

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA

PROGRAMA DE EXPERIENCIAS DOCENTES CON LA COMUNIDAD -EDC-
SUBPROGRAMA DE EJERCICIO PROFESIONAL SUPERVISADO -EPS-

INFORME FINAL DE EJERCICIO PROFESIONAL SUPERVISADO -EPS- REALIZADO EN

LAB. REGIONAL DE ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD
PARA AMERICA CENTRAL Y EL CARIBE DE NESTLE, GUATEMALA

DURANTE EL PERIODO COMPRENDIDO

DEL 5 DE FEBRERO AL 10 DE AGOSTO/2001



PRESENTADO POR

PEDRO ALEJANDRO ORDOÑEZ CRUZ

ESTUDIANTE DE

QUIMICA

RIE DE INFORMES DE EPS

F. EPS. Q.Nes.1/2001

GUATEMALA, 27 de agosto, 2001.

Indice

<u>1. Introducción</u>	<u>3</u>
<u>2. Antecedentes</u>	<u>4</u>
<u>3. Actividades desarrolladas</u>	<u>6</u>
A. Actividades de Docencia	6
B. Actividades de Servicio.	7
C. Actividades de Investigación	9
<u>4. Anexos</u>	<u>27</u>

1. Introducción

La práctica de Ejercicio Profesional Supervisado – EPS – se llevó a cabo en el Laboratorio Regional de Aseguramiento de la Calidad para América Central y El Caribe de Nestlé Guatemala. Este laboratorio está encargado de llevar controles de calidad para todos los productos alimenticios fabricados por las fábricas de Nestlé de la región.

Para la realización de la presente práctica la actividad se centró en el área de pesticidas. Los pesticidas se aplican alrededor del mundo para aumentar la producción de alimentos y para proteger las cosechas durante su transporte y almacenamiento. El comercio entre las naciones con diferentes regulaciones en cuanto a pesticidas hace necesario el análisis de los productos alimenticios en el mercado de origen en busca de todos los pesticidas conocidos. Varios cientos de pesticidas se permiten con tolerancias máximas permitidas variables, dependiendo del tipo de alimento. Especialmente en los productos para infantes, fabricados en Guatemala, la tolerancia de pesticidas es muy baja. Para un estudio confiable de pesticidas, generalmente se aplican las técnicas de "multi-residuo". Los métodos de multi-residuo más adecuados se basan en la cromatografía de gases.

Cada fábrica de la región envía muestras de los productos que manufactura con determinada frecuencia, dependiendo del producto, para ser analizadas y corroborar que los productos estén conforme a las normas de los mercados de destino. Además, las materias primas, especialmente de proveedores nuevos, o los productos recién desarrollados, deben ser evaluados rápidamente para asegurar la calidad de los productos terminados.

Las actividades de servicio del EPS se centraron en llevar a cabo los análisis de determinación de pesticidas en diferentes muestras de diferentes fábricas. Las muestras analizadas fueron tanto programadas como especiales, es decir, no estaban programadas (por ser productos nuevos o materias primas de proveedores nuevos) que deben ser analizadas con mayor rapidez que las programadas.

En menor medida, durante las actividades de EPS también se realizaron determinaciones de perfiles de ácidos grasos en diferentes muestras, ya que esta actividad corresponde también al área de cromatografía de gases.

En el ámbito de la investigación se condujo la validación de un método para análisis de N-metilcarbamatos mediante HPLC, validación que no se logró completamente.

Las actividades de docencia consistieron, por un lado, de conferencias sobre el trabajo realizado y sus aspectos teóricos y técnicos a estudiantes del último año de la carrera de Química, y por otro lado, divulgación de información sobre los pormenores, aplicaciones y problemas del método validado a los analistas del laboratorio Regional de Nestlé.

2. Antecedentes

Nestlé es una compañía multinacional de origen suizo de las más grandes del mundo dedicadas a la producción de alimentos. En sus inicios, hace más de un siglo, Nestlé se concentraba en la producción industrial de alimentos para bebés. A partir de eso la compañía creció y se diversificó hasta producir en la actualidad todo tipo de alimento y estar presente en más de 70 países con más de 500 fábricas.

De acuerdo a su ubicación geográfica las fábricas de Nestlé se agrupan en bloques generales y cada uno de ellos en mercados regionales. Nestlé de Guatemala pertenece a la región de Centro América y El Caribe junto con El Salvador, Nicaragua, Honduras (donde no existe fábrica alguna), Costa Rica, Panamá, Jamaica, y Trinidad y Tobago.

Nestlé se estableció en Guatemala en 1949, con una agencia consignataria ubicada en la ciudad capital. Posteriormente, en 1957, pasó a ser Productos Nestlé de Guatemala. Para aquel entonces, su principal función era la de servir como distribuidora de productos importados, tales como leches, sopas deshidratadas, cubitos, chocolates, etc.

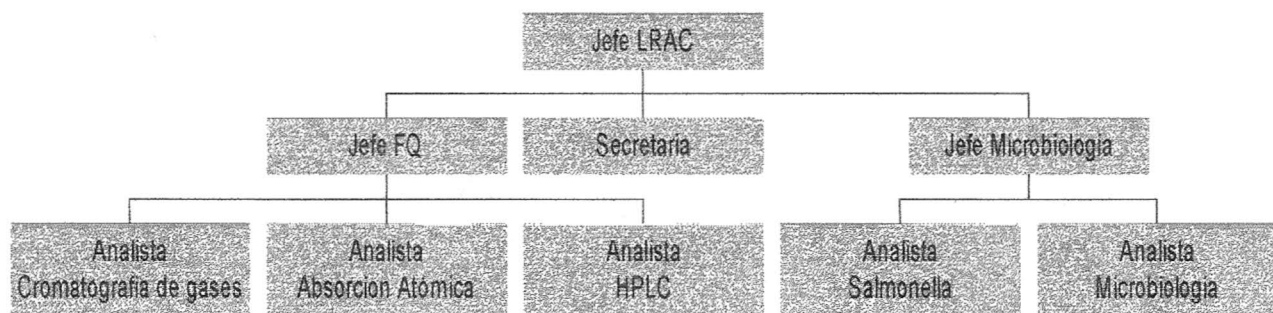
Hace casi 30 años se construyó la fábrica en Antigua Guatemala, la cual comenzó a funcionar con una pequeña planta en donde se envasaban cubitos de pollo y res, así como sopas deshidratadas en sobre. Luego, empezó a producir Nescao. Todos estos productos se vendían en Guatemala y se exportaban a Centro América. En la actualidad, la fábrica de Antigua se destaca tanto por sus instalaciones, lo moderno de su equipo y su personal capacitado que cumplen con los más altos estándares de calidad, como por la demanda de sus productos culinarios deshidratados, bebidas instantáneas, sopas, cremas, atoles y cereales infantiles. Estos productos, además de ser vendidos en el mercado local, se exportan a Centro América, México y Estados Unidos. Entre los productos que se fabrican en otros países de la región se encuentran leches enteras, leches descremadas, evaporadas y condensadas, leches en polvo, malteadas, suplementos alimenticios, helados, chocolates y dulces, galletas, café instantáneo, jugos, etc.

