



FACULTAD DE FARMACIA

ESCUELA DE QUÍMICA Y FARMACIA

**OPTIMIZACIÓN Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO CONFIRMATORIO
DE PLAGUICIDAS ORGANOCORADOS POR GC/ECD
EN ACEITE DE PESCADO**

Trabajo de Internado para optar al título de Químico Farmacéutico

MIGUEL ANGEL CALDERÓN GALAZ

Director de Internado: Dra. María Soledad Lobos Salvo

Co-director de Internado: Dra. Betty San Martín

2014

*Dedicado a mis padres, hermana, abuelos,
tíos y a toda mi familia por el constante apoyo y el
amor incondicional que siempre los ha caracterizado.*

AGRADECIMIENTOS

Primeramente agradezco a mis padres Miguel y Carmen por haberme apoyado, acompañado, comprendido en todos estos años de estudio y desarrollo profesional y personal, agradeciendo de corazón todos sus consejos y decisiones. También a mi hermana Paula por su confianza y apoyo. A mi Tata por sus infinitas enseñanzas y consejos. A mi Nina que al igual que mis padres siempre ha estado apoyándome en todas mis decisiones siendo un apoyo importante en mi vida y a mi prima María de los Ángeles que es prácticamente mi segunda hermana. Por último a mis abuelos que ya no están ya que gracias a su existencia y enseñanzas pude crecer a la persona que soy actualmente. A todos los nombrados anteriormente los quiero muchísimo y les agradezco el estar siempre a mi lado.

Agradezco a la vida por haberme llevado a estudiar a Valparaíso, en donde conocí a prácticamente mi mejores amigos. En Bachillerato al Pepe y al Mario y en ese mismo tiempo al Marco, Rodrigo y Pedro los que conocí en la pensión y posteriormente vivimos juntos por muchos años en un departamento que compartíamos. Y luego en Química y Farmacia al Alexander, el Camilo, Juanito, Felpo, Panchito, el Kike, el Juan, el David, la Ale, la Javi, la Cata, la Caro, la Xio, la Vivy, la Vinxu, la Fran, la Dani, donde nunca olvidare nuestras jornadas de estudio masivo en mi departamento con mucha comida y pasteles. En donde cada uno apporto de manera distinta a mi desarrollo personal siendo importantes personas en mi vida y a los cuales quiero mucho.

Dentro de los años de estudio también agradezco a los profesores que realmente marcaron mi formación de manera positiva, en primer lugar a la profesora Soledad Lobos, la cual fue mi directora de internado y es alguien que realmente admiro mucho, también a la profesora Leticia Luna quien me aconsejó en los momentos adecuados, a la profesora Patricia Acuña y el profesor Waldo que a pesar de haber sufrido en sus ramos los considero muchísimo por haber crecido más como estudiante.

Cuando me vine a realizar mi práctica y posterior internado a Santiago agradezco mucho la oportunidad que me dio el Laboratorio de Farmacología Veterinaria de la Universidad de Chile, más bien a la Dra. Betty y la Dra. Daniela, las que confiaron en mis capacidades y a todos los que conocí, en especial al Aldo, el Diego, la Naty, el Oscar, el Nico, JP, el Yester, al Peter, el Eti, y a todos y todas. Siendo un lugar importante para mi desarrollo profesional y personal. Y también el haber realizado en ese tiempo el postítulo de Análisis Instrumental Orgánico en la U. de Chile en donde incorporé muchos conocimientos para ser un mejor profesional.

Finalmente agradezco la oportunidad de dejar mi aporte en la carrera de Química y Farmacia, donde fue la de diseñar el logo que la identifica. Sintiéndome orgulloso de ser un Farmacéutico formado en una de las mejores escuelas de farmacia del país.



ÍNDICE GENERAL

Dedicatoria.....	I
Agradecimientos.....	li
Índice General.....	lii
Resumen.....	Iv
Summary.....	V
I. Introducción.....	1
II. Objetivos.....	10
II.1. Objetivo general.....	10
II.2. Objetivos específicos.....	10
III. Metodología.....	11
III.1. Materiales y reactivos.....	11
III.2. Equipos e instrumentos.....	12
III.3. Procedimiento experimental.....	12
III.3.1. Selección, almacenaje y pretratamiento de las muestras.....	12
III.3.2. Fortificación de las muestras.....	13
III.3.3. Evaluación del método de extracción.....	13
III.3.4. Cuantificación de POC en GC-ECD.....	15
III.4. Parámetros cromatográficos.....	17
III.5. Validación del método analítico.....	18
III.5.1. Especificidad.....	18
III.5.2. Linealidad.....	20
III.5.3. Sensibilidad.....	21
III.5.4. Límite de detección y Límite de cuantificación.....	21
III.5.5. Precisión del método.....	21
III.5.6. Exactitud.....	22
IV. Resultados y discusión.....	23
IV.1 Evaluación del método de extracción y optimización de los parámetros cromatográficos.....	23
IV.2 Parámetros cromatográficos.....	27
IV.2.1. Número de platos teóricos, altura del plato teórico, factor de capacidad y factor de selectividad.....	27
IV.2.2. Resolución.....	30
IV.3 Validación del método.....	31
IV.3.1. Especificidad.....	31
IV.3.2. Linealidad.....	34
IV.3.3. Sensibilidad.....	37
IV.3.4. Límite de detección y Límite de cuantificación.....	37
IV.3.5. Precisión.....	37
IV.3.5.1. Repetibilidad.....	38
IV.3.5.2. Precisión intermedia.....	39
IV.3.6. Exactitud.....	41
V Conclusiones.....	42
VI. Sugerencias.....	43
VII. Bibliografía.....	44

RESUMEN

Es necesario contar con una regulación respecto a las diversas sustancias riesgosas para la salud humana, como lo son los plaguicidas organoclorados (POC). Los cuales no solo se encuentran en el medio ambiente en concentraciones muy pequeñas, sino que también se bioacumulan en organismos vivos como por ejemplo el salmón, la trucha y sus derivados como la harina y el aceite de pescado.

El laboratorio de Farmacología Veterinaria de la Universidad de Chile (FARMAVET), es uno de los laboratorios autorizados por el Servicio Nacional de Pesca (SERNAPESCA) para regular éstos plaguicidas, mediante programas de control de sustancias prohibidas y no autorizadas.

Éste trabajo de internado se basó en optimizar un método para la cuantificación de 18 POC en aceite de pescado, analizados en un cromatógrafo de gases acoplado a un detector de captura de electrones (GC-ECD), teniendo como objetivos el disminuir el tiempo de análisis de cada muestra, evaluar el método de extracción y la posterior validación de la metodología analítica.

Los resultados demostraron que fue posible disminuir el tiempo del análisis en el GC-ECD, debido a las mejoras en los parámetros del equipo y la utilización de una columna capilar específica para compuestos clorados. Además se evaluó el método de extracción actual del laboratorio comparándolo con otros nuevos, para realizar algún cambio u optimización de este. Pero teniendo en cuenta el efecto de matriz, no fue posible validar la metodología analítica para ningún POC, ya que a pesar de cumplir con los parámetros de linealidad, sensibilidad y precisión, no fue validada la exactitud. Los parámetros fueron definidos para cada analito de manera individual.

SUMMARY

It is essential to have regulations for dangerous substances to human health such as organochloride plaguicides (OCP). This plaguicides can be founded in the environment at low concentrations as well in living organisms such as salmon and trout, and their derivate fish flour and fish oil, by bioaccumulation.

The Laboratory of Veterinary Pharmacology of Universidad de Chile (FARMAVET) is one of the laboratories authorized by the National Fishing and Aquaculture Service (SERNAPESCA) to regulate these plaguicides by prohibited through control programs of prohibited and non authorized substances.

The aim of this internship study was optimize a quantification method to detect 18 OCP in oil fish by a gas chromatography coupled with an electron capture detector (GC-ECD), to diminish the time of analysis of every sample assessing the extraction method and its validation.

Results show that is possible to decrease the time of análisis on GC-ECD due to improvements on the equipment parameters and the utilization of a specific capillary column for chlorine compounds. Additionally we evaluated the currently extraction method used in the lab, by comparison with some new ones, with recently described methods to made some modifications or optimize it. Considering the matrix effect it was no possible to validate the analytical methodology for no one of the 18 POC, the exactitude was not validated, despite the fact that linearity, sensibility and precision parameters were obtained. Parameters were defined for each analyte individually.

I. INTRODUCCIÓN

Los plaguicidas son sustancias destinadas a prevenir, destruir o controlar cualquier plaga, incluyendo las especies no deseadas de plantas o animales que causan perjuicio o que interfieren de cualquier otra forma en la producción, elaboración, almacenamiento, transporte o comercialización de alimentos y otros productos agrícolas. ⁽¹⁾

Pese a que los beneficios obtenidos a partir del uso de plaguicidas son numerosos, la utilización a escala mundial de grandes cantidades de estos compuestos ha dado origen a un conjunto de problemas que afectan al medio ambiente y a la salud humana. De hecho, el uso continuado e incontrolado de los plaguicidas, así como la elevada persistencia de muchos de ellos en el medio ambiente, inciden directamente sobre la salud humana y la supervivencia de numerosas especies. En este sentido, es posible encontrar residuos de plaguicidas en frutas, verduras, aguas, suelos, etc. como consecuencia de su utilización en actividades agrícolas, industriales y domésticas. ⁽²⁾

El impacto negativo sobre el organismo humano depende de la concentración, la susceptibilidad a la degradación, la estabilidad en el medio ambiente, posibilidad de bioacumulación y bioconcentración y la capacidad de inserción en la cadena alimentaria humana, entre otros. ⁽³⁾ Al respecto, el riesgo de exposición a plaguicidas organoclorados (POC) se asocia fundamentalmente con la exposición a largo plazo, debido a su persistencia en el medio ambiente, acumulación en la grasa corporal y carcinogenicidad en animales de experimentación⁽⁴⁾ y en humanos, ⁽⁴⁾ acumulándose en tejidos como glándulas mamarias y cerebro.⁽⁵⁾ Cabe destacar, que estudios recientes han demostrado que el salmón cultivado contiene concentraciones elevadas de contaminantes orgánicos persistentes, incluyendo plaguicidas clorados. ⁽⁶⁾

Debido a que la utilización de plaguicidas ofrece ventajas tan importantes para el rendimiento de los cultivos, hace que sea muy difícil prescindir de esta práctica tal y como está concebida hoy en la agricultura. Sin embargo, no hay que olvidar que se trata de sustancias que han de ser utilizadas adecuadamente para evitar su toxicidad tanto para quienes los aplican en el campo de trabajo, como para el medio ambiente y para los

consumidores de los alimentos, ya que en éstos pueden quedar residuos de los tratamientos utilizados. Es por esto que para que no representen riesgos para la salud de los consumidores, los plaguicidas deben utilizarse siguiendo los códigos de buenas prácticas agrícolas.⁽²⁾

Por otra parte, debido a su naturaleza lipofílica, es que se ha descrito su concentración y bioacumulación en la cadena alimentaria. Por esta razón se pueden encontrar en los alimentos de origen animal, principalmente en la carne y tejidos grasos, como también en los productos lácteos, huevos y pescado, entre otros⁽³⁾. Además existe una real preocupación por la posible contaminación de las aguas con POC, ya que éstos son compuestos orgánicos que persisten en el medio ambiente durante años.⁽⁵⁾

En lo que respecta a la salmonicultura, la obtención de los productos derivados del salmón se divide en tres procesos, primero la piscicultura, en donde se encuentran presentes los procesos de fertilización, incubación, eclosión y alevinaje; segundo la mar, donde se desarrolla la smoltificación, engorda, cosecha y tercero la faena, que consta de productos, desechos y distribución. En el último proceso en las plantas se comienza a dar forma a los diferentes productos, según su destino. Para garantizar la sustentabilidad de esta industria, los residuos orgánicos de los salmones, son enviados a plantas reductoras especializadas con el propósito de tratar esta materia prima, con el fin de producir harina y aceite de salmón de alta calidad. Siendo así como se completa el ciclo productivo del salmón.⁽⁷⁾

