

6
2oj-



Universidad Nacional
Autónoma de México



Facultad de Estudios Superiores
CUAUTITLÁN

MÉTODOS CROMATOGRAFICOS PARA LA DETERMINACION
DE RESIDUOS DE PESTICIDAS EN ALIMENTOS
AGRICOLAS DE CONSUMO HUMANO.
(Estudio Monográfico)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN.

T E S I S
Que para obtener el Título de
Q U I M I C A
p r e s e n t a
LOURDES TAPIA LAGUNA

Directora de Tesis:
Q. VICTORIA O. HERNANDEZ PALACIOS

Cuautitlán Izcalli, Estado de México 1992



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 está 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.

INDICE

	Pág
1.- INTRODUCCION 1
2.-PESTICIDAS 4
2.1.-Definición 5
2.2.-Clasificación 6
2 2.1.-Por su uso y tipo de organismo que afectan 6
2.2.2.-Por su modo de acción 7
2.2.3.-Por su estructura 8
2.3.-Toxicidad. 14
2.4.-Legislación 17
2.4.1.-Legislación mundial de los pesticidas 17
2.4.2.-Legislación en Estados Unidos 17
2.4.3.-Legislación en México 18
3.-METODOLOGIA GENERAL EN EL ANALISIS DE RESIDUOS DE PESTICIDAS.	
3.1.-Preparación de la muestra 21
3.2.-Extracción 21
3.3.- Purificación 22
3.3.1.1.-Extracción líquido-líquido 22
3.3.1.2.-Extracción con fluidos super criticos 23
3.3.2.- Métodos cromatográficos 23
3.3.2.1.-Cromatografía en columna 24
3.3.2.2.-Cromatografía por permeación en gel 25
3.3.3.-Saponificación 26
3.3.4.-Destilación con flujo de nitrógeno 26
3.3.5.- Precipitación 27
3.3.6.-Cromatografía líquida de alta resolución 27
3.4.-Identificación y cuantificación 27
3.4.1.-Métodos cromatográficos 28
3.4.1.1.-Cromatografía de capa fina (CCF) 28
3.4.1.2.-Cromatografía gas-líquido (CGL) 29
3.4.1.3.-Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	. . 38
3.4.2.- Espectrofotometría 41

4.-METODOS ESPECIFICOS PARA LA DETERMINACION DE RESIDUOS DE PESTICIDAS EN PRODUCTOS AGRICOLAS	
4.1: Metodos especificos para la determinación de residuos de pesticidas organoclorados.43
4.1.1.-Cromatografía de capa fina (CCF)43
4.1.2.-Cromatografía gas-líquido (CGL)44
4.2.- Métodos específicos para la determinación de residuos de pesticidas organoclorados.52
4.2.1.-Cromatografía de capa fina (CCF)52
4.2.2.-Cromatografía de gas-líquido (CGL)53
4.3.- Métodos específicos para la determinación de residuos de pesticidas carbamatos.63
4.3.1.-Cromatografía de capa fina (CCF)63
4.3.2.-Cromatografía gas-líquido (CG)64
4.3.2.-Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)67
4.3.2.- Espectrofotometría69
4.4.-Métodos multiresiduales.72
Tablas79
5.-DISCUSION85
6.-CONCLUSIONES89
7.-BIBLIOGRAFIA91

1. INTRODUCCION

La alimentación humana ha sido siempre una preocupación fundamental del hombre, de ahí surge la necesidad de optimizar la obtención de alimentos en cantidad y calidad. Los productos agrícolas, como fuente principal de alimentos, requieren del uso de pesticidas, que se emplean para el control de plagas que los atacan; presentan una gran variedad de estructuras químicas, sin embargo aún cuando contribuyen al logro de mejores cosechas presentan un peligro potencial para la salud por su posible presencia residual y toxicidad en los productos finales de consumo humano.

La Organización de las Naciones Unidas ha venido trabajando en la revisión de los productos químicos agrotóxicos, a través de la Oficina Internacional del Registro de Productos Químicos Potencialmente Tóxicos y la Organización Internacional del Trabajo, dando como resultado la prohibición o restricción de un gran número de compuestos. En 1986 se informó en México del uso de por lo menos 35 productos químicos agrotóxicos denunciados por la ONU, (114). De lo cual se ve la necesidad de llevar a cabo un control sobre los productos agrícolas para consumo humano, tanto de producción nacional como de importación tal como se realiza en los países industrializados; por ejemplo Estados Unidos y Canadá entre otros, lo que implica una investigación de los métodos analíticos aplicados a la determinación de residuos de pesticidas en alimentos. Tomando en cuenta lo anterior los objetivos del trabajo son los siguientes:

- 1) Realizar una revisión bibliográfica de los métodos cromatográficos para la determinación de residuos de pesticidas en alimentos agrícolas para consumo humano.
- 2) Analizar la metodología utilizada en la determinación de residuos de pesticidas en alimentos, resaltando el tipo de técnica empleada, sus aplicaciones y los resultados obtenidos.

La revisión bibliográfica se realizó en el Chemical Abstracts, Analysis Abstracts y Food Science and Technology

Abstracts, de 1970 a 1991. El trabajo se enfoca a los artículos publicados sobre análisis de residuos de pesticidas en alimentos de origen agrícola, éste es por la gran cantidad de literatura publicada en el área de residuos de pesticidas y porque estos compuestos se aplican directamente a los productos agrícolas, que son donde principalmente se presentan problemas de residuos; si bien la contaminación puede darse en diferentes niveles, incluyendo aire, agua, suelos y animales comestibles.

Respecto a las técnicas analíticas aplicadas a la determinación de residuos de pesticidas, en la década de los 40s, se emplearon métodos gravimétricos, posteriormente surge la espectrofotometría como técnica auxiliar en este tipo de análisis, los métodos eran laboriosos y de poca sensibilidad, el uso de la cromatografía en capa fina y en papel para fines cualitativos y semicuantitativos proporcionó buenos resultados, sin embargo el campo del análisis de residuos de pesticidas se revolucionó con la aplicación de la cromatografía de gases; método muy utilizado en la actualidad y que está en constante desarrollo y búsqueda de detectores cada vez más selectivos y sensibles.

Al principio del trabajo se presenta la terminología, clasificación y toxicidad de los pesticidas, a continuación se dan los fundamentos de las técnicas analíticas empleadas para el análisis de residuos de pesticidas en alimentos, y en la tercera parte se revisan las técnicas específicas aplicadas a los grupos químicos organoclorados, organofosforados, carbamatos, así como los métodos analíticos desarrollados para la determinación simultánea de pesticidas de diferente estructura química, conocidos como métodos multiresiduales.

2. PESTICIDAS.

2.1 DEFINICION.

La Organización para la Agricultura y la Alimentación (FAO) y la Organización Mundial para la Salud (OMS) definen el término **pesticida** como:

..Cualquier sustancia o mezcla de ellas utilizada para prevenir o controlar cualquier especie de plantas o animales indeseables, incluyendo también cualquier otra sustancia o mezcla de ellas destinadas a utilizarse como regulador del crecimiento de las plantas, defoliantes o desecantes.. (1).

En nota explicativa a esta definición, ..se dice que el término **pesticida** incluye cualquier sustancia usada para controlar plagas durante la producción, almacenaje, transporte, comercialización o procesamiento de los alimentos y también cualquier otra sustancia que pueda administrarse a los animales para controlar insectos o arácnidos en su cuerpo. El vocablo **pesticida** no es aplicado a los antibióticos ni a otros productos químicos administrados a los animales con objetivos diferentes, como estimular su crecimiento o el comportamiento de reproducción, ni tampoco se aplica a los fertilizantes.. (1).

Los **pesticidas** se utilizan principalmente en agricultura, silvicultura y ganadería; en la industria, para la preservación de numerosos materiales como maderas, textiles y pinturas, en la salud pública para control de ectoparásitos y en el ámbito doméstico (1).

Su extensa utilización representa un riesgo potencial por la presencia de residuos:

*..Se considera como residuo de **pesticida** toda sustancia o mezcla de sustancias presentes en los alimentos resultante del uso de un **pesticida** e incluye derivados específicos, productos de degradación y conversión, metabolitos, productos de reacción e impurezas, los cuales pueden ser considerados tóxicos.. (1).*

El término *residuo de pesticida* incluye residuos de origen desconocido, así como los residuos químicos conocidos (1).

2.2 CLASIFICACION.

La figura 1 muestra la clasificación general que se da a los pesticidas.

FIGURA 1
CLASIFICACION GENERAL DE LOS PESTICIDAS

Por su uso	Por su modo de acción	Por estructura
Insecticidas	Sistémicos	Organoclorados
Herbicidas	Contacto	Organofosforados
Fungicidas		Carbamatos
Acaricidas		Piretroides
Moluscocidas		Dinitroalquil fenoles
Rodenticidas		Ditiocarbamatos
Defoliantes		Amidas
Fumigantes		Ureas
		Triazinas
		Uracilos
		Sales de bupiridilo

2.2.1 Por su uso y tipo de organismo que afectan.

INSECTICIDAS:

Tipo de pesticida empleado para controlar la vida de los insectos que son dañinos para el hombre, ya sean indirectamente como destructores de cosechas, de productos alimenticios o de materiales textiles (3).

HERBICIDAS:

Producto químico utilizado para eliminar vegetación indeseable, especialmente diversos tipos de hierbas (4).

FUNGICIDAS:

Producto químico empleado como medio de control del crecimiento de los hongos. Se reconocen en general dos tipos de fungicidas, aquellos que impiden el crecimiento de hongos y aquellos que eliminan los ya presentes (3).

ACARICIDAS:

Pesticida que es efectivo para matar al menos algunos miembros del orden Acarina, ácaros y garrapatas. Pueden ser biológicamente efectivos en contra de los huevecillos, larvas o estados adultos (4).

MOLUSCOCIDAS:

Producto químico empleado para exterminar caracoles y babosas (4).

RODENTICIDAS:

Pesticida usado para matar ratas, ratones y topillos (3).

DEFOLIANTES:

Producto químico que elimina las hojas de árboles y plantas en crecimiento (3).

FUMIGANTES:

Comprende aquellos agentes tóxicos que se emplean en fase vapor para combatir plagas. Cualquier tóxico que sea suficientemente volátil para dispersarse o vaporizarse se puede emplear como fumigante (3).

2.2.2. Por su modo de acción:**SISTEMICOS:**

Pueden ser definidos como aquellos pesticidas que absorbidos por la savia ejercen su acción sobre patógenos a través de la misma, llegando de este modo hasta partes no tratadas directamente. Actúan a través del sistema vegetativo. Ejm. aldicarb, amifos, dimetoato y disulfoton (2).

CONTACTO:

Matan por contacto directo, están incluidos aquellos que actúan por penetración directa a través de la pared celular del insecto. Son solubles en aceites, ceras y grasas animales, característica indispensable para su acción por contacto. Ejm. piretrinas, hexaclorobenceno y DDT (2).

2.2.3. Por su estructura química:

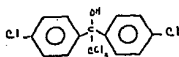
Los pesticidas orgánicos tienen en general estructuras y nombres químicos muy complicados, por lo que se han asignado nombres genéricos aunque su nombre comercial cambie según los fabricantes y los países. Se clasifican en varios grupos químicos, de los cuales los más importantes son los siguientes:

ORGANOCOLORADOS : Son los compuestos orgánicos que contienen cloro en la molécula.

Ejemplo:

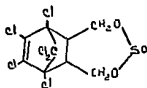
Dicofol

4-cloro--(4-clorofenil)--(triclórometilbenceno-metanol.



Endosulfan

6,7,8,9,10,10,-hexacloro-1,5,5a,-
6,9,9a-hexahidro-6,9-metano-2,4,-
3-benzodioxatiepín-3-óxido.



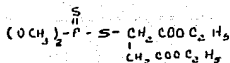
ORGANOFOSFORADOS : Generalmente son ésteres orgánicos del ácido

fosfórico,

Ejemplos:

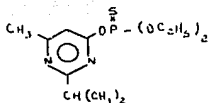
Malatión

Acido butanodioico-[dimetoxifos-
finotiol)-tio]-diethyl éster.



Diazinón

Acido fosforotioico, O, O-dietil
O-[6-metil-2-(1-metiletil)-4--
pirimidinil, 1] éster.

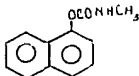


CARBAMATOS: Compuestos que contienen el grupo funcional: $-CONR$, s.n
generalmente N- metilcarbamatos.

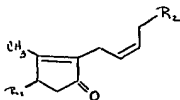
Ejemplos:

Carbarilo

1-naftalenol N- metil carbamato.

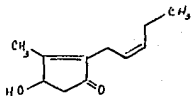


PIRETROIDES: Están incluidos algunos productos naturales con
acción pesticidas y algunos productos químicos con
el grupo específico,

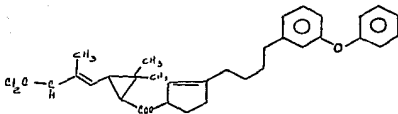


Ejemplos:

Cinrolona:



Permetrina:



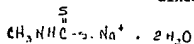
DITIOCARBAMATOS: Dentro de su estructura general contienen al grupo funcional,



Ejemplos

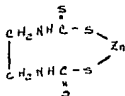
Methiam

N-metilditioicarbamato de sodio dihidratado.

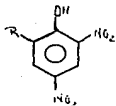


Zineb

Etilenbisditioicarbamato de zinc.



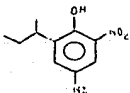
DINITROALQUIL FENOLES :Compuestos con una estructura general del tipo:



Ejemplos

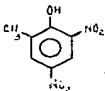
Dinoseb

2-sec-butil-4,6-dinitrofenol.



DNOC

Dinitro-o-cresol 2-metil-4,6-dinitrofenol



AMIDAS: Compuestos que contienen al grupo funcional: $\begin{matrix} \text{O} \\ \parallel \\ \text{-C-NR} \end{matrix}$
Ejemplos:

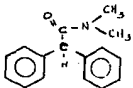
Propanil

3,4-dicloropropionamida.



Difenamida

Dimetil difenil amida.

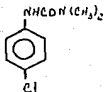


UREAS: Con el grupo funcional: $\begin{matrix} \text{O} \\ \parallel \\ \text{NHCN} \end{matrix}$ pueden ser sustituidas o simples.

Ejemplos:

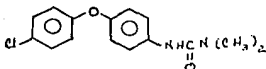
Monouron

3-(p-clorofenil)-1,1-dimetil-tiourea).

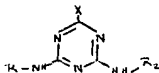


Cloroxuron

3-[p-(p-clorofenoxi)fenil]-1,1-dimetilurea.



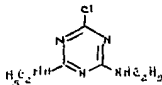
TRIAZINAS : Son compuestos con una estructura general de la forma:



Ejemplos:

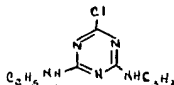
Simazina

2-cloro-4,6-bis(etilamino)-1,3,5-triazina.

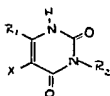


Atrazina

2-cloro-4-etilamino-6-isopropil
amino-s-atrazina.



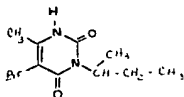
URACILOS : Compuestos con una formula general:



Ejemplos:

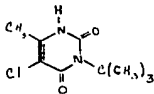
Bromacil

5-bromo-3-sec-butil-6-metil
uracilo.



Terbacil

3-ter-butil-5-cloro-6-metil
uracilo.

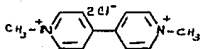


SALES DE BIPIRIDILO: Son sales de biperidilio de amonio
cuaternario

Ejemplos:

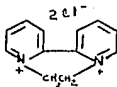
Paraquat

ión 1,1-dimetil-4,4-bipiridilio,
cloruro del



Diquat

1,1-etileno-2,2 ión bipyridilio.



2.3. TOXICIDAD:

Un agente tóxico es cualquier sustancia capaz de producir un efecto nocivo en un organismo vivo, desde el daño en sus funciones hasta la muerte; el efecto es proporcional a la dosis, siendo ésta, la cantidad de sustancia administrada a un organismo (44).

La población en general se encuentra expuesta a residuos de pesticidas por la contaminación del aire, agua, alimentos; en tanto que la exposición ocupacional se presenta durante la elaboración, formulación, envasado, almacenamiento, transporte y aplicación de los pesticidas; en ambos casos se debe considerar no solo la formulación del producto, sino su presentación, los disolventes, las sustancias tensoactivas y las impurezas que puedan contener.

La gran variedad de estructuras químicas de los pesticidas determina que para cada grupo químico exista un cuadro clínico más o menos definido, como resultado de una exposición al producto. En estos cuadros se distinguen:

a) la intoxicación aguda y subaguda, que se presenta después

de la absorción de cantidades elevadas de pesticidas y que generalmente se debe a exposiciones accidentales; la intoxicación aguda por pesticidas se puede atribuir a varias causas, como: la carencia de medidas de seguridad, niveles educacionales insuficientes, el uso de productos prohibidos o restringidos en países industrializados, la ingesta de alimentos contaminados, etc.. y

b) la intoxicación crónica, que se produce por la exposición repetida, de larga duración y en cantidades pequeñas de pesticidas. Este tipo de exposición generalmente es ocupacional.

Para medir el grado de toxicidad de un producto se utilizan diferentes tipos de expresiones, siendo la más importantes la dosis letal 50 (DL50), que es la cantidad calculada de un agente químico necesario para producir la muerte del 50% de los animales en estudio. El tiempo de observación varía de 1 a 4 semanas. Esta cantidad se expresa en mg de la sustancia/Kg de peso corporal (44).

Los pesticidas presentan toxicidad diferente por lo que la Organización Mundial de la Salud establece una clasificación de acuerdo al grado de peligrosidad para el ser humano, refiriéndolos a la dosis letal media de cada pesticida (45). Con base en esto la clasificación es la mostrada en la tabla 1.

El límite máximo de residuos (LMR), es la máxima concentración de residuo de un pesticida resultado de su uso. Es expresado en mg de residuo por kilogramo de muestra" (1)

TABLA 1
CLASIFICACION DE PESTICIDAS DE ACUERDO A SU TOXICIDAD,
EXPRESADA COMO DL50.

Clase	DL50	
	sólidos	líquidos
1.Extremadamente peligroso	< 5	< 20
2.Altamente peligroso	5-50	20-200
3.Moderadamente peligroso	50-500	200-2000
4.Ligeramente peligroso	> 500	> 2000

El término sólido o líquido se refiere al estado físico del

ingrediente o formulación que se clasifica.

FUENTE: Henao, S. H. y G. Carey O. ,Plaguicidas orgafosforados y carbámicos. p. 8

La tabla 2 muestra algunos de los pesticidas utilizados en México, de acuerdo son su grado de toxicidad:

TABLA 2
ALGUNOS PESTICIDAS EMPLEADOS EN MEXICO CLASIFICADOS
DE ACUERDO CON LA OMS.

Extremadamente peligroso		Altamente peligroso		Moderadamente peligroso	
DL50 < 40		DL50 >40-400		DL50 400-2000	
Nombre	DL50	Nombre	DL50	Nombre	DL50
Aldicarb	1	Dieldrin	46	Fenvalerato	451
Paratión	3.6	Diclorvos	56	Malatión	1000
Oxamil	5	Paraquat	125	Amitraz	160
Metamidofos	25	Diazinón	250	Atrazina	750

Discretamente peligrosos	
DL50 >2000	
Nombre	DL50
Captafol	2500
Folpet	9000
Dicamba	3500

La DL50 varía según la forma de presentación y las vías de ingreso.

El LMR para cada pesticida depende de su grado de toxicidad y varía en algunos casos con el tipo de muestra tratada, en la tabla 3 se da una breve lista (60, 75):

TABLA 3
VALORES DE LMR PARA ALGUNOS VEGETALES.

Pesticida	Manzana	Naranja	Tomate	Zanahoria	Pera
	LMR	LMR	LMR	LMR	LMR
Bromofos	2.0	1.5	0.6	1.0	0.1
Malatión	2.0	4.0	3.0	0.5	0.5
Tetraclorvinfos	3.0	-	0.5	0.5	0.5
Metil pirimifos	2.0	-	-	-	-
Carbarilo	5.0	-	2.0	-	5.0
Propoxur	3.0	-	0.5	-	3.0

Las unidades de LMR estan dadas en mg/Kg .

2.4. LEGISLACION.

Varios países particularmente de América del Norte y Europa, han establecido elevadas normas y criterios que aseguran la eficiencia y seguridad en el uso de pesticidas; existen leyes generales y procedimientos para el cumplimiento de las mismas, que reglamentan el uso de pesticidas; con el fin de proteger al hombre y al medio ambiente.

2.4.1. Reglamentación mundial de los pesticidas.

La Comisión Alimentaria Codex, organización patrocinada por la FAO y la OMS, establece normas mundiales para alimentos y determina los niveles máximos permitidos (LMR) de residuos de pesticidas; cada año se establecen valores de LMR para distintos productos agrícolas (110).

De la misma forma los expertos de la FAO en residuos de pesticidas se reúnen cada año para establecer los límites permitidos para distintos alimentos; así como sus propiedades tóxicas.