Para asegurar la calidad de los productos Nestlé, cada fábrica cuenta con un laboratorio de control de calidad, en el que se realizan los análisis de rutina para la liberación de productos al mercado. Adicionalmente, en cada región existe un Laboratorio Regional de Aseguramiento de la Calidad –LRAC– que se dedica a supervisar los resultados de los laboratorios de fábrica y a llevar a cabo análisis más completos y sofisticados de todos los productos de la región. Se llevan a cabo tanto muestreos periódicos programados, como análisis especiales para productos nuevos o cualquier otra situación imprevista. El Laboratorio Regional en Guatemala empezó a funcionar en 1997 y está dividido en dos grandes áreas: Físicoquímica y Microbiología. El área de microbiología a su vez se divide en Microbiología general y *Salmonella*

El área Físicoquímica se divide en:

- Absorción atómica, para el análisis de minerales y metales.
- HPLC, para el análisis de vitaminas y azúcares
- Cromatografía de gases, para el análisis de ácidos grasos y residuos de pesticidas. .

A continuación se presenta cómo está organizado el Laboratorio Regional de Guatemala:



Como actividades de servicio dentro del laboratorio en el área de Fisicoquímica, el estudiante de Química brinda apoyo en los análisis realizados en cualquiera de las áreas mencionadas. Como actividades de investigación se realizan estudios para montar o mejorar métodos y procedimientos. En el ámbito de la docencia, las experiencias adquiridas son transmitidas a estudiantes de la carrera o al personal que labora dentro del Laboratorio Regional.

3. Actividades desarrolladas

A. Actividades de Docencia

□ Objetivos:

1. Transmitir a los estudiantes del curso de Ciencia de Alimentos conocimientos actualizados y aplicados a la realidad del campo de la industria de alimentos.
2. Informar sobre las técnicas analíticas instrumentales modernas a los estudiantes de la carrera de Química.
3. Dar a conocer el método de determinación de carbamatos y su respectiva validación al personal del laboratorio de Aseguramiento de la Calidad de Nestlé. Guatemala.
4. Capacitar al personal del Laboratorio Regional en el uso del software "Turbochrom" que controla el aparato de HPLC usado para el análisis de carbamatos.

□ Actividades

- "Conferencia sobre análisis de pesticidas en alimentos" impartida a estudiantes del curso de Ciencia de Alimentos, carrera de Química, el día 13 de Marzo de 2001.
- "Conferencia sobre el uso del software Turbochrom para el análisis de carbamatos" dictada al personal del laboratorio el 6 de Agosto de 2001.

□ Resultados y Discusión

La primera actividad docente realizada durante la práctica de EPS consistió en una conferencia sobre las técnicas modernas de análisis de residuos de pesticidas en alimentos. Esta plática se impartió a estudiantes del curso de Ciencia de Alimentos de la carrera de Química.

El aspecto más importante de esta plática fue el de poner en contacto a los estudiantes del último año de la carrera de Química con el trabajo de laboratorio realizado en la industria de alimentos. De esta forma se discutió la cromatografía de gases, HPLC, particiones líquidas y purificaciones por cromatografía en columna y exclusión molecular que son técnicas ya estudiadas en cursos teóricos, pero de las cuales aún se desconoce todas sus aplicaciones prácticas. Esta fue, por lo tanto, una oportunidad excelente para refrescar y aclarar conceptos sobre las técnicas mencionadas.

La evaluación de la actividad docente mencionada se realizó mediante preguntas directas a los estudiantes, lo que permitió establecer el grado de comprensión que se estaba alcanzando. Además se comentó la actividad fuera del salón de clases, pudiéndose establecer que se percibió como positiva la actividad.

La segunda actividad docente realizada fue una instrucción sobre la utilización del software llamado "Turbochrom" de la compañía Perkin-Elmer. Esta actividad se llevó a cabo principalmente mediante una presentación que describe todos los pasos a seguir para utilizar de forma completa el software. Desafortunadamente la actividad no se completó, pues el programa no estaba instalado en la computadora al momento de dar la plática, lo cual impidió determinar el éxito de la docencia.

□ Conclusiones

- Se logró determinar que la plática impartida sobre las técnicas de análisis de residuos de pesticidas en alimentos fue provechosa para los estudiantes en el sentido de que les permitió afianzar sus conocimientos sobre las técnicas modernas de análisis y les presentó un panorama actual de lo que se hace en las industrias de alimentos.
- El éxito de la segunda actividad docente no se logró determinar con exactitud, pues no se pudo realizar la parte interactiva de evaluación de la misma. Esto se debió en parte a falta de tiempo durante las últimas semanas de la práctica y en parte a que no se logró instalar de nuevo el software en la computadora.

B. Actividades de Servicio.

□ Objetivos:

1. Dominar las técnicas de extracción y cuantificación de las diferentes clases de pesticidas analizados en el Laboratorio Regional: organoclorados y piretroides, organofosforados y carbamatos.
2. Colaborar en la realización de cálculos de resultados y elaboración de reportes.
3. Aprender la utilización de los aparatos necesarios para el análisis de pesticidas: extracción con solventes, GPC (cromatografía de permeación en gel), cromatografía en columna, cromatografía de gases y HPLC (cromatografía líquida de alta resolución).
4. Adquirir las destrezas analíticas necesarias para lograr resultados confiables y reproducibles en el análisis de pesticidas.
5. Brindar apoyo en el análisis de las muestras de rutina y especiales que se analizan en Laboratorio Regional.

□ Actividades

Las actividades de servicio realizadas en el Laboratorio Regional de Aseguramiento de la Calidad se resumen en el Cuadro 1 (véase la sección Anexos.)

En síntesis, las actividades de servicio se centraron en el área de cromatografía de gases. La mayoría de los análisis realizados fueron la determinación de residuos de pesticidas en muestras de leches. Además se

realizaron determinaciones de contenido de grasas y perfiles de ácidos grasos en productos lácteos y aceites.