Cabe destacar, que el aceite de pescado es hoy día un valioso producto de alto valor nutricional. Aunque esto no fue siempre así; el aceite originalmente fue considerado un "segundo producto" de la fabricación de la harina de pescado, un producto de gran importancia en la nutrición animal. Este segundo producto, que se desechaba inicialmente, comenzó a ser utilizado en la fabricación de pinturas, barnices, resinas, entre otros y también esporádicamente como combustible. Más tarde comenzó a utilizarse en la fabricación de mantecas y margarinas, previa hidrogenación y posteriormente en la preparación de aceites comestibles mezclado semihidrogenado y fraccionado en diferentes proporciones con aceites vegetales. Sin embargo, gracias al descubrimiento de

las propiedades benéficas de los ácidos grasos omega-3 que los aceites marinos contienen en alta proporción y su utilización en la preparación de alimentos o suplementos alimentarios, actualmente el aceite de pescado es un producto escaso, de alto valor comercial y de creciente demanda por sus propiedades nutricionales. ⁽⁸⁾

En lo que respecta al aceite, SERNAPESCA se encarga de normar las plantas salmoneras y sus exportaciones hacia mercados de la comunidad Europea, Argentina, Brasil y China. ⁽⁹⁾ Para ello, posee una red de laboratorios de análisis con calidad asegurada para la determinación de sustancias prohibidas y no autorizadas de diferentes centros de cultivo. ⁽¹⁰⁾ En caso de resultados desfavorables, es decir que un producto sobrepasa los Límites Máximos Residuales (LMR) internacionales presentados en la tabla N°1, el laboratorio de verificación comunica directamente al Departamento de Sanidad Pesquera y a la Unidad de Salud Animal a nivel central. Luego, SERNAPESCA informa de estos resultados al Ministerio de Salud. Además, se notifica a la Unidad de Acuicultura para que adopte las medidas que estime pertinentes e incorpore en su programa de inspecciones una visita al centro de cultivo involucrado. ⁽¹¹⁾

Tabla 1: LMR de POC en aceite de pescado según la comunidad Europea. ⁽¹²⁾

Sustancias prohibidas o indeseables	LMR (mg/Kg)	Sustancias prohibidas o indeseables	LMR (mg/Kg)
Dieldrin	0,1	Alfa-endosulfan, beta-endosulfan	0,005
Parlar 26, 50 y 62	0,2	Heptacloro, heptacloro epóxido	0,2
Oxiclordano, cis-clordano, trans-clordano	0,05	HCH – alfa	0,2
Endrin	0,05	HCH – beta	0,2
DDT,DDE	0,5	HCH – gamma	2,0

Además, desde el año 1997, FARMAVET (Laboratorio de Farmacología Veterinaria de la Universidad de Chile) actúa como Laboratorio Oficial de Verificación del Servicio Nacional de Pesca, en el Programa de Control de Residuos de Medicamentos y Contaminantes para productos hidrobiológicos de exportación. Formando además parte de la Red Nacional de laboratorios para el Servicio Agrícola y Ganadero, cuya función es llevar a cabo el Programa Nacional de Control de Residuos para carnes de cerdo, ave, bovino y ovino, leche y miel destinadas a la exportación y consumo nacional. En forma

complementaria, desde el año 2010 se cuenta con el reconocimiento por parte del Instituto de Salud Pública (ISP) como Laboratorio Bromatológico, lo que valida los resultados de los análisis realizados en FARMAVET ante esta institución y el Ministerio de Salud.⁽¹³⁾

Otro aspecto importante de destacar, es que este laboratorio, se ha especializado en la detección de residuos de medicamentos de uso veterinario y contaminantes químicos en diferentes productos de origen animal destinados a la exportación y consumo nacional. El cual está acreditado hasta el 2016 por el Instituto Nacional de Normalización (INN) bajo la norma NCh-ISO 17025 Of. 2005.^(13,14)

En la figura N° 1, se presenta un esquema que resume el Plan Nacional de Control de Residuos de Antibióticos y Contaminantes de los Alimentos de productos de acuicultura en FARMAVET.

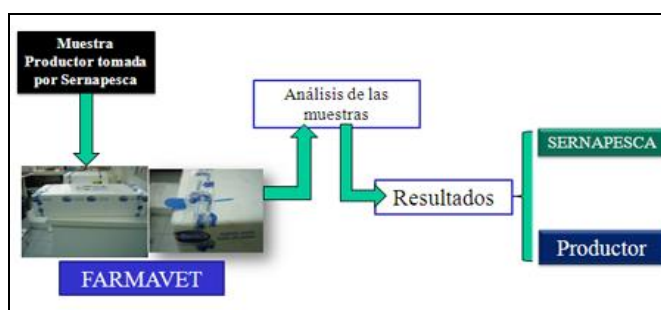


Figura N°1: Esquema plan nacional de control de residuos FARMAVET

Entre los 51 métodos analíticos acreditados y validados que se realizan en el Laboratorio, se encuentra el método confirmatorio para plaguicidas organoclorados en matriz de aceite de pescado, mediante Cromatografía Gaseosa acoplada a un Detector de Captura Electrónica (GC-ECD). Al respecto, esta técnica permite separar los componentes de una mezcla en el tiempo en función de la temperatura, y por otra parte el detector ECD utiliza una fuente de radiación β^- (Níquel 63) para bombardear el gas portador (que puede ser helio o nitrógeno) que pasa a través de una cámara de ionización, generándose de esta forma un plasma de iones positivos, radicales libres y electrones térmicos.⁽¹⁵⁾ Siendo

éste tipo de detector el más sensible disponible para el análisis de compuestos electrófilos, tales como hidrocarburos clorados y residuos de plaguicidas ⁽¹⁶⁾

En la Figura 2 se muestra los principales componentes del Detector de Captura Electrónica. En ella se observa el flujo de electrones que debe ser continuo y lento que se establece entre un ánodo (fuente radioactiva β^- emisora) y un cátodo. Al pasar una sustancia electrófila algunos electrones son absorbidos, disminuyendo la corriente eléctrica.

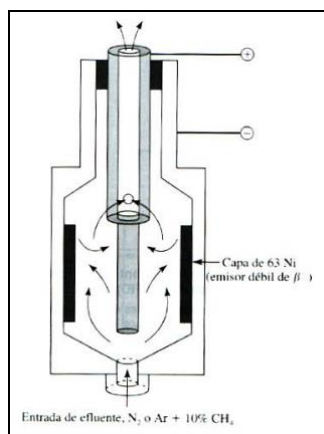
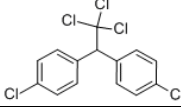
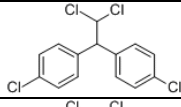
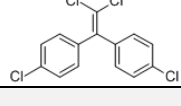
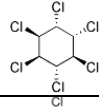
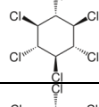
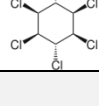
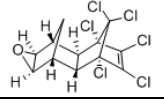
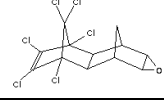
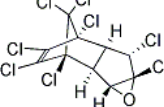
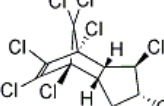
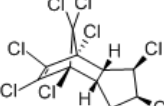
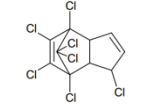
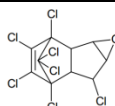

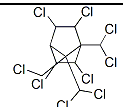
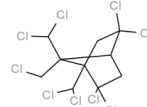
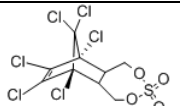
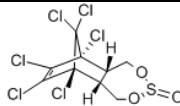
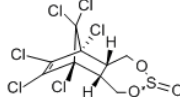


Figura N°2: Componentes del Detector de Captura Electrónica.

En el laboratorio, también se analiza en músculo de salmón y harina de pescado la presencia de los plaguicidas HCH-alfa; HCH-beta; HCH-gama; Heptacloro; Heptacloro epóxido; Oxiclordano; Transclordano; Cisclordano; Dieldrin; Endrin; DDE; DDD; DDT; Parlar 26; Parlar 50; Parlar 62; Alfa-Endosulfan; Beta-Endosulfan (tabla N° 2). Respecto de las muestras de músculo se analizan 10 tipos de plaguicidas, mientras que en las muestras de harina y aceites de pescado se reconocen un total de 18. Además Para aceite de pescado se determina el compuesto Aldrin, mientras que en harina, se determina Dieldrin.

Tabla N° 2: Clasificación de los plaguicidas Organoclorados de acuerdo a su estructura química ⁽¹⁷⁾

Grupo del DDT (diclorodifeniltricloroetano) (clorobenzilatos)			
DDT			
DDD			
DDE			
Grupo del Hexaclorociclohexano (HCH)			
Isómeros	Alfa-HCH		
	Beta-HCH		
	Gama-HCH		
Grupo del Aldrin (ciclodienos)			
Derivados del dimetanonaftaleno	Aldrin		
	Dieldrin	Epóxido del anterior	
	Isodrin	Isómero de aldrin	
	Endrin	Epóxido del anterior	
Derivados del indano	Clordano		
	Oxiclordano	Producto de degradación del clordano	
	Tran-sclordano		
	Cis-clordano		
	Heptacloro	Isómero de clordano	

	Heptacloro epóxido	Epóxido del anterior	
Grupo de los derivados de trementina			
Derivados del Toxafeno	Parlar 26		
	Parlar 50		
	Parlar 62		
Derivados del Endosulfan	Endosulfan sulfato	Producto de transformación de endosulfan	
	Alfa-endosulfan	Isómeros de endosulfan	
	Beta-endosulfan		

Es importante destacar, que independiente del tipo de matriz que se desea analizar representa un trabajo muy complejo debido a la naturaleza lipofílica de los compuestos organoclorados. ⁽³⁾ Al respecto, el método de extracción utilizado en el laboratorio considera una serie de pasos sucesivos en los cuales se utilizan diferentes solventes orgánicos para extraer y concentrar los POC, para luego cuantificarlos en el GC-ECD. La etapa de extracción es realizada por los Técnicos Químicos del laboratorio según protocolos descritos en la orden de trabajo IT LF N° 169 A, de FARMAVET.

En relación al método confirmatorio para plaguicidas organoclorados utilizado actualmente en FARMAVET, se requiere primero de unas 5 a 7 horas para la extracción por solvente de los POC y luego de aproximadamente 190 minutos por cada muestra para la determinación de los 18 residuos de POC por CG/ECD. Además considerando que los tiempos de entrega de resultados en el laboratorio son de importancia para quienes

solicitan los análisis y que además durante ciertas temporadas durante el año existe una alta demanda del cromatógrafo para la cuantificación de Diclorvos (Plaguicida organofosforado)⁽¹⁸⁾ y Cipermetrina/Deltametrina (plaguicidas piretroides)⁽¹⁹⁾ en otras matrices como músculo de salmón o harina de pescado y algunas veces en agua. Es por ello que es de mucho interés de FARMAVET optimizar y validar un método que permita disminuir los tiempos de trabajo.

Según la Norma Chilena NCh-ISO 17025.Of-2005, la validación de un método analítico se define como la confirmación mediante examen y entrega de evidencias objetivas, es decir, que se cumplen los requisitos particulares para el uso previsto.⁽¹⁹⁾

La validación de un método se realiza mediante una serie de pruebas normalizadas y experimentales de las que se obtienen datos sobre su exactitud, precisión, especificidad, límite de detección, linealidad, recuperación, incertidumbre de la medición y estabilidad. El proceso que ha de seguirse para ello debe constar por escrito como procedimiento normalizado de trabajo.

En la tabla 3 se muestran los diferentes parámetros de desempeño del método y lo que muestran:^(21,22)

Tabla N° 3: Parámetros de desempeño del método de validación

Parámetros	Definición
Selectividad	Mide la capacidad del método para identificar/cuantificar los analitos en presencia de otras sustancias endógenas o exógenas en una muestra de la matriz en las condiciones exigidas por el método.
Linealidad	Aptitud de un método para obtener resultados proporcionales a la concentración del analito en la muestra.
Exactitud	Medición de la diferencia entre los resultados obtenidos con un valor de referencia aceptado.
Precisión	Grado de concordancia (grado de dispersión) entre una serie de mediciones obtenidas a partir de múltiples muestreos de una muestra homogénea bajo condiciones establecidas. La precisión puede ser considerada en tres niveles: Repetibilidad o repetitividad: obtenida bajo las mismas condiciones establecidas en un intervalo corto de tiempo, por un mismo analista, en el mismo equipo y con las mismas muestras. Presenta la menor variabilidad Precisión intermedia: obtenida dentro del laboratorio por diferentes analistas, diferentes equipos, días distintos y con la misma muestra homogénea. Componente importante de la incertidumbre.