2.4.1. Reglamentación en Estados Unidos.

En la actualidad son muchos los países que reglamentan la

venta y uso de pesticidas, valiéndose de procedimientos de registro que exigen pruebas de su eficiencia y seguridad. Estas leyes varían de un país a otro; en Estados Unidos el registro y etiquetado de los pesticidas es responsabilidad de la Agencia para la Protección del Medio Ambiente (EPA); de acuerdo con las disposiciones de la Ley Federal de Alimentos, Drogas y Cosméticos, sección 408 y 409. Antes de que un pesticida pueda emplearse deberá de establecerse un límite de tolerancia, el cual es la concentración máxima permitida legalmente en la que un residuo puede estar presente en un alimento, las cuantificaciones se realizan en el laboratorio de la Administración para los Alimentos y los Medicamentos (FDA).

La Ley Federal de Insecticidas, Fungicidas y Rodenticidas administrada por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, indica que para el registro de un nuevo pesticida debiera presentarse el método analítico correspondiente para los residuos obtenidos en productos agrícolas, el método debiera permitir la determinación de los límites de tolerancia, y ser de fácil utilización por la FDA (62).

2.4.2. Reglamentación en México.

En México la Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos (SARH), a través de la Dirección General de Sanidad y Protección Agropecuaria y Forestal (DGSPAF), es la directamente responsable del registro, venta, uso y fabricación de pesticidas y formulaciones de estos; esta facultada para prohibir la venta y/c uso de productos que presentan riesgo a la salud humana, fauna silvestre o daños al ecosistema. En 1986 esta Dirección contaba con un total de 12 laboratorios, en las principales zonas agrícolas del país, para controlar y verificar la calidad de las formulaciones de los pesticidas y sus residuos en los vegetales tratados (78, 104). En México no se han logrado establecer límites de tolerancia, por lo que se utilizan los establecidos en Estados Unidos.

3. METODOLOGIA GENERAL EN EL ANALISIS DE RESIDUOS DE PESTICIDAS.

La metodología utilizada en el análisis de residuos de pesticidas en alimentos toma en cuenta varios factores, como: el tipo de muestra (su contenido de humedad, lípidos y azúcares), las propiedades fisicoquímicas de los productos a analizar (polaridad, peso molecular, etc..) y de manera especial el hecho de que los residuos se encuentran presentes en concentraciones muy bajas, generalmente partes por millón (ppm), o partes por billón (ppb).

La selección y tratamiento de las muestras se realiza de acuerdo con los objetivos de la investigación, así como de las técnicas utilizadas en la determinación analítica. El objetivo más frecuente de este tipo de análisis es comprobar que los productos de consumo humano no exceden los límites máximos permitidos y/o detectar el uso de productos no autorizados.

El análisis de residuos de pesticidas se lleva a cabo desarrollando las siguientes etapas básicas:

- 1.-Preparación de la muestra.
- 2.-Extracción de los residuos de pesticidas de la muestra.
- 3.-Proceso de purificación, para eliminar la materia que interfiere.
- 4.-Determinación cualitativa y cuantitativa de los residuos de pesticidas presentes.

En la figura 2 se resume la metodología utilizada en las diferentes etapas de análisis de residuos de pesticidas.

FIGURA 2
METODOLOGIA UTILIZADA PARA EL ANALISIS DE RESIDUOS
DE PESTICIDAS EN ALIMENTOS.

Preparación de la muestra	-Selección
	-Corte y maceración
Proceso de extracción	- Extracción líquido-líquido
	-Líquido-líquido
	-Extracción
	-Con fluidos supercríticos

		-CCF
Purificación	-Métodos cromatográficos	-C. columna -C.permeación en gel -HPLC
	-Saponificación	
	-Destilación con flujo de nitrógeno	
	-Precipitación	
	-Cromatografía en capa fina	
Determinación cuantitativa y cualitativa	-Cromatografía gas-líquido -Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) -Espectrofotometría	

A continuación se da el fundamento de la metodología utilizada para el análisis de residuos de pesticidas.

3.1. PREPARACION DE LA MUESTRA

Una vez seleccionada la muestra; se debe de conservar de tal manera que no se contamine y que los pesticidas contenidos en ella no se volatilicen, lo que viene a alterar los resultados del análisis. La parte o partes a analizar deberán de separarse cuidadosamente y homogenizar la muestra por corte y molienda, para obtener una muestra representativa, además de facilitar la extracción de los residuos de pesticidas presentes.

3.2. EXTRACCION:

Consiste en la separación física de los residuos de pesticidas presentes en una muestra, empleando disolventes, generalmente se separan con una serie de coextractos (lípidos, pigmentos, etc...). La recuperación de los residuos debe ser lo más completa posible.

La extracción depende de la solubilidad específica del pesticida y de las características de la muestra. Generalmente se

lleva a cabo por mezclado y agitación de la muestra con un disolvente adecuado para una extracción continua (6, 26, 106). Entre los disolventes más comunmente utilizados encontramos: acetona, acetonitrilo, acetato de etilo (10), y metanol (8), también se han utilizado mezclas acetona:agua (9, 11) agua-acetonitrilo (7), acetona-cloruro de metileno y hexano-cloruro de metileno, en distintas proporciones.

Otros disolventes menos comunes en la extracción de residuos de pesticidas son cloroformo, ácido fosfórico, isocianato (13). También se ha empleado solución saturada de hidróxido de calcio como extractante (15); en un procedimiento nuevo ensayado para la extracción de residuos en vegetales éstos se someten a altas presiones (16).

Algunos otros métodos de extracción se basan en la hidrólisis de los residuos para su posterior determinación indirecta.

3.3. PURIFICACION:

La determinación de trazas de pesticidas y sus metabolitos, que pueden ser contaminantes de alta toxicidad en muestras de alimentos requieren del uso de un procedimiento de purificación del extracto de la muestra, se le elimina, en lo posible, pigmentos, grasas y otros coextractantes.

En esta etapa las muestras con alto contenido en grasa son de particular interés por que acumulan muchos de estos contaminantes. Los lípidos de origen vegetal y animal consisten principalmente de mezclas complejas de ácidos grasos de cadena larga, las características comunes de estos constituyentes son los grupos polares, contenido de cadenas hidrocarbonadas, su alto peso molecular y muy baja volatilidad. Los procedimientos para la separación de pesticidas estan basados en estas propiedades físicas y químicas (19).

3.3.1.1. Extracción líquido-líquido

La extracción es un proceso de separación y purificación que

se basa en la diferencia de solubilidad de un soluto en dos líquidos inmiscibles entre sí. La partición líquido-líquido con hexano-acetonitrilo se ha usado para la separación de pesticidas organoclorados en alimentos grasos. Los pesticidas se extraen en la fase polar de acetonitrilo, mientras los lípidos presentes en la muestra se solubilizan en los disolventes utilizados (8, 20, 38).

3.3.1.2. Extracción con fluidos supercríticos:

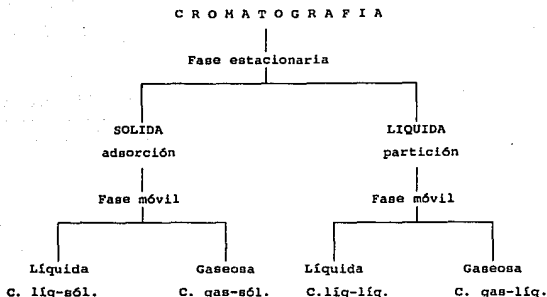
Es una técnica recientemente desarrollada, basada en la fuerza de disolución de los analitos en un fluido supercrítico, siendo éste un fluido cuya temperatura y presión están arriba de su valor crítico, exhibe propiedades fisicoquímicas intermedias entre un líquido y un gas, alta densidad y buen poder de disolución; estas propiedades han demostrado ser útiles en la separación de solutos de acuerdo a las variaciones de temperatura y/o presión en el sistema, se utiliza para la extracción total de pesticidas en los productos con alto contenido en grasa (93), los pesticidas lipo-solubles también se recuperan. En este caso el disolvente libre de lípidos se purifica para análisis por cromatografía de gases (25, 19).

3.2.2. Métodos cromatográficos:

La cromatografía comprende un grupo de métodos que permiten separar, identificar y cuantificar compuestos presentes en mezclas complejas que no podrían separarse de otra manera. Todos estos métodos utilizan una fase estacionaria y una fase móvil. Los componentes de la mezcla son arrastrados a través de la fase estacionaria mediante un flujo de la fase móvil. Las separaciones se basan en la diferencia de velocidad de migración de los componentes a través del sistema (6).

Los métodos cromatográficos pueden clasificarse de acuerdo a la naturaleza de la fase estacionaria; la fase móvil puede ser líquido o gas. Existen cuatro subdivisiones de los procesos de cromatografía que se muestran en el siguiente figura 3.

FIGURA 3
CLASIFICACION DE LOS PROCESOS DE CROMATOGRAFIA



FUENTE: R. Stock y B. F. Rice, Chromatographic methods. p.6

3.3.2.1. Cromatografía en columna:

Técnica en la cual la fase estacionaria es la superficie de un sólido finamente dividido y la fase móvil es un disolvente. En este material el soluto compete por los sitios activos sobre la superficie del sólido. El gel de sílice es el más empleado como adsorbente, aunque también se usan otros tales como el florisil (mezcla de silicatos de magnesio activado y tierra de diatomeas), silicatos de magnesio, alúmina, óxido de magnesio: celita entre otros (17, 29,).

Las propiedades de la fase móvil que se emplea depende de la naturaleza de la muestra a analizar y de la polaridad del adsorbente (39, 107). Para el caso de pesticidas éste método generalmente se usa para analitos de baja polaridad, como son los pesticidas organoclorados (19, 38, 17). Algunos autores recomiendan el uso de una columna empacada con florisil para esta etapa de purificación, eluyendo con isooctano (21). Para la

eliminación de pigmentos presentes en vegetales y frutas se emplean columnas empacadas con carbón vegetal y celita (1:1), (27), ó con carbón activado solamente (20, 38, 106).

3.3.2.2. Cromatografía de permeación por gel

Es una técnica en la que el fraccionamiento se basa en el tamaño y forma molecular de las especies de la muestra. Se han dado varios nombres a este procedimiento: cromatografía de permeación en gel, de exclusión y de tamizado molecular. El grado de retardo depende del grado con que las moléculas o iones de soluto pueden penetrar en aquella parte de la fase de la solución que se mantiene dentro de los poros del material empleado. (39).

Las moléculas o iones cuyo tamaño son mayores que los poros del gel son excluidos completamente, mientras que las especies de menor tamaño pueden penetrar en estas regiones más ó menos libremente, retrasando su movilidad en mayor o menor grado, según su tamaño, su forma y a veces su tendencia a ser adsorbidas por el gel.

El gel consiste de partículas esféricas de un polímero poroso que absorbe fácilmente agua y se hincha a consecuencia de ello. Estos geles se venden con el nombre comercial de Sephadex (39). Así la cromatografía de permeación en gel (CPG), usada generalmente para separar polímeros de alto peso molecular ha sido adoptada para la purificación de muestras de lípidos para la separación de pesticidas organoclorados. La mayoría de los pesticidas sintéticos tienen pesos moleculares entre 200 y 400, g/mol mientras en los lípidos es de 600 a 1500 (19, 12, 38).

Se ha desarrollado un aparato de CPG automático para el tratamiento de muestras eluyendo con ciclohexano y acetato de etilo (9). El sistema comercial desarrollado para la purificación de 85 pesticidas y productos químicos industriales en grasas y aceites de origen vegetal y animal requiere de una etapa adicional de cromatografía en columna de florisil (24). Cuando se utiliza

esta técnica en la purificación de muestras que no contienen grasa o con bajo contenido, en una misma fracción se separan compuestos polares y no polares de peso molecular semejante (19).

Otra de las técnicas utilizadas es la cromatografía en capa fina, la cual es una técnica de separación, identificación y semi-cuantificación.

3.2.3. Saponificación:

Es una reacción química en la cual un éster se hidroliza con un alcalí, comunmente hidróxido de sodio ó potasio, para formar glicerol y la sal de sodio ó potasio correspondiente al éster. De esta manera los lípidos presentes en las muestras a purificar se hidrolizan formando el respectivo jabón el cual se separa de la muestra a analizar (39). La saponificación con KOH/etanol o bien NaOH/ etanol para formar productos solubles facilmente extraídos con éter de petróleo se usa en estas técnicas junto con la cromatografía de adsorción como etapa complementaria. El límite de este método es la estabilidad del residuo a analizar (19, 17). El método AOAC 29.017 de la 14a. edición , reporta su uso para alimentos con materia lípida, usando hidróxido de potasio al 2% en medio alcohólico (17).

3 3.4. Destilación con flujo de nitrógeno:

Corresponde al término en inglés *..Sweep co-distillation..* (19). Es un método empleado para la purificación de residuos de pesticidas presentes en muestras con alto contenido de grasa y se basa en la *..volatilización forzada..* (23). La muestra se funde y se introduce en un tubo de fraccionamiento empacado con perlas de vidrio silanizado (7 a 1.5 mm de diámetro), el tubo se mantiene a una temperatura de 200 a 300 °C; se forza el paso de la muestra a través del tubo por un arrastre de nitrógeno (300 a 600 ml/min); de esta manera los lípidos quedan atrapados en la superficie de las perlas de vidrio, mientras los pesticidas presentes se volatilizan y colectan en una trampa de sulfato de sodio anhidro y florisil, para su posterior elución con un disolvente apropiado y análisis por CGL (19,11, 23 ,108, 106). Este método se emplea para

aislar los pesticidas más volátiles de muestras complejas (65).

En un método reportado en 1987 por Forbes (11) emplea el sistema unitrex, (Universal trace residues extractor), el cual hace posible el tratamiento simultáneo de 10 muestras, con este sistema se han obtenido rendimientos aceptables.

3 3.5. Precipitación:

Esta técnica se basa en la diferencia de solubilidad de las impurezas en un disolvente, con lo que se precipitan y eliminan por filtración. La precipitación por baja temperatura en baño de hielo-metanol a -78°C se desarrolló para separar pesticidas polares y no polares de lípidos. La materia precipitada se filtra y la solución se analiza por cromatografía de gases, esta técnica no es muy común por los problemas que se presentan en la precipitación, adsorción y filtración (19).

Se ha reportado el uso de acetato de zinc para remover las grasas presentes en extractos de arroz, por formación de carboxilatos de zinc con los ácidos grasos los cuales son productos insolubles. Se emplea una etapa adicional de purificación a través de una columna empacada con carbón activado, eluyendo con una mezcla de acetona-hexano, para la eliminación final y total de los pigmentos presentes en la muestra (29).

3.3.6. Cromatografía líquida de alta resolución:

También se emplean columnas de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) por su alta eficiencia y su bajo consumo de disolventes, para separar lípidos de residuos organoclorados y bifenilos policlorados (28, 11).

3.4. IDENTIFICACION Y CUANTIFICACION:

Los métodos de identificación y cuantificación de residuos de pesticidas son los que generalmente se emplean para otras sustancias.

3.4.1.-Métodos cromatográficos:

3.4.1.1. Cromatografía de capa fina (CCF):

La CCF permite aislar fracciones puras a partir de una mezcla de solutos. La fase estacionaria es un sólido finamente dividido que se aplica sobre una placa de vidrio. La fase móvil se desplaza a través del sólido por acción capilar. Dentro de este método existe una repetida transferencia de soluto entre la fase estacionaria y la fase móvil. La velocidad de movimiento de un soluto depende de su coeficiente de partición; su trayectoria se describe en función de su factor de retardo R_f el cual se define con la siguiente relación:

$$R_f = \frac{\text{distancia recorrida por el soluto}}{\text{distancia recorrida por el disolvente}}$$

Para compensar las propiedades no controladas, el R_f para un soluto se compara con el de una sustancia patrón en idénticas condiciones. Dentro de las fases estacionarias en CCF, desde el punto de vista de su composición química y tamaño de partícula, los absorbentes utilizados son semejantes a los que se describen para cromatografía en columna. Las sustancias que se utilizan son el gel de sílice y óxidos de aluminio.

La selección de los disolventes utilizados para el desarrollo de los cromatogramas dependen de 2 factores: 1) la naturaleza de la mezcla de solutos a separar y 2) el tipo de fase estacionaria empleada. En general se eligen en base a la serie elutrópica de disolventes mostrada a continuación, la cual esta ordenada de acuerdo al descenso de la polaridad de los disolventes (6, 113).

Las placas se desarrollan generalmente en forma ascendente y temperatura ambiente. Muchas de las sustancias pueden observarse directamente en la superficie del adsorbente o bien requieren de algun método especial de detección. Los métodos de revelado mostrados en la tabla 4 son los más comunmente utilizados, sensibles, y que permiten la visualización de la mayoría de los compuestos (103).

Serie elutrópica de disolventes

Agua > metanol > etanol > propanol > acetona > acetato de etilo > éter etílico > cloroformo > diclorometano > benceno > tolueno > tricloroetileno > tetracloruro de carbono > ciclohexano > hexano.

FUENTE: A. BRAITHWAITE and F. J. Smith. Chromatographic methods. p. 87

TABLA 4
SISTEMAS DE DETECCION PARA CCF.

Reactivo	Color	Componentes detectados
Observación directa	Varios	Compuestos coloridos
Luz UV (245-366 nm)	Manchas florescentes	Compuestos aromáticos y heterocíclicos
Agua	Manchas blancas y en algunos casos oscuras.	Sustancias hidrófobas de alto peso molecular
2',7-diclorofluoresceína al 0.2% en etanol.	Amarillo-verde y en algunos casos oscuras.	la mayoría de los compuestos orgánicos.
-Vapores de yodo	Amarillo.	Compuestos insaturados.

3.4.1.2. Cromatografía en gas-líquido (CGL):

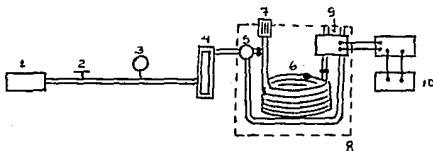
En la cromatografía gas-líquido, los componentes de una muestra en estado gaseoso, se separan como consecuencia del reparto entre la fase móvil gaseosa y la fase líquida estacionaria contenida en una columna, (6, 39).

La fase móvil debe ser químicamente inerte. Entre los gases transportadores utilizados se encuentran argón, helio, nitrógeno e hidrógeno. Las presiones de entrada de los gases a la columna

están comprendidas generalmente entre 10 y 50 psi (lb/in²).

Para lograr una buena eficiencia en la columna se requiere que la muestra sea de tamaño adecuado y se introduce como un gas, se utiliza una jeringa para introducir las muestras a través de un diafragma de caucho o silicon dentro de una entrada para muestras previamente calentada. Los tamaños de las muestras varían desde unas décimas de 1 μ l hasta 10 μ l. La figura 4 muestra un diagrama de los componentes de un cromatógrafo de gases y después se da una breve explicación del principio de funcionamiento básico.

FIGURA 4
DIAGRAMA DE UN CROMATOGRAFO DE GASES



1.-TANQUES DE GAS TRANSPORTADOR

2.-REGULADOR DE PRESION

3.-MANOMETRO

4.-MEDIDOR DE FLUJO

5.-DIVISOR DE FLUJO

6.-COLUMNA

7.-ENTRADA PARA LA INYECCION DE LA MUESTRA

8.- HORNO TERMOSTATADO

9.-DETECTOR

10.-REGISTRADOR

FUENTE: SKOOG, and West. Química analítica. p.750

Como fase estacionaria se han usado muchos tipos de líquidos, para conseguir un tiempo de retención razonable. La muestra tendrá que mostrar al menos cierto grado de compatibilidad

(solubilidad) con la fase estacionaria, por lo tanto la polaridad de las dos sustancias deben ser similares. Los solutos con puntos de ebullición semejantes pero con diferentes polaridades requieren con frecuencia de una fase estacionaria que retenga a uno o más de los componentes de manera selectiva, ya sea por interacciones de dipolo o formación de un aducto.

TABLA 5
FASES ESTACIONARIAS MAS COMUNES PARA COL.

Nombre comercial	Composición química
Escualeno	$C_{30}H_{62}$
OV-1	polimetilsiloxano
DC 710	polimetilfenilsiloxano
QF - 1	politrifluoropropilmetil- silano
Carbowax 20 M	polietilenglicol
SE -60	metil silicona

FUENTE: SKOOG, and West. Química analítica. p.756

Se utilizan dos tipos generales de columnas: a) de relleno y b) tubulares o capilares:

a) Las columnas de relleno se fabrican con tubo de vidrio o metal; generalmente tienen 2 ó 3 metros de largo y un diámetro de 2 a 4 mm, los tubos suelen ir enrollados en espiral con un diámetro aproximado de 15 cm. de modo que se pueden colocar dentro de un horno termostático. El relleno de la columna mantiene fija la fase estacionaria líquida de forma que el área superficial, expuesta a la fase móvil, sea máxima. Los soportes más usados son conocidos con el nombre comercial de cromosorb P, W ó G.

b) Las columnas capilares se fabrican con acero inoxidable, vidrio o sílice fundida, tienen diámetros de 0.25 a 0.50 mm. y longitudes de 10 a 100' m. Su superficie interna está recubierta

con una película de fase estacionaria.

Los detectores, en general, son dispositivos que tienden a responder rápidamente a bajas concentraciones de los solutos a medida que salen de la columna. Dan respuesta lineal, uniforme y estabilidad para una gran variedad de compuestos químicos o bien una respuesta predecible y selectiva a una o más clases de solutos, pero, ningún detector cumple con todos estos requisitos.