Paralelamente a las actividades puramente analíticas se participó en las actividades de mantenimiento de los equipos usados. Entre estas actividades se cuentan: calibración de los cromatógrafos (determinación de tiempos de retención, límites de detección, cambios de columnas y septas de los inyectores) mantenimiento de los compresores de aire, revisión de los generadores de nitrógeno, hidrógeno y aire puro, desecho de reactivos, preparación de soluciones de estándares, etc.

□ Resultados y Discusión

La actividad que ocupó la mayoría del tiempo la práctica de EPS fue el análisis de residuos de pesticidas en productos lácteos. Para evaluar el desempeño de esta actividad se llevan a cabo estudios de recuperación, que consisten en tomar una muestra libre de residuos de pesticidas (previamente analizada para tal efecto) y se le agrega una cantidad conocida de pesticidas. A continuación se le aplica la técnica de extracción de pesticidas de forma idéntica a si se tratara de una muestra de rutina y se inyecta en el cromatógrafo. Si la técnica de extracción fue llevada a cabo correctamente la cantidad que arroja el cromatógrafo debe coincidir con la cantidad agregada. Durante la práctica se realizaron alrededor de 50 de estos estudios de recuperación. Las primeras veces los resultados obtenidos fueron bastante bajos. Sin embargo, al aprender la técnica los resultados se volvieron altos, obteniéndose hasta un 200% de recuperación. Se logró determinar que el error consistía en dejar las muestras en reposo mucho tiempo antes de ser transvasadas a los viales de los cromatógrafos. Esto hacía que las muestras se concentraran afectando así los resultados.

Se sabe entonces, que en las muestras analizadas no se perdía los pesticidas presentes. A pesar de obtener resultados más altos de los reales, las muestras nunca presentaron concentraciones de pesticidas por encima de las normas del Codex Alimentarius.

En cuanto a los análisis llevados a cabo de perfiles de ácidos grasos, porcentajes de grasas y gravedades específicas, los resultados siempre estuvieron en concordancia con los que se esperaban según el producto.

□ Conclusiones

- En los análisis de pesticidas llevados a cabo se producía una concentración de las muestras previas a la inyección en los cromatógrafos de gases. Sin embargo, nunca se encontró una muestra con contenidos elevados de pesticidas.
- Los análisis de perfiles de ácidos grasos, porcentajes de grasas y densidad siempre estuvieron siempre en concordancia con los resultados esperados para los productos analizados.

**Universidad de San Carlos de Guatemala
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia**

**Validación del Método para
Análisis de N-metilcarbamatos por HPLC
y derivatización post-columna**

Informe Final de la Investigación

**Presentado por:
Pedro Alejandro Ordóñez Cruz**

**Estudiante de la Carrera de
Química**

Guatemala, 10 de Agosto de 2001

Indice

<u>1. Resumen</u>	11
<u>2. Introducción</u>	12
<u>3. Antecedentes</u>	13
<u>3.1 Validación de métodos</u>	13
3.1.1 Precisión	13
3.1.2 Exactitud:	13
3.1.3 Linealidad:	14
3.1.4 Rango:	14
3.1.5 Robustez	15
3.1.6 Límite de detección:	15
3.1.7 Límite de cuantificación:	15
3.1.8 Selectividad y Especificidad:	15
<u>3.2 Determinación de residuos de pesticidas en alimentos</u>	15
3.2.1 Compuestos organofosforados:	16
3.2.2 Pesticidas carbamatos:	17
<u>4. Objetivos</u>	20
<u>5. Aspectos Metodológicos</u>	21
5.1 Universo de Trabajo	21
5.2 Recursos Humanos	21
5.3 Recursos Físicos	21
5.4 Recursos Materiales	21
5.4.1 Material y Equipo de Laboratorio	21
5.4.2 Cristalería	21
5.4.3 Reactivos	22
5.5 Procedimiento	22
5.6 Diseño de la Investigación	22
<u>6. Resultados y Discusión</u>	23
<u>7. Conclusiones</u>	24
<u>8. Referencias</u>	25

1. Resumen

En el presente trabajo de investigación se tenía como fin la validación del método de análisis de N-metil-carbamatos en alimentos mediante HPLC y derivatización post-columna. El método de extracción ya se encontraba validado para pesticidas fosforados y clorados. Se debía evaluar entonces la respuesta del aparato a pesticidas carbamatos y determinar precisión, exactitud y límites de detección y cuantificación.

Se logró establecer que la separación de los 10 pesticidas que se deseaba analizar es satisfactoria y sus tiempos de retención son altamente reproducibles. Sin embargo, la cuantificación resultó imposible debido a que el área de los picos presentó una variación demasiado alta.

2. Introducción

Los pesticidas se aplican alrededor del mundo para aumentar la producción de alimentos y para proteger las cosechas durante su transporte y almacenamiento. El comercio entre las naciones con diferentes regulaciones en cuanto a pesticidas hace necesario el análisis de los productos alimenticios en el mercado de origen en busca de todos los pesticidas conocidos. Varios cientos de pesticidas se permiten con tolerancias máximas permitidas variables, dependiendo del tipo de alimento. Para un estudio confiable de pesticidas, generalmente se aplican las técnicas de "multi-residuo". Los métodos de multi-residuo más adecuados se basan en la cromatografía.

Una preocupación reciente de los analistas ambientales es que en el análisis de residuos de pesticidas, las cantidades de reactivos y solventes utilizados y liberados al ambiente es usualmente un factor de 10^8 veces mayor que la cantidad de analitos contaminantes analizados. Es entonces contradictorio que para hacer un análisis de agentes contaminantes en alimentos, el análisis mismo sea más contaminante que lo que se quiere determinar. La respuesta a este problema se está buscando en la actualidad en la miniaturización de los métodos. Sobre todo se ha puesto énfasis en reducir los solventes necesarios para la extracción, y con los nuevos métodos micro se ha logrado reducir dichas cantidades de 10 a 100 veces comparadas con las de los métodos macro.

Los compuestos se pueden identificar con base en sus tiempos de retención en una columna de cromatografía calibrada. La calidad de la información depende de la eficiencia de la separación, la cual guarda una estrecha relación con la longitud de la columna y la selectividad de la fase estacionaria hacia los pesticidas. La información obtenida a partir de una columna comúnmente se utiliza para análisis de sondeo. La ausencia de picos en un cromatograma calibrado con los tiempos de retención de los pesticidas indica que la muestra está libre de dichos pesticidas. La presencia de picos con correlación a los tiempos de retención de los pesticidas calibrados hace necesario un análisis confirmatorio. Esto se puede lograr haciendo pasar la muestra por otra columna capilar con una fase estacionaria de diferente polaridad. Esta segunda columna debe estar calibrada también y si los tiempos de retención de ambas columnas confirman al mismo pesticida se tomará como válido el hallazgo de pesticida, de lo contrario se rechaza la presencia de tal residuo.

