

40
2ij



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

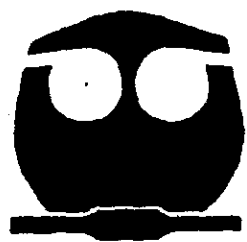


EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

DETERMINACION SIMULTANEA DE TRAZAS DE
NUEVE PLAGUICIDAS ORGANOFOSFORADOS EN
MUESTRAS ACUOSAS POR MEDIO DE LA
TECNOLOGIA DE PRECOLUMNAS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A
YARA ELIZABETH LUNA GONZALEZ



MEXICO, D. F.

1999

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

275015
1



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

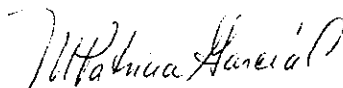
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición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

Jurado asignado:

Presidente: Profra. Lucía Hernández Garciadiago
Vocal: Profra. Georgina Artemisa Duarte Lisci
Secretario: Profra. Martha Patricia García Camacho
1er. Suplente: Profra. Hilda Elizabeth Calderón Villagómez
2do. Suplente: Prof. Ricardo Rodríguez Saenz

Lugar donde se desarrolló el tema:

Laboratorios 201-B y 301-E, Programa de Ingeniería Química Ambiental y Química Ambiental, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México



Director de tesis

Dra. Martha Patricia García Camacho



Sustentante

Yara Elizabeth Luna González

*Dedico este trabajo, con mucho cariño a mis
padres y a Chucho, por su amor, comprensión
y apoyo.*

A Eric, por tu amor, compañía y consejo.

Agradecimientos

A Dios por darme la oportunidad de ser mejor cada día.

A la Dra. Patricia García por su asesoría, confianza y apoyo durante la realización de este trabajo.

A Chayo, Teresita y Loreley, por brindarme su amistad y cariño.

RESUMEN	8
INTRODUCCIÓN	9
OBJETIVO	13
CAPÍTULO 1. LOS PLAGUICIDAS ORGANOFOSFORADOS Y SU ANÁLISIS	14
1.1. PLAGUICIDAS ORGANOFOSFORADOS	14
1.1.1. PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS	14
1.1.2. TOXICIDAD	15
1.1.2.1. Toxicidad aguda	16
1.1.2.2. Toxicidad crónica	17
1.1.3. MÉTODOS DE ANÁLISIS EN MUESTRAS ACUOSAS	17
1.2. ASPECTOS GENERALES DE LA CROMATOGRFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA EFICIENCIA (CLAE).	21
1.2.1. PARÁMETROS GENERALES	22
1.2.1.1. Factor de retención o capacidad (k').	22
1.2.1.2. Eficiencia	25
1.2.1.3. Resolución	26
1.2.1.4. Selectividad	27
1.2.2. INSTRUMENTACIÓN	27
1.2.3. TÉCNICAS	28
1.3. MÉTODOS DE PRECONCENTRACIÓN DE MUESTRAS ACUOSAS	31
1.3.1. EXTRACCIÓN POR DISOLVENTE (LÍQUIDO-LÍQUIDO)	31
1.3.2. EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA (LÍQUIDO-SÓLIDO)	32
1.3.2.1. Extracción en diferido ("off-line")	33

1.3.2.2. Extracción en línea (“on-line”)	35
1.3.2.3. Parámetros fundamentales de la EFS	38
1.3.2.3.1. Volumen de fuga o fin de fijación.	38
1.3.2.3.2. Rendimiento de extracción.	40
1.3.2.3.3. Selección del adsorbente y del disolvente de elución.	41
<u>CAPÍTULO 2. DESARROLLO EXPERIMENTAL</u>	44
2.1. EQUIPOS Y REACTIVOS.	44
2.1.1. PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES ESTÁNDAR DE PLAGUICIDAS.	46
2.1.2. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS.	47
2.2. METODOLOGÍA.	48
2.2.1. IMPLEMENTACIÓN DE LA SEPARACIÓN ANALÍTICA.	48
2.2.1.1. Determinación de la longitud de onda (λ) óptima para la detección simultánea.	49
2.2.1.2. Composición de la fase móvil.	49
2.2.1.3. Linealidad, precisión y límite de detección del sistema cromatográfico	50
2.2.2. OPTIMIZACIÓN DE LA PRECONCENTRACIÓN.	51
2.2.2.1. Descripción del montaje experimental para la preconcentración y análisis en línea de los plaguicidas.	51
2.2.2.2. Rendimiento de extracción en agua grado cromatográfico y agua potable.	54
2.2.2.3. Precisión del método en agua grado cromatográfico y potable	55
2.2.2.4. Aplicación del protocolo de preconcentración y análisis, a diferentes muestras de agua potable comercial.	55
<u>CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u>	57
3.1. IMPLEMENTACIÓN DE LA SEPARACIÓN ANALÍTICA.	57
3.1.1. SELECCIÓN DE LA LONGITUD DE ONDA ÓPTIMA PARA LA DETECCIÓN SIMULTÁNEA.	57

3.1.2. SELECCIÓN DE LA COMPOSICIÓN DE LA FASE MÓVIL	58
3.1.2.1. Optimización del gradiente de elución	58
3.1.3. LINEALIDAD Y PRECISIÓN DEL SISTEMA CROMATOGRÁFICO	61
3.1.4. LÍMITE DE DETECCIÓN DEL SISTEMA CROMATOGRÁFICO.	63
3.2. OPTIMIZACIÓN DE LA PRECONCENTRACIÓN	66
3.2.1. DETERMINACIÓN DEL RENDIMIENTO DE EXTRACCIÓN EN AGUA GRADO CROMATOGRÁFICO Y EN AGUA POTABLE	66
3.2.2. PRECISIÓN DEL MÉTODO EN AGUA GRADO CROMATOGRÁFICO Y POTABLE	70
3.2.3. APLICACIÓN DEL PROTOCOLO DE ANÁLISIS Y PRECONCENTRACIÓN A DIFERENTES MUESTRAS DE AGUA POTABLE COMERCIAL.	71
<u>CAPÍTULO 4. CONCLUSIONES</u>	<u>78</u>
<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	<u>81</u>
<u>LISTA DE FIGURAS</u>	<u>83</u>
<u>LISTA DE TABLAS</u>	<u>84</u>
<u>APÉNDICE A</u>	<u>85</u>
<u>APÉNDICE B</u>	<u>89</u>
<u>APÉNDICE C</u>	<u>99</u>

RESUMEN

En el presente trabajo se presenta un método que permite la determinación simultánea de trazas de 9 plaguicidas organofosforados en muestras de agua potable. Los plaguicidas que se estudiaron son: Metidatión, Paratión-metil, Paratión, Malatión, Fentión, Fenitrotión, Isofenfos, Clorpirifos-metil y Clorpirifos, compuestos muy utilizados en el país y que se caracterizan por ser altamente tóxicos. El método propuesto se basó en la “tecnología de precolumnas” que consiste en el acoplamiento en línea de la extracción en fase sólida al análisis por cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE). La extracción y concentración de los plaguicidas presentes en la muestra se realizó en una precolumna de 13 x 4.5 mm d.i. empacada con una Nucleosil C18, fase estacionaria que retiene a los compuestos no polares y moderadamente polares. El acoplamiento en línea de la precolumna de extracción con la columna analítica (150 x 4.5 mm d.i., empacada también con una Nucleosil C18) se llevó a cabo mediante una válvula de 6 puertos similar al inyector manual de un cromatógrafo de líquidos. La detección se realizó por espectroscopía de absorción ultravioleta-visible a una longitud de onda de 220 nm. De esta forma se desarrolló un procedimiento, rápido y simple que permitió la determinación de estos compuestos en muestras de agua potable a nivel de trazas. El límite de detección del método fue de 0.2- 0.4 $\mu\text{g} / \text{L}$, con coeficientes de variación inferiores al 6.4 %, utilizando volúmenes de muestra pequeños, y sin la necesidad de realizar una limpieza preliminar (“clean up”) de la muestra.

INTRODUCCIÓN

Los plaguicidas son considerados como el arma más efectiva e importante contra el ataque y control de las plagas que afectan los cultivos y los vectores que causan enfermedades al hombre y a los animales, además son productos fáciles de almacenar, transportar y aplicar. Sin embargo, el uso indiscriminado de estos compuestos ha dado origen a nuevas plagas y resistencia de las ya existentes, además ha causado problemas de contaminación ambiental sobre todo en los países en vías de desarrollo donde la regulación para darles un uso adecuado aún se está implementando.

A pesar de que el agua es fundamental para los procesos vitales, la contaminación de ríos, mares y lagos se incrementa día a día debido a la industrialización y al uso masivo de sustancias químicas. La calidad de las aguas superficiales que son la fuente de agua potable para una gran parte de la población mundial ha disminuido drásticamente y las aguas subterráneas consideradas como no renovables también presentan trazas de contaminantes.

Los plaguicidas entran en contacto con el agua durante las aplicaciones para el control de insectos como por ejemplo los mosquitos en campañas sanitarias contra el paludismo (malaria), o bien al ser transportados por el viento o la lluvia a los cuerpos receptores de agua, cercanos a las zonas agrícolas. También, es común que se transporten por la permeación a través del suelo

durante las aplicaciones aéreas, y por el desecho de aguas residuales que se derivan de su producción.

Desde el punto de vista químico, los plaguicidas pueden clasificarse en varias familias. Una de ellas es representada por los plaguicidas organofosforados, compuestos ampliamente utilizados en México y en otros países ya que poseen buena acción plaguicida, son fácilmente degradables y tienen un efecto residual menor que el de los plaguicidas organoclorados anteriormente muy populares. Sin embargo, su mecanismo de acción se lleva a cabo mediante la inhibición de la enzima colinesterasa y es por ello que presentan un efecto tóxico muy agudo, y por lo tanto son considerados como venenos muy potentes para los seres vivos.

En nuestro país, la regulación sobre el uso de plaguicidas aún esta en desarrollo, esto quiere decir que no se cuenta con leyes o reglamentos acordes con los avances en materia de contaminación que se dan en otros países. Esto se observa fácilmente en la Norma Mexicana de Agua Potable (NOM-127-SSA1-1996) en la cual sólo se consideran a los plaguicidas organoclorados y algunos fenoxi-ácidos (DDT, Dieldrin, Aldrin, Clordano, Lindano, Hexaclorobenceno, Heptacloro, Epóxido de heptacloro, Metoxicloro y Ácido 2,4-diclorofenoxiacético), a pesar de que los plaguicidas organofosforados son utilizados comúnmente desde hace varios años.

Los plaguicidas se encuentran presentes en concentraciones muy bajas en las diferentes matrices ambientales (aire, agua y suelo), así como en los alimentos. De ello surge la necesidad de desarrollar métodos analíticos sencillos y confiables que permitan su análisis a nivel de trazas. Los métodos citados en la literatura para la determinación de contaminantes orgánicos en agua requieren de un tratamiento preliminar de limpieza, extracción y concentración, seguido del análisis por Cromatografía de Gases (CG) o por Cromatografía de Líquidos (CL). La extracción líquido-líquido es el método convencional de enriquecimiento de trazas debido a su amplia selectividad apoyada por la gran variedad de disolventes puros disponibles; sin embargo, es una técnica muy lenta y laboriosa, en la cual se pueden formar emulsiones fácilmente, se utilizan grandes cantidades de disolventes orgánicos tóxicos, además de que la muestra se manipula constantemente y se tiene un alto riesgo de contaminación y pérdida. Estos inconvenientes, así como el tiempo empleado en el tratamiento de la muestra pueden minimizarse considerablemente utilizando la extracción líquido-sólido, comúnmente llamada extracción en fase sólida (EFS), la cual se basa en la distribución de los solutos entre una fase sólida y la muestra acuosa.

La EFS puede realizarse en diferido (off-line en inglés), donde la preconcentración se realiza de manera independiente a la etapa del análisis, o

en línea (on-line en inglés), cuando los compuestos que fueron retenidos en el soporte sólido son desorbidos y transferidos directamente hacia la columna analítica donde se lleva a cabo la separación. El acoplamiento en línea de la EFS al análisis cromatográfico, comúnmente llamado “Tecnología de Precolumnas” es el método que presenta mayores ventajas para el manejo de muestras acuosas ya que su manipulación disminuye considerablemente y con ello los riesgos de pérdida y/o contaminación. De esta forma se obtienen resultados más exactos ya que la cantidad total de los compuestos que fueron extraídos es enviada hacia el sistema cromatográfico de análisis. También es importante considerar que permite contrarrestar la desventaja que tiene la detección UV en sensibilidad con respecto a la detección específica del detector de Nitrógeno-Fósforo utilizado en cromatografía de gases, que es por lo menos 2.5 veces mayor, (Driss y col., 1993).

Por lo tanto, teniendo el interés de contar con un procedimiento analítico alternativo a la cromatografía de gases para poder determinar a los plaguicidas a concentraciones muy bajas, en el presente trabajo se persiguió el siguiente objetivo:

OBJETIVO

Desarrollar un procedimiento de preconcentración y análisis en línea, basado en la cromatografía de líquidos, que permita la determinación simultánea de trazas de nueve plaguicidas organofosforados en agua potable.

CAPÍTULO 1. LOS PLAGUICIDAS ORGANOFOSFORADOS Y SU ANÁLISIS

1.1. Plaguicidas Organofosforados

Durante muchos años el hombre ha tratado de desarrollar métodos eficaces para combatir a las plagas que dañan a sus cultivos o que le transmiten enfermedades. Durante las décadas de los 40 y 50, los plaguicidas organoclorados tuvieron gran auge, debido a sus notables propiedades insecticidas y bajo costo, sin embargo la preocupación por su alta persistencia en el medio ambiente, así como su tendencia a la dispersión, bioacumulación y biomagnificación causó que se buscaran compuestos alternativos de menor persistencia, como los plaguicidas organofosforados, los cuales son efectivos contra las plagas que se volvieron resistentes a los plaguicidas organoclorados, además de que son biodegradables y no se bioacumulan. Sin embargo, presentan el inconveniente de que son sumamente tóxicos, por lo que su control en la naturaleza y los alimentos debe ser muy estricto.

1.1.1. Propiedades fisicoquímicas

Los plaguicidas organofosforados son ésteres derivados de ácido fosfórico, la mayor parte de ellos son moderadamente solubles en agua, tienen un alto coeficiente de reparto aceite/agua, baja presión de vapor y se degradan fácilmente por hidrólisis. No se cuenta con referencias bibliográficas que

indiquen efectos a largo plazo en el ambiente provocados por compuestos organofosforados, esto se atribuye a que son sustancias poco persistentes y que se degradan con facilidad, aunque es necesario realizar estudios al respecto. El tiempo de vida media del Paratión y el Malatión es aproximadamente de una semana (Albert, 1991).

En el Apéndice A. se muestra la estructura y las principales propiedades fisicoquímicas de los nueve plaguicidas organofosforados en estudio.

1.1.2. Toxicidad

Los plaguicidas organofosforados tienen la capacidad inherente de causar efectos adversos en los seres vivos, de dañar su estructura o funciones y de provocar su muerte. Su toxicidad depende, entre otros aspectos, de la estructura química, de la magnitud y duración de la exposición, así como de su vía de ingreso al organismo. Las principales vías de entrada al organismo son: la dérmica, respiratoria y digestiva. Una vez que han entrado al organismo se realiza su biotransformación principalmente en el hígado mediante enzimas oxidasas, hidrolasas y transferasas. La eliminación se realiza por orina y en menor proporción en las heces fecales.

Tabla 1. Toxicidad aguda e Ingesta Diaria Admisible (IDA) de los plaguicidas organofosforados estudiados en este trabajo

Compuesto	*DL50 [mg/Kg]	IDA [mg/ Kg]
Clorpirifos	96-270	0.01
Clorpirifos-metil	1000-3700	0.01
Fenitrotión	250	0.005

Compuesto	*DL50 [mg/Kg]	IDA [mg/ Kg]
Fentión	250	0.001
Isofenfos	20	0.001
Malatión	5500	0.02
Metidatión	44	0.001
Paratión	15	0.02
Paratión-metil	6	0.02

DL50 = Dosis letal 50, Dosis que mata al 50 % de una población de prueba, es una medida de la toxicidad de los compuestos, *en rata, ruta oral a menos que se indique otra cosa.

IDA = Ingesta Diaria Aceptable, es una estimación de la dosis de exposición diaria que es poco probable que produzca un efecto nocivo aún cuando la exposición se prolongue toda la vida.

Fuente: CICOPLAFEST. 1997. Catálogo oficial de plaguicidas. SAGAR. México, D.F.

Los valores que se presentan en esta tabla, son muy bajos y es por ello que estos compuestos son considerados como sumamente tóxicos.

1.1.2.1. Toxicidad aguda

Los plaguicidas organofosforados actúan inhibiendo la actividad de la enzima acetilcolinesterasa (ACE), que se encarga de realizar la hidrólisis de la acetilcolina (AC) que se genera en las terminales nerviosas y cuya función principal es la de transmitir el impulso nervioso. Los efectos de la intoxicación se deben a la fosforilación de la acetilcolinesterasa y a la acumulación de la acetilcolina en la sinapsis del nervio, por lo cual se generan gran cantidad de impulsos a las células eefectoras. En los animales superiores, las sinapsis colinérgicas se encuentran en todo el sistema nervioso y por ello los síntomas de envenenamiento ocurren en varios sitios y se manifiestan con: náuseas, salivación, vértigo, temblores, lagrimeo, miosis, convulsiones, coma y muerte.

1.1.2.2. Toxicidad crónica

La exposición crónica a plaguicidas organofosforados causa un aumento en la producción de enzimas (inducción enzimática) encargadas de la biotransformación de sustancias químicas, y a largo plazo daños en los órganos que las producen. Esta inducción se lleva a cabo principalmente en hígado, pero también en riñón, pulmón y glándulas adrenales. Además se han detectado neurotoxicidad y alteraciones de conducta, como reducción de la concentración, pérdida del lenguaje, depresión ansiedad e irritabilidad. Hasta el momento, no se han hecho estudios sobre sus efectos de mutagenicidad, teratogenicidad y carcinogenicidad en el hombre, aunque se sabe algunos productos causan dermatosis.

1.1.3. Métodos de análisis en muestras acuosas

La cromatografía de gases en combinación con un detector específico, de Nitrógeno-Fósforo (DNF) o bien un detector de espectrometría de masas, así como la cromatografía de líquidos con detección por espectroscopía de absorción en el ultravioleta-visible (UV), son las técnicas más comunes para la determinación de trazas de plaguicidas en agua.

La mayoría de los procedimientos para la determinación de plaguicidas en agua utilizan la extracción líquido-líquido para el enriquecimiento de trazas. Sin embargo, el uso de la extracción en fase sólida, utilizando cartuchos,

precolumnas o discos, ha ganado interés en los últimos años y probablemente reemplace a los métodos convencionales de ELL, gracias a su simplicidad y fácil adaptabilidad al manejo de muestras acuosas.

La Tabla 2 muestra un listado de los procedimientos para la determinación de plaguicidas organofosforados que se han publicado recientemente, así como sus principales características

Tabla 2. Características de algunos procedimientos utilizados para la determinación de diversos plaguicidas, entre los cuales se encuentran organofosforados.

Compuesto estudiados	Análisis y detección	Método de extracción	Tipo de muestra	R (%)	LD (µg / L)	Referencia
Clorpirifos, Paratión-metil, Fentión, junto con otros 18 plaguicidas (USEPA 8140)	CG Detector Fotométrico de flama	ELL con diclorometano	Agua superficial, suelo, sedimentos	70-130	0.3	Keith y col., 1991
Plaguicidas que contienen nitrógeno y fósforo (USEPA 507)	GC Detector Nitrógeno-Fósforo	ELL con diclorometano	Agua	70-130	0.1-4.5	Barceló, 1993
Fentión Isofenfos Mevinfos Atrazina Simazina	GC Detector Nitrógeno-Fósforo	EFS (en diferido) Cartuchos XAD-2 y C18	Agua superficial y potable	75-95	0.08-0.60	Psathaki y col., 1994*
Carbaril, Paratión, Paratión-metil, Fenitrotión Metil- y Etil- Azinfos	CL (fase inversa) Detector UV 254 nm	EFS (en línea) precolumnas C18 y PRP-1	Agua potable	81-100	0.03-0.2	Driss y col., 1993*
Clorpirifos, Lindano Isoproturon, Diuron, Atrazina, Zimazina	CL fase inversa Detector Arreglo de diodos	EFS (en diferido) Discos de extracción laminar C18	Agua superficial y potable	75-100	0.01-0.05	Pichon y Charpak, 1998

Compuesto estudiados	Análisis y detección	Método de extracción	Tipo de muestra	R (%)	LD (µg / L)	Referencia
Clorpirifos, Paratión-metil, Fenitrotion, Diazinon, Atrazina, Propazina	CL fase inversa Detector Arreglo de diodos	EFS (en línea) Precolumnas C18	Agua superficial	99	0.03-0.1	Lacorte y col., 1998*
Mevinfos, Clorfenvinfos, Diazinon, Malatión, Fentión, Fenitrotión, Paratión, Paratión-metil	CL fase inversa Detector Arreglo de diodos	EFS (en línea) Precolumnas C18	Agua superficial y potable	100	0.03-0.6	Lacorte y Barceló, 1996*
Isoproturon, Carbaril, Simazina, Fenitrotion, Paratión, Linuron	CL fase inversa Detector Arreglo de diodos	EFS (en línea) Precolumnas C18	Agua superficial y potable	100	0.1	Pichon y Hennion, 1994*
Paraoxon, Paratión-metil, Fenitrotion, Paratión, Gutión	CL fase inversa UV 260 nm.	EFS (en diferido) Cartuchos C18	Agua potable y superficial	> 80	0.26-0.57	Carabia. y Rodríguez, 1992 *

R = Rendimiento de extracción; LD = Límite de detección; CG = Cromatografía de gases; CL = Cromatografía de líquidos; ELL = Extracción líquido-líquido; EFS = Extracción en fase sólida (líquido- sólido); UV = ultravioleta; USEPA= Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos de América; (*) Métodos desarrollados en la Comunidad Europea.

En términos generales se puede señalar, que en la mayoría de los procedimientos descritos en la tabla, la preparación de la muestra se realiza usando extracción en fase sólida, obteniendo los límites de detección más bajos cuando esta se realiza en línea.

La Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos de América (USEPA) se encarga de regular los niveles de plaguicidas en agua potable, basándose en los Niveles Admisibles para la Salud (NAS) de cada compuesto en particular. Estos niveles se seleccionan de acuerdo a la toxicidad de cada plaguicida, por ejemplo: para la Atrazina son 3 µg /L, para Endrin 2 µg /L,

Diquat 20 $\mu\text{g} / \text{L}$ y Paratión-metil 2 $\mu\text{g} / \text{L}$. La Comunidad Europea es más estricta ya que establece niveles fijos para todos los plaguicidas (0.1 $\mu\text{g} / \text{L}$ por plaguicida individual y 0.5 $\mu\text{g} / \text{L}$ por la suma de los plaguicidas presentes), sin hacer distinción por su toxicidad, y es por ello que los métodos desarrollados en Europa necesitan alcanzar límites de detección un orden de magnitud por debajo de los que son desarrollados por la USEPA (Barceló, 1993).

Los métodos oficiales que se emplean comúnmente para la determinación de plaguicidas organofosforados son el USEPA 8140 y el USEPA 507 los cuales involucran la extracción líquido-líquido y el análisis por cromatografía de gases, y son bastante robustos. Desafortunadamente, en México son pocos los laboratorios que los tienen montados, y es importante mencionar que, en parte se debe a que en la legislación de nuestro país no se considera a los plaguicidas organofosforados. El campo de los plaguicidas es muy dinámico y continuamente se introducen en el mercado productos nuevos. De ello surge la importancia de generar constantemente nuevas metodologías de análisis que permitan obtener información rápida y confiable de la presencia de sus residuos en el agua y otras matrices ambientales, así como en los alimentos.

1.2. Aspectos generales de la Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia (CLAE).

La cromatografía es un método de separación en el cual los componentes de una mezcla son separados de acuerdo al equilibrio de distribución del soluto entre dos fases inmiscibles: una fase estacionaria (sólida) y una fase móvil (líquida). En la Figura 1 se representa de manera muy simple el proceso cromatográfico.

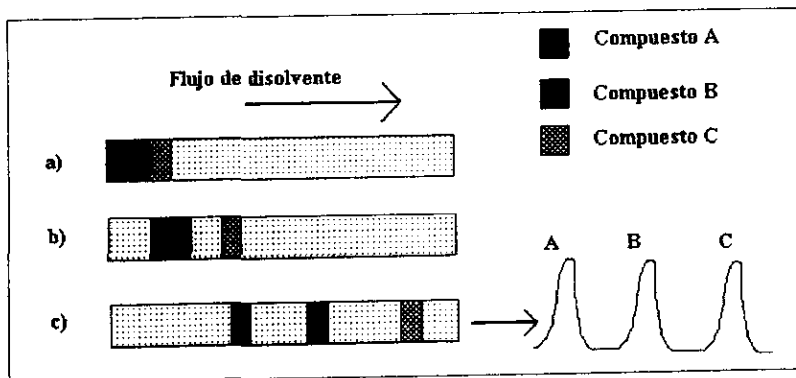


Figura 1. Separación de una mezcla de tres componentes por cromatografía

La muestra se introduce en la fase móvil (a) y es transportada a lo largo de la columna que contiene la fase estacionaria, los solutos de la muestra experimentan interacciones repetidas (repartos) entre ambas fases (b). El reparto entre las fases se lleva a cabo por las diferencias en las propiedades fisicoquímicas de los componentes de la muestra. Al final del proceso los componentes emergen en orden creciente de interacción con la fase estacionaria (c).

La cromatografía de líquidos de alto rendimiento (CLAE) es una herramienta analítica no destructiva, ampliamente utilizada por su sensibilidad y su fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas. La CLAE no se encuentra limitada por la volatilidad o la estabilidad de productos lábiles, permite la recolección de las fracciones separadas y es capaz de separar compuestos iónicos, productos de origen natural, materiales poliméricos y compuestos polifuncionales de alto peso molecular.

1.2.1. Parámetros generales

1.2.1.1. Factor de retención o capacidad (k').

Es un parámetro experimental muy importante que describe el comportamiento de retención de los compuestos. Para describirlo, consideraremos que:

cuando un soluto (A) entra al sistema cromatográfico, inmediatamente se reparte o distribuye entre la fase móvil y la estacionaria, estableciendo un equilibrio entre ambas fases.



La concentración de A en cada fase esta, dada por la constante de reparto o distribución K que se define como:

$$K = C_s / C_m,$$

Ecuación 1

donde: C_s y C_m son las concentraciones molares de soluto en la fase estacionaria y móvil respectivamente. Cuando el máximo del pico aparece en la salida de la columna, la mitad del soluto se ha eluido en el volumen de retención V_R , mientras la otra mitad permanece distribuida entre el volumen de la fase móvil, V_M y el volumen de la fase estacionaria, V_S . Así,

$$V_R C_M = V_M C_M + V_S C_S$$

Ecuación 2

Combinando y reordenando las ecuaciones 1 y 2 obtenemos:

$$V_R = V_M + K V_S$$

Ecuación 3

en donde se observa claramente que el volumen de retención V_R esta relacionado directamente a la constante de distribución K .

El coeficiente de reparto k' esta dado por la relación de los moles de soluto en la fase estacionaria entre los moles en la fase móvil:

$$k' = C_s V_s / C_m V_m = K [V_s / V_m]$$

Ecuación 4

Si despejamos $C_s V_s$ de la Ecuación 2 y sustituimos en Ecuación 4 , obtenemos:

$$k' = V_R - V_M / V_M.$$

Ecuación 5

Y dado que el volumen de retención se relaciona con el tiempo de retención tr y la velocidad de la fase móvil (flujo) F como se muestra en la siguiente ecuación:

$$V_R = F tr$$

Ecuación 6

El volumen de la columna disponible para la fase móvil es:

$$V_M = F t_0$$

Ecuación 7

donde: t_0 es el tiempo requerido para que se lleve a cabo la elución de un soluto que no es retenido en la fase estacionaria (tiempo muerto) y representa el espacio vacío de la columna.

Sustituyendo V_R y V_M en la Ecuación 5 y reordenando, se obtiene:

$$k' = tr - t_0 / t_0$$

Ecuación 8

Dicho de otra forma, el coeficiente de reparto es una medida del tiempo transcurrido en la fase estacionaria en relación con el tiempo transcurrido en la fase móvil y se puede calcular experimentalmente mediante la Ecuación 8. El tiempo de retención tr se mide desde el momento de la inyección hasta la

elución del máximo del pico y t_0 se determina inyectando un soluto no retenido y midiendo su tiempo de elución.

Cuando k' tiene un valor menor que la unidad, el analito eluye tan rápido que no puede lograrse una separación satisfactoria, si es mayor a 20 el tiempo de elución es muy largo, por lo cual para obtener una separación óptima se requiere que el valor de k' se encuentre entre 1 y 5 (Skoog, 1991). El factor de capacidad se puede manipular para obtener mejores separaciones, variando la composición de la fase móvil o la fase estacionaria

1.2.1.2. Eficiencia

Una característica importante de un sistema cromatográfico es su eficiencia, la cual tiene relación directa con el ensanchamiento de banda que ocurre cuando el compuesto migra a través de la columna expresado como una cantidad adimensional denominada número de platos teóricos (N).

Cada plato teórico representa el número de veces que el soluto se reparte entre las dos fases en su paso a través de la columna. El número total de platos teóricos de una columna representa el poder de separación y se calcula con la siguiente ecuación:

$$N = 16 [tr/W_b]^2 = 5.54 [tr/W_{1/2}]^2,$$

donde:

W_b = Ancho del pico en su base, y

$W_{1/2}$ = Ancho del pico a la mitad de su altura.

La eficiencia de la columna también se puede expresarse en unidades de longitud, mediante el cálculo de la altura de plato teórico (H).

$$H = L / N,$$

donde:

L = Longitud de la columna

Para una columna eficiente H es un número pequeño.

1.2.1.3. Resolución

La resolución (R_s) es una medida cuantitativa de la capacidad de la columna para separar dos analitos. El grado de separación o resolución de dos bandas adyacentes se define como la distancia entre los picos (o centros) entre dos solutos dividida entre el ancho (W) promedio de los picos. Cuando la retención y el ancho del pico se miden en unidades de tiempo, la resolución puede calcularse con la siguiente ecuación:

$$R_s = [tr_2 - tr_1] / 0.5 [W_2 + W_1]$$

donde: tr_2 y W_2 , corresponden al tiempo de retención y anchura de pico del compuesto más retenido.

1.2.1.4. Selectividad

Es la habilidad de una columna para discriminar y retener selectivamente a los compuestos. La selectividad se expresa en términos del factor de selectividad (α) que se define como:

$$\alpha = k'_2 / k'_1$$

Cuando (α) es igual a uno, los picos coinciden y no hay separación entre más grande sea su valor más fácil será la separación, el valor óptimo para (α) se encuentra entre 1.1-1.4 (Bidlingmeyer, 1992)

1.2.2. Instrumentación

Los componentes básicos de un equipo de CLAE son: bomba de alta presión, inyector, bucle o lazo de muestreo, reservorios para la fase móvil, columna analítica, columna de guardia para impedir la contaminación de la columna analítica por partículas pequeñas y un detector conectado a un dispositivo que permita el manejo de datos (Skoog, 1991)

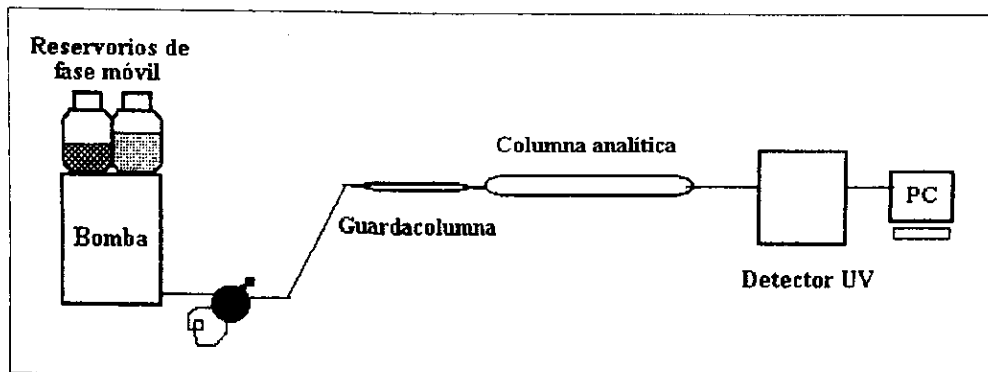


Figura 2. Esquema de los componentes básicos de un cromatógrafo de líquidos de alta eficiencia

1.2.3. Técnicas

Existen varias técnicas de cromatografía de líquidos, que se diferencian por la clase de equilibrios implicados en la transferencia de los solutos entre las fases. Las más comunes se mencionan en la siguiente tabla:

Tabla 3. Principales técnicas de Cromatografía de Líquidos

Método	Fase estacionaria	Tipo de equilibrio
Líquido- sólido (adsorción)	Sólido	Adsorción sobre la superficie
Líquido-líquido (reparto)	Líquido adsorbido en un sólido inerte	Reparto entre fases líquidas inmiscibles
Fase enlazada	Compuestos orgánicos unidos químicamente a una superficie sólida	Reparto y / o adsorción
Pares de iones	Fase inversa en equilibrio con contraiones provenientes de la fase móvil	Separación de pares de iones
Intercambio iónico	Resinas de intercambio iónico	Intercambio de cationes o aniones
Exclusión por tamaño (permeación en gel)	Gel formado por polímeros no iónicos porosos	Retención de las moléculas según su tamaño molecular y geometría

Método	Fase estacionaria	Tipo de equilibrio
Afinidad	Sólido enlazado a un ligante de afinidad (anticuerpo o inhibidor enzimático).	Adsorción a ligantes bioselectivos

La cromatografía de fase enlazada o químicamente unida es la que más se usa en la actualidad ya que se puede aplicar a una gran variedad de compuestos, presenta buena reproducibilidad en la retención, se equilibra rápidamente y no presenta reacciones irreversibles.

Los soportes con fase enlazada se preparan uniendo covalentemente a la superficie de la sílice una especie orgánica R, el enlace que se forma es del tipo siloxano (Si-O-Si-R) ,y se caracterizan por ser muy estable a la hidrólisis en un intervalo de pH de 2 a 7. Los empaques de fase enlazada pueden tener carácter apolar o polar, dependiendo de los grupos funcionales unidos al grupo siloxano. Se clasifican como de fase inversa cuando el recubrimiento unido químicamente tiene carácter no polar y de fase normal cuando el recubrimiento contiene grupos funcionales polares. En la mayoría de las aplicaciones se utilizan empaques de fase inversa, en los cuales el grupo R del siloxano es una cadena C₈ (n-octilo) o una cadena C₁₈ (n-octadecilo). Este tipo de empaques combinados con disolventes muy polares (a menudo acuosos) se aproxima al sistema ideal y universal para la cromatografía de líquidos, ya que

proporcionan retención y selectividad óptimas cuando los compuestos tienen un carácter predominantemente alifático o aromático.

El mecanismo de acción mediante el cual ocurre la retención de los solutos, se debe principalmente a las interacciones hidrofóbicas y al reparto, se piensa que los grupos de hidrocarburo de cadena larga se alinean el uno junto al otro, de forma perpendicular a la superficie del soporte, formando una estructura similar a una brocha o cepillo. Algunos científicos proponen que desde el punto de vista de las moléculas del soluto, la estructura de cepillo se comporta como una fase estacionaria líquido-líquido ordinaria. Otros consideran que la estructura de cepillo es una superficie modificada en la que tiene lugar una adsorción física de esta forma las moléculas de la fase móvil compiten entonces con las del analito por una posición en la superficie orgánica.

La Tabla 4 muestra algunas aplicaciones de la cromatografía de fase enlazada:

Tabla 4. Aplicaciones de la cromatografía de fase enlazada. (Skoog, 1991)

Campo	Mezclas típicas
Productos farmacéuticos	Antibióticos, esteroides, analgésicos
Bioquímica	Proteínas, aminoácidos, lípidos
Alimentos	Aditivos, antioxidantes, edulcorantes
Industria Química	Colorantes, tensoactivos
Contaminantes	Plaguicidas, herbicidas, fenoles
Química forense	Drogas, alcohol en sangre, narcóticos

1.3. Métodos de preconcentración de muestras acuosas

Los compuestos orgánicos que se encuentran como contaminantes de muestras acuosas están a nivel de trazas ($\mu\text{g/L}$ o ng/L) y por lo tanto no pueden ser analizadas sin un tratamiento previo que consiste en:

- Extracción de los analitos de interés que se encuentren disueltos en la fase acuosa
- Concentración de trazas
- Remoción de impurezas provenientes de la matriz

La preparación de la muestra es el paso limitante del procedimiento analítico ya que consume dos terceras partes de análisis, además de que constituye una de las fuentes principales de error analítico (repetibilidad y rendimiento).

Los métodos más empleados para la preconcentración y limpieza de muestras acuosas son: extracción líquido-líquido y extracción en fase sólida.

1.3.1. Extracción por disolvente (líquido-líquido)

La extracción líquido-líquido (ELL) se basa en la distribución de los compuestos orgánicos en entre dos fases, comúnmente una fase acuosa y un disolvente orgánico inmiscible. Las principales ventajas de este tipo de extracción son: su simplicidad y facilidad de montaje en el laboratorio. Sin embargo, no esta exenta de problemas prácticos como la evaporación de grandes cantidades de disolventes tóxicos, generalmente inflamables o la

formación de emulsiones. En este tipo de extracción la muestra se manipula constantemente por lo cual es factible la contaminación o pérdida de los analitos de interés si no se maneja adecuadamente, además de que existe un riesgo para el analista al exponerse a compuestos tóxicos o a sus vapores. Aún así el método propuesto por la Agencia de Protección del Ambiente de los Estados Unidos (USEPA) para la determinación de plaguicidas organofosforados, involucra la ELL de la muestra previo al análisis por cromatografía de gases (Barceló, 1993.)

1.3.2. Extracción en fase sólida (líquido-sólido)

La extracción en fase sólida (EFS) es un proceso físico, que se basa en la distribución de los compuestos entre una fase sólida (adsorbente) y la muestra acuosa. La EFS comúnmente llamada extracción líquido-sólido es un método de preparación de muestras que se aplica muy bien en el manejo de muestras acuosas y se rige por los mismos principios que la cromatografía de líquidos.

Los compuestos orgánicos son atrapados en un adsorbente empacado en un cartucho, membrana o precolumna de extracción a través de la cual se hace pasar la muestra, los analitos retenidos se recuperan posteriormente durante un paso de elución, aplicando un disolvente orgánico adecuado.

La EFS puede realizarse en diferido cuando la preparación de la muestra es un procedimiento aparte del análisis cromatográfico, o bien puede realizarse en línea acoplado a la preconcentración al análisis.

1.3.2.1. Extracción en diferido (“off-line”)

En los procedimientos en diferido, la extracción de los compuestos se realiza de manera independiente a la etapa del análisis cromatográfico.

Las muestras son preconcentradas en cartuchos o discos empacados con adsorbentes.

El proceso de preconcentración comprende las siguientes etapas (Figura 3):

- 1) Acondicionamiento del adsorbente.
- 2) Aplicación de la muestra.
- 3) Elución de los compuestos interferentes (limpieza o simplificación de la matriz).
- 4) Elución de los analitos de interés.

Durante la primera etapa de este proceso, se acondiciona el adsorbente con un disolvente adecuado y posteriormente con agua, para prepararlo para recibir la muestra. Durante la aplicación, la muestra, los analitos y algunas interferencias son retenidos por el adsorbente, aunque estas últimas pueden eliminarse haciendo un lavado con una mezcla de agua y disolvente orgánico. Finalmente se lleva a cabo la elución de los compuestos de interés aplicando un pequeño volumen de disolvente orgánico el cual puede evaporarse para incrementar el factor de enriquecimiento. El proceso completo se esquematiza en la Figura 3.

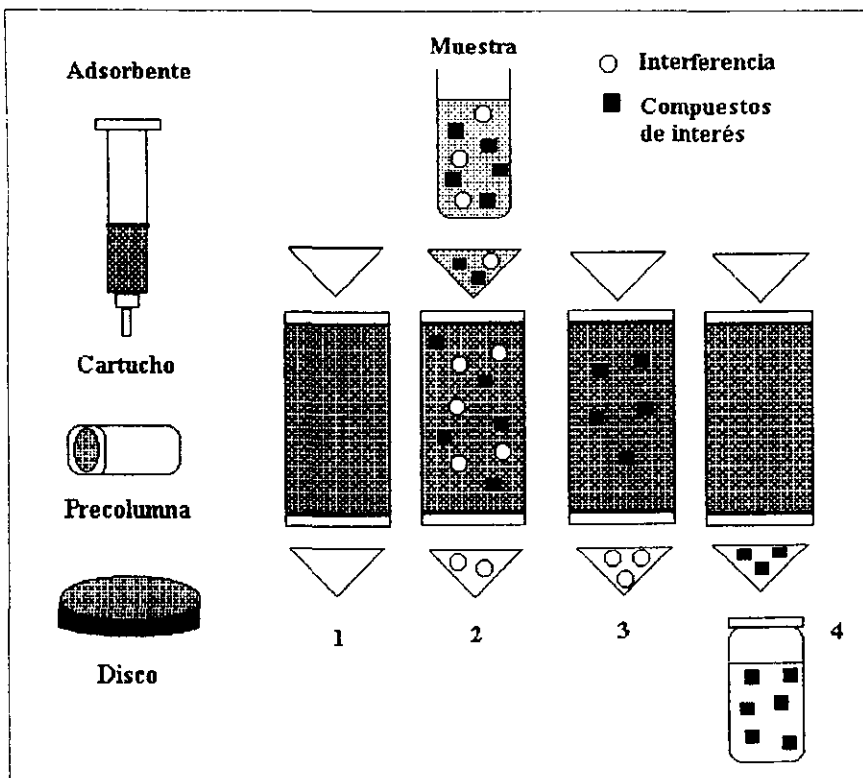


Figura 3. Descripción del proceso de extracción en fase sólida en diferido (off-line) en un cartucho empacado con sílice C18: (1) Acondicionamiento del adsorbente (activación del adsorbente con metanol y acondicionamiento con agua 3-5 mL de cada uno); (2) Aplicación de la muestra; (3) Elución de los compuestos interferentes (lavado con una mezcla de agua y disolvente orgánico); (5) Elución de los analitos de interés

Este tipo de procedimientos aunque son sencillos y rápidos, aun poseen ciertos inconvenientes como la manipulación constante de la muestra, lo cual podría originar pérdidas y/o contaminación, además de que sólo se analiza una alícuota del extracto concentrado lo cual disminuye la sensibilidad del método. Estas desventajas son superadas por las metodologías en línea.

1.3.2.2. Extracción en línea (“on-line”)

Al acoplamiento de la extracción en fase sólida con el análisis cromatográfico se le conoce como “Tecnología de precolumnas”; en este tipo de procedimientos los solutos son primero retenidos en un soporte sólido y después eluidos directamente hacia la columna analítica para su separación y análisis.

El acoplamiento de la EFS al análisis cromatográfico se realiza mediante una válvula de seis puertos similar a la que se emplea como inyector manual en el cromatógrafo de líquidos. La precolumna de extracción se coloca en lugar del bucle (Figura 4).

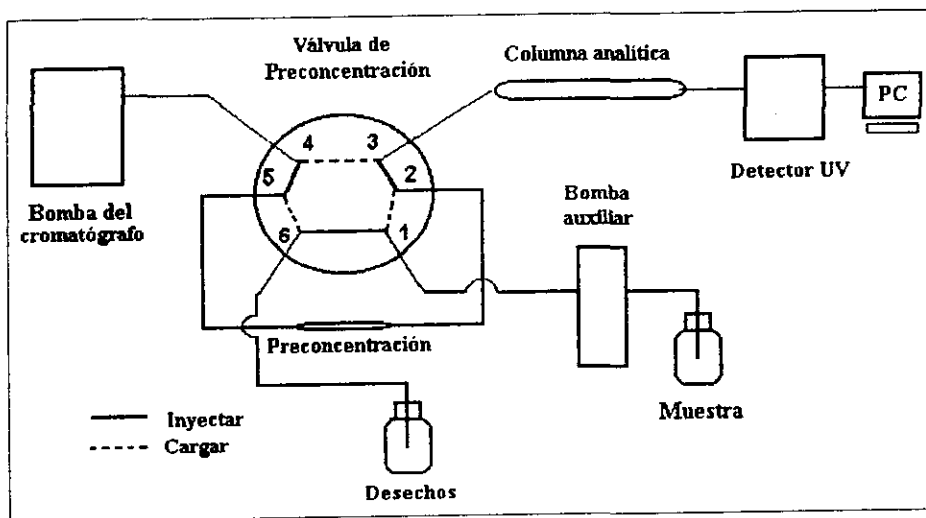


Figura 4. Montaje experimental del acoplamiento en línea de la EFS al análisis cromatográfico

Durante el paso de preconcentración la válvula se encuentra en la posición de “cargar”; de esta forma se alimenta la muestra a la precolumna por medio de la bomba auxiliar, mientras que la bomba del cromatógrafo envía fase móvil de los reservorios a la columna analítica para mantenerla en condiciones de equilibrio. Una vez finalizada la aplicación de la muestra se realiza un lavado con un pequeño volumen de agua grado cromatográfico para eliminar la muestra que se encuentre en los intersticios de la precolumna de extracción y en los capilares. Cuando la válvula se encuentra en la posición “inyectar”, los compuestos retenidos son eluidos de la precolumna por la fase móvil y entran directamente en la columna analítica donde se lleva a cabo la separación (Driss y col., 1993).

