



UNIVERSIDAD DE GUANAJUATO

CAMPUS GUANAJUATO

DIVISIÓN DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS

POSGRADO EN QUÍMICA

**“USO DE CROMATOGRAFÍA DE GASES CON
DETECTOR MÁSIKO PARA LA DETERMINACIÓN
DE FTALATOS EN MUESTRAS
MEDIOAMBIENTALES Y EN ALIMENTOS”**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS QUÍMICAS**

PRESENTA

Q. BIANEY GARCÍA LARA

GUANAJUATO, GTO.

29 DE JULIO DEL 2016

A mi Esposo e Hija, Padres y Hermanas.

Miembros del Jurado asignados para el Examen que para obtener el grado de Maestro en Ciencias en Químicas que presenta la Q. Bianey García Lara:

Dr. Gustavo Cruz Jiménez
Presidente

Dr. Juan Manuel Peralta Hernández
Secretario

Dra. Eunice Yáñez Barrientos
Vocal

Dr. Armando Alcázar Magaña
Suplente

Guanajuato, Gto. Julio de 2016

Por medio de la presente me responsabilizo de la autenticidad y originalidad del presente trabajo titulado “**Uso de cromatografía de gases con detector másico para la determinación de ftalatos en muestras medioambientales y en alimentos**”, realizado por la Q. Bianey García Lara, para obtener el título de **MAESTRO EN CIENCIAS QUIMICAS (M.C)**, en las Instalaciones del Campus Guanajuato en el Departamento de Química de la Universidad de Guanajuato.

Director:

Dr. Kazimierz Wrobel

Co-Directora:

Dra. Katarzyna Dorota Wrobel

Co-Directora:

Dra. Alma Rosa Corrales Escobosa

ÍNDICE

ÍNDICE	iv
ÍNDICE DE TABLAS.....	vi
ÍNDICE DE IMÁGENES.....	x
Lista de Abreviaturas	xii
I. INTRODUCCIÓN GENERAL DEL PROYECTO.....	1
I.1 Descripción de los ftalatos	1
I.2 Características y propiedades de los ftalatos.....	2
I.3 Fuentes de los ftalatos en el medio ambiente.	5
I.3.1 Agua	5
I.3.2 Suelo y sedimentos.	6
I.4 Ftalatos en alimentos.	7
I.5 Efectos en la salud	8
I.6 Técnicas analíticas empleadas para detección y cuantificación de ftalatos.	11
I.6.1 Cromatografía de Gases.....	11
I.6.2 Espectrometría de Masas.	15
I.6.3 Cromatografía de Líquidos.....	28
I.7 Revisión bibliográfica de los métodos utilizados para la determinación de ftalatos.....	29
I.8 Normatividad.....	35
II. JUSTIFICACIÓN	39
III. OBJETIVO.....	39
IV. PARTE EXPERIMENTAL	40
IV.1 Reactivos y Disolventes.....	40
IV.2 Instrumentación analítica.....	40

IV.3	Software	41
IV.4	Estándares	41
IV.5	Muestras.....	41
IV.6	Calibración en el método GC-MS(TQ)	43
IV.7	Calibración en el método GC-FID.....	43
IV.8	Protocolo de extracción en tortilla.....	43
IV.9	Protocolo de extracción en harinas.	44
IV.10	Protocolo de extracción en tostadas ^[86]	44
V.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	45
V.1	Introducción ^[18-20]	45
V.2	Desarrollo de la metodología de determinación de ftalatos en tortilla por Cromatografía de gases con detector de masas triple cuadrupolo (GC-MS(TQ)) con MRM.	47
V.2.1	Condiciones de separación cromatográfica y de detección por MRM.	47
V.2.2	Proceso de calibración y evaluación de parámetros analíticos del procedimiento en GC-MS(TQ).	55
V.3	Análisis de muestras reales por GC-MS(TQ).....	65
V.3.1	Determinación de ftalatos en tortillas	65
V.3.2	Determinación de ftalatos en harina de maíz.	70
V.3.3	Determinación de ftalatos en tostadas horneadas.	72
V.4	Procedimiento de determinación de ftalatos por cromatografía de gases con detector por ionización en flama (GC-FID).....	75
V.5	Análisis de muestras reales por GC-FID.	80
VI.	CONCLUSIONES	82
VII.	REFERENCIAS	85

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Propiedades fisicoquímicas de los ftalatos de interés en este trabajo....	2
Tabla 2: Estructuras y principales propiedades de seis ftalatos, objeto de estudio en el presente trabajo.....	4
Tabla 3. Breve descripción de diferentes métodos para la determinación y cuantificación de ftalatos en diversas matrices.	31
Tabla 4. Listado de muestras analizadas en este trabajo y algunas de sus características.....	42
Tabla 5. Condiciones instrumentales para el análisis de ftalatos por GC-MS(TQ) en el modo MRM.....	47
Tabla 6. Condiciones Instrumentales para MRM dividido en segmentos y sus respectivos tiempo de retención y desviación estándar (DE).	52
Tabla7. Iones de ftalatos recomendados para su identificación y cuantificación por GC-MS en modo SIM (norma CPSC-CH-C1001-09.3 (2010)).	53
Tabla 8. Estructuras moleculares de los ftalatos, sus masas moleculares (MM) y sus respectivos valores de m/z para los iones precursor (IP) y iones producto (Ip) y valores de energías de colisión. En cada uno de los casos, se obtuvieron dos transiciones una para el ion cuantificador (Q') y otra como ion calificador (C) en MRM.	54
Tabla 9. Ecuaciones de regresión lineal obtenidos con base en tres réplicas independientes. Se presentan valores promedios de las pendientes e interceptos con respectivas DE entre paréntesis. Donde “y” es la señal analítica definida con el área de pico del analito y “x” es la concentración en mg/L del analito.....	57
Tabla 10. Factores de supresión/aumento de la señal (SSE) calculados para cada uno de los analitos con base en las pendientes de funciones de regresión	

lineal obtenidas en el método de adición de estándar y en calibración externa.....	59
Tabla 11. Límites de detección (LD) y de cuantificación (LC) evaluados en el procedimiento de calibración y en el análisis de muestras reales (extracto de tortilla, harina o tostada, diluidos 20 veces).	61
Tabla 12. Resultados de adición de estándar obtenidos en el análisis de tortillas “Santo Apetito”, “Irapuato” y “La Económica”. (Se presentan valores promedio con respectivas desviaciones estándar en µg/kg de masa fresca, y desviaciones estándar relativas para tres réplicas).....	63
Tabla 13. Resultados de adición de estándar obtenidos en el análisis de harina de maíz Maseca. (Se presentan valores promedios con respectivas desviaciones estándar en µg/kg de masa seca, y desviaciones estándar relativas para tres réplicas).....	64
Tabla 14. Resultados de adición de estándar obtenidos en el análisis de tostada identificada como “Sanissimo”. (Se presentan valores promedio con respectivas desviaciones estándar en µg/kg de masa seca, y desviaciones estándar relativas para tres réplicas).....	64
Tabla 15. Resultados de determinación de ftalatos en tortillas, se presentan valores promedio para masa fresca de tortilla con sus respectivas DE, obtenidos con base en tres réplicas independientes. Entre paréntesis se describe su DER (n=3).....	66
Tabla 16. Resultados de determinación de ftalatos en tortillas, se presentan valores promedio obtenidos para masa seca de tortilla con sus respectivas DE, obtenidos con base en tres réplicas independientes. Entre paréntesis se describe su DER (n=3).....	67
Tabla 17. Porcentaje de consumo de maíz nixtamalizado y sus subproductos como la harina en la república mexicana.....	70
Tabla 18. Resultados de determinación de ftalatos en harinas de maíz nixtamalizado, se presentan valores promedio con sus respectivas DE	

($\mu\text{g}/\text{kg}$), obtenidos con base en tres réplicas independientes. Entre paréntesis se presenta la desviación estándar relativa.	72
Tabla 19. Características de preparación de las tostadas analizadas.	73
Tabla 20. Resultados de determinación de ftalatos en tostadas, se presentan valores promedio con sus respectivas DE en $\mu\text{g}/\text{kg}$ de masa seca, obtenidos con base en tres réplicas independientes. Entre paréntesis se describe su DER entre replicas.	73
Tabla 21. Condiciones cromatográficas de GC-FID aplicadas en la determinación de ftalatos.	75
Tabla 22. Tiempos de retención de analitos en el sistema GC-FID. Se presentan valores promedio con respectiva desviación estándar (n=6).	76
Tabla 23. Parámetros analíticos evaluados en el proceso de calibración por GC-FID.	76
Tabla 24. Límites de detección (LD) y de cuantificación (LC) evaluados en el procedimiento de calibración y en el análisis de muestras reales (tortilla, tostada).	78
Tabla 25. El porcentaje de recobro del método analítico, el cual se evaluó comparando las concentraciones de muestras fortificadas con las concentraciones proporcionadas por la muestra real, tratándose de la tortilla identificada como Santo Apetito.	79
Tabla 26. El porcentaje de recobro del método analítico, el cual se evaluó comparando las concentraciones de muestras fortificadas con las concentraciones proporcionadas por la muestra real, tratándose de la tostada identificada como Las del Barrio.	80
Tabla 27. Comparación de los resultados obtenidos por GC-FID y por GC-MS(TQ) MRM en tortillas con alto contenido de DEHP y DBP. Se presentan valores promedio con sus respectivas DE en $\mu\text{g}/\text{kg}$ de masa fresca, obtenidos con base en tres réplicas independientes. El valor entre paréntesis corresponde a DER, %.....	81

Tabla 28. Comparación de contenidos de ftalatos en panes y cereales obtenidos de la bibliografía y los obtenidos en la presente tesis, los valores se expresan en $\mu\text{g}/\text{kg}$ en masa seca. 83

ÍNDICE DE IMÁGENES

Figura 1. Proceso de obtención de un plástico flexible a partir del uso de plastificantes.	3
Figura 2. Esquema de Detector por Ionización en Flama.	12
Figura 3. Esquema de Detector por Captura de Electrones	15
Figura 4. Analizador másico de doble enfoque, en el que los iones separados pasan por el sector de campo electrostático y sector magnético.	21
Figura 5. Esquema de un analizador de masas de tipo cuadrupolo.	23
Figura 6. Esquema de un analizador másico de trampa de iones.	24
Figura 7. Esquema general de un espectrómetro de masas en tándem espacial. (MS ¹ primer cuadrupolo separador de masas, CID, MS ³ segundo cuadrupolo separador de masas).	27
Figura 8. Maneras de empaquetamiento para distribución y venta de tortilla.	46
Figura 9. Cromatograma TIC del estándar; cada uno de los picos fueron asignados a los compuestos individuales con base a sus tiempos de retención y espectros de masas.	48
Figura 10. Comparación de espectros experimentales (rojo) y NIST (azul) de cada uno de los ftalatos obtenidos a partir del cromatograma TIC.	50
Figura 11. Gráfico que representa el efecto de la energía de colisión sobre la intensidad de las señales de los iones en el espectro de MS/MS.	51
Figura 12. Propuesta de fragmentación del DBP, partiendo del ion molecular.	53
Figura 13. Cromatogramas correspondientes a curva de calibración para el análisis de muestras 0, 0.025, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5 y 1.0 mg/L de los siete analitos.	55
Figura 14. Ampliación de cada pico cromatográfico para 1. DMP, 2. DEP, 3. DBP, 4. BBP, 5. DEHA, 6. DEHP y 7. DnOP.	56
Figura 15. Gráficos de análisis en PCA de tortillas analizadas en este trabajo.	69

Figura 16. Típicos cromatogramas GC-FID de las soluciones de calibración (0, 1, 2.5, 5, 10, 25 y 50 mg/L de cada uno de los compuestos); (h) – Cromatogramas totales; (a) – (g) ampliación de las regiones de cromatogramas correspondientes a la elución de DMP, DEP, DBP, BBP, DEHA, DEHP y DnOP, respectivamente..... 77

Lista de Abreviaturas

°C	Grado centígrado
ACN	Acetonitrilo
ACS	American Chemical Society
AhR	Receptor de arilhidrocarbonos
ATSDR	Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades
BBP	Bencilbutilftalato
C	Calificador
CI	Ionización Química
CID	Ionización inducida por colisiones
COFEPRIS	Comisión Federal de Protección contra Riesgos Sanitarios
CPSC	Consumer Product Safety Commission
CPSIA	Consumer Product Safety Improvement Act
DAD	Diode array detector
DAS	Diluir-disparar
DBP	Dibutilftalato
DE	Desviación Estandar
DEHA	Di(2-etilhexil)Adipato
DEHP	Di(2-etilhexil)ftalato
DEP	Dietilftalato
DER	Desviación Estandar Relativa
DID	Detector de Ionización por Descarga
DIDP	Di-isodecil ftalato
DINP	Di-isononil ftalato
DMP	Dimetilftalato
DnOP	Di-n-octilftalato
DVE	Divinilbenceno
EC	Energía de colisión
ECD	Detector de captura de electrones
EI	Ionización por impacto de electrones
EPA	Environmental Protection Agency
EPCRA	Emergency Planning and Community Right-to-know Act
FDA	Food and Drug Administration
FIA	Flow Injection Analysis
FID	Detecto por ionización en flama
FTIR	Infrarrojo con transformada de Fourier
GC	Cromatografía de Gases
GC-FID	Cromatografía de gases con detección por ionización en llama
GC-MS	Cromatografía de gases con detección por espectrometría de masas

GC-MS(TQ)	Cromatografía de gases con detector de masas de triple cuadrupolo
GPC	Gel Permeation Chromatography
hCG	Gonadotropina Corionica
HPLC- FLD	Cromatografía líquida de alta resolución con detector fluorométrica
HPLC-DAD	Cromatografía líquida de alta resolución con detector espectrofotométrico de arreglo de diodos
Hx	Hexano
Hz	Hertz
ID	Diámetro Interno
IL-8	Interleucina 8
IP	Ion Precursor
Ip	Ion Producto
IPCS	International Programme on Chemical Safety
LC	Límite de cuantificación
LD	Límite de detección
<i>Log K_{ow}</i>	Coeficiente de reparto Octano-Agua
<i>m/z</i>	Relación masa/carga
MBP	Monobutilftalato
MBzP	Metilbencil ftalato
MDA	Malondialdehído
MEHP	Mono-etilhexilftalato
MiBO	Metil-isobutil ftalatto
MISPE	Molecular Imprinted solid phase
mm	milimetro
MnBP	Metil-n-Butil ftalatto
MRM	Monitoreo de reacciones múltiples
MS	Masas
MTBE	Metilterbutil Eter
NIOSH	Instituto Nacional de Salud y Seguridad Ocupacional
NIST	National Institute of Standards and Technology
OMS	Organización Mundial de la Salud
OSHA	Occupational Safety and Health Administration
PAH	Hidrocarburos Poliaromáticos
PDMS	Polidimetilsiloxano
PE	Polietileno
PID	Detector por fotoionización
PM	Peso molecular
PPAR	Peroxisome proliferator-activated receptors
PVC	Policloruro de vinilo
PVDC	Polivinidieno

Q	Cuadrapolo
Q'	Cuantificador
QuEChERS	Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe
RCF	Celulosa regenerada
RCRA	Resource Conservation and Recovery Act
S/N	Relación señal-ruido
SIM	Monitoreo de ion selectivo
SPE	Solid Phase Microextraction
SPME	Solid Phase Microextraction
T _g	Temperatura de Transición vítrea
THF	Tetrahidrofurano
TIC	Conteo total de iones
TOF	Tiempo de vuelo
TR	Tiempo de retención
TRI	Toxic Release Inventory
UE	Unión Europea
UHPLC	Ultra High Performance Liquid Chromatography
USEPA	Agencia de protección al Ambiente de los Estados Unidos
UV	Ultravioleta-Visible
AFAEESI- MS/MS	Air-flow-assisted extractive ESI-MS/MS

I. INTRODUCCION GENERAL DEL PROYECTO

I.1 Descripción de los ftalatos

Ftalato es el término genérico con el que se denomina a los esteres o diésteres del ácido ftálico. Su síntesis industrial consiste en la esterificación del ácido ftálico con el correspondiente alcohol en presencia de un ácido como catalizador.

Se trata de un grupo muy amplio de compuestos ya que hay una gran variedad de alcoholes que pueden reaccionar con el ácido ftálico, para dar diferentes ftalatos en los que solo varía la cadena carbonada. Sin embargo, solamente alrededor de 60 ftalatos tienen aplicaciones industriales, dentro de estos solo unos pocos se producen a gran escala como el di (2-ethylhexil) ftalato (DEHP), él de mayor volumen de producción a nivel mundial. En el 2010, la producción mundial de ftalatos fue mayor a los 5 millones de toneladas^[1]. En general, los ftalatos son compuestos estables en estado líquido a temperatura ambiente, y con un ligero aroma. Presentan un rango muy amplio de propiedades fisicoquímicas en función de su masa molecular^[2].

Los ftalatos son clasificados como disruptores endocrinos químicos y están ligados a efectos particularmente adversos a la salud. Una exposición en etapa prenatal a estos compuestos ha demostrado una relación de cambio neuroconductual en niveles hormonales de los niños^[3]. El feto masculino, el recién nacido masculino, y el varón puberto parecerían ser grupos con riesgo elevado.

El estudio de los ftalatos en México inició cuando Green Peace en 1999 solicitó a la Secretaría de Salud de México, la eliminación del mercado nacional de productos para infantes de uso oral fabricados con PVC, los cuales contenían grandes cantidades de plastificantes del grupo de los ftalatos. Con este antecedente y la organización de la Dirección General de Salud Ambiental, hoy incorporada a la Comisión Federal de Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS), se inició la investigación en nuestro país^[4].

I.2 Características y propiedades de los ftalatos.

En cuanto a la estructura química básica, los ftalatos son los ácidos bencen-1,2-dicarboxílicos, con dos cadenas laterales que pueden ser compuestas por grupos funcionales que incluyen los alquilo, bencilo, fenilo, cicloalquilo, o alcoxi. Los ésteres ftálicos son típicamente líquidos a temperatura ambiente. Sus puntos de fusión se encuentran entre 5.5 y -58 °C, y sus puntos de ebullición entre 280 y 480 °C. Su solubilidad en agua varía inversamente con la longitud de sus cadenas alquílicas, siendo el DMP el más hidrofílico. Las características fisicoquímicas de los ftalatos de interés en este trabajo se presentan en la tabla 1. Los ésteres que poseen cadenas alifáticas de C₁₀, C₁₁ y C₁₃ son relativamente hidrofóbicos y por ello, poco solubles en agua (solubilidad <0.001 mg/L).

Tabla 1: Propiedades fisicoquímicas de los ftalatos de interés en este trabajo.

Nombre	Acrónimo	Número CAS	Masa Molecular (g/mol)	Punto de ebullición (°C)	Densidad (g/mL)	Log K _{ow}
<i>Dimetil Ftalato</i>	DMP	131-11-3	194.2	282	1.19	1.6
<i>Dietil Ftalato</i>	DEP	84-66-2	222.2	302	1.12	2.5
<i>Dibutil Ftalato</i>	DBP	84-74-2	278.4	340	1.04	4.7
<i>Bencilbutil ftalato</i>	BBP	85-68-7	312.4	370	1.12	4.9
<i>Di(2-etilhexil) ftalato</i>	DEHP	117-81-7	390.6	385	0.98	7.4
<i>Di-n-octil Ftalato</i>	DnOP	117-84-0	390.6	416	0.99	9.1

La retención/acumulación de los ftalatos en suelos o sedimentos es parcialmente gobernada por su hidrofobicidad. Aquellos compuestos con un valor de coeficiente de partición octanol-agua alto, pueden ser absorbidos por suelos y la vegetación. Los ftalatos dialquílicos son solubles en solventes orgánicos como el benceno, tolueno, xileno, dietil éter, cloroformo y éter de petróleo. Los ftalatos son usados principalmente para otorgar flexibilidad a los plásticos con aplicaciones en el envasado de alimentos, dispositivos médicos, juguetes y artículos de puericultura^[5]. Es por ello que los ftalatos pertenecen a las sustancias llamadas “plastificantes” que se agregan en la fabricación de termoplásticos para impartirle blandura y flexibilidad. Debido a su buen desempeño y bajo costo, los plastificantes han permitido crear productos para el consumidor y la industria que son versátiles, durables y de bajo costo. No todos los plastificantes son ftalatos, pero dominan el 93% de estos, quedando aproximadamente un 7% correspondiente a ésteres o poliésteres basados en adipatos, ácido fosfórico, sebácico, etc. Al agregar un plastificante a un polímero disminuye su temperatura de transición vítrea (T_g) lo que resulta en una mayor maleabilidad y flexibilidad. El plastificante penetra entre las cadenas del polímero, separándolas de tal forma que aumenta el volumen libre y como hay más volumen libre entre las cadenas de polímeros, éstas se pueden mover con mayor facilidad a temperaturas más bajas; cosa que no podrían hacer sin el plastificante^[6].

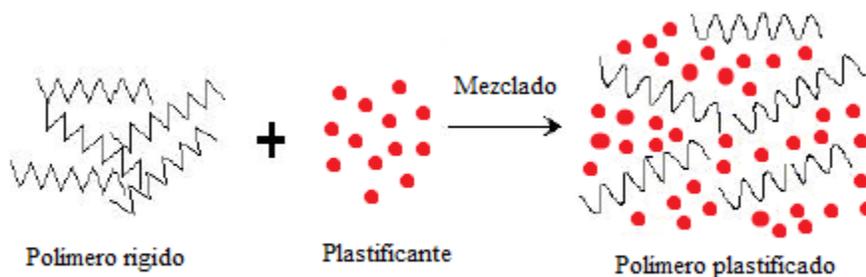
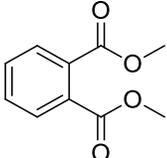
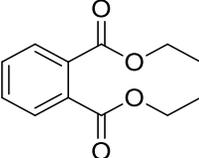
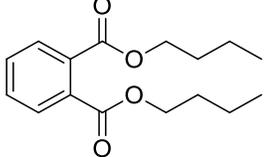
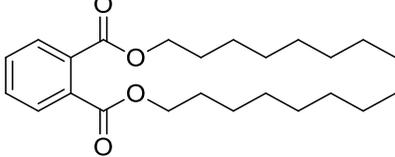
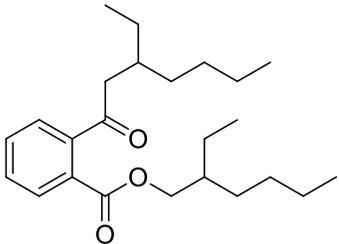
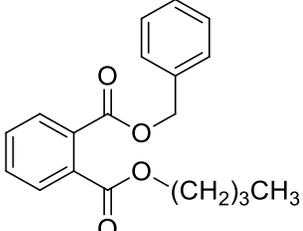


Figura 1. Proceso de obtención de un plástico flexible a partir del uso de plastificantes^[7].

La aplicación principal de los ftalatos es en la producción del policloruro de vinilo (PVC), aunque también se emplean en otros materiales como resinas epoxi, poliéster, gomas sintéticas, naturales y cloradas, polisulfito, nitrocelulosa, etilcelulosa y poliuretano. En estas aplicaciones la cantidad de ftalatos, puede llegar a representar entre 5 y 60% de la masa total del plástico o resina.

El destino final de estos materiales cubre un amplio espectro de productos, como se muestra en la Tabla 2^[8]. También, suelen encontrarse como aditivos en industrias textiles, como componentes de fluidos dieléctricos o en la formulación de pesticidas.

Tabla 2: Estructuras y principales propiedades de seis ftalatos, objeto de estudio en el presente trabajo.

Acrónimo	Estructura	Uso ^[9]
DMP		<p>Productos en los que se encuentra incluyen cepillos de dientes, partes de automóviles, herramientas, juguetes, y empaques de alimentos.</p>
DEP		<p>Plastificante en el PVC, usado en cosméticos, insecticidas y aspirina. Desnaturalizado de alcohol.</p>
DBP		<p>Plastificante en el reverso de alfombras, pinturas, adhesivos, lacas para el cabello y esmalte de uñas; ectoparasiticida.</p>
DnOP		<p>Esta sustancia es utilizada como portador, plastificante o colorante^[10].</p>
DEHP		<p>Empleado en imitación de cuero, ropa impermeable, calzado, tapicería, pisos, cables y alambres, manteles, cortinas de baño, materiales de envasado de alimentos y juguetes para niños. Utilizado en materiales de uso médico^[11] (líneas y contenedores de transfusión sanguínea).^[12]</p>
BBP		<p>Plastificante en el PVC, usado en espumas de vinilo y recubrimientos textiles. Usado en adhesivo en emulsiones de acetato de polivinilo.</p>

I.3 Fuentes de los ftalatos en el medio ambiente.

Los ftalatos entran al ambiente principalmente a través de los rellenos sanitarios y de residuos municipales e industriales de donde son liberados; sin embargo, también pueden liberarse durante la quema de productos plásticos. Una pequeña fracción de estos compuestos se volatiliza a la atmósfera, donde pueden sufrir reacciones fotoquímicas con radicales hidroxilo, o dispersarse a sitios lejanos, tanto en fracción gaseosa como unidos a las partículas y posteriormente reingresar a la tierra por deposición seca o húmeda, su tiempo de vida media para la mayoría de los ftalatos es inferior a un día en la atmósfera. Asimismo, estos compuestos pueden llegar a cuerpos de agua y al océano a través de las descargas de aguas residuales de la industria que manufactura y procesa plásticos, así como de los efluentes de las plantas de tratamiento de agua, todas fuentes de origen antropogénico. La difusión a través del aire es el principal medio de distribución de los ftalatos en el medio ambiente, a pesar de sus bajas presiones de vapor. Su detección en la superficie de nieve y en la capa de hielo de la Antártida, confirma que pueden ser transportados a través del aire a distancias largas sin sufrir degradación^[13].

I.3.1 Agua

El agua es uno de los recursos más importantes con el que contamos y, no está exenta de problemas y su calidad es fácilmente alterada. La contaminación de las aguas subterráneas se debe principalmente a los efluentes urbanos, industriales, filtración de fertilizantes depositados en el suelo procedentes de la agricultura y el excremento del ganado. La solubilidad de contaminantes en agua es una propiedad muy importante ya que influye en su transporte, biodisponibilidad, potencial de bioacumulación y/o degradación, así como su toxicidad acuática. Debido a esta dinámica y gran volumen de producción, los ftalatos provenientes de productos comerciales, se encuentran distribuidos en los diferentes medios de la biosfera y se consideran contaminantes ubicuos. Entre ellos, los que se encuentran en agua a mayor concentración son el DBP y DEHP. La Unión Europea y la Organización Mundial de la Salud (OMS), establecen un valor máximo en agua potable de 8 µg/L. La Agencia de Protección al Ambiente de los Estados Unidos (USEPA) en su Acta de Agua establece que los niveles máximos de contaminantes en agua son 6.0 µg/L para aguas potables y 0.4 mg/L para aguas industriales respectivamente^[14]. En organismos

acuáticos, especialmente en peces, se han evaluado los efectos de los ftalatos en estudios experimentales. Dichos estudios han demostrado algunas alteraciones bioquímicas (actividad enzimática) que afectan el sistema reproductivo del organismo^[15].

I.3.2 Comportamiento y biodegradación en suelo y sedimentos.

