



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**ANÁLISIS DE PESTICIDAS EN ESPINACA
POR CROMATOGRFÍA DE
GASES/ESPECTROMETRÍA DE MASAS**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA DE ALIMENTOS
P R E S E N T A
MARÍA DEL ROCÍO MÉNDEZ DE JESÚS



**EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUÍMICA**



MÉXICO, D. F.

2004



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado asignado:

Presidente	Prof. Liliana Saldivar Osorio
Vocal	Prof. Humberto R. Gómez Ruíz
Secretario	Prof. Francisca Iturbe Chiñas
1er Suplente	Prof. Lucia Hernández Garcíadiago
2do Suplente	Prof. Luz Sandra Sánchez del Angel

Sitio donde se desarrollo el tema:

Laboratorio de Química analítica ambiental 108. Departamento de Química Analítica. División de Estudios de Posgrado Edificio B Facultad de Química UNAM.

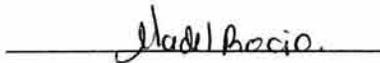
Asesor: M en C Humberto R. Gómez Ruíz.



Supervisor técnico: Q. Adolfo García Osuna.



Sustentante: María del Rocío Méndez de Jesús.



Índice.

Introducción.	v
Resumen.	vi
Objetivos.	vii
CAPÍTULO 1 Marco Teórico.	
1.1 Importancia de los plaguicidas en los alimentos.	1
1.1.1 Definición de plaguicida.	2
1.1.2 Tipos de aplicación y formulaciones de los plaguicidas.	3
1.1.3 Depósito de los plaguicidas en las plantas.	4
1.1.3.1 Residuos de plaguicidas.	5
1.1.3.2 Factores que influyen en la eliminación y degradación ambiental de los residuos de plaguicidas.	7
1.1.3.3 Disminución de residuos de plaguicidas por tratamientos domésticos.	9
1.1.4 Efectos adversos para el ambiente.	10
1.1.4.1 Bioacumulación y biomagnificación.	10
1.1.4.2 Movilidad y persistencia de los plaguicidas en el ambiente.	11
1.1.5 Toxicidad de los plaguicidas.	12
1.1.6 Limite máximo de residuos.	15
1.2 Generalidades sobre métodos de análisis.	19
1.2.1 Muestreo.	19
1.2.2 Preparación de muestras.	21
1.2.2.1 Importancia de la preparación de muestras.	21
1.2.2.2 Clasificación.	22
1.2.2.3 Técnica de vapor sobrenadante.	22
1.2.2.4 Purga y trampa.	25
1.2.2.5 Extracción en Fase Sólida.	25
1.2.2.6 Extracción con Fluidos Supercríticos.	29

1.2.3	Concentración.	31
1.2.4	Métodos analíticos.	34
1.2.4.1	Cromatografía.	34
1.2.4.1.1	Cromatografía de Gases.	35
1.2.4.1.2	Parámetros cromatográficos.	35
1.2.4.1.3	Instrumento: Cromatógrafo de Gases.	41
1.2.4.1.4	Ventajas y desventajas de la cromatografía de gases.	47
1.2.4.2	Espectrometría de Masas.	48
1.2.4.2.1	Instrumento: Espectrómetro de masas.	50
1.2.4.2.2	Aplicaciones de la espectrometría de masas.	55
1.2.4.2.3	Ventajas y desventajas de la espectrometría de masas como instrumento analítico.	55
1.2.4.3	Sistema acoplado Cromatografía de Gases/Espectrometría de Masas.	56
1.2.4.3.1	Ventajas que se obtienen al acoplar un CG a un EM.	56
1.2.4.3.2	Instrumento CG/EM.	56
1.2.4.2.4	Campos de aplicación de los sistemas acoplados CG/EM.	58
1.3	Métodos para análisis de plaguicidas en alimentos.	59
1.4.2	Elección de un método para la determinación de plaguicidas.	59
1.4.2	Etapas involucradas en los métodos de análisis.	60
1.3.2.1	Extracción.	60
1.3.2.1.1	Influencia de los disolventes.	61
1.3.2.2	Limpieza.	61
1.3.2.3	Concentración.	62
1.3.2.4	Separación.	63
1.3.2.5	Detección.	63
1.4.2	Métodos multiresiduos para análisis de plaguicidas.	64
1.3.3.1	Principales métodos multiresiduos.	64
1.3.3.2	Ventajas de los métodos multiresiduos multiclase vs métodos multiresiduos selectivos.	66

1.4 Evaluación de métodos de análisis.	67
1.4.1 Límites de detección instrumental (LDI).	67
1.4.2 Límites de cuantificación instrumental (LCI).	619
1.4.3 Variabilidad del proceso analítico.	69
1.4.4 Límite de detección y cuantificación del método analítico.	70

CAPÍTULO 2 Desarrollo Experimental.

2.1 Muestreo.	71
2.1.1 Obtención de la muestra.	71
2.2 Determinación de plaguicidas en espinacas.	72
2.2.1 Preparación de la muestra.	72
2.2.1.1 Método multiresiduo CDFA.	72
2.2.1.2 Método multiresiduo CDFA modificado.	73
2.3 Evaluación del método multiresiduo CDFA modificado.	80
2.3.1 Límite de detección instrumental.	80
2.3.2 Límite de cuantificación instrumental.	81
2.3.3 Recobro.	81
2.3.4 Límite de detección y cuantificación del método CDFA modificado.	83
2.4 Determinación de plaguicidas en espinacas.	83
2.4.1 Registro inicial y cuantificación de plaguicidas encontrados en espinacas.	83

CAPÍTULO 3 Resultados y Análisis de Resultados.

3.1 ¿Por qué usar un método multiclase para la determinación de plaguicidas en espinacas?.	85
3.1.1 Método multiresiduo CDFA modificado.	85
3.2 Evaluación del método CDFA modificado.	86
3.2.1 Límites de detección y cuantificación instrumentales.	87
3.2.2 Recobro.	90

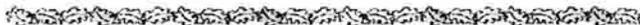
3.3 Límites de detección y cuantificación del método	95
3.4 Determinación de plaguicidas en espinacas.	96

CAPÍTULO 4 Conclusiones y recomendaciones.

4.1 Preparación de la muestra.	99
4.2 Determinación cromatográfica.	99
4.3 Evaluación del método multiresiduo CDFA modificado.	100
4.4 Determinación de plaguicidas en espinacas.	101

5 Bibliografía.	102
------------------------	-----

Apéndice A Generalidades de métodos multiresiduos.	1A
Apéndice B Hojas de datos de los plaguicidas estudiados.	1B
Apéndice C Separación cromatográfica y Espectros de masas.	1C
Apéndice D Cálculos de la evaluación del método.	1D
Apéndice E Cromatogramas del método multiresiduo CDFA modificado.	1E
Apéndice F Degradación de plaguicidas.	1F



Introducción.

En México y en todo el mundo se aplica un gran número de plaguicidas a diversos cultivos siendo los más usados los plaguicidas fosforados, carbamatos y piretróides, mientras que se ha descontinuado el uso de los plaguicidas clorados por su persistencia en el ambiente y solo son aplicados en casos especiales. Los agricultores tienen acceso a una gran variedad de plaguicidas y formulan mezclas especiales que se aplican a cultivos específicos las cuales pueden no ser autorizadas por organismos gubernamentales.

Por lo que es importante conocer si los agricultores realmente aplican los plaguicidas adecuados en sus cultivos y cumplen con lo establecido por la ley, o por lo contrario emplean mezclas y formulaciones no adecuadas o aún prohibidas.

El estudio de los residuos de plaguicidas y sus metabolitos es importante, pues las cosechas son fumigadas para evitar perderlas por efecto de las diversas plagas que las atacan. (1, 2) Esto nos lleva a encontrar residuos de diversos plaguicidas y sus metabolitos en distintos alimentos (vegetales, frutas, cereales, carne, etc.), frescos y procesados, los cuales podrían tener un efecto nocivo en las personas que los ingieren.

En estudios realizados con anterioridad por el Dr. Díaz-Barriga se encontró que al hacer evaluaciones de riesgo sobre poblaciones expuestas a DDT por las fumigaciones realizadas para la erradicación de la malaria, al seleccionar grupos control (no expuestos a DDT) se encontraba que algunas personas de estos grupos presentaban contenidos de DDT relativamente altos. El análisis de los resultados obtenidos daba como conclusión el hecho que las personas no expuestas a las fumigaciones estaban ingiriendo los plaguicidas en la dieta. (3)

Esto da motivo al presente trabajo y se centra en determinar el tipo de plaguicidas usados en cultivos de espinaca que llegan al Distrito Federal, zona en teoría libre de la contaminación por plaguicidas organoclorados.

Resumen.

La Central de Abastos del D.F. representa el mejor sitio de muestreo ya que en ella se concentran alrededor del 40 % de la producción hortofrutícola nacional, las hortalizas en particular provienen de diferentes zonas del país pero principalmente del D.F, Estado de México, Puebla y Tlaxcala. La Central de Abastos distribuye posteriormente a los vendedores al menudeo, aunque es sabido que los grandes supermercados adquieren en forma directa sus productos de productores o intermediarios mayoristas. La otra forma de comercialización de productos hortícolas que existe en el D.F. lo constituyen los llamados "Mercados sobre Ruedas" agrupaciones de pequeños productores que comercializan sus productos en la ciudad, actualmente esto ya no es estrictamente cierto y los vendedores de estos mercados son intermediarios de pequeños productores o adquieren sus productos en la Central de Abastos; por tal motivo en el presente trabajo las espinacas analizadas fueron adquiridas en la Central de Abastos, supermercados, verdulerías y mercados sobre ruedas.

Por la información bibliográfica previa que se generó en el laboratorio se esperaba encontrar mezclas diversas de distintos plaguicidas en cultivos provenientes de otras zonas del país y con base en ello se optó por desarrollar un procedimiento analítico que permitiese la detección de plaguicidas de diferente composición química.

Para la determinación de plaguicidas en espinacas se uso como base el Método Multiresiduo del Departamento de Alimentos y Agricultura de California E. U. (CDFA), el cual se modificó para adecuarlo a la determinación instrumental que se llevo a cabo usando un sistema acoplado Cromatografía de Gases/Espectrometría de Masas (CG/EM).

El desarrollo y aplicación de este tipo de metodologías es útil para la determinación de diferentes clases de plaguicidas y permite además de una determinación cualitativa, un análisis cuantitativo preciso junto con una confirmación inmediata. La metodología que parece ideal para el análisis que se pretende, adolece de una serie de problemas que es necesario resolver antes de proceder con el mismo; entre ellos se encuentran etapas críticas en las que se pueden perder los analitos de interés durante el proceso de preparación de la muestra.

Los pasos críticos encontrados en la determinación de plaguicidas por este método multiresiduo son el secado adecuado de los extractos y la optimización instrumental, esta última de gran importancia ya que de ello depende una evaluación satisfactoria del método.

Objetivos.

Objetivo general.

Desarrollar una metodología que permita determinar trazas de plaguicidas y sus metabolitos en hortalizas con alto contenido de humedad y bajo contenido de grasa y azúcares usando la técnica de Cromatografía de Gases/Espectrometría de Masas (CG/EM) y Extracción en Fase Sólida (EFS) como técnica de preparación de la muestra.

Objetivos particulares.

Evaluar el tipo de plaguicidas usados por los agricultores en los cultivos de espinaca cosechadas en diferentes Estados de la República Mexicana.

Determinar la cantidad de residuos de plaguicidas presentes en espinacas consumidas en el Distrito Federal obtenidas en diversas fuentes de distribución.

Desarrollar métodos analíticos que a futuro permitan evaluar la ingesta diaria de plaguicidas provenientes del consumo de esta hortaliza.

Capítulo 1 Marco Teórico.

1.1 Importancia de los plaguicidas en los alimentos.

Debido al aumento de la población a nivel mundial actualmente es indispensable el empleo de sustancias que protejan los cultivos de plagas, enfermedades y malas hierbas en el campo y durante su almacenamiento, con objeto de conseguir alimentos abundantes y sanos; por lo que el uso de plaguicidas sintéticos (organoclorados, organofosforados, carbamatos, etc.) es ahora indispensable y ha contribuido a mejorar la producción agrícola.

La utilización de plaguicidas ha permitido incrementar los niveles de producción de los cultivos, particularmente el uso de insecticidas, ya que las pérdidas de los cultivos en el campo se deben principalmente a los daños causados por insectos. Los insecticidas y fungicidas también se han utilizado para disminuir las pérdidas poscosecha y la frescura de los alimentos hasta su consumo.

Debido a esto, los plaguicidas de mayor uso en la producción de alimentos son los insecticidas, fungicidas y herbicidas. Los acaricidas y rodenticidas son menos importantes. (4)

Pero estos plaguicidas por su aplicación indiscriminada o mal manejo pueden contaminar los alimentos, en especial los de origen vegetal. Esto ocurre al tratar directamente las cosechas para su almacenamiento o distribución, captación de los residuos de plaguicidas presentes en el suelo por cultivos subsiguientes, desplazamiento de los plaguicidas a los campos vecinos, almacenamiento en locales previamente tratados con plaguicidas, etc., (5) pero sólo una parte más o menos importante del plaguicida queda atrapada en la planta.

Se debe hacer uso de buenas prácticas agrícolas con el fin de mantener los niveles residuales de los plaguicidas en los alimentos al mínimo.

El hombre entra en contacto con los residuos de plaguicidas principalmente a través de los productos vegetales y en menor grado con productos de origen animal (carnes, productos lácteos) y agua, aunque en algunos alimentos (bivalvos) se puede presentar el efecto de biomagnificación; el grado de exposición del hombre a estos residuos está en función de los tratamientos que efectúen los agricultores y de la composición de la dieta alimentaria en la zona geográfica considerada. (6)

1.1.1 Definición de Plaguicida

“Plaguicida es cualquier sustancia o mezcla de sustancias que se destina a controlar cualquier plaga, incluidos los vectores de enfermedades humanas y de animales, así como las especies no deseadas que causen perjuicio o que interfieran con la producción agropecuaria y forestal, así como las que interfieren con el bienestar del hombre y de los animales.” (7)

Los plaguicidas se pueden clasificar de diferentes maneras y a continuación se presentan las clasificaciones más comunes:

(7, 8)

- Por su concentración: En técnico y formulado.
- Por actividad biológica: insecticidas, acaricidas, nematocidas, molusquicidas, rodenticidas, fungicidas y herbicidas.
- Por modo de acción: de contacto, de ingestión, sistémico, fumigante, repelente y defoliante.
- Por composición química: En inorgánicos, orgánicos (la mayoría de origen sintético) y biológicos
- Por su persistencia en el ambiente: tiempo que transcurre entre su aplicación y la degradación ambiental del compuesto. *Tabla No 1.1*

Tabla No. 1.1. Clasificación de los plaguicidas según su persistencia.

Clasificación	Persistencia
Ligeramente persistentes	Menos de cuatro semanas
Poco persistentes	De cuatro a veintiséis semanas
Medianamente persistentes	De veintiséis a cincuenta y dos semanas
Altamente persistentes	Más de un año y menos de veinte
Permanentes	Más de veinte años.

(8)

- Por el uso al que se destinan: Agrícolas, forestales, urbanos, para jardinería, pecuarios, domésticos e industriales.
- Por grupos o familias de compuestos:

Grupo	Compuestos
1	Organoclorados
2	Organofosforados
3	Carbamatos
4	Piretroides

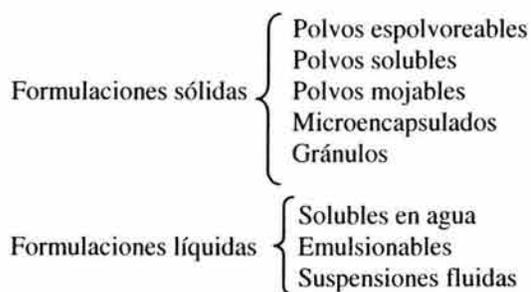
5	De origen botánico
6	Biológicos
7	De cobre
8	Tiocarbamatos
9	Ftalimidas
10	Carboxamidas
11	Carboximidias
12	Guanidinas y Naftoquinonas
13	Organoestánicos
14	Orgánicos con azufre
15	Clorofenoxi
16	Dinitrofenoles
17	Derivados de la urea
18	Triazinas
19	Derivados de los ácidos tricloroacético y tricloropicolínico
20	Bipiridílicos
21	Otros

1.1.2 Tipos de Aplicación y Formulaciones de los Plaguicidas.

Los plaguicidas en general se aplican sobre los cultivos a través de dos sistemas principales:

- a) Empleando el producto químico tal cual, sin formulación alguna.
- b) Utilizando el producto debidamente acondicionado en un vehículo adecuado (formulación), como mezclas de insecticidas con fertilizantes, agua, polvos, en forma de gránulos, suspensiones, microencapsulados, etc.

Una formulación común esta compuesta por: un principio activo, disolventes, diluyentes y coadyuvantes; las formulaciones pueden ser:



Su aplicación varía según del tipo de plaguicida y de la formulación de que se trate; la aplicación de estos en general se clasifica por el tamaño de la partícula. *Tabla No. 1.2.*

Tabla No. 1.2. Tipos de aplicación de formulaciones.

Diámetro volumétrico mediano de las gotas (μm)	Clasificación del tamaño de las gotas
< 50	Aerosol
51 – 100	Niebla
101 – 200	Aspersión fina
201 – 400	Aspersión mediana
> 400	Aspersión gruesa

La aplicación de polvos ha ido declinando debido a los riesgos de arrastre e inhalación de partículas finas de menos de 30 μm . En contraste el número de plaguicidas formulados como gránulos ha incrementado, su aplicación es por espolvoreo (tipo salero). Mientras que algunos plaguicidas volátiles se inyectan o entierran en el suelo. (9,10)

1.1.3 Depósito de los plaguicidas en las plantas.

Los plaguicidas se depositan sobre la planta, para después penetrar en ella. Se denomina depósito a la cantidad de plaguicida que queda sobre la planta o vegetal inmediatamente después de un tratamiento y se expresa en miligramos de plaguicida por kilogramo del vegetal (mg/kg.).

La cantidad depositada de plaguicida que queda sobre un vegetal tras una aplicación depende principalmente de los siguientes factores:

- Dosis del plaguicida aplicado: a mayor dosis, mayor depósito; se expresa en kilogramo de materia activa por hectárea, es decir, cantidad de plaguicida por unidad de superficie cultivada.
- Naturaleza química del plaguicida: Su estructura molecular (por ejemplo su polaridad) determina su retención.
- Naturaleza de la formulación: la presencia de coadyuvantes (adherentes, mojantes, etc.) puede aumentar la retención en la planta.
- Características de la aplicación: si el tamaño de la gota (en las aplicaciones de pulverización) o partícula (espolvoreo) es grande, mayor será el riesgo de deriva y evaporación, y los factores climáticos tomarán una mayor importancia.



- e) Morfología y naturaleza de la superficie vegetal: en especial la relación superficie/peso del vegetal y los recovecos que presenta.
- f) Condiciones climáticas en el momento de la aplicación: a mayor velocidad del viento, mayor deriva, a mayor temperatura, mayor evaporación; secundariamente también pueden influir la humedad relativa, presencia de rocío, etc.
- g) Tiempo de la aplicación: la aplicación deberá realizarse cuando la plaga o enfermedad se encuentre en su estado más vulnerable, pero siempre que el tiempo transcurrido entre la aplicación y la recolección sea el suficiente para que la cantidad de residuos disminuya a un nivel aceptable.

En general se considera que los depósitos procedentes de pulverizaciones líquidas son más tenaces que los procedentes de espolvoreos. Dentro de las aplicaciones líquidas los plaguicidas formulados como emulsiones concentradas o líquidos emulsionables suelen ser más persistentes que los formulados como polvos mojables. Los plaguicidas microencapsulados pueden aumentar la persistencia de los residuos, respecto a los líquidos emulsionables. (6)

Mientras que los principales factores que determinan la penetración de un plaguicida en un órgano vegetal, son los siguientes:

- Liposolubilidad del plaguicida: aumenta la facilidad de penetración en función de la lipofilia del sustrato vegetal.
- Volumen y estructura molecular.
- Formulación del plaguicida: normalmente los tensoactivos favorecen la penetración.
- Grado de esparcimiento del plaguicida: cuanto más extendido éste, mayor superficie de penetración tiene.
- Factores ambientales.

1.1.3.1 Residuos de Plaguicidas

Se entiende por residuo de plaguicida a “toda(s) sustancia(s) presente(s) en un producto alimentario destinado al hombre o a los animales como consecuencia de la utilización de un plaguicida”. (9)



Esta definición es muy amplia y abarca no sólo los restos del plaguicida y sus productos de degradación y metabolitos sino también algunos constituyentes de la formulación e impurezas, que podrían presentar toxicidad propia.

Los residuos presentes en un producto agrícola en el momento de la recolección pueden ser el resultado de:

- a) Absorción por la planta de los plaguicidas aplicados al suelo o ya existentes en él.
- b) Translocación de los plaguicidas aplicados a la planta antes de la aparición de la parte comestible.
- c) Aplicación del plaguicida cuando la parte comestible de la planta está presente.

En el momento de la recolección, los residuos debidos a las dos primeras causas, suelen ser muy bajos o nulos, con frecuencia inferior a los límites de determinación (aunque suele haber excepciones como las hortalizas de raíz o tubérculos que pueden absorber los plaguicidas del suelo); siendo la principal causa de la presencia de estos residuos la aplicación del plaguicida a la parte comestible de la planta. (6)

Los residuos pueden ser:

- a) La sustancia activa y sus metabolitos primarios libres, estructuralmente semejantes a la molécula original.
- b) Productos conjugados: del plaguicida o de sus metabolitos, generalmente solubles en agua.
- c) Metabolitos conjugados covalentemente: son insolubles y no extraíbles

Las características de la planta tratada influyen en la evolución de los residuos de la misma; la estructura física de la epidermis (rugosidad, pilosidad, etc.) de la que depende el tamaño de área expuesta, así como su composición química (recubrimiento ceroso, etc.) pues la mayor parte de los plaguicidas son apolares por lo que se pueden solubilizar en la parte cerosa, reteniéndose en ella y alargando su persistencia.

Los plaguicidas presentan una actividad translaminar (es decir pasan a través de la epidermis a las hojas pero no se mueven más allá) y una actividad sistémica que puede ser acropetal (se mueve de las raíces a las hojas) o basipetal (se mueve de las hojas a las raíces). (6, 11)



1.1.3.2 Factores que influyen en la eliminación y degradación ambiental de los residuos de plaguicidas.

A partir del momento de la aplicación y a lo largo del tiempo la concentración de los residuos va disminuyendo progresivamente por: la acción del crecimiento del órgano vegetal tratado, eliminación por factores ambientales (lluvia, viento, volatilización, solubilización), degradación química etc. El conjunto de estos factores determina el modelo y velocidad de disipación del plaguicida y la cantidad de residuos en un momento dado.

1. Influencia del sustrato vegetal: como los residuos de éstos se expresan en miligramos de plaguicida por kilogramo de vegetal tratado, al aumentar el peso del órgano vegetal, los plaguicidas se diluyen, disminuyendo su cantidad proporcionalmente.
2. Causas mecánicas (lluvia y viento): éstos eliminarán gran parte de los residuos si actúan poco después de la aplicación o cuando el depósito no está aún seco o bien adherido al vegetal.
Los factores más importantes que influyen en la eliminación de residuos por causas mecánicas son: intensidad de la precipitación y cantidad de esta; tipo de plaguicida; tipo de formulación; naturaleza del sustrato vegetal; momento de la lluvia; velocidad del viento y su duración.
3. Causas físicas (volatilización y solubilización): el ritmo de volatilización es función de la presión de vapor del plaguicida, esta característica está influenciada por la temperatura y la velocidad del viento. Los plaguicidas presentan generalmente altas presiones de vapor (del orden de 10^{-4} a 10^{-6} mm de mercurio), por lo que son muy volátiles, gracias a esto son eficaces pues actúan por inhalación y penetran en lugares recónditos; aunque también su alta presión de vapor ayuda a la rápida disipación del plaguicida.

El plaguicida es eliminado al disolverse parcialmente en el agua de lluvia, aunque la mayoría de éstos son débilmente solubles en agua, pero si la precipitación es abundante y la cantidad de plaguicida aplicado es pequeña, la eliminación de los residuos es importante.

4. Descomposición química: se considera como la vía principal de eliminación de los residuos de plaguicidas y depende de la estructura molecular del plaguicida ya que ésta determina la estabilidad química.

Las reacciones que intervienen en la degradación son: hidrólisis, oxidaciones y reducciones, isomerizaciones, descarboxilaciones, etc.

Estos procesos de degradación tienen lugar tanto en la superficie del vegetal como en el interior de sus tejidos y como consecuencia de estas reacciones se originan metabolitos que pueden presentar más alta o baja toxicidad en comparación con la molécula original, *Figura 1.1*. Por ejemplo, los insecticidas tiofosforados; como el paratión, sufren una desulfuración oxidativa en las células vivas formando sus derivados análogos oxigenados (por ejemplo el paraoxón), que son más tóxicos que los primeros. (12)

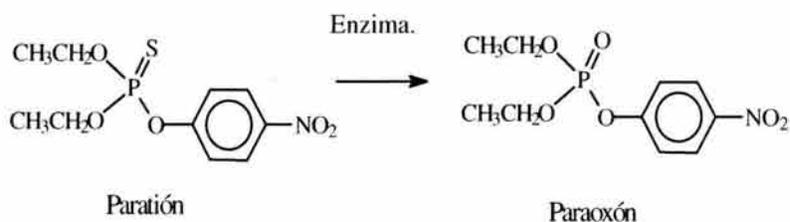


Figura 1.1. Activación enzimática del paratión.

5. Fotodescomposición: los plaguicidas que quedan en la superficie del vegetal son descompuestos por la luz del sol, y se acelera su descomposición en presencia de agua. La alteración fotoquímica es causada por la porción ultravioleta del espectro solar, especialmente la comprendida entre 300 y 400 nm de longitud de onda. Por ejemplo los plaguicidas organofosforados se hidrolizan en presencia de luz dando metabolitos solubles en agua y sin actividad colinesterásica.
6. Adsorción por los coloides del suelo: la distribución de los plaguicidas en el suelo depende de su adsorción sobre las partículas coloidales, de sus características fisicoquímicas y de las propiedades físicas y biológicas del suelo. Los suelos arcillosos tienden a adsorber más fuertemente a los plaguicidas por establecimiento de fuerzas de atracción del tipo Van der Waals y la formación de puentes de hidrógeno. Su adsorción puede aumentar su persistencia, pero también retarda su acción como plaguicida. Los residuos de plaguicidas en la superficie del suelo son más vulnerables de sufrir degradaciones químicas y volatilización.
7. Acción microbiana: Cuando los plaguicidas se incorporan al suelo el principal medio para su degradación es la actividad microbiana, los microorganismos metabolizan gran parte de los plaguicidas, transformándolos en moléculas menos tóxicas, aunque existen algunas excepciones en donde las moléculas resultantes son más tóxicas que la molécula original. (6, 7)

1.1.3.3 Disminución de residuos de plaguicidas por tratamientos domésticos.

Muchos productos vegetales se consumen tal como vienen del mercado, especialmente frutas y hortalizas de consumo en fresco, aunque también suelen someterse a tratamientos domésticos como lavado, pelado, cocción, etc., antes de ser consumidos. Estos tratamientos pueden disminuir notablemente el contenido de residuos en el producto vegetal considerado.

La rapidez con que se eliminan estos residuos, depende del tipo de plaguicida usado, de su localización en el alimento, del tipo de alimento y de la naturaleza del tratamiento doméstico aplicado.

Lavado

El lavado puede ser muy eficaz en la eliminación de residuos, que están en la superficie del producto y su eficiencia está en función de:

- El tipo de plaguicida: cuanto más hidrosolubles sean, más fácilmente serán eliminados.
- El tipo de formulación aplicada: si contiene adherentes u otros coadyuvantes que aumentan la persistencia, éstos disminuyen el grado de eliminación.
- Tipo de producto vegetal: algunos tienen la capacidad de retener fuertemente los residuos debido a su forma física y la composición química de su superficie.
- Tiempo transcurrido desde la aplicación: cuanto más tiempo haya transcurrido más difícil será eliminar los residuos, debido a su parcial penetración, con el tiempo, en los tejidos del vegetal.
- Tipo e intensidad del lavado: grado de agitación mecánica, presencia o no de detergentes, pH del agua, temperatura del agua, tiempo de lavado, etc.

En función de todos estos factores, un lavado puede eliminar; ninguno o más de un 80 % de los residuos de plaguicidas.

Pelado

Es eficaz para eliminar prácticamente la totalidad de los residuos de plaguicidas que quedan en la superficie de frutas y tubérculos, sin embargo, es deficiente para los residuos penetrantes.

Para gran número de frutas y hortalizas la mayor parte de los residuos de plaguicidas se localizan en la periferia, sobre la superficie o en las primeras capas del tejido vegetal. Un pelado de la fruta y hortaliza puede eliminar hasta un 70 a 90 % de estos residuos.

Cocción

El tratamiento por calor acelera la degradación de los residuos transformándolos en compuestos más simples y menos tóxicos, aunque existen algunas excepciones. Por ejemplo, los residuos de etilbisditiocarbamatos (mancozeb, maneb, zineb) pueden incrementar su peligrosidad por la cocción, al degradarse en su metabolito etilentiourea (ETU), que presenta un mayor riesgo que la molécula original. Sin embargo, la mayor parte de los plaguicidas tiende a disminuir la peligrosidad de sus residuos. (6)

1.1.4 Efectos adversos para el ambiente.

La presencia de plaguicidas ampliamente difundidos y persistentes en el ambiente pueden conducir a la pérdida de suelos utilizables, así como la contaminación de otros recursos naturales y fuentes de agua superficial y subterránea afectando de manera directa o indirecta a todos los seres vivos incluyendo al hombre.

El ser humano puede ingerir residuos de plaguicidas no sólo al consumir vegetales tratados, sino también alimentos de origen animal, donde se hayan podido acumular estos residuos. Cuando se trata de residuos de cierta persistencia y además solubles en grasas, éstos tienden a acumularse en tejidos adiposos y grasas en general.

En este sentido, los plaguicidas organoclorados han caído en desuso debido a su persistencia en el ambiente, pues tienden a acumularse principalmente en los tejidos adiposos de los organismos vivientes, presentando finalmente una acumulación y bioconcentración a través de la cadena trófica, permaneciendo como residuos en los diferentes sustratos y en los alimentos del hombre.

Por otra parte los plaguicidas organofosforados son sustancias poco persistentes en el ambiente. Debido a esto, sus efectos sobre él se observan fundamentalmente a corto plazo; su alta toxicidad aguda causa la muerte a especies benéficas como: abejas, insectos polinizadores, peces, etc., especies que no constituyen el blanco. (6, 7, 13)

1.1.4.1 Bioacumulación y biomagnificación.

Bioacumulación es el proceso por el cual un organismo toma del medio sustancias no nutritivas y las acumula en los tejidos. Cuando los plaguicidas persistentes entran a las redes alimentarias, se distribuyen en ellas, se bioacumulan en cada nivel trófico y se biomagnifican. La bioacumulación depende, de la

naturaleza química del compuesto, de la cantidad que entra en contacto con el organismo y de la velocidad de absorción y de excreción del tóxico en cada organismo. Las propiedades que favorecen que un plaguicida se bioacumule son: baja solubilidad en agua, liposolubilidad elevada y alta estabilidad ante la humedad, la luz, la temperatura y la presencia de microorganismos.

Biomagnificación es el proceso mediante el cual algunas sustancias aumentan su concentración de manera progresiva a lo largo de las cadenas alimenticias. Estas concentraciones pueden ser letales para algunos organismos de la cadena trófica o llegar a los niveles superiores de ésta, como el hombre y las aves rapaces.

La capacidad de bioacumulación y biomagnificación de un producto está en relación directa con su persistencia. (8)

1.1.4.2 Movilidad y persistencia de los plaguicidas en el ambiente.

La persistencia de un plaguicida es la duración de éste, sin cambio molecular, a partir del momento de su aplicación en el ambiente. Esta característica, aunada a su movilidad, aumenta el riesgo de estos productos para el ambiente y la salud.

Los factores que influyen sobre la persistencia de los plaguicidas son: el clima, tipo de suelo, su contenido de materia orgánica y microorganismos, por ello la persistencia de un plaguicida varía de un lugar a otro.

A continuación se mencionan algunos ejemplos de la persistencia, bioacumulación y tiempo de vida media de algunos plaguicidas *Tablas No 1.3 y 1.4:*

Tabla No. 1.3. Persistencia de algunos plaguicidas.

Plaguicida	Tiempo de vida media
Clordano	3.3 años
Dieldrin	> 7 años
Endosulfan	35 – 190 días
Captan	1- 12 días
Diclobenil	1 año
Carbaril	4- 29 días
Malatión	4 – 6 días
2,4-D	1 – 14 días

(14)

Tabla No. 1.4. Persistencia de algunos plaguicidas

Plaguicida	Persistencia en suelo (semanas)	Factor de bioconcentración
Organoclorados		
Aldrín	530	4.444 (pez)
Dieldrín	312	3.300 (pez)
Endrín	624	1.000 (pez)
DDT	546	70.000 (ostra)
Hexaclorobenceno (HCB)	208	60 (ostra)
α -Hexaciclohexano (α -HCH)	728	60 (ostra)
Organofosforados		
Malatión	2	0 (camarón)
Paratión	8	
Forato	2	0 (pez)
Carbamatos		
Carbarilo	2	0 (ostra)
Carbofuran	8-16	0
Varios		
Diclorvos	8	0 (ostra)
Captan	1	0
2,4,5-T	1-12	0
Cloruro de etilmercurio	permanente	3000 (pez)

(8)

La movilidad de los plaguicidas se puede determinar a través de los estudios de adsorción/desorción y de lixiviación. Estos estudios se hacen en los suelos más representativos de las zonas agrícolas y nos indican si los plaguicidas y sus productos de descomposición pueden causar la contaminación de alimentos de consumo humano y de animales; pérdida de suelos utilizables y fuentes de agua; así como, la pérdida del hábitat para la vida silvestre.

La movilidad de los plaguicidas depende del tipo de suelo, decrece en suelos con alto contenido de materia orgánica, de estructura fina o bajo pH; y aumenta en suelos con texturas más gruesas y con alto pH. (8)

1.1.5 Toxicidad de los plaguicidas.

En la toxicidad de los plaguicidas intervienen varios factores entre los cuales se encuentran: su estructura molecular (relación estructura – actividad), sus propiedades fisicoquímicas, de las que depende su afinidad por sistemas biológicos específicos; la dosis de exposición a los mismos, así como la intensidad y duración de ésta, la vía de penetración, etc.

Es frecuente que los efectos tóxicos de éstos se aumenten por los ingredientes de la formulación con que se mezclan.

Los métodos empleados para medir la toxicidad son la dosis letal media (DL_{50}) expresada en miligramos de plaguicida por kilogramo de peso corporal (mg/Kg), que evalúa la toxicidad aguda; y el método llamado potencial de toxicidad (pT), que es la dosis tóxica en términos de concentración y se expresa en moles de plaguicida por kilogramo de peso corporal (mol/Kg), siendo el más empleado el primero de ellos.

Los resultados de DL_{50} para cada sustancia sirven de base para los sistemas de clasificación de la toxicidad de los plaguicidas. La toxicidad de los plaguicidas presenta distintos aspectos. En primer lugar se distingue entre toxicidad aguda y toxicidad crónica. La toxicidad aguda puede ser oral, dérmica o por inhalación. *Tabla No 1.5*

La toxicidad oral aguda se refiere a los efectos tóxicos que causa la ingestión del plaguicida una sola vez y se mide a través de la DL_{50} .

La toxicidad dérmica se refiere a los riesgos por contacto y penetración por la piel y se mide como DL_{50} dérmica aguda, que es la cantidad de tóxico expresada en mg/Kg que en contacto por la piel del animal ensayado durante 24 horas es capaz de producir la muerte por penetración del 50 % de los animales ensayados en un plazo de 14 días.

La toxicidad por inhalación debido a una atmósfera contaminada como ocurre con el caso de fumigantes, espolvoreos, nebulizaciones, etc., se mide por la concentración letal que es capaz de producir la muerte del 50 % de los animales ensayados (CL_{50}) que se expresa en miligramos de sustancia por metro cúbico de aire.

Tabla No 1.5. Clasificación de los plaguicidas conforme a su peligrosidad.

Categoría	DL ₅₀ en mg/Kg. de masa corporal				CL ₅₀ Aguda por inhalación mg/L	
	Aguda oral		Aguda dérmica			
	Estado físico		Estado físico		Exposición: 1 hrs	
	Sólido	Líquido	Sólido	Líquido		
	Más de - hasta	Más de - hasta	Más de - hasta	Más de - hasta		
I Extremadamente Tóxicos	-- 5.0	-- 20.0	-- 10.0	-- 40.0	-- 0.2	
II Altamente Tóxicos	5.0 50.0	20.0 200.0	10.0 100.0	40.0 400.0	0.2 2.0	
III Moderadamente Tóxicos	50.0 500.0	200.0 2000.0	100.0 1000.0	400.0 4000.0	2.0 20.0	
IV Ligeramente Tóxicos	500.0 --	2000.0 --	1000.0 --	4000.0 --	20.0 --	

(8)



Desde el punto de vista de los residuos interesa más su toxicidad a corto y mediano plazo (toxicidad subcrónica) y a largo plazo (toxicidad crónica). Entre los factores de interés destacan los siguientes:

- Posibilidades cancerígenas.
- Efectos mutagénicos.
- Efectos teratogénicos.
- Metabolismo de los plaguicidas en el organismo con las características toxicológicas de los metabolitos y los mecanismos de eliminación de estas sustancias.
- Neurotoxicidad.
- Posibles efectos retardados.
- Potenciación por los efectos de otros tóxicos.

Los plaguicidas organofosforados inhiben la acción de varias enzimas en particular, de la acetilcolinesterasa (ACE). Esta enzima realiza la hidrólisis de la acetilcolina (AC) que se genera en las terminales nerviosas y que actúa como transmisora del impulso nervioso. Por hidrólisis bajo la acción de la acetilcolinesterasa la AC se convierte en colina, la cual permanece en estado iónico activo. En el primer paso de esta reacción la acetilcolinesterasa se combina con la acetilcolina para formar un complejo reversible que acetila la enzima y libera la colina. Después, el agua del medio permite liberar la enzima del producto acetilado y dejar en libertad a la enzima y al ácido acético.

Los efectos de la intoxicación por plaguicidas organofosforados se deben a la fosforilación de la enzima acetilcolinesterasa y a la acumulación de la acetilcolina en la sinapsis del nervio, lo que provoca que los impulsos nerviosos no se transmitan normalmente.

La acetilcolinesterasa tiene dos sitios activos, el primero es el sitio aniónico y el segundo es el sitio de formación del éster entre el aminoácido de la enzima y su sustrato. Los plaguicidas organofosforados se unen al segundo sitio activo de la acetilcolinesterasa fosforilándolo, por lo que compiten con la acetilcolina. En la reacción, primero se forma un complejo entre la ACE y el compuesto organofosforado, el cual da lugar a la enzima fosforilada, ésta se hidroliza muy lentamente, porque la unión de la enzima con el fósforo es más fuerte que su unión con el carbono de la acetilcolina.

Debido a que el grupo $P = S$ es menos electrofílico que el $P = O$, los fosforotionatos necesitan oxidarse a los fosfatos correspondientes para ser activos en los organismos.

Su toxicidad crónica es difícil de evaluar, pues en estudios epidemiológicos sobre efectos crónicos de plaguicidas organofosforados en el hombre ha sido difícil relacionar los efectos observados con agentes

causales específicos; aunque se ha encontrado una correlación importante entre la incidencia de efectos neurológicos y el tiempo de exposición de estos plaguicidas.

Diversas pruebas *in vitro* han demostrado que varios plaguicidas organofosforados son potencialmente mutagénicos y teratogénicos.

Los carbamatos al igual que los organofosforados, actúan inhibiendo la actividad de la enzima ACE pero, a diferencia de ellos, la unión con la enzima es reversible, por lo que las manifestaciones de la intoxicación son más benignas y de menor duración; penetran poco al sistema nervioso central, por lo que no hay manifestaciones en ese nivel y después de un corto tiempo la actividad de la ACE retorna a la normalidad.

Algunas reacciones bioquímicas específicas de los compuestos organoclorados son la inhibición de la enzima ATPasa y la elevación de la fosfatasa alcalina y la transaminasa seroglutámica. Tanto el DDT como sus análogos actúan sobre la corteza suprarrenal, en donde causan efectos antiesteroidales y alteraciones en el metabolismo de la vitamina A. En el sistema nervioso central y periférico, los insecticidas organoclorados causan cambios en el movimiento de los iones sodio y potasio a través de la membrana axonal; además alteran las concentraciones de norepinefrina y de otros neurotransmisores tales como el ácido gama-amino butírico (GABA).

Los compuestos organoclorados también tienden a causar una disminución de la respuesta inmunológica del organismo, ya sea retardando la información de anticuerpos o inhibiéndola. Tienen potencial carcinogénico y, en algunos casos teratogénico y embriotóxico.

Su toxicidad aguda suele ser baja, pero presentan efectos adversos a largo plazo (en muchos casos no se manifiestan efectos adversos en el organismo expuesto sino en su descendencia) por lo que contaminan el medio ambiente. (6, 8, 11, 13, 15)

1.1.6 Límite máximo de residuos.

El "Límite máximo de residuo"(LMR) es la cantidad máxima residual de un determinado plaguicida sobre un determinado producto agrícola permitido por la ley. (6)

En otras palabras, se puede decir que es la concentración permitida de un residuo, en o sobre un alimento, que puede aceptarse para el consumo humano o animal a largo plazo. Se expresa en miligramos de plaguicida por kilogramo de peso del alimento fresco (mg/Kg o ppm).

Existen dos criterios para la fijación del límite máximo de residuos (LMR's), el toxicológico y el agronómico *Figura No 1.2*, en el primero se pretende que la ingestión diaria del plaguicida a lo largo de

toda una vida no provoque efectos adversos a la salud de los consumidores, mientras que, en el segundo las dosis empleadas de los plaguicidas deben ser las adecuadas para proteger los cultivos de plagas y/o enfermedades y minimizar los riesgos toxicológicos y ambientales. Esto se logra haciendo uso de buenas prácticas agrícolas, eligiendo las alternativas menos contaminantes, tratando sólo cuando sea necesario, no superando las dosis recomendadas, respetando los plazos de seguridad tras la aplicación, etc. (6)

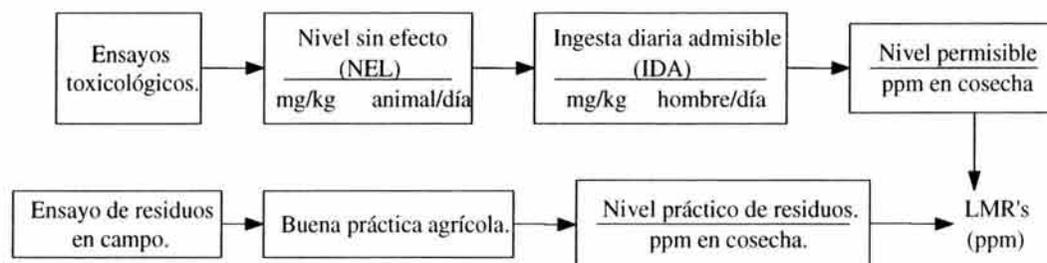


Figura No 1.2. Criterios para la fijación del límite máximo de residuos.

En México los encargados de fijar los límites máximos de residuos son la Secretaría de Agricultura Ganadería y Desarrollo Rural (SAGAR) junto con la Subsecretaría de Agricultura, la Comisión Nacional de Sanidad Agropecuaria y la Dirección General de Sanidad Vegetal. Basándose principalmente en los datos reportados por la Agencia de Protección del Ambiente (Environment Protection Agency, EPA su nombre y sigas en Inglés) y la Organización Mundial de la Salud (OMS).

Estas Instituciones Gubernamentales editaron “La Guía de Plaguicidas Autorizados de Uso Agrícola” en septiembre de 1999; en el cual se encuentran los LMR’s de plaguicidas para cada producto agrícola, así como el intervalo de seguridad en días; es decir el tiempo transcurrido desde la aplicación hasta el consumo de vegetales. A continuación se presentan LMR’s de algunas hortalizas obtenidos de la SAGAR y al EPA.

En cultivos de espinaca la EPA recomienda el uso de 31 plaguicidas diferentes los cuales pueden aplicarse solos o en mezclas mientras que la SAGAR solo permite el uso de 6 de estos plaguicidas recomendados.

Tabla No 1.6 y Tabla No 1.6.1.

Tabla No 1.6. Plaguicidas autorizados en cultivos de espinaca en México.

Plaguicida	LMR (ppm)	Intervalo de seguridad (días)
Azinfos metílico	2.000	14
Diazinon	0.700	10
Malatión	8.000	Sin límite
Paratión metílico	1.000	21
Naled	3.000	4
Permetrina	20.000	7
Dimetoato	2.000	14

(16)

Tabla No 1.6.1. Plaguicidas y límites máximos de residuos permitidos por la EPA en espinaca.

Plaguicida.	LMR (ppm).
Abemactin	0.05
Aletrin	--
Azinfos metil	2.0
Benomil	0.20
Benoxacor	0.01
Captan	100.0
Carbarilo	12.0
Clorprofam	0.3
Cletodim	2.0
Clopiralid	5.0
Diazinon	0.7
Dimetoato	2.0
Disulfoton	0.75
Dodine	12.0
Endosulfan	2.0
Fluazifop-butil	6.0
Lindano	1.0
Metalaxil	10
Metomil	6.0
Metoxicloro	--
Metil paratión	1
Metolacloro	0.30
Mevinfos	1.0
Naled	3.0
Paratión	1
Permetrina	20.0
Femnedifam	0.5
Profam	0.1
S-Etilciclohexiletioicarbamato	0.05
Ziram	7.0
Glifosato y sus metabolitos	0.2

(17)

A continuación se presentan los plaguicidas permitidos por la SAGAR para otras hortalizas de gran consumo en México, en las que el intervalo de seguridad varia dependiendo del tipo de vegetal. Todos los LMR's reportados por esta secretaría fueron tomados de la EPA. *Tablas No 1.7, 1.8 y 1.9.*

Tabla No 1.7. Acelga.

Plaguicida	LMR (ppm)	Intervalo de seguridad (días)
Paratión metílico	1.000	21
Malatión	8.000	Sin límite

(16)

Tabla No 1.8. Col.

Plaguicida	LMR (ppm)	Intervalo de seguridad (días)
Azinfos metílico	2.000	15
Diazinon	0.700	7
Naled	1.000	7
Oxidemeton metil	1.000	21
Paratión metílico	1.000	21
Carbarilo	10.000	3
Dimetoato	2.000	3
Endosulfan	2.000	14
Malatión	8.000	7
Metamidofos	1.000	35
Permetrina	6.000	1
Triclorfon	0.100	21
Metomilo	5.000	1
Fenvalerato	10.000	3
Lambda cyalotrina	0.400	1
Clorotalonil	5.000	Sin límite
Maneb	10.000	10
Captan	2.000	7
Azaridactina	--	Sin límite

(16)

Tabla No 1.9. Lechuga.

Plaguicida	LMR (ppm)	Intervalo de seguridad (días)
Naled	1.000	1
Paratión metílico	1.000	15
Malatión	8.000	14
Oxidemeton metil	2.000	21
Metomilo	5.000	7
Acefato	10.000	14
Azaridactina	--	Sin límite
Endosulfan	2.000	14
Metamidofos	1.000	14
Permetrina	20.000	1
Triclorfon	0.100	21
Folpet	50.000	Sin límite
Maneb	10.000	10
Vinclozolin	10.000	28
Diazinon	0.7000	14
Dimetoato	2.000	14
Mevinfos	0.500	7

(16)

1.2 Generalidades sobre métodos de análisis.

Todo método de análisis de alimentos involucra varias etapas:

1. Muestreo: la selección de los productos a analizar es fundamental para los resultados que se esperan obtener. Dado que tan solo se analiza una pequeña parte del producto se requiere que la muestra seleccionada cumpla con requisitos como integridad, representatividad, etc. Esto debe garantizar que la muestra representa el todo.
2. Preparación de la muestra: dado que las muestras contienen un número muy grande de compuestos (no necesariamente plaguicidas) y que los instrumentos de medición analítica son altamente sensitivos, se necesita que la muestra contenga la menor cantidad posible de interferencias que impidan la determinación o que dañen los instrumentos.
3. Concentración: usualmente los analitos que se determinan están presentes en la muestra a nivel de trazas por lo que deben ser concentrados de tal manera que la concentración final de estos quede dentro del intervalo de concentración óptimo del método de análisis empleado.
4. Determinación: las metodologías instrumentales seleccionadas para el análisis deben ser capaces de determinar cualitativa y cuantitativamente los plaguicidas de interes, es decir deben tener una sensibilidad y selectividad adecuada.

1.2.1 Muestreo.

El muestreo puede ser un proceso complejo dependiendo del producto muestreado y los componentes por los cuales el producto es analizado, además de que desde el momento en que se efectúa el muestreo hasta que se realiza el análisis no se debe agregar ningún componente a la muestra ni perder ningún componente de la misma.

Los principales objetivos del muestreo son asegurar que las muestras sean representativas del material que se analiza y que las muestras analizadas en el laboratorio sean homogéneas, para ello debe tomarse en cuenta el tamaño del lote que se va a muestrear, el estado físico de la fracción que se va a analizar y las propiedades químicas del material que se va a ensayar.

Para tomar muestras representativas y en el caso particular cuando los residuos a analizar tienen límites legales, la muestra final debe ser representativa del lote original; para ello se deben emplear métodos de muestreo adecuados como el muestreo aleatorio en el cual todos los miembros de la población tienen la misma probabilidad de ser incluidos en la muestra ó el muestreo a granel para materiales rocosos, polvos, gases y líquidos, los cuales no están constituidos por elementos discretos, este tipo de muestras se dividen en celdas que se muestrean aleatoriamente.

Cuando una muestra es homogénea, sólo es necesario tomar una porción de la muestra la cual tiene las mismas propiedades del total de la misma. En el caso de los líquidos algunos deben ser mezclados para garantizar que la muestra tomada es homogénea. Cuando las muestras son heterogéneas se deben muestrear diferentes partes del conjunto o tratar de homogenizar la muestra cuando sea posible mediante la trituración, pulverización, molienda, etc.

Por ejemplo, un alimento fumigado con un plaguicida a menudo tiene concentraciones variadas de residuos en la superficie dependiendo donde tuvo contacto el fumigante. Los plaguicidas sintéticos, los cuales se translocan de la superficie de la planta a sus frutos u otras porciones comestibles no son uniformemente distribuidos y a menudo se concentran en áreas particulares. (18)

Existen diversos procedimientos de muestreo en alimentos los cuales han sido implementados por la Administración de Alimentos y Drogas (FDA por sus siglas en Inglés), Organización de Alimentos y Agricultura/Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Comisión del Codex Alimentarius.

El muestreo de alimentos puede ser en el campo o en el mercado, en el primero se recomienda muestrear directamente en el campo o un poco después de la cosecha y para ello se hace una cuadrícula imaginaria que conste de 100 cuadros y se seleccionan sólo 10 aleatoriamente.

