiento cartuchos para la extracción en fase sólida

Cartucho SPE	Acondicionamiento de la columna.
HLB	3 mL de metanol + 3 mL de agua



2.7.2.4. Método 5: Extracción QuEChERS

Para este tipo de extracción se utilizaron 10 mL de muestra pretratada (Punto 2.7.2.1.) y se depositó en un tubo de extracción de polipropileno de 50 mL. Previo a la extracción, la muestra se llevó a un congelador a una temperatura $< 0^{\circ}\text{C}$ por 10 minutos. Posteriormente, se adicionó 10 mL de acetonitrilo al tubo con la muestra y se incorporaron las sales de extracción, las que contiene 500 mg de NaCl y 2000 mg MgSO_4 . En seguida fueron puestos los tubos en agitador orbital por 10 minutos y luego centrifugado a 4500 rpm por 5 minutos a 4°C .

La siguiente etapa consistió en la limpieza del extracto. Para ello se transfirieron 5 mL del sobrenadante, a un tubo con sales de limpieza que contenía 900 mg MgSO_4 , 150 mg amina primaria secundarias (PSA) y 150 mg adsorbente C18. Se agitó durante 2 minutos en multivortex, y luego se centrifugó por 3 minutos a 4500 rpm. Luego se tomó 1000 μL y se depositó en un tubo de vidrio. La fracción de acetonitrilo se evaporó bajo una corriente de nitrógeno, a una temperatura no superior a los 40°C hasta sequedad. Finalmente, se reconstituyó con 1 mL de hexano, y se agitó por 2 minutos en multivortex, seguido de por 2 minutos en un sonicador. La muestra se filtró utilizando filtro de membrana de 0.22 μm , llevándolo a un vial de cromatografía provisto de un inserto de vidrio.

2.8. Optimización del método analítico seleccionado

De acuerdo a los resultados obtenidos (Punto 3.1.1 y 3.1.2.) se seleccionó el método QuEChERS para la determinación OCPs y el método de ELL para la determinación de PCBs en leche materna, utilizando como agente de extracción éter de petróleo y Florisil para su etapa de limpieza.

La obtención de mejores resultados depende de una serie de variables experimentales que se optimizó para incrementar la eficiencia del proceso de extracción. En la optimización se consideraron diferentes factores que pueden influir en la validez de los resultados, como fue el tiempo de agitación y/o sonicación, y el volumen de solvente

como agente extractante. Para ello se realizó un “diseño factorial general completo”, que permitió estudiar los efectos que puede tener sobre la respuesta en la recuperación de los contaminante desde la leche materna. Al realizar el diseño factorial, el hecho de variar los niveles de todos los factores, permitió analizar las interacciones entre dichos factores, y así evaluar las condiciones óptimas de trabajo. Para ello se utilizó el programa de diseño estadístico MINITAB 16, el que permitió escoger las mejores condiciones experimentales de extracción.

2.8.1. Optimización del método QuEChERS para la determinación de OCPs en leche materna

La optimización se hizo en base a la fortificación de una muestra de leche de vaca con OCPs a una concentración de 150 µg/L, a partir de una solución multiestándar de 10 mg/L en acetona.

Para llevar a cabo esto, se seleccionaron 3 factores a 2 y 3 niveles (Tabla 13). La elección de los factores y sus niveles se basó en la amplia variedad de metodologías investigadas (La Tabla 26 del diseño experimental, Anexo).

Tabla 13. Diseño experimental del método QuEChERS; factores y niveles empleados.

Factor	Nivel		
	1	2	3
Tratamiento de la muestra	5mL de leche + 5 mL de agua/metanol (1:1)	10 mL de leche	10 mL de leche + 2 mL de metanol
Agitación	2 minutos	5 minutos	-
Sonicación	0 minutos	5 minutos	-

2.8.2. Optimización de la extracción líquido-líquido y etapa de limpieza Florisil para la determinación de PCBs y DL-PCBs en leche materna

La optimización se hizo en base a la fortificación de una muestra con PCBs a una concentración de 50 µg/L, a partir de una solución multiestándar de 1 mg/L en acetona.

Para el caso de la optimización del método de ELL se seleccionaron 4 factores, a 2 y 3 niveles (Tabla 14). En comparación con el método de optimización descrito anteriormente, se adicionó un cuarto factor; “volumen de extractante” el que contiene 3 niveles, 5; 10; 15 mL de éter de petróleo. (Tabla 27 del diseño experimental ,Anexo)

Tabla 14. Diseño experimental del método de Extracción líquido-líquido; niveles y factores empleados

Factor	Nivel		
	1	2	3
Tratamiento de la muestra	5mL de leche + 5 mL de agua/metanol (1:1)	10 mL de leche	10 mL de leche + 2 mL de metanol
Tiempo de sonicación	0 minutos	5 minutos	-
Volumen de extractante	5 mL de éter de petróleo	10 mL de éter de petróleo	15 mL éter de petróleo
Tiempo de agitación	2 minutos	5 minutos	-

2.9. Estudio del efecto matriz en la determinación de COPs

Con el fin de estudiar la variación en las señales cromatográficas inducidas por la matriz de análisis, se prepararon curvas de calibración en solvente, en extracto matriz (previamente obtenido) y en matriz. Cada una de las curvas estaban constituida por cinco niveles de calibración; 10, 75, 150, 225, y 300 $\mu\text{g/L}$, cada punto de curva por replicado.

La elaboración de curvas en matriz externa y en solvente se realizó con una solución multiestándar de concentración 1000 $\mu\text{g/L}$. Para ello se tomaron 10 μL , 75 μL , 150 μL , 225 μL y 300 μL y se llevó a 1 mL con solvente o extracto de matriz. En todos estos ensayos se empleó 20 μL como estándar interno.

La elaboración de curva en matriz interna, se realizó de acuerdo al diseño experimental optimizado de OCPs como para PCBs. La elaboración se realizó de acuerdo a la Tabla 15 y 16.

Tabla 15. Elaboración de curva en matriz para plaguicidas organoclorados.

Solución multiestándar de OCPs (mg/L)	Alicuota del multiestándar (µL)	Volumen matriz (mL)	Conc. en matriz (µg/L)	Alicuota de estándar interno 50 mg/L (µL)	Conc. estándar interno (µg/L)
10	10	10	10	200	1000
	75		75		
	150		150		
	225		225		
	300		300		

Tabla 16. Elaboración de curva en matriz para bifenilos policlorados

Solución multiestándar de PCBs (mg/L)	Alicuota del multiestándar (µL)	Volumen matriz (mL)	Conc. en matriz (µg/L)	Alicuota de estándar interno 10 mg/L (µL)	Conc. estándar interno (µg/L)
10	10	10	10	100	1000
	75		75		
	150		150		
	225		225		
	300		300		

2.10. Plan de validación del método analítico

La validación del método analítico tuvo como finalidad demostrar que la técnica desarrollada cumple con los requisitos para las aplicaciones analíticas previstas. En esta etapa se definieron las pruebas o parámetros de validación necesarios y el diseño experimental a desarrollar en base a los requerimientos del método. Estos se resumen en la Tabla 17.

El proceso fue llevado a cabo durante cinco días (desarrollado día de por medio), abarcando dos semanas el desarrollo de la validación (ver el procedimiento en el anexo).

La validación del método de COPs fue desarrollado en leche materna, obtenido de un estudio anterior por parte del laboratorio de Química Ambiental, la que se mantuvo refrigerada a una temperatura de -20 °C (Stuardo, 2013).

Tabla 17. Parámetros de validación analíticas

Parámetros a evaluar	Prueba(S)	Método	
		Cualitativo	Cuantitativo
Selectividad	Identificación analito Interferencia de matriz	Sí	-
Linealidad	Rango lineal	-	Sí
Sensibilidad	Pendiente	-	Sí
Límites	Límite de detección Límite de cuantificación	-	Sí
Precisión	Repetibilidad Reproducibilidad	-	Sí
Veracidad	Sesgo Recuperación	-	Sí

2.10.1. Selectividad

En la selectividad se evaluó la capacidad del método implementado para determinar los analitos de interés en la matriz, sin interferencias de otros componentes de comportamiento análogo.

Para este caso, se comparó el cromatograma de una muestra fortificada de leche materna a una concentración de 150 ng/mL, con el cromatograma de una solución multiestándar en solvente, bajo las mismas condiciones.

2.10.2. Linealidad y sensibilidad

Se determinó a partir de la elaboración de cinco curvas de calibración en matriz, una curva cada día, con seis puntos de calibración para OCPs, y cinco puntos de curva para los PCBs, además de un blanco matriz (Tabla 18). (La elección de los 5 puntos de curva para los PCBs se debe a que no se logra llegar a concentraciones más pequeña de manera reproducibles). En ella se graficó la respuesta instrumental frente a las diferentes

concentraciones. Se determinó el coeficiente de determinación promedio de las cinco curvas, con la finalidad de demostrar una correlación de linealidad significativa.

Tabla 18. Concentración utilizada para los niveles de curvas.

	Blanco Matriz	Nivel 1	Nivel 2	Nivel 3	Nivel 4	Nivel 5	Nivel 6
OCPs	0 µg/L	16 µg/L	30 µg/L	75 µg/L	150 µg/L	225 µg/L	250µg/L
PCBs	0 µg/L	-	20 µg/L	75 µg/L	150 µg/L	225 µg/L	250µg/L

2.10.3. Precisión intermedia

2.10.3.1. Repetibilidad

Para determinar el parámetro repetibilidad, se realizó la fortificación de 6 muestras al nivel 3 de acuerdo a la Tabla 18, bajo las mismas condiciones de operación en un intervalo corto de tiempo (mismo día), por un mismo analista, en la misma muestra y en el mismo equipo. La evaluación de este parámetro fue bajo el criterio de Horwitz al nivel de concentración seleccionado (CV%_r).

2.10.3.2. Reproducibilidad

De forma independiente se analizó dos muestras fortificadas al nivel 3 de acuerdo a la Tabla 18, durante cada día de validación, sumando un total de 10 muestras. La evaluación de este parámetro fue bajo el criterio de Horwitz al nivel de concentración seleccionado, en condiciones de reproducibilidad (CV%_R).

2.10.4. Límites

El límite de detección (LD) y cuantificación (LC) del método para cada analito, se obtuvo experimentalmente, mediante el mismo análisis de 10 muestras de leche materna enriquecida al nivel más bajo de concentración (Tabla 18). A partir de lo anterior se calculó el LD, LC y la razón de conformidad para comprobar si el valor obtenido es aplicable para el método validado.

2.10.5. Veracidad

2.10.5.1. Recuperación

Se analizaron 3 muestras matriz fortificada a niveles de concentración 2 y 4 (Tabla 18), y tres muestras blanco matriz. A partir de los resultados obtenidos, se evaluó el promedio de la concentración de los analitos en la muestra fortificada, el porcentaje de recuperación obtenido y el criterio de aceptabilidad.

En la Tabla 19 y 20 se resumen la cantidad de muestras analizadas para cada día de validación de COPs.

Tabla 19. Numero de muestras analizadas para la validación de OCPs en leche materna.

	Blanco Matriz	Nivel 1 16 µg/L	Nivel 2 30 µg/L	Nivel 3 75 µg/L	Nivel 4 150 µg/L	Nivel 5 225 µg/L	Nivel 6 250 µg/L	Total de muestras
Día 1	2	1	1	5	2	1	1	13
Día 2	2	1	1	10	2	1	1	18
Día 3	3	1	3	5	3	1	1	17
Día 4	2	10	1	5	2	1	1	13
Día 5	2	1	1	5	2	1	1	13

Tabla 20.Numero de muestras analizadas para la validación de PCBs en leche materna.

	Blanco Matriz	Nivel 1	Nivel 2 30 µg/L	Nivel 3 75 µg/L	Nivel 4 150 µg/L	Nivel 5 225 µg/L	Nivel 6 250 µg/L	Total de muestras
Día 1	2	-	1	5	2	1	1	12
Día 2	2	-	1	10	2	1	1	17
Día 3	3	-	10	5	3	1	1	23
Día 4	2	-	1	5	2	1	1	12
Día 5	2	-	1	5	2	1	1	12

III - RESULTADOS Y DISCUSION

La optimización de las condiciones cromatográficas permitió la separación de los OCPs como de los PCBs. En este sentido la columna cromatográfica con fase estacionaria HP-5MS utilizada, resultó ser una columna versátil, obteniendo una buena resolución de los picos cromatográficos para el estudio de los COPs.

En la Figura 20, se observa el cromatograma de una mezcla de 25 OCPs a una concentración de 150 ng/mL, analizados por CG-DCE. Además se incluyó el estándar interno de alaclor D13. Los analitos Endrin aldehído y Endrin cetona fueron incorporados de manera cualitativa, debido que el Endrin sufre una descomposición térmica en el instrumento degradándose.

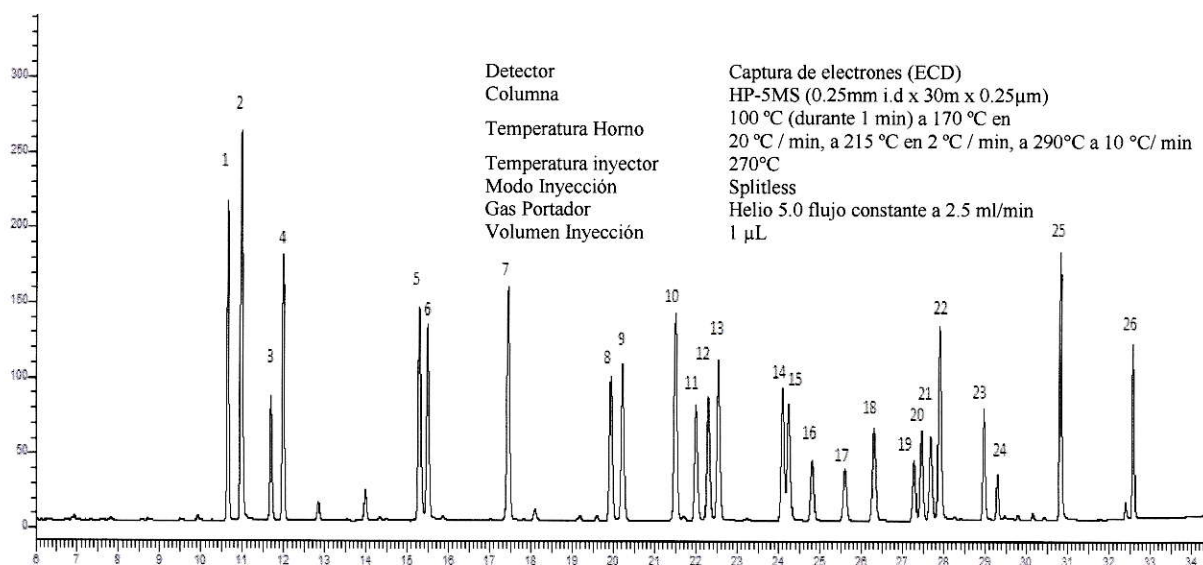


Figura 20. Cromatograma de multiestándar de pesticida organoclorados de concentración de 150 µg/L leídos por GC-ECD. 1 = alfa Hexaclorociclohexano, 2 = Hexaclorobenceno, 3 = beta Hexaclorociclohexano, 4 = gamma Hexaclorociclohexano, 5 = Alaclor D13, 6 = Heptaclor , 7 = Aldrin, 8 = Cis-Clordano, 9 = Trans-Heptaclorepoxido , 10 = Trans-hlordane , 11 = 2,4 DDE, 12 = Alfa-endosulfan , 13 = Cis-Heptachlorepoxide, 14 = Dieldrin, 15 = 4,4 DDE, 16 = 4,4 DDD, 17 = Endrin, 18 = Beta-Endosulfan, 19 = 2,4 DDE, 20 = 2,4 DDT, 21 = Endrin Aldehído, 22 = Clordecone, 23 = Endosulfan Sulfato, 24 = 4,4 DDT, 25 = Endrin Cetona, 26. Mirex.