Los ftalatos presentan una elevada tendencia a absorberse en las partículas de suelo y sedimentos, y pueden bioacumularse en algunos organismos acuáticos y terrestres. Sin embargo, varios organismos son capaces de transformar/degradar este tipo de compuestos, por lo que no se espera su biomagnificación a través de la cadena alimenticia. La fitotoxicidad de los ftalatos ha sido investigada en diversos tipos de plantas, principalmente el DBP y DEHP por su conocida actividad como estrógenos ambientales e incluidos en la lista de “contaminantes prioritarios” descrita por EPA y la UE. En el caso de plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas, específicamente en las etapas de desarrollo de las semillas y germinación de brotes no se observó ningún efecto discernible; sin embargo, en el desarrollo de las raíces se observó una inhibición en el crecimiento debida principalmente a la presencia de DBP. En contraste, el DEHP causó un incremento en el desarrollo de las raíces. El contenido de malondialdehído (MDA), producto de la peroxidación de lípidos, es considerado un importante indicador de daño oxidativo por radicales libres producidos en condiciones de estrés. La presencia de DEHP y DBP aumenta la cantidad de MDA principalmente en raíces y brotes, pero éste no es significativo, indicando resiliencia por parte de la planta. Los resultados reportados sugieren la participación de diversos mecanismos de defensa y adaptación en respuesta al estrés oxidativo causado en plantas por estos ftalatos^[16].

En una descarga de ftalatos al suelo, éstos pueden filtrarse hasta llegar a aguas subterráneas. En las condiciones aerobias, tanto en suelo como en agua, los ftalatos son susceptibles a degradación y/o biodegradación aunque, las moléculas adsorbidas en partículas sólidas presentan una mayor estabilidad respecto a aquellas que existen en forma “libre”. De manera general sin embargo, gracias a la degradación natural y biodegradación, las concentraciones de ftalatos en el medio ambiente suelen ser muy bajas^[17]. La biodegradación microbiológica incluye la hidrólisis del enlace éster al correspondiente mono alquil ftalato, después éste se hidroliza hasta ácido ftálico y consecutivamente hasta formar dióxido de carbono. La velocidad de degradación varía

substancialmente, dependiendo principalmente de la masa molecular del ftalato, su isomería y su constante de partición octanol-agua. Por ejemplo, el DEP ($\log K_{ow}$ 2.5) tiene una vida media en suelos de aproximadamente 19 horas, mientras que el DEHP ($\log K_{ow}$ 7.4) es degradado del mismo suelo después de 70 días de incubación^[18]. Después de la primera hidrólisis, la vida media del mono derivado es menor de 24 horas.

I.4 Ftalatos en alimentos.

La principal fuente de exposición de los humanos a los ftalatos es la dieta. Presencia de los ftalatos en diferentes productos alimenticios es debida a su presencia en materia prima, a la contaminación durante el procesamiento y también es resultado de migración de ftalatos de los empaques de alimentos^[19, 20]. La importancia de empaques de alimentos ha sido reconocida ampliamente lo que quedó reflejado en las directivas de la Unión Europea 82/711/EEC^[21], donde se describen algunas pruebas de migración incluyendo como parámetros importantes el tipo de empaquetado, temperatura y tiempo de almacenamiento.

Para evaluar contribución de diferentes tipos de alimentos en la ingesta diaria, en un estudio reciente se clasificó los alimentos en tres grupos: productos con alto contenido ($\geq 300 \mu\text{g}/\text{kg}$), de bajo contenido ($< 50 \mu\text{g}/\text{kg}$) y de contenido promedio ($50 - 300 \mu\text{g}/\text{kg}$) de ftalatos totales^[22]. Los productos más contaminados fueron los de alto contenido de grasa tales como carne de aves de corral, crema, quesos y aceites. Por otro lado, leche, yogurt, huevos, frutas, verduras, pasta, arroz y bebidas presentaban relativamente bajas concentraciones; aunque dichas concentraciones aumentaban en productos procesados y/o envasados respecto a la materia prima. Los compuestos frecuentemente reportados (en $> 50\%$ de estudios consultados) fueron di-isobutilftalato (DiBP), dibutilftalato (DBP), bencilbutilftalato (BBP); aquellos reportados en menos de 50% estudios fueron dietilftalato (DEP), dimetilftalato (DMP), di(n-octil)ftalato (DnOP) y di-isonilftalato (DiNP)^[22]. Cabe mencionar sin embargo que los resultados reportados varían entre diferentes regiones geográficas; por ejemplo los DMP y DEP fueron los más ubicuos en alimentos de mercado chino^[23] mientras que en USA los de mayor frecuencia correspondieron a DEP y DEHP^[24]; en ambos casos sin embargo, las concentraciones de estos compuestos fueron bajas ($< \text{DL} - 25.98 \mu\text{g}/\text{kg}$). En

este sentido y de manera consistente entre diferentes estudios, el DEHP resultó ser el ftalato más abundante en alimentos, llegando a las concentraciones ≥ 300 mg/kg.

De relevancia para este trabajo de tesis, entre los productos con concentraciones muy cambiantes de ftalatos se detectaron granos, cereales y panes, ésta variabilidad sugiere contribución de diferentes fuentes de contaminación en estos productos. A pesar de las diferencias observadas, las concentraciones de DiBP, DBP and DEHP fueron siempre las más altas respecto a otros ftalatos; en algunos productos el DEHP excedió el límite de 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$. También es necesario resaltar que, entre 35 estudios dedicados a la determinación de ftalatos en la comida y 17 estudios generales sobre monitoreo de ftalatos en comida, todos ellos publicados hasta el año 2014 y discutidos en el reciente artículo de revisión, no se incluyó ningún reporte sobre tortilla de maíz ^[22]. Debido a la importancia de la tortilla como uno de los principales componentes de la dieta mexicana y también debido a la falta de datos sobre este producto, en el presente trabajo de tesis se centró en el análisis de ftalatos en tortillas, tostadas y harina de maíz.

I.5 Efectos en la salud

Los ftalatos son clasificados como “disruptores endocrinos” por la Organización Mundial de la Salud. Un disruptor endocrino es definido por la IPCS como “un agente exógeno que interfiere con la síntesis, secreción, transporte, metabolismo, acción de unión, o eliminación natural de hormonas transportadas por la sangre, responsables por la homeostasis, reproducción y procesos de desarrollo”^[25].

Entre los factores importantes en las alteraciones endocrinas en un organismo vivo se encuentran las siguientes:

- a) Edad del sujeto durante la exposición, con una mayor vulnerabilidad en etapa gestacional.
- b) Tiempo de exposición latente. Una exposición en las primeras etapas de desarrollo pueden manifestarse en edad adulta o incluso en la vejez.
- c) Exposición a los contaminantes múltiples.

- d) Dosis del disruptor durante la exposición, sorprendentemente, una dosis baja de cierto contaminante puede tener efectos más fuertes que una dosis alta.
- e) Efectos trans-generacionales y epigenéticos. La exposición no solo se afecta a un individuo, sino también a su descendencia e incluso pasa a sucesivas generaciones.
- f) La diversidad y complejidad de los mecanismos de acción, dependiendo de tipo del compuesto y de propiedades de sus metabolitos^[26].

Estudios anteriores han demostrado que en roedores expuestos a altas dosis de ciertos ftalatos, los perfiles hormonales resultaron modificados y se presentaban defectos de nacimiento^[27]. Un estudio británico reciente informó resultados similares, en el cual el dibutilftalato (DBP) o su metabolito monobutilftalato (MBP) suprimió la esteroidogénesis en las células de Leydig en fetos de primates. Los ftalatos han sido clasificados como agentes tóxicos por agencias tan importantes como es la EPA^[28]. El DEHP fue catalogado en clase B2 como embriotóxico, teratógeno y previsto para ser un carcinógeno humano^[29], el BBP pertenece a la clase C como posible carcinogénico en humanos, el DBP, DEP y DMP están en Clase D (todavía no clasificados como carcinogénicos en humanos)^[30].

En estudios en humanos se ha reportado que la exposición prenatal a ftalatos se asocia con el encogimiento de la distancia anogenital en niños, indicativo de una disminución de la masculinización y quizás una reducción futura de fertilidad. Adicionalmente, los ftalatos han sido asociados con criptorquidismo y niveles alterados en las hormonas reproductivas. También se observó un incremento en el riesgo de padecimiento de Hipospadias^[31] y un decremento en la calidad y cantidad de líquido seminal^[32].

Un análisis realizado en ratones, los cuales fueron expuestos a 5 mg/kg de masa corporal de DEHP en etapas pre-natales, se reportó el efecto antiadipogénico, en el cual los ftalatos actuaron a través de la PPAR. En contraste, una exposición crónica a DEHP, ha sido asociada con la adipogénesis a través de la PPAR γ , el cual controla el almacenamiento de grasa en el tejido adiposo mediante la promoción de la diferenciación y la supervivencia de los adipocitos, también desempeña un papel importante en el control de la sensibilidad a la insulina. En un cultivo de preadipocitos, la exposición al metabolito del DEHP (MEHP) causó la adipogénesis mediante un efecto sobre los receptores en peroxisomas activados por proliferadores (PPAR γ). Se ha demostrado que una exposición prenatal a los ftalatos, provoca una inhibición en la síntesis de

andrógenos y ejerce efectos adipogénicos, ya que se observó una clara correlación entre el contenido de metabolitos de ftalatos en la orina y la circunferencia abdominal^[33].

Además de efectos en sistemas reproductivo y endocrino, datos experimentales y epidemiológicos sugieren que los ftalatos podrían jugar un papel importante como posibles agentes causantes en el desarrollo y/o aumento de enfermedades alérgicas atópicas. Se ha propuesto que ciertos ftalatos podrían actuar como adyuvantes de otros agentes, influyendo en la respuesta inmune específica. Se reportó un efecto adyuvante del DBP el cual fue asociado con acción de otros alérgenos químicos que desatan la aparición de IL-8 o interleucina 8, principalmente en queratinocitos y células promielocíticas, respectivamente^[34].

Los ftalatos también afectan las células trofoblásticas en placentas humanas. Por ejemplo, una alta concentración de cinco metabolitos de ftalatos encontrada en orina de mujeres embarazadas (MEHP, MEOHP, MnBP, MiBO Y MBzP) fue asociada con el decremento de la expresión de marcadores de diferenciación del trofoblasto (PPAR γ , AhR, hCG) conduciendo a una alteración en el desarrollo de la placenta y de su función. En ratas, al exponer los trofoblastos a DEHP, MEHP y al ácido 2-etilhexanoico, se reportó un incremento significativo en la concentración de diferentes clases de lípidos, lo que sugiere un posible efecto de estos compuestos en la homeostasis fetal de ácidos grasos y lípidos, con un potencial impacto, a un desarrollo anormal del feto^[35, 36].

Dado el amplio uso de ftalatos en la producción de los empaques de comida y demostrada toxicidad de estos compuestos, el presente trabajo de tesis se enfoca en la determinación de típicos ftalatos en tortillas, tostadas y harina de maíz. Estos alimentos se almacenan en bolsas de plástico o en papel y existe un riesgo de la migración de ftalatos del empaque al producto aumentando potencialmente la exposición de los consumidores.

I.6 Técnicas analíticas empleadas para detección y cuantificación de ftalatos.

I.6.1 Cromatografía de Gases.

La Cromatografía de gases (GC) con diferentes tipos de detectores y metodologías de extracción es la técnica por excelencia para la determinación de ftalatos debido a que estos compuestos son semi-volátiles y termoestables (desde el más pequeño dimetilftalato hasta didodecilftalato)^[37, 38]. Un argumento más para el uso preferencial de GC es que ftalatos presentan un amplio intervalo de polaridades lo que dificulta su separación por cromatografía de líquidos. Inicialmente, en GC se usaban los detectores por fotoionización (PID)^[39], por ionización de flama (FID)^[40], de captura de electrones (ECD)^[41], o detector de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR)^[42], pero en la actualidad se emplea con mayor frecuencia la espectrometría de masas (MS) como sistema de detección, utilizado principalmente el modo de monitoreo selectivo de iones (SIM Selected Ion Monitoring)^[43].

En GC-MS con ionización por impacto de electrones (EI), el fragmento m/z 149 es el ion común para la mayoría de los ftalatos a excepción del DMP (ion m/z 163). Ésta es la mayor limitación del método para la determinación de ftalatos, porque generalmente las muestras de interés contienen mezclas de isómeros que inicialmente co-eluyen, tal es el caso del DIDP y DINP con varios sustituyentes alquílicos. El análisis, incluso utilizando el monitoreo selectivo de iones, requiere una separación cromatográfica eficiente y una confirmación adicional para asegurar que no ocurre la co-elución de solutos que producen iones con el mismo valor m/z . Actualmente empleando GC con espectrometría de masas con separador de iones de triple cuadrupolo, la selectividad y el poder de detección aumenta enormemente gracias al uso de monitoreo de reacciones múltiples.

1.6.1.1 Detector por Ionización en Flama (FID)

El detector por ionización en flama utiliza la flama de hidrógeno/aire donde ocurre pirolisis y ionización de los solutos orgánicos que se eluyen de la columna, aumentando de esta manera la conductividad de la flama. Al aplicar la diferencia de potenciales entre la parte inferior del quemador y un electrodo colector colocado encima de la flama, se genera una corriente eléctrica relativamente baja, del orden de 10^{-12} A, misma que es incrementada mediante un amplificador de alta impedancia. Se mide la corriente como señal analítica y esta es directamente proporcional a la masa del soluto introducida a la flama.

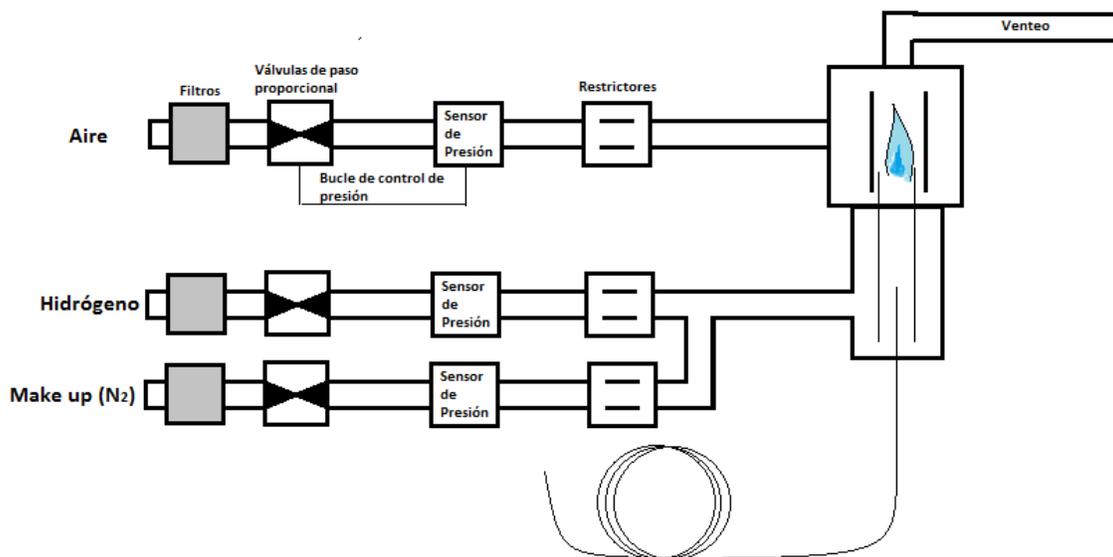


Figura 2. Esquema de Detector por Ionización en Flama^[44].

Para este detector, el gas acarreador empleado en la columna puede ser nitrógeno o helio. Su principal ventaja es alta versatilidad en el análisis de compuestos orgánicos. Por ejemplo, en el análisis de hidrocarburos, su sensibilidad es 10^{-13} g/s, con amplio rango lineal y bajo ruido. Existen algunos grupos funcionales que no dan respuesta en este detector, como el carbonilo, alcohol, halógeno o amina, y tampoco pueden ser detectados gases como el CO_2 , SO_2 , agua y óxidos de nitrógeno. Esta característica del detector no limita en absoluto la técnica, al contrario, puede permitir el análisis de muestra contaminadas con compuestos orgánicos con los grupos funcionales mencionados.

1.6.1.2 Detector por Fotoionización^[45]

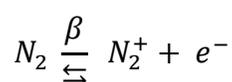
El funcionamiento del PID (por sus siglas en inglés) se basa en la ionización de moléculas orgánicas en fase gaseosa mediante su irradiación con fotones que poseen energía en la región UV (8.3 a 11.7 eV). Es importante que los fotones en este intervalo de energía sean capaces de ionizar muchas especies orgánicas pero no a los gases de acarreo. Un PID tiene dos partes funcionales: una fuente de excitación y una cámara de ionización. La fuente de excitación puede ser una lámpara de descarga alimentada con la corriente directa (1 a 2 kV), radiofrecuencia (75 a 125 kHz), microondas (2450 MHz), o se puede emplear ionización por láser. Los iones de soluto son acelerados por diferencia de potenciales de 100 a 200 V aplicada entre el electrodo acelerador y el electrodo colector, donde se mide la corriente eléctrica que es proporcional a la masa del soluto eluído de la columna. La lámpara más popular para PID es el modelo 10.2 eV, que aplica un fuerte haz de fotones favoreciendo la sensibilidad. Hay ciertas aplicaciones en que la lámpara de 9.5 eV es preferible a la 10.2 eV; esta incluye compuestos aromáticos en matrices alifáticas, mercaptanos en presencia de H_2S , y aminas en presencia de amoniaco.

Un tipo especial de detector donde se utilizan fotones para la ionización de compuestos, es el detector de ionización por descarga (DID). El DID usa fotones en el ultravioleta lejano y para ello se hace pasar helio a través de la cámara en la cual electrodos de alto voltaje generan una descarga luminiscente generando emisión de alta energía a 58.84 nm (teniendo una energía de 21.2 eV). Los fotones pasan a través de una apertura a una segunda cámara donde causan la ionización

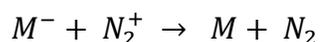
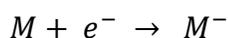
de compuestos que salen de la columna y que tienen su potencial de ionización menor a 21.2 eV. Esta condición se cumple prácticamente para todos los compuestos en fase gaseosa, incluyendo hidrógeno, argón, oxígeno, nitrógeno, metano, carbón, monóxido, óxido nítrico, amoníaco, agua y dióxido de carbono. Los electrones resultantes son atraídos hacia el electrodo colector generando una corriente eléctrica.

1.6.1.3 Detector de Captura de Electrones^[46].

El detector de captura de electrones (ECD) se convirtió en uno de los más usados en muestras ambientales porque detecta selectivamente compuestos halogenados como los pesticidas o bifenilos policlorados y compuestos que contienen en su estructura anillos aromáticos como son los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH). El diseño del detector de captura de electrones se muestra esquemáticamente en la figura 3. La cámara interna del detector se mantiene tan pequeña como sea posible y está forrada con una capa radioactiva de β -emisores (^3H o ^{63}Ni) la cual se sella con aluminio. El tubo de entrada y el cuerpo cilíndrico son aislados uno del otro para que puedan ser usados como electrodos en la celda. Los electrones emitidos provocan la ionización del gas de arrastre (N_2 o Ar) y, mediante aplicación de una diferencia de potenciales, se genera una corriente eléctrica constante.



Los solutos que salen de la columna y entran a la cámara del detector junto con el gas de arrastre provocan una disminución de la corriente que es proporcional a la cantidad de este soluto. Las dos siguientes ecuaciones muestran el mecanismo de la disminución de la ionización de nitrógeno en presencia del soluto M.



Los ECD operan en modo de pulsos a una amplitud de 50 V y 1 μ s de duración con intervalos de 20 a 50 μ s. Comparado con otros detectores, el ECD ofrece alto poder de detección (límites de detección del orden de unas pocas partes por trillón), es simple y versátil. Por otro lado, es necesario mencionar el requerimiento de la pureza del gas acarreador y de muestra, relativamente corto intervalo de respuesta lineal (2 órdenes de magnitud), precauciones necesarias debido al uso de material radioactivo y necesidad de constantes mantenimientos usando altas temperaturas y procedimientos de limpieza de muestra estrictos.

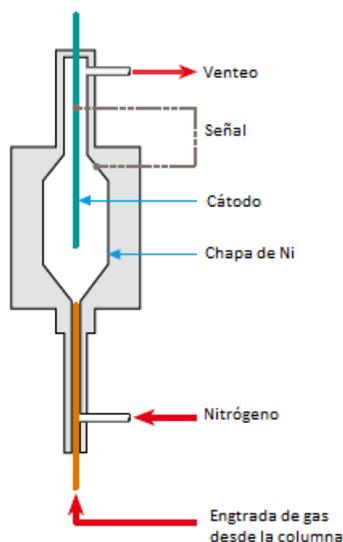


Figura 3. Esquema de Detector por Captura de Electrones^[47].

I.6.2 Espectrometría de Masas.

El término espectrometría de masas (MS) engloba un conjunto de técnicas que se basan en la ionización de moléculas y en la separación de iones generados en fase gaseosa en función de su relación masa/carga (m/z). La capacidad analítica de un equipo MS depende de su configuración y en particular, del tipo de fuente de ionización y del separador de masas. Cuando se utiliza una fuente de iones muy energética, como es por ejemplo el plasma de argón acoplado inductivamente, se producen principalmente iones positivos con carga +1 de átomos (metales, metaloides y algunos

no-metales). Por su parte, las fuentes de ionización suave tales como ionización por electronebulización (ESI) o desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI) producen iones de moléculas sin o con muy poca fragmentación y además se forman aductos de estos iones. Existen también dispositivos de ionización de carácter intermedio, donde la fragmentación de moléculas es mayor respecto a ESI o MALDI, tal es el caso de ionización por impacto de electrones (EI) o, con mucho menor fragmentación de iones, ionización química (CI). Entre diferentes tipos de separadores de m/z , cuadrupolo y trampa iónica operan como filtros de iones, mientras que los separadores de tipo sector de campo magnético y/o electroestático y de tiempo de vuelo funcionan como analizadores. Hoy en día, la configuración del sistema de ionización y separación de masas permite repetir el ciclo de ruptura de los iones produciendo sus fragmentos lo que se denomina espectrometría de masas en tándem (MS)ⁿ. El objetivo es obtener información estructural más completa, así como mejorar la selectividad y sensibilidad para el análisis cuantitativo. En este sentido, en GC se utilizan los separadores de masa tipo trampa iónica, triple cuadrupolo o cuadrupolo con analizador de tiempo de vuelo.

Dependiendo de la configuración del instrumento, MS provee información cualitativa y cuantitativa sobre composición atómica y molecular de la muestra, incluyendo la capacidad de caracterización estructural de los compuestos.

La principal ventaja de espectrometría de masas atómica es su capacidad de cuantificación de metales, metaloides y algunos no-metales con muy alto poder de detección, amplio intervalo de linealidad, prácticamente sin interferencias químicas y con capacidad isotópica. En el caso de espectrometría de masas molecular, además de su posibilidad del análisis cuantitativo, se obtiene la caracterización estructural mediante la medición de la masa exacta de especies moleculares, su padrón isotópico y padrones de fragmentación. Gracias a su excepcional selectividad, se pueden caracterizar/cuantificar varios compuestos presentes en una sola muestra; sin embargo, la importante limitación en este caso es el efecto de la matriz de muestra sobre eficacia de ionización, la necesidad de utilizar equipos de alta resolución para poder distinguir entre iones con muy similares valores m/z y también imposibilidad de distinguir entre isómeros ópticos o geométricos de compuestos. Para eliminar al menos parcialmente estos problemas, se realiza una etapa previa de tratamiento de muestra y separación de compuestos de interés antes de la introducción de la muestra al espectrómetro de masas. De esta manera, la configuración instrumental en la que se

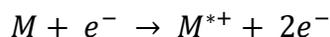
tiene el acoplamiento en línea de un cromatógrafo de gases (GC) o de líquidos (LC) con un espectrómetro de masas, es ampliamente utilizada para diferentes aplicaciones. En particular, las técnicas GC-MS y LC-MS reúnen la capacidad de separación que ofrece el cromatógrafo con la sensibilidad y especificidad de un espectrómetro de masas. El principal problema que se plantea a la hora de acoplar estas dos técnicas es que una de ellas, la cromatografía, trabaja a una presión ligeramente superior a la atmosférica, mientras que la otra trabaja bajo alto vacío. En el caso de GC-MS, el gas portador por excelencia para este acoplamiento es el helio y se utilizan columnas capilares de pequeño diámetro; por otro lado, en la etapa MS es necesario el uso de bombas de alto vacío. En este tipo de acoplamientos, es preciso introducir entre los dos equipos un dispositivo (interface) capaz de eliminar la mayor parte del gas portador, evitando al mismo tiempo el mezclado de los componentes separados previamente en la columna cromatográfica así como pérdidas de muestra por descomposición o condensación. El caudal de las columnas capilares es suficientemente bajo como para que la salida de la columna pueda introducirse directamente en la cámara de ionización^[48].

En el presente trabajo de tesis, la cuantificación de los ftalatos se propone llevar a cabo por GC-MS, es por ello que en las siguientes secciones se describen brevemente típicos dispositivos de ionización y separadores de masa utilizados en esta técnica.

1.6.2.1 Ionización por Impacto de Electrones (EI).

Este tipo de ionización se utiliza principalmente en los equipos GC-MS, donde se analizan compuestos volátiles y semi-volátiles, cuyas masas moleculares no sobrepasan 10^3 Da y entre ellos se incluyen ftalatos. En la cámara de ionización, un filamento caliente de wolframio o de renio emite electrones; estos electrones son acelerados mediante diferencia de potenciales de aproximadamente 70 eV aplicada entre el filamento y el ánodo. Las trayectorias de los electrones y las moléculas son perpendiculares y se cruzan en el centro de la fuente donde colisionan ocasionando la ionización de los solutos. El producto primario son iones de una única carga positiva que se forman cuando los electrones de elevada energía se acercan suficientemente a las moléculas como para causarles la pérdida de electrones por repulsión electrostática. La

ionización por impacto de electrones no es muy eficaz y sólo alrededor de una molécula de entre un millón experimenta la reacción primaria:



donde M representa la molécula de analito y M^{*+} es su ion molecular. Los iones positivos producidos en un impacto de electrones se encuentran sin embargo en altamente excitados estados vibracionales y rotacionales de energía; como resultado de su relajación se produce fragmentación formando un gran número de especies, típicamente con m/z inferior respecto a la molécula intacta del compuesto. Los iones son atraídos a través de la rendija hacia la primera placa de aceleración mediante una pequeña diferencia de potenciales (aproximadamente de 5V) aplicada entre esta placa y las placas repulsoras; se pueden utilizar campos electrostáticos o magnéticos adicionales para manipular el haz de electrones o de iones^[49].

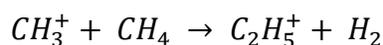
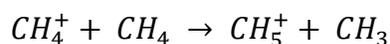
Las fuentes de ionización por impacto de electrones producen corrientes de iones elevadas, obteniéndose buenas sensibilidades, además la extensa fragmentación ayuda en la identificación de los analitos; no obstante, la ausencia de la señal del ion molecular impide en muchos casos establecer la masa molecular del compuesto.

En este trabajo de tesis, para la determinación de ftalatos, se utilizó el instrumento GC-MS equipado con dispositivo de ionización por impacto de electrones.

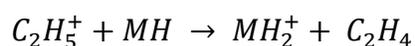
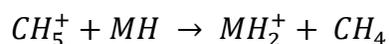
1.6.2.2 Ionización Química (CI).

