



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“ METODOLOGÍA ANALÍTICA PARA LA
DETERMINACIÓN DE PLAGUICIDAS
ORGANOFOSFORADOS EN AJOLOTE
Ambystoma mexicanum ”**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO - BIÓLOGO
P R E S E N T A :
JESÚS HERNÁNDEZ SOTO



MÉXICO, D.F.

2009



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: PEDRO VILLANUEVA GONZÁLEZ

VOCAL: ERNESTINA CERVERA FLORES

SECRETARIO: CLAUDIA A. PONCE DE LEÓN HILL

1er. SUPLENTE: FRANCISCO ROJO CALLEJAS

2º SUPLENTE: ELBA ROJAS ESCUDERO

LUGAR DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**UNIDAD DE ANÁLISIS AMBIENTAL (UNAAMB)
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM
CIUDAD UNIVERSITARIA**

DRA. CLAUDIA PONCE DE LEÓN HILL
ASESORA DEL TEMA

JESÚS HERNÁNDEZ SOTO
SUSTENTANTE

*La vida no te está esperando en ninguna parte, te está sucediendo.
No se encuentra en el futuro como una meta que has de alcanzar,
está aquí y ahora, en este mismo momento, en tu respirar, en la circulación
de tu sangre, en el latir de tu corazón.
Cualquier cosa que seas, es tu vida
y si te pones a buscar significados en otra parte, te la perderás.*

Rajneesh Chandra Mohan (OSHO)

AGRADECIMIENTOS

Resulta curioso comprobar que ni siquiera el lejano horizonte es tan inalcanzable como parece y que, algún día, con perseverancia, paciencia y ánimo, se consigue llegar a toda meta que uno se proponga. Esta Tesis ha sido el caso. Pero el camino recorrido no se podría haber hecho sin aquellos a los que uno aprecia, admira y quiere. Por eso, estas páginas que hoy escribo, en el laboratorio en que he trabajado estos meses, son para expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas que, de una forma u otra, han hecho posible que este trabajo haya llegado a su fin.

Quisiera agradecer, en primer lugar, - aunque suene a tópico y no lo sea – a mis padres, personas maravillosas, emprendedoras, cariñosas, inteligentes, luchadoras, decididas, comprensivas y tenaces; siempre haciendo lo posible por mostrarme todas las opciones. Gracias por su apoyo incondicional y darme la oportunidad de tomar mis decisiones y, sobre todo, por creer en algo que en muchos momentos resulta difícil de creer.

A mi madre Luz María Soto le agradezco principalmente haberme enseñado su deseo incontrolable por conocer nuevas cosas. Gracias por ser mi madre, guía y apoyo incondicional en esto que llamamos vida.

A mi padre Jesús Hernández le agradezco su forma de vivir cordial y alegre. Te doy gracias por la comprensión, apoyo, sacrificio y las enseñanzas dadas.

Por dejarme compartir todo esto con ustedes estoy infinitamente agradecido, les comparto y dedico este logro, uno de mis sueños, los admiro y quiero mucho.

A mis hermanos: Ricardo y Oscar, compañeros de vida; son mis cómplices y apoyo, agradezco haber compartido mi vida y momentos especiales con ustedes durante estos años, los quiero mucho.

A Bety, porque siempre estas al tanto de lo que sucede, eres una persona grandiosa...agradezco haberte conocido.

A mi sobrina Yuri, gracias por tus risas y cariño, te quiero mucho.

A mi abuelita Leo por su persistente guía, gracias por haber estado siempre conmigo.

A la Dra. Claudia Ponce de León por su apoyo, paciencia y asesoría en este proyecto, por creer en mi potencial dirigiendo esta tesis, por el tiempo dedicado al aprendizaje y enseñanza, es un placer trabajar contigo; su amistad y vasto conocimiento están mezclados entre las líneas aquí escritas, jamás podré llegarle a agradecerle lo suficiente.

A mi muy querido jurado, la profesora Ernestina Cervera y el profesor Pedro Villanueva. Gracias por su tiempo y sus atinados comentarios que permitieron llegar a ser a esta tesis lo que es.

Al M en C. Manuel Hernández, el haberme aceptado en su laboratorio como si hubiera formado parte de él desde el principio y por toda la ayuda prestada.

A la Dra. Cecilia Vanegas por el planteamiento de realizar este proyecto. Gracias por el apoyo y la confianza.

A la Dra. Cecilia Robles por tu ayuda y por enseñarme a entender el mundo de los ajolotes.

A todos mis compañeros de la Unidad de Análisis Ambiental: Horacio, David, Fabi “Lechuga”, Fabi “Ajolote” y Diana; por todos los momentos compartidos en esta andadura en el laboratorio, en los cafés, en los pasillos y fuera de la Facultad. En especial agradezco al M en C. Víctor Alcántara por su apoyo constante, por los buenos consejos y por toda su ayuda. Gracias por permitirme conocerlos y compartir con ustedes esta etapa en mi vida.

A Araceli C., Rocío, Araceli P., por su amistad incondicional que las ha hecho partícipes de todos los éxitos y de todas las derrotas de estos 5 años; porque esta aventura, la comenzamos juntos. Gracias por estar siempre ahí dándolo todo y hacerme participe de sus “día a día”, las quiero mucho.

A la Dra. Perla Castañeda, una de las principales “culpables” de que yo haya estudiado química, agradezco su amistad y apoyo incondicional. A Lupita, que ha aguantado con paciencia la avalancha de “peticiones”, no cabe duda que me han dado oportunidades únicas en mi formación académica; gracias por su sincera amistad y por todo el apoyo tan inesperado pero tan grato que me brindaron durante este tiempo.

A todos los miembros de la Sociedad Estudiantil de Químicos Farmacéuticos Biólogos (Viri, Angel, Emiliano, Yudibeth), gracias por compartir conmigo esta nueva etapa en mi vida profesional, agradezco su apoyo en la realización de esta meta.

A todos los amigos y compañeros que surgieron durante estos años, por su apoyo, pláticas, compañía y por hacer de la Facultad de Química un lugar para disfrutar de incontables momentos agradables y divertidos. Por contagiarme y enseñarme cada uno de ustedes algo que los caracteriza.

A PAPITT agradezco de manera especial el apoyo económico proporcionado para la realización de esta tesis.

Y por supuesto a la máxima casa de estudios, la Universidad Nacional Autónoma de México mi Alma Mater, por haberme proporcionado mis estudios dentro de la Facultad de Química dándome la oportunidad de alcanzar esta meta, por llenarme de conocimientos y darme la opción de elegir diversas actividades...muchas gracias.

¡México, Pumas, Universidad!

Jesús Hernández Soto, Junio 2009

ÍNDICE

ABREVIATURAS

CAPITULO I.- INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS 1

CAPITULO II.- MARCO TEÓRICO..... 5

II.1.- Plaguicidas 6

 II.1.1.- Génesis histórica 7

 II.1.2.- Clasificación de los plaguicidas 8

 II.1.3.- Contaminación por plaguicidas 10

 II.1.4.- Legislación global en materia de plaguicidas 13

 II.1.5.- La situación en México 15

II.2.- Metodología analítica para la determinación de plaguicidas en muestras ambientales 18

 II.2.1.- Preparación de la muestra para la determinación de analitos orgánicos 19

 II.2.2.- Muestreo 20

 II.2.3.- Almacenamiento 20

 II.2.4.- Extracción 21

 II.2.5.- Purificación de la muestra (clean-up) 21

 II.2.6.- Determinación instrumental 21

II.3.- Tipos de muestras 22

 II.3.1.- Agua 22

 II.3.2.- Organismos 22

II.4.- Métodos de extracción para muestras líquidas 23

 II.4.1.- Extracción líquido-líquido (LLE) 23

 II.4.2.- Extracción en fase sólida (SPE) 23

 II.4.2.1.- Extracción e fase sólida con adsorbentes poliméricos 27

 II.4.2.1.1.- Absorción vs adsorción 28

 II.4.2.1.2.- Factores experimentales importantes en SPE con adsorbentes poliméricos 30

II.5.- Métodos de extracción para muestras sólidas 32

 II.5.1.- Extracción líquido-sólido 32

 II.5.1.1.- Agitación 32

 II.5.1.2.- Soxhlet 32

 II.5.2.- Extracción asistida por microondas (MAE) 33

 II.5.2.1.- Calentamiento por microondas 33

 II.5.2.2.- Elección del disolvente 35

 II.5.2.3.- Volumen de disolvente 36

 II.5.2.4.- Temperatura y tiempo de extracción 36

 II.5.2.5.- Influencia de otros parámetros en el proceso de extracción 37

 II.5.2.6.- Equipos comerciales 37

II.6.- Limpieza de extractos 39

 II.6.1.- Extracción líquido-líquido 39

 II.6.2.- Extracción en fase sólida 39

 II.6.3.- Cromatografía de permeación en gel 40

II.7.- Cromatografía de gases	43
II.7.1.- Componentes de un cromatógrafo de gases	43
II.8.- Validación del método analítico	45
II.8.1.- Definiciones	46
II.9.- Historia del agua superficial y subterránea de Xochimilco	48
II.9.1.- Ajolote (<i>Ambystoma mexicanum</i>)	49
II.9.1.- Impacto Social y Ambiental	51
CAPITULO III.- MATERIAL Y MÉTODOS	52
III.1.- Área de estudio	53
III.1.1.- Ubicación	53
III.1.2.- Hidrografía	53
III.1.3.- Elección de canales y toma de muestras	54
III.2.- Reactivos	55
III.3.- Material	56
III.4.- Equipos e instrumentos	57
III.5.- Métodos	59
III.5.1.- Limpieza de material de vidrio	59
III.5.2.- Preparación de soluciones	59
III.5.3.- Purificación de los reactivos	60
III.5.3.1.- Sulfato de sodio	60
III.5.3.2.- Florisil	60
III.5.3.3.- Tenax	60
III.5.4.- Preparación de muestras adicionadas	60
III.5.5.- Extracción líquido-líquido (LLE)	61
III.5.6.- Extracción asistida por microondas (MAE)	61
III.5.6.1.- Limpieza de extractos o clean-up	61
III.5.7.- Condiciones cromatográficas (GC-NPD)	62
III.5.8.- Procedimiento Tenax-HS-GC-NPD	62
III.5.8.1.- Extracción en fase sólida con Tenax para muestras acuosas	62
III.5.8.2.- Extracción en fase sólida con Tenax para muestras de tejido	62
III.5.8.3.- Desorción térmica (análisis por headspace)	63
III.5.8.4.- Condiciones cromatográficas (HS-GC-NPD)	63
CAPITULO IV.- RESULTADOS Y ANÁLISIS	64
IV.1.- Ensayos previos y optimización del método cromatográfico	65
IV.1.1.- Condiciones cromatográficas. Optimización del método	65
IV.1.2.- Caudal de gases	66

IV.1.3.- Columna cromatográfica	67
IV.1.4.- Programa de temperatura	67
IV.1.5.- Elección del estándar interno	68
IV.1.6.- Volumen de inyección	68
IV.1.7.- Condiciones óptimas	69
IV.1.8.- Parámetros analíticos	69
IV.1.9.- Métodos de cuantificación	70
IV.1.10.- Rectas de calibración	70
IV.1.11.- Cálculo de los rendimientos de extracción	71
IV.2.- Análisis de plaguicidas organofosforados en agua de la zona lacustre de Xochimilco: extracción líquido-líquido	72
IV.2.1.- Antecedentes	72
IV.2.2.- Optimización de las variables	72
IV.2.3.- Análisis multiresidual en agua de Xochimilco	74
IV.2.4.- Validación del método analítico	75
IV.3.- Desarrollo del método de análisis de plaguicidas organofosforados en agua de Xochimilco mediante extracción en fase sólida con Tenax-TA y desorción térmica por Headspace (espacio de cabeza) y cromatografía de gases	78
IV.3.1.- Antecedentes	78
IV.3.2.- Optimización del método	79
IV.3.2.1.- Selección del adsorbente	79
IV.3.2.2.- Condiciones de desorción y análisis	80
IV.3.2.3.- Determinación de la eficacia de desorción	82
IV.3.2.4.- Optimización de la etapa de adsorción	82
IV.3.3.- Validación del método	83
IV.3.3.1.- Linealidad	83
IV.3.3.2.- Ensayos de recuperación	84
IV.3.3.3.- Repetibilidad y reproducibilidad	85
IV.3.3.4.- Límite de detección y cuantificación	85
IV.4.- Estudio comparativo de los dos métodos de extracción empleados para muestras acuosas (LLE y Tenax-HS)	86
IV.5.- Determinación de plaguicidas organofosforados en ajolote (<i>Ambystoma mexicanum</i>) combinando extracción asistida por microondas (MAE) con cromatografía de gases	88
IV.5.1.- Antecedentes	88
IV.5.2.- Optimización del método de extracción	88
IV.5.2.1.- Estabilidad de los plaguicidas organofosforados	88
IV.5.2.2.- Parámetros de extracción por microondas	89
IV.5.2.3.- Desarrollo del método de limpieza (clean.up)	89

IV.5.3.- Validación del método MAE-GC	94
IV.5.3.1.- Linealidad	94
IV.5.3.2.- Recuperación	95
IV.5.3.3.- Repetibilidad y reproducibilidad	96
IV.5.3.4.- Límite de detección y cuantificación	97
IV.5.3.5.- Aplicación del método	97
IV.6.- Desarrollo del método de análisis de plaguicidas organofosforados tejido de ajolote mediante extracción en fase sólida con Tenax-TA y desorción térmica por Headspace (espacio de cabeza) y cromatografía de gases	100
IV.6.1.- Antecedentes	100
IV.6.2.- Optimización del método	100
IV.6.3.- Validación del método	102
IV.6.3.1.- Linealidad	102
IV.6.3.2.- Ensayos de recuperación	102
IV.6.3.3.- Repetibilidad y reproducibilidad	102
IV.6.3.4.- Límite de detección y cuantificación	103
IV.7.- Estudio comparativo de los dos métodos de extracción empleados para muestras de tejido de ajolote (MAE y Tenax-HS)	104
CAPITULO V.- CONCLUSIONES	106
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	108

INDICE DE TABLAS

Tabla II.1.- Clasificación de los plaguicidas en función de su campo de acción (EPA) 9

Tabla II.2.- Clasificación recomendada por la OMS toxicidad (The WHO *recommended classification of pesticides by hazard*, 2004) 10

Tabla II .3.-Movilización y distribución de compuestos orgánicos en el medio ambiente, con particular referencia a los plaguicidas [Marathon Agricultural and Enviromental Consulting, 1992] 12

Tabla II.4.- Productos químicos sujetos al procedimiento de Consentimiento Fundamentado Previo 15

Tabla II.5.- Plaguicidas incluidos en la propuesta del RETC en México, [PIC, 1998] 16

Tabla II.6.- Plaguicidas agrícolas restringidos en México [Catálogo Oficial de Plaguicidas, 1996.] 17

Tabla II.7.- Plaguicidas prohibidos en otros países y autorizados en México [RAPAM, 1994] 17

Tabla II.8.- Fases estacionarias ligadas a la sílice utilizadas en SPE [Fritz, 1999] 26

Tabla II.9.- Sorbentes poliméricos empleados en SPE 30

Tabla II.10.- Constante dieléctrica (ϵ') y temperatura de ebullición de los principales disolventes usados en MAE 34

Tabla IV.1.- Porcentajes de recuperación promedio (n=3), RSD del procedimiento LLE-GC-NPD aplicado a agua desionizada y en agua de Xochimilco..... 75

Tabla IV.2.- Datos de calibración y límites de detección y cuantificación del método LLE-GC-NPD 76

Tabla IV.3.- Datos de los estudios de repetibilidad y reproducibilidad del método de separación de los tres plaguicidas por LLE-GC-NPD 76

Tabla IV.4.- Concentración ($\mu\text{g L}^{-1}$) de plaguicidas en muestras de Xochimilco 77

Tabla IV.5.- Propiedades físicas y químicas del Tenax-TA 79

Tabla IV.6.- Porcentajes de recuperación promedio (n=3) \pm RSD (%) de muestras de agua enriquecidas con clorpirifos a dos niveles de concentración después de la extracción con Tenax y desorción térmica con HS 84

Tabla IV.7.- Datos de los estudios de repetibilidad y reproducibilidad del método de extracción con Tenax y desorción térmica con HS-GC-NPD 85

Tabla IV.8.- Datos de calibración y límites de detección y cuantificación del método HS-GC-NPD aplicado en muestras acuosas 85

Tabla IV.9.- Porcentajes de recuperación promedio (RSD) de las dos técnicas estudiadas (LLE y HS) 86

Tabla IV.10.- Ventajas e inconvenientes de los dos métodos estudiados para muestras acuosas: LLE y Tenax-HS 87

Tabla IV.11.- Porcentajes de recuperación promedio (n=3), RSD de una solución stock de 200 µg/L de plaguicidas irradiados a 1200W durante 15 min	89
Tabla IV.12.- Porcentajes de recuperación promedio (n=3) ± RSD (%) de muestras de tejido enriquecidas con plaguicidas organofosforados después de varios tratamientos de limpieza	91
Tabla IV.13.- Porcentajes de recuperación promedio (n=3) ± RSD (%) de muestras de tejido enriquecidas con plaguicidas organofosforados a tres niveles de concentración después de la extracción por microondas	96
Tabla IV.14.- Datos de los estudios de repetibilidad y reproducibilidad del método de separación de los tres plaguicidas por MAE-GC-NPD	96
Tabla IV.15.- Datos de calibración y límites de detección y cuantificación del método MAE-GC-NPD.	97
Tabla IV.16.- Concentración (µg Kg ⁻¹) de plaguicidas en muestras de tejido de ajolote	97
Tabla IV.17.- Porcentajes de recuperación promedio (n=3) ± RSD (%) de muestras de tejido enriquecidas con clorpirifos a dos niveles de concentración después de la extracción con Tenax y desorción térmica con HS	102
Tabla IV.18.- Datos de los estudios de repetibilidad y reproducibilidad del método de extracción con Tenax y desorción térmica con HS-GC-NPD	102
Tabla IV.19.- Porcentajes de recuperación promedio (RSD) de las técnicas MAE y Tenax-HS estudiadas	97
Tabla IV.20.- Ventajas e inconvenientes de los dos métodos para muestras de tejido: MAE y Tenax-HS	98

INDICE DE FIGURAS

Figura II.1. Posibles mecanismos de transporte y transformación de plaguicidas en el 11

Figura II.2.- Etapas de la extracción en fase sólida 27

Figura II.3.- Esquema representativo de los mecanismos de: a) adsorción sobre un material con poros grandes, b) adsorción sobre un material con poros pequeños y ramificados, y c) absorción 29

Figura II.4.- Esquema de un extractor Soxhlet 32

Figura II.5.- Principio del sistema de extracción asistida por microondas 33

Figura II.6.- Reactores empleados en MAE. (A, en hornos microondas convencionales; B, en hornos de laboratorio) 38

Figura II.7.- Esquema del proceso de separación empleando GPC 41

Figura II.8.- Esquema de un cromatógrafo de gases 45

Figura II.9.- Fotografías de un ajolote *Ambystoma mexicanum* 49

Figura III.1.- Cromatógrafo de gases Hewlett Packard modelo 6890, equipado con inyector automático, detector de nitrógeno-fosforo (NPD) 58

Figura III.2.- Equipo Headspace Sampler Agilent modelo 7694E, con automuestreador para 12 viales, equipado con una línea de transferencia para acoplamiento a sistema cromatográfico 58

Figura IV.1.- Programa de temperatura del horno del cromatógrafo, utilizado en la separación de los plaguicidas organofosforados mediante GC-NPD 68

Figura IV.2.- Cromatograma GC-NPD correspondientes a una muestra de agua desionizada fortificada a 120 µg/L después de la extracción LLE: (a) diazinon, (b) metil-paratión, (c) clorpirifos y (d) trifenil fosfato (estándar interno) 73

Figura IV.3.- Cromatograma GC-NPD correspondientes a una muestra de agua de Xochimilco fortificada a 120 µg/L después de la extracción LLE: (a) diazinon, (b) metil-paratión, (c) clorpirifos y (d) trifenil fosfato (estándar interno) 74

Figura IV.4.- Graficas de linealidad del método: a) metil-paratión, b) clorpirifos y c) diazinon 75

Figura IV.5.- Diagrama de los experimentos llevados a cabo para la optimización y validación del método de análisis mediante extracción en fase sólida con Tenax-TA y desorción térmica por Headspace (Espacio de cabeza) y Cromatografía de gases 79

Figura IV.6.- Diagrama de la extracción en fase sólida con Tenax-TA y desorción térmica por Headspace (Espacio de cabeza) y Cromatografía de gases 80

Figura IV.7.- Programa de temperatura del horno del cromatógrafo, utilizado en la separación de clorpirifos mediante HS-GC-NPD 81

Figura IV.8.- Efecto del tiempo de extracción en los valores de recuperación de clorpirifos en muestras acuosas. Las muestras son 500 mL de agua de Xochimilco enriquecidos con 200 ng de clorpirifos (concentración de la muestra 400 ngL ⁻¹). Los resultados de recuperación fueron por triplicado.	83
Figura IV.9.- Curva de calibración para clorpirifos mediante desorción térmica con Headspace y cromatografía de gases	84
Figura IV.10.- Cromatogramas GC-NPD correspondientes a una muestra de tejido de ajolote fortificado a 100 µg/Kg después de la extracción MAE y limpieza del extracto utilizando A) Florisil y B) Silica +Florisil: (a) etoprofos, (b) diazinon, (c) metil-paratión, (d) malatión, (e) clorpirifos y (f) trifetil fosfato (estándar interno)	90
Figura IV.11.- Efecto de la duración de elución en los valores de recuperación de los cinco plaguicidas estudiados. Las muestras son 1 gramo de tejido de ajolote enriquecidos con los analitos a una concentración de 100 µgKg ⁻¹ . Los resultados de recuperación fueron por triplicado	92
Figura IV.12.- Efecto del volumen de elución en los valores de recuperación de los cinco plaguicidas estudiados. Las muestras son 1 gramo de tejido de ajolote enriquecidos con los analitos a una concentración de 100 µgKg ⁻¹ . Los resultados de recuperación fueron por triplicado	92
Figura IV.13.- Esquema del procedimiento desarrollado para la limpieza de extractos de tejido de ajolote previa su determinación por cromatografía de gases (GC)	93
Figura IV.14.- Graficas de linealidad del método: a) etoprofos, b) diazinon, c) metil-paratión, d) malatión, e) clorpirifos	94
Figura IV.15.- Cromatograma GC-NPD correspondiente a una muestra de tejido de ajolote fortificado a 100 µg/Kg después de la extracción MAE y limpieza del extracto utilizando un cartucho SPE de C ₁₈ +Florisil: (a) etoprofos, (b) diazinon, (c) metil-paratión, (d) malatión, (e) clorpirifos y (f) trifetil fosfato (b) (estándar interno)	95
Figura IV.16.- Cromatogramas GC-NPD correspondientes a una muestra de tejido de ajolote expuesto a clorpirifos a una concentración de a) 10 mg/L después de la extracción MAE y limpieza del extracto utilizando un cartucho SPE de C ₁₈ +Florisil y b) 10 mg/L después de la extracción MAE y limpieza del extracto utilizando un cartucho SPE de C ₁₈ +Florisil (dilución 1:20)	98
Figura IV.17.- Efecto del tiempo de extracción en los valores de recuperación de clorpirifos en muestras de tejido. Las muestras son 1,0 gramo de tejido enriquecidos con 200 ng de clorpirifos (concentración de la muestra 200 ng/g). Los resultados de recuperación fueron por triplicado	101
Figura IV.18.- Cromatograma HS-GC-NPD correspondiente a una muestra de tejido de ajolote adicionado con 200 ng de clorpirifos después de la extracción con Tenax y desorción térmica con HS	103

ABREVIATURAS

DCM	Diclorometano
DL50	Dosis letal para matar al 50% de los organismos
DVB	Divynnilbenzene (Divinilbenceno)
EPA	Enviromental protection agency (Agencia de protección mediomambiental de los Estados Unidos)
FAO	Food and agricultural organization
GC	Gas chromatography (Cromatografía de gases)
HPLC	High performance liquid chromatography (Cromatografía líquida de alta eficiencia)
HS	Headspace (Espacio de cabeza)
LLE	Liquid-liquid extraction (Extracción líquido-líquido)
LOD	Limit of detection (Límite de detección)
LOQ	Limit of quantification (Límite de cuantificación)
MAE	Microwave-assisted extraction (Extracción asistida por microondas)
MS	Mass spectrometry (Espectrometría de masas)
NPD	Nitrogen-phosphorus detector (Detector Nitrógeno-fósforo)
PA	Poliacrilato
PDMS	Polidimetilsiloxano
PMS	Polimetilsiloxano
PS	Poliestireno
RSD	Relative standard deviation (Desviación estándar relativa)
SPE	Solid phase extraction (Extracción en fase sólida)
SPME	Solid phase micro extraction (Micro extracción en fase sólida)
WHO (OMS)	World health organization (Organización mundial de la salud)

CAPITULO I

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

“Un experto, es aquél que ya ha cometido todos los errores posibles en una materia muy concreta”

Niels Henrik David Bohr, físico danés (1885-1962)

I.I.- INTRODUCCIÓN

Los plaguicidas organofosforados son la subclase de plaguicidas más ampliamente utilizados en las prácticas agrícolas actuales. Estos compuestos son extensamente utilizados en usos agrícolas, industriales e inclusive en uso doméstico. Debido a su menor toxicidad, han reemplazado gradualmente a los plaguicidas organoclorados en los últimos años, debido a su relativa menor persistencia en el ambiente.

El desarrollo de métodos analíticos avanzados para la detección y cuantificación de plaguicidas organofosforados en muestras ambientales e inclusive en tejidos y fluidos humanos, es quizá uno de los principales objetivos en el análisis ambiental actual.

El análisis de plaguicidas organofosforados en muestras reales, es realizado usualmente con técnicas cromatográficas, tal como HPLC y cromatografía de gases (GC) acoplados a varios detectores selectivos como el de captura de electrones (ECD), nitrógeno-fosforo (NPD) y espectrometría de masas (MS).

Las operaciones previas a la introducción de la muestra en el sistema cromatográfico constituyen un aspecto muy importante y de gran trascendencia. Las dificultades en este tipo de preparaciones y los errores que pueden originarse en esta etapa previa pueden ser más determinantes que los que derivan del proceso cromatográfico propiamente dicho.

La técnica instrumental empleada en la realización de este trabajo, es la Cromatografía de gases, donde la muestra inyectada debe ser representativa de la muestra total, evitándose su deterioro (volatilización, la descomposición química o térmica, la acción microbiológica, etc.) desde su adquisición, hasta la introducción en el sistema cromatográfico.

La preparación de la muestra para GC comprende una serie de operaciones, cuya función principal es adecuar y conservar la porción de muestra tomada para su introducción en la unidad de inyección del cromatógrafo de gases. Las muestras ambientales tales como las muestras de tejido son muestras

complejas, y esto junto con que los requerimientos exigidos son cada vez más elevados, supone un reto importante para la Química Analítica. En general, son escasas las muestras que pueden introducirse directamente en el cromatógrafo, por lo que es preciso, casi siempre, alguna operación previa, como ha sido nuestro caso.

Con la finalidad de evitar dificultades derivadas de la complejidad de la matriz las operaciones realizadas son, en general, procesos físico-químicos en los que se emplean dos fases, para llevar a cabo una separación, con o sin pre-concentración. Los métodos que se van a utilizar en este trabajo, y que se verán con más detalle en los capítulos correspondientes son: extracción líquido-líquido (LLE), extracción asistida por microondas (MAE) y extracción en fase sólida (SPE) con Tenax-TA y posterior desorción térmica con Headspace (HS).

I.2.- OBJETIVOS

Esta Tesis se enmarca dentro del proyecto denominado **“Efecto del Clorpirifos sobre la conducta alimentaria y de antidepredación del ajolote *Ambystoma mexicanum*”** adscrito a la Unidad de Análisis Ambiental en la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México. Dicha línea de investigación está relacionada con la determinación de efectos toxicológicos del clorpirifos en ajolote *Ambystoma mexicanum*. El objetivo principal que se ha planteado a la hora de desarrollar la presente Tesis es establecer metodologías analíticas rápidas y no contaminantes, que permitan la determinación de plaguicidas en matrices de interés medioambiental y poder relacionar estos contenidos con la conducta del *Ambystoma mexicanum*.

Además de este objetivo principal, se pueden destacar otros específicos:

- Buscar bibliografía relacionada con el tema.
- Desarrollar métodos para la determinación de plaguicidas empleando cromatografía de gases con un detector nitrógeno-fosforo.
- Estudiar diferentes procedimientos de extracción y su optimización: extracción líquido-líquido, extracción asistida por microondas y extracción en fase sólida con Tenax y desorción térmica con Headspace.
- Validar las metodologías analíticas desarrolladas, llevando a cabo los correspondientes estudios de repetibilidad y reproducibilidad, límites de detección y cuantificación en las condiciones óptimas, así como obtener la correspondiente linealidad tanto del método como del sistema.
- Aplicar las metodologías desarrolladas al análisis de distintos tipos de muestras reales (agua de la zona lacustre de Xochimilco y tejido de ajolote), con objeto de determinar la aplicabilidad de las mismas a diferentes matrices.

CAPITULO II

MARCO TEÓRICO

II.1.- Plaguicidas

Desde 1950 la producción agrícola ha ido aumentando continuamente a un ritmo tan importante debido al aumento de la población. Este incremento se ha conseguido, principalmente, sin poner nuevas tierras en cultivo, sino aumentando el rendimiento por superficie, es decir, consiguiendo una mayor producción por cada hectárea cultivada. Dicho aumento de la productividad se ha desarrollado con la difusión de nuevas variedades de cultivo de alto rendimiento, unido a nuevas prácticas agrícolas que utilizan grandes cantidades de fertilizantes y plaguicidas, así como maquinaria especializada. Los beneficios alcanzados por esta mejora agrícola son indiscutibles, pero han surgido diversos problemas entre los que destacan los daños medioambientales generados, incluyendo la erosión del suelo, la salinización y el anegamiento de suelos muy irrigados, el agotamiento de acuíferos, deforestación y la contaminación del ambiente por el uso excesivo de plaguicidas.

La denominación de plaguicida, incluye una amplia variedad de productos muy diferentes en su composición y propiedades a pesar de su utilización común. Para los fines del *Codex Alimentarius* (Comisión creada en 1963 por la *Food and Agricultural Organization*, FAO, y la *Organización Mundial de la salud*, OMS o WHO, *World Health Organization*, pertenecientes a la ONU), se entiende por plaguicida o pesticida, “cualquier sustancia destinada a prevenir, destruir, atraer, repeler o combatir cualquier plaga, incluidas especies indeseadas de plantas o animales, durante la producción y/o almacenamiento, transporte, distribución y elaboración de alimentos, productos agrícolas o alimentos para animales”. El término incluye las sustancias destinadas a utilizarse como reguladores del crecimiento de las plantas, defoliantes, desecantes, agentes para reducir la densidad de la fruta o inhibidores de la germinación, y las sustancias aplicadas a los cultivos antes o después de la cosecha para proteger el producto contra su deterioro durante el almacenamiento y transporte. El término no incluye normalmente los fertilizantes, nutrientes de origen vegetal o animal, aditivos alimentarios ni medicamentos para animales.

Actualmente, se utilizan cada año en México cerca de 54,678.96 toneladas de plaguicidas [AMIPFAC, 1995]. Muchos de ellos presentan una alta toxicidad así como una gran persistencia y movilidad medioambiental, lo que los convierte en uno de los grupos de contaminantes más importantes. Se han detectado residuos de plaguicidas en alimentos, aguas, suelos, organismos acuáticos, fluidos biológicos, etc. [Dean *et al.*, 1996; Ahmed, 2001; Barr y Needham, 2002; Berrada *et al.*, 2003] y en lugares tan remotos como la Antártida y el Ártico. Se han barajado cifras tan impactantes, como que en algunos casos se calcula que anualmente se consume más de medio kilo de plaguicidas por persona. La

peligrosidad de estos compuestos presenta varios aspectos: peligrosidad en su fabricación y formulación, peligrosidad para el agricultor que entra en contacto con ellos, peligrosidad ecológica asociada a desequilibrios en el medio ambiente y peligrosidad para el consumidor. A pesar de todos los inconvenientes que plantean, difícilmente se puede prescindir de su uso en el estado actual de desarrollo de nuestra agricultura. El riesgo que plantea su aplicación puede verse reducido considerablemente si se aplican correctamente a los cultivos para los que han sido elaborados, siguiendo las correspondientes medidas de seguridad.

II.1.1.- Génesis histórica

Los plaguicidas han sido utilizados en cierta manera desde tiempos muy remotos [Costa *et al.*, 1987]. El papiro de Ebers, escrito sobre el año 1550 A.C., recoge la utilización de ciertos preparados “médicos o farmacéuticos” que se utilizaban para repeler insectos de las casas. Incluso Homero (1000 A.C.) menciona en la Odisea la quema de azufre para “purgar las casas, las habitaciones, etc.” (La Odisea, Capítulo XXII). Dioscórides, médico griego (40-90 A.C.), ya conocía las propiedades tóxicas del azufre y del arsénico. Hay evidencias de que incluso alrededor del año 900 A.C. los chinos utilizaban arsenicales para eliminar insectos de los jardines. Los romanos, por su parte, utilizaban dos especies de plantas (*Veratrum album* L. y *V. nigrum* L., pertenecientes a la familia de las liliáceas) como raticidas [Shepard, 1939].

La evidencia más antigua que se tiene en occidente del uso de plaguicidas, data de 1669, cuando se utilizaron arsenicales como insecticidas para eliminar plagas de hormigas en mieles. Por otro lado, el uso de compuestos de cobre como fungicidas se conoce desde 1807, mientras que el ácido cianhídrico, por ejemplo, ya conocido por los egipcios y romanos como un potente veneno fue utilizado a partir de 1877 para fumigar los museos que guardaban colecciones de insectos [Shepard, 1939].

Hasta mediados de los años treinta, los plaguicidas utilizados eran de origen natural o bien compuestos inorgánicos. El tabaco (nicotina) fue y todavía es utilizado en muchos países como insecticida. El azufre, por ejemplo, se empezó a utilizar con bastante frecuencia a principios del siglo XIX, época en la que ya se conocían sus propiedades como pesticida y, a pesar de la aparición de pesticidas organosulfurados como el Captan, Maneb u otros a finales de la década de los 50, todavía hoy es utilizado con frecuencia dada su baja toxicidad comparada con otro tipo de compuestos. El cloruro de mercurio fue ampliamente utilizado como fungicida a partir de 1891 y fue poco a poco reemplazado por formas mercuriales orgánicas como el fenilmercurio (1915), alquiloalquilvercurio (década de los 20) y alquilvercurio (década de los 40). Los graves envenenamientos acaecidos en lugares como Irak (1971-1972) por el consumo de cereales que contenían estos productos de mercurio hicieron que se prohibiera su uso.

Los primeros productos de síntesis orgánica aparecieron a principios de la década de los 30 y contenían grupos nitrogenados y tiocianatos. Entre 1935 y 1950 aparecieron los pesticidas organoclorados, entre los que se encuentra el DDT que, aunque fue sintetizado por Zeidler en 1874, no fue hasta 1939 cuando el Dr. Paul Muller descubrió su uso como insecticida, por el que le dieron el Premio Nobel de medicina en 1948. Desde entonces el DDT fue ampliamente utilizado para la eliminación de plagas y fue de gran utilidad para erradicar enfermedades como el tifus o la malaria en muchos países. Con la aparición de la cromatografía de gases en 1962, se pudo comprobar la presencia de residuos de plaguicidas clorados en toda la superficie terrestre, sobre todo de DDT, de ahí que a partir de 1970 fuera prohibido su uso por su alta persistencia, su capacidad de acumulación en tejidos grasos y su alta toxicidad, aunque todavía hoy se encuentran restos de DDT en muestras de diversa índole. En México existen algunos organoclorados que todavía se comercializan como el *metoxiclor* o el *lindano*.

Por otro lado, entre 1940 y 1970 aparecieron los compuestos organofosforados y los carbamatos, que presentan menor persistencia medioambiental que los anteriores, y que han sido utilizados hasta nuestros días. Quizás, el grupo de pesticidas más importante de reciente introducción sean los piretroides o piretrinas sintéticos, muchos de los cuales se encuentran, de forma natural, presentes en las flores de los crisantemos y otros.

Aunque hasta el momento son muchas las familias de plaguicidas existentes, se están desarrollando los denominados *biopesticidas* o pesticidas bioquímicos que son sustancias naturales (de origen animal o vegetal, bacterias, minerales, etc.) capaces de controlar plagas por mecanismos que no implican una vía tóxica como los anteriores. En este grupo de compuestos se incluyen las feromonas que son utilizadas para atraer insectos hacia trampas adecuadas. Debido a la dificultad existente para poder asegurar que un determinado producto es efectivamente un *biopesticida*, la Agencia de Protección Medioambiental de Estados Unidos [EPA, <http://www.epa.gov>], entre otros organismos, ha designado comités especiales con este fin. Por otro lado, la ingeniería genética también ha generado especies vegetales resistentes a ciertas plagas, de forma que estos vegetales sean capaces de sintetizar sustancias capaces de combatirlas.

II.1.2.- Clasificación de los plaguicidas

Antes de hablar de la clasificación de los plaguicidas, es importante resaltar que con objeto de proceder a su registro, los pesticidas reciben nombres generalmente cortos, distintivos, que no los vincule a ninguna compañía que los manufacture y que sean ampliamente aceptados por la comunidad científica, ya que la nomenclatura sistemática pocas veces es corta y no resulta nada práctico su uso. Actualmente, ya han sido asignados más de mil nombres oficiales por la International Organization of Standardization [ISO, <http://www.hdrss.demon.co.uk>; <http://www.iso.org>] con este fin.

Actualmente, la clasificación de los plaguicidas se puede hacer en función de diferentes criterios como su campo de acción, grado de penetración, estabilidad, toxicidad, semejanza química, etc. Una clasificación bastante extendida en su uso diario es la generada atendiendo al objetivo o campo de acción al que están destinados. Siguiendo este criterio, la EPA, entre otros, clasifica a los plaguicidas tal como se describe en la Tabla II.1.

Tabla II.1.- Clasificación de los plaguicidas en función de su campo de acción (EPA).

Tipo de plaguicida	Organismo objeto
Acaricidas	Ácaros
Antibióticos	Microorganismos
Alguicidas	Algas
Avicidas	Pájaros
Bactericidas	Bacterias
Defoliantes	Hojas de plantas
Desinfectantes	Microorganismos
Fumigantes	Plagas en edificios, suelos, etc.
Fungicidas	Hongos
Herbicidas	Plantas
Insecticidas	Insectos
Larvicidas	Larvas de insectos
Molusquicidas	Caracoles, babosas
Nematocidas	Nematodos
Ovicidas	Huevos de insectos
Pisticidas	Peces
Repelentes	Insectos, pájaros
Raticidas	Roedores

La OMS, por su parte, recomienda clasificar a los plaguicidas en función de su toxicidad (The WHO *recommended classification of pesticides by hazard*, 2004), atendiendo a dos posibles vías de contacto (oral y tópica) y a la formulación del producto (sólido o líquido), tal como muestra la Tabla II.2. Un indicador de la toxicidad de un compuesto puede ser la DL_{50} , dosis letal, que es la cantidad susceptible de provocar la muerte de un 50% de los animales de experimentación (generalmente ratas). Extrapolando los valores obtenidos en animales a las personas, pueden estimarse unas DL_{50} aproximadas para los seres humanos. Aunque lógicamente existe un margen de error en esta extrapolación, los valores obtenidos dan una orientación sobre la toxicidad del producto en su utilización práctica. En lo que a la DL_{50} como indicador de toxicidad se refiere, la EPA también plantea una clasificación parecida a la de la OMS.