El acoplamiento en línea de la preconcentración de la muestra al análisis cromatográfico es la estrategia ideal para minimizar los inconvenientes de los procedimientos en diferido, son fáciles de montar en las condiciones del laboratorio, son rápidos y la manipulación de la muestra es mínima por lo cual no existe riesgo de contaminación o pérdida de la muestra.

En los procedimientos en línea toda la muestra es analizada a diferencia de los procedimientos en diferido en los cuales se analiza sólo una alícuota pequeña, alrededor de 0.1- 10 % del extracto (Stan, 1995).

Recientemente se han propuesto algunos métodos en donde se acoplan en serie dos a tres precolumnas para realizar transferencias selectivas o el fraccionamiento preliminar de los analitos de una muestra compleja. Por ejemplo tenemos un método que permite la determinación de fenil-ureas (metoxuron, isoproturon, linuron y neburon) y triazinas (simazina, atrazina y terbutilazina) a nivel de trazas en agua de río (Coquart y Hennion, 1991.), el cual consiste en la preconcentración de 500 mL de muestra, la cual se hace pasar a través de dos precolumnas, la primera de ellas empacada con C18 que actúa como filtro de interferentes apolares y la segunda empacada con polimeros apolares estireno-divinilbenceno (PRP-1) que retiene a los analitos de interés con altos rendimientos, permitiendo la determinación cuantitativa por debajo de los 0.1 µg/L.

Otro método que permite la determinación de anilinas y sus derivados en desechos industriales (Hennion y Scribe, 1993) realiza el fraccionamiento de los analitos de acuerdo a su polaridad, por medio de tres precolumnas, la primera de ellas empacada con C18 que retiene a los analitos no-polares, la segunda empacada con copolímero PRP-1 que retiene a los analitos moderadamente polares y la tercera empacada con un intercambiador de cationes, retiene a los compuestos orgánicos catiónicos, la muestra de agua debe ajustarse previamente a un pH de 3 con ácido perclórico, para que los

compuestos se encuentren en su forma iónica. La elución se realiza con un gradiente de solución amortiguadora/metanol y el análisis se lleva a cabo en una columna analítica C18 y un detector de arreglo de diodos obteniendo límites de detección menores a los 10 µg/L, cuando se aplica 10 mL de muestra. Por otra parte, también se han realizado preconcentraciones más selectivas combinando una fase PRP-1 y un intercambiador de cationes, para analizar a metabolitos polares de la atrazina sin la necesidad de efectuar un “clean up” (Coquart , García-Camacho y Hennion, 1993) .

1.3.2.3. Parámetros fundamentales de la EFS

Los fenómenos fisicoquímicos involucrados en la EFS son los mismos tanto para los procedimientos en línea como en diferido. La EFS puede ser considerada como un proceso cromatográfico simple donde el adsorbente es equivalente a la fase estacionaria y la muestra acuosa es equivalente a la fase móvil. Los parámetros fundamentales de la EFS son el volumen de fuga o de fin de fijación V_f de su nombre en inglés (breakthrough volume) y el rendimiento de extracción R.

1.3.2.3.1. Volumen de fuga o fin de fijación.

Indica el volumen que puede ser manejado eficientemente para el enriquecimiento de trazas sin que ocurra la fuga de los solutos, bajo

condiciones de no saturación. Esta fuga se lleva a cabo principalmente cuando los analitos ya no son retenidos por el adsorbente. Este volumen puede determinarse mediante el registro de la señal de UV de una muestra acuosa adicionada con trazas de un soluto (S) el cual tiene una absorbancia (A_0) (ver Figura 5). Dicha muestra se hace pasar a través de la precolumna de extracción, la cual está conectada directamente al detector del cromatógrafo. Mientras S se encuentre retenido por el adsorbente, el agua efluente se encontrará libre de soluto y dará una lectura de absorbancia igual a cero, después de cierto volumen (V_f), ocurre la fuga y S se encuentra en el agua efluente. La curva obtenida se muestra en la Figura 5, en condiciones ideales presenta forma bilogarítmica.

El volumen de fuga (V_f), se define como el volumen en el cual la absorbancia alcanza el 1% de A_0 y corresponde al volumen que puede ser preconcentrado sin pérdida significativa del analito de interés. El volumen de retención en agua grado cromatográfico (V_r) es el volumen donde está situado el punto de inflexión de la curva sigmoidal (corresponde al 50% de A_0) y el volumen correspondiente a la máxima cantidad preconcentrada (V_m) es considerada como 99% de A_0 . La zona sombreada corresponde a esta cantidad.

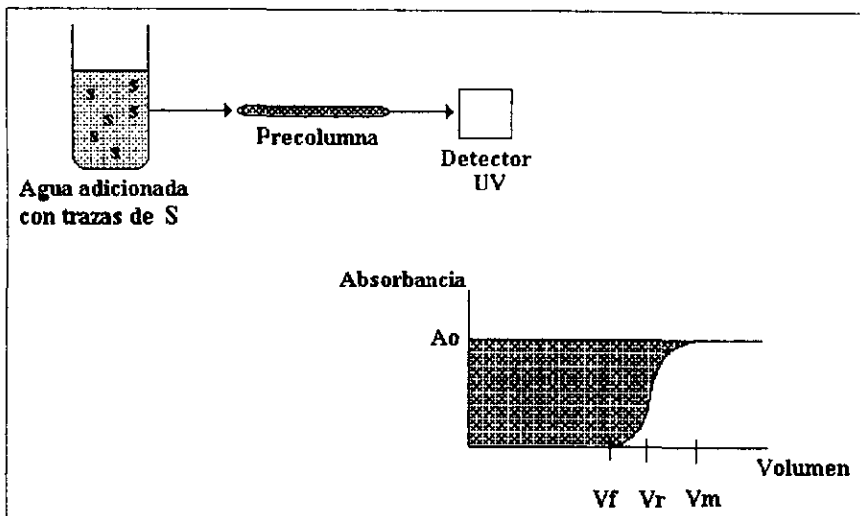


Figura 5. Determinación del volumen de fuga por análisis frontal. A_0 = absorbancia inicial; V_f = volumen de fuga; V_r = volumen de retención; V_m = Volumen correspondiente a la máxima cantidad preconcentrada; S = soluto de interés. El área sombreada representa la máxima cantidad que puede ser preconcentrada.

A pesar de que este método permite determinar el V_f de forma directa con el trazo de las curvas, tiene la desventaja de ser lento además de que sólo permite la determinación del V_f de un solo analito a la vez, y no todos los solutos presentan la forma ideal.

1.3.2.3.2. Rendimiento de extracción.

El rendimiento de extracción se define como la relación existente entre la cantidad extraída, con respecto a la cantidad total aplicada a la precolumna. Se obtienen rendimientos similares al 100 % cuando se trabaja con volúmenes de muestra iguales o menores a V_f ; de esta forma la cantidad adicionada es recuperada en su totalidad.

Un método rápido y sencillo que permite la estimación del rendimiento de extracción y el volumen de fuga de varios compuestos a la vez y que se realiza en las mismas condiciones que se emplean para el análisis cromatográfico consiste en la preconcentración y análisis de diferentes volúmenes de muestra, adicionados con una cantidad constante (C_p) de los analitos de interés. Se recomienda seleccionar un volumen pequeño (V_p) en el que la fuga no ocurra, (esto se puede verificar comparando las áreas de los picos correspondientes al volumen pequeño con las obtenidas por inyección directa de la misma cantidad de los analitos de interés) y posteriormente ir incrementando el volumen. No existe fuga mientras la cantidad concentrada permanezca constante y las áreas de los picos no se modifiquen. Una vez alcanzado el volumen de fuga, la cantidad extraída es menor a la cantidad aplicada y por consiguiente las áreas de los picos disminuyen.

El rendimiento se obtiene dividiendo el área o la altura de los picos obtenidos después de la preconcentración con aquellas obtenidas para el volumen donde la fuga no ocurre (V_p) o con las correspondientes a las inyecciones directas.

1.3.2.3.3. Selección del adsorbente y del disolvente de elución.

La selección del adsorbente adecuado depende del volumen de muestra así como de las propiedades de los compuestos que van a ser analizados (polares,

no polares, iónicos), mientras que la selección del disolvente de elución se basa en el mecanismo de separación involucrado en combinación con las propiedades del adsorbente seleccionado. En la Tabla 5 se resumen las características de los adsorbentes utilizados para el manejo de muestras acuosas.

Tabla 5. Propiedades de los adsorbentes usados en EFS. (Hennion y Scribe, 1993)

Adsorbente	Mecanismo de separación	Disolvente de elución	Compuestos extraíbles
Sílice unida a grupos alquilo (C8 y C18)	Fase inversa	Disolventes orgánicos (metanol y acetoneitrilo)	No polares Débilmente polares
Copolímeros apolares estireno-divinilbenceno	Fase inversa	Disolventes orgánicos (metanol y acetoneitrilo)	Aromáticos no polares a moderadamente polares
Carbón de grafito	Fase inversa	Disolventes orgánicos (metanol acetoneitrilo y THF)	No polares a relativamente polares
Intercambiadores de iones	Intercambio iónico	Agua (pH ajustado)	Compuestos orgánicos catiónicos y aniónicos (ajuste del pH de la muestra)
Adsorbentes cargados con metales	Intercambio de ligantes	Solución acuosa complejante	Compuestos orgánicos que formen complejos con metales

THF = Tetrahydrofurano

Los adsorbentes C8 y C18 son los más usados en EFS, cromatografía analítica y preparativa, son resistentes a la presión, no presentan adsorción

irreversible de los solutos, se obtiene reproducibilidad en la retención además de que se equilibran rápidamente con la fase móvil. Son estables en un intervalo de pH alrededor de 2-7.

CAPÍTULO 2. DESARROLLO EXPERIMENTAL

2.1. Equipos y reactivos.

El sistema cromatográfico

El sistema cromatográfico empleado está equipado con los siguientes módulos:

- Cromatógrafo de líquidos Perkin Elmer con bomba binaria modelo 250
- Detector UV /Vis programable Perkin Elmer modelo 785-A
- Programa: PE Nelson 900 , serie de la interface 950 A/ 970

La determinación de la longitud máxima de absorción se realizó con un detector de arreglo de diodos modelo Polychrom 9065 y su software de control y procesamiento de datos Varian Star Workstation, versión 4.5 1989-1996, Varian Associates , Inc., conectado a un cromatógrafo de líquidos Varian que consta de una bomba terciaria Varian modelo 9010.

- Columna analítica de acero inoxidable de 150 X 4.5 mm d.i. empacada con sílice "Nucleosil" C-18, con un tamaño de partícula de 5 μm .
- Precolumna de guardia de acero inoxidable Hichrom, de 13 X 4.5 mm d.i. empacada con sílice "Nucleosil" C-18, con un tamaño de partícula de 5 μm .

Sistema de preconcentración.

El sistema de preconcentración acoplado en línea con el sistema cromatográfico, se intercaló entre el inyector y la columna analítica (Figura 7), las conexiones se realizaron con tubería capilar de acero inoxidable.

El sistema consta de los siguientes accesorios:

- Válvula Rheodyne (Cotati , California), modelo 7000 de seis entradas y dos vías
- Bomba isocrática Eldex modelo CC-100-S.
- Precolumna de extracción de acero inoxidable Hichrom, de 13 X 4.5 mm d.i. empacada con sílice "Nucleosil" C-18, con un tamaño de partícula de 5 μm .

Otros equipos y accesorios empleados son:

- Purificador y desionizador de agua Modulab Analytical, (U.S.FILTER, USA.)
- Sistema de filtración por vacío (Sartorius)
- Membranas de Nylon (Cole Parmer, USA) de 47 mm diámetro y un tamaño de poro de 0.45 μm .
- Baño de ultrasonido para desgasificar soluciones y fase móvil Bransonic Mod. 1210.
- Jeringa Hamilton de 0-100 μL .

- Micropipeta de volumen variable 1-5 mL
- Micropipeta de volumen variable de 100-1000 μL
- Micropipeta de volumen variable de 10- 200 μL
- Balanza analítica

Disolventes y reactivos.

Se utilizó como disolvente orgánico metanol grado HPLC de EM SCIENCE (NJ,USA).

El agua grado cromatográfico que se utilizó en la preparación de la fase móvil y para el análisis de “blancos” y “controles”, se obtuvo a partir de agua destilada la cual se sometió a un tratamiento de ultrafiltración, seguido por un acabado con un lecho mixto desionizador y filtración a través de una membrana con un tamaño de poro de 0.22 μm , en el sistema Modulab Analytical. El agua obtenida cumple con los estándares de calidad propuestos por the American Society for Testing and Materials (ASTM) correspondientes del agua grado reactivo tipo I (Bidlingmeyer, 1992).

Los estándares de plaguicidas se compraron a ChemService. La pureza de los estándares individuales es del 99%.

2.1.1. Preparación de disoluciones estándar de plaguicidas.

Para la optimización de la preconcentración y el análisis, se preparó una solución estándar de cada uno de los plaguicidas a una concentración de 100

ppm, utilizando como disolvente metanol. También se preparó una solución que contenía a todos los plaguicidas a una concentración de 100 ppm. Dichas soluciones fueron almacenadas a una temperatura de 4°C.

Las soluciones de trabajo se prepararon haciendo diluciones de las soluciones estándar para obtener una concentración de 30 ppm.

2.1.2. Preparación de las muestras.

Para la preparación de las muestras se utilizó agua grado cromatográfico y agua potable de la red de distribución de Ciudad Universitaria. Las muestras de agua potable pueden contener partículas en suspensión, por lo cual es necesario desarrollar un paso de filtración previo al enriquecimiento de trazas. La filtración se realizó con una membrana de Nylon de 47 mm diámetro y un tamaño de poro de 0.45 μm acoplada a un sistema de filtración por vacío (Sartorius).

Se recomienda acondicionar la membrana con metanol durante 10 min., para activarla y posteriormente realizar un lavado con agua grado cromatográfico, de esta forma la membrana esta lista para recibir la muestra acuosa. Una vez que ya se ha filtrado la muestra, se realiza nuevamente un lavado con un pequeño volumen de metanol (las muestras no contienen al final más del 1% de metanol) para eluir a los compuestos que pudieran quedar adsorbidos en la membrana.

Este procedimiento se realizó tanto para las muestras adicionadas de agua grado cromatográfico como para las de agua potable.

2.2. Metodología.

El estudio experimental constó de dos etapas principalmente: La implementación de la separación analítica y la optimización de la preconcentración de acuerdo al diagrama que se muestra en la Figura 6.

2.2.1. Implementación de la separación analítica.

En esta primera etapa se seleccionaron las condiciones óptimas para la separación y detección de los plaguicidas. También se evaluaron algunos parámetros del sistema cromatográfico como son linealidad y límite de detección.

Se utilizó la técnica de cromatografía de fase inversa, ya que se tiene una fase estacionaria apolar, la elución se llevó a cabo con una fase móvil constituida por mezclas de metanol/agua, aunque pueden utilizarse otros disolventes orgánicos como el acetonitrilo.

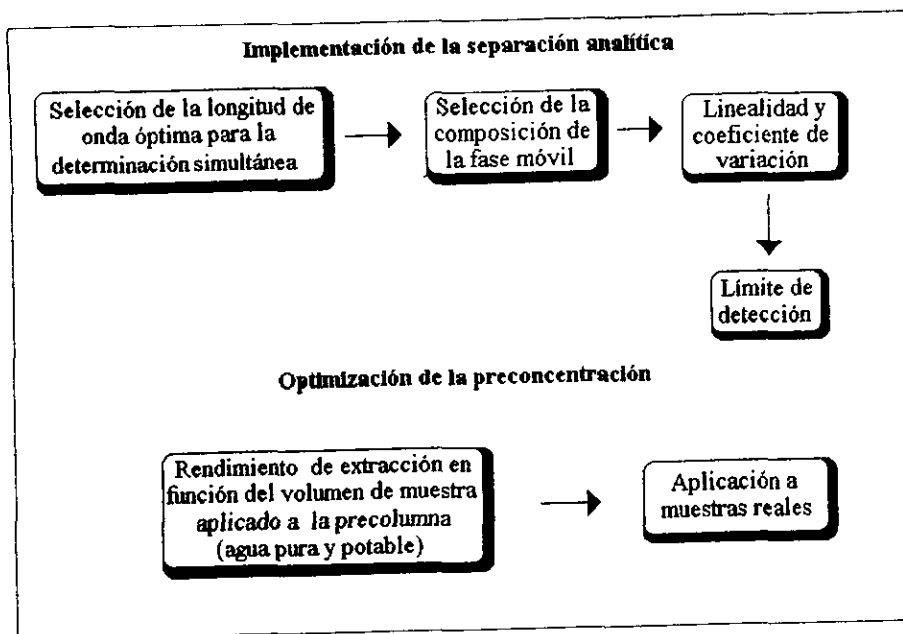


Figura 6. Diagrama general de la metodología

2.2.1.1. Determinación de la longitud de onda (λ) óptima para la detección simultánea.

La determinación de la longitud de onda máxima de absorción de los plaguicidas en estudio se realizó con un detector de arreglo de diodos conectado a un cromatógrafo, mediante la inyección de soluciones estándar de los plaguicidas a una concentración de 30 ppm.

2.2.1.2. Composición de la fase móvil.

La determinación de la composición de la fase móvil se apoyó en la elaboración de la curva del factor de capacidad o retención (k') en función del

porcentaje de metanol de la fase móvil (se trabajó con mezclas de metanol/agua). Se inyectaron individualmente las soluciones estándar de cada uno de los plaguicidas variando el porcentaje de metanol, en el intervalo de 90 a 60 %. El comportamiento de retención de los compuestos bajo estas condiciones ayudó a optimizar un gradiente que permitió la separación de los plaguicidas con la mejor resolución y el menor tiempo de análisis.

2.2.1.3. Linealidad, precisión y límite de detección del sistema cromatográfico

Una vez montada la separación analítica se realizó el estudio de la linealidad con soluciones estándar de la mezcla de los nueve plaguicidas a concentraciones 5, 10, 20, 30 ppm; cada solución se inyectó por triplicado y se calculó el coeficiente de correlación (r).

La precisión del sistema se evaluó, mediante el análisis por triplicado de una solución estándar que contenía a todos los plaguicidas a una concentración de 30 ppm. Con los datos obtenidos se calculó la media (\bar{x}), la desviación estándar (S) y el coeficiente de variación (C.V.).

El límite de detección del sistema cromatográfico se consideró como la concentración que dio una respuesta (altura del pico) 3 veces mayor al ruido de la línea de base.

2.2.2. Optimización de la preconcentración.

2.2.2.1. Descripción del montaje experimental para la preconcentración y análisis en línea de los plaguicidas.

El acoplamiento de la preconcentración al análisis cromatográfico se realizó conectando el inyector manual del cromatógrafo de líquidos (válvula de seis puertos) con otra similar que llamaremos válvula de preconcentración, utilizando tubería capilar.

La preconcentración se efectuó con el montaje experimental que se muestra en la Figura 7:

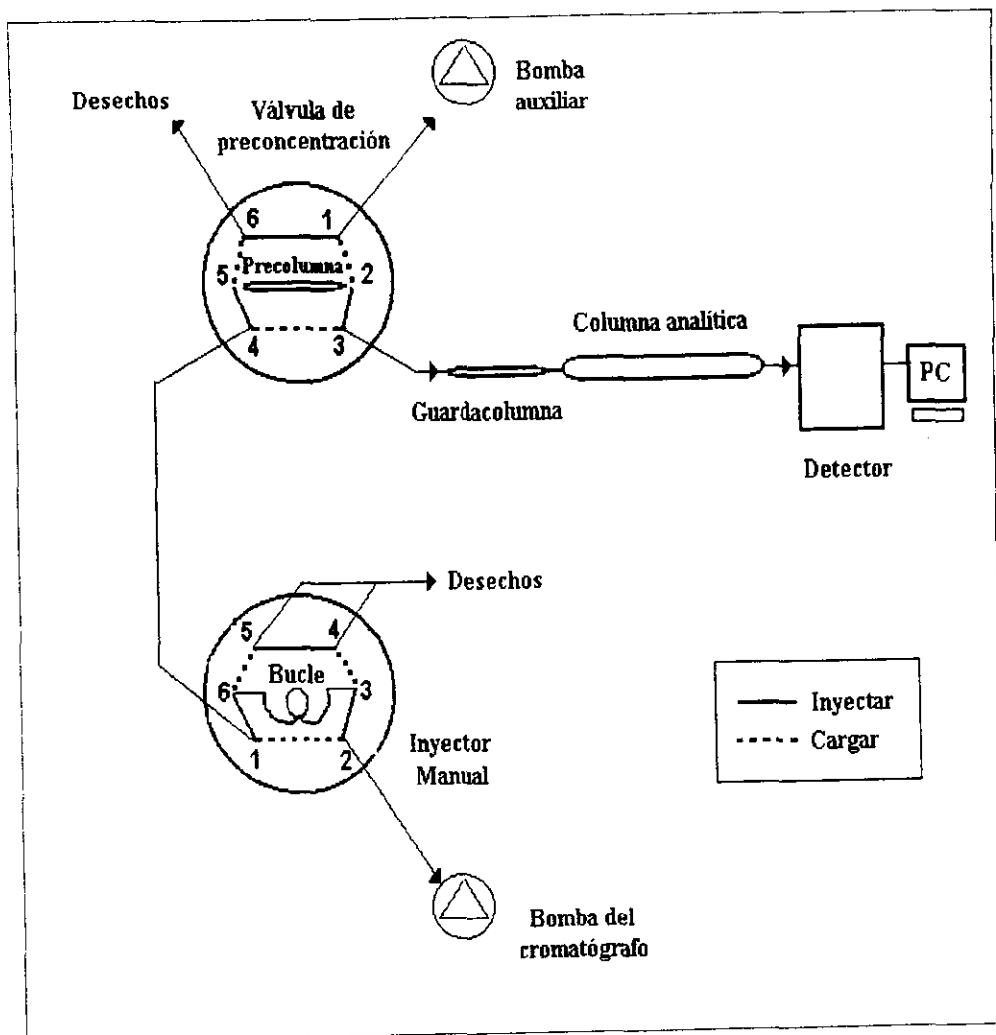


Figura 7. Montaje experimental de la preconcentración acoplada al análisis cromatográfico. Se utilizó una precolumna de 13 X 4.5 mm D.I. empacada con Nucleosil C-18, con un tamaño de partícula de 5 μ m.

