

**IMPLEMENTACIÓN DE UN MÉTODO HS/SPME-GC PARA EL ANÁLISIS DE
RESIDUOS DE PESTICIDAS EN LECHE**

MÓNICA JOHANNA MARTÍNEZ MEJÍA

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
BUCARAMANGA
2010**

**IMPLEMENTACIÓN DE UN MÉTODO HS/SPME-GC PARA EL ANÁLISIS DE
RESIDUOS DE PESTICIDAS EN LECHE**

MÓNICA JOHANNA MARTÍNEZ MEJÍA

**Trabajo de grado presentado como requisito
parcial para optar el título de Química**

Directores:

ELENA E. STASHENKO, Química, Ph.D.

JAIRO RENÉ MARTÍNEZ, Químico, Ph.D.

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
BUCARAMANGA**

2010

A la razón de todos mis esfuerzos mí
Mamita

Agradecimientos

A Dios.

A mi mamita, quien impulsa y guía mis pasos. A mi familia, especialmente mi tía Blanca y Melania, quienes me han brindado todo lo necesario para la consecución de mis metas.

A la Dra. Elena Stashenko y el Dr. Jairo R. Martínez, por su dirección en la ejecución de este proyecto, y su gran vocación docente.

Al Laboratorio de Cromatografía, adscrito al Centro de Investigación en Biomoléculas, CIBIMOL, que suministró el soporte financiero para la realización del proyecto.

A los estudiantes de doctorado William Salgar y Deyanira Caballero, por su colaboración y sus enseñanzas.

A mis amigos: Katherine, Mónica A., Alexa, Andrés, Victor, por todas esas largas noches de estudio, los buenos recuerdos, y por ser un apoyo incondicional durante toda mi carrera universitaria. A Javier quien durante estos últimos meses me ha acompañado pacientemente.

TABLA DE CONTENIDO

	pág.
INTRODUCCIÓN	20
1. ESTADO DEL ARTE.....	23
1.1 LA LECHE	23
1.1.1 Mercado mundial de los productos lácteos.....	23
1.1.2 Producción de leche en Colombia	24
1.1.3 Políticas de calidad para el sector lechero.....	25
1.1.3.1 Presencia de residuos químicos en los alimentos de origen bovino.	25
1.1.3.2 Establecimiento de límites máximos de residuos de plaguicidas en leche de vaca.	27
1.2 PESTICIDAS.....	28
1.2.1 Clasificación, propiedades químicas y usos de los pesticidas	28
1.3 EL ANÁLISIS QUÍMICO COMO HERRAMIENTA PARA EL MONITOREO AMBIENTAL	32
1.3.1 Metodología AOAC (<i>Official Method 970.52</i>) para la determinación de residuos de pesticidas organoclorados y organofosforados.	33
1.3.2 Química verde.....	34
1.3.3 Microextracción en fase sólida.....	34
1.3.3.1 Fundamentos teóricos de la SPME.....	35
1.3.3.2 Modos de extracción	35
1.3.3.3 Termodinámica de la SPME	36
1.3.3.4 Tipos de fibras para SPME.	37
1.3.3.5 Variables que afectan al proceso de SPME.....	40
1.4 ANÁLISIS DE PESTICIDAS	42
1.4.1 Cromatografía de gases.	42
1.4.2 Cromatografía de gases acoplada con detector de captura de electrones. ...	42
1.4.2 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.....	43
2. ANTECEDENTES.....	44

2.1 REVISTAS CIENTÍFICAS.....	44
2.2 PUBLICACIONES O FUENTES NO-FORMALES EN <i>INTERNET</i>	48
3. DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	49
3.1 ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA GC/ \square ECD PARA EL ANÁLISIS CUALITATIVO Y CUANTITATIVO DE LOS PESTICIDAS.	49
3.1.1 Alcance de la técnica estandarizada.....	49
3.1.2 Materiales y reactivos	50
3.1.2.1 Material de referencia certificado.....	50
3.1.2.2 Materiales y equipos.....	51
3.1.3 Estandarización del método cromatográfico para el análisis de pesticidas. .	51
3.1.3.1 Cromatografía de gases de alta resolución acoplada a espectrometría de masas	51
3.1.3.2 Cromatografía de gases de alta resolución con detector de <i>micro</i> -captura de electrones.	52
3.1.3.3 Determinación de los tiempos de retención de los pesticidas.....	53
3.2 DETERMINACIÓN DE LAS MEJORES CONDICIONES DE EXTRACCIÓN SIMULTÁNEA DE LOS PESTICIDAS.....	54
3.2.1 Selección del tipo de recubrimiento	54
3.2.2 Evaluación de los parámetros de extracción.	55
3.2.2.2 Diseño experimental	55
3.3 DETERMINACIÓN DE LAS FIGURAS ANALÍTICAS DE MÉRITO.....	58
3.3.1 Evaluación del rango dinámico lineal y la sensibilidad del método cromatográfico	59
3.3.2 Determinación de los niveles mínimos de detección y de cuantificación.	60
3.3.3 Evaluación de la reproducibilidad del método para los tiempos de retención y áreas.....	61
3.3.4 Evaluación de la eficiencia del método	61
3.4 ANÁLISIS DE MUESTRAS DE LECHE OBTENIDAS DEL MERCADO LOCAL	61
3.4.1 Determinación.....	61

3.4.2 Cuantificación	62
3.5 DETERMINACIÓN DE LAS FIGURAS ANALÍTICAS DE MÉRITO, PARA LA METODOLOGÍA DE EXTRACCIÓN REPORTADA EN AOAC 970.52 (1998)	62
4. ANÁLISIS DE RESULTADOS	63
4.1 MÉTODO CROMATOGRÁFICO PARA EL ANÁLISIS DE PESTICIDAS.	63
4.1.1 Identificación de los componentes mediante cromatografía de gases de alta resolución acoplada a espectrometría de masas.....	63
4.1.1.1 Esquemas de fragmentación para la familia de pesticidas organotiofosforados.	63
4.1.1.2 Esquemas de fragmentación para la familia de pesticidas piretroide.	64
4.1.1.3 Esquemas de fragmentación para los fungicidas de tipo triazol.	65
4.1.2 Cromatografía de gases de alta resolución con detector de <i>micro</i> -captura de electrones	68
4.1.2.1 Determinación de los tiempos de retención de cada uno de los pesticidas.	68
4.2 DETERMINACIÓN DE LAS MEJORES CONDICIONES DE EXTRACCIÓN SIMULTÁNEA DE LOS PESTICIDAS.....	70
4.2.1 Condiciones de extracción de pesticidas por HS/SPME.....	70
4.2.1.1 Selección del tipo de recubrimiento	71
4.2.1.2 Evaluación del efecto del pH sobre la eficiencia de la extracción, de los pesticidas con una baja recuperación.....	72
4.2.1.2 Diseño experimental	73
4.2.1.1 Análisis de la varianza.	74
4.2.1.2 Mejores condiciones de extracción.	77
4.3 DETERMINACIÓN DE LAS FIGURAS ANALÍTICAS DE MÉRITO.....	79
4.3.1 Evaluación del rango dinámico lineal y la sensibilidad del método cromatográfico	79
4.3.2 Determinación de los niveles mínimos de detección y cuantificación	80
4.3.3 Evaluación de la repetibilidad del método para las áreas cromatográficas... ..	81
4.3.4 Evaluación de la eficiencia del método	81

4.4 ANÁLISIS DE MUESTRAS DE LECHE REALES ADQUIRIDAS EN EL MERCADO LOCAL.....	82
4.4.1 Leche entera pasteurizada	82
4.4.2 Leche cruda.	83
4.5 DETERMINACIÓN DE LAS FIGURAS ANALÍTICAS DE MÉRITO, PARA LA METODOLOGÍA DE EXTRACCIÓN REPORTADA EN AOAC 970.52 de 1998....	84
4.6 COMPARACIÓN DEL MÉTODO DESARROLLADO EN ESTE TRABAJO CON EL REPORTADO POR LAS NORMAS AOAC.	85
5. CONCLUSIONES	88
6. BIBLIOGRAFÍA.....	89

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Especificaciones de las sustancias de referencia certificadas.	50
Tabla 2. Descripción de los materiales y equipos empleados.	51
Tabla 3. Parámetros cromatográficas empleados para el análisis de los pesticidas por GC/ μ -ECD y GC/MSD.	52
Tabla 4. Solvente empleado para cada uno de los pesticidas bajo análisis	53
Tabla 5. Variables y niveles del diseño experimental factorial 2^3 , empleados.	57
Tabla 6. Experimentos realizados para las tres variables del diseño factorial.	57
Tabla 7. Preparación de las soluciones de trabajo de los pesticidas, para realizar la curva de calibración	59
Tabla 8. Iones “diagnóstico” en los espectros de masas obtenidos por GC/MSD de los pesticidas analizados.	68
Tabla 9. Tiempos de retención de los pesticidas analizados, obtenidos por GC/ μ -ECD, en una columna DB-5 (30 m x 0,25mm (di) x 0,25 μ m), y evaluación de su reproducibilidad.....	69
Tabla 10. Áreas cromatográficas de los pesticidas analizados [GC/ECD Columna DB-5 (30 m x 0,25mm (di) x 0,25 μ m)], y evaluación de su reproducibilidad.	70
Tabla 11. Medida del error experimental de los pesticidas analizados, para la evaluación del diseño factorial 2^3	73
Tabla 12. Condiciones más favorables para la extracción de cada uno de los pesticidas.	78
Tabla 13. Condiciones más favorables para la extracción del grupo de pesticidas analizadas en la leche.	78
Tabla 14. Linealidad y sensibilidad del método HS/SPME-GC/ μ -ECD.	79
Tabla 15. Niveles mínimos de detección y cuantificación HS/SPME-GC/ μ -ECD... ..	80
Tabla 16. Repetibilidad de áreas de picos cromatográficos de los pesticidas analizadas por HS/SPME-GC/ μ -ECD.	81

Tabla 17. Porcentajes de recuperación de pesticidas, evaluados en matriz de leche enriquecidas.	82
Tabla 18. Porcentaje de recuperación, con la técnica LLE, para dos diferentes niveles de concentración.	84
Tabla 19. Linealidad y sensibilidad del método GC- μ ECD, por inyección directa..	85
Tabla 20. Figuras analíticas de mérito para los métodos reportado en AOAC 970.52 y el desarrollado en el presente trabajo para la extracción por HS/SPME-GC/ECD de pesticidas en leche.....	86
Tabla 21. Comparación de los métodos reportado en AOAC 970.52 y el desarrollado en el presente trabajo para la extracción por HS/SPME-GC/ECD de pesticidas en leche.	86

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Dinámica de producción de leche en Colombia entre 1999-2006.....	24
Figura 2. Esquema del dispositivo comercial de SPME.....	35
Figura 3. Estructura química de algunos recubrimientos comerciales para las fibras de SPME.....	38
Figura 4. Clasificación de las fibras de SPME según si la extracción se produce por absorción o adsorción.....	39
Figura 5. Relación del número de artículos científicos sobre residuos de pesticidas, con el año de su publicación.....	46
Figura 6. Relación del número de publicaciones sobre residuos de pesticidas en leche, según el país.	47
Figura 7. La matriz del diseño experimental factorial 2^3 , está representada geoméricamente por un cubo	56
Figura 8. Formación de iones-fragmento en el espectro de masas (EI, 70 eV) del pesticida organotiofosforado disulfotón.....	64
Figura 9. Iones característicos y ruta de fragmentación (EI, 70 eV) del pesticida fenpropatrin.....	66
Figura 10. Espectro de masas (EI, 70 eV) del fungicida penconazol.....	67
Figura 11. Cromatograma de la mezcla de pesticidas analizados [GC/ECD Columna DB-5 (30 m x 0,25mm (di) x 0,25 μ m)].....	69
Figura 12. Efecto de la naturaleza de los recubrimientos, sobre la extracción de los pesticidas por HS/SPME.....	72
Figura 13. Efecto del pH, sobre la eficiencia de extracción por HS/SPME, de los pesticidas bajo análisis.	73
Figura 14. Diagramas de Pareto de efectos para algunos pesticidas organotiofosforados y piretroides.....	76
Figura 15. Efectos principales y de interacción de cada uno de los factores, en el proceso de extracción de clorpirifos.....	76

Figura 16. Resultados del diseño experimental, para el proceso de extracción de penconazol.....	77
Figura 17. Ampliación de los perfiles cromatográficos obtenidos mediante HS/SPME-GC/□-ECD. (A) Leches comerciales A ₁ y A ₂ con su respectivo duplicado, (B) Comparación con el perfil obtenido en un blanco enriquecido a 25 ng L ⁻¹	83

LISTA DE ANEXOS

Anexo A. Listado de los pesticidas analizados, cuyos residuos son vigilados en la leche de vaca, según la Resolución 2906 de 2007 de los Ministerios de Agricultura, Desarrollo rural y de Protección Social.....	96
Anexo B. Resultados, obtenidos por el <i>software</i> estadístico <i>Statgraphics Centurion XVI</i> , de los efectos de diferentes parámetros y sus interacciones, para la extracción de los pesticidas.	99
Anexo C. Curvas de calibración para cada uno de los pesticidas analizados, siguiendo la metodología HS/SPME-GC/ μ -ECD.....	100

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

AOAC Association of Official Analytical Chemists (Asociación oficial de químicos analíticos)

CAR Carboxeno

CAR/PDMS Poli(dimetisiloxano)/ Carboxeno

CW Carbowax

CW/DVB Carbowax/ Divinilbenceno

μ -ECD Micro-Electron Capture Detector (Detector de micro-captura de electrones) e.g. Por ejemplo

FAO The Food and Agriculture Organization of the United Nations (Organización de Naciones Unidas para Agricultura y Alimentos)

FEDEGAN Federación Nacional de Ganaderos

GC Gas Chromatography (Cromatografía de gases)

GC-ECD Gas Chromatography-Electron Capture Detector (Cromatografía de gases con detector de captura de electrones)

GC-MS Gas Chromatography-Mass Selective Detector (Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas)

HS Headspace

HS/SPME Headspace Solid-Phase Microextraction (Microextracción en fase sólida en modo headspace)

HS/SPME-GC/ μ -ECD Headspace Solid-Phase Microextraction - Gas Chromatography / Micro-Electron Capture Detector (Microextracción en fase sólida en modo headspace-cromatografía de gases con detector de micro-captura de electrones)

HRGC High Resolution Gas Chromatography (Cromatografía de gases de alta resolución)

HRGC/ μ -ECD High Resolution Gas Chromatography-micro Electron Capture detector (Cromatografía de gases de alta resolución con detector de micro-captura de electrones)

HRGC/MSD High Resolution Gas Chromatography-Mass Selective detector (Cromatografía de gases de alta resolución acoplada al detector selectivo de masas)

ICA Instituto Colombiano Agropecuario

ICH International Conference on Armonization of Technical Requeriments for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (Conferencia Internacional sobre Armonización de Requerimientos Tecnicos para el Registro de farmacos para el uso Humano)

RESUMEN

TÍTULO: IMPLEMENTACIÓN DE UN MÉTODO HS/SPME-GC PARA EL ANÁLISIS DE RESIDUOS DE PESTICIDAS EN LECHE*

Autor: MARTÍNEZ MEJÍA, Mónica Johanna**

Palabras clave: Pesticidas, Leche, Microextracción en fase sólida, Cromatografía de gases.

En la presente investigación, se implementó una metodología cromatográfica para la extracción y cuantificación de 11 pesticidas a saber: organofosforados, organotiofosforados, organoclorados, piretroides, carbamatos, triazoles y oxazoles, en leche mediante microextracción en fase sólida en modo *headspace* acoplada a cromatografía de gases.

Para ello, se diseñó un experimento factorial que involucró los principales factores, de influencia significativa en la extracción de los pesticidas en muestras de leche, y permitió encontrar las mejores condiciones de extracción; siendo la temperatura y el tiempo de extracción las variables que tuvieron mayor incidencia sobre la eficiencia.

Las mejores condiciones de extracción fueron las siguientes: *Salting out* del 30%, agitación constante con *micro*-magneto, tiempo de pre-equilibrio de 10 min, temperatura de extracción de 90 °C y tiempo de extracción de 60 min.

Se realizó la determinación de las figuras de mérito y se alcanzaron niveles mínimos de detección (NMD) y niveles mínimos de cuantificación (NMC) por debajo de los límites máximos de residuos (LMR) establecidos por la Resolución 2906 de 2007 de los Ministerios de Agricultura, Desarrollo Rural y Protección Social, la cual está de acuerdo con la normatividad internacional y es de obligatorio cumplimiento para la exportación de productos alimenticios.

Adicionalmente se analizaron muestras de leche adquiridas en el mercado local y aunque no se hallaron residuos de dichos compuestos, el Laboratorio de Cromatografía de la Escuela de Química de la Universidad Industrial de Santander, cuenta hoy en día con una técnica de análisis estandarizada, para la determinación de los residuos de algunos pesticidas, en muestras de leche. Técnica que puede ser ofrecida como servicio analítico, tanto a organizaciones privadas, como a organizaciones públicas encargadas de la vigilancia en la cadena de lácteos.

* Proyecto de grado

** Facultad de Ciencias, Escuela de Química, Directores: Dra. Elena E. Stashenko y Jairo R. Martínez

ABSTRACT

TITLE: DEVELOPELMENT OF A SOLID-PHASE MICROEXTRACTION GAS CHROMATOGRAPHY WITH MICROELECTRON-CAPTURE DETECTION METHOD FOR A RESIDUE ANALYSIS OF PESTICIDES IN MILK*

Autor: MARTÍNEZ MEJÍA Mónica Johanna **

Key words: Pesticides, Milk, Solid phase microextraction, Gas chromatography.

A rapid method based on solid phase microextraction (SPME) technique followed by gas chromatography with microelectron capture detection (GC- μ ECD) was developed for the simultaneous determination of 11 pesticides (organochlorinated, pyrethroids, organophosphorus, oxazol) in milk.

A factorial design was performed to assess the influence of several factors (extraction temperature, extraction time, an addition of sodium chloride) on the SPME procedure and to determine the optimal extraction conditions.

The method was validated and demonstrated to be reliable and linear in the concentration range of interest. LOD_s and LOQ_s were satisfactory and complied with the current MRL_s of the target pesticides in milk.

Additionally, milk samples were analyzed acquired in the local market but found no residues of such compounds, Chromatography Laboratory, School of Chemistry at the Universidad Industrial de Santander, now has a standard analysis technique for the determination of some pesticides residues in milk samples. Technique that can be offered as an analytical service, both private organizations and public organizations responsible for monitoring the dairy products.

* Graduation Project

** Science Faculty, School of Chemistry, Directors, Elena E. Stashenko and Jairo R. Martínez

INTRODUCCIÓN

La química analítica se utiliza como una herramienta de control y vigilancia; cualquier estudio relacionado con la determinación de residuos de contaminantes en alimentos no es un trabajo aislado realizado sólo con fines académicos. Contrario, éste debe estar enmarcado dentro de las actividades de vigilancia del sector productivo, y estar a la vanguardia de las técnicas de extracción y análisis instrumental. Además, debe proporcionar resultados confiables y evitar la obtención de falsos negativos; se estima que en lo relacionado con contaminantes de alimentos en los Estados Unidos, el 35% de los alimentos consumidos tienen residuos de uno o varios de los 600 plaguicidas en uso, pero los métodos de análisis usados sólo detectan un tercio de ellos [1].

La producción agropecuaria a nivel mundial aún depende en alta proporción del uso de pesticidas, que permiten un notable incremento y rendimiento de la producción agrícola. Sin embargo, su uso exagerado e inapropiado los ha convertido en un problema de contaminación ambiental. Los pesticidas, debido a sus propiedades químicas, se bioacumulan en las cadenas alimentarias; diversos estudios han encontrado que algunos pesticidas pueden acumularse en el cuerpo del ganado, concentrándose especialmente en la leche y la carne y, eventualmente, pasan al hombre [2, 3]. Por esta razón en muchos países el uso de algunos pesticidas ha sido prohibido o restringido en el entorno del ganado bovino.

Los residuos de pesticidas son una amenaza a la salud del consumidor, por ello, muchos países han creado mecanismos de vigilancia en el uso responsable de los pesticidas, para evitar que éstos lleguen al consumidor en alimentos como residuos de sustancias, que puedan tener consecuencias negativas sobre la salud. Nuestro país no es ajeno a este proceso de vigilancia. Precisamente, el INVIMA

(Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos) tiene como función atender el control de residuos de sustancias químicas en alimentos procesados para consumo humano; igualmente, el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) está encargado de la prevención y el control de riesgos para la producción agropecuaria. Sin embargo, según uno de sus últimos informes, actualmente no hay información sólida, sobre el estado sanitario en materia de residuos en alimentos de origen animal; tampoco se cuenta con sistemas de diagnóstico que permitan cuantificar la problemática, ni existe un soporte científico para el desarrollo de un programa de vigilancia [4]. Este es un hecho preocupante, ya que cualquier país en proceso de internacionalización de su economía requiere precisamente de una normatividad y de un plan puesto en marcha que garantice la seguridad alimentaria.

Aunque ya se han dado algunos pasos, entre ellos, la creación de la Resolución 2906 de 2007 de los Ministerios de Agricultura, Desarrollo rural y de Protección Social, donde de acuerdo con la normatividad del *Codex Alimentari*, se establecen los límites máximos permisibles de residuos (LMR) de pesticidas en alimentos para consumo humano, entre ellos, en la leche de vaca [5].

El siguiente paso consiste en la implementación y la validación de una metodología analítica que sirva de apoyo para esta vigilancia; la primera opción, es continuar aplicando la metodología estandarizada en la norma AOAC. Sin embargo, como se menciona en la revisión de la literatura, ésta resulta poco selectiva, costosa y con un alto nivel de contaminación ambiental debido al uso de grandes cantidades de solventes en el proceso de extracción.