Los espectrómetros de masas más modernos están diseñados para poder realizar la ionización por impacto de electrones y la ionización química de manera intercambiable. En la ionización química, las moléculas en estado gaseoso se ionizan al colisionar con los iones producidos a partir de un gas reactivo. Este gas (típicamente amoníaco o metano, pero también propano o isobutano, entre otros) se introducen a la cámara de ionización en un exceso de 10^3 a 10^4 veces respecto a los solutos que salen de la columna; de esta manera, al interaccionar con un haz de electrones que se genera en la celda, la ionización del gas reactivo ocurre de manera preferencial. La ionización de los compuestos de interés se realiza mediante reacción con iones

del gas ionizado. Para llevar a cabo experimentos mediante ionización química, es necesario modificar la zona de ionización del haz de electrones, incrementando la capacidad de la bomba de vacío y reduciendo la anchura de la rendija que conduce al separador de masas. Estas medidas permiten mantener una presión de aproximadamente 1 torr en el área de ionización mientras que en el separador, la presión está por debajo de 10^{-5} torr. Uno de los reactivos más comunes es el metano, que reacciona con electrones de elevada energía para dar iones como CH_4^+ , CH_3^+ y CH_2^+ , donde las dos primeras especies corresponden a aproximadamente 90% de todos los productos de reacción. Estos iones reaccionan rápidamente con moléculas de metano adicionales como sigue:



Por su parte, en las colisiones entre las moléculas de compuestos de interés MH y CH_5^+ o C_2H_5^+ ocurren la transferencia de protones y formación de iones de los analitos tal como se presentan a continuación:



La transferencia del protón genera el ion positivo (M+1), pero en algunos compuestos puede encontrarse también una señal (M+29), resultado de la transferencia del ion C_2H_5^+ al analito. Aunque CI en modo positivo tiene muchas más aplicaciones, es posible también formar iones negativos por pérdida de protón u otro tipo de reacciones químicas. Es importante mencionar que la ionización química tiene carácter más suave respecto a EI, por lo que los espectros de masas son relativamente sencillos y el ion molecular aparece como el de mayor intensidad. Al comparar CI con EI, la ionización química ofrece mayor selectividad y mayor poder de detección.

1.6.2.3 Ionización por campo.

En las fuentes de ionización por campo, la ionización ocurre bajo la influencia de un campo eléctrico fuerte (10^8 V/cm). Este campo se produce al aplicar potenciales del orden de (10 a 20 kV) a un emisor en forma de aguja, cubierto por muy finas puntas del carbón, cuyos diámetros son menores de $1 \mu\text{m}$. El emisor (ánodo) se coloca a una distancia de 0.5 a 2 mm del cátodo, el cual a menudo sirve de rendija. La muestra gaseosa se difunde hacia el área de campo eléctrico, alrededor de las microagujas del ánodo y la ionización se produce por un mecanismo de efecto mecánico-cuántico túnel en el que los electrones del analito son extraídos por las microagujas del ánodo. En este caso el analito adquiere poca energía vibracional y rotacional; por lo que se obtiene poca fragmentación de molécula. Una limitación de la ionización por campo es su baja sensibilidad, que es al menos un orden de magnitud inferior a la de las fuentes de impacto de electrones, las corrientes máximas son del orden de 10^{-11} A.

1.6.2.4 Separadores de masas^[50-52].

Una vez formados los iones, estos pasan de la cámara de ionización al área del separador donde son separados en base a su relación masa/carga. El rango de masas de interés es escaneado obteniéndose una separación de iones en un dominio de espacio o tiempo. Los separadores de masa más comunes en GC son el cuadrupolo, trampa iónica, separador de sector del campo y de tiempo de vuelo. En el caso de sector de campo, se puede emplear un solo sector del campo magnético o dos sectores del campo electrostático y magnético, respectivamente. El instrumento equipado con dos sectores se denomina de doble enfoque y es de alta resolución (figura 4).

La relación entre la fuerza del campo magnético y la masa/carga está dada por:

$$\frac{m}{z} = \frac{B^2 r^2 e}{2V}$$

donde B es la inducción del campo magnético aplicado, r es el radio de la trayectoria, e es la carga del electrón, m y z son la masa y carga del ion, respectivamente, V es el voltaje de aceleración. De manera general, el campo magnético aplicado a los iones en movimiento provoca su desvío de tal

manera que el radio de la trayectoria depende de su masa/carga. En un típico analizador por sector magnético, el campo magnético es variado, para que los iones pasen a través de una rendija angosta separados por su m/z dependiendo del ajuste del campo y en un amplio intervalo de masas. Es importante que la inducción del campo pueda ser alterada con suficiente rapidez para poder registrar las señales de corta duración, como ocurre en una separación cromatográfica. Al agregar el sector del campo electrostático, aumenta la resolución del analizador ya que se obtiene el enfoque de los iones que poseen la misma energía cinética. Los analizadores de doble enfoque pueden operar a baja, mediana y alta resolución; en el modo de alta resolución obviamente se pierde la sensibilidad, pero en modo de mediana y baja resolución se elimina muy eficientemente el ruido y la sensibilidad es excelente.

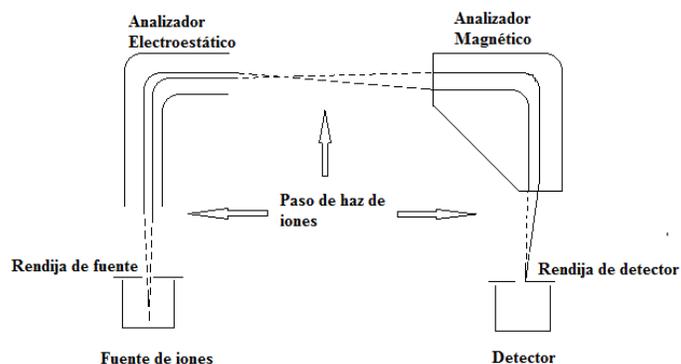


Figura 4. Analizador másico de doble enfoque, en el que los iones separados pasan por el sector de campo electrostático y sector magnético^[53].

El separador de masas quizás más utilizado es el cuadrupolo, sobre todo cuando se combinan tres en un solo equipo o cuando el cuadrupolo es incorporado junto con el analizador de tiempo de vuelo. El cuadrupolo sencillo consiste de cuatro barras cilíndricas precisamente rectas y paralelas entre sí, arregladas de tal manera que el haz de iones es dirigido axialmente entre ellas. Las barras opuestas se conectan eléctricamente, un par está unido al polo positivo de una fuente variable de corriente alterna de radiofrecuencia, que están desfasados 180 grados. Para obtener un

espectro de masas con este dispositivo, los iones se aceleran en el espacio entre las barras mediante un potencial de 5 a 10 V. Entre tanto, los campos de corriente continua y alterna se incrementan simultáneamente, mientras se mantiene constante su relación. En cualquier momento, todos los iones excepto aquellos que tengan un determinado valor m/z son eliminados por los choques con las barras. Con un cambio del ajuste de campos se obtiene el barrido de iones, los cuales de acuerdo a su valor m/z alcanzarán al detector en diferentes tiempos; generalmente se separan iones que difieren en su masa en una unidad.

Para comprender la capacidad de filtración de un cuadrupolo, es necesario considerar el efecto de los potenciales de corriente continua y de corriente alterna en la trayectoria de los iones a medida que atraviesan el canal de barras. Cuando el potencial de corriente alterna es positivo con respecto al eje central, los iones positivos serán acelerados o enfocados sobre el eje central de la estructura como se muestra en la figura 5. Inversamente, cuando el potencial aplicado es negativo, el haz de iones positivos será acelerado hacia los electrodos parciales negativos; es decir, los iones cargados positivamente tienden a ser desenfocados del eje central y neutralizados por choques con barras. Esta tendencia es modulada por un potencial positivo de corriente continua que se superpone a una señal de corriente alterna y, como resultado las barras del plano yz actúan como un filtro que no deja pasar masas bajas. Por su parte, el par de barras que se mantienen a un potencial negativo de corriente continua (plano yz) atraen de manera continua todos los iones; sin embargo, para los iones más ligeros este movimiento se puede compensar por el campo de la corriente alterna manteniéndolos dentro del canal central. Las barras en el plano yz actúan entonces como filtro de masas altas. Para que un ion se desplace a través del cuadrupolo hasta el detector, debe tener una trayectoria estable en ambos planos xz e yz . Por lo tanto, el cuadrupolo transmite una banda de iones que tienen un intervalo limitado de valores de m/z ^[54]. El barrido de espectro es gobernado por la dinámica del ajuste de los dos tipos de campo.

Otro separador de tipo filtro es la trampa iónica; éste se considera más versátil y más sensible que el cuadrupolo sencillo ya que permite almacenar, seleccionar y fragmentar los iones formados en el mismo dispositivo (trampa).

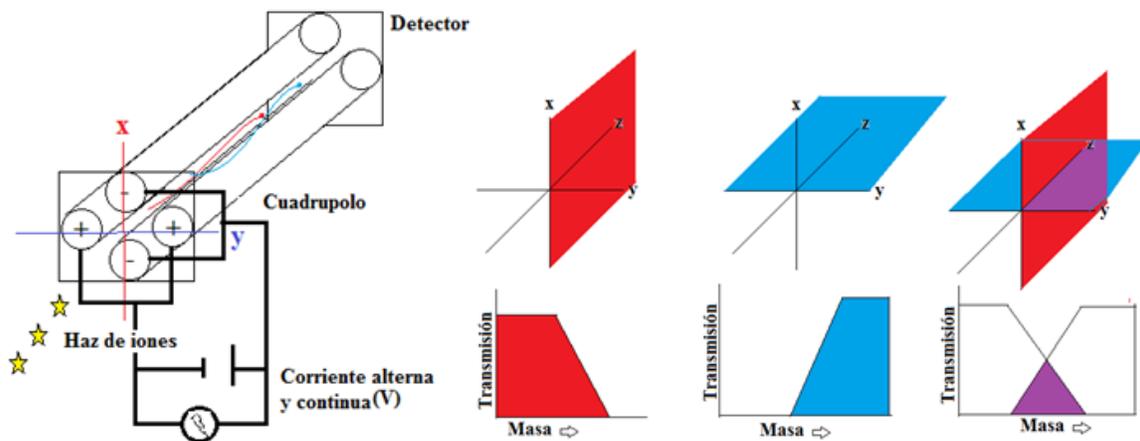


Figura 5. Esquema de un analizador de masas de tipo cuadrupolo^[53].

Es un dispositivo en el que pueden formarse los cationes o aniones gaseosos y éstos se confinan durante controlados periodos de tiempo por la acción de campos electromagnéticos de corriente alterna y continua. Se han desarrollado varios tipos de trampa de iones, la más popular es la trampa simple, pero también se puede mencionar la trampa de resonancia iónica ciclotrónica con transformada de Fourier y trampa orbitante. En la figura 6 se muestra como es una trampa de iones sencilla. Consta de un electrodo anular y un par de electrodos colectores, dentro del espacio formado se mantiene la presión reducida y se introduce gas helio para enfriamiento de iones y, en su caso, para su fragmentación. Al electrodo anular se le aplica un potencial variable de radiofrecuencia, mientras que los electrodos colectores están conectados a tierra (o se les confiere un potencial de corriente continua). Dependiendo de las condiciones del campo, los iones en un intervalo elegido de m/z quedan atrapados circulando en órbitas estables dentro de la cavidad entre los electrodos.

Cuando se incrementa el potencial de radiofrecuencia, las órbitas de los iones más pesados llegan a estabilizarse, mientras que las de los iones más ligeros son eliminadas, produciéndose su colisión con la pared del electrodo anular. De esta manera, con un ajuste del potencial de radiofrecuencia se logra atrapar los iones en el intervalo de m/z de interés y posteriormente, con el

barrido del voltaje, los iones atrapados se desestabilizan y abandonan la cavidad por la apertura en el electrodo colector para su detección y conteo. La trampa de iones ofrece baja resolución en el intervalo de masas de 50 a 5000 Daltons (permite distinguir entre señales que difieren en una unidad de masa)^[55, 56]. Su ventaja importante es la posibilidad de realizar múltiples eventos de fragmentación dentro del mismo dispositivo, simplemente regulando el voltaje y produciendo las colisiones de iones con helio.

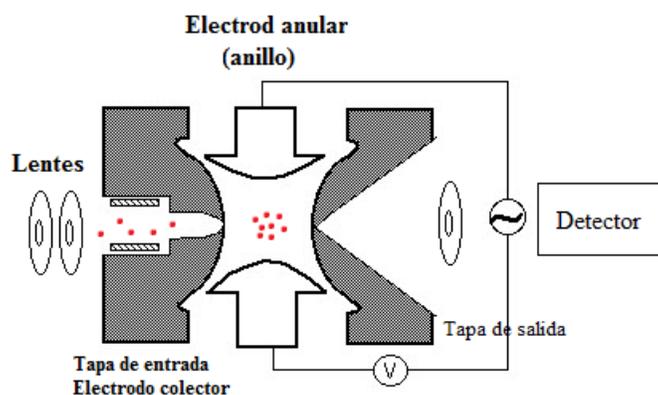


Figura 6. Esquema de un analizador másico de trampa de iones^[57].

Por su parte, en el analizador de masas por tiempo de vuelo (time of flight, TOF)^[58], un paquete de iones es acelerado mediante un impulso de potencial y entra a un tubo libre de cualquier campo en el cual se mantiene alto vacío. Los iones se desplazan en el tubo hasta llegar al detector para su conteo. Basándose en la premisa que todos los iones entran al tubo de vuelo con la misma energía dada por $zeV = mv^2/2$, los iones de diferente masa tendrán diferentes velocidades: $v = (2zeV/m)^{1/2}$. Si un espectrómetro posee un tubo de vuelo con cierta longitud L , el tiempo de vuelo para un ion está dado por: $t = (L^2m/2zeV)^{1/2}$, lo que permite obtener el barrido de m/z de acuerdo con el tiempo que duran los iones en el tubo hasta llegar al detector.

En la mayoría de los instrumentos actuales, el tubo de vuelo tiene integrado un reflector que por la repulsión electrostática cambia la dirección de vuelo de los iones y de esta manera enfoca aquellos de la misma m/z logrando que lleguen al detector al mismo tiempo independientemente de posibles diferencias entre sus energías.

Los tiempos de vuelo son muy cortos (del orden de 10^{-7} s), por lo que la electrónica del instrumento tiene que ser rápida. El rango de masas que pueden ser separadas en TOF es prácticamente ilimitado, lo que hay que resaltar como una ventaja aunque no tan importante si este analizador se utiliza en acoplamiento con GC. Cabe también mencionar que la inserción de diferentes dispositivos dentro del tubo de vuelo permite mejor enfocamiento de iones, eliminación de iones “interferentes” y fragmentación de iones de interés.

El espectrómetro GC-MS con el que se desarrolló el trabajo de tesis cuenta con el sistema de tres cuadrupolos en serie. Aunque un cuadrupolo por se no ofrece alta resolución, los equipos de triple cuadrupolo son capaces de un análisis altamente selectivo y eliminan ruido de manera muy eficiente. De esta manera se obtienen altos valores de señal/ruido y se logra cuantificación de compuestos presentes en la muestra en muy bajos niveles de concentración.

1.6.2.5 Uso de Monitoreo de Reacciones Múltiples (MRM)^[59].

El detector de triple cuadrupolo permite adquirir los datos en las siguientes modalidades: barrido completo (FULL SCAN) en el que se obtiene un cromatograma total de iones (TIC), monitoreo selectivo de iones (SIM), monitoreo de productos de fragmentación de iones precursores (PRODUCT), monitoreo de iones precursores (PRECURSOR) y monitoreo de reacciones múltiples (MRM).

En el modo de barrido completo (FULL SCAN) se lleva a cabo una adquisición continua y virtualmente simultánea de todos los valores m/z en el intervalo establecido inicialmente; el cromatograma TIC obtenido permite detectar la presencia de compuestos esperados/conocidos y también permite asignar los picos cromatográficos que corresponden a la elución de cada uno de ellos. En este caso, solamente un cuadrupolo es utilizado como filtro de masa, mientras que los otros solamente se utilizan para transmisión/enfocamiento de iones. Este tipo de adquisición carece de selectividad y presenta bajos valores S/N. Para solventar dichas limitaciones, se puede utilizar el modo SIM para lo cual a partir del TIC se extraen solo aquellos iones que tengan valor masa/carga del ion más abundante en cada pico cromatográfico. Técnicamente, en el primer cuadrupolo de TQMS se selecciona un solo ion para cada uno de los compuestos (el más

abundante) y este ion es posteriormente filtrado en dos cuadrupolos subsecuentes. A menudo se adquieren en este modo fragmentos de cromatograma correspondientes a los tiempos de elución de cada uno de estos compuestos (ventana de tiempo). Aunque para cada uno de los compuestos se utiliza solamente un ion, el modo SIM ayuda mejorar la selectividad respecto TIC y permite eliminar ruido obteniéndose un aumento de los valores S/N. Es de resaltar sin embargo que la técnica más potente para la cuantificación de trazas de analitos es el monitoreo de reacciones múltiples. En esta modalidad, para cada uno de los compuestos se selecciona un par de iones, uno de los cuales es el precursor y el segundo es producto de su fragmentación (producto). En este caso, el primer cuadrupolo sirve para seleccionar el(los) ion(es) precursor(es) formados por la ionización EI, mientras que el segundo cuadrupolo funciona como zona CID (cámara de fragmentación de iones inducida por colisiones) y en el tercer cuadrupolo se pueden filtrar y monitorear selectivamente los iones productos.

En otras palabras, en el modo MRM se lleva a cabo la ionización de compuestos (EI) y posteriormente la fragmentación de iones (CID - segundo cuadrupolo), mientras que los cuadrupolos 1 y 3 filtran iones de diferentes m/z , lo que conduce al aumento de selectividad hacia el compuesto de interés y, que es muy importante, permite disminuir de manera substancial el ruido. En la zona CID, la fragmentación del precursor ocurre mediante su disociación por colisiones con el gas helio o argón. En el proceso de colisión, la energía cinética del ion precursor se convierte en su energía interna lo que provoca división y reorganización de enlaces y también pérdida de especies neutras. En el tercer cuadrupolo, a menudo se adquieren señales de dos iones provenientes de un solo compuesto, uno de ellos cuantificador y otro calificador (para confirmar la identidad del compuesto). El uso de MRM en el detector de triple cuadrupolo se presenta esquemáticamente en la figura 7. Obviamente, MRM puede llevarse a cabo para varios compuestos al mismo tiempo, lo que es muy útil cuando la separación cromatográfica no es efectiva y ocurren co-eluciones.

Un punto clave en MRM es la selección del ion precursor y ion producto para todos los compuestos de interés. Esta selección se realiza utilizando la modalidad PRODUCT, en la que todos los iones obtenidos en la ionización (EI) del compuesto se dejan pasar a la zona CID registrando espectros de masa que incluyen todos los iones generados. A partir de estos espectros se elige el ion producto que tenga la intensidad más alta posible. En esta etapa se examinan

diferentes energías aplicadas en zona CID (5-100 eV) buscando aumentar la sensibilidad al máximo. Hay que resaltar que la excepcional selectividad del método MRM es debida al uso de la transición ion precursor – ion producto que es única para un compuesto dado. Dicha transición permite también disminuir de manera drástica el ruido aumentando la relación S/N, como ya se mencionó antes en este texto. En la cuantificación MRM, la curva de calibración se construye tomando la intensidad del ion producto para cada uno de los compuestos que se eluyen de la columna. En el caso de ftalatos, se pueden utilizar estándares de compuestos individuales, o mezclas comerciales tales como son los productos EPA con números de catálogo Sigma 861216, CRM47643, 40077-U o 458231.

En resumen, el uso de GC-MS(TQ) con ionización por impacto de electrones y detector másico de triple cuadrupolo proporciona una confirmación/identificación de compuestos mucho más confiable respecto un GC-MS con un simple cuadrupolo. Asimismo, el uso de MRM no solamente aumenta la selectividad, pero sobre todo aumenta el poder de detección haciendo posible la cuantificación de solutos a nivel de ultra traza.



Figura 7. Esquema general de un espectrómetro de masas en tándem espacial. (MS¹ primer cuadrupolo separador de masas, CID, MS³ segundo cuadrupolo separador de masas)^[60].

I.6.3 Cromatografía de Líquidos.

De manera general, cromatografía de líquidos (LC) tiene aplicaciones en separación de compuestos no-volátiles que presentan diferente polaridad, carga eléctrica, tamaño molecular o afinidad a ciertos grupos funcionales. En la búsqueda bibliográfica se han encontrado algunos trabajos sobre el uso de LC en el análisis de ftalatos (tabla 3), por lo que en esta sección se hace una muy breve descripción. La principal ventaja de LC es su enorme versatilidad debido a diferentes dimensiones, así como prácticamente ilimitadas posibilidades de elegir composición de fases móviles y condiciones de elución. Los sistemas de detección abarcan diferentes tipos de detectores espectrofotométricos^[61], específicamente, el detector de arreglo de diodos integrados (DAD, diode array detector), detector fluorimétrico, detectores electroquímicos, detectores de índice de refracción; sin embargo, cada uno de estos sistemas tradicionales tienen sus propias limitaciones en términos de sensibilidad y/o selectividad. Es por ello que, hoy en día existe una clara preferencia de utilizar técnicas híbridas donde se realizan acoplamientos entre LC y MS.

El uso de espectrometría de masas ha permitido que se pueda identificar y cuantificar una gran variedad de especies químicas presentes en muestras con matrices químicamente complejas como los son los alimentos. En el análisis de ftalatos sin embargo, el uso de HPLC-MS o HPLC-MS/MS ha sido poco frecuente; en parte debido a grandes diferencias en polaridad entre compuestos de este grupo y, porque HPLC es más vulnerable a contaminaciones respecto a GC. Entre potenciales fuentes de contaminación con estos ubicuos compuestos hay que mencionar el ambiente de laboratorio, filtros o disolventes utilizados para la fase móvil, su lixiviación de conexiones y de tubería de plástico. Asimismo, es necesario evitar/eliminar impurezas en muestras, por ejemplo provenientes de procedimiento tipo QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe). Las impurezas que se eluyen de la columna LC, al entrar a la fuente de ionización provocan problemas de supresión de ionización de los analitos.

Para eliminar contaminación y posibles interferentes en la determinación de ftalatos en bebidas por HPLC-MS/MS se utilizó una columna adicional llamada “hold back column” ascendente a la válvula del inyector^[62].

I.7 Revisión bibliográfica de los métodos utilizados para la determinación de ftalatos.

En la tabla 3 se presenta una breve descripción de tipo de muestras y de procedimientos utilizados en el análisis de ftalatos, principalmente basados en las separaciones por cromatografía de gases o líquidos con diferentes sistemas de detección. Se puede observar que existe interés en determinar ftalatos en agua potable, muestras medioambientales, en comida y en muestras clínicas. Como se ha dicho antes, estos compuestos son muy ubicuos así que un reto específico es controlar/evitar contaminación de muestras; las potenciales fuentes de contaminación son: el aire, el material de laboratorio, los reactivos, solventes y el propio laborista. Es por ello que los protocolos de limpieza y los blancos son de suma importancia ^[14, 63].

En cuanto al tratamiento de muestra, éste depende obviamente de su composición química. En el caso de matrices acuosas (aguas naturales, bebidas), se utiliza la extracción líquido-líquido con solventes orgánicos tales como n-hexano o iso-octano^[64]. Alternativamente se puede también separar los ftalatos en un dispositivo de extracción en fase sólida (SPE)^[65, 66]. Cuando se trata de muestra sólida con bajo contenido de lípidos (suelos, plantas y alimentos derivados de ellos), los ftalatos usualmente se extraen con mezcla de agua-acetonitrilo^[67, 68]. El análisis de muestras que contienen grasas (alimentos del origen animal, cosméticos, empaques de alimentos) es más retador, ya que el objetivo es lograr la extracción eficiente de ftalatos evitando al mismo tiempo que el extracto contenga lípidos – indeseables a la hora del análisis instrumental. En este sentido, el tratamiento de muestra es un campo activo del desarrollo metodológico; se han examinado diferentes mezclas de solventes (diclorometano, cloroformo, acetonitrilo, metanol) a menudo recurriendo a la extracción asistida por microondas o por agitación en el baño de ultrasonido^[38, 69]. Alternativamente, algunos autores utilizaron micro-extracción dispersiva^[70, 71]. En muchas ocasiones, sobre todo para muestras de composición química compleja, el extracto requiere de un procedimiento de limpieza y/o pre-concentración. Para ello, se ha reportado el uso de cromatografía de exclusión por tamaño molecular (diclorometano-hexano como fase móvil) o extracción de interferentes apolares con un solvente adicional, inmiscible con extracto^[67]. Llama la atención el creciente número de reportes donde se emplean técnicas de micro-extracción tales como micro-extracción en fase sólida, en películas, fibras, sorción de los compuestos presentes en

la fase gaseosa (headspace), etc. Cabe resaltar que estos micro-procedimientos no solamente permiten cumplir con los principios de la química verde, pero son muy adecuados para el análisis en sistemas LC-MS y GC-MS donde se requieren pequeñas cantidades de muestra.

De acuerdo con lo descrito en la parte anterior de esta introducción, la cromatografía de gases ha sido más comúnmente utilizada para este tipo de análisis, debido a que los ftalatos son semi-volátiles y termoestables (desde el más pequeño dimetilftalato hasta di-dodecilftalato) ^[37, 38]. Se ha reportado el uso de columnas capilares con fases estacionares apolares (polidimetilsiloxano o polimetilfenilsiloxano) – estas permiten buena resolución gracias a relativamente altas temperaturas y más bajo sangrado en comparación con columnas polares (Wax)^[72]. Muestras/extractos líquidos que no contienen interferentes poco volátiles pueden ser inyectados directamente en la columna, preferentemente en el modo sin división (splitless) para evitar la contaminación. Para matrices más complejas, se ha reportado la introducción de tipo headspace mediante micro-extracción en fase solida ^[73, 74]. Asimismo, en los años recientes claramente ha aumentado el uso de espectrometría de masas como sistema de detección, aunque la cuantificación de ftalatos por MRM ha sido poco explorada.

Por su parte, LC-MS no parece ser la mejor opción para la determinación simultánea de un gran número de isómeros de ftalatos; además de problemas de contaminación, co-eluciones y dificultad de separar ftalatos polares y apolares en una sola corrida cromatográfica, diferentes compuestos pueden formar idénticos o muy similares iones provocando errores en su cuantificación. El uso de sistemas más sofisticados, de alta resolución y sistemas MSⁿ, como por ejemplo UHPLC-Q-Orbitrap, ha tomado popularidad debido a que estos pueden proveer información estructural detallada y pueden ser utilizados para matrices muy complejas como usualmente lo son los alimentos cumpliendo con la demanda de obtener límites de detección bajos^[75].

Tabla 3. Breve descripción de diferentes métodos para la determinación y cuantificación de ftalatos en diversas matrices.