En la siguiente tabla se muestra con detalle la posición en la que se encuentran conectados cada uno de los componentes del montaje experimental en las diferentes válvulas que se representan en la figura anterior.

Tabla 6. Descripción del acoplamiento de la preconcentración al análisis cromatográfico

Puerto	Válvula del cromatógrafo	Válvula de preconcentración
1	Válvula de preconcentración	Bomba auxiliar
2	Bomba del cromatógrafo	Precolumna de extracción
3	Bucle de inyección	Guardacolumna-columna analítica
4	Desechos	Válvula del cromatógrafo
5	Desechos	Precolumna de extracción
6	Bucle de inyección	Desechos

En la siguiente tabla se presentan la serie de operaciones que se pueden realizar con el montaje completo de preconcentración y análisis así como la posición que debe tener cada una de las válvulas en las diferentes operaciones.

Tabla 7. Operaciones realizadas con el montaje de preconcentración y análisis y descripción de la posición de las válvulas.

Paso	Operación	Bomba	Válvula	
			Preconcentración	Cromatógrafo
1	Acondicionamiento de la precolumna de extracción ^(a)	Preconcentración	Cargar	Cargar
2	Acondicionamiento de la columna analítica ^(b)	Cromatógrafo	Cargar	Cargar
3	Inyección directa de estándares de plaguicidas ^(c)	Cromatógrafo	Cargar	Inyectar

Paso	Operación	Bomba	Válvula	
			Preconcentración	Cromatógrafo
4	Aplicación de la muestra	Preconcentración	Cargar	Cargar
5	Lavado de la precolumna de extracción para eliminar interferencias ^(d)	Preconcentración	Cargar	Cargar
6	Elución y análisis ^(c)	Cromatógrafo	Inyectar	Cargar

^(a) Acondicionamiento con 5 mL de MeOH seguido por 10 mL de agua grado cromatográfico. Se puede realizar simultáneamente con el paso 2.; ^(b) Fase móvil MeOH / Agua 60:40. Se puede realizar simultáneamente con el paso 1; ^(c) Gradiente de elución MeOH / Agua; ^(d) 10 mL de agua grado cromatográfico

Con este montaje experimental se pueden realizar inyecciones directas de estándares mientras se esta realizando la aplicación de la muestra.

2.2.2.2. Rendimiento de extracción en agua grado cromatográfico y agua potable.

La determinación del rendimiento de extracción en función del volumen de muestra se realizó aplicando a través de la precolumna de extracción, diferentes volúmenes (50 a 500 mL) de agua grado cromatográfico y agua potable (de la red de distribución de Ciudad Universitaria), adicionados con una cantidad constante de 1 µg de los plaguicidas en estudio, la solución final no contenía más del 1% de metanol. El rendimiento de extracción se calculó comparando el área del pico obtenido de la preconcentración de una muestra de 50 mL con el área del pico obtenido al aplicar diferentes volúmenes a la

precolumna. Se demostró experimentalmente que con un volumen de 50 mL, no existe fuga de los analitos de interés ya que al preconcentrar esta solución el área de los picos es comparable con la que se obtiene al hacer una inyección directa de una solución estándar con la misma cantidad de los plaguicidas.

2.2.2.3. Precisión del método en agua grado cromatográfico y potable

La precisión del método involucra la preparación de la muestra y es por ello que se determinó en agua grado cromatográfico y en agua potable, mediante la preconcentración y análisis en línea de 3 muestras de 200 mL, adicionadas con $1\mu\text{g} / \text{L}$ de cada plaguicida. Cada muestra se analizó en forma independiente por el mismo analista y en las mismas condiciones de operación

2.2.2.4. Aplicación del protocolo de preconcentración y análisis, a diferentes muestras de agua potable comercial.

El protocolo completo de preconcentración y análisis se aplicó a diferentes muestras de agua comercial con la finalidad de evaluar el método. Los ensayos se efectuaron preconcentrando 200 mL de muestra sin adicionar y adicionada con plaguicidas en concentraciones de 1 y $0.5\mu\text{g} / \text{L}$. Estas muestras se filtraron previamente usando una membrana de Nylon con un tamaño de poro de $0.45\mu\text{m}$ acoplada a un sistema de filtración por vacío Sartorius, las membranas se acondicionaron antes de usar, con metanol

durante 10 min. y con agua. Al terminar la filtración se recomienda realizar nuevamente un lavado de la membrana con un pequeño volumen de metanol (1-2 mL) para eluir a los compuestos que pudieran quedar retenidos en ella.

La preconcentración y análisis de los plaguicidas utilizando la metodología que se muestra de manera global en el siguiente diagrama (Figura 8), se realiza aproximadamente en una hora y media.

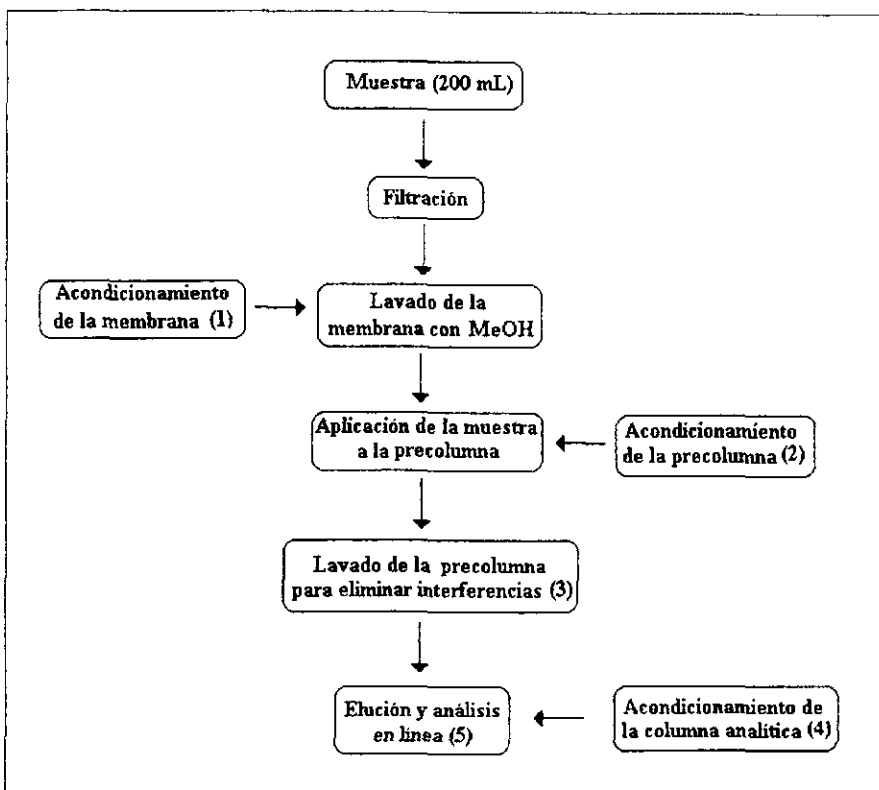


Figura 8. Diagrama de flujo de la metodología para el análisis y preconcentración en línea de los plaguicidas. MeOH = metanol; (1) metanol y agua durante 10 min.; (2) 5 mL de MeOH seguido por 10 mL de agua grado cromatográfico; (3) 10 mL de agua grado cromatográfico; (4) Fase móvil MeOH / Agua 60:40; (5) gradiente de elución MeOH/Agua

CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Implementación de la separación analítica.

3.1.1. Selección de la longitud de onda óptima para la detección simultánea.

El espectro de absorción en la región ultravioleta de los plaguicidas en estudio (ver Apéndice B), mostró que la mayoría de los compuestos presentan más de un máximo y una longitud de onda máxima de absorción (λ) común alrededor de los 200 nm (Tabla 8), sin embargo esta región no es muy selectiva, ya que también muchos otros compuestos pueden absorber incluyendo el metanol que se emplea como fase móvil, por esta razón se eligió una longitud de onda intermedia de 220 nm, ya que en estas condiciones la mayoría de los plaguicidas dan la misma respuesta, excepto el Malatión, el cual tiene una respuesta menor y además el metanol presenta menor absorción.

Tabla 8. Longitudes de onda de máxima de absorción en la región UV para los diferentes compuestos en estudio.

Plaguicida	λ(nm)
Metidatión	215
Paratión-metil	204 y 274.1
Malatión	200
Fenitrotión	200 y 269.4
Paratión	200 y 274.8
Fentión	200 y 250.1
Isofenfos	205 y 277
Clorpirifos-metil	200, 227.9 y 288.7
Clorpirifos	200, 228 y 288.8

3.1.2. Selección de la composición de la fase móvil

3.1.2.1. Optimización del gradiente de elución

Cuando se analizan muestras de agua superficial o potable, generalmente se observa la elución de un pico grande al inicio del cromatograma. Este pico, constituido probablemente por materia orgánica (ácidos húmicos y fúlvicos) que se encuentra disuelta en el agua y que no fue eliminada durante la etapa de limpieza interfiere en la detección de los compuestos más polares (Metidación, Paratión-metil), los cuales eluyen a tiempos de retención muy cortos. Por esta razón, es necesario optimizar un gradiente en el cual los compuestos más polares eluyan alrededor de los 10 minutos.

La variación de k' en función del porcentaje de metanol de la fase móvil que se presenta en la Figura 9, muestra claramente el orden de elución de los plaguicidas en estudio. Se aprecia que a un porcentaje de disolvente orgánico de 60% se obtiene la separación isocrática de todos los compuestos; sin embargo en estas condiciones los tiempos de retención para los compuestos menos polares (Clorpirifos y Clorpirifos-metil) son mayores a los 40 min., por lo cual no se recomienda realizar la separación en estas condiciones, siendo necesario optimizar un gradiente de elución para la separación.

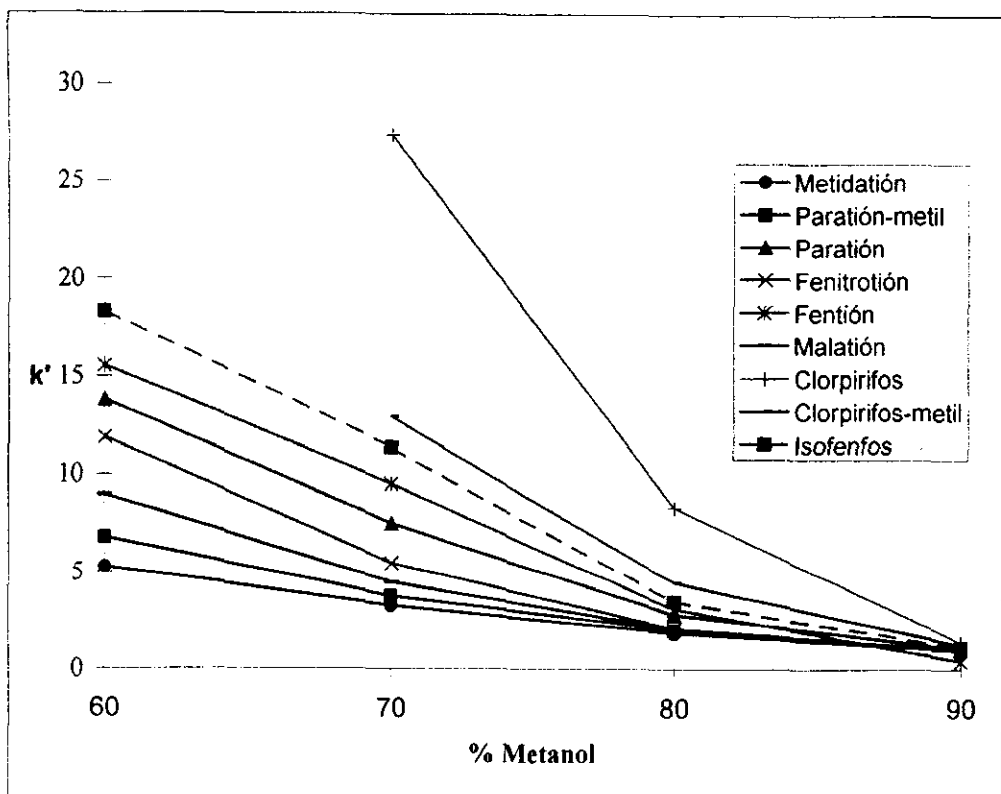


Figura 9. Curva de k' en función del % de metanol en la fase móvil. Columna de 150 x 46 mm d.i. empacada con Nucleosil C18, tamaño de partícula de 5 μm , flujo: 1 mL/min., detección UV a 220 nm, volumen de inyección, 20 μL .

El gradiente seleccionado fue el siguiente:

Condiciones	Tiempo (min.)	MeOH/Agua (v/v)
Elución isocrática	0-17	60:40
Gradiente lineal	17-35	60:40 a 90:10

Flujo: 1 mL/min

y su forma se representa en la Figura 10.

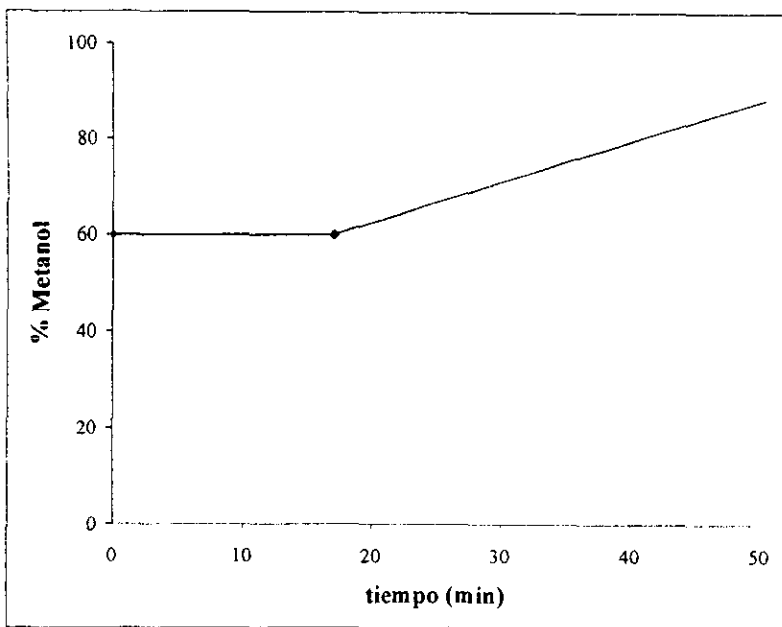


Figura 10. Perfil del gradiente de elución empleado para la separación de los plaguicidas en estudio

Con estas condiciones se logró la separación de los plaguicidas con buena resolución y en el menor tiempo de análisis. Además se evitó que los interferentes de la matriz enmascararan a los plaguicidas más polares como se puede observar en la Figura 11 que corresponde a la inyección directa de 20 μL de una solución de 30 ppm de los plaguicidas en estudio.

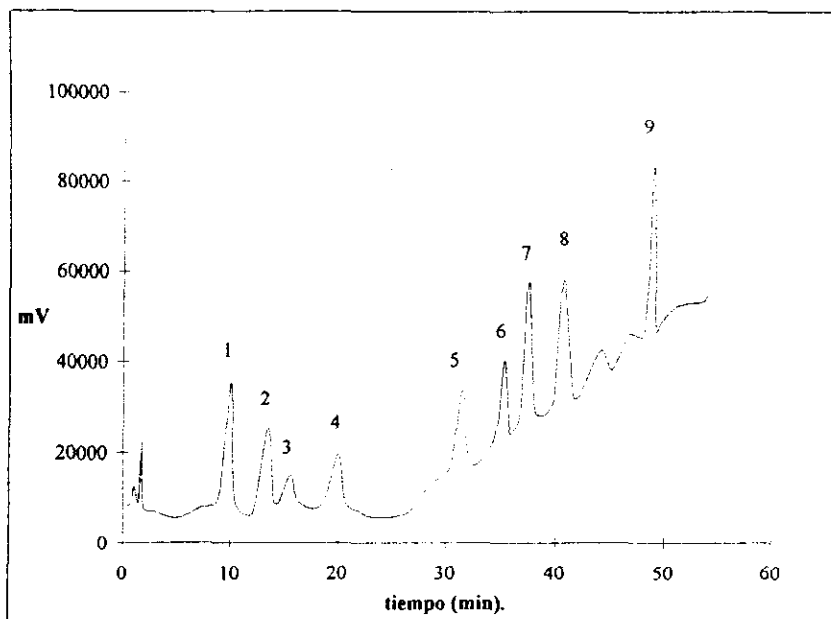


Figura 11. Inyección directa de 20 μL de una solución estándar de 30 ppm de los 9 plaguicidas en estudio; elución isocrática 17 min. 60% MeOH, gradiente lineal de 60% a 90% en 35 min.; Columna analítica de 150 x 4.5 mm d.i. empacada con Nucleosil C18, con un tamaño de partícula 5 μm ; flujo: 1 mL/min, detección UV a 220 nm. Identificación de los picos: 1= Metidación, 2= Paratión-metil, 3= Malatión, 4= Fenitrotión, 5= Paratión, 6= Fentión, 7= Isofenfos, 8= Clorpirifos-metil y 9= Clorpirifos

3.1.3. Linealidad y precisión del sistema cromatográfico

La linealidad es una medida del grado en que la curva de respuesta del detector (área del pico) en función de la concentración se aproxima a una línea recta. Este parámetro se evaluó para cada uno de los plaguicidas mediante la construcción de las curvas de respuesta del detector en función de la concentración, la línea recta que mejor ajustó a los puntos se determinó por regresión lineal en donde el coeficiente de correlación (r), para un caso ideal

debe ser igual a uno. Los coeficientes de correlación obtenidos para los plaguicidas se encuentran alrededor de 0.99 (ver Tabla 9), lo cual indica que este método es confiable en el intervalo de concentraciones seleccionado.

Las curvas de calibración de cada uno de los plaguicidas se muestran en el Apéndice C.

Tabla 9. Datos de curva de calibración.

Plaguicida	Coef. correlación (r)	a	b
Metidación	0.9950	25797	7087
Paratión-metil	0.9909	24088	11622
Malatión	0.9979	7078	789
Fenitrotión	0.9943	21035	3860
Paratión	0.9903	20215	42292
Fentión	0.9919	24895	49358
Isofenfos	0.9915	27850	8132
Clorpirifos-metil	0.9979	23998	3957
Clorpirifos	0.9973	35330	29483

Ecuación de regresión $y = bx - a$; a= ordenada al origen; b= pendiente; r= coeficiente de correlación

El término precisión se refiere al grado de concordancia entre los resultados individuales, obtenidos al analizar varias alícuotas de una solución homogénea y se expresa en términos del coeficiente de variación.

En la Tabla 10 se muestran los resultados obtenidos a partir de 3 inyecciones directas de 20 μL de una solución estándar que contenía a todos los plaguicidas a una concentración de 30 ppm (cantidad inyectada 600 ng)

Tabla 10. Precisión del sistema cromatográfico

Plaguicida	C.V.(%)
Metidatión	1.4
Paratión-metil	2.6
Malatión	5.6
Fenitrotión	3.6
Paratión	3.9
Fentión	3.4
Isofenfos	1.6
Clorpirifos-metil	0.4
Clorpirifos	1

C.V. = coeficiente de variación, C.V. = S/\bar{x} (100)

Los coeficientes de variación obtenidos son iguales o menores al 5.6 %, lo cual indica que el sistema es preciso.

3.1.4. Limite de detección del sistema cromatográfico.

Se obtuvo una respuesta (en altura del pico) 3 veces mayor al ruido de la línea de base, al inyectar 20 μL de una solución de 5 mg/L, para todos los plaguicidas, excepto el Malatión con una solución de 10 mg/L. De esta forma:

$$5 \text{ mg/L} = 5 \text{ ng}/\mu\text{L},$$

$$5 \text{ ng} \times 20 \mu\text{L} = 100 \text{ ng}$$

el limite de detección absoluto para los plaguicidas es de 100 ng inyectados y 200 ng para el Malatión, que como mencionamos anteriormente presenta una absorbancia menor en todo el rango del UV.

Es posible obtener límites de detección del sistema cromatográfico más bajos, cuando se trabaja a longitudes de onda específicas para cada compuesto

(Figura 12). Por ejemplo, la respuesta (alturas del pico) del Paratión-metil y el Paratión es aproximadamente del doble a 273 nm que a 220 nm, lo cual indica que podríamos disminuir el límite de detección a la mitad y aún así obtener picos de buen tamaño. Lo mismo sucede para el Fentión a 254 nm, y en menor medida para el Clorpirifos y Clorpirifos-metil a 287 nm.