	Reproducibilidad: obtenida entre laboratorios como resultado de estudios interlaboratorios diseñados para estandarizar la metodología. Presenta la mayor variabilidad.
Limite de detección	Concentración más baja del analito en una muestra que puede ser detectada pero no necesariamente cuantificada con exactitud.
Limite de cuantificación	Cantidad más baja de un analito en una muestra que puede ser determinada cuantitativamente con precisión y exactitud.
Estabilidad	Propiedad de una muestra, preparada para su cuantificación, de conservar su integridad fisicoquímica y la concentración del analito después de almacenarse durante un tiempo determinado bajo condiciones específicas.
Robustez	Grado en que los resultados se ven afectados por cambios menores en la condiciones experimentales descritas en el método, por ejemplo cambios en la temperatura, pH, concentración del reactivo, etc.
Incertidumbre	Parámetro asociado con el valor de una medición, que caracteriza la dispersión de los valores que pueden atribuirse razonablemente al mesurando.

II. OBJETIVOS

II.1. Objetivo General

- Optimizar y validar un método analítico para la determinación de plaguicidas organoclorados en aceite de pescado a través de cromatografía gaseosa acoplada a detector de captura electrónica (CG-ECD).

II.2. Objetivos específicos

- Evaluar el método de extracción por solvente utilizado actualmente en el laboratorio para cuantificar plaguicidas organoclorados en aceites de pescado y evaluar la capacidad de otros solventes que permitan disminuir los elevados tiempos de extracción.
- Optimizar los parámetros cromatográficos tales como temperatura del horno; temperatura de inyección; temperatura del detector; flujo del gas portador y flujo Make-up; tipo de columna considerando diferentes fases estacionarias (largo de columna, diámetros y espesores).
- Validar el método analítico para la determinación de plaguicidas organoclorados en aceite de pescado, a través de la determinación de los parámetros especificidad, linealidad, sensibilidad, límites de detección y cuantificación, precisión y exactitud.

III. METODOLOGÍA.

III.1. Materiales y reactivos.

Para la evaluación del método de extracción, se utilizaron reactivos de pureza analítica y solventes de grado cromatográfico. El reactivo sulfato de sodio anhidro para análisis EMSURE® Merck y los solventes n-Hexano LiChrosolv®; acetonitrilo LiChrosolv®; diclorometano LiChrosolv®; n-Nonano; éter dietílico EMSURE®, todos ellos de marca Merck y tolueno Ultimar® de marca MACRON Fine Chemicals.

Durante la medición por GC se utilizaron los gases Helio ultrapuro de grado 5.0 y Argón Metano (Metano 5,5% y Argón Bce) ambos de marca INDURA.

Para la fortificación de las muestras se utilizaron soluciones patrones que fueron utilizadas para construir las curvas de calibrado, las cuales se prepararon a partir de los siguientes estándares:

Tabla N°4 Estándares utilizados para la fortificación

Identificación del producto	Laboratorio	% Pureza
HCH-alfa	Dr. Ehrenstorfer	98,0
HCH-beta	Dr. Ehrenstorfer	98,5
HCH-gamma	Dr. Ehrenstorfer	98,5
Heptacloro	Dr. Ehrenstorfer	99,0
Heptacloro epóxido	Dr. Ehrenstorfer	98,5
Oxiclordano	Dr. Ehrenstorfer	99,0
Transclordano	Dr. Ehrenstorfer	98,0
Cisclordano	Dr. Ehrenstorfer	99,0
Dieldrin	Cerilliant	98,8
Endrin	Dr. Ehrenstorfer	99,0
DDT	Dr. Ehrenstorfer	98,5
DDE	Dr. Ehrenstorfer	98,5
DDD	Dr. Ehrenstorfer	99,0
Parlar 26	Cambridge Isotope Laboratories, Inc.	98,3
Parlar 50	Cambridge Isotope Laboratories, Inc.	98,1
Parlar 62	Cambridge Isotope Laboratories, Inc.	100,0
Alfa – Endosulfan	Dr. Ehrenstorfer	97,0
Beta – Endosulfan	Dr. Ehrenstorfer	99,5

Se utilizó para la extracción de los POC una solución de n-hexano saturado con acetonitrilo (hexano:acetonitrilo=1:1,3). Después de agitar vigorosamente ambos solventes, sólo se separó la fase correspondiente al hexano (solución 1). El acetonitrilo remanente se mezcló en igual proporción con n-hexano, se agitó vigorosamente para separar y conservar luego sólo la fase correspondiente a acetonitrilo (solución 2).

Para la purificación de las muestras se utilizó el método de extracción en fase sólida (EFS) usando columnas SPE Florisil® WatersSep-Pak® Vac 12 cc (2g) marca Waters.

Para la preparación de la muestra y el proceso de extracción, se utilizó solo material de vidrio, el cual fue lavado siguiendo el protocolo escrito de “Lavado de material del área de residuos” presente en el manual de procedimiento e instructivos del laboratorio.⁽¹²⁾

III.2. Equipos e instrumentos.

Durante la etapa de extracción se utilizaron: un agitador de tubos modelo Multi Reax marca Heidolph; una centrífuga modelo Sorvall Legend Mach 1.6 R marca Thermo Scientific; un baño termostático modelo CIMAREC marca Thermo Scientific; un sonicador modelo LUC-420 Power Sonic 420 marca LabTech; y una centrifuga para tubos Eppendorf modelo Symphony 2417R marca VWR international.

Para la determinación y cuantificación de los POC se utilizó un Cromatógrafo de Gases PerkinElmer modelo Clarus® 680 acoplado a un detector de captura de electrones PerkinElmer N610 – 0134 el cual contiene 15 mCi de Niquel 63.

III.3. Procedimiento experimental.

III.3.1. Selección, almacenaje y pretratamiento de las muestras.

Se trabajó con muestras de aceite de pescado libre de plaguicidas organoclorados que fueron recolectadas en el mismo laboratorio, en donde fueron homogenizadas en partes iguales para constituir una sola muestra representativa. Éstas se almacenaron en frascos de vidrio con tapa a temperatura ambiente en ausencia de luz.

III.3.2. Fortificación de las muestras.

Previo al dopaje de la muestra de aceite se prepararon las siguientes soluciones stock:

- Se preparó una muestra multicomponente de alfa-HCH; beta-HCH; gama-HCH; Heptacloro; Heptacoro epóxido; Cisclordano; Transclordano; Dieldrin; Eldrin; DDD; DDT; DDE; Alfa-Endosulfan; Beta-Endosulfan todos de concentración 4 µg/mL en n-Nonano como solvente. Esta solución fue codificada como MIX-POC.
- Además se prepararon 3 soluciones a partir de derivados del Toxafeno en n-Nonano. En la tabla 5 se indica la concentración y codificación de cada una.

Tabla N°5: Concentración de los estándares derivados del Toxafeno

Concentración (µg/mL)	Codificación
1,18	Parlar 26
1,18	Parlar 50
1,20	Parlar 62

- Por último, una solución de oxiclordano 10 µg/mL, que viene comercialmente preparado en n-Hexano.

Para la preparación de la muestra, se mezclaron 10 gramos de aceite de pescado con MIX-POC, Parlar 26, Parlar 50, Parlar 62 y Oxiclordano de tal manera de obtener una muestra con los 18 POC de 60 ng/mL. La muestra resultante fue sometida a los distintos procesos de extracción.

III.3.3. Evaluación del método de extracción.

Para cumplir con uno de los objetivos específicos, se realizó una evaluación del método actual de extracción del laboratorio (método de control) y se comparó con otros 4 métodos alternativos. Para cada uno se prepararon blancos y muestras fortificados con los estándares. A continuación se describen el método utilizado por el laboratorio y los métodos alternativos.

- **Método de control:**

1. 50 mL de muestra de la aceite homogenizada manualmente se centrifugaron durante 10 min a 2000 rpm. Luego 10 g. del sobrenadante se mezclaron en un tubo de vidrio con 15 mL de la solución 1 y se agitaron en un agitador de tubos (agitador) por 5 min.
2. Luego se agregaron 15 mL de la solución 2, para agitar nuevamente (agitador) por 5 min. La mezcla resultante fue centrifuga por 5 min a 2000 rpm y sólo la fase translúcida fue trasvasijada a un tubo limpio.
3. La fase resultante fue sometida a dos nuevas extracciones con 10 mL de cada solvente.
4. Los extractos translucidos obtenidos de cada extracción se mezclaron y centrifugaron por 20 min a 2000 rpm. La fase inferior fue descartada
5. El extracto obtenido se mezcló con 10 mL de diclorometano en un baño de agua a 45 °C bajo flujo de nitrógeno. Se agito por 5 min (agitador).
6. La muestra sonicada por 5 min se paso a través de una columna de Florisil que contenía $0,5 \pm 0,1$ g de sulfato de sodio anhidro.
7. El eluato fue recibido en un tubo de vidrio de 50 mL y llevado a sequedad bajo flujo de nitrógeno en baño de agua entre 40 y 50 °C.
8. Se agregaron 3 mL de acetonitrilo y 0,5 g ($\pm 0,1$) de sulfato de sodio anhidro, para luego agitar (agitador) por 1 min, sonicar durante 5 min y centrifugar a 2000 rpm durante 5 min.
9. La solución de acetonitrilo resultante fue secada en un tubo de vidrio de 10 mL bajo flujo de nitrógeno en baño de agua entre 40 y 50 °C.
10. Se agregaron 100 uL de NONANO para agitar (agitador) (2 min) y sonicar (5 min).
11. La muestra resultante fue trasvasijada a un vial con inserto de vidrio para análisis.

- **Método alternativo N°1:** se cambió del método de control el diclorometano (punto 5) por acetato de etilo:ciclohexano (1:1).

- **Método alternativo N°2:** se cambió (punto 8) el acetonitrilo por una solución de acetonitrilo:ácido acético (1:0,01)

- **Método alternativo N°3:** Se modificó desde el punto 5 en adelante, de la siguiente manera:

- Se agregaron 10 mL de n-Hexano para luego agitar, sonicar y separar en la columna de extracción en fase sólida SPE Florisil®. Para esto, primero se acondicionó con 3 mL de Hexano/Éter dietílico (1:1) y posteriormente 3 mL de n-Hexano. La muestra se eluyó con 10 mL de Hexano/Éter dietílico (1:1) y se concentró bajo flujo de nitrógeno entre 40 y 50 °C en baño termorregulado.
- Luego se agregaron 10 mL de n-Hexano, se agitó, sonicó y se pasó por una columna de gel de sílice parcialmente desactivada, que se lavo antes de su uso con 10 mL de n-Hexano y 6 veces con 3 mL de hexano/tolueno 3:7, después de eluir la muestra. Posteriormente el eluido se concentró bajo flujo de nitrógeno entre 40 y 50 °C en baño termorregulado.
- Finalmente, se continuó con el procedimiento control a partir del punto 10.
- **Método alternativo N°4:** se modificó el punto 11 centrifugando a 13.000 rpm por 5 minutos en la centrifuga para tubos eppendorf, previo al trasvasije en el vial con inserto de vidrio para análisis.

III.3.4. Cuantificación de POC en GC-ECD.

La determinación de la concentración de los plaguicidas organoclorados se realizó a través de GC-ECD, empleando curvas de calibrado preparadas en n-Nonano a partir de las soluciones patrones, cuyos rango de concentración se resumen en la tabla 6. Tanto las soluciones patrones de la curva de calibrado como el blanco se prepararon en ausencia y presencia de la matriz aceite. En las tablas 7, 8 y 9 se muestran las condiciones de trabajo para el GC que se utilizaba en el laboratorio y las dos nuevas que se implementaron.

Tabla 6: Rango de concentración para la curva de calibrado.

ANALITO POC	Concentración (ng/mL)			
	20	40	80	120

Cabe mencionar que se utilizó como método de extracción, en la confección de las curvas de calibrado, el que dio resultado más óptimos.

Tabla N°7: Condiciones de análisis cromatográfico utilizados en el laboratorio.