Tipo de muestra	Tratamiento	Preconcentración	Técnica analítica	Condiciones de análisis	Comentarios
<i>Agua Potable</i>					
Agua potable	1 L de muestra Extracción LL con CH ₂ Cl ₂ , evaporación en flujo de N ₂ Reconstitución en 1mL Hexano.	SPE (Fluorisil 60/100 y/o Alúmina) <i>Discos (C₁₈):</i> elución con ACN seguido de CH ₂ Cl ₂ . <i>Cartuchos:</i> elución con CH ₂ Cl ₂ .	GC-PID GC-MS ^[76]	DB-5 o DB-1 de 30 m x 0.32 mm i.d., 0.25 micras. Gas acarreador: helio.	LOD: 0.1 µg/L
<i>Medioambientales</i>					
Aguas subterráneas lixiviados	Extracción LL SPE en membrana C ₁₈ Elución con ACN, evaporación y reconstitución en hexano	Opcional Cartuchos de Fluorisil y/o Alúmina	GC-ECD	Flujo: He 6 mL/min N ₂ 19 mL/min Detector: 320 °C	Volumen de muestra: 5 L
Suelos Lodos Sedimentos ^[41]	Extracción en Soxhlet Extracción con CH ₂ Cl ₂ :acetona (1:1)	GPC si la muestra contiene altas cantidades de lípidos	GC-MS ^[77]	Columnas: DB-5; 30 m x 0.53 mm ID, DB-1701; 30 m x 0.53 mm ID Horno: 150 – 275 °C, 13 min.	10 a 30 g de muestra

SPE: Solid Phase Extraction.

GPC: Gel Permeation Chromatography

Tipo de muestra	Tratamiento	Preconcentración	Técnicas analíticas	Condiciones de análisis	Comentarios
<i>Cosméticos</i>					
Fragancias Agentes espesantes Aerosoles Lubricantes Antiespumantes Emolientes Plastificantes en esmalte de uñas Elongadores (esmalte de uñas)	Adición de 3 g de Celita a 1 g de muestra. Separación del soporte. Elución con hexano (10 mL)	No	HPLC-DAD ^[78-80]	Columna: Partisil ODS-3, 5- μ m (250 mm por 4.6 mm ID). Flujo: 1 mL/min Gradiente: 50% agua, 34% ACN, 13% 2-propanol y 3% metanol; 15% agua, 55% ACN, 25% 2-propanol, y 5% metanol.	Interferencias de otros componentes que se coeluyeron con DMP.
<i>Sintéticos y materiales Plásticos*</i>					
PVC	Extracción de 0.1 g de muestra finamente cortada con 10 mL de THF con agitación por 30 min. Precipitación de PVC con 20 mL de Hexano.	No	GC-MS ^[81] FTIR(pre-screen)	Columna: DB-5MS; 30 m x 0.25 mm ID x 0.25 μ m. Flujo: He, 1 mL/min Horno: 50 – 310 °C	Aplica solo para productos hechos con PVC, otros polímeros como PE no se diluyen en THF

*Tabla 4 para observar método SIM propuesto por CPSC.

Tipo de muestra	Tratamiento	Preconcentración	Técnica analítica	Condiciones de análisis	Comentarios
<i>Alimentos^[82]</i>					
Leche y sus Derivados lácteos.	1.5 mL de muestra se mezcla con 1.5 mL de metanol, 2 mL de Hx, 2 mL de MTBE, se agita por 1 min. Centrifugar y tomar las fases Hx:MTBE y el residuo se extrae de nuevo. Secar las fracciones y reconstituir con Hx.	<i>Fluorisil</i> , elución con CH ₂ Cl ₂ . <i>SPME</i> con fibra de PDMS. <i>MISPE</i> (leche de soya).	GC-MS	Columna: DB-5MS; 30 m x 0.25 mm ID x 0.25 µm.	Altos contenidos de lípidos en matriz LD: 0.64–0.79 ng/g.
Bebidas ^[62]	Extracción L-L 1. 5g de muestra + 500 mg NaCl. Extracción con 2.5 mL Hx: CH ₂ Cl ₂ (10:1). 2. Extracción con Hx, 3 veces por 30 min. Secar con Na ₂ SO ₄ anhidro.	<i>SPE</i> Cartuchos C ₁₈ , previamente lavados con CH ₂ Cl ₂ . <i>SPME</i> con fibra de PMDS-DVB.	LC-MS/MS	Inyección: FIA Flujo: 20 µL/min. Gas de colisión: Argón Energía de Colisión: 19 eV.	Vinos Blancos y rojos: LD: 0.5 – 3.2 µg/L LC: 1.6 – 9.8 µg/L

SPME: Solid Phase Micro Extraction.

PDMS: Polidimetilsiloxano.

MISPE: Molecular Imprinted Solid Phase Extraction.

MTBE: Metil ter-butil éter.

DVB: Divinylbenzene.

Tipo de muestra	Tratamiento	Preconcentración	Técnica analítica	Condiciones de análisis	Comentarios
<i>Alimentos</i>					
Aceites comestibles	Extracción L-L con 40 mL de Hx:ACN, con agitación. Eliminar fase orgánica con lípidos	SPME con fibras de PDMS, PA, PDMS-DVB y CAR-PDMS GPC- Limpieza de muestra (lípidos) ^[83]	GC-EI-MS/MS GC-CI-MS/MS	Columna: DB-5MS; 30 m x 0.25 mm ID x 0.25 µm. Flujo: He, 1 mL/min. Horno: 100 – 250 °C, 28 min. Análisis con CI: Gas Isobutano relación 43-57 m/z de aproximadamente 1-1.2, tiempo de ionización de 2 ms, tiempo de reacción de 50 ms.	Complejidad de matriz. Afinidad de los ftalatos a los lípidos. LD: 0.02–0.05 mg/kg
Productos derivado de Frutas (jaleas, mermeladas) ^[84]	QuEChERS ^[85]	PSA, C ₁₈ , MgSO ₄ Son parte del kit.	GC-MS LC-MS	-	Aplica solo a vegetales, frutos y sus derivados. LD: 1.0 – 1.7 µg/kg LC: 10 – 20 µg/kg
Cereales, harinas y sus Derivados	5 mL de H ₂ O + 15 mL de ACN. Adición de 6 g de MgSO ₄ y 1.5 g de NaAc.	SPE- 50 mg PSA + 50 mg C ₁₈	LC-MS/MS ^[84]	Columna: Poroshell 120 EC-C ₁₈ 100 × 4.6 mm, 2.7 µm. Gradiente: 0-12 min, 40-100% MeOH 12-15 min, 100% MeOH Regresar a 40% MeOH 0.1 min 15.1-18 min 40% MeOH	Complejidad de la matriz y contenidos de lípidos determinara el método de extracción. LD: 0.8–15 µg/kg LC: 10–100 µg/kg

QuEChERS: Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe.
PSA: Primary, Secondary Amine.

I.8 Normatividad

Las agencias federales que desarrollan reglamentos para sustancias tóxicas incluyen a la EPA, OSHA y la Administración de Alimentos y Drogas (FDA). Las recomendaciones proveen instrucciones valiosas para proteger la salud pública, pero no pueden imponerse por ley. Las organizaciones federales que desarrollan recomendaciones para sustancias tóxicas incluyen a la Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades (ATSDR) y el Instituto Nacional de Salud y Seguridad Ocupacional (NIOSH). Los reglamentos y recomendaciones pueden ser expresados como “*niveles que no deben excederse*” en el aire, agua, suelo o alimentos y se basan generalmente en niveles que afectan a los animales.

Estos niveles luego se ajustan para la protección de seres humanos. En ciertas ocasiones estos “*niveles que no deben excederse*” difieren entre organizaciones federales debido a las diferentes duraciones de exposición (una jornada de 8 horas al día o de 24 horas al día), los diferentes estudios en animales u otros factores. Las recomendaciones y los reglamentos son actualizados periódicamente a medida que se dispone de información adicional.

El plan de gestión actual de la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA) incluye los siguientes ocho ftalatos: ftalato de dibutilo (DBP), ftalato de diisobutilo (DIBP), bencilo butil ftalato (BBP), ftalato de di-n-pentilo (DNPP), di (2-etilhexil) ftalato (DEHP), ftalato de di-n-octilo (DnOP), ftalato de diisononilo (DINP), y ftalato de diisodecilo (DIDP). En el desarrollo de este plan, la EPA considera la toxicidad de los ftalatos, su prevalencia en el medio ambiente y su uso generalizado y la exposición humana. La EPA tiene la intención de adoptar medidas en el marco de un enfoque coordinado con el Consumer Product Safety Commission (CPSC) y la (FDA)^[86, 87].

Las acciones tomadas por EPA son las siguientes:

1. Los niveles diarios de exposición al DEHP para el público en general pueden superar los 0.2 mg/kg/día (equivalente a 1.4 mg/día para una persona con un peso promedio de 70 kg).
2. DEHP es regulado bajo el acta de “Safe Drinking Water”. El límite máximo permisible en agua potable es de 0.006 mg/L.
3. DEHP y DBP se encuentran listado como contaminantes peligrosos en aire bajo el acta de “Clean Air”.
4. Bajo la “Resource Conservation and Recovery Act (RCRA)” los ftalatos son regulados como residuos peligrosos si se descargan como producto químico comercial.
5. DBP y DEHP son reportados en la Toxic Release Inventory (TRI) bajo la sección 313 de la Emergency Planning and Community Right-to-know Act (EPCRA).
6. La CPSC y la ley de CPSIA 2008 prohibió el uso de seis ftalatos en juguetes y artículos de puericultura en concentraciones superiores al 0,1 % en peso de : DEHP, DBP, BBP, DINP, DIDP y DnOP^[81].

La FDA regula productos que pueden contener ftalatos tal es el caso de dispositivos médicos, substancias que tienen contacto con la comida, como envolturas plásticas y cosméticos. Los ftalatos no son adicionados a la comida directamente, pero son regulados por la FDA como “substancias que están en contacto con la comida” o “aditivos alimenticios indirectos”, donde los componentes del empaque puedan lixiviarse hacia la comida o las bebidas^[88].

Según FDA, dos factores determinan el grado de riesgo planteado por la exposición a los ftalatos principalmente al DEHP. El primero es la sensibilidad del paciente. De acuerdo con la evidencia citada en el punto I.5, el feto masculino, el recién nacido masculino, y el varón puberto parecerían ser grupos de riesgo elevado. El segundo factor es la dosis recibida por el paciente.

La FDA insiste en tener precaución en el uso de envases plásticos para recalentar alimentos en el microondas^[89]. Las recomendaciones incluyen:

1. Una envoltura de plástico para microondas debe ser colocada sin apretar sobre los alimentos para que el vapor pueda escapar, y no debe tocar directamente los alimentos.
2. Contenedores de comida y envases de margarina no deben utilizarse en el microondas.
3. Los recipientes que contienen comidas preparadas para microondas solo deben usarse una vez.

Algunas jurisdicciones han establecido regulaciones que limitan o prohíben el uso de ftalatos en juguetes de los niños. La CPSC tiene jurisdicción en materia de otros defectos, como la rotura o el peligro de asfixia. También tiene jurisdicción sobre los juguetes, muebles para niños, como cunas, asientos de coche, chupetes y anillos de dentición, y productos de consumo.

1. El uso de seis ftalatos en juguetes infantiles y artículos de puericultura han sido prohibidos en Europa por el Parlamento Europeo: el uso de BBP, DBP, DEHP en artículos infantiles, uso de DINP, DIDP y DnDP en juguetes y mordederas.
2. El gobierno de San Francisco en California, ha prohibido la fabricación, venta y distribución de productos dentro del área metropolitana de juguetes o artículos de cuidado y alimentación para niños que contenga más del 0.1 % de estos ftalatos: DEHP, BBP, DINP, DnOP y DIDP.

Los estados de California, Vermont y Washington en USA tienen establecido estándares para el contenido de ciertos ftalatos en artículos para niños. California prohíbe la manufactura, venta o distribución en comercios de cualquier artículo para el cuidado de niños menores de 3 años que contenga 0.1 % o más de DEHP, DBP, BBP, al igual que Vermont^[90].

En el 2005, la Comisión Europea prohibió el DEHP, DBP y BBP en todos los juguetes y artículos de cuidado para niños. El DINP, DIDP y DnOP están prohibidos en juguetes y artículos para niños que puedan morderse o chuparse^[91]. Canadá propuso en Junio del 2009, asegurar los niveles de ftalatos como protección a los niños y tomó las propuestas hechas en Estados Unidos y formó la Canada Consumer Product Safety Act. En el 2006, el gobierno de Australia declaró que los ftalatos DEHP, DIDP, DMP, DINP, DBP, BBP, DnOP, DEP y bis (2-metiletil) ftalato son Prioridad Química Existente e inicio evaluaciones públicas de riesgo.

II. JUSTIFICACIÓN

Es necesaria la determinación de compuestos denominados ftalatos ya que son considerados como disruptores endocrinos químicos y están ligados a efectos particularmente adversos a la salud. Generalmente la determinación de ftalatos representa un reto debido a su ubicuidad, lo cual quiere decir que cualquier tipo de muestra corre el riesgo de contaminarse por factores exógenos y provocar sobreestimación del verdadero contenido. Es por ello, que se buscan procedimientos que requieran poco manejo de muestra, que sean relativamente rápidos y que ofrecen límites de cuantificación suficientemente bajos para su uso en el análisis de muestras ambientales y en alimentos. La tortilla de maíz es un componente esencial de la dieta mexicana, por lo que se escogió este producto como matriz química a estudiar.

III. OBJETIVO

Desarrollar un nuevo procedimiento de determinación de ftalatos por GC-MS triple cuadrupolo en modalidad de monitoreo de reacciones múltiples (MRM) para su aplicación en muestras alimenticias.

IV. PARTE EXPERIMENTAL

IV.1 Reactivos y Disolventes

- ❖ Acetonitrilo, grado HPLC.
- ❖ Hexano, grado ACS.
- ❖ Acetato de etilo, grado ACS.
- ❖ Isooctano, grado ACS.
- ❖ Agua deionizada.
- ❖ Cloruro de sodio, SIGMA.
- ❖ Sulfato de sodio anhidro, Sigma Aldrich

IV.2 Instrumentación analítica

- ❖ Cromatógrafo de gases equipado con detector de ionización en flama (GC-FID). Modelo Clarus 500 de Perkin Elmer.
- ❖ Cromatógrafo de gases con detección de masas de triple cuadrupolo. Modelo Bruker Scion TM, GC-MS(TQ).
- ❖ Purificador de agua Milli Q Labconco Water PRO PS.
- ❖ Polythron con rotor de acero.
- ❖ Centrífuga.
- ❖ Balanza analítica.

NOTA: *Las condiciones cromatográficas se muestran en el Capítulo de Resultados y Discusión.*

IV.3 Software

- ❖ Microsoft Office 2010
- ❖ TotalChrom Navigator, versión 6.2.1 para controlar el cromatógrafo de gases modelo Clarus 500 de Perkin-Elmer.
- ❖ Programa Grams 8.0 para conversión de formato de datos de GC-FID.
- ❖ Agilent Chemstation. Data Analysis (Instrument #1 offline), tratamiento de datos de GC-FID.
- ❖ MS WorkStation, Method Builder versión 8.2, Bruker Daltonics para SCION MS 45X-GC.
- ❖ MS WorkStation, MS Data Review version 8.2, Bruker Daltonics para SCION MS 45X-GC.
- ❖ ChemDraw Ultra 12.0, para modelar moléculas químicas.

IV.4 Estándares

Se utilizó el producto *EPA 506 Phthalate mix* que contiene DMP, DEP, DBP, BBP, DEHA, DEHP y DnOP cada una a 1000 mg/mL en isooctano, lote: LC05856, cad: feb-2017. Cabe mencionar que la mezcla incluye di(2-etilhexil) adipato (DEHA) otro tipo de plastificante en uso, el cual presenta una menor toxicidad respecto a los ftalatos.

IV.5 Muestras

Se analizaron 14 diferentes tipos de tortilla originarias de distintos puntos del estado de Guanajuato, tres tipos de harina de maíz comercial y tres diferentes tipos de tostadas horneadas. En cada uno de los casos se analizó un solo lote, pero se llevaron a cabo tres repeticiones independientes para cada muestra (tres tortillas de un paquete, tres tostadas y tres alícuotas de 1 g de harina). En la tabla 4 se describen características de estas muestras de importancia para este trabajo.

Tabla 4. Listado de muestras analizadas en este trabajo y algunas de sus características.

<i>Muestra</i>	<i>Empaque</i>		<i>Temperatura de almacenamiento</i>
	<i>Papel Cebolla (-1)</i> <i>Plástico (1)</i>	<i>Tiempo en anaquel</i> <i>Corto (-1)</i> <i>Largo (1)</i>	
La Cosecha de Don Pancho	1	1	-1
Santo Apetito	1	1	-1
León	-1	-1	1
El Maguey	-1	-1	1
Irapuato	-1	-1	1
Janeth	1	1	-1
Silao Máquina	-1	-1	1
Guanajuato	-1	-1	1
Romita	-1	-1	1
Celaya	1	1	-1
Pollo Feliz	1	-1	1
Salamanca	-1	-1	1
Nopalía	1	1	-1
La Económica	1	1	-1

El parámetro de *empaques* se describe como la forma de almacenamiento de las tortillas en dos diferentes presentaciones, sea papel cebolla “-1” o plástico “1”. Descrito como *tiempo en anaquel*, “-1” es un tiempo *corto* corresponde a < 3 días, el cual se refiere a tortillas frescas; “1” es un tiempo *largo* corresponde a > 3 días, refiriendo a un largo tiempo en anaquel. *Temperatura de almacenamiento* se describe como “1” *Caliente* a > 40 °C y “-1” a temperatura ambiente o en refrigeración.

IV.6 Calibración en el método GC-MS(TQ)

Se prepararon 6 soluciones para el proceso de calibración mediante dilución del estándar EPA en isooctano grado ACS. Estas soluciones contenían: 25, 50, 100, 250, 500 y 1000 $\mu\text{g/L}$ de cada uno de los ftalatos. Para establecer las condiciones experimentales, se utilizó una solución con concentración de 500 $\mu\text{g/L}$ de cada uno de los ftalatos.

IV.7 Calibración en el método GC-FID.

Se prepararon 6 soluciones para el proceso de calibración, diluyendo el estándar EPA con isooctano grado ACS. Estas soluciones contenían: 1.0, 2.5, 5.0, 10, 25 y 50 mg/L de cada uno de los ftalatos. Para el estudio de las condiciones de análisis se empleó una solución con concentración de 5 mg/L de cada uno de los ftalatos.

IV.8 Protocolo de extracción en tortilla.

Se tomó una tortilla fresca y se cortó en trozos pequeños con tijeras para facilitar la homogenización, se pesaron 5 g de tortilla por triplicado cada una y a cada porción se agregó una mezcla de $\text{H}_2\text{O}:\text{ACN}$ 1:1. La alícuota de tortilla fue homogenizada en polytrón, seguido por una adición de 3 mL de solución saturada de NaCl y extracción con 10 mL de hexano. Posteriormente, se centrifugó el extracto a 3150 g por 10 min. Se tomó el sobrenadante y se trasvasó a un vial de vidrio de 25 mL. Se eliminó el agua agregando 0.5 g de Na_2SO_4 anhidro. Se llevó a sequedad y se reconstituyó con 500 μL de isooctano para su inyección al sistema GC-MS(TQ). Para el análisis por GC-FID se realizó el mismo procedimiento de extracción para 5 g de muestra de cada tortilla.

IV.9 Protocolo de extracción en harinas.

En viales de vidrio de 25 mL se pesó 1 g de harina por triplicado y se agregaron 1.25 mL de agua deionizada a cada uno de ellos, con una espátula se homogenizó hasta formar masilla, a continuación se agregó 5 mL de ACN y se sometió a ultrasonido por 15 min. Se agregó 1.5 mL de solución saturada de NaCl, se centrifugó recuperando 5 mL de sobrenadante. Finalmente, se evaporó el disolvente (ACN) a temperatura ambiente y se reconstituyó con 0.5 mL de isooctano para su inyección al sistema GC-MS(TQ).

IV.10 Protocolo de extracción en tostadas^[92].

Se pulverizó en mortero de cerámica la tostada y se pesó por triplicado 2.5 g de esta en viales de vidrio de 25 mL. A cada vial se agregaron 10 mL de ACN y se sónico por 15 minutos. Se tomó el extracto de ACN en viales de vidrio de 25 mL limpios y consecutivamente se extrajo las grasas contenidas en el extracto. Se deja evaporar a temperatura ambiente y se reconstituyó con 0.5 mL de isooctano para su inyección al sistema GC-MS(TQ). Para el análisis en GC-FID se siguió el mismo procedimiento de extracción descrito.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

V.1 Introducción^[19-21]

Los empaques recubiertos con películas delgadas, mejor conocidas como recubrimientos adherentes, son extensamente usados para una gran variedad de alimentos envasados. Entre recubrimientos disponibles, hay que mencionar los de PVC, cloruro de polivinildieno (PVDC), polietileno (PE), celulosa regenerada (RCF), acetato de celulosa, etc. Los plastificantes en empaques recubiertos con PVC, no están adheridos químicamente al polímero y puede migrar cuando entran en contacto con la comida, especialmente si hablamos de alimentos con alto contenido en grasas^[93]. Los ftalatos tienden a ser detectados en varios materiales de papel y embalajes de cartón grado alimenticio, tal es el caso de DBP, DiBP, DEHP y BBP. La principal fuente de ftalatos en materiales de papel o cartón son las tintas de impresora y adhesivos usados en estos materiales^[20, 94].

Las tortillas se preservan/almacenan de diversas maneras. En puestos de venta artesanales o en casa, se dejan cubiertas por una servilleta tejida en un canasto de mimbre para conservar la humedad (Fig. 8 A). Las tortillas elaboradas y distribuidas en un solo día, se mantienen a menudo calientes y envueltas en papel térmico o “cebolla” grado alimenticio (Fig. 8 B), este tipo de papel se usa en especial para las tortillas de maíz, ya que es permeable y permite expulsar el vapor caliente después de empaquetado. Este papel ayuda a mantener el producto en buen estado aumentando su tiempo de vida en el anaquel y reparto^[95]. Este papel puede ser en blanco o impreso. Para almacenamiento por periodos prolongados (tiendas comerciales, exportación), se emplean bolsas de polietileno y, si el empaquetado se realiza en vacío, la fecha de caducidad puede ser hasta de un año (figura 8 C). Parte importante de uso de plásticos en la preservación de tortillas es el reparto, la creciente demanda nacional por este producto exige aumentar la frescura y fecha de

caducidad, aunado a esto, la tortilla es un producto que desde el año 2013 ha aumentado su exportación principalmente a Estados Unidos un 28%.

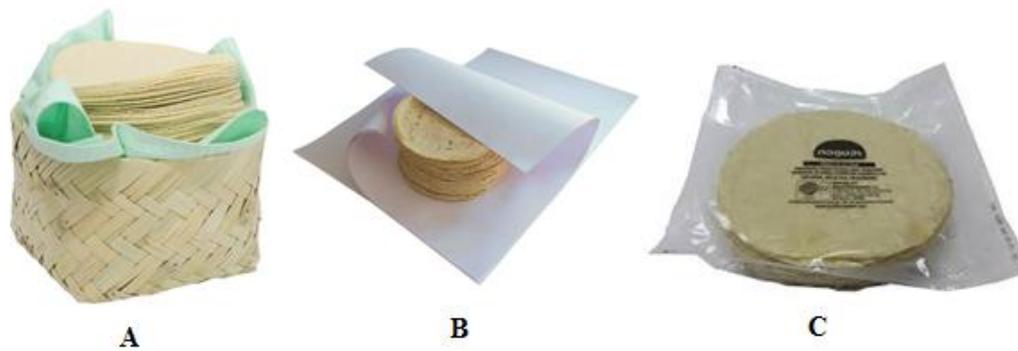


Figura 8. Maneras de empaquetamiento para distribución y venta de tortilla^[96, 97].

El uso de papel y/o bolsas de plástico para empaquetamiento hace que las tortillas sean susceptibles a la contaminación de ftalatos, especialmente si los tiempos de almacenamiento son largos y a temperatura elevada. Es importante resaltar que, para mantener las tortillas “frescas”, este tipo de empaque es necesario ya que permite preservar la humedad en el producto empacado inmediatamente después de su elaboración. También es relevante que hoy en día, tortillas en hogares se re-calientan metiéndolas en bolsas de plástico, en hornos de microondas^[98, 99], lo que potencialmente aumenta la migración de ftalatos.

Debido a que las tortillas inevitablemente tienen contacto con materiales con alto contenido de ftalatos, parecía interesante enfocar el presente trabajo en el desarrollo de un procedimiento adecuado para este tipo de análisis. Para fines comparativos, se incluyeron muestras de harina de maíz y tostadas horneadas. Estas últimas, por su bajo contenido de humedad, podrían captar menores cantidades de ftalatos respecto a tortillas frescas.

V.2 Desarrollo de la metodología de determinación de ftalatos en tortilla por Cromatografía de gases con detector de masas triple cuadrupolo (GC-MS(TQ)) con MRM.

V.2.1 Condiciones de separación cromatográfica y de detección por MRM.

Para el desarrollo del procedimiento se utilizó la solución mixta (500 µg/L de cada uno de los compuestos), obtenida mediante la dilución del estándar EPA 506 Phthalate. Esta solución contiene DMP, DEP, DBP, BBP, DEHA, DEHP y DnOP. Debido a que el objetivo fue la cuantificación por MRM, la resolución cromatográfica de los compuestos no fue un requisito indispensable y más bien se procuró lograr que la corrida cromatográfica sea de tiempo corto, pero sin sacrificar la selectividad. Se utilizó típica columna capilar BP5-MS para GC-MS; de bajo sangrado, apta para amplio intervalo de temperaturas (-40 a 330 °C), con grosor de película 0.25 µm y carácter apolar (5% polisilfenileno siloxano). Se optó por la inyección sin división (splitless) para evitar una adicional fuente de contaminación y dilución de muestra. Con adquisición en el modo FULL SCAN (m/z 50-400), se examinaron diferentes gradientes de temperatura y flujos de gas de arrastre (He) seleccionando las condiciones finales que se presentan en la tabla 5.

Tabla 5. Condiciones instrumentales para el análisis de ftalatos por GC-MS(TQ) en el modo MRM.

Condiciones	Bruker SCION TQ MS		
Inyector	1 µL splitless		
Temp. de inyector	280 °C		
Flujo de gas acarreador	1 mL/min He		
Columna	BP5-MS; longitud de 30m, 0.25 mm ID; 0.25 µm de recubrimiento.		
	°C/min	Temperatura (°C)	Permanencia (min)
Programa de temperatura del horno	-	70	2.5
	30	250	2.5
	30	300	2.5
Tiempo total	15.17 min		
Temp. de fuente de ionización	250 °C		
Modo de adquisición	MRM		
Temp. de línea de transferencia	290 °C		
Presión de celda de colisión	2 mtorr		
Rango de detección, m/z	50-500		

El tiempo total en el cromatograma fue de 15.2 min, permitiendo la resolución de todos los solutos. En la Figura 9 se presenta un ejemplo de cromatograma TIC; los picos fueron asignados a los compuestos individuales con base a sus tiempos de retención y espectros de masas (biblioteca de NIST/EPA/NIH versión 2.0, 2011).