En general es un aparato por el cual pasa el gas acarreador y que genera una señal eléctrica cuando cambia la composición del gas. Entre los detectores utilizados en el análisis de residuos de pesticidas se encuentran:

- 1.-Conductividad térmica.
- 2.-Ionización de llama.
- 3.-Captura de electrones.
- 4.-Fotometría de llama. (emisión de llama)
- 5.-Termoiónico. (llama alcalina)
- 6.-Hall de electroconductividad.
- 7.-Espectrometría de masas acoplada a la cromatografía de gases.

A continuación se da un panorama general de la utilidad y el fundamento de cada uno de estos detectores:

1.- Detector de conductividad térmica:

Es un detector carente de selectividad; está construido de tal manera que dentro de un recinto metálico hay un filamento que se calienta con corriente. La temperatura del filamento es resultado de tres factores principales: 1) la corriente que pasa, 2) la resistencia del filamento y 3) el régimen de pérdida de calor al medio que lo rodea. Los filamentos más comunmente empleados son el de tungsteno, o una aleación de tungsteno y renio, de níquel, de platino-iridio, teflón y tungsteno recubierto de oro para muestras que son corrosivas.

La detección se basa en cambios de la conductividad térmica de la corriente del gas. Su elemento sensitivo es una fuente calentada eléctricamente cuya temperatura depende de la conductividad térmica del gas circundante. El circuito que se usa

en el detector de CT es el puente de conductividad térmica. Es el detector con menor sensibilidad (50).

2.-Detector de ionización de llama:

Cuando se queman compuestos orgánicos en una llama de hidrógeno-aire, se obtienen partículas cargadas o iones. Un par de electrodos con un voltaje polarizado aplicado recoge estos iones y la corriente resultante se amplifica con un electrómetro. Así la muestra que sale de la columna llega a la llama y se mezcla con el hidrógeno y aire que la alimentan. Este detector se emplea en dos formas, simple y doble: el detector doble consta de 2 detectores completos en una sola unidad, puede funcionar como dos detectores independientemente o como un detector de compensación en cuyo caso la señal de una parte se resta a la generada por la otra. Este detector es aproximadamente 1000 veces más sensible que el detector de CT, para la mayoría de los materiales, pero hay algunos compuestos con los que tiene una respuesta baja o nula. Con excepción de estos pocos, la cantidad mínima detectable es aproximadamente de 1 ng. La respuesta de este detector varía con las características de la llama y por tanto debe determinarse para una serie específica de condiciones (50).

3.-Detector de captura de electrones:

Detector sensible con campo de aplicación limitado debido a su alta selectividad. La aplicación más importante es en la detección de residuos de pesticidas organoclorados. El principio de operación de este detector se basa en que algunos isótopos radioactivos liberan partículas durante el proceso de desintegración. Si se les hace chocar con las moléculas del gas acarreador, estas partículas producen un gran número de electrones secundarios de baja energía. Si se colocan electrodos con un voltaje apropiado en la cavidad del detector se pueden recoger estos electrones y convertirlos en una corriente pequeña, pero que se puede medir, a la que se le denomina "corriente permanente" del detector.

Algunas moléculas de muestra, especialmente las que contienen átomos de halógenos, tienen facilidad de capturar electrones de baja energía para formar iones de carga negativa, este proceso de captura reduce la cantidad de electrones que se pueden recoger y por tanto disminuye la corriente de la celda por debajo del valor de la corriente permanente, cuando la muestra sale de la celda del detector la corriente vuelve a su valor original. Los isótopos más comúnmente empleados son el de tritio (^3H) y de níquel (^{63}Ni).

Es un detector muy sensible y puede detectar cantidades de picogramos (10^{-12}g) lo que para una inyección de 1 μl representa una parte por billón (ppb).

El detector de captura de electrones es muy selectivo, no da prácticamente ninguna respuesta a la mayoría de los productos químicos más comunes, pero tiene una gran sensibilidad a los compuestos organohalógenados. Los halógenos dan una respuesta que aumenta del cloro al bromo. Emplea nitrógeno, mezcla de argón con 5% de metano como gas acarreador, dependiendo de las condiciones de análisis, (50).

4.-Detector fotométrico de llama

Conocido también como detector de emisión de llama. Es un detector específico para compuestos que contienen fósforo o azufre. Usa la llama de hidrógeno-aire. Cuando una muestra pasa a través de la llama la emisión de luz causada por la excitación de algunos átomos en el proceso de combustión puede colectarse y medirse en un tubo fotomultiplicador y con las condiciones adecuadas de la llama (mezcla de gases) y un filtro óptico apropiado se puede obtener una alta selectividad para compuestos que contienen azufre o fósforo.

El detector consiste en una sección de combustión y una sección de filtro y el fotomultiplicador. El nivel mínimo detectable de compuestos azufrados es de 200 picogramos, lo que equivale aproximadamente de 2 ng de paratión; las cifras correspondientes a los fosforados son de 40 pg del elemento o 375 pg de paratión.

Los flujos de gas acarreador óptimos para los compuestos

organoazufrados y fosforados son diferentes y estos valores no se pueden obtener simultáneamente en un detector de cabeza dual.

El detector fotométrico alcanza una selectividad notable para compuestos azufrados y fosforados, se han obtenido valores que exceden 50,000 a 1 la respuesta del azufre y fósforo relativa a los compuestos que no contienen este elemento. La selectividad entre el azufre y el fósforo se distingue en la elección de un filtro de longitud de onda de 394 nm para el azufre y de 526 nm para el fósforo, ambos elementos emiten en las dos frecuencias. El azufre produce una respuesta a 526 nm de 5 a 10 % (50).

5.-Detector termoiónico:

Conocido con diferentes nombres entre los cuales se encuentran: detector de ionización de llama específico para fósforo, llama alcalina, termoiónico de sodio y detector de nitrógeno-fosfófo (NPD).

Este tipo de detector funciona con base en el principio de que la conductividad de la llama producida por una sal de sodio, cuando se volatiliza, se ve incrementada en presencia de compuestos organofosforados, este incremento es una función de la concentración. Consiste de un alambre impregnado con una sal alcalina comprimida, en contacto con una llama rica en hidrógeno. La llama sirve para volatilizar la sal, la cual experimenta una reacción de transferencia de electrones con los heteroátomos que contiene la muestra analizada (N, P).

La sal alcalina ha sido reemplazada por silicato de rubidio fundido sobre un alambre de platino, ésta incrementa la reproducibilidad y el tiempo de vida del detector; otras de las sustancias empleadas son de bromuro de cesio (CsBr) y de sulfato de rubidio (Rb_2SO_4) en lugar de NaOH o Na_2SO_4 .

Este detector puede ser manejado de un modo selectivo para nitrógeno o para fósforo solamente. En el modo N-P se tiene una atmósfera de hidrógeno y se trabaja con un potencial negativo, calentándose el detector con una fuente de corriente constante, la llama tiene un voltaje negativo y el electrodo conector se "conecta a tierra". En el modo selectivo para fósforo, el flujo

de hidrógeno se incrementa para sostener la llama, la cual sirve para calentar la fuente termoiónica; nuevamente se tiene un potencial negativo.

Para cualquiera de estas dos formas de manejo se observa estabilidad a concentraciones de picogramos. Estos detectores son ampliamente usados en el análisis de residuos de pesticidas y aditivos para gasolinas. Son sensibles y selectivos con una estabilidad adecuada y una buena linealidad, y requieren de un flujo controlado de hidrógeno y aire.

La selectividad del detector es una función de las proporciones de flujo de gas, de la sal utilizada y su posición respecto a la llama, la cual controla la temperatura y por lo tanto el grado de volatilización de la sal (76).

6.-Detector Hall de electroconductividad:

Esta basado en la medida de incrementos de conductividad producidos por la formación de amonio durante la pirólisis de los compuestos organonitrogenados en agua des-ionizada. Un detector de conductividad eléctrica puede modificarse para determinar compuestos organoclorados, con un tratamiento especial de níquel catalítico y electrolitos diluidos en lugar de agua, esta modificación incrementa la sensibilidad y es capaz de detectar compuestos que contienen azufre o nitrógeno de acuerdo a las condiciones específicas de trabajo.

En el funcionamiento de este sistema, las fracciones efluentes que salen de la columna de cromatografía, pasan a través de un pirolizador con una atmósfera de hidrógeno y un catalizador de alambre de níquel que convierte el nitrógeno orgánico en amoniaco. Los productos que interfieren son eliminados por el $\text{Sr}(\text{OH})_2$, para detectar los iones amoniacaes se mide el cambio en la conductividad entre dos electrodos de platino. Tienen una alta sensibilidad y una selectividad excelente. En el proceso oxidante, en la celda se mide la conductividad de los iones cloruro (70).

7.-Espectrometría de masas acoplada a la CGL

La combinación de la espectrometría de masas con la cromatografía de gases (EM-CG) es una técnica utilizada en el análisis de residuos de pesticidas. La espectrometría de masas se considera como el detector más específico disponible para la identificación de compuestos químicos. Su especificidad se basa en que las moléculas al ser bombardeadas con electrones de una energía particular, al vacío, se fragmentan siguiendo reglas estrictas. Los patrones de fragmentación resultantes reflejan la estructura molecular individual en un espectro de masas que se considera como "huella digital" de la sustancia particular, de esta manera es posible identificar muchos compuestos. El espectro de masas resultante es independiente del instrumento utilizado para su obtención, depende de las condiciones particulares de ionización (9).

El espectro de masas se obtiene convirtiendo los compuestos que integran una muestra en iones que se mueven rápidamente y resolviéndolos en base a su relación de masa a carga.

El principio de funcionamiento y la descripción del espectrómetro de masas sale de los objetivos de este trabajo, para mayor información revisar las referencias 39, 11, 112, y 113.

El problema principal del acoplamiento de EM a CGL es la presencia del gas acarreador, que diluye los componentes eluidos de la columna cromatográfica y tiende a inundar el sistema de bombeo del espectrómetro de masas. En estos casos los gases de salida fluyen a través de un tubo de vidrio poroso situado en una cámara al vacío, los átomos o moléculas del gas transportador difunden fácilmente a través de las paredes del tubo y se bombean hacia afuera dejando las moléculas de la muestra eluida, estas se conducen directamente hacia la entrada del espectrómetro de masas, (109). En la tabla 7 se resumen los detectores utilizados para el análisis de residuos de pesticidas en alimentos.

3.4.1.3. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC):

Es una cromatografía en columna con una fase estacionaria constituida de pequeñas partículas sólidas y una fase móvil líquida. La eficiencia de la separación aumenta cuando se disminuye el diámetro de la partícula de la fase estacionaria. La figura número 6 muestra un diagrama de los componentes de un cromatógrafo de líquidos de alta resolución.

TABLA 7
DETECTORES UTILIZADOS EN EL ANALISIS DE RESIDUOS
DE PESTICIDAS EN ALIMENTOS.

Detector	Sensibilidad g/ml	Pesticidas detectados ejemplos
Conductividad	10^{-8}	General
Ionización de llama	10^{-13}	General
Captura de electrones	10^{-10}	Organoclorados
Fotométrico	10^{-11}	Fosforados
Termoiónico	10^{-12}	Nitrogenados
Hall	10^{-13}	Organoclorados
Espectrometría de masas	10^{-14}	Universal

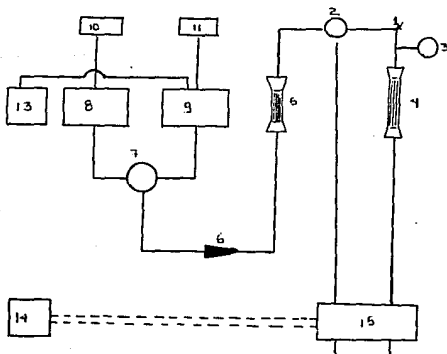
Para conseguir un flujo aceptable se emplean rellenos con partículas de tamaños comprendidos entre 3 y 10 μm , usados normalmente en la cromatografía líquida moderna, se requieren presiones de bombeo de cientos de atmósferas. Como consecuencia de estas altas presiones, el equipo para cromatografía líquida de alta resolución tiende a ser más complejo y caro que otros equipos de cromatografía.

Sistema de Inyección: la muestra se coloca dentro de una jeringa, y se mueve de manera que quede colocada en la corriente del disolvente o bien por inyección directa.

Las columnas se fabrican generalmente con tubos de acero inoxidable, o tubos de vidrio de pared gruesa cuando se aplican presiones bajas (600 psi). Con longitudes comprendidas entre 3 y

150 cm. y diámetros internos de 1 a 4 mm. Los rellenos típicos son de 3 a 10 μm ; El empaque lo constituyen gel de sílice, alúmina a celita, también se utilizan polímeros porosos y resinas de intercambio iónico (6, 39).

FIGURA 6
DIAGRAMA DE UN APARATO DE HPLC.



- | | |
|--|------------------------|
| 1.-ENTRADA PARA LA INYECCION DE LA MUESTRA | 8.-DESGASIFICADOR 1 |
| 2.-DIVISOR DE FLUJO | 9.-DESGASIFICADOR 2 |
| 3.-MANOMETRO | 10.-DISOLVENTE 1 |
| 4.-COLUMNA ANALITICA | 11.-DISOLVENTE 2 |
| 5.-PRECOLUMNA | 13.-BOMBA DE VACIO |
| 6.-BOMBA DE ALTA PRESION | 14.-REGISTRADOR |
| 7.-CAMARA DE MEZCLADO | 15.-SALIDA DE DESECHOS |

FUENTE: SKOOG, and West. Química analítica. p. 723

Sistemas de bombeo: son bombas que, 1) proporcionan presiones superiores a 6.000 psi (lb/in^2), 2) salidas libres de

impulsos, 3) velocidad de flujo de 0.1 a 10 ml/min, 4) reproducibilidad de flujo de 0.5 por 100 o mejores, 5) resistencia a la corrosión por efecto de los disolventes.

El equipo consta de depositos de fase móvil y sistemas de tratamiento del disolvente: uno o más depositos de vidrio o acero inoxidable para una capacidad de 500 ml. o más de disolvente. Además de un deposito para eliminar los líquidos, los gases disueltos o partículas de polvo (112).

No existe un sistema de detección universal de gran sensibilidad para este tipo de cromatografía; así el detector dependerá de la naturaleza de la muestra. Los detectores más usados emplean la absorción de radiaciones ultravioleta o de la región visible, o bien fuentes de filamento de deuterio o tungsteno con filtros para eliminar las interferencias posibles. También se emplean detectores basados en los cambios de índice de refracción del disolvente debido a las moléculas del analito, éste último es el más general que responde a la presencia de todos los solutos. También se ha utilizado la espectrometría de masas como detector específico y sensible (39). La tabla 8 muestra los detectores más comunes para el análisis de residuos de pesticidas por HPLC.

TABLE 8
DETECTORES USADOS EN HPLC.

Detección basada en	Tipo	sensibilidad máxima g/ml.
Absorción UV	S	2×10^{-10}
Absorción IR	S	10^{-6}
Fluorometría	S	10^{-11}
Índice de refracción	G	1×10^{-7}
Conductividad eléctrica	S	10^{-8}
Espectrometría de masas	S	10^{-10}
Electroquímica	S	10^{-12}
Radioactividad	S	---

G = general S = selectivo.

3.4.2.-Espectrofotometría:

Los métodos espectrofotométricos de análisis se basan en la medida de la radiación electromagnética emitida o absorbida por la materia. Los métodos de emisión utilizan la radiación emitida cuando un analito se excitan por energía térmica, eléctrica o radiante. Los métodos de absorción se basan en la disminución de la potencia de la radiación electromagnética como consecuencia de la absorción que se produce en su interacción con el analito. Estos métodos se clasifican según la región del espectro electromagnético que esté implicada; siendo las más importantes las regiones de rayos X, ultravioleta (UV), visible, infrarrojo y microondas (112).

Dentro de los objetivos del trabajo no se contempla la descripción de esta técnica analítica, para lo cual se sugiera revisar las referencias, 39, 111, 112.

Como método analítico, la espectroscopía es de gran interés en la determinación de residuos de pesticidas del grupo de los carbamatos.

4. METODOS ESPECIFICOS PARA LA DETERMINACION DE RESIDUOS DE PESTICIDAS EN PRODUCTOS AGRICOLAS.

En este capítulo se revisan los métodos específicos aplicados a la determinación de residuos de pesticidas en alimentos agrícolas, reportados en la literatura en el período comprendido de 1970 a 1990. Para su presentación se clasifican en 4 grupos:

- a) Métodos analíticos para la determinación de residuos de pesticidas organoclorados.
- b) Métodos analíticos para la determinación de residuos de pesticidas organofosforados.
- c) Métodos analíticos para la determinación de residuos de pesticidas carbamatos.
- d) Métodos analíticos multiresiduales

Para cada grupo mencionado, los métodos se subdividen, de acuerdo a la técnica analítica empleada como paso determinante (de identificación y cuantificación) en: cromatografía de capa fina, cromatografía gas-líquido, cromatografía líquida de alta resolución y espectrofotometría; en todos los casos se presentan los productos químicos que se determinaron, los alimentos a los cuales se les aplicó el método, la metodología general (en forma resumida) y los resultados obtenidos por cada autor.

4.1 METODOS ESPECIFICOS PARA LA DETERMINACION DE RESIDUOS DE PESTICIDAS ORGANOCORADOS

Los métodos desarrollados en el análisis de residuos de pesticidas organoclorados, comprenden análisis específicos de algunos compuestos, así como la detección en conjunto de este tipo de pesticidas.

4.1.1. Cromatografía en capa fina (CCF).

Los pesticidas captan, captafol y folpet, compuestos organoclorados con actividad fungicida han sido determinados de forma simultánea por varios métodos, incluyendo CCF (semicuantitativo) y

cromatografía gas-líquido; para su determinación en manzanas y papas por CCF y fluorometría *in situ*, Francoeur y Mallet (52) en 1977, extraen los residuos con acetonitrilo, para posterior partición en cloruro de metileno-éter de petróleo (20:80) y adición de solución saturada de cloruro de sodio, descartándose la fase acuosa, el disolvente se concentra y se lleva a un volumen conocido.

Las placas se prepararon con sílica gel y solución de cloruro de aluminio 0.1 M., se colocan las muestras y desarrollan utilizando una mezcla de cloruro de metileno-hexano (9:1), al secarse las placas se rocian con solución de clorato de sodio 0.1 M y se calientan a 100°C. El cloruro de aluminio es un catalizador que ayuda a fragmentar las moléculas de los pesticidas durante la etapa de calentamiento, mientras el clorato de sodio es un agente complejante que produce las especies fluorescentes.

Los derivados fluorescentes de captan y captafol preparados con esta técnica tienen una excitación máxima a 355 nm y una emisión máxima a 465 nm. Los porcentajes de recuperación son mayores al 90%, la cantidad mínima detectable es aproximadamente de 0.02 ppm. Los autores comparan los resultados obtenidos con los reportados para CGL y colorimetría, concluyendo que los porcentajes de recuperación son cercanos, 98% para CGL, utilizando un detector de captura de electrones, 99% para colorimetría, con la desventaja para CGL de que se requiere la etapa de purificación en columna de sílica gel.

4.1.2. Cromatografía gas-líquido.

Las muestras con un alto contenido en grasas son de especial interés, por que en ellas se acumulan los pesticidas lipo-solubles lo cual requiere que el proceso de extracción de dichos residuos sea eficiente, en 1970 Porter y Burke (40) describen la determinación de residuos de pesticidas organoclorados en muestras con alto contenido en grasa, por CGL utilizando un detector de captura de electrones; las grasas y aceites analizados se distribuyen en una columna empacada con florisil, los residuos se eluyen con agua al 10% en acetonitrilo. Para una etapa final de

purificación se emplea una columna de florisil eluyendo con acetona y hexano, de esta manera los extractos quedan lo suficientemente libres de grasas para inyectarse en el sistema de CGL. El objetivo de este estudio es encontrar un método de purificación que permita analizar muestras con un alto contenido en grasas, manteniendo la sensibilidad y sensibilidad del detector. Entre los pesticidas analizados están: dieldrin, DDT y sus metabolitos, araclor, mirex, entre otros; los porcentajes de recuperación son de 85-108% para muestras en general, por lo que el método puede emplearse para la purificación de todo tipo de muestras.

Uno de los métodos por CGL para la determinación de captan, captafol y folpet fue propuesto en 1970 por Pomerantz (48) usando un detector de captura de electrones, la extracción se realiza con acetonitrilo, partición en diclorometano-éter de petróleo y purificación en columna de florisil. Con este procedimiento el límite de detección para captan y folpet es de 0.1 mg/Kg y para captafol es de 0.8 mg/Kg. En este análisis se observaron cambios en la sensibilidad del detector, los cuales se deben a problemas de adsorción descomposición de los pesticidas durante el proceso cromatográfico. El porcentaje de recuperación en las muestras es de 80 a 110%.