Los alimentos crudos o parcialmente procesados son vendidos en el mercado a granel por peso o volumen e incluyen: frutas y vegetales frescos, arroz, frijoles, legumbres, huevos, pescados y mariscos aceite vegetal, etc., cada uno de estos productos puede ser muestreado en lotes a granel teniendo en mente el tamaño del lote en el mercado.

El AOAC y el Codex recomiendan usar la siguiente *Tabla 1.10*, para determinar el número de porciones que deben ser tomadas por muestra y recomiendan los siguientes tamaños mínimos de muestra para los productos indicados. (19, 20)

- Vegetales y frutas (se debe tomar en cuenta el tamaño de éstos):
 - Para alimentos compuestos de piezas pequeñas con pesos de 25 g o menores (por ejemplo, cerezas, chícharos, olivos, perejil), tomar 1 Kg como mínimo.

- Para alimentos compuestos de piezas de tamaño mediano con pesos de 25 a 250 g (por ejemplo, manzanas naranjas, zanahorias, papas), tomar 1 Kg como mínimo (con al menos 10 unidades).
- Para alimentos compuestos de piezas grandes con pesos mayores a 250 g (por ejemplo, coles melones, pepinos), tomar 2 Kg como mínimo (con al menos 5 unidades).

- Arroz, frijoles, leguminosas, etc. 1 Kg mínimo.
- Huevos. 10 huevos mínimo.
- Pescados y mariscos. 1Kg mínimo.
- Aceites vegetales. 0.5 Kg mínimo.

Tabla No 1.10. Registro del muestreo para todos los alimentos a granel excepto carne y sus derivados.

Peso del lote (Kg).	Número de porciones tomadas.
50 o menos	3
51 a 500	5
501 a 2000	10
Mayor de 2000	15

1.2.2 Preparación de muestras

1.2.2.1 Importancia de la preparación de muestras en determinaciones instrumentales.

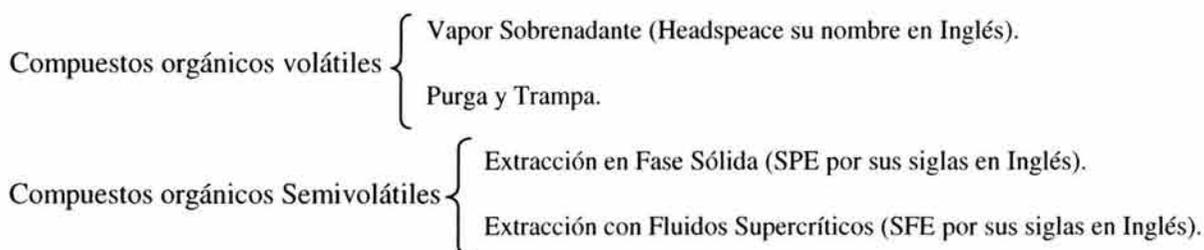
Los objetivos principales de la preparación de muestras son la limpieza y concentración de la muestra para su análisis posterior en la técnica instrumental elegida. Estas técnicas deben lograr de preferencia: evitar al máximo la manipulación de la muestra que cause la pérdida o contaminación de los analitos de interés, eliminar en lo posible las interferencias que proporciona la matriz, sin que estas técnicas adicionen nuevas interferencias, además de buscar que la concentración del analito quede dentro de un intervalo aceptable para su determinación.

Por muchos años la preparación de muestra más popular fue la extracción líquido-líquido, la cual se lleva a cabo en embudos de separación, consume tiempo, es tediosa y costosa. Otras técnicas de preparación de muestras clásicas incluyen la centrifugación, filtración, destilación, cromatografía en columna, liofilización, etc. Estos métodos no sólo involucran varias etapas sino que pueden presentar algunos de los siguientes problemas de análisis: emulsión de fases, grandes volúmenes de disolventes, extractos impuros o húmedos, así como extracciones no cuantitativas e irreproducibles y a menudo son la mayor fuente de error en la cuantificación final.

Mientras que las técnicas analíticas mejoraron volviéndose más eficientes, la extracción de muestras se estancó, por lo que la preparación de muestras aún consume el mayor tiempo en el análisis. Por tal motivo en la década de los 80's se desarrollaron nuevas técnicas de preparación de muestras, con las cuales se ha logrado disminuir los tiempos de análisis, la manipulación de la muestra y el uso de grandes volúmenes de disolventes, entre otros problemas asociados a estas. (20, 21, 22)

1.2.2.2 Clasificación de los procesos de preparación de muestras.

Éstas técnicas se pueden clasificar tomando en cuenta las propiedades físicas de los compuestos orgánicos a determinar, aunque esto no es lo único para su elección, ya que también son importantes las características de la matriz en la que se encuentran y su concentración en ella. Por ejemplo, las técnicas de Vapor Sobrenadante y la de Purga y Trampa se usan en muestras líquidas y sólidas en las que se tienen compuestos orgánicos volátiles. (23, 24)



1.2.2.3 Técnica de vapor sobrenadante (Headspace por su nombre en Inglés).

Esta técnica se aplica en el análisis de los compuestos orgánicos volátiles, que pueden estar en matrices sólidas o líquidas. En esta técnica una cantidad conocida de muestra se confina en un recipiente cerrado dejando un volumen de fase gaseosa (normalmente aire) en la parte de arriba de la muestra, el recipiente se calienta a una temperatura constante un determinado tiempo *Figura 1.3*, para después analizar el vapor confinado en el recipiente.

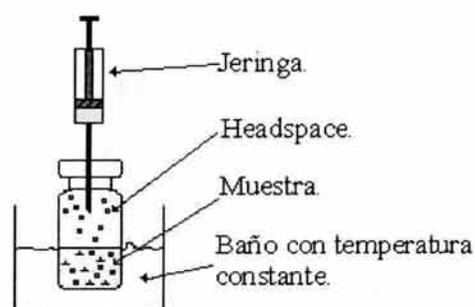


Figura 1.3. Diagrama headspace.

Esta técnica es simple de usar, permite una gran limpieza de la muestra, tiene una alta sensibilidad y su principal objetivo es el de eliminar en la medida de lo posible la manipulación de la muestra, además la extracción por vapor sobrenadante también permite la concentración de los analitos de interés al pasarlos a un volumen de fase gaseosa más pequeño que la muestra que los contiene. Una clara ventaja de esta

técnica es que no existen cambios de disolvente, aunque una de sus limitantes es el tipo de compuestos que pueden ser analizados - sólo para compuestos volátiles -.

Los parámetros que afectan la extracción en esta técnica son:

- Tiempo: éste debe ser el necesario para que se establezca el equilibrio deseado de los analitos con la matriz y el volumen de aire del recipiente en el que se encuentra confinada la muestra, y dependerá de la velocidad de difusión de los compuestos volátiles, la cual a su vez, dependerá del tipo de matriz en la que se encuentren los analitos (sólida o líquida).

Para comprobar que se ha llegado al equilibrio, se prepara una serie de muestras idénticas calentadas a una temperatura, variando el tiempo de calentamiento y se determina el momento en el que las áreas de los analitos ya no aumentan (recobro). *Figura No 1.4*

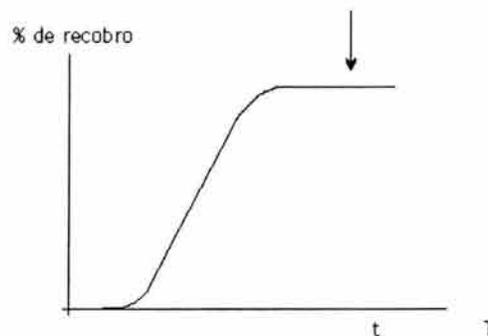


Figura No 1.4. Determinación del tiempo necesario para llegar al equilibrio.

- Coeficiente de reparto (K): El coeficiente de reparto es la relación de las concentraciones de los analitos entre la fase líquida (C_L) y la fase gaseosa (C_G) en el equilibrio, *Ecuación No 1.0*. La extracción de los analitos depende directamente de su coeficiente de reparto, el cual a su vez es dependiente de la matriz y la temperatura. Esta última modifica la presión de vapor de los analitos, mientras que en la matriz se puede modificar al coeficiente de partición por medio del efecto salino, pH y humedad.

$$K = \frac{C_L}{C_G} \quad (1.0)$$

Para encontrar la cantidad de analito en cada fase es necesario conocer el volumen de las dos fases, y como se distribuye el analito entre la fase vapor y la fase líquida en el equilibrio. *Ecuación No 2.0*

$$C_0 V_L = C_G V_G + C_L V_L \quad (2.0)$$

En donde: C_G = Concentración del analito en la fase gaseosa.

V_G = Volumen de la fase gaseosa.

C_L = Concentración del analito en la fase líquida.

V_L = Volumen de la fase líquida.

C_0 = Concentración total del analito.

Si despejamos C_L de la ecuación No 1 y la sustituimos en la ecuación No 2 y reareglando la ecuación se puede conocer la concentración del analito en la fase gaseosa. *Ecuación No 2.1*

$$C_G = \frac{C_0}{(K + V_G/V_L)} \quad (2.1)$$

- Relación de volúmenes de la muestra y la fase gaseosa: ésta técnica permite la extracción y concentración de los analitos simultáneamente, siempre que el volumen de "headspace" sea pequeño los analitos serán concentrados.

Alternativas de aplicación de la técnica:

1. Headspace estático: Se deja que los analitos lleguen al equilibrio bajo las condiciones establecidas (tiempo y temperatura), y una vez que esto sucede se toma un volumen de la parte del vapor sobrenadante o fase gaseosa y se analiza en la técnica instrumental. Permite hacer análisis cualitativos y cuantitativos
2. Headspace dinámico: En éste no es necesario que los analitos lleguen al equilibrio bajo las condiciones establecidas, ya que se hace pasar un gas inerte a través de la fase líquida que acarrea los compuestos volátiles hacia una trampa en donde se atrapan (adsorben) y concentran, aunque la eficiencia en la purga depende de la cinética y el tiempo. Posteriormente los analitos se liberan de la trampa por elución, calentamiento, etc., y se analizan en la técnica instrumental de interés. (25)

Aplicaciones del análisis de vapor sobrenadante.

Esta técnica es aplicable a diversas áreas como: Alimentos (aromas), biociencias, ambiental, polímeros, petróleo y sus derivados, cosmética, etc.

1.2.2.4 Purga y Trampa (PyT).

Esta técnica es una adaptación de la técnica de vapor sobrenadante dinámico que instrumentalmente se diseñó para muestras acuosas *Figura 1.5*, en donde el PyT está acoplado al cromatógrafo de gases a través del inyector.

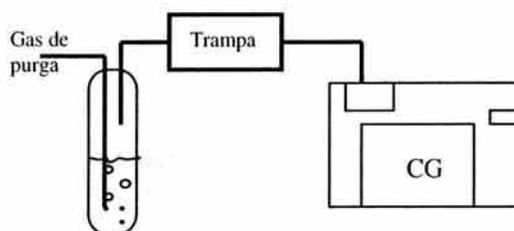


Figura 1.5. Diagrama PyT.

En esta técnica una muestra líquida (aunque actualmente ya se venden equipos con adaptaciones para muestras sólidas) se coloca en un recipiente cerrado y se hace burbujear un gas inerte (He o N₂) a través de ella, la muestra puede ser calentada si se desea. El gas inerte acarrea los compuestos orgánicos volátiles que se encuentran presentes, los cuales son retenidos en una trampa (preparada normalmente de Tenax, sílica gel y carbón activado); en la cual se concentran. Los analitos retenidos son desorbidos al calentar rápidamente la trampa y purgarla con un gas inerte un cierto tiempo; los analitos desorbidos son transferidos y analizados en la técnica instrumental requerida, usualmente está es Cromatografía de Gases (CG). (20, 25)

1.2.2.5 Extracción en Fase Sólida (SPE, sus siglas en Inglés).

Esta técnica separa y extrae los analitos de interés de la muestra en la que se encuentran y los concentra al ser eluidos posteriormente con un disolvente. *Figura 1.6*.

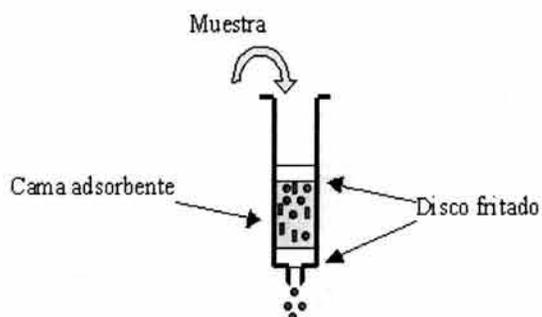


Figura 1.6. Diagrama SPE.

La disolución que contiene los analitos se pasa por una fase sólida empacada, de manera que los compuestos son adsorbidos selectivamente por esta fase, los cuales se eluyen después con una pequeña cantidad de disolvente (eluyente), por lo que se reduce el volumen de la disolución final que contiene los analitos y por consiguiente se modifica la matriz en la que se encuentran.

Las columnas designadas para esta técnica son hechas de polipropileno y usualmente están empacadas con 100, 200, 500, 1000 o 2000 mg de adsorbente, el cual se encuentra entre dos discos fritos de polietileno. La capacidad de volumen de muestra en la columna es de 1, 3 o 6 ml aunque puede ser mayor si se adaptan reservorios a las columnas.

Los tipos de fases sólidas comerciales usadas en esta técnica son:

- Sílica químicamente unida (puede ser de: fase inversa, fase normal e intercambio iónico)
- Sílica, florisil, alúmina (interacciones de fase normal)
- Resinas químicamente unidas
- Resinas de intercambio iónico
- Partículas de exclusión

Éstas fases sólidas deben tener un tamaño de partícula adecuado de manera que su área superficial sea lo suficientemente grande para interactuar y atrapar los analitos de interés, deben tener estabilidad al pH y a los disolventes usados.

La secuencia típica de extracción consiste en: acondicionar el cartucho de extracción, aplicar la muestra y eluirlo. El objetivo de acondicionar el cartucho de extracción es solvatar los grupos funcionales del adsorbente para que estos interactúen reproduciblemente con el analito y consiste en pasar un volumen de disolvente a través de la fase sólida, por lo que ésta se moja creándose así un ambiente favorable para la retención. Una vez solvatado el adsorbente este no debe ser secado, específicamente antes de pasar la muestra.

La forma en que se hace pasar la muestra a través de la fase sólida adsorbente es usando presión positiva o negativa o centrifugación, y el disolvente con el que se eluyen los analitos debe tener la fuerza suficiente como para desplazar las interacciones que tiene el analito con el adsorbente.

Los mecanismos de separación ocurren mediante interacciones entre las moléculas del analito y los grupos funcionales del adsorbente, el tipo de interacciones que presentan pueden ser polares, no polares ó iónicas.

Interacciones no polares o de fase reversa.

Se dice que estas interacciones son de fase reversa porque el adsorbente es menos polar que la solución de la muestra o la fase móvil. Este tipo de interacciones ocurre entre los hidrógenos unidos a carbono del adsorbente y los hidrógenos unidos a carbono de los analitos, a este tipo de interacciones se les conoce como fuerzas de van der Waals o de dispersión. *Figura No 1.7*

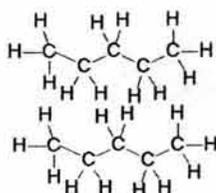


Figura No 1.7. Fuerzas de van der Waals o de dispersión.

Los adsorbentes que presentan este tipo de interacciones son silicas enlazadas que contiene los siguientes grupos funcionales: octadecil (C18), octil (C8), etil (C2), ciclohexil (C6), fenil, etc.

Los analitos que pueden extraerse son no polares o medianamente polares (grupos aromáticos o alifáticos), para favorecer la retención de éstos, es decir facilitar las interacciones no polares entre analito-adsorbente, los analitos deben encontrarse en matrices polares, por el contrario cuando se desea eluir los analitos, se deben usar disolventes o sus mezclas que sean suficientemente no polares como para romper las interacciones analito-adsorbente.

Los disolventes comúnmente usados que favorecen la retención de los analitos son: agua, amortiguadores orgánicos de baja fuerza iónica, mezclas agua/metanol, agua/acetonitrilo, etc.

Los disolventes comúnmente usados que favorecen la elución de los analitos son: metanol, acetonitrilo, acetato de etilo, cloruro de metileno, etc.

Interacciones polares o de fase normal.

Se dice que estas interacciones son de fase normal porque el adsorbente es más polar que la solución de la muestra o la fase móvil. El tipo de interacciones que se presentan son: puentes de hidrógeno, dipolo-dipolo, dipolo-dipolo inducido, etc., en las cuales la distribución de electrones entre los átomos individuales en los grupos funcionales es desigual, causando una polaridad positiva y negativa. Esta propiedad permite que los grupos funcionales polares de los analitos interactúen con los grupos polares del adsorbente. *Figura No 1.8.*

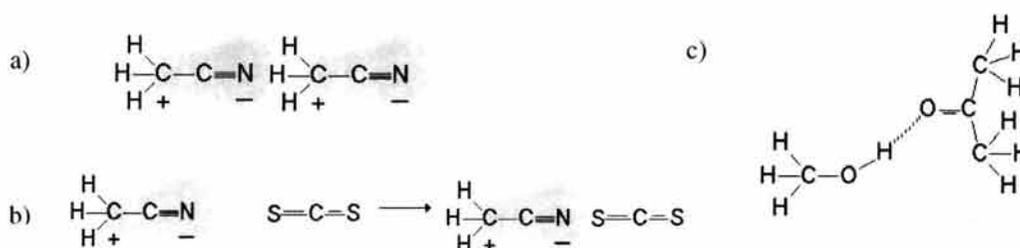


Figura No 1.8. Interacciones a) dipolo-dipolo, b) dipolo-dipolo inducido, c) puentes de hidrógeno.

Los adsorbentes que presentan este tipo de interacciones son silicas enlazadas que contiene los siguientes grupos funcionales: ciano (CN), amino (NH₂), diol (2OH), etc.

Este tipo de fases son ideales para separar compuestos organoclorados y organofosforados.

Los analitos que pueden extraerse son polares o medianamente polares, para favorecer la retención de estos, es decir facilitar las interacciones polares entre analito-adsorbente, los analitos deben encontrarse en matrices no polares, por el contrario cuando se desea eluir los analitos se deben usar disolventes o sus mezclas que sean suficientemente polares como para romper las interacciones analito-adsorbente.

Los disolventes comúnmente usados que favorecen la retención de los analitos son: hexano, isooctano, cloroformo, cloruro de metileno, etc.

Los disolventes comúnmente usados que favorecen la elución de los analitos son: metanol, agua, isopropanol, acetonitrilo, acetona, etc.

Interacciones de intercambio iónico.

Estas interacciones pueden ser aniónicas o cationicas, y se llevan a cabo entre las moléculas cargadas del analito (positiva o negativamente) y las moléculas del adsorbente con carga opuesta a las del analito.

Para retener efectivamente a los analitos, la matriz y el adsorbente deben de estar a un pH donde tanto el analito como el adsorbente estén cargados y no deben de contener altas concentraciones de especies iónicas que compitan por la misma carga que el analito.

Dado que el pH influye en la retención y elución de los analitos, es necesario conocer el pKa de cada grupo, pues el número de moléculas que tienen grupos cationicos cargados aumenta a pH menor al valor de pKa de las moléculas y disminuye a pH's mayores que su pKa y por el contrario el número de moléculas con grupos anionicos cargados aumenta a pH mayor que el pKa de las moléculas y disminuye a pH menor que su pKa.

Para eluir los analitos retenidos es necesario neutralizar sus grupos cargados y para ello se debe cambiar el pH del disolvente, de tal manera que para neutralizar los grupos cationicos el pH del disolvente debe ser mayor que su pKa y para neutralizar los grupos anionicos el pH debe ser menor que su pKa.

Los adsorbentes que presentan este tipo de interacciones son silicas enlazadas que contiene los siguientes grupos funcionales: dietilaminopropil (DEA), trimetilaminopropil (SAX), carboximetil (CBA), etc.

Selectividad y capacidad del adsorbente.

Es necesario también conocer la capacidad y selectividad del adsorbente usado para obtener buenos resultados en la retención, es decir se debe conocer la cantidad de analito que es capaz de retener una masa dada del adsorbente y la selectividad que presenta con este, la cual depende de la estructura de los compuestos a separar, de las propiedades del adsorbente y la composición de la matriz, así por ejemplo, la

máxima selectividad se da cuando el adsorbente elegido solo interactúa con los grupos funcionales del analito los cuales no están presentes en otros componentes de la matriz, bajo estas condiciones los analitos son retenidos y los otros compuestos de la matriz pasan sin retenerse. (21, 26)

1.2.2.6 Extracción con Fluidos Supercríticos (SFE, sus siglas en Inglés).

En esta técnica una pequeña cantidad de muestra se coloca en un cartucho de extracción, después se sella y presuriza el sistema introduciendo un fluido supercrítico, éste se hace pasar a través de la muestra un determinado tiempo, hasta extraer la mayor cantidad de analito o analitos de interés los cuales se recolectan posteriormente. *Figura 1.9.*

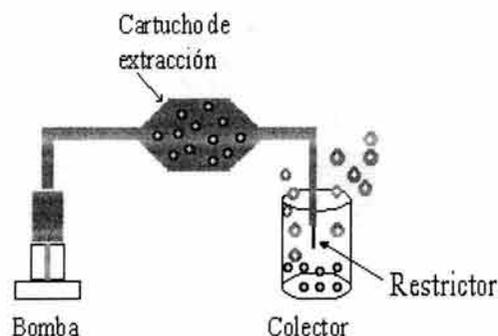
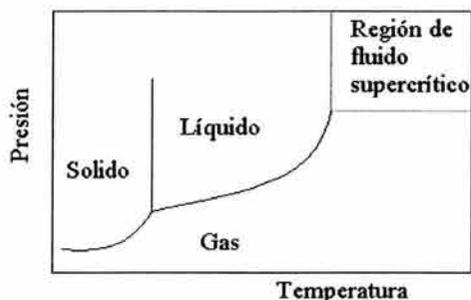


Figura 1.9. Diagrama SFE.

Un fluido supercrítico es aquel que se encuentra por arriba de su punto crítico, es decir arriba de su temperatura y presión críticas. Los fluidos supercríticos tienen densidades, viscosidades y otras propiedades que son intermedias entre las características de esa sustancia en estado gaseoso y en estado líquido. *Figura No 1.10.*



Fluido supercrítico	T _C (° C)	P _C (atm)
Pentano	197	33
CClF ₃	29	38
N ₂ O	36	72
CO ₂	31	73
NH ₃	132	112

Figura No 1.10. Diagrama de fases para una sustancia.

Tabla No 1.11. Temperaturas y presiones críticas de algunos fluidos supercríticos.

Una de las ventajas de la extracción con fluidos supercríticos es que extrae y concentra simultáneamente los analitos por lo que permite disminuir el tiempo de análisis eliminando pasos y disminuye los costos por uso de disolventes. Además de que la transferencia de masa de los analitos al fluido es de 10 a 100 veces más rápida por lo que se obtienen recobros más rápidos. Algunos de los fluidos supercríticos son gases a temperatura ambiente por lo que la etapa de concentración es simplificada y esto hace también que los acoplamientos en línea sean más fáciles, y algunos de estos fluidos son inertes y no tóxicos.

Los pasos principales de esta técnica son: Extracción de los analitos, concentración y reconstitución de los mismos en un disolvente apropiado.

El tipo de muestras analizadas en ésta técnica pueden ser líquidas o sólidas, aunque una desventaja es que solo se pueden analizar pequeñas cantidades de muestra por dificultades instrumentales las cuales tal vez no sean representativas de la muestra completa.

La cantidad de fluido usado en la extracción debe ser tal que ésta extraiga los analitos contenidos en la muestra. Después de la extracción la mezcla fluido-analitos deja el sistema presurizado en el que se encuentra y pasa a través del restrictor en donde el fluido se expande por la disminución de la presión, con lo que éste es removido y los analitos extraídos precipitan (concentran) y son recolectados de inmediato, ya sea en viales vacíos o con disolvente, en una trampa adsorbente, o en una trampa criogénica.

Los analitos recolectados son finalmente reconstituidos en un disolvente adecuado, el cual se elige de acuerdo al tipo de análisis subsecuente.

En la extracción con fluidos supercríticos, la cantidad de soluto disuelto en el fluido es función de la densidad de éste, es decir la fuerza del solvente es selectiva pues se eligen las temperaturas y presiones que dan la densidad deseada. Como puede observarse en la *Figura No 1.11* para el CO_2 debajo de la temperatura crítica, las fases gaseosa y líquida coexisten, el gas tiene el mínimo poder solvente y el líquido la máxima; arriba de la temperatura crítica el poder solvente es ajustable vía la densidad; arriba de la temperatura crítica, hay un límite en el poder solvente y está cercano a densidades altas en donde hay muy poca ganancia en densidad con grandes incrementos en la presión.

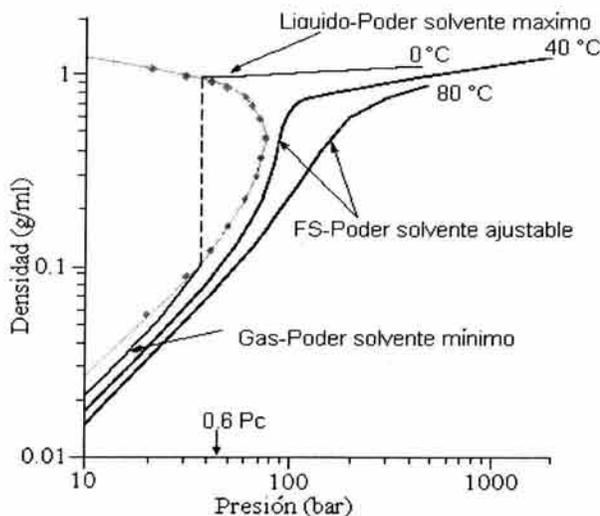


Figura No 1.11. Densidad como función de la presión y temperatura para el CO_2 .

El fluido supercrítico más empleado es el CO₂ porque no representa problema alguno al ser eliminado al medio ambiente después de la extracción, tiene una baja toxicidad, una moderada temperatura crítica y disponibilidad.

El CO₂ como fluido supercrítico extrae preferentemente los compuestos no polares, y con dificultad los compuestos ligeramente polares, para mejorar la extracción de estos últimos se debe aumentar la fuerza disolvente del fluido, es decir su polaridad, para ello se pueden usar otros fluidos supercríticos o se pueden adicionar modificadores al fluido supercrítico o a la muestra, como el metanol o etanol.

La técnica de extracción con fluidos supercríticos puede ser de tipo dinámico o estático; en la primera se suministra constantemente el fluido supercrítico de 0.1 a 3.0 ml/min, lo cual evita su saturación con el analito. En la segunda se pone en contacto con la muestra una cierta cantidad de fluido supercrítico que se recircula a través de la muestra un cierto tiempo (de preferencia hasta alcanzar el equilibrio), para después ventearlo y colectar los analitos. (21, 27,28)

1.2.3 Concentración.

En las técnicas de preparación de muestras clásicas se logra separar los analitos de interés de las interferencias de la matriz, pero estos se encuentran la mayoría de las veces muy diluidos para su determinación directa, por ejemplo cuando se separan los analitos en columnas abiertas suelen eluirse con grandes volúmenes de disolventes. Otro problema en la preparación de muestras clásicas es el disolvente de extracción o elución usado pues muchas veces no es compatible con la técnica instrumental a utilizar, por ejemplo debe ser compatible con la fase móvil en cromatografía de líquidos ó con el sistema inyección/detección en la cromatografía de gases. La solución para ambos problemas es evaporar los disolventes de elución o extracción de tal manera que no causen la pérdida de los analitos.

En todos los métodos de residuos analíticos se requiere de remover el disolvente para incrementar hasta cierto punto la concentración de los analitos. Existen diferentes técnicas de concentración/evaporación disponibles y la mejor técnica en una situación particular depende de las características físicas y químicas del analito y del disolvente que debe ser evaporado.

El método más usado para evaporar grandes cantidades de disolventes sin perder los analitos por evaporación es el concentrador Kuderna-Danish (KD), aunque también suele usarse el rotavapor y el evaporador con corriente de nitrógeno, éste último para evaporar pequeñas cantidades de disolvente.

Concentrador KD.

Consta de tres partes básicas: un tubo colector seguido de un frasco invertido y arriba de éste se coloca una columna condensadora (Snyder). El aparato entero se deja en un baño de vapor con el tubo colector sumergido en el agua caliente permitiendo así que el vapor fluya alrededor de la porción baja del frasco, por lo que el disolvente es evaporado en la parte ancha del frasco, la columna Snyder permite que el disolvente se evapore pero retiene los analitos vaporizados por reflujo. *Figura No 1.12*



Figura No 1.12. Concentrador K-D.

Rotavapor.

Este aparato también permite evaporar grandes volúmenes de disolvente, este equipo consiste de un evaporador rotatorio con dos matraces redondos, un tubo hueco, un motor, condensador, un baño caliente, una unidad de refrigeración y un sistema de vacío. *Figura No 1.13.*

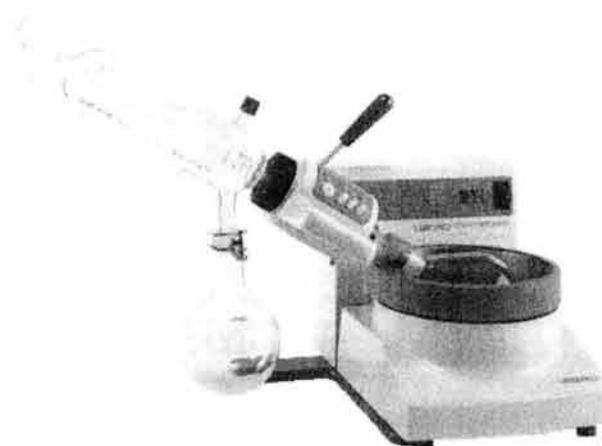


Figura No 1.13. Rotavapor.

El extracto obtenido se coloca en el matraz que se encuentra parcialmente sumergido en el baño caliente, el aparato completo se conecta al vacío el cual aumenta gradualmente mientras continúa la concentración, finalmente el disolvente evaporado se colecta en el segundo matraz.

La evaporación en este tipo de aparato es rápida pues el matraz en el que se encuentra la muestra gira de tal manera que el disolvente forma una película delgada en las paredes internas del matraz aumentando el área superficial del mismo facilitando su evaporación.

Por ejemplo, se prefiere usar un rotavapor para evaporar el tolueno (p eb 110 ° C) porque tiene un punto de ebullición más alto que el acetonitrilo (p eb 81 ° C), acetona (p eb 56 ° C) y cloruro de metileno (p eb 40 ° C) y para lograr esto se requiere del vacío para que la evaporación sea más rápida.

Evaporador con corriente de nitrógeno.

Éste evaporador se usa para concentrar pequeñas cantidades de disolvente, las cuales específicamente no pueden ser evaporadas en un rotavapor por ejemplo.

La concentración se lleva a cabo pasando una corriente de nitrógeno seco de alta pureza sobre la superficie del disolvente el cual es calentado ligeramente con un baño María y el flujo del gas debe ser regulado de manera que el disolvente no salpique las paredes del recipiente que lo contiene. *Figura No 1.14 (19)*

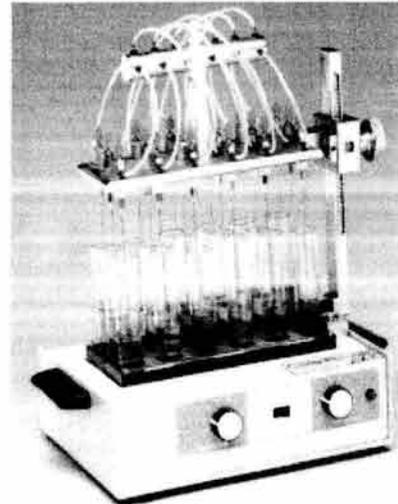


Figura 1.14. Evaporador con corriente de nitrógeno.

Con el desarrollo de las nuevas técnicas de preparación de muestras como las antes mencionadas, el paso de concentración se simplificó pues se ha disminuido el volumen de disolventes usado y en algunos casos este paso es eliminado, por lo que se ahorra tiempo en el análisis de muestras y disminuyen los costos de operación.

1.2.4 Métodos analíticos.

1.2.4.1 Cromatografía.

La cromatografía es una técnica fisicoquímica de separación basada en la distribución de los analitos entre dos fases, una estacionaria y otra móvil. La fase móvil puede ser un gas, un líquido o un fluido supercrítico, y se hace pasar a través de una fase estacionaria con la que es inmisible, la cual se fija o empaca a una columna o a una superficie sólida. Las dos fases se eligen de tal forma que los componentes de la muestra se distribuyen de modo distinto entre ellas. Aquellos componentes que son fuertemente retenidos por la fase estacionaria se mueven lentamente; por el contrario, los componentes que se unen débilmente a la fase estacionaria, se mueven con rapidez. Como consecuencia de la distinta movilidad, los componentes de la muestra son separados y pueden analizarse cualitativa y/o cuantitativamente.

Las técnicas cromatográficas se pueden clasificar según:

1. La forma en que las fases estacionaria y móvil se ponen en contacto: Cromatografía en columna y Cromatografía plana.
2. El tipo de fase móvil y fase estacionaria.

Esta última es la más usada y a la que se hace referencia en el siguiente esquema. *Figura No 1.15*

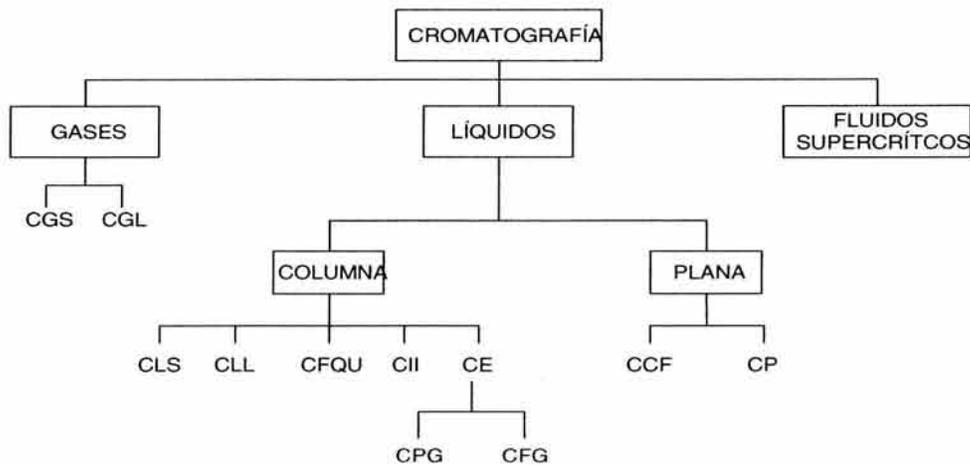


Figura No 1.15. Clasificación de los métodos cromatográficos. CGS: Cromatografía Gas-Sólido; CGL: Cromatografía Gas-Líquido; CLS: Cromatografía Líquido-Sólido; CLL: Cromatografía Líquido-Líquido; CFQU: Cromatografía de Fases Químicamente Unidas; CII: Cromatografía de Intercambio Iónico; CE: Cromatografía de Exclusión; CCF: Cromatografía de Capa Fina; CP: Cromatografía en Papel; CPG: Cromatografía de Permeación en Gel; CFG: Cromatografía de Filtración en Gel.

La cromatografía de líquidos puede llevarse a cabo en columnas o superficies planas; mientras que la cromatografía de gases está restringida a los procedimientos en columna.

En la cromatografía en columna las muestras son separadas al eluirlas con una fase móvil. La elución implica el transporte de una especie a través de una columna por la adición continua de nueva fase móvil. Las sucesivas adiciones de la fase móvil hacen avanzar las moléculas de soluto por la columna en una serie de continuas transferencias entre las dos fases. (29, 30)

1.2.4.1.1 Cromatografía de Gases.

En la cromatografía de gases (CG), La elución se produce por el flujo de una fase móvil de un gas inerte, la fase móvil no interacciona con las moléculas de analito, su única función es la de transportar el analito a través de la columna, mientras que la fase estacionaria es un sólido o un líquido de alto punto de ebullición. Las moléculas de la muestra se distribuyen o equilibran entre el gas portador y la fase estacionaria, las muestras que son más solubles en la fase estacionaria permanecen menos tiempo en el gas portador en movimiento y, por lo tanto se desplazan con más lentitud a través de la columna.

Existen dos tipos de cromatografía de gases: la *cromatografía gas-sólido* y la *cromatografía gas-líquido*.

La *cromatografía gas-sólido* se basa en una fase estacionaria sólida en la cual se produce la retención de los analitos como consecuencia de la adsorción física.

La *cromatografía gas-líquido* se basa en la distribución del analito entre una fase móvil gaseosa y una fase líquida inmovilizada sobre la superficie de un sólido inerte. (30)

1.2.4.1.2 Parámetros Cromatográficos.

A medida que la muestra se reparte entre las dos fases y es arrastrada a través de la columna, los compuestos que contiene se van separando en bandas individuales debido a una serie de transferencias entre las fases, obteniéndose así para cada compuesto separado un pico bien definido. Si los solutos permanecen mucho tiempo en la columna, se obtendrán picos más anchos, es decir, menos altos y más gruesos.

Un cromatograma es el registro gráfico del análisis, y es un registro de señal en función del tiempo. Cuando sólo sale de la columna gas portador aparecerá dibujada una línea recta, *línea base*. Cuando eluye la muestra, se dibuja el perfil de su concentración en forma de pico obteniendo así el *tiempo de retención* y el *área del pico*. *Figura No 1.16*

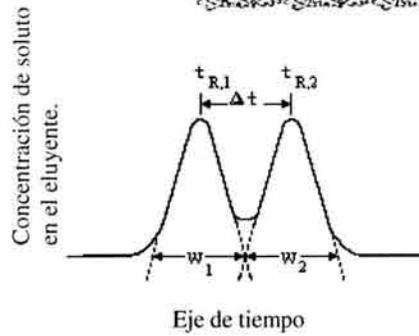


Figura No 1.17: Definición de la resolución.

Cuando este término es muy pequeño ($R_s = 0.75$), los picos se traslapan, y por el contrario si es muy grande ($R_s = 10$), se desperdicia tiempo de análisis; una resolución de 1.5 es suficiente para separar dos picos de tamaño similar. *Figura No 1.18*

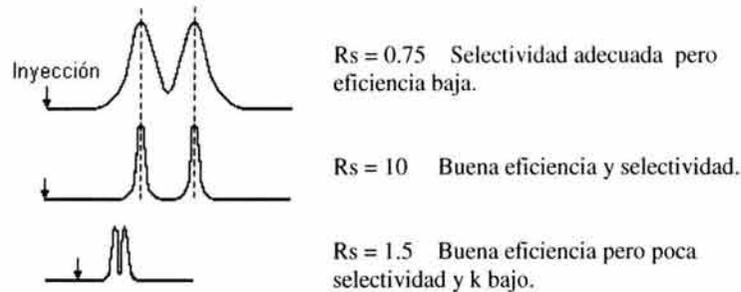


Figura No 1.18: Diagrama de la separación de dos compuestos con distintas resoluciones.

La resolución también es afectada por diversos parámetros operacionales como se muestra en la siguiente *Ecuación 6.0*:

$$R_s = \frac{1}{4} \sqrt{N} \left[\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right] \left[\frac{k}{1 + k} \right] \quad (6.0)$$

Donde: N = Eficiencia.

α = Selectividad.

k = Capacidad.

Se puede variar cada uno de los tres términos de la ecuación para modificar la resolución, la cual puede mejorar al aumentar la separación entre los picos cambiando la selectividad de la columna ó disminuyendo sus anchos individuales (eficiencia de la columna). (29, 30, 31)

Ensanchamiento del pico (platos teóricos).

La eficiencia de la columna es expresada por el número de platos teóricos, “N”. Los platos teóricos miden el ensanchamiento de la banda del soluto a medida que pasa a través de la columna.

Se define un plato teórico como un equilibrio entre las dos fases, y es calculado a partir del tiempo de retención y la anchura de la base del pico (w_b). *Ecuación 7.0*

$$N = 16 \left(\frac{t_r}{w_b} \right)^2 \quad (7.0)$$

Con frecuencia es preferible medir el ancho del pico a la mitad de su altura ($w_{1/2}$) pues esta medición es menos sensible a la asimetría por coleo o cabeceo de los picos. *Ecuación 7.1*

$$N = 5.54 \left(\frac{t_r}{w_{1/2}} \right)^2 \quad (7.1)$$

Algunos de los factores que afectan el número de platos teóricos son: tiempo de retención, longitud de columna, temperatura de columna, soluto, caudal, tamaño de la muestra, técnica de inyección, etc. (29)

La eficiencia de la columna también se expresa como la altura de plato teórico H, *Ecuación 8.0*. Al aumentar el número de platos teóricos disminuye la altura y más eficiente es la columna.

$$H = \frac{L}{N} \quad (8.0)$$

Donde L es la longitud de la columna expresada en centímetros o milímetros. H indica la longitud de la columna necesaria para generar un plato.

Para conseguir una máxima eficiencia, la columna debe funcionar a un caudal óptimo de gas acarreador, y que se puede calcular a partir de una gráfica de H en función del caudal (gráfica de Van Deemter). En donde la altura mínima de H determina la velocidad lineal óptima del gas (fase móvil) o el caudal que debe usarse. *Figura No 1.19*

Al aumentar la longitud de la columna, también aumenta N, sin embargo, también aumenta el tiempo de análisis. Otros factores como el gas acarreador y el grosor de la fase estacionaria empleados también afectan la eficiencia. (29, 31)

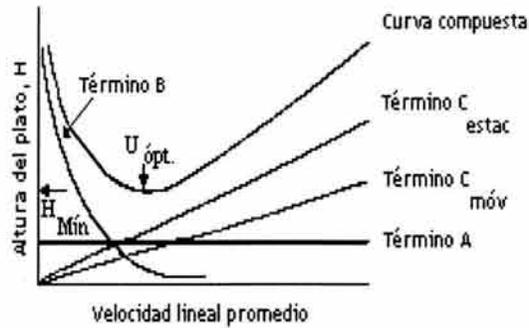


Figura No 1.19: Gráfica de Van Deemter para una columna empacada de cromatografía de gases.

La altura del plato define el ensanchamiento del pico y los factores que la afectan son los procesos termodinámicos y cinéticos de la columna:

- Irregularidades del flujo que provocan mezclado convectivo.
- Difusión transversal y longitudinal en la fase móvil.
- Velocidad finita en el equilibrio del soluto entre la fase estacionaria y fase móvil.

La ecuación de Van Deemter *Ecuación No 9.0*, relaciona los parámetros operacionales de la columna con su eficiencia.

$$H = A + B/\bar{\mu} + C\bar{\mu} \quad (9.0)$$

Estos tres términos identifican los principales aportes a la dispersión del pico, donde:

A es la difusión parásita o efecto de camino múltiple, que es el resultado de la heterogeneidad en las velocidades del flujo y en la longitud de los caminos alrededor de las partículas del empaque, por lo que las moléculas de la muestra se mueven a diferente velocidad lineal provocando el ensanchamiento de los picos disminuyendo la eficiencia de la columna. Cuando se utilizan columnas capilares el término **A** es cero.

B es la difusión molecular longitudinal o axial, es decir el soluto emigra de las zonas de alta concentración a las de menor concentración dentro de la fase móvil, y depende de la velocidad media del gas. La difusión provoca una dispersión gaussiana que disminuye la eficiencia de la columna.

C es la resistencia a la transferencia de masa del soluto. El movimiento molecular lento dentro de la fase estacionaria significa un mayor tiempo de residencia en esta fase mientras que otras moléculas avanzan con la fase móvil. Conforme la fase móvil se mueve más rápido a través de la columna y más lenta sea la

transferencia de masa, más ancha será la banda del soluto que eluye de la columna. C depende del espesor de la fase estacionaria, la difusibilidad del soluto en la fase líquida, el factor de capacidad y la velocidad de flujo. (29)

$\bar{\mu}$ es la velocidad lineal promedio del gas en la que la columna funciona con su máxima eficiencia y puede determinarse a partir de la longitud de la columna, L ; y el tiempo muerto t_0 . Ecuación 10.0

$$\bar{\mu} = \frac{L}{t_0} \quad (10.0)$$

Es importante seleccionar el gas acarreador adecuado porque afecta el funcionamiento tanto de la columna como del detector.

Selectividad.

La selectividad se refiere al espacio relativo entre dos picos *Figura No 1.18*. Este término está definido por la retención relativa (α) Ecuación 11.0 que es la relación del tiempo que dos picos permanecen en la fase estacionaria y es proporcional al coeficiente de reparto, K . Si $\alpha = 1.00$ los dos picos tienen solubilidades idénticas y es imposible la separación. Mientras más elevados son los valores de alfa, mayor es la selectividad de la fase estacionaria y más fáciles las separaciones. (29, 30)

$$\alpha = \frac{t_r A}{t_r B} = \frac{t_r(A) - t_0}{t_r(B) - t_0} \quad (11.0)$$

El término α es optimizado al seleccionar la fase estacionaria y la temperatura de la columna correctas.

Factor de capacidad.

El término retención está definido por el factor de capacidad k , el cual relaciona la cantidad de soluto en la fase estacionaria y móvil en equilibrio con las propiedades termodinámicas de la columna y con la temperatura. El factor de capacidad es el tiempo adicional que un soluto requiere para eluir en comparación con un soluto no retenido, dividido entre el tiempo de elución de un soluto no retenido. Ecuación 12.0

$$k = \frac{t_r - t_0}{t_0} \quad (12.0)$$

1.2.4.1.3 Instrumento: Cromatógrafo de Gases.

Los componentes básicos de un cromatógrafo de gases son: Cilindro del gas portador, control del caudal del gas, inyector, horno, columna, detector, registrador. (29, 30, 31)

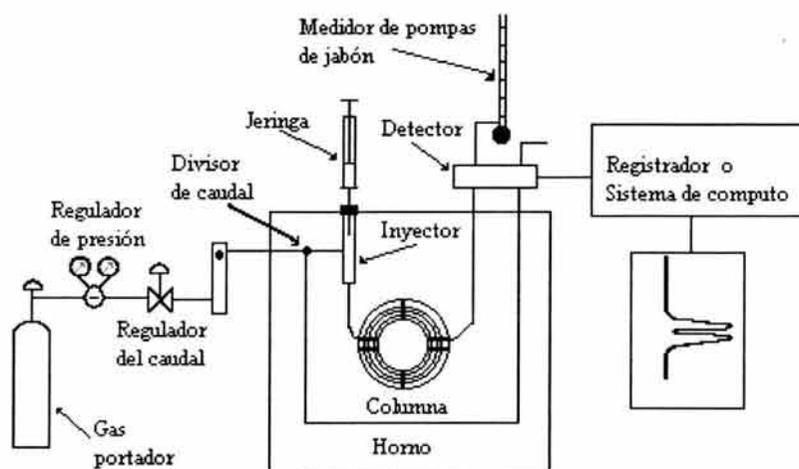


Figura No 1.20: Esquema de un Cromatógrafo de Gases.

Gas portador.

Transporta los componentes volátiles de la muestra a través de la columna. Deberá ser químicamente inerte, no reaccionar ni con la muestra ni con la fase estacionaria, de alta pureza, de bajo peso molecular y un propósito secundario de éste es el de obtener una matriz adecuada para que el detector mida el componente de la muestra.

Los gases portadores utilizados en cromatografía de gases son el helio, nitrógeno e hidrógeno.

Si el gas portador es de peso molecular elevado (como el nitrógeno), generará más platos teóricos, aunque se retardará el tiempo de análisis, un gas portador ligero (como el H_2 y He) genera menor cantidad de platos teóricos, pero optimiza la velocidad del análisis. El nitrógeno da una eficiencia más alta (menor altura del plato) a la velocidad óptima, mientras que el helio e hidrógeno dan un menor número de platos teóricos, pero su óptimo de eficiencia esta a velocidades de flujo más altas que el nitrógeno, por lo que el tiempo de corrida es reducido. *Figura No 1.21*

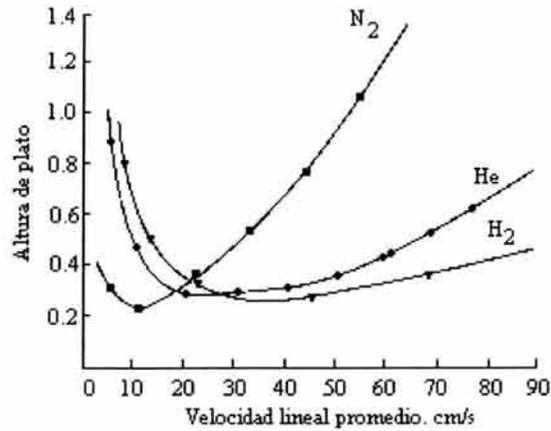


Figura No 1.21: Gráfica Van Deemter para algunos gases portadores que fluyen a través de una columna WCOT.

El gas portador debe ser de alta pureza, pues las impurezas que contenga (en especial agua y oxígeno) pueden alterar químicamente la fase estacionaria y por lo tanto modificar los tiempos de retención y producir señales de fondo en el detector o picos fantasmas.

El gas portador se elige principalmente de acuerdo al tipo de detector empleado y en segundo término la velocidad del análisis que se desea.

Es importante medir y controlar el caudal del gas portador, pues la eficiencia de la columna depende de una apropiada velocidad lineal del gas, y en el análisis cualitativo el flujo del gas debe ser constante para tener tiempos de retención reproducibles.

Esto se logra conectando reguladores de dos etapas en el cilindro del gas portador y reguladores del caudal, aunque muchos cromatógrafos modernos son equipados con medidores electrónicos del caudal los cuales son controlados por computadoras; mientras que la medición de los caudales usualmente se hace con un caudalímetro de burbuja de jabón. (29, 30)

Inyector

La introducción de muestras en el cromatógrafo de gases es mediante jeringas (de 1 a 10 μl de volumen de inyección) o válvulas muestreadoras de gases, en el caso de las jeringas la muestra entra al inyector al perforar con una jeringa un septum de goma de silicon autosellable ubicado en la cabeza del inyector.

El inyector es una cámara de vaporización instantánea situada en la cabeza de la columna, constituida por un alineador de vidrio contenido en un bloque metálico, donde la muestra es vaporizada y barrida hacia la columna.

Normalmente el inyector está 50 °C por encima del punto de ebullición del componente menos volátil de la muestra, el inyector debe ser calentado uniformemente para que la muestra se vaporice rápidamente sin que haya descomposición térmica debido a puntos calientes o condensación debido a puntos fríos.

Las columnas capilares exigen muestras mucho menores, en estos casos se emplea un sistema divisor de la muestra (modo Split su nombre en Inglés), que permite pasar a la cabeza de la columna solamente una pequeña fracción de la muestra inyectada, desechándose el resto. Esta técnica impide la sobrecarga de la columna, pero desperdicia una porción significativa de la muestra; si se desea mejorar la sensibilidad se puede introducir la muestra en la columna por el modo Splitless su nombre en Inglés; también se puede inyectar toda la muestra directamente en la columna (modo On Column su nombre en Inglés), en el cual el inyector es enfriado, la aguja de la jeringa se introduce en la columna, después de la inyección el inyector es rápidamente calentado y comienza la separación. (29, 30, 31)

Horno.