Columna	VF – 5MS 30 m x 0,25 mm x 0,25 mm marca Agilent.
Gas portador	Helio ultrapuro grado 5.0
Inyector	Volumen de Inyección: 2,5 uL Temperatura: 270 °C
Horno	Programa de temperatura: inicialmente el horno se mantiene a 90 °C, luego la temperatura aumenta de 1 °C hasta llegar a los 140 °C, posteriormente sube de 0,5 °C hasta llegar a los 200 °C, y finalmente llega hasta los 230 °C aumentando de 0,5 °C.
Detector ECD	Temperatura: 320 °C Gas Flujo Make up: Argón Metano (Metano 5,5% y Argón Bce) con un flujo de 30 mL/min.
Tiempo de corrida	230 minutos.

Tabla N°8: Condiciones modificadas (C01)

Columna	Capilar TG- 1701 MS marca Thermo Scientific
Inyector	Volumen de Inyección: 2,5 uL Temperatura: 220 °C
Horno	Programa de temperatura: inicialmente el horno se mantiene a 80 °C por 1 minuto, luego la temperatura sube 5 °C por cada 20 minutos hasta llegar a los 250 °C.
Detector ECD	Temperatura: 300 °C Gas Flujo Make up: Argón Metano (Metano 5,5% y Argón Bce) con un flujo de 30 mL/min.
Tiempo de corrida	55 minutos.

Tabla N°9: Condiciones modificadas (C02)

Columna	Capilar TG- 1701 MS marca Thermo Scientific
Inyector	Volumen de Inyección: 2,5 uL Temperatura: 220 °C
Horno	Programa de temperatura: inicialmente el horno se mantiene a 100 °C por 1 minuto, luego la temperatura sube hasta llegar a los 150 °C y finalmente aumenta cada 8 °C hasta llegar a los 30 minutos para alcanzar los 250 °C.
Detector ECD	Temperatura: 300 °C Gas Flujo Make up: Argón Metano (Metano 5,5% y Argón Bce) con un flujo de 30 mL/min.
Tiempo de corrida	61 minutos.

En la tabla 10 se resumen las características de la columna adquirida especialmente para estudiar los compuestos clorados.

Tabla N° 10: Especificaciones de columna para GC

Columna tipo	Capilar
Modelo	TG-1701 MS
Marca	Thermo Scientific
Descripción	14% Cianopropil polisiloxano
Especificación	Especial para compuestos clorados o halogenados
Largo	30 m.
I.D	0,32 mm.
Film	0,25 um.
T° max	260/280 °C

III.4. Parámetros cromatográficos.

- **Número de platos teóricos (N):**

Mide la capacidad de la columna cromatográfica para separar los analitos y demás componentes de la solución que se inyectan en el sistema cromatográfico, entregando información acerca de la eficacia de la columna. Al obtener un mayor número de platos teóricos, menor es la altura del plato teórico correspondiente, lo que lleva un aumento de la eficacia de la columna.

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{\omega} \right)^2 \quad (1)$$

Donde t_R = tiempo de retención y ω = ancho del pico cromatográfico.

- **Altura del plato teórico (H):**

Relaciona la eficacia de una columna con su longitud y se define como el cociente entre la longitud de la columna y su número de platos teóricos.

$$H = \frac{L}{N} \quad (2)$$

- **Factor de capacidad o retención (k'):**

Parámetro que se utiliza para describir las velocidades de migración de solutos en las columnas.

$$k' = \frac{t_R - t_M}{t_M} \quad (3)$$

- **Factor de selectividad (α):**

Es el cociente entre los factores de capacidad de dos picos cromatograficos.

$$\alpha = \frac{k'_B}{k'_A} = \frac{t_{R(B)} - t_M}{t_{R(A)} - t_M} \quad (4)$$

- **Resolución (R):**

Proporciona una medida cuantitativa de su capacidad de la columna para separar dos analitos. Este parámetro fue determinado a través del programa que utiliza el instrumento.

III.5. Validacion del metodo analitico.

III.5.1. Especificidad: para determinar si la matriz de aceite de pescado interfiere en la cuantificación de los plaguicidas organoclorados, se compararon estadísticamente las pendientes de la curva de calibrado obtenidas en presencia y en ausencia de este.

Para analizar estadísticamente la selectividad, se compararon las pendientes de ambos métodos, mediante la siguiente ecuación:

$$m \pm S_m t_{(n-2)} \quad (5)$$

Donde, m = pendiente ; S_m = desviación estándar de la pendiente y $t_{(n-2)}$ = valor tabulado de la distribución student (para $p=0,05$ con $n-2$ grados de libertad). Ambas desviaciones fueron determinadas mediante el software Origin 6.0.

Cuando $m_1 \pm S_m t_{(n-2)} = m_2 \pm S_m t_{(n-2)}$, se demuestra que las pendientes son similares, por lo que los métodos son significativos, por lo tanto no habría efecto de matriz. Para esto se compararon las varianzas (S_m^2) de cada pendiente mediante el test de Fisher, mediante la determinación de F_{cal} según:

$$F_{cal} = \left(\frac{S_1}{S_2} \right)^2 \quad \text{si } S_1 \gg S_2 \quad (6)$$

Como criterio de aceptación, si $F_{cal} < F_{tab}$, ambos métodos son homogéneos, y no habría diferencias significativas entre sus varianzas. Por otra parte, para comparar directamente la significancia entre las pendientes se determinó t_{cal} (ecuación 7) mediante el Test t-Student sólo si $F_{cal} < F_{tab}$, mientras que si $F_{cal} > F_{tab}$ el estimador t_{cal} (ecuación 9) se determino mediante el Test t-Welch.

Test t-Student:

$$t_{cal} = \frac{|\bar{X}_1 - \bar{X}_2|}{Sp \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}} \quad (7)$$

$$Sp = \frac{(n_1 - 1)S_1^2 + (n_2 - 1)S_2^2}{n_1 + n_2 - 2} \quad (8)$$

Donde \bar{X}_1 = promedio de datos de método 1; \bar{X}_2 = promedio de datos de método 2 ; n_1 = número de datos método 1 y n_2 = número de datos método 2

Si $t_{cal} < t_{tab}$ (con $p=0,05$ para $d_t = n_1 + n_2 - 2$), se puede concluir que no hay diferencia significativa entre ambos métodos, tanto en el valor de la pendiente como la varianza.

Test t- Welch:

$$t_{cal} = \frac{|\bar{X}_1 - \bar{X}_2|}{\sqrt{\frac{S_1^2}{n_1} + \frac{S_2^2}{n_2}}} \quad (9)$$

Siendo:

$$\partial_T = \frac{\left(\frac{S_1^2}{n_1} + \frac{S_2^2}{n_2}\right)^2}{\frac{\left(\frac{S_1^2}{n_1}\right)^2}{n_1 + 1} + \frac{\left(\frac{S_2^2}{n_2}\right)^2}{n_2 + 1}} - 2 \quad (10)$$

Si $t_{cal} < t_{tab}$ ($p=0,05$; ∂_t), se puede concluir que no hay diferencia significativa entre las pendientes de ambos métodos, pero de precisión significativamente diferentes.

III.5.2. Linealidad: Con el propósito de demostrar que la señal analítica y la concentración presentan un comportamiento lineal tipo I, es decir, que se puede utilizar el método de los mínimos cuadrados para proponer la ecuación de la recta, se realizaron los siguientes análisis estadísticos:

- **Coefficiente de correlación (r):** parámetro que permite determinar el ajuste del modelo lineal, fue determinado mediante el programa Origin 6.0.

Como criterio de aceptación de este coeficiente de determinó el estimador t_{cal} según la ecuación:

$$t_{cal} = \frac{|r|\sqrt{n-2}}{\sqrt{1-r^2}} \quad (11)$$

Donde n corresponde al número de puntos en la curva de calibrado, r el coeficiente de correlación, r^2 el coeficiente de determinación. Si el valor de t_{cal} es mayor a $t_{tab (n-2)}$ (al 95% de probabilidad) se puede concluir que existe una correlación lineal significativa entre ambas variables.

- **Comportamiento homocedástico:** parámetro que permite demostrar si la varianza de los residuos es constante. Para ello se evalúa F_{cal} (ec. 6).

Si, $F_{cal} < F_{tab}(\delta, \delta)$, las desviaciones son parecidas, se puede concluir que las variables son homocedásticas.

- **Distribución de los residuos:** Para evaluar la distribución normal de la diferencia entre los valores observados de la señal (Y) y los valores esperados para la señal de una concentración determinada (\hat{Y}), se utilizó el software Minitab 16 en el cual se generaron las gráficas de los residuos v/s ajustes, donde una distribución aleatoria alrededor del cero indica una distribución normal. Llamamos residuos a la diferencia entre los valores observados Y_i y los pronosticados \hat{Y}_i , a través de la siguiente ecuación: $Y_i - \hat{Y}_i$ (12)

III.5.3. Sensibilidad: Este parámetro fue determinado a partir de las pendientes de las respectivas curvas de calibrado utilizadas en éste trabajo.

III.5.4. Límite de detección (L.D.) y Límite de cuantificación (L.C.): Estos parámetros fueron determinados utilizando las siguientes ecuaciones:

$$LD = \frac{3S_{y/x}}{m} \quad (13)$$

$$LC = \frac{10S_{y/x}}{m} \quad (14)$$

Donde el $S_{y/x}$ es conocido como desviación estándar residual y fue determinada mediante el programa Origin 6.0.

III.5.5. Precisión del método: Se obtuvo a través de la repetibilidad y la precisión intermedia. Para esto se trabajó con 2 niveles de concentración: 20 ng/mL y 120 ng/mL.

- **Repetibilidad:** Para cada nivel de concentración se registró 3 veces la lectura de la señal analítica durante el mismo día, manteniendo las condiciones experimentales optimizadas.
- **Precisión Intermedia:** Para cada nivel de concentración el estudio se realizó durante 2 días consecutivos, por el mismo analista y bajo las condiciones experimentales establecidas.

Tanto la repetibilidad como la precisión intermedia fueron validadas mediante la determinación del coeficiente de variación (%CV) (ecuación 15), utilizando como criterio de aceptación el coeficiente de variación de Horwitz (%CV_H)(ecuación 16).

$$\%C.V. = \frac{S}{\bar{X}} \cdot 100 \quad (15) \qquad \%C.V._h = 2^{(4-0,5\log C)} \quad (16)$$

Siendo S la desviación estándar de las lecturas, \bar{X} el promedio de éstas y C la concentración de analito expresada en potencia de mg/L. Los rangos de aceptación de $\%CV_h$ para cada nivel de concentración de los POC se encuentran detallados en la tabla 11.

Tabla N°11: Criterio de aceptación de CV Horwitz.

Concentración de POC (ng/mL)	Criterio de aceptación de CV de Horwitz (%)
20	28,83
120	22,01

Como criterio de aceptación $\%CV$ debe ser inferior a $\%CV_h$, ya que de lo contrario los resultados presentarían errores de tipo sistemático.

III.5.6. Exactitud: es importante mencionar que para este trabajo no se disponía de un material de referencia certificado ni de una muestra de aceite positiva, es decir contaminada con POC. Es por esto que para la validación de la exactitud del método se utilizó una muestra de aceite fortificada con la totalidad de los analitos.

Después de determinar la concentración fortificada se procedió a determinar el porcentaje de recuperación (ecuación 17), como:

$$\%R = \frac{C_o - C_a}{C_a} \cdot 100 \quad (17)$$

Donde C_o es la concentración del analito detectada por GC y C_a la concentración adicionado a la muestra. La recuperación fue contrastada estadísticamente mediante el test de Student, comparando el valor de t_{cal} con el t_{tab} . Si $t_{cal} < t_{tab}$ se puede concluir que no existen

diferencias significativas con el 100% de recuperación. El valor de t_{cal} fue determinado mediante la ecuación 18.

$$t_{cal} = \frac{|\bar{X} - 100|\sqrt{n}}{S} \quad (18)$$

Donde X corresponde al % de recuperación, n= numero de replicas y S la desviación estándar de las replicas. Si el valor de t_{cal} es menor a $t_{tab}(p=0,05 \text{ y } n-1)$, se puede concluir que el método es exacto.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

IV.1 Evaluación del método de extracción y optimización de los parámetros cromatográficos.

En la figura N°3 se presenta el cromatograma obtenido del método actual del laboratorio (método control) con las condiciones del equipo resumidas en la tabla 7.