En la Figura 21 se observa el cromatograma de 18 bifenilos policlorados a una concentración de 150 µg/L junto con estándar interno, analizados por GC-DCE.

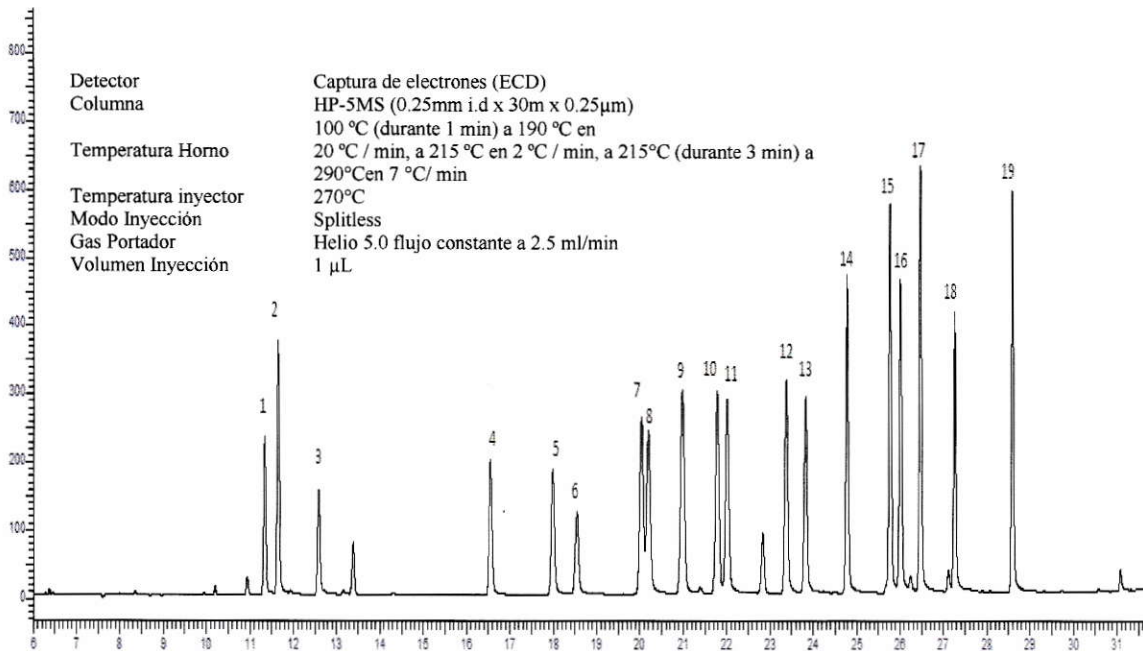


Figura 21. Cromatograma de multiestándar de bifenilos policlorados de concentración de 150 µg/L leídos por GC-ECD. 1 = PCB # 28, 2 = Alaclor D13, 3 = PCB # 52, 4 = PCB # 81, 5 = PCB # 101, 6 = PCB # 77, 7 = PCB # 123, 8 = PCB # 118, 9 = PCB # 114, 10 = PCB # 153, 11 = PCB # 105, 12 = PCB # 138, 13 = PCB # 126, 14 = PCB # 167, 15 = PCB # 156, 16 = PCB # 157, 17 = PCB # 180, 18 = PCB # 169, 19 PCB # 189

3.1. Evaluación de los métodos de extracción de COPs en leche materna

Para apreciar la capacidad de recuperación de cada método empleado, se evaluó el porcentaje efectivo de recuperación de cada analito, fortificando una muestra a una concentración de 150 ng/mL, con cada estándar. Los resultados se resumen en las Tablas 21 y 22.

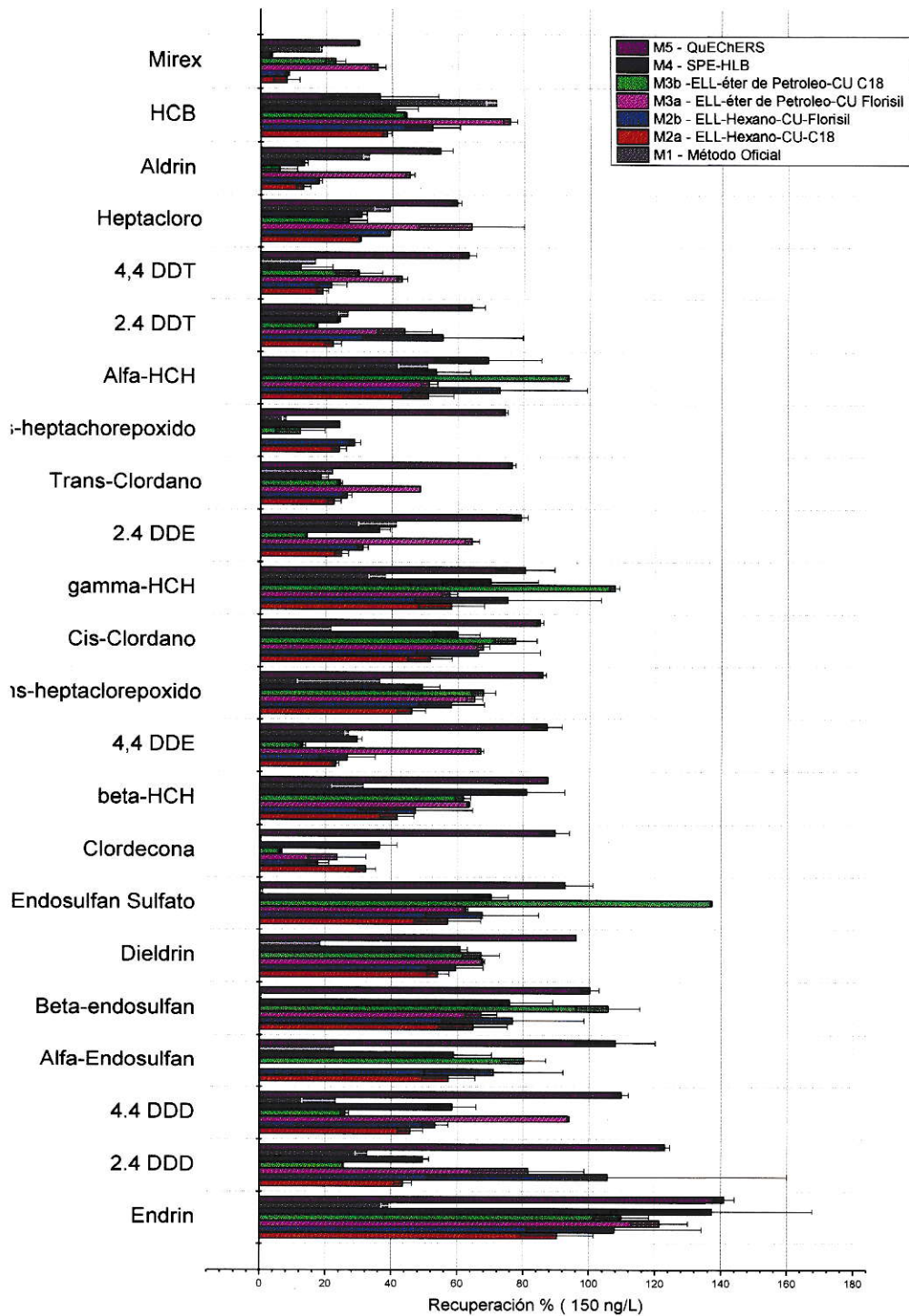


Figura 22. Resultados de la recuperación de los diferentes métodos de extracción de OCPs de una muestra de leche de vaca fortificada a 150 ng/L (M = método).

Tabla 21. Recuperación obtenida para los diferentes métodos de extracción en la determinación de OCPs en leche de vaca. (ICV en %)

	M1.Método Oficial		M2a -ELL- Hexano CU-C₁₈		M2b - ELL- Hexano-CU- Florisil		M3a - ELL- éter de Petróleo-CU C₁₈		M3b -ELL- éter de Petróleo-CU Florisil		M4-SPE-HLB		M5 - QuEChERS	
	Rec.	CV	Rec.	Rec.	Rec.	CV	CV	C.V	Rec.	CV	Rec.	CV	Rec.	CV
Mirex	18,6	0,4	8,0	4,0	8,2	0,6	22,8	3,0	35,7	2,5	3,3	0,4	29,8	0,3
HCB	71,5	3,1	38,3	1,3	52,1	8,4	43,9	0,5	75,8	2,1	40,9	6,9	36,3	17,7
Aldrin	32,8	1,7	12,9	2,2	17,7	0,9	5,7	5,4	45,3	1,4	13,2	1,1	54,5	3,7
Heptacloro	39,2	4,7	30,0	0,3	39,1	0,2	26,6	5,7	64,0	15,9	30,5	1,6	59,6	1,3
4,4 DDT	16,5	3,4	18,8	1,8	21,5	4,7	29,8	7,2	42,9	1,7	12,1	9,8	63,2	2,3
2.4 DDT	26,4	2,8	22,0	2,5	55,3	24,3	17,2	0,3	43,9	8,2	23,7	0,5	64,1	4,0
Alfa-HCH	50,7	8,8	50,9	7,7	72,6	26,6	93,6	0,0	51,2	2,5	53,4	10,4	69,2	16,1
Cis-heptachorepoxido	7,7	1,1	23,9	2,1	28,5	1,8	12,1	7,5	--	--	24,0	0,2	74,4	0,8
Trans-Clordano	21,8	12,7	22,3	2,1	26,3	1,4	24,2	0,7	48,5	0,1	18,3	2,4	76,4	1,2
2.4 DDE	41,2	11,4	24,6	2,1	31,0	1,6	14,1	0,1	64,3	2,2	36,2	3,3	79,1	2,1
gamma-HCH	37,9	5,0	58,0	10,0	75,1	28,3	107,5	1,5	57,4	2,4	69,9	14,5	80,4	8,9
Cis-Clordano	21,4	30,3	51,5	6,7	66,2	18,8	77,5	6,5	67,7	2,0	59,8	6,9	85,0	1,0
Trans-heptachlorepoxido	36,2	24,9	46,0	4,2	58,0	10,0	67,8	3,6	65,1	2,5	49,3	5,2	85,8	1,0
4,4 DDE	26,8	1,0	22,9	1,0	26,4	8,5	12,9	1,0	66,9	0,9	29,4	1,5	87,1	4,5
beta-HCH	31,3	9,6	41,7	5,1	47,2	17,4	61,7	2,3	63,3	0,5	81,0	11,5	87,3	0,1
Clordecona	0,4	0,6	32,2	3,0	17,6	3,4	6,3	0,5	23,5	8,7	36,4	5,2	89,7	4,3
Endosulfan Sulfato	0,9	1,1	57,0	10,1	67,5	17,1	137,1	0,3	62,5	0,7	70,2	5,4	92,6	8,5
Dieldrin	18,3	8,6	54,1	3,4	59,4	8,4	67,2	5,6	67,7	0,5	60,8	2,3	96,0	0,1
Beta-endosulfan	0,4	0,6	64,8	10,5	76,8	21,6	105,7	9,7	67,2	4,8	75,9	13,1	100,2	2,9
Alfa-Endosulfan	22,5	11,1	57,3	8,0	71,0	21,1	80,2	6,6	--	--	58,8	11,6	108,0	12,2
4.4 DDD	23,0	10,1	45,7	3,8	53,3	4,0	25,9	1,2	93,8	0,3	58,5	7,3	109,7	2,3
2.4 DDD	32,6	3,5	43,6	2,7	105,6	54,3	25,4	0,2	81,5	17,0	49,6	1,8	123,0	1,5
Endrin	39,2	2,1	90,3	11,0	107,6	26,5	109,7	8,5	121,4	8,6	137,2	30,5	141,0	3,1

3.1.1. Evaluación de la recuperación de los pesticidas organoclorados fortificados en leche materna

En la Figura 23 se señalan los resultados de recuperación para los diferentes métodos extracción de OCPs. Estos fueron evaluados mediante una curva multiestándar en solvente. En esta ocasión no se utiliza un estándar interno, debido a que se quiere evaluar la capacidad de recuperación de cada método por sí mismo.

De acuerdo a los resultados (Tabla 21 y Figura 23), el porcentaje de recuperación de la extracción líquido-líquido del método oficial va desde un 0,4% a un 50,7%, a excepción del hexaclorobenceno cuyo valor de recuperación es de un 71,5%.

Un factor a tomar en cuenta en el proceso de extracción de los analitos, es la interacción que se genera entre los OCPs con el adsorbente de la fase estacionaria en la etapa de limpieza. En el caso del Clordecon se obtuvo la recuperación más baja con un 0,4%. Ahora bien, la comparación de la estructura de la molécula de Clordecon con la molécula Mirex (Figura 22), se diferencia por la presencia de un grupo carbonilo. Esto determina propiedades físicas diferentes, con una solubilidad en agua de 2,7 mg/L versus el Mirex 0,085 mg/L. Por lo tanto, de esta forma se explica de manera análoga que existe una interacción a través de puente de hidrogeno entre el átomo electronegativo del pesticida (oxígeno) con el átomo de hidrogeno del adsorbente, siendo retenidos tanto en la alumina como en la silica, lo que explicaría la menor recuperación obtenida.