Es importante destacar, que la DL_{50} representa una medida de la toxicidad aguda, pero el peligro de ingerir una dosis superior a la DL_{50} sólo ocurre normalmente por error, accidente, ignorancia o suicidio. Desde el punto de vista de los residuos de estos compuestos, interesa mucho más su toxicidad a corto y medio plazo (toxicidad subcrónica) y sobre todo a largo plazo (toxicidad crónica, como es el caso del desarrollo de un cáncer, por ejemplo), que se averigua también con otros ensayos en diferentes animales.

Otra clasificación bastante extendida es la que se realiza en base a la estructura química de los compuestos, sin embargo, esta clasificación es relativamente compleja ya que existen multitud de clases de pesticidas como puede apreciarse en diversos manuales de pesticidas, como por ejemplo, *The e-pesticide manual* del Bristish Crop Protection Council que es editado cada año.

Tabla II.2.- Clasificación recomendada por la OMS toxicidad
(The WHO recommended classification of pesticides by hazard, 2004)

Clasificación	DL ₅₀ en ratas (mg/kg de peso del animal)			
	Vía oral		Vía tópica	
	Sólidos	Líquidos	Sólidos	Líquidos
Extremadamente tóxicos	≤ 5	≤ 20	≤ 10	≤ 40
Altamente tóxicos	5-50	20-200	10-100	40-400
Moderadamente tóxicos	50-500	200-2000	100-1000	400-4000
Ligeramente tóxicos	>500	>2000	>1000	>4000

II.1.3.- Contaminación por plaguicidas

Desde la Segunda Guerra Mundial, debido al desarrollo tecnológico, grandes cantidades de compuestos químicos sintéticos, probablemente desconocidos por los organismos vivos (xenobióticos), han sido introducidos en el medio ambiente. Algunos de estos compuestos se degradan fácilmente o son transformados en sustancias naturales o inertes, mientras que otros son altamente persistentes y, además, son fácilmente transportados hacia lugares muy alejados de sus focos de emisión. Sobre los años sesenta, la comunidad científica empezó a darse cuenta del peligro potencial que presentaban muchos de estos compuestos para el medio ambiente, de forma que las publicaciones científicas al respecto comenzaron a crecer exponencialmente, incluidas aquellas relacionadas con el análisis de pesticidas.

Generalmente, los plaguicidas son aplicados en estado líquido en forma de spray sobre el cultivo y/o suelo, aunque algunas veces se incorporan directamente como sólidos (polvo o gránulos) o a través del tratamiento de las semillas. En la industria química, la formulación de estos productos suele tener entre un 75 y un 99% de pureza. Hay que tener en cuenta que no todo el pesticida que se aplica alcanza su objetivo, pues una parte va a parar al suelo, otra se evapora en el momento de la aplicación, etc., es decir, sólo una parte más o menos importante de la depositada es absorbida. Este porcentaje depende de la naturaleza del plaguicida, de la formulación del producto (concentración, dosis y presencia de coadyuvantes que aumenten la retención por la planta), de las características de la aplicación (pulverización, espolvoreo, etc.), condiciones climáticas, y morfología y naturaleza de la superficie vegetal [Primo y Carrasco, 1986].

Una vez que se encuentra el plaguicida sobre el vegetal, a lo largo del tiempo, los residuos van disminuyendo progresivamente por acción de diversas causas, como el crecimiento del órgano vegetal tratado, eliminación por agentes mecánicos como el viento y la lluvia, o por causas físicas como la volatilización y solubilización, degradación química, etc. Dicha disminución depende, por un lado, de la naturaleza de la especie vegetal así como de la velocidad del desarrollo de la misma y, por otro, de las características del plaguicida y de la formulación aplicada, así como de todo un conjunto de factores climáticos [Ware, 1983].

La contaminación del medioambiente por plaguicidas se produce por aplicaciones directas en los cultivos agrícolas, derrames accidentales, lavado inadecuado de tanques o contenedores, filtraciones en los depósitos de almacenamiento y residuos descargados o depositados en el suelo. Una vez en el suelo, los plaguicidas pueden pasar a aguas superficiales y subterráneas por lixiviación, dependiendo de sus características químicas tales como solubilidad en agua, capacidad de adsorción sobre el suelo, capacidad de ionización, etc., del tipo de suelo (contenido en arcillas, en materia orgánica, porosidad, etc.), así como de las características topográficas o climáticas (temperatura o grado de precipitación acuosa, etc.). De forma genérica, la ausencia de luz, entre otros, hace que la degradación de los plaguicidas en aguas subterráneas sea lenta. Por otro lado, existe una fracción del producto de aplicación que se volatiliza y pasa a la atmósfera, de forma que son transportados por el viento y, a su vez, pueden volver a la superficie terrestre con las lluvias o por deposición sólida [Ware, 1983].

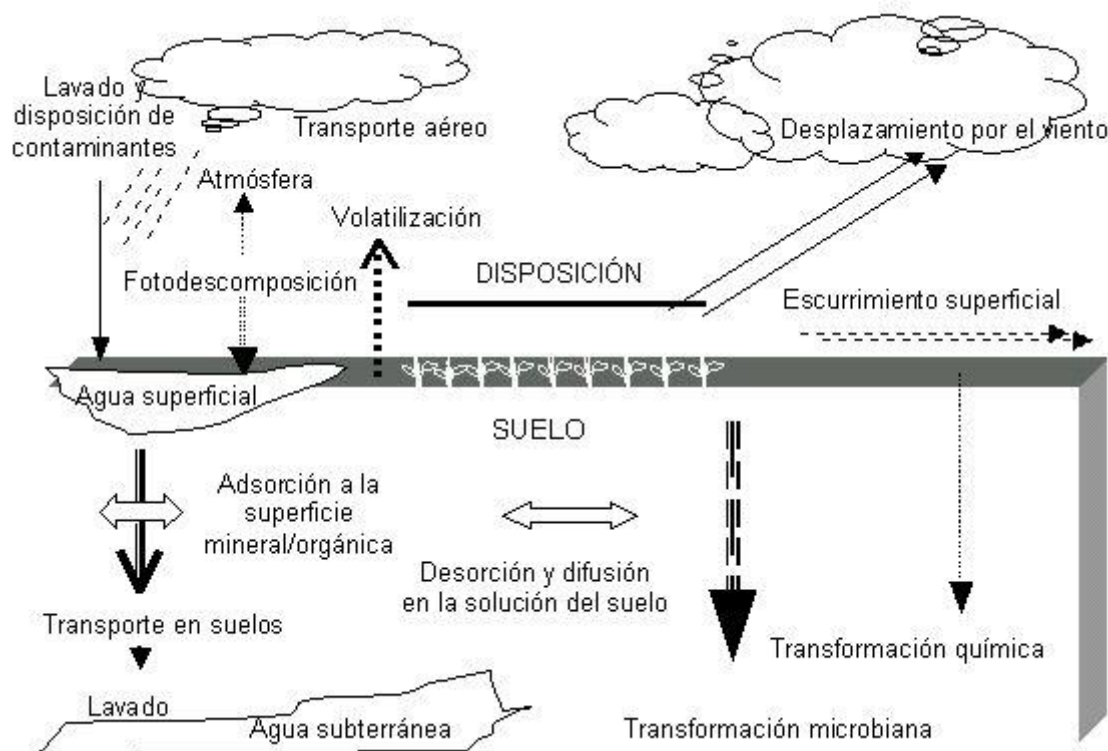


Figura II.1. Posibles mecanismos de transporte y transformación de plaguicidas en el ambiente.

Para evaluar la distribución ambiental de un plaguicida se utilizan parámetros como la constante de Henry, solubilidad en agua, coeficiente de adsorción en suelos, su coeficiente de partición octanol/agua, etc. El valor numérico de estos parámetros determina el grado de afinidad del plaguicida por los sistemas bióticos (animales y plantas) y por los abióticos (suelo, aire y agua).

Tabla II .3.-Movilización y distribución de compuestos orgánicos en el medio ambiente, con particular referencia a los plaguicidas [Marathon Agricultural and Enviromental Consulting, 1992].

Proceso	Consecuencias	Factores
Transferencia (procesos que reubican los plaguicidas sin alterar su estructura.		
Movilización física	<i>Movimiento de compuestos orgánicos debido a la acción del viento.</i>	Velocidad del viento, tamaño de las gotas, distancia al objeto físico.
Adsorción	Eliminación de los compuestos orgánicos debido a su interacción con plantas, suelos y sedimentos.	Contenido de arcilla y materia orgánica, tipo de arcilla, humedad.
Volatilización	Perdida de compuestos orgánicos debido a la evaporación del suelo, planta o ecosistema acuático.	Presión de vapor, velocidad del viento, temperatura.
Lixiviación	Movilización de compuestos orgánicos a través de los suelos: superficialmente o en profundidad.	Contenido de agua, macroporos, textura del suelo, arcilla, contenido de compuestos orgánicos.
Erosión	Movimiento de compuestos orgánicos ocasionada por el agua o la acción del viento.	Escurrimientos, velocidad del viento, tamaño de las partículas de arcilla y de la propia materia con compuestos orgánicos adsorbidos en ellas.
Degradación (procesos que alteran su estructura química)		
Fotoquímica	<i>Ruptura de los compuestos orgánicos debido a la absorción de luz solar.</i>	Estructura de los compuestos orgánicos, intensidad y duración de la exposición solar.
Microbiana	Degradación de compuestos orgánicos ocasionada por microorganismos.	Factores medioambientales (pH, humedad del suelo, temperatura), presencia de nutrientes, contenido de materia orgánica.
Química	Alteración de los compuestos orgánicos por procesos químicos como hidrólisis y reacciones redox.	pH alto o bajo, factores que influyen en la degradación microbiana.
Metabolismo	Transformaciones químicas de los compuestos orgánicos después de ser absorbidos por plantas o animales.	Capacidad de absorción del organismo, metabolismo del mismo, interacciones dentro del organismo.

A pesar de que los plaguicidas actuales no son altamente persistentes en el medio, el principal problema que se plantea es que muchos de ellos son empleados en concentraciones muy por encima de las recomendadas o bien, a pesar de estar prohibido el uso de ciertos grupos de ellos, se utilizan ilegalmente o erróneamente en muchos lugares (por ejemplo, pesticidas de aplicación floral no permitidos en frutas o vegetales). Además, hay que tener en cuenta que los que están permitidos en ciertos países, pueden no estarlo en otros. [Barberá, 1983].

El ser humano puede ingerir residuos de plaguicidas al consumir productos vegetales que hayan sido tratados con los mismos y, también, al consumir alimentos de origen animal que hayan podido acumular esos residuos. Cuando el plaguicida presenta cierta resistencia y, además, es soluble en las grasas (tejidos adiposos), dado que las cadenas alimentarias comienzan en los vegetales y terminan en los animales superiores, en esos últimos casos pueden encontrarse cantidades mayores de plaguicidas persistentes debido a su sucesiva acumulación en la cadena alimentaria. Actualmente, con la prohibición del uso de plaguicidas clorados de alta persistencia, este problema se ha reducido considerablemente. Los productos actuales, aunque tienen una velocidad de degradación más rápida, pueden causar cierta contaminación, aunque el problema sea mucho menor que antes. [Barceló, 1993].

En lo que a la exposición del ser humano a residuos de plaguicidas se refiere, el grado de exposición depende de dos factores claramente diferenciados: por un lado, de los tratamientos efectuados por los agricultores y, por otro, de la composición de la dieta alimentaria media en la zona geográfica considerada. Conocer este grado de exposición es importante, pero ello exige realizar estudios rigurosos a nivel estatal, regional y local, considerando tanto alimentos vegetales como animales [Barceló, 1993].

II.1.4.- Legislación global en materia de plaguicidas

El incremento del volumen global de productos químicos comercializados ha provocado preocupaciones acerca de sus efectos a largo plazo en la salud humana y en el medio ambiente. En las últimas décadas, varios acuerdos internacionales se han centrado en controlar los riesgos asociados a las sustancias químicas peligrosas [SAICM, 2006].

Los acuerdos globales para la reducción y eliminación eventual de estas sustancias mediante la restricción de su producción y comercio es un proceso a largo plazo.

Desde la primera Conferencia Internacional sobre el Medio Humano [Estocolmo, 1972] se ha planteado la necesidad de controlar los riesgos de las sustancias químicas peligrosas, centrando la atención internacional en temas medio ambientales, especialmente los relacionados con la degradación ambiental y la contaminación transfronteriza, y se señalaba el hecho de que la contaminación no reconoce los límites políticos o geográficos y afecta a los países, regiones y pueblos más allá de su punto de origen. Durante

las décadas que siguieron a la Conferencia de Estocolmo, este concepto se amplió para abarcar temas medio ambientales que requieren una acción conjunta de todos los países y regiones del mundo para enfrentarse a ellos de un modo efectivo. En la Cumbre para la Tierra de 1992 se reconoció internacionalmente el hecho de que la protección del medio ambiente y la administración de los recursos naturales deben integrarse en las cuestiones socioeconómicas de pobreza y subdesarrollo [PIC, 1998].

En 1994, 103 países adoptaron el Programa Ambiental de las Naciones Unidas (UNEP) con un acuerdo para la protección del medio ambiente marino (Washington Declaration on Protection of the Marine Environment and Land Based Activities Agreement, 1994) que contempla la reducción de 12 sustancias conocidas como Compuestos Orgánicos Persistentes (COPs). Se reconoció que los COPs son transportados de manera global por el aire y el mar, dando por resultado un aumento en sus concentraciones lejos del sitio original de uso.

Así mismo, la Convención sobre el Prior Informed Consent Agreement [PIC, 1998] o procedimiento de Consentimiento Fundamentado Previo (CFP), para ciertos productos químicos peligrosos y plaguicidas en comercio internacional, fue acordada en Rotterdam, Países Bajos, en septiembre de 1998. Este convenio también conocido como Convenio de Rotterdam entró en vigor el 24 de febrero de 2004 y tiene los siguientes objetivos:

- Promover la responsabilidad compartida y los esfuerzos conjuntos de las Partes en la esfera del comercio internacional de ciertos productos químicos peligrosos a fin de proteger la salud humana y el medio ambiente frente a posibles daños; y
- Contribuir a su utilización ambientalmente racional, facilitando el intercambio de información acerca de sus características, estableciendo un proceso nacional de adopción de decisiones sobre su importación y exportación y difundiendo esas decisiones a las Partes.

El PIC regula las importaciones y exportaciones de determinados productos químicos y plaguicidas peligrosos; cualquier producto químico especificado en éste sólo puede ser exportado con el consentimiento previo del importador. El Convenio del PIC crea un procedimiento para conocer y dar a conocer las decisiones de los países importadores, aplicando así el principio PIC en el comercio internacional de productos químicos. Así mismo, establece disposiciones por las que se exige una información detallada sobre los productos que permita decidir la importación conociendo las propiedades y efectos de los productos, sobre todo en la salud humana y el medio ambiente. Este Convenio se aplica a plaguicidas y productos químicos industriales que han sido prohibidos o rigurosamente restringidos por razones sanitarias o ambientales por algunos países y que han sido notificados para su inclusión en el procedimiento de PIC. El Convenio se aplica a 39 productos químicos (incluyendo 24 plaguicidas, 4

formulaciones plaguicidas extremadamente peligrosas) y 11 productos químicos industriales, mostrados en la Tabla II.4.

Tabla II.4.- Productos químicos sujetos al procedimiento de Consentimiento Fundamentado Previo, [PIC, 1998].

Producto químico	Producto químico
Ácido 2,4,5-Triclorofenoxiacético	HCH
Aldrín	Heptacloro
Captafol	Hexaclorobenceno
Clordano	Lindano
Clordimeformo	Pentacloro fenol
Clorobencilato	Menocrotophos
DDT	Metamidotophos
Dieldrín	Fosfamidón
Dinoseb	Metil-paratión
Dibromoacetano	Paratión
Fluoroacetamida	

Recientemente, el 6 de febrero de 2006, en Dubai, la Conferencia Internacional sobre la Gestión de los Productos Químicos (ICCM) aprobó el Enfoque Estratégico para la Gestión de los Productos Químicos [SAICM, 2006] que constituye un marco de política para la acción internacional ante los riesgos resultantes de los productos químicos, que brindará un marco de política para las actividades internacionales destinadas a lograr la meta del Plan de Aplicación de las Decisiones de Johannesburgo que para 2020 los productos químicos se produzcan y utilicen de manera que se reduzcan al mínimo los efectos. El éxito de su aplicación probablemente traiga consigo un mayor reconocimiento de la seguridad química como cuestión del desarrollo sostenible que concierne a todos los sectores y la aceleración de la creación de capacidad para ayudar a los países en desarrollo y a los países con economías en transición a lograr la gestión racional de los productos químicos.

II.1.5.- La situación en México

En base al Procedimiento de Consentimiento Fundamentado Previo (PIC) en México se tiene la Propuesta Ejecutiva Nacional del Registro de Emisiones y Transferencia de Contaminantes (RETC). Esta propuesta incluye plaguicidas cuyo uso está prohibido en México (aldrín, endrin) y aquellos prohibidos en su comercialización y uso (más no su producción) como el caso de Toxafeno. El RETC es limitado a la producción industrial de plaguicidas en México y no incluye un registro del uso de plaguicidas. En la Tabla II.5 se muestran los pesticidas incluidos en el RETC.

Tabla II.5.- Plaguicidas incluidos en la propuesta del RETC en México, [PIC, 1998].

Lindano	Captan	Warfarina
Endosulfán	DDT	Trifuralin
Silbes	Diazinon	Clorpirifos
Ácido 2,4,-diclorofenoxiacético	Endrín *	Aldrin *
Disulfuro de tetramiltiuram	Heptacloro *	Toxafeno *

*Prohibidos en México

En el caso de México, el plan de acción nacional incluye como objetivos: la eliminación de los usos ilegales del DDT, su reducción gradual para el control del paludismo en un 80% para el año 2001, y su eliminación total en los próximos 10 años, si persiste la tendencia a la baja del paludismo [Bejarano, 2000]. El 15 de octubre de 1987 se publicó en el Diario Oficial de la Federación (en México) el decreto que establece las bases de coordinación entre las Secretarías de: Comercio y Fomento Industrial (actualmente de Economía), Agricultura y Recursos Hidráulicos (actualmente de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación), Desarrollo Urbano y Ecología (actualmente de Medio Ambiente y Recursos Naturales) y Salud, para el ejercicio de las atribuciones que respecto a plaguicidas, fertilizantes y sustancias tóxicas, les confieren, la Ley Federal de Sanidad Vegetal, la Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente y la Ley General de Salud.

En apego al decreto que crea la Comisión Intersecretarial para el Control del Proceso y Uso de Plaguicidas, Fertilizantes y Sustancias Tóxicas (CICOPLAFEST), la Comisión Intersecretarial publicó en los años de 1991 a 1998 el Catálogo Oficial de Plaguicidas, que contiene los productos registrados y sus usos autorizados, sus características principales, así como las indicaciones para su uso e información sobre los riesgos que los mismos implican y sobre el tratamiento en caso de intoxicaciones. El propósito de este catálogo es ayudar al buen uso y manejo de estos productos en las áreas de empleo: agrícola, forestal, pecuario, doméstico, urbano, industrial y en jardinería. Se integra en este catálogo la información de los plaguicidas registrados en México, las características generales de los mismos, así como las aplicaciones para las que se dio la autorización.

Los únicos plaguicidas cuya importación, comercialización y uso están permitidos en México, son los que han sido registrados por la CICOPLAFEST.

La principal actividad actual de la CICOPLAFEST, es la atención al usuario en lo relativo a la emisión de registros y autorizaciones de importación de plaguicidas, fertilizantes y sustancias tóxicas. El catálogo de plaguicidas es un documento oficial elaborado por las Secretarías que Integran a la CICOPLAFEST. La versión del 2004 es una actualización del Catálogo Oficial de Plaguicidas emitido en 1988, e incluye información sobre los usos, sinonimia, mezclas y coadyuvantes de las sustancias

registradas, hasta junio de 2004. Los pesticidas se encuentran regulados por disposiciones ambientales, sanitarias, fito y zoosanitarias, laborales y de transportes.

Las Normas Oficiales Mexicanas (NOM) son las regulaciones específicas de la actividad industrial, comercial y de servicios.

Los plaguicidas de la Tabla II.6 solo pueden ser adquiridos en las comercializadoras mediante la presentación de una recomendación escrita de un Técnico Oficial o Privado que haya sido autorizado por el Gobierno Federal. Su manejo y aplicación se efectuarán de acuerdo a la NOM que establece los requisitos y especificaciones fitosanitarias para el manejo de Plaguicidas Agrícolas Restringidos.

Tabla II.6.- Plaguicidas agrícolas restringidos en México [Catálogo Oficial de Plaguicidas, 1996.]

1,3-dicloropropeno	Metoxicloro	Mevinfos
Alaclor	Metamidofos	Cloropicrina
Aldicarb	Metam sodio	Paraquat
Bromuro de metilo	Lindano	Pentaclorofenol
Clordano	Dicofol	Quintozeno
Fosfuro de aluminio	Forato	Clorotalonil
Isotiocianato de metilo		

En la Tabla II.7 se presentan los pesticidas autorizados en México y ya prohibidos en otros países y considerados de interés prioritario en el Convenio de Estocolmo sobre COPs, como es el caso de Clordano, DDT, Lindano, Paraquat, Metil Paratión y Pentaclorofeno.

Tabla II.7.- Plaguicidas prohibidos en otros países y autorizados en México [RAPAM, 1994].

Alaclor	Metidatión	Endosulfán	Dicofol
Aldicarb	Metamidofos	Forato	Quintoceno
Azinfos Metílico	Metoxicloro	Fosfamidón	Sulprofos
Captafol	Mevinfos	Kadetrina	Triazofos
Carbarilo	Monocrotofos	Linuron	Tridemorf
Captan	Ometoato	Maneb	2,4-D
Clordano	Oxyfluorfen	Diurón	Vamidotion
DDT	Metil Paratión		
Pentaclorofenol			

II.2.- Metodología analítica para la determinación de plaguicidas en muestras ambientales

La elevada toxicidad de los plaguicidas presentes en el medio ambiente obliga a disponer de métodos analíticos fiables, rápidos, económicos y suficientemente sensibles que permitan el control de los compuestos tóxicos en diversos tipos de muestras, tanto en matrices biológicas (alimentos, tejidos animales, tejidos vegetales), como en medioambientales (agua, suelo, aire).

La Química Analítica frente al análisis de residuos de plaguicidas tiene ante sí un reto importante, ya que existe una fuerte demanda social exigiendo el control de todo tipo de contaminantes en el medio ambiente. Por otro lado, sólo es posible establecer legislaciones restrictivas sobre niveles de contaminantes cuando existan métodos adecuados para su análisis.

Los plaguicidas suelen encontrarse a niveles traza en multitud de muestras, tanto biológicas como medioambientales, por lo que se requiere metodologías muy sensibles y selectivas para su determinación. El proceso de análisis es a menudo complicado y consta de varias etapas, siendo generalmente la última de ellas una determinación cromatográfica, gaseosa o líquida, con un detector adecuado.

Los más recientes artículos de revisión [Sabik *et al.*, 2000; Ahmed, 2001; Andreu y Picó, 2004] muestran los diferentes procedimientos de extracción a los que se suelen someter las muestras (principalmente aguas, suelos y frutas) para su posterior análisis y cuantificación, en lo que a contenido en pesticidas se refiere. En este sentido, las técnicas de pre-tratamiento de muestra más utilizadas son la extracción en fase sólida (SPE), la microextracción en fase sólida (SPME) y la extracción líquido-líquido (LLE) -esta última cada vez menos- aunque actualmente se están utilizando en mayor número técnicas como la extracción asistida por microondas (MAE) o la extracción con fluidos supercríticos. En todas ellas se están aplicando, cada vez más, técnicas quimiométricas para la rápida optimización de los parámetros experimentales.

En lo que a las técnicas de separación se refiere, hoy en día la cromatografía de gases (GC) es la técnica más ampliamente empleada para el análisis multiresidual de plaguicidas, siendo, en general, capaz de conseguir los límites de detección más bajos (en el rango de los $\mu\text{g/L}$ incluso en algunos casos ng/L). Muchos métodos oficiales de análisis están basados en esta técnica en los que se utilizan diferentes detectores, como el de nitrógeno y fósforo (NPD), de captura electrónica (ECD), de ionización de llama (FID) o de espectrometría de masas (MS). En este último caso, dada las ventajas actuales que presenta la detección por MS, ésta es cada vez más utilizada, siendo el impacto electrónico la técnica de ionización más utilizada en casi todos los casos [Andreu y Picó, 2004].

Sin embargo, el análisis de compuestos de alto peso molecular, altamente polares o térmicamente lábiles presenta grandes dificultades o es prácticamente imposible de realizar mediante GC. Este hecho ha provocado que la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) haya ido ganando terreno en el análisis de este tipo de compuestos y, más aún, con su acoplamiento a un espectrómetro de masas. La técnica HPLC presenta también la ventaja adicional de permitir derivatizaciones pre- y post-columna de los analitos con objeto de mejorar su detección. El reciente desarrollo de columnas de cromatografía líquida que contienen polímeros impresos molecularmente (MIP) ha sido bastante popular en el análisis de pesticidas dada su gran estabilidad, bajo costo y sencillez de preparación [Ahmed, 2001].

II.2.1.- Preparación de la muestra para la determinación de analitos orgánicos

El proceso analítico se define como “*el conjunto de operaciones comprendidas entre la muestra –sin tomar, sin medir, sin tratar- y los resultados expresados según los requerimientos*”.

Generalmente la determinación de plaguicidas en muestras ambientales no se puede realizar de forma directa en la muestra, sino que son necesarias una serie de etapas previas que constituyen el proceso analítico:

- Estrategia de muestreo (toma de muestra)
- Almacenamiento y conservación
- Pre-tratamiento de la muestra
 - Extracción y separación del analito de la muestra
 - Limpieza y purificación del extracto
 - Pre-concentración del extracto
- Determinación instrumental

Dentro del mismo, se distinguen tres grandes etapas: las operaciones previas, que preparan a la muestra para la medición analítica en sí, la medición y la transducción de la señal analítica, y la toma y el tratamiento de los datos. En la mayoría de los procesos analíticos actuales, más del 80% del tiempo de análisis se invierte prácticamente en la toma y pre-tratamiento de la muestra. Pre-tratamiento que, por otro lado, es imprescindible en la actualidad dado que en una determinada muestra existen multitud de compuestos que pueden interferir en la medida analítica, siendo muy pocas las muestras que actualmente pueden ser analizadas directamente.

Durante la etapa de pre-tratamiento de la muestra se persigue, por un lado, el aislamiento del analito de la propia matriz de la muestra o, lo que es lo mismo, disponer del analito en el estado más puro posible para posteriormente cuantificarlo con fiabilidad y, por otro lado, la preconcentración del mismo,

sobre todo si se encuentra a concentraciones muy bajas. Todo ello evitando la pérdida del mismo durante todo el proceso, así como su posible degradación y la contaminación de la muestra. El pre-tratamiento se podría subdividir a su vez en tres etapas que, en la práctica, pueden llevarse a cabo simultáneamente: extracción, pre-concentración y limpieza (clean-up).

II.2.2.- Muestreo

Por lo que respecta a la toma de muestra, hay que tomar en cuenta que en muchas ocasiones la representatividad de la muestra, es decir, su capacidad de reflejar la exposición al plaguicida, dependerá de la toma. Generalmente, existen procedimientos estandarizados de toma de muestra para muestras ambientales, normalmente se suelen utilizar volúmenes de 1L. Los principales tipos de muestreo par el caso de muestras acuosas son:

- *Muestras simples*: son aquellas muestras tomadas en un tiempo y lugar determinado para su análisis individual.
- *Muestras compuestas*: son las obtenidas por la mezcla y homogeneización de muestras simples recogidas en el mismo punto y en diferentes tiempos.
- *Muestras integradas*: son las obtenidas por mezcla de muestras simples recogidas en puntos diferentes y simultáneamente.

Como norma general, las muestras simples suelen ser poco representativas y sólo proporcionan información puntual de la situación en un momento y lugar dados, pudiendo ser utilizadas en estudios previos o muestras muy homogéneas. La utilización de muestras compuestas es interesante en los casos en que las concentraciones de los analitos varían con el tiempo; si se utiliza este tipo de muestras compuestas, es importante combinarlas proporcionalmente.

En cuanto al transporte de este tipo de muestras, debe ser tal que evite contaminaciones, evaporaciones, derrames, roturas, etc., que son las causas más frecuentes de que se pierdan las muestras, durante su transporte al laboratorio o bien durante su almacenamiento. Por tal motivo, una vez finalizada la toma, el cierre perfecto de los frascos, o recipientes conteniendo las muestras, su colocación en cajas adecuadas provistas de material de relleno para evitar choques fortuitos y las consiguientes roturas.

II.2.3.- Almacenamiento

El tiempo máximo de almacenamiento de las muestras antes de su análisis depende de los parámetros o compuestos a determinar; para la determinación de plaguicidas se recomienda su determinación lo antes posible. En general, el almacenamiento de la muestra debe hacerse mediante refrigeración (aproximadamente 4°C), lejos de la luz solar en todo momento; en algunos casos concretos puede ser necesaria la adición de algunos conservadores químicos o biocidas (para evitar la degradación

de algunos analitos por parte de los microorganismos presentes; su colocación en las condiciones adecuadas de conservación a partir del momento de la llegada al laboratorio, son cuestiones que no pueden ser pasados por alto si se desea obtener una buena fiabilidad en los resultados.

II.2.4.- Extracción

En la etapa de preparación de la muestra se incluye generalmente un paso de extracción de los plaguicidas o metabolitos y otro alternativo de purificación, que debe ser lo suficientemente efectiva para separar a los analitos de los interferentes que están formando parte de la matriz correspondiente a una muestra extremadamente compleja. Muchos factores deben ser considerados para la elección de la técnica de extracción a desarrollar, principalmente los relacionados con el tipo de matriz objeto de estudio. Típicamente, la mayoría de los procedimientos publicados en la bibliografía requieren la extracción de los plaguicidas mediante **disolventes orgánicos** o mediante extracción **en fase sólida (SPE)**, en algunos casos junto con la aplicación de pasos adicionales de purificación para eliminar interferencias y conseguir los límites de detección del método. Otras técnicas más novedosas, como la **microextracción en fase sólida (SPME)**, **extracción asistida por microondas (MAE)** y la **extracción en punto de nube o cloud point (CPE)** se están aplicando cada vez más en la determinación de plaguicidas en diferentes matrices ambientales, debido a su simplicidad y a la poca manipulación de la muestra [Fritz, 1999; Carabias Martínez *et al.*, 2000; Dean, 1998].

II.2.5.- Purificación de la muestra (clean-up)

Es el proceso de purificación de los extractos a fin de permitir una identificación definitiva del residuo en los límites de cuantificación requeridos y minimizando la contaminación en el sistema cromatográfico, ya que la inyección directa de matrices complejas puede ocasionar el deterioro de la columna cromatográfica; además, pueden contener sustancias que interfieran en el análisis de nuestros compuestos de interés.

II.2.6.- Determinación instrumental

La elección de la técnica analítica para la determinación instrumental depende de una variedad de factores incluyendo costo, disponibilidad, selectividad, sensibilidad, propiedades de los analitos y capacidad de análisis. En el caso de los plaguicidas, esta determinación se lleva cabo mediante técnicas cromatográficas, *cromatografía de gases (GC)* o *cromatografía de alta resolución (HPLC)*, acopladas a detectores que permitan la obtención de una sensibilidad y selectividad adecuadas. Aunque una gran variedad de detectores, especialmente el de *captura de electrones (ECD)* o el de *nitrógeno fósforo (NPD)*, han sido tradicionalmente utilizados, actualmente tiene mucha más importancia la *espectrometría de masas (MS)* como sistema de detección en el análisis multiresidual de plaguicidas mediante GC o LC.

II.3.- Tipos de muestras

II.3.1.- Agua

El agua es un importantísimo componente de los seres vivos y es factor limitante de la productividad de muchos ecosistemas. La contaminación de los cursos de agua por plaguicidas se produce en forma directa por la aplicación de plaguicidas en las aguas, por lavado de envases o equipos y por descarga de remanentes y residuos. Es igualmente importante la contribución indirecta producida por lixiviación (infiltración) de productos, caída por desniveles y por contaminación de suelos. Las aguas contaminadas expanden el tóxico a la flora y fauna produciendo la muerte de especies, el aumento de la intoxicación humana, la pérdida del curso de agua como recurso utilizable y la probable contaminación de las reservas hídricas (acuíferos).

El ciclo natural del agua tiene una gran capacidad de purificación. Pero esta misma facilidad de regeneración del agua, y su aparente abundancia, hace que sea el vertedero habitual en el que arrojamos los residuos producidos por nuestras actividades, entre ellos los plaguicidas, de tal manera que se encuentran, en cantidades mayores o menores, al analizar las aguas de los más remotos lugares del mundo. Muchas aguas están contaminadas hasta el punto de hacerlas peligrosas para la salud humana, y dañinas para la vida. Diversos estudios han revelado la presencia de más de 175 compuestos orgánicos en aguas, entre ellos 67 plaguicidas diferentes.

Para saber en qué condiciones se encuentra un río se analizan una serie de parámetros de tipo físico, otros de tipo químico y otros biológicos y después de comparar estos datos con valores de referencia aceptados internacionalmente se podrá indicar la calidad del agua para los distintos usos: consumo humano, uso agrícola y actividades recreativas, etc. [BOE, 1983].

II.3.2.- Organismos

Algunos plaguicidas tienen estructuras químicas muy estables y tardan años en descomponerse a formas menos tóxicas. En las zonas en las que se aplican estas sustancias las concentraciones del producto son cada vez mayores y aunque haya pasado tiempo desde la última aplicación el plaguicida seguirá presente impregnándolo todo. En muchos casos estos productos son, además, difíciles de eliminar por los organismos porque son poco solubles en agua y tienden a acumularse en los tejidos grasos. Cuando unos organismos van siendo comidos por otros el plaguicida se va acumulando en mayores proporciones en los tramos finales de la cadena trófica. De esta forma un plaguicida que se encuentra en concentraciones muy bajas, nada peligrosas, en un bosque o un lago, termina estando en concentraciones decenas o cientos de

veces más altas en los tejidos grasos de los animales, como aves rapaces, peces o mamíferos depredadores que están situados en lo más alto de la cadena trófica.

La determinación directa de contaminantes orgánicos como los plaguicidas en agua presenta muchas limitaciones, debido fundamentalmente al elevado volumen de agua que es necesario procesar para la determinación de estos contaminantes a niveles de concentración tan extremadamente bajos. Multitud de estudios medioambientales demuestran que algunos organismos acuáticos tienden a acumular residuos de estos contaminantes en sus tejidos grasos a niveles de $\mu\text{g/g}$, incluso de ng/g . La absorción de contaminantes orgánicos por estos organismos se produce a través de dos vías: una activa debida a la ingesta de comida y otra pasiva por absorción a través de las membranas del organismo, como la piel o las branquias [Gobas, 1992]. Los organismos acuáticos empleados como muestreadores pasivos son algunos peces y sobretodo moluscos bivalvos. Este proceso de bioacumulación induce a que se alcancen concentraciones muy elevadas de contaminantes en estos organismos, a pesar que su concentración en agua esté muy por debajo de su límite de detección. Además solo absorben la fracción del contaminante que esté biodisponible [Huckins, 2002].

II.4.- Métodos de extracción para muestras líquidas

II.4.1.- Extracción líquido-líquido (LLE)

La LLE ha sido, y quizás todavía sigue siendo, la técnica de extracción, preconcentración y limpieza más utilizada hasta el momento. Se basa en la distribución de la muestra entre dos fases inmiscibles en las que el analito y la matriz tienen solubilidades diferentes. Casi siempre una de las fases es acuosa y la otra orgánica, de forma que tanto la eficacia como la selectividad del proceso dependen de la naturaleza de ambos disolventes. La selectividad depende, además, de todas aquellas variables que puedan afectar al proceso de equilibrio, como el pH, la temperatura, la adición de sales (como cloruro sódico, sulfato sódico, sales de aluminio y de hierro, etc. que originan el efecto salting out), presencia de agentes complejantes, uso de reactivos formadores de pares iónicos o de mezclas de disolventes, etc.

Los disolventes a utilizar deben seleccionarse de acuerdo con la inmiscibilidad de ambas fases y la polaridad del analito. En principio debería elegirse como extractante un disolvente puro o mezclas de disolventes con ciertas características. Por un lado, su solubilidad en agua debe ser inferior al 10%, deben ser volátiles para facilitar su posterior evaporación y, además, deben ser compatibles con las técnicas analíticas utilizadas posteriormente. Por otro lado, deben permitir obtener un valor de la constante de

distribución elevado para los analitos de interés aumentando la concentración de los analitos en la fase orgánica.

La LLE puede llevarse a cabo de cuatro formas diferentes: extracción discontinua (en una o varias etapas), continua, en contracorriente y en línea [Cela *et al.*, 2002]. La elección de una u otra dependerá de las características de la muestra, de los analitos, así como de las constantes de distribución.

Las ventajas que presenta esta metodología son:

- El amplio rango de disolventes distintos y mezclas de ellos que pueden ser empleados, permite una gran versatilidad a esta técnica.
- Es un método muy simple que no requiere el uso ni de instrumentaciones complejas, ni de consumibles costosos, a excepción de los disolventes empleados.

Entre los principales inconvenientes que presenta la extracción líquido-líquido, se encuentran:

- El empleo de grandes volúmenes de disolvente requiere una posterior evaporación de los mismos para concentrar los extractos, lo que añade una etapa más al proceso analítico y que a menudo es bastante costosa en tiempo. Además se requiere el uso de disolventes de elevada pureza para evitar contaminaciones.
- En muestras que contienen surfactantes o grasas, se producen emulsiones en ocasiones difíciles de romper. Por lo que a veces es necesario, centrifugar, filtrar a través de lana de vidrio, enfriar, añadir sales o añadir pequeñas cantidades de otros disolventes.
- La capacidad de extracción puede verse modificada dependiendo del tipo de muestra, por lo que existe una gran variabilidad.

II.4.2.- Extracción en fase sólida (SPE)

La SPE es una técnica de preparación y tratamiento de muestras, basada en la retención selectiva de los analitos y su posterior elución. En ella, los solutos son extraídos de una fase líquida o gaseosa mediante una fase estacionaria sólida apropiada, que generalmente se encuentra en el interior de los denominados cartuchos, formada por pequeñas partículas que presentan una gran afinidad por los analitos que, una vez extraídos, pueden ser eluidos de la fase estacionaria con un disolvente adecuado.

Los comienzos de la SPE como tal, pueden situarse en la década de los años sesenta, de forma que sus primeras aplicaciones se desarrollaron en la extracción de compuestos orgánicos de muestras acuosas. Por esta época, la compañía Rohm y Hass introduce una resina de poliestireno (PS, Amberlite XAD-1)

que fue utilizada por Riley y Tailor (1969) para la preconcentración de compuestos orgánicos (contaminantes, carbohidratos, aminoácidos y ácidos húmicos) de muestras de aguas. A principios de los años setenta, aparecen en el mercado nuevas resinas como las de poliestireno divinilbenceno (PS-DVB, Amberlite XAD-2, XAD-4) o las de poliácido (PA, Amberlite XAD-7 y XAD-8), que comenzaron a utilizarse cada vez más. Uno de estos primeros trabajos fue desarrollado por Burnham (1972), para la preconcentración de fenoles y cresoles en muestras de aguas. El desarrollo de este novedoso sistema de extracción, conjuntamente con el hecho de que estos investigadores contaran con uno de los primeros sistemas GC-MS disponibles, permitió avanzar mucho en el análisis de contaminantes orgánicos de aguas. En principio la técnica fue denominada extracción con columnas de acumulación. Tras las columnas de Amberlite, aparecieron otros copolímeros producidos por diferentes fabricantes, como las de Porapak [Krejčí *et al.*, 1974] o Chromosorb. También se empezaron a utilizar pequeñas columnas de sílice con fases ligadas fruto del rápido desarrollo que tuvo el HPLC en la década de los setenta. En este sentido, May y col. (1975) y Littel y Fallick (1975) fueron los primeros que las utilizaron, también, para la extracción de compuestos orgánicos de aguas. La existencia en el mercado de una amplia gama de fases ligadas con una buena estabilidad (siempre y cuando se evitara el uso de pHs altos), extendió rápidamente la aplicación de la técnica al análisis de fluidos biológicos. Conjuntamente con el desarrollo de fases estacionarias poliméricas y fases ligadas, apareció también, entre los años setenta y ochenta, una nueva generación de adsorbentes de carbón que mejoró algunos de los problemas previos de este tipo de materiales.