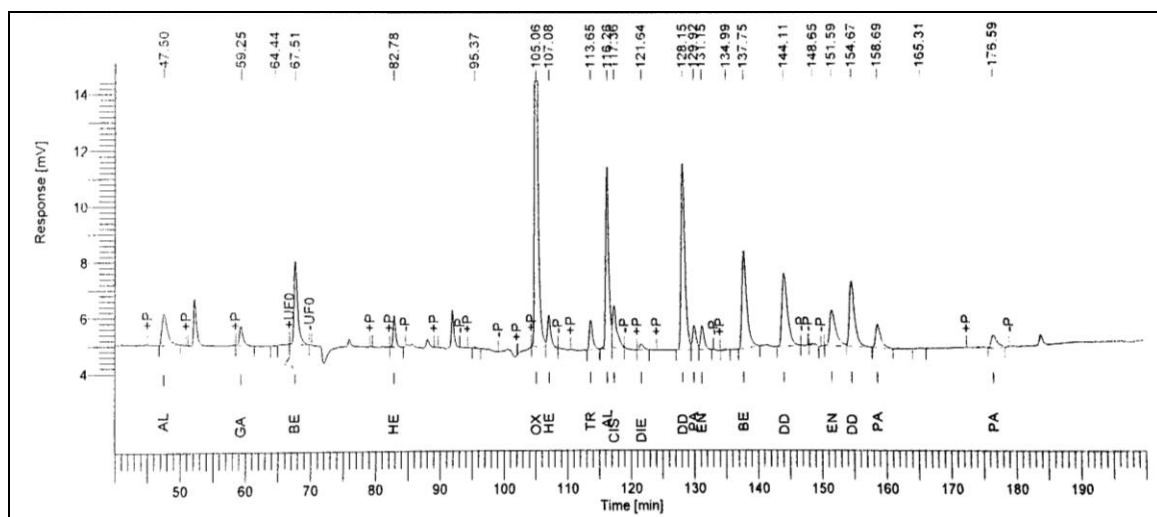


Figura N°3: Cromatograma del método actual de análisis de POC.

Las condiciones del equipo actualmente utilizadas en el laboratorio, son idóneas para el método de extracción actual, esto se demuestra en el cromatograma de la figura anterior, ya que

los analitos se separan cuantitativamente (Resolución superior a 1,5) y además se ha demostrado que no presentan efecto de matriz. Lamentablemente, en estas condiciones el tiempo final de la corrida es extremadamente extensa, no siendo lo más óptimo para un laboratorio de servicio como lo es FARMAVET. A continuación en la tabla N°12, se presentan los tiempos de retención y el factor de capacidad, para cada analito.

Cabe destacar que a pesar de los óptimos valores de resolución, el factor de capacidad para la totalidad de los analitos es superior a 20 (valor máximo recomendado), lo que explica los tiempos excesivos de la separación.

Tabla N°12: Tiempo de retención y factor de capacidad de los parámetros cromatográficos actuales del laboratorio.

Analito	t_R (min)	Factor de capacidad (k')
HCH – alfa	47,495	16,0
HCH – gama	59,248	20,2
HCH – beta	67,513	23,1
Heptacloro	82,781	28,6
Oxiclordano	105,062	36,5
Heptacloro Epoxido	107,084	37,2
Transclordano	113,653	39,6
Alfa – endosulfan	116,259	40,5
Cisclordano	117,356	40,9
Dieldrin	121,643	42,4
DDE	128,152	44,8
Parlar 26	129,920	45,4
Endrin	131,152	45,8
Beta – endosulfan	137,750	48,2
DDD	144,107	50,5
DDT	154,673	54,2
Parlar 50	158,688	55,7
Parlar 62	176,592	62,1

De acuerdo con lo anterior, primeramente se optimizaron las condiciones cromatográficas, probando sólo con la columna específica adquirida para los compuestos organoclorados. Estas pruebas fueron realizadas mediante cambios en las condiciones del equipo, las cuales se evaluaron mediante ensayo y error, eluyendo una preparación multicomponente en ausencia de matriz con

la finalidad de obtener una buena resolución con tiempos de retención más adecuados. Del total de todas las pruebas las condiciones codificadas como C01 y C02 fueron las que obtuvieron un mejor resultado para la resolución de los 18 plaguicidas.

A continuación a modo de ejemplo se presentan en las figuras N° 4 y 5 los cromatogramas de los POC en presencia y ausencia de matriz, para ambas condiciones de trabajo.

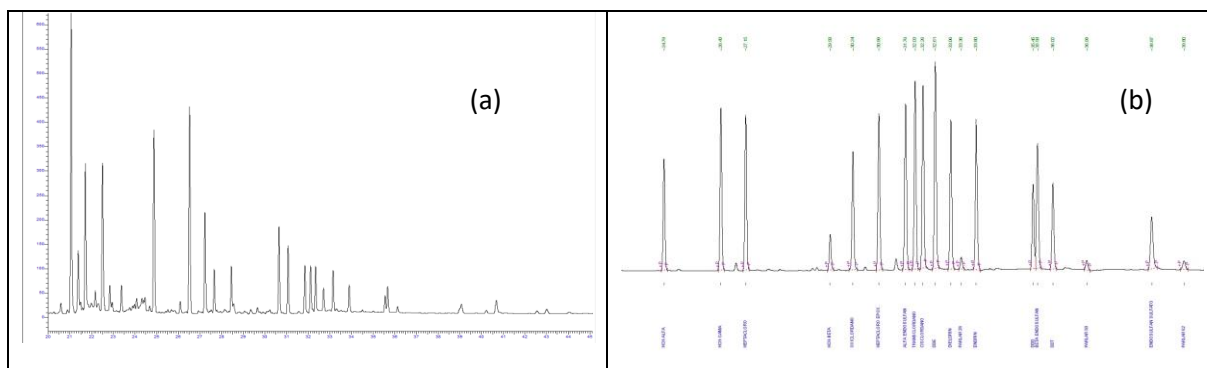


Figura N° 4 : Cromatograma correspondiente a la elución de los POC 0,5 ug/mL que fueron extraídos mediante la condición C01. (a) presencia de matriz, (b) ausencia de matriz.

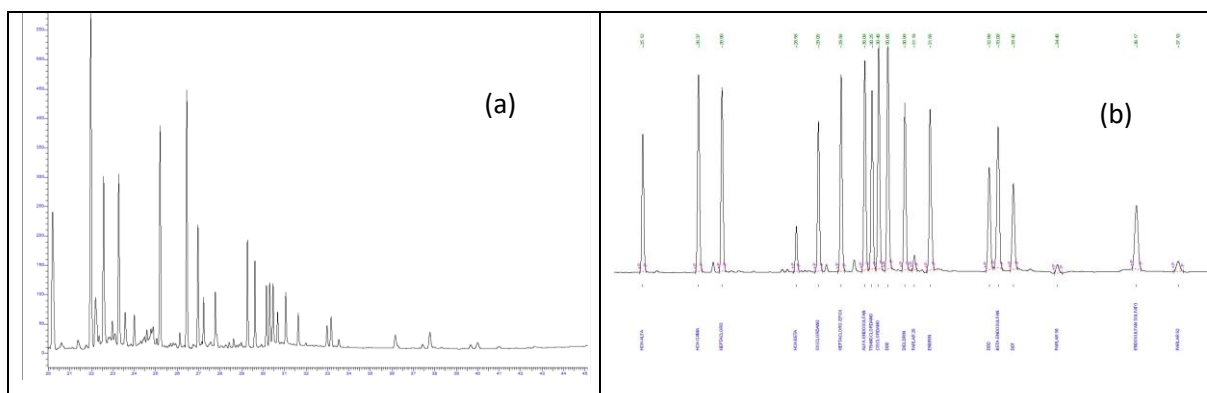


Figura N° 5 : Cromatograma correspondiente a la elución de los POC 0,5 ug/mL que fueron extraídos mediante la condición C02. (a) presencia de matriz, (b) ausencia de matriz.

Con las condiciones C01 y C02 se logró disminuir considerablemente el tiempo total de la separación cromatográfica, no afectando la resolución de los analitos analizados. A pesar de lo anterior, se descartó la condición C02 para los futuros análisis, ya que en presencia de matriz la resolución entre los analitos fue menor.

Posteriormente se evaluó el método de extracción con la nueva condición del equipo, realizando algunos cambios en el método actual del laboratorio (los que se mencionaron en el punto III.3.3). En estas condiciones en las figuras N° 6, 7 y 8 se presentan los cromatogramas registrados.

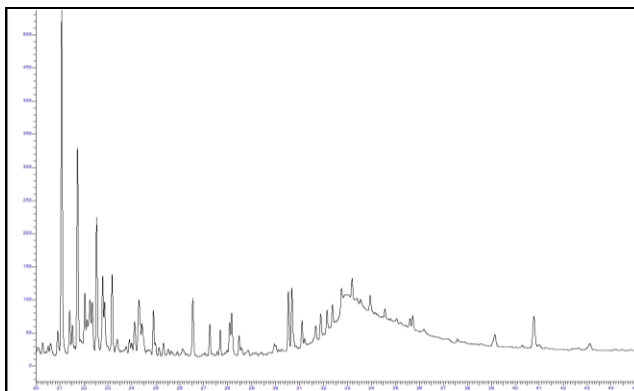


Figura N° 6: Cromatograma de los POC 0,5 ug/mL extraídos con el método alternativo N°1.

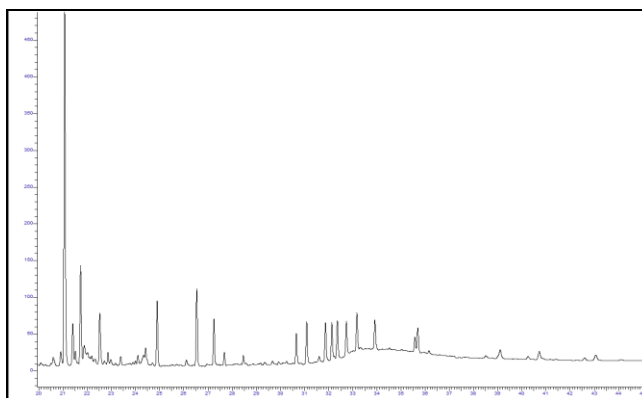


Figura N° 7: Cromatograma de los POC 0,5 ug/mL extraídos con el método alternativo N°2.

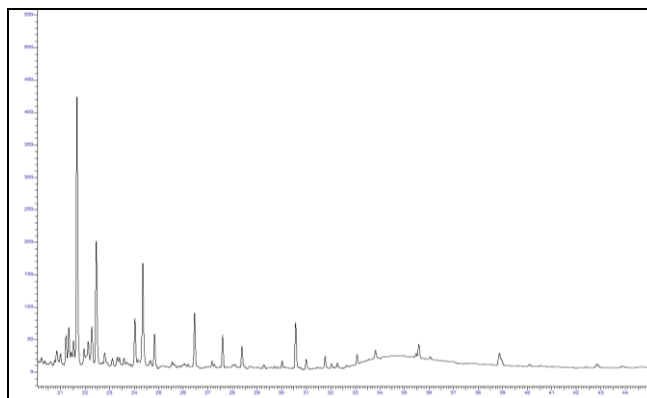


Figura N° 8: Cromatograma de los POC 0,5 ug/mL extraídos con el método alternativo N°3.

Teniendo en cuenta que los extractos resultantes en medio n-Nonano después de utilizar los métodos alternativo 1 y 3 resultaron ser de color amarillo y que en el cromatograma algunos analitos no fueron detectados, ambos métodos fueron descartados. Por otra parte, con el método alternativo 2 aunque visualmente la muestra resultante fue translúcida e incolora en n-Nonano con un buen clean-up, lamentablemente también se observó la ausencia de varios analitos en el cromatograma.

Por último, al utilizar el método alternativo 4 en las condiciones CO1 se registraron cromatogramas como el que se presenta en la figura N°9.