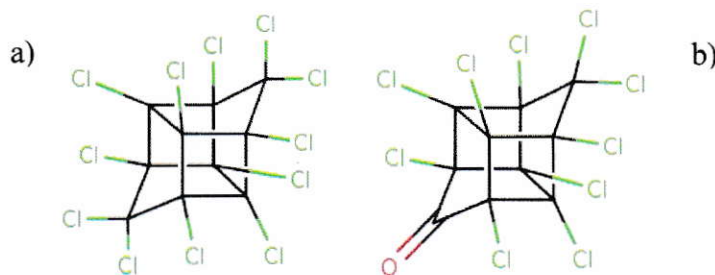


Figura 23. Moléculas de Pesticidas organoclorados. La molecula A corresponde a Mirex y la B a Clordecon

Para el método alternativo de extracción líquido-líquido el solvente que obtuvo mayor recuperación de OCPs, fue el éter de petróleo. Mientras que para la etapa de limpieza (clean-up), el adsorbente que entrega mejores resultados fue el Florisil en relación a C18, para todos los OCPs a excepción del Clordecon. Una baja recuperación en la utilización del adsorbente C₁₈, se debe a que este tipo de cartucho se compone de partículas de sílice con cadena octadecil en su extremo. Esta retiene mayoritariamente los compuestos no polares por interacción hidrofóbica, como son los pesticidas organoclorados principalmente.

La extracción en fase sólida (EFS) con cartucho HLB, fue una técnica rápida y de bajo consumo de solvente (20 mL de solvente). Permitió la retención de una amplia gama de OCPs, desde el pesticida más apolar a los menos apolares como es el caso del hexaclorobenzeno y el endosulfan respectivamente. Aun así, la recuperación es menor en comparación extracción líquido-líquido. La técnica es recomendable para matrices menos complejas como es el agua.

El método QuEChERS siendo una técnica utilizada ampliamente por los laboratorios para análisis de compuestos de carácter polar, proporcionó buenos resultados de recuperación para los pesticidas organoclorados. Una gran cantidad de analitos migraron desde la matriz leche hacia el acetonitrilo, obteniendo valores de recuperación sobre el 54,5 %, a excepción del Mirex con un 29,8% y el Hexaclorobenzeno con un 36,3%. El método se caracterizó por ser más rápido, sencillo con un bajo empleo de solvente (11 mL por muestra). En comparación con los 210 mL del método oficial. Además se logró analizar 18 muestras por duplicado, versus 3 muestras por duplicado del método oficial. Una desventaja que presenta la técnica QuEChERS, es la necesidad de evaporar el acetonitrilo para posteriormente reconstituir la muestra en hexano antes del análisis instrumental.

3.1.2. Evaluación de la recuperación de los bifenilos policlorados fortificados en leche de vaca.

Las técnicas desarrolladas para la extracción de PCBs, se basaron en el método de extracción oficial y los tres mejores métodos obtenidos de la experiencia anterior (Tabla 21). Los resultados de recuperación de PCBs se resumen en la Tabla 22.

Tabla 22. Recuperación obtenida (R%) y (CV%), para los diferentes métodos de extracción en la determinación de bifenilos policlorados en leche vaca.

	M1 - Método Oficial (n=3)		M3a - ELL-éter de Petróleo-CU Florisil (n=3)		M3b -ELL-éter de Petróleo-CU C18 (n=3)		M5 QuEChERS (n=3)	
	R	CV	R	CV	R	CV	R	CV
PCB #28	38,9	5,2	49,7	14,5	57,8	14,9	33,5	25,3
PCB #52	39,5	4,4	57,1	6,4	63,8	14,8	42,4	73,0
PCB #101	42,3	5,8	70,0	7,7	52,8	19,5	32,2	30,0
PCB #81	34,3	5,5	65,5	8,3	46,4	12,1	28,2	6,6
PCB #77	23,8	5,1	59,4	7,3	59,0	16,9	35,5	5,8
PCB #123	39,4	10,9	53,3	8,5	41,4	13,4	19,2	9,6
PCB #118	48,9	15,0	59,0	7,3	92,1	33,8	44,5	59,4
PCB #114	38,3	7,5	35,9	31,3	51,6	14,3	25,5	10,6
PCB #153	42,5	13,3	50,8	6,1	40,9	20,0	20,2	10,8
PCB #105	25,1	5,5	48,8	8,2	47,7	15,1	31,4	16,8
PCB #138	32,6	10,9	49,2	8,3	50,8	22,7	22,0	16,9
PCB #126	25,9	7,3	49,6	6,3	45,0	15,7	25,8	13,0
PCB #167	38,6	15,7	47,3	2,5	45,0	11,8	22,3	10,2
PCB #156	33,2	13,3	47,1	5,7	41,7	10,8	22,4	7,1
PCB #157	28,8	11,7	50,3	6,5	48,2	15,2	27,6	33,0
PCB #180	39,5	17,0	33,2	26,0	39,0	19,3	16,8	12,5
PCB #169	29,9	10,6	36,8	36,1	--	--	49,4	24,6
PCB #189	39,4	19,5	47,1	6,5	47,7	17,6	17,5	25,5

Al evaluar los cuatros métodos utilizados para la determinación de PCBs en leche de vaca, la técnica QuEChERS es la que entrega resultados bajos de recuperación frente a los otros métodos, debido a la baja afinidad de los PCBs con acetonitrilo. Aun así, la variación de los resultados en la recuperación fluctúa alrededor de un 10%.

Por el contrario, empleando el método de extracción líquido-líquido con éter de petróleo como solvente, los porcentajes de recuperación son superiores en comparación con los métodos ya mencionados. Aunque no se aprecia una diferencia evidente entre la etapa de limpieza (clean-up) con Florisil y C₁₈, se seleccionó finalmente, el primer cartucho mencionado, debido a que presenta una menor dispersión de los resultados respecto al promedio, mostrando ser más reproducible (Figura 24).

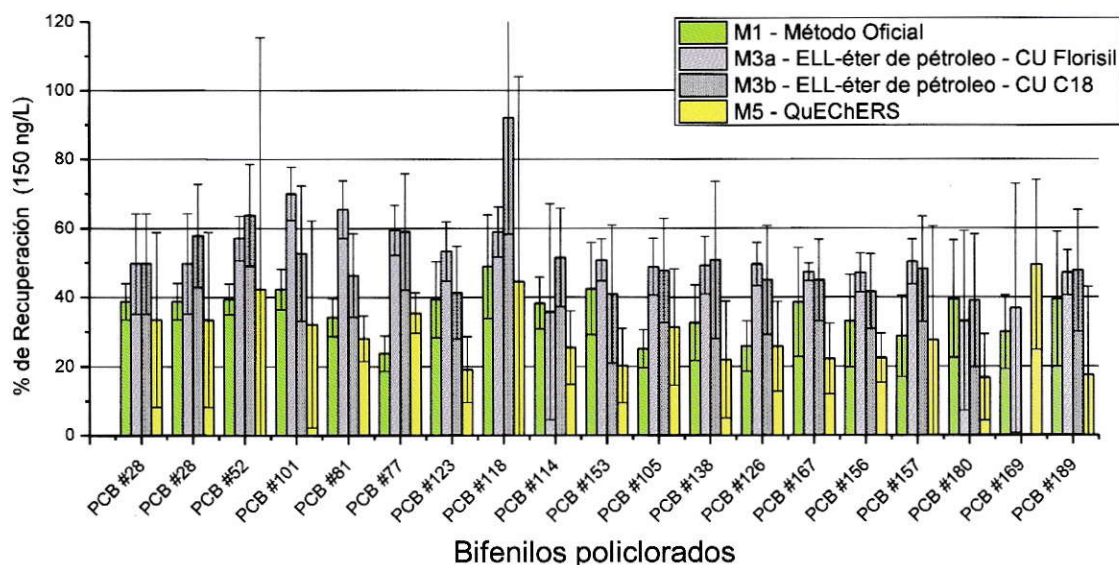


Figura 24. Resultados de la recuperación porcentual de los diferentes métodos de extracción de PCBs de una muestra de leche de vaca fortificada a 150 ng/L.

3.1.3. Optimización de los métodos

Las pruebas de optimización se hicieron en base a todos los COPs. Las condiciones óptimas seleccionadas se realizaron en base al analito que presentó menor recuperación. Para el caso de los OCPs correspondió a Aldrin. En la Figura 25 se graficó la respuesta frente a los diferentes factores y niveles considerados, evaluados de manera independiente.

De acuerdo a los ensayos realizados para la optimización (Figura 26), los resultados indica que el “tratamiento de la muestra previa a la etapa de extracción” para el método QuEChERS, afecta de manera negativa la recuperación del analito de la matriz, disminuyendo en un 15% su valor. La “agitación de la muestra durante 5 minutos” obtuvo una mejora de los resultados en un 6 % frente al otro nivel, mientras que la “sonicación” genera una pérdida en la recuperación de un 5%. Los gráficos fueron realizados con el programa estadístico Minitab 6.

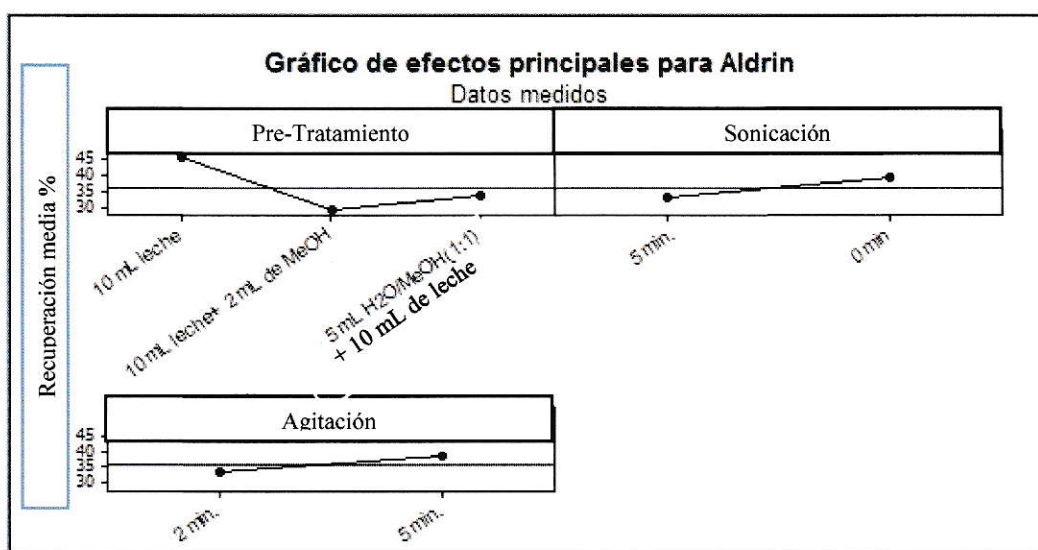


Figura 25. Gráficos de efectos principales en la optimización del método QuEChERS para la determinación de OCPs.

En la Figura 26, se graficó las interacciones de los diferentes factores y sus correspondientes niveles evaluados. En él se puede observar que la muestra bajo condiciones; “sin pre-tratamiento, sin sonicación y agitación durante 5 minutos”, obtiene altos porcentaje de recuperación, entorno al 50%, reafirmando los resultados anteriormente evaluados de manera independiente.

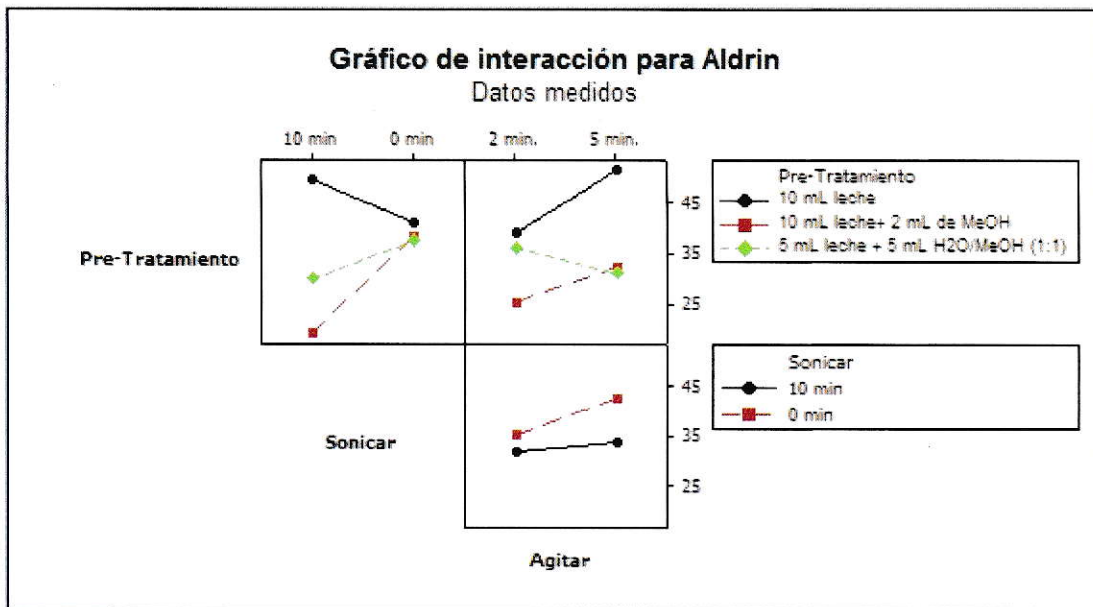


Figura 26. Interacción de los diferentes factores evaluados en la optimización del método QuEChERS para la determinación de OCPs.

En la Figura 27 se graficó la respuesta del PCB #180 frente a los diferentes factores y niveles considerados, evaluados de manera independiente. El tratamiento previo de la muestra de leche con la adición de 2 mL de metanol, obtuvo una recuperación de un 13% superior por sobre otros niveles evaluados, reafirmando lo descrito en la literatura. El baño ultrasonido o la acción de “sonicar” a la cual se somete la muestra, favorece en un 3% la recuperación, situación contraria a las de los OCPs. Esto también describe de manera análoga que el comportamiento de los PCBs en la matriz es diferente a las de los OCPs, aunque ambos se caracterizan por alto grado de lipofilia.

Los diferentes niveles del factor “agitación” mejoran de manera significativa la extracción. En tanto un mayor volumen de éter de petróleo (15 mL) en la etapa de extracción mejora en un 20% en los resultados de recuperación.