Durante la década de los 80 y 90, el desarrollo de la SPE experimentó un gran crecimiento y, si bien inicialmente los esfuerzos se centraban en encontrar una fase estacionaria óptima y universal, poco a poco cambiaron y se centraron en resolver problemas concretos en función de las necesidades analíticas. Como es bien sabido, las fases estacionarias se encuentran en el interior de pequeñas columnas, cartuchos cerrados o discos. En el caso de los discos, el adsorbente está inmovilizado en una membrana de microfibras de 0,5 mm de espesor, que permite flujos más altos que los utilizados en los cartuchos. Los discos se emplean, sobre todo, cuando el volumen de la muestra es muy grande y la concentración de los analitos es baja, como en el análisis de contaminantes orgánicos de aguas. En este caso, la rapidez de la extracción es mayor, el flujo es más uniforme y la eficiencia de la extracción es mayor al ser menor el tamaño de partícula.

En principio, todas las fases estacionarias desarrolladas desde los comienzos de la SPE son utilizadas actualmente y su modificación ha permitido mejorar las aplicaciones de la técnica, al igual que las mejoras introducidas en el proceso de fabricación de las mismas. Estas fases sólidas son similares a las empleadas en cromatografía de líquidos, siendo las más utilizadas las de carbón activo, alúmina, gel de

sílice, silicato de magnesio (Florisil), sílices enlazadas (Tabla II.8) y polímeros como el estireno-divinilbenceno. El uso de una u otra fase estacionaria dependerá de la estructura y propiedades del analito así como de la composición de la matriz de la muestra.

Tabla II.8.- Fases estacionarias ligadas a la sílice utilizadas en SPE [Fritz, 1999].

Tipo de fase estacionaria	Representación	Polaridad
Octadecil (endcapped)	C ₁₈ ec	Muy apolar
Octadecil	C ₁₈	Muy apolar
Octil	C ₈	Apolar
Etil	C ₂	Poco polar
Ciclohexil	CH	Poco polar
Fenil	PH	Poco polar
Cianopropil	CN	Polar
Diol	2OH	Polar
Sílice	SiOH	Polar
Carboximetil	CBA	Intercambiador catiónico débil
Aminopropil	NH ₂	Intercambiador aniónico débil
Ácido Propilbencenosulfónico	SCX	Intercambiador catiónico fuerte
Trimetilaminopropil	SAX	Intercambiador aniónico fuerte

Las etapas en una extracción en fase sólida en cartuchos son las siguientes:

- Etapa 1.- Acondicionamiento del cartucho para que esté solvatado. Prepara a la fase sólida para que pueda interactuar mejor con la muestra.
- Etapa 2.- La muestra conteniendo analitos e interferencias pasa a través del adsorbente.
- Etapa 3 y 4.- El adsorbente retiene selectivamente a los analitos y alguna interferencia, mientras que otras interferencias pasan sin ser retenidas.
- Etapa 5.-El adsorbente es lavado con un disolvente selectivo, adecuado para eluir las interferencias retenidas, mientras que los analitos objetos de estudio permanecen en el lecho adsorbente.
- Etapa 6. - Finalmente, los analitos concentrados y purificados con eluidos del adsorbente.

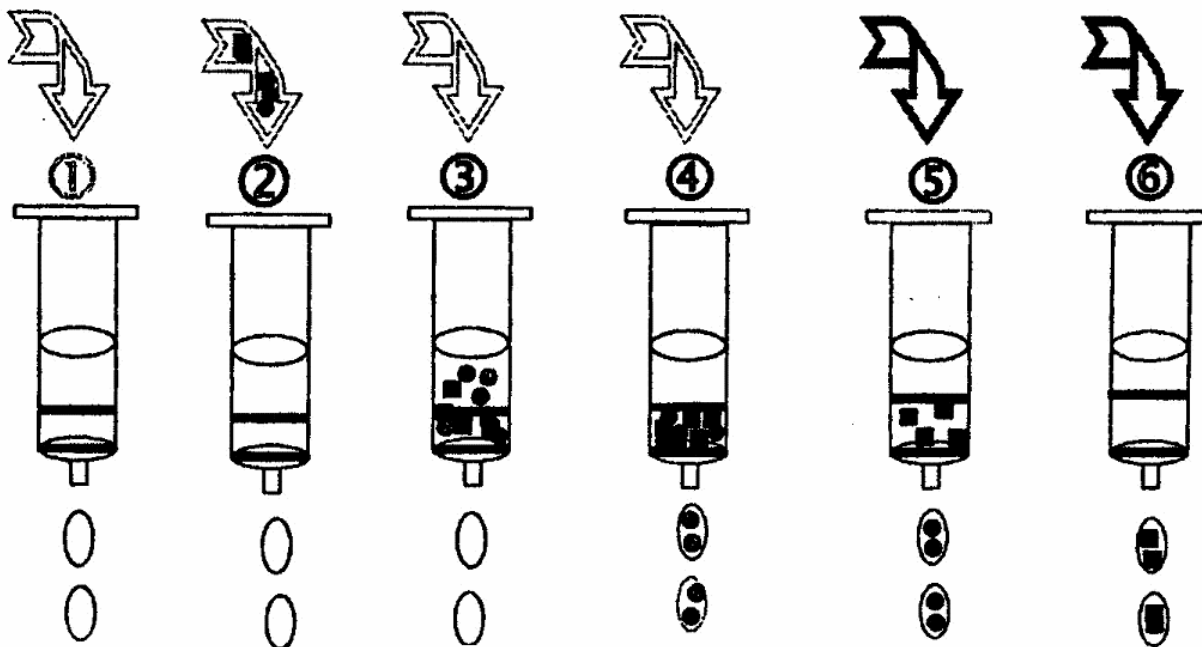


Figura II.2.- Etapas de la extracción en fase sólida

El proceso de separación analito-muestra puede basarse en tres fenómenos distintos:

- **Fase reversa:** el objetivo es separar compuestos no polares desde una muestra de elevada polaridad, por ejemplo agua. Para este tipo de aplicaciones se requieren soportes sólidos relativamente hidrofóbicos, siendo eluidos con una pequeña cantidad de disolvente orgánico.
- **Fase normal:** en esta técnica se quiere aislar compuestos polares de muestras no polares, como por ejemplo aceites, por lo que se emplearán soportes polares para extraer el analito y eluirlo con un disolvente polar.
- **Intercambio iónico:** para extraer compuestos iónicos o que puedan ionizarse con un cambio en el pH. Emplean soportes con grupos intercambiadores de cationes o aniones, dependiendo del analito a retener y se eluye con disolventes orgánicos.

II.4.2.1.- Extracción en fase sólida con adsorbentes poliméricos

La etapa más delicada en el análisis de compuestos orgánicos como los plaguicidas radica en la preparación de la muestra, donde se separan estos compuestos de la matriz para introducirlos en la columna cromatográfica. Esta etapa, denominada fraccionamiento, puede realizarse mediante distintas técnicas; según se seleccione una u otra se aislarán compuestos de muy distinta volatilidad y polaridad. La *inyección directa del vapor* confinado en un recipiente destaca por su sencillez y rapidez.

Por este motivo, se han diseñado técnicas que tratan de solucionar este aspecto manteniendo algunas de sus ventajas. Entre las posibilidades estudiadas, destaca el *arrastré con gas inerte* de los

compuestos volátiles presentes en muestras sólidas, líquidas y gaseosas. Se pueden arrastrar los vapores liberados de un sólido que se calienta (desorción térmica directa) o utilizar un burbujeo de gas inerte en un líquido caliente, o recircular los compuestos presentes en una muestra gaseosa. Las técnicas automáticas que se fundamentan en el arrastre con gas inerte son la desorción térmica automática (ATD) [Valero *et al.*, 1997] y el “Purge & Trap” (Purga y Trampa, arrastre automático con gas inerte) [García-Jares *et al.*, 1995; Thompson *et al.*, 1994]. Su automatización y la ausencia de disolventes orgánicos son características destacables, pero la más importante es la sensibilidad de la técnica debido a la extracción dinámica seguida de preconcentración en una trampa fría que contiene un material extractante. Se emplean sobre todo con compuestos de alta y media volatilidad.

En los últimos años ha surgido un grupo de nuevos dispositivos para fraccionar plaguicidas que se basan en la adsorción sobre un material extractante. La introducción en el cromatógrafo de gases se realiza habitualmente mediante una rápida desorción a alta temperatura en corriente de gas inerte.

II.4.2.1.1.- Absorción vs Adsorción

La interacción entre analito y fase extractante puede transcurrir por un mecanismo de adsorción, cuando el analito se acumula en la superficie del extractante, o por reparto, cuando penetra en su interior [Dabrio, 2000]. El primero de ellos es propio de extractantes sólidos, mientras que el segundo ocurre con líquidos o con sólidos que se comportan en parte como líquidos. Este último caso, recibe el nombre de absorción. Aunque aparentemente tanto la absorción como la adsorción funcionan de manera similar, su fundamento, sus mecanismos y sus resultados son totalmente dispares.

Se puede hablar de adsorción cuando los analitos se concentran fundamentalmente en la superficie del extractante en lugar de en todo su volumen. La adsorción es en la mayor parte de los casos un proceso exotérmico, ya que supone una disminución de la entropía al aumentar el orden del analito por su concentración sobre la superficie del adsorbente. Las interacciones analito-adsorbente son generalmente intensas. El equilibrio muestra-adsorbente depende de las características de éste, incluyendo su superficie, y de la temperatura. Para un adsorbente, soluto y temperatura dados, la cantidad adsorbida varía con la concentración de soluto de acuerdo con diferentes modelos.

Una diferencia destacada en la aplicación práctica de ambos procesos, es la gran influencia que tiene el volumen de la fase en la absorción, mientras que la adsorción depende en gran medida de la superficie del material sin que tenga efecto alguno el volumen. De forma esquemática se puede apreciar esta diferencia entre absorción y adsorción en la figura II.3. En la misma figura se distinguen dos tipos de adsorciones según el tamaño del poro, siendo más beneficiosa la adsorción sobre materiales con poros

más estrechos y ramificados, ya que ofrecen más superficie que aquellos con poros de un mayor tamaño [Lord *et al*, 2000].

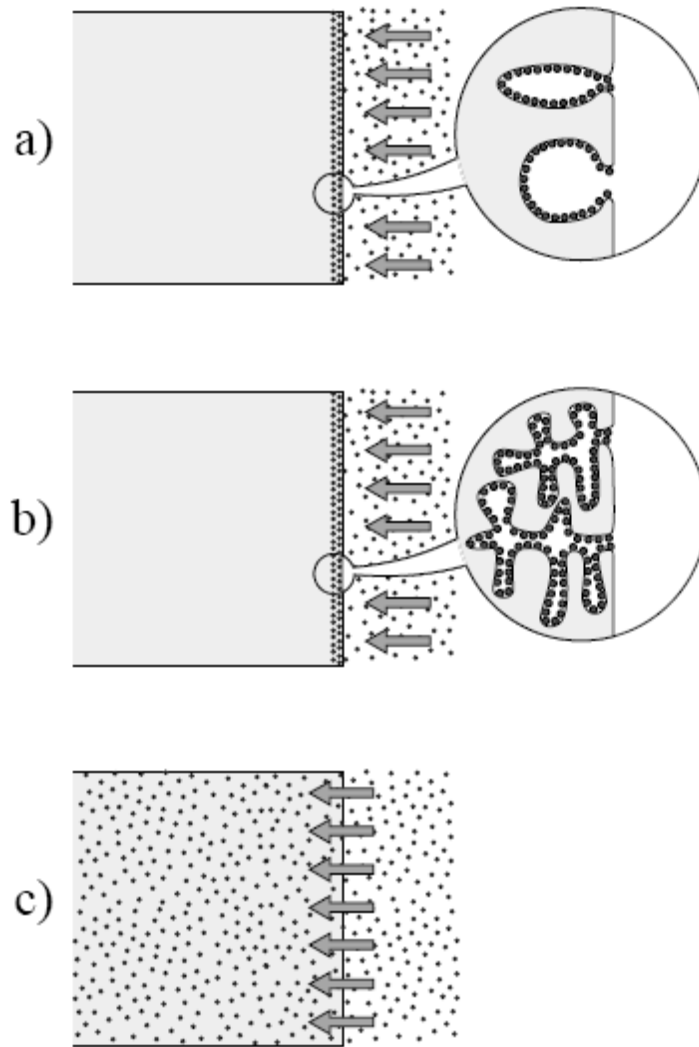


Figura II.3.- Esquema representativo de los mecanismos de: a) adsorción sobre un material con poros grandes, b) adsorción sobre un material con poros pequeños y ramificados, y c) absorción.

La tabla II.9 muestra una lista de los adsorbentes poliméricos más usados hoy en día.

Tabla II.9.- Sorbentes poliméricos empleados en SPE.

Distribuidor	Nombre	Tipo
Hamilton	PRP	PS-DVB
Interaction	MP-1	PS-DVB + C ₁₈
	MP-2	Polivinil piridina
Lab. Instruments	MP-DVB	PS-DVB
	Ostion SP-1	PS-DVB
	Synachrom	PS-DVB-EVB
	Spheron MD	Metacrilato-DVB
Polymer Labs.	PLRS-S	PS-DVB
Supelco	XAD-2	PS-DVB
	DAX-8	Polimetacrilato
	CG	PS-DVB
	Tenax CG	Poli (2,6-difenil-p-fenilenóxido)
Waters	Tenax TA	
	Oasis	Poli-DVB-vinylpirrolidona

PS, poliestireno; DVB, divinilbenceno; EVB, etilvinilbenceno

II.4.2.1.2.- Factores experimentales importantes en SPE con adsorbentes poliméricos

Muchos son los factores que influyen en el proceso de extracción y desorción de esta técnica. Su conocimiento es fundamental para cualquiera que haga uso de la misma.

- **Tiempo de extracción y de desorción**

Los tiempos de extracción y de desorción son dos variables importantes que deben ser controlados de forma rigurosa para que la reproducibilidad de la técnica sea buena. De manera general, tanto la eficiencia de la extracción como de la desorción aumentan con el tiempo. En lo que al tiempo de extracción se refiere, llega un momento en el que ésta es máxima (tiempo de equilibrio) y no se extrae más analito. Estos tiempos de equilibrio pueden llegar a ser largos, sin embargo no es necesario trabajar con tiempos tan largos siendo posible trabajar en condiciones de no equilibrio, en cuyo caso se debe controlar rigurosamente el tiempo de extracción, dado que pequeñas variaciones en el mismo pueden provocar variaciones importantes en el porcentaje de analito extraído [Rodríguez *et al*, 2003].

- **pH**

El empleo de soportes basados en polímeros orgánicos, además de ser estables en todo el rango de pH, presentan una mejor eficiencia a la hora de extraer compuestos orgánicos, debido a su mayor área superficial. [Fritz, 1999].

- **Fuerza iónica**

Normalmente se añade a la muestra una sal con el objeto de disminuir la solubilidad de los analitos en la misma y favorecer el paso de estos hacia el polímero. Este efecto de “*salting-out*”, bien conocido en técnicas como LLE, afecta a cada compuesto de forma específica. Las sales más utilizadas con este fin son el cloruro de sodio, bicarbonato de sodio, carbonato de potasio y el sulfato de amonio.

- **Agitación**

En general, la agitación acelera la transferencia de los analitos hacia el polímero. Cuando se trata de matrices líquidas, compensa los bajos coeficientes de difusión propios de las mismas. El tiempo de equilibrio disminuye al aumentar la velocidad de agitación, pero una agitación muy rápida puede provocar falta de reproducibilidad y de precisión e incluso no permitir que los compuestos queden retenidos [Rodríguez *et al*, 2003].

- **Temperatura**

La temperatura tiene efectos contrapuestos sobre la extracción. Por un lado, un aumento de la misma provoca un incremento de los coeficientes de difusión de los analitos en la muestra, aumentando así la cantidad de analito extraído y disminuyendo el tiempo de extracción [Martos *et al*, 1997]. Por otro lado, el aumento de la temperatura favorece la desorción de los analitos, con lo que es preciso buscar un valor óptimo que minimice este último. En principio, es recomendable calentar ligeramente la muestra y estudiar la influencia de la temperatura [Sakamoto *et al*, 2004].

II.5.- Métodos de extracción para muestras sólidas

II.5.1.- Extracción líquido-sólido

El empleo directo de disolventes para la extracción de analitos de muestras medioambientales es uno de los métodos de extracción más antiguos y usados en química analítica [Dean, 1998]. Podemos clasificar estos métodos en dos grupos: aquellos que necesitan un aporte de calor (Soxhlet) y aquellos que no necesitan calor, pero necesitan algún tipo de agitación (agitación o sonicación).

II.5.1.1. - Agitación

Es la extracción más simple, que consiste en introducir muestra y disolvente en un recipiente adecuado y agitar durante un determinado tiempo. Existe una gran variedad de agitadores comerciales, que permiten distintas formas de agitación circular, como el agitador vortex. Por lo general después de esta agitación se necesita separar la muestra del disolvente a través de una etapa de filtración o centrifugación, dependiendo de la muestra se puede conseguir la separación del extracto insoluble por una simple decantación.

Una modalidad en este tipo de extracción es la extracción por ultrasonidos o sonicación, que emplea ondas sonoras para producir la agitación de la muestra en el disolvente. Para ello, se puede emplear tanto una sonda como un baño generador de ultrasonidos, repitiendo el proceso dos o tres veces más.

II.5.1.2. - Soxhlet

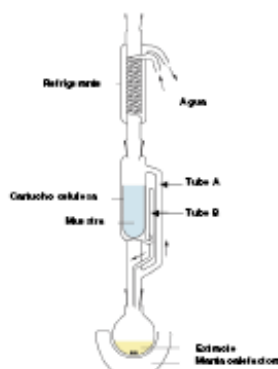


Figura II.4.- Esquema de un extractor Soxhlet.

La extracción Soxhlet fue introducida a mitades del siglo XIX y desde entonces siempre se ha considerado como método de referencia para asegurar la eficiencia de extracción de cualquier nueva metodología. Para su funcionamiento la muestra se introduce en un cartucho poroso de celulosa, que actúa como filtro, acompañada de la misma cantidad de sulfato sódico anhidro. Este cartucho se coloca en el

interior del tubo Soxhlet, como indica la figura II.4, en el matraz de fondo redondo se introduce el disolvente orgánico, que al aplicar calor se evapora, llegando al refrigerante por el tubo A y destilando encima del cartucho que contiene la muestra. El disolvente va llenando lentamente el compartimiento de la muestra hasta llegar al nivel del tubo B, que por efecto sifón arrastra todo el extracto de la muestra de vuelta al matraz. Este ciclo se repite varias veces, obteniéndose siempre una extracción de la muestra con disolvente puro. Esta técnica requiere largos tiempos de extracción entre 3 y 48 horas.

II.5.2.- Extracción asistida por microondas (MAE)

La extracción asistida por microondas (MAE, microwave-assisted extraction) emplea radiación electromagnética de microondas para desorber el analito de su matriz. De toda el espectro electromagnético, solo se considera radiación de microondas a aquella cuya longitud de onda que esté comprendida entre 0.3 mm y 1 m, con frecuencias de 100 GHz a 300 MHz, esto sitúa a éste tipo de radiación entre las ondas de radio y la zona infrarroja. A pesar del amplio rango de frecuencias posibles, los hornos microondas comerciales, tanto domésticos como científicos, solo trabajan a frecuencias de 2450 MHz [Dean, 1998].

II.5.2.1. - Calentamiento por microondas

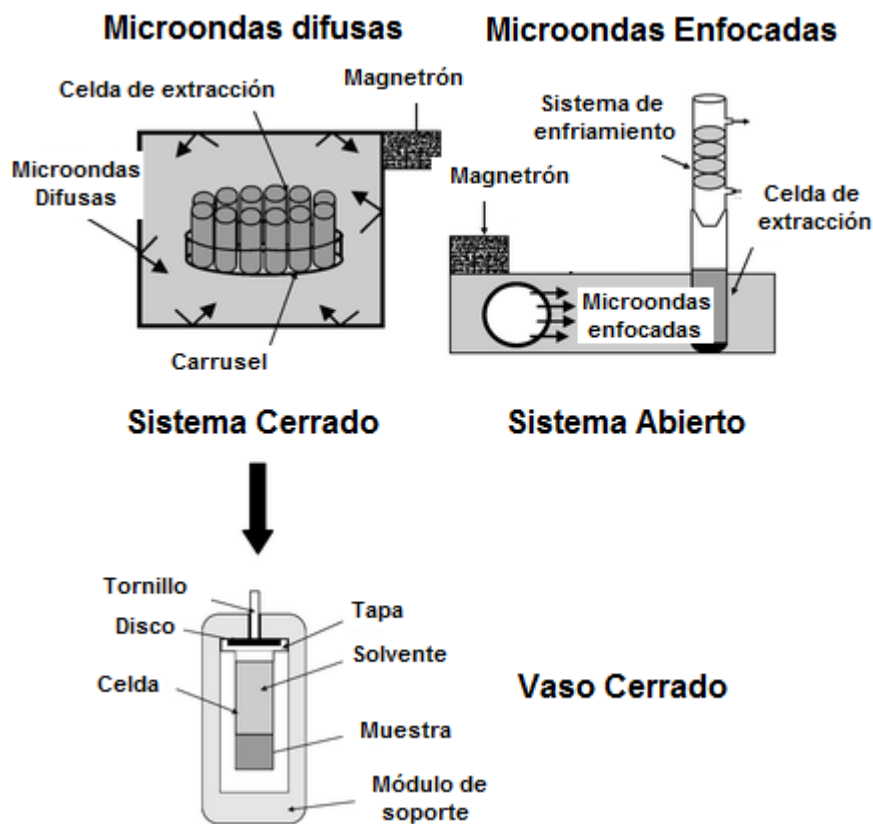


Figura II.5.- Principio del sistema de extracción asistida por microondas

El principio por el cual se produce calentamiento al emplear energía de microondas puede ser por conducción iónica o por rotación bipolar, produciéndose ambos mecanismos simultáneamente en multitud de ocasiones (figura II.5). La conducción iónica es la migración electroforética de los iones al aplicar un campo electromagnético, este flujo de iones provoca fricción debido a la resistencia que ejerce el disolvente y produce calentamiento. La rotación bipolar es el realineamiento de dipolos con el campo aplicado, así que empleando una frecuencia de microondas de 2450 MHz, se produce un alineamiento de los dipolos de $4.9 \times 10^9 \text{ s}^{-1}$, siendo este movimiento molecular el que produce el calentamiento. La gran diferencia que presenta este tipo de calentamiento con los sistemas convencionales, consiste en que el calentamiento se produce en el seno de la disolución y no por convección desde una fuente externa, produciendo un calentamiento mucho más homogéneo y eficaz.

La capacidad de un disolvente para absorber energía de microondas y comunicarla a otras moléculas presentes en él depende de su factor de disipación.

El factor de disipación ($\tan \delta$) de un disolvente es el cociente entre su pérdida dieléctrica (ϵ''), la eficiencia en convertir la energía microondas en calor, y su constante dieléctrica (ϵ'), la polarizabilidad de una molécula en un campo magnético [Sparr Eskilsson 2000]. Las moléculas polares y los ácidos absorben esta energía muy intensamente, debido a que poseen un momento dipolar permanente que es afectado por las microondas, sin embargo disolventes no polares, como el hexano o el tolueno, no se calientan en presencia de microondas. La tabla II.10 muestra la constante dieléctrica de los disolventes más usados en MAE [MLS].

Tabla II.10.- Constante dieléctrica (ϵ') y temperatura de ebullición de los principales disolventes usados en MAE. [MLS]

Disolvente	ϵ'	Temperatura de ebullición(°C)
Agua	80.1	100.0
Acetonitrilo	37.5	81.6
Metanol	32.6	64.6
Etanol	24.3	78.2
Acetona	20.7	56.0
Ciclohexanona	18.3	155.4
Tolueno	2.3	110.6
Hexano	1.9	68.7

Esta extracción se puede realizar a presión elevada o a presión atmosférica, dependiendo si el reactor esté cerrado o abierto. Si se realiza en reactores cerrados, se pueden hacer extracciones a temperaturas superiores a la de ebullición del disolvente empleado, mejorando la eficiencia e incrementando la velocidad de la extracción.

Existen tres mecanismos por los cuales se produce la extracción de un analito de una muestra empleando microondas [Jassie, 1997]:

- **Mecanismo I:** la muestra se sumerge en un disolvente o mezcla de ellos que absorban intensamente la energía de las microondas y produzcan un calentamiento.
- **Mecanismo II:** la muestra se puede extraer combinando disolventes polares que absorban las microondas, y apolares que extraigan el analito. Una alternativa consiste en el uso de barras de polímero fluorado inerte (Carboflon o Weflon) como agitadores magnéticos en el interior del reactor, que además de mejorar la extracción del analito por la agitación interna, absorben la energía de las microondas y transfieren el calor al disolvente.
- **Mecanismo III:** en aquellas muestras que sean capaces de absorber microondas, sobre todo aquellas con elevado contenido en agua, podemos emplear disolventes transparentes a las microondas para extraer el analito, ya que la propia muestra es la que calentará al disolvente.

II.5.2.2. - Elección del disolvente

La elección del disolvente más adecuado es esencial para obtener un óptimo proceso de extracción, entre las propiedades físicas del disolvente tenemos que considerar principalmente: su capacidad de absorción de microondas, su interacción con la matriz de la muestra y la solubilidad del analito en él. Interesa que el disolvente posea una gran selectividad y de esta forma extraer la mayor cantidad posible de analito y la menor cantidad de matriz de la muestra. Otro parámetro importante es la compatibilidad del disolvente empleado con la siguiente etapa del proceso analítico, generalmente una etapa de limpieza del extracto, para evitar tediosos procesos de evaporación y/o cambios de disolventes.

Podemos clasificar los disolventes más empleados, para la extracción de compuestos orgánicos, según cuál sea su mecanismo de calentamiento. De esta forma en el Mecanismo I, se emplea: agua para la extracción de Atrazina de suelos [Xiong, 1998], tetrahidrofurano para extraer pesticidas organoclorados en sedimentos [Silgoner, 1998] o tampones acuosos de pH=10 para la extracción de herbicidas de Imidazolinona de suelos [Stout, 1996]. En el Mecanismo II, la mezcla más usada es acetona:hexano (1:1), por ejemplo para la extracción de 95 compuestos semivolátiles orgánicos marcados por la EPA [Lopez-Avila, 1995] y fenoles de suelos [Egizabal, 1998] o extracción de PAH de partículas atmosféricas [Piñeiro-Iglesias, 2000]. Otras mezclas de disolventes empleadas, que producen calentamiento por el Mecanismo II, son: etil acetato-ciclohexano (1:1) para la extracción de organoclorados de pescados [Weichbrodt, 2000] o el uso de tolueno que se calienta con una pequeña cantidad de agua (10 %) para la extracción de PCBs, PAHs y organoclorados de sedimentos [Pastor, 1997]. En el caso de muestras con elevado contenido en agua (Mecanismo III), existen metodologías que emplean distintos disolventes

orgánicos, invisibles a las microondas, para la extracción de aceites esenciales de plantas [Paré, 1994].

II.5.2.3. - Volumen de disolvente

La cantidad de disolvente empleado para la extracción de una muestra está comprendido entre 10 y 30 mL. Este volumen debe ser suficiente para cubrir en su totalidad a la muestra, sobre todo en aquellos casos en los que la muestra pueda hincharse. Lógicamente el volumen de disolvente a emplear vendrá relacionado con la cantidad y volumen de muestra a extraer. En un estudio de la extracción de hidrocarburos en muestras de sedimentos, empleando 1-15 gramos de muestra y entre 10 y 30 mL de disolvente, se llegó a la conclusión de que la relación cantidad de muestra-volumen de disolvente no debería de ser mayor del 30 % [Vázquez Blanco, 2000]. Generalmente, en otras técnicas de extracción al aumentar el volumen de disolvente también aumenta la extracción del analito, pero varios estudios demuestran que en MAE el empleo de un exceso de disolvente puede disminuir la extracción de los analitos, por ejemplo en la extracción de: PCBs y PAHs en lodos y sedimentos [Enders, 1996; Chee, 1996a].

II.5.2.4. - Temperatura y tiempo de extracción

Es uno de los parámetros más estudiados, no solo en MAE, sino también en cualquier otra técnica de extracción, debido a que a mayor temperatura de trabajo se obtiene una mayor eficiencia en la extracción. Esto es debido a que al aumentar la temperatura el disolvente tiene mayor capacidad para disolver el analito, además disminuye su tensión superficial y su viscosidad [Sparr Eskilsson, 2000].

Las temperaturas de trabajo suelen ser de 100 a 150 °C, obteniéndose recuperaciones elevadas en tiempos muy cortos, pero para ello hay que asegurarse de que el analito a determinar sea estable en estas condiciones de temperatura y presión. Entre el gran número de familias de compuestos orgánicos que son estables, tanto a la radiación de microondas, como a su extracción a alta temperatura se encuentran los contaminantes: LAHs, PAHs, PCBs, fenoles y polibromados entre otros [Yusà, 2006a; Lopez-Avila, 1998] y pesticidas organoclorados [Lopez-Avila, 1994], piretroides [Sanusi, 2004], triazinas [Hoogerbrugge, 1997], organofosforados [Lopez-Avila, 1995], etc. En el caso de compuestos termolábiles, se pueden emplear temperaturas más suaves, como por ejemplo para extraer herbicidas derivados de la sulfonilurea en suelos se emplean temperaturas inferiores a 70 °C [Font, 1998] o para extraer aminoácidos en alimentos se emplean temperaturas entre 40 y 80 °C [Kovács, 1998]. Para la extracción de compuestos de polímeros, establecer la temperatura de extracción es aún más importante, ya que a temperaturas elevadas se favorece la permeabilidad del polímero al disolvente, mejorando

considerablemente la eficiencia en la extracción [Marcato, 2000], pero el uso de temperaturas demasiado altas puede provocar una excesiva extracción de matriz o incluso la fusión total o colapso del polímero.

Los tiempos de extracción empleados en MAE son significativamente más cortos que empleando técnicas convencionales. En general se consiguen recuperaciones cuantitativas en tiempos cercanos a los 10 minutos, aunque existen estudios que en tan solo 3 minutos consiguen extraer pesticidas en suelos y sedimentos [Lopez-Avila, 1994; Chee, 1996b]. El empleo de tiempos de extracción superiores no mejora la extracción de los analitos, así por ejemplo para la extracción de herbicidas derivados de la sulfonilurea en suelos, se obtienen prácticamente las mismas recuperaciones en 5 que en 30 minutos de extracción [Font, 1998]. El mismo comportamiento se observa en la extracción del fungicida Dimetomorph de suelos, en el que no hay apenas diferencias de recuperación al extraer durante 3 o 45 minutos [Stout, 1998]. En la extracción de compuestos termolábiles, un excesivo tiempo de extracción puede provocar la degradación de los analitos [Pylypiw, 1997].

II.5.2.5. - Influencia de otros parámetros en el proceso de extracción

Aunque en menor medida que los parámetros citados anteriormente, la extracción de un analito puede verse modificada por:

- **La cantidad de agua o humedad que posea la muestra:** ya que el agua absorbe fuertemente la energía de microondas y puede producir un sobrecalentamiento durante la extracción.
- **La potencia del magnetrón:** según el disolvente que se emplee y sobretodo del número de reactores que extraigamos simultáneamente, necesitaremos aplicar una potencia determinada. Si es insuficiente no se alcanzará la temperatura de extracción y si es muy superior, se produce el llamado efecto “bumping”, que consiste en un calentamiento brusco y no homogéneo en el tiempo, con radiaciones muy energéticas, seguidas de largos tiempos con radiación prácticamente nula [Zuloaga, 2000].

II.5.2.6. - Equipos comerciales

Los componentes esenciales de cualquier horno microondas son: un generador de microondas, también llamado magnetrón, una guía de ondas, una cavidad resonante y una fuente de energía. Los reactores en los que se introduce la muestra y se realiza la extracción, ver figura 1.12, están fabricados con materiales transparentes a las microondas, como por ejemplo Teflón o tetrafluoroetileno. En uno de estos reactores se suele introducir un tubo para medir la presión o una sonda de fibra de vidrio para medir la temperatura, de esta forma se monitorea el proceso y el sistema regula la potencia del magnetrón para obtener la temperatura o presión requerida.

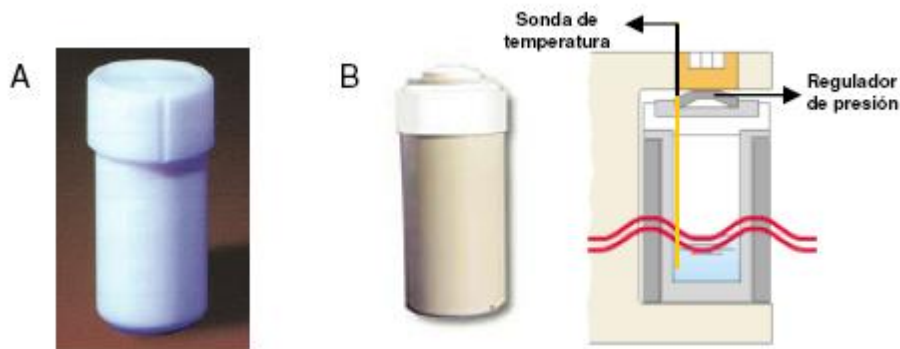


Figura II.6.- Reactores empleados en MAE. (A, en hornos microondas convencionales; B, en hornos de laboratorio)

La gran diferencia de precio entre hornos microondas domésticos y específicos de laboratorio para realizar extracciones con disolventes orgánicos, radica en las medidas de seguridad para el operador, ya que evitan fugas de radiación de microondas, explosiones en presencia de disolventes orgánicos, así como permiten una mayor durabilidad del magnetrón [Dean, 1998]. Entre las múltiples casas comerciales que fabrican equipos de extracción por microondas, solo CEM (Matthews, EEUU) con su equipo MARS-5 y Milestone (Soriso, Italia) con el Ethos SEL, permiten realizar extracciones asistidas por microondas con disolventes orgánicos, el resto solo se pueden emplear para digestiones con ácidos y por motivos de seguridad, según el fabricante, no es recomendable para realizar extracciones [Erickson, 1998].

II.6. - Limpieza de extractos

La determinación de contaminantes orgánicos, presentes en niveles traza en muestras medioambientales o alimentos, requiere de un proceso de purificación o limpieza del extracto con el que se consiga separar los analitos a determinar de las especies interferentes y que además se obtenga una recuperación cuantitativa de todos ellos. Las especies interferentes presentes en este tipo de muestras son generalmente compuestos de elevado peso molecular, como lípidos, polímeros o pigmentos, que imposibilitan la posterior determinación cromatográfica (tanto por GC como por HPLC). Las metodologías más frecuentemente empleadas para la limpieza de extractos cromatográficos son: extracción líquido-líquido, extracción en fase sólida y cromatografía de permeación en gel.

II.6.1. - Extracción líquido-líquido

Este procedimiento, también denominado *partición con disolventes*, se emplea comúnmente en la limpieza de extractos. La partición con hexano-acetonitrilo es uno de los métodos más empleados para la eliminación de grasas o aceites de extractos con alto contenido lipídico. El procedimiento es muy simple y consiste en disolver este extracto graso en hexano, que se extrae repetidas veces con acetonitrilo, estos disolventes son inmiscibles y forman dos fases bien separadas. Además el acetonitrilo es un mal disolvente para las grasas, pero sin embargo disuelve, con mayor avidez que el hexano, una gran variedad de contaminantes orgánicos, como PCBs, PAHs y multitud de plaguicidas.

Esta metodología sola o combinada con otra técnica es comúnmente empleada en multitud de procedimientos, como por ejemplo: en la determinación de PAHs y multiresiduos de pesticidas en aceite oliva se emplea una partición con acetonitrilo-hexano para extraer estos compuestos de la matriz [Guardia-Rubio, 2006; García Sánchez 2006], en la determinación de dioxinas en matrices biológicas por PFE se emplea partición con dimetil sulfóxido, acetonitrilo y hexano para eliminar compuestos grasos [Kitamura, 2004] o en la determinación de alquifenoles en peces y moluscos se extrae con acetonitrilo y se emplea una partición con hexano para eliminar los restos grasos de la matriz [Tsuda, 2000].

II.6.2. - Extracción en fase sólida

Al igual que en el apartado interior, este método de extracción también es ampliamente utilizado como proceso de limpieza de extractos. Las fases sólidas más empleadas para realizar SPE en fase normal son generalmente adsorbentes inorgánicos polares, como: gel de sílice, alúmina o florisil (gel de sílice de magnesio). Estos soportes retienen muy fuertemente los compuestos orgánicos hidrofílicos y en menor medida los compuestos hidrofóbicos. El proceso de elución se realiza con un disolvente hidrofóbico, como

por ejemplo hexano, al que se van añadiendo pequeñas cantidades de modificador, que suele ser un disolvente más hidrofílico, produciéndose una separación paulatina de los compuestos según su hidrofobicidad. También se pueden emplear soportes hidrofóbicos como carbón grafitizado o fases orgánicas unidas a sílice como la C18, donde se retienen los compuestos muy lipofílicos eluyendo el resto.

Generalmente las fases sólidas polares (sílice, alúmina y florisil) requieren de un proceso de activación, en el que empleando temperaturas de 300-350 °C se eliminan las moléculas de agua que bloquean los puntos polares activos del soporte sólido. Esta activación mejorando considerablemente la reproducibilidad ya que de esta forma siempre habrá el mismo número de puntos activos por gramo de soporte, sin depender de la humedad que haya podido captar del medio.

Cuando se emplea alúmina, además de la activación a elevada temperatura, también se requiere de una desactivación del soporte, que se consigue añadiendo pequeñas cantidades de agua, para bloquear de una forma controlada el número de puntos activos de la alúmina y de esta forma ajustar la capacidad de retención del soporte a nuestro analito.

El empleo de la extracción en fase sólida como método para realizar la limpieza de extractos cromatográficos está ampliamente extendido para la determinación de multitud de analitos en matrices de distinta índole. A continuación citaremos algunos ejemplos del uso de SPE en el análisis de plaguicidas, como: en la determinación de Endosulfan y derivados en suelos, tras una extracción PFE se emplea un tratamiento con florisil para limpiar el extracto [Hussen, 2006]; en la determinación de 21 plaguicidas por MAE en suelos, el extracto se purifica empleando fases de florisil y alúmina como adsorbente [Barriada-Pereira, 2003], en la determinación de organofosforados en tejidos animales tras una partición con disolventes se limpia el extracto con un cartucho de C18 [Pagliuca, 2005] o finalmente en la determinación de piretroides en mantequilla y aceites vegetales se usan cartuchos de carbón grafitizado [Ramesh, 1998].

II.6.3. - Cromatografía de permeación en gel

Esta técnica fue inicialmente desarrollada para determinar la distribución de pesos moleculares de polímeros y consiste en la separación de los distintos compuestos de una mezcla por tamaño, mediante un proceso de partición entrópica en una matriz porosa. Se denomina cromatografía de permeación en gel (GPC, Gel permeation chromatography) aunque a veces es también conocida como cromatografía de exclusión por tamaños (SEC, size exclusion chromatography). La técnica consiste en una cromatografía líquida convencional que emplea columnas de un material macroporoso, generalmente de copolímero poliestireno-divinilbenceno, que es mecánicamente fuerte y puede soportar presiones y flujos elevados.

Como fase móvil es muy común el empleo de diclorometano o tetrahidrofurano, pero debido a su peligrosidad tanto para el operador como para el medio ambiente, se suele sustituir por alcanos, tanto cíclicos como lineales. El uso de modificadores como metanol, acetato de etilo o metil tert-butil éter es frecuente para ajustar las condiciones de elución. La figura 1.14 muestra el proceso de separación de la GPC y un dibujo de la estructura macroporosa de la fase estacionaria. Esta metodología se considera universal, debido a que se puede emplear en todo tipo de muestras y analitos, ya que la separación se produce única y exclusivamente por interacciones físicas [Fernández-Moreno, 2006].