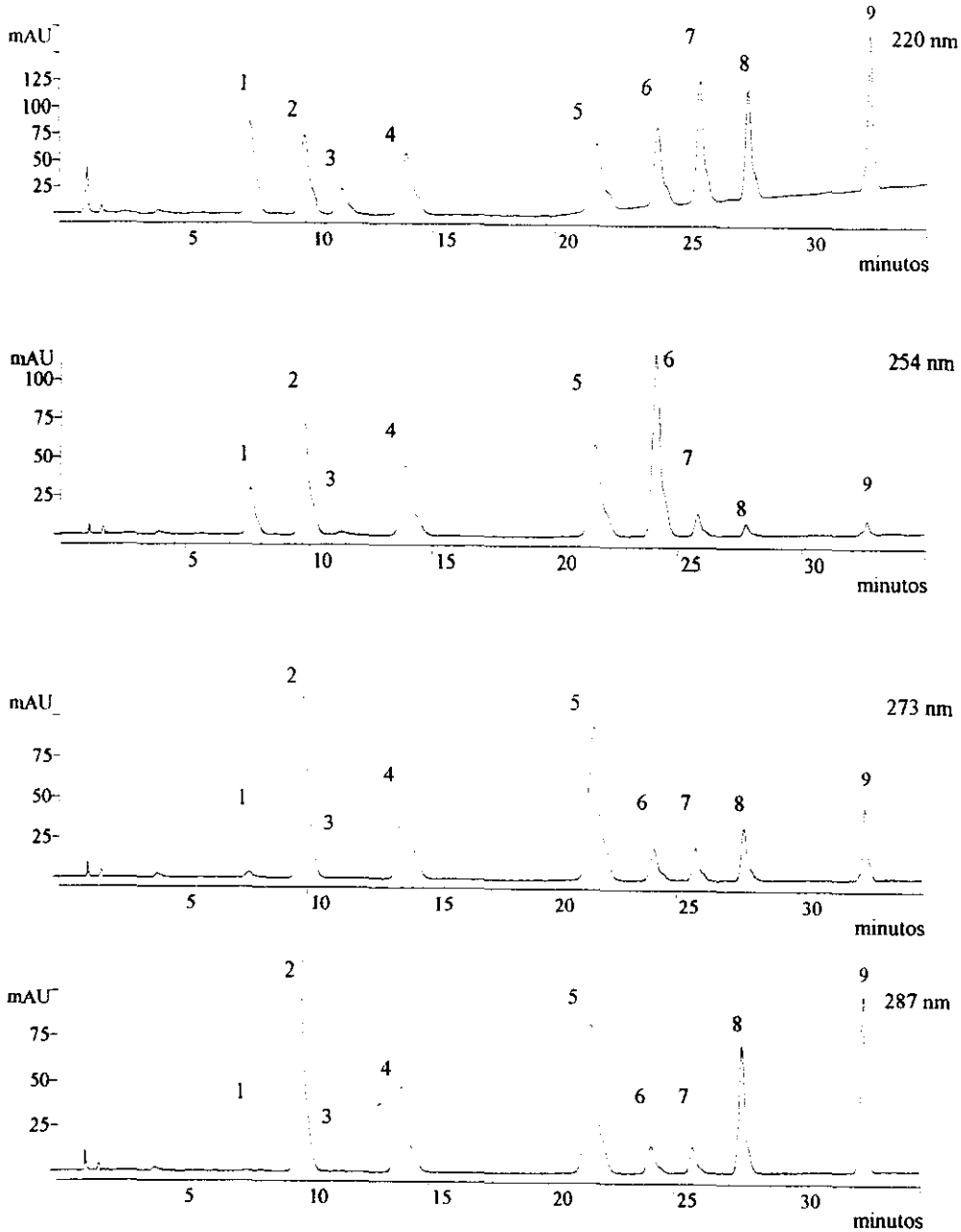


Figura 12. Cromatogramas obtenidos por inyección directa de 20 μ L de una solución estándar de 30 ppm de los 9 plaguicidas en estudio; detección UV, arreglo de diodos, a) 220 nm, b) 254 nm, c) 273 nm, d) 287; Identificación de los picos: 1= Metidati3n, 2= Parati3n-metil, 3= Malati3n, 4= Fenitroti3n, 5= Parati3n, 6= Fenti3n, 7= Isofenfos, 8= Clorpirifos-metil y 9= Clorpirifos

3.2. Optimización de la preconcentración

3.2.1. Determinación del rendimiento de extracción en agua grado cromatográfico y en agua potable

La optimización de la preconcentración se efectuó mediante el estudio de la determinación del rendimiento de extracción en función del volumen de muestra, en agua grado cromatográfico y en agua potable de la red de distribución de Ciudad Universitaria.

El volumen de muestra que se puede aplicar a la precolumna se encuentra íntimamente ligado con el rendimiento de extracción ya que conforme aumenta el volumen de la muestra se llega a un punto en el que los compuestos que pasan por la precolumna ya no son retenidos por el adsorbente (volumen de fuga), y si se trabaja a volúmenes mayores, el rendimiento obtenido es menor al 100%. Mientras no se llegue al volumen de fuga, la cantidad preconcentrada de cada analito es similar a la cantidad aplicada a la precolumna, y por lo tanto las áreas de los picos obtenidos son iguales a los obtenidos por inyección directa de la misma cantidad, una vez alcanzado el volumen de fuga, las áreas de los picos disminuyen.

En el estudio se eligió el volumen de 50 mL adicionado con 1 μg de plaguicidas como referencia, ya que se comprobó experimentalmente que al preconcentrar esta solución el área de los picos es comparable con la que se obtiene al hacer una inyección directa de la misma cantidad de los plaguicidas.

Se aplicaron hasta 500 mL de agua adicionada con 1µg de cada plaguicida, teniendo rendimientos muy cercanos al 100% para todos los plaguicidas (Tabla 11 y Figura 13 a) incluyendo los más polares. La precolumna de extracción es reutilizable siempre y cuando se regenere cada vez con metanol, sin embargo después de seis meses de uso diario, se observó que los plaguicidas más polares del grupo (Metidati3n y Parati3n-metil), se fugaban de la precolumna de extracci3n a partir de los 200 mL (Figura 13 b). Por lo tanto es aconsejable revisar los rendimientos de extracci3n peri3dicamente, o por lo menos cada tres meses, si la precolumna se utiliza diariamente.

Tabla 11. Rendimiento de extracci3n en diferentes vol3menes de agua grado cromatogr3fico y potable, aplicados en la precolumna de extracci3n.

Compuesto	Rendimiento (%) agua grado cromatogr3fico				Rendimiento (%) agua potable		
	100 mL	200 mL	300 mL	500 mL	100 mL	200 mL	300 mL
Metidati3n	99	99	99	100	99	100	99
Parati3n-metil	97	100	102	101	102	100	100
Malati3n	99	100	99	100	103	104	101
Fenitroti3n	98	99	105	99	100	99	99
Parati3n	100	102	103	102	100	101	102
Fenti3n	100	106	100	106	100	100	100
Isofenfos	99	100	103	100	99	100	99
Clorpirifos-metil	100	100	107	100	101	100	100
Clorpirifos	105	106	99	106	104	99	101

Precolumna de 13 X 4.5 mm d.i. empacada con Nucleosil C-18, tama3o de part3cula de 5 µm; columna anal3tica de 150 x 4.5 mm d.i. empacada con Nucleosil C18, tama3o de part3cula de 5 µm, fase m3vil metanol-agua, gradiente 17 min. 60% MeOH, 60 % a 90 % en 35 min.; flujo: 1 mL/min, detecci3n UV a 220 nm.

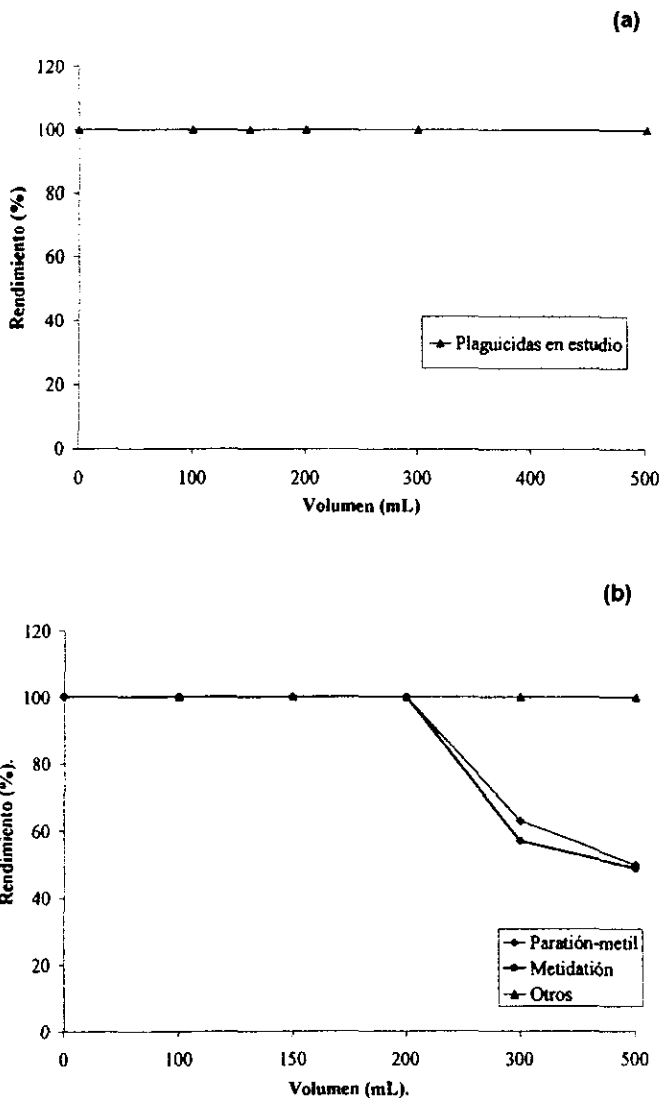


Figura 13. Rendimientos de extracción promedio, obtenidos al preconcentrar diferentes volúmenes de agua grado cromatográfico adicionados con 1 µg de los plaguicidas en estudio. (a) Precolumna nueva y con tres meses de uso diario. (b) Precolumna con seis meses de uso diario. Condiciones igual que en Tabla 11.

Para la preconcentración de las muestras de agua, se consideró que un volumen de 200 mL sería adecuado, ya que se puede determinar sin problemas hasta una concentración de 0.5 µg/L, para cada plaguicida excepto el Malatión con 1 µg/L, (el cálculo teórico de esta concentración se realiza a partir del límite de detección absoluto; así, si tenemos $100 \text{ ng} / 200 \text{ mL} = 0.5 \text{ ng/mL} = 0.5 \text{ µg/L}$). Este límite de detección del método es suficiente para controlar a los plaguicidas en sus niveles admisibles para la salud (NAS) establecidos para cada uno, considerando su toxicidad por la USEPA. El plaguicida más tóxico de los estudiados en este trabajo es el Paratión-metil y su NAS es de 2 µg/L (4 veces mayor que el límite de detección).

Si se aplicara una muestra de 500 mL, se podría detectar hasta 0.2 µg / L de cada compuesto y 0.4 µg / L para el Malatión

Los rendimientos obtenidos en agua potable fueron similares a los obtenidos con agua grado cromatográfico (ver Tabla 11) siempre y cuando, previamente a la aplicación en la precolumna, se filtre la muestra en una membrana millipore de 0.45 µm y se eluyan los compuestos adsorbidos en ella, con un pequeño volumen de metanol (1 o 2 mL, cuando se trabajan 200 mL de muestra). De no realizar esta operación, los rendimientos pueden disminuir hasta un 20 % con agua potable.

3.2.2. Precisión del método en agua grado cromatográfico y potable

La precisión de un método analítico es el grado de concordancia entre los resultados analíticos individuales cuando el procedimiento completo (preconcentración y análisis) se aplica repetidamente a una muestra bajo las mismas condiciones de operación y por el mismo analista.

La precisión del sistema se diferencia de la precisión del método en cuanto a que esta última considera a la preparación de la muestra.

En la Tabla 12 se muestran los resultados obtenidos al analizar 3 muestras de 200 mL de agua grado cromatográfico y potable de la red de distribución de Ciudad Universitaria, cada una adicionada con 1 µg de los plaguicidas en estudio.

Tabla 12. Precisión del método en agua grado cromatográfico y en agua potable.

Plaguicida	C.V. (%)	
	agua grado cromatográfico	agua potable
Metidación	1.8	3.3
Paratión-metil	2.6	6.2
Malatión	4.3	5.9
Fenitrotión	3.8	6.4
Paratión	2.2	4.1
Fentión	3.5	4.5
Isofenfos	3.1	5.2
Clorpirifos-metil	2.3	4.8
Clorpirifos	1.4	1.7

Como se observa los coeficientes de variación son inferiores al 6.5 %, por lo cual se considera que el método es preciso.

3.2.3. Aplicación del protocolo de análisis y preconcentración a diferentes muestras de agua potable comercial.

El protocolo completo de preconcentración y análisis fue aplicado a diferentes muestras de agua potable comercial (Electropura, Santa María y Bonafont), con la finalidad de demostrar la capacidad del método para determinar a los plaguicidas estudiados a nivel de trazas en diferentes matrices de agua potable.

Se trabajaron 200 mL de muestra adicionada con estándares a concentraciones trazas (1 µg/L) y sin adicionar (blanco). También se trabajó una muestra “control” de agua grado cromatográfico adicionada con estándares (1 µg/L) por cada muestra de agua comercial. La Figura 14 presenta el cromatograma obtenido de la preconcentración de 200 mL de agua grado cromatográfico adicionada con plaguicidas (control).

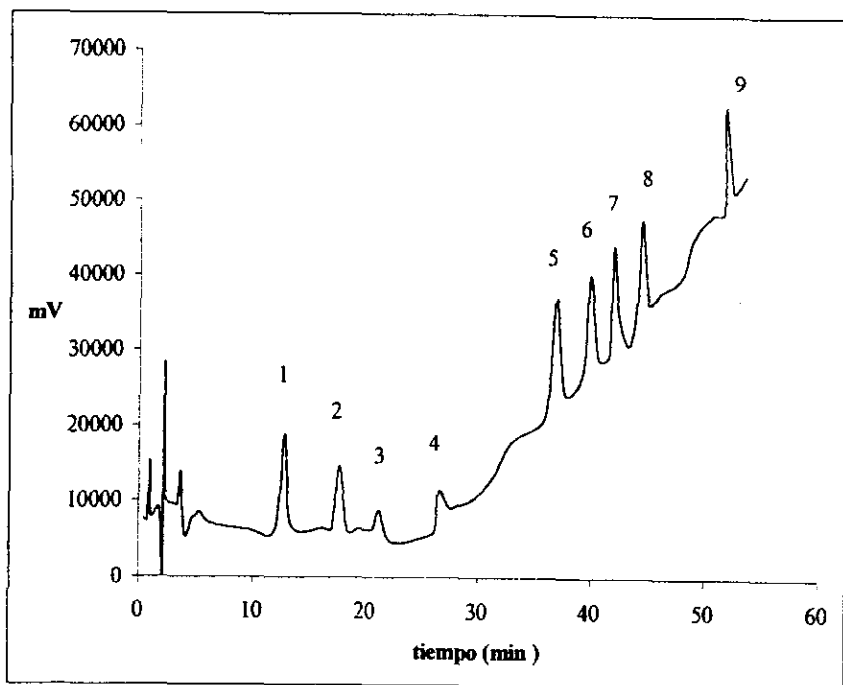


Figura 14. Preconcentración en línea de 200 mL de agua grado cromatográfico adicionada con estándares de plaguicidas a una concentración de 1 ppb (control). Precolumna de 13 X 4.5 mm d.i. empacada con Nucleosil C-18. Condiciones de análisis e identificación de los picos igual que en Figura 11.

En la Figura 15, Figura 16, y Figura 17, se muestran los cromatogramas correspondiente al análisis de 200 mL de agua comercial (Electrapura, Santa María y Bonafont) adicionadas con estándares y sin adicionar.

Se aprecia que las muestras de agua comercial adicionada y la muestra "control" presentan el mismo perfil de elución, salvo por el pico de los interferentes que sólo aparece en las muestras de agua comercial con un tiempo de retención menor a 10 min., el cual no causa interferencia con los picos de los compuestos más polares que aparecen después de este tiempo.

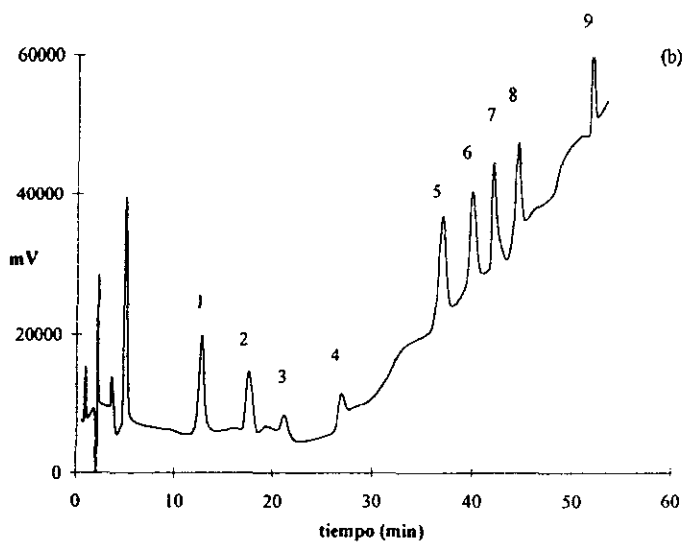
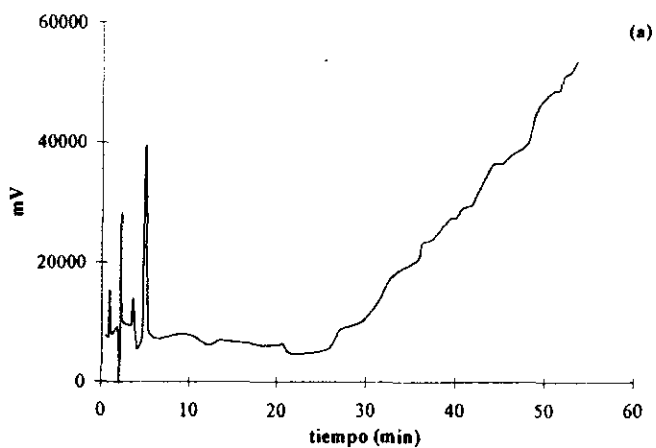


Figura 15. Preconcentración en línea de 200 mL de agua comercial (Electropura) (a) sin adicionar, (b) adicionada con estándares de plaguicidas a una concentración de 1 ppb. Precolumna de 13 X 4.5 mm d.i. empacada con Nucleosil C-18. Condiciones de análisis e identificación de los picos igual que en Figura 11.

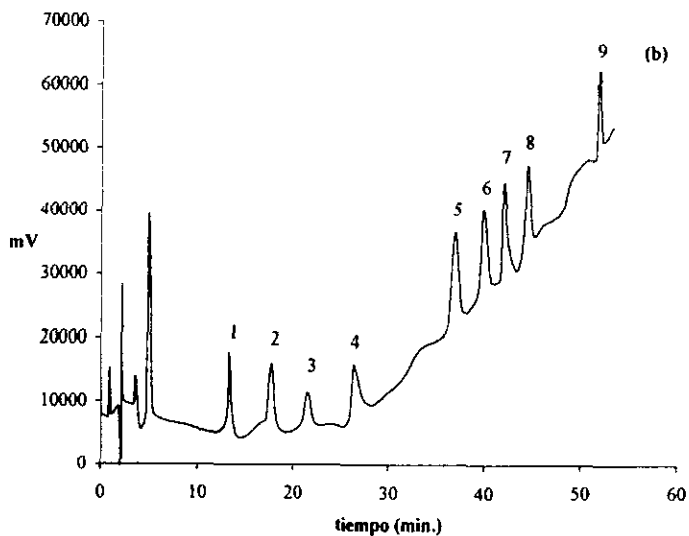
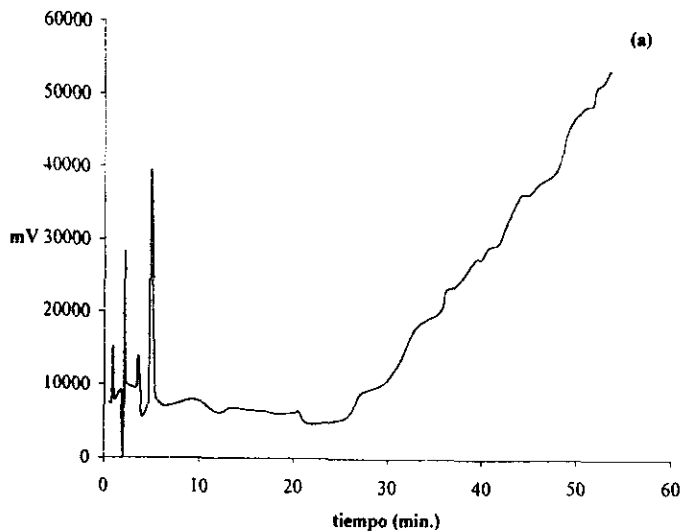


Figura 16. Preconcentración en línea de 200 mL de agua comercial (Santa María) (a) sin adicionar, (b) adicionada con estándares de plaguicidas a una concentración de 1 ppb. Precolumna de 13 X 4.5 mm d.i. empacada con Nucleosil C-18. Condiciones de análisis e identificación de los picos igual que en Figura 11.

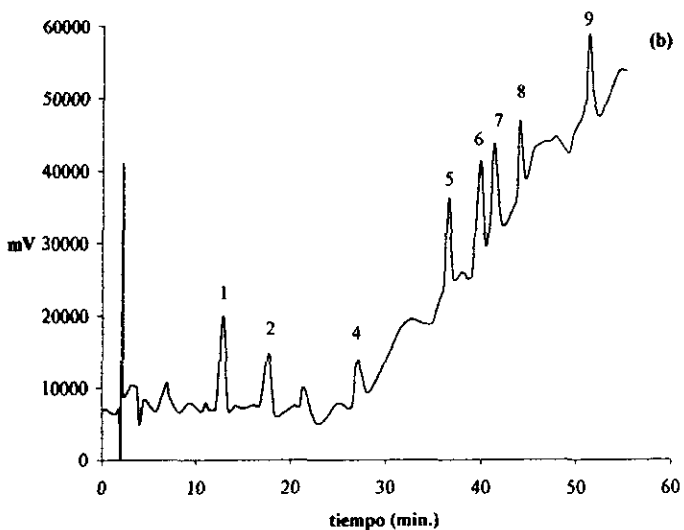
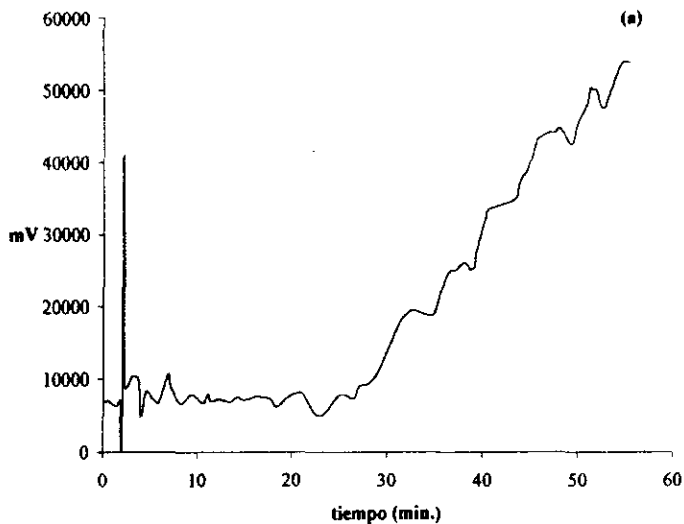


Figura 17. Preconcentración en línea de 200 mL de agua comercial (Bonafont) (a) sin adicionar, (b) adicionada con estándares de plaguicidas a una concentración de 1 ppb. Precolumna de 13 X 4.5 mm d.i. empacada con Nucleosil C-18. Condiciones de análisis e identificación de los picos igual que en Figura 11.