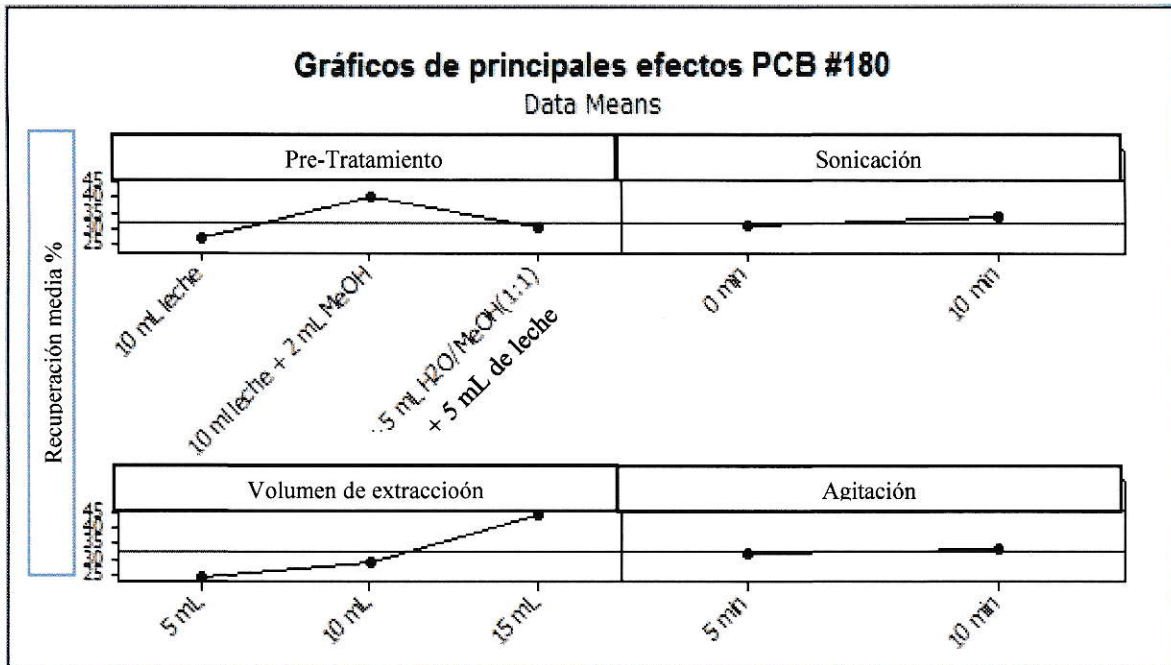


Figura 27. Gráficos de efecto principales en la optimización del método ELL para la determinación de PCBs.

En la Figura 28, se graficó las interacciones de los diferentes factores y sus correspondientes niveles evaluados. Se puede observar que la muestra bajo condiciones analíticas de; “10 mL de muestra + 2 mL de MeOH, sonicar la muestra por 10 min, la adición de 15 mL de éter de petróleo y la agitación durante 5 minutos”, son las mejores condiciones para la extracción de PCBs de la matriz, obteniendo una recuperación de un 62%.

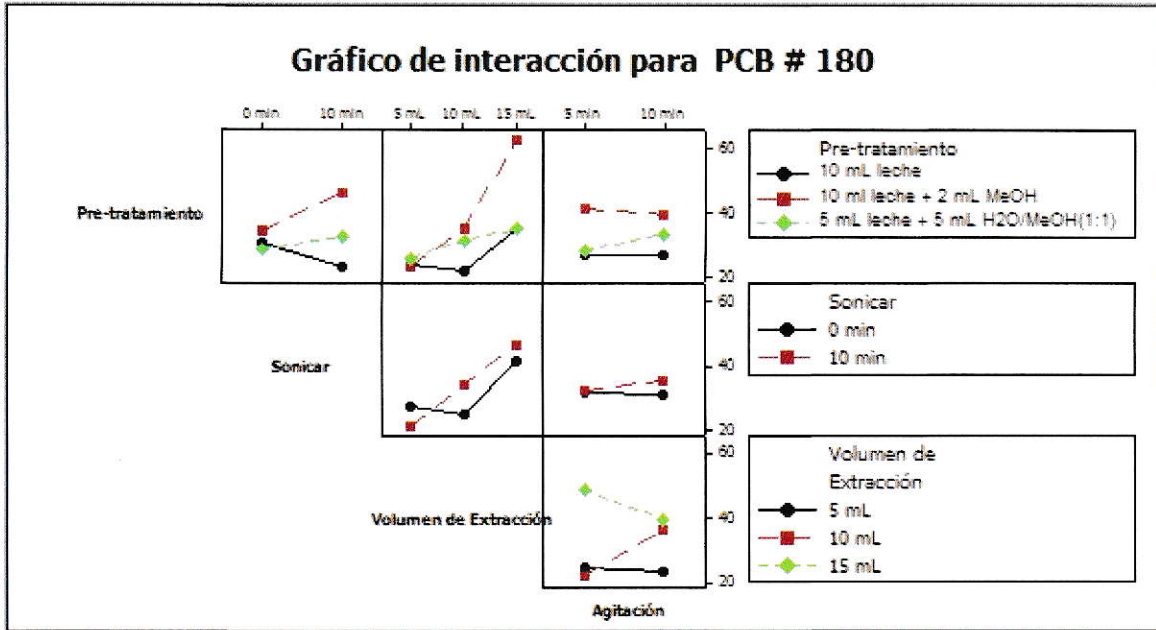


Figura 28 Interacción de los diferentes factores evaluados en la optimización del método ELL para la determinación de PCBs.

3.1.4. Efecto de la matriz en el análisis de COPs por cromatografía de gases con detector de captura de electrones.

La elaboración de una curva en matriz externa (CME) y la curva en solvente (CS), difirieron en la preparación. Es decir, para la CME se empleó un extracto de un blanco de leche materna para aforar la solución, mientras en la curva en solvente se empleó hexano. Ambas presentan la misma concentración de los analitos (COPs), aun así, no proporcionaron la misma respuesta instrumental. La composición química de la leche tuvo una influencia sobre la respuesta lineal de los diferentes analitos. A modo de ejemplo se graficó la respuesta del PCB # 81 (Figura 29). La matriz genera una disminución de la respuesta instrumental (pendiente), para las curvas en matriz externa. La curva en matriz interna presentó la menor respuesta instrumental debido a la pérdida de los analitos asociados a la extracción, sumado al efecto matriz.

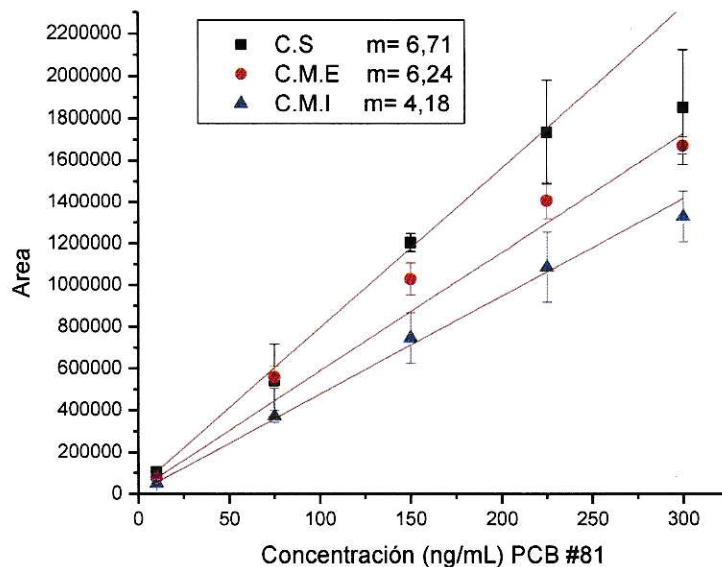


Figura 29. Evaluación de la respuesta instrumental bajo tres tipos de curvas para el PCB#81 .C.S= curva en solvente, C.M.I= curva en matriz interna, C.M.E= curva en matriz externa.

El efecto matriz provoca un error sistemático proporcional, dependiente de la concentración de analito en la muestra (Figura 28).

En la Figura 30 para los OCPs y Figura 31, para los PCBs, se evalúa la recuperación obtenida de la extracción bajo los tres tipos de curvas de calibración; en solvente, en matriz externa y en matriz interna.

Existe diferencia al evaluar la recuperación de los pesticidas organoclorados, mediante las diferentes curvas. El resultado obtenido para una curva de calibración en matriz interna arrojó valores de recuperación de 40% mayor sobre las otras. Mientras que para los PCBs se obtiene una menor diferencia. Esto es debido al uso del estándar interno en una etapa intermedia del método extracción y no de un inicio como es el caso de los OCPs.

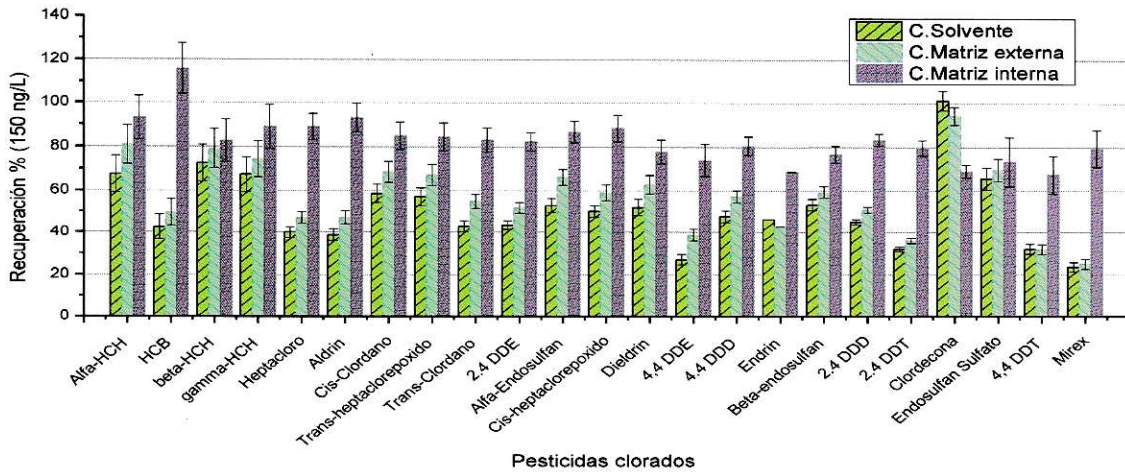


Figura 30. Fortificado de OCPs en matriz, evaluado mediante diferentes curvas.

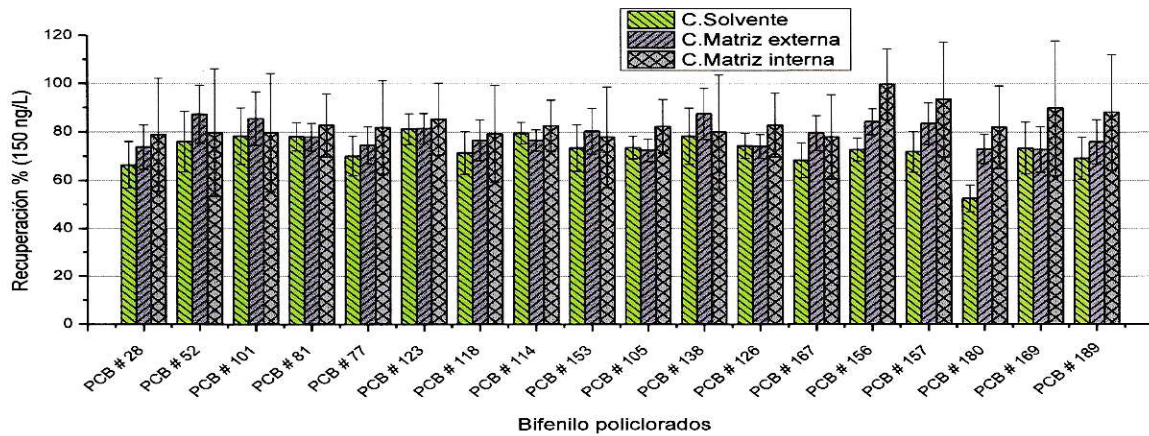


Figura 31. Fortificado de PCBs en matriz, evaluado mediante diferentes curvas.

Por lo tanto es necesario realizar la validación del método bajo una curva de calibración en matriz interna, para evitar la sobreestimación de los resultados cuantitativos o la subestimación, debido a la presencia de componentes que ocasionan que los analitos sean adsorbidos por la matriz.

3.2. Evaluación de los parámetros de validación

Para la validación del procedimiento analítico desarrollado, se determinaron diferentes parámetros con el fin de demostrar que el procedimiento cumple con los requisitos para las aplicaciones analíticas previstas. Los criterios de evaluación empleado se basaron en los definidos por la AOAC.

3.2.1. Selectividad

Mediante el cromatograma (Figura 32) de OCPs inyectado en solvente versus OCPs en matriz, se demostró la capacidad del método analítico para medir e identificar simultáneamente sin interferencias entre los analitos y/o sustancias propias de la leche materna, u otras sustancias química que pueden estar presentes en la muestra. Solo se logró ver un leve aumento de la señal ruido de la línea base.

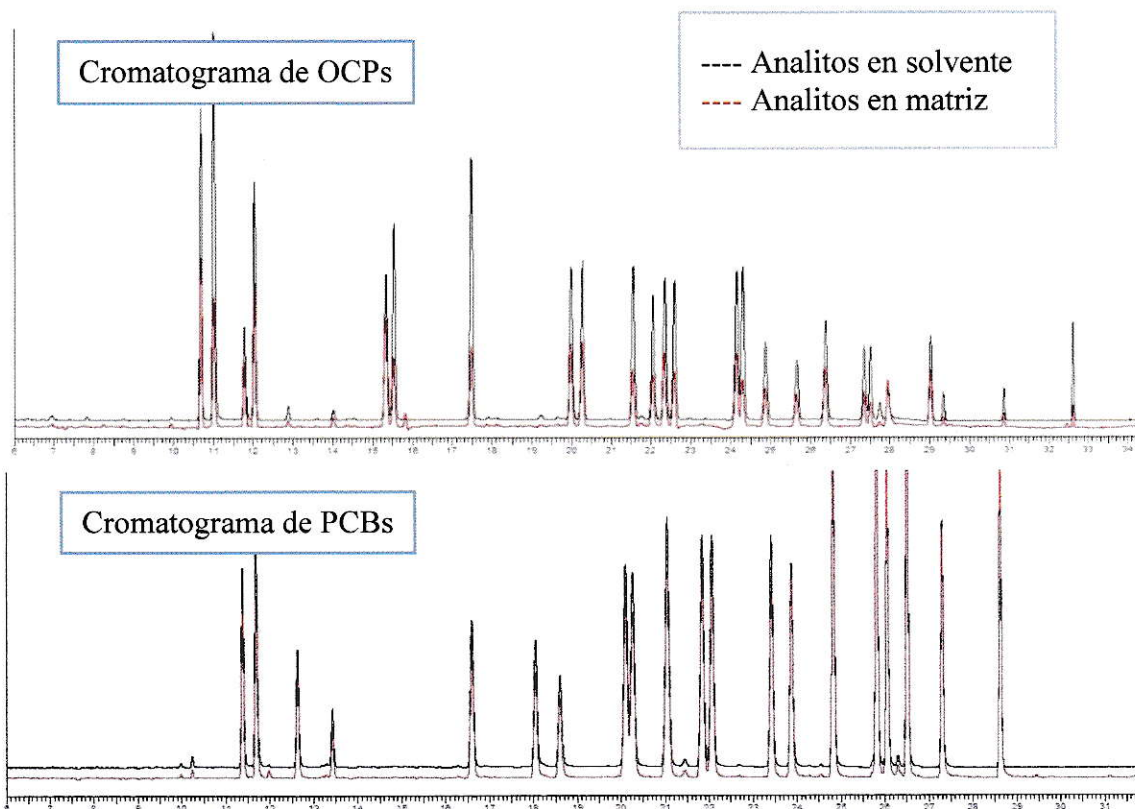


Figura 32. Estudio de la selectividad: Determinación de la capacidad del método para discriminar sin interferencia entre los analitos y la matriz de leche materna.