Para determinar la presencia de residuos de pesticidas organoclorados por CGL, otro de los métodos utilizan el detector de espectrometría de masas y el detector fotométrico de llama aplicado a muestras de queso, cocoa y pescado por Bellman y Barry en 1971 (41). La preparación de la muestra involucra la extracción de los lípidos presentes con una mezcla de éter de petróleo y éter etílico, para una muestra previamente macerada en metanol, se procede a la partición de los pesticidas aislados, con éter de petróleo y se eluyen a través de una columna empacada con florisil; el eluato final se concentra y se inyecta a la columna cromatográfica. se identifican residuos de p,p'-DDE, los isómeros α , β , δ , de HCH, (1,2,3,4,5,6-hexacloro hexano).

Los problemas presentes en el análisis por CGL de los residuos de captan, captafol y folpet (descomposición o degradación dentro de la columna cromatográfica) y su aplicación

en diversos cultivos de vegetales hacen que en 1984 Barbina y colaboradores (58) realicen un estudio para su determinación simultánea por CGL empleando columnas capilares, con detector de captura de electrones. Las cantidades mínimas detectadas en muestras de manzanas y peras es de 0.0010 mg para captan y folpet y 0.020 mg para captafol, los cuales son menores a los reportados por Pomerantz (48) en 1970, el porcentaje de recuperación varía entre 72.0 y 83.8% para captan, 73.0 y 93.0% para folpet, para captafol es de 70.8 a 91.8%. La extracción se realiza con acetronitrilo, se purifica por partición en hexano-éter dietílico (1:1) y posterior extracción con solución saturada de sulfato de sodio. La capa orgánica se emplea en la determinación de los residuos, las columnas de vidrio se lavan para remover posibles residuos y se calientan a 110 °C, previo tratamiento con mezcla silanizada, preparada inmediatamente antes de usarse con volúmenes iguales de trimetilcloro silano y hexametildisilazano, ambos en tolueno al 5%; en estas condiciones el tiempo de retención en minutos (Tr) obtenido para los compuestos es de 4.46, 5.1 y 11.22; para captan, folpet y captafol respectivamente, de esta misma forma se preparan curvas patrón para cada pesticida. Entre las columnas de trabajo se probaron varias encontrando que las columnas SE-52 al 1% en chromosorb no permiten la separación de estos tres residuos, La silinización de la columna capilar es para obtener reproducibilidad de los picos.

Para la determinación de endosulfan, sulfato de endosulfan y sus metabolitos, en 1981 Wilkes (49) propone el uso de CGL-espectrometría de masas, desarrolla el método aplicándolo a la determinación de estos residuos en manzanas y zanahorias, por adición de 0.1 ppm de muestras patrón, (50% de la tolerancia de estos pesticidas en zanahorias). La extracción y purificación se realiza siguiendo la metodología propuesta en el AOAC (17), en tanto que la confirmación de la presencia de estos compuestos se lleva a cabo usando CGL-EM. En estas condiciones, los tiempos de retención para endosulfan I y II y sulfato de endosulfan son de 3.3, 4.6 y 6.2 minutos respectivamente.

Dentro de la clasificación general de los pesticidas se mencionan a los fumigantes, por sus características químicas y

tóxicas, entre los compuestos más empleados están cloruro de metileno, cloroformo, 1,2-diclorometano, metilcloroformo, tricloro etileno, tetracloruro de carbono y tetracloro etileno. Heikes y Hopper en 1986 (51), describen un método para la determinación simultánea de estos pesticidas; presentes en cereales y productos a base de cereales. Las muestras se maceran y agitan con agua para después purgarlas con nitrógeno; los pesticidas se colectan en una trampa que contiene una mezcla de las resinas tenax TA y XAD-4, eluyendo con hexano para la extracción de los pesticidas de la resina. La determinación se realiza por CGL usando un detector de captura de electrones, o bien un detector de electroconductividad Hall. Utilizando éste método se pueden cuantificar concentraciones de ppb o sub-ppb, esto requiere de un control riguroso de los disolventes, reactivos y material empleados durante el análisis, además del uso de un patrón para validar los resultados. Los porcentajes de recuperación obtenidos son de 82 a 102%.

La determinación de clorotalonil y sus metabolitos, 4-hidroxi-2,5,6-tricloroisoftalonitrilo (HTCN), hexaclorobenceno y pentacloro benzonitrilo en arándanos por extracción, metilación, purificación en columna de florisil y determinación por CGL con detector de captura de electrones los reportan El-Nabarawy y Carey, en 1988 (54); la extracción se realiza con acetona-ácido sulfúrico y posterior purificación en columna de florisil, nueva extracción con una mezcla de éter de petróleo-éter etílico (1:1). Para la reacción de metilación se utiliza una solución de HCl-metanol (1:1) como reactivo de catalización; el reactivo de metilación que consiste de una mezcla de 3-metil-1-p-toliltriazeno en éter etílico, dejando que la reacción de metilación se lleve a cabo. Después de lo cual se eluye a través de una columna empacada con florisil, utilizando hexano como eluyente, seguido de éter de petróleo-éter etílico (1:1), los residuos se concentran y se determinan por CGL con un detector de captura de electrones; los porcentajes de recuperación son de 85.7 a 92.3% para clorotalonil, 75.0 a 78.4% para hexacloro benceno, 76.3 a 83.5% para pentacloro benzonitrilo y de 95.9 a 99.5% para HTCN.

En 1988 Martindale (59) analiza muestras de papa para determinar residuos de hexaclorohexano, captafol, ciclorofen, DDT, dieldrin, clorpirifos, metil pirimifos y algunos de sus metabolitos. Se emplea acetona como disolvente de extracción, partición en hexano y purificación por elución a través de una columna empacada con alúmina eluyendo con hexano. La detección se realiza con el detector de captura de electrones. Los porcentajes de recuperación son de 75 a 99 %, la concentración límite detectada es de 0.001ppm para los metabolitos de HCH.

Tomando en cuenta que los compuestos químicos empleados como fumigantes son solubles en grasas, se espera que los alimentos con un alto contenido en grasa, tratados con estos productos, contengan este tipo de residuos, de acuerdo a lo reportado anteriormente por Daft en 1988 (21), por lo tanto el método utilizado para su determinación debe de ser capaz de analizar todo tipo de alimentos incluyendo los de alto contenido en grasa; en un estudio realizado por Daft en 1989 (14) se emplea una extracción de la muestra con acetona e isooctano, para la posterior determinación por CGL; los cromatogramas resultantes de las muestras con un contenido menor al 20% en grasa están libres de los efectos de distorsión por impurezas grasas, además de que no requieren de la etapa de purificación; pero esta etapa sí es necesaria para las muestras con un alto contenido en grasa (21-70%) permitiendo de esta manera un análisis semicuantitativo.

Las muestras se clasifican y tratan de acuerdo a su consistencia y contenido en grasa; así se extraen directamente con isooctano o bien se funden y diluyen con isooctano; las muestras sólidas o con consistencia pulposa se coextraen con acetona al 20% -NaCl al 5 % en ácido fosfórico al 25 %-isooctano. Los extractos de alimentos con un alto contenido en grasa (21-70 %) se purifican por elución a través de una columna de florisil (21). La determinación se lleva a cabo por CGL usando dos detectores, el de captura de electrones y el de electroconductividad.

Los porcentajes de recuperación de los 22 fumigantes analizados a partir de las muestras de alimentos de diversas clases fue en promedio de 73% para alimentos grasos, 78% para no grasos, bajando el porcentaje para ambos tipos de muestras cuando

los extractos se purifican por elución a través de la columna de florisil; aplicando este procedimiento a 5549 muestras se encontró que 372 de ellas contenían alguno de los siguientes residuos: cloroformo, cloruro de metileno, tetracloruro de carbono, 1,1-diclorometano, propileno dicloro, entre otros; en cantidades que variaban de 7 a 799 ng/g; de estos resultados el 78.1% de las muestras correspondían a alimentos con un contenido en grasa de 1% o más, mientras productos no grasos como frutas y vegetales estuvieron prácticamente libres de residuos de pesticidas organoclorados.

Con lo revisado hasta este punto podemos ver que uno de los métodos de detección más adecuados es el detector de captura de electrones, que ha comprobado ser de gran utilidad en la determinación de residuos organoclorados. Newsome (55), lo utiliza aplicándolo a un método que involucra la extracción con acetoneitrilo, una coextracción con acetona, la etapa de purificación se realiza por la elución a través de una fase estacionaria sólida de C18, se eluye con metanol al 40% en agua y posteriormente con metanol. Para el análisis por CGL una alícuota se extrae con tolueno y se inyecta directamente al cromatógrafo, el método permite determinar concentraciones de 20 a 80 ng/ml. Los pesticidas determinados son dicloran, clorotalonil, captan, folpet y captafol; de esta manera la acetona es el disolvente de extracción más efectivo para muchos de los residuos de pesticidas y tipos de muestras con un buen porcentaje de recuperación, además de aumentar el efecto de la adsorción de los pesticidas en la fase estacionaria. El problema que se tiene es la descomposición parcial de captafol, por lo que la determinación está limitada a 1 ppm para este pesticida, para el cual se emplea la HPLC. El porcentaje de recuperación es de 74% a 119% en manzana, tomate, pera, naranja, papa, fresa, pepino, y uva. El uso de la fase estacionaria C18 permite aislar y purificar rápidamente estos residuos con un ahorro de disolventes.

Los residuos de pesticidas organoclorados en la India en muestras de vegetales fueron determinados por Lal y colaboradores en 1989 (56); la extracción se realiza con acetona y se pasa a través de una columna empacada con carbón activado y sulfato de

sodio anhidro. el eluato se concentra y analiza por CGL, utilizando el detector de captura de electrones, se analizan residuos de hexacloro ciclo hexano (HCH), heptacloro, aldrin, DDT y sus metabolitos. El 90% de las muestras analizadas contenian al menos alguno de estos residuos en concentraciones que rebasan los límites máximos permitidos (57). Este estudio demuestra el uso irracional de los pesticidas organoclorados no permitidos por la FAO/OMS, dado su alto grado de toxicidad, discutido en la sección 2.3, en la India el uso de DDT esta restringido a el control de mosquito, por lo que no es directamente aplicado a los vegetales, pero su presencia en las muestras analizadas se debe en parte a posibles transferencias del sitio de aplicación.

En un análisis realizado en 1990 a 244 muestra de alimentos en la India, que incluyen cereales, frutas, aceites y leguminosas, Kaphalia (26) detecta residuos de HCH y DDT, en el 85% de las muestras analizadas. La extracción se realiza con acetoneitrilo y los pesticidas son reextraídos con hexano; los pigmentos se separan del extracto en una columna empacada con carbón activado y la purificación se realiza por tratamiento con ácido sulfúrico concentrado y una columna empacada con florisil. Los porcentajes de recuperación son mayores a 85%, excepto para β -HCH, el cual se recupera en un 79%, para productos secos, aceites y grasas.

La tabla 8 resume la metodología utilizada, por cada uno de los autores, en el análisis de residuos de pesticidas organoclorados en alimentos. Al final del capítulo se muestra la tabla 12 que resume las condiciones generales empleadas en el análisis cromatográfico de estos residuos.

TABLA 8
RESUMEN DE LA METODOLOGIA EMPLEADA PARA EL ANALISIS
DE RESIDUOS DE PESTICIDAS ORGANOCORADOS.

EXTRACCION	REFERENCIA
Disolventes:	
Acetonitrilo	48, 49, 50, 55, 58, 51
Acetona	55, 56, 59
Metanol	41
Isocetano	14, 22
PURIFICACION	
Extracción líquido-líquido	
Disolventes : Hexano	49, 51, 59, 58
Eter de petróleo	50, 48, 53
Cloruro de metileno	48, 50
Eter etílico	41
Cromatografía en columna	
Adsorbente: Alúmina	59
Cis	55
Carbón activado	56
Florisil	48, 41, 49, 58
DETERMINACION	
CCF	50
CGL	
Detector: Captura de electrones	48, 49, 51, 58, 59, 14, 22, 56
Hall de electroconduct.	14, 22
Ionización de llama	41

4.2. METODOS ANALITICOS PARA LA DETERMINACION DE RESIDUOS DE ORGANOFOSFORADOS.

4.2.1. Cromatografía de capa fina:

Entre los métodos reportados para la determinación de residuos de pesticidas organofosforados por CCF podemos mencionar el que presentan Wood y Kanagasabapathy en 1983 (60), los residuos se determinan en muestras de manzanas, naranja, tomate y pera. La muestra se macera en hexano-acetona (4:1), y se extrae con solución saturada de sulfato de sodio, la fase orgánica se eluye a través de una columna empacada con óxido de aluminio empleando: 1) hexano y 2) hexano-acetona (98:2), se concentra y analiza por CCF, las placas se preparan con sílica gel, el sistema se desarrolla en mezcla de hexano-acetona-cloroformo (75:20:5); para detectar los residuos organotiofosforados la placa se rocía con cloruro de magnesio y una solución de 2,6-dicloro-p-benzoquinona cloroimida (DCQ), los residuos se observan en manchas de color amarillo y/o naranja-rosa, dependiendo de la naturaleza del compuesto.

En otro sistema de detección, las placas se rocían con una solución de 4-(4-nitrobenzilo) piridina (NBP), se calientan a 100°C y se rocían con una solución de 3,6,9-triazaundecametilidamina (TUMD), los residuos presentes se observan en manchas de color azul. Empleando estos sistemas de detección se analizan los residuos de bromofos, malatión y tetraclorvinfos en cantidades mínimas de 0.4 mg/kg para cada una de las muestras analizadas; los resultados ofrecen porcentajes de recuperación del 50%.

En un método rápido aplicado a muestras de frutas y vegetales Kumar y Sharma en 1987 (61), determinan residuos de malatión, forato, dimetoato y metil azinfos; se utilizan placas de sílica gel impregnadas con p-cresol al 0.5%. Los residuos se extraen por maceración de la muestra con etil metil cetona-ciclo hexano (3:2), se realiza una partición con ciclo hexano, se concentra y aplica a las placas, que se desarrollan en una mezcla de hexano-xileno-acetato de etilo-acetona (50:15:5:10), se secan a temperatura ambiente y se exponen a los vapores de yodo. El límite de

detección es de 1 a 2 µg, la identidad de los residuos se comprueba por espectrometría de infrarrojo.

4.2.2. Cromatografía gas-líquido:

En 1971 Storherr y colaboradores (67), proponen un método para la determinación de residuos de pesticidas en alimentos no grasos. El paso de extracción varía de acuerdo al contenido de azúcares en las muestras; así para alimentos con 5% o menos de azúcares se extrae con acetonitrilo, en tanto que para productos con un contenido de azúcares del 5 al 15% el disolvente es una mezcla de acetonitrilo-agua (4:1), después de lo cual, en ambos tipos de muestras se procede a la partición con cloruro de metileno, los extractos se eluyen a través de una columna empacada con carbón activado-óxido de magnesio-celita (1:2:4), se eluye con acetonitrilo-benceno (1:1), los eluatos se recogen y los residuos se determinan por CGL, utilizando el detector termiónico de KCl. El método se aplica a muestras de manzana, lechuga, fresa y ejote para 41 residuos organofosforados y sus productos de degradación, obteniéndose porcentajes de recuperación del orden del 82 al 110%.

Dentro de la cuantificación de residuos de pesticidas organofosforados en 1974 se reporta la determinación de seis pesticidas y sus productos de oxidación; Laski (62), analiza muestras de manzana y ejote. La extracción y purificación se realiza de acuerdo a lo reportado por Storherr (67), la determinación se realiza por CGL utilizando el detector termiónico de KCl; los porcentajes de recuperación en manzana y ejote son de 86.5 y 92% de paratión respectivamente, 99.3 y 103.7% de paraoxón, 125.1 y 112.9% de dimetoato, 96.7 y 100% para los análogos oxigenados de carbofenotión, finalmente para EPN son de 90.8 y 98.3%. Lo relevante de este trabajo es el estudio comparativo que realiza el autor con respecto al uso del detector termiónico de KCl y el detector fotométrico de flama específico para fósforo, el análisis estadístico de los resultados obtenidos indica que los dos sistemas de detección, son adecuados para la cuantificación de residuos de pesticidas organofosforados.

Para el análisis de algunos pesticidas, por las propiedades

químicas que presentan, no es posible su determinación directa por CGL, por lo que se requiere de la formación de productos derivados con propiedades cromatográficas adecuadas. Singh y Lapointe (63) en 1971 describen la determinación de residuos organotiofosforados por oxidación con hipoclorito de sodio, para su posterior análisis por CGL, utilizando el detector fotométrico de flama. Se analizan muestras de pera, manzana, arándano y lechuga, se extrae con acetonitrilo para la posterior partición con hexano, las muestras se fortifican con 0.25 lg de cada uno de los siguientes pesticidas; malatión, paratión, ronnel, metil paratión, diazinón y fenitrotión. para la oxidación se toma la muestra y se diluye con acetona, se hace reaccionar con hipoclorito de sodio y se inyecta directamente al cromatógrafo de gases equipado con una columna DEGS y detector fotométrico de flama. Los tiempos de retención para los patrones de diazinón, ronnel, malatión, paratión, metil paratión, y fenitrotión son de 0.15 y 0.23 min, 0.41 y 0.54, 0.79 y 1.07, 1.00 y 1.71, 1.08 y 1.43 min respectivamente para las muestras analizadas, el primer valor corresponde a tiempo de retención antes de la oxidación y el segundo valor corresponde al producto de oxidación.

Al continuar el estudio en 1979, Laski (64) utiliza el procedimiento ya descrito (63), excepto en las condiciones de CGL donde se varían la temperatura de la columna de 175 a 185 °C, dependiendo del pesticida y el derivado. Además de introducir el sistema acoplado de CGL-EM y el análisis infrarrojo, en este método se procede a la preparación de los derivados de 10 pesticidas: forato, metidatión, clorpirifos, fenclorfos, malatión, paratión, entión, DMPA, leptofos, diazinón; en muestras de papa, lechuga, manzana y apio; se obtienen porcentajes de recuperación de 0.0, 67.3, 98.5, 97.1, 82.5, 97.6, 63.4, 93.1, 82.4 y 93.7% para cada uno de los pesticidas respectivamente, el forato no se oxida a su correspondiente producto de oxidación de lo cual se propone que la reacción para forato se debe de realizar con permanganato de potasio; los resultados se comprueban por EM e infrarrojo, el método es rápido y sensitivo, ayuda a la determinación de estos pesticidas a y algunos de sus metabolitos correspondientes.

Se ha mencionado que la extracción es parte fundamental de la metodología del análisis de residuos de pesticidas, por lo que algunos autores han comparado los diferentes procesos de extracción para lograr mejores rendimientos; es el caso de Aoki y colaboradores (65) en 1975, analizan muestras de arroz y utilizan cuatro fases estacionarias distintas para la determinación por CGL, el método se aplica a 11 pesticidas. el tratamiento de la muestra se inicia con la maceración de la muestra para después aplicar alguno de los procesos siguientes: a) con acetona, por agitación mecánica por una hora, partición en benceno y reconcentración de la muestra. b) Benceno o hexano por agitación mecánica por una hora, o bien extrayendo en un equipo soxhlet durante 6 horas. c) Con benceno-acetona o acetona-hexano (1:2), por agitación mecánica y partición en una solución de NaCl al 5%. En cada una de las muestras tratadas con alguno de estos procedimientos, se procede a la partición en acetonitrilo saturado con hexano y posterior extracción con sulfato de sodio y reextracción con benceno. Después de concentrar la fase orgánica, se hace eluir a través de una columna empacada con carbón activado, eluyendo cada muestra con 5 sistema de 1) metanol-benceno (3:7), 2) metanol-benceno (1:1), 3) acetona-hexano (1:4), 4) acetona-hexano (3:7) y 5) acetona-hexano (1:1); se colecta el eluato y se concentra para su determinación por CGL. Para las muestra donde la extracción se realizo con acetona los porcentajes de recuperacion son del orden del 47 al 76.7%; con benceno son de 42.9 a 75.4%; con hexano de 44 a 65.5%; para el sistema acetona-hexano (1:2) es de 45 a 82.1% para acetona-benceno (1:2) es de 63.0 a 85.7% y realizando la extracción con el aparato soxhlet es 44.7 a 90.3% 57.5 a 89.3% y 75.6 a 100.5% para acetona, benceno y hexano respectivamente; se observa que la extracción soxhlet produce los mejores porcentajes de recuperación utilizando hexano como disolvente extractante. Los porcentajes de recuperación en el proceso de partición son de 85 a 100%; excepto para diclorvos. En los disolventes de elución para la columna de adsorción con las mezclas de acetona-hexano (3:7) y (1:1) se obtienen los mejores porcentajes de recuperación. Todas las columnas utilizadas en la CGL son adecuadas para este tipo de

análisis, las cantidades detectadas bajo estas condiciones son de un rango de 0.010 ng para diclorvos, 0.08 ng para malatión. Este estudio lleva a proponer un método para la extracción simultánea de residuos de cinofos, fentoato, IBP, malatión y paratión en arroz, soya y otros cultivos similares. se propone que en la extracción se utilice un aparato soxhlet con hexano, para una extracción continua de 6 horas, partición en acetoneitrilo saturado con hexano y reextracción con benceno, purificando en una columna empacada con carbón activado, eluyendo con acetona-hexano al 50%, concentrar y determinar por CGL.