Los carbamatos son pesticidas de amplia distribución en la actualidad, pues son menos resistentes al calor y luz que los clorados, lo que los hace más biodegradables. Es de suma importancia contar con un método que se acople a la extracción con la que ya se cuenta para pesticidas clorados y fosforados y que permita cuantificar a los pesticidas carbamatos con un gasto mínimo de solventes y una exactitud y sensibilidad adecuada.

3. Antecedentes

3.1 Validación de métodos

La validación de un método analítico es el proceso mediante el cual se establece por estudios de laboratorio que las características de desempeño del método llenan los requerimientos para la aplicación analítica deseada.

La validación se requiere para cada método nuevo o modificado para asegurar que es capaz de dar resultados reproducibles y confiables, cuando es usado por diferentes operadores empleando equipo análogo en el mismo o diferentes laboratorios.

Los parámetros analíticos típicos usados en la validación de un ensayo incluyen:

- Precisión
- Exactitud
- Linealidad
- Rango
- Robustez
- Límite de detección
- Límite de cuantificación
- Selectividad
- Especificidad

3.1.1 Precisión

La precisión de un método analítico es el grado de concordancia entre resultados de pruebas individuales obtenidos cuando el método se aplica a un muestreo múltiple de una muestra homogénea.

La precisión es una medida de la reproducibilidad de la totalidad del método analítico (incluyendo muestreo, preparación de la muestra y análisis) bajo condiciones de operación normales. La precisión se determina aplicando el método para analizar una muestra un número suficiente de veces para obtener resultados estadísticamente válidos (por ejemplo, entre 6 y 10 veces). La precisión se expresa entonces como la desviación estándar relativa (RSD por sus siglas en inglés):

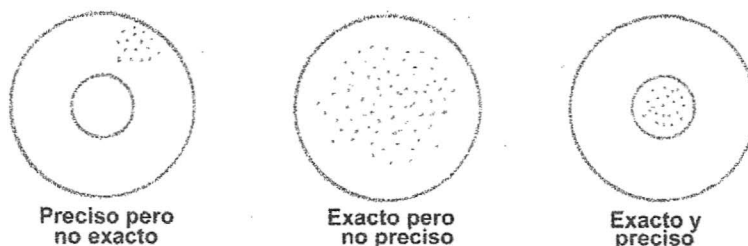
$$\% \text{ RSD} = \frac{\text{desv_std_x_100}}{\text{media}}$$

3.1.2 Exactitud:

La exactitud es una medida de la cercanía de los resultados obtenidos con un método respecto al el valor real.

La exactitud indica la desviación entre el valor medio encontrado y el valor real. Se determina aplicando el método a muestras a las que se les ha agregado cantidades conocidas de analito. Estas deben ser analizadas contra soluciones estándar y blancos para asegurarse de que no existen interferencias. La exactitud se calcula entonces a partir de los resultados de la prueba como un porcentaje de la cantidad de analito recuperado por la prueba.

La exactitud y la precisión no son lo mismo, como lo muestra el diagrama de abajo. Un método puede tener buena precisión y sin embargo, no ser exacto.



Los errores de medición se pueden dividir en dos grandes categorías: errores sistemáticos y errores al azar.

Los errores sistemáticos ocurren de fuentes que pueden ser atribuidos a la metodología, el instrumento o el operador y afectan tanto a la precisión como a la exactitud.

Los errores al azar afectan solo a la precisión y son difíciles de eliminar porque son resultado de fluctuaciones al azar en la medida de la señal debido al ruido u otros factores.

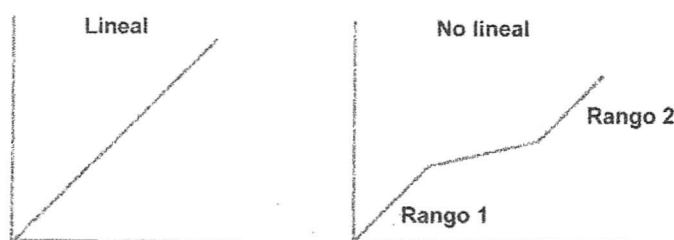
3.1.3 Linealidad:

La linealidad es la habilidad del método de obtener resultados que son ya sea directamente o bien después de transformación matemática, proporcionales a la concentración del analito dentro de un rango dado.

La linealidad se determina calculando la línea de regresión usando un tratamiento matemático de los resultados (por ejemplo mínimos cuadrados) contra la concentración del analito.

3.1.4 Rango:

El rango del método es el intervalo entre los niveles inferior y superior de un analito que han sido determinados con precisión, exactitud y linealidad aceptables. Se determina en una curva de respuesta ya sea lineal o no lineal (por ejemplo, donde más de un rango está involucrado, como se muestra abajo) y se expresa normalmente en las mismas unidades que las del resultado de la prueba.



3.1.5 Robustez

La robustez es el grado de reproducibilidad de resultados obtenidos del análisis de la misma muestra bajo una variedad de condiciones de prueba normales, por ejemplo diferentes analistas, laboratorios, instrumentos, lotes de reactivos, temperaturas de ensayo, pequeñas variaciones en la fase móvil, días diferentes, etc.

3.1.6 Límite de detección:

Este es la concentración más baja en una muestra que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada, bajo las condiciones experimentales mencionadas. El límite de detección es importante para pruebas de impurezas (o de residuos como es el caso de los pesticidas) y los ensayos de dosis conteniendo niveles bajos de medicamento y placebos.

El límite de detección generalmente se expresa como la concentración que da una relación de señal / ruido de 2:1.

Ya que el límite de detección depende de la relación señal / ruido, se puede mejorar al aumentar la señal del analito o disminuir el ruido.

3.1.7 Límite de cuantificación:

Este es la concentración más baja de analito en una muestra que puede ser determinada con precisión y exactitud aceptables.

Se expresa como la concentración que da un relación señal / ruido de 10 y se determina analizando un número de muestras cercas de este valor.

3.1.8 Selectividad y Especificidad:

La selectividad es la habilidad de medir exactamente y específicamente el analito en presencia de componentes que se espera puedan estar presentes en la matriz de la muestra.

La especificidad de una ensayo asegura que la señal medida proviene de la sustancia de interés y que no existe interferencia de excipientes, productos de degradación y/o impurezas.

La determinación de estos parámetros se puede llevar a cabo evaluando la pureza y la identidad de los picos, una función presente en los programas controladores de equipos de HPLC.