La temperatura de la columna se controla al colocar la columna dentro de un horno, por lo que las columnas deben ser enrolladas. Para tener tiempos de retención reproducibles la temperatura del horno debe ser controlada en el orden de ± 0.1 °C.

Puede suceder que si la temperatura de la columna es muy alta los picos salen muy juntos al principio del cromatograma pobremente resueltos, por el contrario si la columna esta muy fría los compuestos no eluyen a un tiempo razonable, obteniendo picos muy anchos.

Las separaciones cromatográficas pueden ser isotérmicas o programadas: en las separaciones isotérmicas la temperatura de la columna se mantiene constante durante el análisis, provee una resolución óptima pero sólo pueden separarse compuestos con intervalos de punto de ebullición estrechos; en las separaciones con temperatura programada la temperatura aumenta durante el análisis, al comenzar el análisis la temperatura es baja para resolver los compuestos que tienen tiempos de retención pequeños, conforme el análisis avanza la temperatura aumenta reduciendo los tiempos de retención de los compuestos que eran más retenidos. (29)

Columna.

En la cromatografía de gases hay dos tipos básicos de columnas las empacadas y las tubulares abiertas o capilares, estas últimas de amplio y mayor uso en los últimos años.

Las columnas empacadas se construyen con tubos de acero inoxidable, o vidrio; los diámetros internos van de 1.6 a 9.5 mm y con frecuencia la longitud es de 1 - 5 m, estas columnas se empacan con un soporte interno o adsorbente de gran área, usualmente tierra de diatomeas y la fase estacionaria se deposita sobre estos.

La eficiencia de estas aumenta cuando el tamaño de partícula disminuye, y dan mejores separaciones para mezclas de gases y compuestos de bajo peso molecular.

Las columnas capilares tienen un diámetro interno de 0.53 mm o menos, usualmente el capilar se construye de sílica fundida la cual se recubre con poliimida para proteger la pared exterior. La capa de fase estacionaria cubre la pared interior y usualmente tiene un intervalo de grosor de 10 a 0.25 μm .

Para una mayor eficiencia la fase estacionaria se distribuye a través de la columna como una capa delgada.

En las columnas tubulares abiertas la capa de fase estacionaria se deposita en la pared del tubo, por lo que este tipo de columnas tiene una trayectoria para el flujo abierta y sin restricción por en medio, lo cual disminuye la caída de presión. *Figura 1.22.*

Las columnas capilares pueden ser:

- Columnas tubulares abiertas con pared impregnada (wall-coated open tubular WCOT en Inglés). Son tubos de sílica fundida, en que la fase estacionaria líquida cubre la pared interior.
- Columnas tubulares abiertas con soporte impregnado (support-coated open tubular SCOT en Inglés). Son tubos de sílica fundida, en que la fase estacionaria líquida que está impregnada en un soporte cubre la pared interior.
- Columnas tubulares abiertas con capa porosa (porous-layer open tubular PLOT en Inglés). Son tubos de sílica fundida, en que la fase estacionaria sólida cubre la pared interior. (29, 32)

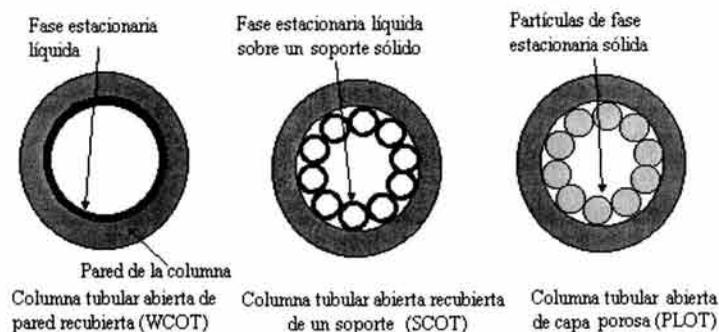


Figura No 1.22: Tipos de columnas tubulares abiertas

La fase estacionaria contenida en la columna determina la retención y selectividad de la separación, esto debido a las interacciones moleculares del soluto con la fase estacionaria (dipolo-dipolo, dipolo-dipolo inducido, puentes de hidrógeno, interacciones dispersivas).

Tipos de fase estacionaria:

1. **Líquidas:** comúnmente son elaboradas de polisiloxanos $(Si-O)_x$, con diversos grupos funcionales como metilos, fenilos, cianopropilos, la concentración y tipo de grupos funcionales determina la selectividad; fases estacionarias polares como el polietilenglicol y ésteres (diisododecil ftalato, dietilenglicol succinato, etc.); fases especiales para compuestos quirales.
2. **Adsorbentes sólidos:** elaboradas a partir de polímeros porosos entrecruzados como acrilonitrilo-copolímero de divinilbenceno, estireno-copolímero de divinilbenceno, polivinil pirrolidona, etc., otros adsorbentes son alumina, sílica gel, zeolitas, etc.
3. **Entrecruzadas:** Estas presentan enlaces covalentes entre sus moléculas, por lo que aumenta su temperatura límite y su tiempo de vida.
4. **Enlazadas:** en estas las fases líquidas forman enlaces covalentes con las paredes de sílica fundida de la columna, son térmicamente más estables y conservan las propiedades cromatográficas de las fases líquidas originales. (29)

Detector.

El detector es un dispositivo que mide la concentración de cada uno de los componentes de la muestra y genera una señal eléctrica proporcional a dicha concentración. Cuando la concentración es alta tiende a ser no lineal y a baja concentración la cantidad mínima detectable es definida como la concentración que da una respuesta tres veces mayor que el ruido (línea base). El intervalo de linealidad de un detector es

definido como la concentración entre el límite de detección y cuando la respuesta se desvía de la linealidad un 10 %. (29)

Los detectores pueden ser sensibles a la concentración, es decir, su respuesta depende sólo de la concentración del analito; o sensibles a la masa, responden a la masa del analito que entra al detector por unidad de tiempo.

Los detectores que responden a todos los analitos son llamados universales y los que sólo responden a ciertos compuestos son llamados selectivos.

En general se desea que los detectores tengan las siguientes características: Adecuada sensibilidad, estabilidad y reproducibilidad, respuesta universal, respuesta selectiva, respuesta lineal, simplicidad y durabilidad. (31)

A continuación se describen tres de los detectores (además del espectrómetro de masas) más usados en la cromatografía de gases:

Detector de Ionización de Flama (DIF).

En un quemador que produce una flama de hidrógeno, el efluente de la columna se mezcla con hidrógeno y aire, al aplicar una diferencia de potencial entre el extremo del quemador y un electrodo colector se produce una corriente la cual proviene de los iones y electrones generados en la flama hidrógeno-aire. Cuando entra en la flama material ionizable con el eluyente de la columna, este se quema y la corriente aumenta notablemente, la corriente que resulta se dirige para su medida hacia un amplificador operacional de alta impedancia.

Este detector es sensible a la masa, pues responde al número de átomos de carbono que entra en el detector por unidad de tiempo, es insensible a compuestos como H_2O , CO_2 , SO_2 y NO_x , grupos funcionales como carbonilo, alcohol, halógeno y amina, originan en la flama pocos iones o prácticamente ninguno. Tiene una elevada sensibilidad (10^{-13} g/s) y un gran intervalo de respuesta lineal (10^7) y bajo ruido; aunque una de sus desventajas es que destruye la muestra. (29)

Detector de Conductividad Térmica (DCT).

Consiste en un filamento metálico en espiral sostenido en el interior de una cavidad que está dentro de un bloque metálico, al pasar una corriente a través del filamento se eleva su temperatura. El filamento pierde calor al transferirlo por medio de conducción térmica con las moléculas del gas portador, convección libre y forzada, radiación y conducción a través de los contactos del metal. La velocidad con la que el filamento pierde calor depende de la composición y flujo del gas.

Cuando eluye una muestra de la columna, como las moléculas de esta son más grandes y se mueven con mayor lentitud conducen menos el calor, la temperatura del filamento aumenta y causa el correspondiente incremento en la resistencia eléctrica. El cambio de resistencia del filamento se mide mediante un circuito con puente de Wheatstone.

Este detector es de respuesta universal, tiene un amplio intervalo lineal (10^5), no es destructivo de la muestra, pero tiene una sensibilidad relativamente baja; 10^{-8} g de soluto/ml de gas portador. (29, 31)

Detector de Captura de Electrones (DCE).

El detector de captura de electrones mide la disminución de una señal en vez del aumento de la corriente. A medida que el gas acarreador fluye a través del detector, una lamina radiactiva de ^{63}Ni ioniza las moléculas de un gas auxiliar (normalmente N_2) y forma electrones lentos, estos se desplazan hacia al ánodo y se colectan produciéndose una corriente constante que se amplifica y mide. Al introducir en el detector una muestra que contenga moléculas que capturan electrones se reducirá esa corriente.

Este detector es de respuesta selectiva para compuestos halogenados, peróxidos, quinonas y grupos nitro, no es sensible a grupos funcionales como aminas, alcoholes e hidrocarburos; tiene un intervalo limitado de respuesta lineal (10^4), y no altera la muestra de manera significativa. (31, 32)

1.2.4.1.4 Ventajas y desventajas de la cromatografía de gases.

Las principales ventajas de la cromatografía de gases son:

- Alta resolución: Lo que permite separar muestras complejas.
- Velocidad: Separa varios compuestos en poco tiempo.
- Sensibilidad: Es capaz de separar mezclas complejas y detectarlas en concentraciones extremadamente bajas esto último depende del tipo de detector utilizado.
- Sencillez.
- Resultados cuantitativos.

Mientras que sus limitaciones son:

- Muestras muy complejas requieren de extracción, limpieza o derivatización (si los compuestos a analizar son termolabiles) antes de analizarlas por cromatografía de gases.
- Es una técnica “deficiente” para análisis cualitativos.

- Es una técnica deficiente para usarla en escala preparativa.
- Es difícil tratar compuestos iónicos, compuestos de elevada polaridad y compuestos de peso molecular elevados pues no son volátiles. (29, 31)

1.2.4.2 Espectrometría de Masas

La espectrometría de masas es una metodología espectroscópica en la cual se generan espectros característicos y únicos para las moléculas de distintos compuestos, por lo que aporta información acerca de la estructura de las moléculas orgánicas, estructura y composición de superficies sólidas, relaciones isotópicas de átomos en las muestras, etc.

El principio bajo el cual operan los espectrómetros de masas es el de promover la ionización de las moléculas de un compuesto y posteriormente separar y cuantificar los distintos iones que se han producido.

Cuando a una molécula la hacemos interaccionar con una fuente de alta energía (ca. 70 eV) provocamos la salida de un electrón del orbital molecular, con ello se genera el ión molecular (M^+); si el ión queda con un exceso de energía que no es capaz de estabilizar, se fragmentará expulsando un fragmento neutro (mx) y formando un ión fragmento (A^+) de menor masa: *Figura No 1.23*

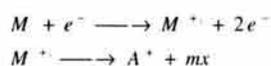


Figura No 1.23. Proceso de ionización.

Si el ión fragmento A^+ aún posee un exceso de energía que no pueda estabilizar, éste continuará fragmentándose expulsando más fragmentos neutros y produciendo iones de masas cada vez menor. *Figura No 1.24*

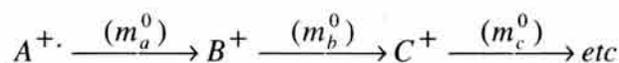


Figura No 1.24. Mecanismo de fragmentación.

Cuando en un espectro de masas se puede definir uno de estos procesos, se le denomina “mecanismo de fragmentación”.

Cualquiera de los iones formados puede seguir distintos mecanismos de fragmentación y esto tan solo depende de la cantidad de energía que recibió la molécula durante la ionización, todos los mecanismos de

fragmentación que pueda seguir una molécula constituyen un patrón de fragmentación y este es característico y único para una molécula. *Figura No 1.25*

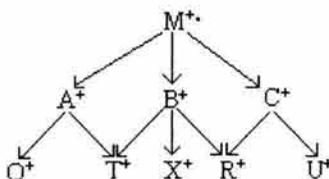


Figura No 1.25 Patrón de fragmentación.

Los procesos en espectrometría de masas son unimoleculares, consecutivos y competitivos, esto quiere decir que cada molécula de un compuesto se comportará en una forma distinta e independiente de las demás. En la ionización, cada molécula podrá adquirir una energía diferente que la conducirá a través de diferentes mecanismos de fragmentación, produciendo diferentes iones; sin embargo para un compuesto determinado existirán ciertas estructuras iónicas que son más estables y que por lo tanto generen iones fragmento preferentes. Esto da lugar a la formación de un mayor número de iones de una masa determinada.

Si después de la ionización separamos los iones formados en función de sus masas, no sólo tendremos información de la masa de la molécula original (definida por el valor M^+) sino que también se registran los distintos fragmentos de dicha molécula. Los espectrómetros de masas están diseñados para separar los iones de distinta masa que se producen en la ionización según su relación masa/carga (m/z); sin embargo la mayoría de los iones producidos en este tipo de ionización se forman con una sola carga ($z=1$), por lo que la relación masa/carga es igual a la masa ($m/z=m$) y se tiene una resolución másica. El otro valor que registran los espectrómetros de masas es el del número de iones de un mismo valor m/z que se generan y se define como la intensidad de las señales, el valor de intensidad está en relación directa con la estabilidad del ión formado y éste es un reflejo de la estructura del mismo. Una señal intensa debe corresponder a un ión estable, lo que a su vez implica una estructura estable. (33)

El espectro de masas es un gráfico de barras en el que se relacionan la intensidad relativa de los iones con su relación masa/carga (m/z), y éstos son característicos para cada compuesto, el tamaño o el marco del espectro de masas está definido por el valor m/z del ión molecular M^+ y las distintas piezas las constituyen los iones fragmentos A^+ , B^+ , C^+ , etc. a sus respectivos valores de m/z , todos estos iones se encuentran traslapados en el espectro de masas y el ión con mayor intensidad es denominado pico base y se le asigna un valor de 100, y la intensidad del resto de los iones se considera como un porcentaje de la intensidad del pico base. (29)

1.2.4.2.1 Instrumento: Espectrómetro de Masas

Los componentes que constituyen un espectrómetro de masas son: 1) sistema de introducción de muestra, 2) fuente de ionización, 3) analizador másico, 4) sistema de colección de iones (detector), 5) sistema de colección de datos y 6) sistema de vacío. *Figura No 1.26*

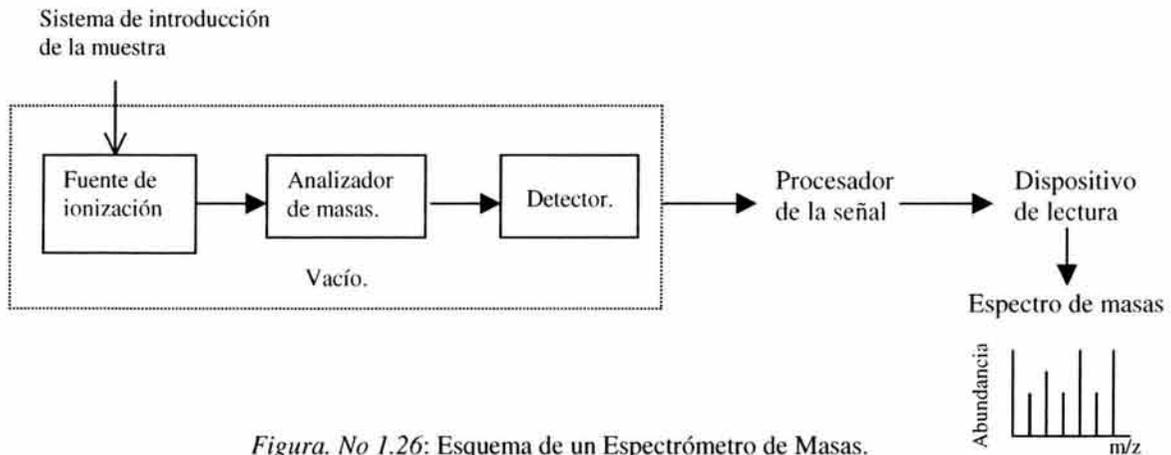


Figura. No 1.26: Esquema de un Espectrómetro de Masas.

Sistema de Introducción de la muestra.

Permite la introducción de una muestra representativa en forma gaseosa en la fuente de iones con la mínima pérdida del sistema de vacío. La necesidad de producir un alto vacío se debe a que las partículas cargadas, incluidos los electrones interactúan con los componentes de la atmósfera y como consecuencia son neutralizados.

Los espectrómetros de masas están equipados con diversos tipos de entradas que se adaptan a distintas muestras:

- Sistemas indirectos de entrada: para muestras termoestables.
- Entrada por sonda directa: para muestras líquidas o sólidas no volátiles.
- Sistemas de entrada cromatográficos y de electroforesis capilar: para determinación de componentes de mezclas complejas.

Fuente de ionización.

Este es el principal elemento de los espectrómetros de masas, ya que la obtención de un buen espectro depende de que se haya realizado una buena ionización. La fuente de ionización convierte los componentes de la muestra en iones positivos (generalmente son el 90 %), mediante el bombardeo con electrones, fotones, iones o moléculas.

Las fuentes de ionización pueden ser de fase gaseosa o de desorción. En la primera se volatiliza la muestra en el sistema de introducción y luego se ioniza, esta fuente se utiliza para compuestos térmicamente estables que tengan puntos de ebullición menores de 500 ° C; mientras que en la segunda la muestra en estado sólido o líquido se transforma directamente en iones gaseosos y es utilizada para muestras no volátiles y térmicamente inestables.

Las fuentes de iones pueden ser:

- Fuentes duras: comunican energía suficiente para producir iones fragmentados con una relación masa/carga menor que la del ion molecular, y provee información estructural y naturaleza de los grupos funcionales, aunque su desventaja es que puede desaparecer el pico del ion molecular impidiendo establecer el peso molecular del analito.
- Fuentes blandas: dan lugar a poca fragmentación, por lo que el espectro de masas resultante, consta del pico del ion molecular y sólo algunos o ningún otro pico, por lo que sirve para la determinación exacta del peso molecular.

Métodos de ionización más utilizados en espectrometría de masas.

Tales métodos se dividen en dos categorías métodos unimoleculares (impacto electrónico o ionización por campo) y bimoleculares (ionización química). En el primero la muestra es gasificada para después entrar a la cámara de ionización en donde interactúa con un haz de electrones. En la segunda categoría, que incluye las técnicas de desorción, los iones se forman a partir de muestras en fase condensada dispuestas dentro de las cámaras de ionización.

Ionización por Impacto Electrónico

Los electrones emitidos desde un filamento de renio o tungsteno incandescente son acelerados y forzados a describir una trayectoria helicoidal, por efecto de un pequeño campo magnético. El número de electrones es controlado por la temperatura del filamento, mientras que su energía lo es por el potencial a que se mantiene el filamento. Los iones se forman por el intercambio de energía durante la interacción del haz electrónico con las moléculas de la muestra, lo que produce un ión molecular que generalmente se halla en un estado de excitación electrónica y vibracional. Posteriormente se produce la relajación mediante la fragmentación de los iones moleculares que dan lugar a iones de masas más bajas y en algunos casos se transfiere un átomo de hidrógeno al ión molecular protonado resultando en un pico intenso $(M+1)^+$.

Los iones positivos producidos por el impacto electrónico pasan a través de una rendija del espectrómetro de masas hacia el analizador másico.

Algunas de sus desventajas son que se necesita volatilizar la muestra; puede desaparecer el pico del ion molecular, impidiendo establecer el peso molecular del analito, aunque una extensa fragmentación permite identificar estructuralmente los posibles analitos.

Ionización Química

La ionización química es el resultado de las interacciones químicas iónico-moleculares entre una gran cantidad de iones, formados a partir de un gas reactivo, y las moléculas neutras procedentes de una pequeña cantidad de muestra.

La ionización química consiste en hacer interaccionar los electrones emitidos con un gas reactivo el cual como consecuencia es ionizado. Los iones del gas reactivo interaccionan con las moléculas de la muestra para producir la ionización de los componentes de la muestra. La ionización química produce menos iones fragmento y más iones moleculares (M^+) y iones protonados $(M+1)^+$ o $(M-1)^+$, estos iones son importantes para el análisis cualitativo pues sirven para identificar el peso molecular de la muestra. Un ejemplo es la interacción electrónica con el metano (gas reactivo) que produce iones CH_4^+ , CH_5^+ , $C_2H_5^+$, estos iones interactúan con las moléculas de analito por cuatro mecanismos básicos: (1) transferencia de carga, (2) transferencia de protón, (3) abstracción del hidruro y (4) adición.

Los gases reactivos más usados son: metano, isobutano y amoníaco.

Analizador de masas.

El analizador de masas separa el haz iónico en todos sus componentes según su relación masa/carga (m/z). Los espectrómetros de masas se clasifican según la naturaleza del analizador de masas en: sector magnético, cuadrupolar, de tiempo de vuelo y trampa de iones. A continuación se explican estos analizadores:

1. De sector magnético: Por historia son los analizadores que por mayor tiempo se han utilizado y usan un imán o electroimán para hacer que el haz procedente de la fuente de iones se desplace con una trayectoria semicircular por el tubo analizador, el barrido de los iones de diferente masa se lleva a cabo variando la fuerza del campo del imán o el potencial de aceleración.

Hoy los analizadores que se conocen como de doble enfoque usan un sector de campo eléctrico para seleccionar los iones con una sola energía cinética y un sector de campo magnético para

seleccionar los iones con una sola masa/carga, por lo que los iones más ligeros se desvían más que los iones pesados, finalmente los iones dispersados inciden en el detector y el espectro es obtenido por el barrido de ambos sectores.

El doble enfoque le da a este instrumento una alta resolución y exactitud másica, es capaz de medir iones con valores de m/z mayores de 10,000 uma.

2. Cuadrupolar: Consta de cuatro barras cilíndricas paralelas que actúan como electrodos. En donde a las barras opuestas se les aplica al mismo tiempo potenciales de radiofrecuencia y corriente directa. Los iones son acelerados a través de las barras, son deflectados y atraídos alternadamente por los polos de éstas y para una específica amplitud de radiofrecuencia y voltaje de corriente directa sólo los iones con una sola relación m/z pueden llegar al detector; iones grandes o pequeños chocarán con las barras y serán neutralizados. El intervalo completo de masas es barrido por un cambio sistemático del radio de amplitud de la radiofrecuencia del voltaje de corriente directa. Una de sus ventajas es que los tiempos de barrido son pequeños.
3. De trampa de iones: Aquí se aplica un campo de radiofrecuencia al electrodo confiriendo a los iones órbitas estables. El espectro de masas es obtenido por la desestabilización de las órbitas para masas individuales (m/z), una a la vez. Cuando sus órbitas son desestabilizadas alrededor de la mitad de los iones son inyectados al detector.
4. De tiempo de vuelo: Los iones positivos se producen mediante el bombardeo de la muestra con impulsos cortos de electrones, iones secundarios o fotones generados por láser. Los iones producidos son acelerados mediante un campo eléctrico, Las partículas aceleradas pasan al tubo analizador en donde sus velocidades dentro del tubo varían inversamente con sus masas, llegando primero al detector las partículas más ligeras que las más pesadas.

Su principal desventaja es que tiene una menor resolución y reproducibilidad que los separadores de masas magnéticos y cuadrupolares; aunque algunas de sus ventajas son: facilidad de accesibilidad a la fuente de iones, un intervalo de masas virtualmente ilimitado y rapidez en la adquisición de datos.

Los espectrómetros de masas de sector magnético y cuadrupolo son los más populares dada la facilidad de su acoplamiento con CG y su simple control a través de computadoras. Ambos permiten una resolución

unitaria, esto es pueden distinguir un $\Delta m = 1$ (entre $m/z = 100$ y $m/z = 101$); sin embargo existen equipos que permiten resoluciones de $\Delta m = 0.00001$, los cuales se denominan equipos de alta resolución. (33)

Detector.

Este es un multiplicador de iones (o electrones) que permite una respuesta rápida y una ganancia aceptable ($1 * 10^6$) y además genera una señal proporcional al número de iones que llegan a él. Existen diferentes tipos de detectores entre los cuales se encuentran los siguientes:

- Canal multiplicador de dínodo continuo: Es el más común de los detectores, cuando un ión choca con la cubierta de óxido de plomo en la pared del detector, se emiten electrones. Estos electrones son enviados al detector donde ellos también chocan con la pared emitiendo más electrones. El efecto neto es una cascada donde un ión produce hasta un millón de electrones. La corriente de estos electrones es amplificada para producir una señal.
- Canal multiplicador de electrones de dínodos discretos: Tiene una serie de dínodos alineados y cada dínodo se mantiene a un potencial más alto que el anterior. El cátodo y los distintos dínodos tienen superficies de Cobre – Berilio, las cuales emiten ráfagas de electrones cuando son alcanzadas por iones o electrones de elevada energía.
- Copa de Faraday: El detector está alineado de manera que los iones que salen del analizador incidan sobre el electrodo colector. La carga de los iones positivos que inciden en la placa es neutralizada por un flujo de electrones procedentes de tierra y la caída del potencial resultante es amplificada para producir una señal. (29, 31)

Sistema de vacío.

Los iones producidos deben llegar hasta el detector sin haber sufrido cambios, para ello se requiere que no exista otro gas presente que pueda dar lugar a colisiones ion-molécula. Esto se logra con el alto vacío ($1 * 10^{-6}$ a $1 * 10^{-7}$ torr) y es por ello que los espectrómetros de masas cuentan con bombas mecánicas y bombas de difusión o turbomoleculares que permiten alcanzar esos niveles de vacío.

Sistema de colección de datos.

Como todo tipo de instrumentos se requiere de un registro permanente de los eventos, en el caso de la espectrometría de masas la velocidad de adquisición de datos es muy rápida por lo que es necesario el uso de computadoras las cuales agilizan la entrega de resultados y reportes. (33)

1.2.4.2.2 Aplicaciones de la espectrometría de masas.

Entre las aplicaciones más importantes se encuentran las siguientes:

1. Elucidación de la estructura de las moléculas orgánicas y biológicas.
2. Determinación del peso molecular de péptidos, proteínas y oligonucleótidos.
3. Determinación de secuencias de aminoácidos en muestras de polipéptidos y proteínas.
4. Detección e identificación de especies separadas por cromatografía y electroforesis capilar.
5. Identificación de drogas de abuso y sus metabolitos en sangre, orina y saliva.
6. Pruebas para confirmar la presencia de drogas en sangre de caballos de carreras y en atletas olímpicos.
7. Determinación de residuos de plaguicidas en alimentos.
8. Control de compuestos orgánicos volátiles en agua de suministro, etc. (31)

1.2.4.2.3 Ventajas y desventajas de la espectrometría de masas como instrumento analítico.

Ventajas:

- Sensibilidad: puede medir cantidades muy pequeñas de analito.
- Especificidad: que se debe a los patrones de fragmentación característicos, los cuales aportan información acerca del peso y de la estructura molecular, los cuales son usados para la identificación de compuestos desconocidos ó para la confirmación de compuestos en una muestra.

Mientras que su desventaja:

- Es difícil de establecer cuales son las distintas especies que puedan estar presentes en una mezcla de compuestos.

1.2.4.3 Sistema acoplado Cromatografía de Gases/Espectrometría de Masas (CG/EM).

1.2.4.3.1 Ventajas que se obtienen al acoplar un cromatógrafo de gases a un espectrómetro de masas.

La cromatografía de gases es una magnífica herramienta para separar y cuantificar mezclas complejas, pero deja mucho que desear en cuanto a la identificación de los compuestos que logra separar. La espectrometría de masas es una magnífica metodología para la identificación de compuestos, sin embargo con ella no es posible el análisis de mezclas. Como se puede ver ambas técnicas son complementarias y su acoplamiento dio como resultado una herramienta poderosísima para el análisis de compuestos orgánicos, pues con éste tipo de sistemas es posible identificar y cuantificar los componentes de una mezcla compleja, en un corto tiempo y con cantidades muy pequeñas de muestra.

El acoplamiento de estos dos instrumentos dio como resultado el desarrollo de una nueva metodología mucho más poderosa que permite realizar análisis que antes resultaban imposibles de resolver. En la actualidad son varios los sistemas de referencia internacional (ASTM, EPA, NIOSH, USP, etc) que incluyen a los sistemas CG/EM como una metodología de rutina para la realización de algunos ensayos.

1.2.4.3.2 Instrumento CG/EM.

Los componentes del sistema acoplado CG/EM son: cromatógrafo de gases, espectrómetro de masas, y sistema de computo. *Figura No 1.27*

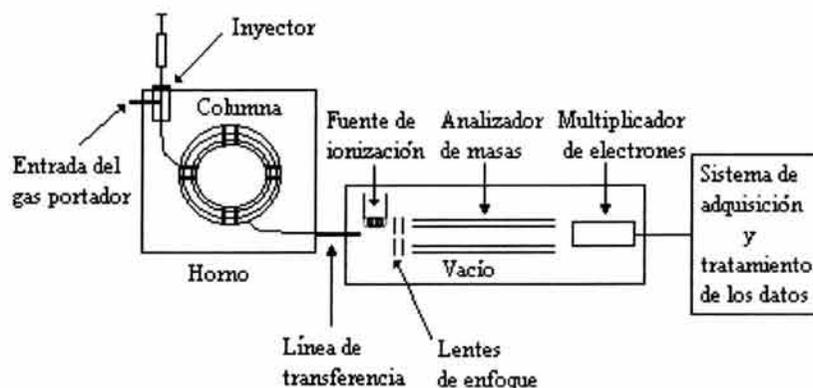


Figura No 1.27: Esquema del sistema acoplado CG/EM.

Un problema de incompatibilidad entre el CG y el EM era la diferencia entre las presiones requeridas, mientras que el cromatógrafo opera a presiones altas, el espectrómetro de masas está diseñado para operar al alto vacío; por lo que se necesitaba de una interface que llevara los componentes de la muestra de un

ambiente a otro, la interface introducía los analitos sin pérdidas por adsorción o condensación, eliminando la mayor parte del gas acarreador. Las interfaces incluían a un tubo llamado línea de transferencia que llevaba al efluente cromatográfico a la interface, este se calentaba usualmente 25 ° C arriba de la temperatura más alta de la columna, para evitar la condensación y adsorción del analito.

En la actualidad el uso de columnas capilares de un diámetro externo de 0.3 mm o menor ha hecho posible introducirlas directamente en la fuente de ionización, por lo que el uso de la línea de transferencia ya no es necesario.

Filamento de la fuente de ionización: picos cromatográficos grandes (pico del disolvente) pueden dañar el filamento y este puede apagarse cuando estos picos eluyen; debido a esto se prefiere mantener apagado el filamento al inicio de los análisis cromatográficos, que es cuando eluyen los disolventes, esto es conocido como "Solvent Delay" (su nombre en Inglés). Al incrementar la corriente del filamento aumenta la sensibilidad del espectrómetro de masas pero también disminuye el tiempo de vida del filamento. Por lo que se requiere cambiar el filamento y limpiar la fuente cada cierto tiempo.

Para detectar los picos estrechos del cromatógrafo de gases el espectrómetro de masas debe hacer un barrido rápido a través del intervalo de masas seleccionado, este método es conocido como SCAN (su nombre en Inglés). El valor de m/z que es barrido es seleccionado por el operador, un barrido lento da mayor sensibilidad, pero a valores más grandes de barrido disminuye la sensibilidad porque se reduce el tiempo en el que pasa cada m/z . Un valor de barrido típico para un Cromatógrafo de Gases/Espectrómetro de Masas es de 33-300. Se comienza con una $m/z = 33$ porque los picos del aire $m/z = 28$ y 32 son eliminados.

Cuando se desea mejorar la sensibilidad del espectrómetro de masas se elige un intervalo estrecho de m/z o uno sólo, esta técnica es llamada monitoreo selectivo de iones (selected ion monitoring, SIM su nombre en Inglés). Para maximizar la sensibilidad los valores de SIM pueden incluir el pico base y otro ion abundante.

Las ventajas principales de un espectrómetro de masas como detector para cromatografía de gases son:

- Es un detector universal para CG.
- Alta sensibilidad: 10^{-12} g por el método SCAN y 10^{-15} g por el método SIM.
- Especificidad para la identificación de compuestos desconocidos o su confirmación, es muy sensible pues los analizadores másicos reducen la interferencia de fondo.

- Es muy específico pues los patrones de fragmentación son característicos y proporcionan información acerca del peso y la estructura molecular.
- Los picos son identificados al comparar su espectro de masas con los de una biblioteca o se determina su estructura por los patrones de fragmentación que presentan.

Y sus desventajas son:

- Tiene un costo de mantenimiento alto.
- Necesita un operador con experiencia.
- Es difícil igualar la precisión y exactitud obtenida con otros detectores. (29, 31, 33)

1.2.4.3.3 Campos de aplicación de los sistemas acoplados CG/EM

Cualquier muestra que pueda ser sometida a un análisis por CG podrá, en principio, ser analizada en CG/EM. El requisito que generalmente se establece es el que los componentes de la muestra posean una presión de vapor alta a la temperatura de operación de los equipos (de -10 a 450 °C). Otro requisito, que tiene más que ver con los análisis cuantitativos, es el de asegurarse que todos los componentes de la mezcla sean volátiles, que eluyan de la columna en un tiempo razonable y que no se degraden térmicamente.

Tradicionalmente los análisis por CG se practican tanto para formulaciones, en donde solo interesa determinar los componentes mayoritarios o bien en el análisis de trazas; este intervalo tan amplio de concentraciones es también aplicable a los sistemas CG/EM y el extremo inferior puede aún ser menor.

Los campos en los que este tipo de instrumentos se ha empleado es muy variado, por ejemplo, en la determinación de plaguicidas en jugos de frutas, mantequilla, etc. identificación de los componentes de medicamentos y determinación de sus metabolitos en fluidos biológicos, determinación de subproductos en síntesis orgánicas, etc. (33)

1.3 Métodos para análisis de plaguicidas en alimentos.

Dado el impacto que tiene el uso de plaguicidas en el ambiente su determinación en los productos alimenticios y en el medio ambiente es de vital importancia por lo que se han desarrollado diversas metodologías para determinarlos en suelo, agua y alimentos siendo la cromatografía de gases capilar la técnica más utilizada para su determinación.

Los plaguicidas desarrollados recientemente son más sofisticados en su química, selectividad y solubilidad pues son diseñados para ser efectivos en aplicaciones de baja concentración, debido a esto las metodologías diseñadas para su determinación deben ser capaces de detectar niveles de partes por billón ($\mu\text{g}/\text{kg}$) o menores, además de que los niveles legales de tolerancia para estos compuestos químicos han llegado a ser tan bajos que se requiere incluso de detecciones en niveles de partes por trillón (ng/kg).

Actualmente con los instrumentos modernos disponibles se pueden tener sensibilidades cercanas a los mg/kg (ppm), por lo que para medir cantidades menores es necesario concentrar (enriquecer) los plaguicidas presentes sin que se pierdan los analitos o se concentren las impurezas de reactivos y/o materiales.

1.3.1 Elección de un método para la determinación de plaguicidas.

Para elegir el método de determinación de plaguicidas apropiado se deben tomar en cuenta dos cosas, la primera es el tipo de muestra a analizar, pues su composición (contenido de grasa, agua, azúcares, etc.) afecta la separación de los residuos de plaguicidas de la matriz que los contiene; mientras que la segunda toma en cuenta las características químicas de los plaguicidas, por ejemplo su polaridad:

Plaguicidas polares: azodrin, monitor, monocrotofos, ometoato, etc.

Plaguicidas no polares: DDT, clordano, lindano y dieldrin o N-metil carbamatos como carbarilo, aldicarb y metomil.

Además el método seleccionado no debe aportar nuevas interferencias que pudieran imposibilitar la determinación de los plaguicidas; debe ser capaz de confirmar la identidad de los analitos además de cuantificarlos; el recobro obtenido para el método elegido debe estar dentro del intervalo aceptable que marca dicha metodología además de validar el método para cada tipo de muestra, pues no se sabe el efecto que puede tener la naturaleza de la matriz en la determinación. (19, 34)



1.3.2 Etapas involucradas en los métodos de análisis.

En general los métodos de análisis de plaguicidas involucran dos etapas: preparación de la muestra y determinación, la primera incluye extracción, limpieza y concentración. Este tipo de metodologías determina un solo plaguicida o sus familias y se conocen con el nombre de métodos selectivos o multiresiduos; en la actualidad la tendencia es desarrollar métodos multiresiduos multiclase, es decir estas nuevas metodologías determinan residuos de diferentes plaguicidas simultáneamente en una extracción-determinación.

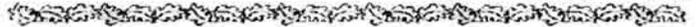
1.3.2.1 Extracción.

El proceso de extracción se lleva a cabo generalmente usando uno o varios disolventes. El propósito de la extracción es remover la mayor cantidad de residuos de plaguicidas que sea posible de la muestra con un mínimo de contaminación. Esto se logra al dividir la muestra en partículas más pequeñas (homogenizando) para aumentar el área superficial que está en contacto con el disolvente, el cual debe disolver los plaguicidas y disolver lo menos posible los demás componentes de la muestra. El extracto obtenido es entonces separado del material sólido por filtración al vacío. El objetivo de la homogenización es romper los tejidos de la planta y exponer los plaguicidas que penetraron al interior para que interaccionen con el disolvente.

Cuando se desea extraer residuos de plaguicidas de productos que tienen gran cantidad de humedad, se debe usar disolventes que sean miscibles con el agua ya que estos logran extraer mejor los analitos al estar en contacto directo con la muestra durante la homogenización.

Los disolventes más usados para la extracción son acetonitrilo o acetona y sus mezclas con agua (para muestras con humedad < 30 %), aunque el acetato de etilo ha comenzado a introducirse en este tipo de metodologías.

Se prefiere usar acetona (p. eb. 56.5° C) como disolvente de extracción porque es más volátil que el acetonitrilo (p. eb. 81.6° C) y por lo mismo es más fácil de concentrar, pero el acetonitrilo sigue siendo el disolvente más popular pues tiene la ventaja de ser un disolvente más fuerte (es más polar) y es rápidamente miscible con el agua, pero su mayor ventaja es que puede ser separado del agua por una simple adición de sal (salting out por su nombre en Inglés) y el azeotropo que forma con el hexano puede ser concentrado fácilmente pues su punto de ebullición es de 52° C y en este caso la concentración de la muestra es relativamente más simple que una solución acuosa de alcohol o acetona. (19, 34, 35, 36)



1.3.2.1.1 Influencia de los disolventes.

Es esencial que los disolventes usados en estas metodologías sean de alta pureza, pues si contienen impurezas estas son concentradas al evaporar el disolvente, también se debe tomar en cuenta la respuesta que tiene el disolvente en el detector usado porque usualmente se usan detectores que son selectivos para un elemento que contiene la molécula analizada, por lo que el extracto final no debe estar disuelto en un disolvente que contenga elementos a los que el detector responda.

Al aumentar la polaridad del disolvente de extracción los métodos tienen la capacidad de extraer mayor cantidad de residuos pero también aumenta la cantidad de compuestos coextraídos, la presencia de disolventes polares en el extracto afecta el proceso de limpieza por lo que los residuos extraídos deben ser transferidos a otro disolvente para después ser limpiados.

Se prefiere usar disolventes con bajo punto de ebullición, pues esto permite una rápida evaporación de los mismos para ajustar la polaridad de los extractos y que estos sean compatibles con el detector.

En general todos los disolventes varían en toxicidad y para estas metodologías se deben usar los menos tóxicos.

1.3.2.2 Limpieza.

Los procedimientos de limpieza purifican los extractos por lo que permiten una identificación definitiva de los residuos extraídos que se encuentran en bajas concentraciones, sin embargo, la mayoría de los procedimientos de limpieza adsorben, destruyen o remueven algunos residuos de analitos del extracto.

En este paso se eliminan en gran medida los compuestos coextraídos de la muestra (que impiden el análisis directo de la misma) y muchos plaguicidas polares, la mayoría de los procedimientos de limpieza involucran a la cromatografía ya sea en columna o cartuchos y el tipo de adsorbentes y disolventes de elución usados dependerá de las características químicas de los compuestos que se desea recobrar. Existen diversos procedimientos de limpieza entre los que destacan:

- **Partición Líquido-líquido:** Los disolventes usados deben ser poco tóxicos, de bajo punto de ebullición, no afectar el detector usado y minimizar la concentración de los componentes polares extraídos de la muestra. Las combinaciones de disolventes comúnmente usadas son:
 - Para frutas y verduras grasas: acetónitrilo-éter de petróleo-agua.
 - Frutas y vegetales en general: acetona-cloruro de metileno-éter de petróleo-agua.
- **Columna empacada con Florisil:** Esta columna absorbe los componentes polares y no se puede usar si los plaguicidas a recobrar son polares.

- Columna empacada con carbón-celita-óxido de magnesio: Esta columna no debe usarse para la limpieza de plaguicidas polares (por ejemplo monitor y acefato) porque el óxido de magnesio puede absorber los plaguicidas polares.
- Columna empacada con carbón-celita silanizada: Esta columna puede usarse para la limpieza de plaguicidas polares, medianamente polares y no polares.

En el caso de las columnas antes mencionadas estas pueden ser: de escala reducida o minicolumna.

- Extracción en fase sólida: Los adsorbentes más utilizados son los de fase reversa (C18), Florisil, y adsorbentes de intercambio iónico.
- Cromatografía de permeación en gel: Separa muy bien la grasa de los plaguicidas disueltos en ella. (19, 34, 35)

En el caso de los métodos multiresiduos multiclase se toman varias alícuotas independientes del extracto y se les somete a diferentes tipos de limpieza, así estas alícuotas pueden ser determinadas en diferentes técnicas instrumentales.

1.3.2.3 Concentración.

Las técnicas de concentración más adecuadas se eligen en función del método de extracción seleccionado, de los analitos y del disolvente a concentrar. En éste paso los analitos son concentrados al evaporar el disolvente, el cual nunca se debe evaporar a sequedad pues de ser así se pueden perder los analitos. Por ejemplo algunos estudios han demostrado que hay grandes pérdidas del plaguicida α -BHC cuando los extractos se evaporan casi a sequedad en el concentrador Kuderna-Danish. El disolvente de los extractos purificados solo es evaporado casi a sequedad cuando interfiere en la determinación, por ejemplo en el caso de las extracciones para plaguicidas organohalogenados en las que se usa cloruro de metileno, éste debe ser removido por completo antes de la determinación cuando el detector que se usa es captura de electrones.

En general para concentrar el aparato más usado es el concentrador K-D, también se usan el rotavapor y el evaporador con corriente de nitrógeno; aunque actualmente la tendencia es eliminar este paso o simplificarlo al usar las nuevas técnicas de preparación de muestras en las cuales se usan pequeñas cantidades de disolventes. (38)



1.3.2.4 Separación.

Para una adecuada separación de los analitos en un sistema cromatográfico, los extractos en los que se encuentran los analitos deben ser limpiados adecuadamente para no dañar las columnas cromatográficas, no reportar la presencia de falsos residuos o cuantificarlos con una exactitud inadecuada o enmascararlos por completo.

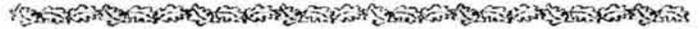
En el caso de la cromatografía de líquidos y de gases la selección de las columnas depende de la naturaleza de los plaguicidas que serán separados, así por ejemplo, si se desea separar plaguicidas clorados o piretroides se usa una fase estacionaria no polar y por el contrario cuando se desea separar plaguicidas polares una fase estacionaria polar es la más adecuada, pero para los métodos multiresiduos se prefiere usar fases estacionarias no polares o medianamente polares. (38)

1.3.2.5 Detección.

Debido a que el proceso analítico está sujeto a posibles errores de interpretación o medición es necesario confirmar la identificación de los residuos. La elección de los procedimientos de confirmación depende de la identificación tentativa del plaguicida, la cantidad de muestra disponible para el análisis, tipo de muestra y disponibilidad de la instrumentación requerida para la prueba de confirmación.

Para confirmar la identidad de cualquier residuo encontrado en los primeros análisis la FDA requiere de un Espectrómetro de Masas y para ello se debe contar con un sistema acoplado CG/EM o bien se pueden confirmar los residuos previamente reportados por técnicas menos rigurosas con un análisis cromatográfico adicional (CG o CLAE), con diferentes columnas, fases móviles y/o detectores.

Los detectores para cromatografía de gases de uso común en este tipo de metodologías son: el detector de captura de electrones, fotométrico de flama, termiónicos (Nitrógeno-Fósforo), de conductividad electrolítica y los sistemas acoplados CG/EM que están tomando más importancia en las metodologías multiresiduos pues detectan y confirman simultáneamente la estructura de los plaguicidas que pueden ser volatilizados. (35, 36, 38)



1.3.3 Métodos multiresiduos para análisis de plaguicidas.

Como se menciona anteriormente, existen métodos que analizan un solo plaguicida o sus familias y métodos que son capaces de determinar diferentes clases de plaguicidas simultáneamente. Los primeros son llamados métodos selectivos y se emplean cuando se sabe qué tipos de plaguicidas se encuentran en las muestras o cuando un residuo no puede ser determinado por un método multiresiduo común.

Los métodos multiresiduos multiclase determinan un gran número de plaguicidas con características químicas diversas en una sola extracción en un gran número de alimentos, este tipo de métodos se emplea en muestras de origen desconocido, es decir se desconoce con que tipo de plaguicidas fueron tratadas.

1.3.3.1 Principales métodos multiresiduos.

Existen dos métodos multiresiduos principales para la determinación de plaguicidas en alimentos, los multiclase y los selectivos, los primeros se clasifican según el tipo de alimento que analizan, mientras que los métodos selectivos se clasifican según las características químicas de los plaguicidas, y cada método a su vez tiene diferentes procedimientos de extracción, limpieza, determinación y confirmación entre los que se puede elegir.

Métodos multiresiduos multiclase * { Método I para alimentos no grasos.
Método II para alimentos no grasos.
Método para alimentos grasos.

Métodos multiresiduos selectivos { Métodos para N-Metilcarbamatos.
Métodos para ácidos y fenoles.
Métodos para herbicidas del tipo fenilurea.
Métodos para Bencimidazoles.

Las metodologías más usadas en la actualidad son las ya reportadas por diversas organizaciones mundiales como las de la FDA, AOAC, EPA, etc., algunas de estas metodologías son resumidas en el *Apéndice A Tabla 1-A. (19, 34, 35, 37)* Antes de comenzar el análisis de la muestra se debe contar con la información necesaria para facilitar el desarrollo de cada uno de los pasos del método multiresiduo a utilizar, por lo que se debe tomar en cuenta cada uno de los puntos que se mencionan a continuación:

* En el método I se extrae con acetona o sus mezclas con agua.
En el método II se extrae con acetonitrilo o sus mezclas con agua.

1. **Revisión de procedimientos.** → Análisis de procedimientos apropiados.

2. **Preparar la muestra** → Muestreo y cantidad de muestra

3. **Elección del método**



Basado en el tipo de producto.

- Productos con contenido de grasa > al 2 %
(*lacteos, carne, pescados, semillas, etc.*)
- Productos no grasos (< 2 % de grasa), (*frutas y vegetales, granos, etc.*)
- Huevos/huevos secos



Basado en el tipo de residuos específicos

- N-Metilcarbamatos.
- Ácidos y fenoles.
- Herbicidas del tipo fenilurea.
- Bencimidazoles.

4. **Revisar información de soporte.**
(si se necesita)

- Características del producto
- Preparación de la muestra
- Control de calidad....

5. **Desarrollo del análisis.** → Metodologías

6. **Identificación de los residuos.** → Según su comportamiento químico.

7. **Cuantificación de los residuos.** → CG o CLAE.

8. **Confirmar los residuos** → Instrumentos disponibles.

9. **Reportar los residuos.** → Establecer procedimientos.

Entre los métodos multiresiduos generales que cubren el mayor número de residuos de plaguicidas y muestras se encuentran los siguientes:

1. Método Mills-Olney-Gaither (MOG): Método para vegetales y frutas con alto contenido de humedad (> 30 % H₂O) no grasos (< 2% de grasa).
2. Método de Luke: Para frutas y vegetales no grasos.
3. Método para carbamatos Krause: Extracción con acetona y determinación por cromatografía de líquidos. (19, 34)

En la *Tabla No 1.12* se muestran los procedimientos que conforman cada uno de los métodos antes mencionados.

Tabla No 1.12: Principales métodos multiresiduos.

Plaguicidas clorados y fosforados.			Carbamatos
Alimentos no grasos (< 2%), de baja y alta humedad		Alimentos grasos (> 2%)	
Método de Luke Polar hasta no polar	MOG Relativamente no polar	MOG Moderadamente no polar	Alimentos no grasos (< 2%) Método de Krause modificado.
Extracción.			
Acetona o acetona-agua. ↓ Partición con cloruro de metileno.	Acetonitrilo o acetonitrilo-agua. ↓ Partición con éter de petróleo.	Etil y/o éter de petróleo. ↓ Partición con acetonitrilo-éter de petróleo.	Acetona. ↓ Partición con cloruro de metileno.
Limpieza.			
Limpieza polar Columna de carbón-celita ↓ Limpieza no polar Florisil ↓ Columna de MgO-celita-carbón.	Florisil con mezcla de éteres o cloruro de metileno. ↓ Florisil PCBs Eluir con éter de petróleo o mezcla de éteres o cloruro de metileno.	Florisil con mezcla de éteres o cloruro de metileno. ↓ Florisil PCBs Eluir con éter de petróleo con mezcla de éteres y cloruro de metileno.	Columna de carbón-celita silanizada.

(19)

1.3.3.2 Ventajas de los métodos multiresiduos multiclase vs métodos multiresiduos selectivos.

Una ventaja obvia de los métodos multiresiduos multiclase es que pueden determinar una mayor cantidad de residuos de plaguicidas simultáneamente en comparación con los métodos selectivos.

El tiempo empleado en el análisis de los métodos multiclase es menor, pues en una sola extracción se pueden determinar decenas de compuestos.

Las cantidades de disolventes empleados se reducen considerablemente disminuyendo los costos y la cantidad de desechos producidos y además se elimina el uso de disolventes altamente tóxicos. (34)

1.4 Evaluación de métodos de análisis.

Cualquier método que sea nuevo o bien se haya modificado deberá ser validado para confirmar su efectividad (evaluar desempeño del laboratorio). En general los parámetros que se evalúan son: linealidad, exactitud, precisión (reproducibilidad y repetibilidad) y límite de detección. Este último parámetro se calcula cuando la concentración del analito se encuentra dentro del nivel de trazas.

1.4.1 Límite de detección instrumental (LDI).

Como ya se mencionó antes es importante calcular el límite de detección cuando se determinan analitos a concentraciones muy bajas. Existen muchas definiciones de límite de detección y en general éste se define como un número expresado en unidades de concentración (o cantidad) que define la menor concentración (o cantidad) de un compuesto (o elemento) que un químico analítico puede determinar y que sea estadísticamente diferente de la señal generada por un blanco. (41) Esta definición esta incompleta por lo que deja un buen margen de libertad para decidir la definición exacta de límite de detección, ya que no existe un consenso adecuado para su definición exacta, éste se le define comúnmente como la cantidad de concentración de analito que proporciona una señal igual a la señal del blanco, (y_B) más tres veces la desviación estándar del blanco, (S_B). (18)

$$\text{LDI} = y_B + 3 S_B$$

Esta definición no es adecuada para los métodos cromatográficos pues en estos no existe blanco.