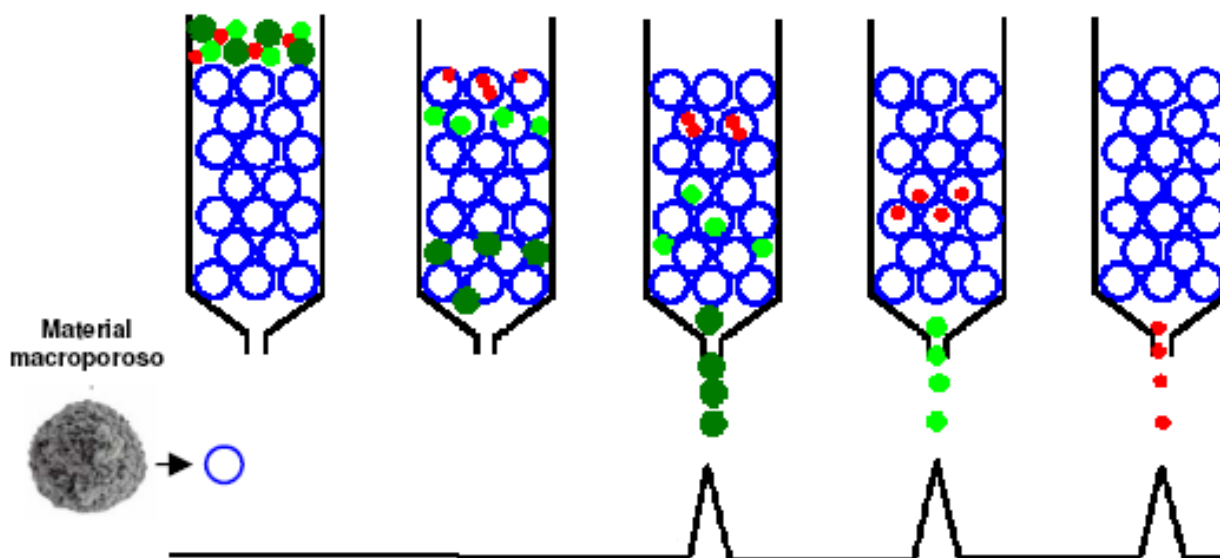


Figura II.7.- Esquema del proceso de separación empleando GPC.

Existen multitud de metodologías analíticas que emplean la GPC como etapa de limpieza de extractos, sobretodo en matrices muy grasas como alimentos, ya que los tiempos de elución de los triglicéridos son muy distintos de los principales contaminantes orgánicos, de esta forma se emplea en la determinación de PAH en aceite de orujo de oliva [Martínez-López, 2005] o en la determinación de compuestos organohalogenados en tejido adiposo [Saito 2004]. En el caso de suelos y sedimentos, la GPC también es capaz de separar el azufre coextraído de la muestra que interfiere en la determinación cromatográfica. En el análisis de pesticidas también existen precedentes como por ejemplo en análisis de multiresiduos de pesticidas en aceite de oliva [Guardia-Rubio 2006] o en tejidos animales [Garrido-Frenich 2006]. La gran aceptación de esta metodología es debida a su fácil manejo, versatilidad y simplicidad del proceso, además de obtener recuperaciones cuantitativas.

Se han descrito distintas metodologías en las que se acopla directamente GPC con un cromatógrafo de gases, empleando como interfase dos válvulas de 6 vías, para la determinación de pesticidas organofosforados en aceite de oliva [Vreuls, 1996]. Del mismo modo existen algunos casos de

acoplamiento directo entre GPC y HPLC en fase normal, a través de una previa evaporación del disolvente, para la determinación de PCBs y OCPs en muestras grasas y medioambientales [Rimkus, 1996].

A menudo una simple limpieza de extractos por GPC, no es suficiente para eliminar completamente los residuos de grasa, por ello se suele combinar la GPC con otro sistema de separación como SPE, para que la separación de los compuestos se produzca por dos fenómenos primero por tamaño y después por polaridad. Ejemplos de ello son: la limpieza de extractos de tejido humano por GPC seguida de SPE con sílice para determinar compuestos clorados [Saito, 2004], la limpieza de extractos de matrices biológicas con GPC y SPE con LiChrolut EN para medir PAHs nitrogenados [Dusek, 2002] o la limpieza de extractos de vegetales con GPC y SPE con una mini columna de Florisil y sílice para determinar pesticidas nitrogenados y fosforados [Ueno, 2003].

II.7.- Cromatografía de gases

La Cromatografía de gases (GC) es una técnica analítica de separación que ha experimentado un gran desarrollo desde sus inicios. Además, sus posibilidades han ido ampliándose a medida que se ha mejorado la instrumentación (columnas capilares, integradores computarizados, sistemas de gradientes de temperatura, nuevos detectores, etc.). Esta técnica cromatográfica es la que ofrece mejor poder de resolución para los plaguicidas. Su principal limitación se encuentra en la labilidad de los solutos, los cuales deben ser estables a las temperaturas requeridas para su volatilización.

En GC la fase móvil es un gas, mientras que la fase estacionaria puede ser un sólido adsorbente, un líquido retenido en un soporte sólido (como es el caso de las columnas empaquetadas) o un líquido impregnado en la pared interna de una columna capilar. LA GC actúa globalmente como instrumento, ya que realiza tanto la separación como las determinaciones cualitativas y cuantitativas de los compuestos en estudio. Por tanto, se encuadra dentro de las técnicas de separación que tienen incorporado un sistema de detección. En GC, la mezcla a separar, una vez volatilizada, se hace pasar a través de la columna con la ayuda de un gas inerte, basándose la separación en la distinta velocidad de los compuestos a su paso por ésta, los cuales van llegando a continuación al sistema de detección. Las señales del detector se registran adecuadamente obteniéndose una serie de picos que constituyen un cromatograma. La posición de los picos (tiempo de retención) se utiliza con fines cualitativos mientras que el área o la altura de los mismos se relaciona con la concentración de los compuestos.

II.7.1- Componentes de un Cromatógrafo de gases

Los componentes de un cromatógrafo son:

- **Sistema de suministro de gas portador:** generalmente es un cilindro de gas a presión, con un monorreductor a la salida y con un sistema de regulación y medida del caudal. Su misión es llevar la mezcla de los solutos desde que se introduce en el sistema cromatográfica hasta la salida del detector, pasando a través de la columna donde se produce la separación. Debe ser químicamente inerte y no interaccionar ni con la columna ni con los componentes de la mezcla.
- **Sistema de introducción de la muestra:** cuya configuración varía en función del estado físico de la misma y el tipo y capacidad de la columna utilizada. Este sistema pone en contacto la muestra con la corriente de gas portador.
- **Sistema de control de la temperatura:** Existen tres zonas del cromatógrafo donde esta variable debe controlarse: la zona de inyección, en la columna y el detector. Desde el punto de vista de separación cromatográfica, es en la columna donde mayor incidencia tiene esta variable, ya que de

ella depende el éxito de la separación. Para controlar la temperatura de la columna, ésta está situada en el denominado “horno” del cromatógrafo, que dispone de un sistema de calefacción eléctrico con un sistema de ventilación adecuado, regidos ambos por un sistema electrónico.

- **Columna:** se trata del componente principal del cromatógrafo, ya que es donde se produce la separación de los compuestos. En ella se encuentra la fase estacionaria (líquida o sólida). Presenta distintas medidas o tamaños según el tipo de aplicación.
- **Sistema de detección:** situado a la salida de la columna. A través de él pasa el gas portados con los compuestos ya separados. Cada vez que pasa un compuesto se genera una señal eléctrica que es amplificada adecuadamente.
- **Registrador:** al que llega la señal eléctrica amplificada y da lugar al cromatograma. A partir del mismo se obtienen los datos cualitativos y cuantitativos.
- **Integrador-computador:** es el sistema informático incorporado al cromatógrafo para la toma y tratamiento de los datos. Realiza automáticamente las operaciones de integración de los picos, medida de los tiempos de retención, cálculos con estándares e imprime el informe final del análisis.

La inyección cromatográfica es un parámetro importante a valorar, ya que la precisión del proceso cromatográfico viene determinada por la calidad de la inyección. Las formas de inyección más comunes son:

- **“Split” o división de flujo,** donde una vez volatilizada la muestra se despreja una fracción del volumen inyectado, por lo que frente a otros tipos de inyección requiere una superior concentración del extracto.
- **“Splitless” o flujo sin dividir,** donde una vez volatilizada, toda la muestra pasa a la columna.

La inyección más utilizada tradicionalmente en el análisis de compuestos orgánicos es en Split. Las razones son varias: su sencillez, da bandas cromatográficas más estrechas, permite introducir muestras “sucias” y los tiempos de retención que se obtienen son muy reproducibles.

Ahora bien, la inyección en Split obliga a desprejar la mayor parte de la muestra inyectada, por lo que comparando con otras técnicas de inyección, requiere una concentración de extracto superior.

La inyección en Splitless evitaría tener que concentrar la muestra de forma tan exhaustiva.

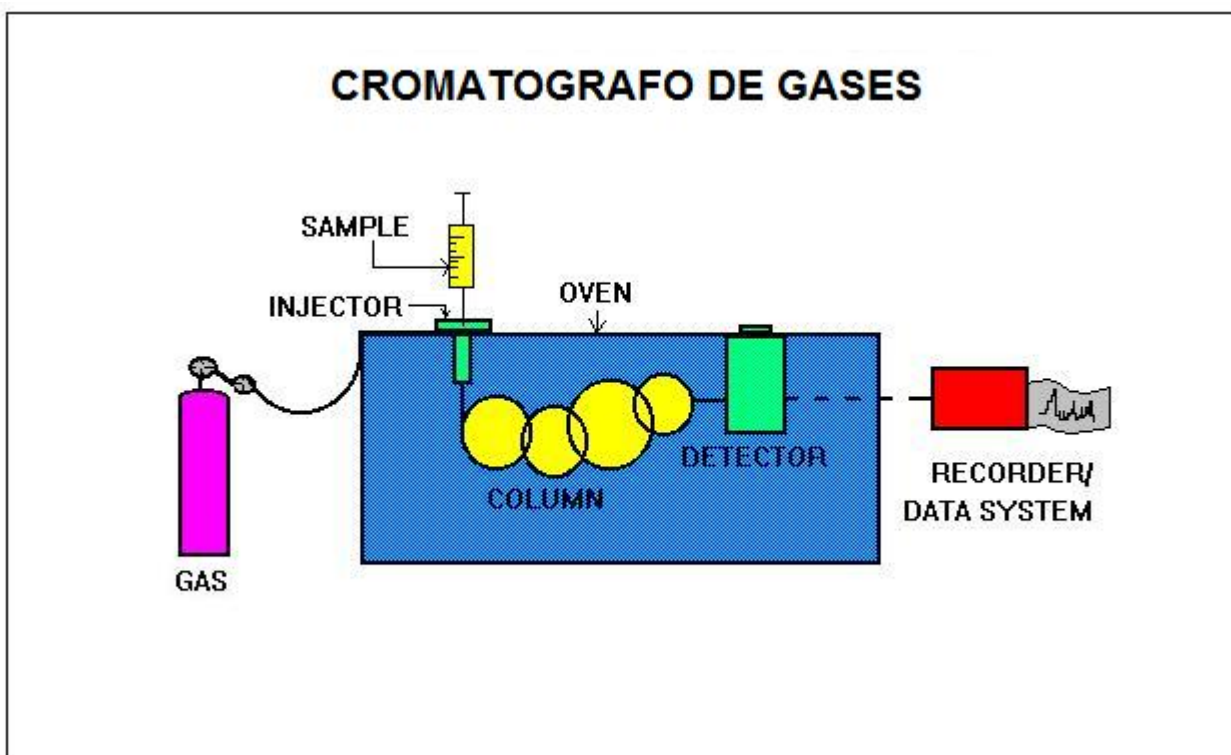


Figura II.8.- Esquema de un cromatógrafo de gases.

II.8.- Validación del método analítico

Millones de mediciones analíticas se realizan diariamente en miles de laboratorios alrededor de mundo. El costo de realizar estas mediciones es elevado y surgen costos adicionales de las decisiones tomadas en base a los resultados. Si el resultado de una prueba no es confiable entonces tiene poco valor y la prueba no debió haberse realizado así. Para que un resultado analítico concuerde con el propósito requerido, debe ser lo suficientemente confiable para que cualquier decisión basada en ésta pueda tomarse con confianza. Así el desempeño del método debe validarse.

La estandarización de un método analítico es un proceso riguroso que dependiendo de la técnica analítica a la que pertenezca el método, la matriz, el analito, la cantidad de parámetros de estandarización y de la logística empleada para su desarrollo, puede requerir de un tiempo más o menos considerable. Mediante la aplicación del protocolo de estandarización se desea obtener de forma experimental y para las condiciones particulares del laboratorio, los valores de los parámetros que servirán como criterios de confianza del método analítico; estos parámetros son: exactitud, precisión, linealidad, límite de detección, límite de cuantificación y porcentajes de recuperación.

II.81.- Definiciones

- **Validación:** Evidencia experimental documentada de que un procedimiento cumple con el propósito para el que fue diseñado [CENAM, 2005].
- **Matriz:** material en el cual se encuentra la sustancia de interés [CENAM, 2005].
- **Muestra:** Se refiere a cada sistema físico que sea sometido al procedimiento de análisis siguiendo el método que se está estandarizando, ya sea un blanco, un estándar, una muestra adicionada o una muestra real propiamente dicha [Coy, 1999].
- **Blanco:** Es un sistema físico que no contiene muestra real y por consiguiente no debería contener el analito de interés, pero que debe contener todos los reactivos que se utilizan en el método de análisis y ser sometido a las mismas condiciones y al mismo procedimiento que las muestras reales y los estándares [Coy, 1999].
- **Muestra adicionada:** Es una muestra natural o real a la cual se le ha adicionado una cantidad conocida del analito que se estudia [Coy, 1999].
- **Linealidad:** Capacidad de un método analítico, en un intervalo de trabajo, para obtener resultados que sean directamente proporcionales a la concentración del analito en la muestra [Coy, 1999].
- **Curva de Calibración:** Representación gráfica de la señal de medición como una función de la cantidad de analito [CENAM, 2005].
- **Calibración:** Conjunto de operaciones que determinan, bajo condiciones específicas, la relación entre los valores indicados por un instrumento o sistema de medición, o los valores representados por una medición material y los valores conocidos correspondientes a un patrón de referencia [Coy, 1999].
- **Corrida analítica:** Conjunto de muestras analizadas en forma continua, bajo las mismas condiciones experimentales [Coy, 1999].
- **Exactitud:** Es el grado de aproximación entre el valor obtenido experimentalmente y el valor real o aceptado; normalmente se expresa en términos del error. Se tendrán como referencia los patrones preparados en el laboratorio y por lo menos un patrón externo certificado [Coy, 1999].
- **Precisión:** Indica el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes porciones de una muestra homogénea del producto, se evalúa como repetibilidad y reproducibilidad [Coy, 1999].
- **Repetibilidad:** Precisión de un método analítico que expresa la variación dentro de un mismo laboratorio obtenida entre determinaciones independientes realizadas en las mismas condiciones.

- **Reproducibilidad:** Precisión de un método analítico que expresa la variación obtenida entre determinaciones independientes realizadas en el mismo laboratorio. Pero en diferentes condiciones de análisis, tales como días, equipo, columna o analistas [Coy, 1999].
- **Recuperación:** Es la capacidad que tiene un procedimiento analítico para determinar cuantitativamente una especie química que ha sido adicionada a la muestra. Se expresa como porcentaje de recuperación (%R) [Coy, 1999].
- **Límite de detección:** La mayoría de los criterios coinciden en que el límite de detección se define a partir de la más pequeña cantidad detectable, pero no necesariamente cuantificable bajo las condiciones establecidas de la prueba [CENAM, 2005].
- **Límite de detección instrumental:** Es la mínima concentración del analito que puede ser medida y reportada con 95 % de confianza, misma que es determinada al analizar un patrón o material certificado de referencia [CENAM, 2005].
- **Límite de detección del método:** Es la mínima concentración del analito que, cuando se procesa a través del método completo incluyendo la extracción y/o tratamiento de la muestra, produce una señal con una probabilidad [CENAM, 2005].
- **Límite de cuantificación:** Es la menor concentración que puede ser medida con límites específicos de precisión y exactitud obtenidos en condiciones de operación rutinarias en el laboratorio. El LCM es generalmente de 5 a 10 veces el LDM. Son características de desempeño que marcan la habilidad de un proceso de medición química para cuantificar adecuadamente un analito [CENAM, 2005].

II.9.- Historia del agua superficial y subterránea de Xochimilco

En la zona de los canales de Xochimilco existe un sistema agrícola de alta productividad, las chinampas, que consisten en plataformas de plantación levantadas y separadas por canales. Los agricultores extraen los sedimentos de los canales para preparar camas de semilla, que proporcionan un medio fértil para la germinación. Antes de cada siembra se extiende sobre la superficie del suelo el sedimento del fondo de los canales. A lo largo del tiempo, la chinampa se asienta sobre el fondo de lo que era el sistema lacustre; sus fundamentos de material vegetal se han descompuestos y forman una base porosa y permeable [Bazant, 2001].

El sistema lacustre Chalco-Tláhuac-Xochimilco abastece aproximadamente el 30% de agua subterránea que es utilizada para uso y consumo humano en la Ciudad de México, lo cual representa una porción considerable para el área urbana. El desarrollo acelerado de la zona metropolitana de la Ciudad de México incrementa el problema de suministro de agua de una calidad adecuada, lo que se asocia con el origen de diversos contaminantes. Las actividades agrícolas y pecuarias propician el aporte de fertilizantes, plaguicidas, aunado a la producción de desechos animales y humanos que llegan a los canales alterando la calidad del agua [Mazari, 2004].

En la Delegación Xochimilco se ha realizado una gran explotación forestal y se han incrementado los asentamientos humanos, tanto regulares como irregulares lo que ha alterado el medio ambiente, limitando la cantidad de agua que formaba los manantiales y alimentaba los canales. La extracción continua de agua subterránea, el uso de los ríos y arroyos como drenajes, el entubamiento de importantes ríos, la disminución de zonas boscosas con vegetación original, así como la disminución en la precipitación fluvial han tenido fuerte influencia sobre los sistemas acuáticos que sostenían esta región. En los alrededores se encuentra una zona montañosa que favorece la recarga de agua, sin embargo, el proceso de filtración y recarga de agua es lenta e insuficiente para sustituir la cantidad que se extrae para abastecer a la ciudad. Por lo tanto, parte del volumen de agua se recarga con agua residual tratada, o agua residual sin previo tratamiento causando un problema de calidad del recurso [Cisneros, 2005].

Aunque a partir de 1987 la zona chinampera ha sido declarada como Patrimonio Histórico y cultural de la Humanidad, la región no ha sido protegida adecuadamente. Cada año se invaden terrenos de zonas chinamperas en partes altas para la construcción de viviendas, las que carecen de drenaje que es insuficiente para cubrir la demanda, por lo que, las descargas de aguas residuales se han convertido en un grave problema al ser vertidas sobre los canales en forma directa. Esta alteración del ciclo hidrológico y de la calidad de agua tiene como consecuencia el deterioro del sistema lacustre de la zona de Xochimilco [Mazari, 2004; Cisneros, 2005].

II.9.1.- Ajolote (*Ambystoma mexicanum*)

La creciente degradación de los sistemas acuáticos ha llevado al deterioro de la vida acuática de la zona lacustre de Xochimilco [Huerto, 1988]. Las poblaciones de anfibios han disminuido drásticamente en los últimos 50 años. Este problema se ha visto acentuado en la última década en América del Norte donde se distribuye la familia Ambystomatidae, una de las más expuestas a declive poblacional. Perteneciente a esta familia, la especie *Ambystoma mexicanum* es endémica de la Cuenca del Valle de México. Esta especie sobrevive de manera relictual en los lagos de Xochimilco y Chalco [Alford, 2001].

Si bien, los anfibios no son las únicas especies que se han visto disminuidas sus poblaciones en las últimas décadas, diversos estudios han tratado de explicar las causas de sus declive ya que son considerados como indicadores de la calidad del ecosistema debido a su condición anfibia [Blaustein, 1994; Blaustein & Wake, 1995; Blaustein & Kiesecker, 2002].

Existen seis causas principales que pueden explicar la reducción de las poblaciones de anfibios: 1) la sobreexplotación de las especies para su uso comercial, 2) la introducción de especies exóticas a su ambiente, 3) el cambio de uso de suelo que puede reducir su hábitat, 4) el cambio climático global, 5) el incremento del uso de plaguicidas y otros productos tóxicos y 6) enfermedades emergentes [Pounds, 2001].



Figura II.9.- Fotografías de un ajolote *Ambystoma mexicanum*.

De los organismos acuáticos, la acumulación de los plaguicidas en peces son los que más han sido estudiados ya que es un grupo de organismos acuáticos fáciles de obtener, además de que diversas especies son comestibles. Existen menos estudios con anfibios, pero los anfibios pueden ser buenos indicadores de estresores químicos, por la permeabilidad de su piel al agua y a los electrolitos [Lombardis, Kyriakopoulou-Sklavounou et al. 1999][Gilliland, Summer et al 2001; Berzins and Bundy 2002]. Más aún, las larvas de algunos presentan respiración branquial y bucofaríngea, esto conduce a una gran cantidad de rutas de incorporación de partículas suspendidas donde los plaguicidas pueden estar adsorbidos [Lombardis, Kyriakopoulou-Sklavounou et al. 1999]. México posee un anfibio endémico que está en vías de extinción por las actividades del hombre, el ajolote *Ambystoma mexicanum* por lo que resulta un organismo acuático adecuado para estudios en México.

En general, las concentraciones de plaguicidas se pueden detectar en los organismos acuáticos después de muchos años por las características de persistencia de algunos de estos compuestos y su propiedad de mantenerse dentro del tejido graso de animales [Teran and Sierra 1987]. Los plaguicidas pueden ser incorporados por los organismos acuáticos y bioacumularse, como es el caso de algunos plaguicidas clorados [Watanabe and Ito 1984]. La bioacumulación en el tejido de los plaguicidas en organismos acuáticos ocurre básicamente por dos mecanismos. El primero se debe a la transferencia de los plaguicidas disueltos en el agua a través de la piel de los organismos. El segundo mecanismo, es la biomagnificación, la cual ocurre cuando el organismo ingiere y asimila el contaminante. Watanabe et al, encontraron que por ejemplo, la tendencia de acumulación de plaguicidas organoclorados en los peces, está relacionado con el contenido de grasa, debido a la hidrofobicidad de éstos. Feng et al. [Feng, Yu et al, 2003] encontró niveles más altos de plaguicidas organoclorados en peces que en sedimentos o agua, atribuyéndolo a los niveles de materia orgánica que se encontraban disueltos en el sedimento y que fueron comidos y digeridos por los peces.

El análisis de plaguicidas en organismos acuáticos, no es sencillo. Los organismos son matrices muy complicadas por la diversidad de compuestos y sustancias que contienen, todas ellas con la posibilidad de interferir en la determinación del contaminante. Los métodos de extracción que se han utilizado en peces, incluyen extracción por sonicación con mezcla de disolventes [Hong, Kim et al, 2004], por extracción con microondas [Weichbrodt, Vetter et al, 2000] y la extracción con solvente acelerada [Pazou, Lalcyte et al, 2006]. En todos los casos se requiere un paso de limpieza para evitar la interferencia en la detección de los plaguicidas. La separación y la detección de los plaguicidas ha sido realizada con cromatografía de gases y detectores ECD, NPD y MS.

Como se puede apreciar, la literatura muestra una gama de métodos para la determinación de los plaguicidas en las distintas matrices ambientales. Cada uno de estos métodos ha sido aplicado, para unos cuantos plaguicidas con unos resultados limitados. Es por ello que el estudio comparativo de los distintos métodos para los plaguicidas en las distintas matrices ambientales de interés en México, adquiere gran importancia.

II.9.2.- Impacto Social y Ambiental

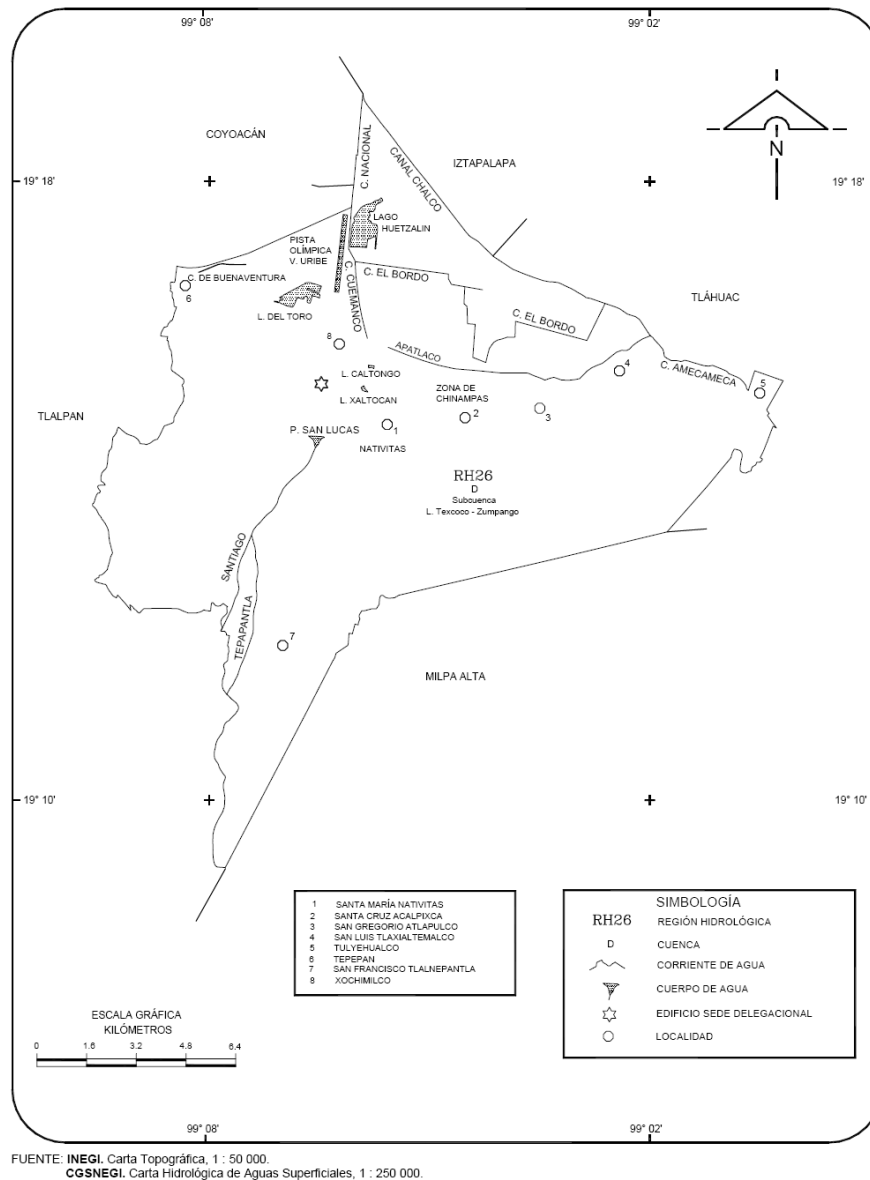
Se ha comprobado la presencia de contaminantes en la zona lacustre de Xochimilco y que constituyen un riesgo no solo para la salud humana sino también para los ecosistemas. Entre estos compuestos se encuentran los plaguicidas organofosforados. Asimismo, se observa la necesidad de contar con herramientas que permitan conocer la composición y el comportamiento que tendrán los contaminantes sobre la fauna de dicho ecosistema, por lo cual es importante el desarrollo de metodologías confiables de muestreo y análisis de plaguicidas que permitan evaluar el daño a la salud humana y al ambiente, y orientar la toma de decisiones para la creación de Normas ambientales y regulación de las actividades contaminantes. Por otro lado, la vinculación científica generada tendrá un impacto social y ambiental positivo considerando que la realización de proyectos de investigación es de gran importancia para el desarrollo de recursos humanos especializados y la generación de información científica que ayude a la mejora y conservación del medio ambiente en sus diferentes ámbitos.

CAPITULO III

MATERIAL Y MÉTODOS

III.- MATERIAL Y MÉTODOS

III.1.- Área de estudio



III.1.1.- Ubicación

Xochimilco es una de las 16 Delegaciones del Distrito Federal y se localiza al sureste de la capital mexicana. El lago pertenece a esta delegación y se localiza en los 19° 09' y 19° 19' de latitud norte y 98° 58' y 99° 10' longitud oeste y una altitud de 2240 msnm. [INEGI, 2001].

III.1.2.- Hidrografía

El lago de Xochimilco se encuentra al sur del Valle de México. Tiene una superficie de aproximadamente 24 Km² y su profundidad máxima es de 10 m, por lo regular no sobrepasa de un metro.

Aunque la Delegación no tiene corrientes de agua relevantes, sí presenta una importancia hidrológica, por las innumerables zanjas y algunos canales permanentes que limitan las chinampas y que sirven de comunicación entre las mismas. En esta zona se encuentran 10 canales y 7 lagunas importantes. Los canales son: Cuemanco, Apatlaco, Tlicuilli, Nacional, Texhuilo, Apampilco, Japón, La Noria, Amelalco y Atlicic. Las lagunas son: El Toro, La Virgen, Tlilac, Tlicuilli, Texhuilo, Caltongo y Xaltocan.

III.1.3.- Elección de canales y toma de muestras

Las muestras utilizadas para aplicar los métodos desarrollados se llevó a cabo tomado en cuenta estudios preliminares realizados por el grupo de trabajo de la Unidad de Análisis ambiental (UNAAMB) de la Facultad de Ciencias.





Las muestras se tomaron directamente en los canales a tres cuartas partes de su profundidad en frascos de vidrio ámbar, previamente lavados (sección III.5.1) y se transportaron en refrigeración al laboratorio, conservándose así hasta su análisis.

III.2.- Reactivos

- Estándares de adición

Compuesto	Formula	Cantidad	Observaciones
Chlorpyrifos	$C_9H_{11}C_{13}NO_3PS$	250 mg	PESTANAL®, analytical standard
Parathion-methyl	$C_8H_{10}NO_5PS$	100 mg	PESTANAL®, analytical standard
Diazinon	$C_{12}H_{21}N_2O_3PS$	250 mg	PESTANAL®, analytical standard
Ethoprophos	$C_8H_{19}O_2PS_2$	100 mg	PESTANAL®, analytical standard
Malathion	$C_{10}H_{19}O_6PS_2$	100 mg	PESTANAL®, analytical standard
Triphenyl phosphate	$(C_6H_5O)_3PO$	Ampolleta de 1 mL	Disolución de 500 µg/mL en methyl tert-butyl ether (standard type internal) de Supelco

- Acetato de Etilo grado HPLC (Tecsiquim ®).
- Acetona grado HPLC (Tecsiquim ®).
- Hexano grado HPLC (Tecsiquim ®).

- Diclorometano grado HPLC (Tecsiquim ®).
- Acetonitrilo grado HPLC (J.T. Baker ®)
- Sulfato de Sodio anhidro para uso con gases y disolventes, grado ACS, $\geq 99.0\%$ (T), granulado (Fluka ®).
- Supelclean LC-Florisil (Supelco ®).
- Cartuchos Strata ® C₁₈ – E de 500 mg (55 μ m, 70 Å).
- Agua desionizada obtenida de sistema de purificación de agua marca Barnstead®.
- Cobre granulado (complexometric), $\geq 99.8\%$ (Aldrich ®).
- Tenax TA® de 60/80 mallas marca Sigma-Aldrich ®
- Cloruro de mercurio (HgCl₂) en polvo (J.T. Baker ®)
- Helio (He): Denominado de "Ultra Alta Pureza" grado 5 (Praxair ®).
- Nitrógeno comprimido (N₂): Denominado de "Ultra Alta Pureza" grado 5 (Praxair ®).
- Hidrogeno: Denominado de "Ultra Alta Pureza" grado 5 (Praxair ®).
- Aire comprimido: Denominado de "Extra Seco" (Praxair ®).

III.3.- Material

- Matraces volumétricos de 50 mL.
- Embudos de separación de 150 mL.
- Micropipetas NICHIRYO (Nichipet EX) de 4 volúmenes distintos:

Intervalo de uso(μ L)	Incrementos(μ L)
2.0 - 20	0.02
10 -100	0.02
20 - 200	0.20
100 -1000	1.00

- Columna de vidrio para cromatografía de 15 cm de longitud con llave de teflón.
- Matraces Erlenmeyer de 50 mL.
- Filtros Whatman® de 11.0 cm grado cualitativo grado 5.
- Embudos de filtración.
- Matraces Kitazato de 1 L.
- Matraces de ebullición de 50 mL fondo plano junta 24/40.
- Tubo cónico de 50 mL para centrifuga.
- Viales de 40 mL, Borosilicato , tapa abierta y septa de Teflón – silicón de 0.135".
- Viales de 12.0 mL, color ámbar con tapa de rosca.
- Viales de 3.0 mL, color ámbar con tapa de rosca.
- Viales de 1.0 mL color ámbar con tapa de rosca y septa (PTFE/Red Rubber), con inserto incluido de capacidad de 300 μ L.
- Viales de vidrio de encapsulado de fondo redondo de 10 mL, 23 x 46 mm para Headspace.
- Tapones de encapsulado plateados de aluminio, con septa de PTFE/silicona de 20 mm de 10 mL.
- Encapsuladora manual de 20 mm.

III.4.- Equipos e instrumentos

- Cromatógrafo de Gases Hewlett Packard modelo 6890, equipado con inyector automático, detector de nitrógeno-fosforo (NPD), software Chemstation PC y una columna capilar “HP-5MS” (Varian) Sílice de longitud de 30 m x 0.25 mm de diámetro interno y recubrimiento de 0.25 μm de (5%-Phenyl)-methylpolysiloxane. Se utilizó Helio como gas acarreador a un flujo de 30 mLmin^{-1} .
- Sistema de Reacción Acelerado por Microondas, Modelo MARS 5, equipado con 14 cartuchos o vasos Green Chem de volumen interno de 100 mL para extracción asistida por microondas.
- Equipo Headspace Sampler Agilent modelo 7694E, con automuestreador para 12 viales, equipado con una línea de transferencia para acoplamiento a sistema cromatográfico.
- Agitador orbital EBERBACH.
- Centrífuga para tubos de 50 mL Hettich, modelo universal 32-R.
- Mufla Felisa, modelo FE960.
- Agitador VELP 2X³, Científica con regulación Copa de goma: \varnothing 55 mm. Frecuencia de oscilación: 0 a 40 Hz. Potencia: 45W 220V.
- Balanza Analítica, A. Max 120 g, e=0.0001 g, Min. 0.01 g, d=0.0001 g.
- Manifold para extracciones en fase sólida (SPE Vacuum Manifold) de 12 puertos.
- Rotavapor Heidolph (Modelo LABOROTA 4011-digital)
- Bomba de vacío/presión de aluminio de 24 pulgadas de *Hg* y presión máxima de 2.45bar (35 *psig*) para uso con químicos y disolventes corrosivos, tolerante a la humedad y vapores de disolventes.

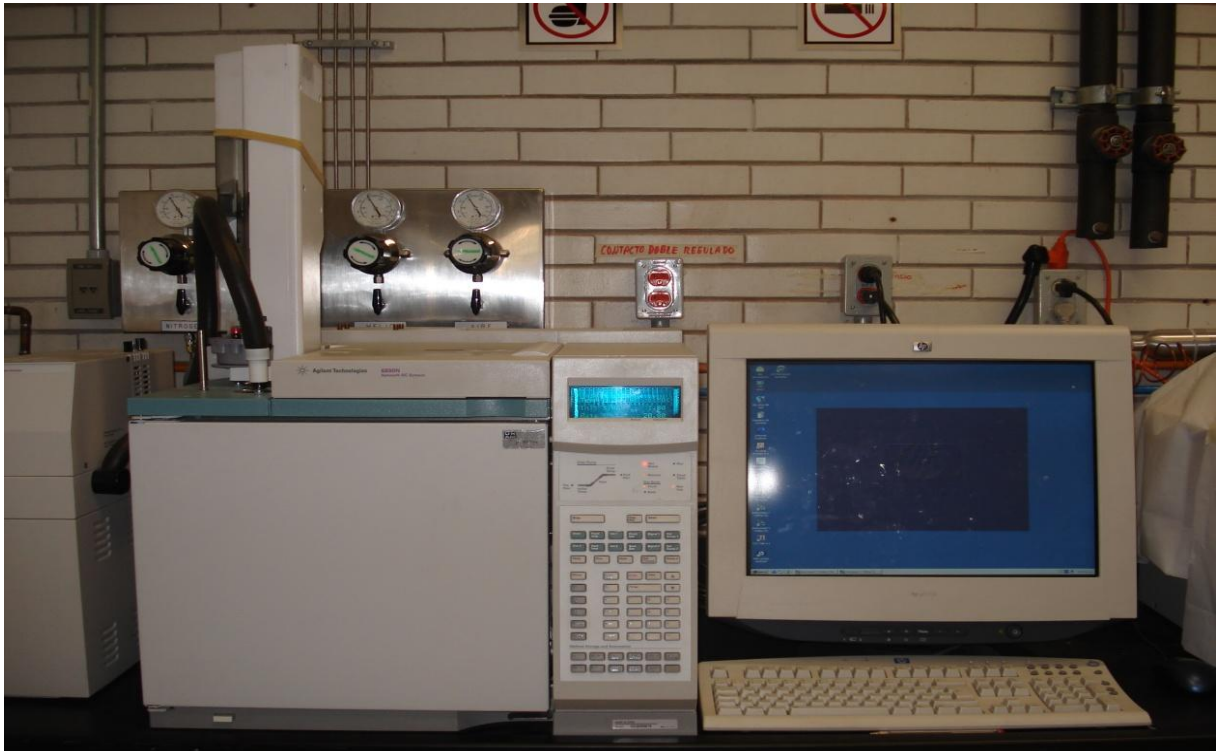


Figura III.1.- Cromatógrafo de gases Hewlett Packard modelo 6890, equipado con inyector automático, detector de nitrógeno-fosforo (NPD).

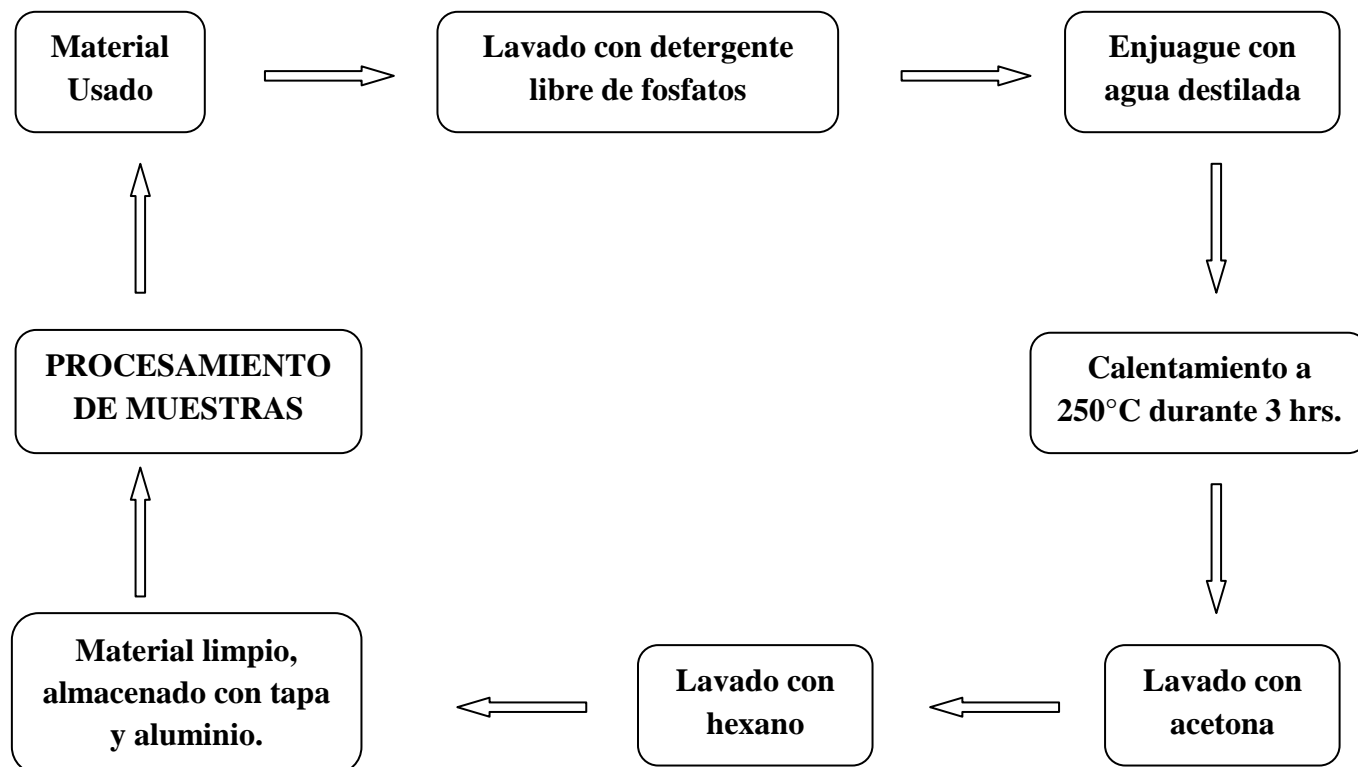


Figura III. 2.- Equipo Headspace Sampler Agilent modelo 7694E, con automuestreador para 12 viales, equipado con una línea de transferencia para acoplamiento a sistema cromatográfico.