3.2 Determinación de residuos de pesticidas en alimentos

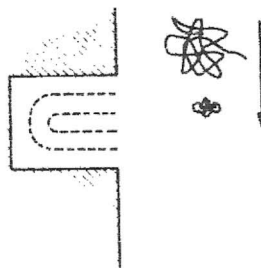
Cuando se analizan pesticidas en alimentos la selectividad de los detectores es de suma importancia. En conjunción con una limpieza apropiada, el gran número de sustancias de la matriz son transparentes. Los pesticidas son compuestos pequeños y relativamente lipofílicos que contienen al menos uno de los heteroátomos: Cl, Br, I, S, P o

N. Estos heteroátomos raras veces están en compuestos lipofílicos pequeños de origen biológico. De esta forma, los detectores selectivos a estos heteroátomos son adecuados para el análisis de residuos de pesticidas. Los detectores selectivos más importantes hasta ahora han sido: captura de electrones (ECD, para halogenados) detector termiónico de nitrógeno y fósforo (NPD) y los detectores de fotometría de llama (FPD, para fosforados, azufrados y nitrogenados).

3.2.1 Compuestos organofosforados:

Los compuestos organofosforados probablemente representan la clase más grande de sustancias utilizadas como pesticidas en la actualidad. Existen quizás más de 100 compuestos de esta clase disponibles a lo largo del mundo. Tienen varias ventajas sobre otros tipos de pesticidas, tales como alta toxicidad para los organismos blanco, pero no son persistentes en el ambiente como los organoclorados y se descomponen a productos no tóxicos. Sin embargo, su alta toxicidad causa una gran preocupación y se han implementado regulaciones estrictas en la mayoría de países limitando las cantidades máximas de residuos en productos para consumo humano. Además de su toxicidad al humano, los organofosforados son tóxicos para una gran variedad de vida animal, lo que ha despertado preocupación sobre sus niveles en el ambiente.

Para asegurar que estas sustancias no se encuentran en niveles peligrosos en los alimentos, el agua y muestras ambientales, se han desarrollado e implementado a lo largo de los últimos años diversas técnicas analíticas. Actualmente, estas comprenden más que nada la cromatografía líquida o gaseosa con varios métodos de detección. La determinación de bajas concentraciones de pesticidas organofosforados en diferentes matrices requiere de, además de técnicas de detección selectivas y sensibles, la aplicación de técnicas de extracción efectivas y de purificación, que permitan una determinación tanto cuantitativa como cualitativa. Para la extracción de organofosforados se usan varios solventes entre los cuales se pueden citar: acetona, acetona – agua, diclorometano, acetato de etilo, metanol – agua y acetona – hexano. Aún con el uso de detectores selectivos para fósforo es necesaria la purificación de las muestras antes de sus análisis. Esto se logra sobre todo mediante cromatografía de permeación en gel, que es un tipo de cromatografía de exclusión molecular en donde la fase móvil no es acuosa sino orgánica y trabaja a altas presiones. En este tipo de cromatografías las partículas de gran tamaño molecular eluyen antes pues al hacer eluir la mezcla por un gel, las partículas pequeñas pueden penetrar dentro la estructura interna del gel, mientras que las grandes no pueden. De este modo, las moléculas grandes tienen un volumen disponible efectivo a través del cual eluir mucho menor que las partículas pequeñas. De este modo se eliminan lípidos, proteínas y carbohidratos de la muestra.



Mecanismo de acción de la cromatografía de exclusión molecular

En la figura 3 se puede observar el efecto limpiador del GPC. En el cromatograma A la muestra no se ha purificado por GPC, por lo que aparecen picos prominentes de compuestos de matriz que no son de interés para el análisis. Luego del GPC estos picos desaparecen, lo que aumenta la exactitud del análisis.

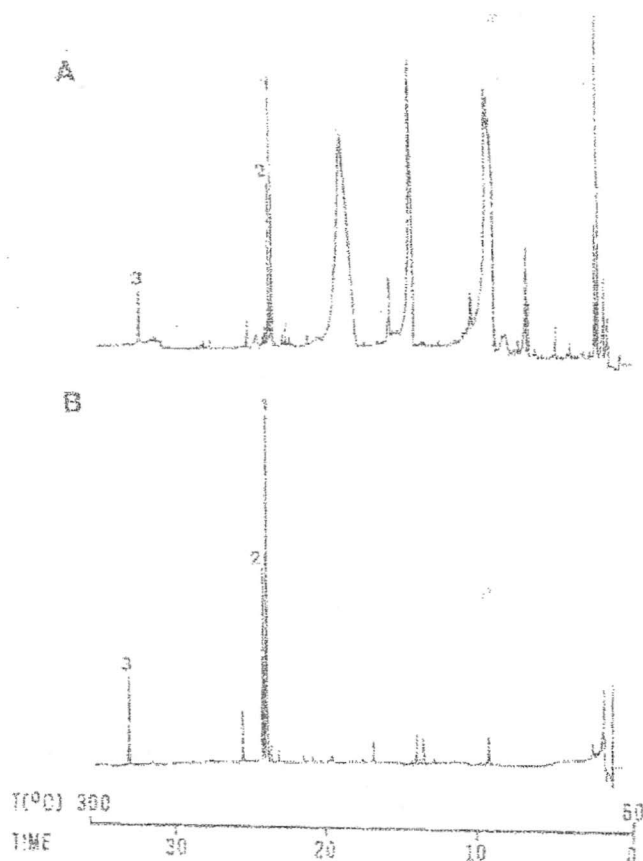


FIGURE 3. GC-NPD chromatograms of a bivalve sample of *Tapes semidecussatus* after gel permeation chromatographic cleanup (A) and after gel permeation and Florisil column chromatography (B). Compounds identified correspond to: (1) fenitrothion, (2) malathion, and (3) phosmet. (Reprinted from Barceló, D., Solé, M., Durand, G., and Albaigés, I., *Fresenius J. Anal. Chem.*, 339, 676, 1991. With permission.)