La definición de límite de detección aplicada a contaminantes alimenticios, es la concentración mínima de un contaminante que puede ser detectada cualitativamente pero no cuantitativamente. La FDA lo define como una señal que es 3 veces mayor que la señal del ruido. (19)

La EPA recomienda estimar el límite de detección empleando uno de los siguientes incisos:

1. LDI igual a la concentración que corresponda a una relación señal-ruido de 2.5 a 5.
2. El LDI se considera como tres veces la desviación estándar de las medidas instrumentales del analito.
3. LDI igual a la región de la curva estándar donde hay un cambio significativo en la sensibilidad (ruptura de la pendiente de la curva estándar).
4. LDI igual a las limitaciones instrumentales. (42)

El método matemático ofrece otra definición de límite de detección que es más completa:

$$LDI = X_A + 3S_{X_A}$$

En donde al interpolar en la recta de la regresión de la curva de calibración el punto $(y_A + 3S_{y_A})$, se obtiene en el eje de concentración el valor de X_A que es el límite de detección con un 50 % de error; y S_{X_A} es la desviación estándar de X_A . *Figura No 1.28*

Este límite de detección también puede obtenerse al interpolar directamente el punto $(y_A + 3S_{y_A})$ con la recta y , en donde se obtiene el valor de LDI con un 95 % de confianza.

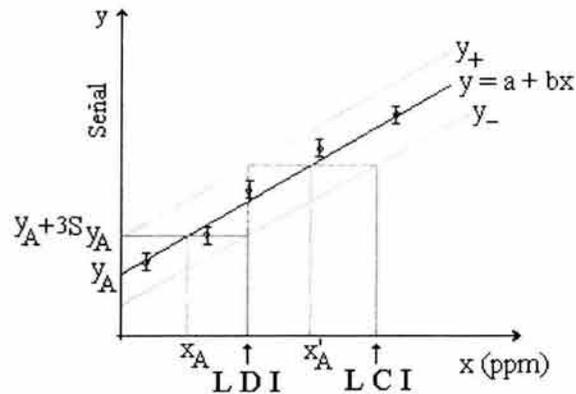


Figura No 1.28. Obtención de los límites de detección y cuantificación instrumentales a partir de la recta de regresión y sus intervalos de confianza.

Para calcular tanto el límite de detección como el de cuantificación, el método matemático presupone que existe una relación lineal entre la señal analítica (y) y la concentración del analito (x), por lo que se calcula la “mejor” línea recta que pasa a través de los puntos de la curva de calibración por el método de los mínimos cuadrados, es decir “la línea debe pasar por el centro de gravedad de los puntos (\bar{x}, \bar{y}) ”.

Cada uno de los puntos de la gráfica está sujeto a un error experimental. El método de mínimos cuadrados supone que todos los errores se encuentran en la señal (y), lo que provoca que haya desviaciones en esta dirección entre los puntos experimentales y la recta calculada.

Como existen errores aleatorios de los valores de la pendiente y de la ordenada al origen, primero se calcula la desviación estándar sobre la regresión ($S_{y/x}$) con la cual se pueden calcular las desviaciones estándar sobre la pendiente (b) y sobre la ordenada al origen (a). Para calcular el límite de detección además se necesita conocer los intervalos de confianza (al 95 % en este caso) sobre la recta calculada, en los cuales se interpola para conocer el LDI y también el LCI (Límite de Cuantificación Instrumental) con el mismo nivel de confianza. (43, 46)

1.4.2 Límite de cuantificación instrumental (LCI).

Al igual que en el límite de detección instrumental también existen diferentes definiciones para éste, entre las cuales se describen las siguientes:

El límite de cuantificación es el límite más bajo para mediciones cuantitativas precisas y se sugiere usar el siguiente valor para éste:

$$(18) \quad \text{LCI} = y_B + 10 S_B$$

Usualmente en los métodos de análisis de alimentos la definición de límite de cuantificación, es la concentración mínima de un contaminante en una muestra alimenticia que puede ser determinada cuantitativamente con precisión aceptable. La FDA lo define como una señal que es 10 veces mayor que la señal del ruido. (19)

La definición de límite de cuantificación según el método matemático es la siguiente:

$$\text{LCI} = X'_A + 3S_{X'_A}$$

Donde X'_A que es el límite de cuantificación con un 50 % de error y se obtiene al interpolar el LDI con la recta (y_+), éste nuevo punto se hace intersectar con la recta de la regresión para obtener X'_A ; y $S_{X'_A}$ es la desviación estándar de dicho punto.

El LCI se puede obtener al interpolar directamente el LDI con la recta (y_+) y este nuevo punto se hace interpolar con la recta (y_-) para obtener el correspondiente límite de cuantificación con un 95 % de confianza. *Figura No 1.28*

1.4.3 Variabilidad del proceso analítico.

El uso de recobros de adiciones conocidas a las matrices es parte de un protocolo analítico y sirve para estimar la variabilidad del procedimiento analítico pues los resultados del análisis de residuos son afectados por factores primarios procedentes de los pasos de extracción y limpieza por lo que se obtienen recobros variables.

También se hacen adiciones conocidas a las muestras para verificar la ausencia de efectos de matriz o caracterizar dichos efectos, y se deben hacer adiciones cuando se analiza una nueva matriz ya que se debe verificar la cantidad y tipo de interferencias que provoca.

Las matrices deben adicionarse con una cantidad que sea entre 5 y 50 veces el LDM estimado ó entre 1 y 10 veces el nivel ambiental estipulado, pero no debe ser mayor que el intervalo lineal del método.

El intervalo lineal del método analítico es aquel que se encuentra entre el LCI y hasta que la curva de calibración se desvía de la linealidad.

Para calcular la eficiencia de recobro se debe preparar una curva de calibración a partir de estándares puros (\geq al 95 % de pureza) y graficar el valor de la relación de señales plaguicida/EI (y) como función de la relación de concentración correspondiente del plaguicida/EI (x) y obtener los parámetros de la regresión (m , a , y b), donde la pendiente representa la sensibilidad del método analítico. Al interpolar en la curva los valores de las señales obtenidos en los experimentos de replicas de adición de matrices, estos se convierten en las concentraciones correspondientes del o los analitos. Con estos datos se calcula el coeficiente de variación (C. V.) para cada cantidad adicionada para estimar la precisión de la metodología de extracción empleada. (46, 31, 43, 44, 45)

1.4.4. Límite de detección y cuantificación del método analítico (LDM y LCM)

Ya calculada la precisión del instrumento (LDI y LCI) se debe calcular la precisión del método de extracción completo, esto se hace calculando el LDM y LCM.

Para el análisis de residuos el LDM se define como la cantidad mínima de un analito que satisface los siguientes requerimientos:

- Debe ser mayor o significativamente diferente al LDI.
- El LDM es la concentración en la que el recobro es mayor o igual al 70 %. La manera usual de obtenerlo es a través de una curva de calibración en donde se grafica la concentración calculada de las muestras adicionadas (y) versus la concentración teórica (x) de analito en la muestra adicionada, se calculan los parámetros de regresión (m , a , y b) en donde el valor de la pendiente multiplicado por 100 es el recobro obtenido.
- El coeficiente de variación de la determinación de las replicas del LDM debe ser igual o menor a 0.2 (equivalente a 20 %) (46)

Para obtener el LDM se recomienda procesar mínimo siete muestras independientes a través del método analítico completo, adicionando de 1 a 5 veces el LDI estimado. Se calcula la desviación estándar de los valores obtenidos y para calcular el LDM se obtiene la t de student para una cola y $n-1$ grados de libertad al 99 % de confianza. (42, 46)

$$\text{LDM} = \text{C.A.} + t_{(n-1, 1-\alpha=0.99)} S$$

Capítulo 2 Desarrollo Experimental.

2.1 Muestreo.

Se decidió analizar inicialmente los vegetales de hojas verdes (espinacas) que provengan de diversas áreas del país, debido a que se consumen en grandes cantidades por tener bajo precio (es decir son de uso común en la dieta de los mexicanos) y porque se cosechan todo el año. Estas plantas presentan una hoja grande, y su superficie expuesta a los plaguicidas es mayor en relación con el peso de las mismas.

Las muestras analizadas en este trabajo se obtuvieron en la Central de Abastos, supermercados y en diversos mercados sobre ruedas en manojos de aproximadamente 250 g. con raíces.

2.1.1 Obtención de la muestra.

1. Central de Abastos (CEDA por sus siglas): Se decidió que unas de las muestras a analizar fueran espinacas compradas en la central de abastos, debido a que ésta satisface la demanda de alimentos de más de 20 millones de habitantes de la Ciudad de México y su área metropolitana, a ella llegan alimentos de casi todas de las entidades federativas del país y aquí se agrupan los agentes que intervienen en la cadena de distribución de alimentos en el área metropolitana.

La Central de Abastos es una de las más importantes distribuidoras de alimentos de Latinoamérica, y realiza el mercadeo de mayoreo y medio mayoreo de los productos que ahí se comercializan, entre los que destacan: nopal, col, rábano, cebolla de rabo, cilantro, perejil, flores y follaje, lechuga, zanahoria, elote, coliflor, etc.

Debido a esto es posible conocer la procedencia de las espinacas, siendo las principales entidades productoras de la República: Puebla, Estado de México, Tlaxcala y Distrito Federal.

2. Mercados sobre ruedas: También se obtuvieron muestras de diversos mercados sobre ruedas del Distrito Federal (D. F.), debido a que comúnmente la compra de alimentos en México y particularmente en el D. F. es por medio de los mercados sobre ruedas donde pequeños comerciantes venden sus productos directamente al público en ciertos días y áreas de la ciudad; y estos pequeños productores cultivan sus propios vegetales en zonas cercanas a la ciudad por lo que no entran en distribución de la CEDA.

3. Supermercados: Un sector de la población compra sus alimentos principalmente en los supermercados, los cuales consiguen los vegetales por un trato directo con los agricultores y los concentran en grandes almacenes para después distribuirlos en todas sus tiendas, por lo que el tiempo entre la cosecha y el consumo del vegetal es relativamente grande.

El principal objetivo de analizar muestras obtenidas en diferentes lugares (CEDA, mercados “sobre ruedas” y supermercados) es conocer el tipo de plaguicidas que los agricultores aplican en los cultivos de espinaca en particular y el tipo y cantidad de los residuos presentes en este vegetal, que de encontrarse se compararán con los LMR’s establecidos por la SAGAR y la EPA.

2.2 Determinación de plaguicidas en espinacas.

2.2.1 Preparación de la muestra.

2.2.1.1 Método multiresiduo CDFa.

Para la determinación de plaguicidas en espinacas se decidió emplear el Método Multiresiduo del Departamento de Alimentos y Agricultura de California E. U. (The California Department of Food and Agriculture CDFa, su nombre y siglas en inglés), ya que permite determinar más de 150 plaguicidas: organohalogenados, organofosforados y carbamatos, en 19 grupos de cultivos diferentes, ver estos datos en el *Apéndice A: tabla 2-A, y 3-A.*

En dicho apéndice también se encuentra el diagrama de trabajo de este método multiresiduo y las condiciones instrumentales empleadas para la determinación de cada clase de plaguicida que éste método sugiere. (39)

2.2.1.2 Método Multiresiduo CDFA Modificado.

Del método CDFA solo se determinaron los plaguicidas que pueden analizarse por cromatografía de gases; plaguicidas halogenados, y fosforados, aunque también se incluyen algunos carbamatos y piretróides pueden analizarse por esta técnica. El análisis instrumental del método multiresiduo CDFA fue modificado empleándose para ello un sistema acoplado Cromatógrafo de Gases/Espectrómetro de Masas (CG/EM).

La separación de los plaguicidas se llevo a cabo en una columna con fase estacionaria de polaridad intermedia (5 % fenil, 95 % metil polisiloxano) que es una de las 7 diferentes fases estacionarias que la FDA recomienda para la determinación de residuos de plaguicidas. (19, 34, 40)

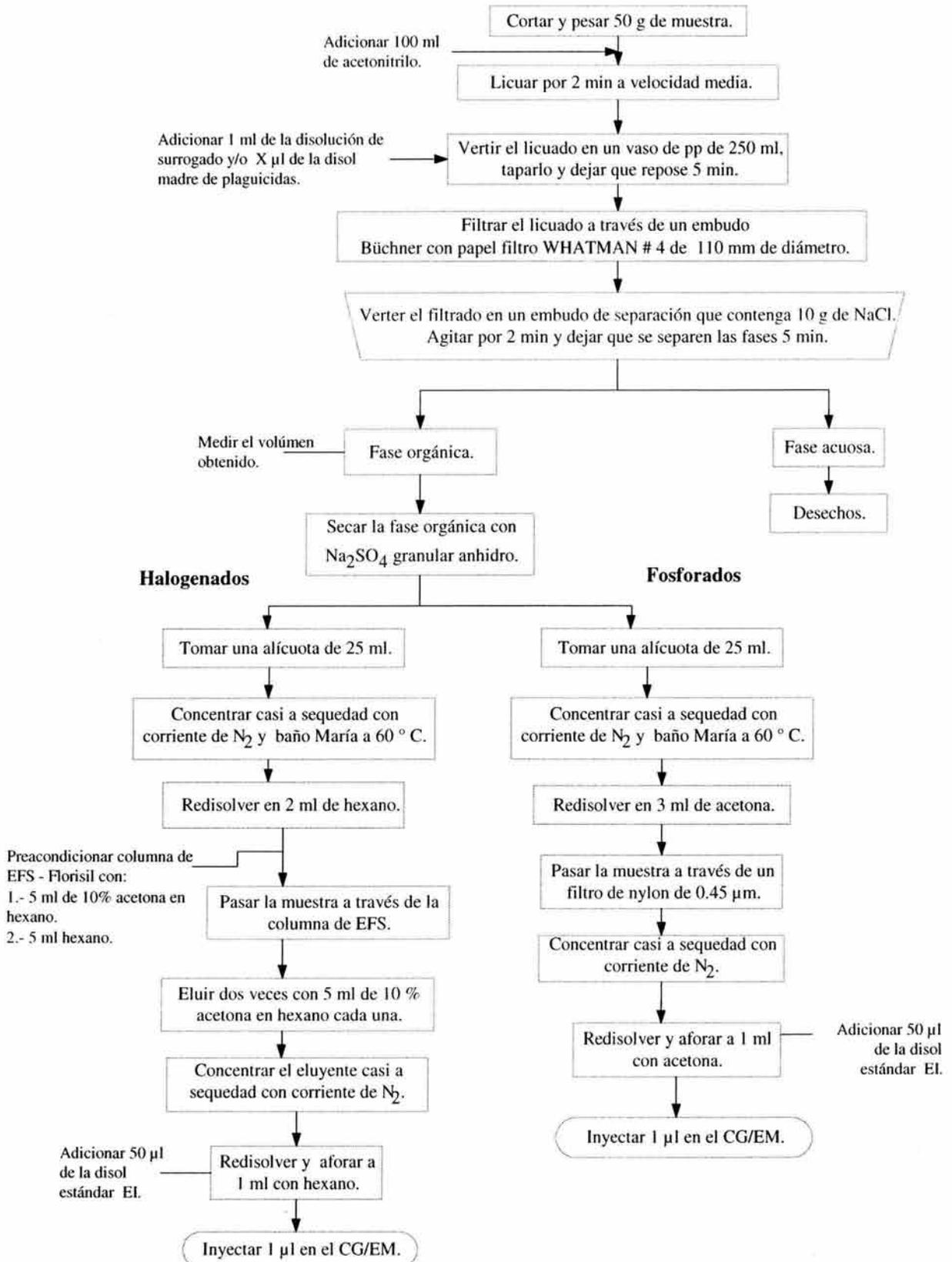
En la *Tabla No 2.1* se mencionan brevemente las principales diferencias entre el método CDFA inicial y modificado.

Tabla No 2.1.

Parámetro	Método CDFA.	
	Inicial.	Modificado.
Extracción y Homogenización.	Licuar y filtrar.	Licuar, reposar el licuado, filtrar en embudo Büchner.
Eliminación de agua en el extracto.	Adicionar sal al extracto y agitar, separar la fase acuosa.	Adicionar sal al filtrado y separar la fase acuosa, adicionar Na ₂ SO ₄ anhidro a la fase orgánica.
Concentración de la muestra.	Tomar una alícuota de 10 ml y concentrarla con corriente de aire a 70 ° C para cada tipo de plaguicida.	Tomar dos alícuotas de 25 ml y concentrarlas con corriente de N ₂ a 60 ° C.
Limpieza. Plaguicidas halogenados: Plaguicidas fosforados:	Con EFS-Florisil. Cambio de disolvente y filtrar si es necesario.	Con EFS-Florisil. Cambio de disolvente y filtrar.
Volumen final de la muestra.	5 mL.	1 mL.
Determinación instrumental.	Varía según el tipo de plaguicida a determinar.	Única determinación usando un sistema acoplado CG/EM.
Confirmación.	Uso de una segunda columna cromatográfica y/o detector.	Inmediata al obtener el espectro de masas para cada compuesto detectado.

En la *Figura No. 2.1* se muestra el diagrama de trabajo del método multiresiduo CDFA modificado seguido de las condiciones instrumentales usadas. Cabe mencionar que la extracción de los plaguicidas del tipo piretróide y carbamato se llevo a cabo en la parte del método CDFA modificado correspondiente al análisis de plaguicidas fosforados.

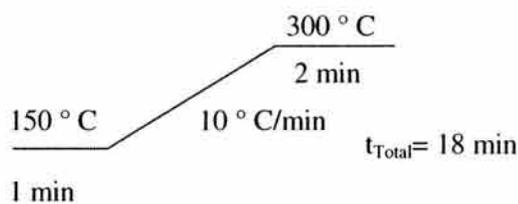
Figura No. 2.2. Método multiresiduo CDFA modificado.



Condiciones instrumentales

Cromatógrafo de Gases:

- Gas acarreador: Helio.
- Temperatura del inyector: 250 °C.
- Volumen inyectado: 1 µl
- Modo de inyección: Split pulsado
 - Presión del pulso 40 psi
 - Tiempo del pulso 0.25 min
 - relación de split 1:20
- Columna capilar de silica fundida (WCOT) HP-5: 5 % Fenil metil siloxano de 30 m de longitud x 0.25 mm di x 0.25 µm de espesor de fase estacionaria.
 - Flujo de columna de 1.2 ml/min.
- Programa de temperatura



Espectrómetro de Masas.

- Temperatura de la línea de transferencia: 280 °C.
- Temperatura de la fuente de ionización: 230 °C.
- Tipo de Ionización: Impacto Electrónico (IE)
- Barrido másico de $m/z = 33 - 550$ uma
- Fuente de impacto electrónico: 70 eV
- Tiempo de encendido (Solvent delay, su nombre en Inglés): 2 min.

Los materiales, equipos y reactivos utilizados en el método multiresiduo CDFA modificado son los siguientes:

1.- Instrumentación:

Sistema acoplado CG/EM

Cromatógrafo de Gases Hewlett Packard HP 6890

Detector de Masas Hewlett Packard HP 5973

Inyector automático Agilent 7683

Gas acarreador: helio de ultra alta pureza marca PRAXAIR.

2.- Materiales y Aparatos

Licuadora con vaso de vidrio de ocho velocidades Osterizer.

Balanza granataria con una precisión de 0.1 g

Balanza analítica con una precisión de 0.0001 g

Evaporador con corriente de nitrógeno.

Procesador de vacío para 12 muestras con unidad de control de vacío J. T. Baker.

Parrilla de calentamiento.

Cartuchos de extracción en fase sólida:

Florisil de 500 mg de 8 ml de capacidad, BAKERBOND spe 7420-06, Lote E06109, J. T. Baker

Filtros de Nylon WHATMAN de 0.45 μ m.

Viales Headspace de 6 y 10 ml con sellos de aluminio y septas de TFE/silicon.

Viales de vidrio de 2 y 40 ml con tapa de teflón Agilent

Viales de vidrio de 100 μ l Agilent

Micropipetas:

Gilson de 50 – 200 μ l.

Finnpipette de 200 – 1000 μ l.

Whatman No 4 de 11 cm de diámetro.

Desecador.

Probeta de 10 ml con divisiones de 1 ml.

Probeta de 100 ml con divisiones de 10 ml.

Vasos de precipitado de 30, 50 y 250 ml.

Pipetas volumétricas de 0.5, 1 y 25 ml.

Matraces aforados de: 1, 2, 5, 10, 25 y 50 ml.

Embudo Büchner de 11 cm de diámetro.

Kitasato de 250 ml.

Pipetas pasteur desechables.

Tubos de vidrio de 50 ml.

3.- Reactivos y patrones.

Plaguicidas:

Clorados:

Mirex: Chem Service Lote 241-136B 99.4 % de pureza caducidad 07/07.

DDT: PolyScience Corp 99 % de pureza.

Endrin: PolyScience Corp 99 % de pureza.

Metoxicloro: PolyScience Corp 99 % de pureza.

Lindano: PolyScience Corp 99 % de pureza.

Aldrin: PolyScience Corp 99 % de pureza.

Endosulfan: PolyScience Corp 99 % de pureza.

Heptacloro: PolyScience Corp 99 % de pureza.

Fosforados:

Malatión: Riedel-de Haën 98.1 % de pureza lote 71980 caducidad 17-01-02.

Chem Service 98.2 % de pureza lote 256-112B caducidad 02/04.

Ometoato: Riedel-de Haën 98.3 % de pureza lote 80610 caducidad 02-09-03.

Chem Service 98 % de pureza lote 265-112A caducidad 12/02.

Paratión: Chem Service 98 % de pureza lote 245-79A caducidad 06/04.

Azinfos metil: PolyScience Corp 99 % de pureza.

Disulfotón: PolyScience Corp 99 % de pureza.

Naled: PolyScience Corp 99 % de pureza.

Piretróides:

Permetrina: Chem Service (20 % cis – 78 % trans) Lote 265-32A caducidad 05/04.

Deltametrina: Riedel-de Haën 99.8 % de pureza lote 72110.

Cipermetrina: Chem Service (mezcla de isómeros) 254-14B 98 % de pureza caducidad 02/04.

Carbamatos:

Carbarilo: Chem Service 99 % de pureza lote 265-15A caducidad 05/04.

Maneb: Riedel-de Haën 94.5 % de pureza lote 9117X caducidad 27-10-01.

Chem Service > 95 % ± 0.5 % de pureza lote 265-48A caducidad 05/05.

Estándar interno: Acenafteno 99% de pureza, marca Aldrich lote 11016DX.

Surrogado: Antraceno 97% de pureza, marca Aldrich lote 17607BZ.

Sulfato de sodio anhidro (Na_2SO_4) J. T. Baker lote T1302.

Sal común (NaCl)

Disolventes: Deben ser grado plaguicida o equivalente.

Acetonitrilo grado HPLC J. T. Baker lotes E02253, V07469 y V36C53

Hexano J. T. Baker lote G16273 y Mallinckrodt Nanograde lote 4159 T43E93

Acetona grado plaguicida J. T. Baker lote M-3I600

Cloruro de metileno Mallinckrodt Nanograde lote 3023T07403.

Metanol J. T. Baker lote X41C21

Disoluciones¹:

Mezcla de 10% Acetona en hexano: medir 90 ml de hexano con una probeta de 100 ml, y completar el volumen a 100 ml con acetona.

Disolución estándar de antraceno (surrogado, S) de aproximadamente 100 ppm: pesar aproximadamente pero con precisión 0.0025 mg de antraceno y aforar a 25 ml con acetonitrilo.

Disolución madre de acenafteno (Estándar Interno, EI) de aproximadamente 400 ppm: pesar aproximadamente pero con precisión 0.004 g de acenafteno y aforar a 10 ml con metanol – cloruro de metileno.

Disolución estándar EI de aproximadamente 200 ppm: de la disolución anterior tomar 5 ml y aforar a 10 ml con metanol – cloruro de metileno.

Disolución madre de plaguicidas de aproximadamente 1000 ppm: pesar aproximadamente pero con precisión 0.025 g de cada plaguicida y aforar a 25 ml con metanol – cloruro de metileno.

Disolución secundaria de plaguicidas de aproximadamente 200 ppm: de la disolución anterior tomar 1 ml y aforar a 5 ml con metanol – cloruro de metileno.

Disolución secundaria de plaguicidas de aproximadamente 10 ppm: de la disolución madre de plaguicidas tomar 0.05 ml y aforar a 5 ml con metanol – cloruro de metileno.

Disolución estándar de plaguicidas de aproximadamente 0.5 ppm: de la disolución anterior tomar 0.25 ml y aforar a 5 ml con metanol – cloruro de metileno.

Preparación de las disoluciones estándar para la curva de calibración: de la disolución secundaria de plaguicidas de aproximadamente 200 ppm tomar alícuotas de 0.50, 0.40, 0.35, 0.30, 0.25, 0.20, 0.15, 0.10 y 0.05 ml y aforar a 2 ml cada una con cloruro de metileno, antes de aforar adicionar a cada una 0.10 ml de la disolución estándar EI de aproximadamente 200 ppm.

Preparación de las disoluciones estándar para la evaluación de los límites de detección y cuantificación instrumentales: de la disolución secundaria de plaguicidas de aproximadamente 10 ppm tomar alícuotas de 0.20, 0.10 y 0.05; de la disolución estándar de plaguicidas de aproximadamente 0.5 ppm tomar alícuotas de 0.10 y 0.05 ml; aforar a 2 ml cada alícuota con cloruro de metileno, antes de aforar adicionar a cada una 0.10 ml de la disolución estándar EI de aproximadamente 200 ppm.

¹ **Nota:** Todas las disoluciones se guardaron en viales de vidrio con tapa de teflón y se almacenaron a 4 °C.

2.3 Evaluación del método multiresiduo CDFa modificado.

Para evaluar esta metodología se analizaron cuatro clases diferentes de plaguicidas: halogenados, fosforados, piretroides y carbamatos.

Entre los plaguicidas estudiados se encuentran los permitidos por la SAGAR y la EPA para aplicarse en cultivos de espinaca. *La Tabla No 2.1* muestra los plaguicidas analizados en cada clase mencionada.

Tabla No 2.1. Plaguicidas analizados.

Clase	Plaguicida estudiado.
Halogenados	Aldrin, Endosulfan, Endrin, DDT, Heptacloro, Lindano, Metoxicloro y Mirex.
Fosforados	Azinfos metil, Disulfotón, Malatión, Naled, Ometoato y Paratión
Piretroides	Cipermetrina, Deltametrina y Permetrina
Carbámicos	Carbarilo y Maneb

Las hojas de datos de estos plaguicidas se encuentran en el *Apéndice B*.

2.3.1 Límite de detección instrumental (LDI).

Para calcular tanto el límite de detección como el de cuantificación se usó el método matemático.

Para determinar el límite de detección instrumental se asumió que todos los plaguicidas analizados tienen un factor de respuesta muy parecido por lo que se construyó una curva de calibración multicomponente con un intervalo muy bajo de concentración para tener una buena estimación de la ordenada al origen.

La curva calibración se hizo con cinco puntos los cuales se inyectaron por triplicado, y se preparó a partir de la disolución madre de plaguicidas de 1000 ppm, el intervalo de concentración fue de 1, 0.5, 0.25, 0.1 y 0.05 ppm para la mayoría de los plaguicidas, excepto para cipermetrina que fue de 0.2 a 0.02 ppm; ometoato y malatión de 20 a 7 ppm, la cual fue inyectada en el cromatógrafo de gases usando las condiciones instrumentales mencionadas anteriormente y detectada en el espectrómetro de masas por el modo SIM usando un solo ion para la cuantificación y detección de cada plaguicida.

2.3.2 Límite de cuantificación instrumental (LCI).

La definición de límite de cuantificación usada en esta tesis es la que proporciona el método matemático:

$$LCI = X'_A + 3S_{X'_A}$$

El LCI se obtuvo al interpolar directamente el LDI con la recta (y_+) de la curva de calibración de cada plaguicida y este nuevo punto se interpoló con la recta (y_-) para obtener el correspondiente límite de cuantificación con un 95 % de confianza.

Los cálculos correspondientes al LDI y LCI se encuentran en el *Apéndice D*.

2.3.3 Recobro.

Antes de adicionar las espinacas con los plaguicidas a analizar se hizo un blanco de método, el cual consistió en hacer toda la extracción conforme al método multiresiduo CDFa modificado pero sin contener la muestra (solo disolventes) para determinar el tipo de interferencias que introduce éste método seguido del análisis de una muestra inicial para determinar las interferencias que introduce la muestra (compuestos coextraídos) *Apéndice E*.

Se adicionaron dos cantidades diferentes a la matriz estudiada (espinacas), la cual fue analizada previamente para verificar que estaba exenta de residuos de plaguicidas, las cantidades adicionadas de los plaguicidas analizados fueron menores o aproximadamente iguales al L.M.R estipulado por la SAGAR y la EPA, cada adición se hizo por duplicado, es decir se hicieron dos extracciones independientes para la misma cantidad adicionada. Dichos extractos fueron adicionados con 80 y 200 μ l de la disolución madre de plaguicidas de aproximadamente 1000 ppm de concentración en el tercer paso del diagrama de trabajo (presentado anteriormente) del método multiresiduo CDFa modificado y procesados conforme esta metodología de extracción. Ver los cromatogramas en el *Apéndice E*.

En el caso de los plaguicidas clorados que están prohibidos por lo que no existe L.M.R reportado, se adicionaron aproximadamente 2 ppm. En la *Tabla No. 2.3* se muestran las cantidades reales adicionadas.

Para evaluar las cantidades recobradas de plaguicidas adicionados en estos dos análisis se hicieron dos curvas de calibración independientes en donde la concentración adicionada a las matrices se encuentra en el intervalo central de la curva de calibración correspondiente, posteriormente los plaguicidas fueron cuantificados por el método del estándar interno, el valor obtenido de la interpolación en la curva de

calibración fue multiplicado por el factor de concentración del método para obtener la cantidad recuperada en mg de plaguicida/kg muestra. *Apéndice D*

El intervalo de concentración de la primera curva de calibración fue de 30, 25, 20, 15 y 10 ppm², es decir entre 2.4 y 0.8 mg de plaguicida/kg de muestra. Los coeficientes de correlación obtenidos fueron mayores a 0.99 excepto para, malatión, endosulfan, permetrina y deltametrina que fueron de 0.98 y 0.97 para naled. *Apéndice D*

El intervalo de concentración de la segunda curva de calibración fue de 50, 45, 40, 35, 30, 25 y 20 ppm³, es decir entre 4.8 y 1.6 mg de plaguicida/kg de muestra. Los coeficientes de correlación obtenidos fueron mayores a 0.99 para todos los plaguicidas. *Apéndice D*

Tabla No. 2.3. Cantidad adicionada de plaguicidas a la matriz de espinaca.

Plaguicida	C. A. No 1 (ppm)	C. A. No 2 (ppm)	L.M.R (ppm) SAGAR-EPA
DDT	1.54	3.84	--
Heptacloro	1.72	4.30	--
Metoxicloro	1.64	4.11	--
Aldrin	1.64	4.10	--
Endrin	1.72	4.29	--
Lindano	1.57	3.92	1.0
Endosulfan	1.70	4.24	2.0
Azinfos	1.56	3.89	2.0
Mirex	1.64	4.10	--
Maneb	1.65	4.13	--
Carbarilo	1.56	3.90	12.0
Permetrina	1.57	3.94	20.0
Deltametrina	1.59	3.97	--
Antraceno S	1.87	3.47	--
Ometoato*	1.54	3.84	--
Paratión	2.39	5.98	1.0
Malatión	1.53	3.82	8.00
Cipermetrina	0.28	0.70	--
Disulfoton	1.55	3.87	0.75
Naled	2.05	5.14	3.0

*Dimetoato: L. M. R. (EPA): 2.0 ppm

C. A.: Cantidad Adicionada (mg plaguicida/kg muestra)

S: Surrogado

Para fines prácticos se dirá que la C. A. No 1 es equivalente a 1.6 ppm y la C. A. No 2 a 4 ppm.

² El intervalo de concentración para naled fue de 38 a 25 ppm, para paratión de 45 a 15 ppm y para cipermetrina de 5 a 3 ppm.

³ El intervalo de concentración para naled fue de 77 a 32 ppm, para paratión de 75 a 30 ppm, para cipermetrina de 10 a 4 ppm y para maneb de 100 a 20 ppm.

2.3.4 Límite de detección y cuantificación del método CDFA modificado (LDM y LCM).

Después de calcular la precisión del instrumento (LDI y LCI) se evaluó la precisión del método de extracción completo a través del LDM y LCM, los cuales se calcularon a partir de los LDI, LCI y el recobro obtenidos anteriormente para cada plaguicida:

Después de calcular los límites de detección y cuantificación instrumentales en unidades de mg de plaguicida/kg de muestra para cada plaguicida, se asumió que esta concentración era equivalente al recobro del método de extracción obtenido, y usando una relación directa se calculó cual sería la cantidad equivalente a un 100 % de recobro, la cual es el LDM y LCM respectivamente, en el *Apéndice D* se encuentra un ejemplo del cálculo.

2.4 Determinación de plaguicidas en espinacas.

2.4.1 Registro inicial y cuantificación de plaguicidas encontrados en espinacas.

Usando el método multiresiduo CDFA modificado se hizo un registro inicial de los plaguicidas que pudieran estar presentes en espinacas, para ello se analizó un gran número de espinacas compradas en distintos mercados, supermercados y la CEDA, procedentes de diversas áreas del país. *Tabla No. 2.4.*

El objetivo de hacer un registro inicial de los plaguicidas en las muestras es saber que tipos de plaguicidas se están utilizando para proteger este tipo de cultivos, y por consiguiente saber que tipo de plaguicidas serán cuantificados posteriormente.

Las muestras se analizaron durante las 24 horas siguientes a su compra para evitar la pérdida de algunos plaguicidas, especialmente los organofosforados que tienen un corto tiempo de vida media. En la extracción sólo se usaron las hojas (parte comestible) y no se les dio ningún tratamiento de limpieza anterior, solo se eliminó el exceso de tierra.

Las hojas fueron cortadas en cuadrados de 0.5 x 0.5 cm de ancho aproximadamente y después se mezclaron en una charola donde se procedió al muestreo por cuarteo.

El surrogado que se usó en este método fue antraceno en lugar de antraceno decadeuterado, la cantidad adicionada fue de 0.5 ppm en muestra aproximadamente.



Los plaguicidas que se espera encontrar son los permitidos por la SAGAR, al analizar espinacas de orígenes diferentes se sabrá que tipo de plaguicidas se usan realmente, los plaguicidas que se encuentren en este registro inicial serán cuantificados posteriormente por el método del estándar interno tomando en cuenta el porcentaje de recobro del surrogado en la cuantificación y se comparará la cantidad encontrada con el L.M.R reportado por la SAGAR.

Tabla No. 2.4. Origen de las muestras analizadas

Compra y procedencia de las muestras.		
Supermercado 1 (Superama)	Mercado 1 (Tlaxcala).	Verdulerías D. F. (origen desconocido)
Supermercado 2 (Aurrera)	Mercado 2 (Edo de México)	Central de abastos:
Supermercado 3 (Comercial Mexicana)	Mercado 3 (origen desconocido)	<ul style="list-style-type: none"> • San Gregorio Xochimilco • Sta. Ma Uxalpa Toluca (Edo México) • Tlaxcala • San Martín Puebla
Supermercado 4 (Wal-Mart)	Mercado 4 (Puebla)	
	Mercado 5 (Xochimilco)	
	Mercado 6 (Milpa alta)	
	Mercado 7 (Cuautitlán)	

Mercados establecidos en diferentes zonas del D. F.

Capítulo 3 Resultados y Análisis de Resultados.

3.1 ¿Por qué usar un método multiclase para la determinación de plaguicidas en espinacas?

En México a pesar de la existencia de organismos especializados en el uso de plaguicidas como la Comisión Intersecretarial para el Control del Proceso y uso de Plaguicidas, Fertilizantes y Sustancias Tóxicas (CICOPLAFEST, por sus siglas), no existe información confiable sobre el uso de plaguicidas, pues es una práctica común entre los agricultores el uso de mezclas no autorizadas o que no corresponden al cultivo, es decir se desconoce el tipo de plaguicida que ha sido usado por lo que se decidió emplear un método multiresiduo multiclase en lugar de un método multiresiduo selectivo.

3.1.1 Método multiresiduo CDFa modificado.

La principal modificación hecha a ésta metodología fue el uso de un sistema acoplado CG/EM, ya que al analizar muestras con otros detectores como el de captura de electrones, fotométrico de flama, etc., se pueden reportar falsos positivos, es decir, solo se confirma la identidad de los picos por su tiempo de retención, el problema es que pueden existir otros compuestos (llamados residuos analíticos no identificados) que tengan el mismo tiempo de retención de los plaguicidas analizados. La presencia de los residuos analíticos no identificados se debe a uno de los siguientes factores: es un nuevo plaguicida, es un metabolito no encontrado antes o interferencias coextraídas.

El uso de sistemas acoplados CG/EM permite la identificación de los compuestos separados por Cromatografía de Gases; por lo que cada compuesto se identifica no solo por su tiempo de retención sino también por su espectro de masas, el cual es característico para cada compuesto.

Dado que el detector empleado es un Espectrómetro de Masas que operó en el modo de barrido completo (SCAN su nombre en Inglés), por lo que no es tan sensible como los detectores empleados en la metodología CDFa, se decidió analizar una alícuota mayor del extracto y concentrarlo hasta un volumen final de 1ml.

Aunque este detector en el modo de monitoreo selectivo de iones (SIM sus siglas en Inglés) es tan sensible como el detector de captura de electrones y demás detectores empleados en la metodología CDFa, no se uso en el modo SIM en la detección de plaguicidas en espinacas porque se deseaba identificar los

compuestos presentes en los extractos de las muestras analizadas no solo los plaguicidas sino también las interferencias de matriz y de método, las cuales son de gran importancia pues pueden coeluir con los plaguicidas dando lugar a reportes de falsos positivos cuando se usa otro tipo de detectores.

Al realizar las primeras extracciones de espinacas uno de los principales problemas que se observó fue la presencia de remanentes de agua en los extractos concentrados, para eliminar los residuos de agua se usó sulfato de sodio granular anhidro. El obtener extractos secos es un punto crítico en esta metodología pues se sabe ya que una cantidad mínima de agua hidroliza los plaguicidas presentes en la muestra por lo que no pueden ser determinados. (40)

Dado lo anterior, la metodología de extracción-determinación propuesta fue evaluada obteniendo los límites de detección y cuantificación instrumentales y de método. La determinación de plaguicidas en espinacas usando el método multiresiduo CDFa modificado consistió de un registro inicial de estos en las muestras, los cuales se cuantificaron por el método del estándar interno.

3.2 Evaluación del método CDFa modificado.

Para evaluar esta metodología se analizaron cuatro clases diferentes de plaguicidas: halogenados, fosforados, piretroides y carbamatos. Los primeros han sido prohibidos o restringidos desde la década de 1950 por lo que no se espera encontrarlos en las muestras, pero se incluyeron en la validación para demostrar que esta metodología es capaz de determinarlos; mientras que los plaguicidas fosforados y carbamatos son los de mayor uso en todo el mundo por su gran eficacia insecticida y baja persistencia, los fungicidas de mayor uso son los ditiocarbámicos y algunos de estos son usados en los vegetales como preservadores poscosecha por lo que se incluyó en este estudio a uno de ellos, Maneb (en la presente tesis este fungicida se colocó en la clase de los carbamatos); en la actualidad la tendencia es difundir el mayor uso de los insecticidas piretroides (naturales y/o sintéticos) ya que son altamente tóxicos para los insectos, en especial los mosquitos y presentan baja toxicidad en los animales de sangre caliente, por lo que también se analizaron en el método multiresiduo CDFa modificado.

La separación cromatográfica de los plaguicidas estudiados y sus espectros de masas se presentan en el *Apéndice C*.

3.2.1 Límites de detección y cuantificación instrumentales.

Para obtener los límites de detección y cuantificación instrumentales se inyectó la curva de calibración multicomponente en el CG/EM y el detector opero en el modo SIM usando un solo ion para la detección de cada plaguicida con el fin de obtener una mayor sensibilidad, los iones elegidos para cada plaguicida son el pico base del espectro de masas de cada compuesto. *Tabla No 3.1*

El *Cromatograma No C-2* corresponde a una disolución de la curva de calibración multicomponente.

Tabla No 3.1. Iones de los plaguicidas utilizados en la detección por SIM.

Plaguicida	tr. (min)	m/z
Acenafteno (EI)	3.64	153
Ometoato	4.41	156
Naled	4.98	109
Lindano	6.01	181
Antraceno (S)	6.30	178
Disulfotón	6.40	88
Carbarilo	7.27	144
Heptacloro	7.32	100
Malatión	7.88	173
Aldrin	7.96	263
Paratión	8.09	291
Maneb	8.63	64
Endosulfan	9.36, 10.40	241, 195
Endrin	10.24, 12.01	263, 317
DDT	11.22	235
Metoxicloro	12.25	227
Azinfos	12.81	160
Mirex	13.00	272
Permetrina	13.85, 13.99	183
Cipermetrina	14.74, 14.83, 14.91, 14.94	163
Deltametrina	16.36	181

Con los datos obtenidos se hicieron las gráficas de calibración para cada plaguicida siendo el eje de las ordenadas la relación de áreas (plaguicida/EI) y el de las abscisas la relación de concentraciones (plaguicida/EI), los datos obtenidos fueron procesados conforme el método matemático para obtener el LDI correspondiente. *Apéndice D*

Al disminuir las concentraciones de la curva de calibración multicomponente para algunos plaguicidas no se obtuvo respuesta en el detector mientras que otros proporcionaban una señal grande a las mismas concentraciones inyectadas, en la *Tabla No 3.2* se muestran las concentraciones mínimas detectadas para cada plaguicida analizado.

Tabla No 3.2 Concentraciones mínimas detectadas en el CG/EM

Plaguicida	Concentración mínima detectada (ppm).	
	SCAN	SIM
DDT	4.800	0.2400
Heptacloro	5.3800	0.1076
Metoxicloro	5.1400	0.5140
Aldrin	5.1200	0.1024
Endrin	5.3600	--
Lindano	4.900	0.0980
Endosulfan	5.300	0.1060
Azinfos	19.4400	--
Mirex	5.1200	0.0256
Maneb	18.400	--
Carbarilo	19.5200	--
Permetrina	9.8400	--
Deltametrina	14.8800	--
Antraceno	4.3400	0.4340
Omtoato	9.6000	3.0000
Paratión	7.4800	--
Malatión	4.7800	0.7000
Cipermetrina	3.5200	--
Disulfotón	4.8400	0.0968
Naled	25.6800	--

Al analizar las curvas de calibración de cada plaguicida se observa que la pendiente varía en cada una de ellas, es decir cada compuesto tiene un factor de respuesta diferente en el detector por lo que se recomienda usar un intervalo de concentración diferente para cada compuesto. Figuras No 3.3-a y 3.3-b

Figura No. 3.3-a. Curva de calibración multicomponente para calcular límite de detección.

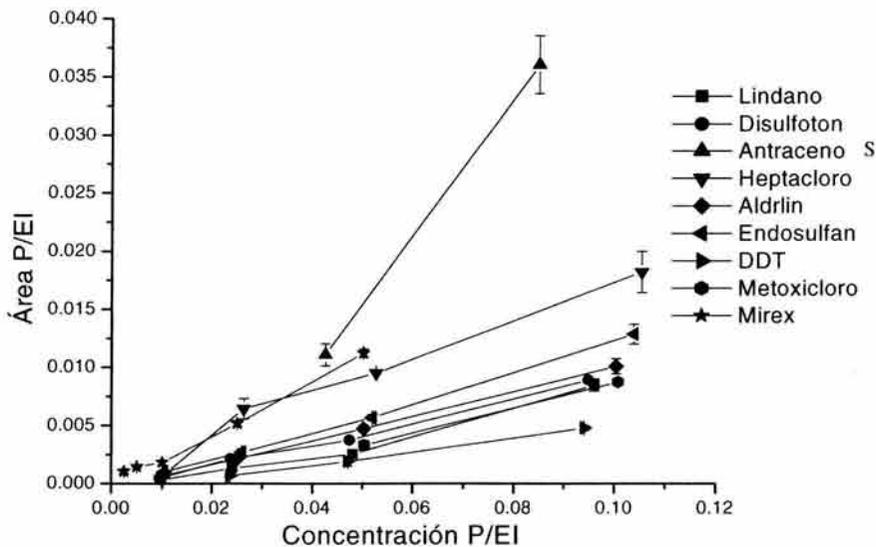
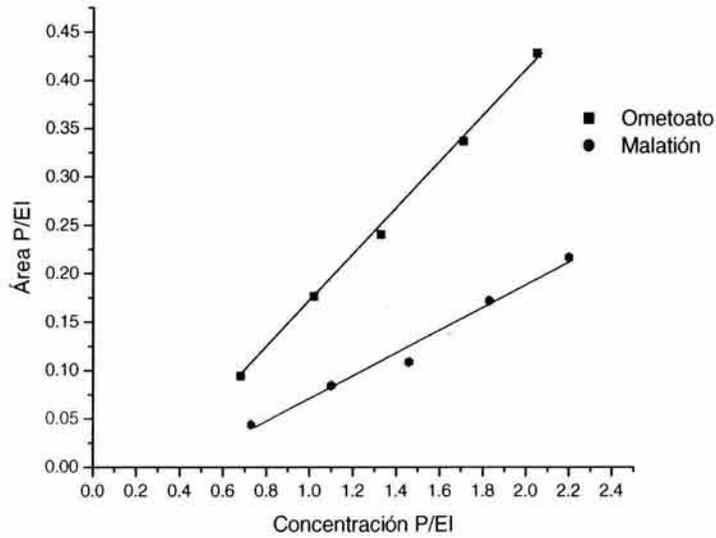


Figura No. 3.3-b



Debido a lo mencionado anteriormente sólo se obtuvieron los límites de detección y cuantificación instrumentales para los plaguicidas que presentaron los factores de respuesta más grandes, es decir que a muy bajas concentraciones aún son detectados por el CG/EM. *Tabla No 3.4*

Tabla No 3.4. Límites instrumentales.

Plaguicida	LDI (ppm)	LCI (ppm)
Lindano	0.4163	0.8281
Aldrin	0.1919	0.3778
Disulfotón	0.2773	0.5458
Heptacoloro	0.5531	1.1153
Endosulfan	0.3025	0.5957
Mirex	0.1097	0.2175
Ometoato	4.1440	7.9867
Malatión	1.6394	3.2206

3.2.2 Recobro.

En la siguiente tabla se presentan los recobros obtenidos en la muestra adicionada con 1.6 ppm de plaguicidas para ambas extracciones.

Tabla No 3.2.

Plaguicida	Extracción Clorados			Extracción Fosforados			%R*
	%R	S	C.V.	%R	S	C.V.	
DDT	46.32	2.76	5.95	50.41	3.29	6.52	C
Heptacoloro	51.78	1.16	2.24	68.10	2.52	3.71	C
Metoxicloro	58.82	0.22	0.37	59.93	1.36	2.27	C
Aldrin	51.09	1.49	2.92	66.49	1.56	2.35	C
Endrin	52.95	0.91	1.71	56.87	0.10	0.17	C
Lindano	38.66	0.70	1.81	49.18	1.87	3.80	C
Endosulfan	44.90	1.68	3.75	47.83	0.15	0.31	C
Azinfos	NR	--	--	NR	--	--	NR
Mirex	36.02	0.06	0.18	39.62	0.23	0.59	C
Maneb	NR	--	--	NR	--	--	--
Carbarilo	66.07	2.95	4.46	64.21	5.88	9.15	--
Permetrina	58.31	2.36	4.05	61.21	1.63	2.67	V
Deltametrina	NR	--	--	NR	--	--	S
Antraceno S	65.68	5.46	8.31	73.15	2.11	2.88	--
Ometoato	NR	--	--	NR	--	--	NR
Paratión	56.52	2.08	3.68	57.92	1.50	2.59	C
Malatión	63.38	2.81	4.43	64.47	1.91	2.96	V
Cipermetrina	NR	--	--	NR	--	--	C
Disulfotón	49.17	2.38	4.85	63.65	1.86	2.92	P
Naled	NR	--	--	NR	--	--	NR

C: completo (> 80 %); P: parcial (50 – 80 %); S: pequeño (< 50 %); V: variable; NR: No recobrado.

*Recobros proporcionados por el PAM (34) S: Desviación estándar. C.V.: Coeficiente de variación.

Al analizar los recobros de los extractos adicionados con 1.6 ppm se observó que la mayoría de los plaguicidas presentaron recobros incompletos al comparar los valores obtenidos con los reportados por el PAM, y que algunos plaguicidas se degradaban *Cromatograma F-1*, apareciendo en el cromatograma los picos de los productos de descomposición de los plaguicidas listados en la *Tabla No 3.3*, por lo que el recobro reportado para estos plaguicidas se obtuvo sumando las áreas del plaguicida correspondiente y su metabolito, carbarilo se degradó por completo a naftol por lo que el recobro se calculó con el metabolito solamente.

Los bajos recobros y la degradación de estos plaguicidas se atribuyeron inicialmente a que los extractos no fueron analizados inmediatamente (las muestras se analizaron entre 7 y 15 días después de extraídos).

Tabla No 3.3

Plaguicida	Metabolito
Carbarilo	Naftol
DDT	DDD
Metoxicloro	Metoxicloro olefina

El método 8081A de la EPA reporta que si la degradación de DDT es mayor del 15 % el cromatógrafo de gases presenta sitios activos en el inserto del inyector o en alguna otra parte del sistema. El porcentaje de degradación de DDT en los extractos para plaguicidas clorados y fosforados fue de 47 % y 37 % respectivamente, lo cual indico que se tuvo un problema instrumental. (47)

Lo anterior se comprobó comparando dos cromatogramas de una misma disolución estándar de 30 ppm, el primer cromatograma formó parte de la primera curva de la calibración (inicialmente el inserto estaba desactivado) y el segundo se obtuvo después de inyectar los extractos adicionados con 1.6 ppm.

Cromatogramas F-2 y F-3 en el Apéndice F

En el primer cromatograma no se observa degradación de ningún plaguicida mientras que en el segundo se encontró que algunos plaguicidas se degradaron, *Tabla No 3.4*, y que ometoato, naled, malatión, azinfos, cipermetrina, maneb y deltametrina no se recobraron.

Tabla No 3.4. Degradación de algunos plaguicidas en la disolución estándar de 30 ppm.