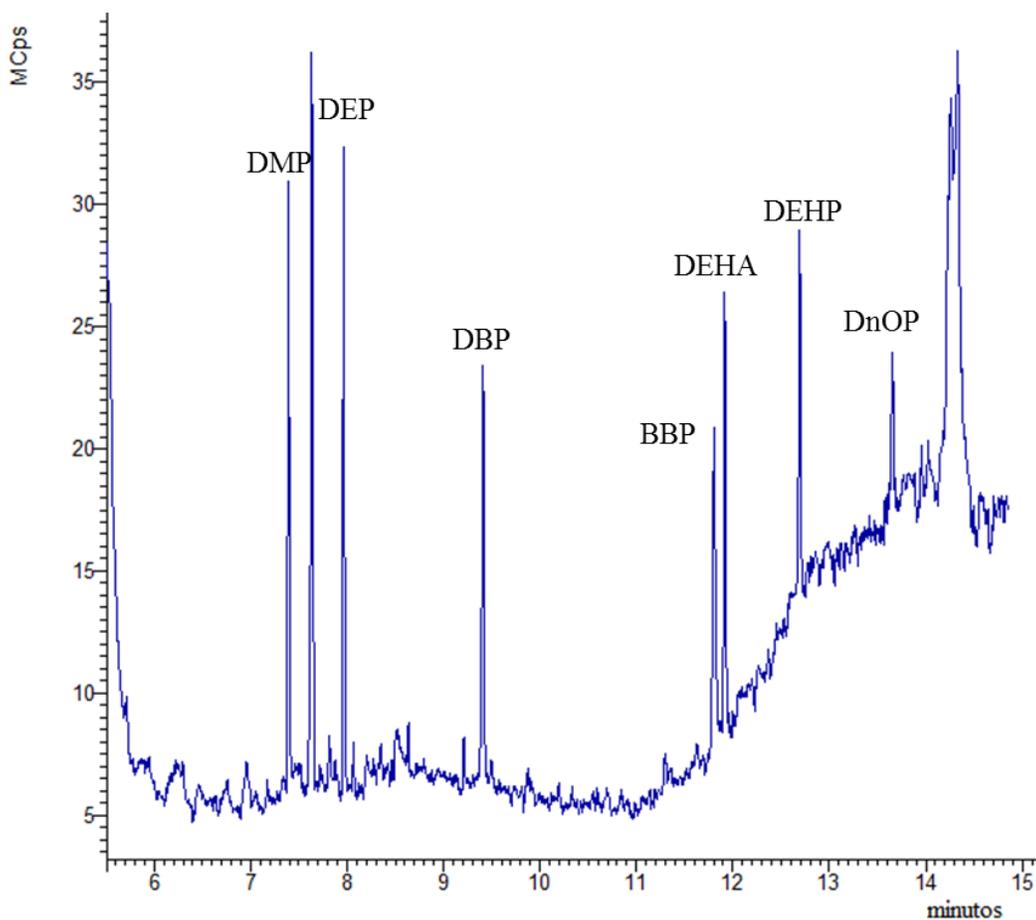
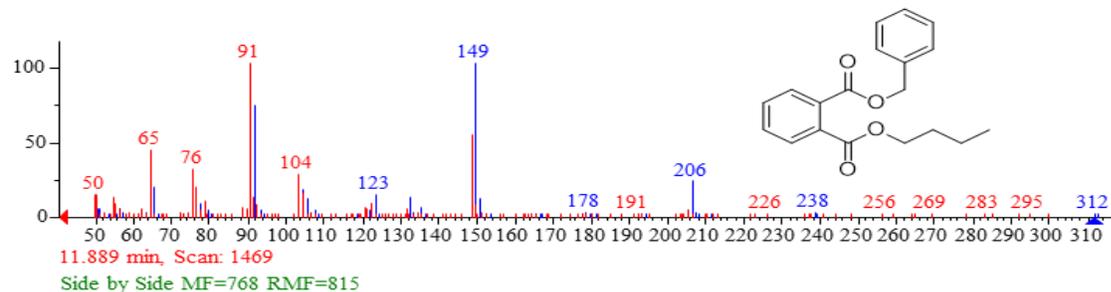
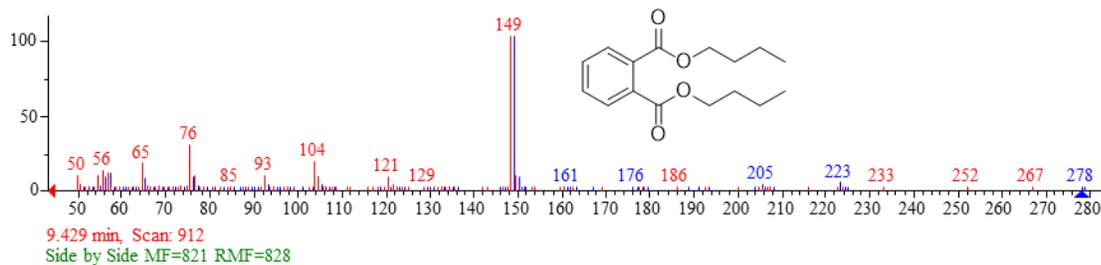
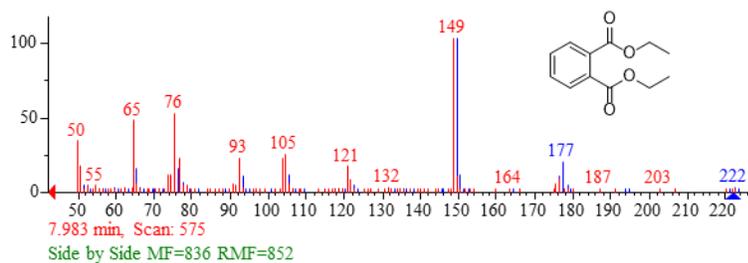
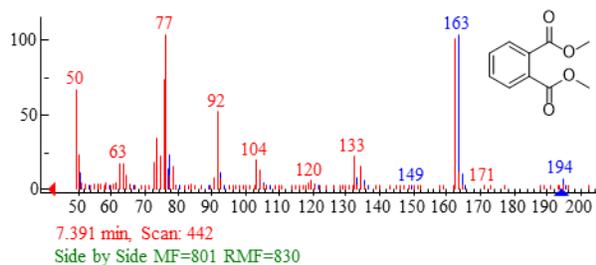
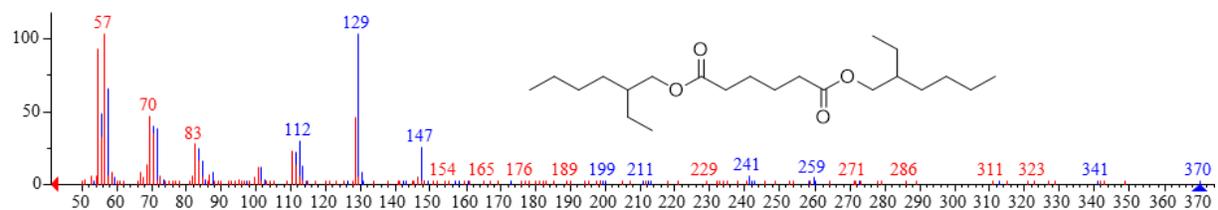


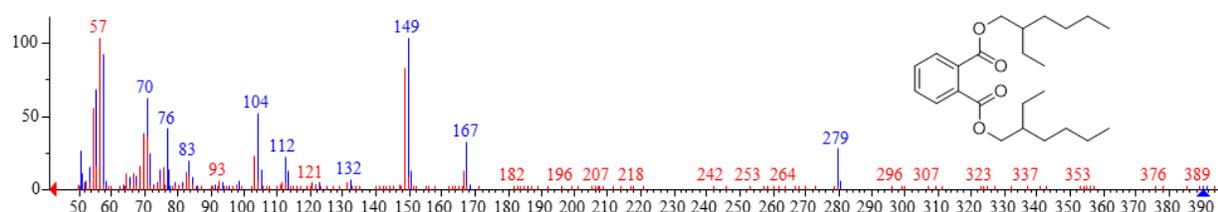
Figura 9. Cromatograma TIC de una solución estándar de ftalatos (500 $\mu\text{g/L}$ de cada uno de los compuestos).

Los tiempos de retención se presentan tabla 6. En la figura 10 se muestran espectros de masa de cada uno de los componentes de la mezcla de calibración y su comparación con respectivo espectro de la biblioteca NIST. Con base en estos datos, para cada uno de los ftalatos se escogió el ion mayoritario para ser utilizado como ion precursor en la cuantificación por monitoreo de reacciones múltiples (MRM). Como se puede observar, el ion precursor m/z 149 resultó ser característico de todos los ftalatos (excepto DMP).

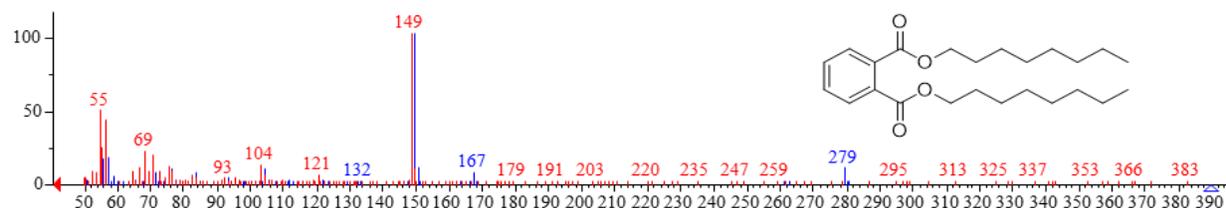




11.940 min, Scan: 1494
Side by Side MF=777 RMF=841



12.721 min, Scan: 1677
Side by Side MF=758 RMF=821



13.695 min, Scan: 1901
Side by Side MF=727 RMF=898

Figura 10. Comparación de espectros experimentales (rojo) y NIST (azul) de cada uno de los ftalatos obtenidos a partir del cromatograma TIC.

A continuación, se obtuvieron espectros de fragmentación de los iones precursor, empleando la modalidad PRODUCT (monitoreo de productos de fragmentación de iones precursor). A partir de los espectros MS/MS, para cada uno de los compuestos se eligió uno o más iones de mayor intensidad posible para utilizarlos como iones cuantificadores. Un parámetro importante de establecer fue la energía de ionización en la zona de CID para la obtención del mayor valor de relación S/N del ion producto (cuantificador) y por lo tanto, el más bajo límite de detección posible. Se examinó de manera sistemática el efecto de la energía de fragmentación sobre la

intensidad de los iones productos (cuantificadores) para todos analitos; con base en estos resultados (figura 11), se seleccionó la energía que arrojó el valor de S/N más alto.

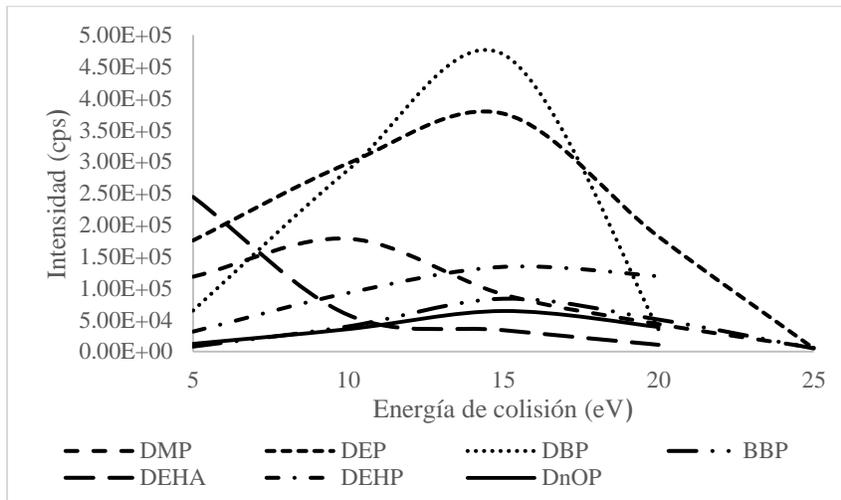


Figura 11. Gráfico que representa el efecto de la energía de colisión sobre la intensidad de las señales de los iones en el espectro de MS/MS.

Los valores m/z de iones precursores, cuantificadores y calificadores, así como las respectivas energías de colisión seleccionadas se resumen en la tabla 8. Aunque el ion precursor m/z 149 fue igual casi para todos (excepto DMP y DEHA), hay que recordar que los compuestos entran al detector másico en diferentes tiempos, correspondientes a sus tiempos de retención en la separación cromatográfica, lo que permite separar eventos de su fragmentación y conteo, evitando conflictos. Finalmente, se definieron los segmentos de tiempo en el cromatograma para la adquisición de las señales de iones cuantificadores bajo las condiciones de MRM (tabla 6).

Tabla 6. Condiciones Instrumentales para MRM dividido en segmentos y sus respectivos tiempos de retención y desviación estándar (DE).

Compuesto	Segmento	Tiempo	Tiempo de retención	Ventana de Tiempo (Δ min)
DMP	1	0 – 7.90	7.40 ± 0.1	1.0
DEP	2	7.47 – 8.53	7.98 ± 0.1	1.0
DBP	3	8.53- 9.93	9.43 ± 0.1	1.0
BBP	4	9.93 – 12.39	11.89 ± 0.1	1.0
DEHA	5	11.40 – 12.44	11.94 ± 0.1	1.0
DEHP	6	12.20 – 13.22	12.72 ± 0.1	1.0
DnOP	7	13.13 – 14.20	13.69 ± 0.1	1.0

En la parte de introducción se comentó que la técnica MRM no ha sido de uso común en el análisis de ftalatos, lo que impide la comparación de las condiciones propuestas en este trabajo con datos existentes. Por otro lado, la Comisión de Seguridad de Productos para el Consumidor de Estados Unidos de Norteamérica, en su Norma CPSC-CH-C1001-09.3 (2010), establece el procedimiento GC-MS para la determinación de ftalatos en modo SIM. Los iones recomendados en esta norma se presentan en la tabla 7; todos estos iones aparecen en espectros de ftalatos obtenidos en este trabajo con ionización por impacto de electrones y presentados en figura 10; sin embargo, en el método SIM se recomienda utilizar la suma de varias señales (para aumentar el poder de detección), mientras que en el método MRM se utiliza una transición entre el ion precursor y producto aumentando drásticamente el valor S/N.

Por otro lado, con base de espectros MS, MS/MS y conociendo los iones recomendados por la norma antes mencionada, fue posible proponer el padrón de fragmentación para cada compuesto. Cabe señalar sin embargo que el sistema de triple cuadrupolo no permite medición de la masa exacta (baja resolución), por lo que estos resultados no son confiables. De manera de ejemplo, en la figura 12 se presenta a modo de ejemplo, el padrón de fragmentación propuesto para DBP, partiendo de su ion molecular. Debajo de cada estructura se presenta lista de iones calculados del padrón isotópico teórico incluyendo el porcentaje de distribución de cada uno de ellos.

Tabla 7. Iones de ftalatos recomendados para su identificación y cuantificación por GC-MS en modo SIM (norma CPSC-CH-C1001-09.3 (2010)).

Ftalato	Ion de identificación	Iones de cuantificación Confirmativo (<i>m/z</i>)
DMP	163	194, 135, 77
DEP	149	177, 76, 105
DBP	223	149, 167, 205, 223
BBP	206	91.1, 149, 206
DEHP	279	149, 167, 279
DnOP	279	149, 167, 261, 279

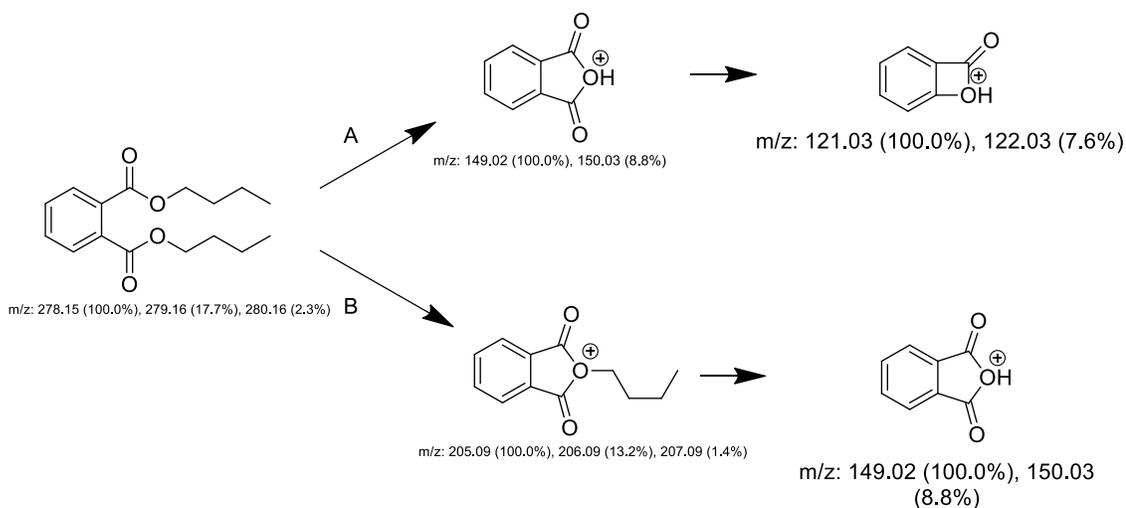
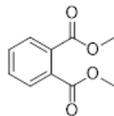
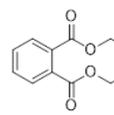
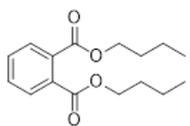
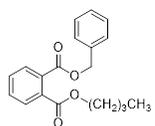
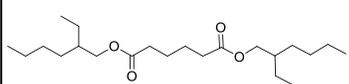
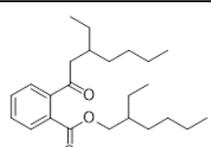
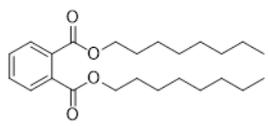


Figura 12. Propuesta de fragmentación del DBP, partiendo del ion molecular.

Utilizando las condiciones establecidas, se llevó a cabo el proceso de calibración.

Tabla 8. Estructuras moleculares de los ftalatos, sus masas moleculares (MM) y sus respectivos valores de m/z para los iones precursor (IP) y iones producto (Ip) y valores de energías de colisión. En cada uno de los casos, se obtuvieron dos transiciones una para el ion cuantificador (Q') y otra como ion calificador (C) en MRM.

Compuesto	Estructura	MM	IP	Ip	Energía de colisión (eV)	Ion
DMP		194.2	163.1	133.2	10	Q'
			194.2	163.1	10	C
DEP		222.2	149.1	121.1	15	Q'
			177.2	149.1	17	C
DBP		278.4	149.1	121.0	15	Q'
			205.2	149.1	10	C
BBP		312.4	149.1	93.0	15	Q'
			206.0	149.0	12	C
DEHA		370.6	129.0	111.0	5	Q'
			129.0	57.0	10	C
DEHP		390.6	149.1	121,0	15	Q'
			167.0	149.1	10	C
DnOP		390.6	149.0	121.1	15	Q'
			279.0	149.1	12	C

V.2.2 Proceso de calibración y evaluación de parámetros analíticos del procedimiento en GC-MS(TQ).

CALIBRACIÓN

Se obtuvieron cromatogramas MRM de las siete soluciones estándar que contenían 0, 0.025, 0.05, 0.10, 0.25, 0.50 y 1.0 mg/L de cada uno de los compuestos, mismos que de manera de ejemplo se presentan en la figura 13. Para mayor claridad, en la figura 14 se muestran señales analíticas obtenidas para estas soluciones en cada uno de los segmentos del cromatograma empleando las condiciones MRM; es de notar que el ruido fue prácticamente inexistente. En el proceso de calibración se tomó el área de los picos cromatográficos como señal analítica, utilizando la plataforma MS Workstation, de Bruker. Las funciones de calibración se obtuvieron por el método de regresión lineal y los resultados se presentan en la tabla 9.

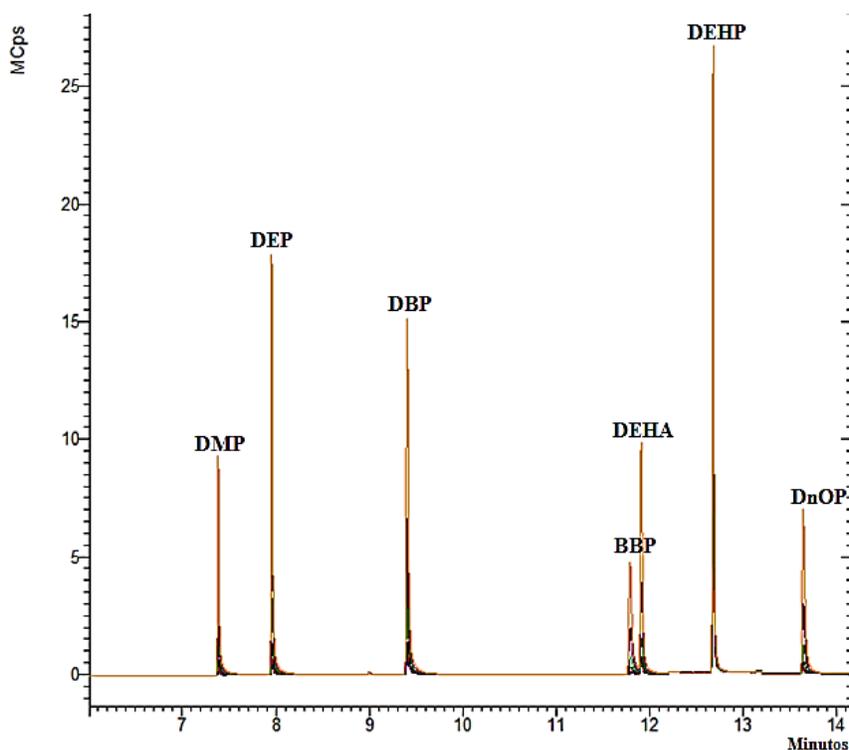


Figura 13. Cromatogramas correspondientes a curva de calibración para el análisis de muestras 0, 0.025, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5 y 1.0 mg/L de los siete analitos.

b)

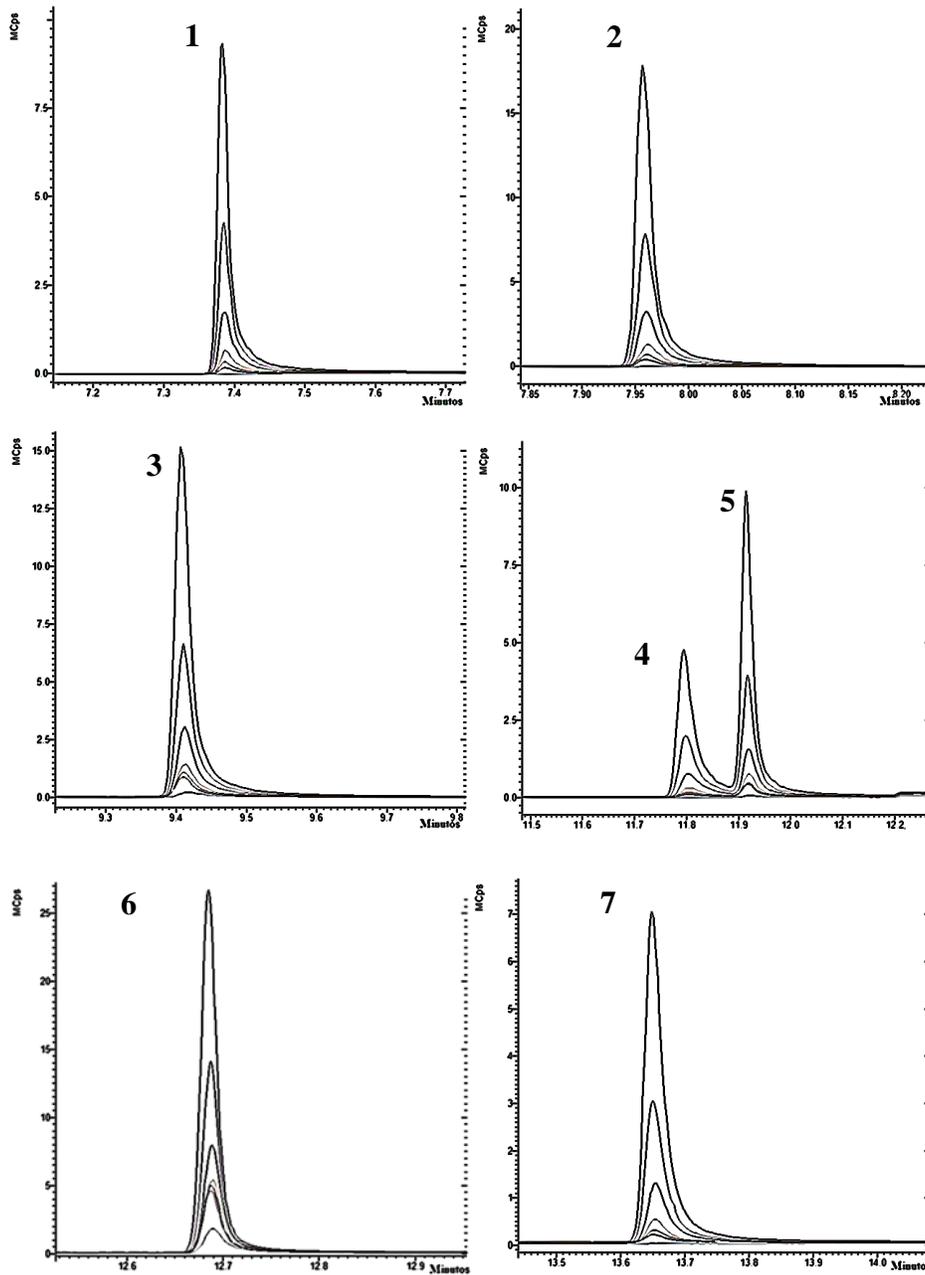


Figura 14. Ampliación de cada pico cromatográfico para 1. DMP, 2. DEP, 3. DBP, 4. BBP, 5. DEHA, 6. DEHP y 7. DnOP.

Tabla 9. Ecuaciones de regresión lineal obtenidos con base en tres réplicas independientes. Se presentan valores promedios de las pendientes e interceptos con respectivas DE entre paréntesis. Donde “y” es la señal analítica definida con el área de pico del analito y “x” es la concentración en mg/L del analito.

Compuesto	Ecuación	Coefficiente de regresión (R ²)	DER(CF), %*
DMP	$y = 7.37e^5 (2.10e^4)x + 1.71e^3 (288)$	0.9998 (0.0001)	4.7
DEP	$y = 1.33e^6 (1.78e^4)x + 278 (41.3)$	0.9998 (0.0003)	2.1
DBP	$y = 1.72e^6 (2.44e^5)x + 2.65e^4 (6.19e^3)$	0.9999 (0.0002)	2.7
BBP	$y = 7.12e^5 (2.24e^4)x + 4.41e^3 (160)$	0.9991 (0.0002)	5.9
DEHA	$y = 1.47e^6 (5.01e^4)x + 3.28e^4 (1.97e^3)$	0.9993 (0.0003)	6.9
DEHP	$y = 6.73e^5 (2.55e^4)x + 754 (30.1)$	0.9997 (0.0001)	3.7
DnOP	$y = 6.75e^5 (1.79e^3)x + 6.56e^3 (266)$	0.9994 (0.0003)	5.3

*Desviación estándar relativa de los factores de respuesta individuales (señal analítica respecto a la masa o concentración del analito para cada estándar, S/x) en curva de calibración.