III.5.- Métodos

III.5.1.- Limpieza de material de vidrio

La limpieza del material de vidrio incluye una serie de etapas según el siguiente esquema:



III.5.2.- Preparación de soluciones

- **Disolución de Plaguicidas Organofosforados** (Clorpirifos, Metil-paratión, Diazinon, Etoprofos, Malatión): Se prepararon por gravimetría, disoluciones individuales stock de cada compuesto a una concentración de 100 mg L^{-1} en acetona, que fueron almacenados en el congelador a -50°C . A partir de estas disoluciones individuales, se prepararon mezclas stock a una concentración de 1 mg L^{-1} . Las disoluciones de trabajo se fueron preparando por disolución en acetona para fortificar las muestras y en acetato de etilo para inyectar en el sistema cromatográfico.
- **Disolución de Estándar Interno para Organofosforados:** Se utilizó Trifenil fosfato (organofosforado) en la preparación de una disolución a 1 mg L^{-1} de concentración en Acetato de Etilo (HPLC) a partir del estándar adquirido.

III.5.3.- Purificación de los Reactivos

III.5.3.1.- Sulfato de sodio

Se colocó el sulfato de sodio en una cápsula de porcelana y se calentó a 933 K (660°C) en una mufla durante 48 horas. Se dejó enfriar en una estufa a 383 K (110°C), y se transfirió a frascos de vidrio, el cuál fue sellado con parafilm y almacenado a temperatura ambiente.

III.5.3.2.- Florisil

- **Activación del Florisil:** Se colocaron 100 gramos de Florisil en un vaso de precipitados y se adicionó agua desionizada hasta cubrirlos en su totalidad, dejando reposar la suspensión 5 min. Posteriormente se filtró a través de un embudo Büchner acoplado a un matraz Kitazato sin vacío; se realizaron 2 enjuagues más con agua desionizada y finalmente se succionó, con ayuda de vacío, el agua que quedaba. El Florisil húmedo fue transferido a una cápsula de porcelana y calentado a 650°C en una mufla durante 2 horas. Después se transfirió a frascos de vidrio color ámbar y se calentó durante 18 horas a una temperatura de 110°C. Finalmente el frasco fue sellado con parafilm y almacenado a temperatura ambiente.
- **Desactivación de Florisil (10%):** Se pesaron 50 gramos de Florisil activado y fueron colocados en un matraz bola y se adicionaron 5 mL de agua desionizada gota a gota, distribuyéndola sobre la superficie del Florisil uniformemente. Después, se homogenizó con la ayuda del rotovapor a temperatura y presión ambiente durante 30 min. Por último, el Florisil fue transferido a un frasco color ámbar y sellado con parafilm. Dicha activación se realizó inmediatamente antes de utilizarse.

III.5.3.3.- Tenax

Antes de utilizar las esferas de Tenax-TA, éstas fueron lavadas con acetona (5mL/gramo) y hexano (5mL/gramo), tres veces en cada disolvente con la ayuda del rotovapor a temperatura y presión ambiente durante 5 min en cada lavado. Después de los lavados, las esferas se dejaron secar durante toda la noche en una estufa a una temperatura de 180°C.

III.5.4.- Preparación de muestras adicionadas

Las muestras de agua para el procedimiento de adición fueron colectadas de la laguna de Cuemanco, en la zona lacustre de Xochimilco. Todas las muestras fueron usadas sin previo tratamiento excepto el de filtración a través del sistema Millipore con el fin de eliminar partículas de sedimento y de vegetación atrapadas durante la colecta. Agua desionizada también fue utilizada para estos fines.

Las muestras de agua adicionadas fueron preparadas adicionando una alícuota de una mezcla stock de los plaguicidas a los niveles de concentración requeridos, mezclando la muestra durante 10 min mediante agitación mecánica en Vortex, y dejando las muestras en reposo en la oscuridad a 4°C durante 4 horas previas a la aplicación del método de extracción.

En cuanto a las muestras de tejido, los ajolotes fueron mantenidos libres de plaguicidas en las instalaciones de la Unidad de Análisis Ambiental, los organismos fueron sacrificados y diseccionados y las muestras fueron preparadas adicionando una alícuota de una mezcla stock en acetona de los plaguicidas a los niveles de concentración requeridos. Una vez que el solvente fue evaporado a temperatura ambiente, las mezclas fueron puestas en reposo en la oscuridad a 4°C en una Caja de Petri durante 6 horas previas a la aplicación del método de extracción.

III.5.5.- Extracción Líquido-líquido (LLE)

Cincuenta mL de agua en estudio fueron extraídos 3 veces (2x10 mL, 1x5mL) con diclorometano mediante agitación manual durante 2 minutos. Para eliminar cualquier resto acuoso, la fase orgánica se paso a través de una columna de vidrio rellena con aproximadamente 2 gramos de sulfato de sodio anhidro (purificado). Finalmente el extracto fue concentrado mediante evaporación en rotovapor hasta un volumen de 3 mL y posteriormente evaporado a sequedad bajo flujo de nitrógeno y redissuelto en 1 mL de acetato de etilo previa adición del estándar interno (a una concentración de 100 µg L⁻¹) para su posterior análisis cromatográfico.

III.5.6.- Extracción asistida por microondas (MAE)

Un gramo de tejido (peso húmedo) fue homogenizado y secado con 10 gr de sulfato de sodio anhidro con la ayuda de un mortero. Posteriormente la muestra fue colocada dentro de los vasos reactores Green Chem para su extracción con 10 mL de una mezcla 1:1 de Diclorometano: Acetona. La extracción se realizó irradiando los cartuchos a la energía máxima de 1200 W durante 15 min a una temperatura máxima de 110°C. Después de enfriarse, los cartuchos fueron abiertos y los extractos fueron filtrados a gravedad mediante filtro Whatman (grado 5) y colocados en matraces de ebullición de fondo plano.

III.5.6.1.- Clean-up ó limpieza de los extractos

Los extractos obtenidos en el procedimiento antes mencionado fueron evaporados utilizando el rotovapor hasta un volumen aproximado de 2 mL a una temperatura menor de 35° C, posteriormente estos extractos son pasados a través de una columna formada por el cartucho C₁₈ y 2 gramos de Florisil desactivado al 10 %, previo acondicionamiento de la columna con 5 mL de la mezcla Diclorometano –

Acetona 1:1 (HPLC) antes de verter los extractos. La elución se llevó a cabo con 6 mL de acetonitrilo. La fracción recolectada fue evaporada a sequedad mediante flujo de nitrógeno y redisolto en 1mL de acetato de etilo previa adición del estándar interno (a una concentración de $100 \mu\text{g L}^{-1}$) para su posterior análisis cromatográfico.

III.5.7.- Condiciones Cromatográficas (GC-NPD)

Los extractos obtenidos por los métodos de extracción líquido-líquido y extracción asistida por microondas fueron sometidos a análisis cromatográfico con las siguientes condiciones:

Temperatura del inyector: 250°C . Temperatura del detector: 300°C . El programa de temperatura del horno fue programado de la siguiente manera: 120°C durante 1 min, $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ hasta 200°C (2 min), $2.0^{\circ}\text{C}/\text{min}$ hasta 205°C (1 min), $12^{\circ}\text{C}/\text{min}$ hasta 300 (5 min). Tiempo de análisis: 35.42 min. Volumen de inyección, 2 μL usando automuestreador y modo split-splitless.

III.5.8.- Procedimiento Tenax-HS-GC-NPD

III.5.8.1.- Extracción en fase sólida con Tenax para muestras acuosas

La extracción con Tenax fue realizada para un volumen de muestra de 500 mL, los cuales fueron colocados en un frasco al que se adicionaron 0.1 gramos de HgCl_2 (agente biocida, para evitar de gradación por microorganismos) y 0.5 gramos de esferas de Tenax. Los frascos fueron sometidos a agitación orbital durante 36 horas a 120 rpm. Concluido el tiempo de agitación, las esferas de Tenax fueron removidas mediante filtración a través del pre filtro metálico del sistema Millipore y fueron colocadas en viales para secarlas bajo flujo de nitrógeno.

III.5.8.2.- Extracción en fase sólida con Tenax para muestras de tejido

Para el procedimiento de extracción se colocaron muestras de 1 gramo de tejido en tubos de centrifuga de vidrio, adicionando 10 mL de agua ultrapura y homogenizando con ayuda de un homogenizador mecánico. Posteriormente se adicionaron 0.1 gramos de HgCl_2 y 0.5 gramos de esferas de Tenax. Los tubos fueron sometidos a agitación orbital durante 60 horas a 120 rpm. Concluido el tiempo de agitación, los tubos fueron centrifugados a 3000 rpm durante 25 min, esto permitió que el tejido sedimentara y las esferas de Tenax permanecieran en la parte superior del sobrenadante de donde fueron retiradas cuidadosamente utilizando una espátula y colocadas posteriormente en viales para secarlas bajo flujo de nitrógeno.

III.5.8.3.- Desorción térmica (análisis por Headspace)

Las muestras obtenidas en los pasos anteriores fueron sometidas a desorción térmica con ayuda de un equipo de “espacio de cabeza” ó Headspace, los viales fueron cerrados herméticamente y sometidos a calentamiento a una temperatura de 190°C durante 15 minutos. Los compuestos volatilizados fueron inyectados durante 1 min directamente a través de una línea de transferencia calentada a 210°C insertada en el puerto de inyección en el cromatógrafo utilizando helio como gas acarreador.

III.5.8.4.- Condiciones Cromatográficas (HS-GC-NPD)

Temperatura del inyector: 250°C. Temperatura del detector: 300°C. El programa de temperatura del horno fue programado de la siguiente manera: 120°C durante 1 min, 20°C/min hasta 200°C (1 min), 10.0°C/min hasta 300°C (1 min). Tiempo de análisis: 19.0 min.

CAPITULO IV

RESULTADOS Y ANÁLISIS

IV.1.- Ensayos previos y optimización del método cromatográfico

Antes de poner a punto cualquier método de análisis, independientemente de la técnica que se vaya a emplear, es necesario realizar unos ensayos previos. El objetivo es conocer el comportamiento de los compuestos a estudiar en el sistema que queremos emplear. Una vez realizados estos, se pasa a la optimización exhaustiva de los parámetros que afecten a la determinación.

Los estudios que se han realizado tienen como objetivo:

- Seleccionar los compuestos que se emplearán a lo largo de todo el trabajo.
- Elegir un estándar interno y un disolvente adecuado.
- Conseguir las condiciones cromatográficas más idóneas.
- Evaluar los métodos de cuantificación a utilizar y calcular los rendimientos de extracción.

IV.1.1.- Condiciones cromatográficas. Optimización del método

El detector de nitrógeno-fosforo ha sido el más utilizado en CG para el análisis de plaguicidas organofosforados. En los últimos años se han ampliado los conocimientos en este campo gracias a la incorporación de la Espectrometría de Masas (MS).

Para los compuestos a estudiar, se hizo un análisis por GC-NPD, con la finalidad de identificar los tiempos de retención de los plaguicidas a estudiar.

Uno de los mayores inconvenientes que se plantea a la hora de determinar por CG los componentes de una muestra, reside en la utilización de condiciones tales que permitan obtener separaciones precisas en tiempos de desarrollo que no resulten excesivamente largos.

Muy probablemente, la puesta a punto del método cromatográfico constituye una de las mayores dificultades en el estudio. Resulta necesario seleccionar la columna y las condiciones que hagan posible las determinaciones con la mayor sencillez, dentro de la complejidad requerida. Así, surgen diferentes inconvenientes, como la separación de determinados compuestos, las subidas en la línea base de los cromatogramas al utilizar diferentes programas de temperatura, e incluso otras inherentes al trabajo en sí.

Se procedió a la optimización de los distintos parámetros que afectan a la separación y determinación de nuestros compuestos. Algunos de estos parámetros no se optimizaron, ya que la experiencia previa del grupo de investigación junto con los trabajos bibliográficos más actuales, nos habían demostrado que eran los idóneos.

De los parámetros que afectan a la separación (caudal de gases, columna cromatográfica, programa de temperatura y volumen de inyección y elección del estándar interno).

IV.1.2.- Caudal de gases

El gas portador es la fase móvil en GC y su misión es la de acarrear la mezcla de solutos que se introduce en el cromatógrafo hasta el detector, a través de la columna, donde se produce la separación. El gas ideal debe ser químicamente inerte y no interaccionar ni con la columna ni con los componentes de la mezcla. El gas utilizado debe de ser siempre de gran pureza, es decir libre de sustancias ajenas tales como el agua, los hidrocarburos y el oxígeno que pueden afectar a la base estacionaria. El agua y el oxígeno deterioran ciertas columnas como las de poliamida o poliéster, e incluso originan picos “fantasmas” al desplazar impurezas existentes en la columna.

Respecto a los gases, los más utilizados como portadores son nitrógeno, helio, menos frecuentemente se emplea hidrogeno (tiene la desventaja de su carácter reductor que afecta la integridad de algunos analitos), argón o incluso dióxido de carbono. La elección de uno de ellos depende del tipo de muestra con la que se trabaje, del tipo de columna y del detector utilizado. Cada de estos gases presenta ventajas e inconvenientes. En nuestro caso, se utiliza por experiencia previa el helio de grado 5 de pureza 99,996 % que tiene la ventaja de ser seguro y puro.

Para obtener resultados reproducibles es esencial conseguir un flujo constante de fase móvil gaseosa, para correlacionar con fiabilidad los tiempos de retención de los estándares con los picos de la muestra problema. A lo largo de nuestro trabajo se utilizó helio con un caudal de $3,5 \text{ ml min}^{-1}$. Se utiliza este valor porque la bibliografía y la experiencia previa ya nos habían demostrado que era el óptimo. Para el detector NPD los gases necesarios para mantener la llama son hidrógeno y aire.

El flujo de split o relación de división de la muestra, también es un parámetro crítico. En general, la inyección con split es la técnica más adecuada para introducir la muestra en las columnas capilares. Este sistema de introducción de muestra es menos eficaz para el análisis de trazas ya que la cantidad de compuestos que llega a la columna se reduce, llegando a ser insuficiente para el detector. A partir de estudios anteriores se estableció como optimo la inyección en splitless o sin división de muestra, es una técnica utilizada para muestras muy diluidas, tales como el análisis de trazas.

IV.1.3.- Columna cromatográfica

Se eligió como idónea la HP-5MS (30 m x 0,25 mm i.d. x 0,25 μ m) y recubrimiento de 0.25 μ m de (5%-Phenyl)-methylpolysiloxane, ya que en la bibliografía y en estudios previos por nuestro grupo de trabajo demostraban que era la correcta, debido a su carácter no polar.

IV.1.4.- Programa de temperatura

La temperatura es un factor clave en GC. Existen tres zonas en el cromatógrafo en las que debe controlarse esta variable con precisión: la zona de inyección, la columna y el detector.

La temperatura de la columna tiene una influencia decisiva en la separación cromatográfica, ya que afecta a la constante o relación de distribución de los compuestos.

En lo referente al control de la temperatura del detector, en principio tanto el detector como las conexiones entre él y la columna deben estar a una temperatura adecuada para que no se produzcan condensaciones que darían lugar a pérdidas de componentes menos volátiles, o a un solapamiento entre los picos.

Los estudios iniciales consistieron en obtener los cromatogramas individuales de cada uno de los compuestos, ya que aunque se disponía de datos bibliográficos de partida sobre los tiempos de retención de algunos de los compuestos, no todos se correspondían con las características de la columna utilizada por nosotros. Para ello, se prepararon disoluciones en acetato de etilo de cada compuesto a partir de los patrones puros, las cuales se analizaron en las condiciones iniciales de trabajo. La temperatura óptima depende de los puntos de ebullición de los compuestos.

Una vez identificados perfectamente los compuestos se buscó un programa de temperatura que los separase en el menor tiempo posible, ya que hay compuestos con tiempos de retención muy próximos que tiene riesgo de aparecer solapados si el programa de temperatura no se optimiza.

Para elegir el programa de temperatura óptimo, en primer lugar, se prepararon mezclas con los compuestos, esta mezcla se analizó por GC utilizando diversos programas de temperatura basados en la bibliografía y a partir de los cromatogramas obtenidos, se observó que el mejor programa de temperatura que lograba separar de la mejor manera los compuestos de estudio y en el menor tiempo era la siguiente:

Temperatura del inyector: 250°C. Temperatura del detector: 300°C. El programa de temperatura del horno fue programado de la siguiente manera: 120°C durante 1 min, 5°C/min hasta 200°C (2 min), 2.0°C/min hasta 205°C (1 min), 12°C/min hasta 300 (5 min). Tiempo de análisis: 35.42 min., como se puede ver en la figura IV.1.

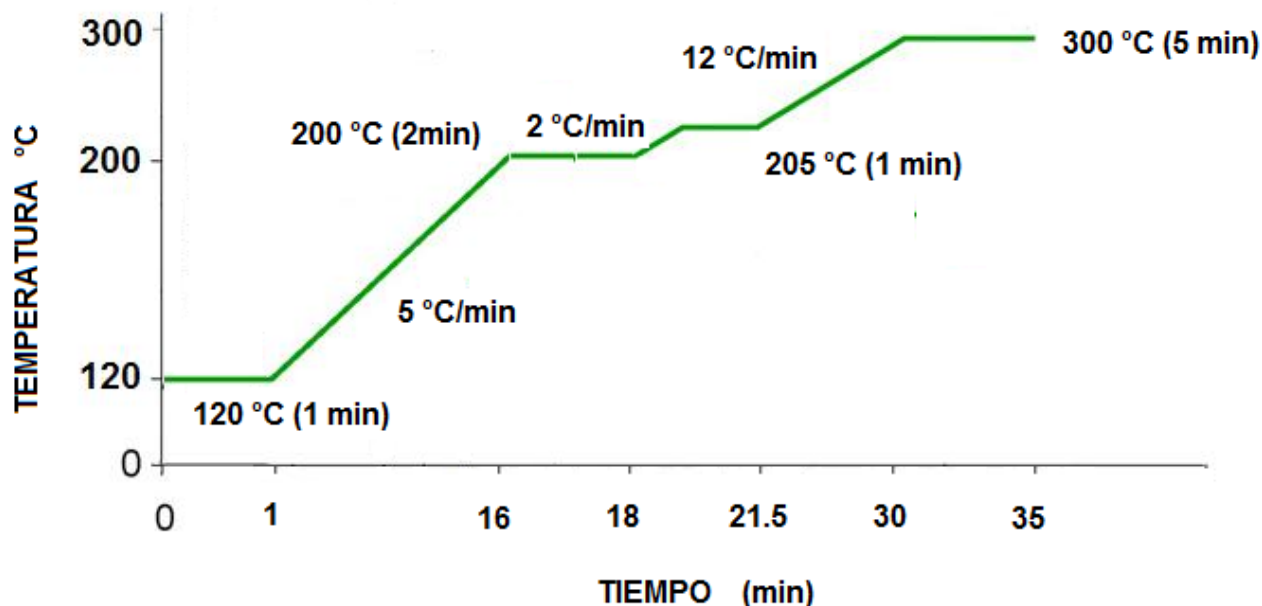


Figura IV.1.- Programa de temperatura del horno del cromatógrafo, utilizado en la separación de los plaguicidas organofosforados mediante GC-NPD.

IV.1.5.- Elección del estándar interno

Como estándar interno se seleccionaron en un principio, dos compuestos: trifetil fosfato y tributil fosfato. Se prepararon disoluciones en acetato de etilo con los compuestos en estudio y los 2 estándares elegidos. Se comprobó cromatográficamente que el que mejor resultado daba era el trifetil fosfato ya que no interfería con ninguno de los compuestos en estudio y su tiempo de retención está dentro de los límites que marcamos en el programa propuesto, además es un compuesto que responde bien al detector de nitrógeno - fosforo. El otro estándar interno probado se solapaba con alguno de los compuestos en este estudio.

IV.1.6.- Volumen de inyección

El volumen de inyección es otra de las variables a optimizar. Las jeringas que más se utilizan oscilan entre 1,0 y 10,0 μL . En nuestro caso, se compararon los resultados obtenidos con 1,0 y 2,0 μL . Se separaron disoluciones con los 5 compuestos seleccionados en acetato de etilo, se analizaron en las condiciones descritas en los apartados anteriores. El estudio se hizo comparando los cromatogramas obtenidos al

inyectar ambos volúmenes, la relación área de la señal de compuesto (c.v.) / área de la señal de estándar interno (i.s.).

Se observó que los valores no variaron apreciablemente, optando por ello utilizar el volumen de 2,0 µL ya que el manejo resulta más fácil.

IV.1.7.- Condiciones óptimas

En la Figura IV.1 se muestran las condiciones óptimas de temperatura para la determinación de los plaguicidas organofosforados seleccionados, disueltos en acetato de etilo.

IV.1.8.- Parámetros analíticos

Una vez obtenida una buena separación de todos los compuestos elegidos, se paso a estudiar las características analíticas de cada uno de ellos. En concreto, se obtuvieron las rectas de calibración para cada compuesto, porcentajes de recuperación, el límite de detección, el límite de cuantificación, la repetibilidad y la reproducibilidad.

El intervalo lineal, se define como el intervalo de concentraciones en la que la respuesta sigue la ecuación de una recta es decir, no pierde la linealidad.

El límite de detección (LOD), se puede definir según el comité especial de la American Chemical Society como sigue: es la concentración más baja de un analito que el proceso analítico detecta de forma fiable (basados en cálculos estadísticos).

La certidumbre estadística se expresa como límite de confianza y, por definición, el límite de detección de la señal del analito se encuentran en el nivel de confianza del 99.7%, lo que equivale al triple de la desviación estándar del fondo (s_{blanco}).

Sin embargo, lo anterior sólo se refiere a la señal y no a la concentración.

Para calcular el LOD en términos de la concentración es necesario incluir la sensibilidad del instrumento del analito o pendiente, y despejando de la ecuación de la recta que relaciona los datos determinados experimentalmente se obtiene:

$$LOD = \frac{3 s_{blanco}}{m}$$

donde s_{blanco} es la desviación estándar de 5 determinaciones de la señal NPD obtenida para la concentración de trabajo más baja (3 µg/L) y m es la pendiente de la curva de calibración.

El límite de cuantificación (LOQ) aunque no tiene un uso tan amplio como el de detección, también se ha calculado. El límite de cuantificación se encuentra donde la señal debida solo al analito es 10 veces la desviación estándar de la señal de fondo. Por lo tanto, la señal en el instrumento en este caso será la señal del blanco mas la señal del analito.

$$LOQ = \frac{10 s_{blanco}}{m}$$

donde s_{blanco} es la desviación estándar de 5 determinaciones de la señal NPD obtenida para la concentración de trabajo más baja (3 $\mu\text{g/L}$) y m es la pendiente de la curva de calibración.

Los valores de repetibilidad se han calculado como desviación estándar relativa porcentual [RSD (%)], expresada como una fracción o porcentaje de la media, por lo que su valor se expresa en %.

$$RSD (\%) = \frac{s}{x} \times 100$$

Por el cálculo de las características analíticas, se prepararon disoluciones en acetato de etilo conteniendo todos los compuestos y se inyectaron en el cromatógrafo en las condiciones indicadas en cada apartado. Las concentraciones para cada uno de los compuestos de las disoluciones empleadas para las rectas de calibrado. Todas ellas se inyectaron por triplicado. Se empleó trifenil fosfato como estándar interno a concentración de 100 μgL^{-1} y como respuesta se empleo el área del compuesto de interés dividido por el área del estándar interno.

IV.1.9.- Métodos de cuantificación

A la hora de cuantificar las muestras reales, la metodología elegida fue la de estándar interno, aunque como se podrá observar en los capítulos posteriores, también se tendrá que utilizar la cuantificación por estándar externo, ya que en procedimiento por HS no se pudo llevar a cabo la volatilización del trifenil fosfato.

IV.1.10.- Rectas de calibración

Es importante que la concentración de las disoluciones stock sea lo más próxima posible a la del problema, ya que disoluciones diferentes pueden tener diferentes tipos de interferencias que afectan a la señal. Para ello se prepararon disoluciones en el disolvente elegido de todos los compuestos a concentraciones conocidas mas el trifenil fosfato, las cuales, fueron inyectadas por triplicado en el cromatógrafo en las condiciones optimas. A partir de los datos obtenidos se calculan las rectas de calibración de ecuación general:

$$Y = b + m C$$

donde: *Y* es la relación Área pico compuesto/ Área pico patrón interno

b es la ordenada en el origen

m es la pendiente

C es la relación Concentración compuesto/ Concentración estándar interno

Una vez que tenemos la ecuación de la recta para cada compuesto, las muestras ambientales se someten al procedimiento de extracción, al extracto se añade el estándar interno en concentración conocida y se lleva al cromatógrafo. A partir de las cromatogramas obtenidos se calcula la relación Área compuesto/ Área estándar interno, y se interpola en las rectas para obtener la concentración del compuesto en el extracto. Al resultado se le aplica el rendimiento para cada uno de los compuestos en los distintos métodos de extracción, para calcular la concentración de los plaguicidas en la muestra.

IV.1.11.- Cálculo de los rendimientos de extracción

Para su cálculo se utilizaron muestras ambientales adicionadas con todos los compuestos a estudiar en concentraciones conocidas, sometidas al proceso de extracción, al extracto se le añade el (i.s.) y se inyectaron en el cromatógrafo de gases.

A partir de estos datos obtenidos y teniendo en cuenta el volumen final de fase orgánica y los μg de compuestos iniciales, se calculan los μg extraídos y el rendimiento de extracción (%) de cada compuesto a partir de las formulas siguientes:

$$\% \text{ Compuesto extraído} = \frac{\mu\text{g extraídos}}{\mu\text{g adicionados}} \times 100$$

Como ya se dijo, todos estos estudios se hacen para cada tipo de extracción, y se realizan por triplicado, así los valores que aparecen en las tablas de los rendimientos son la medida de los resultados obtenidos en cada ensayo.

IV.2.- Análisis de plaguicidas organofosforados en agua de la zona lacustre de Xochimilco: extracción con disolventes (LLE).

En esta sección se describe la determinación analítica de un grupo de plaguicidas (Diazinon, Metil-paratión y Clorpirifos) en muestras de agua provenientes de la zona lacustre de Xochimilco mediante extracción con diclorometano y posterior separación y detección por Cromatografía de gases acoplado a un detector de Nitrógeno-Fosforo (GC-NPD).

En esta primera parte experimental de la presente Tesis, se decidió utilizar, en primer lugar, técnicas convencionales de extracción en este tipo de matrices y, posteriormente, ir avanzando en técnicas más novedosas y poder hacer una comparación entre métodos.

IV.2.1.- Antecedentes

Típicamente, en extracciones multiresiduales, muchos autores tienden a aplicar un método “universal” o “general” con un simple paso de extracción con disolventes, o mediante SPE, debido a las diferentes propiedades físico-químicas de los analitos a determinar [Barr *et al*, 1999].

Este apartado va a tratar la LLE convencional, una de las técnicas más tradicionales para la extracción de plaguicidas en muestras ambientales. Dado los bajos volúmenes de muestra y disolventes empleados, en realidad se va a tratar de una modificación del método EPA 3510C , que permite reducir considerablemente el volumen de muestra y disolventes utilizados, lo cual supone una gran ventaja, teniendo en cuenta el alto grado de toxicidad de los disolventes y la gran generación de residuos que esto implica.

Las primeras experiencias de la aplicación de la técnica LLE se llevaron a cabo para la determinación de los 3 plaguicidas OPs seleccionados en agua desionizada, con el propósito de identificar factores de error y limitantes de la técnica.

IV.2.2.- Optimización de las variables

El primer paso fue elegir un método inicial, de entre los propuestos en los datos bibliográficos y a partir de este ir haciendo modificaciones en función de las variables optimizadas. Hay que destacar, que en el desarrollo del procedimiento LLE aplicado no se llevó a cabo ningún estudio comparativo de posibles disolventes orgánicos para la extracción, sino que se basó en un procedimiento previamente desarrollado en nuestro laboratorio, para la determinación de OPs en muestras de agua y en el cuál se utilizó diclorometano (DCM) como mejor disolvente extractante de los compuestos estudiados.

De esta manera, el método de extracción fue el siguiente: 50 mL de agua desionizada fueron extraídos 3 veces (2x10 mL, 1x5mL) con diclorometano mediante agitación manual durante 2 minutos.

La optimización del procedimiento LLE (tiempo de extracción y número de extracciones) se llevó a cabo con disoluciones de los tres pesticidas en agua desionizada, calculando los porcentajes de recuperación obtenidos para cada plaguicida. En primer lugar se comprobó que partir de la tercera extracción no se obtenía cantidad apreciable de ninguno de los compuestos seleccionados en extracciones sucesivas. Por este motivo se decidió realizar el procedimiento con tres extracciones 2x10 mL y 1x5 mL, la agitación siempre manual y el tiempo de agitación elegido fue de 3 min, ya que la experiencia previa nos había demostrado que tiempos mayores a estos tres minutos, no cambiaban apreciablemente los rendimientos.

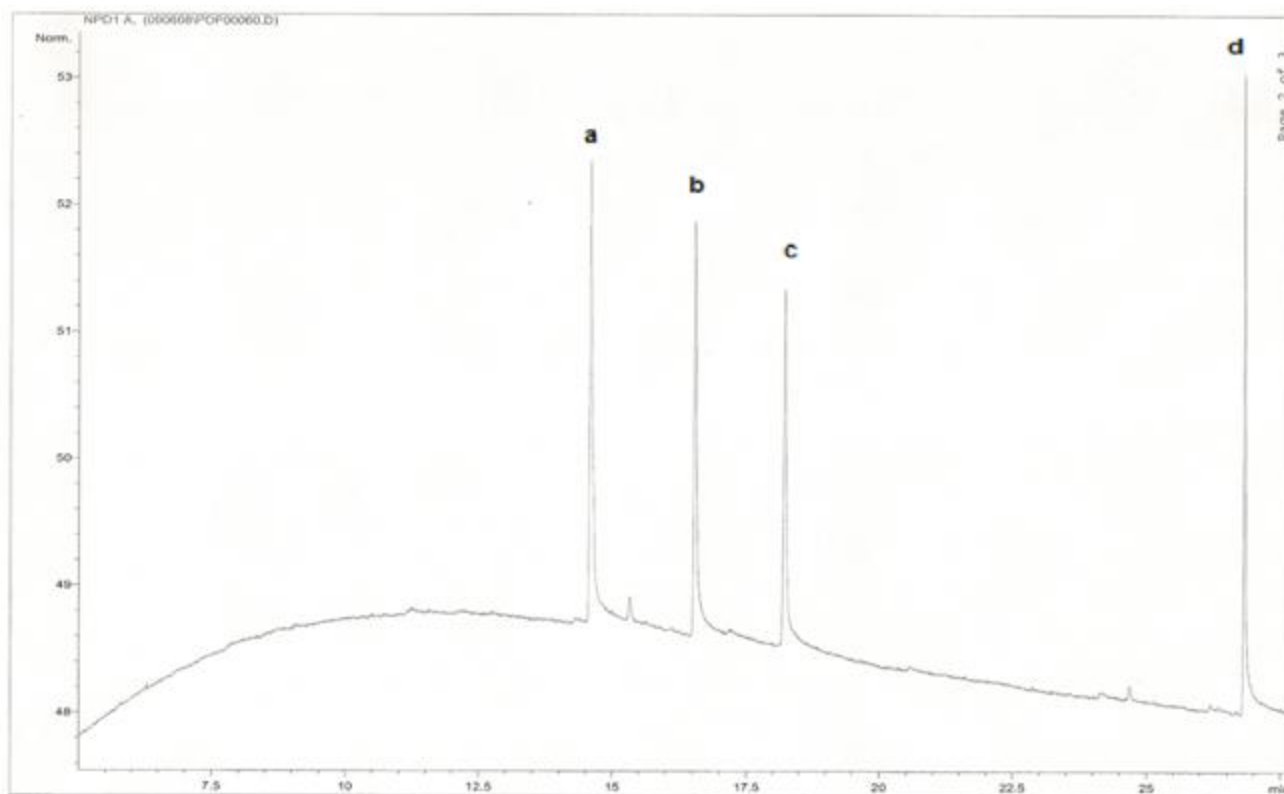


Figura IV.2.- Cromatograma GC-NPD correspondientes a una muestra de agua desionizada fortificada a 120 $\mu\text{g/L}$ después de la extracción LLE: (a) diazinon, (b) metil-paratión, (c) clorpirifos y (d) trifenil fosfato (estándar interno).

Una vez optimizado el procedimiento LLE y con objeto de evaluar la repetibilidad del mismo, se aplicó a la determinación de estos pesticidas en agua desionizada enriquecida a tres niveles de concentración diferentes (30, 60 y 120 $\mu\text{g/L}$). La eficacia del procedimiento LLE pudo comprobarse por comparación de las áreas de los picos obtenidos de los extractos con los de un estándar. Se llevaron a cabo tres extracciones a cada nivel de concentración ($n=3$). La Tabla IV.1 muestra los porcentajes de recuperación obtenidos para cada pesticida cada nivel de concentración, así como la RSD. Tal como puede apreciarse

en dicha tabla, los porcentajes de recuperación medios se encontraron en torno al 80% para todos los pesticidas, excepto para el diazinon que sólo se recuperó entre el 68%.

IV.2.3.- Análisis multiresidual en agua de Xochimilco

Una vez comprobado los valores de recuperación del procedimiento LLE, este se aplicó al análisis de muestras de agua provenientes de la zona lacustre de Xochimilco enriquecidas a tres niveles de concentración diferentes (30, 60 y 120 $\mu\text{g/L}$), con objeto de demostrar la utilidad de la metodología desarrollada (Tabla IV.1). La experiencia resultó problemática por la formación de emulsiones que retrasaban llevar a cabo la extracción. Este problema también ha sido encontrado por muchos otros autores y así se refleja en la bibliografía. Para resolver este problema se decidió probar diversas formas para romper dichas emulsiones; la primera de estas fue mediante un proceso de sonicación, pero esto requería someter la muestra a este tratamiento durante 2 horas lo cual hacía el método muy laborioso. El segundo método probado fue la adición de NaCl el cual también resultó poco eficiente. Debido a lo anterior se decidió utilizar la columna rellena con sulfato de sodio, que además de eliminar las emulsiones nos ayudaba a eliminar las trazas de agua presentes en los extractos orgánicos.

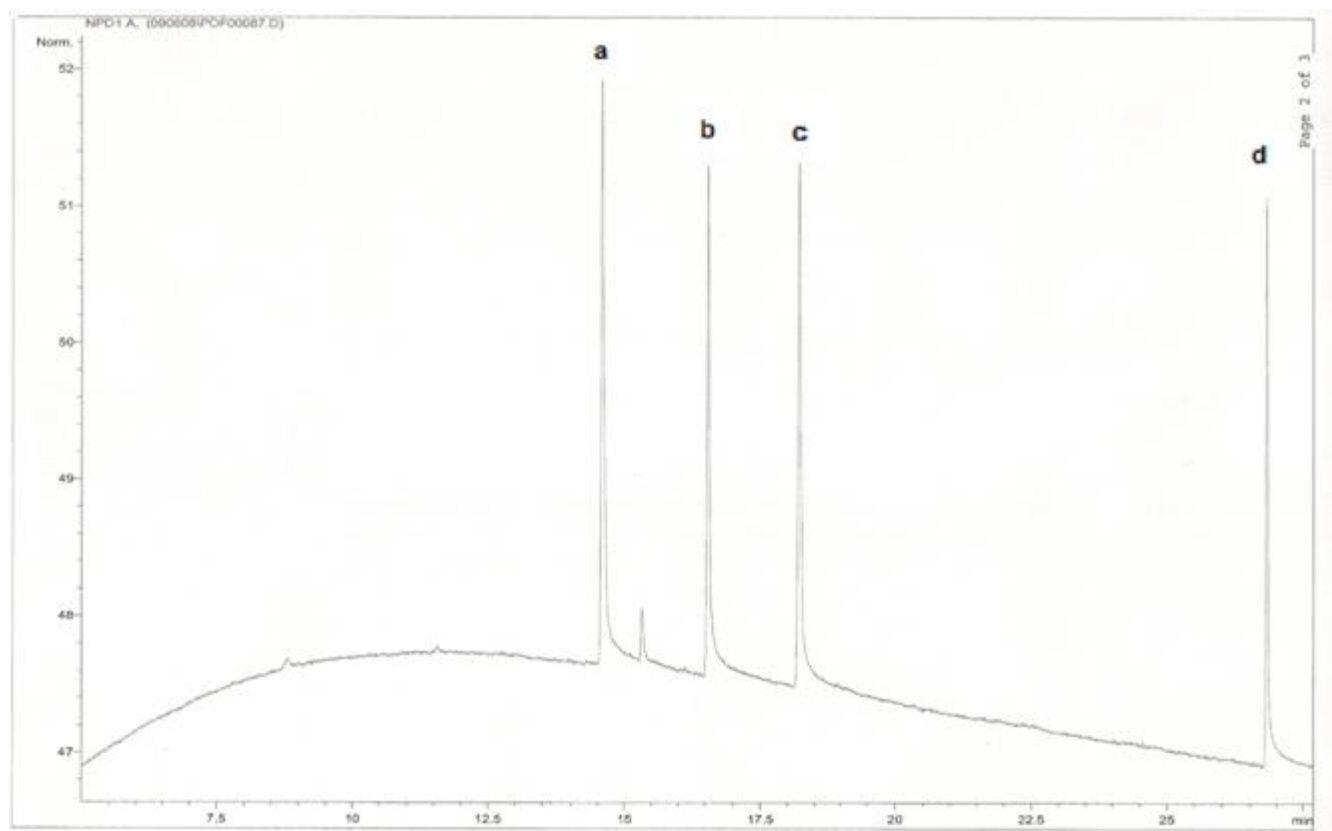


Figura IV.3.- Cromatograma GC-NPD correspondientes a una muestra de agua de Xochimilco fortificada a 120 $\mu\text{g/L}$ después de la extracción LLE: (a) diazinon, (b) metil-paratión, (c) clorpirifos y (d) trifenil fosfato (estándar interno).

Tabla IV.1.- Porcentajes de recuperación promedio (n=3), RSD del procedimiento LLE-GC-NPD aplicado a agua desionizada y en agua de Xochimilco.