Los picos de los plaguicidas se observan de buen tamaño con $1 \mu\text{g/L}$ preconcentrados, e igualmente con una concentración más baja como se puede observar a continuación en la Figura 18, que corresponde al cromatograma obtenido de la preconcentración de 200 mL de agua comercial adicionada con $0.5 \mu\text{g/L}$ (cerca del límite de detección). Se observa que los picos se diferencian fácilmente del ruido de la línea base.

En ninguna de las muestras de agua comercial sin adicionar se detectó la presencia de los plaguicidas estudiados.

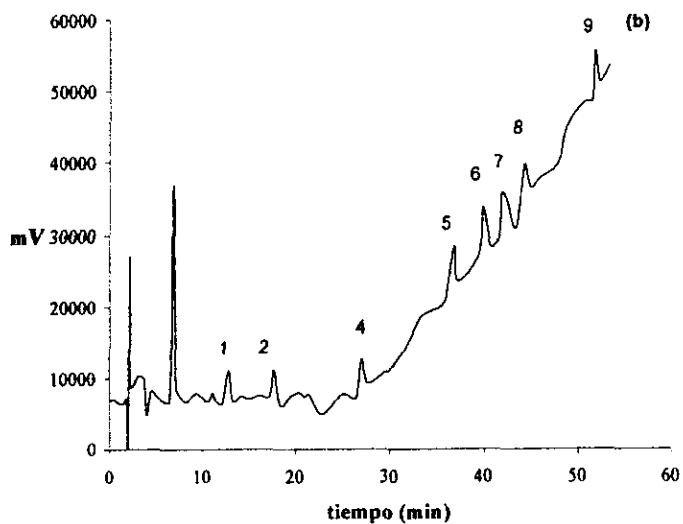
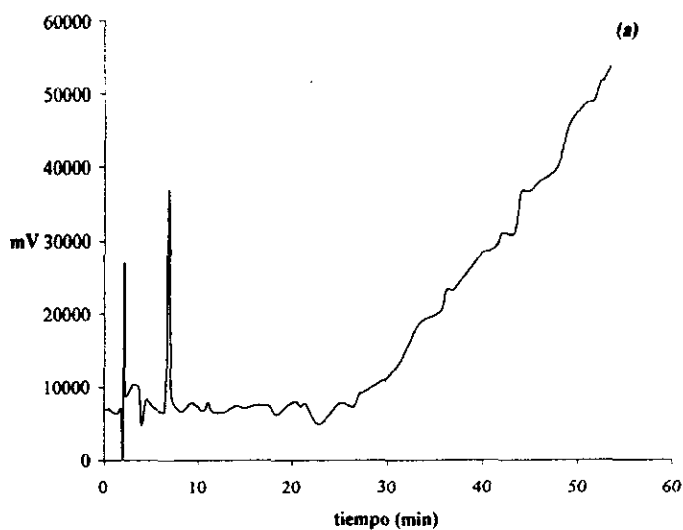


Figura 18. Preconcentración en línea de 200 mL de agua comercial (a) sin adicionar, (b) adicionada con estándares de plaguicidas a una concentración de 0.5 ppb. Precolumna de 13 X 4.5 mm d.i. empacada con Nucleosil C-18. Condiciones de análisis e identificación de los picos igual que en Figura 11.

CAPÍTULO 4. CONCLUSIONES

La determinación de los plaguicidas organofosforados a nivel de trazas puede realizarse por Cromatografía de líquidos de Alta Eficiencia (CLAE) en fase inversa con detección UV, utilizando el acoplamiento en línea de la preconcentración al análisis cromatográfico. Esta estrategia permitió contrarrestar la limitación de la detección UV, menos sensible con respecto a la detección específica Nitrógeno-Fósforo utilizada en cromatografía de gases.

El empleo de la "tecnología de precolumnas" permitió minimizar considerablemente la manipulación de la muestra y con ello el riesgo de contaminación o pérdidas durante la etapa de preparación de la muestra. Además, se obtuvieron resultados exactos (el rendimiento de extracción obtenido es aproximadamente del 100 %), precisos (los coeficientes de variación obtenidos son menores al 6.5 %) y se desarrolló un método sensible ya que los límites de detección obtenidos (0.2 a 0.4 $\mu\text{g/L}$) son comparables con los que se reportan en el método 8140 de la USEPA (0.3 $\mu\text{g/L}$), suficiente para poder controlar a estos plaguicidas en sus niveles tóxicos.

El método demostró ser simple y rápido, ya que la preconcentración y el análisis se llevan a cabo aproximadamente en una hora y media. Es de bajo costo, la precolumna de extracción puede utilizarse varias veces (su vida se

prolonga aproximadamente hasta seis meses de uso diario); además de que su adaptabilidad para el manejo de muestras acuosas es un indicio de que podría aplicarse a otros tipos de aguas como las subterráneas o las superficiales, donde los plaguicidas pueden presentarse con mayor incidencia. Esto facilitaría los programas de monitoreo ambiental necesarios para el control y seguimiento de contaminantes.

Por lo tanto, a continuación se presentan algunas recomendaciones para darle seguimiento a esta línea de investigación.

- Obtener las curvas de calibración para cada uno de los compuestos, utilizando el protocolo completo de preconcentración y análisis.
- Realizar la validación del método de tal forma que quede establecido en forma documentada y por estudios de laboratorio que la capacidad del método satisface los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas.
- Realizar un muestreo formal para la aplicación del método al agua potable existente en el Distrito Federal y otros estados de la República Mexicana, principalmente en aquellos que tengan posibilidades de estar contaminados, y donde las fuentes de distribución se encuentren cercanas a zonas agrícolas.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- Considerando que los plaguicidas organofosforados no son muy persistentes y pueden degradarse para dar origen a productos más tóxicos, es importante desarrollar metodologías de análisis que sean capaces de determinar a los plaguicidas y a sus productos de degradación.
- En el presente trabajo se presentó una propuesta para el análisis de nueve plaguicidas organofosforados en agua potable, estos plaguicidas son muy usados en nuestro país, aunque también es importante considerar que en las zonas agrícolas se usan una gran variedad de compuestos siendo de suma importancia continuar con el desarrollo de nuevas metodologías de análisis que los contemplen.

BIBLIOGRAFÍA

Albert, L. 1991. Los plaguicidas el ambiente y la salud. Centro de Ecodesarrollo. México D.F.

Barceló, D. 1993. *Official Methods of analysis of priority pesticides in water using gas chromatographic techniques.* Environmental Analysis: techniques, applications and quality assurance. Barceló, D. Elsevier Science Publishers. Amsterdam, The Netherlands. Vol.13, Pp. 149-178.

Beltrán, J., López, F., y Hernández, F. 1993. Solid-phase extraction of pesticides residues from ground water: Comparison between extraction cartridges y extraction discs. *Anal. Chimica Acta*, 283:297-303.

Bidlingmeyer, B. 1992. *Practical HPLC methodology y applications.* 1a Ed., John Wiley & Sons, Inc. N.Y., E.U.A Pp. 85-94, 224-242 y 252-257

Carabia, R. y Rodríguez, E. 1992. Sensitive method for the determination of organophosphorus pesticides in fruits and surface waters by high-performance liquid chromatography with UV detection. *J. Chromatography*, 607:37-45.

CICOPLAFEST. 1997. Catálogo oficial de plaguicidas. Sagar. México, D.F.

Coquart, V. y Hennion, M. C. 1991. Interference removal in the organic trace-level analysis of aqueous environmental samples by on-line liquid chromatographic preconcentration techniques with two precolumns *J. Chromatography*, 553:329-343.

Coquart, V., García-Camacho, P., y Hennion, M.C. 1993. Trace level determination of hydroxyatrazine y dealkylated degradation products of atrazine in water. *J. Environm. Anal. Chem.*, 52:100-112.

Driss, M., Hennion, M. C., y Bouguerra, M.L. 1993. Determination of Carbaryl y some organophosphorus pesticides in drinking water using on-line chromatographic preconcentration techniques. *J. Chromatography*, 639:352-358.

Johnson, W., Fendinger, N., y Plimmer, J. 1991. Solid-phase Extraction of Pesticides from Water: Possible Interferences from Dissolved Organic Material. *Anal. Chem.*, 63:1510-1513.

Hennion, M.C. y Scribe, P. 1993. *Environmental Analysis: techniques, applications and quality assurance.* Barceló, D. Elsevier Science Publishers. Amsterdam, The Netherlands. Vol.13, Pp. 23-77.

Keith, L., Mueller, W. y Smith, D. 1991. Compilation of E.P.A.'s Sampling and Analisis Methods. Lewis Publishers.E.U. Pp. 487-611.

Lacorte, S. y Barceló, D. 1994. Validation of an automated precolumn exchange system (PROSPEKT) coupled to liquid chromatography with diode array detection. Application to the determination of pesticides in natural waters. *Anal. Chimica Acta*, 296:223-234.

Lacorte, S. y Barceló, D. 1996. Improvements in the determination of organophosphorus pesticides in ground and wastewater samples from interlaboratory studies by automated on-line liquid-solid extraction followed by liquid chromatography with diode array detection. *J. Chromatography A*,725:85-92

Lacorte, S.,Vreuls, J., y Barceló, D. 1998. Monitoring of pesticides in river using fully automated on-line solid-phase extraction and liquid chromatography with diode array detection with a novel filtration device. *J. Chromatography, A* 795:71-82.

Pichon,V. y Hennion, M. C. 1994. Determination of pesticides in environmental waters by automated on-line trace-enrichment y liquid chromatography. *J. Chromatography, A* 665:269-285.

Pichon,V. Y Charpak, M. 1998. Multiresidue analysis using new laminar extraction disk and liquid cromatography and application to French priority list. *J. Chromatography, A* 795:83-92

Psathaki, M. Manoussaridou, E. y Stephanou, G. 1994. Determination of organophosphorus and triazine pesticides in ground and drinking waters by solid-phase extraction and gas cromatography with nitrogen-phosphorus detection. *J. Chromatography A* 667:241-248.

Restrepo, I. 1992. Los plaguicidas en México. Comisión Nacional de Derechos Humanos, México D.F. México.

Stan, H.-J. 1995 Analysis of pesticides in ground y Surface Water II,Chemistry of Plant Protection, vol. 12, Ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany.

Skoog, D. y Leary, J. 1991. Análisis Instrumental. 4ª Ed. McGraw-Hill, Pp. 667-700, 731-774. México, D.F. México

Willard, H., Merrit, L. y Dean, J. 1991. Métodos Instrumentales de Análisis. Grupo Editorial Iberoamérica. Pp. 505-530, 569-601. México, D.F. México.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Separación de una mezcla de tres componentes por cromatografía	21
Figura 2. Esquema de los componentes básicos de un cromatógrafo de líquidos de alta eficiencia	28
Figura 3. Descripción del proceso de extracción en fase sólida en diferido (off-line) en un cartucho empacado con sílice C18	34
Figura 4. Montaje experimental del acoplamiento en línea de la EFS al análisis cromatográfico	35
Figura 5. Determinación del volumen de fuga por análisis frontal	40
Figura 6. Diagrama general de la metodología	49
Figura 7. Montaje experimental de la preconcentración acoplada al análisis cromatográfico	52
Figura 8. Diagrama de flujo de la metodología para el análisis y preconcentración en línea de los plaguicidas	56
Figura 9. Curva de k' en función del % de metanol en la fase móvil	59
Figura 10. Perfil del gradiente de elución empleado para la separación de los plaguicidas en estudio	60
Figura 11. Inyección directa de 20 μL de una solución estándar de 30 ppm de los 9 plaguicidas en estudio	61
Figura 12. Cromatogramas obtenidos por inyección directa de 20 μL de una solución estándar de 30 ppm de los 9 plaguicidas en estudio	65
Figura 13. Rendimientos de extracción promedio, obtenidos al preconcentrar diferentes volúmenes de agua grado cromatográfico adicionados con 1 μg de los plaguicidas en estudio. (a) Precolumna nueva y con tres meses de uso diario. (b) Precolumna con seis meses de uso diario	68
Figura 14. Preconcentración en línea de 200 mL de agua grado cromatográfico adicionada con estándares de plaguicidas a una concentración de 1 ppb (control)	72
Figura 15. Preconcentración en línea de 200 mL de agua comercial (Electropura) (a) sin adicionar, (b) adicionada con estándares de plaguicidas a una concentración de 1 ppb	73

Figura 16. Preconcentración en línea de 200 mL de agua comercial (Santa María) (a) sin adicionar, (b) adicionada con estándares de plaguicidas a una concentración de 1 ppb.....	74
Figura 17. Preconcentración en línea de 200 mL de agua comercial (Bonafont) (a) sin adicionar, (b) adicionada con estándares de plaguicidas a una concentración de 1 ppb.....	75
Figura 18. Preconcentración en línea de 200 mL de agua comercial (a) sin adicionar, (b) adicionada con estándares de plaguicidas a una concentración de 0.5 ppb.....	77

LISTA DE TABLAS

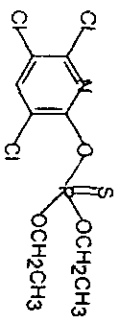
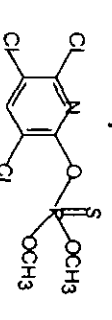
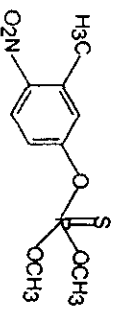
Tabla 1. Toxicidad aguda e Ingesta Diaria Admisible (IDA) de los plaguicidas organofosforados estudiados en este trabajo	15
Tabla 2. Características de algunos procedimientos utilizados para la determinación de diversos plaguicidas, entre los cuales se encuentran organofosforados.....	18
Tabla 3. Principales técnicas de Cromatografía de Líquidos	28
Tabla 4. Aplicaciones de la cromatografía de fase enlazada. (Skoog, 1991) ..	30
Tabla 5. Propiedades de los adsorbentes usados en EFS. (Hennion y Scribe, 1993).....	42
Tabla 6. Descripción del acoplamiento de la preconcentración al análisis cromatográfico.....	53
Tabla 7. Operaciones realizadas con el montaje de preconcentración y análisis y descripción de la posición de las válvulas.....	53
Tabla 8. Longitudes de onda de máxima de absorción en la región UV para los diferentes compuestos en estudio.....	57
Tabla 9. Datos de curva de calibración.....	62
Tabla 10. Precisión del sistema cromatográfico	63
Tabla 11. Rendimiento de extracción en diferentes volúmenes de agua grado cromatográfico y potable, aplicados en la precolumna de extracción.....	67
Tabla 12. Precisión del método en agua grado cromatográfico y en agua potable.....	70

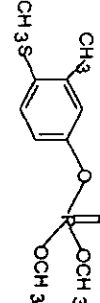
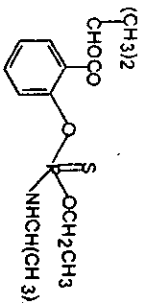
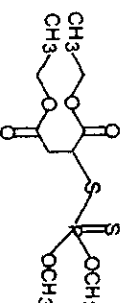
Figura 16. Preconcentración en línea de 200 mL de agua comercial (Santa María) (a) sin adicionar, (b) adicionada con estándares de plaguicidas a una concentración de 1 ppb.....	74
Figura 17. Preconcentración en línea de 200 mL de agua comercial (Bonafont) (a) sin adicionar, (b) adicionada con estándares de plaguicidas a una concentración de 1 ppb.....	75
Figura 18. Preconcentración en línea de 200 mL de agua comercial (a) sin adicionar, (b) adicionada con estándares de plaguicidas a una concentración de 0.5 ppb.....	77

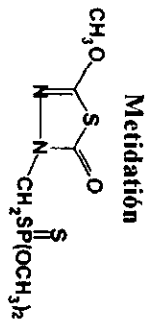
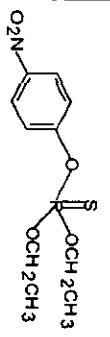
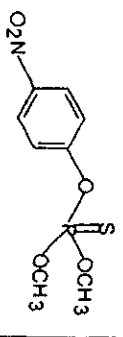
LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Toxicidad aguda e Ingesta Diaria Admisible (IDA) de los plaguicidas organofosforados estudiados en este trabajo	15
Tabla 2. Características de algunos procedimientos utilizados para la determinación de diversos plaguicidas, entre los cuales se encuentran organofosforados.....	18
Tabla 3. Principales técnicas de Cromatografía de Líquidos	28
Tabla 4. Aplicaciones de la cromatografía de fase enlazada. (Skoog, 1991) ..	30
Tabla 5. Propiedades de los adsorbentes usados en EFS. (Hennion y Scribe, 1993)	42
Tabla 6. Descripción del acoplamiento de la preconcentración al análisis cromatográfico.....	53
Tabla 7. Operaciones realizadas con el montaje de preconcentración y análisis y descripción de la posición de las válvulas.....	53
Tabla 8. Longitudes de onda de máxima de absorción en la región UV para los diferentes compuestos en estudio.....	57
Tabla 9. Datos de curva de calibración.....	62
Tabla 10. Precisión del sistema cromatográfico	63
Tabla 11. Rendimiento de extracción en diferentes volúmenes de agua grado cromatográfico y potable, aplicados en la precolumna de extracción.....	67
Tabla 12. Precisión del método en agua grado cromatográfico y en agua potable.....	70

Apéndice A. Estructura y propiedades fisicoquímicas de los plaguicidas en estudio.

PLAGUICIDA.	ASPECTO.	P.f. [°C]	P.e. [°C]	P. Vapor [mPal (25°C)]	Log Pow	Estabilidad.	Solubilidad agua [mg/L]
<p>Clorpirifos</p>  <p>PM. 350.6</p>	Cristales granulares blancos- incoloros	42-43.5	-	2.7	5.11	Se favorece la hidrólisis al aumentar el pH y por la presencia de metales que formen complejos.	1.4
<p>Clorpirifos-metil</p>  <p>PM. 322.5</p>	Cristales incoloros.	45.5-46.5	-	5.6	4.30	Hidrólisis en condiciones ácidas (pH 4-6) y alcalinas (pH 8-10)	5
<p>Fenitrotión.</p>  <p>PM. 277.2</p>	Líquido oleoso café rojizo. d=1.32	3.4	140- 145	18	3.43	Relativamente estable, en condiciones normales.	21

PLAGUICIDA.	ASPECTO.	P.f. [°C]	P.e. [°C]	P. Vapor [mPal (25°C)]	Log Pow	Estabilidad.	Solubilidad agua [mg/L]
<p>Fentión.</p>  <p>P.M. 278.3</p>	Líquido oleoso café, olor a mercaptano. d=1.25	7.5	348	0.74	4.84	Relativamente estable en condiciones ácidas. Moderadamente estable en condiciones alcalinas Estable a la luz	4.2
<p>Isofenfos.</p>  <p>P.M. 345.4</p>	Líquido oleoso incoloro. d=1.13	12	390	0.44	4.12	Sufre fotodegradación	18
<p>Malatión.</p>  <p>P.M. 330.36</p>	Líquido café-amarillo. d=1.23	2.9	156-157	5.4	2.89	Se hidroliza a pH >7 o pH <5, Estable en solución amortiguadora a pH=5.26	145

PLAGUICIDA.	ASPECTO.	P.f. [°C]	P.e. [°C]	P. Vapor [mPa] (25°C)	Log Pow	Estabilidad.	Solubilidad agua [mg/L]
<p>Metidatión</p>  <p>PM. 301,96</p>	Cristales incolores	39 a 40	-	0.45	2.42	Estable a la hidrólisis en medio neutro o ligeramente ácido, menos estable a pH 1 o 3	240
<p>Paratión.</p>  <p>PM. 291,26</p>	Líquido amarillo pálido. d=1.27	6.1	150	0.89	2.15 3.83	Hidrólisis lenta en medio ácido (pH 1-6) rápida en medio alcalino. Se isomeriza a o,5-dietil- isómero al calentar por encima de 130 °C.	11
<p>Paratión-metil.</p>  <p>PM. 263,21</p>	Cristales. d= 1.35	37-38	-	1.3	2.9	-	55

P. f. = punto de fusión; P. e. = punto de ebullición; P. Vapor = presión de vapor; Log Pow = logaritmo del coeficiente de reparto octanol/agua; P.M. = peso molecular; d= densidad

APÉNDICE B

ESPECTROS DE ABSORCIÓN EN LA REGIÓN ULTRAVIOLETA DE LOS PLAGUICIDAS EN ESTUDIO

Spectrum Plot Report

Spectrum # 7

File: c:\star\module04\star053.run
 tR: 33.035 min PuP (190->367 nm) = 207.528 nm
 Name: CLORPIRIFOS

Instrument: Diode Array Detect
 Method: L.G.MTH
 Operator: yara
 Run Date: 18-MAR-98 6:49 PM

Scan Rate: 10.851 Hz Bunch: 4 Data Rate: 2.713 Hz
 Detector Range: 190->367 nm Valid Range: 190->367 nm
 Spectrum Type: Within Peak Correction Type: Baseline