Teniendo en cuenta estos resultados, se procedió a validar el método alternativo 4, resultados que a continuación se presentan

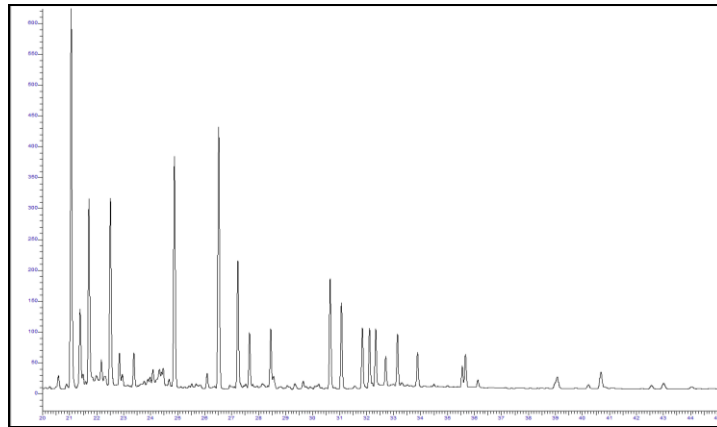


Figura N° 9: Cromatograma de los POC 0,5 ug/mL extraídos con el método alternativo N°4.

IV.2 Parámetros cromatográficos.

IV.2.1. Numero de Paltos teóricos, altura del plato, factor de capacidad y selectividad.

En la tabla N°13 se muestran los tiempos de retención de los estándares internos de los 18 plaguicidas organoclorados a 20 y 120 ng/mL. En la tabla se observa que no existen diferencias significativas de este parámetro para distintas concentraciones, por lo que se puede concluir que t_R no se vería afectado en el rango de trabajo que fue construida la curva de calibrado.

Tabla N°13: Tiempos de retención (t_R), promedio y desviación estándar para POC a 20 y 120 ng/mL

Analito	ng/mL	t_R (min)			Promedio	S
HCH - alfa	20	24,784	24,784	24,786	24,785	0,0012
	120	24,805	24,806	24,805	24,805	0,0006
HCH - gama	20	26,426	26,426	26,427	26,426	0,0006
	120	26,445	26,445	26,445	26,445	0,0000
Heptacloro	20	27,144	27,144	27,145	27,144	0,0006
	120	27,160	27,160	27,160	27,160	0,0000
HCH - beta	20	29,576	29,576	29,578	29,577	0,0012
	120	29,590	29,590	29,590	29,590	0,0000
Oxiclordano	20	30,235	30,235	30,235	30,235	0,0000
	120	30,249	30,249	30,250	30,249	0,0006
Heptacloro Epoxido	20	30,982	30,982	30,983	30,982	0,0006
	120	31,769	31,77	31,769	31,769	0,0006
Alfa - endosulfan	20	31,757	31,757	31,757	31,757	0,0000
	120	31,769	31,769	31,769	31,769	0,0000
Transclordano	20	32,024	32,024	32,024	32,024	0,0000
	120	32,036	32,036	32,037	32,036	0,0006
Cisclordano	20	32,255	32,255	32,256	32,255	0,0006
	120	32,266	32,266	32,266	32,266	0,0000
DDE	20	32,628	32,629	32,628	32,628	0,0006
	120	32,641	32,641	32,641	32,641	0,0000
Dieldrin	20	33,058	33,058	33,058	33,058	0,0000
	120	33,069	33,068	33,069	33,069	0,0006
Parlar 26	20	33,376	33,376	33,376	33,376	0,0000
	120	33,390	33,390	33,390	33,390	0,0000
Endrin	20	33,799	33,799	33,799	33,799	0,0000
	120	33,807	33,807	33,808	33,807	0,0006
DDD	20	35,457	35,458	35,457	35,457	0,0006
	120	35,467	35,467	35,467	35,467	0,0000
Beta - endosulfan	20	35,565	35,566	35,565	35,565	0,0006
	120	35,576	35,576	35,576	35,576	0,0000
DDT	20	36,032	36,032	36,033	36,032	0,0006
	120	36,044	36,044	36,044	36,044	0,0000
Parlar 50	20	37,014	37,014	37,014	37,014	0,0000
	120	37,025	37,024	37,025	37,025	0,0006
Parlar 62	20	39,832	39,832	39,832	39,832	0,0000
	120	39,851	39,851	39,851	39,851	0,0000

A partir de los cromatogramas registrados a 20 y 120 ng/mL se calcularon los parámetros cromatográficos que se resumen en la tabla N°14. A modo de ejemplo en la figura 10 se presenta el cromatograma registrado para los POC a 120 ng/mL.

Tabla N°14: Resultado de los parámetros cromatográficos

Analito	N	H	k'	α
HCH – alfa	437009	0,0069	7,6	---
HCH – gama	386738	0,0078	8,2	1,07
Heptacloro	524176	0,0057	8,4	1,03
HCH – beta	546860	0,0055	9,3	1,10
Oxclordano	506274	0,0059	9,5	1,02
Heptacloro Epoxido	682937	0,0044	9,8	1,03
Alfa - endosulfan	717296	0,0042	10,0	1,03
Transclordano	729544	0,0041	10,1	1,01
Cisclordano	740059	0,0041	10,2	1,01
DDE	756204	0,0040	10,3	1,01
Dieldrin	539735	0,0056	10,5	1,02
Parlar 26	549575	0,0055	10,6	1,01
Endrin	811921	0,0037	10,7	1,01
DDD	2480975	0,0012	11,3	1,05
Beta - endosulfan	1673965	0,0018	11,4	1,00
DDT	922624	0,0033	11,5	1,01
Parlar 50	757514	0,0040	11,8	1,03
Parlar 62	1126428	0,0027	12,8	1,03

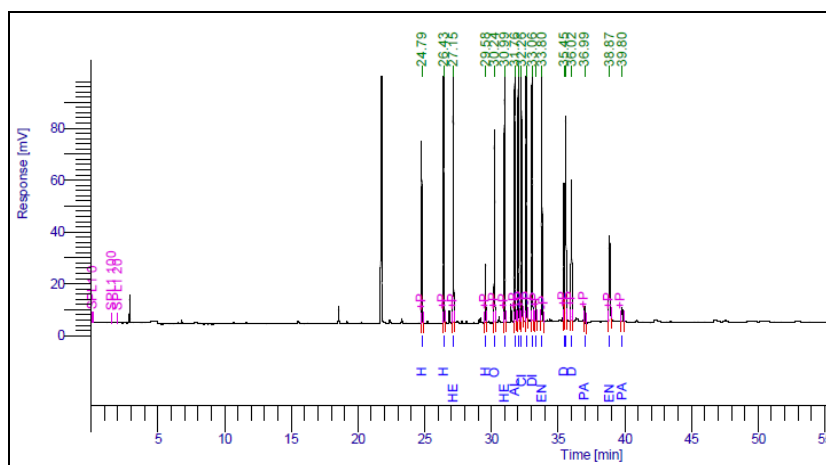


Figura N°10: cromatograma de POC a una concentración de 120 ng/mL

En la tabla N° 14, se observa que los platos teóricos (N) y el factor de selectividad para todos los analitos, cumplen con los criterios de aceptación ($N > 1200$; $1 < \alpha < 2$). Con respecto al factor de capacidad a pesar de no estar en el rango conveniente (entre 1 y 5), éstos son menores a 20.

IV.2.2. Resolución.

En la tabla N° 15 se muestra la Resolución obtenida para señales cromatográficas contiguas. Cabe destacar que sólo para DDD y Beta endosulfan, se determinó de manera manual debido al solapamiento del pico cromatografico (figura N° 11). Para el resto de los analitos la Resolución fue determinada directamente por el instrumento.

Tabla N° 15 Resoluciones de los POC

Analito	Resolución (R)
HCH – alfa	---
HCH – gama	16,870
Heptacloro	7,164
HCH – beta	24,741
Oxiclordano	6,679
Heptacloro Epoxido	7,414
Alfa - endosulfan	7,332
Transclordano	2,605
Cisclordano	2,206
DDE	3,431
Dieldrin	4,360
Parlar 26	2,899
Endrin	4,186
DDD	16,033
Beta - endosulfan	1,207
DDT	4,103
Parlar 50	8,520
Parlar 62	14,240

Los resultados obtenidos de la resolución para la mayoría de POC, resultó ser mayor que 1,5; valor recomendado para una buena separación (solapamiento de un 0,15% entre los picos cromatográficos). Se probaron distintas condiciones del equipo, para mejorar la resolución de DDD y Beta - endosulfan, pero no se obtuvieron mejores resultados.

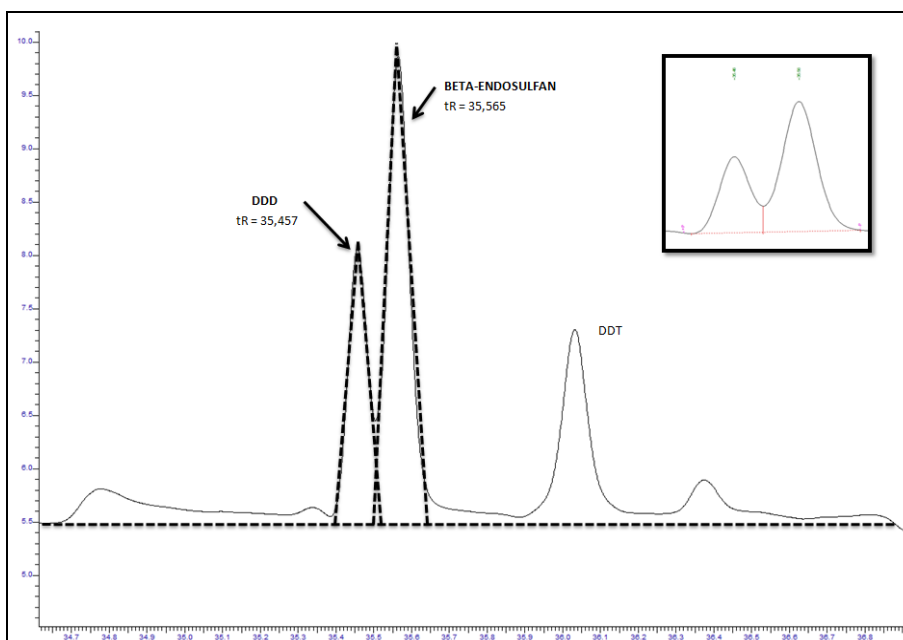


Figura N°11: Resolución de DDD y Beta endosulfan a una concentración de 20 ng/mL.

Tabla N°16: Cálculo de Resolución

Resolución (R) entre DDD y Beta endosulfan	(R) calculada manualmente		(R) del equipo
	20 ng/mL	120 ng/mL	120 ng/mL
	1,080	1,060	1,207

IV.3. Validación del método.

IV.3.1. Especificidad.

Los estimadores estadísticos para las curvas de calibrado en ausencia y en presencia de matriz de aceite obtenidas para los POC son presentados en la tabla 17 y 18, respectivamente.

Para evaluar la diferencia de la precisión (Sb) del estimador de la pendiente entre ambas curvas para cada uno de los elementos en estudio, se llevó a cabo el Test de Fisher entre ambos grupos de datos. Los resultados obtenidos son presentados en la tabla 19.

Tabla 17: Estimadores estadísticos para los POC en ausencia de matriz de aceite.

Analito	b	S _b	m	S _m	m ± S _m t _{n-2}
HCH - alfa	-6261	1360	531	17,37	531 ± 75
HCH - gama	-12024	1908	893	24,38	893 ± 105
Heptacloro	-5630	724	743	9,25	743 ± 40
HCH - beta	-824	248	330	3,17	330 ± 14
Oxiclordano	2187	1221	652	15,61	652 ± 67
Heptacloro Epoxido	-5461	1035	886	13,22	886 ± 57
Alfa - endosulfan	-3171	1685	991	21,53	991 ± 93
Transclordano	-7035	1934	1152	24,71	1152 ± 106
Cisclordano	-3836	2106	1069	26,90	1069 ± 116
DDE	-4448	2154	1096	27,53	1096 ± 118
Dieldrin	-3346	838	822	10,71	822 ± 46
Parlar 26	-5106	1012	718	12,93	718 ± 56
Endrin	1635	941	814	12,02	814 ± 52
DDD	-5971	1318	701	16,84	701 ± 72
Beta - endosulfan	-4202	1930	1002	24,66	1002 ± 106
DDT	-1601	697	373	8,90	373 ± 38
Parlar 50	-5350	911	758	11,64	758 ± 50
Parlar 62	-5332	827	551	10,57	551 ± 45

Tabla 18: Estimadores estadísticos para los POC en presencia de matriz de aceite.