3.2.2. Linealidad y sensibilidad

Los resultados del estudio de linealidad se resumen en la Tabla 23. Los datos obtenidos indican que el modelo ajustado es capaz de explicar la respuesta a partir de la variable concentración, de modo que el intervalo de concentración entre 16 ng/mL y 250 ng/mL se comportó de manera lineal. De acuerdo a la evaluación estadística de la linealidad, los resultados del coeficiente de correlación para cada analito, obtuvo valores $r > 0,99$, el cual indica un alto grado de correlación entre las variable. De modo que se cumple con el requisito como criterio de aceptabilidad estipulada.

La pendiente se encuentra directamente relacionada con la sensibilidad del método, de forma que el analito alfa-HCH presenta una mayor respuesta frente a pequeños cambios de concentración ($m=9,291$). Mientras que el analito menos sensible al método QuEChERS desarrollado para determinación de OCPs corresponde a 4,4' DDT ($m= 0,846$).

Tabla 23. Resultados de los parámetros de validación del método QuEChERS para la determinación de OCP en leche materna.

	Límites					Veracidad						
	Promedio (n=3) (ng/mL)	σ	LOD (n=6)	LOQ (n=6)	Razón de conformidad	Sesgo	σ	t _{calc}	Recuperación nivel 1 (n=6) (ng/mL)	σ	Recuperación nivel 2(n=6) (ng/mL)	σ
alfa-HCH	7,4	0,6	1,9	5,7	4	77,9	7,2	1,0	99,3	1,9	94,0	6,7
HCB	8,2	0,5	1,7	5,1	5	81,2	6,6	2,3	94,1	1,2	99,0	8,2
beta-HCH	7,9	0,6	1,9	5,9	4	81,1	7,1	2,1	102,8	1,1	93,1	4,5
gamma-HCH	7,8	0,5	1,6	4,9	5	79,9	6,8	1,8	102,0	1,0	92,5	5,3
Heptacloro	8,2	0,5	1,7	5,2	5	72,4	4,8	1,4	112,1	2,3	84,9	1,9
Aldrin	8,0	0,5	1,6	4,8	5	72,3	7,4	0,9	101,7	2,3	90,0	7,4
Cis-Clordano	7,4	0,5	1,7	5,3	4	80,2	5,7	2,2	102,0	1,5	90,5	6,1
Trans-heptacloropoxido	7,9	0,6	1,8	5,5	4	75,9	7,2	0,3	102,7	1,4	91,3	4,3
Trans-Clordano	7,5	0,4	1,3	3,8	6	75,3	5,6	0,1	101,3	2,6	89,2	6,7
2.4-DDE	7,7	0,6	2,0	6,0	4	79,3	6,8	1,5	100,0	2,2	91,2	6,1
Alfa-Endosulfan	7,5	0,5	1,7	5,3	4	76,1	6,8	0,4	102,2	1,4	90,2	5,6
Cis-heptacloropoxido	16,5	0,4	1,2	3,6	10	73,1	6,7	0,6	101,6	2,5	90,0	5,0
Dieldrin	7,8	0,4	1,3	4,0	6	73,7	7,0	0,5	103,9	2,4	87,8	5,4
4,4'- DDE	7,9	0,7	2,2	6,6	4	73,9	6,5	0,4	103,9	1,9	86,8	5,9
4,4'- DDD	7,9	0,5	1,8	5,5	4	73,7	6,3	0,5	98,6	2,3	90,7	7,5
Endrin	8,4	0,7	2,2	6,7	4	75,0	6,5	0,0	117,7	2,9	81,7	1,7
Beta-endosulfan	15,3	0,7	2,2	6,7	8	77,6	7,9	0,8	105,5	0,5	88,8	4,0
2.4 DDD	7,8	0,6	2,0	6,1	4	73,8	4,9	0,6	105,5	0,5	86,6	5,8
2.4 DDT	8,5	0,7	2,1	6,5	4	75,3	7,0	0,1	112,2	5,3	83,0	2,6
Clordecon	8,1	0,4	1,4	4,2	6	87,4	1,3	20,7	107,3	1,1	91,2	5,2
Endosulfan Sulfato	8,5	0,7	2,2	6,7	4	78,2	6,1	1,3	112,6	2,3	87,8	1,6
4,4 DDT	7,3	0,5	1,7	5,0	4	76,5	6,9	0,5	119,3	7,2	82,5	2,8
Mirex	7,4	0,5	1,8	5,3	4	75,4	5,2	0,2	102,1	3,8	90,5	6,0

Tabla 23. Resultados de los parámetros de validación del método QuEChERS para la determinación de OCP en leche materna (continuación)

	Linealidad y sensibilidad			Precisión					
	Promedio pendiente (ng/mL) (n=3)	Promedio Intercepto	Promedio Coef. Corr.	Repetibilidad (ng/mL) (n=6)	σ	CVR%	Reproducibilidad (ng/mL) (n=10)	σ	CVR%
alfa-HCH	9,291	-0,017	0,996	79,4	6,7	8,4	75,6	2,7	3,6
HCB	6,806	0,053	0,998	83,1	7,8	9,4	76,6	3,5	4,5
beta-HCH	2,836	-0,003	0,995	84,1	6,7	8,0	74,8	2,9	3,9
gamma-HCH	6,873	-0,032	0,994	82,1	6,0	7,3	74,1	2,9	3,9
Heptacloro	5,306	-0,046	0,995	77,7	8,3	10,7	73,9	1,5	2,1
Aldrin	6,476	-0,045	0,997	75,2	7,5	10,0	75,0	1,5	2,0
Cis-Clordano	5,947	-0,009	0,996	79,4	6,6	8,3	75,1	3,3	4,4
Trans-heptacloropoxido	6,034	-0,011	0,996	79,5	7,2	9,1	74,5	4,6	6,2
Trans-Clordano	5,099	-0,017	0,996	76,9	7,5	9,8	74,6	2,7	3,6
2.4' - DDE	3,816	0,003	0,997	79,9	7,8	9,7	76,1	2,7	3,5
alfa-Endosulfan	5,765	-0,006	0,996	79,2	6,7	8,4	75,2	3,3	4,4
Cis-heptacloropoxido	4,716	-0,005	0,996	78,5	7,8	10,0	74,5	3,0	4,0
Dieldrin	5,765	-0,022	0,995	78,0	7,9	10,1	74,7	3,3	4,4
4,4' - DDE	4,440	-0,026	0,996	78,4	7,9	10,1	75,4	2,5	3,3
4.4' - DDD	3,587	0,001	0,996	77,8	7,3	9,4	75,6	1,8	2,4
Endrin	3,538	-0,030	0,994	79,2	7,9	9,9	76,0	3,4	4,5
Beta-endosulfan	5,890	-0,012	0,996	79,5	6,5	8,2	76,9	5,2	6,8
2.4' - DDD	3,865	-0,029	0,995	75,6	7,1	9,4	74,9	1,7	2,3
2.4' - DDT	1,915	-0,015	0,992	79,4	8,5	10,7	75,5	2,0	2,7
Clordecon	1,446	0,006	0,996	95,2	9,0	9,5	77,9	6,9	8,9
Endosulfan Sulfato	4,001	-0,010	0,997	81,7	6,9	8,5	76,1	2,0	2,6
4,4' - DDT	0,846	-0,008	0,991	79,6	8,3	10,4	74,7	4,8	6,5
Mirex	1,745	0,002	0,995	79,0	8,0	10,2	78,6	4,1	5,2

Tabla 24. Resultados de los parámetros de validación del método ELL para la determinación de PCBs en leche materna.

	Linealidad y sensibilidad			Precisión					
	Promedio pendiente (ng/mL) (n=3)	Promedio Intercepto	Promedio Coef. Corr.	Repetibilidad (n=6) (ng/mL)	σ	CVr %	Reproducibilidad (n=10) (ng/mL)	σ	CVR %
PCB # 28	1,3972	-0,0159	0,9978	69,9	6,0	8,5	75,3	4,1	5,5
PCB # 52	0,8690	0,0065	0,9959	83,4	9,6	11,6	74,5	4,3	5,7
PCB # 101	1,6103	0,0191	0,9950	79,1	9,1	11,5	74,1	4,3	5,8
PCB # 81	1,5654	-0,0028	0,9978	75,5	4,4	5,8	75,0	4,6	6,2
PCB # 77	1,1112	-0,0023	0,9946	79,0	8,8	11,2	75,9	4,7	6,2
PCB # 123	2,5955	0,0095	0,9957	76,7	5,7	7,5	75,4	7,4	9,8
PCB # 118	2,0064	0,0072	0,9969	70,6	8,1	11,5	76,9	7,3	9,5
PCB # 114	3,1559	-0,0075	0,9970	77,0	5,7	7,4	75,1	3,1	4,1
PCB # 153	2,6270	0,0074	0,9963	75,2	6,1	8,2	78,0	4,7	6,0
PCB # 105	2,7304	-0,0126	0,9955	75,8	6,6	8,7	74,4	3,7	4,9
PCB # 138	2,2379	0,0122	0,9963	73,1	5,2	7,2	76,5	4,7	6,1
PCB # 126	2,2705	-0,0115	0,9960	69,5	5,8	8,3	71,0	6,6	9,3
PCB # 167	3,1139	0,0067	0,9969	71,1	7,0	9,9	72,2	3,4	4,8
PCB # 156	3,6350	-0,0097	0,9949	72,7	8,4	11,6	72,6	5,1	7,0
PCB # 157	2,9667	0,0041	0,9964	73,5	6,4	8,7	73,0	5,2	7,2
PCB # 180	3,2714	0,0038	0,9901	71,3	6,5	9,0	72,5	3,7	5,1
PCB # 169	2,1781	-0,0142	0,9966	67,9	6,4	9,4	72,4	6,9	9,6
PCB # 189	3,1523	-0,0039	0,9980	69,9	6,0	8,5	74,4	3,0	4,0

Tabla 24. Resultados de los parámetros de validación del método ELL para la determinación de PCBs en leche materna. (Continuación)

	Límites					Veracidad n=6						
	Promedio (ng/mL) (n=3)	σ	LOD (n=6)	LOQ (n=6)	Razón de conformidad	Sesgo	σ	t calc	Recuperación nivel 1 (n=6) (ng/mL)	σ	Recuperación nivel 2 (n=6) (ng/mL)	σ
PCB # 28	19,6	1,3	4,3	13,2	5	74,5	4,8	0,2	96,7	8,9	105,5	6,3
Aclor D13												
PCB # 52	20,5	1,3	4,4	13,3	5	83,4	9,6	2,1	103,3	10,1	106,1	19,6
PCB # 101	20,7	1,3	4,2	12,9	5	79,1	9,1	1,1	79,4	7,3	102,6	8,8
PCB # 81	21,3	1,7	5,7	17,2	4	75,5	4,4	0,3	89,6	23,9	102,1	3,8
PCB # 77	21,4	1,5	4,9	15,0	4	79,0	8,8	1,1	97,8	9,2	100,2	14,3
PCB # 123	20,8	1,6	5,3	16,3	4	79,6	9,5	1,2	103,8	8,9	99,2	13,7
PCB # 118	21,6	1,4	4,7	14,4	5	70,6	8,1	1,3	102,7	12,7	96,4	13,7
PCB # 114	19,8	1,5	5,0	15,1	4	75,6	7,1	0,2	110,3	14,8	94,7	11,3
PCB # 153	19,8	1,4	4,5	13,8	4	75,2	6,1	0,1	108,4	6,7	100,5	12,1
PCB # 105	20,2	1,4	4,5	13,7	4	75,8	6,6	0,3	103,2	12,0	97,5	13,1
PCB # 138	20,3	1,5	5,0	15,2	4	73,1	5,2	0,9	110,8	1,9	99,3	12,8
PCB # 126	19,3	1,0	3,4	10,4	6	69,5	5,8	2,3	104,7	33,4	107,5	9,6
PCB # 167	21,2	1,3	4,4	13,2	5	70,4	5,7	2,0	111,4	30,0	109,9	9,6
PCB # 156	20,3	1,7	5,5	16,6	4	71,6	6,3	1,3	99,3	15,8	97,0	14,5
PCB # 157	19,5	1,5	4,9	14,9	4	73,5	6,4	0,6	96,4	31,5	108,7	10,6
PCB # 180	20,3	1,7	5,5	16,8	4	71,3	6,5	1,4	95,1	15,1	96,7	13,9
PCB # 169	19,9	1,6	5,2	15,9	4	67,9	6,4	6,9	112,0	31,2	105,1	11,7
PCB # 189	21,6	1,6	5,4	16,3	4	72,2	8,3	0,9	108,5	36,0	105,6	11,9



3.3. Límites de detección y cuantificación

En la Tabla 23 y 24 se muestra los resultados obtenidos del límite de detección (LD) y el límite de cuantificación (LC). En general, se observa que la mayoría de los compuestos OCPs tienen un LD entre 1,3 – 4,8 ng/mL, mientras que para los PCBs el LD estuvo en un rango entre 3,4 – 5,7 ng/mL.

La razón de conformidad para los COPs se observó valores dentro del rango 4 – 10, a excepción del cis-heptacloropóxido y beta endosulfán, por lo cual fue necesario repetir la experiencia para estos dos analitos, fortificando la muestra a una concentración de 20 ng/mL. Por lo cual el valor elegido para la determinación del límite de detección y el límite de cuantificación de acuerdo al nivel más bajo, es el correcto.