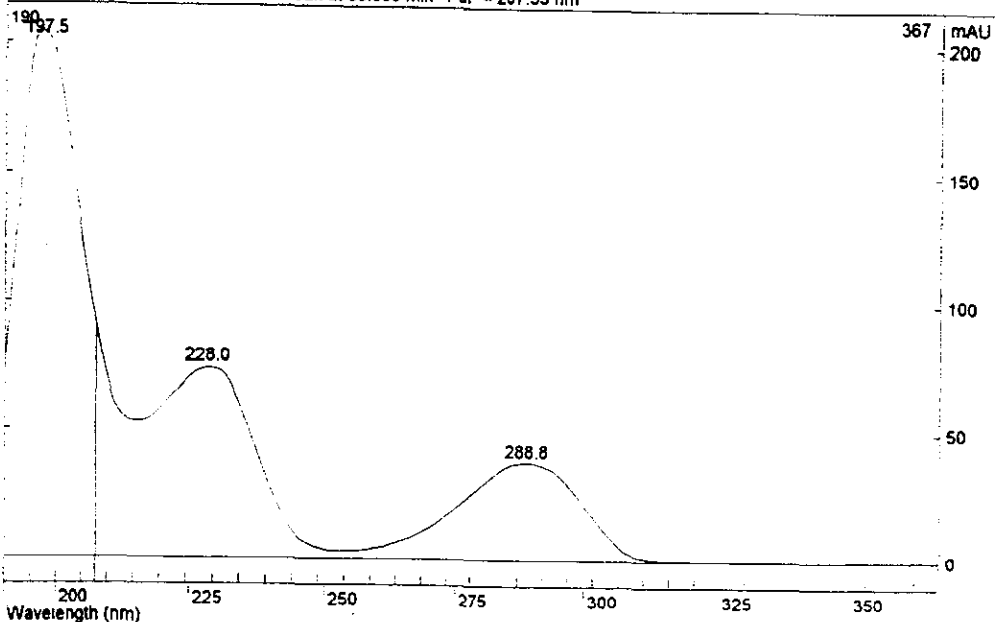
Absorbance Table

nm	mAU	nm	mAU	nm	mAU	nm	mAU	nm	mAU
190	77.761	229	73.817	268	10.953	306	5.433	344	0.263
195	192.185	234	59.629	273	17.329	311	1.266	348	0.292
200	192.601	239	31.385	278	25.261	316	0.426	353	0.322
205	124.722	244	10.333	282	33.072	320	0.278	358	0.375
210	89.443	249	4.289	287	37.883	325	0.213	362	0.369
215	53.291	254	3.334	292	36.742	330	0.197	367	0.401
220	57.820	258	4.187	297	29.310	334	0.232		
224	89.597	263	6.649	302	16.694	339	0.247		

Channel Range: 190 to 367 nm Absorbance Range: 0.1974 to 200.93 mAU

Max Wavelength (nm): 197.48 227.97 288.78
 Percent of Max Abs.: 100.0% 37.1% 19.0%

Within Peak at 33.035 min PuP = 207.53 nm



Print Date: 24 Mar 1998 18:00:47

Spectrum Plot Report

Spectrum # 7

File: c:\star\module04\star053.run

IR: 28.188 min PuP (190->367 nm) = 206.576 nm

Name: METILCLORPIRIFOS

Instrument: Diode Array Detect

Method: LG.MTH

Operator: yara

Run Date: 18-MAR-98 6:49 PM

Scan Rate: 10.851 Hz Bunch: 4 Data Rate: 2.713 Hz

Detector Range: 190->367 nm Valid Range: 190->367 nm

Spectrum Type: Within Peak Correction Type: Baseline

Absorbance Table

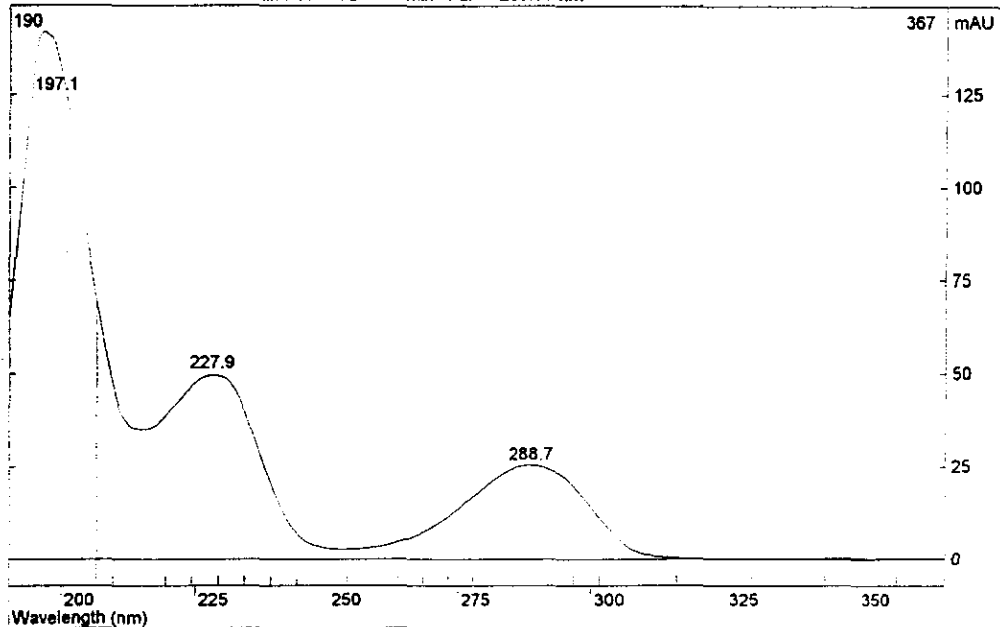
nm	mAU	nm	mAU	nm	mAU	nm	mAU	nm	mAU
190	64.894	229	49.402	268	7.560	306	3.664	344	0.325
195	136.027	234	39.500	273	11.702	311	1.020	348	0.346
200	130.563	239	20.344	278	16.912	316	0.446	353	0.317
205	84.990	244	6.925	282	22.020	320	0.291	358	0.377
210	46.166	249	3.311	287	25.194	325	0.294	362	0.380
215	35.128	254	2.788	292	24.375	330	0.255	367	0.411
220	38.630	258	3.349	297	19.345	334	0.286		
224	46.809	263	4.874	302	10.958	339	0.264		

Channel Range: 190 to 367 nm Absorbance Range: 0.2555 to 143.09 mAU

Max Wavelength (nm): 197.10 227.87 288.72

Percent of Max Abs.: 100.0% 34.9% 17.7%

Within Peak at 28.188 min PuP = 206.58 nm



Print Date: 24 Mar 1998 18:18:24

Spectrum Plot Report

Spectrum # 7

File: c:\star\module04\star053.run

IR: 14.493 min PuP (190->367 nm) = 218.166 nm

Name: FENTROTION

Instrument: Diode Array Detect

Method: LG.MTH

Operator: Yara

Run Date: 18-MAR-98 6:49 PM

Scan Rate: 10.851 Hz Bunch: 4 Data Rate: 2.713 Hz

Detector Range: 190->367 nm Valid Range: 190->367 nm

Spectrum Type: Within Peak Correction Type: Baseline

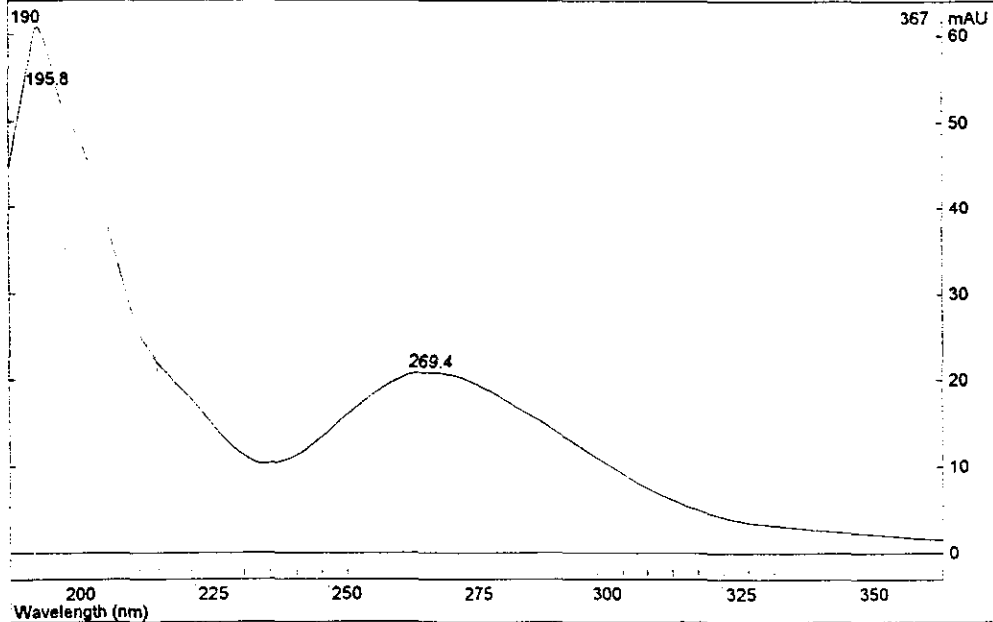
Absorbance Table

nm	mAU	nm	mAU	nm	mAU	nm	mAU	nm	mAU
190	44.631	229	14.114	268	20.812	306	9.190	344	2.634
195	60.705	234	11.332	273	20.562	311	7.496	348	2.402
200	52.364	239	10.396	278	19.602	316	6.110	353	2.193
205	45.975	244	11.294	282	18.137	320	5.038	358	1.935
210	35.982	249	13.382	287	16.417	325	4.178	362	1.647
215	25.476	254	15.944	292	14.647	330	3.592	367	1.485
220	21.071	258	18.332	297	12.819	334	3.234		
224	17.872	263	20.067	302	10.994	339	2.943		

Channel Range: 190 to 367 nm Absorbance Range: 1.4853 to 61.012 mAU

Max Wavelength (nm): 195.78 269.39
Percent of Max Abs.: 100.0% 34.2%

Within Peak at 14.493 min PuP = 218.17 nm



Print Date: 24 Mar 1998 18:09:09

Spectrum Plot Report

Spectrum # 7

File: c:\star\module04\star053.run
 IR: 24.704 min PuP (190->367 nm) = 209.039 nm
 Name: FENTION

Instrument: Diode Array Detect
 Method: LG.MTH
 Operator: yara
 Run Date: 16-MAR-98 6:49 PM

Scan Rate: 10.851 Hz Bunch: 4 Data Rate: 2.713 Hz
 Detector Range: 190->367 nm Valid Range: 190->367 nm
 Spectrum Type: Within Peak Correction Type: Baseline

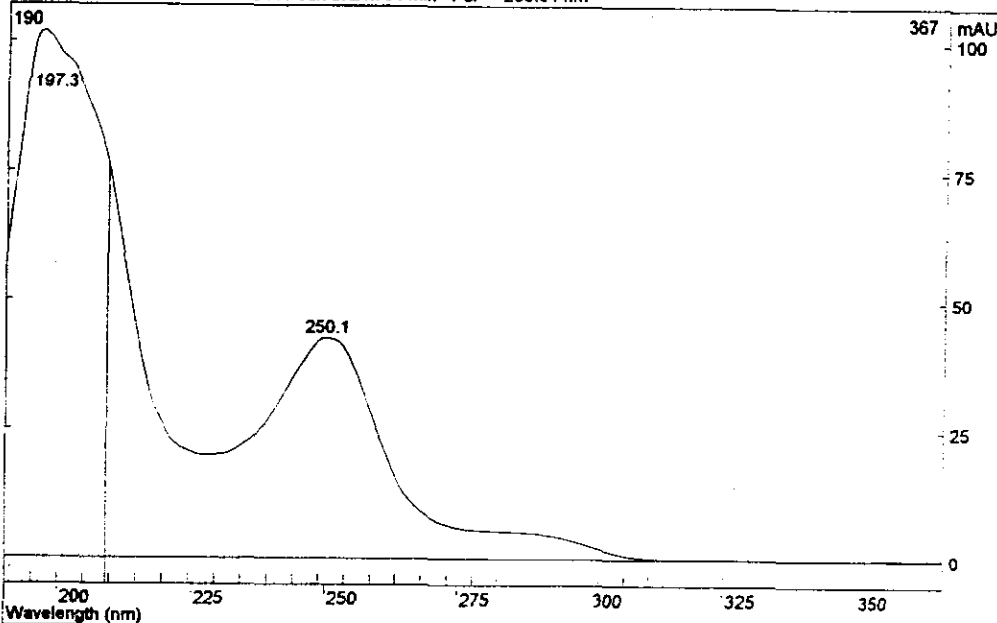
Absorbance Table

nm	mAU	nm	mAU	nm	mAU	nm	mAU	nm	mAU
190	80.140	229	20.112	268	9.279	306	0.829	344	0.223
195	99.184	234	21.943	273	6.565	311	0.271	348	0.171
200	97.748	239	27.110	278	5.649	316	0.143	353	0.228
205	89.646	244	35.487	282	5.354	320	0.088	358	0.286
210	72.644	249	42.375	287	5.174	325	0.136	362	0.288
215	43.819	254	40.396	292	4.570	330	0.122	367	0.273
220	26.075	258	27.977	297	3.486	334	0.132		
224	20.641	263	15.817	302	2.023	339	0.210		

Channel Range: 190 to 367 nm Absorbance Range: 0.0879 to 103.55 mAU

Max Wavelength (nm): 197.28 250.13
 Percent of Max Abs.: 100.0% 41.2%

Within Peak at 24.704 min PuP = 209.04 nm



Print Date: 24 Mar 1998 18:11:35

Spectrum Plot Report

Spectrum # 7

File: c:\star\module04\star053.run
 tR: 26.025 min PuP (190->367 nm) = 200.904 nm
 Name: ISOFENFOS

Instrument: Diode Array Detect
 Method: LG.MTH
 Operator: yara
 Run Date: 18-MAR-98 6:49 PM

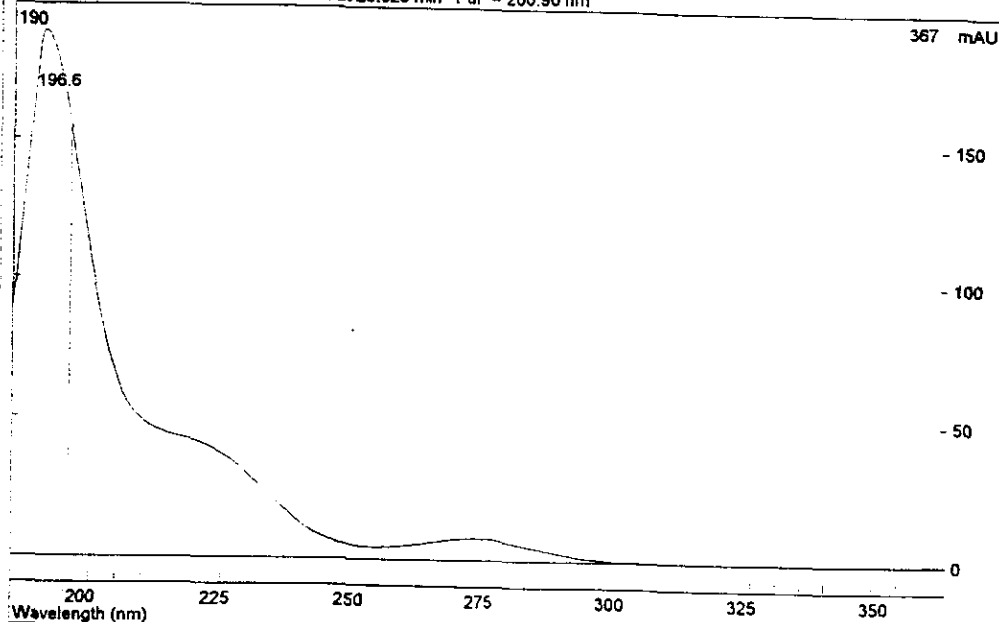
Scan Rate: 10.851 Hz Bunch: 4 Data Rate: 2.713 Hz
 Detector Range: 190->367 nm Valid Range: 190->367 nm
 Spectrum Type: Within Peak Correction Type: Baseline

Absorbance Table							
nm	mAU	nm	mAU	nm	mAU	nm	mAU
190	89.229	229	37.530	268	6.333	306	0.325
195	184.617	234	30.126	273	7.497	311	0.248
200	165.139	239	21.069	278	7.902	316	0.236
205	107.880	244	12.892	282	7.100	320	0.247
210	65.816	249	7.729	287	5.307	325	0.217
215	49.221	254	5.255	292	3.334	330	0.289
220	44.283	258	4.610	297	1.644	334	0.300
224	41.838	263	5.143	302	0.744	339	0.278

Channel Range: 190 to 367 nm Absorbance Range: 0.2172 to 190.89 mAU

Max Wavelength (nm): 196.62
 Percent of Max Abs.: 100.0%

Within Peak at 26.025 min PuP = 200.90 nm



Print Date: 24 Mar 1998 18:13:47

Spectrum Plot Report

Spectrum # 3

File: c:\star\module04\star053.run
 tR: 11.575 min PuP (190->367 nm) = 204.818 nm
 Name: MALATION

Instrument: Diode Array Detect
 Method: LG.MTH
 Operator: yara
 Run Date: 18-MAR-98 6:49 PM

Scan Rate: 10.851 Hz Bunch: 4 Data Rate: 2.713 Hz
 Detector Range: 190->367 nm Valid Range: 190->367 nm
 Spectrum Type: Within Peak Correction Type: Baseline

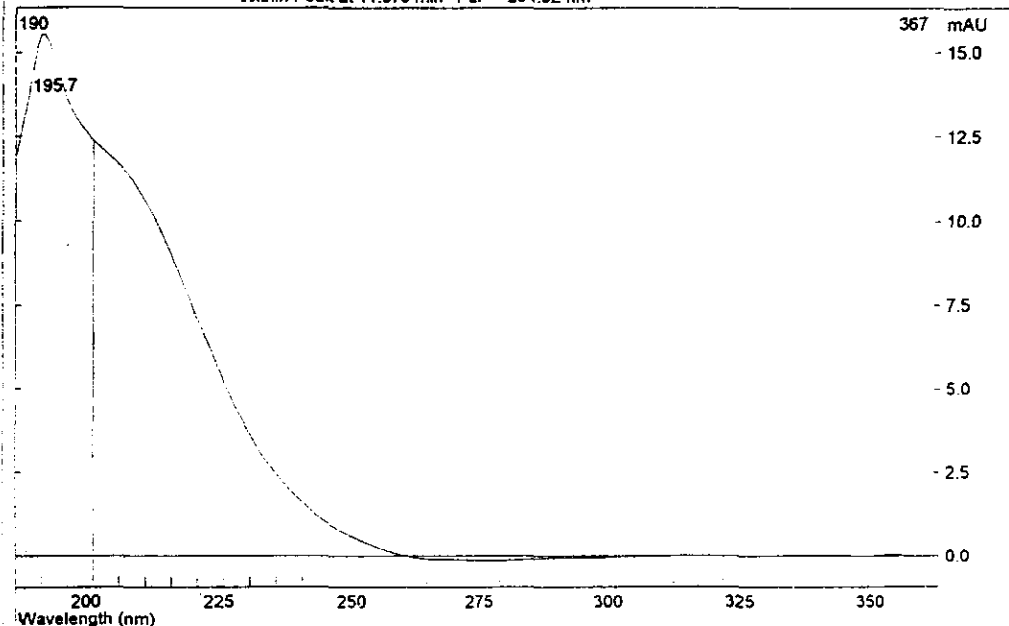
Absorbance Table

nm	mAU	nm	mAU	nm	mAU	nm	mAU	nm	mAU
190	11.895	229	5.193	268	-0.090	306	-0.023	344	0.034
195	15.509	234	3.646	273	-0.109	311	-0.025	348	0.024
200	13.568	239	2.470	278	-0.128	316	0.002	353	-0.016
205	12.393	244	1.629	282	-0.145	320	0.019	358	0.052
210	11.661	249	1.011	287	-0.110	325	0.005	362	-0.009
215	10.559	254	0.570	292	-0.064	330	-0.015	367	0.002
220	9.020	258	0.271	297	-0.065	334	0.005		
224	7.102	263	0.032	302	-0.052	339	0.034		

Channel Range: 190 to 367 nm Absorbance Range: -0.1448 to 15.572 mAU

Max Wavelength (nm): 195.74
 Percent of Max Abs.: 100.0%

Within Peak at 11.575 min PuP = 204.82 nm



Spectrum Plot Report

Spectrum # 7

File: c:\star\module04\star053.run
 tR: 7.809 min PuP (190->367 nm) = 213.146 nm
 Name: METIDATION

Instrument: Diode Array Detect
 Method: LG.MTH
 Operator: yara
 Run Date: 18-MAR-98 6:49 PM

Scan Rate: 10.851 Hz Bunch: 4 Data Rate: 2.713 Hz
 Detector Range: 190->367 nm Valid Range: 190->367 nm
 Spectrum Type: Within Peak Correction Type: Baseline

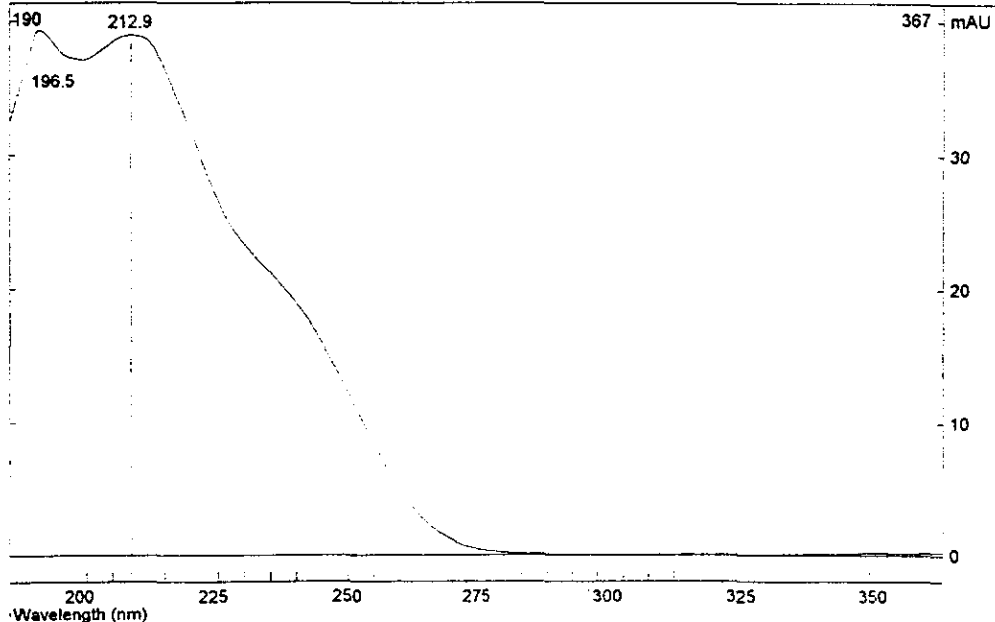
Absorbance Table

nm	mAU	nm	mAU	nm	mAU	nm	mAU	nm	mAU
190	32.541	229	26.650	266	2.695	306	0.037	344	0.103
195	39.135	234	23.381	273	1.287	311	0.019	348	0.127
200	37.650	239	21.193	278	0.551	316	0.047	353	0.206
205	37.124	244	18.918	282	0.264	320	0.074	358	0.173
210	38.442	249	15.888	287	0.134	325	0.088	362	0.183
215	38.884	254	12.244	292	0.091	330	0.084	367	0.247
220	38.404	258	8.414	297	0.061	334	0.082		
224	31.565	263	5.129	302	0.064	339	0.123		