Analito	b	S _b	m	S _m	m ± S _m t _{n-2}
HCH - alfa	568362	91127	9430	1164	9430 ± 5010
HCH - gama	637753	89739	10037	1147	10037 ± 4934
Heptacloro	180683	71701	3243	916	3243 ± 3942
HCH - beta	97391	31775	1670	406	1670 ± 1747
Oxiclordano	86634	27119	1460	347	1460 ± 1491
Heptacloro Epoxido	159733	60621	2892	775	2892 ± 3333
Alfa - endosulfan	122962	38122	2056	487	2056 ± 2096
Transclordano	108723	38574	2105	493	2105 ± 2121
Cisclordano	100825	42326	2368	541	2368 ± 2327
DDE	44414	15003	987	192	987 ± 825
Dieldrin	86612	29727	1775	380	1775 ± 1634
Parlar 26	39733	1918	486	25	486 ± 105
Endrin	55566	22969	1943	293	1943 ± 1263
DDD	44505	21752	2706	278	2706 ± 1196
Beta - endosulfan	58851	30322	3104	387	3104 ± 1667
DDT	19586	7119	754	91	754 ± 391
Parlar 50	24373	10243	844	131	844 ± 563
Parlar 62	13194	3009	214	38	214 ± 165

Tabla 19: Test de Fisher para curva en ausencia y presencia de matriz.

Analito	F _{cal}	F _{tab}	Resultado
HCH – alfa	4491,86	9,28	F _{cal} > F _{tab}
HCH – gama	2211,21	9,28	F _{cal} > F _{tab}
Heptacloro	9809,32	9,28	F _{cal} > F _{tab}
HCH – beta	16398,98	9,28	F _{cal} > F _{tab}
Oxiclordano	492,98	9,28	F _{cal} > F _{tab}
Heptacloro Epoxido	3431,30	9,28	F _{cal} > F _{tab}
Alfa – endosulfan	512,00	9,28	F _{cal} > F _{tab}
Transclordano	397,88	9,28	F _{cal} > F _{tab}
Cisclordano	404,10	9,28	F _{cal} > F _{tab}
DDE	48,50	9,28	F _{cal} > F _{tab}
Dieldrin	1258,16	9,28	F _{cal} > F _{tab}
Parlar 26	3,59	9,28	F _{cal} < F _{tab}
Endrin	595,93	9,28	F _{cal} > F _{tab}
DDD	272,30	9,28	F _{cal} > F _{tab}
Beta – endosulfan	246,87	9,28	F _{cal} > F _{tab}
DDT	104,47	9,28	F _{cal} > F _{tab}
Parlar 50	126,51	9,28	F _{cal} > F _{tab}
Parlar 62	13,23	9,28	F _{cal} > F _{tab}

Debido a que para cada elemento el valor de F_{cal} fue mayor que el tabulado, excepto al analito Parlar 26, indica que ambas desviación estándar difieren significativamente, lo cual conduce a que la comparación de las pendientes de ambos métodos se lleve a cabo mediante el test de Welch, datos que han sido resumidos en la tabla 20.

A razón de que las diferencias entre ambas curvas de calibrado, para la cuantificación de los POC son significativas ($t_{cal} > t_{tab}$, $p=0,05$) excepto para los analitos transclordano, DDE y Parlar 50; se puede concluir que la matriz de aceite de pescado interfiere en la cuantificación de dichos analitos. Esto se podría deber a que muchas de las especies presentes en la matriz de aceite no son removidas en la etapa de extracción por solvente, tanto por el método de control como el método alternativo 4.

Tabla 20: Test de Welch para la comparación de medias entre método en ausencia dematriz y presencia de matriz.

Analito	t_{cal}	t_{tab}
HCH – alfa	15,283	4,308
HCH – gama	15,946	4,308
Heptacloro	5,456	4,308
HCH – beta	6,599	4,308
Oxiclordano	4,654	4,308
Heptacloro Epoxido	5,179	4,308
Alfa – endosulfan	4,368	4,308
Transclordano	3,862	4,308
Cisclordano	4,798	4,308
DDE	1,132	4,308
Dieldrin	5,012	4,308
Parlar 26	16,769	2,777
Endrin	7,685	4,308
DDD	14,404	4,308
Beta – endosulfan	10,829	4,308
DDT	8,349	4,308
Parlar 50	1,314	4,308
Parlar 62	16,905	3,182

Teniendo en cuenta estos resultados, la cuantificación de los POC en aceite de pescado debe llevarse a cabo mediante el método por adición estándar o bien estudiar otras condiciones que permitan extraer cuantitativamente los analitos, previo a su determinación por GC-ECD.

Es importante mencionar que todos los resultados que a continuación se analizan corresponde a las curvas de calibrado preparadas en ausencia matriz de aceite.

Por último, se destaca que en el laboratorio actualmente preparan las curvas de calibrado en aceite de pescado refinada, que no da efectos de matriz.

IV.3.2. Linealidad.

Con la finalidad de demostrar que la concentración y la señal analítica presentan un comportamiento lineal que permita el uso de los mínimos cuadrados para la proposición de la

ecuación de la recta más ajustada a los datos, se analizaron las señales analíticas en el rango de concentraciones descrito en la Tabla 6 para cada uno de los elementos en estudio.

- **Coefficiente de correlación:** en la tabla 21 se presentan el coeficiente de correlación (r), coeficiente de determinación (r^2) y t_{cal} para cada analito obtenidos de la curva de calibrado preparada en ausencia de matriz.

Tabla N°21: Coeficiente de correlación, coeficiente de determinación y t_{cal} para los POC analizados en GC-ECD.

Analito	(r)	(r^2)	t_{cal}
HCH – alfa	0,9989	0,998	30,546
HCH – gama	0,9993	0,999	36,494
Heptacloro	0,9999	1,000	81,640
HCH – beta	0,9999	1,000	105,402
Oxclordano	0,9994	0,999	41,867
Heptacloro Epoxido	0,9998	1,000	67,409
Alfa - endosulfan	0,9995	0,999	46,110
Transclordano	0,9995	0,999	46,609
Cisclordano	0,9994	0,999	39,822
DDE	0,9994	0,999	39,822
Dieldrin	0,9998	1,000	76,687
Parlar 26	0,9997	0,999	55,888
Endrin	0,9998	1,000	67,409
DDD	0,9994	0,999	41,505
Beta - endosulfan	0,9994	0,999	40,806
DDT	0,9994	0,999	41,867
Parlar 50	0,9998	1,000	64,538
Parlar 62	0,9996	0,999	51,973

A partir de los datos obtenidos en la tabla se aprecian que los t_{cal} son mayores al $t_{tab} = 4,3027$ para la totalidad de los analitos, por lo que matemáticamente estaría demostrando para ellos que hay una relación lineal entre las variables.

A modo de ejemplo en la figura 12 se presenta la curva de calibrado obtenida para Heptacloro en presencia y ausencia de matriz.

- **Comportamiento Homocedástico:** las desviaciones estándar del primer y último punto de las curvas fueron comparadas mediante del test de Fisher, a un nivel de 5% y (n-1) grados de libertad. Teniendo en cuenta que todos los analitos tienen un F_{cal} (tabla N° 22) inferior al

$F_{\text{tab}(2,2)} = 19,000$; se puede concluir que las desviaciones son similares y por ende son homocedásticas.

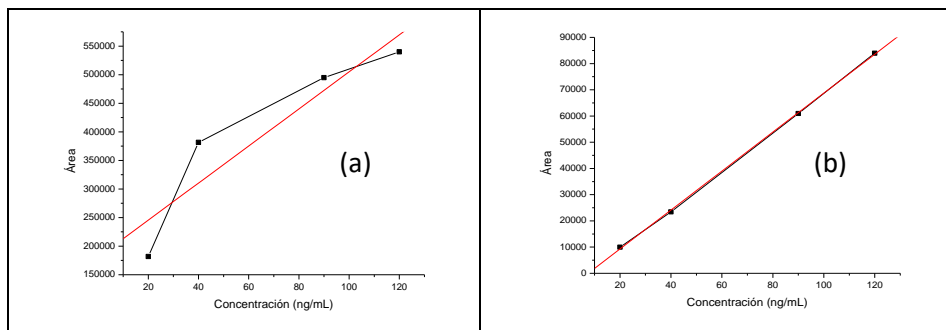


Figura N° 12: Curva de calibrado de heptacloro en matriz (a) y heptacloro sin matriz (b) obtenido por GC-ECD, entre 20 y 120 ng/mL.

Tabla N°22: Estimador de Fisher para el cálculo de homocedasticidad.

Analito	Fcal
HCH - alfa	5,806
HCH - gama	2,980
Heptacloro	4,015
HCH - beta	4,796
Oxiclordano	3,077
Heptacloro Epoxido	2,813
Alfa - endosulfan	6,142
Transclordano	5,057
Cisclordano	2,902
DDE	5,372
Dieldrin	4,912
Parlar 26	7,903
Endrin	2,114
DDD	3,137
Beta - endosulfan	5,383
DDT	4,733
Parlar 50	3,391
Parlar 62	5,821

- **Distribución de los residuos:** debido al número de puntos ($n=4$) utilizados en la curva de calibrado no se registraron los gráficos ya que con estos no fue posible visualizar una distribución aleatoria alrededor.

IV.3.3. Sensibilidad.

Este parámetro se analizó a partir de las pendientes (tabla 17), obtenidas para cada analito. En ella se observa que los analitos Transclordano, Cisclordano y DDE resultaron ser los más sensibles, por presentar la mayor pendiente, por el contrario HCH-beta y DDT fueron los menos sensibles

IV.3.4. Límite de detección (L.D.) y Límite de cuantificación (L.C.).

Los valores calculados para la determinación de L.D. y L.C. se obtuvieron a partir de las ecuaciones 13 y 14, cuyos resultados son presentados en la tabla N°23. En ella se observa que los analitos heptacloro y HCH-beta presentaron los menores valores para ambos límites.

Tabla N° 23: Límites de detección y cuantificación para POC, del método analizados por GC-ECD

Analito	L.D. (ng/mL)	L.C (ng/mL)
HCH – alfa	7,77	25,90
HCH – gama	6,49	21,64
Heptacloro	2,96	9,86
HCH – beta	2,28	7,61
Oxiclordano	5,68	18,95
Heptacloro Epoxido	3,55	11,82
Alfa – endosulfan	5,16	17,20
Transclordano	5,10	16,99
Cisclordano	5,98	19,94
DDE	5,97	19,89
Dieldrin	3,09	10,31
Parlar 26	4,28	14,26
Endrin	3,51	11,70
DDD	5,71	19,04
Beta – endosulfan	5,85	19,49
DDT	5,67	18,91
Parlar 50	3,65	12,16
Parlar 62	4,56	15,19

IV.3.5. Precisión.

A continuación se presentan los resultados de la precisión determinados a través de la repetibilidad y la precisión intermedia.

IV.3.5.1. Repetibilidad: en la tabla N° 24 se detallan los resultados del estudio de repetibilidad, determinados a través del coeficiente de variación (%CV).

Tabla N° 24: Coeficientes de variación de la señal analítica para 2 niveles de concentración de POC.

Analito	C_{POC} (ng/mL)	Promedio señal (n=3)	S	% CV
HCH – alfa	20	5219	159	3,05
	120	58517	383	0,65
HCH - gama	20	7179	148	2,07
	120	96430	256	0,27
Heptacloro	20	9869	50	0,50
	120	83935	99	0,12
HCH - beta	20	5555	78	1,41
	120	38701	171	0,44
Oxiclordano	20	14792	95	0,64
	120	81119	167	0,21
Heptacloro Epóxido	20	13126	115	0,88
	120	100930	193	0,19
Alfa - endosulfan	20	16947	136	0,80
	120	114716	338	0,29
Transclordano	20	16884	111	0,66
	120	130338	250	0,19
Cisclordano	20	18510	117	0,63
	120	123501	199	0,16
DDE	20	18314	154	0,84
	120	126039	358	0,28
Dieldrin	20	12952	79	0,61
	120	94699	176	0,19
Parlar 26	20	9673	140	1,44
	120	81891	393	0,48
Endrin	20	18486	159	0,86
	120	99030	232	0,23
DDD	20	9132	172	1,88
	120	78168	304	0,39
Beta - endosulfan	20	16590	117	0,71
	120	115084	273	0,24
DDT	20	6271	124	1,98
	120	43677	271	0,62
Parlar 50	20	9139	148	1,62
	120	84955	273	0,32
Parlar 62	20	6319	175	2,76
	120	60730	421	0,69

En la tabla anterior se observa que los valores de los coeficientes de variación obtenidos a los dos niveles de concentración, son menores que el criterio máximo de aceptación de %CV de Horwitz (%), es decir 28,83% y 22,01% para 20 y 120 ng/mL, respectivamente. Esto permite demostrar que la lectura de la señal analítica es repetible.