3.3.1. Precisión del método

La precisión de la metodología para cada uno de los COPs, se evaluó con estudios de repetibilidad y de reproducibilidad, utilizando como criterio de evaluación el coeficiente de variación de Horwitz ($CV\%_h$). En condiciones de repetibilidad de acuerdo a la Ecuación 9, el valor fue de un 11.8% ($CV\%_r$) a un nivel de concentración de 75 ng/mL. El coeficiente de variación de Horwitz en condiciones de reproducibilidad de acuerdo a la Ecuación 13 fue de 15.8% ($CV\%_R$), para el mismo nivel de concentración (Tabla 23 y 24).

La variación de los resultados obtenidos en la evaluación de la precisión, dependió principalmente del proceso de preparación de la muestra. El uso de alaclor D13 como estándar subrogante, compensó las pérdidas producidas durante el desarrollo de método.

Si se observa el gráfico de precisión para los pesticidas organoclorados (Figura 33), el clordano tiene una recuperación por exceso de 95,2 ng/mL y un $CV\%$ de un 9,7%. Aun así este valor es preciso, ya que se evalúa la diferencia existente entre los resultados sin considerar el valor próximo al de fortificación (75 ng/mL).

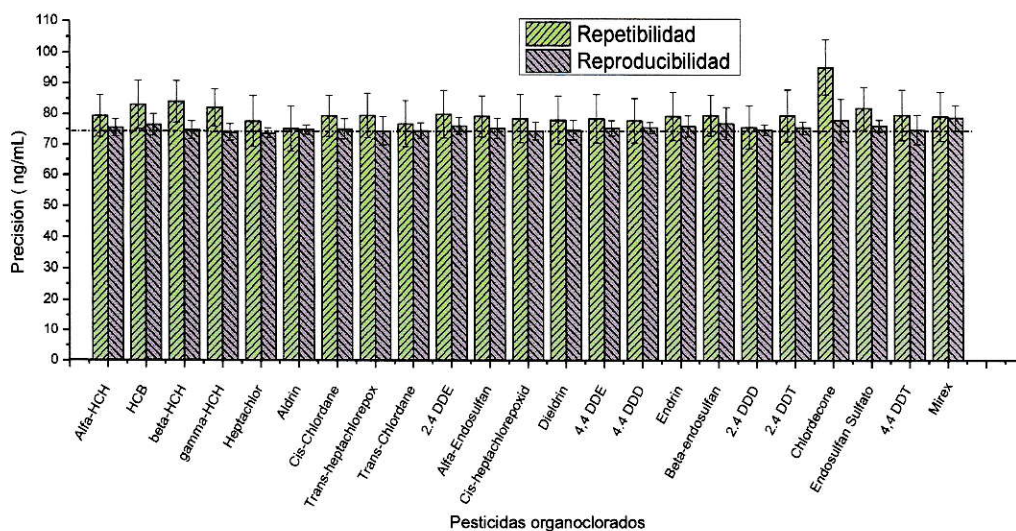


Figura 33. Precisión del método M5: técnica QuEChERS en la determinación de OCPs en leche materna.

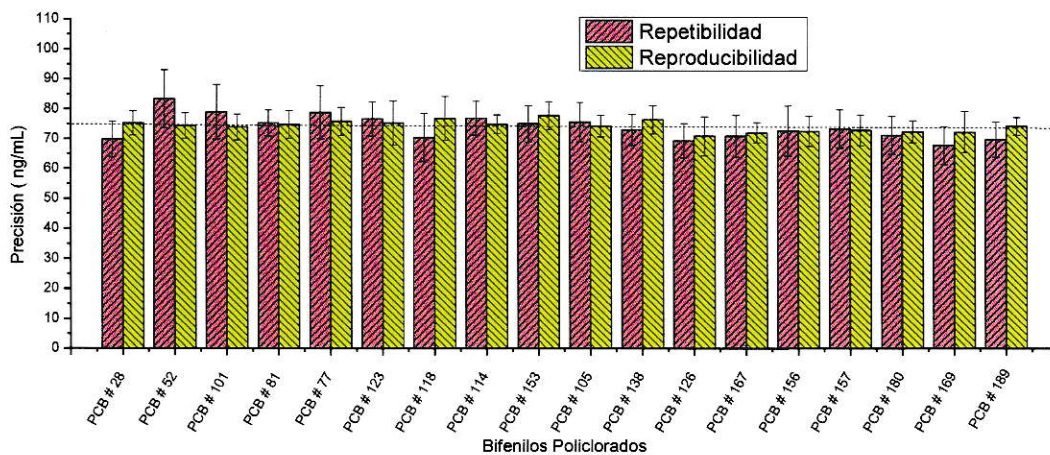


Figura 34. Precisión del método M3A: Extracción líquido-líquido con éter de petróleo y limpieza con cartucho Florisil en la determinación de PCBs en leche materna.

El estudio de la variabilidad del método efectuado sobre la misma muestra en las mismas condiciones operativas (repetibilidad), entregó valores entre un 7,3 – 10,7 CV%_r para el método de pesticidas organoclorados. Para los bifenilos policlorados los valores fueron entre un 5,8 – 11,6 CV%_r (Figura 34).

En tanto el estudio de la variabilidad (reproducibilidad) realizado sobre la misma muestra en condiciones operativas diferentes (durante 5 días), los valores obtenidos fluctúan entre un 2,0 – 8,9 CV%_R para el método de OCPs, mientras que para el método de PCBs los valores fueron entre un 4,0 – 9,8 CV%_R.

Por lo cual la evaluación de la repetibilidad como la reproducibilidad para OCPs y PCBs se acepta, ya que el coeficiente de variación obtenido en la experiencia es menor al coeficiente de variación de Horwitz en condiciones de repetibilidad, ($CVR\% < 11,8 CVR\%_{\text{-Horwitz}}$). En tanto el coeficiente de variación de Horwitz en condiciones reproducibilidad fue menor al valor teórico crítico ($CVR\% < 15,8 CVR\%_{\text{-Horwitz}}$).

3.3.2. Veracidad

Con el parámetro veracidad se evaluó el grado de concordancia entre los resultados y el valor de referencia al nivel que fue fortificada la muestra, permitiendo ver el rendimiento del método analítico en cuanto al proceso de extracción.

3.3.2.1. Recuperación

Este parámetro de validación se evaluó determinando el porcentaje de recuperación mediante la fortificación de la leche materna a dos niveles concentración, correspondiente a 30 ng/mL y 150 ng/mL, a las que se aplicó el proceso de extracción correspondiente.

El criterio de aceptación en base al valor obtenido para el porcentaje de recuperación se basó en los criterios de AOAC (Tabla 7, R% de acuerdo a la concentración esperada del analito). Para la muestra fortificada a nivel de concentración

de 30 ng/mL el rango de %R teórico esperado es entre un 60-115%, mientras para el nivel de fortificación de 150 ng/mL el rango de %R teórico esperado es entre un 80-110%.

En la Figura 35 se graficó el porcentaje de recuperación, entre los diferentes pesticidas organoclorados, mientras en la Figura 36 se presentan los bifenilos policlorados. La línea roja corresponde al rango de recuperación utilizado como criterio de aceptabilidad.

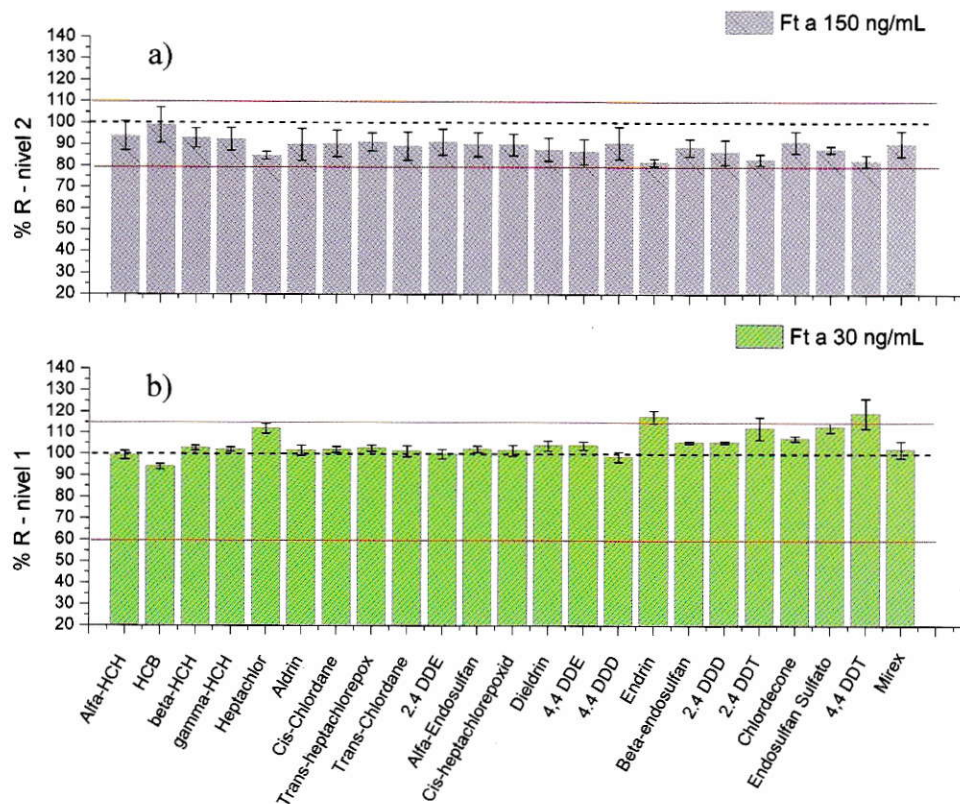


Figura 35. Resultados de recuperación obtenido para el método QuEChERS en la determinación de OCPs en leche materna, evaluada a dos niveles de concentración.

Para los OCPs fortificados a nivel de 30 ng/mL (Figura 35 a), se obtuvieron valores de recuperación de un 94-119%, y una desviación estándar de un 0,5-7,2 %. Mientras para la recuperación a nivel de fortificación de 150 ng/mL (Figura 35 b), se

obtuvieron valores de recuperación de 81-99% y una desviación estándar de 1,6-8,2%. Los analitos endrin y 4,4' DDT, originan una desviación de la exactitud por exceso, obteniendo valores de recuperación de un 117 % y un 119% respectivamente. En este caso se puede deber a interferencias de la matriz. Para los OCPs a nivel de fortificación de 150 ng/mL el porcentaje de recuperación se encuentra dentro de los criterios de evaluación, pero se produce una desviación de la exactitud menor el valor teórico. Aun así el método QuEChERS demuestra ser un procedimiento tanto exacto como preciso.

Para los PCBs fortificados a nivel de 30 ng/mL (Figura 36 b), se obtuvieron valores de recuperación de un 79 -112%, y una desviación estándar de un 1,9 - 36%. En tanto para la recuperación a nivel de fortificación de 150 ng/mL (Figura 36a), se obtuvieron valores de recuperación de 99-105% y una desviación estándar de 3,8-19,6%, por lo cual los resultados se encuentra dentro del rango de %R teóricos esperados.

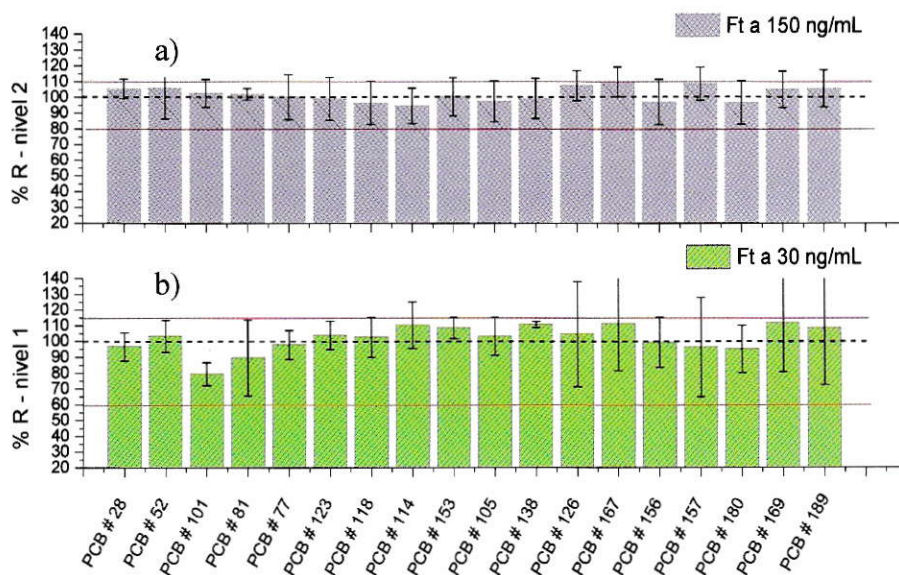


Figura 36. Resultados de recuperación obtenido para el método ELL clean-up florisil en la determinación de PCBs en leche materna, evaluada a dos niveles de concentración.

En síntesis, aunque todas las etapas de extracción estén sistematizadas en factores como tiempo, agitación, volumen y temperatura, la naturaleza química de la

leche materna y las interacciones físicas y/o químicas de los reactivos durante el análisis, introducen errores aleatorios al método.

Para el caso de los PCBs se presentan una distribución aleatoria en los diferentes ensayos mayores en comparación al método QuEChERS. Por lo que el uso del estándar subrogante juega un rol protagónico en el análisis de cantidades trazas, especialmente si es utilizado desde una etapa inicial. Si el estándar subrogante y el analito responden proporcionalmente a los errores instrumentales y fluctuaciones del método, la razón entre las señales será independiente a las variaciones.

Si bien no existe una norma o reglamento que fije límites de COPs en leche materna, debido a que son sustancias de uso prohibido o en algunos casos de uso restringido, paradójicamente el Codex y la Unión Europea (EU) fija Límites Máximos Residuales en alimentos. Estos límites son basados en estudios toxicológicos, que permite concentración máxima de residuos de una sustancia (plaguicida) en uso de superficie o parte interna de un producto alimenticio. Bajo este argumento los LD logrados, son igual al LMR en leche o alimento de origen lácteo, siendo que el LD debe ser cinco veces menor. Por consiguiente, se necesita contar con técnicas analíticas selectivas, sensibles, robustas, con la finalidad de cubrir un gran número de compuestos en concentraciones más bajas.

IV - CONCLUSIONES

Se logró el desarrollo de dos metodologías alternativas al método oficial de la UNEP, para la determinación de COPs en leche materna. La evaluación de estos métodos se realizó con leche de vaca debido a la poca disponibilidad de leche materna.