El cálculo de regresión genera un coeficiente de regresión o determinación (R²) que es una medida del grado de linealidad (calidad) en el ajuste de la función lineal respecto a los datos experimentales. Un valor de 1.00 indica un ajuste perfecto. De acuerdo con las indicaciones EPA en el área del análisis cromatográfico, para fines cuantitativos, R² debe ser mayor que o igual a 0.99; así mismo, la desviación estándar relativa de los factores de respuesta individuales (DER(CF)) para los estándares en una curva de calibración debe ser menor o igual al 20%^[100]. El factor de respuesta se calcula para cada punto de calibración y corresponde a la señal analítica dividida por la masa o concentración del analito (CF=S/x), de esta manera CF representa la pendiente de línea entre el origen de coordenadas y la señal obtenida para un estándar dado. De ahí, el parámetro DER(CF) se calcula como $DER(CF) = (DE(CF)/mCF) * 100$, donde mCF es el promedio de los valores CF para todos los estándares en la curva de calibración y DE(CF) es la desviación estándar de los valores CF individuales del valor promedio. Bajo los criterios que se acaban de mencionar y con base en los resultados de tres replicas independientes de proceso de calibración (tabla 9), se puede concluir que las funciones de calibración cumplen con los criterios EPA para los análisis cromatográficos.

EVALUACIÓN DE EFECTO DE SUPRESIÓN/AUMENTO DE LA SEÑAL ANALÍTICA EN PRESENCIA DE MATRIZ.

Un aspecto muy importante en el análisis de muestras reales por espectrometría de masas es la evaluación de los posibles efectos de matriz sobre la respuesta del instrumento (señal analítica). Cabe recordar que la sensibilidad se expresa como la pendiente de la curva de calibración y se define como la mínima diferencia entre dos concentraciones del analito que pueden ser diferenciadas de manera estadísticamente significativa con base en sus señales analíticas. Si los compuestos presentes en la matriz de la muestra afectan la respuesta instrumental, ocurre un cambio en la pendiente de la función de regresión lineal entre la calibración externa (analitos interferentes) y el método de adición de estándar (presencia de la matriz de muestra)^[101]. Es por ello que, para evaluar los efectos de matriz que en el caso de espectrometría de masas se debe principalmente a cambios en la eficacia de ionización, se comparan las pendientes de estas dos funciones. En otras palabras, se calcula la razón entre la pendiente de la función lineal en el método de adición estándar y la pendiente de la curva de calibración obteniéndose el factor de supresión/aumento de la señal (SSE, signal suppression/enhancement). Cuando no se presentan efectos de matriz, el valor SSE es de 100%, pero los valores usualmente reportados y considerados aceptables van desde 50 a 120%^[102, 103]. Aunque los efectos de matriz son más pronunciados en los procedimientos de LC-MS respecto GC-MS, en este trabajo también se evaluó SSE. Para ello, se llevó a cabo el experimento de adición de estándar agregando a la muestra de tortilla las siguientes concentraciones de cada uno de los ftalatos: 25, 50, 100, 250, 500 y 1000 $\mu\text{g/L}$ (el procedimiento se describe detalladamente a continuación, en el apartado de pruebas de exactitud). Las pendientes de las funciones lineales y los valores SSE calculados se presentan en la tabla 10; donde se observa que en el análisis de tortillas el efecto de matriz fue prácticamente despreciable (SSE en el intervalo 82.9 – 102%).

Tabla 10. Factores de supresión/aumento de la señal (SSE) calculados para cada uno de los analitos con base en las pendientes de funciones de regresión lineal obtenidas en el método de adición de estándar y en calibración externa.

Compuesto	Pendiente de curva de calibración	Pendiente de curva por adición estándar	SSE, %
DMP	7.37e ⁵	7.51e ⁵	102%
DEP	1.33e ⁶	1.24e ⁶	93.2%
DBP	1.72e ⁶	1.47e ⁶	85.5%
BBP	7.12e ⁵	6.69e ⁵	93.9%
DEHA	1.47e ⁶	1.22e ⁶	82.9%
DEHP	6.73e ⁵	-	-
DnOP	6.75e ⁵	5.79e ⁵	85.7%

LÍMITE DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN

Se define como límite de detección a la mínima cantidad o concentración del analito en una muestra que puede ser detectada de manera confiable con el método, pero de manera imprecisa la que impide su cuantificación. Cabe señalar que esta definición no es totalmente rigurosa, porque el significado de “confiable” no es claro. En el caso de cromatografía, el límite de detección es la cantidad inyectada que resulta en un pico con una altura al menos dos o tres veces mayor del ruido de la línea base.

El límite de detección se expresa como:

$$LD = \frac{3.3 \sigma}{S} \dots (1)$$

En esta ecuación, σ corresponde a la desviación estándar de la respuesta instrumental en ausencia del analito. Dependiendo del modo de adquisición de la señal, hay dos maneras de calcular σ :

1. Desviación estándar del blanco: se determina por la medida de la magnitud de la respuesta de un número apropiado de muestras blanco y calculando la desviación estándar de estas respuestas.

2. Desviación estándar del ruido de línea base en la región de elución del pico de soluto, siendo este el más utilizado en procedimientos cromatográficos.

Por su parte, el valor S en la ecuación se refiere a la pendiente de la función lineal que relaciona la respuesta del instrumento con la concentración del analito, este valor también puede ser evaluado de maneras diferentes:

1. Utilizando todos los estándares de calibración para el cálculo de función de regresión lineal.
2. Utilizando solamente estándares de baja concentración.
3. Utilizando un solo punto de calibración - en este caso se calcula CF para el más bajo estándar cuya respuesta es cercana al límite de cuantificación^[104, 105].

El límite de cuantificación (LC) de un procedimiento analítico se define como la menor cantidad de analito en una muestra que puede ser determinado cuantitativamente con una adecuada precisión y exactitud y es también el límite bajo del intervalo de linealidad de procedimiento y es recomendado como el más bajo estándar de calibración. Este parámetro se calcula como lo muestra la siguiente ecuación:

$$LC = \frac{10 \sigma}{S} \dots (2)$$

Donde σ es la desviación estándar de la respuesta en ausencia del analito y S es la pendiente, ambos obtenidos como se describió antes.

Ambos parámetros, LD y LC deben ser calculados para el proceso de calibración y también en condiciones de análisis de muestras reales. En el primer de los casos, los valores se presentan como masa o concentración del analito introducida directamente al instrumento (si se trata de procedimiento cromatográfico, “on-column”, es decir inyectado en la columna) en segundo caso, los límites se expresan como la masa o concentración del analito en la muestra (en caso de tortilla, microgramos del analito por un kilogramo de masas seca de tortilla). Para evaluar LD y LC del procedimiento, el proceso de calibración debe llevarse a cabo en presencia de matriz de muestra siguiendo el mismo tratamiento que se emplea para muestras reales. En la práctica, se realiza la curva de calibración agregando los estándares a la muestra que no contiene analito o, si esto no es posible, utilizando la muestra diluida para que su contenido del analito sea despreciable^[106].

Los valores de LD y LC evaluados en este trabajo se presentan en la tabla 11. Cabe señalar que los límites de detección reportados en otros métodos basados en el uso de espectrometría de masas cubren el intervalo de 0.8 - 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (tabla 3). En particular, se han reportado procedimientos de determinación de ftalatos en diversos alimentos y bebidas, entre estos en licores donde los límites de detección obtenidos para diferentes compuestos utilizando instrumentos AFAEESI (Air-flow-assisted extractive ESI)- MS/MS fueron entre 11.4 – 34.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ^[107]. De esta manera, el procedimiento propuesto en este trabajo presenta el poder de detección comparable con los procedimientos reportados recientemente en literatura.

Tabla 11. Límites de detección (LD) y de cuantificación (LC) evaluados en el procedimiento de calibración y en el análisis de muestras reales (extracto de tortilla, harina o tostada, diluidos 20 veces).

Analito	Calibración, ng/mL		Análisis de tortilla, $\mu\text{g}/\text{kg}$ (masa seca)		Análisis de harina, $\mu\text{g}/\text{kg}$ (masa seca)		Análisis de tostada, $\mu\text{g}/\text{kg}$ (masa seca)	
	LD	LC	LD	LC	LD	LC	LD	LC
DMP	0.62	1.88	0.11	0.34	0.31	0.94	0.12	0.38
DEP	4.56	13.8	0.82	2.47	2.28	6.90	0.91	2.76
DBP	6.68	20.2	1.20	3.61	3.34	10.1	1.34	4.04
BBP	2.28	6.91	0.41	1.23	1.14	3.46	0.46	1.38
DEHA	10.3	31.1	1.84	0.55	5.15	15.6	2.06	6.22
DEHP	2.45	7.41	0.43	1.32	1.23	3.71	0.49	1.48
DnOP	5.31	16.1	0.95	2.88	2.66	8.05	1.06	3.22

PRUEBAS DE EXACTITUD

La validación de un método busca evaluar la exactitud de los resultados considerando tanto efectos sistemáticos como los aleatorios sobre los resultados. La exactitud se estudia en dos componentes: la “veracidad” y la “precisión”.

La precisión se relaciona con el error aleatorio cometido en el análisis repetitivo de la misma muestra y este parámetro describe la dispersión de los valores individuales respecto al valor promedio; se expresa como la desviación estándar o la desviación estándar relativa. Para

caracterizar los alcances de un procedimiento analítico, la precisión es calculada en tres diferentes aspectos:

1. Repetibilidad: llamada también precisión a corto plazo o intra-ensayo, se evalúa con base en repeticiones realizadas en un corto intervalo de tiempo, las mismas condiciones de operación y por un solo analista, con un equipo y en el mismo laboratorio.
2. Precisión intermedia: se expresa como la precisión dentro del laboratorio, refiriéndose a un análisis practicado en diferentes días, con diferentes analistas y distintos equipos.
3. Reproducibilidad: se expresa como la precisión entre laboratorios (colaboraciones entre laboratorios usualmente aplicados a la estandarización de una metodología)^[108].

La evaluación de la veracidad se fundamenta en la comparación de la media de los resultados obtenidos para una muestra con el contenido “verdadero” y es una medida de posibles errores sistemáticos. Puesto que el valor verdadero no se conoce, existen varias estrategias para evaluar y, en su caso minimizar los errores sistemáticos. En primer lugar, hay que mencionar el uso de materiales de referencia, experimentos de recuperación (recobro), comparación de los resultados obtenidos mediante el método de adición de estándar y calibración externa y comparación de los resultados obtenidos empleando procedimientos diferentes, preferencialmente basados en diferentes principios fisicoquímicos^[109]. En este trabajo, para evaluar la veracidad del procedimiento propuesto, se llevaron a cabo los experimentos de recobro. En concreto, a la muestra de tortilla (5 g de masa fresca) se agregó una alícuota de 0.5 mL de la solución estándar mixta (100 ng/mL) conteniendo 0.05 μg de cada compuesto, lo que resultó en la cantidad de estándar agregado a la muestra de 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$. De la misma manera se agregaron alícuotas de mix de estándares que correspondieron a 50 y 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de cada compuesto directamente a la tortilla. Los resultados obtenidos en el análisis de estas muestras y respectivos porcentajes de recuperación se presentan en la tabla 12. En el caso de harina de maíz, a un gramo de muestra seca se agregaron 0.05 y 0.25 μg del estándar mix teniendo de esta manera adiciones de cada uno de los compuestos correspondientes a 50 y 250 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (masa seca): los resultados obtenidos se muestran en la tabla 13. Finalmente, experimentos similares se realizaron para las tostadas, en este caso la masa de mix de estándares agregados a 2.5 g de la muestra seca fueron 0.05 y 0.25 μg , lo que correspondió a 20 y 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de cada uno de los compuestos agregados a la masa seca de tostada. Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 14.

Tabla 12. Resultados de adición de estándar obtenidos en el análisis de tortillas “Santo Apetito”, “Irapuato” y “La Económica”. (Se presentan valores promedio con respectivas desviaciones estándar en $\mu\text{g}/\text{kg}$ de masa fresca, y desviaciones estándar relativas para tres réplicas).

Compuesto	Sin adición “Santo Apetito”	Adición de estándar (10 $\mu\text{g}/\text{kg}$)	Recuperación	Adición de estándar (50 $\mu\text{g}/\text{kg}$)	Recuperación
DMP	ND	10.7 \pm 0.3 (3.0)	107%	54.1 \pm 3.1 (5.7)	108%
DEP	34.9 \pm 0.5 (1.0)	34.5 \pm 0.4 (8.0)	-	83.1 \pm 4.9 (5.9)	96.0%
DBP	24.8 \pm 0.3 (1.0)	32.8 \pm 0.8 (3.0)	80.0%	66.1 \pm 1.0 (1.5)	83.0%
BBP	11.9 \pm 0.9 (8.0)	19.3 \pm 0.9 (5.0)	74.0%	32.5 \pm 0.05 (0.2)	41.0%
DEHA	ND	4.37 \pm 0.3 (8.0)	44.0%	19.9 \pm 1.2 (6.0)	40.0%
DEHP	204 \pm 25 (12)	212 \pm 7 (3.0)	80.0%	253 \pm 10 (4.0)	98.0%
DnOP	ND	3.37 \pm 0.10 (3.0)	34.0%	14.3 \pm 1.0 (7.0)	29.0%

Compuesto	Sin adición “Irapuato”	Adición de estándar (500 $\mu\text{g}/\text{kg}$)	Recuperación	Sin adición “La Económica”	Adición de estándar (500 $\mu\text{g}/\text{kg}$)	Recuperación
DMP	ND	558 \pm 4 (0.7)	112%	ND	498 \pm 23 (4.6)	100%
DEP	2.57 \pm 0.97 (38)	585 \pm 10 (1.7)	116%	21.3 \pm 0.2 (0.9)	530 \pm 28 (5.3)	102%
DBP	16.4 \pm 1.9 (11)	631 \pm 9 (1.4)	122%	41.4 \pm 2.4 (5.8)	564 \pm 32 (5.7)	105%
BBP	ND	517 \pm 40 (7.7)	103%	ND	472 \pm 42 (8.9)	95%
DEHA	8.76 \pm 0.81 (9.2)	675 \pm 2 (0.3)	133%	1.63 \pm 0.23 (14)	575 \pm 51 (8.9)	115%
DEHP	93 \pm 6 (6.5)	545 \pm 25 (4.6)	91%	59.6 \pm 5.5 (9.3)	573 \pm 15 (2.6)	103%
DnOP	ND	472 \pm 17 (3.6)	94%	ND	345 \pm 47 (14)	70%

Tabla 13. Resultados de adición de estándar obtenidos en el análisis de harina de maíz Maseca. (Se presentan valores promedios con respectivas desviaciones estándar en $\mu\text{g}/\text{kg}$ de masa seca, y desviaciones estándar relativas para tres réplicas).

Compuesto	Sin adición	Adición de estándar (50 $\mu\text{g}/\text{kg}$)	Recuperación	Adición de estándar (250 $\mu\text{g}/\text{kg}$)	Recuperación
DMP	ND	43.0±2.6 (6.1)	86.0%	203±18 (8.9)	81.0%
DEP	11.4 ± 2.1 (18)	67.4 ± 6.2 (9.2)	112%	266 ± 17 (6.4)	102%
DBP	39.5 ± 10.8 (27)	100 ± 5 (5.0)	121%	352 ± 9 (2.6)	125%
BBP	ND	53.8 ± 1.1 (2.0)	108%	275 ± 16 (5.8)	110%
DEHA	ND	56.0 ± 1.3 (2.3)	112%	233 ± 7 (3.0)	93.0%
DEHP	28.1 ± 2.1 (7.5)	81.5 ± 4.7 (5.8)	107%	274 ± 3 (1.1)	98.4%
DnOP	ND	55.7 ± 1.1 (2.0)	111%	245 ± 17 (6.9)	98.0%

Tabla 14. Resultados de adición de estándar obtenidos en el análisis de tostada identificada como “Sanissimo”. (Se presentan valores promedio con respectivas desviaciones estándar en $\mu\text{g}/\text{kg}$ de masa seca, y desviaciones estándar relativas para tres réplicas).

Compuesto	Sin adición	Adición de estándar (20 $\mu\text{g}/\text{kg}$)	Recuperación	Adición de estándar (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$)	Recuperación
DMP	ND	22.3 ± 0.9 (3.9)	111%	100 ± 2.9 (2.9)	100%
DEP	17.8 ± 2.9 (16)	32.9 ± 1.6 (4.9)	75.5%	108 ± 2.9 (2.7)	90.2%
DBP	56.2 ± 2.0 (3.5)	72.5 ± 6.0 (8.3)	81.5%	136 ± 4 (2.8)	79.8%
BBP	ND	18.9 ± 1.8 (9.7)	94.5%	90.6 ± 5.6 (6.2)	90.6%
DEHA	ND	19.3 ± 1.6 (8.1)	96.5%	76.9 ± 3.2 (4.2)	76.9%
DEHP	24.9 ± 4.2 (4.2)	50.7 ± 1.7 (3.4)	129%	120 ± 4 (4.3)	95.1%
DnOP	ND	16.3 ± 1.6 (9.8)	81.5%	66.0 ± 2.8 (4.2)	65.9%

En la determinación de ftalatos en matrices alimenticias, laboratorios de origen europeo han demostrado valores de DER para evaluar su precisión intermedia entre 0.5% y 28%, otros han demostrado DER para DBP entre 30% y 47% en bebidas principalmente^[110]. En el análisis de recobro, se ha reportado una recuperación entre el 80% y 110%, utilizando estándar interno, pero sin el uso de este, los valores aumentaron hasta 130% aproximadamente. Estos datos bibliográficos están de acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo y presentados en esta sección. Sin embargo, hay que mencionar, que para las tortillas, la recuperación para bajas concentraciones (10 µg/kg y 50 µg/kg) y los porcentajes evaluados con base en masa fresca no fueron satisfactorios. Por lo anterior, se decidió evaluar el porcentaje de humedad en las tortillas y expresar todos los resultados por masa seca. Una vez evaluados parámetros analíticos del procedimiento y demostrada su exactitud, se decidió llevar a cabo la determinación de ftalatos en tres tipos de muestras con base en la calibración externa.

V.3 Análisis de muestras reales por GC-MS(TQ).

V.3.1 Determinación de ftalatos en tortillas

Se analizaron 14 diferentes tipos de tortillas cuya descripción de muestra en la tabla 4 en la parte experimental. En esta misma sección IV.6 se describe el procedimiento de extracción; la cuantificación se llevó a cabo por el método GC-TQMS en el modo MRM. Los resultados obtenidos y expresados como microgramo de ftalatos por un kilogramo de masa fresca se muestran en la tabla 15. Es importante enfatizar que el blanco fue corrido con cada porción de muestras y su valor se restó del resultado obtenido en las muestras. Este paso fue muy importante debido al carácter ubicuo de los ftalatos. En la tabla 16 se presentan los mismos resultados pero expresados como microgramos de ftalato por un kilogramo de masa seca, para ello se determinó el porcentaje de humedad en tortillas, obteniéndose el valor promedio de $44.1 \pm 1.2\%$ ^[111].

Tabla 15. Resultados de determinación de ftalatos en tortillas, se presentan valores promedio para masa fresca de tortilla con sus respectivas DE, obtenidos con base en tres réplicas independientes. Entre paréntesis se describe su DER (n=3).

<i>Compuesto</i>								
	<i>DMP</i>	<i>DEP</i>	<i>DBP</i>	<i>BBP</i>	<i>DEHA</i>	<i>DEHP</i>	<i>DnOP</i>	<i>Total de ftalatos</i>
Tortilla								
La Cosecha Don Pancho	ND	40.9 ± 1.1 (2.7)	23.0 ± 1.4 (6.1)	ND	31.9 ± 5.1 (16)	155 ± 23 (15)	ND	251
Santo Apetito	ND	34.9 ± 0.5 (1.4)	24.8 ± 0.3 (1.2)	11.9±0.9 (7.6)	ND	204 ± 25 (12)	ND	277
León	ND	6.74±0.27 (4.0)	51.9 ± 4.3 (8.0)	ND	110 ± 11 (10)	139 ± 2 (2.0)	ND	308
El Maguey	ND	8.72±0.97 (11)	16.4 ± 1.9 (12)	ND	8.76±0.81 (9.2)	93.0 ± 6.3 (6.7)	ND	127
Irapuato	ND	2.57±0.01 (0.4)	15.2 ± 2.1 (14)	ND	ND	62.6 ± 1.5 (2.4)	ND	80.4
Janeth	ND	3.42±0.30 (8.8)	30.8 ± 0.8 (2.6)	ND	31.5±1.5 (4.8)	47.0 ± 6.5 (14)	ND	113
Silao Máquina	ND	35.1±2.1 (6.0)	129 ± 23 (18)	ND	ND	140 ± 14 (10)	ND	304
Guanajuato	ND	2.74±0.50 (18)	ND	ND	ND	91.9 ± 1.9 (2.1)	ND	94.6
Romita	ND	6.86±0.12 (1.7)	73.1 ± 1.7 (2.3)	ND	ND	40.0 ± 2.8 (7.0)	ND	120
Celaya	ND	3.39±0.09 (2.7)	12.5 ± 0.1 (0.8)	ND	107 ± 2 (1.9)	58.3 ± 1.1 (1.9)	5.9 ± 0.3 (5.0)	187
Pollo Feliz	ND	1.89±0.34 (18)	3.04±0.16 (5.3)	ND	1.86±0.12 (6.5)	235 ± 17 (7.2)	2.23±0.44 (20)	244
Salamanca	ND	ND	153 ± 3 (2.0)	ND	34.4 ± 2.1 (6.1)	150 ± 11 (7.3)	ND	337
Nopalía	ND	6.93±0.14 (2.0)	32.6 ± 1.6 (4.9)	ND	6.59±0.47 (7.1)	46.0 ± 1.4 (3.0)	ND	92.1
La Económica	ND	9.86±2.70 (27)	41.4 ± 2.4 (5.8)	ND	1.63±0.23 (14)	59.6 ± 5.5 (9.2)	ND	113

Tabla 16. Resultados de determinación de ftalatos en tortillas, se presentan valores promedio obtenidos para masa seca de tortilla con sus respectivas DE, obtenidos con base en tres réplicas independientes. Entre paréntesis se describe su DER (n=3).

<i>Compuesto</i>								
	<i>DMP</i>	<i>DEP</i>	<i>DBP</i>	<i>BBP</i>	<i>DEHA</i>	<i>DEHP</i>	<i>DnOP</i>	<i>Total de ftalatos</i>
Tortilla								
La Cosecha Don Pancho	ND	73.2±2.0 (2.7)	41.1±2.5 (6.1)	ND	57.1±9.3 (16)	277 ± 41 (15)	ND	449
Santo Apetito	ND	62.4±0.9 (1.4)	44.4±0.5 (1.1)	21.3±1.6 (7.5)	ND	365 ± 45 (12)	ND	494
León	ND	12.1±0.5 (4.1)	92.8 ± 7.7 (8.3)	ND	197 ± 20 (10)	249 ± 4 (1.6)	ND	551
El Maguey	ND	15.6±1.73 (11)	29.3 ± 3.4 (12)	ND	15.7 ± 1.5 (9.6)	166 ± 11 (6.6)	ND	227
Irapuato	ND	4.60±0.02 (0.4)	27.2 ± 3.8 (14)	ND	ND	112 ± 3 (2.7)	ND	144
Janeth	ND	6.12±0.54 (8.8)	55.1 ± 1.4 (2.5)	ND	56.4 ± 2.7 (4.8)	84.1 ± 11.6 (14)	ND	202
Silao Máquina	ND	62.8±3.8 (6.1)	231 ± 41 (18)	ND	ND	250 ± 25 (10)	ND	544
Guanajuato	ND	4.90±0.89 (18)	ND	ND	ND	164 ± 3 (1.8)	ND	169
Romita	ND	12.3±0.2 (1.7)	131 ± 3 (2.3)	ND	ND	71.6 ± 5.0 (7.0)	ND	215
Celaya	ND	6.06±0.16 (2.7)	22.4±0.18 (0.8)	ND	191 ± 4 (2.1)	104 ± 2 (1.9)	10.6 ± 0.5 (4.7)	334
Pollo Feliz	ND	3.38±0.61 (18)	5.44±0.29 (5.3)	ND	3.33±0.21 (6.3)	420 ± 30 (7.2)	3.99±0.79 (20)	436
Salamanca	ND	ND	274 ± 5 (1.8)	ND	61.5 ± 3.8 (6.2)	268 ± 20 (7.5)	ND	604
Nopalía	ND	12.4±0.2 (1.6)	58.3 ± 2.9 (5.0)	ND	11.8 ± 0.8 (6.8)	82.3 ± 2.5 (3.0)	ND	165
La Económica	ND	17.6±4.8 (27)	74.1 ± 4.3 (5.8)	ND	2.92±0.41 (14)	107 ± 10 (9.3)	ND	202

Los resultados obtenidos claramente demuestran que el DEHP es el ftalato de mayor concentración en tortilla (71.6 – 420 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en masa seca). Otros dos compuestos encontrados en todas las muestras analizadas, aunque en más bajas concentraciones, fueron DBP (5.44 – 274 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en masa seca) y DEP (3.38 – 73.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en masa seca). Estos datos están en concordancia con los estudios anteriores realizados en diferentes tipos de alimentos en países de Europa (Bélgica, UK, Portugal), Asia (China, Corea) y Norte América (Canadá, USA)^[22]. También de acuerdo con abundancia de ftalatos reportada en otros estudios, DMP no fue detectado en ninguna muestra, mientras que BBP se encontró en un tipo de tortilla y DnOP en dos muestras. En cuanto a los ftalatos totales, el orden decreciente de la contaminación fue el siguiente (expresando las concentraciones en masa seca de tortilla): Salamanca (604 $\mu\text{g}/\text{kg}$) > León (551 $\mu\text{g}/\text{kg}$) \approx Silao máquina (544 $\mu\text{g}/\text{kg}$) > Santo Apetito (494 $\mu\text{g}/\text{kg}$) > La Cosecha de Don Pancho (449 $\mu\text{g}/\text{kg}$) > Pollo feliz (436 $\mu\text{g}/\text{kg}$) > Celaya (334 $\mu\text{g}/\text{kg}$) > El Maguey (227 $\mu\text{g}/\text{kg}$) > Romita (215 $\mu\text{g}/\text{kg}$) > Janeth (202 $\mu\text{g}/\text{kg}$) \approx La Económica (202 $\mu\text{g}/\text{kg}$) > Guanajuato (169 $\mu\text{g}/\text{kg}$) \approx Nopalía (165 $\mu\text{g}/\text{kg}$) > Irapuato (144 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Entre estas muestras, las seis primeras se podrían clasificar como las de alto contenido de ftalatos totales (>300 $\mu\text{g}/\text{kg}$)^[22]. Cabe también mencionar que DEHA, que es otro tipo de plastificante, ha sido encontrado y determinado en ocho muestras cubriendo el intervalo de concentraciones de 2.92 hasta 197 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en masa seca. Se sabe que la migración de los ftalatos desde empaques hacia los alimentos, además del material del empaque, depende de la temperatura y tiempo de contacto. Es por ello que las tortillas analizadas se seleccionaron incluyendo las de diferente tiempo en el anaquel (“1” –frescas, < 3 días; “-1” –con largo tiempo en anaquel, > 3 días) y temperatura de almacenamiento (“-1” –elevada, “1” –ambiente o en refrigeración). El modelo PCA obtenido se presenta en la figura 15. En este modelo, los dos primeros componentes principales describieron 62% de la variabilidad total de los datos. La distribución de las muestras en las coordenadas PC1, PC2 muestra su ordenamiento desde las tortillas menos contaminadas con ftalatos (Guanajuato, Irapuato, Celaya, Maguey) hasta las muestras altamente contaminadas (Santo Apetito, Salamanca). La gráfica de varianzas residuales indica que todas las muestras pertenecen al modelo (no se detectaron “outliers”). De manera muy importante, en la gráfica de “X-loadings”, las variables correspondientes a las concentraciones de ftalatos están localizadas en el mismo espacio que las muestras contaminadas formando una agrupación; esto claramente indica que las posibles fuentes de contaminación proveen a las tortillas tres ftalatos que usualmente han sido reportados como los más ubicuos en productos

alimenticios^[22]. Tomando en cuenta el componente principal PC1, el tipo de empaque y el tiempo de almacenamiento se agrupan junto con variables de ftalatos, es decir el empacamiento en bolsas de plástico y largos tiempos de almacenamiento se asocian con elevadas concentraciones de ftalatos en tortillas. Estos resultados confirman que la migración del empaque es una importante ruta de contaminación de las tortillas. Por otro lado, la variable de temperatura tiene valor de PC1 negativo y se aleja de las variables de ftalatos. Para entender por qué sus coordenadas son opuestas a las variables de empaque y tiempo es necesario notar que las tortillas se mantienen calientes solamente cuando se destinan a la venta en este mismo día (corto tiempo) y entonces se empacan en papel cebolla.