Este trabajo presenta como alternativa de análisis, uno de los métodos de extracción denominado QuEChERS (rápido, fácil, barato, efectivo, robusto y seguro), que es la SPME (microextracción en fase sólida); técnica que se ha empleado en diversos análisis y que rápidamente ha resultado un conveniente

modo de remplazar la convencional extracción líquido-líquido (LLE) ya que proporciona buenos resultados con un número mínimo de pasos analíticos y con un consumo bajo de solventes y materiales.

En este trabajo, se realizó la implementación de la técnica de análisis simultáneo de pesticidas, por SPME en modo de espacio de cabeza (*Headspace*, HS) acoplada a cromatografía de gases con detector de *micro*-captura de electrones (HS/SPME-GC/ μ -ECD).

Para ello, se diseñó un experimento factorial que involucró los principales factores, de influencia significativa en la extracción de los analitos, y permitió encontrar las mejores condiciones de temperatura extractiva, tiempo de extracción y la fuerza iónica adecuada para el análisis.

Se realizó la determinación de las figuras de mérito y se alcanzaron niveles mínimos de detección (NMD) y niveles mínimos de cuantificación (NMC) por debajo de los límites máximos de residuos (LMR) establecidos por las normas colombianas.

1. ESTADO DEL ARTE

1.1 LA LECHE

Dentro de la producción mundial de alimentos de origen animal, la leche se encuentra catalogada como uno de los productos primarios, al igual que la carne y el huevo. Su producción proviene, principalmente, de ganado bovino.

Este alimento básico satisface algunos requerimientos nutricionales, gracias a su mezcla de proteínas (3,0-3,5%), grasa, carbohidratos, sales de calcio y fósforo (1%), vitaminas y otros componentes menores dispersos en agua; de manera tal, que los productos lácteos derivados pueden cubrir tanto diferentes hábitos de consumo, como usos muy distintos de interés nutricional [6].

1.1.1 Mercado mundial de los productos lácteos. La leche fresca de vaca sin procesar se produce en casi todos los países del mundo. Según la Organización de Naciones Unidas para Agricultura y Alimentos (FAO), en el año 2004 se produjeron 519 millones de toneladas, y de esta cifra, los países europeos representaron el 41%. Los países del continente americano participaron con el 28% y los del continente asiático con el 22%. África y Oceanía contribuyeron con porcentajes marginales del 4% y 5%, respectivamente [7].

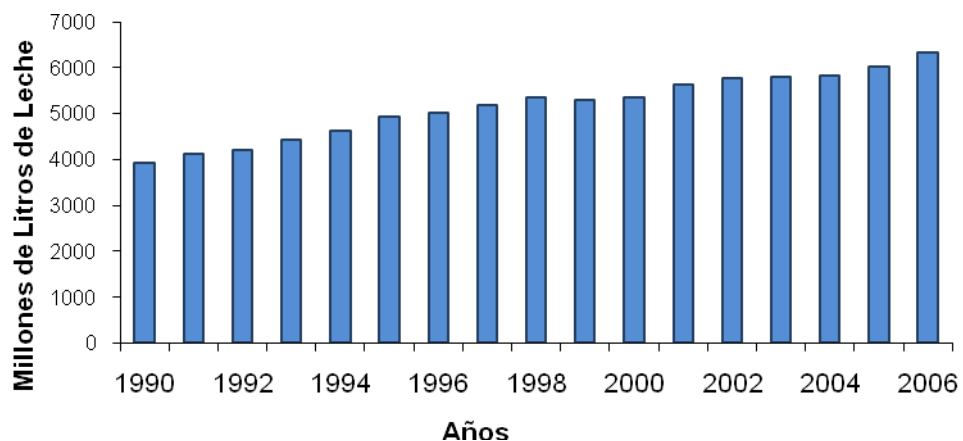
En general, los países de América Latina no son grandes productores. El principal productor en esta región es el Brasil con 23,3 millones de toneladas. Sin embargo, la participación de Colombia en el mercado ha crecido vertiginosamente, siendo éste un sector que presenta gran dinamismo, especialmente, referente al mercado regional, con exportaciones a Venezuela y Ecuador, que son países eminentemente importadores, lo que posiciona a Colombia en el puesto 26 en las exportaciones a nivel mundial [6, 7].

Vale la pena mencionar, que el mercado con Venezuela ha sido el objetivo de las exportaciones colombianas de productos lácteos, gracias a su gran dinámica en el consumo.

1.1.2 Producción de leche en Colombia. La Federación Nacional de Ganaderos (FEDEGAN) reportó en el año 2006, un total de 6.224 millones de litros de leche producida en el país (**Figura 1**), se mantuvo la tendencia de crecimiento del 2.8% registrada en los últimos 15 años. Con ello, el sector lácteo ha abastecido la demanda interna de leche, lo que permite disminuir notablemente el valor agregado alto que traen consigo las importaciones [6].

A la par del incremento en el volumen de producción, el empleo del eslabón industrial de la cadena también lo hizo. En efecto, mientras que en el año de 1992 la industria vinculó a 12.940 trabajadores, para el año de 2000 esta variable alcanzó la cifra de las 13.846 [6, 7].

Figura 1. Dinámica de producción de leche en Colombia entre 1999-2006.



Sin embargo, el crecimiento en la producción, inquieta en la actualidad al gobierno y los dirigentes gremiales del sector lácteo en Colombia, respecto a la posibilidad de sostener a largo plazo esta dinámica de producción, ya que las “soluciones

artesanales” implementadas, no constituyen un mecanismo adecuado para garantizar la salida comercial a los mayores volúmenes de producción.

1.1.3 Políticas de calidad para el sector lechero. El incremento en la producción de leche trae consigo riesgos inmediatos, como la salida al mercado de leche que no cumple con los estándares requeridos. Consecuente a esto, el acuerdo de competitividad de la cadena láctea, al cual está suscrito el país, pretende integrar todos los eslabones de la cadena productiva y establecer reglas claras en varios aspectos, entre ellos, precios y calidad, y definir los requisitos que debe tener la leche para el consumo humano que se obtenga, se envase, se transporte, comercialice, se importe o se venda en el país [8].

Las restricciones para el libre comercio de la leche están basadas principalmente en el control de su calidad composicional y microbacteriológica, así como en la ausencia de residuos considerados como tóxicos y nocivos para el consumidor; los residuos más problemáticos presentes en la leche, se derivan de fármacos antibacterianos, hormonas promotoras del crecimiento, y ciertos pesticidas, metales pesados y productos químicos de uso masivo en los sistemas de producción intensivos. Los gobiernos tienen la potestad de restringir el comercio internacional de estos alimentos, cuando las medidas aplicadas en el país exportador no tengan un soporte científico. Por esto, crear mecanismos que garanticen la inocuidad de los alimentos, es un reto importante que están enfrentando los países en vías de desarrollo como Colombia [6, 8].

1.1.3.1 Presencia de residuos químicos en los alimentos de origen bovino.

En particular, las fuentes de contaminación en la leche son las siguientes:

- Uso de antiparasitarios externos (ectoparasiticidas). Éstos están indicados para el control de insectos y ácaros mediante procedimientos de aplicación externa, y abarcan una amplia gama de compuestos químicos como organoclorados, organofosforados, carbamatos, formamidinas, piretroides,

fenilpirazoles; su amenaza de toxicidad radica en la necesidad que sienten los productores de incrementar el uso de estas sustancias (en cuanto la dosis y/o la frecuencia de aplicación), por la resistencia que desarrollan los parásitos externos a los antiparasitarios tradicionales [9].

- Uso de antiparasitarios internos (antihelmínticos, endoparasiticidas). El primer antiparasitario antihelmíntico moderno para bovinos, ovinos y equinos, la fenotiazina, fue descubierto en 1938. En los años sucesivos se han ido descubriendo nuevas sustancias activas con propiedades antihelmínticas mejoradas para el ganado, sobre todo, con una mayor eficacia, espectro de actividad más amplio, menor toxicidad y menor residualidad. La mayoría de los antihelmínticos son eficaces contra una o más de las tres grandes clases de helmintos parásitos del ganado: los nemátodos, los tremátodos y los céstodos. Hay compuestos que son eficaces contra varias clases de helmintos, como son los benzimidazoles y las avermectinas, los cuales han producido un profundo impacto en los sistemas de producción ganaderos. Empero, se han detectado residuos de fenbendazol y el oxibendazol en leche en concentraciones de 1,67 ng/mL [10], cuando hay sobredosificación o, especialmente, si no se respetan los tiempos de retiro recomendados, constituyendo por tanto, una amenaza potencial para la salud de los consumidores.
- Los tratamientos que se emplean para obtener mayores rendimientos productivos en los animales como los anabólicos y algunos antibióticos, además de ciertas hormonas que incrementan la ganancia diaria de peso de los animales o consiguen una mayor producción de leche.
- Los medicamentos veterinarios aplicados con fines terapéuticos para el control de ciertas enfermedades a animales cuyos productos están destinados al consumo de los seres humanos, dejan residuos de esos compuestos o de sus

metabolitos, en su carne o secreciones como la leche, especialmente, si no se tienen en cuenta las buenas prácticas de uso de los medicamentos [11].

- Finalmente, los diversos residuos conocidos comúnmente como pesticidas, entre los cuales figuran los insecticidas y fungicidas agroindustriales que contaminan granos y forrajes; el peligro de los residuos de estos compuestos se incrementa si se tiene en cuenta que éstos pueden aparecer, además, en carne y leche de animales que han pastado en potreros tratados con agroquímicos [4].

1.1.3.2 Establecimiento de límites máximos de residuos de plaguicidas en leche de vaca. Ya que la presencia de residuos químicos en los alimentos de origen animal y agrícola implica un riesgo para la salud humana, para el comercio internacional y la tecnología de procesamiento de subproductos. Como respuesta, en muchos países se están aplicando las Buenas Prácticas Agrícolas y Buenas Prácticas Ganaderas [8].

Sin embargo, la evaluación toxicológica de los compuestos químicos usados en el campo agropecuario implica estudios multidisciplinarios, a saber: establecimiento de límites máximos de residuos y estudios de ingesta diaria admisible, tiempos de espera o retirada de los productos y niveles de efectos no observables, lo cual implica el desarrollo de métodos analíticos de detección de residuos, programas de calidad de laboratorios, criterios de evaluación de las sustancias químicas, programas de educación, legislación apropiada y un adecuado programa de vigilancia y control. Estas medidas deben estar coordinadas por organizaciones públicas y privadas, incluyendo universidades y centros de investigación.

Colombia, enfrentando los retos que implica la apertura de mercados externos, emitió la Resolución 2906 de los Ministerios de Agricultura, Desarrollo rural y de Protección Social, publicada en el Diario Oficial No. 46.735 de 29 de agosto de 2007, que tiene aplicación en todo el territorio nacional. En ésta normatividad en

la cual se establecen los LMR de pesticidas en alimentos para consumo humano. Referente a la leche de vaca, el tipo de residuos de pesticidas que se vigilan, se presenta en el **Anexo A**.

En Colombia, el ICA es la institución encargada de la prevención y el control de riesgos para la producción agropecuaria, esta entidad cuenta con una red de laboratorios de diagnóstico de pesticidas y, particularmente para alimentos grasos como la leche, éste sólo cuenta con un laboratorio especializado para la determinación y cuantificación de pesticidas en matrices lácteas, y que no es de orden nacional [12].

1.2 PESTICIDAS

Un pesticida es un producto químico preparado y aplicado con el propósito de combatir, de manera efectiva, cualquier tipo de organismo que compita con el ser humano por el alimento disponible o que presente riesgo para su salud o integridad; pueden ser definidos como “plaguicidas” o “herbicidas”, dependiendo de si su acción está dirigida hacia el control de plagas o de malezas [13].

Estos productos están diseñados para causar el mayor destroz posible en los organismos invasores, interfiriendo o modificando sus mecanismos fisiológicos fundamentales, infortunadamente, estos efectos también son compartidos por otros animales incluido el hombre, y que en determinadas circunstancias pueden provocarle la muerte. Esto significó que en sus inicios, estos productos fueran altamente tóxicos y persistentes; en la actualidad, se exige que estos productos sean altamente específicos y fácilmente biodegradables.

1.2.1 Clasificación, propiedades químicas y usos de los pesticidas. Los pesticidas se clasifican en una gran variedad de formas: según los organismos que controlan, su concentración, su modo de acción y su composición química.

Atendiendo a la estructura química de la sustancia biológicamente activa, se derivan grupos tales como: organofosforados, organoclorados, carbamatos, piretroides, triazoles, entre otros [13].

- **Pesticidas organoclorados (OCP).** Son compuestos orgánicos sintéticos de los cuales el DDT es su exponente principal, en general, éstos son fuertes “agresores” ecológicos, debido a su estabilidad química. Su uso está prohibido, sin embargo, la dispersión de estos productos ha sido tan amplia, que sus vestigios aún se hallan en diferentes zonas del país.
- **Pesticidas organofosforados (OPP).** Son compuestos orgánicos sintéticos derivados del ácido fosfórico; son ésteres que tienen diferentes combinaciones de oxígeno, carbono, azufre y nitrógeno ligados, lo cual resulta en diferentes subclases, de sustancias a saber: fosfatos, fosfonatos, fosforotioatos, fosforoditioatos, fosforotiolatos. Estos actúan como ectoparasiticidas, insecticidas o acaricidas, útiles para la agricultura y para el ganado bovino, ovino, porcino y aviar; ya que son capaces de interrumpir la transmisión nerviosa de los parásitos. Los OPP inhiben ciertas enzimas importantes del sistema nervioso, particularmente, la acetilcolinesterasa. El grupo fosfato del insecticida se liga a la enzima fosforilada de modo irreversible. Esta inhibición resulta en la acumulación de acetilcolina en las uniones o sinapsis neurona/neurona y neurona/músculo (neuromuscular), causando contracciones rápidas de los músculos voluntarios y finalmente parálisis. De los pesticidas organofosforados, el clorpirifos es uno de los más usados en Colombia [14], y aunque éste se emplea en forma de fosforotioato, que es un inhibidor débil de la acetilcolinesterasa, en el hígado se convierte *in vivo*, desde la forma azufrada a un éster fosfato activo, que posee una fuerte acción sobre la colinesterasa, capaz de afectar a un ser humano [10, 13, 15].

En general, el ganado tolera bien los tratamientos con los compuestos organofosforados autorizados como garrapaticidas, mosquicidas, piojicidas; algunos son muy volátiles con poder residual de unos pocos días; otros, aplicados en bovinos, se depositan y pueden permanecer activos contra los parásitos durante semanas e incluso meses, de modo que, según la sustancia activa usada, los residuos que dejan en la carne o leche pueden ser mayores o menores y los periodos de espera varían; razón por la cual, la mayoría de los organofosforados no están autorizados para el uso en ganado lechero en producción, en caso de usarlos, se desecha la leche durante varios días tras su aplicación [8,10].

- **Carbamatos.** Son ésteres del ácido carbámico, usados sobre todo contra plagas agrícolas, pero también contra los parásitos externos del ganado bovino. Al igual que los organofosforados, los carbamatos también inhiben la colinesterasa, pero de modo reversible. Hay diferentes clases de sustancias de este grupo, con diferentes funciones, como, por ejemplo, los ditiocarbamatos que son fungicidas, los fenilcarbamatos que son herbicidas, y los metilcarbamatos que son insecticidas [15].

El modo de acción de los carbamatos es similar al de los OPP. En este caso, la reacción causa una carbamilación del grupo hidroxilo serina (de la enzima), El sistema nervioso central es el sitio de acción de los carbamatos y los signos de intoxicación también son similares a los de los OPP. Comparada con la fosforilación, el complejo de enzimas carbamiladas es relativamente menos estable; y se hidroliza en un período de varios minutos.

- **Los piretroides.** También se llaman piretroides sintéticos, son análogos de las piretrinas naturales, con amplio espectro antiparasitario y con un alto grado de lipofilia (solubilidad en grasas). Se utilizan abundantemente contra las garrapatas, las moscas y, en general, contra los insectos adultos. Se comercializan para la ganadería, sobre todo, en forma de concentrados para baños de aspersión e

inmersión, en forma de *pour-ons* listos para el uso, y como constituyentes principales en orejeras (caravanas, aretes, crótalos) [10].

Su modo de acción consiste en afectar la transmisión nerviosa de los insectos; interfieren con el transporte de sodio en la membrana celular de las neuronas, de modo similar al de los organoclorados.

Los piretroides no suelen producir residuos elevados en carne o leche y, por ello, tienen periodos de espera relativamente cortos y son numerosos los que pueden emplearse sobre el ganado lechero en producción.

- **Pirazol.** Los pirazoles originales fueron tebufenpiral y fenpiroximato. Actúan inhibiendo el transporte de electrones en las mitocondrias, en el sitio de la reductasa NADH-CoQ, de tal modo, que se altera la formación del trifosfato de adenosina. [15].
- **Los fenilpirazoles.** Son una clase química de insecticidas y acaricidas, cuyo representante principal es el fipronil, que se usa para el control de parásitos externos sobre todo en bovinos [15].

En la ganadería, el fipronil es eficaz, sobre todo, contra las garrapatas y las moscas picadoras en bovinos, pero, en general, es un antiparasitario externo con actividad insecticida y acaricida de amplio espectro que actúa por contacto y tiene un largo poder residual. Su mecanismo de acción consiste en bloquear los canales de cloro regulados por ácido γ -aminobutírico en la membrana celular de las células del sistema nervioso central. Los insectos afectados muestran hiperexcitación y acaban muriendo. El bloqueo parece que es más estable en insectos que en vertebrados y mamíferos, en los que se da también este tipo de mecanismo [9].

- **Los triazoles.** Son importantes fungicidas para el control de varias clases de hongos, tales como ascomicetes, deuteromicetes, y basidiomicetes. Los triazoles actúan en general inhibiendo la producción de ergosterol, componente de la membrana celular del hongo [14,15]. En este sentido el tetraconazole, fungicida triazol sistémico de última generación, se destaca por su gran eficiencia, amplio espectro de acción y selectividad sobre los cultivos.

1.3 EL ANÁLISIS QUÍMICO COMO HERRAMIENTA PARA EL MONITOREO AMBIENTAL

En los estudios de evaluación del impacto ambiental de los pesticidas, el análisis químico juega un papel importante, y técnicas como la cromatografía, la espectrofotometría, la difracción de rayos X o el uso de trazadores radiactivos han sido empleadas para la detección y cuantificación de agentes contaminantes en diversos ecosistemas [16,17].

Las etapas básicas para la determinación de pesticidas son: muestreo, extracción del pesticida de la muestra, limpieza e identificación, y cuantificación. Pero, para que este proceso sea exitoso, debe cumplirse con una fase de validación, la cual consiste en satisfacer una serie de parámetros, que garantizan la aceptación del método.

En la etapa de muestreo, la matriz a evaluar debe ser representativa y correctamente procesada. Mientras que en el análisis debe cumplirse con las siguientes condiciones: la extracción debe ser completa; la limpieza debe ser efectiva; la resolución cromatográfica debe ser adecuada; la determinación cuantitativa debe responder a la sensibilidad del detector y el método debe ser reproducible. En general, estas técnicas resultan costosas debido al empleo de patrones, los cuales son importados; y el uso de solventes orgánicos, e.g., acetona, hexano, metanol, acetonitrilo, éter, de costo alto, usados en el proceso

de extracción. De manera que diversas investigaciones han centrado su atención en optimizar la técnica de extracción y cuantificación en función de reducir los costos, pero manteniendo la eficiencia. Para ello, se han planteado algunas propuestas en el proceso de extracción, por ser ésta una de las etapas más costosas y delicadas de todo el proceso [18].

1.3.1 Metodología AOAC (*Official Method 970.52*) para la determinación de residuos de pesticidas organoclorados y organofosforados. La Asociación de Químicos Analíticos Oficiales de EUA (AOAC), publica periódicamente las referencias consideradas como oficiales y de calidad, para realizar estudios analíticos de residuos de pesticidas.

La distribución líquido-líquido entre éter de petróleo y acetonitrilo, es el método establecido, para la separación de pesticidas de grasas biológicas, ceras y alimentos grasos (leche, mantequilla, queso y pescado). Usando una correcta proporción, los pesticidas se distribuyen en la fase de acetonitrilo, mientras que los lípidos quedan solubilizados en la fase no polar debido a su contenido de hidrocarburos. Esta metodología incluye pasos posteriores de *clean-up*, en una columna de florisil, donde los pesticidas y la materia grasa son retenidos, y se obtienen fracciones de pesticidas separadas de las grasas, al eluir con solventes de baja polaridad [18, 19]. Esta última etapa es crítica, ya que pequeñas cantidades de lípidos pueden causar deterioro en la columna cromatográfica, contaminación del sistema cromatográfico y disminución de la sensibilidad.

La metodología “clásica”, resulta larga, tediosa y consume gran cantidad de solventes costosos y tóxicos; además, son inevitables los tratamientos posteriores de purificación del extracto, haciendo que las recuperaciones para algunos pesticidas resulten bajas. Por tanto, es necesario que se desarrollen nuevos métodos analíticos para la determinación de pesticidas desde este tipo de

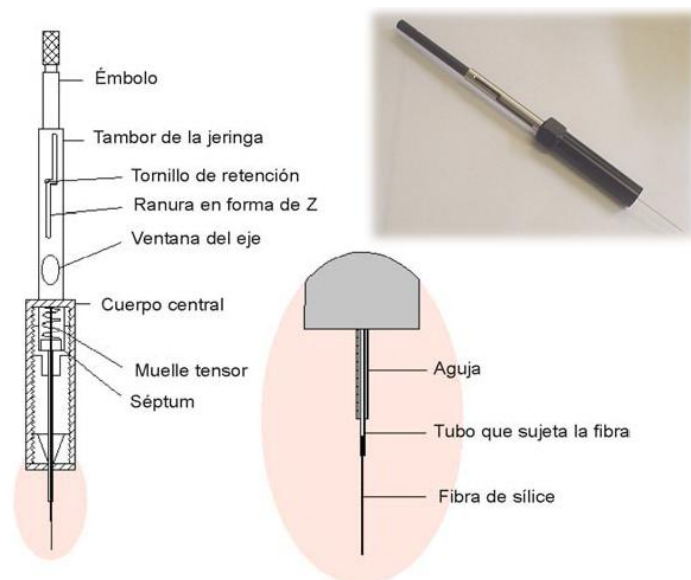
matrices, principalmente, considerando aquellos métodos que determinen en breve tiempo la presencia y el nivel del contaminante.