Plaguicida	Metabolito	tr (min)	% Descomposición
Carbarilo	Naftol	3.87	100
Lindano	BHC	3.55	22.1
Aldrin	Isodrin	8.45	0.6
DDT*	DDE	9.72	7.5
	o,p-DDT	10.49	
Endosulfan	Endosulfan éter	6.77	2.1
Metoxicloro	Metoxicloro olefina	10.98	2.0
	o,p-Metoxicloro	11.35	
Piretroides	3-Fenoxibenzaldehído	5.40	--

**Ver los cálculos en el apéndice F*

Estos problemas se deben a que el inserto y la lana de vidrio en el inyector presentaron sitios activos después de inyectar disoluciones estándar y muestras (aún los insertos nuevos y la lana de vidrio grado pesticida presentan sitios activos que degradan algunos plaguicidas fosforados y al Carbarilo) por lo que se desactivaron varios insertos y lanas de vidrio con diferentes procesos de silanización obteniéndose la mejor desactivación del inserto al silanizarlo con hexametildisilazano y la lana de vidrio con dimetildiclorosilano y trimetilclorosilano. Ver la técnica de silanización en el *Apéndice F*.

Al inyectar nuevamente la misma disolución estándar de 30 ppm usando un inserto bien desactivado se observó que todos los plaguicidas estaban presentes y que las áreas y alturas de todos los picos aumentaron considerablemente. *Cromatograma No F-4*

Cabe mencionar que al inyectar una disolución de 200 ppm se observó que además Naled se descompone en Diclorvos y los plaguicidas fosforados se degradan en Fosforoditioato.

Después de corregir el problema anterior se inyectó la segunda curva de calibración y se analizó la segunda muestra adicionada con 4 ppm.

Cabe mencionar que esta muestra se inyectó 3 días después de extraída usando un inserto en mal estado y 2 meses después con un inserto desactivado adecuadamente. Al usar un inserto activado se obtienen menores respuestas de los plaguicidas porque se degradan antes de entrar a la columna cromatográfica.

Tablas No 3.5 y 3.7

Dado lo anterior antes de iniciar un análisis de plaguicidas se debe tener el cromatógrafo en perfecto estado (inyector y columna) pues de no ser así se obtendrán falsos recobros para algunos plaguicidas los cuales serán menores a lo esperado. También se debe tomar en cuenta que los plaguicidas fosforados producen nuevos sitios activos en el inserto por lo que éste debe cambiarse cada cierto número de inyecciones de estándares o de muestras y además debe optimizarse el modo de inyección para evitar la pérdida de estos plaguicidas por adsorción o termólisis en el inyector. (49)

Tabla No 3.5. Plaguicidas degradados en los extractos adicionados con 4 ppm usando un inserto activo.

Plaguicida	% Descomposición	
	Extracción clorados	Extracción fosforados
Carbarilo/Naftol	100	100
DDT/DDD y o,p-DDT	100	39.60
Metoxicloro/o,p-Metoxicloro	57.13	55.16

Tabla No 3.6. Recobros obtenidos en la muestra adicionada con 4 ppm usando un inserto activado.

Plaguicida	Extracción Clorados.			Extracción fosforados.			%R *
	%R	S	C.V.	%R	S	C.V.	
DDT	14.96	0.53	3.55	20.27	0.54	2.65	C
Heptacloro	13.83	0.03	0.20	32.38	0.45	1.38	C
Metoxicloro	18.11	0.48	2.66	21.08	0.52	2.45	C
Aldrin	14.08	0.04	0.25	32.43	1.58	4.88	C
Endrin	18.33	0.55	3.01	22.75	0.59	2.61	C
Lindano	14.86	0.03	0.19	28.92	0.03	0.10	C
Endosulfan	20.80	0.70	3.37	25.96	1.52	5.86	C
Azinfos	NR	--	--	NR	--	--	NR
Mirex	11.99	0.26	2.18	16.55	0.25	1.50	C
Maneb	NR	--	--	NR	--	--	--
Carbarilo	35.62	2.47	6.95	115.70	108.93	94.15	--
Permetrina	17.76	1.49	8.40	23.73	0.95	4.02	V
Deltametrina	NR	--	--	17.67	0.40	2.28	S
Antraceno S	27.09	0.21	0.76	54.96	1.80	3.27	
Ometoato	NR	--	--	15.55	0.30	1.91	NR
Paratión	31.61	0.91	2.89	31.23	0.81	2.60	C
Malatión	34.83	3.67	10.54	40.59	2.41	5.94	V
Cipermetrina	NR	--	--	60.60	1.97	3.26	C
Disulfotón	23.49	0.04	0.15	41.69	2.49	5.97	P
Naled	NR	--	--	NR			NR

C: completo (> 80 %); P: parcial (50 – 80 %); S: pequeño (< 50 %); V: variable; NR: No recobrado.

*Recobros proporcionados por el PAM (34) S: Desviación estándar. C.V.: Coeficiente de variación.

Al usar un inserto debidamente desactivado los porcentajes de descomposición disminuyen notablemente en comparación con el obtenido al usar un inserto activo, y los recobros mejoraron significativamente para la mayoría de los plaguicidas a pesar del tiempo transcurrido entre la extracción y la determinación. *Tabla No 3.6*

Tabla No 3.7. Plaguicidas degradados en los extractos adicionados con 4 ppm usando un inserto desactivado.

Plaguicida	% Descomposición	
	Extracción clorados	Extracción fosforados
Carbarilo/Naftol	14.54	12.24
DDT/ DDD	58.48	29.71
Metoxicloro/o,p-Metoxicloro	43.95	16.83

Al comparar las extracciones para plaguicidas clorados y fosforados usando un inserto desactivado; en la primera, se obtienen menores recobros por la limpieza adicional con EFS-Florisil, aunque la variación en estos es menor que en la extracción para plaguicidas fosforados en la cual solo hay un cambio de disolvente por lo que los recobros son mayores. *Tabla No 3.8*

Tabla No 3.8. Recobros obtenidos en la muestra adicionada con 4 ppm usando un inserto desactivado.

Plaguicida	Extracción Clorados			Extracción Fosforados			%R*
	%R	S	C.V.	%R	S	C.V.	
DDT	29.17	1.44	4.95	88.60	10.40	11.74	C
Heptacloro	19.90	0.95	4.80	55.73	12.78	22.94	C
Metoxicloro	51.14	1.82	3.57	135.96	22.90	16.85	C
Aldrin	19.30	0.31	1.61	59.59	13.51	22.66	C
Endrin	33.06	1.05	3.17	72.96	13.01	17.83	C
Lindano	25.77	0.83	3.21	56.74	11.04	19.46	C
Endosulfan	43.81	1.80	4.10	77.81	8.44	10.85	C
Azinfos	38.70	5.18	13.39	51.83	6.02	11.61	NR
Mirex	31.36	5.99	19.10	80.85	9.27	11.47	C
Maneb	NR	--	--	NR	--	--	--
Carbarilo	51.39	7.45	14.50	87.81	11.20	12.76	--
Permetrina	79.25	13.27	16.75	161.62	18.76	11.61	V
Deltametrina	57.08	6.77	11.86	83.24	13.82	16.60	S
Antraceno S	36.41	1.75	4.80	99.83	23.22	23.26	--
Ometoato	15.23	0.10	0.65	65.92	8.78	13.31	NR
Paratión	75.01	7.19	9.59	55.20	8.04	14.57	C
Malatión	70.99	9.16	12.91	94.56	16.90	17.87	V
Cipermetrina	481.09	447.66	93.05	306.55	64.82	21.15	C
Disulfoton	24.75	0.57	2.29	63.10	14.64	23.20	P
Naled	NR	--	--	NR	--	--	NR

C: completo (> 80 %); P: parcial (50 – 80 %); S: pequeño (< 50 %); V: variable; NR: No recobrado.

*Recobros proporcionados por el PAM (34) S: Desviación estándar. C.V.: Coeficiente de variación.

A pesar de que los recobros mejoraron, la limpieza con EFS-Florisil no es suficiente para aislar las interferencias apolares coextraídas lo que ocasiona coelución entre las interferencias y los plaguicidas (en especial en la extracción de clorados) haciendo difícil su detección y una apropiada integración de los picos correspondientes por lo que se obtienen evaluaciones falsas en los recobros de plaguicidas clorados y piretroides especialmente, por lo que los coeficientes de variación de los recobros son mayores en los plaguicidas que eluyen en donde hay mayor interferencia por la coelución presente en el cromatograma.

Cromatogramas No E-5 y E-6

3.3 Límites de Detección y Cuantificación del Método.

Para calcular los límites de detección y cuantificación instrumental se utilizaron los recobros calculados a partir de la muestra adicionada con 4 ppm que se inyectó con el inserto desactivado y los límites de detección y cuantificación instrumentales de la *Tabla No 3.4*; los cuales se obtuvieron con el instrumento en mal estado.

Los límites de detección y cuantificación del método obtenidos se presentan en las *Tablas No 3.9 y 3.10*, y a pesar de que las condiciones instrumentales no fueron del todo adecuadas, los límites de detección y cuantificación del método que se calcularon son menores que los LMR's reportados por la SAGAR y la EPA, es decir, si las muestras analizadas tuvieran plaguicidas se podrían detectar fácilmente aunque la cuantificación no sería del todo confiable si el CG/EM no esta del todo optimizado.

*Tabla No 3.9.*Límite de detección de método.

Plaguicida	LDM (ppm)	
	Extracción clorados.	Extracción fosforados.
Lindano	0.1292	0.0587
Disulfoton	0.0620	0.0243
Aldrin	0.1149	0.0372
Heptacoloro	0.2224	0.0794
Endosulfan	0.0552	0.0311
Mirex	0.0280	0.0109
Ometoato	2.1768	0.5029
Malatión	0.1847	0.1387

*Tabla No 3.10.*Límite de cuantificación de método.

Plaguicida	LCM (ppm)		LMR (ppm)
	Extracción clorados.	Extracción fosforados.	
Lindano	0.2571	0.1168	1.00
Disulfoton	0.1221	0.0479	0.80
Aldrin	0.2262	0.0733	--
Heptacoloro	0.4484	0.1601	--
Endosulfan	0.1086	0.0612	2.00
Mirex	0.0555	0.0215	--
Ometoato	4.1952	0.9693	2.00*
Malatión	0.3629	0.2725	8.00

*LMR para dimetoato (EPA)

Al comparar los resultados obtenidos de LDI, LCI y recobros se observa que los mejores datos provienen de la extracción para plaguicidas fosforados ya que existe una menor manipulación de muestra y menor coextracción de interferencias por el cambio de disolvente, por lo que los límites de detección y

cuantificación de método calculados a partir de ésta extracción son menores que los obtenidos de la extracción para plaguicidas fosforados; es decir, dicha extracción es más eficiente en la determinación de todos los tipos de plaguicidas que la extracción para plaguicidas clorados.

3.4 Determinación de plaguicidas en espinacas.

A continuación se presentan los resultados obtenidos para las espinacas analizadas usando un inyector desactivado, en donde ya se tomó en cuenta el porcentaje de recobro del surrogado para la cuantificación, es decir el recobro de antraceno obtenido en cada análisis. *Tabla No 3.11* Dichos resultados se compararan con los LMR's reportados para cada plaguicida en espinaca, como no se encontró reportado un LMR para ometoato en espinaca ni otra hortaliza similar se comparará la cantidad detectada con el LMR de su análogo azufrado dimetoato que es de 2 ppm, ya que los fosforotioatos son más tóxicos que los fosfoditioatos el LMR de ometoato debe ser menor que el de dimetoato. En el caso de maneb el LMR con el que se compara es el reportado en lechuga que es de 10 ppm.

Tabla No 3.11. Resultados finales del análisis de plaguicidas en espinacas.

Procedencia de las muestras	Plaguicidas detectados	Concentración ppm
Mercado # 1 (Tlaxcala).	Malatión	6.164
	Ometoato	12.88
	Maneb	24.29
Mercado 2 (Edo de México)	Ometoato	8.136
	Maneb	1.384
Mercado 3 (origen desconocido)	Ometoato	0.186
	Maneb	1.232
Mercado 4 (Puebla)	ND	---
Mercado 5 (Xochimilco)	ND	---
Mercado 6 (Milpa alta)	Metamidofos*	NC
Mercado 7 (Cuautitlán)	ND	---
Verdulerías D. F. (origen desconocido)	ND	---
Central de abastos: San Gregorio Xochimilco Sta. Ma Uxalpa Toluca (Edo México) Tlaxcala San Martín Puebla	ND	---
	ND	---
	ND	---
	ND	---
Supermercado 1 (Superama)	ND	---
Supermercado 2 (Aurrera)	ND	---
Supermercado 3 (Comercial Mexicana)	ND	---
Supermercado 4 (Wal-Mart)	ND	---

** % Recobro del surrogado en dicha determinación: 51.04 %

NC: No cuantificado; ND: No detectado.

Con lo que respecta a las concentraciones determinadas en la espinaca comprada en el mercado 1 las concentraciones de ometoato y maneb son 6.44 y 2.43 veces mayores que sus LMR's establecidos, mientras que la espinaca comprada en el mercado 2 contiene una concentración de ometoato 4 veces mayor. Una concentración tan alta de ometoato nos dice que el tiempo de espera entre la aplicación de plaguicidas y la recolección de espinaca no fue el suficiente como para que dichos compuestos se degradaran, aunque por otra parte el encontrar maneb, un fungicida no recomendado para espinaca puede ser indicación de que la aplicación de dichas mezclas de plaguicidas no autorizadas para ese cultivo se usan para prolongar la vida de anaquel de dicha hortaliza.

Entre los plaguicidas que se determinaron se detectó la presencia de un plaguicida fosforado llamado metamidofos el cual no fue cuantificado por falta del estándar puro correspondiente, este insecticida no se aplica en espinacas pero sí en lechuga y vegetales del género *Brassica* (5), y su presencia solo indica que los agricultores usan diferentes tipos de plaguicidas (ya sean recomendados o no por la CICOPPLAFEST) para proteger sus cultivos.

En general se puede decir que la cantidad de plaguicidas detectados en espinacas rebasa el LMR establecido por la SAGAR y la EPA pero el número de muestras que presentaron esta incidencia es tan pequeño que no es de gran importancia toxicológica.

Capítulo 4 Conclusiones y recomendaciones.

4.1 Preparación de muestra.

El desarrollo de un adecuado protocolo de preparación de muestra es fundamental para obtener extractos con la mínima cantidad de interferencias co-extraídas, así como para evitar la descomposición de los plaguicidas y recobros aceptables.

La extracción en fase sólida es de gran ayuda para eliminar interferencias co-extraídas, sin embargo debido al alto contenido de componentes no polares, el uso de un solo cartucho de extracción no es suficiente para eliminar las ceras, fitoles y colestenoles presentes en las espinacas, por lo que se propone utilizar una limpieza adicional de EFS - C18 para eliminar estas interferencias o precipitar las ceras extraídas al bajar rápidamente la temperatura de los extractos iniciales y filtrarlos.

También es de vital importancia eliminar toda el agua remanente de los extractos pues de no ser así los plaguicidas se hidrolizan durante la concentración de la alícuota a analizar, la concentración debe hacerse cuidadosamente para no evaporar completamente el disolvente lo cual daría como resultado la pérdida total de los plaguicidas. (19)

El análisis instrumental de los extractos obtenidos debe hacerse lo más pronto posible para evitar la degradación, adsorción o isomerización de los plaguicidas, por lo que se debe determinar el tiempo máximo de almacenamiento de los extractos en el cual los plaguicidas no presentan degradación o isomerización.

4.2 Determinación cromatográfica.

Para obtener una adecuada determinación cualitativa de todos los plaguicidas se debe contar con un sistema de verificación del CG/EM, de lo contrario los resultados obtenidos no serán del todo reales.

Uno de los principales problemas que se presentaron en este estudio fue el generado por las camisas del puerto de inyección del cromatógrafo de gases y la lana de vidrio que se emplea en el inserto para evitar que la columna se tape. Ambos presentan sitios activos lo cual provocaba la degradación completa o parcial de todos los plaguicidas; por lo que antes de comenzar cualquier análisis se debe verificar que el inserto se encuentra en buenas condiciones ya que además este sufre una activación gradual al inyectar

continuamente estándares de plaguicidas fosforados y muestras, por lo tanto se debe contar con insertos y lana de vidrio bien silanizados los cuales deben cambiarse conforme se requiera (prueba de degradación de Carbarilo, DDT y de Aldrín).

Para verificar que el sistema instrumental se encuentra en óptimas condiciones se recomienda contar con una solución de verificación que contenga aquellos plaguicidas susceptibles a degradación, la cual debe ser inyectada antes de analizar estándares o muestras.

4.3 Evaluación del método multiresiduo CDFA modificado.

En general los recobros obtenidos por el método multiresiduo CDFA modificado son menores a los reportados por el método II para alimentos no grasos del PAM debido a que CG/EM no estaba debidamente optimizado; por lo que solo se obtuvieron los LDM y LCM para la mayoría de plaguicidas clorados y tres fosforados los cuales son inferiores a los límites máximos de residuos permitidos por SAGAR y EPA, aún usando un instrumento fuera de condiciones ideales, por lo tanto se deberá evaluar nuevamente esta metodología.

A pesar de los problemas instrumentales encontrados, el método multiresiduo CDFA modificado es capaz de determinar plaguicidas en muestras reales y muestras adicionadas satisfactoriamente.



4.4 Determinación de plaguicidas en espinacas.

De todas las muestras analizadas solo un porcentaje pequeño de estas dio un resultado positivo en la presencia de plaguicidas.

Maneb y Metamidofos no se encuentran en las listas de plaguicidas recomendados para el cultivo de espinaca por la CICOPLAFEST, pero no son plaguicidas prohibidos o restringidos.

De manera que la primera conclusión a la que se puede llegar a pesar de un muestreo tan pequeño (tomando en cuenta los volúmenes que maneja la Central de Abastos), es que los agricultores tienen buenas prácticas agrícolas con lo que respecta a la aplicación de mezclas de plaguicidas y tiempos de cosecha.

La segunda es que debido al consumo de espinacas no existe una contribución importante en la dieta con lo que respecta a plaguicidas. Es importante hacer notar que a pesar de que se analizaron cuantitativamente los extractos para un grupo de plaguicidas se realizó un análisis cualitativo de todos los extractos buscando cualquier otro plaguicida que pudiera estar presente.

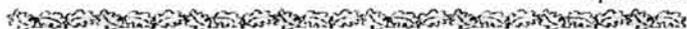
Es importante continuar el estudio con esta metodología en diferentes hortalizas y productos de la dieta de los habitantes del D.F., procedentes de diversas zonas del país y cultivadas en diferentes ciclos de cosecha para comparar el tipo de plaguicida aplicado según el tipo de vegetal y la estación de su siembra y los efectos en la dieta de la población.

5 Bibliografía.

1. Webster H. Sill. (1982). Plant Protection. An integrated interdisciplinary approach. The Iowa State University Press. Ames, Iowa 1st Edition. USA.
2. Agricultural Chemicals-Congresses. (1979). Chemistry and Agriculture. Industrial Division of the Chemical Society. Special Publication No 36. London.
3. Comunicación personal Humberto Gómez-Díaz Barriga.
4. Shibamoto Takayuki. T Leonard F. Bjeidanes. 1996. Introducción a la toxicología de los alimentos Editorial ACRIBIA S. A. España.
5. Belitz H. D. 1997. Química de alimentos. Segunda Edición Editorial ACRIBIA S.A. España.
6. Coscolla, Ramón. 1993. Residuos de plaguicidas en alimentos vegetales. Ediciones Mundi-Prensa Madrid España.
7. Catálogo oficial de plaguicidas. 1994. SAGAR- CICOPLAFEST.
8. Catálogo oficial de plaguicidas. 1998. SAGAR- CICOPLAFEST.
9. Barbera, Claudio. 1989. Pesticidas agrícolas. Cuarta edición. Editorial OMEGA. Barcelona
10. Mattews. G. A. 1988. Métodos para la aplicación de pesticidas. Segunda reimpresión. Compañía Editorial Continental S. A. de C. V. México.
11. Ishaaya, Isaac & Degheele Danny. 1998. Insecticides with novel modes of action, mechanism and application. Springer India.
12. Jokanovic, Milan. 2001. Biotransformation of organophosphorus compounds. Toxicology vol 166 pp 139-160.
13. Alpuche, Leticia. 1990. Plaguicidas y sus efectos en el ambiente y la salud. Centro de Ecodesarrollo de México. México
14. P.H. Howard. (1991). Handbook of environmental fate and exposure data for organic chemicals. USA
15. Wayland J. Hayes, Jr. Et al. 1991. Handbook of pesticide toxicology Vol I, II, III. Academic Press Inc. USA.
16. Guía de plaguicidas autorizados de uso agrícola. 1999. SAGAR- CICOPLAFEST.
17. EPA. Office of pesticide program. (2002). www.epa.com
18. Miller y Miller. 1993. Estadística para química analítica. Segunda edición Addison-Wesley Iberoamericana USA.
19. Meloan, Clifton E. 1996. Pesticides Laboratory Training Manual. AOAC INTERNATIONAL
20. Rubinson & Rubinson. 2000. Química analítica contemporánea. Pearson Education. México.
21. Morris Zief and Ruthann, Kiser. 1994. A technical guide to theory method development and use solid phase extraction for sample preparation. J. T. Baker.

22. Knipe C. R et al. 1993. Designing a sample preparation method that employs supercritical fluid extraction. Hewlett-Packard Company.
23. U. S. Environmental Protection Agency. 1977. Sampling and Analysis Procedures for Screening of Industrial Effluents for Priority Pollutants, Environmental Monitoring and Support Laboratories. Cincinnati, Ohio
24. Grob Robert L. 1983. Chromatographic Analysis the Environment. Second Edition MARCEL DEKKER Inc. USA.
25. Hachenberg H, et al. 1979. Gas Chromatographic Headspace Analysis. HEYDEN. Great Britain.
26. Blevis Dennis D. et al. 1993. Handbook of sorbent extraction technology. Edited by Nigel Simpson/K. C. Van Horne. Published by Varian USA.
27. Gere Dennis R. and Derrico Ellen M. 1994. SFE Theory to practice-first principles and method development. Part I. LC GC the magazine of separation science Vol 12. Num 5 pp 352 – 366.
28. Hawthorne, Steven B. 1990. Analytical-scale supercritical fluid extraction. Analytical Chem Vol 62. Num 11. pp 633A – 642A.
29. Willard, Hobart H. et al. 1991. Métodos instrumentales de análisis. Grupo Editorial Iberoamérica. Séptima Edición. México.
30. McNair, Harold M. 1981. Cromatografía de gases. Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos. Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico.
31. Skoog, Douglas A. et al. 1992. Principios de Análisis Instrumental. Mc Graw Hill. Quinta Edición. México.
32. Harris, Daniel C. 2001. Análisis Químico Cualitativo. Editorial Reverté 2ª Edición España.
33. Gómez Ruíz, Humberto y García Osuna, Adolfo. 1989. ¿Qué son? y ¿Para que sirven? Los equipos acoplados de Cromatografía de Gases/Espectrometría de Masas. UNAM.
34. McMahon, B. M., and Hardin, N. F. (Eds), 1994. Pesticide Analytical Manual. Vol 1 3rd ed, U. S. Food and Drug Administration, Rockville, MD.
35. Motohashi, Noboru et al. 1996. Review Official multiresidue methods of pesticide analysis in vegetables, fruits and soil. Journal of Chromatography A Vol 745 pp 333-346.
36. Nollet Leo, M. L. 1996. Handbook of food analysis Vol 2 Residues and other food component analysis Marcel Dekker, Inc ed. USA.
37. Official Methods of Analysis. 1995. General multiresidue methods Chap 10 16th ed. AOAC INTERNATIONAL Gaithersburg, MD.
38. Van der Hoff, G. R. and Van Zoonen, Piet. 1999. Review Trace análisis of pesticides by gas chromatography Journal of Chromatography A Vol 843 pp 301-322.

- 
39. Hefner, K. et al. 1994. Determination of Limits of detection for selected Organohalogen, organophosphate and Carbamate Pesticides on Representative commodities Using the Enhanced CDFA Multiresidue Screening Method. Department of Food & Agriculture. Sacramento CA.
 40. Cook, et al. (1999). Multiresidue Analysis of Pesticides in Fresh Fruits and Vegetables Using Procedures Developed by the Florida department Agriculture and Consumer Services. J of AOAC Vol 82 No 6 pp 1419 – 1435.
 41. Gómez Ruiz, H. (1998). Control de Calidad en Resultados Analíticos. FQ UNAM.
 42. Federal Register Part VIII. (1984). EPA 40 CFR Part 136 Vol 49 No 209.
 43. Vogelgesang & Hädrich. (1998). Limits of detection, identification and determination: a statistical approach for practitioners. Accred Qual Assur No 3 pp 242 – 255.
 44. ASTM D4210. "Interlaboratory Quality Control Procedures and a Discussion on Reporting Low-Level Data", ASTM Philadelphia, PA 19103.
 45. ASTM E882. "Accountability and Quality Control in the Chemical Analysis Laboratory", ASTM Philadelphia, PA 19103.
 46. EPA. (1991). Manual of Methods Validation. U.S.EPA
 47. EPA. (1996). Method 8081A Organochlorine pesticides by gas chromatography. Vol I Section B.
 48. Knapp, Daniel R. (1979). Handbook of Analytical Derivatization Reactions. JOHN WILEY & SONS. USA.
 49. Wylie, Philip L. (1996). Improved Gas Chromatographic Analysis of Organophosphorus Pesticides with Pulsed Splitless Injection. J of AOAC Vol 79 No 2 pp 571 – 577.



Apéndices.

Apéndice A. Métodos multiresiduos para la determinación de plaguicidas.

Tabla 1-A. Procedimientos de extracción.

Analito	Muestra	Solvente de extracción	Procedimiento de limpieza	Determinación
Organoclorados Organofosforados Organonitrogenados	Frutas, Vegetales	Acetona.	El filtrado se extrae con éter de petróleo-CH ₂ Cl ₂ , se adiciona sal a la fase acuosa y se extrae con CH ₂ Cl ₂ . Las fases orgánicas son combinadas y secadas con Na ₂ SO ₄ anhidro. Los plaguicidas organoclorados y organonitrogenados se determinan por CG. Los plaguicidas organohalogenados: se hace una limpieza con Florisil y se determinan por CG.	CG-KCl termoiónico. CG-DCE
Organoclorados Organofosforados Otros plaguicidas (organonitrogenados, etc)	Alimentos Grasas	Acetona-agua (2:1) (La cantidad de agua depende del contenido de agua en las muestras).	Se adiciona NaCl al filtrado y se extrae con CH ₂ Cl ₂ La fase orgánica es secada con Na ₂ SO ₄ anhidro. Se concentra y disuelve en ciclohexano-acetato de etilo (1:1). La solución es limpiada por CPG con ciclohexano-acetato de etilo (1:1). Las grasas son disueltas en la fase móvil y se limpian por CPG directamente. Se toma una alícuota, la cual se concentra y disuelve en acetato de etilo. Los plaguicidas nitrogenados, fosforados y los que contienen azufre son determinados por CG. Los plaguicidas clorados requieren de una limpieza adicional con una minicolumna de sílica gel y son determinados por CG. Los eluyentes son: (1) hexano-tolueno (65:35), (2) tolueno, (3) tolueno-acetona (95:5), (4) tolueno-acetona (80:20), (5) acetona. Para plaguicidas halogenados y PCB's la fase orgánica sólo se lava con H ₂ SO ₄ conc. El solvente se reemplaza por isooctano, y se determina por CG.	CG-DCE CG-DFF CG-DNF CG-EM (SIM)
Organoclorados Organofosforados Organonitrogenados	Frutas, Vegetales	Acetona.	El filtrado se extrae con éter de petróleo-CH ₂ Cl ₂ , se adiciona sal a la fase acuosa y se extrae con CH ₂ Cl ₂ . Las fases orgánicas son combinadas y secadas con Na ₂ SO ₄ anhidro. Los plaguicidas organoclorados y organonitrogenados se determinan por CG. Los plaguicidas organohalogenados: se hace una limpieza con Florisil y se determinan por CG.	CG-DCEL CG-DFF
Plaguicidas	Alimentos no grasos de baja humedad (< 10%)	35 % agua en acetona.	El filtrado se extrae con éter de petróleo-CH ₂ Cl ₂ , se adiciona sal a la fase acuosa y se extrae con CH ₂ Cl ₂ . Las fases orgánicas son combinadas y secadas con Na ₂ SO ₄ anhidro, e inyectadas en un CG o se limpia una vez más con una columna de carbón mezclado (carbón-celita-óxido de magnesio, 1:4:2) o florisil.	CG-DCEL CG-DFF

Tabla 1-A. Continuación.

Analito	Muestra	Solvente de extracción	Procedimiento de limpieza	Determinación
Organoclorados Organofosforados Carbamatos y otros.	Frutas, Vegetales.	Acetona, Acetona-agua (Para cereales).	Se adicionan agua y salmuera al filtrado y se extraen con CH ₂ Cl ₂ o hexano. La fase orgánica es secada con Na ₂ SO ₄ anhidro, se concentra y se disuelve en ciclohexano-CH ₂ Cl ₂ (85:15). La solución es limpiada por CPG con la misma solución. La fracción tomada se concentra, se disuelve y se determina por CG.	CG-DCE CG-DNF
Organoclorados Organofosforados Carbamatos, funguicidas.	Frutas y vegetales.	Acetona.	El filtrado es extraído con CH ₂ Cl ₂ -hexano (1:1) La fase orgánica es secada con Na ₂ SO ₄ anhidro, se concentra y se disuelve en ciclohexano- CH ₂ Cl ₂ (1:1). La solución es limpiada por CPG con la misma solución. La fracción tomada se concentra, se disuelve con 10% de acetona en ciclohexano y se determina por CG.	CG-DCE CG-DFF CG-DNF CG-DIF
Organoclorados Organofosforados Funguicidas.	Frutas y vegetales, grasas, cereales.	Acetato de etilo más adición de Na ₂ SO ₄ .	El filtrado es concentrado y limpiado por CPG con ciclohexano-acetato de etilo (1:1). Se colecta una fracción a la que se le adiciona un estándar interno y la mezcla es inyectada en un CG sin evaporación.	CG-DCE CG-DNF
Organoclorados.	Vegetales, arroz, hojas de Té.	Acetona.	Se concentra el filtrado, se adiciona una solución de NaCl al 5 % y se extrae con hexano. La fase orgánica es concentrada y disuelta con ciclohexano-CH ₂ Cl ₂ (1:1). La solución es limpiada por CPG con la misma solución. La fracción es concentrada, disuelta en hexano y analizada por CG.	CG-DCEL
Plaguicidas	Alimentos grasos y no grasos.	Extracción con fluidos supercríticos. (CO ₂).	La muestra se mezcla con tierra de diatomeas y se extrae. Los extractos de muestras grasosas son limpiados por CPG con Hexano-CH ₂ Cl ₂ (1:1) y determinado por CG.	CG-DFF CG-DCEL
Organoclorados Organofosforados Carbamatos.	Frutas y vegetales.	Acetonitrilo.	Se adiciona sal al filtrado y se extrae. El acetonitrilo se coloca en tres viales separados, se concentra y reconstituye con benceno para determinar los plaguicidas clorados, para los fosforados se reconstituye con acetona. La tercera porción se reconstituye con metanol-agua (1:3) y se usa para la determinación de carbamatos.	CG-DCE CG-DNF CG-DFF CLAE CG-EM
Plaguicidas.	Cosechas.	Acetato de etilo (adicionar Na ₂ SO ₄ anhidro).	El filtrado se concentra y disuelve con ciclohexano- acetato de etilo . La solución es limpiada por CPG con la misma solución. La fracción tomada se concentra y disuelve con ciclohexano- acetato de etilo (1:1). se determina por CG.	CG-DCE CG-DFF CG-DNF
Plaguicidas	Frutas y vegetales.	Acetonitrilo.	Se adiciona sal al filtrado y se extrae. El acetonitrilo es secado con Na ₂ SO ₄ anhidro, se concentra y se disuelve con acetona.	CG-EM
Organoclorados Organofosforados Carbamatos.	Frutas y vegetales.	Acetonitrilo.	El extracto es filtrado a través de SPE C ₈ . Se adiciona buffer y salmuera al eluato y se extrae. Una porción de acetonitrilo es concentrada y analizada por CG par la determinación de plaguicidas clorados y fosforados. Otra porción de acetonitrilo se pasa a través de un cartucho de SPE (de sílica enlazada con aminopropil) y los carbamatos son analizados por HPLC.	CG-DCEL CG-DFF CLAE

Tabla 1-A. Continuación.

Analito	Muestra	Solvente de extracción	Procedimiento de limpieza	Determinación
Plaguicidas, Organofosforados, funguicidas halogenados, piretroides, triazinas, fenilureas, carbamatos.	Frutas y vegetales.	Acetona.	Se extrae con CH ₂ Cl ₂ y se limpia por CPG con ciclohexano-acetato de etilo (1:1). Se separa en una minicolumna de sílica gel, los eluyentes son (1) hexano-tolueno (65:35), (2) tolueno, (3) tolueno-acetona (95:5), (4) tolueno-acetona (80:20), (5) acetona.	CCFAE
Carbamatos.	Frutas y vegetales.	Para muestras no grasas: (1) CH ₂ Cl ₂ -agua. (2) Acetonitrilo. Para muestras grasas: Acetonitrilo.	Prepurificar usando una partición acetonitrilo-hexano que es necesaria para la extracción con el último solvente. Limpiar por cromatografía en columna con Florisil. El mismo procedimiento descrito arriba con la prepurificación y cromatografía en columna.	CLAE
Plaguicidas.	Productos agrícolas.	Acetona.	Se adiciona salmuera al filtrado y se extrae con hexano. La fase orgánica es lavada con agua, y secada con Na ₂ SO ₄ , concentrada y disuelta con ciclohexano-acetona (1:1). La solución es limpiada por CPG con ciclohexano-acetona (1:1). La fracción es concentrada e inyectada en CG-EM.	CG-EM
Carbamatos, triazinas, acetamida, dinitroanilina y otros.	Suelo.	Metanol-agua (2:1).	Se extrae en Soxhlet. El volumen del extracto es reducido en un rotavapor (remover el solvente por completo). La fase acuosa es disuelta en agua, se coloca en un cartucho de C ₁₈ y se eluye con acetato de etilo.	CG-DNF CG-EM
Insecticidas y funguicidas.	Frutas y vegetales.	Acetona-agua (2:1).	Se extrae con CH ₂ Cl ₂ y se limpia con CPG con ciclohexano- acetato de etilo (1:1). Se separa con una minicolumna se sílica gel. (1) CH ₂ Cl ₂ , (2) hexano-acetona (8:2), (3) acetato de etilo, (4) metanol-agua (6:4), (5) metanol-agua (7:3).	CCFAE
Organoclorados, organofosforados, piretroides, carbamatos, triazinas, ureas.	Frutas y vegetales.	_____	La muestra molida es mezclada con Florisil, transferida a una columna y eluida con acetato de etilo o CH ₂ Cl ₂ -acetona (9:1).	CG-DCE CG-DFF CG-DNF
Organoclorados Organofosforados Carbamatos Piretroides y otros.	Frutas y vegetales.	Extracción con fluidos supercríticos con CO ₂ .	Atrapar con Hypersil ODS, y eluir con acetonitrilo.	CG/EM (trampa de iones)

Tabla 1-A. Continuación.

Analito	Muestra	Solvente de extracción	Procedimiento de limpieza	Determinación
Plaguicidas	1.- Productos con alta humedad. 2.- Productos con baja humedad. 3.- Alimentos grasos.	Acetona.	1.- Productos con alta humedad: La muestra se homogeniza con acetona y se filtra. El filtrado se filtra a través de una columna de Sep-Pak C ₁₈ y se eluye la muestra con 30 % agua en acetona. 2.- Productos con baja humedad: La muestra se homogeniza con agua, se muele con acetona a alta velocidad y se filtra. El filtrado se filtra a través de una columna de Sep-Pak C ₁₈ y se eluye la muestra con 30 % agua en acetona. 3.- Alimentos grasos: Se adiciona a la muestra oxalato de potasio y celita, se muele a mano hasta obtener un polvo fino, se transfiere a una columna de pre-partición unida a una columna Sep-Pak C ₁₈ , y se eluye con 20 % de agua en acetona. El eluato se extrae con acetona-CH ₂ Cl ₂ (50:100). La fase orgánica es secada con Na ₂ SO ₄ anhidro, concentrado y disuelto con acetona-éter de petróleo (5:10). La solución es filtrada a través de una columna Accell Plus QMA-Sep-Pak NH ₂ y se filtra a través de acetona-éter de petróleo (1:2). Se combinan los eluatos y se concentran y disuelven en acetona.	CG/EM (trampa de iones, IQ) CLAE
Plaguicidas	Frutas y vegetales.	1.- Acetona-agua (2:1). 2.- (i) Acetato de etilo (ii) Hexano-acetona (8:2)	Adicionar salmuera al filtrado y extraer con las siguientes soluciones: 1. Acetato de etilo. 2. Ter-butyl metiléter. 3. Dietiléter. 4. Éter de petróleo. 5. Ciclohexano-acetato de etilo (1:1). 6. Ciclohexano La fase orgánica se seca con Na ₂ SO ₄ , se concentra y disuelve con ciclohexano-acetato de etilo (1:1). La solución es limpiada por CPG, con el mismo solvente. Se toma una alícuota que se concentra y disuelve con acetato de etilo, y se determina por CG. El siguiente procedimiento es igual al mencionado anteriormente.	CG-DCE CG-DNF

Motohashi Noboru et al. 1996. Review Official multiresidue methods of pesticide analysis in vegetables, fruits and soil. Journal of Chromatography A Vol 745 pp 333-346.

CG-KCI Cromatografía de Gases-Detector Termoiónico.

CG-DCE: Cromatografía de Gases-Detector de Captura de Electrones.

CG-DFF: Cromatografía de Gases-Detector Fotométrico de Flama.

CG-DNF: Cromatografía de Gases-Detector Nitrógeno Fósforo.

CG-EM: Cromatografía de Gases-Espectrometría de masas.

CG-DCEL: Cromatografía de Gases-Detector de Conductividad Electrolítica.

CG-DIF: Cromatografía de Gases-Detector de Ionización de Flama

CLAE: Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia.

CCFAE: Cromatografía en Capa Fina de Alta Eficiencia.

IQ: Ionización Química.

CPG: Cromatografía de Permeación en Gel.



Tabla 2-A. Cultivos en las que se puede emplear el método multiresiduo CDFA.

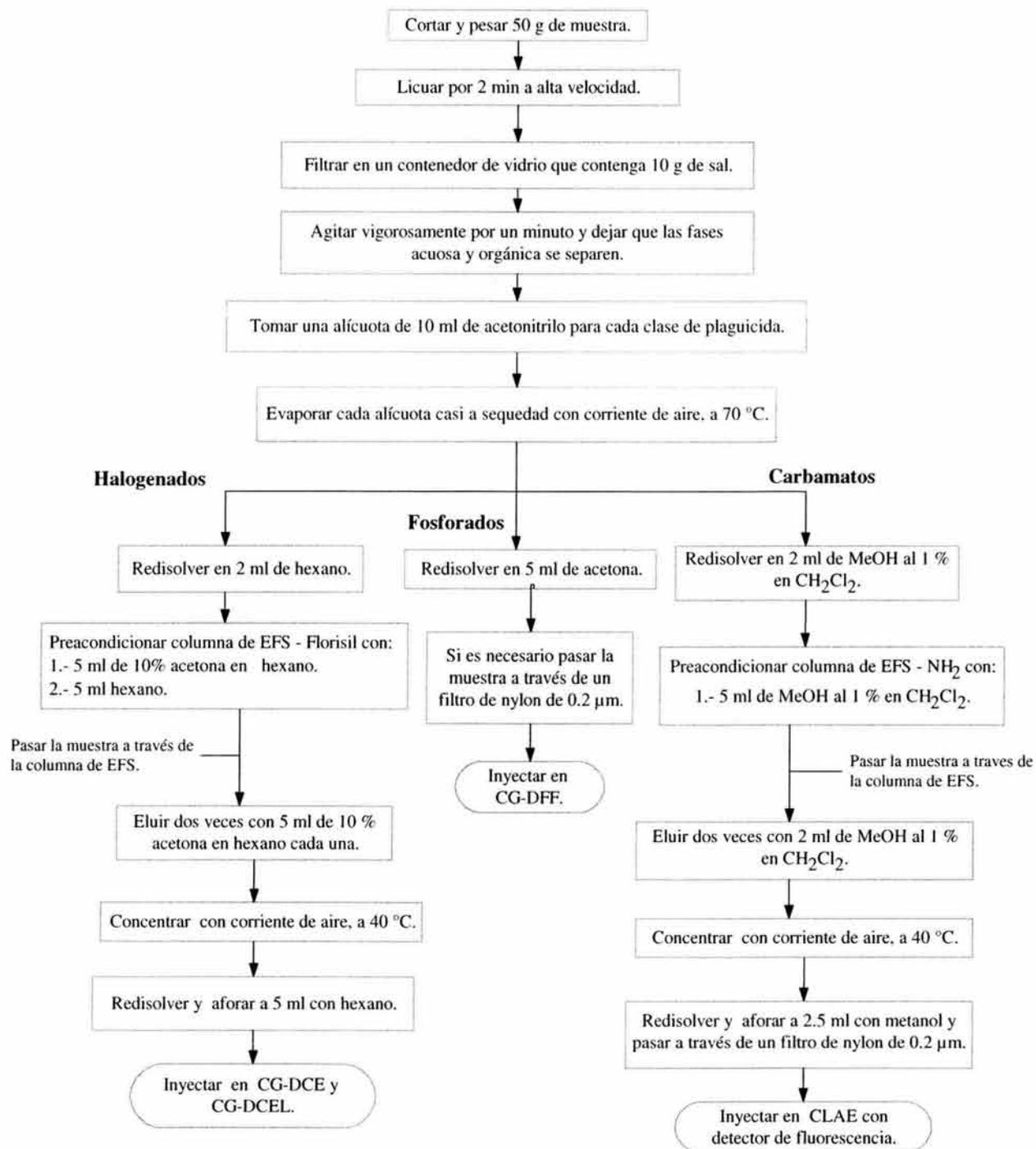
Número del grupo de cosecha.	Nombre.
1	Raíces y tubérculos.
2	Hojas de raíces y tubérculos.
3	Bulbos.
4	Vegetales frondosos (excepto el género <i>Brassica</i>).
5	Vegetales frondosos del género <i>Brassica</i> .
6	Legumbres.
7	Follaje de legumbres.
8	Frutas.
9	Cucurbitáceas.
10	Cítricos.
11	Pomelos
12	Drupas.
13	Bayas.
14	Nueces.
15	Cereales.
16	Forraje, pastura y paja de cereales.
17	Forraje de pasto, pastura y heno.
18	Alimentos no grasos para animales.
19	Hierbas y especias.

Tabla 3-A. Plaguicidas determinados por el método multiresiduo CDFA.

Organofosforados.		Organohalogenados.		Carbamatos.
α -Mevinfos	Fensulfotion	Alaclor	Lindano	Aldicarb
β -Mevinfos	Fention	Aldrin	Metaloclor	Aldicarb sulfona
Acefato	Fonofos	Aletrin	Metoxicloro	Albicarb sulfóxido
Azinfos etil	Forato	Anilazina	Metribuzin	Bendiocarb
Azinfos metil	Fosalone	Atrazina	Nitrofen	BPMC
Bensulide	Fosfamidon	Benefin	o,p-DDD	Bufencarb
Bromofos	Fosmet	Bifenox	o,p-DDE	Carbarilo
Carbofenotión	Isofenfos	Bifentrin	o,p-DDT	Carbofurano
Clorfenvinfos	Leptofos	Captafol	o,p-Dicofol	3-OH Carbofurano
Clorpirifos	Malaaxon	Captan	Oxadiazinon	3-ona Carbofurano
Clorpirifos metil	Malatión	Carbofenotion	Oxifluorfen	Isoprocab
Compound	Merfos	Ciflutrin	p,p-DDD	Metiocarb
Crotoxfos	Metamidofos	Cipermetrina	p,p-DDE	Metiocarb sulfóxido
Crufomato	Monocrotofos	Cis-Permetrina	p,p-DDT	Metomilo
Cumafos	Metidatión	Clorbenzilato	p,p-Dicofol	1-Naftal
Demeton	Ometoato	Cloroneb	Pendimetalin	Oxamil
Dialifor	Oxidemeton metil	Clorotalonil	Pentacloroanilina	Promecarb
Disulfoton	Paratión	Clorprofam	Pentaclorobenceno	Propoxur
EPN	Paratión metílico	Clortal dimetil	Pentacloronitrobenceno	
Dioxatión	Pirimifos metil	Diclobenil	Piretrinas	
Diazinon	Profenofos	Diclona	Profluralin	
Diazoxon	Propetamfos	Dicloran	Pronamida	
Diclorvos	Ronnel	Dieldrin	Propanil	
Dicrotofos	Tetraclorvinfos	Endosulfan I	Sulfato	
Dimetoato	Tionazin	Endosulfan II	Terbacil	
Etion	Triazifos	Endosulfansulfato	Tetradifon	
Etoprop	Tributilfosfato	Endrin	Tetrametrina	
Fenamifos	S,S,S-Tributilfosforotrition	Esfenvalerato	Tiobencarb	
Fenclorfos	Sulprofos	Etalfluralin	tran-Permetrina	
Fenitrotion	Temefos	Etilan	Triadimefon	
	Terbufos	Fenarimol	Trifluralin	
		Fenvalerato	Vinclozolin	
		Folfet	α -BHC	
		Heptacloro	β -BHC	
		Heptacloro epóxido	δ -BHC	
		Iprodiona	ϵ -BHC	

A continuación se muestra el diagrama de trabajo correspondiente a la preparación de la muestra del método multiresiduo CDFA y las condiciones instrumentales.

Figura No A-1. Método Multiresiduo CDFa.



EFS: Extracción en Fase Sólida.
 DFF: Detector Fotométrico de Flama.
 DCE: Detector de Captura de Electrones.
 DCEL: Detector de Conductividad Electrolytica.
 CLAE: Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia.

Condiciones instrumentales del método multiresiduo CDFA.*Para plaguicidas organofosforados:*

Instrumento: CG-DFF

Columnas:

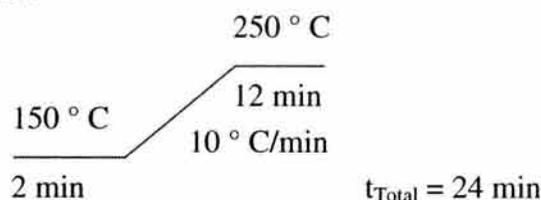
DB-1 (dimetil polisiloxano), de 30 m de longitud x 0.53 mm de diámetro interno x 1.5 μm de espesor de fase estacionaria.DB-17 (50 % fenilmetil polisiloxano), de 30 m de longitud x 0.53 mm de diámetro interno x 1.0 μm de espesor de fase estacionaria.

Temperatura del inyector: 220 ° C.

Temperatura del detector: 250 ° C.

Volumen de inyección: 1 μl .

Rampa de temperatura:

*Para plaguicidas organoclorados:*

Instrumento: CG-DCE

Columnas:

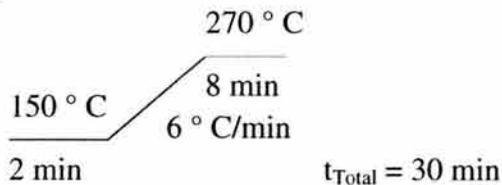
DB-1 (dimetil polisiloxano), de 30 m de longitud x 0.25 mm de diámetro interno x 0.25 μm de espesor de fase estacionaria.DB-17 (50 % fenilmetil polisiloxano), de 30 m de longitud x 0.25 mm de diámetro interno x 0.25 μm de espesor de fase estacionaria.

Temperatura del inyector: 220 ° C.

Temperatura del detector: 320 ° C.

Volumen de inyección: 1 μl .

Rampa de temperatura:



Instrumento: CG-DCEL

Columnas:

DB-1(dimetil polisiloxano), de 30 m de longitud x 0.53 mm de diámetro interno x 1.0 μm de espesor de fase estacionaria.

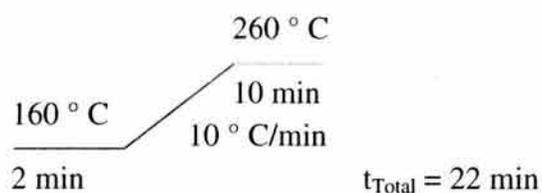
DB-17 (50 % fenilmetil polisiloxano), de 30 m de longitud x 0.53 mm de diámetro interno x 1.5 μm de espesor de fase estacionaria.

Temperatura del inyector: 220 ° C.

Temperatura del detector: 250 ° C.

Volumen de inyección: 2 μl .

Rampa de temperatura:



Para carbamatos.

Instrumento: CLAE con detector de fluorescencia.

Detector: longitud de onda de excitación, 330 nm.

Longitud de onda de emisión, 465 nm.

Columna: C18, tamaño de partícula 5 μm .

Flujo: 1.0 ml/min.

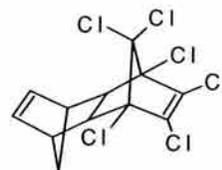
Volumen de inyección: 20 μl .

Gradiente de elución:

Inicial:	80:20	agua:acetonitrilo. (2 min)
Al minuto 16.	10:90	agua:acetonitrilo. (2 min)
Al minuto 18.1.	80:20	agua:acetonitrilo.
Tiempo total: 21.0 min.		

Apéndice B. Datos de los plaguicidas analizados*.

Aldrin.



No CAS: 309-00-2 $C_{12}H_8Cl_6$ P.M. 364.91g/mol

Sinónimos: 1,2,3,4,10,10-Hexacloro-1-4,4a,5,8,8a-hexahidro-1,4:5,8-dimetanonaftaleno; HHDN; octaleno; compuesto 118.

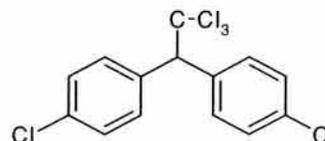
Propiedades: Cristales, p. f. 104 ° C; p. vap. $7.5 \cdot 10^{-5}$ mm Hg (20 ° C). Prácticamente insoluble en agua. Estable en presencia de álcalis orgánicos e inorgánicos, estable a la acción de cloruros metálicos hidratados. Se epoxidiza a dieldrin en organismos vivientes.

Usos: insecticida.

Toxicidad: DL₅₀ oral en ratas: 39 mg/Kg.

IDA para el hombre: 0.0001 mg (aldrin + dieldrin)/kg.

p,p'-DDT.



No CAS: 6088-51-3 $C_{14}H_9Cl_5$ P.M. 354.49 g/mol

Sinónimos: 1,1'-(2,2,2-Tricloroetil)-bis[4-clorobenceno]; diclorodifeniltricloroetano; clorofenotano; clofenotanodicofano; pentaclorin; Agritan; Gesapon; Neocid.

Propiedades: Cristales, p. f. 108.5-109 ° C; p. vap. $1.5 \cdot 10^{-5}$ mm Hg (20 ° C). Prácticamente insoluble en agua. Solubilidad en g/100 ml de solvente a 25 °C: acetona 58, benceno 78, benzil benzoato 42, tetracloruro de carbono 45, colobenceno 74, ciclohexanona 116, xileno 18.3. Se convierte en DDE por catálisis con Fe (III) y cloruros de aluminio. Puede sufrir dehidrocloración a temperaturas mayores a 50 °C.

Usos: insecticida.