Para la determinación de OCPs en muestra de leche de vaca, se desarrolló el método de extracción QuEChERS el que resultó ser uno de los procedimientos más rápidos y sencillos. Con esta técnica se obtuvo valores de recuperación entre un 29,8-141,0% de OCPs de una muestra fortificada a 150 ng/mL. Mientras para la determinación de PCBs, se desarrolló el método extracción líquido-líquido utilizando éter de petróleo como agente extractante y Florisil para la etapa de limpieza del extracto, con el que se obtuvo valores de recuperación entre un 33,2-65,5 % de los analitos desde la matriz. En tanto con el método oficial solo se logró valores de recuperación entre un 0,4-71,5% para determinación de OCPs, mientras la determinación de PCBs fue de un 23,8 – 48,9%.

Las principales ventajas de los métodos implementados frente al método oficial de la UNEP para la extracción COPs, fue el uso de solvente, el tiempo de análisis y la baja manipulación de las muestras. El consumo de solvente se redujo de 210 mL a 11 mL como también la disminución de residuos, mientras que el análisis de muestras por día fue de 3 mediante el método oficial, mientras mediante los métodos alternativos fue de 23 muestras.

El diseño factorial en la optimización analítica para la determinación de COPs en leche materna, permitió estudiar los efectos que pueden tener varios factores sobre la recuperación de los analitos desde la matriz, como fue el uso de metanol, el tiempo de agitación, tiempo de baño ultrasonido, además del volumen de solvente como agente extractante. En base a esto se determinaron las condiciones óptimas para la extracción de OCPs y PCBs de leche materna, logrando valores recuperación en base al analito más

crítico de un 28,9% a 51,5% para el Aldrin y de un 33,2% a 62,9% para el PCB # 180, evaluados en una curva en solvente.

Finalmente, la metodología multiresiduo para el análisis de 25 pesticidas organoclorados y 18 bifenilos policlorados en leche materna evaluada en una curva en matriz interna, obtuvo un porcentajes de recuperación entre el 94-119% y coeficientes de variación entre el 0,5% - 7,2% para OCPs, mientras la recuperación PCBs fue entre el 79-112% y coeficientes de variación entre el 1,9%-36.0%. La cual señala que la validación de las metodologías implementadas cumple con los parámetros mínimos de selectividad, linealidad, exactitud y precisión para la determinación de COPs de manera simultánea, con un bajo efecto matriz. Por lo tanto se cumple con los requisitos para la aplicación analítica prevista, basados en criterios definidos por la AOAC para este tipo de análisis.

REFERENCIAS

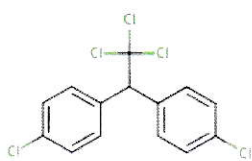
- A.E.F.I. (2001). Validación de métodos analíticos. In A. E. de Farmacéuticos (Ed.), Validación de métodos analíticos (Marzo 2001, pp. 45–105). Barcelona.
- Agilent Technologies. (2002). Gas Chromatographs, G1176-9000, 60.
- Agilent Technologies. (2011). Agilent QuEChERS Selection Guide. Retrieved from www.agilent.com/chem/sampleprep
- Albert, L. A. (2002). Compuestos orgánicos persistentes. Toxicología Ambiental (pp. 333–358). Mexico. Editorial Limusa.
- Baird, C., & Cann, M. (2008). Environmental Chemistry. W. H. Freeman and Company (Vol. 1). Nueva York, USA. Editorial W.H Freeman and Company.
- Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec. (2015). Protocole pour la validation d'une méthode d'analyse en chimie.
- CHROMAcademy. (2015). Sample Preparation Liquid/Liquid Extraction Techniques. Retrieved from http://www.chromacademy.com/lms/sco59/Sample_Preparation_Liquid-Liquid_Extraction_Techniques.pdf
- EPA. (2002). The Foundation for Global Action on Persistent Organic Pollutants: A United States Perspective Office of Research and Development.
- EPA. (2015). Persistent Organic Pollutants: A Global Issue, A Global Response. Retrieved from <http://www.epa.gov/international-cooperation/persistent-organic-pollutants-global-issue-global-response>
- INECC, & Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático. (2013). Contaminantes Orgánicos Persistentes (COPs). Retrieved February 7, 2016, from <http://www.inecc.gob.mx/sqre-temas/765-sqre-cop#5>
- Instituto de Salud Pública. (2010). Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: “ Aspectos generales sobre la validación de métodos”. Santiago, Chile.
- J.T.Baker. (2012). Bakerbond speTM Column Instructions. Retrieved from <https://www.avantormaterials.com/WorkArea/DownloadAsset.aspx?id=4294972001>
- Martins, J. G., Amaya Chávez, A., Waliszewski, S. M., Colín Cruz, A., & García Fabila, M. M. (2013). Extraction and clean-up methods for organochlorine pesticides determination in milk. *Chemosphere*, 92(3), 233–246. <http://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.04.008>
- Mattice, J. (2010). Handbook of Pesticides: Methods of Pesticide Residues Analysis. *Journal of Environmental Quality* (Vol. 39). <http://doi.org/10.2134/jeq2010.0001br>

- Patterson, D. G., Aylward, L. L., Covaci, A., & Franzblau, A. (2014). *Biomonitoring for POPs. Environmental Forensics for Persistent Organic Pollutants*. Elsevier B.V. <http://doi.org/10.1016/B978-0-444-59424-2.00005-0>
- Plascencia Villa, G. (2003). *Espectrometría de masas*. Universidad Nacional Autónoma de México, 1–40. Cuernavaca, Mexico, Editorial U. Autonomía de México.
- PNUMA. (2007). *Guía para el plan de vigilancia mundial de contaminantes orgánicos persistentes*, 156.
- Ramírez, O. I. T. (2006). *Análisis de pesticidas por cromatografía de gas*. Bogotá, Colombia. Editorial Universidad Nacional de Colombia.
- Ritter, L., Solomon, K. R., Forget, J., & Stemeroff, M. (2015). *Persistent organic pollutants. Guelph on Canada*. Retrieved from <http://www.chem.unep.ch/pops/ritter/en/ritteren.pdf>
- Ritter, L., Solomon, K. R., Forget, J., Stemeroff, M., & O'Leary, C. (1995). *A Review of Selected Persistent Organic Pollutants*. *Apostila*, (December), 1–149.
- Rodan, B. D. (2000). *Screening for Persistent Organic Pollutants: Techniques To Provide a Scientific Basis for POPs Criteria in International Negotiations*. *Environmental Science & Technology*, 33(20), 3482–3488.
- SANCO. (2007). *Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed*. Sa. Document no. Sanco/3131/2007
- Skoog, D. A., Holler, F. J., & Crouch, S. R. (2008). *Principios de Análisis Instrumental*. Santa Fe, Mexico. Editorial Cengage Learning.
- Stockholm Convention. (2008). *The Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants*. Retrieved February 7, 2016, from <http://chm.pops.int/TheConvention/Overview/tabid/3351/Default.aspx>
- Sullivan, G. O., & Megson, D. (2014). *Brief Overview: Discovery, Regulation, Properties, and Fate of POPs*. *Environmental Forensics for Persistent Organic Pollutants*. Elsevier B.V. <http://doi.org/10.1016/B978-0-444-59424-2.00001-3>
- Stuardo, C. V. (2013). *Desarrollo y validación de un método analítico para determinación de plaguicidas disruptores endocrinos en leche materna mediante cromatografía de gases con detección por espectrometría de masas*. Universidad de Concepción
- United Nations Environment Programme. (2013). *Human exposure to pops across the globe: POPs levels and human health implications*. Stockholm. Retrieved from <http://www.unep.org/chemicalsandwaste/portals/9/POPs/docs/UNEP-POPS-COP.6-INF-33.English.pdf>
- United Nations Environment Programme. (2015). *Listing of POPs in the Stockholm Convention*. Retrieved from <http://chm.pops.int/TheConvention/ThePOPs/ListingofPOPs/tabid/2509/Default.aspx>

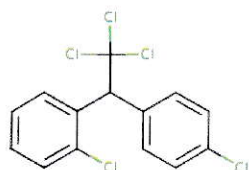
- Wania, F., & Mackay, D. (1996). Tracking the distribution of persistent organic pollutants. *Environmental Science & Technology*, 30(9), 390A–396A. [http://doi.org/10.1016/S0926-3373\(97\)80026-4](http://doi.org/10.1016/S0926-3373(97)80026-4)
- Watson, J. (1999). *Separation Methods for Waste and Environmental Applications*. New York.
- Wiberg, K. (2002). *Enantiospecific Analysis and Environmental Behavior of Chiral Persistent Organic Pollutants (POPs)*.

V - ANEXOS

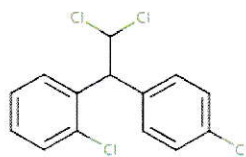
5.1. Pesticidas Organoclorados



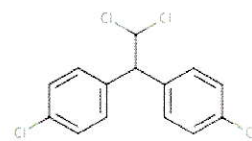
4,4'- DDT



2,4'- DDT



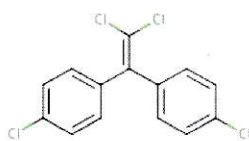
2,4'- DDD



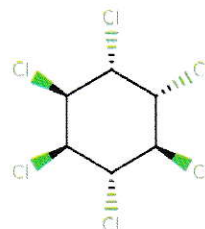
4,4'-DDD



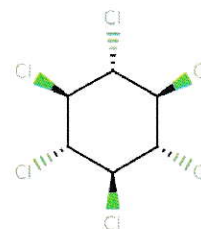
4,4'- DDE



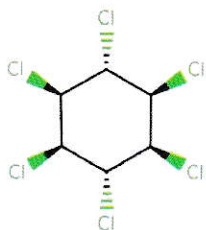
2,4'- DDE



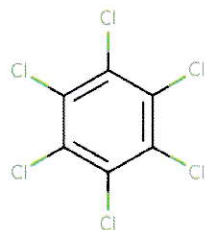
Alfa-HCH



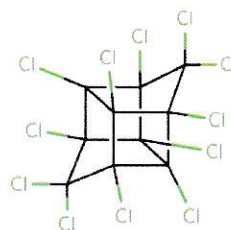
Beta-HCH



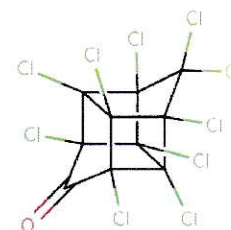
Gamma-HCH



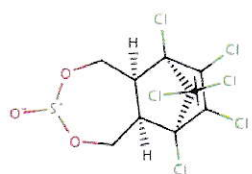
Hexaclorobenceno



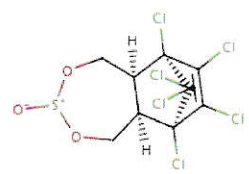
Mirex



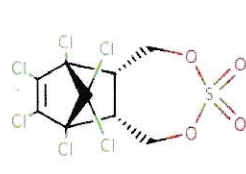
Clordecono



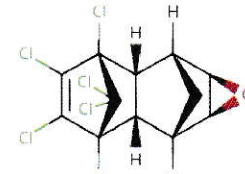
Alfa-endosulfan



Beta-endosulfan



Endosulfan sulfato



Endrin

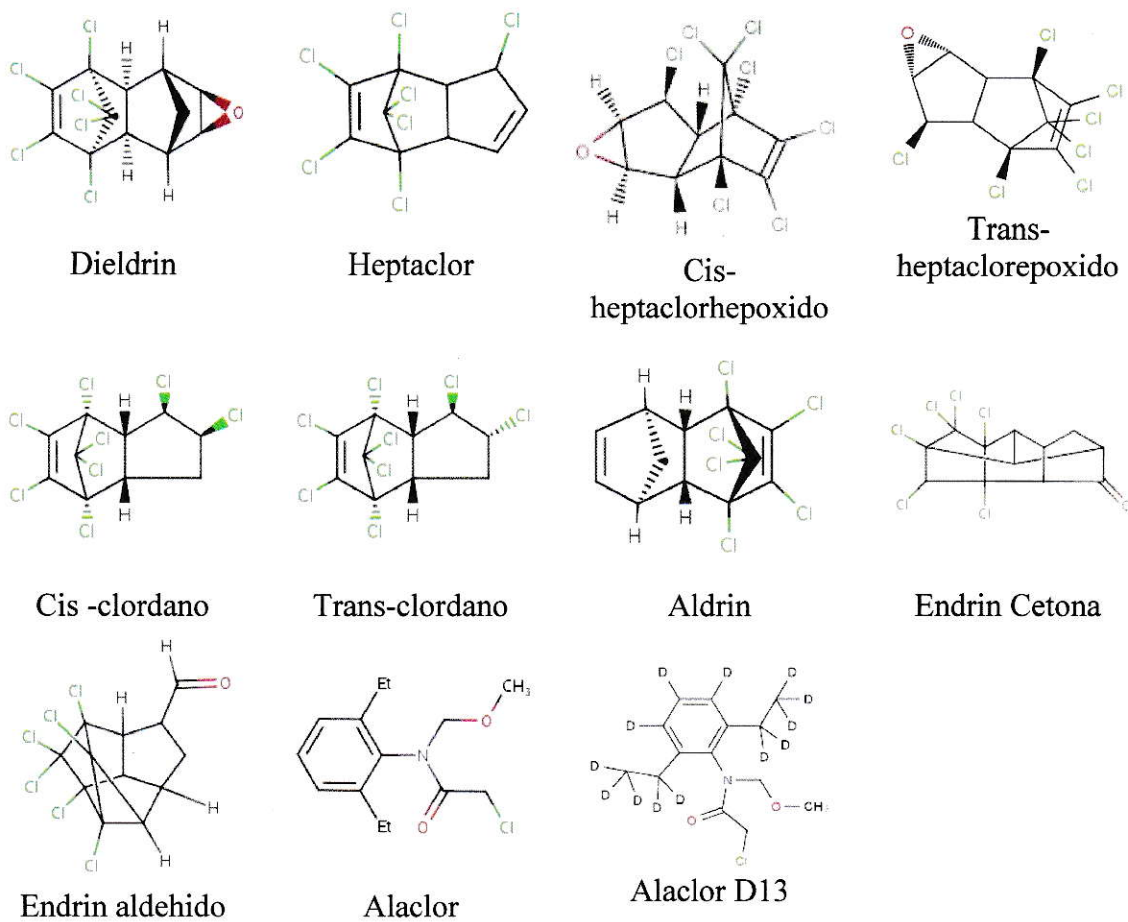


Figura 37. Estructura molecular de los pesticidas organoclorados estudiados como contaminantes orgánico persistente en el biomonitoreo de leche materna.