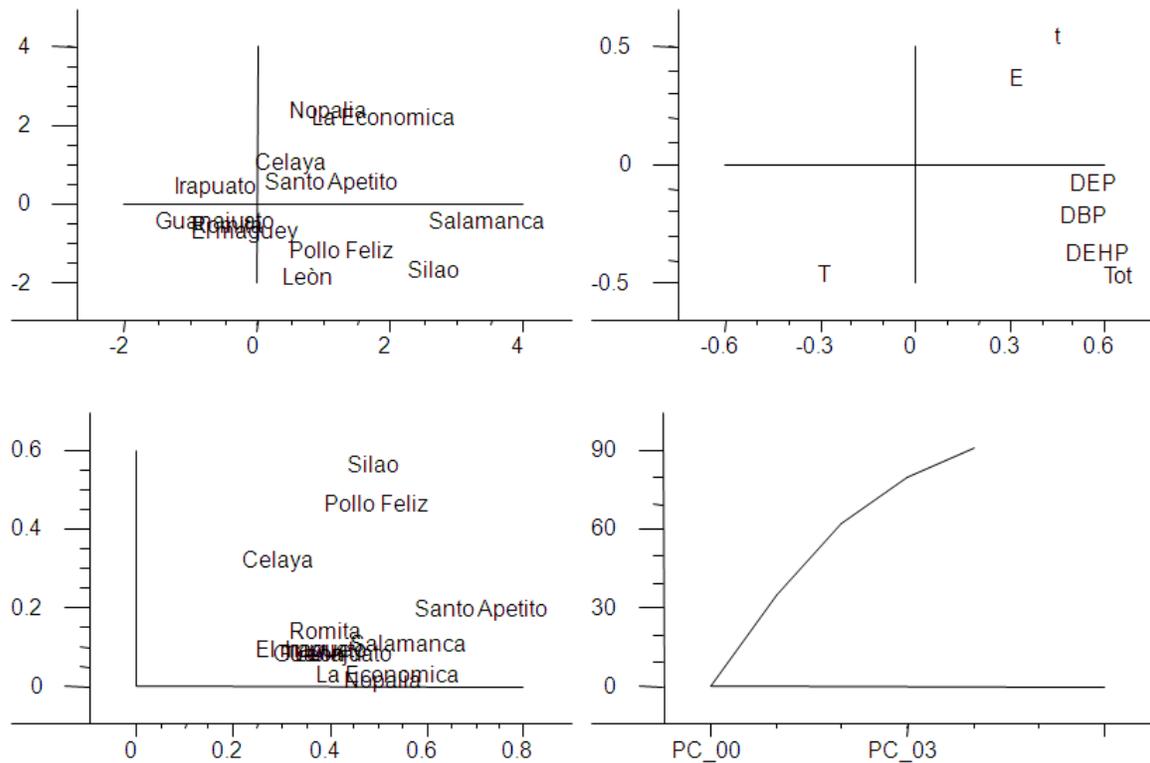


Figura 15. Gráficos de análisis en PCA de tortillas analizadas en este trabajo.

En resumen, los resultados del análisis PCA indican que la migración del empaque es una importante ruta de contaminación de tortilla con ftalatos, que los tres ftalatos DEHP, DBP y DEP son los más ubicuos y que su migración se ve favorecida por largos tiempos de almacenamiento en bolsas de plástico. El efecto de temperatura no se puede excluir, pero en este estudio se analizaron tortillas adquiridas en las tiendas donde las tortillas calientes siempre se venden en el papel y el mismo día de su elaboración.

V.3.2 Determinación de ftalatos en harina de maíz.

El ritmo acelerado de vida hace más necesario consumir harinas de maíz nixtamalizado, ya que se presentan en una forma más accesible al consumidor, pero las tortillas elaboradas con estas harinas son diferentes a las tradicionales. La Secretaría de Economía y el Consejo Regulador de la Masa calculan que a lo largo del año 2014 se consumieron entre 7 y 9 millones de toneladas de tortillas tan solo en México, cifra superior a la media anual de 8.4 millones de toneladas^[112].

Tabla 17. Porcentaje de consumo de maíz nixtamalizado y sus subproductos como la harina en la república mexicana.

Materia prima para elaboración de tortilla	Porcentaje de Uso
Maíz nixtamalizado	65%
Maseca	25%
Minsa	8%
Harimasa	1%
Cargill	0.50%
Macsa	0.40%
Blancas	0.20%

La cuantificación de ftalatos en harinas se realizó para tres principales marcas comerciales que se posicionan como líderes en el ranking de consumo nacional, como se muestra en la tabla 17. La metodología de extracción se describe en el punto IV.7. Se empleó el procedimiento GC-MS(TQ) propuesto (tabla 5). Los resultados de la determinación se muestran a continuación en la tabla 18. En primer lugar, se observa una mayor discrepancia entre valores individuales obtenidos en tres réplicas de una muestra respecto al análisis de tortillas (DER entre 7 hasta 35% para harinas y en el intervalo 1-20% para tortillas). La baja precisión se debe a que el polvo de harina contiene partículas muy finas impidiendo una buena separación de las fases después de la extracción. Por otro lado, las concentraciones totales de ftalatos fueron más bajas y presentaron diferencias menores entre tipos de harina, respecto los datos obtenidos en el análisis de tortillas (133 – 544 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de ftalatos totales en masa seca de tortilla y 65.2 - 83.8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en harinas).

Estos resultados parecen confirmar que durante elaboración y almacenamiento de tortillas, este producto se contamina con ftalatos de manera adicional a su contenido en harinas. Cabe también señalar que para su venta en las tiendas, las harinas se empacan en bolsas de papel en porciones de 1 kg. Dichas bolsas no contienen o tienen un mínimo contenido de plastificantes y además, la harina es un material seco y no grasoso, lo que en su conjunto limita de manera sustancial la migración de ftalatos.

Tomando en cuenta estas consideraciones, se esperaba encontrar muy bajas concentraciones de plastificantes en harinas, los resultados obtenidos ubican a las harinas entre productos medianamente contaminados (50 – 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de ftalatos totales). De ahí se propone que los ftalatos en harinas corresponden a la suma de su contenido en grano, la contaminación durante el proceso industrial (lavado, nixtamalización, molienda, secado, tamizado) y posible contaminación durante transporte/almacenamiento en mayoreo.

Tabla 18. Resultados de determinación de ftalatos en harinas de maíz nixtamalizado, se presentan valores promedio con sus respectivas DE ($\mu\text{g}/\text{kg}$), obtenidos con base en tres réplicas independientes. Entre paréntesis se presenta la desviación estándar relativa.

<i>Compuesto</i>								
<i>Harina</i>	<i>DMP</i>	<i>DEP</i>	<i>DBP</i>	<i>BBP</i>	<i>DEHA</i>	<i>DEHP</i>	<i>DnOP</i>	<i>Total</i>
Maseca	ND	11.4±2.0 (18)	39.5±10.8 (27)	ND	ND	28.1±2.1 (7.6)	ND	79.0
Minsa	ND	11.0±2.9 (26)	30.8±11.5 (37)	ND	ND	23.4±4.9 (21)	ND	65.2
Harimasa	ND	ND	31.8±2.6 (8.3)	ND	20.7±6.02 (29)	31.3±4.3 (14)	ND	83.8

V.3.3 Determinación de ftalatos en tostadas horneadas.

En México, una tostada es una tortilla de maíz crujiente. Se pueden fabricar a partir del secado de tortillas al sol, comal u horno, aunque también pueden freírse en aceite o manteca, lo cual, las cataloga como comida rápida y como platillo típico mexicano. La contaminación con ftalatos en estos productos dependerá de su fabricación. En horno o comal, la tortilla de secará a una temperatura entre los 120 y 300 °C^[113], temperaturas que se acercan a los puntos de ebullición de los ftalatos estudiados en el presente trabajo. Su preservación y empaque es en bolsas de plástico, principalmente celofán, pero en este caso la migración, se ve limitada ya que el producto se encuentra deshidratado y a temperatura ambiente. En el caso de las tostadas fritas, la migración de los ftalatos se puede presentar a partir del aceite en el que son freídas.

Se ha demostrado que los aceites de olivo pueden contener ftalatos tales como DBP (153-394 $\mu\text{g}/\text{kg}$), BBP (85.0 - 175 $\mu\text{g}/\text{kg}$) y DEHP (439 – 2660) $\mu\text{g}/\text{kg}$ ^[114]. Cada tostada frita, puede adsorber de 5 a 7 mL de aceite de cocción. Para analizar las tostadas con alto contenido de grasa, tendría que utilizarse otro procedimiento de extracción que permitiera determinar compuestos polares y liposolubles en una corrida. El interés de este trabajo fue evaluar los siete típicos ftalatos en tortilla, sin extenderse a otros ingredientes de este producto tales como grasa o relleno de tacos;

es por ello que se analizaron solamente muestras de tostadas horneadas o secadas, mismas que se enlistan en la tabla 19. Tratándose de material de muy bajo contenido de humedad, se pesaron alícuotas de 2.5 g para su análisis por el procedimiento propuesto. Los resultados del análisis de tostada se presentan en la tabla 20.

Tabla 19. Características de preparación de las tostadas analizadas.

Tostada	Tipo de cocción
Sanissimo	Horneada
Charras	Horneada
Las del Barrio	Deshidratada

Tabla 20. Resultados de determinación de ftalatos en tostadas, se presentan valores promedio con sus respectivas DE en $\mu\text{g}/\text{kg}$ de masa seca, obtenidos con base en tres réplicas independientes. Entre paréntesis se describe su DER entre replicas.

<i>Compuesto</i>								<i>Totales</i>
	<i>DMP</i>	<i>DEP</i>	<i>DBP</i>	<i>BBP</i>	<i>DEHA</i>	<i>DEHP</i>	<i>DnOP</i>	
Tostadas								
Sanissimo	ND	17.8 ± 2.9 (16)	56.2 ± 2.0 (3.5)	ND	ND	25.0 ± 4.2 (17)	ND	99.0
Charras	ND	57.7 ± 7.6 (13)	8.61 ± 0.34 (4.0)	ND	ND	40.8 ± 8.1 (20)	ND	107
Las del Barrio	ND	2.79 ± 0.20 (7.5)	12.9 ± 0.2 (1.0)	ND	ND	47.6 ± 5.8 (12)	ND	63.3

La precisión en el análisis de tostadas fue similar a la obtenida para tortillas frescas (DER 1-20%), pero las concentraciones fueron mucho más bajas en comparación con tortilla en masa seca (el intervalo 63.3 – 107 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de masa seca de ftalatos totales en tostadas). Estos datos confirman que durante secado/horneado de tortillas, los ftalatos son parcialmente eliminados (temperaturas de ebullición de los siete compuestos van desde 282 °C hasta 385 °C) y además la migración desde el empaque es reducida. En cuanto a DEHA, su temperatura de ebullición es de 214 °C y este compuesto no fue detectado en ninguna de las muestras después de tratamiento térmico.

V.4 Procedimiento de determinación de ftalatos por cromatografía de gases con detector por ionización en flama (GC-FID).

Para fines comparativos, se exploró la capacidad del sistema GC-FID para realizar la determinación de ftalatos en las mismas muestras que fueron analizadas por el procedimiento propuesto (GC-MS(TQ) MRM). Para ello, se utilizó la columna capilar Elite-XLB de bajo sangrado (Perkin-Elmer) e hidrógeno como gas de arrastre. Las condiciones de separación se modificaron para asegurar la resolución cromatográfica de los ocho compuestos de interés. Las condiciones finales se presentan en la tabla 21; comparando con la detección en MS (tabla 5), el flujo en la columna fue más bajo (0.8 mL/min) y el tiempo total del cromatograma más largo (25.5 min). En la tabla 22 se muestran los tiempos de retención promedio de cada analito obtenidos en seis inyecciones de los estándares.

Tabla 21. Condiciones cromatográficas de GC-FID aplicadas en la determinación de ftalatos.

Columna	Elite-XLB (30 m, ID: 0.25m, 0.25 μ m de recubrimiento)		
Gas acarreador	Hidrógeno	0.8 mL/min	
Inyección	Splitless	Volumen = 1 μ L	
Inyector	Temperatura 280 °C		
	°C/min	Temperatura °C	Permanencia, min
Programa de temperatura	Inicio	70	1
	10	270	2
	30	300	1
Tiempo total de análisis	25.5 min		
Temperatura del detector	300 °C		
Gas del detector	H ₂ = 45 mL/min; aire extra seco= 450 mL/min		

Tabla 22. Tiempos de retención de analitos en el sistema GC-FID. Se presentan valores promedio con respectiva desviación estándar (n=6).

Analito	Tiempo de retención ± DE (min)
DMP	9.89 ± 0.01
DEP	11.5 ± 0.01
DBP	15.4 ± 0.01
BBP	19.1 ± 0.01
DEHA	19.3 ± 0.01
DEHP	20.5 ± 0.01
DnOP	22.2 ± 0.01

Debido a que la detección en FID ofrece menor sensibilidad respecto a la detección por espectrometría de masas en modo MRM, los estándares de calibración se prepararon en el intervalo de concentraciones 0 – 50 mg/L para cada uno de los compuestos. Las funciones de calibración y la cuantificación en muestras reales se realizaron mediante la aplicación off-line de software ChemStation (Agilent Technologies), tomando el área del pico cromatográfico como señal analítica. Las funciones de regresión lineal junto con respectivos coeficientes de regresión (R^2) y desviación estándar relativa de los factores de respuesta (DER(CF)) se presentan en la tabla 23. De acuerdo con los criterios EPA, los parámetros de calibración cumplieron con los requisitos aceptados para el análisis cromatográfico ($R^2 > 0.99$; $DER(CF) \leq 20\%$)^[100]. De manera de ejemplo, en la figura 16 se muestran cromatogramas de las seis mezclas de calibración.

Tabla 23. Parámetros analíticos evaluados en el proceso de calibración por GC-FID.

Compuesto	Ecuación	Coefficiente de regresión (R^2)	DER(CF), %
DMP	$y = 2.39e^4 x + 2.24e^3$	0.9975	17
DEP	$y = 2.80e^4 x - 9.36e^3$	0.9976	5.4
DBP	$y = 2.98e^4 x + 6.43e^3$	0.9995	12
BBP	$y = 2.63e^4 x + 1.90e^3$	0.9951	17
DEHA	$y = 3.02e^4 x + 1.39e^4$	0.9988	4.3
DEHP	$y = 3.34e^4 x + 2.01e^4$	0.9999	11
DnOP	$y = 2.44e^4 x + 8.34e^3$	0.9992	23

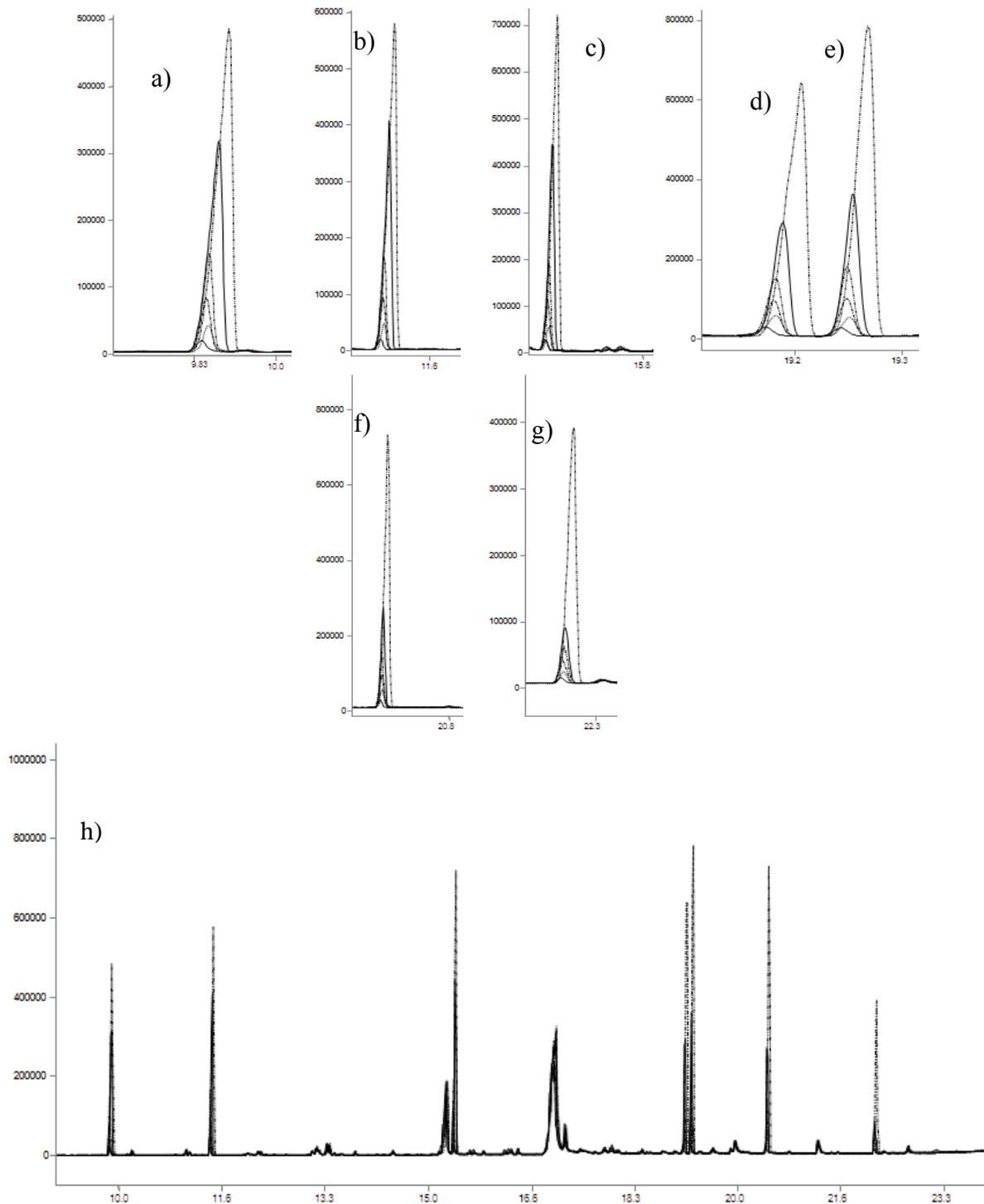


Figura 16. Típicos cromatogramas GC-FID de las soluciones de calibración (0, 1, 2.5, 5, 10, 25 y 50 mg/L de cada uno de los compuestos); (h) – Cromatogramas totales; (a) – (g) ampliación de las regiones de cromatogramas correspondientes a la elución de DMP, DEP, DBP, BBP, DEHA, DEHP y DnOP, respectivamente.

Con base en el proceso de calibración, se evaluaron los límites de detección y de cuantificación, siguiendo los mismos procedimientos que anteriormente para el procedimiento GC-MS(TQ) MRM.

Los resultados obtenidos se resumen en la tabla 24, presentando los límites obtenidos en la etapa de calibración y los límites evaluados en el análisis de muestras reales (en este caso se excluyeron muestras de harina). Lógicamente estos valores fueron más altos respecto al procedimiento por GC-MS(TQ) MRM y, en la mayoría de los casos, inadecuados para poder cuantificar ftalatos en sus niveles de concentración encontrados en la primera parte del trabajo. Cabe mencionar, que la calibración se realizó empleando el método de adición de estándar, la determinación de LD y LC en tortilla y tostada se utilizó la matriz de cada una respectivamente.

Tabla 24. Límites de detección (LD) y de cuantificación (LC) evaluados en el procedimiento de calibración y en el análisis de muestras reales (tortilla, tostada).

Analito	Calibración, ng/mL		Análisis de tortilla, µg/kg (masa seca)		Análisis de tostada, µg/kg (masa seca)	
	LD	LC	LD	LC	LD	LC
DMP	250	756	44.7	135	50.0	151
DEP	161	489	28.8	87.5	32.2	97.8
DBP	206	626	36.8	112	41.2	125
BBP	203	614	36.3	110	40.6	123
DEHA	186	563	33.3	101	37.2	113
DEHP	231	700	41.3	125	46.2	140
DnOP	879	2665	157	477	176	533

Para examinar la veracidad de los resultados GC-FID se llevaron a cabo los experimentos de recuperación. Con el fin de observar diferencias entre dos sistemas instrumentales (GC-FID y GC-MS(TQ) MRM), en ambos casos se utilizó el mismo tratamiento de muestra, es decir el mismo proceso de extracción de ftalatos de tortillas y de tostadas, sin embargo, conociendo los alcances de GC-FID los experimentos consistieron en dos puntos de adición de estándar mixto correspondientes a 500 y 1000 µg/kg de cada uno de los ftalatos respecto a masa fresca para tortilla y masa seca para tostada. El análisis de las muestras sin y con adición de estándar arrojó

porcentajes de recuperación en el intervalo antes mencionado, de manera similar al procedimiento GC-MS(TQ) por MRM.

Tabla 25. El porcentaje de recobro del método analítico, el cual se evaluó comparando las concentraciones de muestras fortificadas con las concentraciones proporcionadas por la muestra real, tratándose de la tortilla identificada como Santo Apetito.

Compuesto	sin adición	Adicionada (500 µg/kg)	Recuperación	Adicionada (1000 µg/kg)	Recuperación
DMP	ND	475 ± 24 (5.1)	95.0%	1234 ± 19 (1.6)	123%
DEP	ND	537 ± 57 (11)	107%	1233 ± 61 (4.9)	123%
DBP	ND	504 ± 29 (5.8)	101%	1058 ± 41 (3.9)	106%
BBP	ND	462 ± 69 (15)	92.4%	861 ± 98 (11)	86.1%
DEHA	ND	498 ± 18 (3.6)	99.6%	979 ± 53 (5.4)	97.9%
DEHP	193 ± 15 (7.8)	649 ± 26 (4.0)	91.2%	978 ± 33 (3.8)	79.5%
DnOP	ND	517 ± 40 (7.7)	103%	870 ± 14 (1.7)	87.0%

En cuanto a las tostadas, en experimentos de recobro se utilizó la muestra “Las del Barrio”, no detectando en ella ninguno de los compuestos de interés (tabla 26). En las muestras enriquecidas con estándares de 500 y 1000 µg/kg de masa seca, para mayoría de los compuestos los porcentajes de recuperación fueron aceptables (91.8 – 124%), de manera similar como para la tortilla fresca. Sin embargo, adicionando 1000 µg/kg DEP y DEHA, las recuperaciones fueron 142% y 141%, respectivamente y este claro efecto de matriz requiere una mayor atención en estudios futuros.

Tabla 26. El porcentaje de recobro del método analítico, el cual se evaluó comparando las concentraciones de muestras fortificadas con las concentraciones proporcionadas por la muestra real, tratándose de la tostada identificada como Las del Barrio.

Compuesto	sin adición	Adicionada (500 µg/kg)	Recuperación	Adicionada (1000 µg/kg)	Recuperación
DMP	ND	520 ± 45 (8.7)	104%	1240 ± 61 (4.9)	124%
DEP	ND	520 ± 34 (6.5)	104%	1418 ± 111 (7.8)	142%
DBP	ND	503 ± 43 (8.5)	101%	1182 ± 157 (13)	118%
BBP	ND	472 ± 58 (12)	94.4%	1089 ± 146 (13)	109%
DEHA	ND	515 ± 40 (7.8)	103%	1412 ± 78 (5.5)	141%
DEHP	ND	459 ± 42 (9.2)	91.8%	1239 ± 43 (3.5)	122%
DnOP	ND	546 ± 40 (7.3)	109%	1163 ± 79 (6.8)	116%

V.5 Análisis de muestras reales por GC-FID.

Aunque el poder de detección del procedimiento GC-FID no fue suficiente para lograr la cuantificación de todos los ocho compuestos en cada una de las muestras preparadas de igual manera como para GC-MS(TQ), algunas de estas muestras contenían relativamente altas concentraciones y estas fueron analizadas por GC-FID. En la tabla 27 se presentan los resultados obtenidos junto con los datos del procedimiento desarrollado en la primera parte de este trabajo, observándose una concordancia aceptable entre dos procedimientos. Tal como ya se mencionó antes, GC-FID parece ser una herramienta adecuada para el análisis de ftalatos en comida, pero puede ser utilizado solamente en el análisis de muestras con alto contenido de ftalatos. Por otro lado, se podría realizar un estudio adicional centrado en el desarrollo de un pretratamiento de

muestra que asegure la preconcentración efectiva de los analitos para poder utilizar el sistema GC-FID que es más económico y más simple en el manejo instrumental respecto GC-MS(TQ).

Tabla 27. Comparación de los resultados obtenidos por GC-FID y por GC-MS(TQ) MRM en tortillas con alto contenido de DEHP y DBP. Se presentan valores promedio con sus respectivas DE en $\mu\text{g}/\text{kg}$ de masa fresca, obtenidos con base en tres réplicas independientes. El valor entre paréntesis corresponde a DER, %.

Muestra	Compuesto	Promedio \pm DE, $\mu\text{g}/\text{kg}$ masa seca (DER, %)	
		<i>GC-FID</i>	<i>GC-MS(TQ) MRM</i>
La Cosecha de Don Pancho	DEHP	108 \pm 9 (8.3)	155 \pm 23 (15)
Santo Apetito	DEHP	193 \pm 15 (7.8)	204 \pm 25 (12)
León	DEHP	156 \pm 21 (13)	139 \pm 2 (1.4)
El Maguey	DEHP	108 \pm 17 (16)	93.0 \pm 6.3 (6.8)
Silao maquina	DBP	144 \pm 18 (12)	129 \pm 23 (18)
	DEHP	121 \pm 24 (20)	140 \pm 14 (10)
Guanajuato	DEHP	ND	91.9 \pm 1.9 (2.1)
Romita	DEHP	120 \pm 28 (23)	40.0 \pm 2.8 (7.0)
Pollo Feliz	DEHP	197 \pm 25 (13)	235 \pm 17 (7.2)
Salamanca	DBP	162 \pm 19 (12)	153 \pm 3 (2.0)
	DEHP	174 \pm 24 (14)	150 \pm 11 (7.3)

VI. CONCLUSIONES

El presente trabajo de tesis ha sido enfocado en la determinación de seis ftalatos típicamente reportados en alimentos (DMP, DEP, DBP, BBP, DEHP Y DnOP), seleccionando a la tortilla, harina y tostada de maíz como muestras reales para su análisis. Se incluyó también otro tipo de plastificante (DEHA), contenido en el estándar EPA de los ftalatos con el fin de poder verificar presencia de plastificantes del grupo de adipatos. Se desarrolló un nuevo procedimiento analítico, en el que el extracto de la muestra se introduce a la columna capilar de un cromatógrafo de gases, el cual es acoplado a un espectrómetro de masas con triple cuadrupolo.