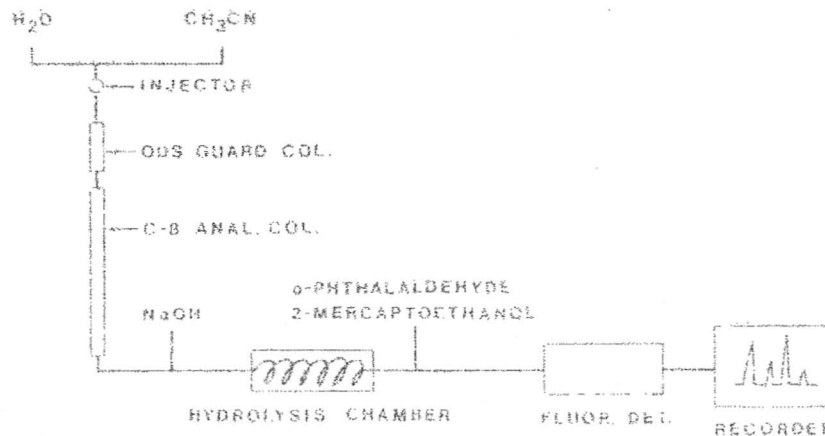
Debido al costo relativamente bajo, además de su alta sensibilidad y límites bajos de detección de los equipos de cromatografía de gases, esta es la técnica de elección de muchos laboratorios para el análisis de pesticidas. Los detectores más utilizados en la actualidad para el análisis de organofosforados son: el detector termoiónico de nitrógeno y fósforo (NPD), captura de electrones (ECD), fotometría de llama (FPD) y espectrometría de masas (MS). El más sensible y de mayor certeza es el espectrómetro de masas, que junto a una base de datos de pesticidas puede identificar de inmediato y con certeza total cualquier pesticida. Sin embargo, este es el detector más costoso. Le sigue en sensibilidad y selectividad al MS, el FPD, luego el NPD y por el ECD.

Para la confirmación de pesticidas organofosforados se puede usar el detector MS o bien se pueden comparar los resultados de la misma muestra en dos columnas diferentes o dos detectores diferentes.

3.2.2 Pesticidas carbamatos:

Los carbamatos son una clase importante de plaguicidas de amplio espectro. La mayoría son insecticidas y nematicidas (sobre todo los N-metilcarbamatos) y poseen baja fitotoxicidad, además de ser bastante biodegradables. Las regulaciones de los EEUU no permiten más de 10 – 40 ppb en agua potable.

Puesto que son termolábiles no se pueden analizar por cromatografía de gases. Se analizan por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con un gradiente de metanol agua. Esto permite separar a los carbamatos según su polaridad. Luego de la elución por HPLC es necesario llevar a cabo una reacción post-columna. Los N-metilcarbamatos se hidrolizan en medio básico, lo que libera metilamina. Esta se hace reaccionar luego con o-ftalaldehído (OPA) lo que forma un isoindol que por ser fluorescente se puede detectar con un detector de fluorescencia. Esto le da al método la selectividad necesaria y su sensibilidad es alrededor de las 5 ppb. Anteriormente se trabajaba con detectores ultravioleta, pero debido a la gran cantidad de compuestos que absorben en UV no presentaba la selectividad deseada.



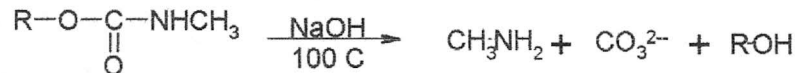
Sistema de HPLC y derivatización post columna para carbamatos

También en el caso de los carbamatos es

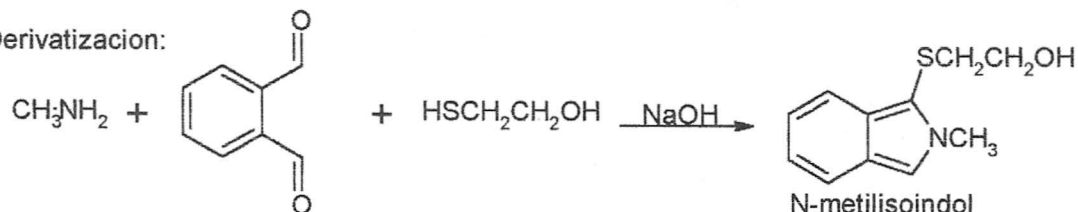
necesario un paso de limpieza efectivo. Los aminoácidos presentan también fluorescencia, por lo que es importante eliminar a las proteínas de la muestra. Para la purificación de las muestras de carbamatos se utilizan muchos tipos de cromatografía de partición. Actualmente se utiliza también la técnica de GPC, lo que permite darle el mismo tratamiento tanto a organoclorados, organofosforados y carbamatos.

□ Química de la reacción post-columna:

Hidrolisis:

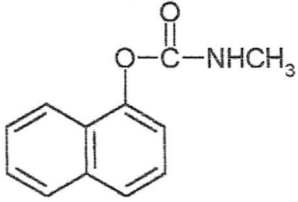
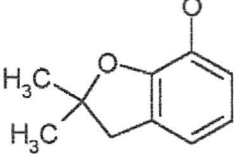
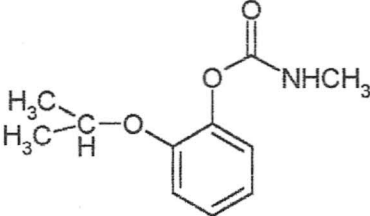
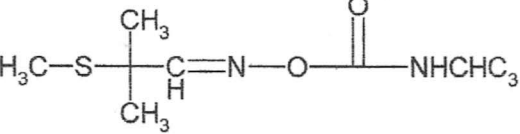
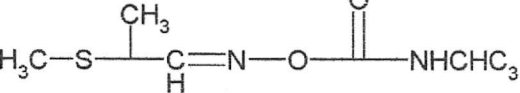
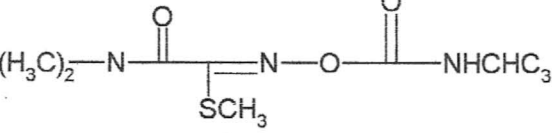


Derivatización:



N-metilisoindol
Ex: 330 nm
Em: 465 nm

□ Tabla de pesticidas carbamatos

Nombre y estructura	Mecanismo de acción	LD ₅₀ mg/Kg
 <p>Carbaryl (sevin)</p>	Inhibidor de colinesterasa	540
 <p>Carbofuran (furadan)</p>	Inhibidor de colinesterasa	5
 <p>Propoxur (Baygon)</p>	Inhibidor de colinesterasa	100
 <p>Aldicarb (Temik)</p>	Inhibidor de colinesterasa	20
 <p>Metomil (Lamnate)</p>	Inhibidor de colinesterasa	20
 <p>Oxamil (Vydate)</p>	Inhibidor de colinesterasa	5

4. Objetivos

- Validar el método de análisis de N-metil-carbamatos por HPLC y derivatización post columna.
- Determinar la precisión, exactitud, linealidad, rango, robustez y límites de detección y cuantificación del método.
- Dejar el equipo en condiciones óptimas de funcionamiento de modo que se puedan realizar los análisis de rutina de carbamatos a todas las muestras que lleguen al Laboratorio Regional.
- Establecer los controles y medidas de mantenimiento del equipo de HPLC, sus columnas y el aparato de derivatización post columna.