1.3.2 Química verde. Los principios de la química verde nos recuerdan que el papel de los químicos y la química analítica, no es sólo brindar solución a los problemas ambientales del pasado, sino lo más importante, el evitar los problemas ambientales en el futuro. Convencidos de ello, hoy en día se generan propuestas, que incluyen la implementación de nuevas técnicas de extracción como, por ejemplo, la SPME que prescinde de uso de solventes [20].

1.3.3 Microextracción en fase sólida. La revisión cuantitativa que se presenta, condujo a reconocer la SPME como una técnica novedosa, y una herramienta muy útil para el análisis medioambiental, en especial, para la determinación de residuos de pesticidas [20]. Esta técnica permite minimizar la manipulación de la muestra, no precisa del uso de disolventes orgánicos, es rápida, polifuncional y, además, soluciona algunos de los problemas relacionados con los métodos tradicionales, e.g., la formación de emulsiones, el elevado consumo de disolventes, “efectos de memoria” y las señales altas del blanco [21].

La SPME es una técnica de extracción y concentración simultánea de los analitos en diferentes matrices; se realiza mediante una fibra de sílice fundida que está recubierta de un sorbente, en la mayoría de los casos polimérico, seguida de la desorción de los analitos mediante temperatura o un disolvente orgánico [22]. El pequeño tamaño de la fibra y su geometría cilíndrica permiten incorporarla en una jeringa, de esta forma, se facilita su manipulación. Un esquema del dispositivo comercial de SPME se muestra en la **Figura 2**.

Figura 2. Esquema del dispositivo comercial de SPME.



1.3.3.1 Fundamentos teóricos de la SPME. El principio de la SPME consiste en la partición de los analitos entre la matriz de la muestra y el recubrimiento de fibra. Así, el transporte de los analitos desde la matriz de la muestra hasta la fibra comienza cuando la fibra entra en contacto con la muestra y la extracción se considera completa cuando la concentración de analito ha alcanzado el equilibrio de distribución. De manera que el recubrimiento resulta como una trampa de analitos, lo que resulta en una acumulación de masa sobre la fibra.

La eficiencia de la extracción depende del reparto del analito entre la matriz de la muestra y el recubrimiento y, la partición obedece a las propiedades fisicoquímicas del analito, la matriz de la muestra, la fase extractora y la temperatura.

1.3.3.2 Modos de extracción. Existen dos formas básicas de llevar a cabo la extracción por SPME: (1) extracción por inmersión directa (D); (2) espacio de cabeza (HS); (3) con protección de membrana; en este último modo de extracción, se coloca una membrana semipermeable alrededor de la fibra, que evita que compuestos de elevado peso molecular, como ácidos húmicos o proteínas, que

pueden estar presentes en la matriz de la muestra lleguen hasta la fibra y puedan interferir con el análisis [23]. El modo HS/SPME también permite proteger la fibra de estos compuestos de elevado peso molecular u otras interferencias no volátiles. Además permite modificar la matriz de la muestra, como por ejemplo variando el pH, sin dañar la fibra, de manera que este modo de extracción es muy útil para el análisis de muestras sólidas como sedimentos o alimentos o muestras biológicas [24] donde la interferencia de la matriz es importante, pero está restringido a compuestos volátiles o semivolátiles.

1.3.3.3 Termodinámica de la SPME. La SPME es un proceso de equilibrio donde sólo se consideran tres fases, a saber: (1) recubrimiento de la fibra, (2) la fase gaseosa o HS y (3) la fase condensada estimada homogénea. Durante su extracción, los analitos migran desde las tres fases hasta alcanzar el equilibrio. Ya que la masa permanece constante, se tiene:

$$C_oV_s = C_fV_f + C_hV_h + C_sV_s \quad \text{(Ecuación 1)}$$

Donde C_o es la concentración inicial del analito en la fase condensada; C_f , C_h , C_s son las concentraciones en el equilibrio del analito en el recubrimiento de la fibra, en el *headspace* y en la matriz, respectivamente. V_f , V_h , V_s son los volúmenes del recubrimientos de la fibra, el *headspace* y la matriz, respectivamente. Esta ecuación puede ser expresada en términos de coeficientes de partición entre la fibra y el HS (K_{fh}) y de ésta con la muestra (K_{hs}) [25,26].

$$n = \frac{K_{fs}V_fC_oV_s}{K_{fs}V_f + K_{hs}V_h + V_s} \quad \text{(Ecuación 2)}$$

En las condiciones de trabajo de la SPME, generalmente, se cumple que $V_s \gg K_{fs}V_f$ ya que en la mayoría de los casos V_f es mucho más pequeño que V_s , por lo que la **Ecuación 2** se transforma en la siguiente:

$$n = K_{fs}V_fC_o \quad \text{(Ecuación 3)}$$

Como se observa en la **Ecuación 3**, la cantidad de analito adsorbida sobre la fibra es directamente proporcional a la concentración inicial en la muestra (C_0). Sin embargo, esta afirmación no es válida en el caso cuando los analitos a determinar tengan valores de K_{fs} muy elevados (gran afinidad por la fibra) y se estén utilizando volúmenes de muestra muy pequeños. Otro factor, que se debe tener en cuenta, es el hecho de que no en todos los tipos de fibras comerciales, la extracción de los analitos se realiza mediante un proceso de absorción, que es lo que se considera en este modelo matemático. Así, existen fibras, en las que la extracción de los analitos se produce mediante un proceso de adsorción por lo que en estos casos el modelo matemático que explica el proceso de extracción es ligeramente diferente. La ecuación que define el proceso de extracción por adsorción es la siguiente [26]:

$$n = \frac{K_{fsD}V_f C_0 V_s (C_{f \max} - C_f)}{K_{fs}V_f + K_{hs}V_h + V_s(C_{f \max} - C_f)} \quad \text{(Ecuación 4)}$$

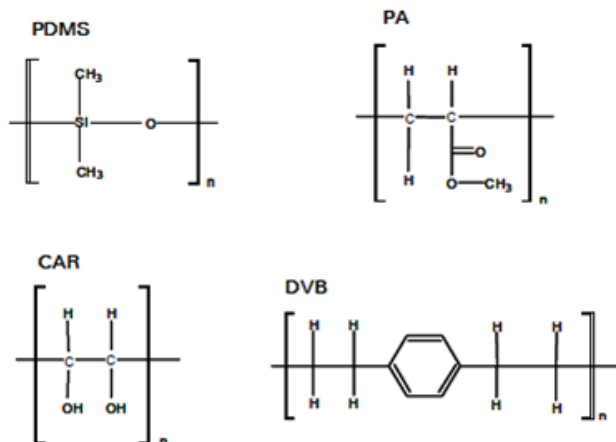
Donde K_{fsD} es el coeficiente de distribución del analito entre la muestra y la superficie de la fibra, C_f es la concentración final de analito en la superficie de la fibra y $C_{f \max}$ es la concentración máxima de analito en la superficie de la fibra. Los demás parámetros son los mismos que los que aparecen en la **Ecuación 1** [25, 26].

1.3.3.4 Tipos de fibras para SPME. Actualmente, hay fibras con diferentes recubrimientos, de manera que la SPME puede usarse para determinar un amplio grupo de compuestos. La regla general que puede ser usada para la selección de la fibra más adecuada para cada aplicación, depende de la polaridad y volatilidad de los analitos. En general, se recomienda utilizar las fibras de mayor espesor, como la de 100 μm , para compuestos muy volátiles y con coeficientes de partición bajos; y las de menor espesor para los que presenten coeficientes de partición elevados. La reducción del espesor de la fibra de 100 μm a 7 μm limita la aplicación de SPME a un número reducido de analitos, pero permite trabajar a

mayores temperaturas, lo que extiende su aplicación a compuestos con temperaturas de ebullición más elevadas [26].

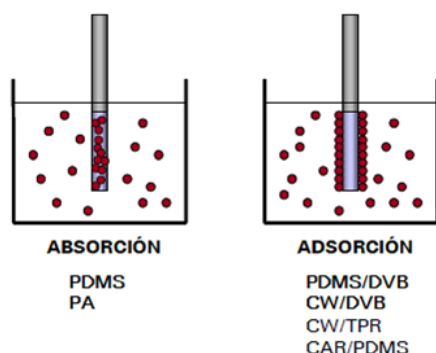
Los primeros recubrimientos comercializados fueron poli(dimetilsiloxano) (PDMS) y poli(acrilato) (PA), pero los tipos de recubrimientos han ido aumentando progresivamente (**Figura 3**) y actualmente existe un amplio conjunto de fibras para múltiples aplicaciones.

Figura 3. Estructura química de algunos recubrimientos comerciales para las fibras de SPME.



Las fibras de PDMS, son las más utilizadas, y las más adecuadas para los analitos apolares como poliaromáticos o BTEX (benceno, tolueno, xileno y etilbenceno) [27, 28], aunque, en algunos casos, también pueden ser usadas para la determinación de analitos ligeramente polares. En la fibra de PDMS, que es un polímero líquido, el proceso de extracción se debe principalmente a un fenómeno de absorción. En la **Figura 4** se clasifican las fibras comerciales según si el proceso de extracción se produce mayoritariamente por absorción o adsorción [26].

Figura 4. Clasificación de las fibras de SPME según si la extracción se produce por absorción o adsorción.



Los recubrimientos de PA o Carboxen (CAR) se utilizan para la extracción de analitos polares como fenoles. Aunque las fibras de PA son polímeros sólidos, su baja densidad hace que los analitos sean extraídos por un proceso muy similar al de la absorción, al igual que las fibras de PDMS. Sin embargo, los coeficientes de difusión de los analitos en las fibras de PA son menores que los que poseen los analitos en las fibras de PDMS, por lo que, en general, los tiempos de extracción son mayores para los compuestos volátiles en el espacio de cabeza [29].

Las fibras en las que se combina más de un polímero, como por ejemplo, las de PDMS/DVB [poli(dimetilsiloxano)/ divinilbenceno] o CW/DVB (carbowax/ divinilbenceno), son más adecuadas para la determinación de analitos muy volátiles, ya que a diferencia de las fibras de PDMS y PA, la principal interacción entre la fibra y los analitos se produce por adsorción (quedan en la superficie del sólido hasta encontrar el equilibrio), ya que son polímeros sólidos [24, 26, 29]. En general, en este tipo de fibras, los coeficientes de distribución de los analitos son mayores que los que presentan las fibras de PDMS. El principal inconveniente es el intervalo lineal dinámico, que es menor para las fibras de absorción, además, se presentan los problemas de desplazamiento.

1.3.3.5 Variables que afectan al proceso de SPME. El proceso de SPME depende de una serie de variables experimentales que pueden ser modificadas para incrementar su eficacia. Entre estas variables se encuentra la agitación de la muestra, que incrementa la difusión de los analitos desde la matriz de la muestra a la fibra o al espacio de cabeza, por lo que se disminuye el tiempo requerido para llegar al equilibrio. Otros parámetros importantes son el tiempo y la temperatura de extracción, así como la modificación de las condiciones de la muestra, y los parámetros que afectan la etapa de desorción [30, 31].

- **La agitación.** En SPME también se debe tener en cuenta la cinética del proceso, ya que los analitos deben ser transportados desde la matriz de la muestra a la fibra en inmersión o desde la matriz de la muestra al espacio de cabeza y de allí hacia la fibra, en el caso de que la extracción se realice mediante extracción del espacio de cabeza de la muestra (HS-SPME). Para aumentar la velocidad de la extracción es necesario utilizar un sistema de agitación, de manera que se facilite la difusión de los analitos hacia la superficie de la fibra. Esto no es necesario con muestras gaseosas ya que la propia convección del aire es suficiente para llegar al equilibrio de forma rápida. En muestras líquidas, sin embargo, se han utilizado diferentes modos de agitación, entre ellos se encuentran los siguientes: las barras magnéticas agitadoras, ultrasonidos o movimientos de la fibra o del vial. Estos sistemas de agitación sirven para disminuir el efecto causado por la zona estática que se forma alrededor de la fibra y que disminuye la velocidad de extracción, así como para compensar los coeficientes de difusión bajos de las matrices líquidas.

- **El tiempo de extracción.** Es un parámetro muy importante a tener en cuenta. Al desarrollar un método analítico basado en SPME se debe determinar el tiempo necesario para llegar al estado de equilibrio que es característico para cada analito-fibra e intentar trabajar en esas condiciones. Sin embargo, para algunos compuestos el tiempo necesario para llegar al equilibrio es muy largo, por

lo que generalmente se opta por trabajar en condiciones de no-equilibrio y se seleccionan tiempos de extracción inferiores para no alargar el tiempo de análisis [31]. En estos casos es muy importante controlar estrictamente el tiempo de extracción ya que pequeñas variaciones en la medida del tiempo pueden cambiar de forma considerable la cantidad de analito extraída.

- **La temperatura de extracción.** Este parámetro afecta de dos formas completamente opuestas el proceso de SPME. Por un lado, los coeficientes de difusión de los analitos en la muestra aumentan al incrementar la temperatura, por lo que aumenta la cantidad de analito extraída; sin embargo, un aumento de la temperatura disminuye los coeficientes de distribución del analito entre la muestra y la fibra por lo que la eficacia de la extracción se afecta negativamente [30, 31]. En HS/SPME, al aumentar la temperatura también aumenta la concentración de los analitos en el espacio de cabeza, por lo que la extracción es también más rápida.

- La concentración de sal en la muestra y la modificación del pH también pueden afectar el proceso de SPME. La presencia de sales, generalmente NaCl, u otras sales como Na₂SO₄, en la muestra aumenta el coeficiente de distribución de los analitos que están presentes en forma no ionizada por lo que la cantidad de analito extraída generalmente aumenta. Sin embargo, si los analitos están en forma ionizada, se observa una disminución de la eficacia de la extracción. Esto se debe al aumento del coeficiente de actividad de las especies iónicas al aumentar la fuerza iónica de la solución. En consecuencia, el pH de la muestra es otro factor para tener en cuenta cuando se optimiza el proceso de SPME, ya que los analitos deben estar siempre presentes en la muestra en su forma neutra, no ionizada, para su extracción. Para que los analitos estén presentes en la forma neutra, es recomendable trabajar a valores de pH al menos dos unidades por debajo de sus valores de pKa, si son ácidos los analitos [31].

- **Etapa de desorción.** Los parámetros que afectan la etapa de desorción dependen de cómo se realiza la desorción (térmica o con solvente orgánico). Si ésta se lleva a cabo térmicamente en un cromatógrafo de gases, los parámetros a optimizar son la temperatura y el tiempo de desorción [31]. Se recomienda fijar la temperatura máxima de uso de la fibra recomendada por el fabricante [32] y el tiempo debe ser el adecuado para que la desorción de los analitos de la fibra sea completa y no haya “efectos de memoria”.

1.4 ANÁLISIS DE PESTICIDAS

La identificación y la cuantificación de pesticidas se lleva a cabo por medio de técnicas cromatográficas; la cromatografía de gases (GC) es la más utilizada, acoplada a detectores selectivos, como el de captura de electrones (ECD) y el selectivo de masas (MSD) [33].

1.4.1 Cromatografía de gases. Es un método dinámico de separación en el cual los componentes orgánicos de una mezcla se reparten entre dos fases: una es estacionaria, con una larga área superficial y, la otra, es un gas. En esta técnica la muestra se vaporiza y se arrastra por la fase móvil a través de la columna. Los componentes de la muestra o analitos son separados con base en sus presiones de vapor relativas y su afinidad por la fase estacionaria [34].

1.4.2 Cromatografía de gases acoplada con detector de captura de electrones. El ECD es uno de los detectores más usados en el análisis medioambiental [33]. Posee respuesta selectiva, es muy sensible a las moléculas que contiene grupos funcionales electronegativos tales como halógenos, peróxidos, quinonas y grupos nitro, por el contrario, no es sensible a aminas, alcoholes e hidrocarburos. El ECD es ampliamente usado en el análisis de pesticidas halogenados, similares al grupo de pesticidas analizados en este trabajo.

El mecanismo de operación del ECD, se basa en emisiones de partículas β de ^{63}Ni , éstas partículas cargadas negativamente colisionan con el gas “make-up” (argón: metano) y producen más electrones, esta corriente constante es colectada por un electrodo positivo. Sin embargo, cuando analitos capaces de atrapar electrones eluyen de la columna cromatográfica, esta corriente decrece, proporcionalmente a la concentración de los mismos [34].

1.4.2 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. El acoplamiento de cromatografía de gases con espectrometría de masas (GC-MS), es una de las técnicas de mayor importancia para el análisis de mezclas de complejas, puesto que presenta una capacidad excelente para identificar y cuantificar los analitos. Consiste en la separación cromatográfica de los componentes de la mezcla y su paso posterior a la cámara de ionización en un espectrómetro de masas a presión reducida (vacío), en donde el compuesto es bombardeado por electrones de 70 eV de energía, provenientes de un filamento de tungsteno (cátodo), como resultado de la ionización de las moléculas se forman iones moleculares con suficiente energía para fragmentarse. Las corrientes iónicas reconstituidas de los iones fragmento y del ion molecular dan lugar al espectro de masas, el cual es como la “huella digital” de cada compuesto y proporciona información estructural. El detector selectivo de masas puede operar en dos formas: (1) barrido completo (*full scan*) y (2) Monitoreo de ion(es) seleccionado(s) (SIM), en el primer modo, se procesa, en función del tiempo, la corriente iónica total y, en el segundo, sólo se mide la corriente iónica parcial del fragmento o fragmentos de interés, pre-seleccionado(s), lo que permite aumentar la selectividad y, sobre todo la sensibilidad del método [35].

2. ANTECEDENTES

La SPME es la técnica de extracción introducida en 1990 por Pawliszyn y su grupo de colaboradores; figura en el mercado, introducida por Supelco, desde 1993 por la firma Supelco [29, 32]. Previo al inicio de la parte experimental de la presente tesis, se realizó un estudio cuantitativo sobre el estado de la investigación respecto a esta técnica.

Se encontró, que en los últimos 15 años, la SPME ha sido aplicada en diferentes campos, incluyendo el medioambiental, el farmacéutico, el biomédico y el agroalimentario, entre otros.

2.1 REVISTAS CIENTÍFICAS

Las herramientas utilizadas en esta vigilancia bibliográfica fueron las bases de datos y patentes *Web of Science (ISI Web of Knowledge, Thomson, Versión 3.0)* y *Scopus*. Del volumen de publicaciones sobre este tema de investigación, fue posible sesgar las búsquedas mediante análisis cuantitativo, encontrar un alto número de publicaciones recientes que sirvieron de base para el inicio de la investigación.

El análisis medioambiental es el área en la cual la química analítica ha hecho sus mayores aportes, principalmente, relacionados con la determinación de residuos de contaminantes, entre ellos los pesticidas. En la **Figura 5, (Ecuación de búsqueda 1)**, se observa la dinámica de las publicaciones relacionadas con residuos de pesticidas en diversas matrices (agua, suelos, sedimentos, alimentos), que demuestra el creciente interés en esta temática durante los últimos 20 años, y la preocupación sobre el rigor científico e implementación de nuevos métodos de determinación y cuantificación de éstos. De estas publicaciones, el 17,9% (**Ecuación de búsqueda 2**) ha centrado sus esfuerzos para vigilancia en la

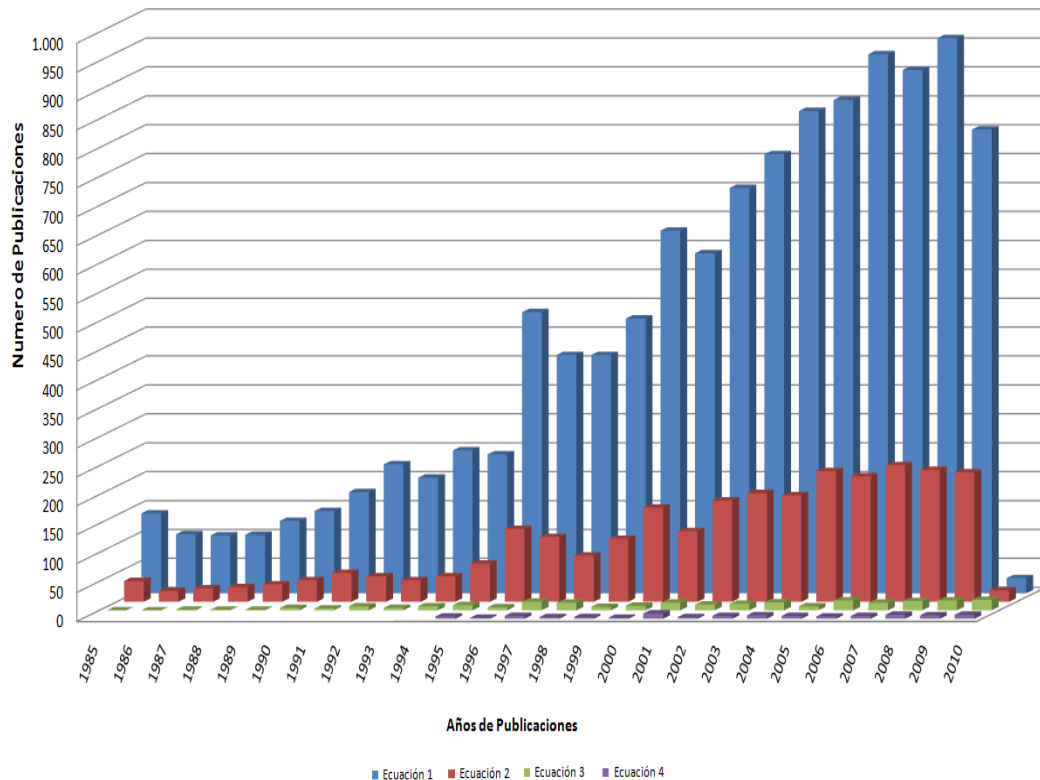
inocuidad en alimentos específicamente; y de éstas el 8,2% (**Ecuación de búsqueda 3**) han detectado la presencia de residuos de pesticidas en leche de consumo humano. En dichas publicaciones, los autores han reportado el uso de técnicas convencionales de extracción, pero, en los últimos 5 años, la SPME ha aumentado su popularidad y ocupa el 2,6% en las publicaciones referentes; hasta la fecha de consulta, se han realizado 7 nuevas publicaciones en el año 2010 sobre el tema de interés.