Channel Range: 190 to 367 nm Absorbance Range: 0.0193 to 39.539 mAU

Max Wavelength (nm): 196.55 212.89
 Percent of Max Abs.: 100.0% 98.8%

Within Peak at 7.809 min PuP = 213.15 nm



Print Date: 24 Mar 1998 18:05:02

Spectrum Plot Report

Spectrum # 3

File: c:\star\module04\star053.run
 tR: 22.210 min PuP (190->367 nm) = 235.261 nm
 Name: PARATION

Instrument: Diode Array Detect
 Method: LG.MTH
 Operator: yara
 Run Date: 18-MAR-98 6:49 PM

Scan Rate: 10.851 Hz Bunch: 4 Data Rate: 2.713 Hz
 Detector Range: 190->367 nm Valid Range: 190->367 nm
 Spectrum Type: Within Peak Correction Type: Baseline

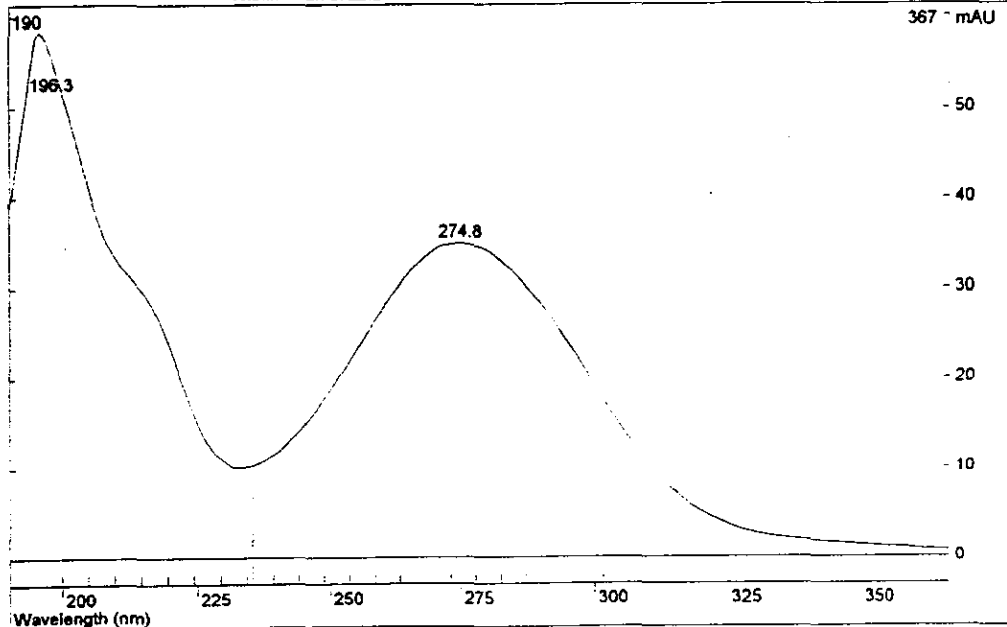
Absorbance Table

nm	mAU	nm	mAU	nm	mAU	nm	mAU	nm	mAU
190	39.013	229	11.232	268	33.461	306	13.314	344	1.613
195	57.767	234	10.220	273	34.897	311	9.706	348	1.406
200	51.970	239	11.531	278	34.685	316	6.863	353	1.194
205	41.236	244	14.167	282	33.073	320	4.912	358	1.079
210	33.611	249	17.739	287	30.216	325	3.584	362	0.843
215	29.887	254	21.993	292	26.478	330	2.717	367	0.758
220	24.166	258	26.518	297	22.099	334	2.178		
224	16.050	263	30.499	302	17.581	339	1.870		

Channel Range: 190 to 367 nm Absorbance Range: 0.7584 to 58.621 mAU

Max Wavelength (nm): 196.29 274.78
 Percent of Max Abs.: 100.0% 59.7%

Within Peak at 22.210 min PuP = 235.26 nm



Spectrum Plot Report

Spectrum # 7

File: c:\star\module04\star053.run

tR: 10.162 min PuP (190->367 nm) = 233.892 nm

Name: METILPARATION

Instrument: Diode Array Detect

Method: LG.MTH

Operator: yara

Run Date: 18-MAR-98 6:49 PM

Scan Rate: 10.851 Hz Bunch: 4 Data Rate: 2.713 Hz

Detector Range: 190->367 nm Valid Range: 190->367 nm

Spectrum Type: Within Peak Correction Type: Baseline

Absorbance Table

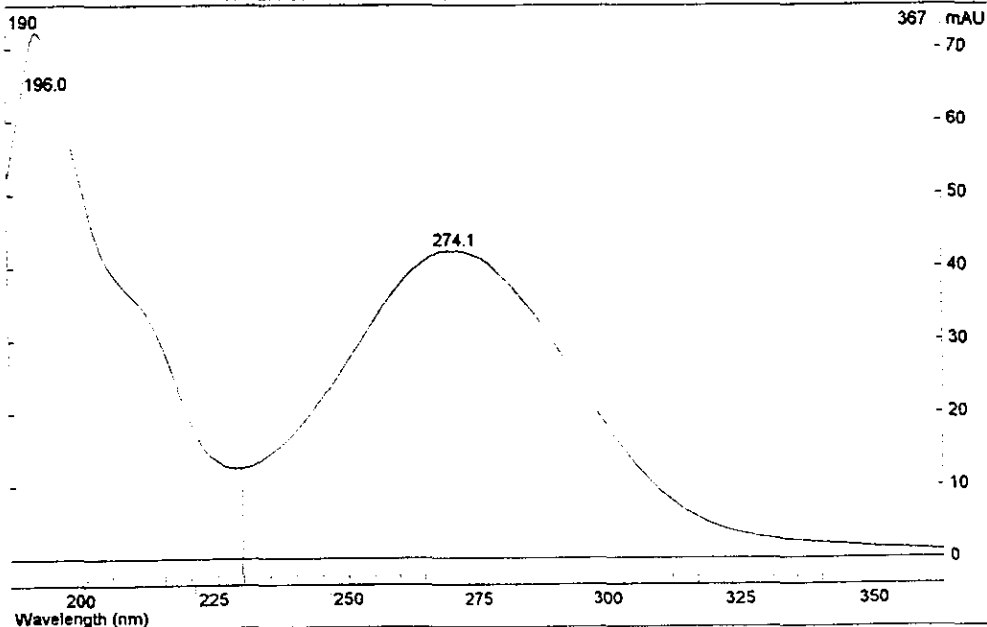
nm	mAU	nm	mAU	nm	mAU	nm	mAU	nm	mAU
190	52.163	229	13.485	268	40.619	306	15.339	344	2.062
195	71.814	234	12.523	273	42.073	311	11.182	348	1.866
200	63.255	239	14.303	278	41.538	316	7.979	353	1.570
205	49.144	244	17.588	282	39.311	320	5.692	358	1.446
210	39.362	249	21.989	287	35.611	325	4.235	362	1.287
215	35.180	254	27.179	292	30.979	330	3.301	367	1.093
220	28.496	258	32.630	297	25.687	334	2.700		
224	18.926	263	37.325	302	20.325	339	2.376		

Channel Range: 190 to 367 nm Absorbance Range: 1.0933 to 72.359 mAU

Max Wavelength (nm): 195.96 274.11

Percent of Max Abs.: 100.0% 58.2%

Within Peak at 10.162 min PuP = 233.89 nm



Print Date: 24 Mar 1998 18:06:57

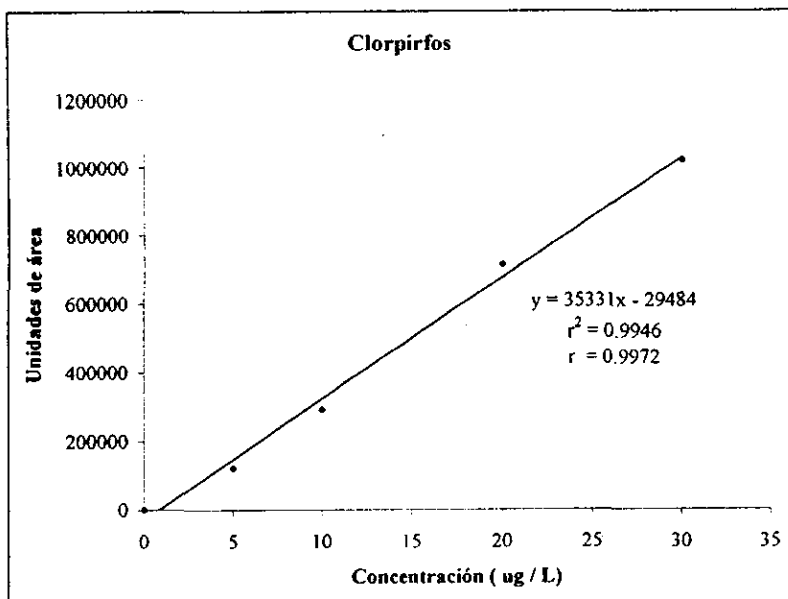


Fig. C.1. Variación de la respuesta del detector en función de la concentración de Clorpirifos

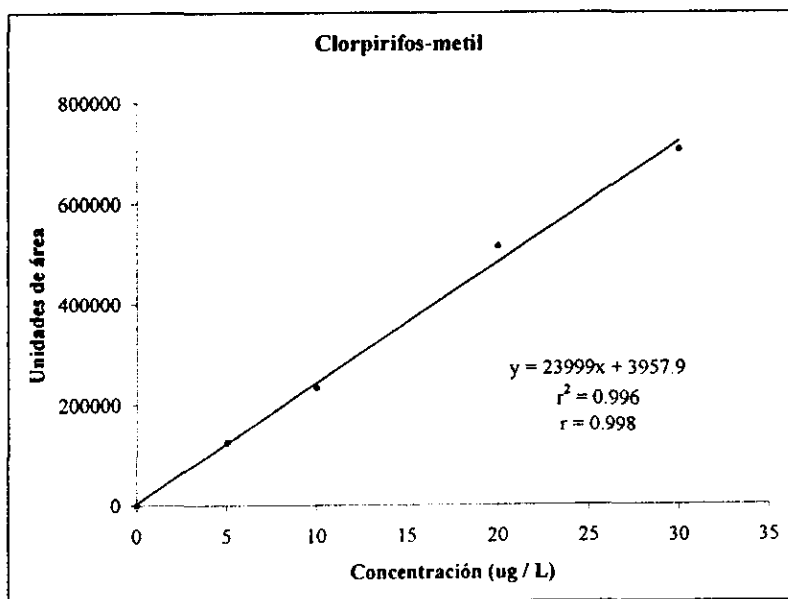


Fig. C.2. Variación de la respuesta del detector en función de la concentración de Clorpirifos-metil.

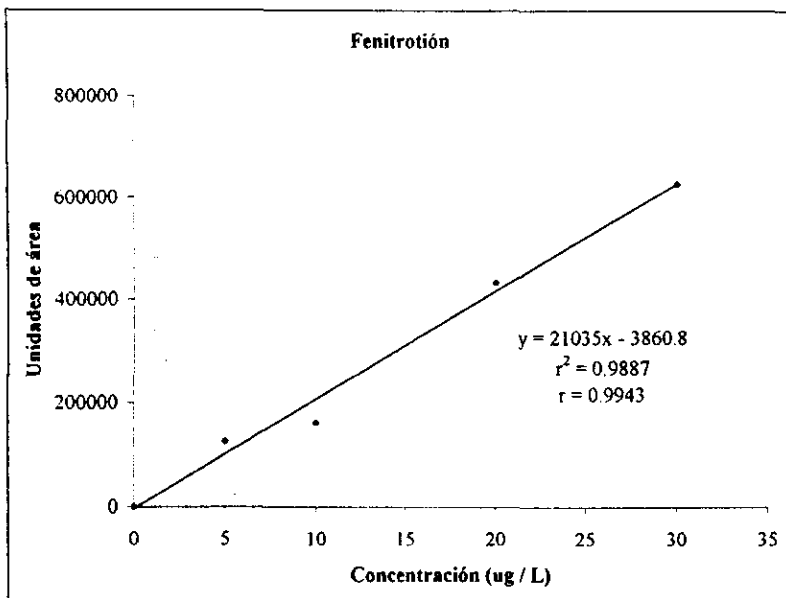


Fig. C.3. Variación de la respuesta del detector en función de la concentración de Fenitrotión.

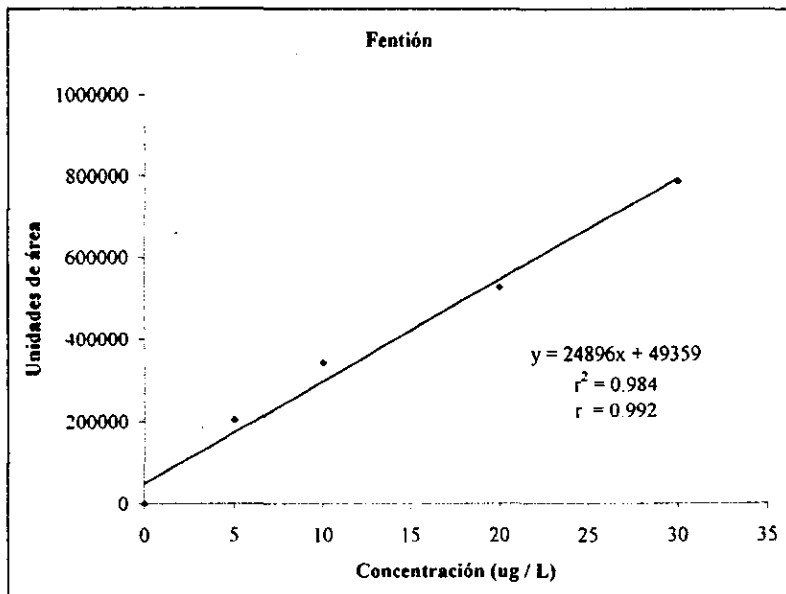


Fig. C.4. Variación de la respuesta del detector en función de la concentración de Fentión.

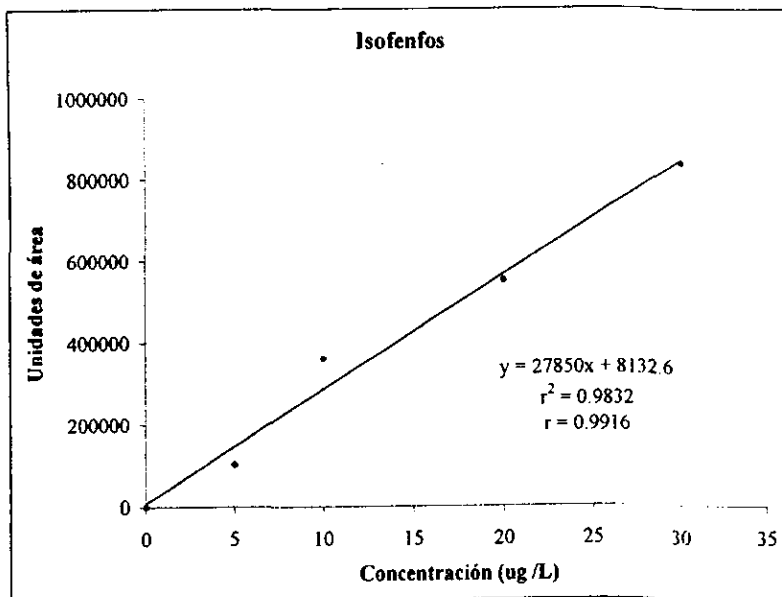


Fig. C.5. Variación de la respuesta del detector en función de la concentración de Isofenfos.

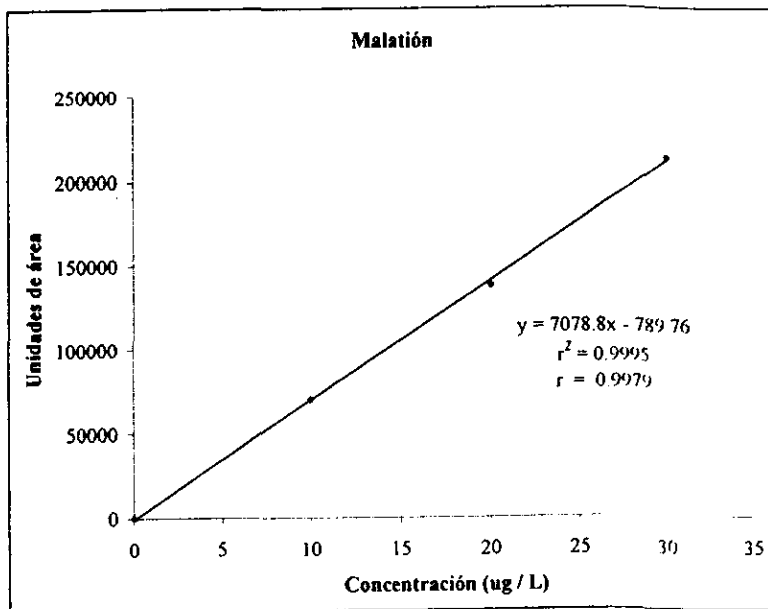


Fig. C.6. Variación de la respuesta del detector en función de la concentración de Malatión.

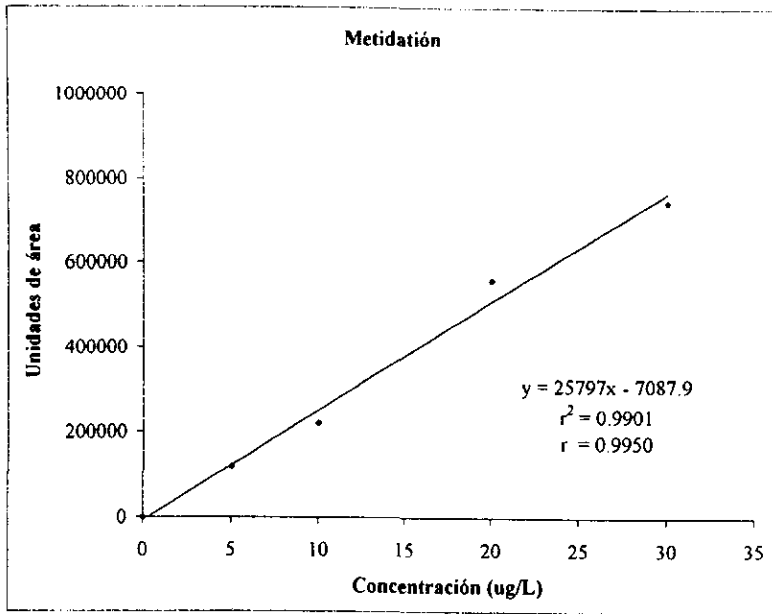


Fig. C.7. Variación de la respuesta del detector en función de la concentración de Metidación.

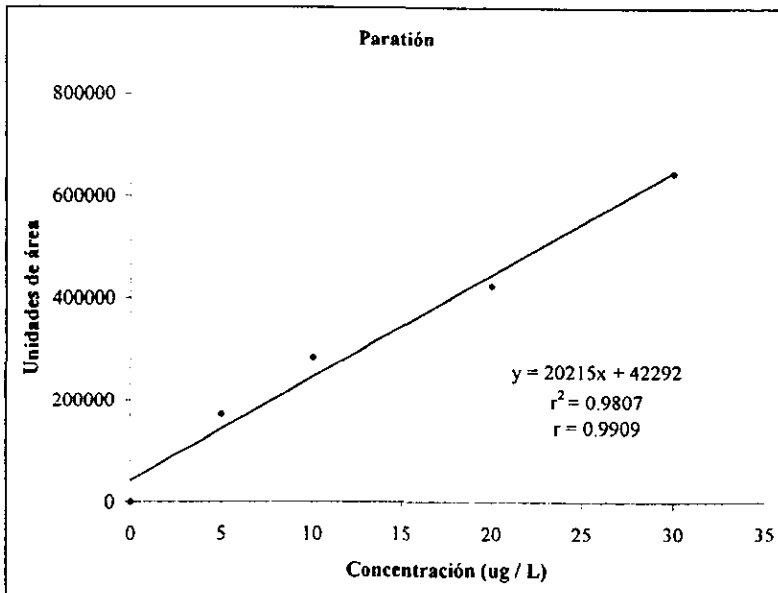


Fig. C.8. Variación de la respuesta del detector en función de la concentración de Paratión.

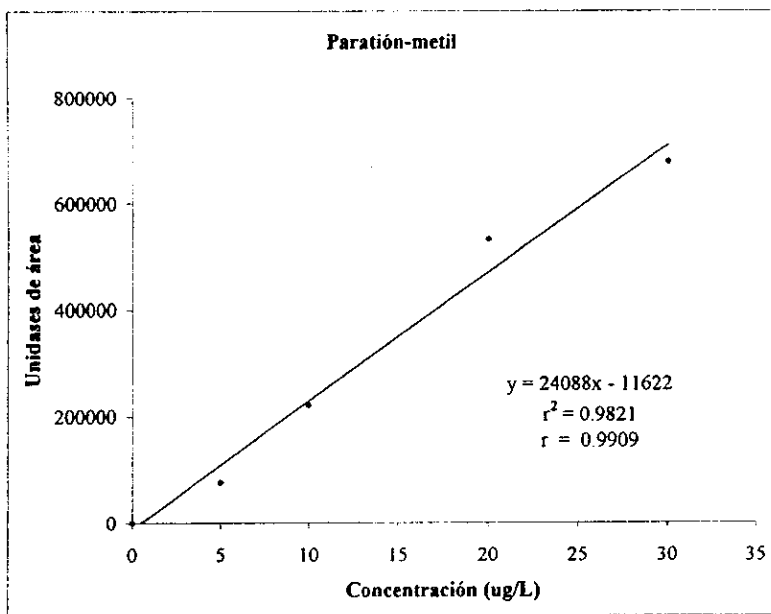


Fig. C.9. Variación de la respuesta del detector en función de la concentración de Paratión-metil.