En 1980 Ferreira y Silva (66), proponen un método para la determinación de 18 pesticidas organofosforados y 7 de sus metabolitos en frutas y vegetales; los residuos se extraen con acetona, la partición se realiza con hexano y/o acetato de etilo, de acuerdo con la polaridad de los residuos. Los extractos de hexano se purifican por elución a través de una columna empacada con florisil, mientras los extractos de acetato de etilo no requieren de esta etapa. Los porcentajes de recuperación son mayores al 80%, el método no se aplica al análisis de la sulfona de fentión en naranjas, por los bajos intervalos de recuperación obtenidos (58-68%), lo mismo sucede con diclorvos; en otros casos algunos pesticidas no se detectan, como sucede con diazinón, entión y fentioón en uvas, así como metidatión en durazno. El método es adecuado para el análisis de residuos organofosforados en frutas y vegetales, además de ser rápido y emplear disolventes relativamente económicos. Una desventaja es la inyección de dos extractos distintos (hexano y acetato de etilo), en las columnas de CGL. Pero finalmente esto ayuda a la determinación de un número mayor de residuos presentes en las muestras; algunos compuestos análogos del oxígeno son difíciles de separar entre sí por estos métodos, sobre todo si están presentes en concentraciones muy diferentes para una muestra particular. El método tiene una sensibilidad de 0.1 mg/kg.

Para la determinación de residuos de malatión, paratión, paraoxón, monocrotofos, forato y dimetoato en papas, vegetales, cereales y frutas; Carson en 1981 (68), reporta un método el cual es una modificación al método propuesto por Storherr (67), y

permite la cuantificación de ppb y utiliza todo el extracto de la muestra; la cual se concentra con un sistema de vacío en comparación con el baño maría empleado por Storherr (67). Se utilizan los detectores fotométrico de flama y el termiónico de KCl. Para la extracción de los residuos en cereales se emplea una mezcla de acetonitrilo-agua al 35%, con esta excepción la extracción y purificación es la misma que utiliza Storherr. Permitiendo la cuantificación de concentraciones menores a las determinadas por Storherr (67); de esta manera se logra detectar un mínimo de 2 ppb de malatión, mientras Storherr cuantifica un mínimo de 32 ppb. Este aumento en la sensibilidad se debe en parte a que se inyectan volúmenes que contienen una cantidad de extracto equivalente a 30 lg de muestra y Storherr inyecta una muestra equivalente a 100lg; en general el método aumenta la sensibilidad y el rango de recuperación de 82 a 110% a un intervalo de 92 a 125%.

Con la finalidad de observar la persistencia de dimetoato, dimetoxón y malatión en plantas, se realizó un estudio de campo, las muestras se recogen durante 30 días consecutivos para su posterior análisis. Lee en 1981 (69), describe un método donde la extracción se realiza con cloroformo, la etapa de purificación consiste en la elución a través de una columna empacada con sílica gel utilizando acetona-hexano (1:4) y acetona para después añadir un patrón interno de malatión y analizar por CGL. Los tiempos de retención para dimetoato, dimetoxón y malatión son de 5.2 min, 8.0 y 1.0 min respectivamente, la mínima cantidad detectada en las muestras analizadas es de 0.01 ppm de dimetoxón, y los porcentajes de recuperación son de 92% y 89% para dimetoato y dimetoxón respectivamente el estudio realizado permite observar que los residuos de este tipo de pesticidas aplicados a los vegetales persisten después de un mes de su aplicación.

La determinación de fenamifos y sus derivados sulfóxido y sulfona correspondiente en zanahorias y frambuesas la describe Brawn en 1981 (81). La extracción se realiza con acetona y una reextracción con solución saturada de NaCl y cloroformo, el extracto se concentra y disuelve en hexano-acetona (1:1), para su purificación se utilizan dos columnas; 1) empacada con sílica gel

y 2) con mezcla de carbón activado-celulosa, la columna 1 se coloca de tal manera que el eluato 1 pase a la columna 2, ambas columnas se eluyen con hexano-acetona (1:2). Después de recoger esta fracción las columnas se separan y la columna 1 se eluye con acetona, esta fracción contiene el sulfóxido de fenamifos, los extractos 1 y 2 se concentran y redisuelven en acetato de etilo para su determinación cromatográfica, los porcentajes de recuperación para los tres residuos son en promedio del 75%. Los límites de detección para estos residuos son de 0.01 ppm de acuerdo al método ya indicado.

Para la determinación de residuos organofosforados en aceitunas Ferreira y Tainha en 1983 (82), reportan la extracción con acetonitrilo, partición con hexano, de acuerdo con el método AOAC (17), para su purificación los extractos se eluyen a través de una columna preparada con florisil desactivado con 2% de agua, la elución se realiza con éter etílico-hexano (2:3), se repite la operación utilizando florisil desactivado con 1% de agua. Para la determinación de dimetoato y fosfamidón el eluyente que se emplea es acetona, la determinación de los residuos se realiza por CGL. Los pesticidas determinados en estas condiciones son: etil fosfamidón, fosfamidón, dimetoato, metidatió, paratió y diazinón, con porcentajes de recuperación de 78 a 101%. El método es capaz de detectar estos residuos con una sensibilidad promedio de 0.1 mg/kg, comprobándose el uso de diazinón en concentraciones mayores al LMR establecido por la FAO/OMS, el cual es de 2 mg/kg para aceitunas, lo mismo ocurre con metidatió (1 mg/kg) y paratió (0.5 mg/kg) en las primeras semanas después de que los pesticidas se aplicaron a los frutos.

Otro método de determinación de residuos organofosforados es el que reporta Adachi y colaboradores en 1984 (24), se extrae con agua y acetonitrilo (1:1), la remoción de las grasas se realiza adicionando acetato de zinc, para que de esta manera los carboxilatos de zinc se precipitan y separan por filtración. La solución se eluye a través de una columna empacada con carbón activado empleando diclorometano y acetona-hexano (1:1) para la elución de los residuos, para el posterior análisis por CGL. El método de extracción se prueba para diferentes concentraciones de

acetónitrilo-agua; 30, 40 y 50%, en la mezcla al 30% se obtienen los porcentajes de recuperación más altos, 84 a 104%, en comparación con los porcentajes obtenidos para la solución al 40% (81 al 100%) y 50% (60 al 89%). Para una muestra de 50 g, 2 ml de solución final y una inyección de 5 μ l los límites de detección en μ g para los pesticidas organofosforados que se analizaron son: diazinón, 4; fenitrotión 6.4; paratión, 4.8; malatión, 16; dimetoato, 8; s-bencil-diisopropil fosforotioato (BIF), 6.4; fentoato, 8 y EPN, 32 ppb. El método es rápido e involucra una sola etapa para la remoción de las grasas, además de que puede ser aplicado a todo tipo de muestras vegetales.

El Comité de Métodos Analíticos de Londres para el análisis de residuos de pesticidas informa en 1985 (71), de un método para la determinación de residuos organofosforados en granos, la extracción emplea acetona-agua para posterior partición en diclorometano, la capa orgánica se purifica por elución a través de una columna empacada con carbón activado-silica gel; eluyendo con acetona-tolueno-diclorometano (1:1:5), y posterior análisis por CGL, empleando los detectores termiónico y fotométrico de flama, con porcentajes de recuperación que van del 68 al 94%.

El método de Storherr (67), fue utilizado por Blaha y Jackson en 1985 (12), como un parámetro de comparación para el método propuesto por ellos. Se analizaron muestras con alto contenido de grasas y muestras sin grasa, dentro de los que encontramos; frutas, vegetales, granos, cacahuatas, alimentos para bebé, entre otros; este trabajo intenta desarrollar un método que logre la recuperación total de todos los residuos de pesticidas organofosforados en todo tipo de alimentos, los pesticidas se separan en base a su polaridad con un mínimo de interferencias; de esta manera se extraen y analizan 17 residuos: para muestras con bajo contenido en agua (25% o menos) se extrae con acetona-agua (2:1), para muestras con más del 25% en agua se extrae con acetona. Después de esto el extracto se filtra y se procede a la partición con cloruro de metileno-hexano (1:9), se colecta la fase orgánica (eluito 1), la fase acuosa se extrae con cloruro de metileno-acetona (3:1) (eluito 2); se repite la operación y se obtiene el eluito 3. Los tres eluitos anteriores se purifican por

cromatografía de permeación en gel (CPG), eluyendo con cloruro de metileno-hexano (1:1). se emplea la CPG por ser el método más adecuado para la purificación de residuos de polaridades diferentes, mientras la columna de florisil se emplea solamente para residuos polares. La determinación por CGL utiliza el detector de captura de electrones y el fotométrico de flama.

La acetona como disolvente de extracción ha sido empleada por Luke, (30, 31), Sawyer (32), Stan (9), entre otros, por su gran capacidad para extraer los residuos de las muestras de alimentos, en este método se incrementa la polaridad de la mezcla de partición (cloruro de metileno-hexano), para que de ésta forma los residuos se separen de acuerdo a su polaridad. la primer etapa de partición con mezcla (1:9) extrae los residuos menos polares, la segunda etapa extrae los residuos moderadamente polares, mientras los residuos más polares se extraen con acetona y cloruro de metileno (3:1), los porcentajes de recuperación estan en el intervalo de 80 a 118%.

El análisis de Blaha y Jackson (12) se realiza por duplicado aplicando el método de Storherr (67), por el cual se determinan concentraciones mayores, esto es por el método propuesto (12) determinan concentraciones de 0.005 ppm de metamidofos y por el método de Storherr (67) de 0.032 ppm para metamidofos, en muestras de ejotes; de acuerdo con estos resultados el método de Blaha y Jackson (12) da mejores porcentajes de recuperación y mejor sensibilidad que el método de Storherr (67).

La determinación directa por CGL para alimentos grasos no es práctica de realizar utilizando el detector fotométrico de flama o el detector termoiónico, ya que los extractos contienen cantidades considerables de grasa que interfieren en los sistemas de detección de los residuos, también afectan a las columnas y en general a la resolución de los sistemas. Para aislar los residuos de los pesticidas organofosforados de los lípidos coextraídos se utilizan diferentes técnicas para su purificación y determinación final por CGL con alguno de los detectores mencionados, por lo que Di Muccio y colaboradores (72) en 1987, proponen utilizar una partición en una columna empacada con extrelut, un material poroso del tipo del carbón activado, eluyendo con hexano-acetonitrilo, el

sistema proporciona un método de purificación sencillo y efectivo para aislar 9 residuos. A los extractos finales se les determinan los residuos presentes; se compara con los resultados obtenidos por partición líquido-líquido, siendo de esta manera factible de sustituir en el procedimiento utilizado por Luke (30, 31):

Algunos pesticidas organofosforados tales como el dimetoato, malatión, fenitrotión y quinalfos se utilizan en las plantaciones de té por su baja toxicidad relativa, baja persistencia y su alto porcentaje de pérdida durante el proceso de manufactura del té. para su determinación se utiliza el ácido sulfúrico como reactivo de purificación de acuerdo a lo reportado por Wan (77) en 1990, la muestra se macera y extrae con tolueno-metanol (3:1), y una porción del extracto se trata con H_2SO_4 agitando vigorosamente hasata separación total de las fases, la capa de tolueno se eluye a través de una columna empacada con florisil utilizando tolueno-acetona (98:2), el eluato final se concentra y analiza por CGL. Los porcentajes de recuperación son: dimetoato, 21.9%; malatión, 94.4%; fenitrotión 97.2% y quinalfos 96.1%; por los resultados obtenidos se observa que el método no resulta adecuado para la determinación de dimetoato. la función del ácido es la destrucción de la materia lípida que interfiere en la determinación de estos residuos de pesticidas organofosforados.

La tabla 9 resume la metodología utilizada por cada autor en el análisis de residuos de pesticidas organofosforados en alimentos agrícolas de consumo humano. Al final del capítulo se muestra la tabla 13 que resume las condiciones generales empleadas en el análisis cromatográfico de estos residuos.

TABLA 9
RESUMEN DE LA METODOLOGIA EMPLEADA PARA EL ANALISIS
DE RESIDUOS DE PESTICIDAS ORGANOFOSFORADOS

EXTRACCION	REFERENCIA
Disolventes	
Acetonitrilo	12, 60, 65, 66, 71, 72, 74, 81
Acetona	12, 60, 65, 66, 71, 72, 74, 81
Cloroformo	69, 81
Benceno	65
PURIFICACION	
Extracción líquido-líquido:	
Disolventes: Hexano	66, 82
Acetato de etilo	66
Cloruro de metileno	12, 62, 67, 71
Acetonitrilo	65
Cromatografía en columna:	
Adsorbentes: Gel de sílice	69, 73, 81
Carbón activado-	
MgO-celita	62, 67, 68, 60
Permeación en gel	12
Carbón activado	65
Florisil	66, 49, 53, 58, 82
DETERMINACION	
CCF	60, 61
CGL	
Detector de captura de electrones	13
Fotométrico de flama	12, 63, 64, 29, 68, 69 71
Termiónico	62, 64, 66, 67, 68
Ionización de llama	65
Espectrometría de masas	64

4.3 METODOS ANALITICOS ESPECIFICOS PARA LA DETERMINACION DE RESIDUOS DE PESTICIDAS CARBAMATOS

Dentro de este grupo de métodos se revisan las técnicas aplicadas a residuos de pesticidas de los grupos N-metil carbamatos y ditiocarbamatos, de acuerdo a la clasificación química de estos productos.

4.3.1 Cromatografía en capa fina:

La CCF es una técnica que es rápida y no requiere de procedimientos extensos de purificación; en 1974 Lawrence y Laver (79) describen la determinación de estos residuos por la formación de sus derivados fluorescentes y su separación por CCF; el proceso de extracción se realiza con metanol y cloroformo, para la posterior formación de las correspondientes anilinas por hidrólisis con KOH, calentando a 110 °C, estos derivados se extraen con hexano y se aplican a las placas preparadas con gel de sílice y cloruro de daniel (cloruro de 1-dimetildiaminonaftaleno-5-sulfonilo); el sistema se desarrolla en cloroformo-hexano (3:1), se rocian con trietanolamina hasta que las manchas son totalmente visibles. Para el análisis cuantitativo cada mancha se separa y extrae el residuo con acetona midiendo la intensidad de la fluorescencia a 350 y 510 nm; comparando los valores obtenidos con los de un estándar tratado con el procedimiento de reacción explicado; el método se aplica a la confirmación de monourón y linurón en extractos de papa, betabel, zanahoria y nabos. La presencia de residuos de pesticidas carbamatos es fácil de confirmar a concentraciones de 0.5 ppm aplicando esta técnica.

Para la determinación de residuos de carbarilo y propoxur en vegetales y frutas Wood y Kanagasapathy en 1983 (60) proponen un método donde la extracción se realiza con diclorometano; las muestras se aplican en placas preparadas con gel de sílice y se desarrollan en hexano-acetona-cloroformo (75:20:5), después de lo cual se rocian con solución de KOH y tetrafluorato de 4-nitro-bencen-diazoniolo (FNBD); el límite de detección es de 50 a 100 ng y los porcentajes de recuperación son mayores al 70% para

carbarilo, en tanto para propoxur es un método adecuado siempre y cuando no se requiera conocer la concentración de cada uno de sus metabolitos.

4.3.2. Métodos por CGL:

Existen dos problemas en el desarrollo de los métodos de CGL para el análisis de residuos de pesticidas carbamatos: 1) los métodos no son lo suficientemente sensibles y selectivos para este tipo de compuestos; 2) la descomposición de los residuos a sus correspondientes fenoles dentro de las columnas cromatográficas; la primera dificultad se ha eliminado desarrollando nuevos métodos de detección que involucran la determinación selectiva de un elemento específico, tal como N, S o Cl; la segunda dificultad ha decrecido por el uso de derivados termoestables o los productos de hidrólisis.

Los pesticidas carbarilo, mesurol, promecarb, zectran y productos fenólicos de degradación de zectran, se analizan por Lorah y Hemphill en 1974 (85) en muestras de tomate y lechuga con el detector termiónico, dada su respuesta a nitrógeno y azufre. Al analizar se extraen y purifican por el método de Holden (89), el pesticida zectran no se recupera, en tanto que los otros pesticidas se recuperan hasta en un 90%; los cromatogramas, el porcentaje de recuperación y la curva de calibración demuestran que utilizando este método no se lleva a cabo la degradación adicional en las columnas, por lo tanto se considera adecuado para la cuantificación de N-metil carbamatos.

Para la cuantificación de residuos de pesticidas carbamatos basado en su conversión a sus derivados 2,4-dinitrofenoles (DNF) o 2,6-dinitro-trifluorometilos (DNTM) y su determinación con un detector de captura de electrones, Ernest y colaboradores (80) describen un método en 1975; los compuestos estudiados son carbarilo, propoxur y mesurol; los cuales se extraen con cloruro de metileno, la hidrólisis se realiza con NaOH y $MgSO_4$, se destila y agrega H_2SO_4 y KOH, finalmente se agrega solución de 1-fluoro-2,4-dinitrobenceno o 4-cloro-a-a-trifluoro-3,5-dinitro-anilina. Los derivados se extraen con isooctano y se inyectan al

sistema de CGL. El método es aceptable para la determinación de N-metil carbamatos aromáticos que no contienen grupos nitro; los derivados DNF y DNTH de los pesticidas carbamatos analizados son estables y el detector de captura de electrones es muy sensible a estos compuestos, los porcentajes de recuperación son de 90-95%.

Los derivados de pesticidas carbamatos fueron analizados por Lawrence (86) en 1976, utilizando un procedimiento de alquilación con hidruro de sodio-yoduro de metilo. La ventaja de la alquilación esta en que se producen compuestos termoestables que pueden ser analizados en un amplio rango de condiciones utilizando un detector de conductividad electrolytica. El método evalúa residuos de clorprofam, profam y sweep presentes en muestras de papa, naranja, zanahoria, maíz, espinaca y piña, La muestra se macera con celita y metanol; los residuos se extraen con agua-cloroformo (10:1), la capa orgánica se separa y se agrega dimetil sulfóxido:benceno (1:1), yoduro de metilo e hidruro de sodio, para su posterior análisis por CGL. Se obtienen porcentajes de recuperación de 65 a 100% dependiendo del tipo de muestra.

El tiabendazol, benomil y metil-2-benzamidazol (MBZ) son tres pesticidas carbamatos usados en el control de plagas en vegetales y frutas, de lo cual surge la necesidad de un método para su determinación simultánea. Tjan y Jansen en 1979 (88) extraen estos residuos con acetato de etilo, y purifican por partición con HCl 0.1 N. El benomil es un pesticida inestable en solución acuosa en donde se hidroliza a MBZ, los residuos se extraen y refluían con acetona, carbonato de sodio al 30%, bromuro de pentafluorobencilo, purificando por elución en una columna empacada con alúmina utilizando benceno al 5% en hexano y cloruro de metileno. Los límites de detección son de 0.01 y 0.05 ppm para tiabendazol y MBZ respectivamente, la estructura de los derivados se confirma utilizando CGL-EH, en conclusión el método demuestra ser muy sensible al detector de captura de electrones por formación de los derivados de estos productos.

Holden en 1975 (89) propone la formación de compuestos 2,4-dinitroéter para la determinación de residuos de pesticidas carbamatos en cultivos, el método emplea un detector de captura de electrones. Los residuos de estos pesticidas se extraen con

acetonitrilo, procediendo a una partición con éter de petróleo y diclorometano, para una segunda fase de purificación se agrega una solución de cloruro de amonio y ácido fosfórico para precipitar las impurezas presentes, se extrae con diclorometano y KOH, a la fase orgánica se le agrega solución de 1-fluoro-2,4-dinitrobenceno para formar los correspondientes fenil éter de los carbamatos presentes en la muestra, después se añade solución de borato de sodio y se extrae con isooctano y analizan por CGL. Para la preparación de las curvas estandar los pesticidas de análisis se dividen en 3 grupos: 1) Propoxur, landrin, carbanalato; 2) captión, hercules 5727, bay 78537 y mobam; 3) captión, promecarb, box y mesuroil; las soluciones se prepararon en benceno y los derivados se obtienen de acuerdo a lo ya indicado, con porcentajes de recuperación de 90 a 98%, detectandose concentraciones límite de 0.05 ppm para todos estos residuos de pesticidas carbamatos.

Continuando con sus investigaciones Holden en 1975 (90) estudia la posibilidad de determinar simultáneamente 4 residuos de carbamatos en vegetales: propoxur, carbofuran, carbanolato y carbarilo, de acuerdo al método reportado en 1973 (89); se obtienen porcentajes de recuperación de 77 a 102% en un estudio colaborativo (8 laboratorios), se utiliza un detector de captura de electrones; los resultados de este estudio demuestran que el método de Holden (89) es lo suficientemente sensible y preciso para ser utilizado en la determinación de residuos de pesticidas N-metil carbamatos presentes en alimentos de tipo agrícola, por lo cual se incluye dentro de los métodos oficiales del AOAC (1990) para la determinación de los cuatro residuos de carbamatos mencionados en manzanas, ejotes, col entre otros vegetales (97).