Las principales dificultades en el desarrollo de este trabajo han sido: (1) carácter ubicuo de los ftalatos lo que obligó a controlar muy eficientemente las posibles fuentes de contaminación de la muestra y hacia una muy importante corrección de los resultados por el valor del blanco; (2) similar patrón de fragmentación de los ftalatos en el dispositivo de ionización por impacto de electrones y en la zona CID, por lo que el uso de monitoreo de reacciones múltiples requería la resolución cromatográfica de los compuestos.

Una vez establecida las condiciones de separación y cuantificación de los ocho compuestos en el modo MRM, se evaluaron los principales parámetros analíticos. Los límites de detección instrumentales fueron en el intervalo de 0.62 – 10.3 $\mu\text{g/L}$ y los límites de detección del método fueron en un intervalo de entre 0.11 – 1.84 $\mu\text{g/kg}$ en masa seca en tortilla, 0.31 – 5.15 $\mu\text{g/kg}$ en masa seca en harina, 0.12 – 2.06 $\mu\text{g/kg}$ masa seca de tostadas, en concordancia con los datos reportados en literatura reciente. Basándose en el proceso de calibración se obtuvieron los coeficientes de regresión y los valores DER(CF) para cada uno de los compuestos, demostrando que el procedimiento propuesto cumple con los requerimientos EPA para el análisis cromatográfico. La veracidad ha sido demostrada mediante los experimentos de recuperación, obteniéndose en la mayoría de los casos (compuestos individuales en tres diferentes matrices químicas) los porcentajes de recobro en el intervalo de 80 – 120%.

En el análisis de tortilla, los ftalatos encontrados en todas las muestras fueron: DEHP (71.6 – 420 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en masa seca) > DBP (5.44 – 274 $\mu\text{g}/\text{kg}$) > DEP (3.38 – 73.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$), en concordancia con los datos reportados anteriormente en otros productos alimenticios derivados de granos (tabla 28).

Tabla 28. Comparación de contenidos de ftalatos en panes y cereales obtenidos de la bibliografía y los obtenidos en la presente tesis, los valores se expresan en $\mu\text{g}/\text{kg}$ en masa seca.

Compuesto	Panqué de Alforfón	Pan Blanco	Croissant	Cereales varios	Pan Italiano	Cereales y sus derivados	Pan, galletas, pasteles, cereales	Tortilla (este trabajo)	Referencia
DMP	NR	NR	NR	ND-1.4	ND	NR	0.37	ND	[115]
DEP	NR	NR	NR	ND-558	ND	NR	1.17	ND-73.2	
DBP	1.0	1.9	41	ND-61	143	10.2-143	15.9	ND-274	[30]
BBP	ND	0.6	1.9	ND-14	ND	NR	5.92	ND-21.3	[19]
DEHA	NR	NR	NR	NR	ND	NR	NR	ND-197	[99]
DEHP	9.8	12.0	536	ND-1073	270	22.8-270	61.6	ND-420	[116]
DnOP	NR	NR	NR	ND-2.8	ND	NR	0.5	ND-5.9	

-NR-No reportado.

-ND-No detectado.

De los 15 tipos de tortilla incluidos en el estudio, seis fueron clasificadas como altamente contaminadas (ftalatos totales > 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en masa seca) y el resto como medianamente contaminadas (ftalatos totales entre 50 y 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ masa seca). Ocho productos contenían DEHA, el plastificante del grupo de adipatos. El análisis multivariante por el método de componentes principales arrojó que la migración del empaque es una importante ruta de contaminación de tortillas con ftalatos. Los tres compuestos (DEHP, DBP y DEP) fueron de mayor abundancia y su migración se vio favorecida por largos tiempos de almacenamiento en bolsas de plástico. El efecto de temperatura no se pudo excluir, pero en un estudio futuro sería necesario estudiar el efecto de temperatura de manera sistemática, controlando condiciones de calentamiento.

Los resultados obtenidos en el análisis de tres harinas de maíz comerciales revelaron la presencia de los mismos tres ftalatos encontrados en tortillas (DEHP, DBP, DEP), pero en concentraciones más bajas. Estos productos contenían ftalatos totales en el intervalo 65.2 - 83.8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en masa seca. Se ha propuesto que los ftalatos en harinas corresponden a la suma de su contenido en grano, la contaminación durante el proceso industrial (lavado, nixtamalización, molienda, secado, tamizado) y posible contaminación durante transporte/almacenamiento en mayoreo.

Las concentraciones de ftalatos totales en tostadas horneadas (63.3 – 107 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en masa seca) fueron similares respecto a las harinas. Estos resultados indican que durante secado/horneado de tortillas, los ftalatos son parcialmente eliminados (temperaturas de ebullición de los siete compuestos van desde 282 °C hasta 385 °C) y además su migración desde el empaque es reducida. En cuanto a DEHA, éste no fue detectado en ninguna de las muestras después de tratamiento térmico debido a su baja temperatura de ebullición (214 °C).

En un trabajo futuro, parece interesante proponer un procedimiento de preconcentración de muestra que permita utilizar GC-FID como una opción económica, sencilla y apta para el análisis rutinario de largas series de muestras.

VII. REFERENCIAS

1. Li, F.M., et al., *Inhibitory effects and oxidative target site of dibutyl phthalate on Karenia brevis*. Chemosphere, 2015. **132**: p. 32-39.
2. Ochoa, K.E.P., *Análisis de screening de ftalatos y sus productos de degradación en aguas*.
3. Serrano, S.E., et al., *Phthalates and diet: a review of the food monitoring and epidemiology data*. Environ Health, 2014. **13**(1): p. 43.
4. Naturales, S.d.M.A.y.R. and I.N.d. Ecología, *Género, ambiente y contaminación por sustancias químicas*. Instituto Nacional de Ecología.
5. Bergh, C., R. Torgrip, and C. Ostman, *Simultaneous selective detection of organophosphate and phthalate esters using gas chromatography with positive ion chemical ionization tandem mass spectrometry and its application to indoor air and dust*. Rapid Commun Mass Spectrom, 2010. **24**(19): p. 2859-67.
6. Pinto, F.M. *PROCESAMIENTO Y PROPIEDADES DE ALGUNAS POLIOLEFINAS*.
7. <http://www.4college.co.uk/a/dp/polymers.php>, *Polymeric chain*.
8. Prevention, D.o.H.a.H.S.C.f.D.C.a., *Fourth National Report on Human Exposure to Environmental Chemicals*. 2009: <http://www.cdc.gov/exposurereport>
9. Heudorf, U., V. Mersch-Sundermann, and J. Angerer, *Phthalates: Toxicology and exposure*. International Journal of Hygiene and Environmental Health, 2007. **210**: p. 623-634.
10. Moretti, G.L. and D. Romano, *Phthalates: Chemical Properties, Impacts on Health, and the Environment*. 2012: Nova Science Publishers.
11. Gimeno, P., et al., *Identification and quantification of 14 phthalates and 5 non-phthalate plasticizers in PVC medical devices by GC-MS*. Journal of Chromatography B, 2014. **949-950**: p. 99-108.
12. Monographs, I., *DI(2-ETHYLHEXYL) PHTHALATE*. **77**.
13. Polo Piñeiro, M., *Desarrollo de nuevos métodos de microextracción en fase sólida para la determinación de contaminantes emergentes en matrices acuosas*. Univ Santiago de Compostela.
14. Serodio, P. and J.M. Nogueira, *Considerations on ultra-trace analysis of phthalates in drinking water*. Water Res, 2006. **40**(13): p. 2572-82.
15. Montague, P., *Hormonas Sexuales de los Peces*. 1997, Environmental Research Foundation.
16. Ma, T., et al., *Phytotoxicity in seven higher plant species exposed to di-n-butyl phthalate or bis (2-ethylhexyl) phthalate*. Frontiers of Environmental Science & Engineering, 2015. **9**(2): p. 259-268.
17. Fernández Bremauntz, A., *Las sustancias tóxicas persistentes en México*. 2004, México, D.F.: Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales, Instituto Nacional de Ecología.
18. Otton, S.V., et al., *Biodegradation of mono-alkyl phthalate esters in natural sediments*. Chemosphere, 2008. **71**(11): p. 2011-6.
19. Guo, Y. and K. Kannan, *Challenges encountered in the analysis of phthalate esters in foodstuffs and other biological matrices*. Anal Bioanal Chem, 2012. **404**(9): p. 2539-54.
20. Fasano, E., et al., *Migration of phthalates, alkylphenols, bisphenol A and di(2-ethylhexyl)adipate from food packaging*. Food Control, 2012. **27**(1): p. 132-138.
21. Communities, E., *Consolidated TEXT produced by the CONSLEG system of the Office*. 1982, European Communities.
22. Serrano, S.E., et al., *Phthalates and diet: a review of the food monitoring and epidemiology data*. Environ Health, 2014. **13**: p. 43-56.
23. Guo, Y., et al., *Occurrence and profiles of phthalates in foodstuffs from China and their implications for human exposure*. J Agric Food Chem, 2012. **60**: p. 6913-6919.
24. Schecter, A., et al., *Phthalate concentrations and dietary exposure from food purchased in New York state*. Environ Health Perspect, 2013. **121**: p. 473-494.
25. Åke Bergman, J.J.H., Susan Jobling, Karen A. Kidd, R. Thomas Zoeller, and Andrea C. Gore, *State of the Science of Endocrine Disrupting Chemicals 2012* World Health Organization, 2012.
26. Newbold, R.R., et al., *Developmental exposure to endocrine disruptors and the obesity epidemic*. Reproductive Toxicology, 2007. **23**(3): p. 290-296.

27. Li, J.-H. and Y.-C. Ko, *Plasticizer incident and its health effects in Taiwan*. The Kaohsiung Journal of Medical Sciences, 2012. **28**(7, Supplement): p. S17-S21.
28. MONOGRAPHS, I., *EVALUATION OF THE CARCINOGENIC RISK OF CHEMICALS TO HUMANS*. 1982. **29**.
29. *Toxics Release Inventory (TRI) Basis of OSHA Carcinogens*. 2015.
30. Xu, D., et al., *Determination of 23 phthalic acid esters in food by liquid chromatography tandem mass spectrometry*. J Chromatogr A, 2014. **1324**: p. 49-56.
31. Axelsson, J., et al., *Prenatal phthalate exposure and reproductive function in young men*. Environmental Research, 2015. **138**(0): p. 264-270.
32. Harris, S., et al., *Comparison of toxicogenomic responses to phthalate ester exposure in an organotypic testis co-culture model and responses observed in vivo*. Reproductive Toxicology, 2015. **58**: p. 149-159.
33. Feige, J.N., et al., *The endocrine disruptor monoethyl-hexyl-phthalate is a selective peroxisome proliferator-activated receptor gamma modulator that promotes adipogenesis*. J Biol Chem, 2007. **282**(26): p. 19152-66.
34. Lourenço, A.C.S., et al., *The plasticizer dibutyl phthalate (DBP) potentiates chemical allergen-induced THP-1 activation*. Toxicology in Vitro, 2015. **29**(8): p. 2001-2008.
35. Fowler, P.A., et al., *Impact of endocrine-disrupting compounds (EDCs) on female reproductive health*. Molecular and Cellular Endocrinology, 2012. **355**(2): p. 231-239.
36. Diamanti-Kandarakis, E., et al., *Endocrine-Disrupting Chemicals*. The Endocrine Society, 2009. **30**(4): p. 293-342.
37. Guo, Z., et al., *Development and application of a method for analysis of phthalates in ham sausages by solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry*. Meat Sci, 2010. **84**(3): p. 484-90.
38. Liu, Y., S. Wang, and L. Wang, *Development of rapid determination of 18 phthalate esters in edible vegetable oils by gas chromatography tandem mass spectrometry*. J Agric Food Chem, 2013. **61**(6): p. 1160-4.
39. 506, E.M., *DETERMINATION OF PHTHALATE AND ADIPATE ESTERS IN DRINKING WATER BY LIQUID-LIQUID EXTRACTION OR LIQUID-SOLID EXTRACTION AND GAS CHROMATOGRAPHY WITH PHOTOIONIZATION DETECTION*. 1995.
40. Li, X., et al., *Determination of phthalates in water samples using polyaniline-based solid-phase microextraction coupled with gas chromatography*. Journal of Chromatography A, 2006. **1135**(1): p. 101-108.
41. EPA, *METHOD 8061A - PHTHALATE ESTERS BY GAS CHROMATOGRAPHY WITH ELECTRON CAPTURE DETECTION (GC/ECD)*. 1996.
42. 8410, E., *GAS CHROMATOGRAPHY/FOURIER TRANSFORM INFRARED (GC/FT-IR) SPECTROMETRY FOR SEMIVOLATILE ORGANICS: CAPILLARY COLUMN*.
43. EPA, *METHOD 8270D - SEMIVOLATILE ORGANIC COMPOUNDS BY GAS CHROMATOGRAPHY/MASS SPECTROMETRY (GC/MS)*. 1998.
44. Imagen modificada y obtenida de <http://slideplayer.com/slide/3426827/>, *Slide #16890 GC Detectors - The Flame Ionization Detector*. Slideplayer.
45. Patnaik, P., *DEAN'S ANALYTICAL CHEMISTRY HANDBOOK*. SECOND EDITION ed.: McGraw-Hill.
46. Fowles, I.A., *Gas Chromatography* Second Edition ed. 1995, University of Greenwich: John Wiley & Sons.
47. http://scicalgas.com/wp-content/uploads/2013/07/electron_capture_diagram.jpg.
48. Kilson, F.G., B.S. Larsen, and C.N. McEwen, *Gas chromatography and mass spectrometry a practical guide*. 1996, United States of America: Academic Press.
49. Skoog, D.A., F.J. Holler, and T.A. Nieman, *Principios de análisis instrumental*. 5ta ed. 1992, Saunders College: McGraw Hill.
50. Grob, R.L., *Modern practice of gas chromatography*. 3ra ed. 1995, Canada: Jhon Wiley & Sons, Inc.
51. Scott, R.P.W., *Chromatography tandem techniques*. 1ra ed. Separation Science Series. 1998: Jhon Wiley & Sons.
52. Fifield, F.W. and D. Kealey, *Principles and practice of analytical chemistry*. 5th ed. 2000: Blackwell Science.
53. <http://encyclopedia2.thefreedictionary.com/Mass+Spectrometers>, *Quadrupole and magnetic sector*.
54. Miller, P.E. and M.B. Denton, *The quadrupole mass filter: Basic operating concepts*. Journal of Chemical Education, 1986. **63**(7): p. 617.
55. Stafford Jr, G., *Ion trap mass spectrometry: a personal perspective*. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2002. **13**(6): p. 589-596.
56. MARCH, R.E. and J.F.J. TODD, *Quadrupole ion trap mass spectrometry*. 2nd ed, ed. J.D. WINEFORDNER. Vol. 165. 205, Hoboken, New Jersey.: Jhon Wiley & Sons, Inc.

57. <http://www.cif.iastate.edu/mass-spec/ms-tutorial>, *Ion trap*.
58. Silverstein, R.M., F.X. Webster, and D.J. Kiemle, *Spectrometric Identification of Organic Compounds*. 7th ed. 2005, USA: Jhon Wiley & Sons, Inc. 502.
59. Hübschmann, H.J., *Handbook of GC-MS: Fundamentals and Applications*. 2015: Wiley.
60. <http://what-when-how.com/proteomics/quadrupole-mass-analyzers-theoretical-and-practical-considerations-proteomics/>, *Triple quadrupole mass spectrometer (TQMS)*.
61. Wang, L., et al., *Cloud point extraction coupled with HPLC-UV for the determination of phthalate esters in environmental water samples*. *Journal of Environmental Sciences*, 2007. **19**(7): p. 874-878.
62. Hayasaka, Y., *Analysis of phthalates in wine using liquid chromatography tandem mass spectrometry combined with a hold-back column: Chromatographic strategy to avoid the influence of pre-existing phthalate contamination in a liquid chromatography system*. *Journal of Chromatography A*, 2014. **1372**(0): p. 120-127.
63. Marega, M., et al., *Phthalate analysis by gas chromatography-mass spectrometry: blank problems related to the syringe needle*. *J Chromatogr A*, 2013. **1273**: p. 105-10.
64. Xu, J., P. Liang, and T. Zhang, *Dynamic liquid-phase microextraction of three phthalate esters from water samples and determination by gas chromatography*. *Anal Chim Acta*, 2007. **597**(1): p. 1-5.
65. Fu, S., et al., *[Magnetic multi-walled carbon nanotubes as a solid phase extraction adsorbent for the determination of 13 phthalate acid esters in water samples by gas chromatography-mass spectrometry]*. *Se Pu*, 2012. **29**(8): p. 737-42.
66. Guo, L. and H.K. Lee, *Vortex-assisted micro-solid-phase extraction followed by low-density solvent based dispersive liquid-liquid microextraction for the fast and efficient determination of phthalate esters in river water samples*. *J Chromatogr A*, 2013. **1300**: p. 24-30.
67. Sannino, A., *Development of a gas chromatographic/mass spectrometric method for determination of phthalates in oily foods*. *J AOAC Int*, 2010. **93**(1): p. 315-22.
68. Sablayrolles, C., et al., *Development and validation of methods for the trace determination of phthalates in sludge and vegetables*. *J Chromatogr A*, 2005. **1072**(2): p. 233-42.
69. Li, S., et al., *Slow-injection ultrasound-assisted emulsi fi cation-microextraction for determination of phthalate esters in water*. *J Chromatogr Sci*, 2014. **52**(9): p. 1127-34.
70. Farajzadeh, M.A. and L. Khoshmaram, *Development of dispersive liquid-liquid microextraction technique using ternary solvents mixture followed by heating for the rapid and sensitive analysis of phthalate esters and di(2-ethylhexyl) adipate*. *J Chromatogr A*, 2015.
71. Farajzadeh, M.A., et al., *Determination of phthalate esters in cow milk samples using dispersive liquid-liquid microextraction coupled with gas chromatography followed by flame ionization and mass spectrometric detection*. *J Sep Sci*, 2012. **35**(5-6): p. 742-9.
72. Gimeno, P., et al., *Identification and quantification of 14 phthalates and 5 non-phthalate plasticizers in PVC medical devices by GC-MS*. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2014. **949-950**: p. 99-108.
73. Rios, J.J., A. Morales, and G. Marquez-Ruiz, *Headspace solid-phase microextraction of oil matrices heated at high temperature and phthalate esters determination by gas chromatography multistage mass spectrometry*. *Talanta*, 2010. **80**(5): p. 2076-82.
74. Holadova, K., et al., *Headspace solid-phase microextraction of phthalic acid esters from vegetable oil employing solvent based matrix modification*. *Anal Chim Acta*, 2007. **582**(1): p. 24-33.
75. Wei Jia, et al., *Analysis of phthalates in milk and milk products by liquid chromatography coupled to quadrupole Orbitrap high-resolution mass spectrometry*. *Journal of Chromatography A*, 2014. **1362**: p. 110–118.
76. EPA, *METHOD 525.2 - DETERMINATION OF ORGANIC COMPOUNDS IN DRINKING WATER BY LIQUID-SOLID EXTRACTION AND CAPILLARY COLUMN GAS CHROMATOGRAPHY/MASS SPECTROMETRY*.
77. EPA, *METHOD 8270D-SEMIVOLATILE ORGANIC COMPOUNDS BY GAS CHROMATOGRAPHY/MASS SPECTROMETRY (GC/MS)*. 2007.
78. HUBINGER, J.C. and D.C. HAVERY, *Analysis of consumer cosmetic products for phthalate esters*. *JOURNAL OF COSMETIC SCIENCE*, 2006. **57**: p. 127-137.
79. HUBINGER, J.C., *A survey of phthalate esters in consumer cosmetic products*. *JOURNAL OF COSMETIC SCIENCE*, 2010. **61**: p. 457-465.
80. Koniecki, D., et al., *Phthalates in cosmetic and personal care products: Concentrations and possible dermal exposure*. *Environmental Research*, 2011. **111**: p. 329-336.

81. COMMISSION, C.P.S., *CPSC-CH-C1001-09.3 - Standard Operating Procedure for Determination of Phthalates*. 2010.
82. Yang, J., et al., *Recent advances in analysis of phthalate esters in foods*. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2015. **72**: p. 10-26.
83. Guo, Y. and K. Kannan, *Challenges encountered in the analysis of phthalate esters in foodstuffs and other biological matrices*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2012. **404**: p. 2539-2554.
84. Dunming Xu, et al., *Determination of 23 phthalic acid esters in food by liquid chromatography tandem mass spectrometry*. *Journal of Chromatography A*, 2014. **1324**: p. 49-56.
85. Technologies, A., *PROVEN APPROACHES FOR TODAY'S FOOD ANALYSIS CHALLENGES*, in *Agilent Bond Elut QuEChERS Food Safety*.
86. EPA *Phthalates - Action Plan*. 2012.
87. Industry, G.f., *Limiting the Use of Certain Phthalates as Excipients in CDER-Regulated Products*, U.S.D.o.H.a.H. Services, F.a.D. Administration, and C.f.D.E.a.R. (CDER), Editors. 2012, Division of Drug Information, WO51, Room 2201 Center for Drug Evaluation and Research Food and Drug Administration: USA.
88. Schierow, L.-J. and M.M. Lee, *Phthalates in plastics and possible Human Health Effects*. 2008, Congressional Research Service.
89. Moreira, M.A., L.C. Andre, and Z.L. Cardeal, *Analysis of phthalate migration to food simulants in plastic containers during microwave operations*. *Int J Environ Res Public Health*, 2014. **11**(1): p. 507-26.
90. Linda-Jo Schierow, R., Science, and Industry Division; Margaret Mikyung Lee, American Law and Division, *Phthalates in Plastics and Possible Human Health Effect*, in *RL34572*. 2008.
91. COUNCIL, D.E.O.T.E.P.A.O.T., *Amending for the 22nd time Council Directive 76/769/EEC on the approximation of the laws, regulations and administrative provisions of the Member States relating to restrictions on the marketing and use of certain dangerous substances and preparations (phthalates in toys and childcare articles)*. 2005.
92. Barp, L., et al., *Determination of phthalate esters in vegetable oils using direct immersion solid-phase microextraction and fast gas chromatography coupled with triple quadrupole mass spectrometry*. *Analytica Chimica Acta*, 2015. **887**: p. 237-244.
93. Cao, X.-L., *Phthalate Esters in Foods: Sources, Occurrence, and Analytical Methods*. *COMPREHENSIVE REVIEWS IN FOOD SCIENCE AND FOOD SAFETY*, 2010. **9**.
94. Cariou, R., et al., *Measurement of phthalates diesters in food using gas chromatography–tandem mass spectrometry*. *Food Chemistry*, 2016. **196**: p. 211-219.
95. Italmex. *Aditivos Para Alimentos Italmex, S. A. de C.* <http://www.aditivositalmex.mx/termico.html>.
96. <http://www.tortilladoras.com.mx/producto/papel-para-tortilla/>, *Tortilla empapelada*.
97. <https://www.tortillasnagual.com/categoria-producto/tortillas/>, *Tortila plastificada*.
98. González-Castro, M.I., et al., *Phthalates and Bisphenols Migration in Mexican Food Cans and Plastic Food Containers*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 2011. **86**(6): p. 627-631.
99. Moreira, M.A., L.C. Andr^o, and Z.L. Cardeal, *Analysis of Phthalate Migration to Food Simulants in Plastic Containers during Microwave Operations*. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2014.
100. EPA, *8000D-DETERMINATIVE CHROMATOGRAPHIC SEPARATIONS*.
101. Metrología, C.N.d. and Eurachem, *MÉTODOS ANALÍTICOS ADECUADOS A SU PROPÓSITO. Guía de Laboratorio para la Validación de Métodos y Temas Relacionados*. 2005, CENAM.
102. Services, U.S.D.o.H.a.H., et al., *Guidance for Industry - Bioanalytical Method Validation*. 2001.
103. Ibarra, A.A.G., *“EMPLEO DE TÉCNICAS DE ESPECTROMETRÍA DE MASAS PARA EL ESTUDIO METABOLÓMICO DE DIVERSOS ORGANISMOS BAJO ESTRÉS AMBIENTAL.”*, in *Departamento de Química*. 2015, Universidad de Guanajuato: Guanajuato.
104. Krueve, A., et al., *Tutorial review on validation of liquid chromatography–mass spectrometry methods: Part I*. *Analytica Chimica Acta*, 2015. **870**: p. 29-44.
105. GUIDELINE, I.H.T., *VALIDATION OF ANALYTICAL PROCEDURES: TEXT AND METHODOLOGY Q2(R1)* 2005.
106. *ICH Harmonized Tripartite Guideline. Validation of analytical procedures: text and methodology (Q2/R1)*. http://www.ish.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf. 2012 ICH.

107. Sun, J., et al., *Development of an air-flow-assisted extractive electrospray ionization source for rapid analysis of phthalic acid esters in spirits*. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2015. **29**(19): p. 1711-1716.
108. Huber, L., *Validation of Analytical Methods*, in *Agilent Technologies*.
109. Krueve, A., et al., *Tutorial review on validation of liquid chromatography–mass spectrometry methods: Part II*. *Analytica Chimica Acta*, 2015. **870**: p. 8-28.
110. Wenzl, T., *Methods for the determination of phthalates in food*, in *Outcome of a survey conducted among European food control laboratories*. 2009, EUROPEAN COMMISSION Joint Research Centre Institute for Reference Materials and Measurements: Belgium.
111. Hidráulicos., S.d.A.y.R., et al., *NMX-F-083-1986. ALIMENTOS. DETERMINACIÓN DE HUMEDAD EN PRODUCTOS ALIMENTICIOS. FOODS. MOISTURE IN FOOD PRODUCTS DETERMINATION. NORMAS MEXICANAS. DIRECCIÓN GENERAL DE NORMAS*. 1986.
112. Economista, E., *Los títulos de Gruma se aprecian 57.17% en el año*, in *El Economista*. 2014, June 30: México.
113. Huegel, D.J.C., I.O.A. Aguilar, and I.M.1.J.e. Guti'erez, *La Reconversi'ón de la M'quina Tortilladora: Hacia la Producci'ón Sostenible de la Tortilla Mexicana*. Instituto Global para la Sostenibilidad, 2012.
114. Cavaliere, B., et al., *Tandem mass spectrometry in food safety assessment: The determination of phthalates in olive oil*. *Journal of Chromatography A*, 2008. **1205**: p. 137-143.
115. Makkliang, F., et al., *Development of magnetic micro-solid phase extraction for analysis of phthalate esters in packaged food*. *Food Chemistry*, 2015. **166**(0): p. 275-282.
116. Gallart-Ayala, H., O. Núñez, and P. Lucci, *Recent advances in LC-MS analysis of food-packaging contaminants*. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2013. **42**: p. 99-124.