* - The Merck Index. Thirteenth Edition. 2001 USA

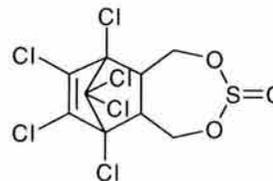
- Worthing and Walker. 1987. The pesticide manual. A world compendium. Published by the British Crop Protection Council. 8th Edition. Great Britain.

- Patnaik Pradyot. 1999. A comprehensive guide to the hazardous properties of chemical substances WILEY 2nd Edition. USA.

Toxicidad: DL₅₀ oral en ratas: 113 mg/Kg.

IDA para el hombre: 0.02 mg/kg.

Endosulfan.



No CAS: 115-29-7 C₉H₆Cl₆O₃S P.M. 406.93 g/mol

Sinónimos: 6,7,8,9,10,10-Hexacloro 1,5,5a,6,9,9^a-hexahidro-6,9-metano-2,4,3-benzodioxatiopin-3-oxido; sulfito cíclico del 1,4,5,6,7,7-hexacloro-5-norborneno-2,3-dimetanol; Clortiopin; Malix; Thiodan; Thionex.

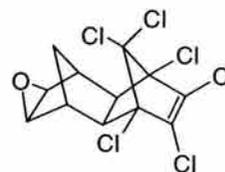
Propiedades: producto técnico, cristales cafés con p. f. 70-100 ° C (p. f. 106 ° C para el compuesto puro). Prácticamente insoluble en agua. Soluble en la mayoría de solventes orgánicos. Estable en ácidos minerales diluidos, hidrolizado rápidamente por álcalis en diol y oxido se sulfuro. El producto comercial es una mezcla de α-isómero (endosulfan I 64 – 67 %), p. f. 108-110 ° C y β-isómero (endosulfan II 29 – 32 %), p. f. 208-210 ° C.

Usos: insecticida.

Toxicidad: DL₅₀ oral en ratas: 43 mg/Kg.

IDA para el hombre: 0.008 mg /kg.

Endrin.



No CAS: 72-20-8 C₁₂H₈Cl₆O P.M. 380.91 g/mol

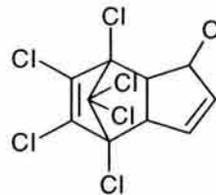
Sinónimos: (1α,2β,2αβ,3α,6α,6αβ,7β,7αβ)-3,4,5,6,9,9-Hexacloro-1a,2,2a,3,6,6a,7,7a-octahidro-2,7:3,6-dimetanonaft[2,3-b]oxirano; mendrin; nendrin; hexadrin; ENT-17251.

Propiedades: cristales, se descompone a 245 °C. p vap. a 25 °C: 2*10⁻⁷ mm Hg. Solubilidad en g/100 ml de solvente a 25 °C: acetona 17, benceno 13.18, tetracloruro de carbono 3.3, hexano 7.1, xileno 18.3.

Usos: insecticida.

Toxicidad: DL₅₀ oral en ratas: 7.5 mg/Kg.

IDA para el hombre: 0.0002 mg/kg.

Heptacloro.

No CAS: 76-44-8

 $C_{10}H_5Cl_7$

P.M. 373.32 g/mol

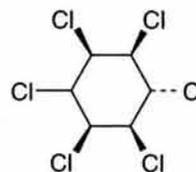
Sinónimos: 1H,1,4,5,6,7,8,8-Heptacloro-3a,4,7,7-tetrahidro-4,7-metanoindeno; E-3314; Velsicol 104; Drinox; Heptamul.

Propiedades: cristales, p.f. 95-96 °C. p vap. a 25 °C: $3 \cdot 10^{-4}$ mm Hg. Solubilidad en g/100 ml de solvente a 27 °C: acetona 75, benceno 106, tetracloruro de carbono 112, ciclohexanona 119, alcohol 4.5, xileno 102. Susceptible a epoxidación.

Usos: insecticida.

Toxicidad: DL_{50} oral en ratas: 100 mg/Kg.

IDA para el hombre: 0.0005 mg/kg.

Lindano.

No CAS: 58-89-9

 $C_6H_6Cl_6$

P.M. 290.83 g/mol

Sinónimos: (1 α ,2 α ,3 β ,4 α ,5 α ,6 β)-1,2,3,4,5,6-Hexaclorociclohexano; γ -HCH; γ -hexaclorobenceno; γ -BHC; ENT-7796; Jacutin; Lintox; Lerexano.

Propiedades: cristales, p.f. 112.5 °C. p vap. a 20 °C: $9.4 \cdot 10^{-6}$ mm Hg. n_D^{20} 1.644. Solubilidad en g/100 ml de solvente a 20 °C: acetona 43.5, benceno 28.9, tetracloruro de carbono 24, éter 20.8, etanol 6.4. Insoluble en agua. Es dehidroclorinado por álcalis. En solución se pierde el 50 % en 11 h a pH 9.

Usos: insecticida.

Toxicidad: DL_{50} oral en ratas: 88 mg/Kg.

IDA para el hombre: 0.01 mg/kg.

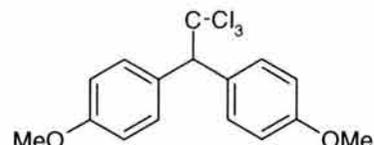
n_D^{20} Índice de refracción a 20 °C.

Metoxicloro.

No CAS: 72-43-5

 $C_{16}H_{15}Cl_3O_2$

P.M. 345.65 g/mol



Sinónimos: 1,1'-(2,2,2-Tricloroetil)bis[4-metoxibenceno]; DMDT; metoxi-DDT; Marlato.

Propiedades: cristales dimórficos, p.f. 78-78.2° o 86-88 °C. Prácticamente insoluble en agua. Soluble en alcohol. Sus solubilidades son aproximadamente iguales a la s de DDT.

Usos: insecticida.

Toxicidad: DL₅₀ oral en ratas: 5.0 g/Kg.

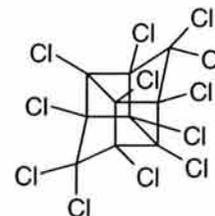
IDA para el hombre: 0.1 mg/kg.

Mirex.

No CAS: 2385-85-5

 $C_{10}Cl_{12}$

P.M. 545.55 g/mol

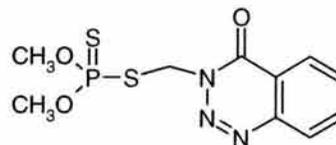


Sinónimos: 1,1a,2,2,3,3a,4,5,5a,5b,6-Dodecachlorooctahidro-1,3,4-meteno-1H-ciclobuta[cd]-pentaleno; Hexacloropentadieno, CG-1283, ENT-025719, Declorano.

Propiedades: cristales blancos inodoros. Prácticamente insoluble en agua. Solubilidad a temperatura ambiente: dioxano 15.3%, xileno 14.3 %, benceno 12.2 %, tetracloruro de carbono 7.2 %, etilmetilcetona 5.6 %. Prácticamente no corrosivo a metales. Se descompone a 485 °C.

Usos: insecticida, retarda el fuego en plásticos y papel.

Toxicidad: DL₅₀ oral en ratas: 600 mg/Kg.DL₅₀ cutánea en ratas: > 2000 mg/kg

Azinfos metil

No CAS: 86-50-0 $C_{10}H_{12}N_3O_3PS_2$ P.M. 317.33 g/mol

Sinónimos: Ácido O,O-dimetil S-[(4-oxo-1,2,3-benzotriazin-3(4H)-il)metil]ester fosforoditioico; Bayer 17147; ENT-23233; R-1582; Cotnion-metil; Gusathion M; Guthion.

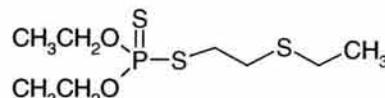
Propiedades: cristales; p. f. 73 - 74 ° C; d_4^{20} 1.44; n_D^{76} 1.6115. Solubilidad en agua a 25 ° C: 33 mg/l. Soluble en metanol, etanol, propilen glicol, xileno, otros disolventes orgánicos. Sus soluciones en metanol, y propilen glicol son estables hasta por 3 semanas. Inestable a temperaturas > 200 °C. Es hidrolizado por ácidos y bases.

Usos: insecticida, acaricida.

Toxicidad: DL₅₀ oral en ratas: 11 mg/Kg.

DL₅₀ dérmica en ratas: 220 mg/Kg.

IDA para el hombre: 0.0025 mg/kg.

Disulfotón.

No CAS: 298-04-4 $C_8H_{19}O_2PS_3$ P.M. 274.41 g/mol

Sinónimos: Ácido O,O-dietil S-[2-(etilthio)etil]ester fosforoditioico; tiodemeton, ditiodemeton; Bayer19639; ENT-23347; Disyston.

Propiedades: aceite incoloro, p. eb. a 0.01 mm Hg : 132 – 133 °C. d_4^{20} 1.144; n_D^{20} 1.5348. p. vap. $1.8 \cdot 10^{-4}$ mm Hg (20 ° C). Insoluble en agua. Es metabolizado por plantas y animales a sulfóxido, sulfona, análogo oxigenado y 2-etiltioetil mercaptano.

Usos: insecticida.

Toxicidad: DL₅₀ oral en ratas: 2.63 mg/Kg.

DL₅₀ dérmica en ratas: 6 mg/Kg.

IDA para el hombre: 0.002 mg/kg.

d_4^{20} Gravedad específica a 20 °C.

Malatión.

No CAS: 121-75-5

 $C_{10}H_{19}O_6PS_2$ P. M. 330.36 g/mol

Sinónimos: dietil (dimetoxifosfinotioiltio)succinato, maldison, malaton, mercaptotion, carbofos.

Propiedades: El malatión técnico (95.5 % de pureza) es un líquido ámbar claro; p. f. 2.85 °C; p. eb. 156 – 157 °C a 0.7 mm Hg; p. vap. 5.3 mPa (30 °C); d_4^{25} 1.23; n_D^{25} 1.4985. Solubilidad a temperatura ambiente: 145 mg/l agua, miscible en la mayoría de disolventes orgánicos incluyendo alcoholes, ésteres, cetonas, éteres y aceites vegetales. Se hidroliza a pH > 7.0 o < 5.0. Estable en buffer acuoso a pH 5.26.

Se metaboliza por hidrólisis de los ésteres carboxílico y fosforoditioato y/o por oxidación del fosforoditioato a fosforotioato (malaoxon).

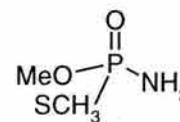
Usos: insecticida y acaricida.

Toxicidad: DL₅₀ oral para ratas: 1000mg/Kg.DL₅₀ (24 h) cutánea en conejo: 4100 mg/Kg.Toxicidad tópica en abejas: DL₅₀ 710 ng/abeja.

IDA para el hombre: 0.02 mg/Kg.

Metamidofos.

No CAS: 10265-92-6

 $C_2H_8NO_2PS$ P.M. 141.13 g/mol

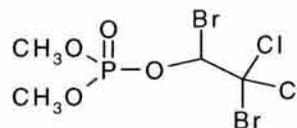
Sinónimos: Éster del ácido O,S-dimetil fosforamidotioico; Bayer 71628; ETN-27396; SRA-5172; Monitor; Tamaron.

Propiedades: Cristales, p.f. 54 °C. n_D^{40} 1.5092. Densidad a 44.5 °C: 1.31.; p. vap. $3 \cdot 10^{-4}$ mm Hg (30 °C).

Soluble en agua y etanol.

Usos: insecticida y acaricida.

Toxicidad: DL₅₀ oral para ratas: 27 mg/Kg.

Naled.

No CAS: 300-76-5 $C_4H_7Br_2Cl_2O_4P$ P.M. 380.78 g/mol

Sinónimos: Éster del ácido 1,2-dibromo-2,2,-dicloroetilfosfórico; bromclofos; ENT-24988;OMS-75; RE-4355; Bromex; Dibrom; orto-dibrom.

Propiedades: Líquido de olor pungente, p.eb. 110 °C a 0.5 mm de Hg, d_4^{25} 1.96. Puede ser cristalizado, p.f. 26.5 – 27.5 °C, p.vap. aproximada $2 \cdot 10^{-3}$ mm Hg a 20 °C. Prácticamente insoluble en agua. Se hidroliza por completo en agua en 48 h. Soluble en hidrocarburos aromáticos y clorados, cetonas y alcoholes. Los metales o agentes reductores lo descomponen en diclorvos.

Usos: insecticida y acaricida.

Toxicidad: DL_{50} oral en ratas: 250 mg/Kg.

DL_{50} cutánea en ratas: 800 mg/Kg.

Ometoato.

No CAS: 1113-02-6 $C_5H_{12}NO_4PS$ P. M. 213.2

Sinónimos: Dimetoato análogo oxigenado; O,O-Dimetil S-metilcarbamoilmetil fosforotioato.

Propiedades: Aceite de color amarillo a incoloro, se descompone a 135 °C; p. vap. 3.3 mPa a 20 °C; d_4^{25} 1.32; n_D^{25} 1.4987. Miscible en agua, acetona, etanol. Se hidroliza a 24 °C, el 50 % de su descomposición ocurre en 2.5 días a pH 7.

Usos: Insecticida y acaricida.

Toxicidad: DL_{50} oral en ratas:50 mg/Kg.

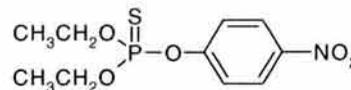
DL_{50} (7 días) cutánea en ratas: 700 mg/Kg.

Toxicidad tóxica en abejas: DL_{50} ng/abeja.

IDA para el hombre: 0.0003mg/K

Paratión.

No CAS: 56-38-2

 $C_{10}H_{14}NO_5PS$ P.M. 291.26 g/mol

Sinónimos: Éster del ácido O,O-dietil O-(4-nitrofenil)fosforotioico; dietil-p-nitrofenil monotiofosfato; DNTP; S.N.P; E-605; AC-3422; ENT-15108; Alkron; Folidol; Fostox E; Rhodiatox; Tiofos.

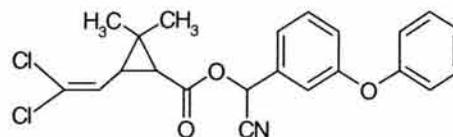
Propiedades: Líquido amarillento, p.eb. 375 °C a 760 mm Hg, p.f. 6 °C, d_4^{25} 1.26; n_D^{25} 1.5370; p.vap. a 20 °C: $3.78 \cdot 10^{-5}$ mm Hg. Viscosidad a 25 °C: 15.30 cp. Soluble en alcoholes, ésteres, éteres, cetonas, hidrocarburos aromáticos. Prácticamente insoluble en agua (20 ppm), éter de petróleo, queroseno. Incompatible con sustancias que tienen pH > 7.5. Se isomeriza por completo en su análogo O,S-dietilo. Es muy tóxico porque se metaboliza en su análogo oxigenado formando después dietil-4-nitrofenilfosfato.

Usos: Insecticida y acaricida.

Toxicidad: DL₅₀ oral en ratas: 13 mg/Kg.

DL₅₀ cutánea en ratas: 21 mg/Kg.

IDA para el hombre: 0.005 mg/kg.

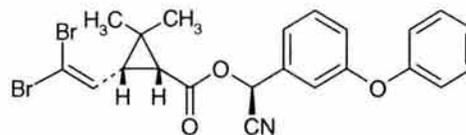
Cipermetrina.No CAS: 52315-07-8 $C_{22}H_{19}Cl_2NO_3$ P.M. 416.30 g/mol

Sinónimos: (±)-α-ciano-3-fenoxibencil-(±)-cis,-trans-3-(2,2-diclorovinil)-2,2-dimetilciclopropano carboxilato; NRDC-149; FMC-30980; PP-383; Ammo; Arribo; Baricad; Basatrin; Demon; Electron; Ripcord.

Propiedades: Potente piretróide sintético que existe como una mezcla de isómeros cis y trans, el producto comercial es una mezcla de ocho isómeros. Semi-sólido viscoso, p.f. 60 – 80 °C. Insoluble en agua. Soluble en metanol, acetona, xileno, cloruro de metileno.

Usos: Insecticida.

Toxicidad: DL₅₀ (8 días) oral en ratas: 250 mg/Kg.

Deltametrina.

No CAS: 52918-63-5 $C_{22}H_{19}Br_2NO_3$ P.M. 505.21 g/mol

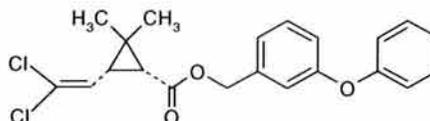
Sinónimos: (S)- α -ciano-3-fenoxibencil-(1R)-cis-3-(2,2,-dibromovinil)-2,2,-dimetilciclopropano carboxilato; decametrina; esbecitrin; FMC-45498; NRDC-161; RU-22974; Butox; Decis.

Propiedades: cristales, p.f. 98 – 101 °C. Soluble en etanol, acetona, dioxano. Insoluble en agua.

Usos: Insecticida.

Toxicidad: DL₅₀ oral en ratas: 31 mg/Kg.

IDA para el hombre: 0.02 mg/kg.

Permetrina.

No CAS: 52645-53-1 $C_{21}H_{20}Cl_2O_3$ P.M. 391.29 g/mol

Sinónimos: 3-(fenoxifenil)metil (\pm)-cis,trans-3-(2,2-dicloroetenil)-2,2-dimetilciclopropanecarboxilato; FMC-33297; NIA-33297; NRDC-143; PP-557; Corsair; Dagnet; Ectiban; Ridect.

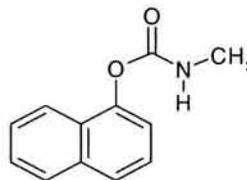
Propiedades: Piretróide sintético estable a la luz, de los cuatro isómeros posibles solo dos de ellos tienen actividad plaguicida. La mezcla técnica contiene aproximadamente 60 % trans- y 40 % cis-isómeros. Líquido viscoso amarillo, p.f. aproximado: 35 °C, p.eb. 220 °C a 0.05 mm Hg, densidad 1.190 – 1.272 a 20 °C; p.vap. a 50 °C: $< 1 \cdot 10^{-6}$ mm Hg. Solubilidad en agua: < 1 ppm, soluble o miscible en disolventes orgánicos excepto etilen glicol.

Usos: Insecticida

Toxicidad: DL₅₀ oral en ratas: 3801 mg/Kg

DL₅₀ (8 días) oral en ratas: 1500 mg/Kg

IDA para el hombre: 0.05 mg/kg.

Carbarilo.

No CAS: 63-25-2 $C_{12}H_{11}NO_2$ P.M. 201.22 g/mol

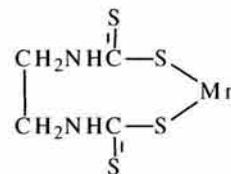
Sinónimos: 1-Naftalenol carbamato; 1-naftil N-metilcarbamato; ENT-23969; OMS-29; UC-7744; Arylam; Carylderm; Derbac; Dicarbam; Sevin.

Propiedades: Cristales, p.f 142°C, Moderadamente soluble en DMF, acetona, isoforona, ciclohexanona. Solubilidad en agua a 30 °C: 120 mg/L. Presión de vapor a 25 °C: $<4 \cdot 10^{-5}$ mm Hg. Estable al calor, luz, ácidos, hidrolizado por álcalis.

Usos: Usos: Insecticida de contacto.

Toxicidad: DL_{50} oral en ratas: 250 mg/Kg

IDA para el hombre: 0.01 mg/kg.

Maneb.

No CAS: 12427-38-2 $(C_4H_6MnN_2S_4)_x$ P. M. $(265.3)_x$ g/mol

Sinónimos: manebe; manganeso etilenbis(ditiocarbamato).

Propiedades: Sólido cristalino amarillo densidad: 1.92. Solubilidad: virtualmente insoluble en agua y solventes orgánicos comunes, se disuelve en agentes quelantes, soluble en cloroformo y piridina. Se descompone por exposición prolongada al aire y humedad y rápidamente por ácidos.

Usos: Funguicida.

Toxicidad: DL_{50} oral en ratas macho: 6750 mg (técnico)/Kg.

IDA para el hombre: 0.05 mg/Kg.

Acenafteno.

No CAS: 83-32-9

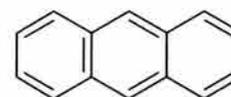
 $C_{12}H_{10}$

P.M. 154.21 g/mol

Sinónimos: 1,2-Dihidroacenaftileno; peri-etilenaftaleno; 1,8-etilenaftaleno.

Propiedades: cristales, p.f. 95 °C. Insoluble en agua. 1 g se disuelve en: 31 ml de alcohol, 56 ml de metanol, 25 ml propanol, 2.5 ml de cloroformo, 5 ml de benceno o tolueno.

Usos: intermediario en la producción de colorantes; manufactura de plásticos; insecticida; fungicida.

Antraceno.

No CAS: 120-12-7

 $C_{14}H_{10}$

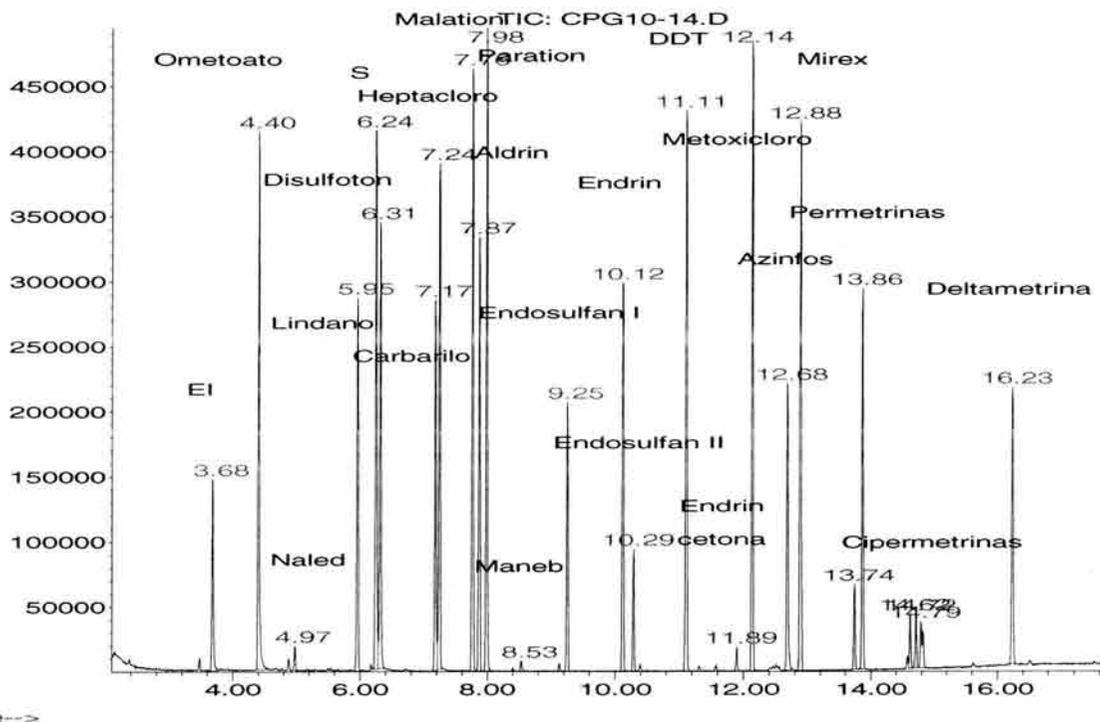
P.M. 178.23 g/mol

Propiedades: Cristales, p.f. 218 °C, p.eb. a 760 mm Hg: 342 °C. Insoluble en agua. 1 g se disuelve en: 67 ml de alcohol, 70 ml de metanol, 200 ml éter, 85 ml de cloroformo, 62 ml de benceno, 31 ml de disulfuro de carbono, 86 ml de tetracloruro de carbono, 125 ml de tolueno.

Usos: producción de colorantes y antraquinona.

Apéndice C. Separación cromatográfica.

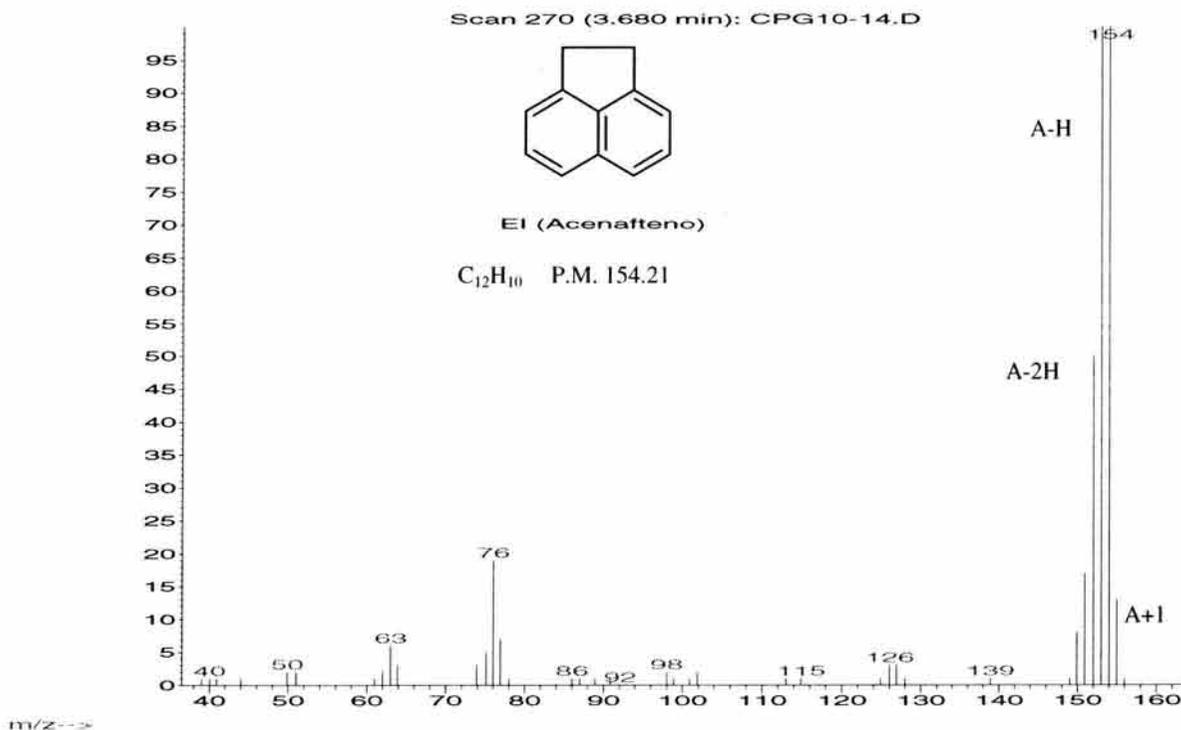
Abundance



Cromatograma No C-1. Disolución estándar de 30 ppm inyectada por SCAN

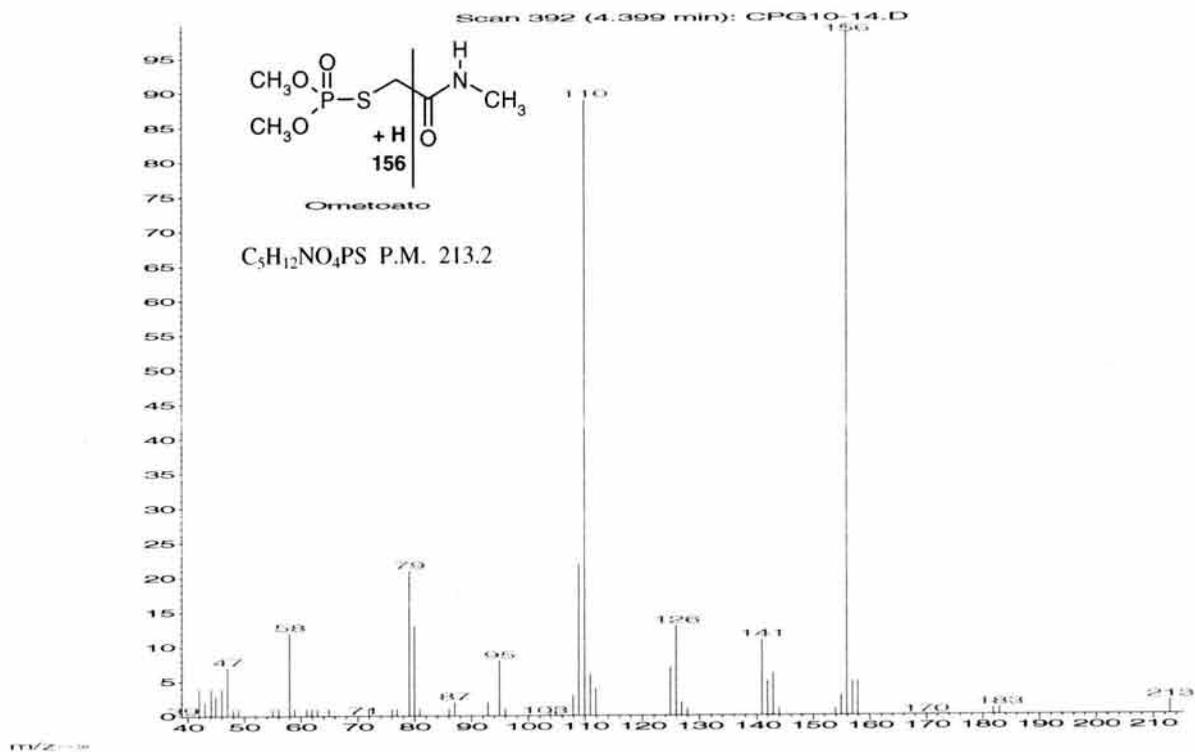
A continuación se presentan los espectros de masas del EI, S, y plaguicidas del cromatograma anterior.

Abundance



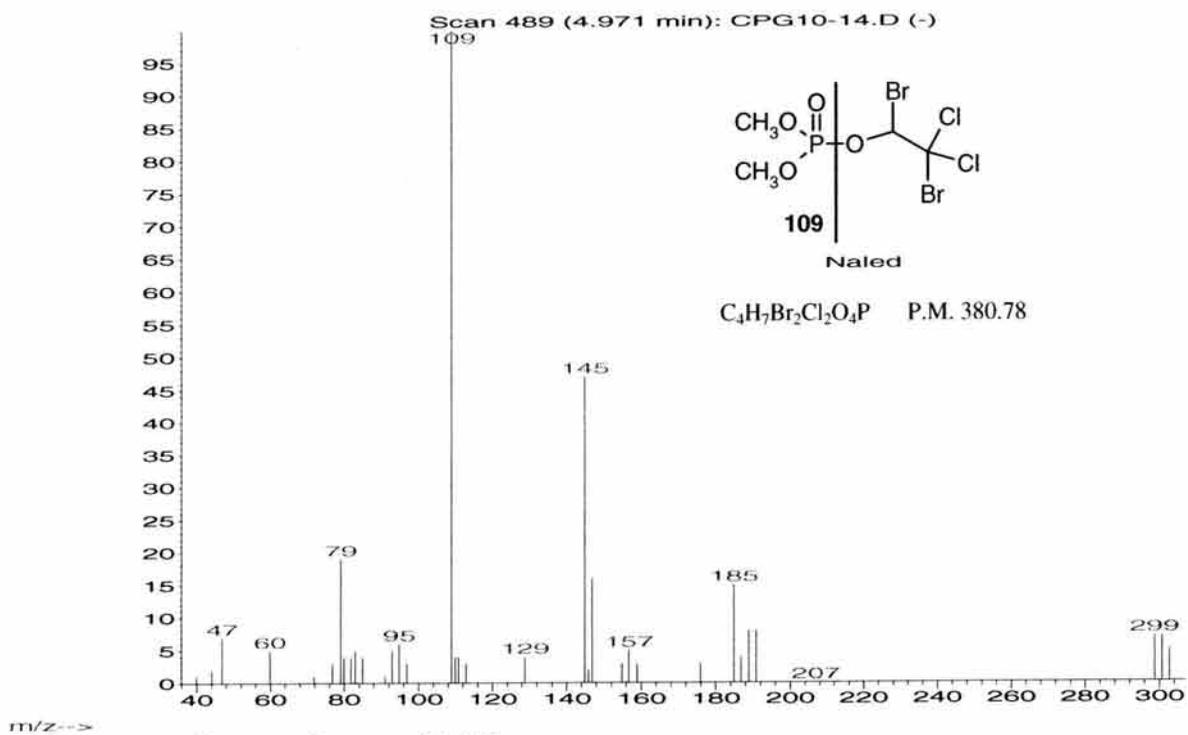
Espectro de masas No 1C.

Abundance



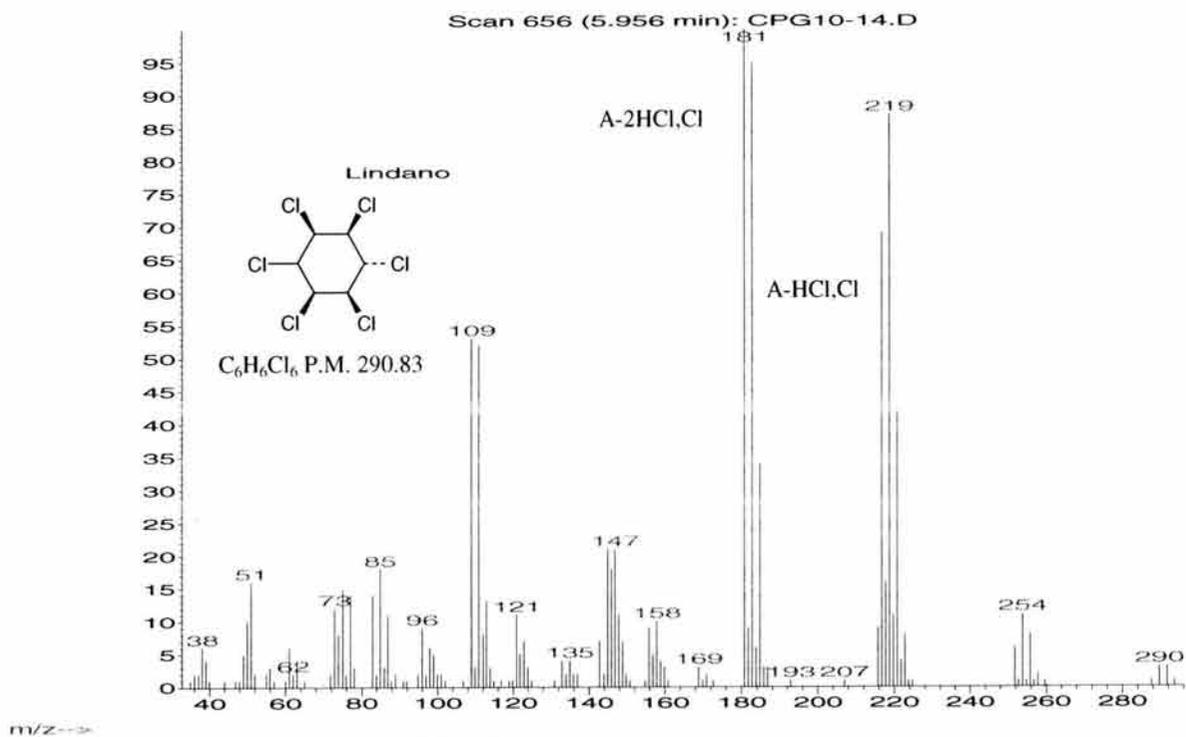
Espectro de masas No 2C.

Abundance



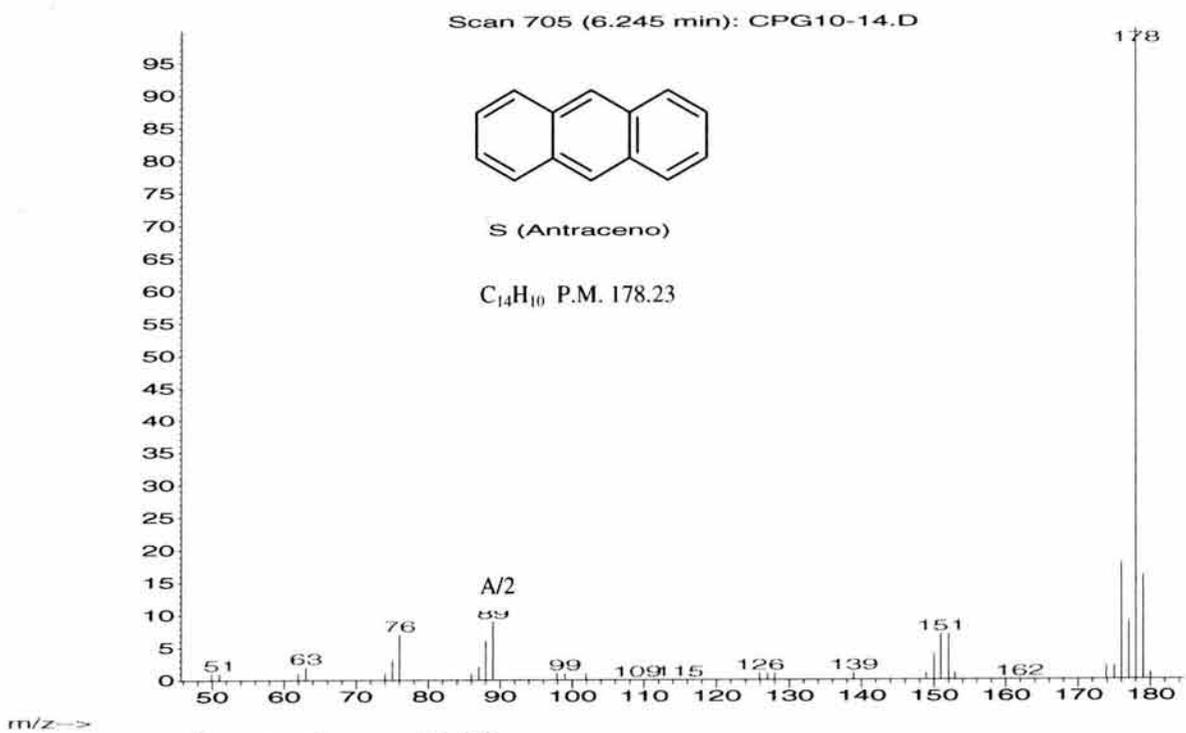
Espectro de masas No 3C.

Abundance



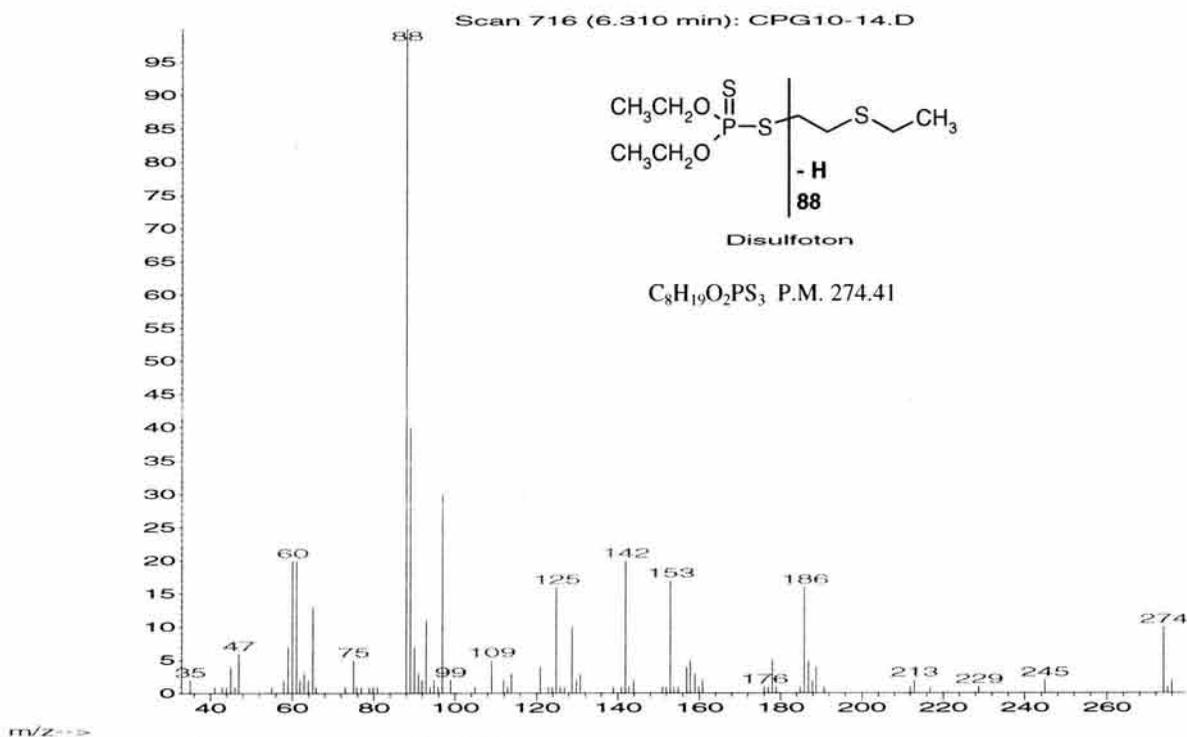
Espectro de masas No 4C.

Abundance



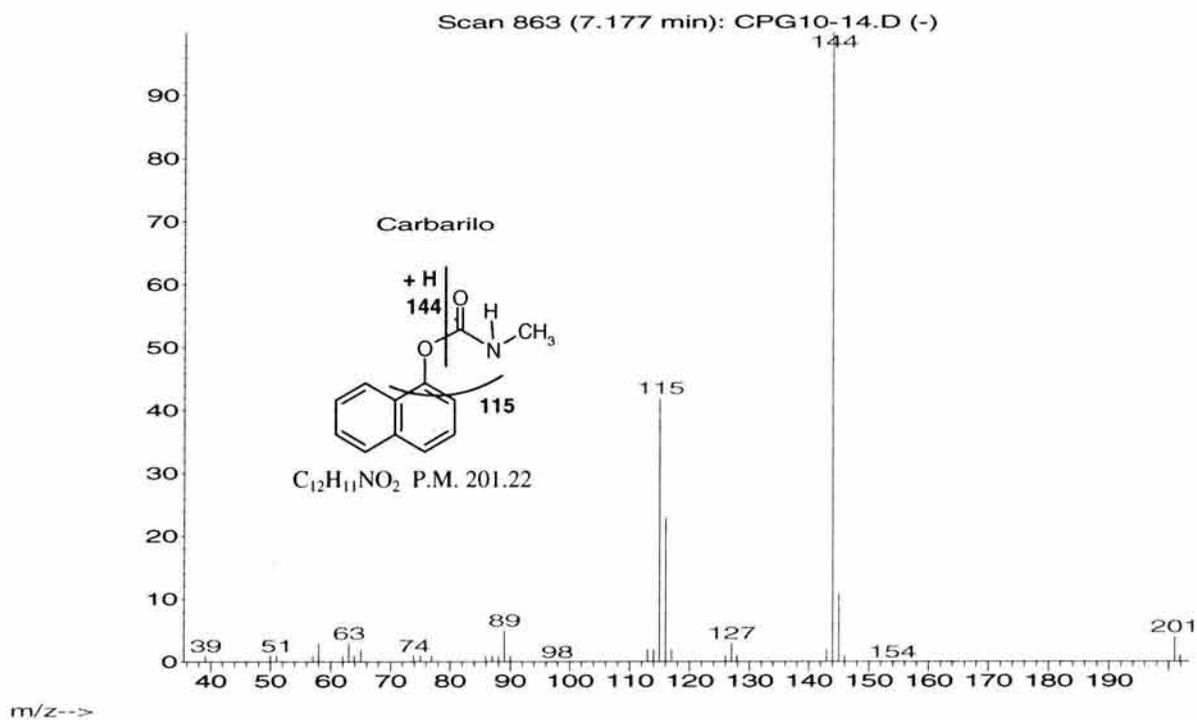
Espectro de masas No 5C.

Abundance



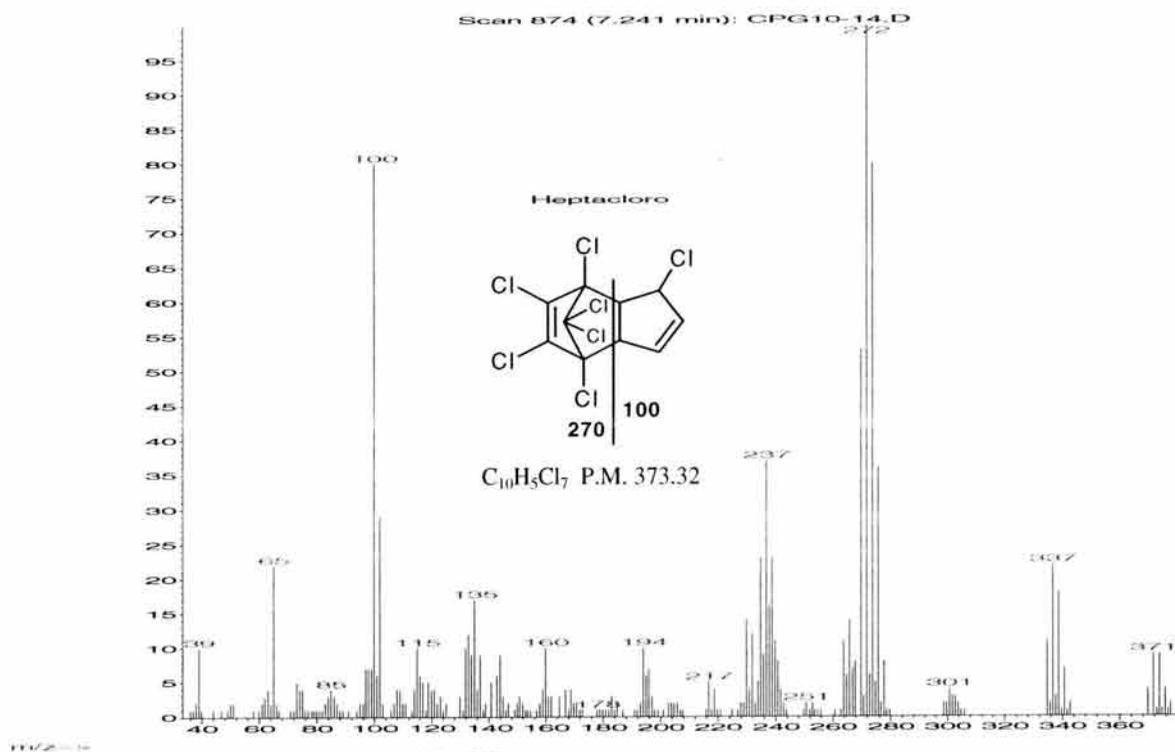
Espectro de masas No 6C.

Abundance



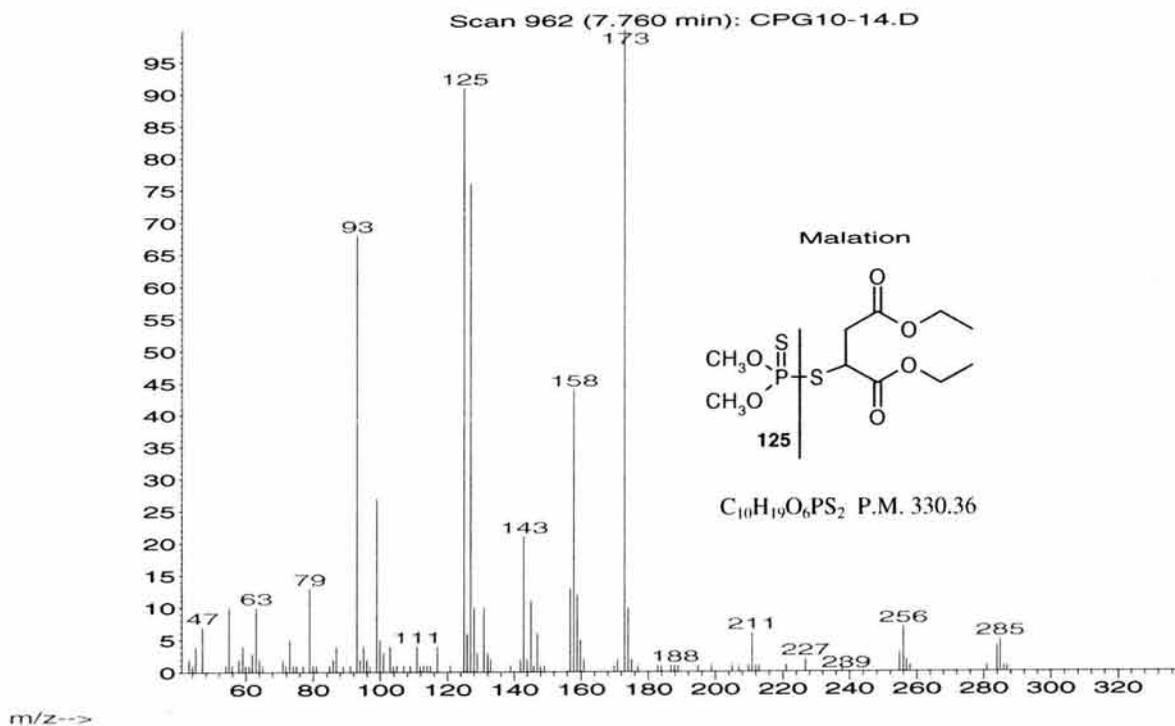
Espectro de masas No 7C.

Abundance

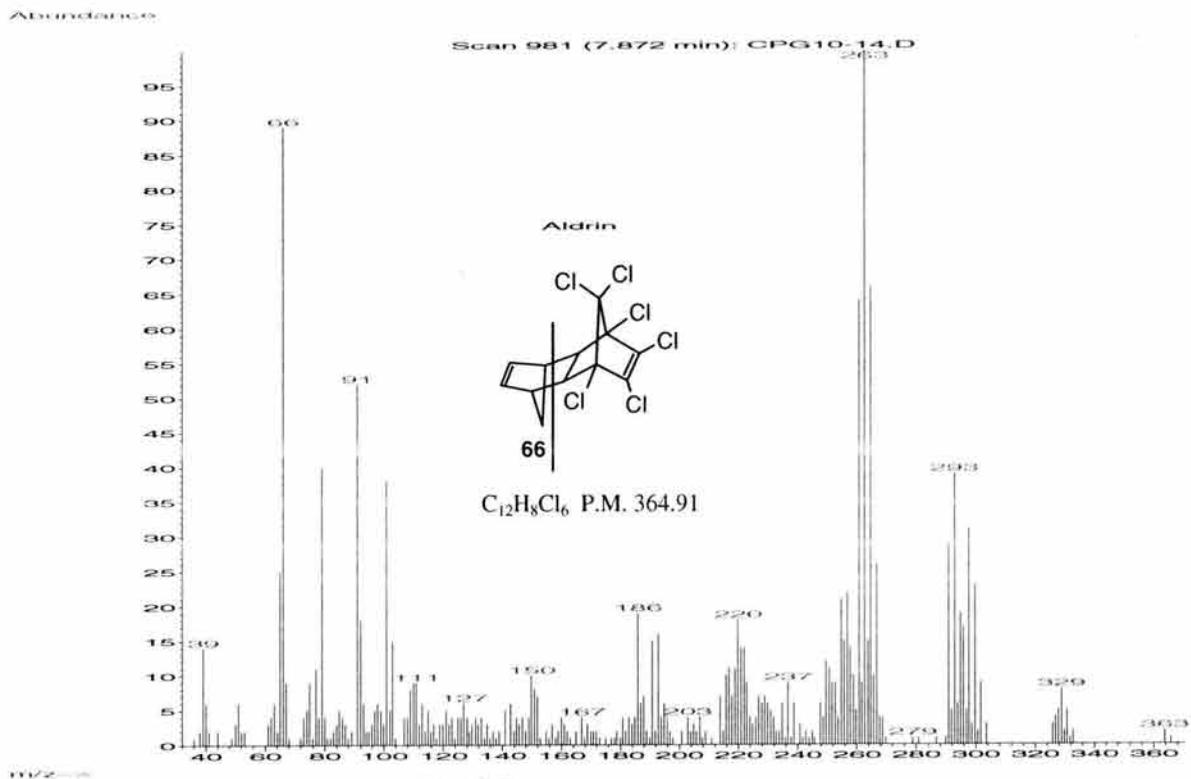


Espectro de masas No 8C.