5.2. Bifenilos policlorados

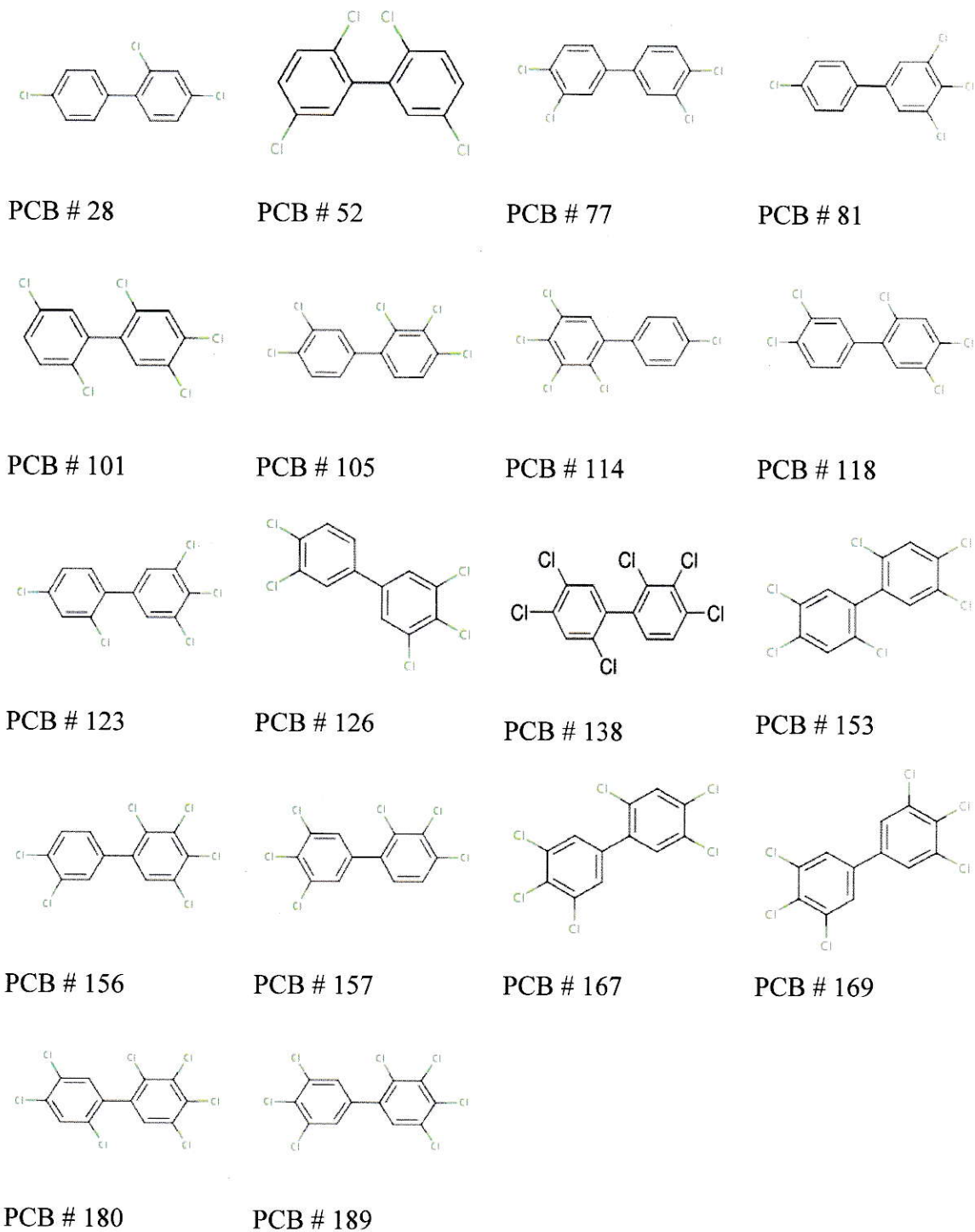
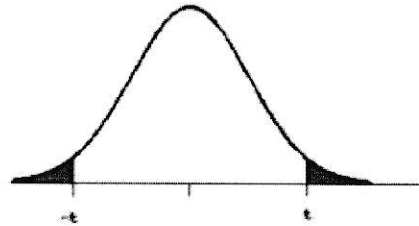


Figura 38. Estructura molecular de los bifenilos policlorados estudiados como contaminantes orgánico persistente en el biomonitoreo de leche materna

Tabla 25 Prueba de Distribución t-student para el estudio de distribución normal de una muestra.



(a) El área de las dos colas está sombreada en la figura.
 (b) Si H_0 es direccional, las cabeceras de las columnas deben ser divididas por 2 cuando se acota el P-valor.

gl	ÁREA DE DOS COLAS						
	0,20	0,10	0,05	0,02	0,01	0,001	0,0001
1	3,078	6,314	12,706	31,821	63,657	636,619	6366,198
2	1,886	2,920	4,303	6,695	9,925	31,598	99,992
3	1,638	2,353	3,182	4,541	5,841	12,924	28,000
4	1,533	2,132	2,776	3,747	4,604	8,610	15,544
5	1,476	2,015	2,571	3,365	4,032	6,869	11,178
6	1,440	1,943	2,447	3,143	3,707	5,959	9,082
7	1,415	1,895	2,365	2,998	3,499	5,408	7,885
8	1,397	1,860	2,306	2,896	3,355	5,041	7,120
9	1,383	1,833	2,262	2,821	3,250	4,781	6,594
10	1,372	1,812	2,228	2,764	3,169	4,587	6,211
11	1,363	1,796	2,201	2,718	3,106	4,437	5,921
12	1,356	1,782	2,179	2,681	3,055	4,318	5,694
13	1,350	1,771	2,160	2,650	3,012	4,221	5,513
14	1,345	1,761	2,145	2,624	2,977	4,140	5,363
15	1,341	1,753	2,131	2,602	2,947	4,073	5,239
16	1,337	1,746	2,120	2,583	2,921	4,015	5,134
17	1,333	1,740	2,110	2,567	2,898	3,965	5,044
18	1,330	1,734	2,101	2,552	2,878	3,922	4,966
19	1,328	1,729	2,093	2,539	2,861	3,883	4,897
20	1,325	1,725	2,086	2,528	2,845	3,850	4,837
21	1,323	1,721	2,080	2,518	2,831	3,819	4,784
22	1,321	1,717	2,074	2,508	2,819	3,792	4,736
23	1,319	1,714	2,069	2,500	2,807	3,767	4,693
24	1,318	1,711	2,064	2,492	2,797	3,745	4,654
25	1,316	1,708	2,060	2,485	2,787	3,725	4,619
26	1,315	1,706	2,056	2,479	2,779	3,707	4,587
27	1,314	1,703	2,052	2,473	2,771	3,690	4,558
28	1,313	1,701	2,048	2,467	2,763	3,674	4,530
29	1,311	1,699	2,045	2,462	2,756	3,659	4,506
30	1,310	1,697	2,042	2,457	2,750	3,646	4,482
40	1,303	1,684	2,021	2,423	2,704	3,551	4,321
60	1,296	1,671	2,000	2,390	2,660	3,460	4,169
100	1,290	1,660	1,984	2,364	2,626	3,390	4,053
140	1,288	1,656	1,977	2,353	2,611	3,361	4,006
∞	1,282	1,645	1,960	2,326	2,576	3,291	3,891

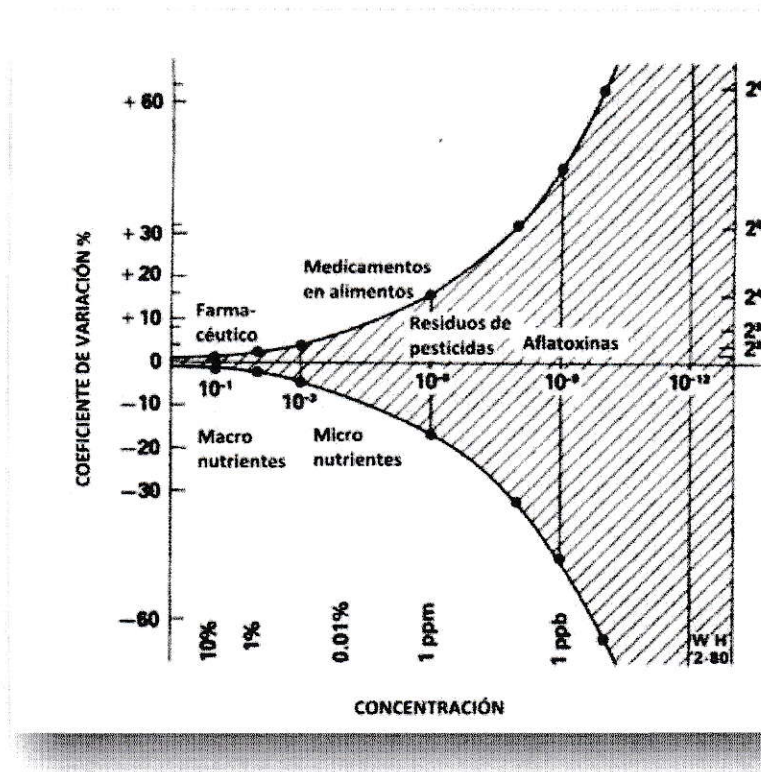



Figura 39. Gráfico de Horwitz, En el se puede ver el coeficiente de variación % aceptable en términos de recuperación, de acuerdo a la concentración del analito en la muestra.

Tabla 26. Matriz del diseño experimental de optimización para la determinación de OCPs por método QuEChERS

Experimento	Tratamiento de la muestra	Tiempo Agitación	Tiempo Sonicación
1	1	1	1
2	1	1	2
3	1	2	1
4	1	2	2
5	2	1	1
6	2	1	2
7	2	2	1
8	2	2	2
9	3	1	1
10	3	1	2
11	3	2	1
12	3	2	2
n=3			

Tabla 27. Matriz del diseño experimental de optimización para la determinación de PCBs por método extracción líquido-líquido.

Experimento	Tratamiento de la muestra	Tiempo sonicación	Volumen extractante	Tiempo agitación
1	1	1	1	1
2	1	1	1	2
3	1	1	2	1
4	1	1	2	2
5	1	1	3	1
6	1	1	3	2
7	1	2	1	1
8	1	2	1	2
9	1	2	2	1
10	1	2	2	2
11	1	2	3	1
12	1	2	3	2
13	2	1	1	1
14	2	1	1	2
15	2	1	2	1
16	2	1	2	2
17	2	1	3	1
18	2	1	3	2
19	2	2	1	1
20	2	2	1	2
21	2	2	2	1
22	2	2	2	2
23	2	2	3	1
24	2	2	3	2
25	3	1	1	1
26	3	1	1	2
27	3	1	2	1
28	3	1	2	2
29	3	1	3	1
30	3	1	3	2
31	3	2	1	1
32	3	2	1	2
33	3	2	2	1
34	3	2	2	2
35	3	2	3	1
36	3	2	3	2
n=2				

	DETERMINACION DE BIFENILOS POLICLORADOS EN LECHE MATERNA POR CROMATOGRAFIA GASEOSA CON DETECTOR DE CAPTURA DE ELECTRONES	Emisión: XX-XX-2016
		Versión: 1
		Actualización:
Sección Química Ambiental	ME-XXX.XX-XX	Página 94 de X


7.2 Preparación de la Muestra

7.2.1 Extracción

- a) Tomar 10 mL de la muestra de leche materna y depositarlos en tubo de extracción polipropileno de 50 mL.
- b) Adicionar 2 mL de metanol grado HPLC y sonicar durante 10 minutos.
- c) Adicionar 15 mL de éter de petróleo grado GC y agitar en multivortex a 1800 rpm.
- d) Centrifugar los tubos a 4500 rpm por 5 minutos a 4°C.

7.2.2 Etapa de Limpieza

- a) En un sistema de extracción al vacío manífor, condicionar las columnas Florisil pasando hexano 3 mL 2 veces. Eliminar el solvente remanente.
- b) En un tubo de vidrio de 15 mL previamente rotulado, agregar 100 µL de solución de trabajo estándar interno Alaclor D13. Colocar los tubos al interior del sistema de extracción al vacío manífor.
- c) Transferir con precisión 1 mL de la muestra a la columna. A una velocidad de flujo de 5 mL/min o menor.
- d) Pipetear 2 mL de éter de petróleo como eluyente al interior de la columna, repitiendo la operación 3 veces. La elución debe ser lenta para maximizar la recuperación.
- e) Colocar el tubo de vidrio en un concentrador de nitrógeno y llevar las muestras a sequedad a una temperatura no mayor de 40°C.
- f) Lavar las paredes del tubo de vidrio con pequeñas cantidades de acetona.
- g) Reconstituir con 1000 µL de hexano
- h) Agitar por 2 minutos en ultrasonido.
- i) Agitar por 2 minutos en agitador digital.
- j) Traspasar la muestra a un vial de 2 mL, para ser analizado por GC-ECD.

	DETERMINACION PESTICIDAS POLICLORADOS EN LECHE MATERNA POR CROMATOGRAFIA GASEOSA CON DETECTOR DE CAPTURA DE ELECTRONES	Emisión: XX-XX-2016
		Versión: 1
		Actualización:
Sección Química Ambiental	ME-XXX.XX-XX	Página X de X

5.3. Preparación de muestra

5.3.1. Extracción método QuEChERS

- a) Medir 10 mL de la muestra de leche y depositarlo en tubo de extracción QuEChERS. Llevarlo al congelador por 10 minutos a una temperatura $< 0^{\circ}\text{C}$, previo a la extracción.
- b) Sacar la muestra del congelador y adicionar 10 mL de acetonitrilo al tubo de extracción QuEChERS de 50 mL que contiene la muestra.
- c) Adicionar las Sales de Extracción QuEChERS, las que contiene 500 mg de NaCl y 2000 mg MgSO_4
- d) Agitar el tubo en el multivortex por 10 minutos y posteriormente centrifugar los tubos a 4500 rpm durante 5 minutos a una temperatura de 4°C .
- e) Traspasar 5 mL del sobrenadante obtenido a un tubo de Sales de clean up QuEChERS para muestra grasa (900 mg MgSO_4 /150mg PSA/150mg C18) y agitar por 2 minuto en multivortex.
- f) Posteriormente, centrifugar por 3 minutos a 4500 rpm.
- g) Del sobrenadante obtenido, tomar 1000 μL y se depositó en un tubo de ensayo limpio.
- h) Colocar el tubo de vidrio en un concentrador de nitrógeno y llevar las muestras a sequedad a una temperatura no mayor que 40°C .
- i) Lavar con acetona cuidadosamente las paredes del tubo de vidrio, con el fin de arrastrar remanente de las paredes del tubo y secar nuevamente bajo corriente de nitrógeno.
- j) Reconstituir la muestra con 1000 μL de Hexano
- k) Agitar por 2 minutos en multivortex.
- l) Agitar por 2 minutos en ultrasonido.
- m) Filtrar las muestra a través de filtro de membrana de 0.22 μm y traspasar a un vial provisto de un inserto de vidrio.