Los estudios realizados por Llompart y Fernández-Álvarez de la Universidad de Santiago de Compostela son de relevancia para esta investigación, los autores realizaron un diseño metodológico para la extracción de algunos piretroides de muestras acuosas, utilizan la SPME-GC/ECD, demostrando que, a pesar de la volatilidad mediana de éstos compuestos, fue posible la validación de un método analítico alcanzando bajos NMD y NMC [36].

Los investigadores Gonzales-Rodríguez y Garrido Fernich incluyeron un grupo de pesticidas ampliamente usado en la región de Almería, España; además reportaron el hallazgo de residuos de *p',p-DDE* en la leche materna de tres mujeres de la región y en cinco muestras de leche de cabra [37].

Junto con los resultados, obtenidos por Gonçalves y Alpendurada [38], en éstas investigaciones se han diseñado metodologías para determinar grupos de pesticidas en alimentos, suelo, lodo, agua y otras matrices, usando la SPME como método de extracción. Sin embargo, los resultados obtenidos difieren en lo relacionado con las condiciones de extracción (tipo de fibra, temperatura, tiempo, *salting out* y pH), ya que éstas dependen mucho de las propiedades fisicoquímicas del grupo de pesticidas elegido en el análisis.

Figura 5. Relación del número de artículos científicos sobre residuos de pesticidas, con el año de su publicación.

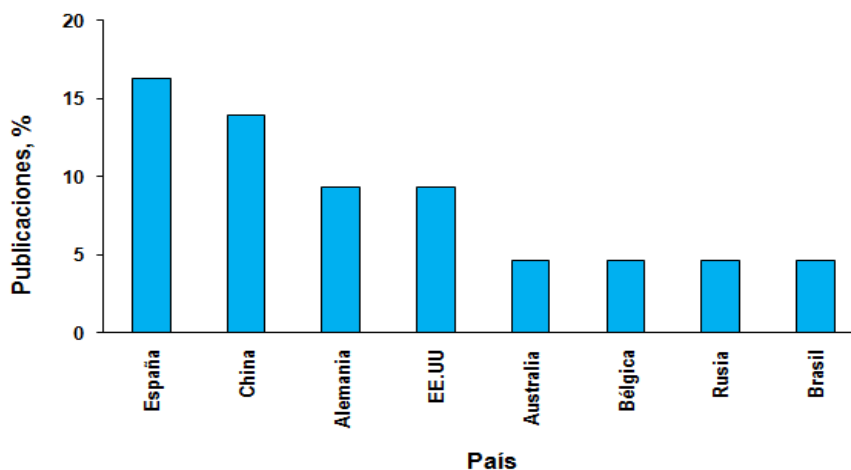


Fuente: Scopus. Periodo de observación: 1985-2010. Fecha de consulta: 24 de abril de 2010. **Ecuación 1.** TITLE-ABS-KEY (pesticides, residue analysis) AND LIMIT-TO (SUBJAREA: ENVIRONMENTAL SCIENCE, CHEMISTRY) AND LIMIT-TO (EXACT KEY WORD : pesticide residues). **Ecuación 2.** TITLE-ABS-KEY (pesticides, residue analysis) AND LIMIT-TO (SUBJAREA: ENVIRONMENTAL SCIENCE, CHEMISTRY) AND LIMIT-TO (EXACT KEY WORD : pesticide residues, food contamination). **Ecuación 3.** TITLE-ABS-KEY (pesticides, Residue analysis) AND LIMIT-TO (SUBJAREA: ENVIRONMENTAL SCIENCE, CHEMISTRY) AND LIMIT-TO (EXACT KEY WORD: pesticide residues, milk, animal, human, extraction). **Ecuación 4.** TITLE-ABS-KEY (pesticides, Residue analysis, milk) AND LIMIT-TO (SUBJAREA: ENVIRONMENTAL SCIENCE, CHEMISTRY) AND LIMIT-TO (EXACT KEY WORD (pesticide residues, animal, human, extraction, solid phase microextraction, SPME).

Los resultados obtenidos por Sakamoto y Tsutsumi, también son un punto de partida en esta investigación; los autores usaron la fibra de PA y lograron extraer 45 pesticidas simultáneamente desde matrices acuosas; su aporte a la investigación consistió en la construcción de perfiles de temperaturas de extracción de manera que fácilmente se pueda introducirse un nuevo pesticida al análisis sin alterar las demás condiciones de extracción [39].

En los últimos años, se han publicado algunas revisiones bibliográficas en las cuales se resume el estado actual de la investigación en lo referente a la extracción de residuos de pesticidas en matrices alimenticias, se destaca la SPME como una técnica novedosa, ventajosa y que alcanza límites de detección entre los 0,003-0,7 mg kg⁻¹ [16, 17, 20].

Figura 6. Relación del número de publicaciones sobre residuos de pesticidas en leche, según el país.



Fuente: Scopus. Periodo de observación: 1985-2010. Fecha de consulta: 24 de abril de 2010. **Ecuación de búsqueda** *TITLE-ABS-KEY (pesticides, Residue analysis) AND LIMIT-TO (SUBJAREA: ENVIRONMENTAL SCIENCE, CHEMISTRY) AND LIMIT-TO (EXACT KEY WORD (pesticide residues, milk, animal, human, extraction, solid phase microextraction, SPME)*

Según los resultados obtenidos en el estudio cuantitativo sobre la presencia de pesticidas en leche, se observa que la mayoría de trabajos se han desarrollado principalmente en España, Estados Unidos y China (**Figura 6**). Esto se interpreta como una consecuencia de los grandes volúmenes de producción de leche fresca en éstos países.

2.2 PUBLICACIONES O FUENTES NO-FORMALES EN *INTERNET*

Para el desarrollo de esta tesis de investigación, se buscó también la información más reciente en Colombia, referente a esta problemática. Se encontró que son muchas las tesis realizadas en las diferentes universidades del país, por ejemplo el Grupo Interdisciplinario en Análisis de Residuos (GIAR) de la Universidad de Antioquia, diseñaron un método para la determinación de fentión en leche bovina, basado en el método de dispersión de matriz en fase sólida [40]; en la Universidad de Caldas se analizaron muestras de leche cruda, hervida y pasteurizada, obtenidas de 20 fincas lecheras y encontraron residuos de DDT, BHC, dieldrín, aldrín y heptacloro epóxido, con valores de 0,04, 0,04, 0,04, 0,1 y 0,17 ppm, respectivamente. Los resultados de otro estudio, realizado por la Universidad Nacional, reportaron niveles de lindano y dieldrín por encima de los permitidos por la FAO/OMS en muestras de leche pasteurizada y en polvo provenientes de la Sabana de Bogotá; en otro estudio realizado en la Sabana de Bogotá, se encontraron altos niveles de endosulfan y tetradifon en leche (160 y 410 ppb), probablemente, debido al uso de desechos de floricultura como complemento alimenticio en la ración de las vacas [3, 4]. Estas investigaciones concuerdan con el hecho de que el uso de pesticidas en nuestro país se ha convertido en un riesgo para la salud pública, y que sí existen sus residuos en leche de vaca, que llegar a manos del consumidor.

3. DESARROLLO EXPERIMENTAL

En el presente trabajo, la implementación de la metodología analítica para la determinación de residuos de pesticidas en leche de consumo humano, se desarrolló en las siguientes etapas experimentales:

- Se determinaron de los parámetros cromatográficos adecuados para separación de los pesticidas analizados;
- Se establecieron las mejores condiciones para el método SPME, para la extracción de los pesticidas en las muestras de leche, se estudio la influencia de variables tales como tipo de fibra, modo de extracción, temperatura de extracción y efecto *salting out*, mediante un diseño experimental factorial 2ⁿ, sobre la eficiencia y la reproducibilidad de la extracción;
- Se hallaron las figuras de mérito, tales como exactitud, precisión, medida como repetitibilidad y reproducibilidad, especificidad, límites de detección (NMD) y cuantificación (NMC), rango dinámico lineal (RDL) y robustez, que garantizan la confiabilidad del método.
- Se implementó la metodología para las muestras de leche adquiridas en el mercado local.

3.1 ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA GC/ μ -ECD PARA EL ANÁLISIS CUALITATIVO Y CUANTITATIVO DE LOS PESTICIDAS.

3.1.1 Alcance de la técnica estandarizada. En este trabajo, se desarrolló un método HS/SPME-GC/ μ -ECD para la cuantificación de residuos de diversos pesticidas en leche de vaca, a saber: organofosforados, organotiofosforados, organoclorados, piretroides, carbamatos, triazoles y oxazoles, utilizando cromatografía de gases de alta resolución, acoplada al detector de *micro*-captura de electrones o al detector selectivo de masas.

En la **Anexo A**, se exponen los pesticidas que pueden ser determinados usando este método. Se seleccionó este grupo de pesticidas, porque son muy usados en Colombia, además, sus LMR están establecidos en la resolución anteriormente mencionada, y porque es posible analizarlos mediante HS/SPME-GC/ECD. Este último criterio tuvo en cuenta las propiedades físicas de los compuestos a saber: el coeficiente de partición octanol-agua y la presión de vapor (P_v). Estos valores se tomaron de la literatura y no fueron determinados en este estudio, de manera que el grupo de pesticidas escogidos para el análisis pertenece a un intervalo de $\log P_v$ entre -4,4 - 0,8.

3.1.2 Materiales y reactivos

3.1.2.1 Material de referencia certificado. La implementación de una metodología cromatográfica requiere contar con material de referencia certificado de los pesticidas a analizar. En la **Tabla 1** se reportan las sustancias de referencia certificadas, que se emplearon en este estudio.

Tabla 1. Especificaciones de las sustancias de referencia certificadas.

Pesticida	Pureza, %	Nº de Lote	Fabricante
Bifentrin	99,0	383-27	Supelco (Bellefonte, EE.UU.)
Ciflutrina	95,0	60407	Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Alemania)
Clorprofam	99,7	8058X	Fluka (Seelze, Alemania)
Dimetoato	99,4	5334X	Fluka (Seelze, Alemania)
Disulfotón	99,9	LB52155	Supelco (Bellefonte, EE.UU.)
Dursbán	99,6	B8040183	Accustandar, Inc. (Newhaven, EE.UU)
Fenbuconazol	99,5	414-57B	Supelco (Bellefonte, EE.UU.)
Fenpropatrin	98,7	8080X	Fluka (Seelze, Alemania)
Fipronil	97,6	8015X	Fluka (Seelze, Alemania)
Miclobutanilo	99,4	5027X	Fluka (Seelze, Alemania)
Penconazol	99,1	6006X	Fluka (Seelze, Alemania)
Tebuconazol	98,8	80418	Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Alemania)
Vinclozolin	99,5	61109	Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Alemania)

3.1.2.2 Materiales y equipos. En la **Tabla 2** se reportan los materiales y equipos empleados en el siguiente trabajo.

Tabla 2. Descripción de los materiales y equipos empleados.

Producto	Especificaciones
Reactivos químicos	Acetona, acetato de etilo, hexano, diclorometano, metanol; grado pesticida, <i>J.T. Baker Inc.</i> , (<i>Phillipsburg</i> , EE.UU.)
Material de laboratorio	
Viales y <i>Septa</i>	Viales ámbar estándar para SPME de 4 mL; y <i>septa</i> de silicona blanca recubierta con teflón; <i>Supelco</i> , (<i>Bellefonte</i> , EE.UU.)
Fibras para SPME	Fibras de sílice fundida recubiertas con PDMS/DVB de 65µm, PDMS de 100µm, PA de 85µm y CAR/PDMS de 75µm; <i>Supelco</i> (<i>Bellefonte</i> , EE.UU.).
Dispositivo para SPME	Dispositivo para muestreo manual por SPME; <i>Supelco</i> , (<i>Bellefonte</i> , EE.UU.)
Balones aforados	1, 2 y 10 mL de <i>Schott</i> (<i>Texas</i> , EE.UU.)
Micropipetas	2-20, 25-250 y 100-1000 µL de <i>Brand</i> (<i>Wertheim</i> , <i>Alemania</i>).
Equipos menores	
Manta de agitación	<i>Schott</i> , modelo MR 1065.
Balanza analítica	Balanza analítica AG 285 de <i>Mettler Toledo</i> (<i>Schwerzenbach</i> , Suiza).

3.1.3 Estandarización del método cromatográfico para el análisis de pesticidas. La cromatografía de gases acoplada al detector de *micro*-captura de electrones se utilizó para el desarrollo del método HS/SPME y el detector selectivo de masas (MSD) para la identificación y confirmación de los pesticidas.

3.1.3.1 Cromatografía de gases de alta resolución acoplada a espectrometría de masas. Se empleó un cromatógrafo de gases HP-5890A *Series II* (*Hewlett-Packard*, Palo Alto, California, EE.UU.), acoplado a un detector selectivo de masas HP 5972 (*Hewlett-Packard*, Palo Alto, California, EE.UU.); con puertos de inyección *split/ splitless* (inyección manual para SPME e inyección automática para soluciones, HP 7683 *Series Injector*). Se utilizó un sistema de datos MS *ChemStation Rev.* (*Hewlett-Packard*, Palo Alto, California, EE.UU.).

3.1.3.2 Cromatografía de gases de alta resolución con detector de *micro-captura de electrones*. Se empleó un cromatógrafo de gases HP-6890 *Series Plus* (Hewlett-Packard, Palo Alto, California, EE.UU.), con programación electrónica de temperatura y control electrónico de presión de gases, equipado con un detector de *micro-captura de electrones*, con puertos de inyección *split/splitless* (inyección manual para SPME e inyección automática para soluciones, HP 7683 *Series Inyector*). El sistema de datos fue el *ChemStation Rev* (Hewlett-Packard, Palo Alto, California, EE.UU.).

Análisis preliminares permitieron establecer los parámetros de operación de los cromatógrafos utilizados, las cuales se describen en la **Tabla 3**. Con éstos, se logró realizar la determinación simultánea de los pesticidas con una resolución aceptable.

Tabla 3. Parámetros cromatográficos empleados para el análisis de los pesticidas por GC/ μ -ECD y GC/MSD.

Parámetros cromatográficos	Descripción
-Columna cromatográfica	Columna capilar de sílice fundida con fase estacionaria de DB-5 de 30 m x 0,25mm (<i>d.i.</i>) x 0,25 μ m.
-Temperatura del detector	300°C
-Temperatura del inyector	250°C
-Temperatura del horno	
Temperatura inicial	100°C (3min)
Programación	4°C/ min hasta 200°C (10min) @ 10°C/ min hasta 280°C (5min)
-Gas de arrastre (<i>carrier gas</i>)	Helio, 99.995%, AGA Fano, S.A.
Modo	Flujo constante, 1mL/ min
-Gas auxiliar (<i>make up gas</i>)	Ar-CH ₄ , AGA Fano, S.A.
Flujo volumétrico	30 mL/ min
-Presión del gas de arrastre	23.87 psi
-Flujo total	24.6 mL/ min
-Modo de inyección	<i>splitless</i>

3.1.3.3 Determinación de los tiempos de retención de los pesticidas. Una vez establecidos los parámetros cromatográficos, se procedió a establecer los tiempos de retención (t_R) de cada uno de los compuestos y su reproducibilidad. Para ello, se prepararon soluciones “stock” de 1000 mg L⁻¹ de cada uno de los pesticidas en el solvente adecuado, tal como se indica en la **Tabla 4**, y se prepararon diluciones a 1,0 mg L⁻¹, para inyectar cada uno de los patrones al GC/ μ -ECD.

Tabla 4. Solvente empleado para cada uno de los pesticidas bajo análisis.

Sustancia	Solvente
Bifentrin	Metanol
Ciflutrina	Hexano
Clorpirifos	Metanol
Clorprofam	Acetona
Dimetoato	Metanol
Disulfotón	Metanol
Fenbuconazol	Acetona
Fenpropatrin	Metanol
Fipronil	Metanol
Miclobutanilo	Metanol
Penconazol	Hexano
Tebuconazol	Diclorometano
Vinclozolin	Diclorometano

Para establecer la reproducibilidad de los t_R y de las áreas cromatográficas medida en cuentas, se inyectó una mezcla de los patrones de pesticidas, por triplicado, al GC/ μ -ECD, bajo las condiciones descritas anteriormente. Los criterios de calidad están representados en términos del coeficiente de variación [41] (CV, %, **Ecuación 5**).

$$CV, \% = \frac{\bar{X}}{s} \quad \text{(Ecuación 5)}$$

$$\bar{X} = \frac{X_1 + X_2 \dots X_n}{n} \quad \text{(Ecuación 6)}$$

$$s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{X})^2}$$

(Ecuación 7)

Donde

\bar{X} = Promedio de los datos; s = Desviación estándar

3.2 DETERMINACIÓN DE LAS MEJORES CONDICIONES DE EXTRACCIÓN SIMULTÁNEA DE LOS PESTICIDAS.

Con el fin de establecer las mejores condiciones de extracción por SPME de los pesticidas elegidos para el análisis de la matriz láctea, se realizó una serie de experimentos preliminares.

En el presente trabajo, *Headspace* fue seleccionado como el modo de extracción más adecuado para la SPME de los pesticidas desde la leche, ya que esta matriz tiene un contenido alto de grasa, proteínas y demás sustancias que pueden dañar o cambiar las propiedades de los recubrimientos extractores y que además no son compatibles con el análisis por GC/MS ECD

3.2.1 Selección del tipo de recubrimiento. Para seleccionar el recubrimiento, que permita la extracción simultánea de los pesticidas con una mayor eficiencia, se evaluaron cuatro tipos de recubrimientos, cada uno de ellos por triplicado: CAR/PDMS de 75µm, PA de 85µm, PDMS de 100µm y PDMS/DVB de 65µm. Se compararon las respuestas del detector, medidas como área cromatográfica (en cuentas) para cada uno de los analitos. Para ello, se preparó una solución de trabajo, resultante al tomar 20 µL de cada una de las “stock” de pesticidas de 1000 mg L⁻¹ que se aforó a 1,0 mL con metanol, de esta solución se tomaron 125 µL y se llevaron a un volumen de 25,0 mL con agua, grado HPLC.

Finalmente, para el procedimiento de extracción se tomó un volumen de 2 mL de esta última solución, se transfirió a un vial ámbar estándar de 4 mL para SPME. El vial se selló herméticamente con un *septum* blanco de silicona, posteriormente, se sumergió en un baño de calentamiento a 75°C, con ayuda de un micromagneto se mantuvo una agitación constante, y previamente se adicionaron 0,4 g de NaCl (20%, para el efecto *saling out*), se sometió al proceso de pre-equilibrio durante 10 min, luego, se expuso cada una de las fibras a la solución durante 45 min. La desorción de los analitos de la fibra se realizó en el puerto de inyección del GC/ECD, a una temperatura de 250°C.

3.2.2 Evaluación de los parámetros de extracción. Una vez escogido el tipo de fibra extractora, se procedió a realizar un diseño factorial con el objetivo de estudiar el efecto de los variables que afectan el proceso SPME, para cada uno de los pesticidas.

3.2.2.1 Evaluación del efecto del pH sobre la eficiencia de la extracción para los pesticidas que presentaron una baja recuperación. Debido a que el pH juega un rol importante en el proceso de extracción mediante SPME [29], se procedió a modificar el pH de extracción a un valor de 2, adicionando 10 µL de solución de ácido sulfúrico 0,5 N, para aquellos pesticidas que tienen una baja recuperación. Para ello se preparó una solución de trabajo tal como se indica en el **Numeral 3.2.1.**

3.2.2.2 Diseño experimental. Para el análisis de los parámetros de extracción se utilizó un diseño experimental factorial completo a dos niveles (2^3), el cual permitió determinar la significancia en la extracción de las variables evaluadas, tomando como variable de respuesta del sistema de detección, el área cromatográfica para cada uno de los compuestos.

Las variables de extracción escogidas para el análisis fueron:

- La temperatura de extracción. Este parámetro es de gran importancia ya que el grado de repartición de los compuestos semivolátiles (como los pesticidas analizados) entre la fase condensada y el HS es generalmente bajo, y la forma más fácil y eficiente de aumentarlo es calentar la matriz; el intervalo de temperatura fue escogido con base en investigaciones hechas por algunos autores [36-39].
- El tiempo de extracción: puesto que es proceso que involucra un equilibrio de repartición entre la fase estacionaria y la matriz.
- El efecto de *salting out* (adición de NaCl).

Para ello, se eligen los extremos del dominio experimental para cada variable tal como se indica en la **Tabla 5**.