Los pesticidas carbamatos se emplean en el control de plagas en frutas y vegetales; el LMR establecido por la FAO/OHS para estos pesticidas, expresado como CS_2 , es de 0.1 mg/Kg, 5 y 1 para papa, apio y lechuga; algunos de los procedimientos para la determinación de estos residuos involucra la espectrofotometría para la cuantificación del CS_2 liberado durante la digestión que se realiza con HCl (83). En 1981 el panel para la determinación de residuos de pesticidas ditiocarbamatos en Londres (91) emplea este procedimiento para proponer el método de espacio de cabeza, el

matraz de digestión se sella y después de un tiempo adecuado se obtiene una muestra de los gases que existen en el espacio superior del matraz inyectándose directamente en el cromatógrafo de gases, el contenido de CS_2 se determina por comparación con una curva estándar. El método se aplica a muestras de lechuga, la cual se macera y coloca dentro de la botella de reacción con $SnCl_2$ al 1.5% en HCl. 5 M, la botella se sella y calienta a $80^{\circ}C$, después de lo cual se toma una alícuota y analiza por CGL utilizando un detector fotométrico de llama selectivo para azufre. Los porcentajes de recuperación obtenidos son de 81% para zineb, 87% para maneb, 78% para mancozeb y 93% para thiram, por lo cual el método se aplicó al análisis de muestras de tomate, fresa, lechuga y frambuesa. En 1987 McGhie y Holland (95), ratifican estos resultados.

4.3.3. Métodos de HPLC:

La cantidad de pesticidas carbamatos utilizados en la agricultura se incrementa, reemplazando a los pesticidas organoclorados, los cuales son más tóxicos. El trabajo reportado en 1980 por Krause (96), emplea cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para la determinación de metil carbamatos presentes en cultivos, se estudia el efecto de los diferentes sistemas de extracción y purificación en los porcentajes de recuperación, la extracción de los residuos se realiza con metano, acetonitrilo y éter de petróleo y una reextracción con cloruro de metileno, el extracto final se eluye a través de una columna empacada con carbón activado y celita utilizando tolueno-acetonitrilo (3:1) y metanol; para la determinación se inyecta al sistema de HPLC. Se utiliza una mezcla de acetonitrilo-agua como sistema de disolventes y una solución de reacción de NaOH, o-ftalaldehído en metanol-tetraborato de sodio y 2-mercaptoetanol para la formación de las especies fluorescentes, el detector trabaja a 340 y 445 nm. Entre los disolventes de extracción evaluados se encuentran: acetonitrilo, acetona y metanol; siendo este último el que proporciona mayor porcentaje de recuperación de los residuos de carbamatos (97.8%); para la fase de purificación se emplea la

extracción líquido-líquido, CPG, la precipitación con NH_4Cl y ácido fosfórico (89, 90) columnas empacadas con florisil, carbón activado-óxido de magnesio-celita (67), carbón activado-celita; se prefiere esta última por ser más sencilla y se obtienen los más altos porcentajes de recuperación. la técnica de HPLC utilizada tiene una buena resolución, es selectiva y sensible en la determinación de este grupo de pesticidas, se detectan 27 residuos de este grupo en cantidades de nanogramo. El método se reporta en el AOAC 15a. ed de 1990 (97) como oficial para la determinación de residuos de aldicarb, bufencarb, carbarilo, carbofurano, metomilo, metiocarb y oxamil en uvas y papas.

En 1983 Krause y August (98) estudian la posibilidad de aplicar el método desarrollado (96) al análisis multiresidual de pesticidas presentes en frutas y vegetales; para la etapa de detección se trabaja a 288 y 366 nm, estos valores dependen de los residuos a cuantificar, se determinan 22 residuos en un intervalo de recuperación de 93 a 115%; es un método selectivo para residuos de pesticidas con propiedades fluorescentes.

El método de Krause (96) involucra la extracción con cuatro disolventes y purificación con carbón activado; por lo cual Chaput en 1987, (27) considera que el método es muy largo y propone utilizar la CPG con elución a través de una columna de carbón activado-celita para la purificación de residuos de pesticidas carbamatos presentes en muestras con un alto contenido en pigmentos y posterior cuantificación por HPLC, la extracción inicial se realiza con metanol, una posterior partición en diclorometano, elución en columna de CPG y cuantificación por HPLC. Los porcentajes de recuperación son de 80-97 %; excepto para el sulfóxido de aldicarb, el cual es muy soluble en agua, el límite de detección varía de 5 a 10 ppm dependiendo del compuesto; el método se aplica al análisis de 300 muestras distintas de manzanas, papas, brocoli y col.

En 1989 Bicchi y colaboradores (102) presentan un método para el análisis de residuos de tiofanato de metilo, tiabendazol (TBZ) y carbendazim (CBZ) en manzanas y peras. La muestra se macera con HCl-metanol (4:1) a pH de 7.5 y se eluye a través de extralut 20 con diclorometano y se analiza por HPLC, se utiliza detección UV a

285 nm y fluorometría, como fase móvil se utiliza hexano-isopropanol (85:15), bajo estas condiciones las cantidades mínimas detectadas son 100 ng/ml para CBZ, 140 ng/ml TBZ y 500 ng/ml para tiofanato de metilo con porcentajes de recuperación de 83.8, 82.9 y 68.8% respectivamente; es un método que no se aplica satisfactoriamente al análisis de tiofanato de metilo dado los bajos porcentajes de recuperación obtenidos.

4.3.4. Métodos espectrofotométricos:

El análisis de los residuos de pesticidas del grupo de los carbamatos generalmente se realiza por espectrofotometría visible, esta técnica requiere de varios días para la obtención de resultados, además de etapas muy largas para la purificación del extracto.

Los residuos de pesticidas ditiocarbamatos se cuantifican por tratamiento de la muestra con un ácido caliente, el CS_2 formado se remueve por una corriente de nitrógeno haciendolo reaccionar con una solución de acetato de cobre y una amina para formar el correspondiente dietil ditiocarbamato cúprico, el cual se cuantifica midiendo la absorbancia de la solución resultante. En una modificación a este principio general Keppel (83) en 1971 utiliza HCl y $SnCl_2$ en la etapa inicial, además de una trampa de NaOH y benceno para eliminar el H_2S y otras interferencias presentes. El CS_2 producido se hace reaccionar con acetato de cobre y se mide la absorbancia a 435 nm, obteniendose porcentajes de recuperación de 75.4 a 101% para zineb, terbam y maneb en diferentes cultivos.

El pesticida carbarilo es un insecticida de contacto con buenas propiedades en el control de plagas en los países tropicales, por lo cual es importante su determinación; en 1974 Rangaswamy y Majumder (84) en la India reportan el análisis de estos residuos, se extraen con metanol para la posterior reacción con o-toluidina-HCl, nitrito de sodio y KOH para la formación del compuesto colorido, la absorbancia se mide a 520 nm; con recuperación del 80 al 90%; el método se considera aceptable para la determinación de concentraciones de 0.1 $\mu g/ml$ en muestras de

granos y cacahuates tratados con carbarilo.

El carbofurano es uno de los pesticidas organofosforados menos tóxico que se emplea en la India; por lo que Rangaswamy (87) desarrolla en 1976 un método para su determinación en jitomate, tomate y otros cultivos, los residuos se extraen con cloroformo para posterior partición con hexano, el color se desarrolla utilizando anilina y NaNO_2 , la absorbancia se mide a 460 nm con recuperación del 90 al 100%, siendo sensible a concentraciones de 0.025 ppm y no involucra la etapa de purificación, por lo tanto es un método rápido y adecuado para el análisis de residuos de este pesticida.

Sastry y colaboradores en 1987 (94) reportan la determinación de carbarilo y propoxur en muestras de granos, los cuales se maceran y extraen con cloroformo; las muestras se analizan con los tres procedimientos siguientes; 1) la muestra se trata con NaOH 1 M y solución de p-aminofenol al 0.09%, se mide la absorbancia a 600 nm durante los 15 min siguientes; mediante este procedimiento se cuantifica propoxur y carbarilo de manera global. 2) La muestra se trata con NaOH 0.05 M, solución de hidrocioruro de p-dimetilfenilamina (DMFA) al 0.1% y solución de m-periodato de sodio 0.001 M, los compuestos coloridos se extraen con butanol y se mide la absorbancia a 600 nm para la determinación global de carbarilo y propoxur. 3) A la muestra se agrega NaOH 0.25 M y solución de ácido 1-amino-2-naftol-4-sulfónico (ANS) al 0.1% y la absorbancia se mide a 700 nm; este último procedimiento es exclusivo para la cuantificación de carbarilo, los porcentajes de recuperación obtenidos son de 95 a 96 % para muestras de granos; el método es rápido, simple, sensible, económico y no requiere de una etapa de purificación.

La tabla 10 resume la metodología utilizada, por cada uno de los autores, en el análisis de residuos de pesticidas carbamatos en alimentos. Al final del capítulo se muestra la tabla 14 que resume las condiciones generales empleadas en el análisis cromatográfico de estos residuos.

TABLA 10
RESUMEN DE LA METODOLOGIA EMPLEADA PARA EL ANALISIS
DE RESIDUOS DE PESTICIDAS CARBAMATOS.

EXTRACCION	REFERENCIA
Disolventes:	
Acetonitrilo	85, 89, 90,
Metanol	48, 79, 86, 96, 98, 101
Acetato de etilo	88
Cloroformo	87, 94
Diclorometano	60
PURIFICACION	
Extracción líquido-líquido	
Disolventes : Hexano	88, 87
Eter de petróleo	85, 89, 90, 96
Diclorometano	80, 88, 89, 90, 85, 101
Cloroformo	79, 86
Acetonitrilo	96
Cromatografía en columna	
Adsorbente: Alúmina	88
Carbón activado-celita	89, 90, 85, 96
Extrelut 20	102
Florisil	96
Otros: Precipitación con:	
NH ₄ Cl-H ₃ PO ₄	96, 98, 89
DETERMINACION	
CCF	60, 79
CGL	
Detector: Captura de electrones	80, 88, 90, 89
Fotométrico de llama	83, 91
Termiónico	85, 89, 90
Espectrometría de masas	88
HPLC	96, 98, 101, 102
ESPECTROFOTOMETRIA UV:	83, 84, 87, 94

4.4 METODOS MULTIRESIDUALES

Los análisis de residuos de pesticidas que se realizan en productos agrícolas, presentan frecuentemente, el problema de que se desconoce el tipo de compuestos químicos utilizados como pesticidas, así como las concentraciones a las cuales fueron aplicados; en este caso, las muestras deberán de analizarse para todos los residuos posibles. Otro factor que complica el problema es la dinámica existente en el uso de pesticidas, o sea el hecho de algunos productos tienen la tendencia a ser reemplazados por otros con mayor potencia y/o menor toxicidad, de manera que varía el tipo de compuestos a determinar. La posibilidad de realizar análisis individuales para cada residuo, no es práctica, ni posible, por la gran cantidad de pesticidas probables para cada muestra, por lo que se han desarrollado métodos multiresiduales.

Un método multiresidual es un procedimiento que detecta varios residuos de pesticidas a la vez, en un análisis simple y rápido para los pesticidas más significativos o comunes usados hoy en día, debe proporcionar la identificación y cuantificación confiable de un gran número de compuestos a muy bajas concentraciones. El análisis se inicia, como ya se ha observado, con la extracción, seguido de una serie de procedimientos de purificación para reducir o minimizar los coextractantes presentes en la muestra.

De los métodos multiresiduales desarrollados se pueden mencionar los procedimientos descritos en el AOAC de 1984, (17) en la sección 29 y en el Manual de Análisis de Pesticidas (PAM) de la FDA, que ofrecen porcentajes de recuperación de hasta el 80% o más para 80 compuestos químicos analizados (30).

En el método del AOAC (17, 97), específico para pesticidas organofosforados y organoclorados, la extracción se realiza de acuerdo al contenido de grasa y humedad de la muestra, el acetonitrilo es para muestras con un alto contenido de agua (más del 75%), la mezcla de acetonitrilo-agua para muestras con menos del 75% en agua y un alto contenido de azúcares, para muestras que contienen grasa, se extrae con éter de petróleo seguido de partición con acetonitrilo. Para todas las muestras se continúa

con una etapa de extracción con éter de petróleo, seguido de la purificación a través de una columna empacada con florisil, usando una mezcla de éter de petróleo y éter etílico como eluyente. Después de esto la determinación se realiza por alguno de los métodos cromatográficos, CCF o CGL.

En la determinación por CCF se utiliza óxido de aluminio como soporte, en el caso de compuestos organoclorados se utiliza acetona al 2% en heptano como eluyente y una mezcla de nitrato de plata, 2-fenoxietanol y peróxido de hidrógeno como agente de revelado; mientras para los compuestos organofosforados se emplea el éster de la dimetilformamida en éter y metil ciclohexano como eluyente y tetrabromo fenolftaleína, nitrato de plata y ácido cítrico en solución como sistema revelador. Para la cromatografía de gases se emplea el detector de captura de electrones. Este método permite detectar y cuantificar más de 200 compuestos químicos empleados como pesticidas.

Es importante hacer notar que en este procedimiento los pesticidas que son solubles o parcialmente solubles en agua se pierden por dilución del extracto de acetonitrilo-agua, es por esto que el método está limitado a compuestos relativamente no polares (17).

En 1975, Luke y colaboradores (30) proponen un método multiresidual para la determinación de residuos de pesticidas en vegetales y frutas frescas, el cual pretende minimizar o eliminar las etapas de purificación, común a los métodos multiresiduales que usan la cromatografía de gases para la etapa de determinación. Las ventajas de este método es el decremento del tiempo de trabajo y un incremento de la eficiencia y del porcentaje de recuperación para toda clase de pesticidas orgánicos presentes.

En relación a los métodos multiresiduales que se proponen hasta antes de 1975, el método de Luke (30), introduce dos modificaciones; la primera es el uso de acetona en lugar de acetonitrilo, como disolvente de extracción; la acetona tiene un punto de ebullición menor y por tanto es más fácil de concentrar y remover. La segunda modificación consiste en la eliminación de la etapa de purificación para la determinación de residuos organofosforados y organonitrogenados, dado que el uso de la columna de

florisil resulta invariablemente en la pérdida de algunos de estos residuos. Para minimizar la pérdida de residuos la técnica analítica propone que la columna de florisil se utilice después de que el extracto de la muestra se ha analizado para residuos que contienen nitrógeno y fósforo. El método se aplica a compuestos polares y no polares, con excepción de compuestos con una carga iónica permanente y compuestos que son difíciles de analizar por cromatografía gas-líquido.

La detección para la CGL se realiza utilizando el detector termiónico, para compuestos organofosforados y nitrogenados, para compuestos organoclorados se emplea un detector de captura de electrones. Siguiendo este método se analizan 15 residuos organofosforados, 9 organoclorados, 2 organonitrogenados y 2 hidrocarburos; con un intervalo de recuperación del 83 al 113%.

En una modificación al método propuesto en 1975 se sustituye el detector de captura de electrones por un detector Hall de electroconductividad selectivo para halógenos (HECD-X). Para los compuestos organofosforados se reemplaza el detector termiónico por un fotométrico de llama selectivo para fósforo, (31), el uso de este detector elimina la etapa de purificación necesaria cuando se emplean detectores no selectivos, de esta manera los resultados del análisis por CGL dependen solamente de la extracción y de las condiciones cromatográficas.

Con este método se logra recuperar 79 de 82 residuos de pesticidas; 3 triazinas, 2 metil carbamatos, 1 organosulfurado, 11 organonitrogenados, 16 organoclorados, 1 organobromado y 44 organofosforados, de los cuales 3 son solubles en agua. El intervalo de recuperación es de 48 a 118% para etilentiourea y metil carbobenotión respectivamente. Este método simplifica la interpretación de los cromatogramas, minimiza el tiempo de análisis e incrementa el tiempo de vida de la columna y el detector.

En un método multiresidual aplicado al análisis de frutas, desarrollado por Holland y Mc Guie, (43), la extracción se realiza con metanol y una etapa de purificación que consiste en la partición en tolueno y elución a través de una columna de florisil-carbón activado-celulosa, para la posterior determinación

en una columna cromatográfica OV-225 con detección de captura de electrones y de ionización de llama. Los compuestos diclorvos, dimetoato y acefato se determinan directamente en el extracto de metanol empleando el detector de ionización de llama; los porcentajes de recuperación en general son de 80 a 85%, con excepción de los tres pesticidas mencionados anteriormente en los cuales los porcentajes de recuperación son menores al 24%. Por este método se analizaron 4 residuos de pesticidas organoclorados, 2 metil carbamatos y 10 fungicidas. El método es rápido y económico.

En un estudio colaborativo para comprobar la eficiencia del método de Luke (31); realizado por Sawyer y colaboradores en 1985 (32), se compara el porcentaje de recuperación y reproducibilidad del método en el análisis de muestras fortificadas y no fortificadas de lechuga, tomate y fresas para compuestos organoclorados y organofosforados; los pesticidas a determinar fueron clorpirifos, a-hexacloro benceno (HCB), acefato, ometoato, monocrotofos y dieldrin.

Los pesticidas organoclorados se analizan en una columna de metil silicona con el detector Hall de electroconductividad, los compuestos organofosforados se determinan en una columna cromatográfica de succinato de dietilén glicol (DEGS). Los porcentajes de recuperación varían de 98 a 118%, para los 10 laboratorios participantes en el estudio. Se obtienen resultados satisfactorios para proponer el método como oficial para el análisis de residuos de pesticidas en frutas y vegetales.

En 1986 se publicó el complemento de los métodos AOAC (18), sección 29, donde se realizan los cambios al método oficial, el método queda restringido a alimentos con un contenido de 2% de grasa como máximo, la ausencia de la etapa de purificación permite detectar residuos de varios grupos, incluyendo algunos que no se recuperan por métodos que incluyen la columna de florisil en su etapa de purificación (33).

Alternativamente algunos autores han seguido utilizando el método multiresidual del AOAC de la 14a. edición (17); incluyendo los pasos de purificación en la columna de florisil y la detección con el detector de captura de electrones; Yurawecz y Puma (36) en

1986 aplican el método al análisis de 143 compuestos organoclorados y organofosforados. Los extractos de las muestras se purifican y determinan satisfactoriamente reduciendo la temperatura de la columna de 200 a 130°C, es un método que no se aplica a compuestos muy volátiles, por la etapa de remoción del disolvente. Los porcentajes de recuperación son cercanos al 80% de acuerdo con el método AOAC.

Para la extracción de 243 residuos de pesticidas en una variedad de alimentos importados a Estados Unidos en el período de 1982 a 1986 se aplicó el método de Luke (34), las muestras fueron seleccionadas de acuerdo a lo que se sabía de ellas, es decir posibles problemas de plagas de los países de origen. Se utilizan varios sistemas para su determinación por CGL y en algunos casos se hizo necesaria la confirmación de los residuos por espectrometría de masas. De las 19851 muestras analizadas el 24.5% de ellas contenían algún derivado de endosulfan.

El método de extracción de Luke (31), ha tenido aceptación por la gran cantidad de residuos que se determinan (103). Stan en 1989 (9), aplica este método de extracción a un procedimiento de cromatografía de gases acoplado a un sistema de detección de espectrometría de masas, lo cual permite la detección de contaminantes a niveles de trazas en intervalos inferiores a ppb, en presencia de una gran cantidad de compuestos extraídos de la matriz que no dan respuesta con este tipo de detectores; el método incluye una etapa de purificación a través de una columna de filtración en gel; el residuo se concentra y se hace pasar a través de una columna de sílica gel, de la cual se obtienen 6 fracciones que se eluyen con mezcla de tolueno-hexano. Las fracciones 1 y 2 contienen los pesticidas organoclorados para su análisis por CGL y detección selectiva de espectrometría de masas. El método se aplica al análisis de 76 residuos.

Mattern y colaboradores en 1990 (35) aplican un método multiresidual para analizar 12 pesticidas y dos de sus metabolitos presentes en un lote de 100 muestras de papas, manzanas, peras y tomates. La determinación se realizó por CGL en una columna capilar y la detección por el sistema acoplado a espectrometría de masas. La recuperación es de 73 al 120%, las ventajas del método

son: 1) sustitución de la inyección en frío por una inyección en caliente, lo cual permite el análisis de compuestos polares y termolábiles. 2) El uso del detector selectivo de masas y 3) una sola etapa de cuantificación, sustituyendo las 3 diferentes determinaciones, una para organoclorados, otra más para organofosforados y otra más por HPLC para compuestos de difícil análisis por CGL.

Siguiendo con este estudio Chao-Hung Liu y colaboradores (37) reportan en 1991 la determinación de 20 pesticidas, los cuales se ha comprobado que tienen propiedades oncogénicas. Se describe el procedimiento basado en la extracción de Luke (34), determinación por CGL con un detector de espectrometría de masas selectivo para iones (35) y cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas. Una vez extraídos los pesticidas se eluyen a través de una columna de florisil, con éter de petróleo-dicloro metano-éter etílico (1:1:1), para la determinación se requieren 5 sistemas diferentes de CGL y dos análisis adicionales por HPLC. Con un intervalo de recuperación de 70 a 123 %; este método tiene la ventaja del uso de un solo detector, mientras otros métodos de CGL requieren para las mismas condiciones de 5 detectores distintos.