Plaguicidas	Recuperaciones en Agua desionizada						Recuperaciones en Agua de Xochimilco					
	30 µg/L		60 µg/L		120 µg/L		30 µg/L		60 µg/L		120 µg/L	
	%	RSD	%	RSD	%	RSD	%	RSD	%	RSD	%	RSD
Diazinon	68,9	4,1	68,3	1,9	70,0	2,6	66,3	0,2	68,6	1,6	66,6	4,8
Metil-paratión	91,4	8,1	87,3	4,8	85,9	3,0	90,5	1,9	82,3	1,7	78,9	4,3
Clorpirifos	97,0	5,2	97,5	5,0	95,3	3,7	98,3	2,5	94,2	1,7	86,5	0,8

IV.2.4.- Validación del método analítico

Una vez optimizada la separación cromatográfica, así como el método de extracción, y obtenidos los valores de recuperación del método, se obtuvieron las correspondientes rectas de calibración para los tres plaguicidas (Tabla IV.2) a concentraciones comprendidas entre 3 y 500 µg/L, mostrando coeficientes de correlación (r^2) aceptables, superiores a 0,99. Los límites de detección obtenidos, calculados como: $LOD = 3s (1/m)$, se encontraron entre 0,13 µg/l (diazinon) y 0,88 µg/l (metil-paratión).

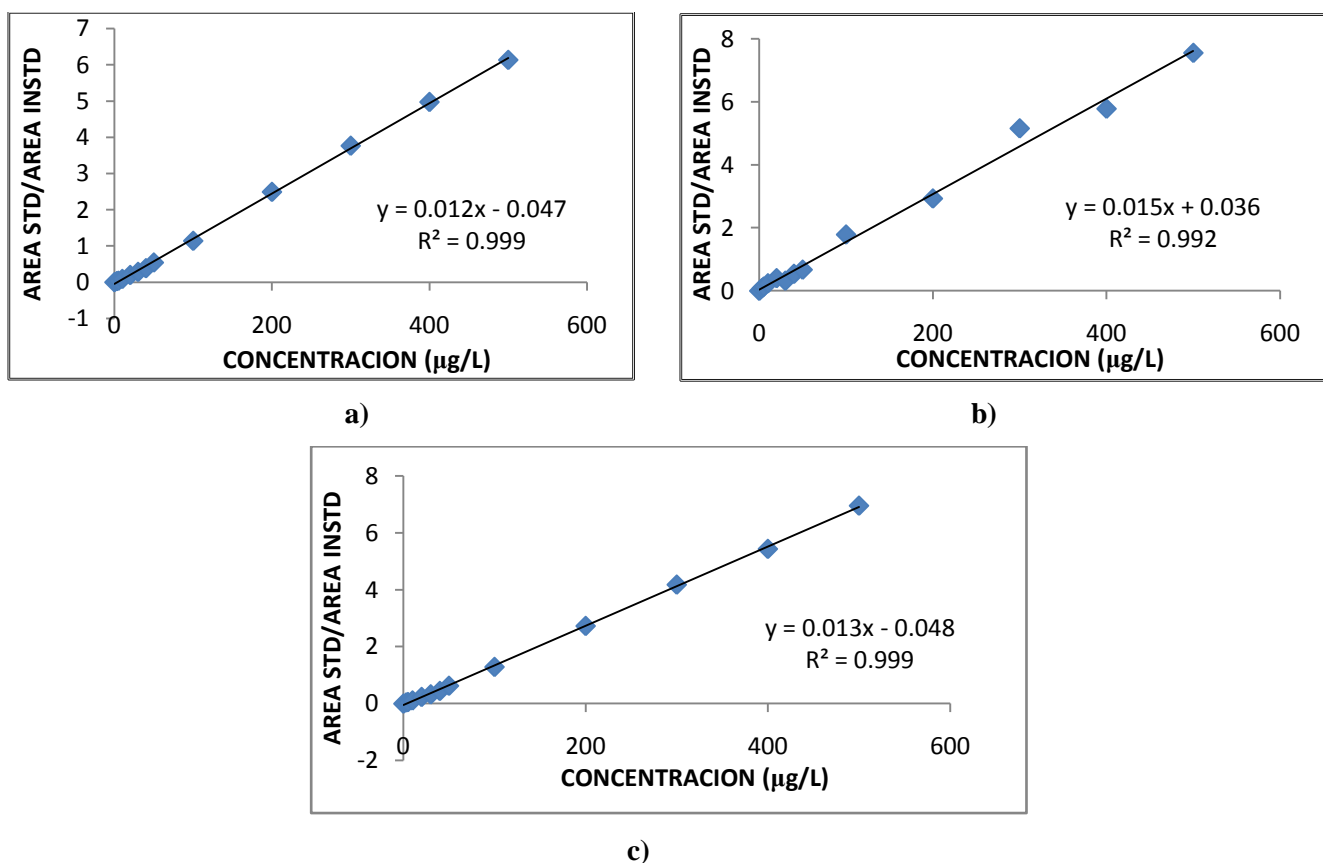


Figura IV.4.- Gráficas de linealidad del método: a) metil-paratión, b) clorpirifos y c) diazinon

Tabla IV.2.- Datos de calibración y límites de detección y cuantificación del método LLE-GC-NPD.

Plaguicidas	t_r (min)	Intervalo de calibración	Ecuación de la línea recta	Linealidad (r^2)	LOD ^{a)} $\mu\text{g/L}$	LOQ ^{b)} $\mu\text{g/L}$
Diazinon	14,59	(3 – 500 $\mu\text{g/L}$)	$y = 0,013x - 0,048$	0,999	0,13	0,46
Metil-paratión	16,55	(3 – 500 $\mu\text{g/L}$)	$y = 0,012x - 0,047$	0,999	0,88	2,6
Clorpirifos	18,22	(3 – 500 $\mu\text{g/L}$)	$y = 0,015x + 0,036$	0,992	0,29	0,98

a) $\text{LOD} = 3s (1/m)$

b) $\text{LOQ} = 10s (1/m) = 3 \text{ LOD}$

donde s es la desviación estándar de la señal NPD obtenida para la concentración de trabajo más baja y m es la pendiente de la curva de calibración.

Posteriormente se llevaron a cabo los correspondientes estudios de reproducibilidad y repetibilidad. Para ello se realizaron cinco inyecciones consecutivas a tres niveles de concentración distintos (20, 100 y 400 $\mu\text{g/L}$) en tres días diferentes. La Tabla IV.3 muestra los parámetros de validación del método. Los valores de RSD de los tiempos de retención oscilaron entre 0,1 y 0,4% para la repetibilidad y entre 0,2 y 0,6% para la reproducibilidad. Asimismo, los valores de RSD para las áreas oscilaron entre 2,1 y 6,2% para la repetibilidad y entre 6,5 y 8,3% para la reproducibilidad.

Tabla IV.3.- Datos de los estudios de repetibilidad y reproducibilidad del método de separación de los tres plaguicidas por LLE-GC-NPD

Plaguicidas	Repetibilidad		Reproducibilidad		Recuperación del método
	t_r	Área	t_r	Área	% Rec (RSD)
	(RSD, n=15)	(RSD, n=15)	(RSD, n=45)	(RSD, n=45)	
Diazinon	0,2	5,0	0,2	6,5	67,1 (1,8)
Metil-paratión	0,4	6,2	0,2	8,3	83,9 (5,1)
Clorpirifos	0,1	2,1	0,6	7,7	93,0 (6,4)

Tal como se ha indicado anteriormente, la determinación de residuos de plaguicidas en muestras reales plantea serias dificultades: la baja concentración de los mismos en este tipo de muestras, así como la gran cantidad de interferencias de la propia matriz de la muestra. En este caso particular, con objeto de aplicar la anterior metodología se realizó el análisis de plaguicidas en muestras reales, provenientes de los diversos puntos de muestro (ver Material y métodos) de la zona lacustre de Xochimilco.

Los resultados obtenidos se presentan en la tabla IV.4 y muestra que sólo diazinon y clorpirifos fueron encontrados en una de las muestras tratadas provenientes del sitio “La Draga” a niveles de 13,1 y 8,2 $\mu\text{g L}^{-1}$ respectivamente; quizás esta área en particular está influenciada por descargas agrícolas.

Tabla IV.4.- Concentración ($\mu\text{g L}^{-1}$) de plaguicidas en muestras de Xochimilco.

Plaguicidas	Sitios de muestreo				
	Bordo	Draga	Cuemanco	Y Griega	Japón
Diazinon	n.q.	13,1	0,9	n.d.	0,5
Metil-paratión	n.d.	n.q.	n.q.	n.d.	n.d.
Clorpirifos	n.q.	8,2	n.q.	n.d.	n.q.

n.d.: no detectado; **n.q.:** detectado, no cuantificado.

IV.3.- Desarrollo del método de análisis de plaguicidas organofosforados en agua de Xochimilco mediante extracción en fase sólida con Tenax-TA y desorción térmica por Headspace (Espacio de cabeza) y Cromatografía de gases.

La determinación de la concentración de plaguicidas en agua se puede realizar mediante adsorción en fase sólida para su posterior análisis mediante desorción térmica. La desorción térmica permite que el contaminante retenido en un adsorbente se libere al elevar la temperatura, a la vez que un gas inerte lo arrastra para su análisis mediante cromatografía gaseosa.

Los adsorbentes para desorción térmica constituyen un amplio grupo de materiales poliméricos sintéticos, porosos, hidrófobos y térmicamente estables que se han empleado habitualmente como fase estacionaria en cromatografía gas-sólido. Las características comunes que deben cumplir todos ellos son: afinidad por un amplio grupo de compuestos, alta capacidad de adsorción a temperatura, estabilidad térmica, baja afinidad por el dióxido de carbono y por el vapor de agua, tamaño de partícula uniforme y granulada y sin tendencia a la formación de polvo.

En este capítulo se describen las experiencias realizadas para desarrollar y validar un método para la determinación de clorpirifos en agua mediante la adsorción en Tenax-TA, desorción térmica con el uso de Headspace y análisis por cromatografía de gases.

IV.3.1.- Antecedentes

La aplicación de la desorción térmica ha sido ampliamente utilizada para el análisis de compuestos orgánicos volátiles y algunos plaguicidas presentes en la atmósfera, mediante captación pasiva en muestreadores empacados con soportes sólidos como es el caso del Tenax. Una nueva aplicación de la desorción térmica para el análisis de clorpirifos en agua se presenta en el siguiente apartado.

Es la primera vez que el Tenax-TA es utilizado para realizar una extracción en fase sólida de plaguicidas en muestras acuosas, por lo que, el objetivo del presente estudio fue probar la efectividad de la aplicación de la adsorción de plaguicidas en polímeros porosos y el uso de un sistema de desorción térmica (Headspace) acoplado a un cromatógrafo de gases para la determinación de clorpirifos en muestras de agua provenientes de la zona agrícola de Xochimilco.

IV.3.2.- Optimización del método

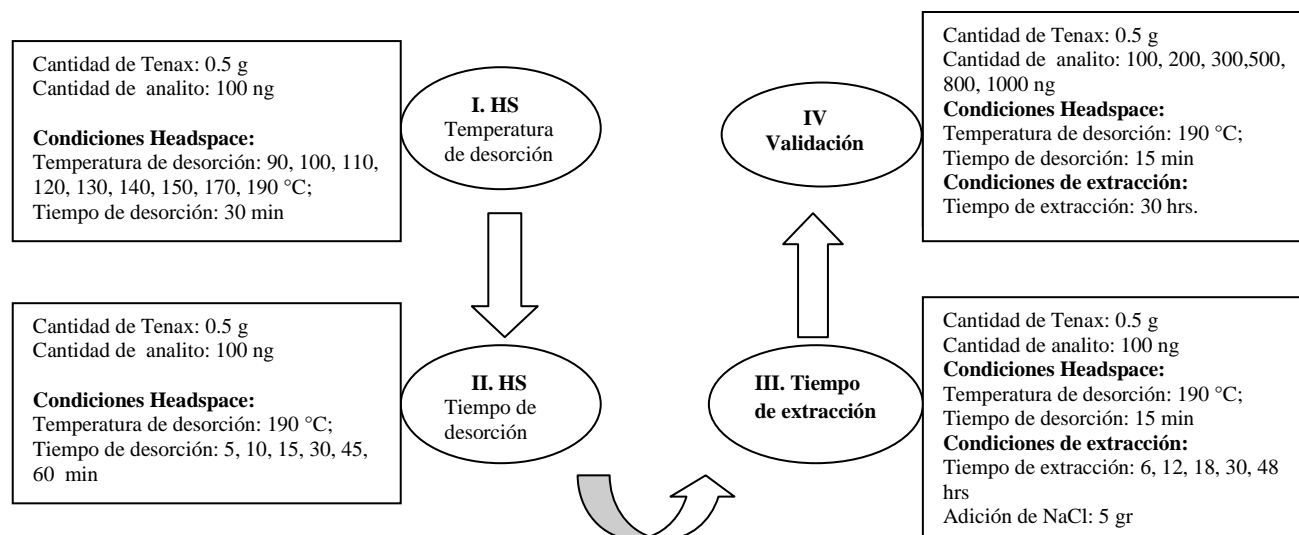


Figura IV.5.- Diagrama de los experimentos llevados a cabo para la optimización y validación del método de análisis mediante extracción en fase sólida con Tenax-TA y desorción térmica por Headspace (Espacio de cabeza) y Cromatografía de gases.

IV.3.2.1.- Selección del adsorbente

La estructura porosa de los adsorbentes juega un papel importante en la interacción superficial que se produce en el proceso de adsorción del contaminante. La interacción de éste último con la superficie del sólido aumenta con la microporosidad del adsorbente.

El Tenax TA es un polímero basado en el óxido de poli-2,6-difenilfenileno que se usa normalmente como relleno de columnas y como material adsorbente. El Tenax no adsorbe agua ni dióxido de carbono y presenta afinidad por un importante grupo de compuestos hidrofóbicos. Presenta baja polaridad, una superficie de adsorción relativamente alta y es estable hasta casi 400°C.

Tabla IV.5.- Propiedades físicas y químicas del Tenax-TA.

Adsorbente	Propiedades						
	Propiedad química	Tamaño de malla	Densidad (g mL ⁻¹)	S (m ² /g)	V micro (mL/g)	T max	Proveedor
Tenax-TA	Oxido poli (2,6-difenil-p-fenileno)	20/35	0,19	26	6,7	375	Supelco

S área superficial específica del adsorbente obtenida de la isoterma de adsorción de N₂ a 77K

V **micro** volumen de microporos, poros de diámetro inferior a 2 nm

T **max** temperatura máxima de utilización

IV.3.2.2.- Condiciones de desorción y análisis

El análisis de los viales rellenos de adsorbente que contenían clorpirifos se llevó a cabo utilizando el acoplamiento de dos técnicas: desorción térmica y cromatografía de gases. La desorción térmica se realizó calentando los viales en un muestreador de espacio de cabeza (Headspace), tras el cual una corriente de Helio transfería los vapores desorbidos desde el vial al inyector del cromatógrafo mediante la utilización de una línea de transferencia caliente. Cabe mencionar que fue necesario modificar las condiciones cromatográficas con el objetivo de realizar el análisis en el menor tiempo posible (Ver Material y Métodos). Un esquema del sistema empleado se muestra en la figura IV.6.

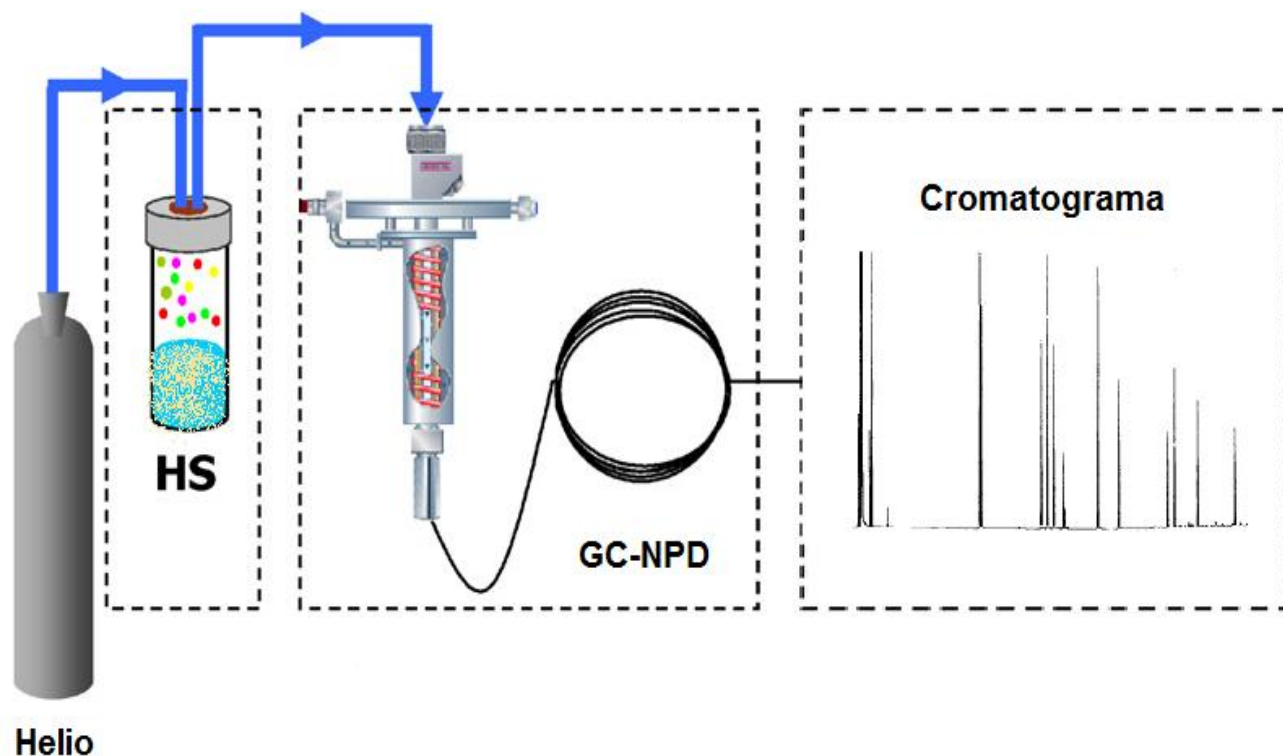


Figura IV.6.- Diagrama de la extracción en fase sólida con Tenax-TA y desorción térmica por Headspace (Espacio de cabeza) y Cromatografía de gases.

En primer lugar, y para realizar las experiencias posteriores, fue necesario estudiar las dos variables más importantes: la temperatura y el tiempo de desorción. Para ello se utilizaron viales rellenos con Tenax adicionados con clorpirifos (200 ng de clorpirifos adicionados).

- **Temperatura de desorción**

La figura IV.5 muestra los resultados de la optimización de la temperatura de desorción. Las temperaturas del horno del espacio de cabeza utilizadas fueron 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 170, 190 °C; observándose que las mejores respuestas cromatográficas se obtuvieron a una temperatura de 190 °C.

- **Tiempo de desorción**

A la temperatura de desorción óptima, y con el fin de obtener la máxima respuesta cromatográfica, se estudiaron diferentes tiempos de desorción (5, 10, 15, 30, 45 y 60 min). En este caso, se observó en general un incremento de las recuperaciones al aumentar el tiempo de desorción, presentando los mejores resultados a un tiempo de 15 min, ya que a tiempos mayores no se obtenían mejores valores de recuperación.

De este modo, esos fueron los valores seleccionados para continuar el trabajo experimental.

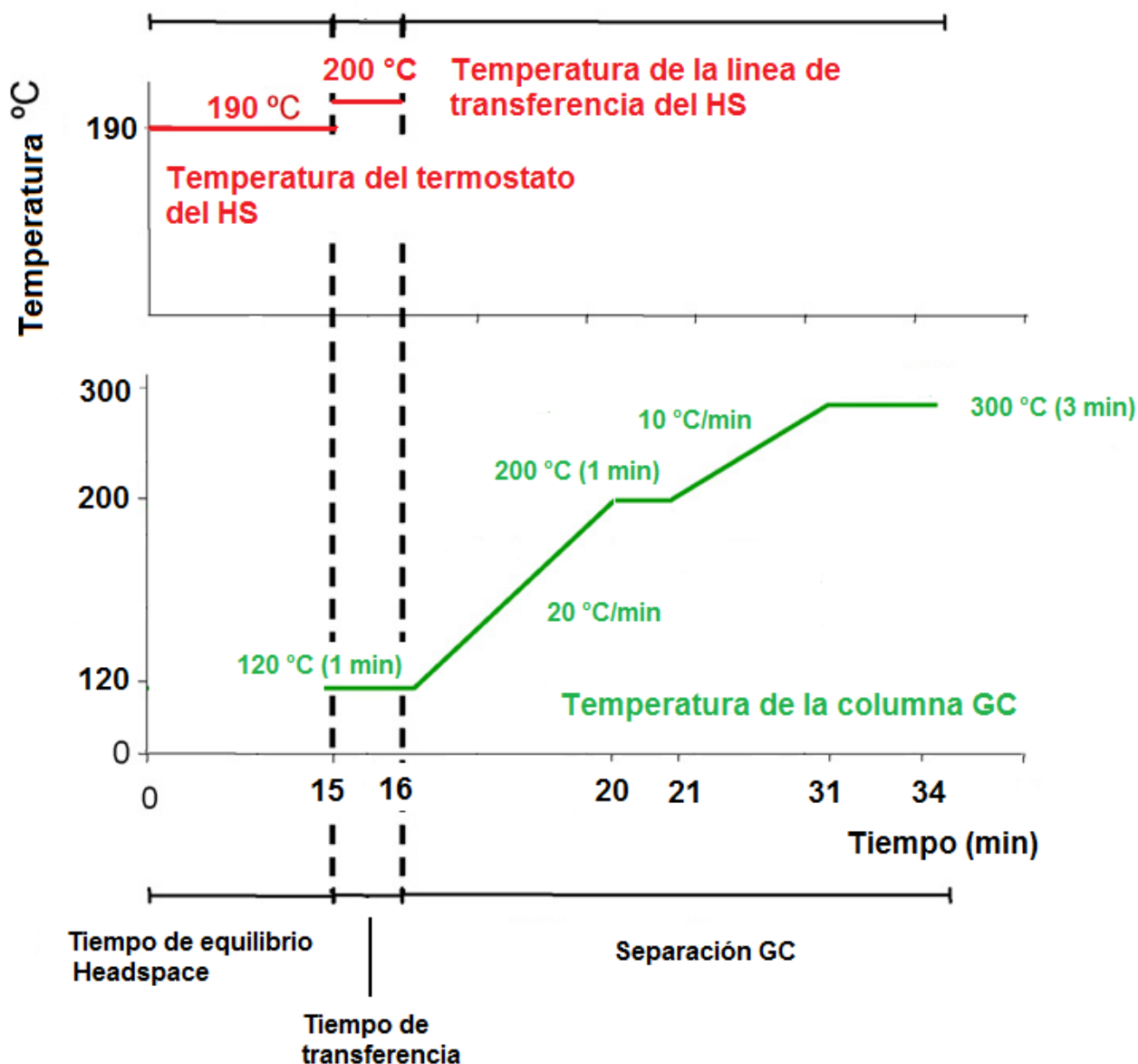


Figura IV.7.- Programa de temperatura del horno del cromatógrafo, utilizado en la separación de clorpirifos mediante HS-GC-NPD.

IV.3.2.3.- Determinación de la eficacia de desorción

Se define la eficacia de desorción como el cociente entre la masa del analito recuperada de un elemento de muestreo y la masa introducida. La eficacia de desorción, entendida como la masa que se recupera del vial respecto a la que previamente se introdujo, debe de ser lo más próxima posible al 100%, por dos razones. Por un lado, conviene que toda la masa retenida sea analizada para obtener una mayor señal analítica y por otro, al ser el material adsorbente reutilizable, no debe quedar clorpirifos retenido en su interior tras cada análisis.

Para su determinación se recomienda que se realicen experiencias para dos niveles diferentes. Para ello se debería añadir, utilizando una jeringa calibrada, una masa conocida del analito al adsorbente, preparando tres tubos para cada nivel. Por ello, se optimizaron las condiciones de desorción de modo que se consiguiese la total desorción del clorpirifos recogido. No obstante en todos los casos se realizó una segunda desorción a cada tubo para comprobar si la primera fue total, en este caso no se observó presencia de clorpirifos en la segunda desorción, pero el valor de la eficacia de desorción fue del 70%, quizás este valor pudiera aumentar llevando a cabo la desorción a temperaturas mayores, pero en nuestro caso, esto no pudo realizarse, ya que en el muestreador de espacio de cabeza utilizado sólo se puede alcanzar una temperatura máxima de 200°C.

IV.3.2.4.- Optimización de la etapa de adsorción

Una vez optimizadas las variables de desorción para el Tenax (190 °C, 15 min), el siguiente paso fue la selección de las condiciones óptimas para la adsorción de clorpirifos en medio acuoso. Las dos variables que se optimizaron fueron el tiempo de extracción y el contenido de sal. Todas las experiencias se realizaron a temperatura ambiente, con agitación orbital y utilizando un volumen de muestra de 500 mL.

- **Tiempo de extracción**

El primer paso en el desarrollo del método fue el estudio del efecto del tiempo de adsorción en la eficacia de la extracción para el plaguicida estudiado. Este apartado es de gran importancia práctica ya que determina la obtención del tiempo necesario para obtener las mayores recuperaciones.

En este sentido, se realizaron extracciones de una muestra fortificada con 200 ng de clorpirifos con tiempos de 6, 12, 18, 30 y 48 horas. Los resultados obtenidos, representando la cantidad extraída (ng) en función del tiempo se muestran en la figura IV.8.

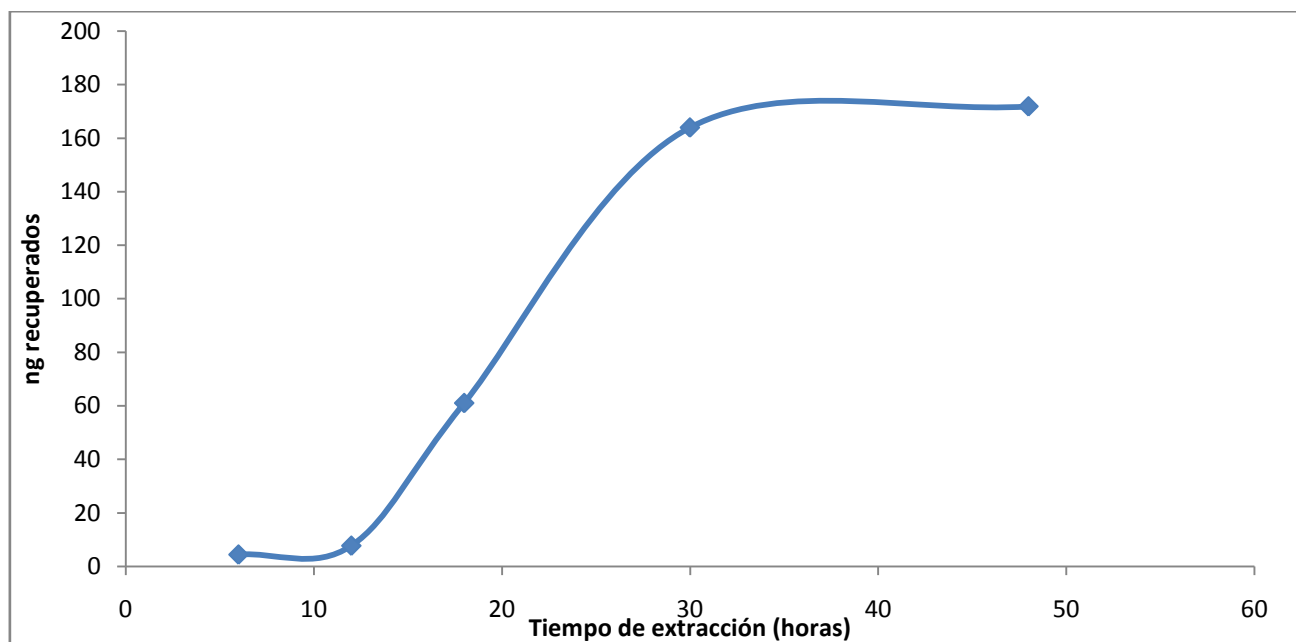


Figura IV.8.- Efecto del tiempo de extracción en los valores de recuperación de clorpirifos en muestras acuosas. Las muestras son 500 mL de agua de Xochimilco enriquecidos con 200 ng de clorpirifos (concentración de la muestra 400 ngL⁻¹). Los resultados de recuperación fueron por triplicado.

- **Fuerza iónica (contenido de sal)**

El efecto del contenido de sal (5 % de NaCl) en la muestra fue el segundo parámetro de adsorción que se estudió, puesto que ya es bien conocida la eficacia del efecto salino en la extracción de plaguicidas polares en agua, al menos mediante LLE. En este caso, la adición de sal no mejoró la eficacia de la extracción. Como consecuencia, se decidió trabajar sin adición de NaCl.

A la vista de los resultados obtenidos, se seleccionó un tiempo de extracción de 30 horas, ya que utilizando este tiempo de extracción se conseguía recuperar más del 70 % de la cantidad de clorpirifos adicionada. Tras establecer las condiciones óptimas de extracción (*adsorción*: 500 mL de muestra y 30 horas de extracción mediante agitación orbital; *desorción*: 15 min a 190°C), se llevo a cabo la validación del procedimiento, para lo cual se estudió la precisión, el % de recuperación, la linealidad, el límite de detección y el límite de cuantificación.

IV.3.3.- Validación del método

IV.3.3.1.- Linealidad

Para comprobar la linealidad del método, se utilizaron viales con 0,5 g de Tenax, la preparación de los viales se realizó inyectando en el interior de cada vial volúmenes diferentes de una disolución stock de clorpirifos en acetona, de modo que se cubriese todo el intervalo de calibración(50-1000 ng de clorpirifos).

En la figura IV.9 se representa la recta de calibración obtenida, el rango de linealidad hallado fue de 200-1000 ng.

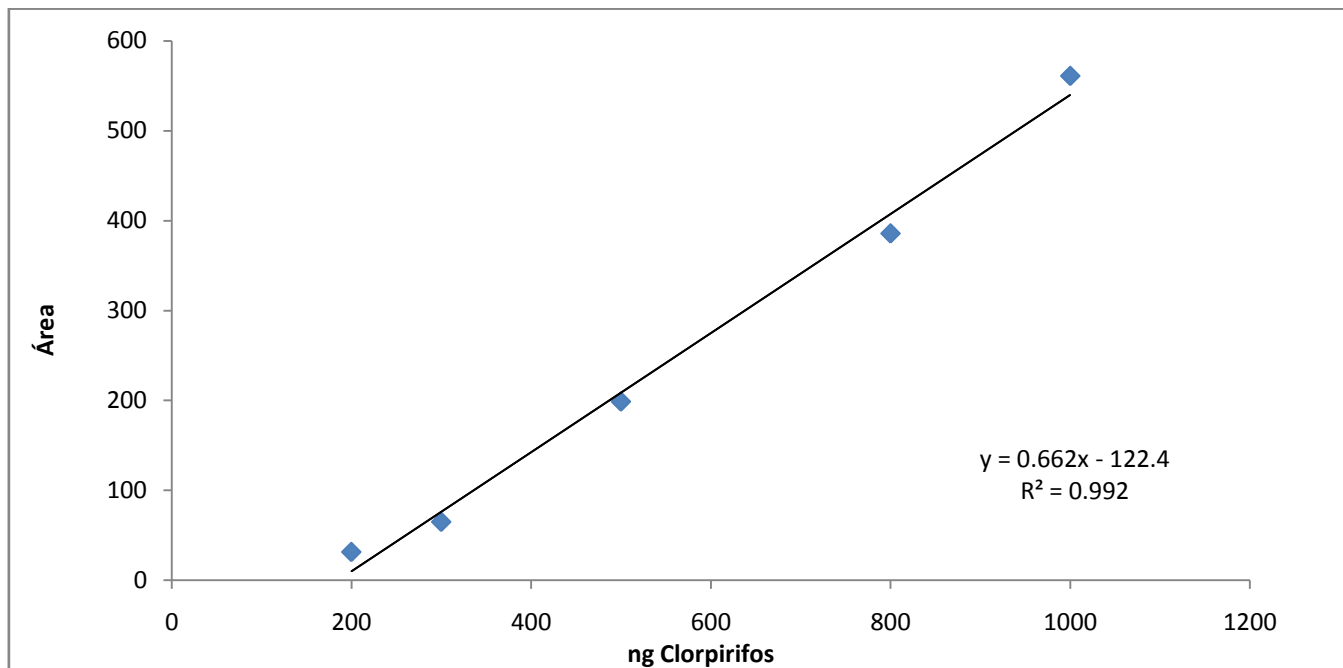


Figura IV.9.- Curva de calibración para clorpirifos mediante desorción térmica con Headspace y cromatografía de gases.

IV.3.3.2.- Ensayos de recuperación

Para calcular la recuperación de clorpirifos presente en muestras acuosas, se llevaron a cabo ensayos a dos niveles de concentración utilizando muestras de agua adicionadas con pequeñas cantidades de clorpirifos (200 y 800 ng adicionados). Los valores de recuperación se muestran en la tabla IV.6. Se han obtenido valores de recuperación de 87.6 y 67.5 para los dos niveles estudiados, mientras que el valor de recuperación global obtenido fue de 77,5 %. Estos resultados confirman la utilidad de la metodología descrita para la determinación directa de clorpirifos en agua. La desviación estándar relativa obtenida para los ensayos de recuperación fue de 13,0%.

Tabla IV.6.- Porcentajes de recuperación promedio (n=3) (RSD) de muestras de agua enriquecidas con clorpirifos a dos niveles de concentración después de la extracción con Tenax y desorción térmica con HS.

Plaguicidas	% de Recuperación (RSD)	
	200 ng	800 ng
Clorpirifos	87,6 (11,3)	67,5 (9,0)

IV.3.3.3.- Repetibilidad y reproducibilidad

Tabla IV.7.- Datos de los estudios de repetibilidad y reproducibilidad del método de extracción con Tenax y desorción térmica con HS-GC-NPD.

Plaguicidas	Repetibilidad		Reproducibilidad		Recuperación del método
	t_r	Área	t_r	Área	% (RSD)
	(RSD, n=15)	(RSD, n=15)	(RSD, n=45)	(RSD, n=45)	
Clorpirifos	0,1	8,8	0,2	9,2	77,5 (13,1)

Una vez que se obtuvieron los valores de recuperación del método de se llevaron a cabo los correspondientes estudios de de repetibilidad y de reproducibilidad. Para ello se realizaron 5 inyecciones consecutivas a tres niveles de adición de clorpirifos distintos (200, 500 y 800 ng) en tres días diferentes. La Tabla IV.7 muestra los valores de RSD de los tiempos de retención oscilaron entre 0,1 % para la repetibilidad y 0,2% para la reproducibilidad, mientras que los valores de RSD para las áreas oscilaron entre 8,8% para la repetibilidad y entre 9,5% para la reproducibilidad.

El método fue repetible y reproducible al cumplir con el criterio de valores de RSD no mayores al 15 %.

IV.3.3.4.- Límite de detección y cuantificación

Los valores del límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ) fueron establecidos de acuerdo a la recomendación de la IUPAC como $LOD = 3s_{blanco}/m$ y $LOQ = 10s_{blanco}/m$ respectivamente; donde s_{blanco} es la desviación estándar de 5 determinaciones de la señal NPD obtenida para la concentración de trabajo más baja (200 ng) y m es la pendiente de la curva de calibración.

El límite de detección obtenido fue de $0,11 \mu\text{gL}^{-1}$, mientras que el valor del límite de cuantificación fue de $0,33 \mu\text{gL}^{-1}$.

Tabla IV.8.- Datos de calibración y límites de detección y cuantificación del método HS-GC-NPD aplicado en muestras acuosas.

Plaguicidas	t_r (min)	Intervalo de calibración	Ecuación de la línea recta	Linealidad (r^2)	LOD ^{a)} μgL^{-1}	LOQ ^{b)} μgL^{-1}
Clorpirifos	8,69	(200 – 1000 ng)	$y = 0,662x - 122,4$	0,992	0,11	0,33

IV.4.- Estudio comparativo de los dos métodos de extracción empleados para muestras acuosas (LLE y Tenax-HS).

Una vez expuestos los dos métodos de extracción empleados para muestras de agua, parece adecuado llevar a cabo un estudio comparativo de los mismos, ya que cada una de las técnicas presenta ventajas e inconvenientes

Para poder comparar la eficacia de la extracción se ha calculado, en cada caso, el porcentaje de recuperación.

El estudio comparativo se va a hacer en función de los valores de recuperación y en función también de ventajas e inconvenientes operacionales (costo, rapidez, comodidad, limpieza, etc.).

En cuanto a la reproducibilidad, ambas técnicas muestran valores de desviación estándar relativa porcentual similares, por lo que no destaca una sobre la otra.

En la tabla IV.9 se muestran los valores de recuperación de las dos técnicas empleadas. Como se puede observar sólo se pudo realizar el estudio de clorpirifos por medio del método de headspace, ya que la temperatura del horno de este analizador solo permitió la desorción de este plaguicida del Tenax.

Tabla IV.9.- Porcentajes de recuperación promedio (RSD) de las dos técnicas estudiadas (LLE y HS).

Plaguicidas	Extracción Líquido-líquido		Extracción con Tenax-HS	
	% Recuperación (RSD)	LOD (μgL^{-1})	% Recuperación (RSD)	LOD (μgL^{-1})
Etoprofos	-----	-----	-----	-----
Diazinon	67,1 (1,8)	0,13	-----	-----
Metil-paratión	83,9 (5,1)	0,88	-----	-----
Malatión	-----	-----	-----	-----
Clorpirifos	93,1 (6,4)	0,29	77,5 (13,1)	0,11

Como se ha comentado, se va a hacer la comparación en función de las ventajas e inconvenientes operacionales, que en muchos casos van a ser cuestiones decisivas. Así, en la tabla IV.10 aparecen reflejados aspectos como rapidez, comodidad, costo, consumo de disolvente, etc.

Tabla IV.10.- Ventajas e inconvenientes de los dos métodos estudiados para muestras acuosas: LLE y Tenax-HS.

MÉTODO	CARACTERISTICAS	VENTAJAS	DESVENTAJAS
LLE	Tiempo: 5-15 min Muestra: 50 mL Extractante: 25 mL DCM	Consumo de poca cantidad de solvente. Procedimiento muy conocido. No requiere filtración previa a la extracción. Bajo costo.	Tiempos largos de extracción. Largo y tedioso. Formación de emulsiones. Requiere paso de concentración de la muestra.
Tenax-HS	Tiempo: 30-60 horas Muestra: 500 mL (agua) Extractante: 0.5 g de Tenax	Eliminación del uso de solventes orgánicos. Simplicidad en la operación. Automatización del sistema. No requiere paso de limpieza de la muestra ni de pre-concentración de la misma. Posibilidad de analizar muestras muy complejas. Poca manipulación de la muestra.	Inversión moderada en el analizador de Headspace. Costo alto del adsorbente (Tenax-TA). Posibilidad de bajos porcentajes de recuperación debido a poca interacción entre el analito y el adsorbente.. Incompleta desorción del analito del Tenax.

Como se puede apreciar, el número de ventajas es mayor en la extracción con Tenax y desorción térmica con Headspace. Un aspecto muy importante a tener en consideración hoy en día es el consumo de disolventes orgánicos, ya que su uso conlleva problemas ambientales y problemas de gestión de residuos. En este sentido la extracción con Tenax y desorción térmica lo es para muestras acuosas, ya que este método evita por completo la utilización de disolventes. Por otro lado, un punto a valorar es la comodidad en la realización del análisis y es indiscutible que la extracción con Tenax es la mejor en este sentido, y se perfila como un método novedoso para el análisis de plaguicidas organofosforados en diversas matrices, ya que dicho método no requiere de una manipulación excesiva de la muestra, por lo que el riesgo de pérdida del analito disminuye considerablemente.

IV.5.- Determinación de plaguicidas organofosforados en ajolote (*Ambystoma mexicanum*) combinando extracción asistida por microondas (MAE) con cromatografía de gases

En esta sección se presenta la determinación de cinco plaguicidas organofosforados (etoprofos, diazinon, metil-paratión, malatión y clorpirifos) en tejido de ajolote por cromatografía de gases acoplado a un detector de Nitrógeno-Fosforo (GC-NPD) previa extracción asistida por microondas.