Figura 7. La matriz del diseño experimental factorial 2^3 , está representada geoméricamente por un cubo

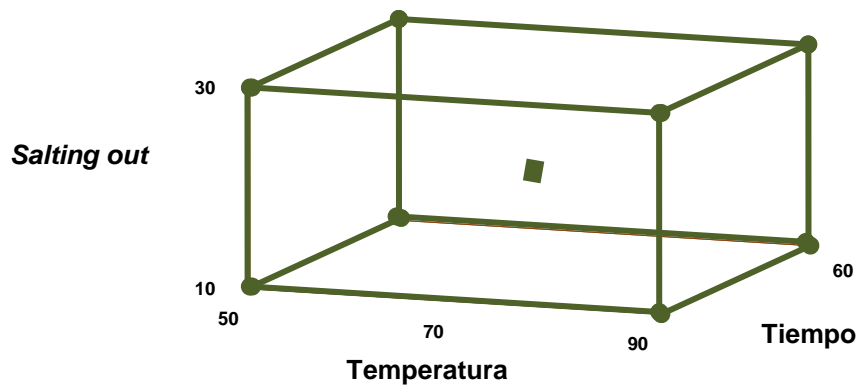


Tabla 5. Variables y niveles del diseño experimental factorial 2^3 , empleados.

Variable	Niveles		
	Alto	Central	Bajo
(A) Temperatura, °C	90	70	50
(B) Tiempo, min	60	40	20
(C) <i>Salting out</i> , % p/v	30%	20%	10%

Con el diseño factorial completo, se efectúan aleatoriamente todas las posibles combinaciones que pueden formarse con los niveles de los factores a investigar, resultando en ocho experimentos, los cuales se muestran en la **Tabla 6**. Además el tamaño del error experimental fue calculado realizando cinco experimentos adicionales en el punto central de la región de trabajo explorada tal y como se observa en el cubo de la **Figura 7**. Los ensayos se realizaron enriqueciendo muestras de la leche ultrapasteurizada (UHT) semidescremada adquirida en el mercado local (utilizada como blanco de la matriz).

Tabla 6. Experimentos realizados para las tres variables del diseño factorial.

N° Experimentos	Temperatura, °C	Tiempo, min	<i>Salting out</i> , % p/v
1	70	40	20
2	50	60	10
3	90	20	10
4	70	40	20
5	90	60	30
6	90	20	30
7	70	40	20
8	50	20	10
9	50	20	30
10	70	40	20
11	90	60	10
12	50	60	30
13	70	40	20

En el análisis de los resultados del diseño experimental se usó la metodología de superficie de respuesta con ayuda del software estadístico *Statgraphics Centurion XVI*, usando la licencia de prueba de 30 días.

Una vez determinados los niveles de cada factor, que permiten una mejor extracción, se procedió a la validación del método.

3.3 DETERMINACIÓN DE LAS FIGURAS ANALÍTICAS DE MÉRITO

Teniendo en cuenta que la técnica de SPME está influenciada por el efecto de la matriz, y sus interferencias pueden alterar las constantes de partición entre las fases; para los procesos de cuantificación, como la curva de calibración, todos los experimentos fueron realizados enriqueciendo leche ultrapasteurizada (UHT) semidescremada adquirida en el mercado local (utilizada como blanco de la matriz).

Se determinaron las figuras de mérito, tales como precisión (expresada como repetibilidad), exactitud (expresada como porcentaje de recuperación), nivel mínimo de detección (NMD), nivel mínimo de cuantificación (NMC), rango dinámico lineal (RDL), sensibilidad, de acuerdo con lo recomendado por la Conferencia Internacional sobre Armonización de Requerimientos Técnicos para Registro de Fármacos para uso Humano (ICH) [42].

Para la determinación de estos parámetros, se realizó una curva de calibración por el método de adición estándar en el intervalo de 1-125 $\mu\text{g L}^{-1}$. Cada nivel de la curva de calibración se preparó enriqueciendo un blanco de leche con cada uno de los volúmenes de solución de trabajo reportado en la **Tabla 7** y aforando la mezcla a 2,0 mL.

Tabla 7. Preparación de las soluciones de trabajo de los pesticidas, para realizar la curva de calibración.

Concentración, $\mu\text{g L}^{-1}$	Volumen de la solución stock de 1 mg L^{-1} , μL
0	0
1	2
2,5	5
5	10
10	20
25	50
50	100
80	160
100	200
125	250

Cada uno de los puntos de la curva de calibración fueron extraídas bajo las condiciones que se describen en la **Tabla 12**.

Para esta calibración se utiliza un modelo lineal con un término constante:

$$y = b + mx \quad \text{(Ecuación 8)}$$

El término b indica la magnitud de la señal estimada del blanco, mientras que m es la pendiente de la curva de calibración. La calidad de la calibración, se evalúa calculando el valor de la señal, \hat{y}_i , para los distintos patrones a través del modelo utilizado **(Ecuación 8)**. Las diferencias entre las señales observadas y las predichas se denominan residuos. La llamada desviación estándar residual s_y y tiene unidades correspondientes a la señal observada.

$$s_y = \sqrt{\frac{\sum (y_i - \hat{y}_i)^2}{N - 2}} \quad \text{(Ecuación 9)}$$

3.3.1 Evaluación del rango dinámico lineal y la sensibilidad del método cromatográfico. El RDL y la sensibilidad del método se calcularon empleando la curva de calibración. El RDL se determinó evaluando el intervalo de concentraciones en que la respuesta del detector fue lineal para los pesticidas

analizados (1-125 $\mu\text{g L}^{-1}$), con 10 niveles de concentración, el doble recomendado por ICH [42]; y se reportó como el coeficiente de determinación de la curva de calibración. La sensibilidad se reportó como la pendiente de la curva a un nivel de confianza del 95%.

3.3.2 Determinación de los niveles mínimos de detección y de cuantificación.

La NMD es la más pequeña señal analítica discernible que puede ser medida (y_L) y no corresponde a una fluctuación aleatoria de la medida del blanco (y_B), y depende de a cuántas unidades de desviación estándar del blanco (S_B) está la señal. Está definido como se indica en las **Ecuaciones 10 y 11**.

$$y_L = \bar{y}_B + kS_B \quad \text{(Ecuación 10)}$$

La IUPAC define la la concentración límite, X_L , así:

$$X_L = \frac{(Y_L - Y_B)}{m}$$

$$X_L = \frac{K * S_B}{m}$$

$$NMD = \frac{kS_B}{m} \quad \text{(Ecuación 11)}$$

Donde $k= 3$ para un nivel de confianza del 95%, y m es la pendiente obtenida por regresión de la curva de calibración. El método IUPAC utiliza como fuente de variabilidad de las señales, la desviación estándar del blanco. Un método alternativo, aunque menos usado, utiliza la desviación estándar de los residuales de la curva de calibración (**Ecuación 9**) como estimador de la desviación estándar del blanco. Esto es útil si no se ha repetido el blanco y s_B no puede calcularse.

El nivel mínimo de cuantificación (NMC) se definió para un valor de $k=10$ [42].

$$NMC = \frac{kS_B}{m} \quad \text{(Ecuación 12)}$$

3.3.3 Evaluación de la reproducibilidad del método para los tiempos de retención y áreas. La reproducibilidad del método fue evaluada como el CV de la medición de los t_R y de áreas, realizando un quintuplicado para una de las concentraciones de la curva de calibración. Se enriqueció la muestra blanco de leche con una mezcla de pesticidas patrón ($25 \mu\text{g L}^{-1}$), y se utilizaron las condiciones de extracción obtenidas en el diseño experimental.

3.3.4 Evaluación de la eficiencia del método. La eficiencia del método desarrollado se evaluó con base en el porcentaje de recuperación, donde la muestra blanco de leche se enriqueció en dos niveles de concentración, 8 y $30 \mu\text{g L}^{-1}$, realizando cada uno de los experimentos por triplicado.

El porcentaje de recuperación se calculó de acuerdo con la **Ecuación 13**:

$$\text{Recuperación, \%} = \frac{C_x}{C_m} \quad \text{(Ecuación 13)}$$

Donde C_x corresponde a la concentración de pesticida determinada experimentalmente y C_m es la concentración inicial a la cual se enriquece el blanco.

3.4 ANÁLISIS DE MUESTRAS DE LECHE OBTENIDAS DEL MERCADO LOCAL

Se realizó los análisis cualitativo y cuantitativo de cuatro marcas comerciales de leche procesada, obtenidas en el mercado local, y de muestras de leche cruda, procedentes de los municipios de Tona, Lebrija y el Berlín.

3.4.1 Determinación. Se realizó la extracción por HS/SPME-GC/□-ECD, por triplicado, se compararon los t_R con cada uno de los pesticidas de referencia, con los de los picos cromatográficos observados en los cromatogramas obtenidos de

los extractos de las matrices lácteas, analizadas bajo las mismas condiciones cromatográficas.

3.4.2 Cuantificación: Para la cuantificación de cada uno de las pesticidas en las muestras de leche analizadas, se utilizó el factor de respuesta (R_f) establecido del análisis de las soluciones patrón de pesticidas en diferentes concentraciones.

3.5 DETERMINACIÓN DE LAS FIGURAS ANALÍTICAS DE MÉRITO, PARA LA METODOLOGÍA DE EXTRACCIÓN REPORTADA EN AOAC 970.52 (1998)

Siguiendo la metodología de extracción recomendada por la AOAC 970.52 [5], se determinaron los porcentajes de recuperación de cada uno de los pesticidas, al enriquecer un blanco de leche (10 mL) con una concentración de 25 y 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ de la mezcla de pesticidas patrón. Los experimentos se realizaron por triplicado y adicionalmente se realizó un blanco de procedimiento.

Igualmente se presentan la sensibilidad del método, los NMD y los NMC del método.

4. ANÁLISIS DE RESULTADOS

4.1 MÉTODO CROMATOGRÁFICO PARA EL ANÁLISIS DE PESTICIDAS.

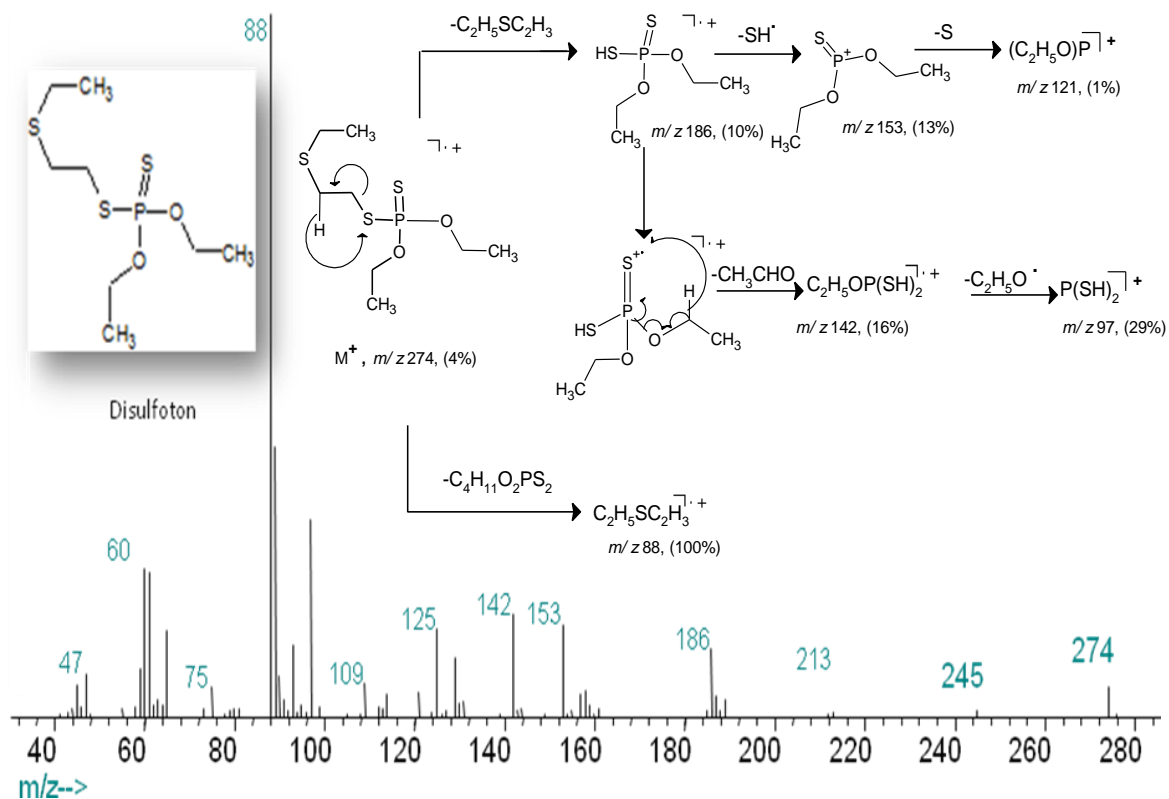
4.1.1 Identificación de los componentes mediante cromatografía de gases de alta resolución acoplada a espectrometría de masas. La identificación de los pesticidas y la determinación de los tiempos de retención cromatográficos, se realizó por comparación de los espectros de masas experimentales, con los de las bases de datos (NIST y WILEY), así como con base en los patrones de fragmentación de cada uno de los compuestos. Los tiempos de retención se correlacionaron con los de sustancias-patrón analizados por GC/ μ -ECD.

4.1.1.1 Esquemas de fragmentación para la familia de pesticidas organotiofosforados. Los pesticidas de tipo organotiofosforado que se identificaron mediante espectrometría de masas, fueron los siguientes: clorpirifos, dimetoato, disulfotón y triazofos. Estos compuestos, en general, presentan un patrón de fragmentación similar al que aparece en la **Figura 8**.

La ruta de fragmentación para el pesticida disulfotón se presenta en la **Figura 8**. En el espectro de masas, obtenido por ionización con electrones (EI, 70 eV), se aprecia la presencia del ion molecular, M^+ , m/z 274 (4%) de baja intensidad, que indica la ausencia en la molécula de elementos estructurales que le permitan estabilizarse. También figuran iones característicos, que confirman su estructura y presencia de grupos funcionales, *i.e.*, el fragmento, catión-radical, en m/z 186 (10%) proveniente de la eliminación de una molécula de $C_2H_5SC_2H_3$ desde el ion molecular, mediante la migración de un átomo de hidrógeno, a través de un estado de transición cuadríclico, a su vez, este fragmento libera HS^{\cdot} dando lugar a un fragmento, en m/z 153 (13%) el cual es característico del grupo funcional ditiofosforado. Posteriormente, una pérdida característica de 32 unidades correspondientes a la salida de un átomo de azufre, genera un fragmento en m/z

121 (1%), lo cual corrobora la presencia de azufre en la estructura molecular. A partir del ion m/z 186 y, por la eliminación de CH_3CHO , se obtiene el fragmento en m/z 142 (16%), acompañado de su ion isotópico en $A+2$. Finalmente, se presenta la formación de un fragmento característico de los pesticidas organotiofosforados en m/z 97 (29%).

Figura 8. Formación de iones-fragmento en el espectro de masas (EI, 70 eV) del pesticida organotiofosforado disulfotón.



4.1.1.2 Esquemas de fragmentación para la familia de pesticidas piretroide.

Los siguientes pesticidas fueron los de tipo piretroide, a saber: bifentrin, ciflutrina y fenpropatrin, que, en general presentaron un patrón de fragmentación similar al señalado en la **Figura 9**.

En la **Figura 9** aparece el espectro de masas del pesticida fenpropatrin, cuyo ion molecular es de masa impar, M^+ , en m/z 349 (2%), que indica la presencia de un átomo de nitrógeno en su estructura y corrobora su fórmula bruta. A partir del ion molecular, y por pérdida de un grupo metilo, se genera el fragmento ($M-CH_3^+$) en m/z 334 (1%), que indica la presencia de metilo en la estructura molecular. Igualmente, a partir del ion molecular, se forma un fragmento, en m/z 125 (39%) de intensidad media, mediante una ruptura α , vía formación de un ion acilo; el cual mediante una descarboxilación (CO) da lugar al ion, pico de base, en m/z 97; estos fragmentos corroboran la presencia de un grupo carbonilo en la estructura molecular de este pesticida tipo piretroide. El fragmento en m/z 225 (2%) se deriva igualmente del ion molecular mediante una ruptura α con respecto al carbonilo y por migración de un átomo de hidrógeno, lo que indica la presencia de un grupo éster en la estructura. Este fragmento elimina un radical OH^{\cdot} y produce un catión en m/z 208 (14%). Finalmente, el fragmento en m/z 141 (16%), se forma mediante una ruptura característica de los ésteres, siendo este fragmento el complementario del catión m/z 208 (14%).

4.1.1.3 Esquemas de fragmentación para los fungicidas de tipo triazol. Los fungicidas de tipo triazol presentan un patrón de fragmentación similar al que aparece en la **Figura 10**.

El espectro de masas del fungicida penconazol (**Figura 10**), no exhibe la señal del ion molecular, en m/z 283; pero aparecen iones característicos, a saber: en m/z 248 (62%) y 213 (10%), correspondientes a pérdidas sucesivas de radicales cloro, típicas de pesticidas clorados, además de sus correspondientes iones isotópicos en $A+2$. Los iones “diagnóstico” para este compuesto se ubican en m/z 201 (3%) el que genera, por eliminación de un radical metilo, seguido de la eliminación de una molécula de etileno, el ion pico de base en m/z 159, que contiene la estructura del ion tropilio, lo cual confirma la presencia de un grupo aromático en su fórmula molecular.

Figura 9. Iones característicos y ruta de fragmentación (EI, 70 eV) del pesticida fenpropatrin.

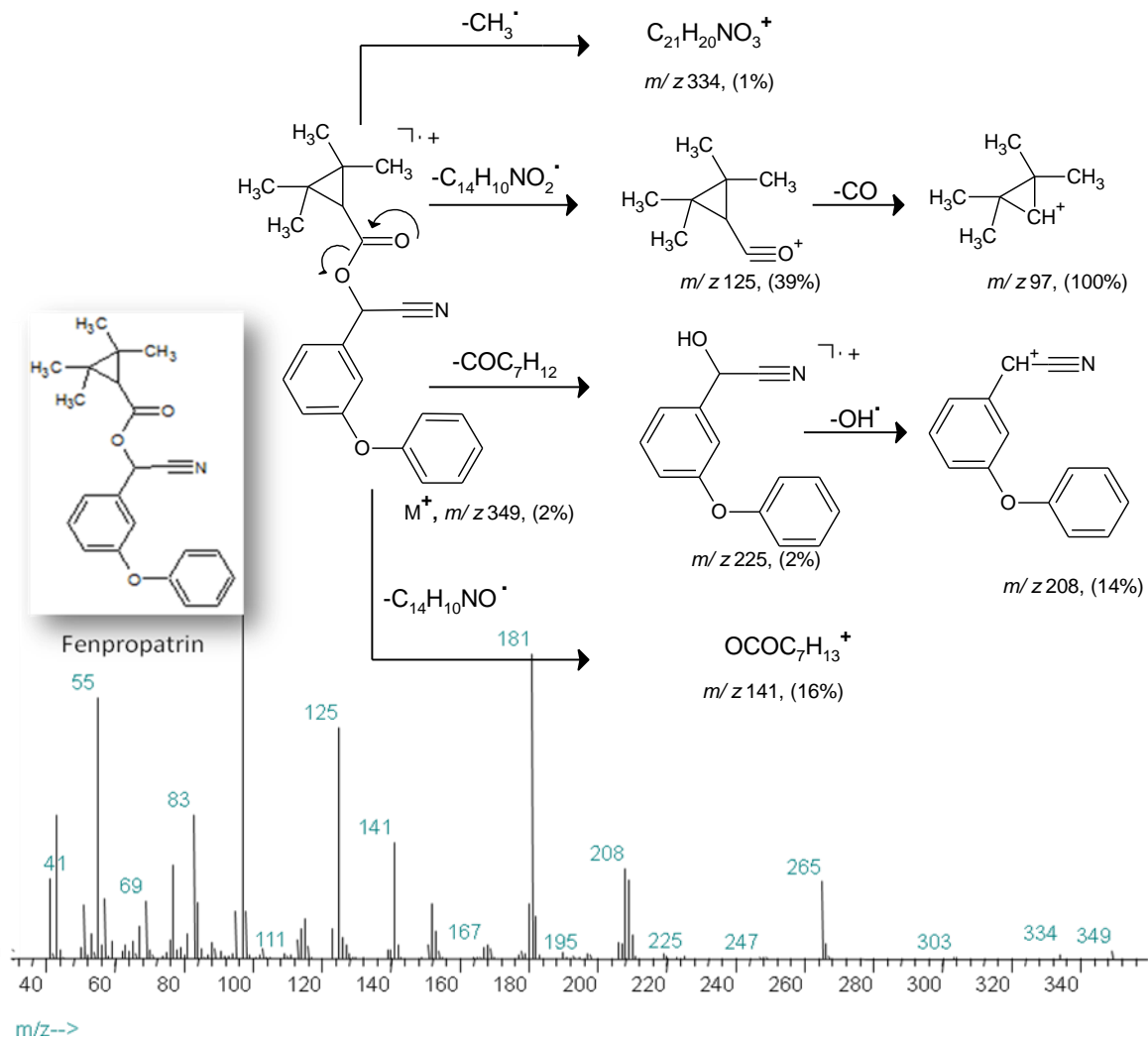
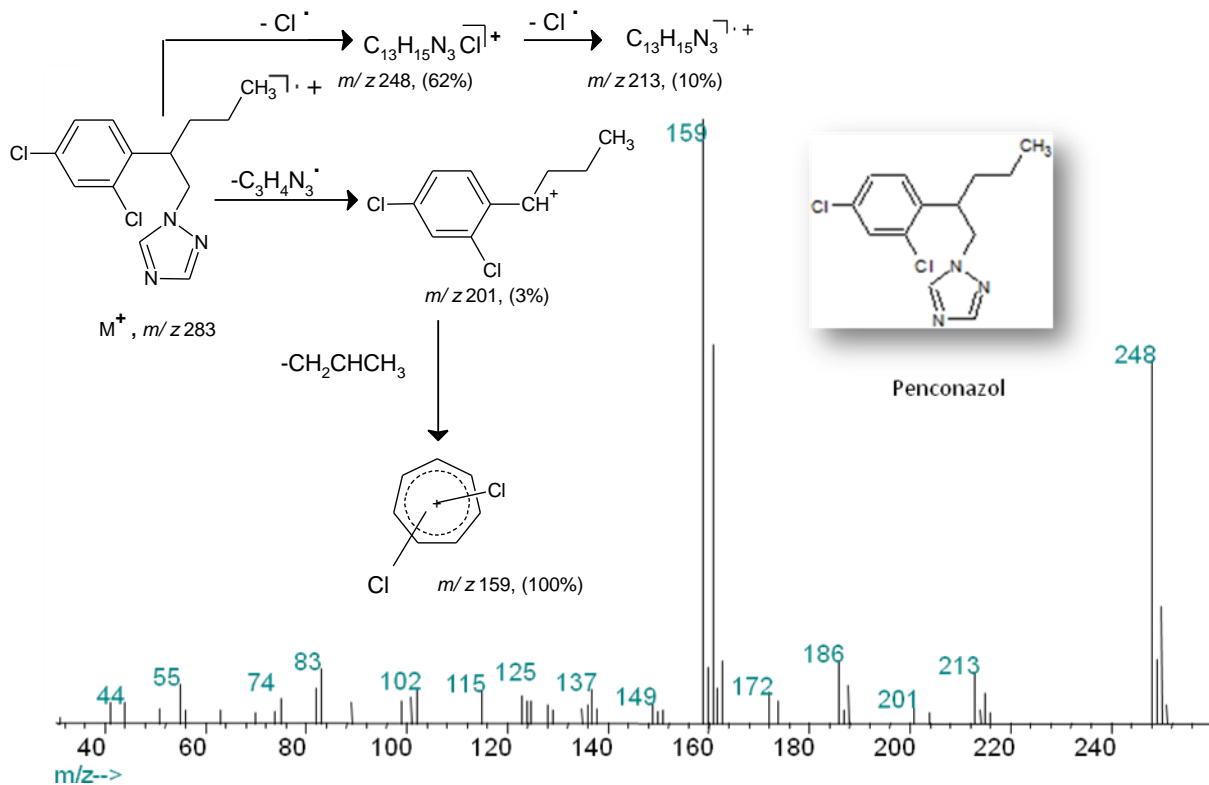


Figura 10. Espectro de masas (EI, 70 eV) del fungicida penconazol.