Se observa el avance obtenido en los diferentes sistemas de detección y la búsqueda de detectores cada vez más selectivos, sensibles y específicos. Así mismo se muestra el avance de los métodos cromatográficos para las determinaciones multiresiduales de pesticidas en frutas y vegetales.

La tabla 11 resume la metodología utilizada, por cada uno de los autores, en el análisis de multiresiduos de pesticidas en alimentos. Al final del capítulo se muestra la tabla 15 que resume las condiciones generales empleadas en el análisis de estos residuos.

TABLA 11
RESUMEN DE LA METODOLOGIA EMPLEADA PARA EL ANALISIS
MULTIRESIDUAL DE PESTICIDAS EN ALIMENTOS.

EXTRACCION	REFERENCIA
Disolventes:	
Acetonitrilo	17, 36
Acetona	30, 31, 32, 34, 9, 35, 37
Metanol	36
PURIFICACION	
Extracción líquido-líquido	
Disolventes :	
Eter de petróleo	17, 35
Cromatografía en columna	
Adsorbente: Florisil	17, 35, 36
Permeación en gel	9
Sin purificación	30, 31, 32, 34, 37
DETERMINACION	
CCF	17
CGL	
Detector: Captura de electrones	17, 30, 36,
Ionización de llama	30, 32, 33, 34, 36
Termiónico	30
Espectrometría de masas	9, 35, 37
HPLC	37

TABLA 12
CONDICIONES GENERALES PARA EL ANALISIS DE RESIDUOS DE PESTICIDAS ORGANOCLORADOS

APARATO	COLUMNA	EMPAQUE	DETECTOR	GASES (1)	TEMPERATURAS	REF
BARNEN COLUMN 500	1.8 m x 2 mm DI.	1) DC-200 AL 10% * 2) OU-17 AL 3% + OF1 AL 2%*	IONIZACION DE LLAMA	HELIO	ISOTERMICA DE 125 A 180 C.	41
	1.8 m x 4 4 mm DI	1) DC-200 AL 10% * 2) OF1 AL 15% + 10% DC-200 10% *	CAPTURA DE ELECTRONES	N ₂ = 120	DETECTOR: 200 C COLUMNA: 1200 C	40 38
CARLO EREM FRAC TOU. 4300	CAPILAR 20 m x 0.3 mm DI.	OU-1 *	CAPTURA DE ELECTRONES	He = 3-5 AIRE-META- NO AL 5% = 23	INYECTOR: 240 °C COLUMNA: 200 °C DETECTOR: 250 °C	49
TRACOR	1.8 m x 4 mm DI	SP-2401 AL 15% **	CAPTURA DE ELECTRONES	N ₂ = 80	INYECTOR: 170 °C COLUMNA: 220 °C DETECTOR: 280 °C	54
	2.6 m x 4 mm DI	OU-101 AL 20% *	CAPTURA DE ELECTRONES	METANO- ARGON AL 5% = 80-110	INYECTOR: 150 °C COLUMNA: 90 °C DETECTOR: 250 °C	14 21
	1) 7.5m x 4 mm DI 2) 3.6m x 4 mm DI 3) 1.8m x 4 mm DI	SP-100 AL 10% OU-225 AL 20% + OU-17 AL 20% OU-101 AL 5% TODAS EN **	CAPTURA DE ELECTRONES HECD-C1 (2)	METANO-AR- GON AL 5% = 50-75 He = 80-110 N ₂ = 60	PROGRAMADA Ti=120°C, Tf=350°C RAMP= 50°C/min, TIEMPO INIC.= 15 TIEMPO FINAL= 15	55
PACKARD 438	2m x 2 mm DI	SE-30 AL 10% +	CAPTURA DE ELECTRONES	N ₂ = 30	TEMPERATURAS: COLUMNA: 200°C	56

SOPORTES: * CHROMOSORB
** SUPELCOPORT

FLUJO DE GASES (ml/min)
DI: DIAMETRO INTERNO DE LAS COLUMNAS
HECD-C1: DETECTOR DE ELECTROCONDUCTIVIDAD HALL
SELECTIVO DE CLORO

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

TABLA 13
CONDICIONES GENERALES PARA EL ANALISIS DE RESIDUOS DE PESTICIDAS ORGANOFOSFORADOS.

APARATO	COLUMNA	EMPAQUE	DETECTOR	GASES	TEMPERATURAS	REF
	6' x 4 mm DI	1) DEOS AL 2% * 2) DC-200 AL 6% **	NPD-KC1		DE COLUMNA DE 220 A 260 C	67 62
MICRO TEK MOD. 160.	6' x 4 mm DI	DEOS AL 1%	FOTOMETRICO DE LLAMA	N ₂ = 40 H ₂ = 100 O ₂ = 30 AIRE = 40	T _c = 175, T _d = 200, T _i = 200	63 64
HEWLETT- PACKARD MOD 5710	4' x 2 mm DI	SE-30 AL 3% ULTRAFASE	NPD CFU-EM	H ₂ *	T _c = 190, T _d = 200, T _i = 200	64
MOD 48H- PF	1) 1.50 cm X 3 mm DI 2. 3, 4.) 3.00 cm X 3 mm DI.	1) DC-200 AL 10% + QF1 AL 15% 2) DEOS AL 10% + H ₃ PO ₄ AL 0.5% 3) 4) DC-200 AL 10% + OU- 17 AL 15% *** 5) DC-200 AL 2.5 % + EPON 0.25 % RESINA 100%	IONIZACION DE LLAMA		1.- T _c : 180, T _i : 250 2.- T _c : 180 3., 4., 5): T _c : 190 EN TODOS LOS CASOS T _d = T _i = 350	65
VARIAN AEROGRA- PH. 2700	300 cm X 22 mm DI.		TERMOIONICO	N ₂ = 40 H ₂ = 50 AIRE = 120	T _c = 200 T _i = 225 Y 260 T _d = 235	66
PERKIN- ELMER F-17	1.00 m X 3 mm DI	1) DC-200 AL 2% + QF1 AL 3% 2) OU-17 AL 1.5% + QF1 AL 1.95% 3) DC-200 4) CARBONAX 30M AL 5% ***	TERMOIONICO	N ₂ = 40 H ₂ = 8 AIRE = 135	T _d = 250 T _c = 200 A 260, T _i = 250.	66

SOPORTES: * CHROMOSORB
 ** TUPELCOPORT
 *** GAS CHROMQ

FLUJO DE GASES: ml/min
 TEMPERATURA: GRADOS CENTIGRADOS
 DI: DIAMETRO INTERNO DE LA COLUMNA.

CONTINUA LA TABLA 13

CONDICIONES GENERALES PARA EL ANALISIS DE RESIDUOS DE PESTICIDAS ORGANOFOSFORADOS.

APARATO	COLUMNA	EMPAQUE	DETECTOR	GASES	TEMPERATURAS	REF
	1.8m X 4 mm DI	1) DEGS AL 1% 2) DC-200 AL 6% ***	TERMOIONICO		1) Tc= 165 °C 2) Tc= 220 a 260	67
	1.8m X 4 mm DI	1) OU-101 AL 10% 2) OU-101 AL 10% + OU-210 AL 15 % (1 +1) *	FOTOMETRICO DE LLAMA	N ₂ = 120 H ₂ = 100 AIRE= 80	Tc= 200 °C Ti= 215 °C Td= 200 °C	68
	1.8m X 2 mm DI	3) DEGS =	TERMOIONICO	N ₂ = 120 H ₂ = 30 AIRE= 300		
MOD 7A- PFF	2m X 3mm DI	DC-200 AL 10% *	FOTOMETRICO DE LLAMA	N ₂ = 50 H ₂ = 60 AIRE= 50	Td= 230 °C Tc= 210, °C Ti= 230 °C	29
TRACOR MOD 560	2m X 4mm DI	DEGS AL 2% *	CAPTURA DE ELECTRONES	METANO 10% EN ARGON 70 ml/min	Tc = 200 °C Td = 250 °C Ti = 215 °C	12
			TERMOIONICO			
UARIAN UISTA	2m X 2mm DI	ULTRABOND 20 SE **	FOTOMETRICO DE LLAMA	N ₂ = 65	Td = 300 °C Tc = 175, °C Ti= 200 °C	12
	2m X 4mm DI	OU-17 AL 10% ***	FOTOMETRICO DE LLAMA			71

SOPORTES : * CHROMOSORB
** SUPELCOPORT
*** GAS CHROMO

DI: DIAMETRO INTERNO DE LAS COLUMNAS
FLUJO DE GASES EN ml/min

TABLA 14
CONDICIONES GENERALES PARA EL ANALISIS DE RESIDUOS DE PESTICIDAS CARBAMATOS

A PARATO	COLUMNA	EMPAQUE	DETECTOR	GASES	TEMPERATURAS	REF
BABER COLMAN 500	174 cm X 2 mm DI	CARBOWAX 20 M #	IONIZACION DE LLAMA	NITROGENO HIDROGENO AIRE	Td= 250 °C Tc= VARIABLE, Ti= 210 °C	85
HEWLETT PACKARD 5700H	160 cm X 3 mm DI	OU-210 AL 10% + OU-17 AL 10% #	CAPTURA DE ELECTRONES	ARGON- METANO AL 5% = 60	Ti= 250 °C To = 210 °C Td = 300. °C	80
MICROT HI 220	1.3m X 6 mm DI	OU-1 AL 3% #	DE ELECTRO- CONDUCTIUI- DAD.	H ₂ = 60 H ₁ = 30	To= 155 H 227 °C Td= 210 °C Ti= 235 °C	80
HEWLETT PACKARD D 5992A	1) 1.6 m X 3 mm DI 2) 1.8 m X 3 mm DI	1) OU-1 AL 3% # 2) OU-17 AL 3%#	CAPTURA DE ELECTRONES	ARGON- METANO AL 5% = 60	To= 240. °C Ti= 250 °C Td= 350 °C PARA LAS DOS	88
PACKARD 802	1.8m X 4mm DI	DC-200 AL 10% EN ANAKROM ABS	CAPTURA DE ELECTRONES		To= 212°C Td= 218°C Ti= 200°C	89
PACKARD 802	1.8m X 4 mm DI	DC-200 AL 10% 2m x 3mm DI	CAPTURA DE ELECTRONES FOTOMETRICO DE LLAMA		To= 232°C Td= 250°C Ti= 200°C To= 600°C Td= 1000°C Ti= 100°C	90 91
HPLC	25 cm X 4.6 mm DI	ZORBAX C-8	FLUORESC- CENTE	SOLUCION DE REACC. A 1.5 ml/ min	Tc= 35°C T CAMARA DE HIDRO- LISIS: 100°C	9 9 98 99 100
SPECTRO PHYSICS SP-8700	25cm X 4 mm DI	APEX ODS 5µm	FLUORESC- CENTE	1.0ml/min	To= AMBIENTE	101
PERRIN- ELMER 501 L53	15 cm x 4.6 mm DI	LI CHROMOSORB DIOL	ESPECTRO- FLUORIME- TRICO			101

SOPORTES: #CHROMOSORB
#SUPELCOFORT
##GAS CHROMOC

DI: DIAMETRO INTERNO DE LAS COLUMNAS
FLUJO DE GASES: ml/min

TABLA 15
CONDICIONES GENERALES PARA EL ANALISIS DE MULTIRESIDUOS.

APARATO	COLUMNAS	EMPAQUE	DETECTOR	GASES	TEMPERATURAS	REF
	1.85m x 4 mm DI	DC-200 EN * *** ****	CAPTURA DE ELECTRONES Y NPD	H ₂ = 30 N ₂ = 120 AIRE=300	Tc= 200 °C Ti= 225°C EN TODOS LOS CASOS	17
SEARLE 4740	1.8m x 4mm DI	A Y B) DEGS AL 2% C) OU-101 AL 2% D) OU-101 AL 10% E) OU-101/OU-210 10/15 TODAS EN *	CAPTURA DE ELECTRONES, TERMOIONICO, IONIZACION DE LLAMA	A, B) N ₂ = 60 C, D, E) N ₂ = 120	A, B, C, D) To= 200 °C B) To= 165 °C	30
SEARLE 4740	A, B, D) : 1.2m X 2 mm DI C) 3m X 2 mm DI E) 7.6m X 2 mm DI	A) DEGS AL 2% * B, C) DEGS AL 2% Y H ₂ PO ₄ AL 0.5% * D) OU-101 AL 2% E) SF30 AL 2% + OU-210 AL 0.5%	TERMOIONICO, HALL DE ELECTROCON- DUCTIVIDAD	H ₂ = 60	A, B) To= 180 °C C) To= 120 °C D, E) To= 200 °C	31
	1) 1.8m x 2 mm DI 2) 1.2m x 2 mm DI	1) OU-101 AL 2% ** 2) DEGS AL 2% *	HALL DE ELECTROCON- DUCTIVIDAD IONIZACION DE LLAMA	H ₂ = 60 H ₂ = 60- 100	1) TC= 200, °C Td= 900 °C 2) To= 180 °C Td= 200 °C	32 33 34
HP 5890	25m X 0.2 mm DI	PELICULA DE METIL SILICONA 0.33mm	ESPECTROME- TRO DE MASAS MSD HP5970	HELIO	PROGRAMADA Ti= 250, Td=260 1 MIN A 100, RAMP 30 C/MIN 150 C, 2 MIN. RAMP 3 C/MIN A 205, 10 C/MIN A 260, POR 10 MINUTOS.	9

SOPORTES: * CHROMOSORB
**SUPELCOPORT
*** GAS CHROMQ
****MANAKRON

DI: DIAMETRO INTERNO DE LAS COLUMNAS
FLUJO DE GASES EN ml/min

CONTINUA LA TABLA 15
CONDICIONES GENERALES DEL ANALISIS DE MULTIRESIDUOS

APARATO	COLUMNAS	EMPAQUE	DETECTOR	GASES	TEMPERATURAS	REF
UNIKIAN 3400	2m X 0.5mm 30m X 0.25 mm DI	PELICULA DE METIL SILICONA 1 µm	ESPECTROMETRO DE MASAS	N ₂ = 25	PROGRAMADA: T INICIAL= 50 RAMP: 50 C/MIN PARA 300 POR 15 MIN	35
HENLETT- PACKARD 5730A	1.8m X 4 mm DI	1) OU-101 AL 10% 2) OU-101 AL 10% + OU-210 AL 15% (1+1) 3) OU-101 AL 5% 4) OU-101 AL 5% + OU-210 AL 7.5% (1+1) *	HALL DE ELECTROCON- DUCTIDAD CAPTURA DE ELECTRONES	N ₂ = 120 ARGON- METANO (95+5)= 50	1, 2) T _c = 130°C T _d = 210°C T _i = 150°C 3, 4) T _c = 130°C T _d = 300°C T _i = 250°C	36
UNIRIAN 3400	1) 2m X 0.56mm DI 2) 30 m X 0.25mm DI 3) 15m X 0.25mm DI	PELICULA DE METIL SILICONA DE 1 µm	ESPECTROMETRO DE MASAS	He = 25	PROGRAMADA NO SE INDICAN LAS CONDICIO- NES.	37
CROMATO- GRAFO DE HPLC MINIATOS 400	22 cm X 4.6 mm DI	FASE REVERSA C ₁₈ PARTICULA DE 5 µm	ESPECTROMETRO DE MASAS		FASE MOVIL: ACETONITRILLO AL 20% + 65% AGUA + 15% ACETATO DE AMONIO 0.013M	37

SOPORTES: **CHROMOSORB DE 60 A 100 MALLAS
***GAS-CHROM Q
****BANANKROM ABS

FLUJO DE GASES: ml/min
DI: DIAMETRO INTERNO DE LAS
COLUMNAS.

5. DISCUSSION

El desarrollo de métodos analíticos para la determinación de residuos de pesticidas requiere de una infraestructura compleja y costosa, por el equipo instrumental que se necesita, los reactivos de alta pureza (grado pesticida), el entrenamiento constante del personal asignado a la investigación y el acondicionamiento de un laboratorio especial para evitar la contaminación de las muestras por factores externos; todo esto con el fin de obtener resultados satisfactorios y reproducibles. Estas investigaciones tienen como objetivo principal proponer nuevas técnicas de análisis o bien mejorar las ya existentes, siendo los países altamente tecnificados los que desarrollan este tipo de métodos analíticos.

El paso inicial del análisis de residuos de pesticidas en alimentos es la extracción de los mismos de la matriz del producto empleando disolventes, sin embargo dada la gran cantidad de pesticidas en uso y sus diferentes propiedades químicas, es posible que no se recupere el 100% de los residuos presentes, lo que implica que se debe de tener cuidado en este paso, los disolventes extractantes más empleados son la acetona y el acetonitrilo, para residuos de carbamatos el metanol es ampliamente utilizado; dependiendo de las características de la muestra (contenido de grasas, de azúcares y de agua) y la polaridad de los productos a extraer; el acetonitrilo recupera residuos de pesticidas parcialmente polares y no polares, mientras la extracción con acetona se indica para residuos polares; esta última evita la formación de emulsiones provocadas por la presencia de pectinas de frutas y vegetales o de almidón presente en granos, además de ser más fácil de eliminar y minimiza las interferencias en la determinación cuantitativa.

Los procesos de purificación del extracto inicial, desarrollados para eliminar coextractos presentes (pigmentos, grasas y azúcares entre otros), implican pasos de extracción y concentración. De los más comunes es la extracción líquido-líquido los disolventes que se han empleado en esta etapa son principalmente el hexano, acetato de etilo, cloruro de metileno y éter de petróleo, en este caso se presenta el problema de que se deben realizar varias extracciones consecutivas para obtener resultados satisfactorios, lo que puede ocasionar la pérdida de

productos; por lo que se utilizan técnicas auxiliares como la cromatografía de adsorción en columna, entre los adsorbentes más empleados se encuentran: el florisil, la alúmina, la sílica gel, y el carbón activado utilizado principalmente para eliminar pigmentos de extractos vegetales, esta técnica presenta el inconveniente de una posible adsorción irreversible de los compuestos de manera que en algunos casos no se recuperan los pesticidas polares. Para las muestras con alto contenido de grasa los procesos mencionados son de poca utilidad, por lo que se han propuesto nuevas técnicas para la extracción de pesticidas lipo-solubles, como es el caso de la destilación con flujo de nitrógeno y la cromatografía de permeación en gel.

Respecto a la determinación (identificación y cuantificación) las técnicas dependen de la estabilidad de los compuestos y de sus propiedades químicas; la CCF se emplea para análisis cualitativo y semicuantitativo; la CGL en la actualidad es la técnica más utilizada en este tipo de análisis; la detección de residuos de pesticidas organoclorados se realiza, generalmente, con el detector de captura de electrones, pero debido a las interferencias que producen algunos compuestos con grupos nitro dentro de su estructura, su selectividad y sensibilidad se ve disminuida, por lo que se puede emplear el detector Hall de electroconductividad. para la determinación de residuos de pesticidas organofosforados se puede elegir entre el detector fotométrico de llama y el termiónico (NP) en su modo selectivo para fósforo; el detector de ionización de llama tiene poco campo de aplicación en el análisis de residuos de pesticidas. La espectrometría de masas es el sistema de detección más selectivo, sensible y costoso que se emplea para el análisis de residuos de todos los grupos químicos. La resolución de los residuos depende en gran parte de la sensibilidad y selectividad del detector y de las columnas utilizadas.

El análisis por HPLC se emplea para pesticidas que no pueden determinarse directamente por CGL, ya sea por que son termolábiles o no ser lo suficientemente volátiles, aunque los detectores usados para HPLC son menos selectivos y sensibles los resultados que se obtienen son buenos. Por otra parte la espectrofotometría

se recomienda para analizar compuestos termolábiles, no volátiles y capaces de formar algún tipo de derivado colorido, para su análisis en la región UV o visible del espectro; esta técnica se utiliza ampliamente en el análisis de residuos de pesticidas carbamatos con resultados aceptables.

6. CONCLUSIONES

- 1.-El análisis de residuos de pesticidas en alimentos requiere el uso de métodos analíticos sensibles y selectivos aplicables a la detección de bajas concentraciones de productos (ppm o ppb).
- 2.-La gran cantidad de literatura existente respecto a los métodos analíticos de determinación de residuos de pesticidas, muestra la preocupación por encontrar cada vez mejores técnicas para el control de residuos potencialmente tóxicos en productos de consumo humano.
- 3.-De las etapas que comprende el análisis de residuos, la extracción y purificación son pasos fundamentales para obtener el extracto con el menor porcentaje de pérdida; respecto a la identificación y cuantificación, ésta se realiza eficientemente por técnicas como: CGL con diferentes tipos de detectores (captura de electrones, termiónico, de ionización de llama, Hall de electroconductividad y recientemente con CGL acoplada a espectrometría de masas); HPLC y la espectrofotometría.
- 4.-Los métodos multiresiduales dan la posibilidad de analizar un gran número de compuestos en un solo proceso, tratando de minimizar las etapas de purificación; la tendencia es al uso de un análisis cuantitativo completamente automatizado capaz de determinar muy bajas concentraciones, pero, aun en estas condiciones no se logra la obtención de resultados 100% satisfactorios.
- 5.-El trabajo realizado cumple con los objetivos planteados, al presentar la información actualizada del tema, que puede servir de referencia para trabajos posteriores.