5. Aspectos Metodológicos

5.1 Universo de Trabajo

Determinación de residuos de pesticidas N-metil-carbamatos en muestras de alimentos mediante cromatografía HPLC y derivatización post-columna.

5.2 Recursos Humanos

- Pedro Alejandro Ordóñez Cruz; estudiante de la carrera de Química, practicante EPS en el Laboratorio Regional de Nestlé Guatemala.
- Jorge Méndez; analista del área de pesticidas en el Laboratorio Regional de Nestlé Guatemala.

5.3 Recursos Físicos

Instalaciones del Laboratorio Regional de Nestlé Guatemala.

5.4 Recursos Materiales

5.4.1 Material y Equipo de Laboratorio

- Cromatógrafo HPLC: bomba HPLC, columna especial para el análisis de carbamatos, detector de fluorescencia.
- Unidad de derivatización post-columna Pickering PCX –5100
- Computadora PC con software Turbochrom.
- Rotavapor con control de temperatura y presión
- Cromatógrafo GPC
- Agitador mecánico

5.4.2 Cristalería

- Balones de 500 mL con bocas esmeriladas
- Embudos de vidrio
- Probeta de 100 mL
- Pipetas volumétricas de 1, 2, 3, 4, 5 y 10 mL
- Beakers de 30, 150, 250 y 400 mL
- Espátulas de metal
- Varillas de agitación
- Viales de vidrio ámbar
- Pipetas Pasteur

5.4.3 Reactivos

- Metanol grado HPLC
- Acetona grado analítico
- Acetato de etilo grado analítico
- Ciclohexano grado analítico
- Agua grado HPLC
- Reactivo de hidrólisis Pickering
- Reactivo de derivatización: o-ftalaldehído Pickering
- Sulfato de sodio grado analítico
- Cloruro de sodio grado analítico

5.5 Procedimiento

Pesar 25 g de muestra y ajustar a 50 g según su contenido de humedad. Agregar 20 g de cloruro de sodio, 100 mL de acetona, 25 mL de acetato de etilo y 25 mL de ciclohexano. Agitar fuertemente durante 3 minutos si es una muestra de bajo contenido en grasa o agitación suave durante 30 minutos si tiene alto contenido de grasa.

Filtrar mediante un papel separador de fases y obtener 100 mL de capa orgánica. Evaporar hasta casi sequedad en rotavapor. Agregar 0.5 g de sulfato de sodio y 10 ml de eluyente GPC (acetato de etilo / ciclohexano 1:1). Inyectar en cromatógrafo GPC. Evaporar el eluato hasta sequedad y reconstituir con 10 mL de acetato de etilo. Tomar 2 mL de la solución, evaporar a sequedad y reconstituir con 2 mL de metanol agua 1:1. Trasvasar a un vial ámbar e inyectar en sistema HPLC con derivatización post-columna.

5.6 Diseño de la Investigación

Se inyectarán en el cromatógrafo HPLC con equipo de derivatización post-columna estándares de pesticidas carbamatos de concentración conocidas. De esta forma se determinará el tiempo de retención de cada uno. Con 10 inyecciones de cada nivel de calibración (10, 20, 50, 100 y 200 ppb) se establecerá la variación del tiempo de retención, la linealidad entre estos valores y la variación de las áreas dentro de cada nivel.

Al obtener resultados aceptables para los parámetros anteriores se procederá a hacer estudios de recuperación en muestras de alimentos para evaluar la exactitud. El programa es capaz de establecer la relación señal / ruido, mediante la cual se establecerá los límites de detección y cuantificación.

6. Resultados y Discusión

El primer paso de la investigación consistió en inyectar estándares de pesticidas carbamatos en concentraciones de 10, 20, 50, 100 y 200 ppb. De allí se logró establecer los tiempos de retención de cada componente, al ser inyectados uno por uno. Se logró establecer que los tiempos de retención no variaban más allá del 3%, por lo que el aparato siempre detectaba a los compuestos sin problema alguno.

Luego se procedió a elaborar gráficas de concentración contra área del pico para calibrar el aparato. En este punto se encontró el problema de que las áreas de los picos no eran reproducibles, con variaciones de hasta del 200%. Además, la forma de los picos no era regular sino asimétrica. La presión del sistema también presentó problemas al elevarse muy por encima de los valores aceptables. Se procedió entonces a limpiar la columna, primero con gradiente de solventes, de menos a más apolar para eliminar toda clase de impurezas y luego a flujo invertido. Sin embargo, con esto no se logró mejorar la forma de los picos, únicamente se corrigió de manera temporal el problema de la presión elevada.

Se logró determinar que la presión elevada se debía a una precolumna que sirve de filtro antes de la columna analítica. Esta precolumna tiene la misma composición que la columna de modo que detiene cualquier impureza que pudiera dañar a la columna. En principio esta precolumna debería durar 100 inyecciones, pero a la vigésima inyección ya presentaba problemas. Por lo tanto se concluyó que el sistema de bombas HPLC ya necesitaba servicio. Se solicitó de los proveedores sellos nuevos para la bomba de HPLC y las bombas del sistema de derivatización. Al haber daño en el sistema de bombeo, las áreas no son reproducibles e incluso es posible que partículas de los sellos dañados estuvieran ocluyendo a la precolumna, elevado así la presión. Sin embargo, al concluir la práctica aún se estaban esperando estos repuestos, por lo que no se pudo concluir el trabajo de validación.

Otro problema que se tuvo fue con el software Turbochrom que controla al equipo de HPLC. Por un conflicto de configuración con Windows se perdió el acceso al programa y este problema no pudo ser solucionado ni con la ayuda del técnico experto en sistemas por lo que no se logró extraer los datos ya almacenados en el programa.

7. Conclusiones

- Se logró establecer que los tiempos de retención de cada uno de los 10 compuestos carbamatos analizados presentan muy poca variación. Esto permite su fácil identificación mediante el cromatógrafo HPLC.
- La presión del sistema HPLC se elevaba excesivamente debido a que la precolumna se dañaba antes de terminar su vida útil.
- Los picos de cada compuesto carbamato no presentaban áreas reproducibles, lo que impidió que se lograra establecer linealidad y exactitud.
- Es posible que los sellos y empaques del sistema de HPLC estuvieran dañados pues ya habían excedido su vida útil. De este modo se puede explicar que las áreas de los picos no sean reproducibles y además es posible que desprendieran partículas que dañaran a la precolumna.
- Por falta de los repuestos del equipo de HPLC no se logró completar la validación del método.