Los parámetros de extracción (tiempo de extracción, temperatura y tipo de disolvente), así como el método de limpieza han sido optimizados con objeto de minimizar el número de pasos o etapas de dicho procedimiento.

Este trabajo constituye una de las primeras aplicaciones en la determinación de estos compuestos en este organismo, permitiendo la determinación de este grupo de plaguicidas en ajolote hasta unos pocos $\mu\text{g/L}$.

IV.5.1.- Antecedentes

Hasta la elaboración de este capítulo de la presente Tesis, se habían desarrollado varios métodos de análisis de pesticidas por GC, pero ninguno de ellos habían sido aplicados a muestras de tejido de ajolote.

En lo que a la MAE respecta, se había aplicado combinada con GC en varios trabajos para el análisis de plaguicidas organofosforados y organoclorados en peces, pero de igual manera no se encontró trabajo alguno sobre su aplicación en el análisis en tejido de *Ambystoma mexicanum* o de ningún otro anfibio.

IV.5.2.- Optimización del método de extracción

IV.5.2.1.- Estabilidad de los plaguicidas organofosforados

Para poder realizar extracciones asistidas por microondas (MAE) es imprescindible que los analitos a determinar sean estables, tanto a esta radiación, como al calentamiento que provoca. Existe un gran número de especies que son estables a este tratamiento y han sido ampliamente estudiadas, como por ejemplo los contaminantes PCBs y PAHs o multitud de plaguicidas organoclorados [Pastor, 1996].

Por lo que la primera etapa consistió en comprobar la estabilidad de estos compuestos durante el calentamiento por microondas. Para ello se irradió a la máxima potencia (1200 W, 15 min) una solución stock de $200 \mu\text{g L}^{-1}$ y se calculó la recuperación obtenida para cada uno de los compuestos estudiados, siendo todas ellas superiores al 99%.

Tabla IV.11.- Porcentajes de recuperación promedio (n=3), RSD de una solución stock de 200 µg/L de plaguicidas irradiados a 1200W durante 15 min.

Plaguicidas	Recuperación	
	%	(RSD)
Diazinon	100,2	(1,0)
Metil-paratión	99,6	(2,1)
Clorpirifos	102,0	(1,4)
Etoprofos	100,0	(3,0)
Malatión	101,1	(0,8)

IV.5.2.2.- Parámetros de extracción por microondas

Una vez asegurada la estabilidad de estos compuestos el siguiente paso consistió en buscar las mejores condiciones para la extracción por microondas. Para ello, se empleó diclorometano como disolvente extractante ya que este disolvente resultó efectivo en la extracción de los plaguicidas estudiados en capítulo anterior; en cuanto a las condiciones de tiempo de extracción y potencia del magnetrón, se decidió utilizar las mismas condiciones que se utilizaban por nuestro grupo de trabajo en la extracción de plaguicidas en sedimentos, en donde se utilizaba una potencia de 1200 W y un tiempo de extracción de 15 min. Todas las extracciones se realizaron en reactores de teflón (PTFE) de 100 mL de volumen interno, empleando 1 gramo de tejido y 10 mL de diclorometano como disolvente.

IV.5.2.3.- Desarrollo del método de limpieza (clean-up)

El siguiente paso consistió en buscar un método de limpieza adecuado para los extractos de tejidos tratados por microondas. Debido a las altas presiones y temperaturas que se alcanzan en los reactores, se extrae una mayor cantidad de matriz de muestra, entre la que destacan los lípidos. El procedimiento empleado para esta limpieza del extracto consistió en un fraccionamiento en columna, para lo cual se decidió utilizar diferentes adsorbentes en cartuchos SPE; la ventaja de utilizar este tipo de fases sólidas es el hecho de poder disminuir la cantidad de adsorbente utilizado y en consecuencia reducir la cantidad de solvente utilizado para llevar a cabo la elución de los analitos. Los tres soportes o adsorbentes estudiados para llevar a cabo la limpieza fueron: Florisil, C₁₈ y Silica. Para calcular las recuperaciones se empleó tejido de ajolote exento de plaguicidas, que fue secado y homogenizado con sulfato de sodio anhidro. Posteriormente se añadieron 100 µL de una solución stock de plaguicidas a una concentración de 1 mg/L en acetona, se dejó evaporar a temperatura ambiente.

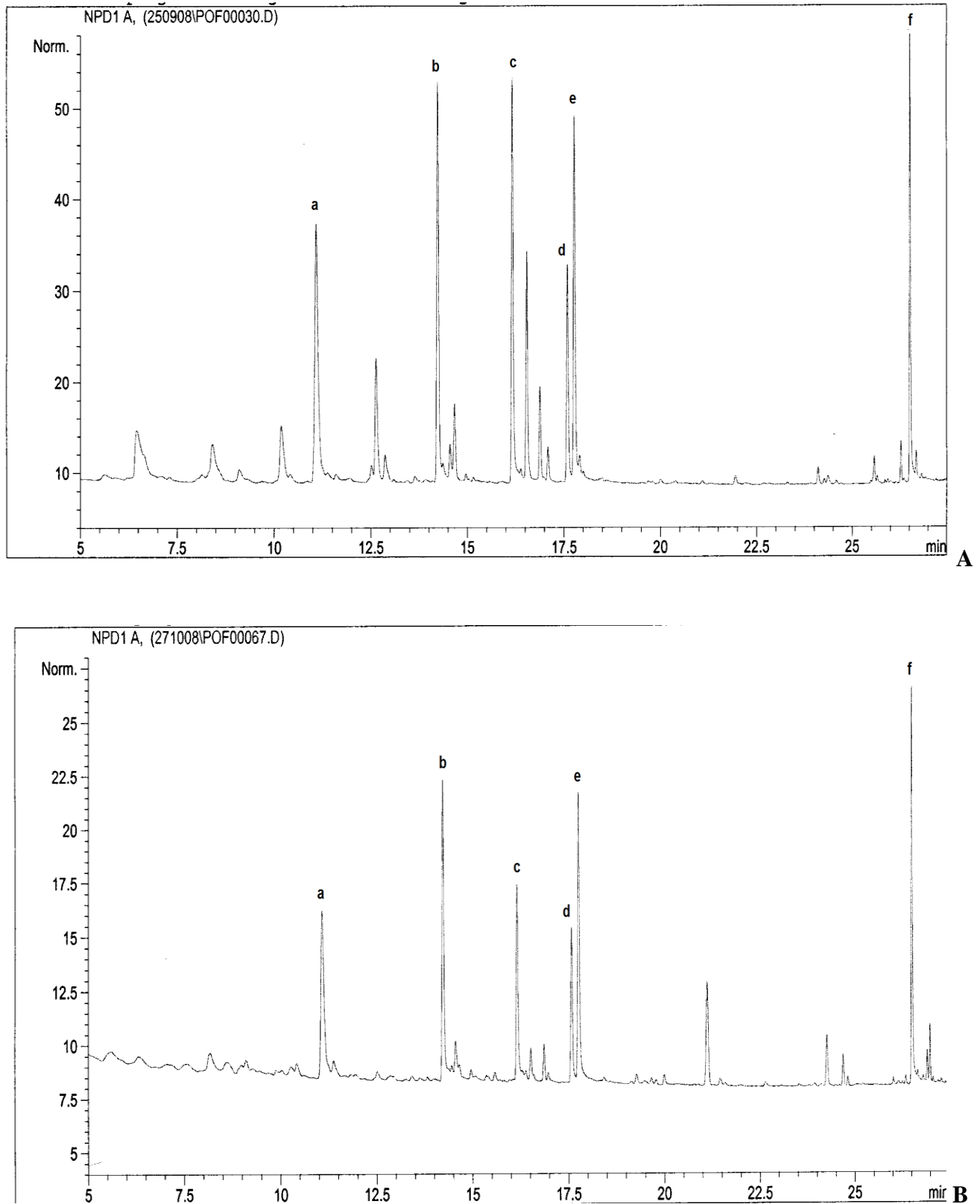


Figura IV.10.-Cromatogramas GC-NPD correspondientes a una muestra de tejido de ajolote fortificado a 100 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ después de la extracción MAE y limpieza del extracto utilizando A) Florisil y B) Silica +Florisil: (a) etoprofos, (b) diazinon, (c) metil-paratión, (d) malatión, (e) clorpirifos y (f) trifenil fosfato (estándar interno).

El tejido se mantuvo a 4°C durante 6 horas para fomentar la unión de los plaguicidas al tejido. El inconveniente de emplear florisil para el fraccionamiento de plaguicidas organofosforados, consiste en que, debido a que son compuestos con una ligera polaridad, es necesario el empleo de un disolvente más polar para su elución. De esta forma debemos de elegir el disolvente más apropiado para que la elución de plaguicida sea cuantitativa y la extracción de matriz mínima. Para ello se emplearon distintos disolventes como: acetato de etilo y acetonitrilo.

Siendo el acetonitrilo el que presentó una mejor elución de los plaguicidas retenidos en los adsorbentes. Pero debido a la polaridad del disolvente también eluyen gran cantidad de componentes de la matriz de la muestra, que no presentan ningún residuo sólido visible, pero si un elevado número de picos cromatográficos que interfieren con nuestros analitos. Para ello se decidió utilizar una combinación de soportes C₁₈ + Florisil ya que de esta manera eluirán menos componentes de la matriz.

Los valores de recuperación se calcularon como el cociente entre concentración encontrada después de todo el tratamiento de la muestra y lo añadido previamente. La figura IV.10 muestra las recuperaciones obtenidas según las distintas condiciones empleadas.

Tabla IV.12.- Porcentajes de recuperación promedio (n=3) (RSD) de muestras de tejido enriquecidas con plaguicidas organofosforados después de varios tratamientos de limpieza.

Plaguicidas	Recuperación % (RSD)		
	Florisil	Silica + Florisil	C ₁₈ + Florisil
Etoprofos	90,5 (3,7)	56,5 (3,7)	95,1 (0,5)
Diazinon	92,0 (2,0)	52,9 (2,0)	96,5 (1,8)
Metil-paratión	81,3 (4,1)	58,9 (5,3)	96,1 (3,3)
Malatión	58,0 (2,3)	51,7 (2,5)	101,9 (2,6)
Clorpirifos	44,7 (2,6)	66,8 (2,3)	95,9 (3,9)

Durante la optimización del procedimiento, las condiciones de elución (duración de elución y volumen de elución) fueron investigadas. La relación entre el tiempo de elución y el valor de las recuperaciones de los cinco plaguicidas estudiados se muestra en la Fig. IV.11. Generalmente, 1 min de elución no fue suficiente para llevar a cabo la recuperación de todos los plaguicidas con valores de recuperación mayores al 70 %. Las recuperaciones para la mayoría de los analitos incrementaron significativamente cuando la duración de la elución aumento de 1 min a 3 ó 5 min. Además se observó que estas recuperaciones permanecían sin cambios significativos si se utilizaban tiempos de elución mayores a 5 min.

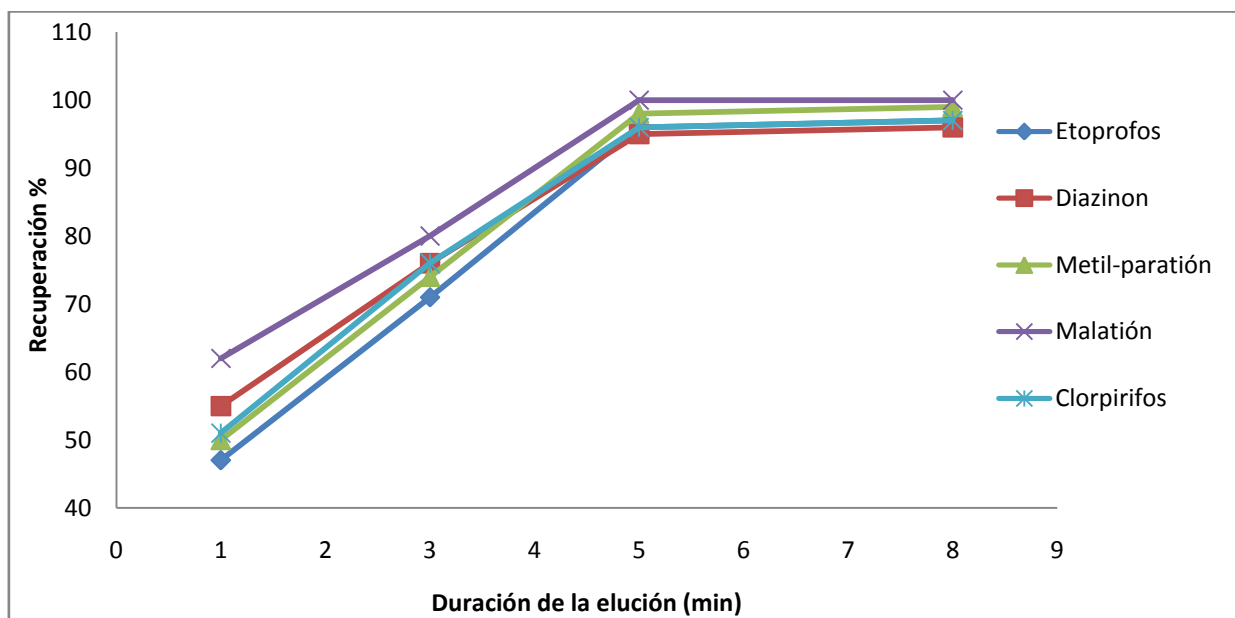


Figura IV.11.- Efecto de la duración de elución en los valores de recuperación de los cinco plaguicidas estudiados. Las muestras son 1 gramo de tejido de ajolote enriquecidos con los analitos a una concentración de $100 \mu\text{gKg}^{-1}$. Los resultados de recuperación fueron por triplicado.

Con el objetivo de realizar un rápido procedimiento de elución de los analitos y sin sacrificar su eficiencia, se decidió que 5 minutos era un buen periodo para llevar a cabo una completa elución de los analitos obteniendo valores de recuperación mayores del 90 %.

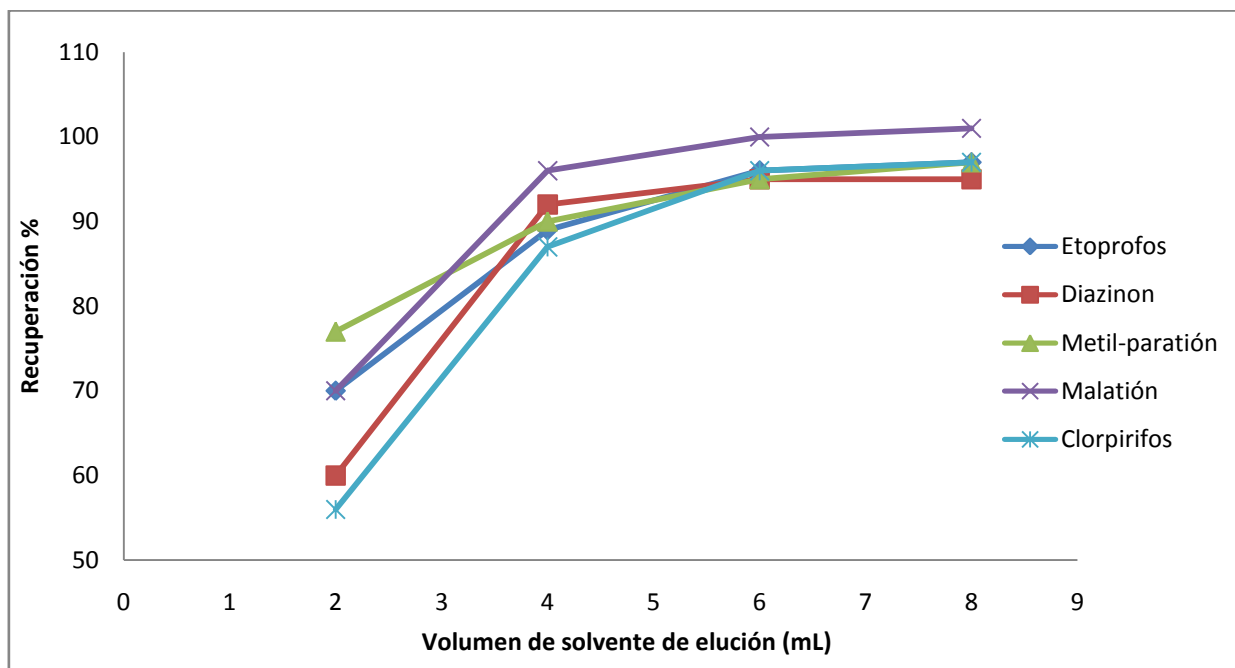


Figura IV.12.- Efecto del volumen de elución en los valores de recuperación de los cinco plaguicidas estudiados. Las muestras son 1 gramo de tejido de ajolote enriquecidos con los analitos a una concentración de $100 \mu\text{gKg}^{-1}$. Los resultados de recuperación fueron por triplicado.

El efecto del volumen de solvente de elución sobre los valores de recuperación de los plaguicidas estudiados se ilustra en la Figura IV.12. Con 2 mL de acetonitrilo como disolvente de elución, 4 de los 5 compuestos presentaron valores de recuperación menores a 70%, excepto metil-paratión que presentó un valor de recuperación del 76 %. Conforme incrementaba el volumen de solvente de elución también lo hacían los valores de recuperación de los plaguicidas; observándose que los analitos presentaban valores de recuperación similares para volúmenes entre 6 y 8 mL, por lo que se decidió que el volumen de elución óptimo del procedimiento de limpieza fuera de 6 mL.

La Figura IV.13 muestra el esquema del procedimiento de limpieza de extractos aplicado en la determinación de plaguicidas OPs en muestras de tejido de ajolote.

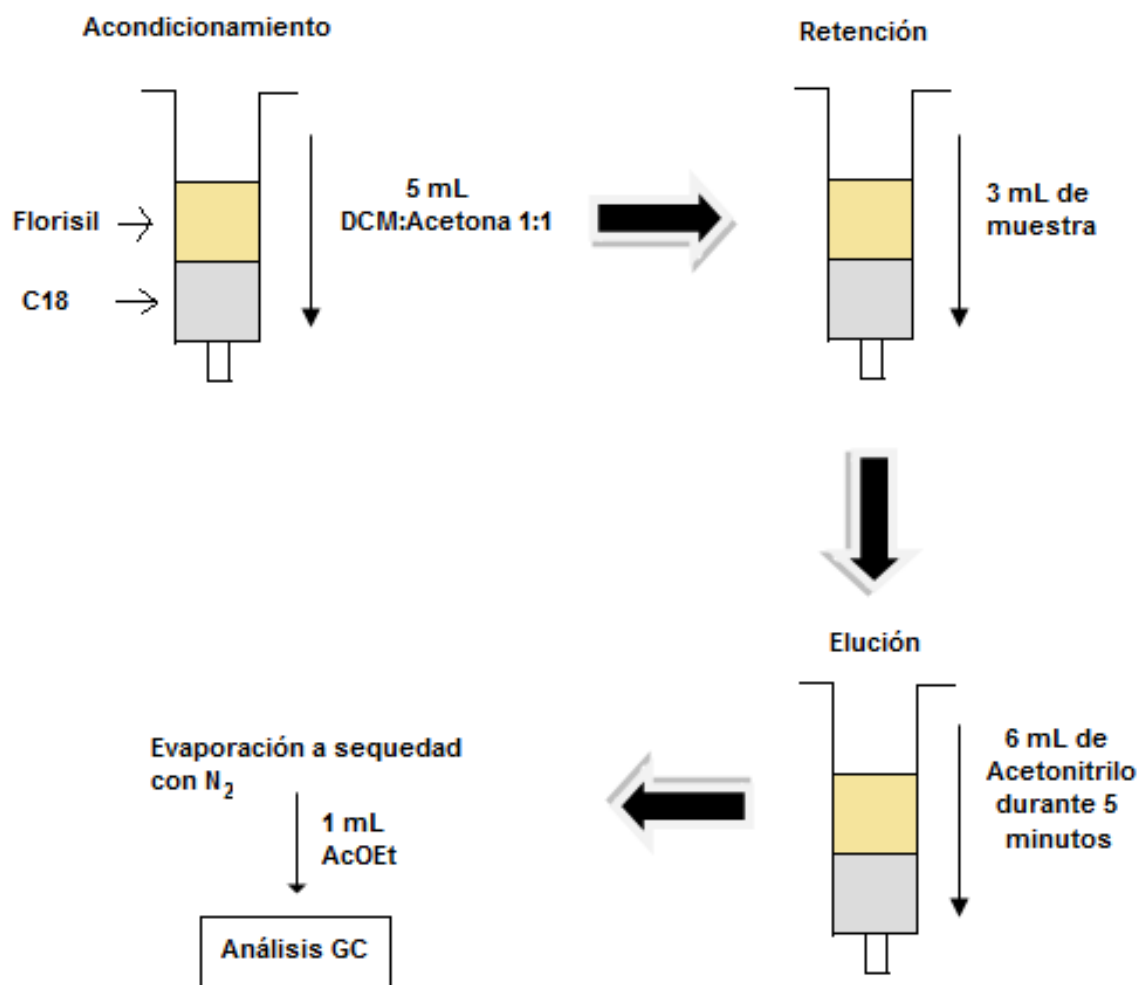


Figura IV.13.- Esquema del procedimiento desarrollado para la limpieza de extractos de tejido de ajolote previa su determinación por cromatografía de gases (GC).

IV.5.3.- Validación del método MAE-GC

IV.5.3.1.- Linealidad

Una vez optimizado el método de extracción, se obtuvieron las correspondientes rectas de calibración para los cinco plaguicidas (Figura IV.14) a concentraciones comprendidas entre 3 y 500 $\mu\text{g/L}$, utilizando como estándar interno trifetil fosfato mostrando coeficientes de correlación (r^2) aceptables, superiores a 0,99.

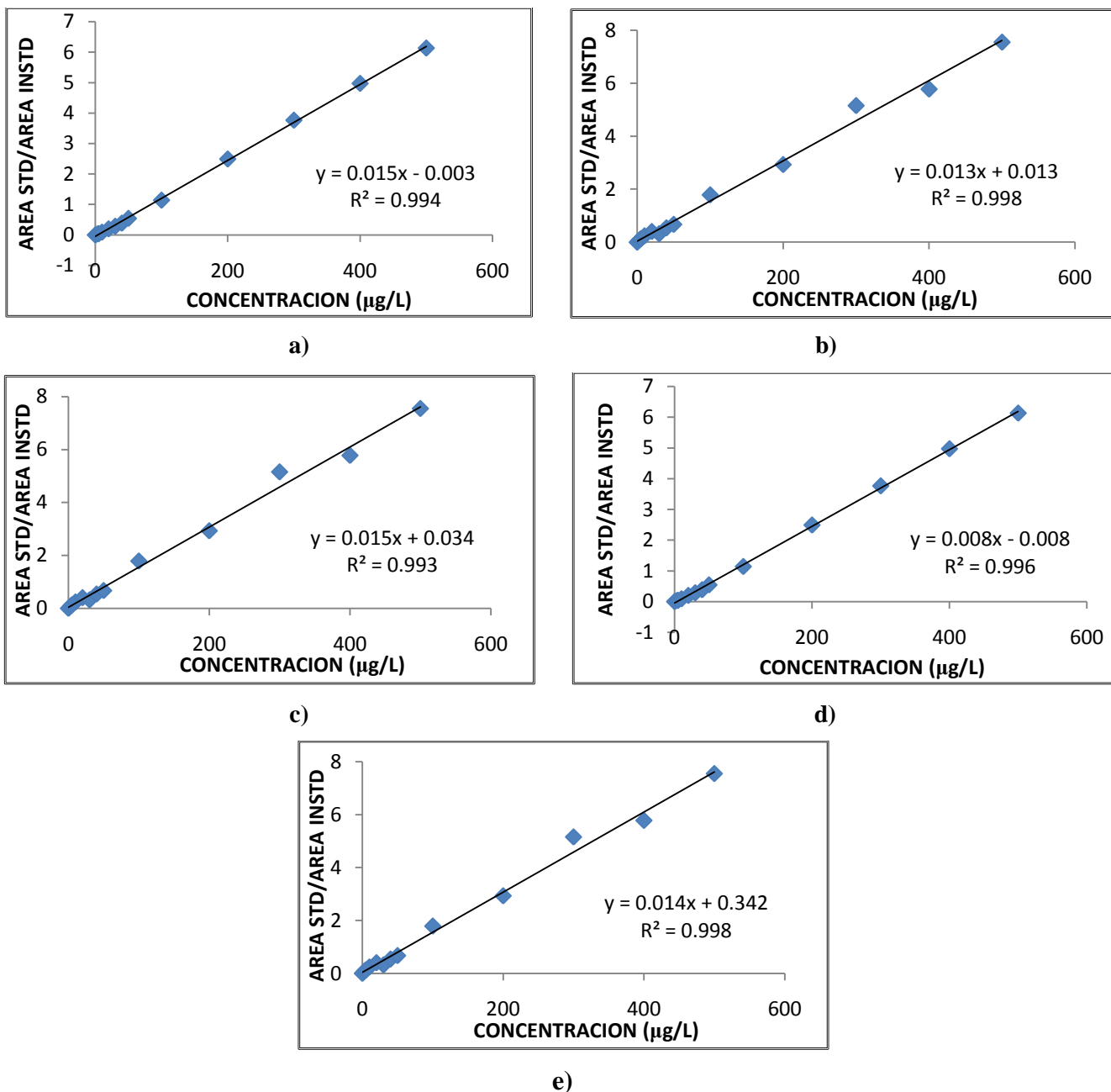


Figura IV.14.- Graficas de linealidad del método: a) etoprofos, b) diazinon, c) metil-paratió, d) malatió, e) clorpirifos.

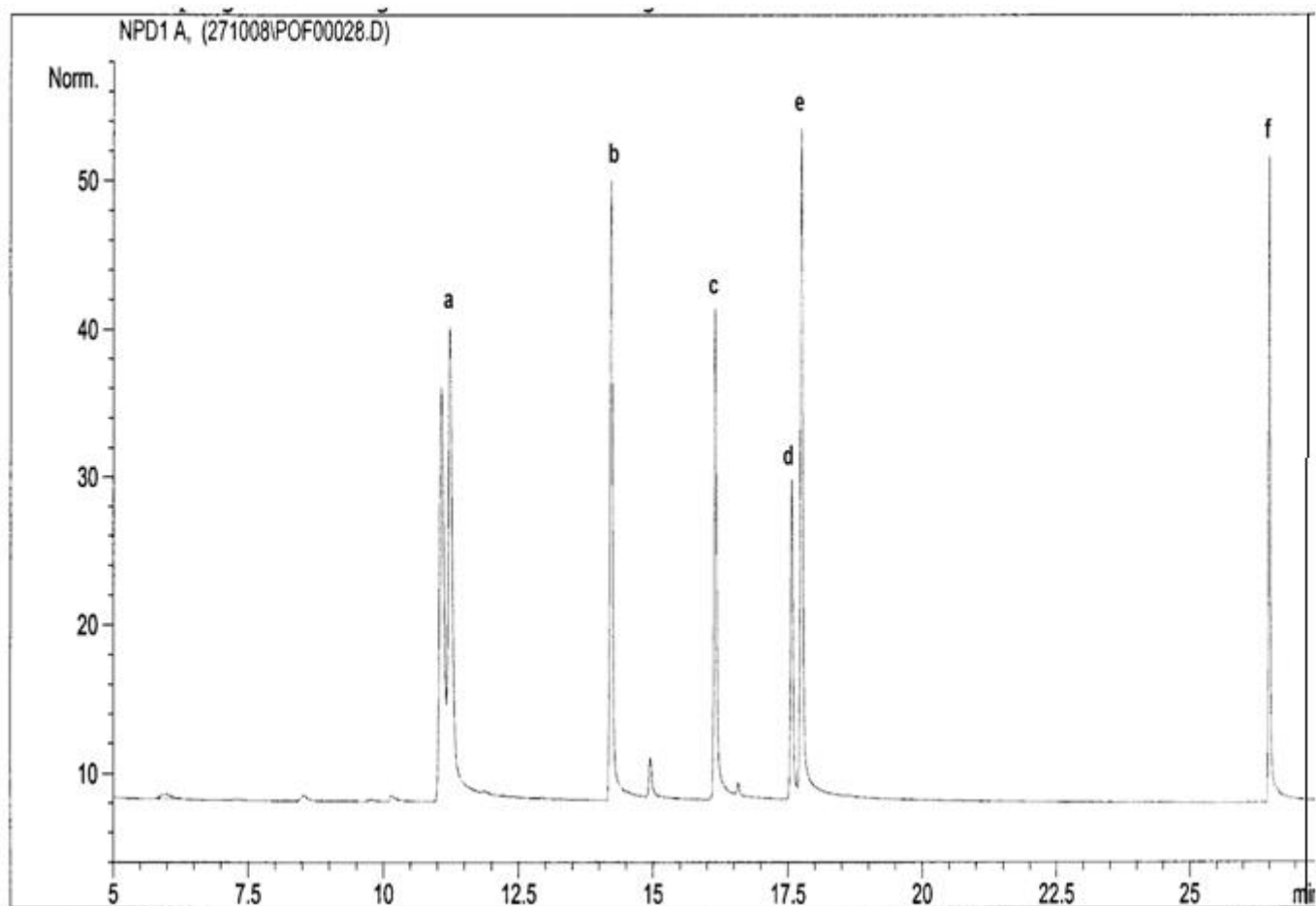


Figura IV.15.-Cromatograma GC-NPD correspondiente a una muestra de tejido de ajolote fortificado a 100 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ después de la extracción MAE y limpieza del extracto utilizando un cartucho SPE de C_{18} +Florisil: (a) etoprofos, (b) diazinon, (c) metil-paratión, (d) malatión, (e) clorpirifos y (f) trifenil fosfato (estándar interno).

IV.5.3.2.- Recuperación

Con objeto de evaluar la recuperación del método, éste se aplicó a la determinación de los plaguicidas en tejido de ajolote enriquecidos a tres niveles de concentración diferentes (25,75 y 150 $\mu\text{g}/\text{Kg}$). La eficacia del procedimiento MAE pudo comprobarse por comparación de los cromatogramas de los extractos obtenidos con los de un estándar. Se llevaron a cabo tres extracciones a cada nivel de concentración ($n=3$). La Tabla IV.13 muestra los porcentajes de recuperación obtenidos para cada plaguicida a cada nivel de concentración, así como la RSD.

Tal como puede apreciarse en dicha tabla, los porcentajes de recuperación medios se encontraron en torno al 100% para todos los plaguicidas y valores de RSD menores al 15 %.

Tabla IV.13.- Porcentajes de recuperación promedio (n=3) (RSD) de muestras de tejido enriquecidas con plaguicidas organofosforados a tres niveles de concentración después de la extracción por microondas.

Plaguicidas	Recuperación % (RSD)		
	25 µg/Kg	75 µg/Kg	150 µg/Kg
Etoprofos	96,2 (2,4)	95,8 (3,2)	94,6 (6,1)
Diazinon	98,5 (4,7)	97,0 (6,0)	97,3 (3,9)
Metil-paratión	98,8 (2,0)	97,9 (1,8)	98,1 (2,7)
Malatión	101,1 (9,4)	100,5 (7,1)	100,5 (5,6)
Clorpirifos	96,4 (1,5)	96,6 (2,0)	94,0 (2,0)

IV.5.3.3.- Repetibilidad y reproducibilidad

Tabla IV.14.- Datos de los estudios de repetibilidad y reproducibilidad del método de separación de los tres plaguicidas por MAE-GC-NPD

Plaguicidas	Repetibilidad		Reproducibilidad		Recuperación del método % (RSD)
	t _r	Área	t _r	Área	
	(RSD, n=15)	(RSD, n=15)	(RSD, n=45)	(RSD, n=45)	
Etoprofos	0,1	2,2	0,2	4,5	95,9 (3,8)
Diazinon	0,1	2,3	0,2	3,3	97,3 (2,9)
Metil-paratión	0,1	0,6	0,1	1,7	98,2 (2,4)
Malatión	0,2	0,3	0,3	2,6	100,7 (11,0)
Clorpirifos	0,1	0,5	0,1	1,5	96,5 (7,1)

Una vez que se obtuvieron los valores de recuperación del método se llevaron a cabo los correspondientes estudios de de repetibilidad y de reproducibilidad. Para ello se realizaron 5 inyecciones consecutivas a tres niveles de concentración distintos (10, 100 y 400 µg/L) en tres días diferentes. La Tabla IV.14 muestra los valores de RSD de los tiempos de retención oscilaron entre 0,1 y 0,2% para la repetibilidad y entre 0,1 y 0,3% para la reproducibilidad, mientras que los valores de RSD para las áreas oscilaron entre 0,3 y 2,3% para la repetibilidad y entre 1,5 y 4,5% para la reproducibilidad.

El método fue repetible y reproducible al cumplir con el criterio de valores de RSD no mayores al 15 %.

IV.5.3.4.- Límite de detección y cuantificación

Los valores del límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ) fueron establecidos de acuerdo a la recomendación de la IUPAC como $LOD = 3s_{blanco}/m$ y $LOQ = 10s_{blanco}/m$ respectivamente; donde s_{blanco} es la desviación estándar de 5 determinaciones de la señal NPD obtenida para la concentración de trabajo más baja sometida a todo el método (25 $\mu\text{g}/\text{Kg}$) y m es la pendiente de la curva de calibración. Los límites de detección obtenidos estaban comprendidos entre 0,03 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ para etoprofos y 0,27 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ para el metil-paratión, mientras que los valores del límite de cuantificación estaban comprendidos entre 0,12 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ y 0,92 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ para etoprofos y metil-paratión respectivamente, lo que permitió determinar este grupo de plaguicidas a muy bajas concentraciones.

Tabla IV.15.- Datos de calibración y límites de detección y cuantificación del método MAE-GC-NPD.

Plaguicidas	t_r (min)	Intervalo de calibración	Ecuación de la línea recta	Linealidad (r^2)	LOD ^{a)} $\mu\text{g}/\text{Kg}$	LOQ ^{b)} $\mu\text{g}/\text{Kg}$
Etoprofos	11,05	(3 – 500 $\mu\text{g}/\text{L}$)	$y = 0,015x - 0,003$	0,994	0,03	0,12
Diazinon	14,21	(3 – 500 $\mu\text{g}/\text{L}$)	$y = 0,013x + 0,013$	0,998	0,12	0,41
Metil-paratión	16,14	(3 – 500 $\mu\text{g}/\text{L}$)	$y = 0,015x + 0,034$	0,993	0,27	0,92
Malatión	17,53	(3 – 500 $\mu\text{g}/\text{L}$)	$y = 0,008x - 0,008$	0,996	0,25	0,86
Clorpirifos	17,74	(3 – 500 $\mu\text{g}/\text{L}$)	$y = 0,014x + 0,342$	0,998	0,17	0,60

a) $LOD = 3s (1/m)$

b) $LOQ = 10s (1/m) = 3 LOD$

donde s es la desviación estándar de la señal NPD obtenida para la concentración de trabajo más baja y m es la pendiente de la curva de calibración.

IV.5.3.5.- Aplicación del método

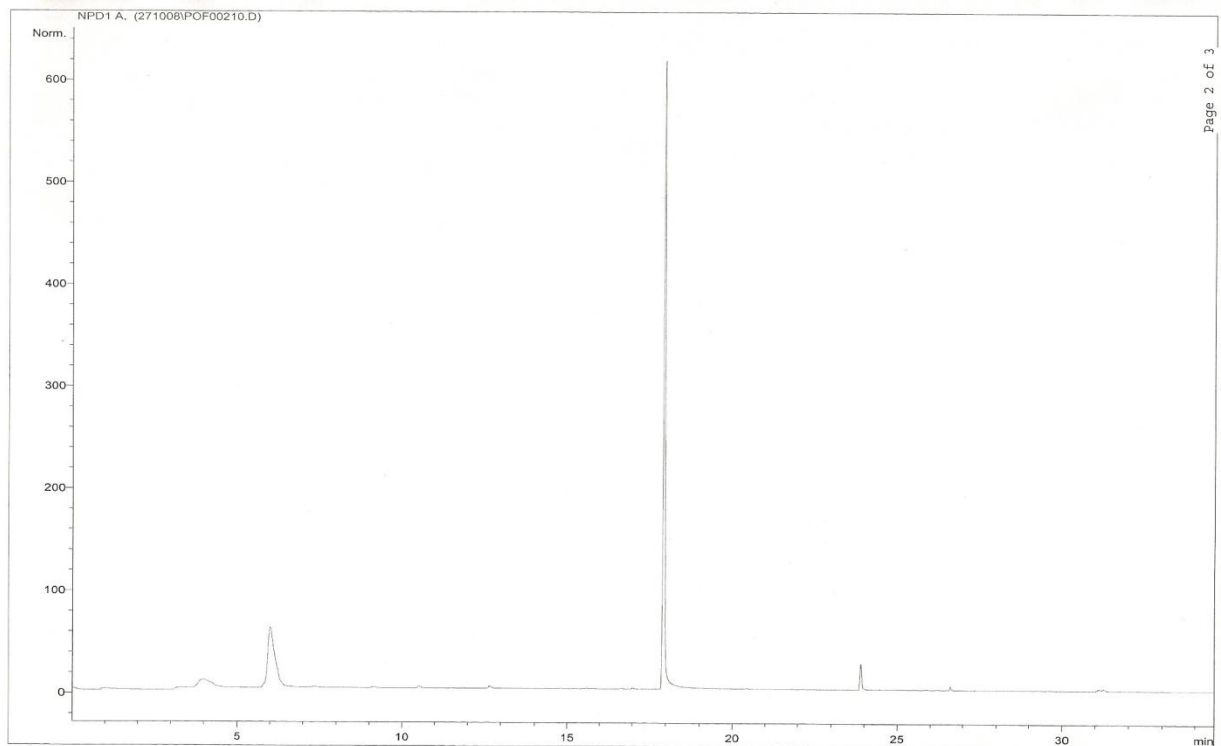
Tabla IV.16.- Concentración ($\mu\text{g Kg}^{-1}$) de plaguicidas en muestras de tejido de ajolote.

Plaguicidas	^a Concentración de exposición 0,5 mg L^{-1}			^a Concentración de exposición 10 mg L^{-1}		
	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4	Muestra 5	Muestra 6
Clorpirifos	0,410	0,933	1,517	15,533	7,513	12,349

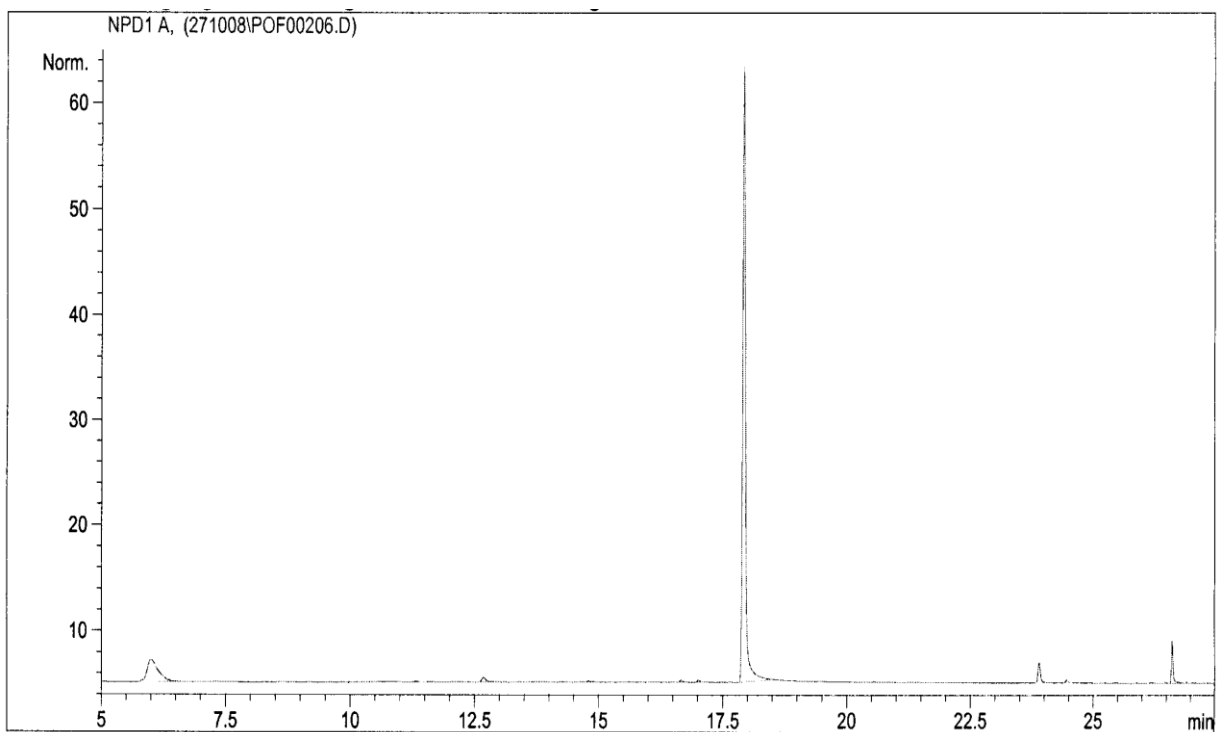
a) Concentraciones en el agua contenida en la pecera.