7. BIBLIOGRAFIA

- 1.-VETTORAZZI, G. *International regulatory aspects for pesticides chemical*. CRC. Press, New York, 1979.
- 2.-TEDDER, J. M. et al. *Química orgánica Vol. V*, URMO, 1979, p. 390-452.
- 3.-HAWLEY, Gensner G. *Diccionario de química y productos químicos*. Omega, Barcelona, España, 1988.
- 4.-GUNTHER, F. A. y L. B. Jeppson. *Insecticidas modernos y la producción mundial de alimentos*. CECOSA, México, D.F. 1969, p. 3-50
- 5.-ROJAS Garcidueñas, Manuel. *Manual teórico práctico de herbicidas y fitoreguladores*. Limusa, 2a ed. México, D.F. 1984, p. 75-125.
- 6.-HEFTMAN, Erich. (editor). *Chromatography*. Vol 2 Van Nostrand Reinhold Company, 3a ed. New York, 1975, p. 1-220.
- 7.-BATISTA, Massimo, et al. ..Extraction and isolation of triazine herbicides from water and vegetables by a double trap tandem system... *Anal. Chem.* , 61, 935-939, 1989.
- 8.-LUCHEFELD, R. G. ..Multiresidue method for determining substituted urea herbicides in food... *J.Assoc. Off. Anal. Chem.*, 70(4), 740-745, 1987.
- 9.-STAN, Hans-Jurgen. ..Application of capillary gas chromatography with mass selective detection to pesticide residue analysis... *J. Chromatography*, 467, 85-98, 1989.
- 10.-ROOS, A. H.; et al. .. Universal extraction/clean-up procedure for screening of pesticides by extraction with ethyl acetate and size exclusion chromatography... *Analytica chimica Acta.*, 196, 95-102, 1987.
- 11.-FORBES, S. Some newer approaches to analyte isolation in pesticide residue analysis... *Analytica Chimica Acta.*, 196, 75-83 1987.
- 12.-BLAHA, J. J. and P. J. Jackson. ..Multiresidue method for quantitative determination of organophosphorus pesticides in foods... *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* , 68(6), 1095-1099, 1985.
- 13.-DAFT, J. ..Determining multifumigants in whole grain and

- legumes, milled and low-fat grain products, spices, citrus fruit and beverages.. *J. Assoc. Off. Anal.Chem.*, 70(4), 734 - 739, 1987.
- 14.-DAFT, J. .. Determination of fumigants and related chemical in fatty and nonfatty foods.. *J. Agric. Food Chem.*, 37, 560-564, 1989.
- 15.-TSUKIOKA, T. and T. Marakami. ..Capillary gas chromatographic mass spectrometry ,determination of acid-herbicides in soils and sediments... *J. Chromatography.*, 469, 351-353, 1989.
- 16.-NELSON, S. D. and S.U. Khan. ..Novel approach to the extraction of herbicides and their metabolites from plant tissues... *Agric. Food. Chem.*, 37, 1302 - 1308, 1989.
- 17.-*Official methods of analysis.* , AOAC, 14a. ed., Virginia Estados Unidos. 1984, p. 533-562.
- 18.-..Changes in methods..., *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 68(2), 385-389, 1985.
- 19.-WALTERS, Stephen M. ..Cleanup techniques for pesticides in fatty foods.. *Analytical Chimica Acta*, 236, 77-82, 1990.
- 20.-KAPHALIA, Bhupendras S., et al. ..Organochlorine pesticide residues in different Indian cereals, pulses, spices, vegetables, fruit, milk, butter, deshi ghee and edible oils... *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 73(4), 509-512, 1990.
- 21.-DAFT, J. L. ..Rapid determination of fumigant and industrial chemical residues in food..., *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 71(40), 748-759, 1988.
- 22.- Communication. ..Gas chromatographic determination of metalaxyl in soils and sunflower.. *J. Agric. Food. Chem.*, 29, 1296-1298, 1984.
- 23.- LUKE, Barry G. and J. C. Richards. ..Recent advances in cleanup of fats by sweep co-distillation. Part 2. Organophosphorus residues... *J. Assoc. Off. Anal.Chem.*, 67(5), 902-904, 1984.
- 24.-HOPPER, H. L. ..Gel permeation system for removal of fats during analysis of food for residues of pesticides and herbicides... *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* , 64(3), 720-

- 723, 1981.
- 25.-KING, J. M. ..Fundamental applications of supercritical extraction in chromatographic science... *J. Chromatog. Sci.* , 27(7), 355-364, 1989.
- 26.-AMBRUS, Arpad, et al. ..General method for determination of pesticide residues in samples of plant origin, soil and water. I. Extraction and cleanup... *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 64(3), 733-768, 1981.
- 27.-CHAPUT, Daniel. ..Simplified multiresidue method for liquid chromatographic determination of N-methylcarbamate insecticides in fruit and vegetables... *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* , 71(3), 542-547, 1988.
- 28.-SEYMOUR, Mark P., et al. ..Large-scale separation of lipids from organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls using a polymeric high-performance liquid chromatographic column... *Analyst (London)*., 111, 1203-1205, 1986.
- 29.-ADACHI, Kazuhiko, et al. ..Simple analytical method for organophosphorus pesticide determination in unpolished rice, using removal of fats by zinc acetate... *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 67(4), 798-800, 1984.
- 30.-LUKE, Milton A., et al. .. Extraction and cleanup of organochlorine, organophosphate, organonitrogen, and hidrocarbon pesticide in procedure for determination by gas chromatography.. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 58(5), 1020-1026, 1975.
- 31.-LUKE, Milton A., et al. .. Improved multiresidue gas chromatography determination of organophosphorus, organonitrogen and organohalogen pesticides in produce, using flame photometric and electrolytic conductivity detectors... *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 64(5), 1187-1195 1981.
- 32.-SAWYER, Leon D. .. The Luke et al. method for determining multipesticide residue in fruits and vegetables: collaborative study... *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 68(1), 64-71, 1985.
- 33.-Committee for analytical for residues of pesticides.

- ..Determination of a range of organophosphorus pesticide residues in grain... *Analyst (London)*, 105, 515-517, 1980.
- 34.-LUKE, M. A., et al. ..Levels and incidences of pesticide residues in various foods and animal feeds analyzed by Luke multiresidue methodology for fiscal years 1982-1986... *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 71(2), 415-433, 1988.
- 35.-MATTERN, Gregory C., et al. ..Determination of several pesticides with a chemical ionization ion trap detector... *J. Agric. Food Chem.*, 38, 402-407.
- 36.-YURAWECZ, M. P. and B. J. Puma, ..Gas chromatographic determination of electron capture sensitive volatile industrial chemical residue in foods, using AOAC pesticide multiresidue extraction and cleanup procedures... *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 69(1), 80-85, 1986.
- 37.-LIU, Chao-Hong et al. ..Multiresidue determination of nonvolatile and themally labile pesticides in fruits and vegetables by thermospray liquid chromatography/mass spectrometry... *J. Agric. Food Chem.*, 39, 718-723, 1991.
- 38.-WELL, D. E. ..Extraction clean-up and group separation techniques in organochlorine trace analysis... *Pure Appl.Chem.*, 60(2), 1427-1448, 1988.
- 39.-SKOOG and West. .. *Análisis instrumental*... 4a. ed. Mc. Graw Hill, México. p 697-765, 1990.
- 40.-PORTER, Mildred L. and J.A. Burke. ..An isolation and cleanup procedure for low levels of organochlorine pesticide residues in fats and oils... *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 53, 733-737, 1970.
- 41.-BELLMAN, S. W. and T. L. Barry. ..Combined gas chromatography-mass spectrometry of multiple chlorinated pesticide residues in foods... *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 54(3), 525-527, 1971.
- 42.-SARH, Dirección General de Sanidad Vegetal y Protección Agropecuaria y Forestal. *Manual de Agroquímicos farmacéuticos, alimentos y biológicos veterinarios. Vol*

1. Plaguicidas. México, 1988.

- 43.-HOLLAND, P. T. and T. K. McGuire ..Multiresidue method for determination of pesticides in kiwifruit, apples, and berryfruits... *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 66(4), 1003-1008, 1983.
- 44.-FERNICOLA, Nilda A. G. G. de y Pedro Jauge. *Nociones básicas de toxicología.*, Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud/ Organización Panamericana de la salud/ Organización Mundial de la Salud, 1985, 160 pp.
- 45.-VEGA, G. Y Silvia, *Toxicología III. Evaluación epidemiológica de riesgos causados por agentes químicos ambientales.* Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud/ Organización Panamericana de la salud/ Organización Mundial de la Salud, 1985, pp. 127-164.
- 46.-Merck Co. editores *The Merck Index*, 11a. ed. 1990.
- 47.-MATTERN, Gregory C., et al. ..CG/MS and LC/MS determination of 20 pesticides for o which dietary oncogenic risk has been estimated..., *J. Agric. Food Chem.*, 39, 700-704, 1991.
- 48.-POMERANTZ, Irwin H., et al. ..Extraction, cleanup and gas-chromatographic method for analysis of captan, folpet and difolotan in crops... *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 53, 154, 1970.
- 49.-WILKES, Perry S. ..GAS-liquid chromatographic mass spectrometric confirmation of endosulfan and endosulfan sulfate in apples and carrots... *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 64(5), 1208-1210, 1981.
- 50.-RONALD, Freud W. *La práctica de la cromatografía de gases.*, División de Arondale Hewlett-Packard. 2a. ed, 1977.
- 51.-HEIKES, D.L. and M. L. Hopper, ..Purge and trap method for Determination of fumigants in whole grains, milled grain products, and intermediate grain-based food... *J. Assoc.Off. Anal. Chem.*, 69(6), 990-997, 1986.
- 52.-FRANCOEUR, Yves and V. Mallet. ..Simultaneous determination of

- captan and captafol in apples and potatoes by thin layer chromatography and *in situ* fluorometry... *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 60(6), 1328-1331, 1977.
- 53.-HENAO, Samuel H. y German Corey O. *Plaguicidas organofosforados y carbámicos*. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud/Organización Panamericana de la salud/Organización Mundial de la Salud, Metepec, México, 1986, p. 6-15.
- 54.-EL-NABARAWY, I. and W. F. Carey. ..Improved method for determination of chlorathalonil and related residues in cranberries... *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 71, 358-360, 1988.
- 55.-NEWSOME, W. H. and P. Collins. ..Multiresidue method for fungicide residue in fruit and vegetables. .. *J. Chromatography* , 472, 416-421, 1989.
- 56.-LAL, Rup, et al. ..Residues of organochlorine insecticides in Delhi vegetables..., *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 42, 45-49, 1989.
- 57.-FAO/WHO, *Joint Food Standards Programe Codex Alimentaries Commission, Codex Committe on Pesticides Residues*. Vol.XII, 2a. ed. Roma, 1986.
- 58.-BARBINA, N. Tacheo et al. ..Multiresidue method for captan, folpet, captafol, vinclozolin and iprodione on Italian apples and pears by capillary gas-liquid chromatography whit electron-capture detection... *Pestic. Science* , 15, 612-615, 1984.
- 59.-MARTINDALE, Ronald W. ..Determination of residues of a rango of fungicides, anti-sprouting agents and (organochlorine and organophosphorus) insecticides in potatoes by gas-liquid and high performance liquid chromatography... *Analyst* , 113, 1229-1233, 1988.
- 60.-WOOD, A. B. and L. Kanagasabapathy. ..Evaluation of inexpensive thin-layer chromatographic procedures for the estimation of some organophosphorus and carbamate insecticide residues in fruit and vegetables... *Pestic. Science*, 14, 108-118, 1983.
- 61.-KUMAR, Reena and C. B. Sharma. ..Separation and identification

- of certain organophosphorous pesticides residues in vegetables... *J. of Liquid Chromatography.*, 10(16), 3637-3642, 1987.
- 62.-KOVACS, M. F. and C. L. trichilo. ..Regulatory perspective of pesticides analytical anforcement methodology in the Unites States... *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 70(6), 937-941, 1987.
- 63.-SINGH, J. and M. R. Lapoint ..Confirmation of six organothio- phosphous pesticides by chemical derivatization at nano- gram levels... *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 57(6), 1285- 1287, 1974.
- 64.-SINGH, J. and W. P. Chochrane. ..Confirmation of organothio- phosphorus insecticide residues in fruit and vegetables by oxidative derivatization... *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 62(4), 751-756, 1979.
- 65.-AOAKI, Yoichi, et al. ..Comparative study of methods for the extraction of eleven organophosphorus pesticide residues in rice..., *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 58(6), 1286-1293, 1975.
- 66.-FERREIRA, J. R. and A. M. S. Silva Fernandes .Gas-liquid chromatographic determination of organophosphorus insecticide residues in fruit and vegetables... *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 63(3), 517-522, 1980.
- 67.-STORHERR, R. W., et al. ..A general method for organophosphorus pesticide residue in nonfatty foods... *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 54(3), 513-516, 1971.
- 68.-CARSON, L. J. ..Modified Storherr method for determination of organophosphorus pesticide in nonfatty food total diet composites... *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 64(30), 714-719, 1981.
- 69.-LEE, Young W. and N. D. Westcott. .. Gas chromatographic quantitative analysis and persistence of dimethoate and dimethoxon residues on and in wheat plants... *J. Agric. Food. Chem.*, 29, 860-862, 1981.
- 70.-HALL, Randall C. .. A highly sensitive and selective micro-electrolytic conductivity detector for gas chromatography... *J. Chromatographic Science.*, 12, 152-160, 1974.

- 71.-Committee for analytical for residues of pesticides.
..Determination of a range of organophosphorus pesticide residues in grain.. *Analyst (London)*, 110, 765-768, 1985.
- 72.-DI MUCCIO, A., et al. .. On column partition cleanup of fatty extracts for organophosphate pesticide residue determination.. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 70(1), 106-108, 1987.
- 73.-LORES, E. M., et al ..Improved silica gel cleanup method for organophosphorus pesticides..., *Chemosphere*, 16(5), 1065-1069, 1987.
- 74.-HOPPER, M. L. ..Improved method for partition of organophosphate pesticide residues on solid phase partition column... *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 71(40), 731-734, 1988.
- 75.-FAO/CODEX COMMISSION, *Guía de límites máximos de residuos*, Roma, 1978.
- 76.-DAVID, P. A. and M. Novotny ..Characterization of the nitrogen and phosphorus thermionic detector response in capillary SFC... *Anal. Chem.*, 61, 2082-2086, 1989.
- 77.-WAN, H. ..Small scale method for the determination of organophosphorus insecticides in tea using sulphuric acid as cleanup reagent... *J. Chromatography*, 516, 446, 1990.
- 78.- SARH. Dirección General de Sanidad Vegetal. *Ley de Sanidad Fitopecuaria de Los Estados Unidos Mexicanos*. Diario Oficial de la Federación, 1980, México.
- 79.-LAWRENCE, J. F. and G. M. Laver ..Analysis of carbamate and urea herbicides in foods, using fluorogenic labeling... *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 57(5), 1022-1025, 1974.
- 80.-ERNEST, G. F., et al...Thin layer chromatographic detection and indirect gas chromatographic determination of three carbamate pesticides... *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 58(5), 1015-1019, 1975.
- 81.-BROWN, M. J. ..A method for determining fenamiphos and its sulfoxide and sulfone in plants and soil... *J. Agric. Food. Chem.*, 29, 1129-1132, 1981.
- 82.-FERREIRA, J. R. and A. M. Tainha ...Organophosphorus

- insecticide residues in olives and olive oil... *Pestic. Science.*, 14(2), 167-172, 1983.
- 83.-KEPPEL, George E. .. Collaborative study of the determination of dithiocarbamate residues by modified carbon disulfide evolution method.. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 54(3), 528-532, 1971.
- 84.-RANGASWAMY, J. R. and S. K. Majumder. ..Colorimetric method for estimation of carbaryl and its residues on grains.. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 57(3), 592-594, 1974.
- 85.-LORAH, E. and D. D. Hemphill. ..Direct chromatography of some N-methyl carbamate pesticides... *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 57(3), 570-575, 1974.
- 86.-LAWRENCE, J. F. ..Evolution and confirmation of an alkylation-gas liquid chromatographic method for the determination of carbamate and urea herbicides in foods... *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 59(6), 1276-1278, 1976.
- 87.-RANGASWAMY, J., et al. ..Spectrophotometric method for the determination of carbofuran residues... *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 59(6), 1276-1278, 1976.
- 88.-TJAN, Gwan H. and J. T. A. Jansen ..Gas-liquid chromatographic determination of thiabendazole and methyl 2-bendimidazole carbamate in fruits and crops... *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 62(4), 769-773, 1979.
- 89.-HOLDEN, Edward R. ..Gas chromatographic determination of residues of methylcarbamate insecticides in crops as their 2,4-dinitrophenyl ether derivatives... *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 56(3), 713-717, 1973.
- 90.-HOLDEN, Edward R. ..Collaborative study of the 2,4-dinitrophenyl ether multiresidue method for use in determining four carbamate pesticides in crops... *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 58(3), 562-565, 1975.
- 91.-Panel on determination of dithiocarbamate residues. ..Determination of dithiocarbamate pesticide in foodstuff by a headspace method... *Analyst (London)*, 106, 782-787, 1981.
- 92.-STOCK, R. and C. B. F. Rice. *Chromatographic methods.*, 3a. ed. Chapman and Hall Science Paperbacks. 1973, 414 pp.

- 93.-RIZVI, S. S. H., et al. ..Supercritical fluid extraction fundamental principles and modeling methods... *Food Technology*. 40(6), 55-65, 1986.
- 94.-SASTRY, C. S. P. et al ..Spectrometry determination of carbaryl and propoxur using aminophenols and phenylenediamine... *Analyst (London)*, 112, 75-78, 1987.
- 95.-MC GUIE, Tony K. and P. T. Holland. .. Headspace gas chromatographic of carbon disulphide in the determination of dithiocarbamate fungicide residues... *Analyst (London)*, 112, 1075-1076, 1987.
- 96.-KRAUSE, Richard T. ..Multiresidue method for determining N-methylcarbamate insecticides in crops, using high performance liquid chromatography... *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 63(5), 1114-1124, 1980.
- 97.-*Official methods of analysis.*, AORC, 15a. ed., Virginia Estados Unidos. 1990, p. 274-311.
- 98.-KRAUSE, Richard T. and E. m. August. ..Aplicability of a carbamate insecticide multiresidue method for determining additional types of pesticides in fruits and vegetables... *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 66(2), 234-240, 1983.
- 99.-KRAUSE, Richard T. ..Liquid chromatographic determination of N-methylcarbamate insecticides and metabolites in crops. I. Collaborative study... *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 68(4), 726-733, 1985.
- 100.-KRAUSE, Richard T. ..Liquid chromatographic determination of N-methylcarbamate insecticides and metabolites in crops. II. Analytical characteristics and residue findings... *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 68(4), 734-741, 1985.
- 101.-HOPPER, M. L. and K. Griffitt. ..Evaluation of an automated permeation cleanup and evaporation systems for determining pesticide residue in fatty samples... *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 70(4), 1081-1086, 1987.
- 102.-BICCHI, Carlo, et al. .. Simultaneous determination of bendamidazole fungicides by HPLC on apples, pears and their pulps... *Pestic. Sci.*, 25, 355-360, 1989.
- 103.-FRANK, R. et al. ..Residues of insecticides, fungicides, and herbicides on Ontario-Grown vegetables 1980-1985... *J.*

- Assoc. Off. Anal. Chem.*, 70(6), 1081-1086, 1987.
- 104.-SARH. Dirección General de Sanidad Vegetal. *Ley de Sanidad Fitopecuaria de Los Estados Unidos Mexicanos*. Diario Oficial de la Federación, 1974, México.
- 105.-FAO/OHS Serie: *Estudio FAO, producción y protección vegetal, Residuos de plaguicidas en los alimentos*. p. 5-18, 1990, Roma.
- 106.-FURTON, K. and J. Rein ..Trend in techniques for the extraction of drugs and pesticides from biological specimens prior to chromatographic separation and detection... , *Analytical Chimica Acta.*, 236, 99-114, 1990.
- 107.-GILLESPIE . A. M. and S. M. Walters. ..Alumina blending technique for separation of pesticides from lipids... *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 67(2), 290-292, 1984
- 108.-LUKE , B. G., J. C. Richards and E. F. Dawes. .. Recent advances in cleanup of fats by sweep co-distillation. Part 1. Organochlorine residues.. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 67(2), 295-298, 1984
- 109.-FENSELAU, Catherine ..The mass spectrometer as a gas chromatographic detector. *Anal. Chem.*, 49(7), 563A-568A, 1977.
- 110.-*The pesticide Chemical news guide* . Editores R.E. Duggan and P. D. Duggan. Washington, 131 p. 1987.
- 111.-ROBINSON, James W., *Principios de análisis instrumental*. acribia, , Zaragoza, España, 1974, 360pp.
- 112.-SKOOG A. D. y D. M. West *Química analítica.*, 4a. ed. Mc. Graw Hill, México,
- 113.-BRAITHWAITE, A. and F. J. Smith, *Chromatographic methods.*, 3a. ed. Chapman and Hall, U. S. A., New York, 1985, 412pp.
- 114.-..En México se venden 35 agrotóxicos prohibidos o severamente restringidos en otros países... *Guía del consumidor*. 173, 2-3, 1987.