8. Referencias

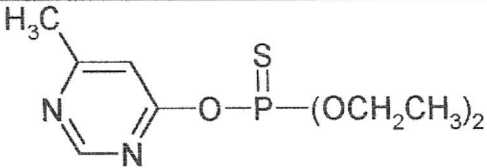
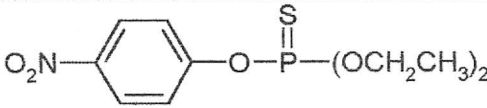
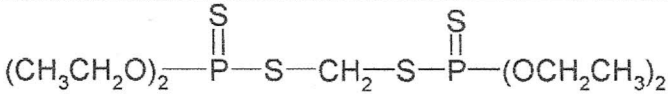
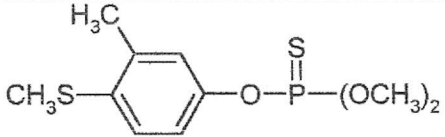
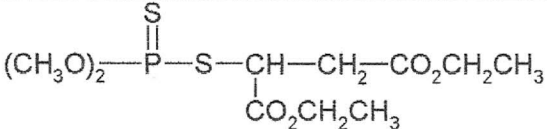
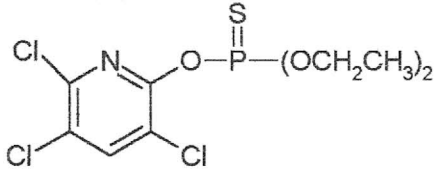
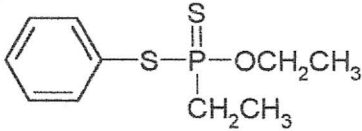
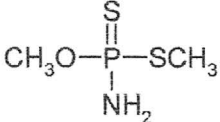
1. **"A Guide to Validation in HPLC"**, Perkin Elmer, 1992
2. W. G. Fong, et al. **"Modern Techniques for analysis of pesticide residues in food"**, 2a edición, Academy Press, Inc, EEUU, 1999.

4. Anexos

□ Tabla de recuento de actividades de servicio:

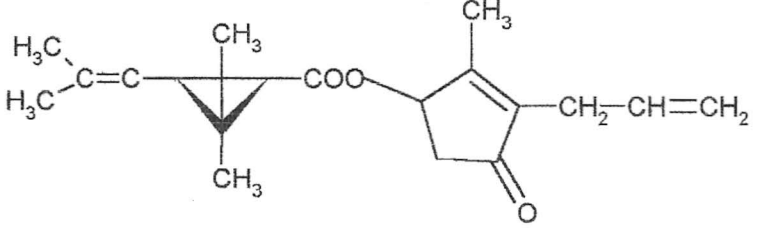
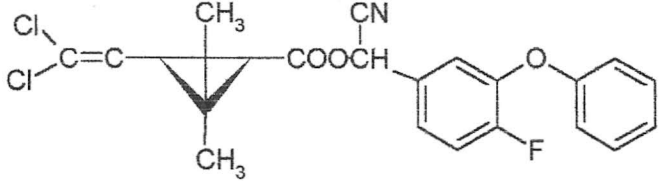
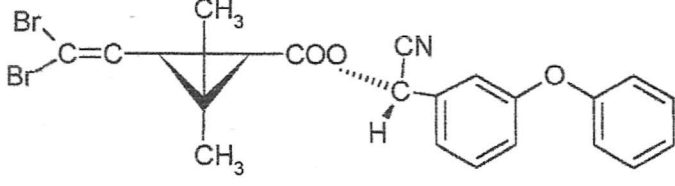
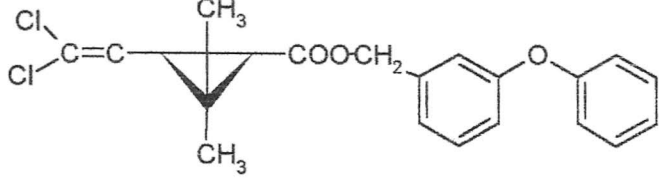
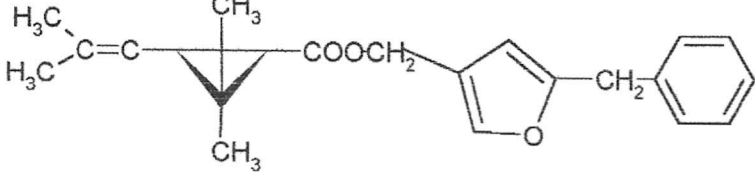
Actividad	Número de muestras analizadas
Estudio de recuperación de pesticidas	50
Análisis de residuos de pesticidas en alimentos	45
Determinación de porcentaje de grasa en alimentos	5
Perfil de ácidos grasos en alimentos	3
Determinación de gravedad específica de alimentos líquidos	1

• Cuadro 2: Pesticidas organofosforados:

Nombre y estructura	Mecanismo de acción	LD ₅₀ mg/Kg
 <p style="text-align: center;">Diazinon</p>	Inhibidor de colinesterasa	250 – 355
 <p style="text-align: center;">Parathion</p>	Inhibidor de colinesterasa	10
 <p style="text-align: center;">Ethion</p>	Inhibidor de colinesterasa	40 – 45
 <p style="text-align: center;">Fenthion</p>	Inhibidor de colinesterasa	250
 <p style="text-align: center;">Malathion</p>	Inhibidor de colinesterasa	775 – 3320
 <p style="text-align: center;">Clorpyrifos</p>	Inhibidor de colinesterasa	504
 <p style="text-align: center;">Fonofos</p>	Inhibidor de colinesterasa	6
 <p style="text-align: center;">Metamidofos</p>	Inhibidor de colinesterasa	20

• **Pesticidas piretorides:**

Los piretorides son modificaciones sintéticas de la piretrina, un grupo de productos naturales presentes en plantas como el crisantemo, que desde hace tiempo se observó que tiene una poderosa acción repelente e insecticida.

Nombre y estructura	Mecanismo de acción	LD ₅₀ mg/Kg
 <p>Alletrin</p>	<p>Insecticida no sistémico con acción estomacal y de contacto. Paraliza antes de matar</p>	<p>1100</p>
 <p>Cyflutrin</p>	<p>Insecticida no sistémico con acción estomacal y de contacto. Actúa sobre el SNC, Actividad residual prolongada</p>	<p>500</p>
 <p>Deltametrin</p>	<p>Insecticida no sistémico con acción estomacal y de contacto. Actividad rápida</p>	<p>1000</p>
 <p>Permetrin</p>	<p>Insecticida no sistémico con acción estomacal y de contacto. Paraliza antes de matar. Leve efecto repelente</p>	<p>2000 – 3000</p>
 <p>Resmetrin</p>	<p>Insecticida no sistémico con acción estomacal y de contacto. Paraliza antes de matar. Similar a piretrinas naturales</p>	<p>> 2500</p>