IV.3.5.2. Precisión Intermedia.

En la tabla N° 25 se presentan los resultados obtenidos del estudio de precisión intermedia, realizados en días distintos.

Se observa que los CV% obtenidos para los dos niveles de concentración de POC, medidos en los 2 días distintos, son menores que el criterio máximo de aceptación de CV de Horwitz (%), sugiriendo de esta forma que la lectura de la señal analítica es precisa en días distintos.

Tabla N° 25: Coeficientes de variación de la señal analítica para 2 niveles de concentración de POC.

Analito	Día	C _{POC} (ng/mL)	Promedio señal (n=3)	S	% CV
HCH-alfa	1	20	5219	159	3,05
		120	58517	383	0,65
	2	20	5248	207	3,95
		120	58273	336	0,58
HCH-gama	1	20	7179	148	2,07
		120	96430	256	0,27
	2	20	7512	204	2,71
		120	96330	428	0,44
Heptacloro	1	20	9869	50	0,50
		120	83935	99	0,12
	2	20	9775	193	1,98
		120	83068	321	0,39
HCH-beta	1	20	5555	78	1,41
		120	38701	171	0,44
	2	20	5521	183	3,31
		120	38968	474	1,22
Oxiclordano	1	20	14792	95	0,64
		120	81119	167	0,21
	2	20	15292	431	2,82
		120	81252	823	1,01
Heptacloro Epóxido	1	20	13126	115	0,88
		120	100930	193	0,19
	2	20	13392	137	1,02
		120	101597	394	0,39
Alfa Endosulfan	1	20	16947	136	0,80
		120	114716	338	0,29
	2	20	17314	115	0,67

		120	110616	338	0,31
Transclordano	1	20	16884	111	0,66
		120	130338	250	0,19
	2	20	17084	89	0,52
		120	132471	222	0,17
Cisclordano	1	20	18510	117	0,63
		120	123501	199	0,16
	2	20	18644	171	0,92
		120	124101	369	0,30
DDE	1	20	18314	154	0,84
		120	126039	358	0,28
	2	20	18361	117	0,64
		120	127706	229	0,18
Dieldrin	1	20	12952	79	0,61
		120	94699	176	0,19
	2	20	13119	184	1,41
		120	95366	411	0,43
Parlar 26	1	20	9673	140	1,44
		120	81891	393	0,48
	2	20	9739	88	0,91
		120	82558	194	0,24
Endrin	1	20	18486	159	0,86
		120	99030	232	0,23
	2	20	18619	215	1,15
		120	99563	584	0,59
DDD	1	20	9132	172	1,88
		120	78168	304	0,39
	2	20	9272	239	2,58
		120	78768	396	0,50
Beta-Endosulfan	1	20	16590	117	0,71
		120	115084	273	0,24
	2	20	16923	189	1,12
		120	116184	444	0,38
DDT	1	20	6271	124	1,98
		120	43677	271	0,62
	2	20	6438	75	1,17
		120	44144	214	0,49
Parlar 50	1	20	9139	148	1,62
		120	84955	273	0,32
	2	20	9205	96	1,04
		120	85455	272	0,32
Parlar 62	1	20	6319	175	2,76
		120	60730	421	0,69
	2	20	6386	120	1,89
		120	61330	279	0,45

IV.3.6. Exactitud.

Lamentablemente, como se destacó anteriormente, para el desarrollo de esta investigación no se disponía de un material de referencia certificado ni de una muestra de aceite contaminada con los POC, es por esto que se determinó el % de recuperación para todos los analitos dopados en la matriz de aceite de pescado, en la curva de calibrado preparada en ausencia de matriz. En la tabla 26, se resumen los resultados obtenidos.

En ella queda de manifiesto el efecto de matriz, ya que los % de recuperación resultaron ser considerablemente elevados para casi todos los analitos, excepto para el Parlar 62 el cual dio un valor negativo. Por lo tanto, no fue posible determinar la exactitud del método.

Tabla N° 26: Porcentaje de recuperación

Analito	Concentración Fortificado	Promedio Concentración	%R
HCH – alfa	60	2383	3871
HCH – gama	60	1620	2600
Heptacloro	60	639	964
HCH – beta	60	705	1076
Oxiclordano	60	320	434
Heptacloro Epoxido	60	456	661
Alfa – endosulfan	60	303	405
Transclordano	60	254	323
Cisclordano	60	266	344
DDE	60	107	78
Dieldrin	60	290	383
Parlar 26	60	108	80
Endrin	60	237	295
DDD	60	327	445
Beta – endosulfan	60	273	356
DDT	60	228	281
Parlar 50	60	135	124
Parlar 62	60	54	-9,72

Por último, a pesar de haber optimizado los parámetros cromatográficos (N, H, k', α , R), no fue posible validar las nuevas condiciones debido al efecto de matriz detectado luego de la extracción, quedando parcialmente validada la metodología.

V. Conclusiones

- Los resultados de este estudio permiten concluir que sólo al reemplazar la columna capilar VF – 5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 mm marca Agilent) utilizada actualmente en el laboratorio FARMAVET por la columna capilar TG-1701 MS (marca Thermo Scientific), además de modificar los parámetros cromatográficos del CG-ECD, tales como, temperatura del inyector; una gradiente de temperatura del horno; y condiciones del detector, fue posible disminuir los tiempos de análisis para la totalidad de los plaguicidas organoclorados, de 230 a 55 minutos.
- Se validó parcialmente el método GC-ECD para la determinación de los POC ya que no fue posible evaluar la exactitud del método. Esto se explicaría debido a la dificultad en la manipulación de la muestra, especialmente durante la etapa de extracción que no permite eliminar completamente el efecto matriz u otras sustancias presentes en el aceite.

VI. Sugerencias

En función del tiempo dado para realizar éste internado, no fue posible utilizar otras condiciones que permitiera eliminar el efecto de matriz, por lo que se sugiere al laboratorio realizar lo siguiente:

- Adquirir una columna de extracción en fase sólida Florisil de más capacidad, ya que de acuerdo a bibliografía encontrada recientemente se recomienda utilizar columnas con 4 a 6 gramos de Silicato de Magnesio (Florisil), para remover interferencias responsables del efecto de matriz.⁽²³⁾
- También se recomienda realizar una microextracción en fase sólida (SPME) en headspace con fibra de PDMS-DVB.⁽²³⁾

En el caso de eliminar completamente el efecto de matriz con estas condiciones, será posible cuantificar los POC en una curva de calibrado preparada solo con patrones en medio n-Nonano, disminuyendo aun más el tiempo total de la metodología.

VII. Bibliografía

1. EUSKO JAURLARITZA. Residuos de Plaguicidas. Revista Osakidetza Departamento de Salud Gobierno Vasco: 45-55, 2011.
2. RAVELO Pérez, Lidia. Metodologías analíticas alternativas para la determinación de plaguicidas en aguas y productos agroalimentarios. Tesis doctorales. Santa Cruz de Tenerife, España, Universidad de la laguna, 2009. 5 p.
3. GREGOR ARH, Simona Fras, Tomas Polak, Bozidar Zlender, Marjan Veber y Matev Pompe, 2009. Mofication of Method for the Determination of Organochlorine Pesticides in Meat Samples: Acta Chim. Slov, 56: 920-926.
4. Zeinab, H.M. Al-Targi, Refaat, G. Abou El Ela, El-Dressi, A.Y., 2011. Organochlorine pesticide residues in human breast milk in El-Gabal Al-Akhdar, Libya. International Conference on Life Science and Technology IPCBEE: 3: 146-149.
5. PIÑERO GONZALEZ, Izquierdo Córser, Allara Cagnasso y García Urdaneta, 2007. Residuos de plaguicidas organoclorados en 4 tipos de aceites vegetales: Archivos latinoamericanos de nutrición, 57 N°4: 397-401.
6. SUSAN D. SHAW, Diane Brenner, Michelle L. Berger, David O. Carpenter, Chia – Swee Hong y Kurunthachalam Kannan, 2006. PCBs, PCDD/Fs, and Organochlorine Pesticides in Farmed Atantic Salmon from Maine, Eastern Canada, and Norway, and Wild Salmon from Alaska: Environ. Sci. Technol, 40: 5347-5354.
7. GÓMEZ CALLE, Vilma. Acuicultura del Salmón [diapositiva]. La Serena, Chile. Universidad del Mar, 2011. 36 diapositivas, col.
8. Valenzuela Alfonso, Sanhueza Julio, De la Barra Fernando, 2012. El aceite de pescado: ayer un desecho industrial, hoy un producto de alto valor nutricional. Artículos de actualización, Revista Chilena de Nutrición: 39 N°2: 201-209.
9. SERNAPESCA, Gobierno de Chile. Programa de Harina de Pescado, Manual de Procedimientos Sección 1. HDP/MP1. Junio 2013, Chile, 2013.
10. SERNAPESCA, Gobierno de Chile. Programa de Harina de Pescado, Norma Técnica Sección 1. Requisitos de infraestructura y manejo sanitario para establecimientos elaboradores de harina y aceite de pescado de exportación no destinado al consumo humano (HDP/NT1). Junio 2013, Chile, 2013.
11. SERNAPESCA, Gobierno de Chile. Programa de control de fármacos, Manual de Procedimientos Sección 1. Programa de control de residuos de productos farmacéuticos, sustancias prohibidas, sustancias no autorizadas y contaminantes (FAR/MP1). Diciembre 2013, Chile, 2013.

12. Directiva 2006/77/CE de la comisión por la que se modifica el anexo I de la directiva 2002/32/CE del Parlamento Europeo y del Consejo por lo que respecta a los niveles máximos de los compuestos organoclorados en la alimentación animal. Diario Oficial de la Unión Europea. 30.9.2006. L 271/ 53-55 pp.
13. FARMAVET, Laboratorio de Farmacología Veterinaria de la Universidad de Chile, 2014. <<http://www.farmaco.veterinaria.uchile.cl/>> .
14. ISO/IEC 2005. Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración. ISO/IEC 17025:2005, 2005.
15. PerkinElmer, Clarus 600/680 GC, User's guide, 2014. <<http://www.perkinelmer.com/>>
16. SKOOG Douglas, Holler F. James y Crouch Stanley. Principio de Análisis Instrumental. Sexta Edición. México, CENGAGE Learning, 2008, pp.967 – 993
17. A.Ferrer, 2003. Intoxicación por plaguicidas: Anales Sis San Navarra: 26 (supl. 1): 155-171.
18. Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades. (ATSDR). 1997. Reseña Toxicológica del Diclorvos (en inglés). Atlanta, GA: Departamento de Salud y Servicios Humanos de los EE.UU., Servicio de Salud Pública.
19. Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades (ATSDR). 2003. Reseña Toxicológica de las Piretrinas y los Piretroides (en inglés). Atlanta, GA: Departamento de Salud y Servicios Humanos de los EE.UU., Servicio de Salud Pública.
20. Norma Chilena Oficial, NCh-ISO 17025, Of 2005. 2005. Instituto Chileno de Normalización INN, Chile. Requisitos Generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración. 14-15 pp.
21. UNODC.2010. Directrices para la validación de métodos analíticos y la calibración del equipo utilizado para el análisis de drogas ilícitas en materiales incautados y especímenes biológicos. <<http://www.unodc.org/>>
22. EURACHEM. 1998. The fitness for purpose of analytical methods: A laboratory guide to method validation and related topics. <<http://www.eurachem.org/>>
23. Mary Rose R. Agustin, Hyun-Mee Park, Soon-Min Hong, Jae-Chun Ryu, Kang-Bong Lee, 2005. Determination of mono- to octachlorobiphenyls in fish oil using Florisil adsorption followed by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography with time-of-flight mass spectrometric detection: Journal of Chromatography A, 1085: 278–284