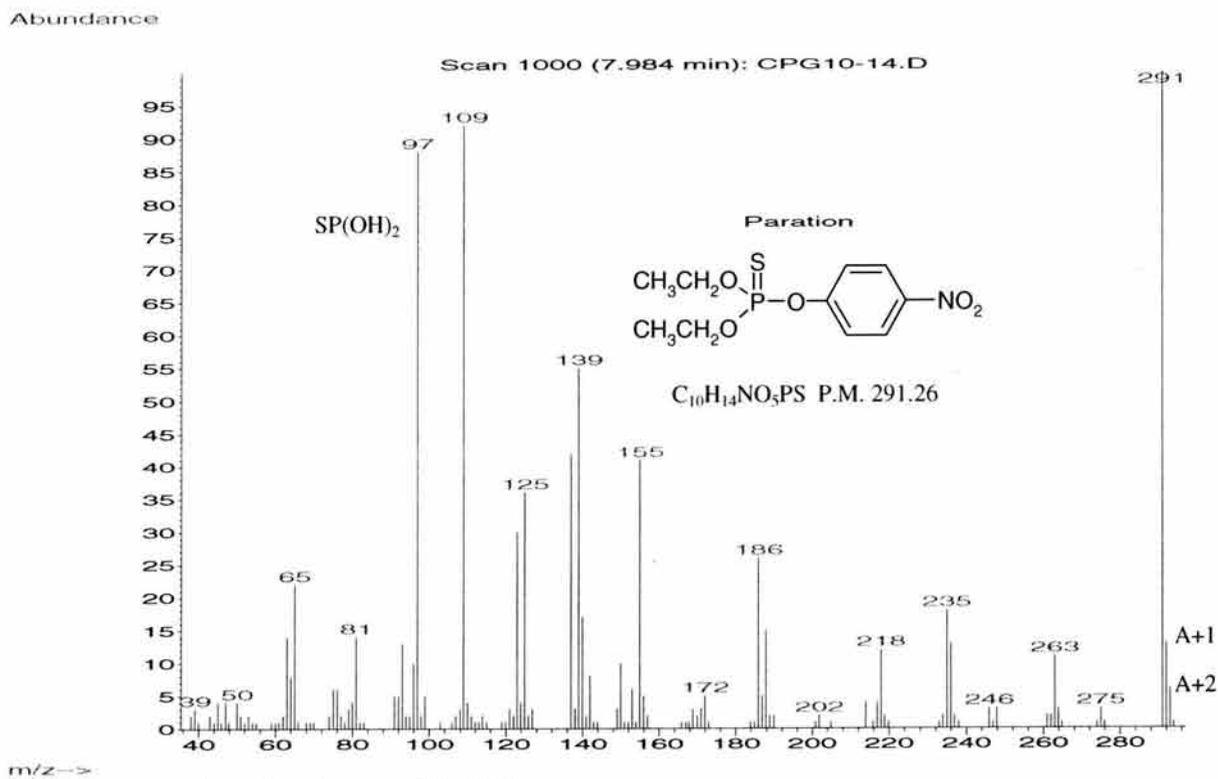
Abundance



Espectro de masas No 9C.



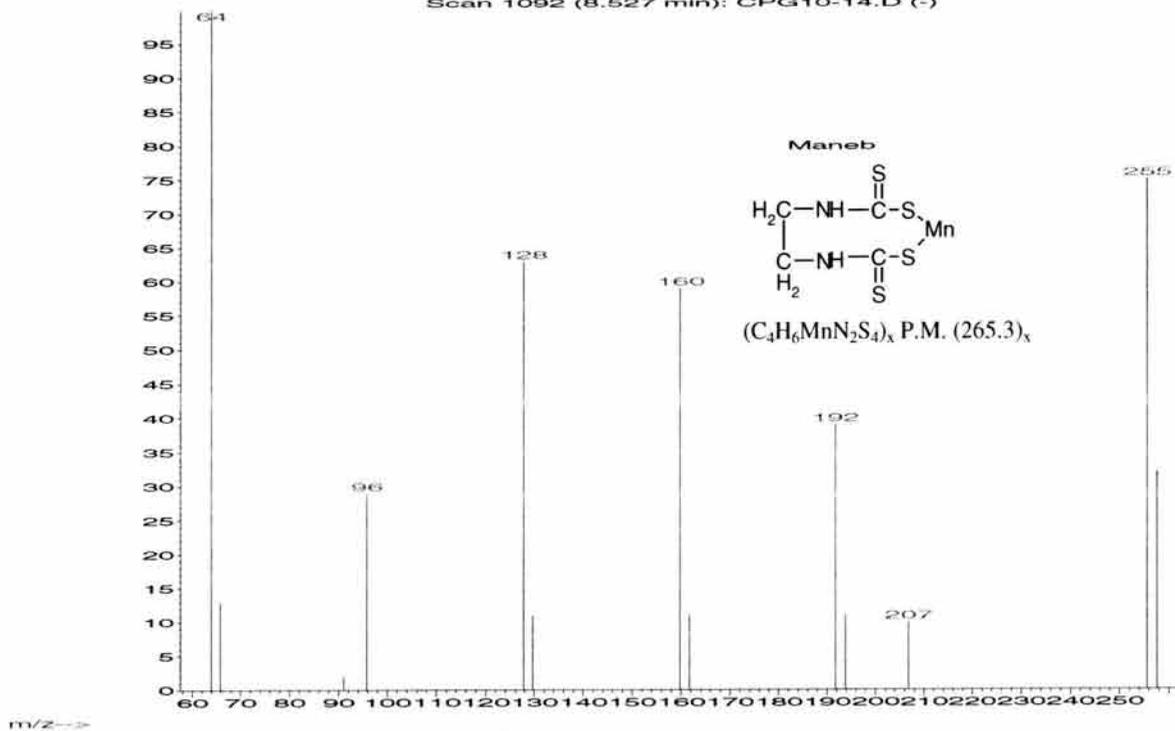
Espectro de masas No 10C.



Espectro de masas No 11C.

Abundance

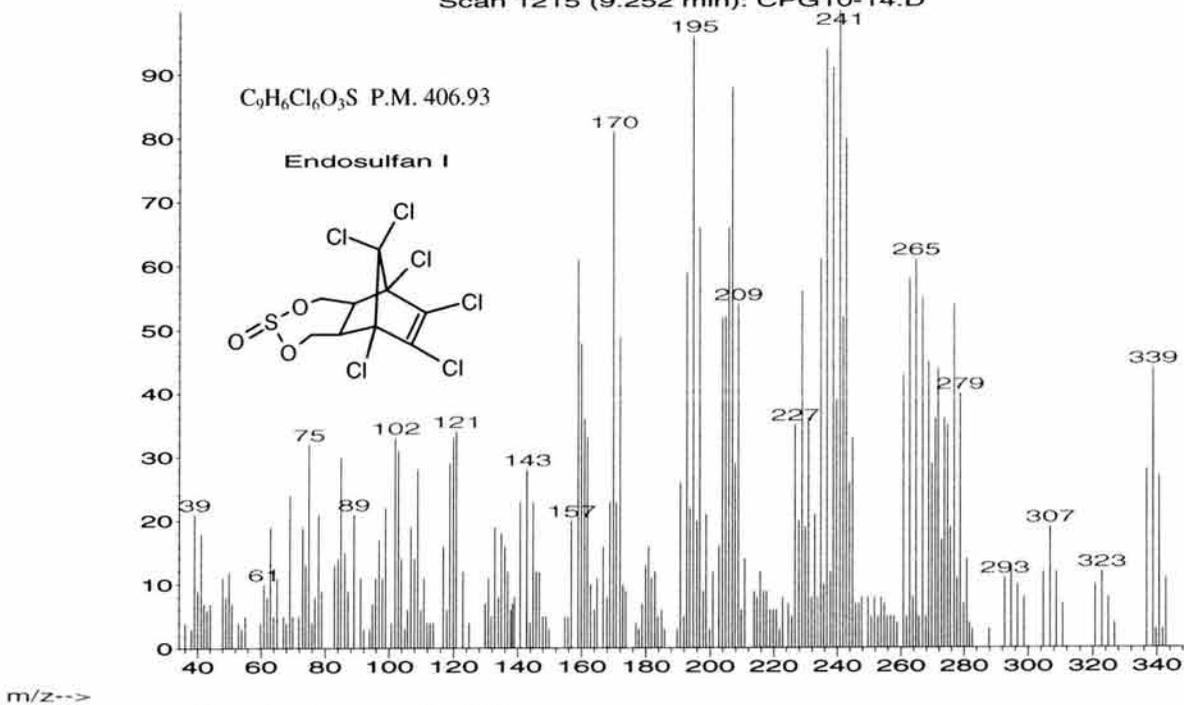
Scan 1092 (8.527 min): CPG10-14.D (-)



Espectro de masas No 12C.

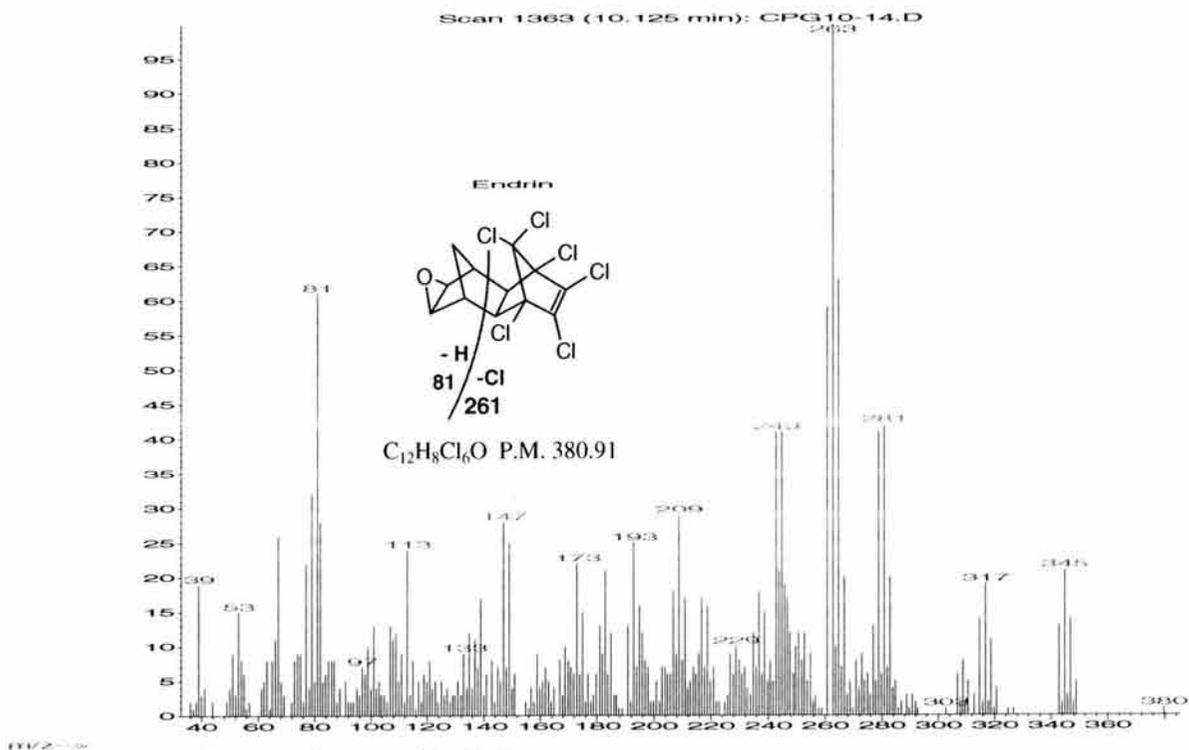
Abundance

Scan 1215 (9.252 min): CPG10-14.D



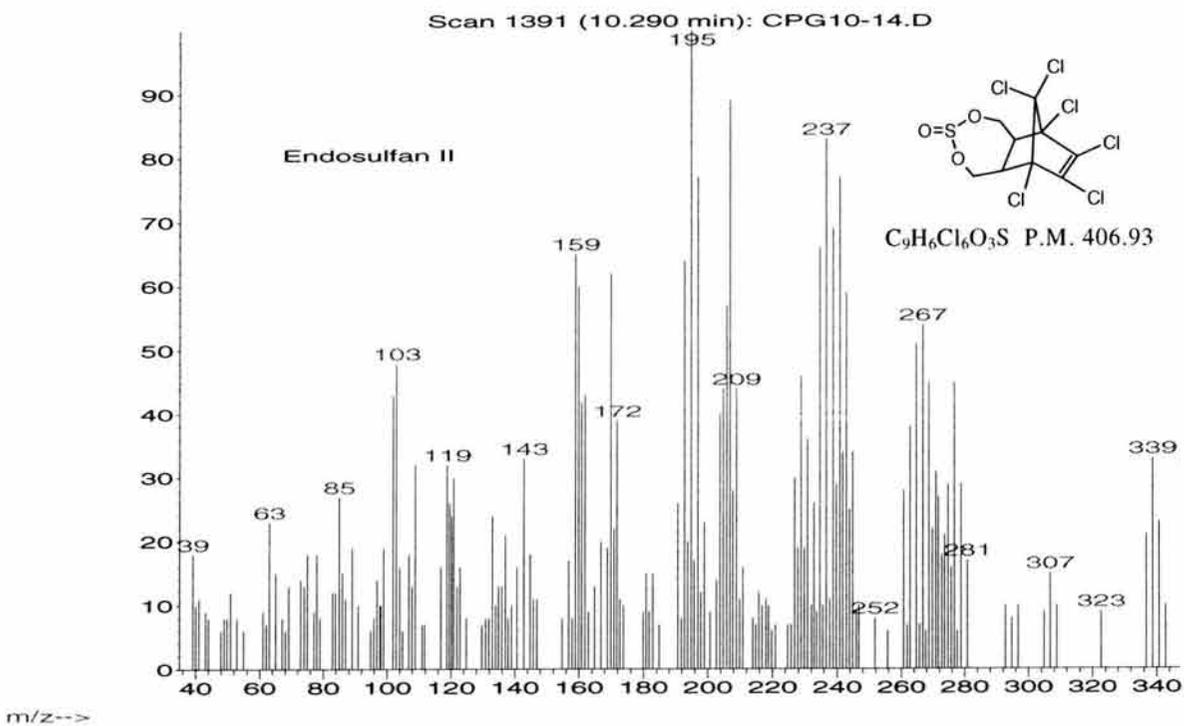
Espectro de masas No 13C.

Abundance



Espectro de masas No 14C.

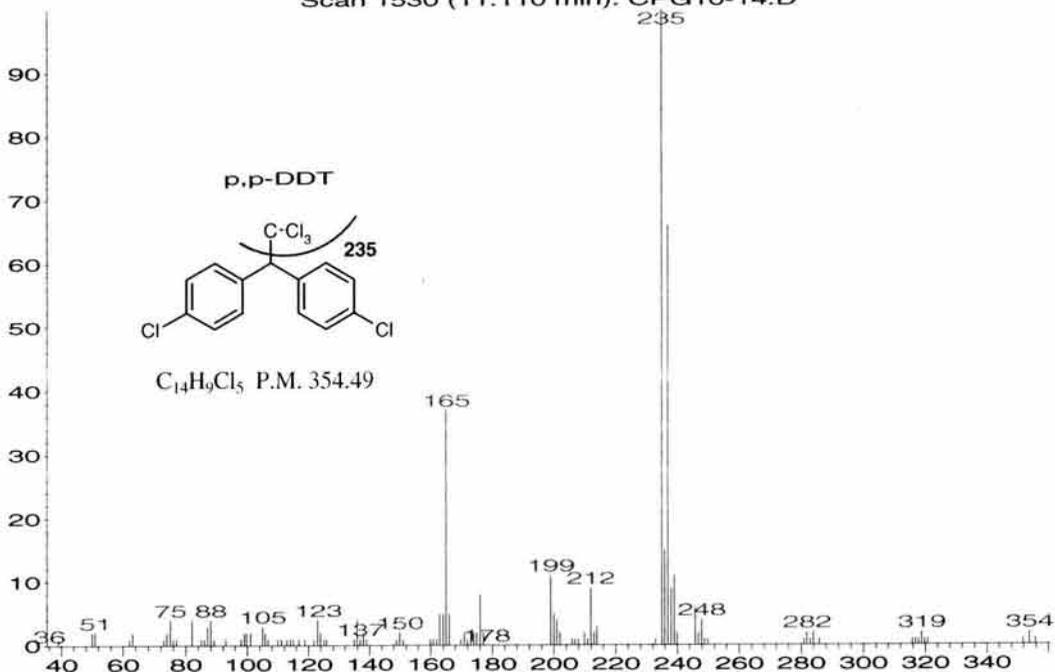
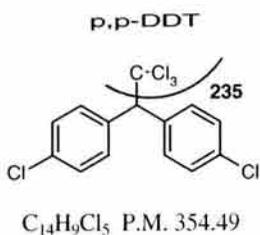
Abundance



Espectro de masas No 15C.

Abundance

Scan 1530 (11.110 min): CPG10-14.D

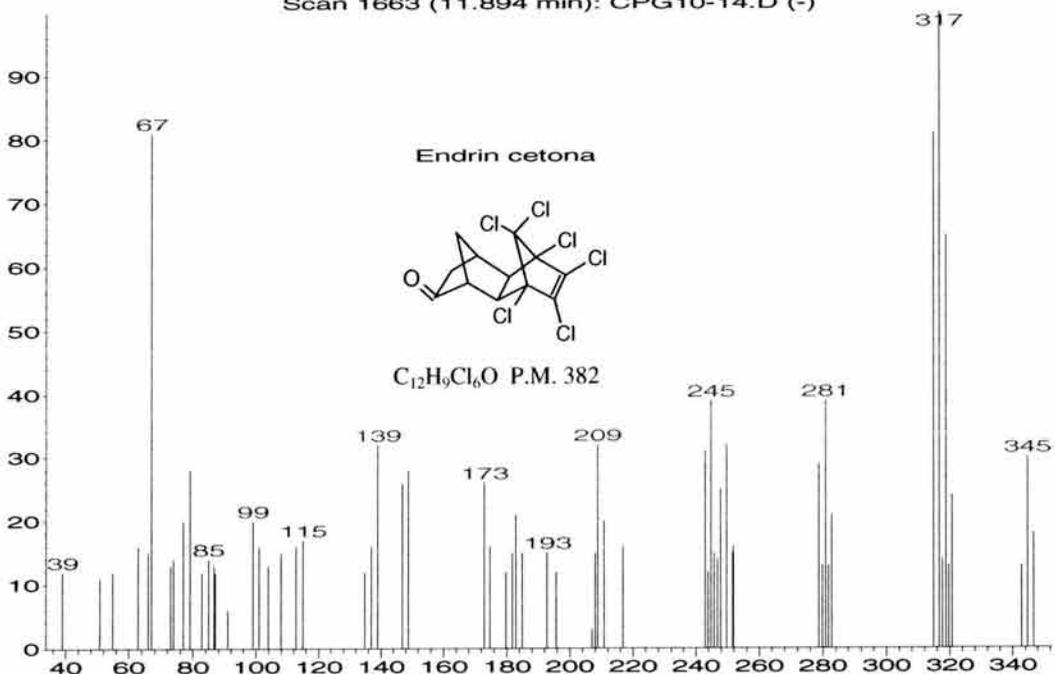
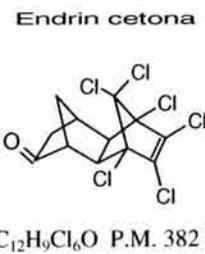


m/z-->

Espectro de masas No 16C.

Abundance

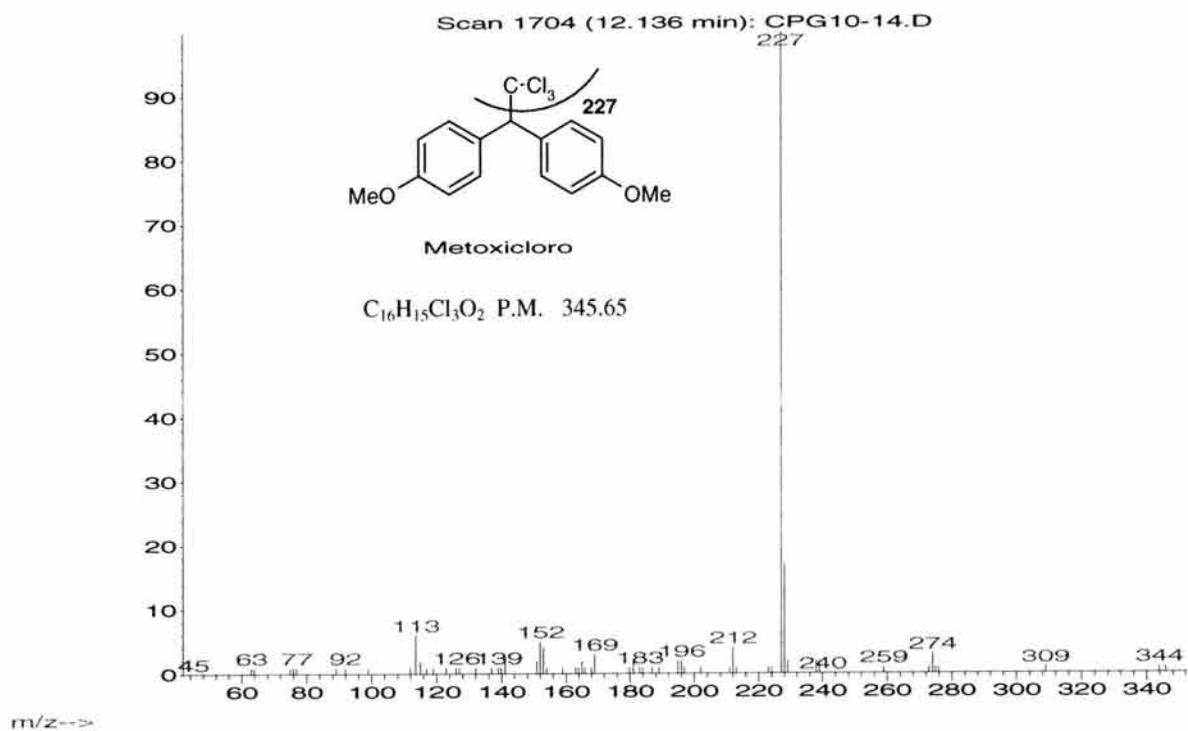
Scan 1663 (11.894 min): CPG10-14.D (-)



m/z-->

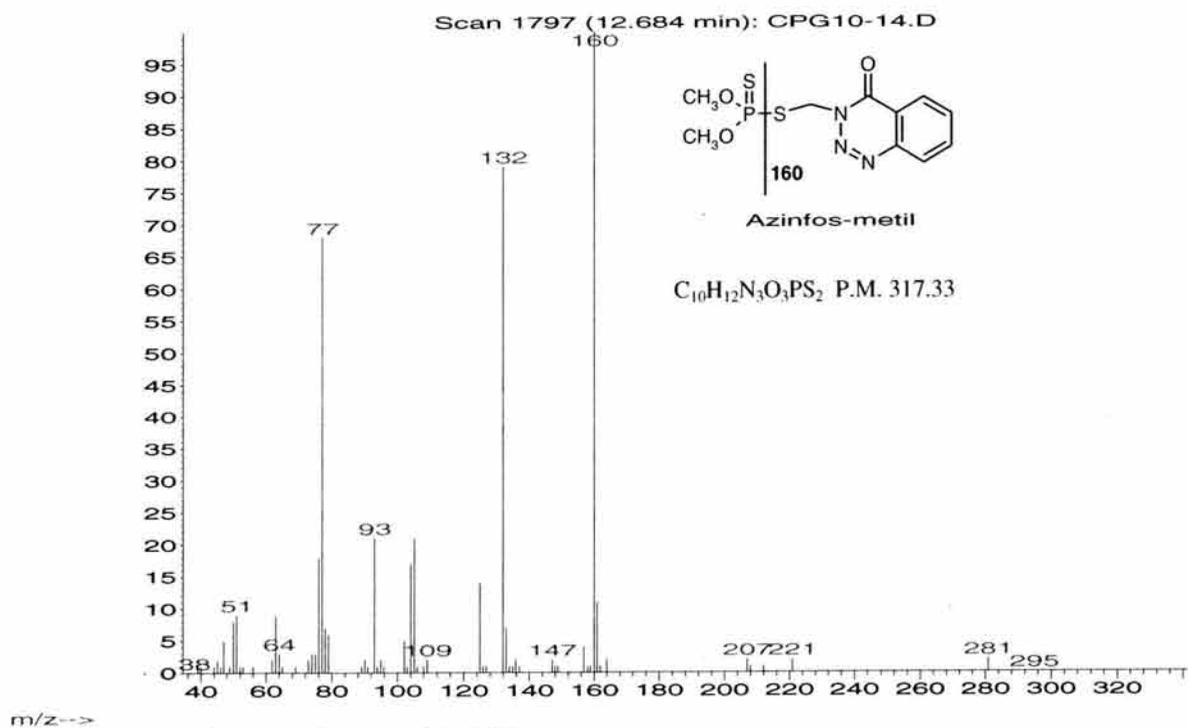
Espectro de masas No 17C.

Abundance



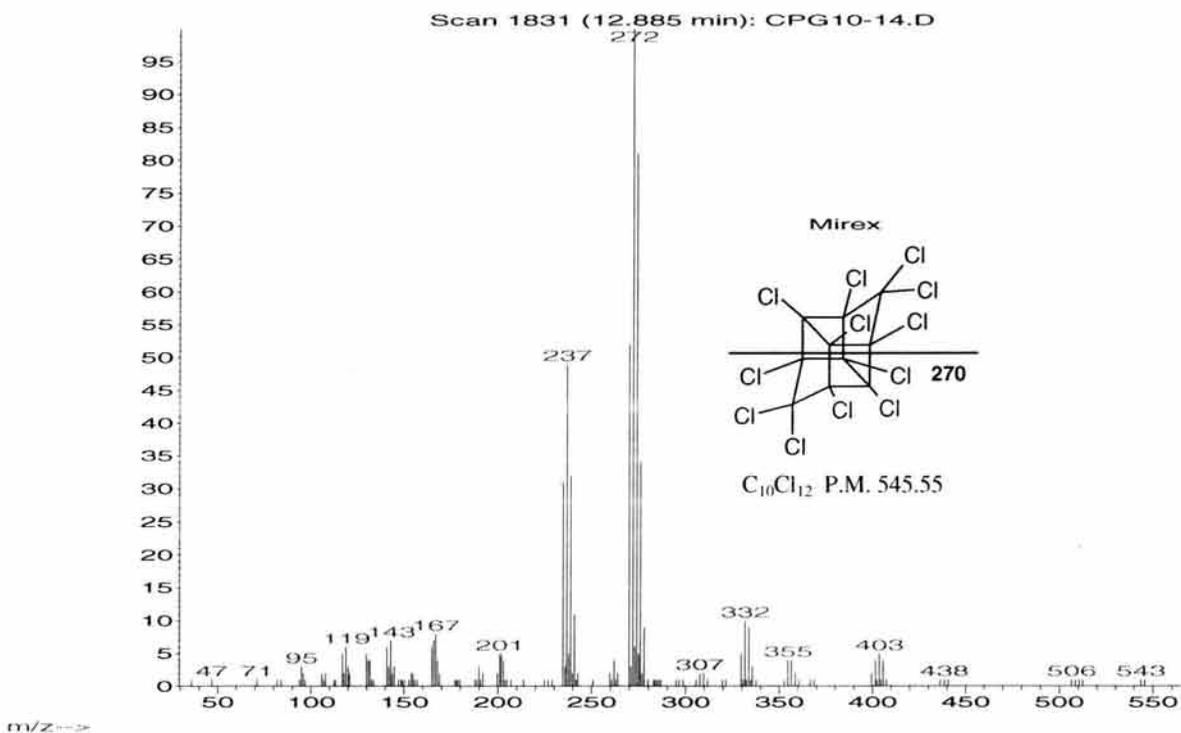
Espectro de masas No 18C.

Abundance



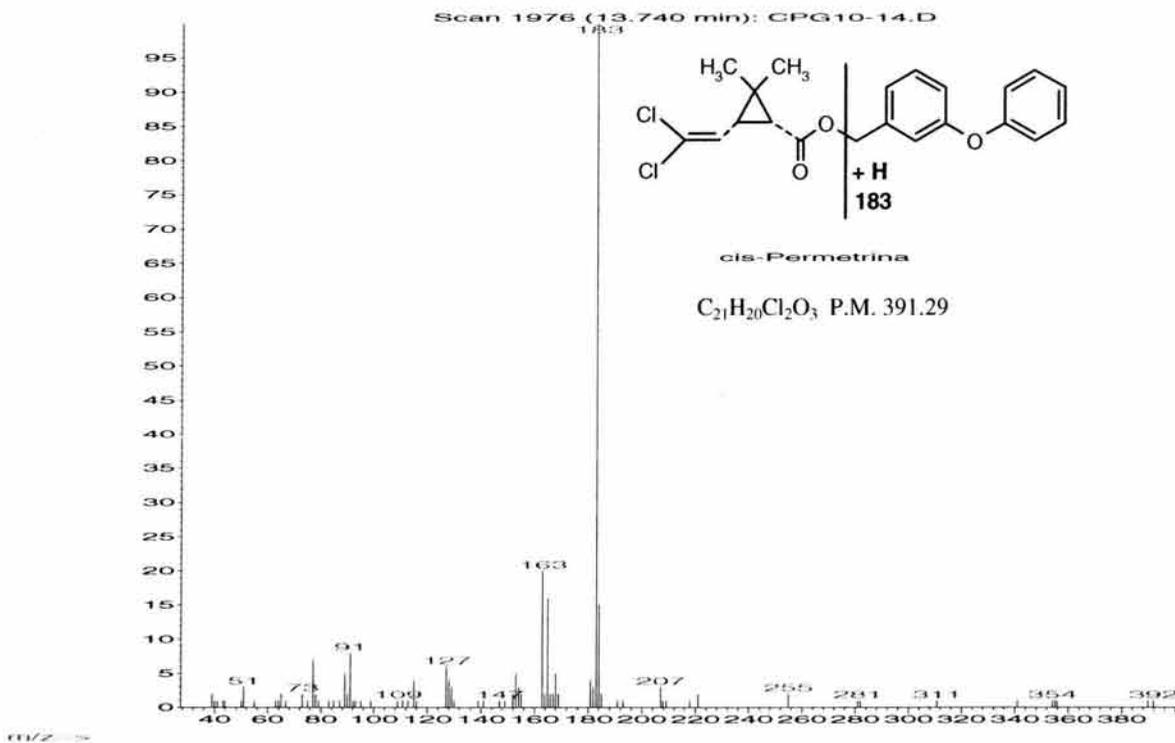
Espectro de masas No 19C.

Abundance



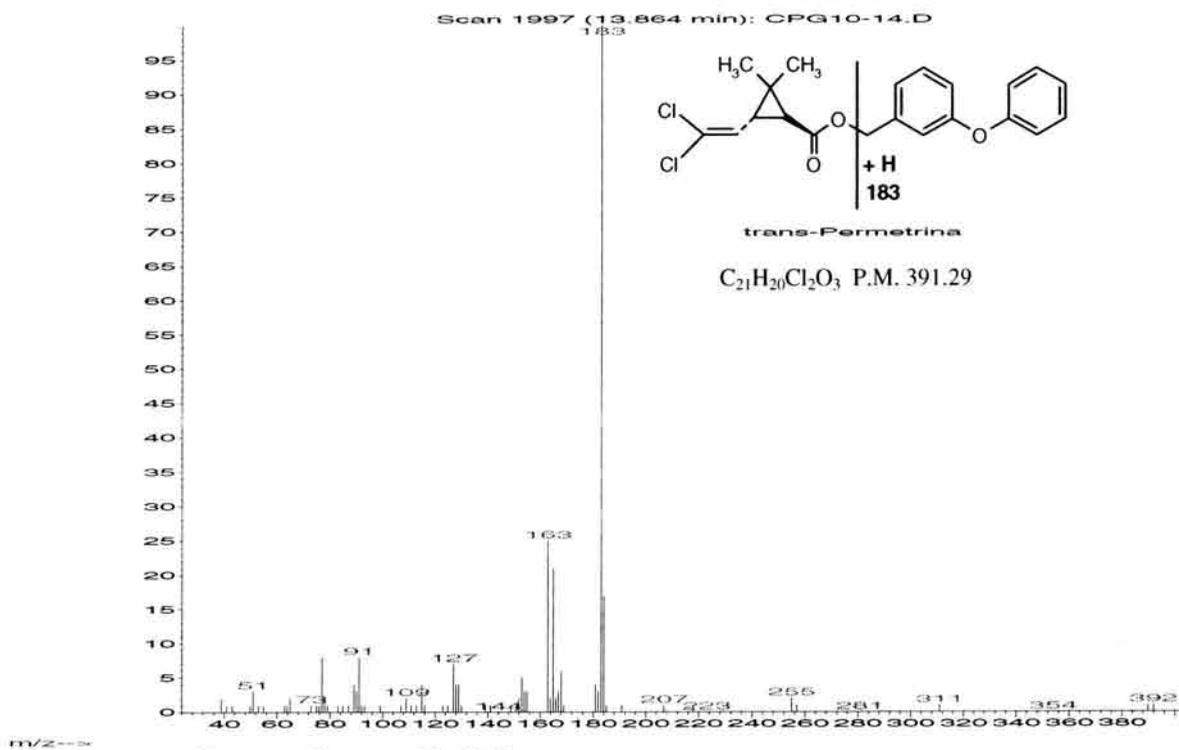
Espectro de masas No 20C.

Abundance



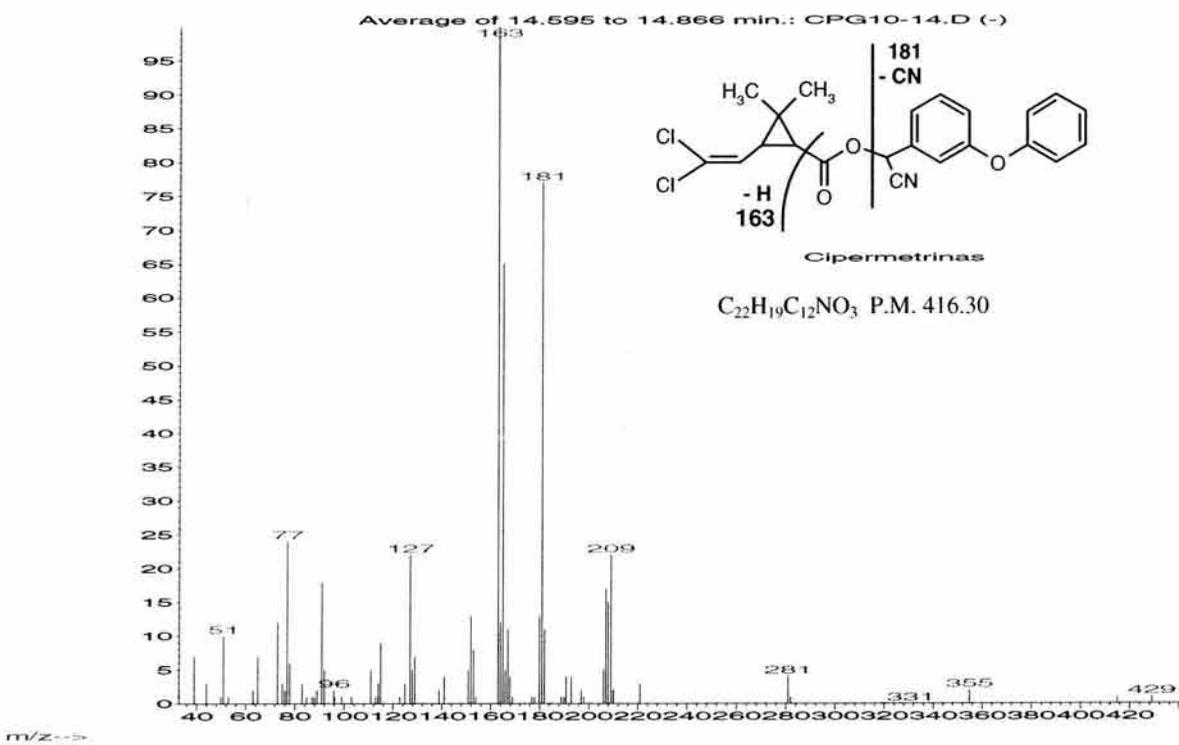
Espectro de masas No 21C.

Abundance



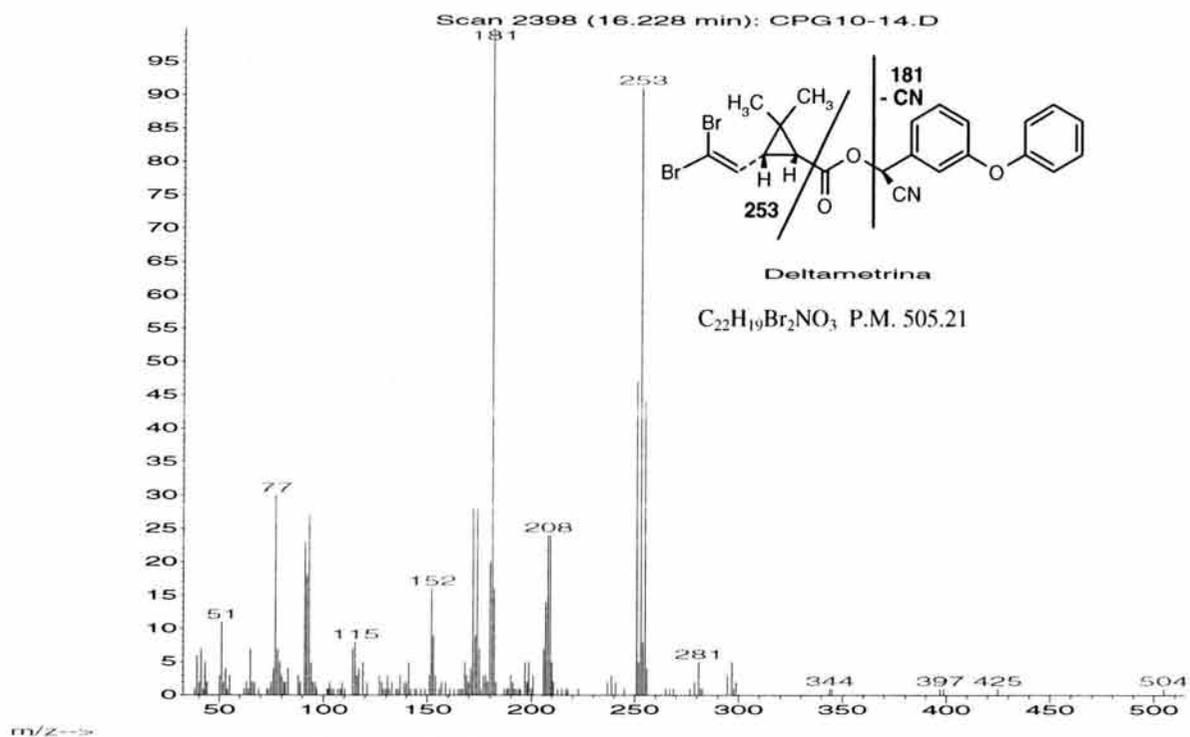
Espectro de masas No 22C.

Abundance



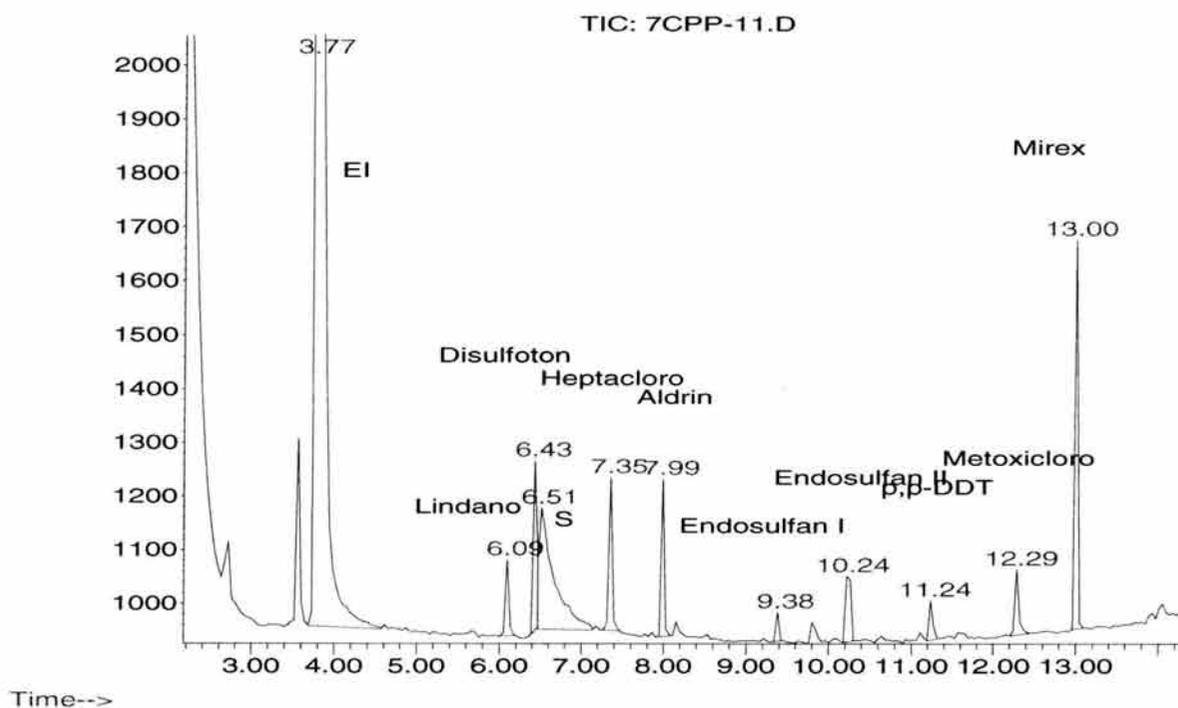
Espectro de masas No 23C.

Abundance



Espectro de masas No 24C.

Abundance



Cromatograma No C-2. Disolución estándar de 1 ppm inyectada por SIM

Apéndice D. Cálculos de la evaluación de Método.

Curvas de calibración para Límite de Detección y Cuantificación Instrumental.

Se ilustran dos ejemplos de las gráficas obtenidas y después una tabla con los parámetros de regresión obtenidos para los demás plaguicidas.

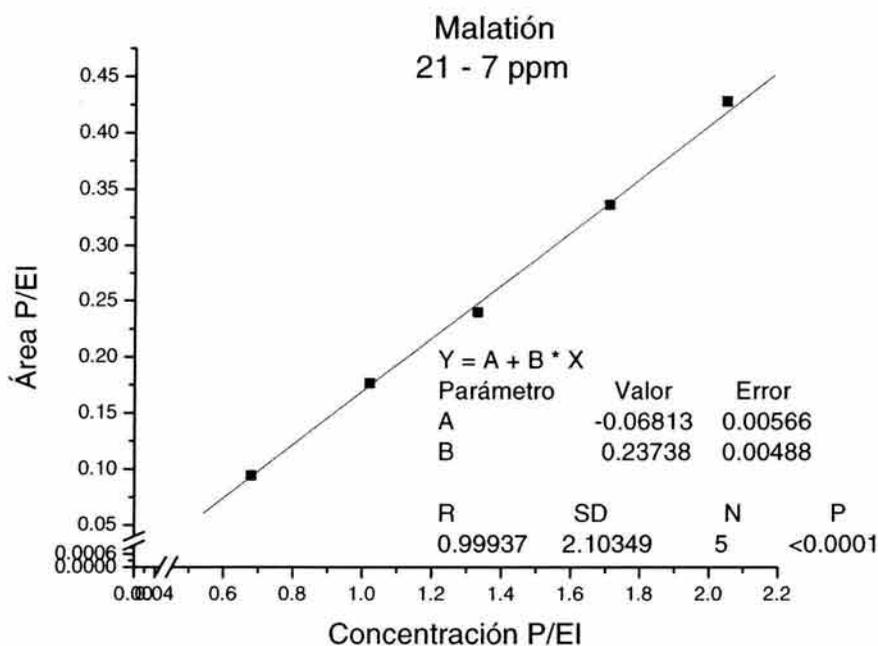
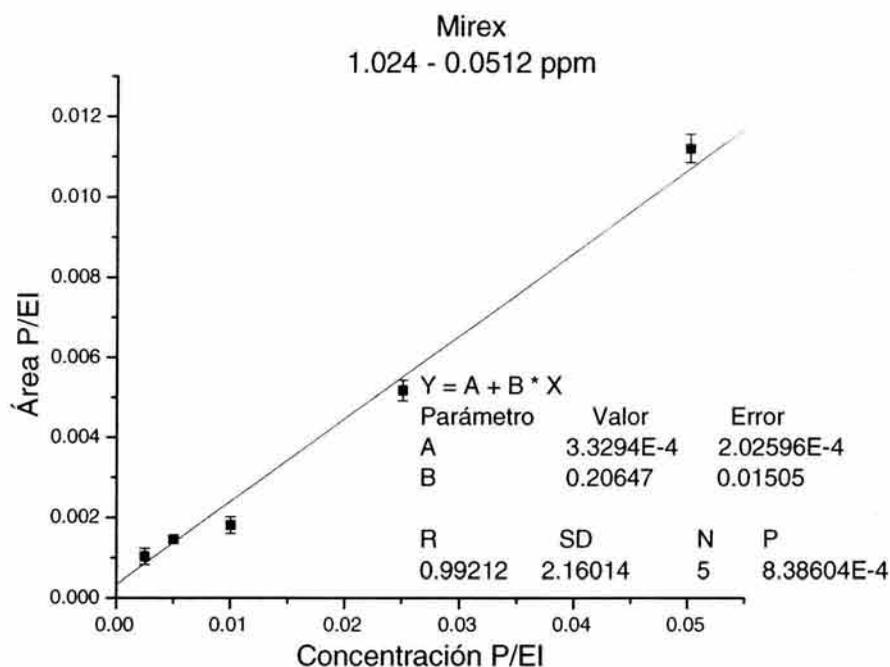


Tabla No 1D. Parámetros de la regresión.

Plaguicida.	Ordenada	Pendiente	Coef C.
Lindano	$-5.23185 \cdot 10^{-4}$	0.08252	0.98129
Disulfotón	$-4.45894 \cdot 10^{-4}$	0.09619	0.99752
Heptacloro	-0.00118	0.20239	0.99724
Aldrin	$-4.07969 \cdot 10^{-4}$	0.10303	0.99988
Endosulfan	$-5.6631 \cdot 10^{-4}$	0.12725	0.99856
Mirex	$3.3294 \cdot 10^{-4}$	0.20647	0.99212
Ometoato	-0.04591	0.11742	0.99204
Malatión	-0.06813	0.23738	0.99937

Cálculos de LDI y LCI usando el método matemático.

Si existe una relación lineal entre la señal analítica (y) y la concentración del analito (x), la “mejor” línea recta que pasa a través de los puntos de la curva de calibración se calcula por el método de los mínimos cuadrados.

Cada uno de los puntos de la gráfica está sujeto a un error experimental. El método de mínimos cuadrados supone que todos los errores se encuentran en (y), lo que provoca que haya desviaciones en esta dirección entre los puntos experimentales y la recta calculada. Algunas de esas desviaciones (conocidas como los residuos de (y)) serán positivas y otras negativas, por lo que se intenta minimizar la suma de los cuadrados de los residuos. La recta se calcula basándose en el principio de que “la línea debe pasar por el centro de gravedad de los puntos (\bar{x}, \bar{y})”.

Para la recta

$$y = a + bx \quad (1-D)$$

$$b = \frac{\sum_i \{(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})\}}{\sum_i (x_i - \bar{x})^2} \quad (2-D)$$

$$a = \bar{y} - b\bar{x} \quad (3-D)$$

Para calcular los errores aleatorios de los valores de la pendiente y de la ordenada al origen, primero se calcula el valor de $S_{y/x}$ (desviación estándar sobre la regresión) con la relación:

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_i (y_i - y_{calc})^2}{n - 2}} \quad (4-D)$$

Las desviaciones estándar sobre la pendiente (b) y sobre la ordenada al origen (a) están dadas por:

$$S_b = \frac{S_{y/x}}{\sqrt{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}} \quad (5-D)$$

$$S_a = S_{y/x} \sqrt{\frac{\sum_i x_i^2}{n \sum_i (x_i - \bar{x})^2}} \quad (6-D)$$

Límite de detección.

Para calcular el límite de detección es necesario conocer los intervalos de confianza sobre la recta calculada:

$$y_{\pm} = \bar{y} + b(x_i - \bar{x}) \pm tS_{y/x} \sqrt{1 + \frac{1}{n} + \frac{(x_i - \bar{x})^2}{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}} \quad (7-D)$$

en donde t es el valor de la "t de student", a dos colas, con un nivel de confianza s para $n-2$ grados de libertad.

Se calcula primero el valor de (y_+) para $x_i = 0$. Con este valor se calcula el valor correspondiente de x en la recta (y_-). Para despejar el valor de x de las ecuaciones de las rectas (y_{\pm}) se utiliza un término auxiliar:

$$C = b^2 - \frac{(t * S_{y/x})^2}{\sum_i (x_i - \bar{x})^2} \quad (8-D)$$

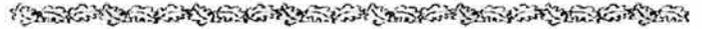
por lo que despejando x_i en la ecuación 7-D, para la recta (y_+) se obtiene:

$$x_1 = \bar{x} - \frac{b}{C}(\bar{y} - y_o) - \frac{tS_{y/x}}{C} \sqrt{\left(1 + \frac{1}{n}\right)C + \frac{(y_o - \bar{y})^2}{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}} \quad (9-D)$$

y para la recta (y_-):

$$x_2 = \bar{x} - \frac{b}{C}(\bar{y} - y_o) + \frac{tS_{y/x}}{C} \sqrt{\left(1 + \frac{1}{n}\right)C + \frac{(y_o - \bar{y})^2}{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}} \quad (10-D)$$

Entonces, el límite de detección se obtiene sustituyendo el valor calculado de (y_+) para $x=0$ en la ecuación 10-D.



Para calcular el límite de cuantificación, se calcula ahora el valor de (y_+) para $x=LD$, y nuevamente con este valor se calcula el valor de (x) en la recta (y) . Este valor corresponde al límite de cuantificación.