Una vez analizadas las rutas de fragmentación de cada uno de los pesticidas, se les escogieron sus iones “diagnóstico” los cuales son estructuralmente representativos de la molécula, éstos fueron empleados en la identificación de los estándares (**Tabla 8**), usando el método de monitoreo de iones seleccionados (SIM) que permite aumentar la sensibilidad de la técnica GC/MSD.

Tabla 8. Iones “diagnóstico” en los espectros de masas obtenidos por GC/MSD de los pesticidas analizados.

Pesticida	Ion molecular M^+ , m/z	Ion pico de base, m/z	Iones “diagnóstico”, m/z			
Clorprofam	213	43	171	154	127	43
Dimetoato	229	87	157	125	104	87
Disulfoton	274	88	186	153	142	88
Vinclozolin	285	212	241	212	198	
Clorpirifos	349	182	314	286	258	197
Penconazol	283	159	248	213	201	159
Fipronil	452	213	255	213	179	143
Miclobutanilo	288	179	245	179	150	137
Tebuconazol	307	125	250	207	139	125
Bifentrin	422	181	181	166		
Fenpropatrin	349	97	334	265	208	97
Fenbuconazol	336	129	129	198	211	
Ciflutrina	433	163	206	199	163	127

4.1.2 Cromatografía de gases de alta resolución con detector de *micro*-captura de electrones. La estandarización del método cromatográfico se llevó a cabo bajo los parámetros descritos en la **Tabla 3** de la Parte Experimental.

4.1.2.1 Determinación de los tiempos de retención de cada uno de los pesticidas. Una vez establecidas las condiciones cromatográficas, se procedió a determinar los tiempos de retención de cada uno de los compuestos. En la **Tabla 9** aparece, en orden de elución, el número de compuestos que fue posible separar, sus tiempos de retención, áreas cromatográficas medidas en cuentas, y la evaluación de la reproducibilidad del método cromatográfico expresada mediante el CV.

Tabla 9. Tiempos de retención de los pesticidas analizados, obtenidos por GC/ μ -ECD, en una columna DB-5 (30 m x 0,25mm (di) x 0,25 μ m), y evaluación de su reproducibilidad.

Pesticida	t_R , min			t_R , min (promedio)	s	CV, (%)
	1	2	3			
Clorprofam	18,78	18,76	18,87	18,80	0,06	0,33
Dimetoato	20,83	20,61	20,87	20,77	0,14	0,69
Disulfotón	22,76	22,75	22,79	22,77	0,02	0,08
Vinclozolin	24,88	24,86	24,87	24,87	0,01	0,04
Clorpirifos	27,20	27,19	27,20	27,19	0,01	0,03
Penconazol	28,76	28,74	28,76	28,75	0,01	0,03
Fipronil	29,61	29,58	29,61	29,60	0,02	0,06
Miclobutanilo	33,03	33,00	33,02	33,02	0,02	0,06
Tebuconazol	40,19	40,15	40,47	40,27	0,17	0,42
Bifentrin	42,51	42,50	42,50	42,50	0,01	0,01
Fenpropatrin	42,66	42,65	42,66	42,66	0,01	0,02
Fenbuconazol	46,04	46,02	45,99	46,02	0,02	0,05
Ciflutrina isómero	46,16	46,14	46,15	46,15	0,01	0,01
Ciflutrina isómero	46,29	46,28	46,30	46,29	0,01	0,02
Ciflutrina isómero	46,39	46,38	46,43	46,40	0,03	0,06
Ciflutrina isómero	46,45	46,44	46,50	46,46	0,03	0,07

Figura 11. Cromatograma de la mezcla de pesticidas analizados [GC/ECD Columna DB-5 (30 m x 0,25mm (di) x 0,25 μ m)].

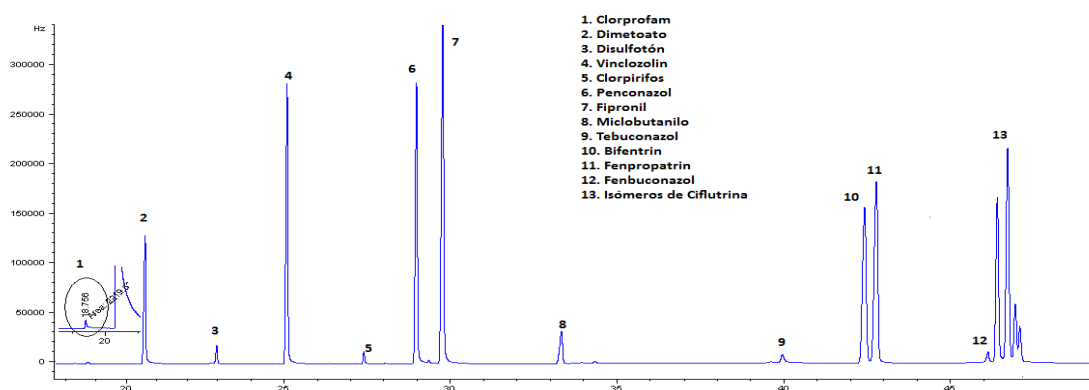


Tabla 10. Áreas cromatográficas de los pesticidas analizados [GC/ECD Columna DB-5 (30 m x 0,25mm (di) x 0,25 μ m)], y evaluación de su reproducibilidad.

Pesticida	Área, cuentas			Área promedio, cuentas	s	CV, (%)
	1	2	3			
Clorprofam	2,59E+03	2,61E+03	2,49E+03	2,56E+03	6,43E+01	2,51
Dimetoato	3,32E+05	3,42E+05	3,22E+05	3,32E+05	1,00E+04	3,01
Disulfotón	2,22E+04	2,42E+04	2,38E+04	2,34E+04	1,06E+03	4,52
Vinclozolin	1,89E+05	1,69E+05	1,75E+05	1,78E+05	1,03E+04	5,78
Clorpirifos	2,56E+04	2,46E+04	2,43E+04	2,49E+04	6,81E+02	2,74
Penconazol	2,51E+05	2,54E+05	2,42E+05	2,49E+05	6,24E+03	2,51
Fipronil	2,79E+05	2,89E+05	2,64E+05	2,77E+05	1,26E+04	4,54
Miclobutanilo	2,61E+05	2,66E+05	2,52E+05	2,60E+05	7,09E+03	2,73
Tebuconazol	4,32E+03	4,36E+03	4,21E+03	4,30E+03	7,77E+01	1,81
Bifentrin	4,25E+04	4,45E+04	4,13E+04	4,28E+04	1,62E+03	3,78
Fenpropatrin	3,60E+04	3,70E+04	3,37E+04	3,55E+04	1,69E+03	4,76
Fenbuconazol	2,26E+04	2,36E+04	2,13E+04	2,25E+04	1,15E+03	5,12
Ciflutrina isómero	5,12E+05	5,25E+05	5,01E+05	5,13E+05	1,20E+04	2,34
Ciflutrina isómero	6,80E+05	6,90E+05	6,71E+05	6,80E+05	9,50E+03	1,40
Ciflutrina isómero	2,08E+05	2,18E+05	2,03E+05	2,09E+05	7,64E+03	3,65
Ciflutrina isómero	8,74E+04	8,44E+04	8,64E+04	8,61E+04	1,53E+03	1,78

4.3.1 En las **Tablas 9 y 10** se observa que la medición de áreas y t_R no presenta desviaciones significativas, ya que sus coeficientes de variación (CV) figuran dentro de lo recomendado por las Buenas Prácticas del Laboratorio (GLP).

4.2 DETERMINACIÓN DE LAS MEJORES CONDICIONES DE EXTRACCIÓN SIMULTÁNEA DE LOS PESTICIDAS.

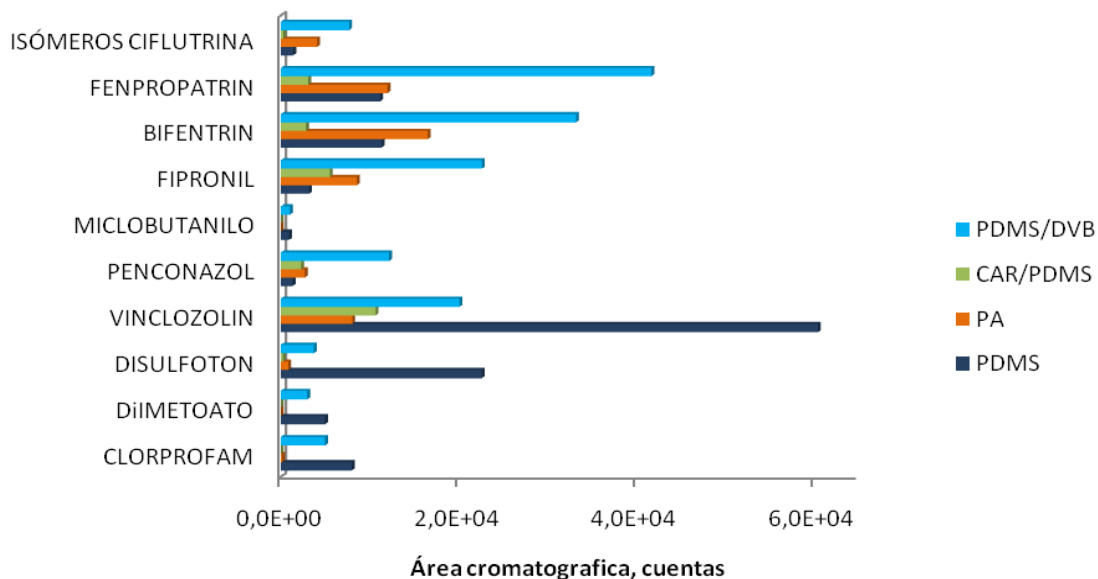
4.2.1 Condiciones de extracción de pesticidas por HS/SPME. El procedimiento para elegir las mejores condiciones para la extracción simultánea de los pesticidas de muestras de leche se describió en el **Numeral 3.2.**

4.2.1.1 Selección del tipo de recubrimiento. La eficiencia de las fibras extractoras sobre el grupo de pesticidas evaluados se muestra en la **Figura 12**; el clorpirifos se omitió en esta gráfica, ya que exhibe una elevada recuperación con las 4 fibras; asimismo, los picos cromatográficos de isómeros del pesticida de tipo piretroide ciflutrina se cuantificaron como la suma de sus áreas.

Al analizar los resultados, se observó que las fibras de CAR/PDMS y PA no exhibieron una buena eficiencia de extracción para los compuestos analizados, de manera que fueron excluidas del análisis experimental posterior. Estos resultados se deben a que, este tipo de fibras están recomendadas principalmente para el análisis de compuestos polares; sin embargo, se incluyeron en el estudio, ya que diversos autores las han reportado como eficientes para la extracción de algunos ésteres como es el caso de los pesticidas de tipo piretroide y además, son ampliamente usados para compuestos de baja polaridad, por ejemplo los poliaromáticos [27]. Continuando con el análisis preliminar, se destaca la afinidad de los pesticidas organotiofosforados por la fibra de PDMS (clorprofam, dimetoato, disulfoton y vinclozolin). Sin embargo, las respuestas obtenidas para los pesticidas de tipo piretroide y triazoles al utilizar PDMS fueron significativamente más bajas con respecto a los obtenidos al extraer con PDMS/DVB; incluso esta fibra también resultó adecuada para la extracción de los primeros.

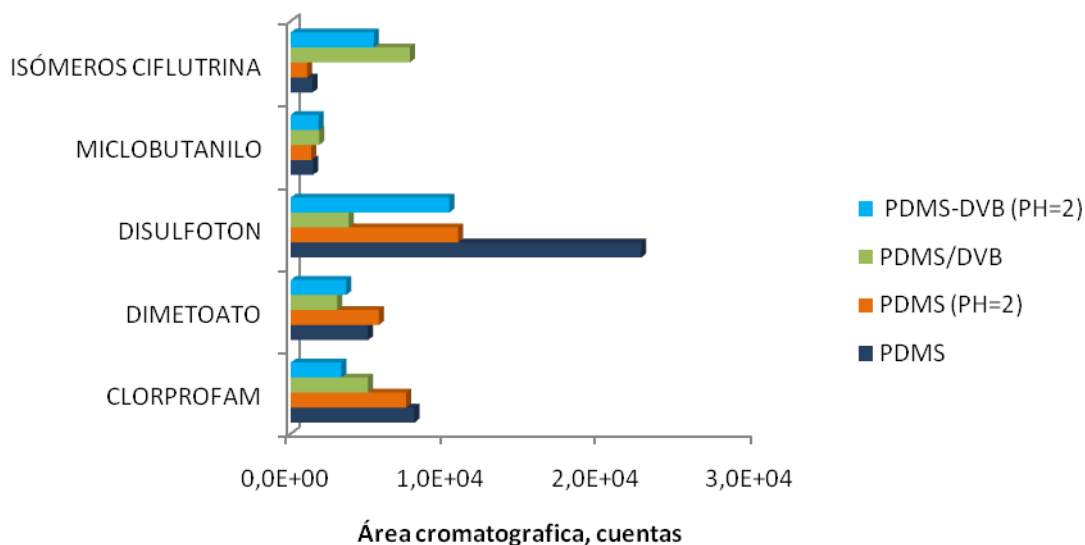
La fibra de PDMS/DVB fue escogida para continuar con los experimentos, ya que presenta de forma general una extracción eficiente para el grupo de pesticidas analizados, especialmente, aquellos menos volátiles, brindando la posibilidad de incrementar la respuesta de estos compuestos, los cuales en general tienen una relación señal/ ruido baja comparada con los demás compuestos.

Figura 12. Efecto de la naturaleza de los recubrimientos, sobre la extracción de los pesticidas por HS/SPME.



4.2.1.2 Evaluación del efecto del pH sobre la eficiencia de la extracción, de los pesticidas con una baja recuperación. Debido a que el pH juega un papel importante en el procedimiento de extracción por SPME, los pesticidas con baja recuperación, e.g., el clorprofam, dimetoato, miclobutanilo y ciflutrina se sometieron a un cambio en pH de extracción a un valor de 2. Pero como se observa en la **Figura 13**, esta variable no afectó la eficiencia de la recuperación de este tipo de analitos, razón por la cual, los experimentos adicionales se llevaron a cabo al pH de la muestra.

Figura 13. Efecto del pH, sobre la eficiencia de extracción por HS/SPME, de los pesticidas bajo análisis.



4.2.1 Diseño experimental. El tratamiento de los datos del diseño experimental, consiste en determinar cuáles efectos son significativos; esto requiere comparar el tamaño de cada efecto con la variación causada por el error experimental, el cual se midió con el quintuplicado del punto central.

Tabla 11. Medida del error experimental de los pesticidas analizados, para la evaluación del diseño factorial 2^3 .

Pesticida	Punto medio del diseño experimenta					Área promedio, cuentas	CV, %
	Área, cuentas						
	1	2	3	4	5		
Clorprofam	3,23E+03	3,31E+03	3,51E+03	3,21E+03	3,51E+03	3,35E+03	4,43
Dimetoato	5,87E+03	5,48E+03	5,78E+03	5,48E+03	5,98E+03	5,72E+03	4,01
Disulfotón	3,26E+05	2,93E+05	3,18E+05	3,13E+05	3,11E+05	3,12E+05	3,90
Vinclozolin	5,34E+05	4,91E+05	4,20E+05	4,91E+05	5,21E+05	4,92E+05	8,95
Clorpirifos	1,01E+05	1,16E+05	1,02E+05	1,06E+05	1,06E+05	1,06E+05	5,44
Penconazol	9,34E+04	9,36E+04	9,64E+04	9,86E+04	9,35E+04	9,51E+04	2,45
Fipronil	6,13E+03	6,48E+03	6,11E+03	6,28E+03	6,16E+03	6,23E+03	2,47
Miclobutanilo	6,56E+03	6,76E+03	6,01E+03	6,36E+03	6,56E+03	6,45E+03	4,40
Bifentrin	2,57E+03	2,50E+03	3,28E+03	2,30E+03	2,53E+03	2,64E+03	14,30
Fenpropatrin	3,15E+03	3,35E+03	3,10E+03	3,35E+03	3,25E+03	3,24E+03	3,56
Ciflutrina	2,17E+03	2,22E+03	2,97E+03	2,12E+03	2,35E+03	2,36E+03	14,70

Dicho tratamiento se aprecia en la **Tabla 11**, donde el CV es el parámetro estadístico utilizado. Se encontraron valores entre 2-14%.

4.2.1.1 Análisis de la varianza. El análisis de los resultados del diseño experimental usó la metodología de ANOVA con ayuda del *software* estadístico *Statgraphics Centurion XVI*, usando la licencia de prueba de 30 días. Con este diseño se pueden estudiar 7 efectos, a saber: tres principales y tres interacciones dobles y una interacción triple para cada uno de los pesticidas, lo cual resulta en la tarea de analizar 11 diseños experimentales.

El análisis de varianza ANOVA, para la variable de respuesta, medida en área cromatográfica (cuentas) se encuentra en el **Anexo B**, allí se resume el análisis estadístico realizado para diseño experimental. Para cada factor se muestran dos términos: la *Razón-F* que mide la contribución de cada factor en la variación de la respuesta y *el Valor-P*, el cual es una medida de la significancia estadística de cada uno de estos valores, de manera que para este estudio los factores considerados como significantes en el proceso de extracción, son aquellos que presentan un valor $p < 0,05$ que es el Valor de Probabilidad o nivel de confianza del 95%.

Un primer vistazo a la tabla ANOVA, muestra que varios factores son significantes para la extracción de algunos de los pesticidas, los cuales se resaltan en el **Anexo B**, tales como la temperatura (A) para vinclozolin, clorpirifos, penconazol, miclobutanilo, y los pesticidas de tipo piretroide; el tiempo de extracción (B) es, en general, significativo para todo el grupo de pesticidas analizados y *salting out* (C), únicamente para clorpirifos, miclobutanilo y vinclozolin; y algunas interacciones de segundo orden, lo cual se describe minuciosamente a continuación.

- Primero, se estimaron los efectos potencialmente importantes para cada pesticida. En la **Figura 14** se encuentran los gráficos de Pareto estandarizados

para algunos de los compuestos analizados. Estos resultados fueron comparables con los obtenidos mediante la gráfica de Daniel lo cual es señal que estos efectos de los factores son reales para el proceso de extracción.

- Luego, se analizaron los efectos principales que resultaron significativos, es decir, el cambio observado en la variable de respuesta debido a un cambio en el nivel de cada factor. De los resultados se infiere que el factor tiempo de extracción es estadísticamente significativo (a un 95% de confianza) para todos los pesticidas bajo análisis. El efecto de la temperatura de extracción no es estadísticamente significativo para algunos pesticidas organotiofosforados, ni para el fipronil, pero sí tiene gran efecto para los pesticidas de menor presión de vapor, e.g., bifentrin, ciflutrina, fenpropatrin y vinclozolin.

- Al evaluar los efectos de interacción, es decir, cuando la respuesta de un factor depende fundamentalmente del nivel de otro factor. Esta interacción puede ser interpretada gráficamente (**Figura 15**), e.g., en el caso del clorpirifos se encontró que las mejores condiciones de extracción fueron una temperatura de 90°C, y un *salting out* de 30%. Además, se observó una interacción de segundo orden AB, tal como se muestra en los gráficos de interacción (**Figura 15**), indicando que el método de extracción resultó mucho más efectivo si se extrae durante 60 min pero a 90 °C.