La tabla IV.16 muestra las concentraciones de clorpirifos encontradas en muestras de tejidos de ajolote, que fueron proporcionados por el laboratorio de Ecofisiología de la Facultad de Ciencias; como puede

observarse, el método fue aplicado satisfactoriamente en la determinación de este plaguicida en ajolotes que fueron expuestos a 2 diferentes niveles de exposición.



a)



b)

Figura IV.16.-Cromatogramas GC-NPD correspondientes a una muestra de tejido de ajolote expuesto a clorpirifos a una concentración de a) 10 mg/L después de la extracción MAE y limpieza del extracto utilizando un cartucho SPE de C₁₈ +Florisil y b) 10 mg/L después de la extracción MAE y limpieza del extracto utilizando un cartucho SPE de C₁₈ +Florisil (dilución 1:20).

Es importante señalar que las concentraciones de clorpirifos encontradas en los ajolotes expuestos, demuestran que este plaguicida puede acumularse fácilmente en el tejido, quizá es necesario realizar estudios más específicos para determinar la cantidad de plaguicida presente en el agua, ya que podemos considerar que los plaguicidas disponibles son aquellos que se encuentren en la fase acuosa y que serán éstos, los que en determinado momento pueden estar accesibles para los organismos.

IV.6.- Desarrollo del método de análisis de plaguicidas organofosforados en tejido de ajolote mediante extracción en fase sólida con Tenax-TA y desorción térmica por Headspace (Espacio de cabeza) y Cromatografía de gases.

En este apartado se estudia el potencial de los adsorbentes poliméricos para la extracción de clorpirifos en muestras de tejido de ajolote (*Ambystoma mexicanum*) y posterior desorción térmica como etapas previas a la determinación por cromatografía de gases. Este trabajo constituye un novedoso método y proporciona una herramienta de análisis de este tipo de plaguicidas en matrices complejas, ya que ofrece una doble ventaja, por un lado la concentración del analito durante la captación del mismo y por otro, la posibilidad de evitar la etapa de limpieza o clean up.

IV.6.1.- Antecedentes

Hasta la elaboración de este capítulo de la presente Tesis, se habían desarrollado varios métodos de extracción de plaguicidas. Es la primera vez que el Tenax-TA es utilizado para realizar una extracción en fase sólida en matrices de tejido, por lo que, el objetivo del presente estudio fue probar la efectividad de la aplicación de la adsorción de plaguicidas en polímeros porosos y el uso de un sistema de desorción térmica (Headspace) acoplado a un cromatógrafo de gases para la determinación de clorpirifos en tejido.

IV.6.2.- Optimización del método

En la sección IV.3 se presentó la determinación de clorpirifos en agua de la zona lacustre de Xochimilco. Con el fin de completar la aplicación de la técnica a muestras más complejas, se llevó a cabo el análisis en tejido de ajolote. En el caso del tejido es una matriz bastante compleja, una gran cantidad de compuestos, especialmente lípidos, pueden ser adsorbidos por el Tenax, además de los analitos objetos de estudio, con lo que la calidad de los análisis decrece y el tiempo de vida media de la resina disminuye drásticamente.

Algunas de las variables optimizadas para la determinación de clorpirifos en muestras acuosas fueron aplicadas al análisis de tejido (*desorción térmica*: 15 min a 190°C). Por lo que respecta a la cantidad de muestra, se fijó una cantidad de 1,0 gramo de muestra a la cual se adicionaron 10 mL de agua desionizada para su posterior extracción con 0,5 gramos de Tenax, previa homogenización mecánica.

El parámetro más importante a optimizar fue el tiempo de adsorción, el cual puede influir significativamente en la eficacia de la extracción de los analitos en tejido por adsorción con Tenax.

Este parámetro es de gran importancia práctica ya que determina la obtención del tiempo necesario para obtener las mayores recuperaciones. En este sentido, se realizaron extracciones de un muestra de tejido fortificada con 200 ng de clorpirifos con tiempos de 6, 12, 18, 30, 48, 60, 72 y 90 horas. Los resultados obtenidos, representando la cantidad extraída (ng) en función del tiempo se muestran en la figura IV.17.

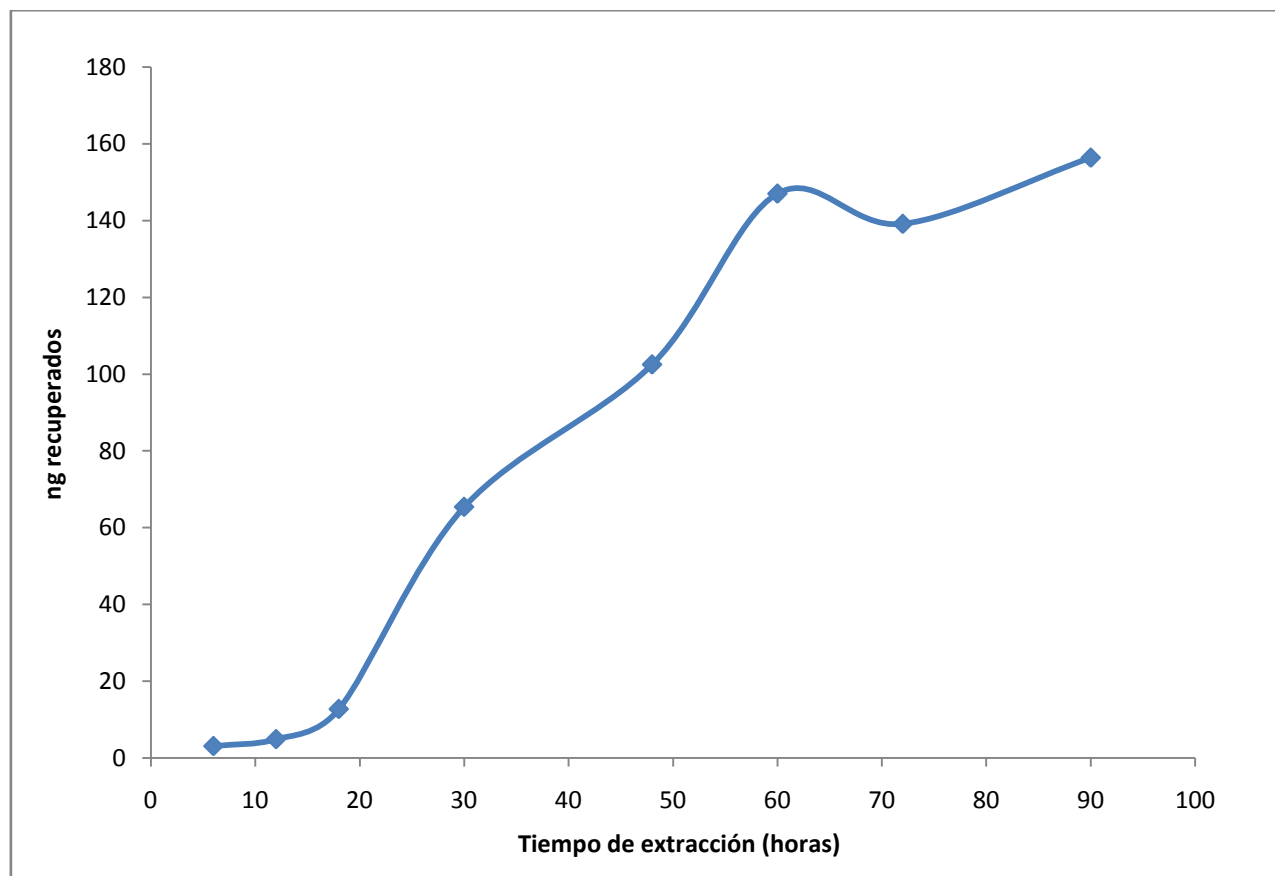


Figura IV.17.- Efecto del tiempo de extracción en los valores de recuperación de clorpirifos en muestras de tejido. Las muestras son 1,0 gramo de tejido enriquecidos con 200 ng de clorpirifos (concentración de la muestra 200 ng/g). Los resultados de recuperación fueron por triplicado.

A la vista de los resultados obtenidos, se seleccionó un tiempo de extracción de 60 horas, ya que utilizando este tiempo de extracción se conseguía recuperar más del 60 % de la cantidad de clorpirifos adicionada. Tras establecer las condiciones óptimas de extracción (*adsorción*: 1,0 gramo de muestra y 60 horas de extracción mediante agitación orbital; *desorción*: 15 min a 190°C), se llevo a cabo la validación del procedimiento, para lo cual se estudió la precisión, el % de recuperación, la linealidad, el límite de detección y el límite de cuantificación.

IV.6.3.- Validación del método

IV.6.3.1.- Linealidad

Para comprobar la linealidad del método, se utilizaron viales con 0,5 g de Tenax, la preparación de los viales se realizó inyectando en el interior de cada vial volúmenes diferentes de una disolución stock de clorpirifos en acetona, de modo que se cubriese todo el rango de calibración (200-1000 ng de clorpirifos) mostrando coeficientes de correlación (r^2) aceptables, superiores a 0,99.

IV.6.3.2.- Ensayos de recuperación

Para calcular la recuperación de clorpirifos presente en tejido, se llevaron a cabo ensayos a dos niveles de concentración utilizando muestras de tejido adicionadas con pequeñas cantidades de clorpirifos (200 y 800 ng adicionados). Los valores de recuperación se muestran en la tabla IV.17. Se han obtenido valores de recuperación de 70,8 y 63,5 para los dos niveles estudiados, mientras que el valor de recuperación global obtenido fue de 67,2 %. Estos resultados confirman la utilidad de la metodología descrita para la determinación directa de clorpirifos en tejido. La desviación estándar relativa obtenida para los ensayos de recuperación fue de 7,5%.

Tabla IV.17.- Porcentajes de recuperación promedio (n=3) (RSD) de muestras de tejido enriquecidas con clorpirifos a dos niveles de concentración después de la extracción con Tenax y desorción térmica con HS.

Plaguicidas	Recuperación % (RSD)	
	200 ng/g	800 ng/g
Clorpirifos	70,8 (3,0)	63,5 (4,0)

IV.6.3.3.- Repetibilidad y reproducibilidad

Tabla IV.18.- Datos de los estudios de repetibilidad y reproducibilidad del método de extracción con Tenax y desorción térmica con HS-GC-NPD.

Plaguicidas	Repetibilidad		Reproducibilidad		Recuperación del método % (RSD)
	t_r (RSD, n=15)	Área (RSD, n=15)	t_r (RSD, n=45)	Área (RSD, n=45)	
Clorpirifos	0,1	8,8	0,2	9,2	67,2 (7,5)

Una vez que se obtuvieron los valores de recuperación del método de se llevaron a cabo los correspondientes estudios de de repetibilidad y de reproducibilidad. Para ello se realizaron 5 inyecciones consecutivas a tres niveles de adición de clorpirifos distintos (200, 500 y 800 ng) en tres días diferentes. La Tabla IV.18 muestra los valores de RSD de los tiempos de retención oscilaron entre 0,1 % para la repetibilidad y 0,2% para la reproducibilidad, mientras que los valores de RSD para las áreas oscilaron entre 8,8% para la repetibilidad y entre 9,5% para la reproducibilidad. El método fue repetible y reproducible al cumplir con el criterio de valores de RSD no mayores al 15 %.

IV.6.3.4.- Límite de detección y cuantificación

Los valores del límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ) fueron establecidos de acuerdo a la recomendación de la IUPAC como $LOD = 3s_{blanco}/m$ y $LOQ = 10s_{blanco}/m$ respectivamente; donde s_{blanco} es la desviación estándar de 5 determinaciones de la señal NPD obtenida para la concentración de trabajo más baja (200 ng) y m es la pendiente de la curva de calibración.

El límite de detección obtenido fue de 56,3 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, mientras que el valor del límite de cuantificación fue de 169,0 $\mu\text{g}/\text{Kg}$.

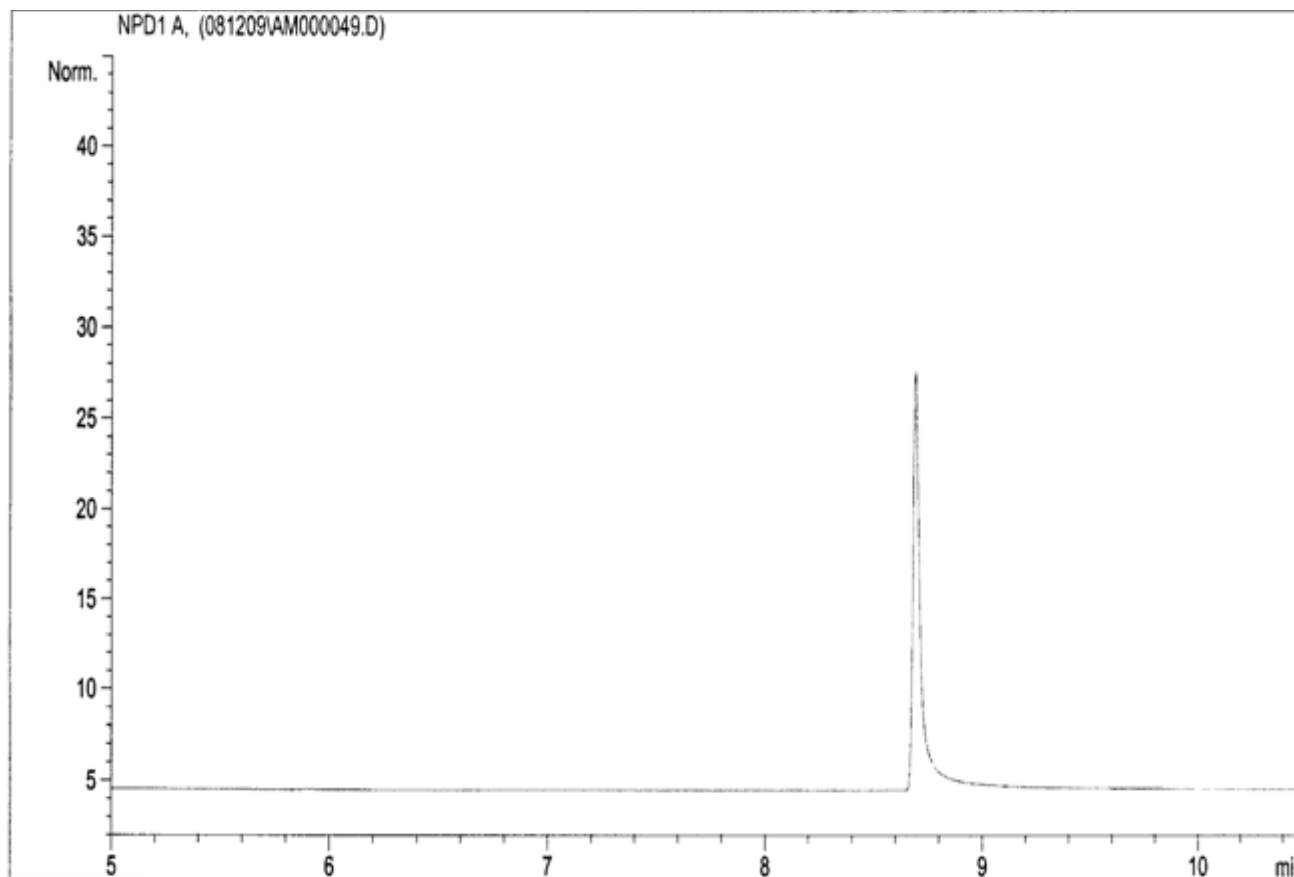


Figura IV.18.-Cromatograma HS-GC-NPD correspondiente a una muestra de tejido de ajolote adicionado con 200 ng de clorpirifos después de la extracción con Tenax y desorción térmica con HS.

IV.7.- Estudio comparativo de los dos métodos de extracción empleados para muestras de tejido de ajolote (MAE y Tenax-HS).

Tal como en el capítulo IV.4, se realizó la comparación de los dos métodos utilizados para la determinación de plaguicidas en tejido de ajolote, los aspectos que se tomaron en cuenta fueron los mismos. En la tabla IV.19 se presentan los valores de recuperación promedio obtenidos para ambos métodos, se puede observar que los porcentajes de recuperación para el método de extracción asistida por microondas son muy buenos, ya que se logró obtener recuperaciones de más del 95 % para los plaguicidas estudiados. En cuanto al método de extracción en fase sólida con Tenax y posterior desorción térmica por Headspace, sólo se llevó a cabo el estudio para clorpirifos debido a las limitaciones mencionadas en el capítulo IV.4, sin embargo, esta técnica se puede considerar como un avance en el análisis ambiental, ya que dentro de las ventajas que ofrece dicha metodología se encuentran: que se logra eliminar el uso de disolventes y se evita el paso de limpieza, por lo que la disminución en las etapas de la metodología son visibles, lo cual se traduce en la disminución del tiempo de análisis y el riesgo de pérdida del analito disminuye considerablemente.

Tabla IV.19.- Porcentajes de recuperación promedio (RSD) de las técnicas MAE y Tenax-HS estudiadas.

Plaguicidas	Extracción MAE		Extracción con Tenax-HS	
	% Recuperación (RSD)	LOD (μgKg^{-1})	% Recuperación (RSD)	LOD (μgKg^{-1})
Etoprofos	95,9 (3,8)	0,03	-----	-----
Diazinon	97,3 (2,9)	0,12	-----	-----
Metil-paratión	98,2 (2,4)	0,27	-----	-----
Malatión	100,7 (11,0)	0,25	-----	-----
Clorpirifos	96,5 (7,1)	0,17	67,2 (7,5)	56,3

En la tabla IV.20 aparecen reflejados aspectos como rapidez, comodidad, costo, consumo de disolvente, etc. Como se puede apreciar, el número de ventajas es mayor en la extracción asistida con microondas para el caso de tejido, que aunque el número de pasos es mayor en comparación con la extracción con Tenax, permite la determinación multiresidual de plaguicidas en esta matriz tan compleja.

Tabla IV.20.- Ventajas e inconvenientes de los dos métodos estudiados para muestras de tejido: MAE y Tenax-HS.

MÉTODO	CARACTERISTICAS	VENTAJAS	DESVENTAJAS
MAE	Tiempo: 15-30 min Muestra: 1 g (tejido) Extractante: 10 mL DCM	Extracción rápida. Volumen bajo de solventes. Extracción múltiple de muestras de manera simultánea Elevada extracción de los compuestos de la matriz. Limite de detección muy bajos.	Requiere de paso de limpieza o clean-up. Moderada inversión económica en la adquisición del equipo.
Tenax-HS	Tiempo: 30-60 horas Muestra: 1 g (tejido) Extractante: 0.5 g de Tenax	Eliminación del uso de solventes orgánicos. Simplicidad en la operación. Automatización del sistema. No requiere paso de limpieza de la muestra ni de pre-concentración de la misma. Posibilidad de analizar muestras muy complejas. Poca manipulación de la muestra.	Inversión moderada en el analizador de Headspace. Costo moderado del adsorbente (Tenax-TA). Posibilidad de bajos porcentajes de recuperación debido a poca interacción entre el analito y el adsorbente. Incompleta desorción del analito del Tenax.

Es necesario comentar, que una vez que se han optimizado y validado los diferentes métodos presentados en esta Tesis, se cuenta con un conjunto de técnicas y métodos confiables para el muestreo y caracterización de plaguicidas organofosforados en muestras ambientales, sobre todo en tejido de ajolote que permite realizar estudios y proyectos de investigación científica para determinar la presencia de estos compuestos como elemento para evaluar el impacto a los ecosistemas. El presente estudio será la base de una futura implementación de una técnica de muestreo y análisis para monitorear la contaminación por plaguicidas en ecosistemas tan importantes como la zona lacustre de Xochimilco y de organismos endémicos y de gran importancia medioambiental como es el caso del ajolote *Ambystoma mexicanum*, lo cual sería un punto de partida para la conservación de dichos ecosistemas.

CAPITULO V

CONCLUSIONES

V.- CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en la presente Tesis, se pueden extraer las siguientes conclusiones generales:

1. Se ha optimizado una serie de metodologías analíticas para la determinación de plaguicidas organofosforados en muestras de agua de la zona lacustre de Xochimilco y en tejido de ajolote (*Ambystoma mexicanum*).
2. Las metodologías combinan el uso de la cromatografía de gases y métodos de extracción (líquido-líquido, extracción asistida por microondas y extracción en fase sólida con Tenax y desorción térmica con Headspace). La combinación de estos procedimientos ha permitido alcanzar límites de detección del orden de ng/L.
3. Se comprobó la estabilidad de los plaguicidas a tratamientos muy energéticos, como MAE y desorción con HS. Estos compuestos no presentaron ninguna descomposición o degradación durante los estudios realizados, por lo que pueden extraerse empleando temperaturas y presiones elevadas.
4. Se ha demostrado la utilidad de los métodos de extracción optimizados en la determinación de plaguicidas organofosforados en muestras reales.
5. Se ha puesto de manifiesto el potencial de la extracción con Tenax y desorción térmica en la determinación de plaguicidas como una metodología limpia al eliminar el uso de disolventes.
6. Las metodologías analíticas han sido validadas llevando a cabo los correspondientes estudios en las condiciones óptimas, mostrando parámetros de calidad altamente satisfactorios desde el punto de vista analítico.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahmed, F.E., (2001) *Analyses of pesticides and their metabolites in foods and drinks*. Trends Anal. Chem., **20**: 649.
- Andreu, V., Picó, Y., (2004) *Determination of pesticides and their degradation products in soil: critical review and comparison of methods*. Trends Anal. Chem., **23**:772.
- Barberá, C. (1989), *Pesticidas agrícolas*. Ediciones Omega, S.A., Barcelona.
- Barr, D.B., Needham, L.L., (2002) *Analytical methods for biological monitoring of exposure to pesticides: a review*. J. Chromatogr. B, **778**: 5.
- Barriada-Pereira, M., Concha-Graña, E., González-Castro, M. J., Muniategui-Lorenzo, S., López-Mahía, P., Prada-Rodríguez, D. and Fernández-Fernández, E. (2003) *Microwave-assisted extraction versus Soxhlet extraction in the analysis of 21 organochlorine pesticides in plants*. J. Chromatogr. A **1008**:115-122.
- Bavcon, M., Trebse P. and Zupancic-Kralj L., (2003) *Investigations of the determination and transformations of diazinon and malathion under environmental conditions using gas chromatography coupled with a flame ionisation detector*. Chemosphere, **50**: 595-601.
- Bazant, J.S. (2001) *“Periferias urbanas. Expansión urbana incontrolada de bajos ingresos y su impacto en el medio ambiente”*. Editorial Trillas, S.A. de C.V. México.
- Bejarano F., 2000. *Amenaza Global. Cuaderno ciudadano sobre Contaminantes Orgánicos Persistentes*, RAPAM. Primera edición. México.
- Berrada, H., Font, G., Montó, J.C., (2003) *Application of solid-phase microextraction for determining phenylurea herbicides and their homologous anilines from vegetables*. Crit. Rev. Anal. Chem., **33**:19.
- Berzins, D.W., Bundy, K.J. (2002). *“Bioaccumulations of lead in xenous laevis tadpoles from water and sediments”*. Environmental International **28**: 69-77.
- Catálogo Oficial de Plaguicidas, 1995. *Comisión Intersecretarial para el Control y uso de Plaguicidas, Fertilizantes y Sustancias Tóxicas (CICOPLAFEST)*, México.
- Chee, K.K., Wong, M.K. and Lee, H.K. (1996) *Optimization of microwave assisted solvent extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons in marine sediments using a microwave extraction system with high-performance liquid chromatography - fluorescence detection and gas chromatography - mass spectrometry*. J. Chromatogr. A. **723**: 259-271.
- Chee, K.K., Wong, M.K. and Lee, H.K. (1996) *Microwave extraction of phthalate esters from marine sediment and soil*. Chromatographia **42**: 378-384.
- CICOPLAFEST, 2004. www.sagarpa.gob.mx/cicoplafest/

- Cisneros, I.L.P. (1999) “Aspectos ambientales relacionados con la calidad del agua en Xochimilco”. Tesis de Licenciatura (Biología). UNAM, Facultad de Ciencias. México, D.F.
- Convenio de Estocolmo sobre Contaminantes Orgánicos Persistentes (COPs), 2001. Ginebra/Nairobi. www.pops.int/
- Costa, L.G., Galli, C.L., Murphy, S.D., (1987). *Toxicology of pesticides: Experimental, clinical and regulatory perspectives*. Springer-Verlag, Berlín.
- Dean, J.R. (1998) *Extraction methods for environmental analysis*, Wiley, EEUU.
- Dean, J.R., Wade, G., Barnabas, I.J., (1996) *Determination of triazine herbicides in environmental samples*. J. Chromatogr. A, **733**: 295.
- Dusek, B., Hajslová, J. and Kocourek, V. (2002) *Determination of nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons and their precursors in biotic matrices*. J. Chromatogr. A **982** :127-143.
- Egizabal, O. Zuloaga, N. Etxebarria, L.A. Fernández and J.M. Madariaga, (1998) *Comparison for microwave-assisted extraction and Soxhlet extraction for phenols in soil samples using experimental designs*. Analyst **123**: 1679-1684.
- Enders, B. and Schwedt, G. (1997) *Supercritical fluid extraction, microwave assisted extraction and soxhlet extraction for the analysis of PCB's in soil and sewage sludge*. Journal fur Praktische Chemie-Chemiker-Zeitung, **339**:250-255.
- Environmental Protection Agency (EPA): <http://www.epa.gov>
- Erickson, B. (1998) *Standardizing the world with microwaves*. Anal. Chem. **70**:467a-471a.
- Fernández Moreno, J.L., Arrebola Liébanas, F.J., Garrido Frenich, A. and Martínez Vidal, J.L. (2006) *Evaluation of different sample treatments for determining pesticide residues in fat vegetable matrices like avocado by low-pressure gas chromatography–tandem mass spectrometry*. J. Chromatogr. A **1111**: 97-105.
- Font, N., Hernández, F., Hogendoorn, E.A., Baumann, R.A. and van Zoonen, P. (1998) *Microwave-assisted solvent extraction and reversed-phase liquid chromatography-UV detection for screening soils for sulfonylurea herbicides*. J. Chromatogr. A **798**:179-186.
- Food and Agricultural Organization, FAO: <http://www.fao.org>.
- Fritz, J. S. (1999) *Analytical solid-phase extraction*, Wiley-VCH, EEUU.
- García Sánchez, A., Ramos Martos, N. and Ballesteros, E. (2006) *Multiresidue analysis of pesticides in olive oil by gel permeation chromatography followed by gas chromatography–tandem mass spectrometric determination*. Anal. Chim. Acta **558**: 53-61.

- Garrido Frenich, A., Martínez Vidal, J.L., Cruz Sicilia, A.D. and González Rodríguez, M.J. (2006) *Multiresidue analysis of organochlorine and organophosphorus pesticides in muscle of chicken, pork and lamb by gas chromatography–triple quadrupole mass spectrometry*, Anal. Chim. Acta 558: 42-52.
- Gilliland, D.C., Summer, C.L. et al. (2001). "Organochlorine insecticides, polychlorinated biphenyls, and metals, sediment, and green frogs from southwestern Michigan". *Chemosphere* 44: 327-399.
- Gobas, F.A.P.C. (1992) *Modeling the accumulation and toxicity of organic chemicals in aquatic food chains*, In "Chemical Dynamics in Fresh Water Ecosystems", Eds. Frank A.P.C. Gobas and John A. McCorquodale, Lewis Publishers. Mexico.
- Guardia-Rubio, M., Fernández-De Córdoba, M.L., Ayora-Cañada, M.J. and Ruiz-Medina, A. (2006) *Simplified pesticide multiresidue analysis in virgin olive oil by gas chromatography with thermoionic specific, electron-capture and mass spectrometric detection*. *J. Chromatogr. A* 1108 231-239.
- Hoogerbrugge, R., Molins, C. and Baumann, R.A. (1997) *Effects of parameters on microwave-assisted extraction of triazines from soil: evaluation of an optimization trajectory*. *Anal. Chim. Acta* 348: 247-253.
- Huckins, J.N., Petty, J.D., Prest, H.F., Clark, R.C., Alvarez, D.A., Orazio, C.E., Lebo, J.A., Cranor, W.L. and Johnson, B.T. (2002) *A guide for the use of semipermeable membrane devices (SPMDs) as samplers of waterborne hydrophobic organic contaminants*. American Petroleum Institute.
- Hussen, A., Westbom, R., Megersa, N., Mathiasson, L. and Björklund, E. (2006) *Development of a pressurized liquid extraction and clean-up procedure for the determination of α -endosulfan, β -endosulfan and endosulfan sulfate in aged contaminated Ethiopian soils*. *J. Chromatogr. A* 1103: 202-210.
- International Organization of Standardization (ISO): <http://www.hdrss.demon.co.uk>; <http://www.iso.org>
- Jassie, L., Revesz, R., Kierstead, T., Hasty E. and Metz, S. (1997) *Microwave-enhanced Chemistry*. American Chemical Society, Washington DC.
- Kitamura, K., Takazawa, Y., Hashimoto, S., Choi, H. and Morita, M. (2004) *Effective extraction method for dioxin analysis from lipid-rich biological matrices using a combination of pressurized liquid extraction and dimethyl sulfoxide/acetonitrile/hexane partitioning*. *Anal. Chim. Acta* 512: 27-37.
- Kodaka, R., Sugano T., Katagi T. and Takimoto Y., (2003) *Clay-Catalyzed Nitration of a Carbamate Fungicide Diethofencarb*. *J. Agric. Food Chem.*, 51: 7730-7737.
- Kovács, Á., Ganzler, K. and Simon-Sarkadi, L. (1998) *Microwave-assisted extraction of free amino-acids from food*. *Z. Lebensm.-Unters. Forsch. A* 207: 26-30.

- Krejčí, M., Roudná, M., Vavrouch, Z., (1974) *Analysis of non-ionic surfactants of the alkylphenol type in the presence of mineral oil by means of liquid chromatography*. J. Chromatogr., 91:549.
- Larson, B. Montonarella L. and Moust, F.(1993) “*Technologies for environmental cleanup: soil and groundwater*”. Kluwer academic Publishers, Dordrecht.
- Lopez-Avila, V., Young, R. and Beckert, W.F. (1994) Microwave assisted extraction of organic compounds from standard reference soils and sediments, Anal. Chem. 66:1097-1106.
- Lopez-Avila, V., Young, R. and Beckert, W.F. (1998) *Stability of organic pollutants during microwave-assisted extraction from solid matrices*. J. AOAC Int. 81: 462-476.
- Lopez-Avila, V., Young, R., Benedicto, J., Ho, P., Kim, R. and Beckert, W.F. (1995) *Extraction of organic pollutants from solid samples using microwave energy*. Anal. Chem. 67: 2096-2102.
- Loumbardis, N.S., Kyriakopoulou-Sklavounou, et al. (1999). “*Effects of cadmio exposue on bioacumulation and larval growth in the frog Rana rdibunda*”. Environmental Pollution 104: 429-433.
- Marathon Agricultural and Enviromental Consulting: <http://www.marathonag.com>
- Marcato, B. and Vianello, M. (2000) *Microwave-assisted extraction by fast sample preparation for the systematic analysis of additives in polyolefins by high-performance liquid chromatography*. J. Chromatogr. A 869 285-300.
- Martinez-Lopez, S., Morales-Noé, A., Pastor-García, A., Morales-Rubio, A. and de la Guardia, M. (2005) *Sample preparation improvement in polycyclic aromatic hydrocarbons determination in olive oils by gel permeation chromatography and liquid chromatography with fluorescence detection*. J. AOAC Int. 88: 1247-1254.
- Mazari, H.M. y López-Vidal. (2004) “*Calidad microbiológica del agua en la zona chinampera y agua subterránea en Xochimilco*”. UNAM, grupo de calidad del agua. Reporte para UNESCO Octubre 25.
- Microwave Laboratory System Easywave Software V.3.5.4.1., Milestone GMBH (Germany).
- O. Zuloaga-Zubieta, O. (2000). *Development of methods for the extraction of some organic pollutants from soils*. Tesis Doctoral Universidad del País Vasco.
- Pagliuca, G., Gazzotti, T., Zironi, E. and Sticca, P. (2005) *Residue analysis of organophosphorus pesticides in animal matrices by dual column capillary gas chromatography with nitrogen-phosphorus detection*. J. Chromatogr. A 1071: 67-70.
- Paré, J.R.J., Bélanger, J.M.R. and Stafford, S.S. (1994) *Microwave-Assisted Process (MAP): a new tool for the analytical laboratory*. Trends Anal. Chem. 13:176-184.
- Pastor, E. Vázquez, R. Ciscar and M. de la Guardia. (1997) *Efficiency of the microwave-assisted extraction of hydrocarbons and pesticides from sediments*. Anal. Chim. Acta 344: 241-249.

- Primo, E. y Carrasco, J.M. (1986), *Química agrícola II. Plaguicidas y fitoreguladores*. Editorial Alhambra, S.A., Madrid.
- Prior Informed Consent Agreement (PIC), 1998. *Procedure for Certain Hazardous Chemicals and Pesticides in International Trade*. www.fco.gov.uk/Files/kfile/CM%206119.pdf
- Pylypiw, H.M.J., Arsenault, T.L., Thetford, C.M. and Incorvia, M.M.J. (1997) Suitability of Microwave-Assisted Extraction for Multiresidue Pesticide Analysis of Produce, *J. Agric. Food Chem.* 45: 3522-3528.
- Ramesh, A. and Balasubramanian, M. (1998) *Rapid preconcentration method for the determination of pyrethroid insecticides in vegetable oils and butter fat and simultaneous determination by gas chromatography– electron capture detection and gas chromatography–mass spectrometry*. *Analyst* 123: 1799-1802.
- RAPAM, 1994. "Red de Acción sobre Plaguicidas y Alternativas en México". United Nations Dept for Policy Coordination and Sustainable Development, 5.
- "Real Decreto 3349/83, de 30 de noviembre, sobre la Reglamentación técnico-sanitaria para la fabricación, comercialización y utilización de plaguicidas", Boletín Oficial del Estado (1983) España.
- Rimkus, G.G., Rummeler, M. and Nausch, I. (1996) *Gel permeation chromatography-high performance liquid chromatography combination as an automated clean-up technique for the multiresidue analysis of fats*. *J. Chromatogr. A* 737: 9-14.
- SAICM, 2006. Strategic Approach to International Chemicals Management: www.chem.unep.ch/saicm/
- Saito, K., Sjödin, A., Sandau, C.D., Davis, M.D., Nakazawa, H., Matsuki, Y. and Patterson, D.G. (2004) *Development of a accelerated solvent extraction and gel permeation chromatography analytical method for measuring persistent organohalogen compounds in adipose and organ tissue analysis*. *Chemosphere* 57: 373-381.
- Sanusi, A., Guillet, V., and Montury, M. (2004) *Advanced method using microwaves and solid-phase microextraction coupled with gas chromatography–mass spectrometry for the determination of pyrethroid residues in strawberries*. *J. Chromatogr. A* 1046:35-40.
- Shepard, H.H., (1939). *The chemistry and toxicology of insecticides*. Burgess Publ. Co., Minneapolis.
- Silgoner, R., Krska, E., Lombas, O., Gans, E., Rosenberg and Grasserbauer, M. (1998) *Microwave assisted extraction of organochlorine pesticides from sediments and its application to contaminated sediment samples*. *Fresenius, J. Anal. Chem.* 362: 120-124.
- Sparks, R. (1993). *Environmental soil chemistry*, Elsevier, Amsterdam Holland.

- Sparr-Eskilsson, C. and C. Björklund, C. (2000) *Analytical-scale microwave-assisted extraction*. J. Chromatogr. A, 902: 227-250.
- Stout, S.J., Babbitt, B.W., DaCunha, A.R., and Safarpour, M.M. (1998) *Microwave-assisted extraction coupled with gas chromatography with nitrogen-phosphorus detection or electron capture negative chemical ionization mass spectrometry for determination of dimethomorph residues in soil*. J. AOAC Int. 81: 1054-1059.
- Stout, S.J., daCunha, A.R., and Allardice, D.G. (1996) *Microwave-assisted extraction coupled with gas chromatography - electron capture negative chemical-ionization mass spectrometry for the simplified determination of imidazolinone herbicides in soil at the ppb level*. Anal. Chem. 68: 653-658.
- Teran, M.T., Sierra, M. (1987). “*Organochlorine insecticides in trot Salmotrutta fario L. taken from four rivers in Leon.*” Journal Association of Analytical Chemistry 71: 445-449.
- *The WHO recommended classification of pesticides by hazard and Guidelines to classification, 2004. World Health Organization, International program of chemical on chemical safety, 2005.*
- Tsuda, T., Suga, K., Kaneda, E. and Ohsuga, M. (2000) *Determination of 4- nonylphenol, nonylphenol monoethoxylate, nonylphenol diethoxylate and other alkylphenols in fish and shellfish by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection*. J. Chromatogr. B 746: 305-309.
- Ueno, E., Oshima, H., Saito, I., and Matsumoto, H. (2003) *Determination of nitrogen- and phosphorus-containing pesticide residues in vegetables by gas chromatography with nitrogen-phosphorus and flame photometric detection after gel permeation chromatography and a two-step minicolumn cleanup*. J. AOAC Int. 86: 1241-1251.
- Vázquez Blanco, E., López Mahía, P., Muniategui Lorenzo, S., Prada Rodríguez, D. and Fernández Fernández, E. (2000) *Optimization of microwave-assisted extraction of hydrocarbons in marine sediments: comparison with the Soxhlet extraction method*. Fresenius J. Anal. Chem. 366: 283-288.
- Vreuls, J.J., Swen, R.J.J., Goudriaan, V.P. , Kerkhoff, M.A.T., Jongenotter ,G.A., and Brinkman, U.A. (1996) *Automated on-line gel permeation chromatography-gas chromatography for the determination of organophosphorus pesticides in olive oil*. J. Chromatogr. A 750: 275-286.
- Ware, G.C. (1983), *Pesticide theory and application*. W.H. Freeman and Company, San Francisco.
- Watanabe, S., Ito, K. (1984). “*Pesticide accumulation in fish*” Pesticide science 8: 47-53.
- Weichbrodt, M., Vetter, W. and Luckas, B. (2000) *Microwave-assisted extraction and accelerated solvent extraction with ethyl acetate/cyclohexane before determination of organochlorines in fish tissue by gas chromatography with electron-capture detection*. J. AOAC Int. 83 1334-1343.
- Xiong, G., Liang, J., Zou S. and Zhang, Z. (1998) *Microwave-assisted extraction of atrazine from soil followed by rapid detection using commercial ELISA kit*. Anal. Chim. Acta, 371: 97-103.

- Yusà, V., Pastor A., and de la Guardia, M. (2005) *Microwave-assisted extraction of OCPs, PCBs and PAHs concentrated by semi-permeable membrane devices (SPMDs)*. Anal. Chim. Acta, 540: 355-366.
- Zuloaga-Zubieta, O., (2000) *Development of methods for the extraction of some organic pollutants from soils*, Tesis Doctoral Universidad del País Vasco.