Figura 14. Diagramas de Pareto de efectos para algunos pesticidas organotiofosforados y piretroides.

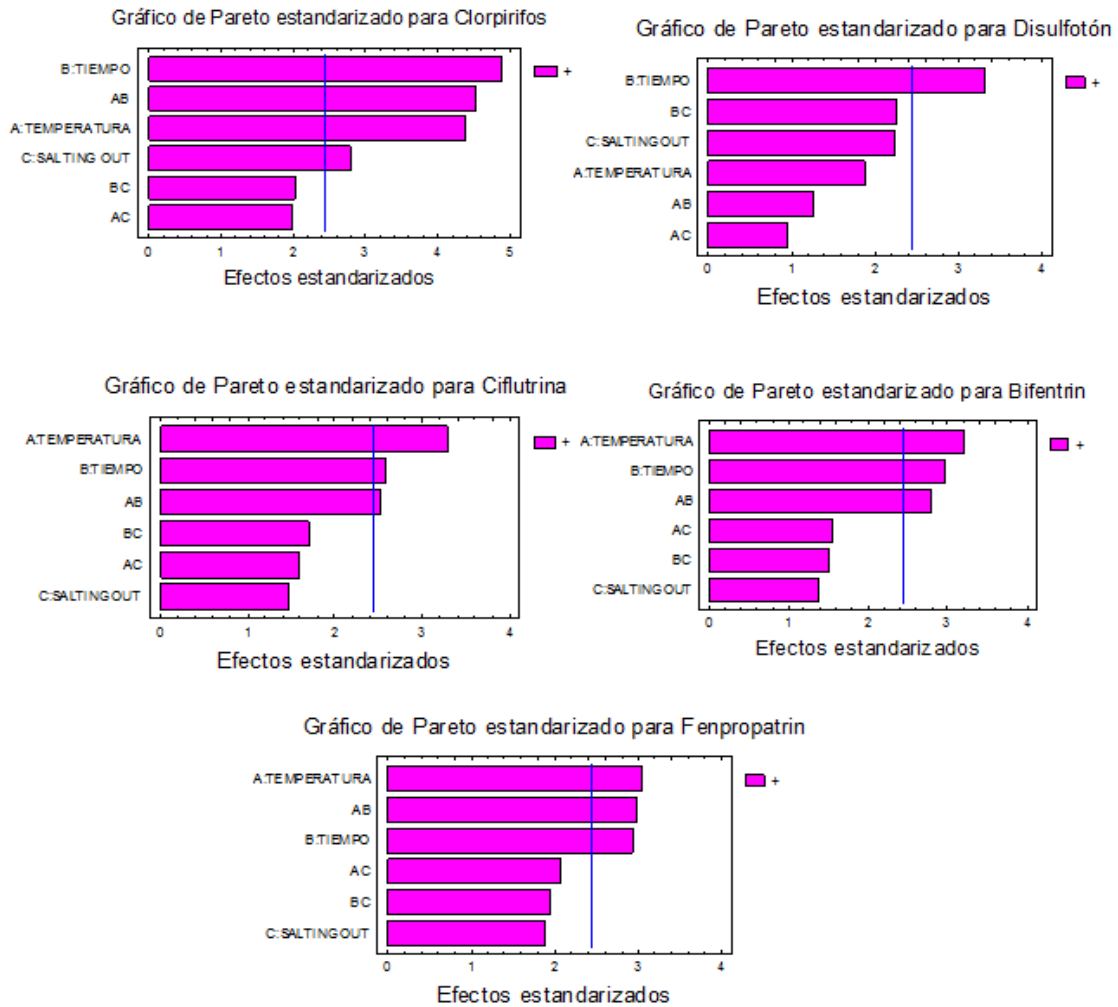
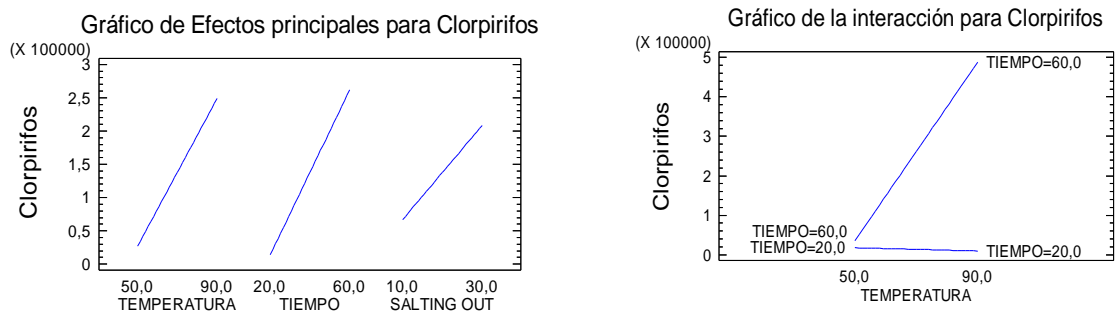
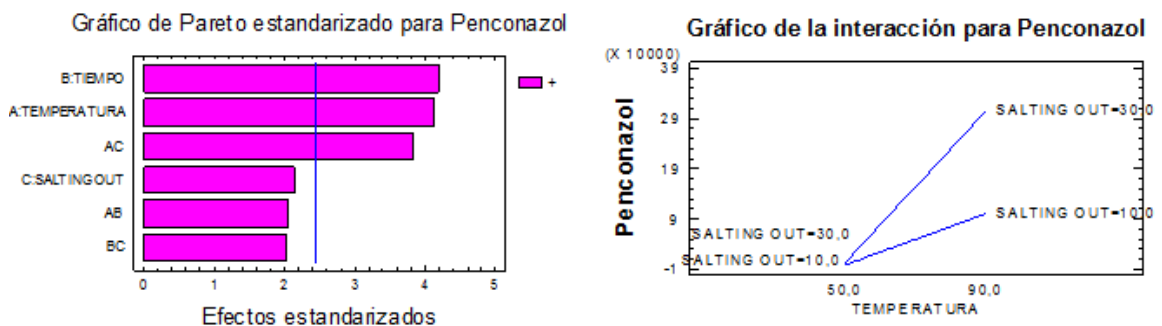


Figura 15. Efectos principales y de interacción de cada uno de los factores, en el proceso de extracción de clorpirifos.



- De forma general, al evaluar la respuesta generada en el diseño experimental para pesticidas de tipo triazol como el penconazol, se aprecia, que la adición de electrolitos (NaCl), no es un factor influyente en el proceso de extracción (**Figura 16**), sin embargo, la evaluación de los efectos de interacción entre las variables para este pesticida, proporciona una información adicional, ya que aunque el *salting out* no es una variable significativa, al trabajar a una temperatura de extracción de 60°C, se obtienen mejores resultados cuando se adiciona NaCl (30%).

Figura 16. Resultados del diseño experimental, para el proceso de extracción de penconazol.



Al unificar estas condiciones, según las gráficas de interacciones y las de los efectos principales, se pueden determinar las mejores condiciones para extracción simultánea de multiclases de pesticidas desde una matriz de leche.

4.2.1.2 Mejores condiciones de extracción. Cuando se realiza un diseño experimental para la extracción y análisis simultáneo de varios pesticidas, generalmente, no se logra trabajar en el punto óptimo de cada uno de los compuestos (**Tabla 12**).

Tabla 12. Condiciones más favorables para la extracción de cada uno de los pesticidas.

Pesticida	Temperatura, °C	Tiempo, min	Salting out, % p/v
Clorprofam	50	60	30
Dimetoato	50	60	30
Disulfotón	90	60	30
Vinclozolin	90	60	30
Clorpirifos	90	60	30
Penconazol	90	60	30
Fipronil	90	60	30
Miclobutanilo	90	60	30
Bifentrin	90	60	30
Fenpropatrin	90	60	30
Ciflutrina	90	60	30

Sin embargo, sí se puede trabajar bajo condiciones que permitan extraer la mayoría de los compuestos, y para este grupo de pesticidas las condiciones de extracción que aumentan la eficiencia de la extracción se indican en la **Tabla 13**.

Tabla 13. Condiciones más favorables para la extracción del grupo de pesticidas analizadas en la leche.

Variable	Especificaciones
Temperatura, °C	90
Tiempo, min	60
Salting out	30%

De manera, que los posteriores procedimientos de extracción fueron realizados de la siguiente forma: la extracción se llevó a cabo en el modo *headspace* utilizando una fibra de PDMS/DVB de 65 µm; en un vial ámbar para SPME de 4 mL, se tomaron 2 mL de la muestra a extraer, (para este volumen de muestra) previamente se pesaron 0,6 g de NaCl, se sumergió el vial en un baño de calentamiento previamente equilibrado a una temperatura de 90°C y constante

agitación, se mantuvo este sistema durante 10 min. Al pasar este tiempo la fibra de PDMS/DVB se expuso en el espacio de cabeza durante 60 min. Luego, la fibra se retrajo y se retiró del vial, para llevarla al puerto de inyección en el GC/ECD.

4.3 DETERMINACIÓN DE LAS FIGURAS ANALÍTICAS DE MÉRITO

El procedimiento para la determinación de las figuras analíticas de mérito del método se describió en el **Numeral 3.3**.

4.3.1 Evaluación del rango dinámico lineal y la sensibilidad del método cromatográfico. El RDL y la sensibilidad se determinaron con base en los datos obtenidos de la curva de calibración para cada una de los pesticidas analizados.

En la **Tabla 14** se muestra, para cada pesticida, la pendiente de la curva (factor de respuesta, R_f), que mide la sensibilidad del método y su desviación (S_{Rf}). El coeficiente de determinación R^2 mide el ajuste de la curva para el intervalo de concentraciones evaluado ($1 - 125 \mu\text{g L}^{-1}$).

Tabla 14. Linealidad y sensibilidad del método HS/SPME-GC/ μ -ECD.

Pesticidas	R_f	$t \cdot S_{Rf}$	b	S_b	R^2
Bifentrin	190	12	1334	239	0,999
Ciflutrina	109,0	3,2	772	62	0,999
Clorprofam	113,2	7,2	703	96	0,998
Dimetoato	115,4	6,8	-53	13	0,995
Disulfotón	1210	35	1833	85	0,999
Clorpirifos	2190	48	28307	117	0,999
Fenpropatrin	112,0	3,7	1830	89	0,999
Fipronil	277,3	3,2	1206	60	0,999
Miclobutanilo	155,8	8,6	-214	13	0,999
Penconazol	652,75	15	2900	366	0,999
Vinclozolin	5519,41	60	2700	129	0,999

R_f : Pendiente S_{Rf} : Desviación estándar de la pendiente b : Ordenada en el origen S_b : Desviación estándar de la ordenada t : 2,31 para un 95% de confianza. (curva de calibración $y = R_f + b$)

En el intervalo de concentraciones evaluado se observó una buena linealidad para todo el grupo de pesticidas ($R^2= 0,995-0,999$). Por tanto, el RDL del método implementado fue de 1–125 $\mu\text{g L}^{-1}$. La sensibilidad del método se determinó como la pendiente de la curva de calibración (R_f); se encontró que el método es muy sensible para los pesticidas clorpirifos, disulfotón, penconazol, vinclozolin; y, en general, con una sensibilidad aceptable para todos, además, el valor de la desviación estándar otorga confiabilidad en los resultados.

4.3.2 Determinación de los niveles mínimos de detección y cuantificación.

Para la determinación del NMD y NMC del método analítico SPME-GC se siguieron los criterios descritos en el **Numeral 3.3.2**. En la **Tabla 15**, se observan los NMD y NMC para cada una de los pesticidas estudiados.

Los NMC alcanzados para el método implementado fueron entre 0,6-12,8 $\mu\text{g kg}^{-1}$, por debajo del LMR establecido por la Resolución 2906, de los Ministerios de Agricultura, Desarrollo rural y de Protección Social que rige en Colombia para alimentos como la leche.

Tabla 15. Niveles mínimos de detección y cuantificación HS/SPME-GC/ μ -ECD.

Pesticidas	NMD, $\mu\text{g kg}^{-1}$	NMC, $\mu\text{g kg}^{-1}$
Bifentrin	3,8	12,8
Ciflutrina	1,7	5,7
Clorprofam	2,6	8,6
Dimetoato	3,4	11,4
Disulfotón	2,1	7,1
Clorpirifos	1,6	5,4
Fenpropatrin	2,4	7,9
Fipronil	0,7	2,2
Miclobutanilo	2,6	8,6
Penconazol	1,7	5,6
Vinclozolin	0,8	2,3

4.3.3 Evaluación de la repetibilidad del método para las áreas cromatográficas. En la **Tabla 16**, se presentan los coeficientes de variación CV de las áreas cromatográficas para un punto de la curva de calibración, lo cual muestra que el método implementado presentó CV que no superaron el 5% para la medición de área, de manera que cumple lo recomendado por las GLP.

Tabla 16. Repetibilidad de áreas de picos cromatográficos de los pesticidas analizadas por HS/SPME-GC/ μ -ECD.

Sustancia	Área, cuentas					Área Promedio, cuentas	CV, %
	1	2	3	4	5		
Clorprofam	3,67E+03	3,68E+03	3,70E+03	3,67E+03	3,59E+03	3,66E+03	1,18
Dimetoato	2,74E+03	2,68E+03	2,85E+03	2,74E+03	2,71E+03	2,75E+03	2,34
Disulfoton	3,17E+04	3,16E+04	3,15E+04	3,15E+04	3,09E+04	3,15E+04	0,96
Vinclozolin	1,43E+05	1,44E+05	1,44E+05	1,43E+05	1,39E+05	1,43E+05	1,38
Clorpirifos	7,74E+04	7,72E+04	7,75E+04	7,72E+04	7,74E+04	7,73E+04	0,17
Penconazol	1,29E+04	1,24E+04	1,29E+04	1,24E+04	1,20E+04	1,25E+04	3,11
Fipronil	8,10E+03	9,23E+03	8,42E+03	8,55E+03	8,65E+03	8,59E+03	4,81
Miclobutanilo	3,46E+03	3,62E+03	3,63E+03	3,67E+03	3,57E+03	3,59E+03	2,33
Bifentrin	5,89E+03	5,92E+03	5,83E+03	5,89E+03	5,80E+03	5,87E+03	0,86
Fenpropatrin	3,87E+03	3,80E+03	3,84E+03	3,70E+03	3,50E+03	3,74E+03	3,94
Ciflutrina	3,55E+03	3,46E+03	3,45E+03	3,42E+03	3,46E+03	3,47E+03	1,36

Estos valores confirman la precisión analítica del método implementado (HS/SPME-GC/ μ -ECD) bajo las condiciones halladas mediante el diseño experimental.

4.3.4 Evaluación de la eficiencia del método. Los resultados obtenidos de la eficiencia del método desarrollado, medido como el porcentaje de recuperación de analitos en muestras de leche enriquecidas, aparecen en la **Tabla17**.

Tabla 17. Porcentajes de recuperación de pesticidas, evaluados en matriz de leche enriquecidas.

Pesticidas	Recuperación a 8 $\mu\text{g L}^{-1}$, %	Recuperación a 30 $\mu\text{g L}^{-1}$, %
Bifentrin	84,3	88,5
Ciflutrina	82,7	87,7
Clorpirifos	81,1	89,9
Clorprofam	86,1	99,8
Dimetoato	101,0	100,0
Disulfoton	96,9	98,9
Fenpropatrin	76,4	83,9
Fipronil	81,2	99,5
Miclobutanilo	94,1	95,1
Penconazol	76,6	72,8
Vinclozolin	81,2	84,4

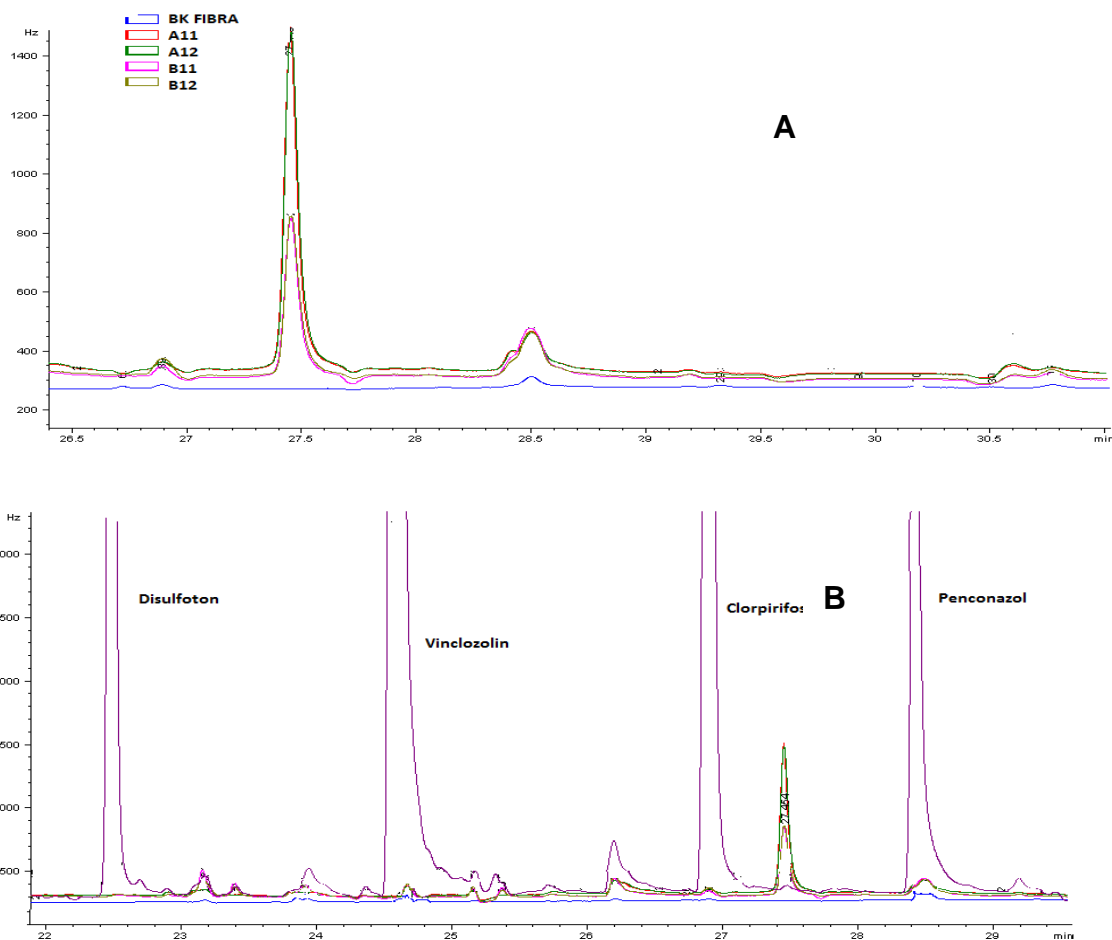
El método resulta eficiente para la extracción de todos los pesticidas analizados, ya que no se encontraron valores inferiores al 70%; ello está de acuerdo con lo establecido por las GLP.

4.4 ANÁLISIS DE MUESTRAS DE LECHE REALES ADQUIRIDAS EN EL MERCADO LOCAL

4.4.1 Leche entera pasteurizada. Una vez estandarizado el método HS/SPME-GC/ECD, se realizó su análisis cualitativo y cuantitativo. Se usaron cuatro marcas comerciales de leche procesada vendidas en el mercado local las cuales se denominaron: A₁, A₂, A₃ y A₄. En la **Figura 17** se presentan los cromatogramas obtenidos, que muestran que no se presentan señales correspondientes a los t_R de los pesticidas evaluados, de manera que no se encontraron residuos de

pesticidas, por encima de los NMD del método, en ninguna de las leches evaluadas.

Figura 17. Ampliación de los perfiles cromatográficos obtenidos mediante HS/SPME-GC/ μ -ECD. **(A)** Leches comerciales A₁ y A₂ con su respectivo duplicado, **(B)** Comparación con el perfil obtenido en un blanco enriquecido a 25 ng L⁻¹



4.4.2 Leche cruda. Los perfiles cromatográficos obtenidos al analizar muestras de leche cruda de los municipios de Tona, Lebríja y Berlín, no presentan señales correspondientes a los t_R de los pesticidas evaluados, de manera que no se encontraron residuos de pesticidas en las muestra de leche analizadas, por encima de los NMD del método.

4.5 DETERMINACIÓN DE LAS FIGURAS ANALÍTICAS DE MÉRITO, PARA LA METODOLOGÍA DE EXTRACCIÓN REPORTADA EN AOAC 970.52 de 1998.

Para éstas determinaciones, se siguió la metodología de extracción recomendada por la AOAC 970.52, pero todas las cantidades usadas fueron llevadas a la centésima parte.

Para determinar los porcentajes de recuperación, la leche (10 mL) se enriqueció con mezcla de pesticidas, en concentraciones de 25 y 100 $\mu\text{g L}^{-1}$, se realizó por triplicado el procedimiento de extracción líquido-líquido por lotes, para la extracción de la grasa, posteriormente se llevó a cabo el proceso de partición con acetonitrilo, se concentró, y se obtuvo un extracto final que fue inyectado al GC/ μ -ECD bajo los parámetros cromatográficos descritos en la **Tabla 3**. Adicionalmente, se inyectó una solución de la mezcla de pesticidas de igual concentración, de manera que por comparación de sus áreas cromatográficas fue posible hallar el porcentaje de recuperación del método.

Tabla 18. Porcentaje de recuperación, con la técnica LLE, para dos diferentes niveles de concentración.

Pesticidas	Recuperación a 25 $\mu\text{g L}^{-1}$, %	Recuperación a 100 $\mu\text{g L}^{-1}$, %
Bifentrin	81,2	82,8
Clorpirifos	98,4	98,8
Clorprofam	65,0	72,6
Dimetoato	89,0	93,4
Disulfoton	79,9	87,4
Fenpropatrin	81,7	83,9
Fipronil	78,6	79,6
Miclobutanilo	77,4	77,8
Penconazol	51,0	54,3
Tebuconazol	84,9	85,0
Vinclozolin	57,0	60,1

El procedimiento de extracción realizado arrojó porcentajes de recuperación por debajo del 70% para los pesticidas penconazol y vinclozolin, los demás pesticidas presentaron una buena recuperación.

Igualmente se exponen los NMD y NMC (**Tabla 19**) obtenidos al inyectar en forma condensada, el material de referencia certificado de cada uno de los pesticidas en un intervalo de concentraciones de 1-200 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Tabla 19. Linealidad y sensibilidad del método GC- μ ECD, por inyección directa.

Pesticidas	Rf	R ²	NMD	NMC
Bifentrin	143,8	0,998	1,73	5,77
Ciflutrina	326,0	0,999	0,91	3,03
Clorprofam	56,5	0,998	6,02	20,06
Dimetoato	76,9	0,997	0,91	3,03
Disulfotón	212,5	0,999	0,95	3,18
Clorpirifos	458,2	0,999	0,92	3,05
Fenpropatrin	157,6	0,999	0,31	1,04
Fipronil	297,5	0,998	7,62	25,4
Miclobutanilo	366,2	0,998	1,6	5,33
Penconazol	117,4	0,996	0,70	2,45
Vinclozolin	102,2	0,999	1,96	6,53

R_f: Pendiente S_{Rf}: Desviación estándar de la pendiente t: 2,31 para un 95% de confianza.

4.6 COMPARACIÓN DEL MÉTODO DESARROLLADO EN ESTE TRABAJO CON EL REPORTADO POR LAS NORMAS AOAC.

En las **Tablas 20 y 21** se resumen las figuras analíticas de mérito para cada uno de los métodos y los valores obtenidos.

Tabla 20. Figuras analíticas de mérito para los métodos reportado en AOAC 970.52 y el desarrollado en el presente trabajo para la extracción por HS/SPME-GC/ECD de pesticidas en leche.

Método	% Recuperación	NMD	NMC
Método AOAC 970.52	54,3-93,4	0,3-7,6	1,0-25,4
Método HS/SPME-GC/ECD	72,8-100,0	0,1-3,8	2,2-12,8

Tabla 21. Comparación de los métodos reportado en AOAC 970.52 y el desarrollado en el presente trabajo para la extracción por HS/SPME-GC/ECD de pesticidas en leche.

Parámetro evaluado	Método AOAC 970.52	Método HS/SPME-GC/ECD
Volumen de muestra	10 mL	2 mL
Tratamiento preliminar	No requiere	No requiere
Tiempo de análisis	3 horas, además requiere un proceso largo de concentración posterior en equipo Kuderna-Danish.	60 min
Volumen de solvente	50 mL de éter etílico 80 mL de éter de petróleo 10mL de metanol 50 mL de acetonitrilo	No requiere uso de solventes
Contaminación Ambiental	Genera residuos de solventes, y sólidos como el florisil	No genera residuos

De acuerdo con el estudio de la reproducibilidad de los dos métodos de extracción, se puede afirmar, que tanto la LLE por lotes del método AOAC, como la SPME, son técnicas confiables para el análisis cualitativo del grupo de pesticidas analizados. Sin embargo, al comparar la eficiencia de las dos técnicas, se puede concluir que la técnica SPME implementada en este trabajo presenta valores de recuperación más altos. Además, la técnica de extracción referenciada

en la norma AOAC, a pesar de que los volúmenes fueron reducidos para la realización de este trabajo, sigue siendo una técnica más costosa, no sólo por la cantidad de solventes que requiere, sino adicionalmente, por el costo de la disposición final de residuos.

5. CONCLUSIONES

La metodología implementada para el análisis simultáneo de pesticidas por la técnica HS/SPME-GC/ μ -ECD ha cumplido con los requerimientos establecidos por las GLP, proporcionando de esta manera confianza en los resultados y, por ende, posibilitando su aplicación para el análisis de pesticidas en matrices lácteas.

El método HS/SPME-GC/ μ -ECD para la determinación de 11 pesticidas en matrices lácteas fue implementado, y permitió obtener porcentajes de recuperación altos (73 - 100%) con coeficientes de variación que cumplen con las recomendaciones de las GLP, para los tiempos de retención y las áreas cromatográficas (0.2 -4.8%).

La temperatura y el tiempo de extracción fueron las variables que tuvieron mayor incidencia sobre la eficiencia del proceso de extracción de pesticidas de la muestra. Las mejores condiciones de extracción fueron las siguientes: *Salting out* del 30%, agitación constante con *micro*-magneto, tiempo de pre-equilibrio de 10 min, temperatura de extracción de 90 °C y tiempo de extracción de 60 min.

El Laboratorio de Cromatografía de la Escuela de Química de la Universidad Industrial de Santander, cuenta hoy en día con una técnica de análisis estandarizada, para la determinación de los residuos de algunos pesticidas, en muestras de leche. Esta técnica puede ser ofrecida como servicio analítico, tanto a organizaciones privadas, como organizaciones públicas encargadas de la vigilancia en la cadena de lácteos.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Observatorio Agrocadenas. Segundo Informe de coyuntura leche 2006. Secretaria técnica del consejo nacional de la leche. [Sitio en Internet]. Disponible en: www.redlactea.org/documentos/inf%20cy%20202006. Acceso: 19 noviembre de 2009.
2. CISCATO, C. and BERTONI G., Resíduos de pesticidas em leites bovino e humano, *Ecotoxicología y Medio Ambiente*, **2004**, 14, p.p. 23-38.
3. MÁRQUEZ, D., Residuos químicos de origen animal: Problemas y desafíos para la inocuidad alimentaria en Colombia, *Revista Corpoica-Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, **2008**, 9, p.p.124-135.
4. Los residuos de medicamentos en la leche: problemática y estrategia para su control, Corpoica. [Sitio en internet]. Disponible en: www.corpoica.org.co. Acceso: 1 noviembre de 2009.
5. COLOMBIA. MINISTERIO DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL Y MINISTERIO DE LA PROTECCIÓN SOCIAL. Resolución 2906 de 2007. Por el cual se establecen los límites máximos de residuos de plaguicidas -LMR- en alimentos para consumo humano y en piensos forrajes. Bogotá D.C, 2007. Diario Oficial No. 46.735 de 29 de agosto de 2007. [Sitio en Internet]. Disponible en: web.invima.gov.co/portal/documentsportal/documents/root//resolucion2906de2007plaguicidasalimentos.pdf. Acceso: 15 noviembre de 2009.
6. La Cadena de Lácteos en Colombia: una mirada global de su estructura y dinámica 1991-2005. MINISTERIO DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL. [Sitio en Internet]. Disponible en: www.redlactea.org/lacteos/documentos/acuerdo%20competitividad.pdf. Acceso: 15 noviembre de 2009.

7. Producción de leche: enfoque estadístico. Boletín informativo del Instituto Nacional de Estadística. [Sitio en Internet]. Disponible en: www.ine.cl. Acceso: 1 febrero de 2010.
8. Política sanitaria de inocuidad para las cadenas de la carne bovina y de la leche. Concejo Nacional de Política Económica y Social, Republica de Colombia 2005. [Sitio en Internet]. Disponible en: www.dnp.gov.co/archivos/documentos/subdirección_compes/3376.pdf . Acceso: 14 febrero de 2010.
9. BAKUMA, E. and AWUMBILA, B., Survey of pesticides used in the control of ectoparasitides of farm animals in Ghana, *Trop. Anim. Health Produc.*, **1994**, 26, p.p 123-126.
10. Antiparasitarios internos para el ganado bovino, ovino, porcino y aviar. Junquera P. [Sitio en Internet]. Disponible en: www.parasitosdelganado.net. Acceso: 1 febrero de 2010.
11. WANG, L. and YUAN-QUAN, LI., Simultaneous determination of ten antibiotic residues in milk by UPLC, *Chromatographia*, **2009**, 70, p.p 253-258.
12. Laboratorios de residuos de plaguicidas. Portal institucional del Instituto Colombiano Agropecuario (ICA). [Sitio en Internet]. Disponible en: www.ica.gov.co/getdoc/79a70b836a5442097825bc3b4b4103f/laboratorioderesiduos.aspx. Acceso: 28 abril de 2010.
13. An Introduction to insecticides, George Ware, Department of Entimology, University of Arizona. [Sitio en Internet]. Disponible en: www.ipmworld.umn.edu/chapters/ware.html. Acceso: 15 mayo de 2010.

14. MORALES, C. and RODRÍGUEZ, N., El Clorpirifos: Posible disruptor endocrino en bovinos de leche, *Rev. Col. Cienc. Pec.*, **2004**, 17 (3), p.p 255-263.
15. Insecticides: chemistries and characteristics, Jeffrey R., Department of Entomology, Virginia Polytechnic Institute and State University [Sitio en Internet]. Disponible en: www.ipmworld.umn.edu/chapters/bloogm.html. Acceso: 15 mayo de 2010.
16. PITCHARD, E., Desarrollo de una metodología analítica para la determinación de plaguicidas organofosforados y organoclorados en muestras biológicas humanas, Tesis Doctoral, Departamento de Ciencias Ambientales y Química Analítica. Universidad Jaume I de Castellon, **2001**.
17. MARTINEZ, J., and FRENICH G., Determination of pesticide transformation products: A review of extraction and methods detection, *J. Chromatogr. A*, **2009**, 1216, p.p 6767-6788.
18. LAMBROPOULOU, D., Methods of sample preparation for determination of pesticide residues in food matrices by chromatography–mass spectrometry-based techniques: a review, *Anal. Bioanal. Chem.*, **2007**, 389, p.p 1663–1683.
19. AOAC MÉTODO 970.52. General multiresidue methods. Organochlorine and Organophosphorus pesticide residues. **2008**.
20. KALJURAND, M., Application of the principles of green chemistry in analytical chemistry, *Pure Appl. Chem.*, **2006**, 78 (11), p.p. 1993–2002.
21. LAMBROPOULOU, D. and KONSTANTINOY, I., Review: Recent developments in headspace microextraction techniques for the analysis of

environmental contaminants in different matrices, *J. Chromatogr. A*, **2007**, 1152, p.p 70–96.

22. LORD, H. and PAWLISZYN, J., Evolution of solid-phase microextraction technology, *J. Chromatogr. A*, **2000**, 885, p.p 153–193.

23. BASHEER, C. and LEE, H., Hollow fiber membrane-protected solid-phase microextraction of triazine, *J. Chromatogr. A*, **2004**, 1047, p.p189–194.

24. ZHANG, Z. and PAWLISZYN, J., Headspace solid-phase microextraction, *Anal. Chem.*, **1993**, 65, p.p 1843-1852.

25. PAWLISZYN, J. and JINNO, K., Analysis of organophosphorus insecticides from environmental samples using solid-phase microextraction, *J. Chromatogr. A.*, **1996**, 736, p.p 219-228.

26. GÓRECKI, T. and PAWLISZYN, J., Theory of analyte extraction by selected porous polymer SPME fibres, *Analyst.*, **1999**, 124, p.p 643–649

27. AGUINAGA, N. and CAMPILLO, N., A headspace solid-phase microextraction procedure coupled with gas chromatography–mass spectrometry for the analysis of volatile polycyclic aromatic hydrocarbons in milk samples, *Anal. Bioanal. Chem.*, **2008**, 391, p.p 753–758.

28. KATAOKAA, H. and PAWLISZYN, J., Review Applications of solid-phase microextraction in food analysis, *J. Chromatogr. A.*, **2000**, 880, p.p 35–62.

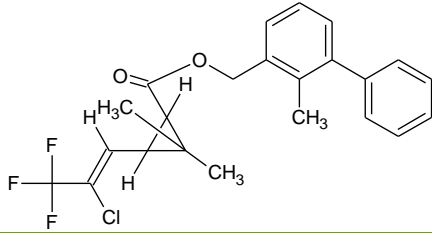
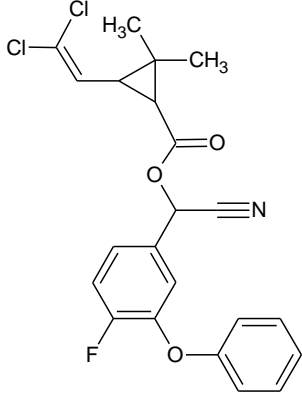
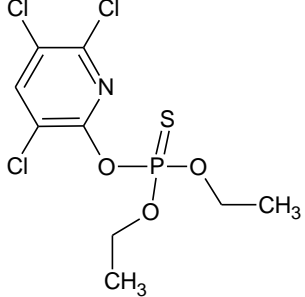
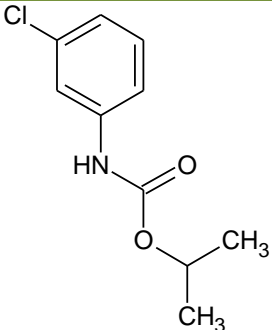
29. PAWLISZYN, J., Solid phase microextraction: Theory and practice, Willey-VCH, New York, 1997, p. 247.

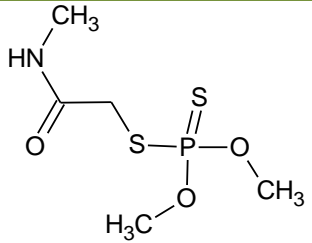
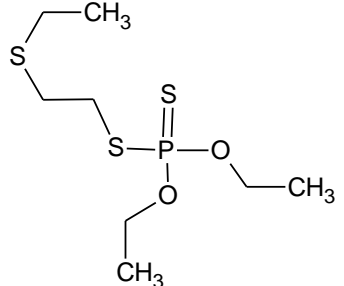
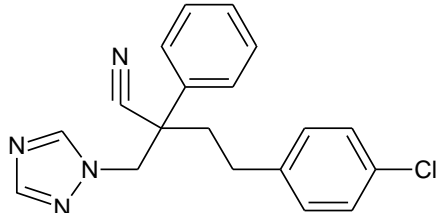
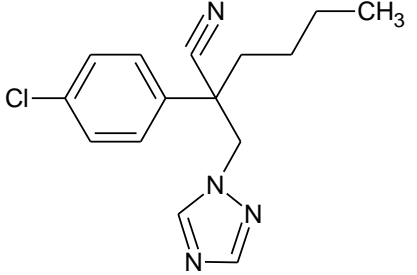
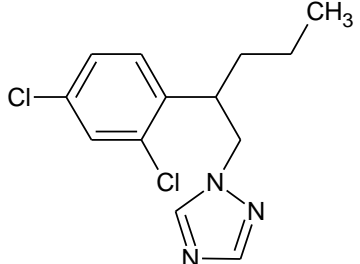
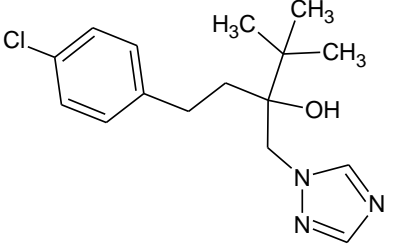
30. LLOMPART, M., CASAS, V., Multivariate optimization of the factors influencing the solid-phase microextraction of pyrethroid pesticides in water, *J. Chromatogr. A.*, **2006**, 1124, p.p 148–156.
31. SHIREY, R., Optimization of extraction conditions and fiber selection for semivolatil analytes using solid phase microextraction, *J. Chromatogr. Sci.*, **2000**, 38, p.p 279-288.
32. SUPELCO, Solid Phase Microextraction: Theory and optimization of conditions, **1998**, Bolletin 923, p.p 1-8.
33. SHIBAMOTO, T., Chromatographic analysis of environmental and food toxicants, Marcel Dekker INC, 1998, New York, p.p 230-261.
34. MILLLER, J., Basic gas chromatography, John Wiley, Canada, 1997, p.p. 3-5.
35. MacEWEN, C., Gas chromatography and mass spectrometry. A practical guide, Academic Press, EE.UU., 1996, p.p 10-20.
36. FERNANDEZ, M. and LLOMPART, M., Multivariate optimization of the factors influencing the solid-phasemicroextraction of pyrethroid pesticides in water, *J. Chromatogr. A.*, **2006**, 1124, p.p 148-156.
37. GARRIDO A. and MARTÍNEZ, L., Determination of pesticides and some metabolites in different kinds of milk by solid-phase microextraction and low-pressure gas chromatography-tandem mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.*, **2005**, 382, p.p 164-172.

38. GONÇALVES, C. and ALPENDURADA, F., Optimization and validation of a solid-phase microextraction method for simultaneous determination of different types of pesticides in water by gas chromatography–mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.*, **2007**, 1141, p.p 165–173.
39. SAKAMOTO, M. and TSUTSUMI, T., Applicability of headspace solid-phase microextraction to the determination of multi-class pesticides in waters, *J. Chromatogr. A.*, **2004**, 1028, p.p 63–74.
40. RAMÍREZ, N and BETANCUR, M., Validation of analytical method for the assay of fention in bovine milk, *Actual. Biol.*, **2006**, 28 (85), p.p 115-124.
41. MILLER, J.C. and MILLER, J.N, Estadística para química analítica, Delware Addison-Wesley Iberoamericana, **1993**, p. 345.
42. BURGESS, C., Valid analytical methods and procedures, Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2000, p.87.
43. PULIDO, H. y DE LA VARA, R., Análisis y diseño de experimentos, McGrawHill, **2008**, p 121.
44. Pesticides propieties database, IUPAC Agrochemical Information. [Sitio en Internet]. Disponible en: www.eu-footprint.org . Acceso 20 octubre de 2009.

ANEXOS

Anexo A. Listado de los pesticidas analizados, cuyos residuos son vigilados en la leche de vaca, según la Resolución 2906 de 2007 de los Ministerios de Agricultura, Desarrollo rural y de Protección Social.

Pesticida	Estructura	Clasificación	LMR, mg/Kg [5]	Log P _v *[44]
Bifentrin		Acaricida/ Insecticida Piretroide	0,05	-1,75
Ciflutrina		Insecticida Piretroide. (también utilizado como medicament o veterinario)	0,01	-3,52
Clorpirifos		Insecticida Organotiofos forado	0,02	0,2
Clorprofam		Herbicida Carbamato	0,0005	0,01

Dimetoato		Insecticida Organotiofos forado	0,05	-0,60
Disulfoton		Insecticida Organotiofos forado	0,01	0,81
Fenbuconazo I		Fungicida Triazol	0,05	-4,40
Miclobutanilo		Fungicida Triazol	0,01	-0,67
Penconazol		Fungicida Triazol	0,01	-0,44
Tebuconazol		Fungicida Triazol	0,01	-0,43

Fenpropatrin		Acaricida/Insecticida Piretroide	0,1	-0,11
Fipronil		Acaricida Fenilpirazol	0,02	NR
Vinclozolin		Fungicida Oxazol	0,05	-1,79

*Presión de vapor a 25°C, mPa

Anexo B. Resultados, obtenidos por el *software* estadístico *Statgraphics Centurion XVI*, de los efectos de diferentes parámetros y sus interacciones, para la extracción de los pesticidas.

Pesticida		Factores			Interacción		
		A:Temperatura	B:Tiempo	C: Salting out	AB	AC	BC
CLORPROFAM	<i>Razón-F</i>	0,01	15,76	11,42	0,46	0,38	11,2
	<i>Valor-P</i>	0,9445	0,0074	0,0149	0,5236	0,5584	0,0155
DIMETOATO	<i>Razón-F</i>	3,77	5,21	5,06	4,12	3,83	4,68
	<i>Valor-P</i>	0,1001	0,0625	0,0655	0,0888	0,098	0,0738
DISULFOTON	<i>Razón-F</i>	3,52	11,03	4,98	1,63	0,89	5,1
	<i>Valor-P</i>	0,1098	0,016	0,0672	0,2494	0,3812	0,0647
VINCLOZOLIN	<i>Razón-F</i>	22,69	30,79	6,45	17,57	5,17	6,49
	<i>Valor-P</i>	0,0031	0,0014	0,0441	0,057	0,0634	0,0437
CLORPIRIFOS	<i>Razón-F</i>	19,18	23,9	7,78	20,58	3,95	4,08
	<i>Valor-P</i>	0,0047	0,0027	0,0139	0,0039	0,0941	0,09
PENCONAZOL	<i>Razón-F</i>	16,98	17,47	4,61	14,58	4,17	4,15
	<i>Valor-P</i>	0,0062	0,0058	0,0753	0,0872	0,0088	0,0877
FIPRONIL	<i>Razón-F</i>	5,04	4,74	0,81	5,87	1,32	1,25
	<i>Valor-P</i>	0,0748	0,0815	0,4096	0,0599	0,3027	0,3144
MICLOBUTANILO	<i>Razón-F</i>	6,63	12,23	8,64	3,53	2,26	7,52
	<i>Valor-P</i>	0,042	0,0129	0,026	0,1093	0,183	0,0336
BIFENTRIN	<i>Razón-F</i>	10,33	8,82	1,9	7,76	2,38	2,26
	<i>Valor-P</i>	0,0183	0,025	0,2173	0,0318	0,1736	0,1833
FENPROPATRIN	<i>Razón-F</i>	9,27	8,63	3,53	8,83	4,34	3,76
	<i>Valor-P</i>	0,0227	0,026	0,1095	0,0249	0,0825	0,1004
CIFLUTRINA	<i>Razón-F</i>	10,79	6,69	2,19	6,35	2,54	2,91
	<i>Valor-P</i>	0,0167	0,0414	0,1898	0,0453	0,1624	0,1392

Anexo C. Curvas de calibración para cada uno de los pesticidas analizados, siguiendo la metodología HS/SPME-GC/□-ECD