A continuación se ejemplifica como se calculo el LDI y LCI.

	x	y	xi-x	(xi-x)2	yi-y	(yi-y)2	(xi-x)(yi-y)	ycalc	(yi-ycalc)	(yi-ycalc)2	(xi)2
Mírex	0.05	0.0116	0.0314	0.0009860	0.0075	5.579E-05	0.000235	0.010977	0.000623	3.885E-07	0.0025
	0.05	0.0105	0.0314	0.0009860	0.0064	4.057E-05	0.000200	0.010977	-0.000477	2.273E-07	0.0025
	0.05	0.0115	0.0314	0.0009860	0.0074	5.431E-05	0.000231	0.010977	0.000523	2.738E-07	0.0025
	0.025	0.0056	0.0064	0.0000410	0.0015	2.159E-06	9.404E-06	0.005526	0.000074	5.469E-09	0.000625
	0.025	0.0052	0.0064	0.0000410	0.0011	1.143E-06	6.844E-06	0.005526	-0.000326	1.063E-07	0.000625
	0.025	0.0047	0.0064	0.0000410	0.0006	3.241E-07	3.644E-06	0.005526	-0.000826	6.823E-07	0.000625
	0.01	0.0015	-0.0086	0.0000740	-0.0026	6.920E-06	2.262E-05	0.002256	-0.000756	5.710E-07	0.0001
	0.01	0.0017	-0.0086	0.0000740	-0.0024	5.908E-06	2.090E-05	0.002256	-0.000556	3.087E-07	0.0001
	0.01	0.0022	-0.0086	0.0000740	-0.0019	3.727E-06	1.660E-05	0.002256	-0.000056	3.094E-09	0.0001
	0.005	0.0015	-0.0136	0.0001850	-0.0026	6.920E-06	3.578E-05	0.001165	0.000335	1.119E-07	0.000025
	0.005	0.0013	-0.0136	0.0001850	-0.0028	8.013E-06	3.850E-05	0.001165	0.000135	1.809E-08	0.000025
	0.005	0.0016	-0.0136	0.0001850	-0.0025	6.404E-06	3.442E-05	0.001165	0.000435	1.888E-07	0.000025
	0.003	0.001	-0.0156	0.0002434	0.00	9.801E-06	4.884E-05	0.000729	0.000271	7.321E-08	0.000009
	0.003	0.00066	-0.0156	0.0002434	0.00	1.205E-05	5.414E-05	0.000729	-0.000069	4.821E-09	0.000009
	0.003	0.0014	-0.0156	0.0002434	0.00	7.457E-06	4.260E-05	0.000729	0.000670566	4.497E-07	0.000009
suma	0.279	0.06196	0.0000	0.0045876	0.0000	0.000221489	0.001000224			3.41293E-06	0.009777
promedio	0.0186	0.004130667									
pendiente	0.2180										
ordenada	0.0001										

CÁLCULO DEL L.D.

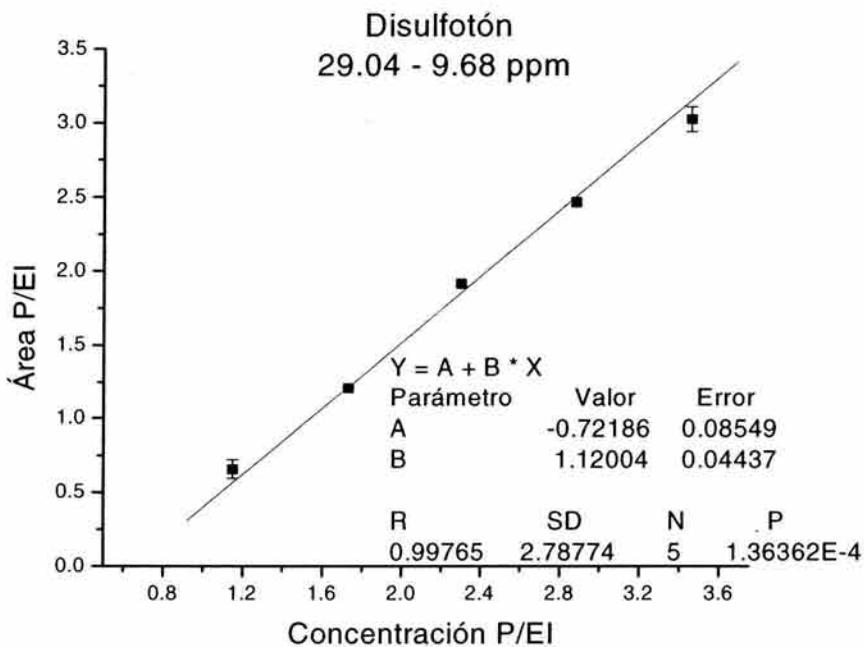
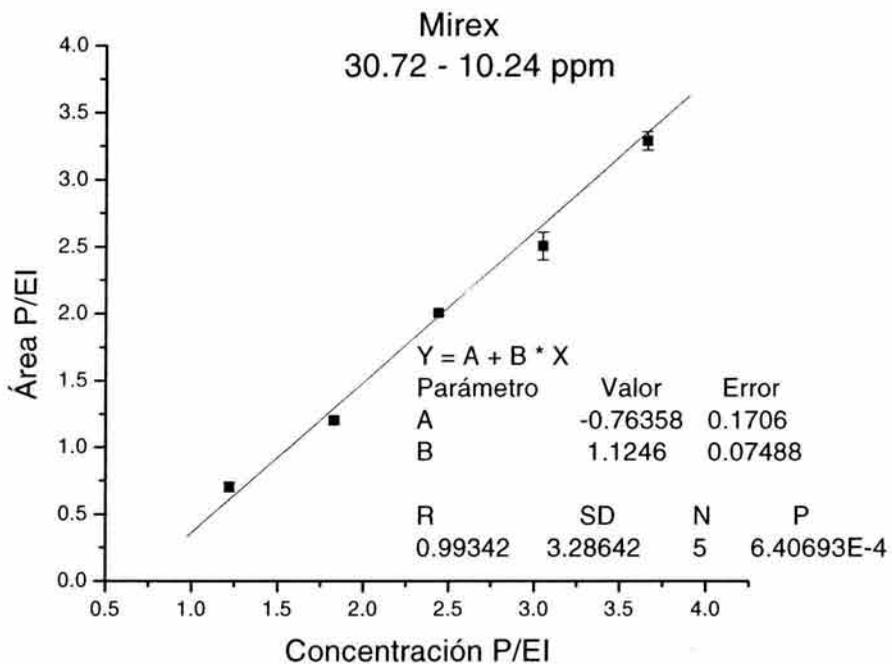
X	0.0186						
Y	0.004130667						
n	15	1+1/n	1.066666667				
t(n-2)	2.16						
Suma(xi-X)2	0.0045876	B	0.21803	Sb	0.0076		
Suma(xi-X)(yi-Y)	0.001000224	A	0.00008	Sa	0.0002		
Suma(yi-calc)2	3.41293E-06	Sy/x	0.00051				
Suma(xi)2	0.009777						
Término aux. C	0.047269093						
x	0						
Y+	0.001258103	X-LD	0.0107	L.D.	0.1097	ppm	

CÁLCULO DEL L.C.

x	0.0107					
Y+	0.003558705	X-LC	0.0212	L.C.	0.2175	ppm



Datos de regresión lineal para las curvas de calibración con un intervalo de concentración de 30 a 10 ppm:



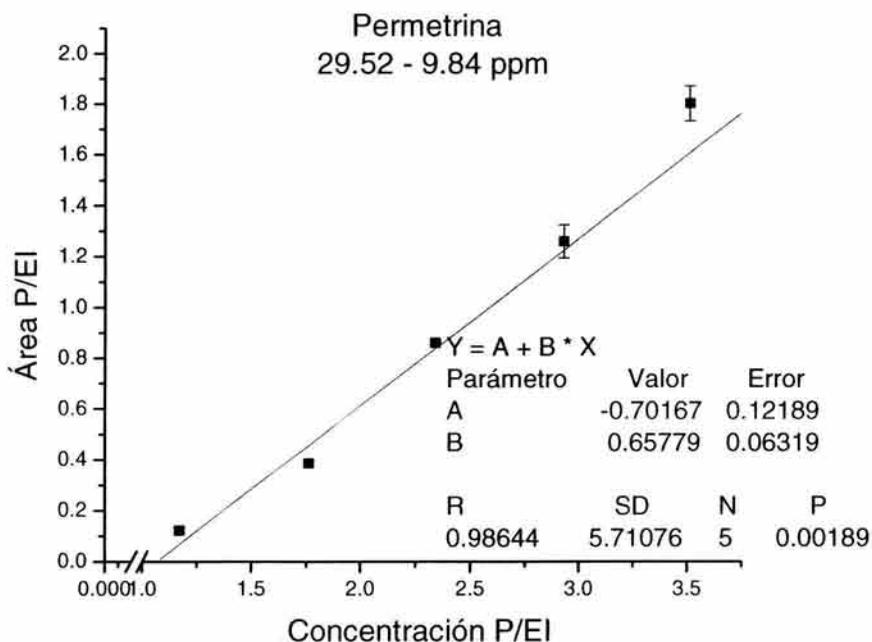
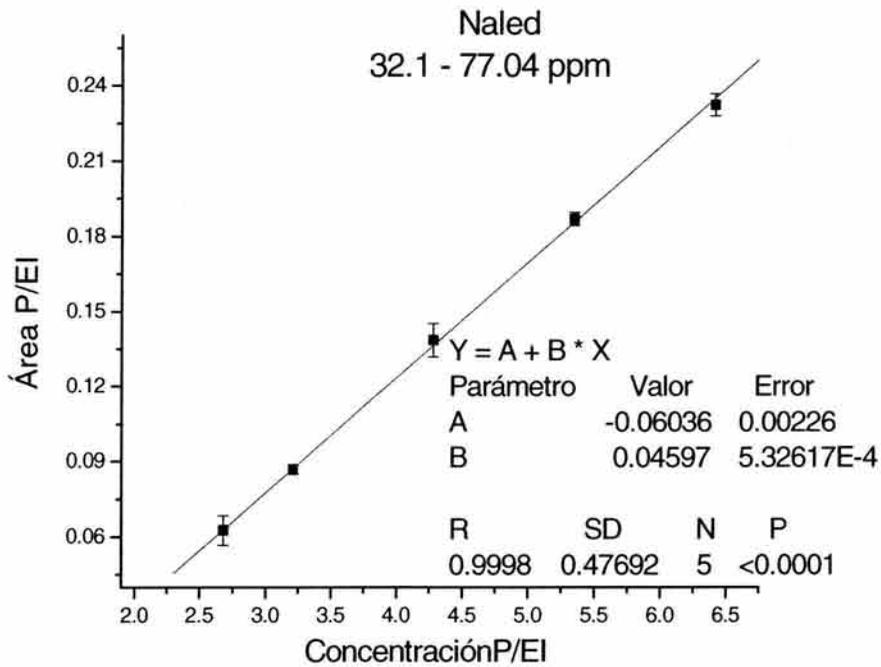
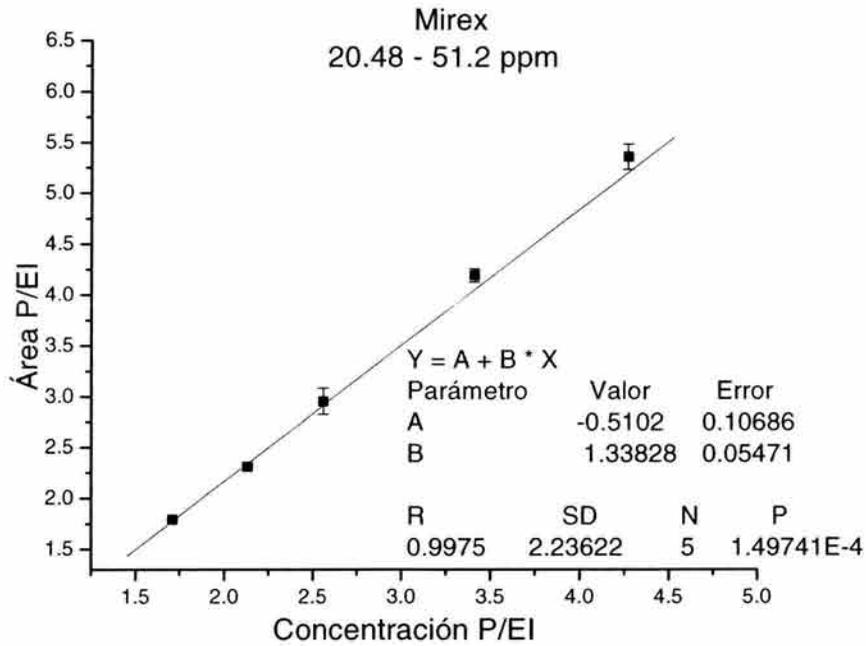


Tabla No 2D. Parámetros de la regresión.

Plaguicida	Ordenada	Pendiente	Coef. C.
Lindano	-0.47468	0.7722	0.99701
Heptacloro	-1.02114	1.0889	0.99513
Aldrin	-0.86615	1.00614	0.93988
Endosulfan	-0.78663	0.68675	0.98271
Endrin	-0.74423	0.74711	0.99218
DDT	-0.7905	1.02446	0.99721
Metoxicloro	-1.20381	1.08039	0.99229
Mirex	-0.76358	1.1246	0.99342
Ometoato	-0.98279	0.63599	0.99894
Disulfotón	-0.72186	1.12004	0.99765
Malatión	-0.67453	0.94712	0.98236
Paratión	-1.19642	0.6548	0.99436
Carbarilo	-0.89832	0.44695	0.99251
Permetrina	0.70167	0.65779	0.98644
Deltametrina	-0.35403	0.24896	0.98458
Antraceno S	-1.07814	1.18072	0.99253

Datos de regresión lineal para las curvas de calibración con un intervalo de concentración de 60 a 20 ppm:



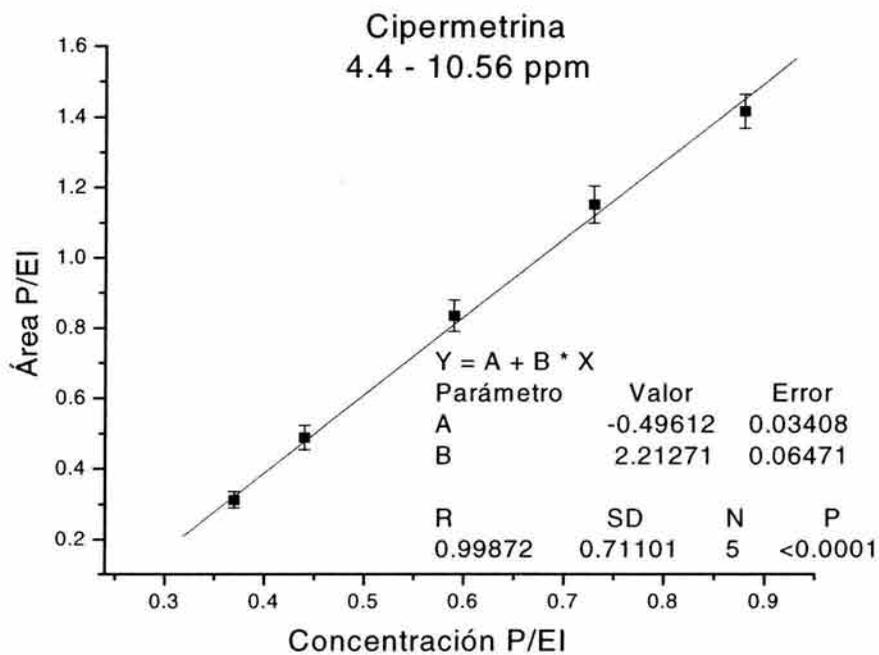
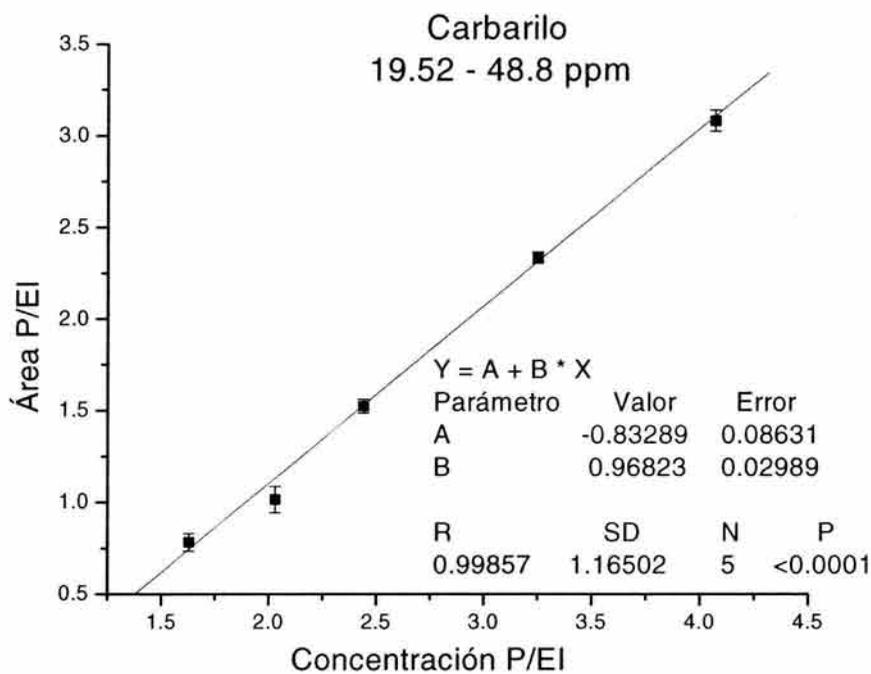


Tabla No 3D. Parámetros de la regresión.

Plaguicida	Ordenada	Pendiente	Coef. C.
Lindano	-0.33054	0.90845	0.99966
Heptacloro	-0.41485	1.15717	0.99921
Aldrin	-0.35696	1.03377	0.99903
Endosulfan	0.68468	0.93519	0.99908
Endrin	-0.59125	0.96829	0.9985
DDT	-0.69546	1.43112	0.99831
Metoxicloro	-0.83394	1.38397	0.99669
Mirex	-0.5102	1.33828	0.9975
Ometoato	-0.56137	1.06439	0.99916
Naled	-0.06036	0.04597	0.9998
Disulfotón	-0.36913	1.0127	0.99793
Malatión	-0.63004	1.36189	0.9984
Paratión	-1.07246	0.98271	0.99788
Azinfos	-0.29183	0.59922	0.99757
Carbarilo	-0.83289	0.96823	0.99857
Maneb	-0.01394	0.02898	0.9997
Permetrina	-0.45516	0.93084	0.99851
Cipermetrina	-0.49612	2.21271	0.99872
Deltametrina	-0.3822	0.59408	0.99845
Antraceno S	-0.97551	1.70992	0.99906

Fórmulas empleadas en el cálculo de recobro y cuantificación de los plaguicidas en las muestras:

Ecuación de la recta:

$$y = a + bx, \text{ es decir igual a } \frac{A_p}{A_{El}} = a + F_{rr} x \quad (11-D)$$

Concentración del plaguicida en 1 ml de extracto (C_{1ml}):

$$C_{1ml} = \left[\frac{\left(\frac{A_p}{A_{El}} \right) - a}{F_{rr}} \right] * C_{El} = mgP / L \quad (12-D)$$

Concentración del plaguicida en la muestra (C_M):

$$C_M = C_{1ml} \frac{mg}{L} * \frac{1mlV_f}{25mlA} * \frac{0.1LE_i}{0.05kgM} = mgP / kgM \quad (13-D)$$

Cálculo del recobro (% R):

$$\% R = \frac{C_M}{C_{Ml}} * 100 \quad (14-D)$$

Promedio (\bar{x}):

$$\bar{x} = \sum_i \frac{x_i}{n} \quad (15-D)$$

Desviación estándar (S):

$$S = \sqrt{\sum_i \frac{(x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (16-D)$$

Coefficiente de variación (C. V.):

$$C.V. = \frac{S}{\bar{x}} (100) \quad (17-D)$$

Ejemplo de cálculo para la obtención del recobro del plaguicida Carbarilo:

$C_{EI} = 12$ ppm
 C_M Carbarilo: 3.9 ppm

	Regresión	Área		Área P/EI	C_{Iml}	C_{Mc}	%R
		Archivo	EI				
a=	-0.83289	E100F-1F	2083777	4977707	2.3888	38.9881	79.89
b=	0.96823	E100F-2F	1463908	4439486	3.0326	46.7141	95.73
r=	0.99857					$\bar{\%R}$	87.81
						S	11.20
						C. V.	12.76

Calculos para obtener el L.D.M y el L.C.M:

$$C_M = LDI \text{ (ó } LCI) * \frac{1mlV_f}{25mlA} * \frac{0.1LE_i}{0.05kgM} = mgP / kgM \quad (18-D)$$

$$LDM \text{ (} LCM \text{)} = \frac{C_M}{\% R} * 100 \quad (19-D)$$

A_P : Área del plaguicida.

A_{EI} : Área del Estándar Interno.

C_M : Concentración en muestra calculada.

C_{Mt} : Concentración en muestra teórica.

E_i : Volúmen del extracto inicial.

F_{rr} : Factor de respuesta relativo.

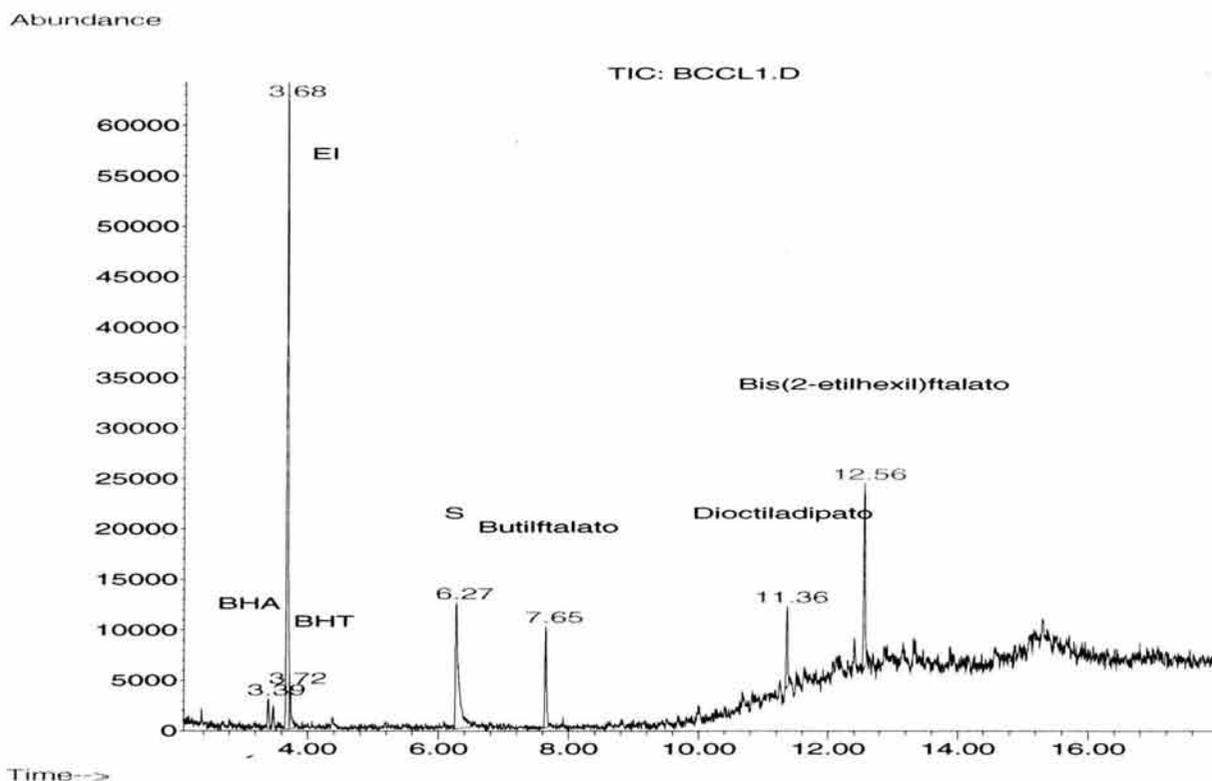
A: Alícuota analizada

M: Muestra

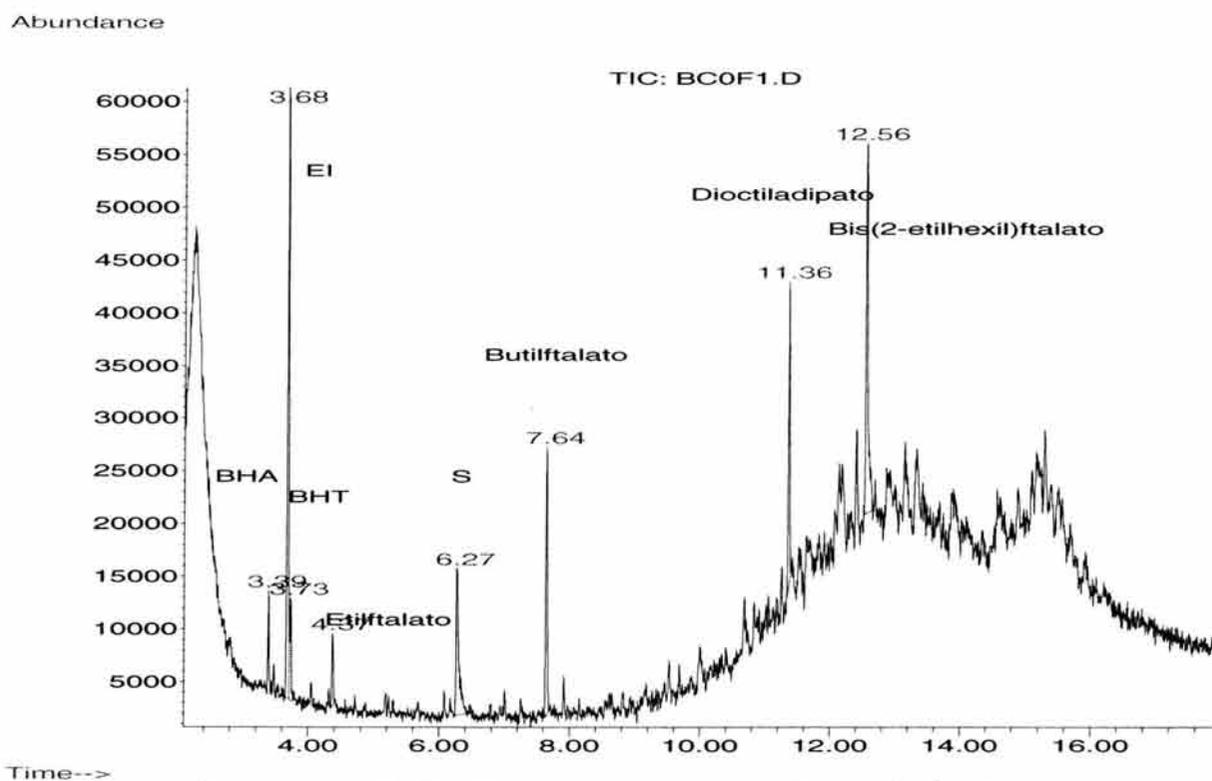
P: Plaguicida.

V_f : Volúmen final de (A)

Apéndice E. Cromatogramas del método multiresiduo CDFa modificado.

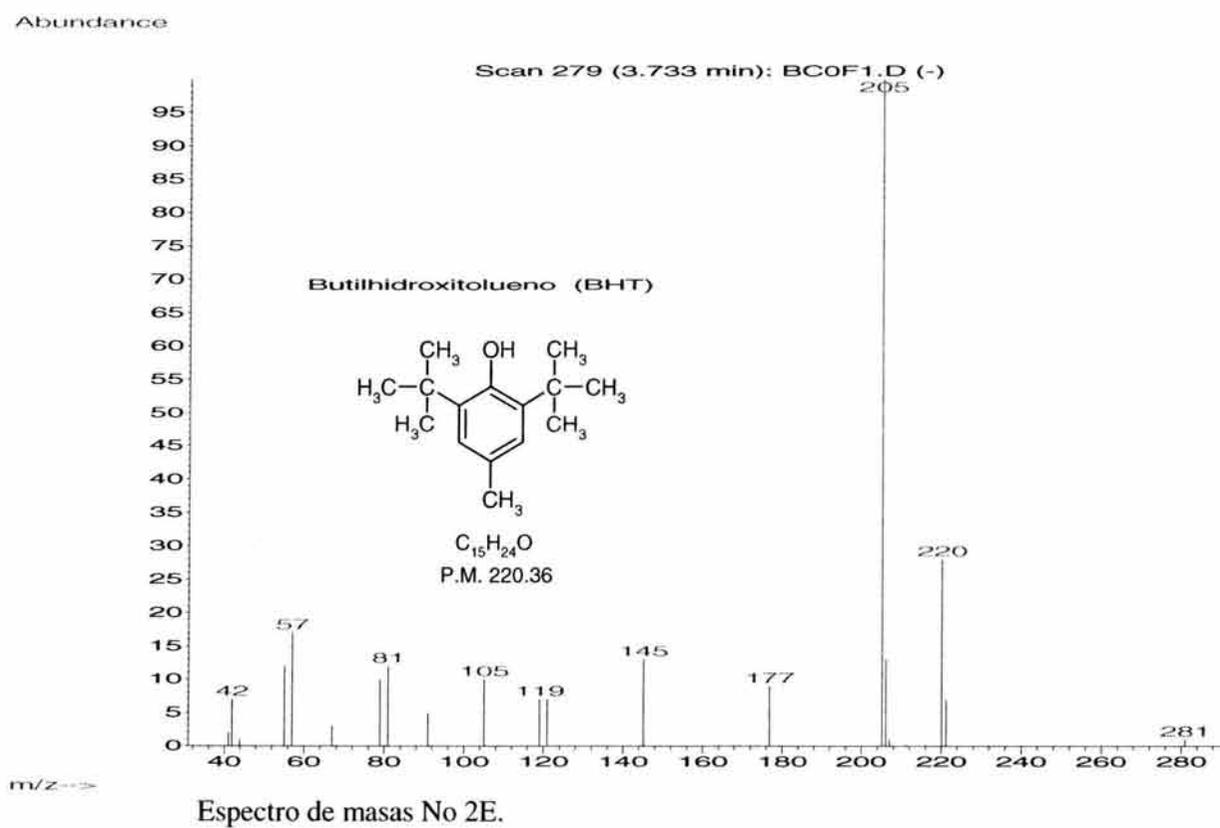
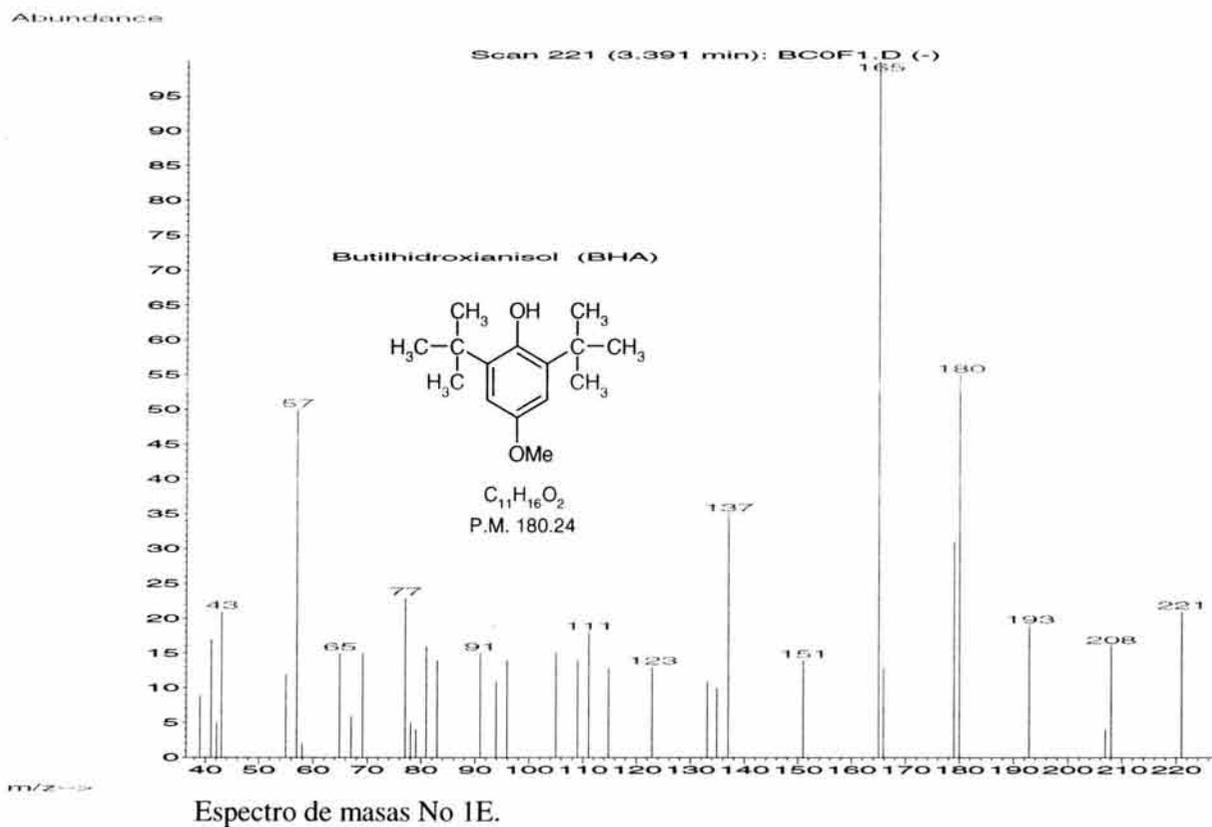


Cromatograma No E-1. Blanco de método, extracción para clorados.

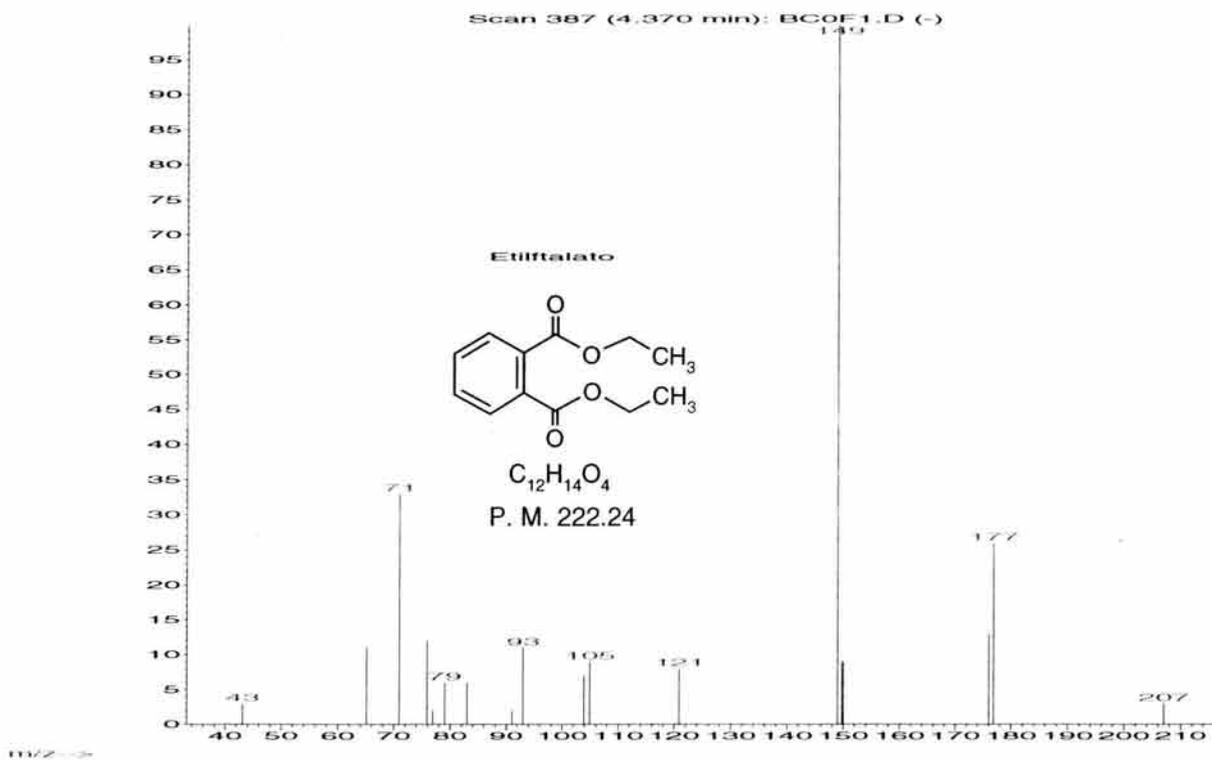


Cromatograma No E-2. Blanco de método, extracción para fosforados.

Espectros de masas de las interferencias del blanco de método.

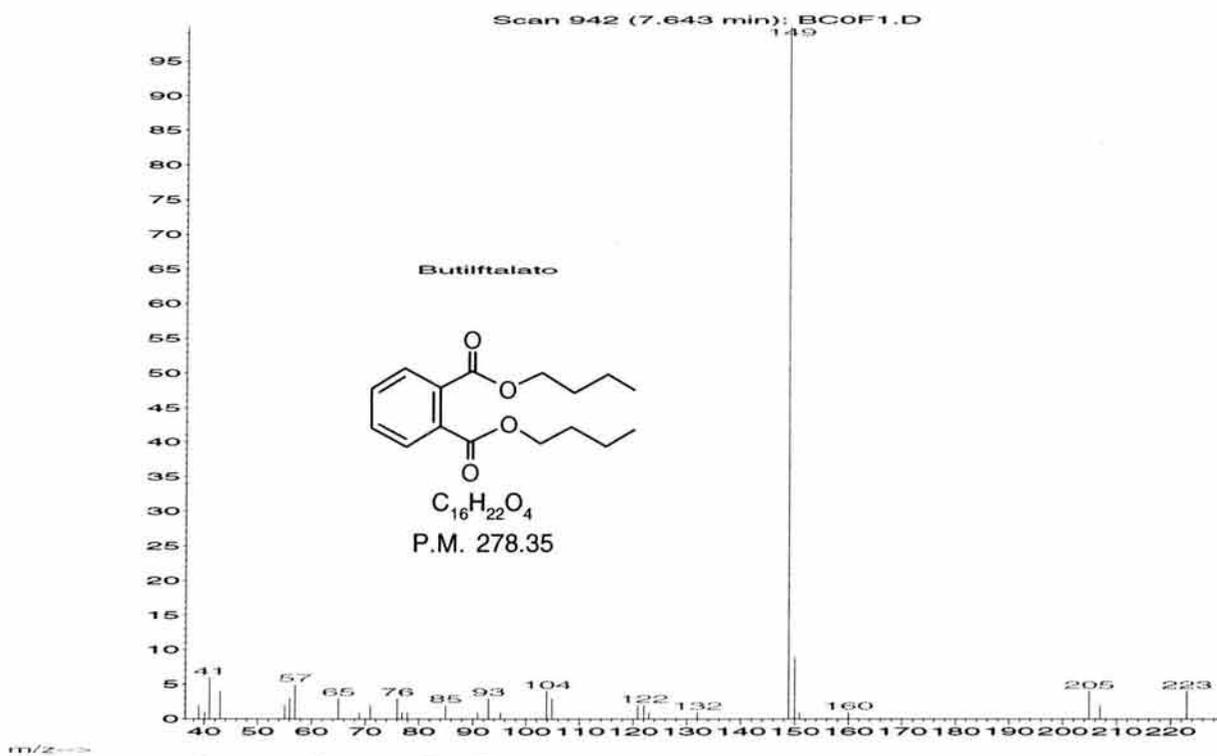


Abundance



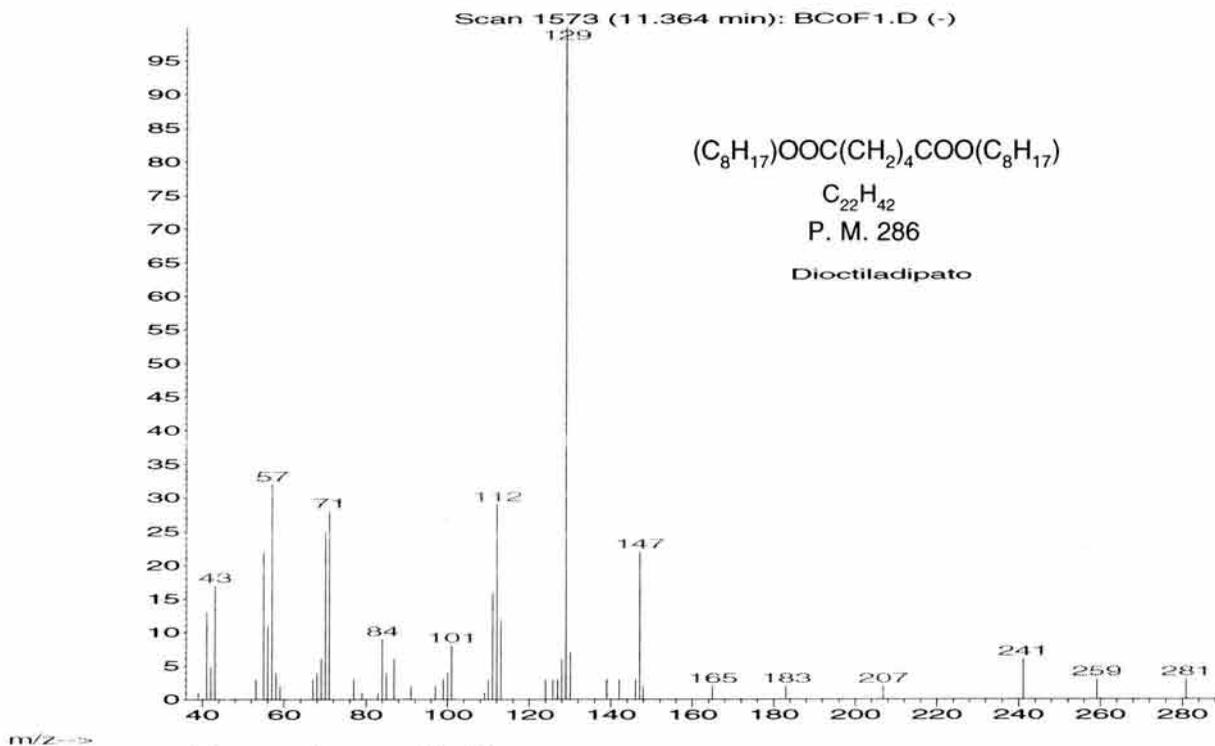
Espectro de masas No 3E.

Abundance



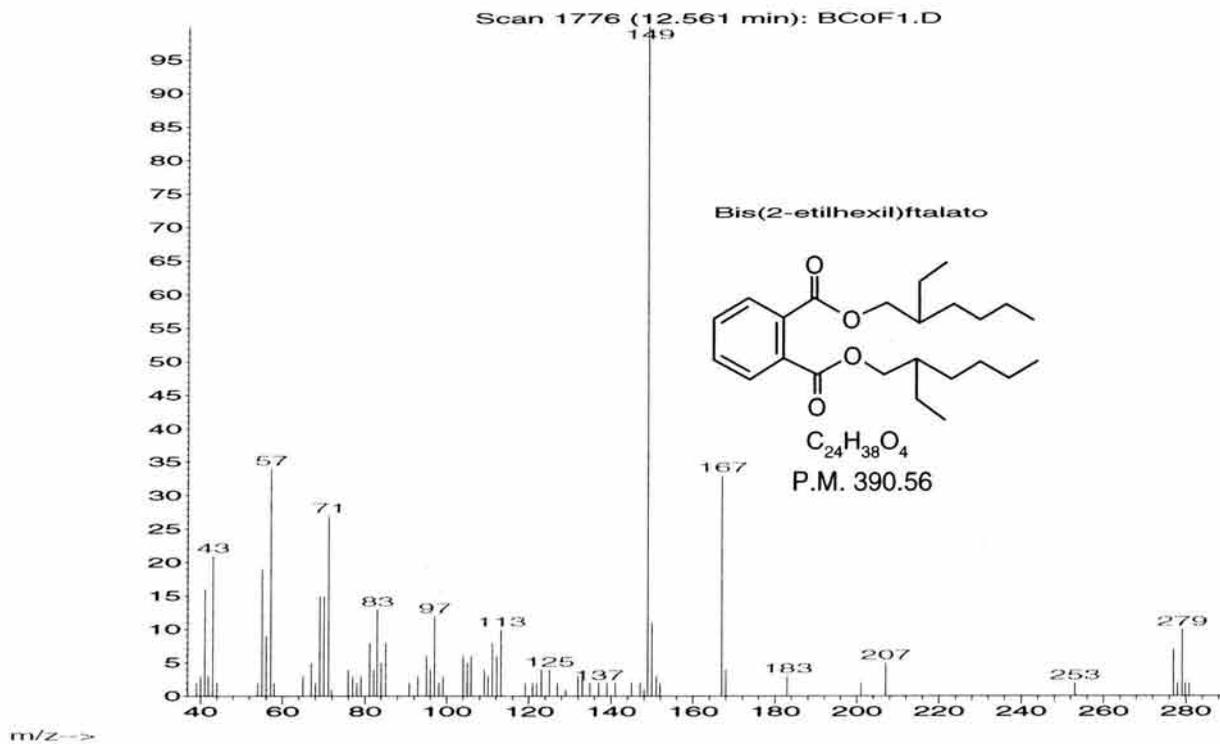
Espectro de masas No 4E.

Abundance



Espectro de masas No 5E.

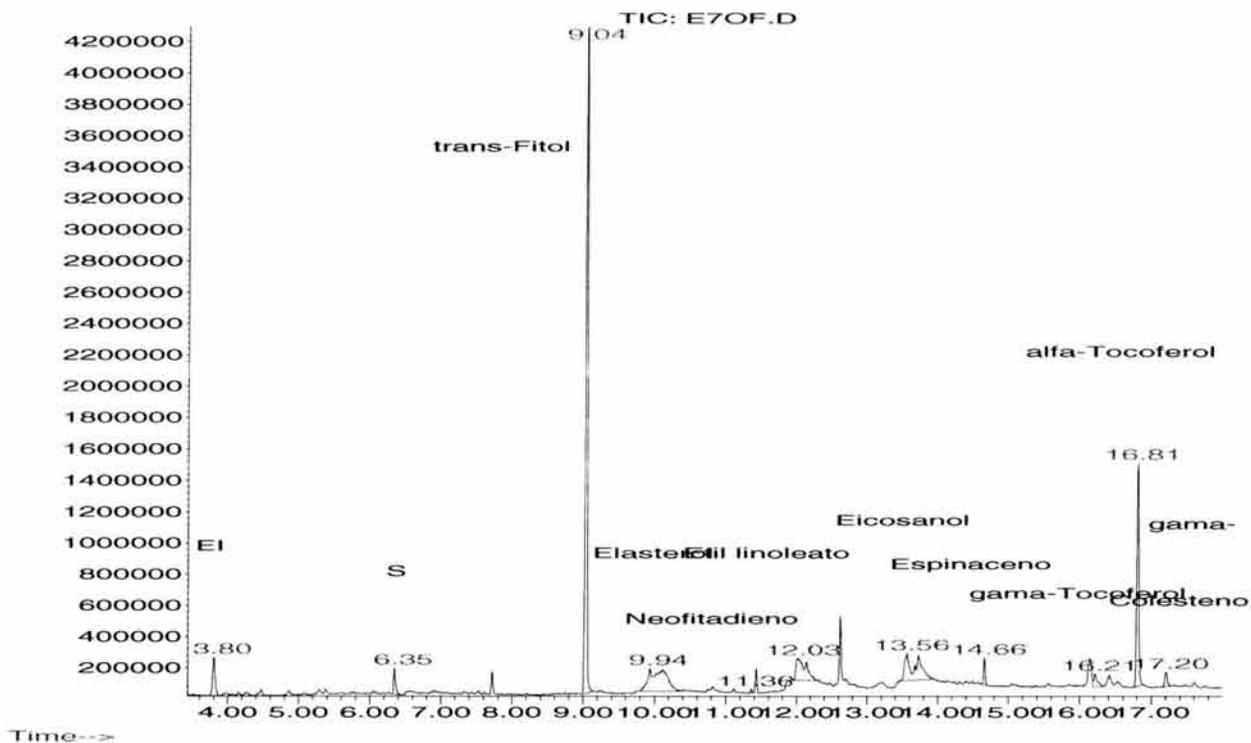
Abundance



Espectro de masas No 6E.

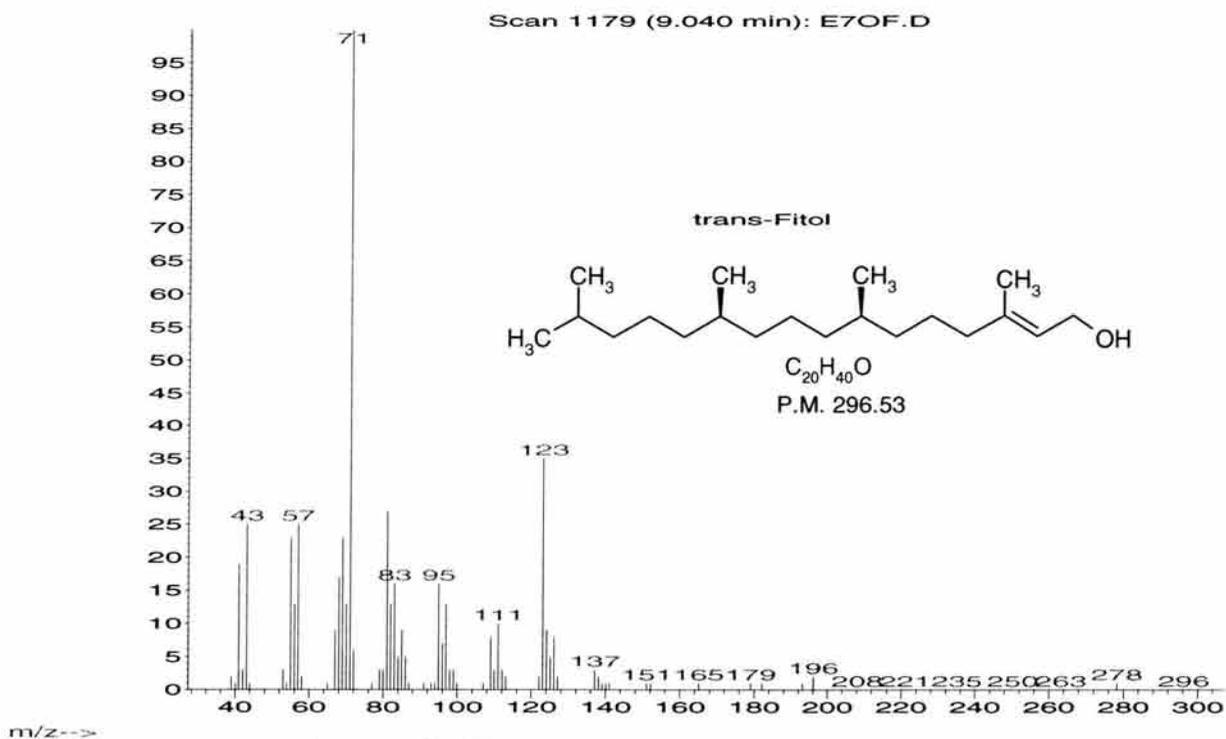
Interferencias coextraídas de la matriz (espinaca) y sus espectros de masas correspondientes.

Abundance



Cromatograma No E-3. Extracción para plaguicidas fosforados.

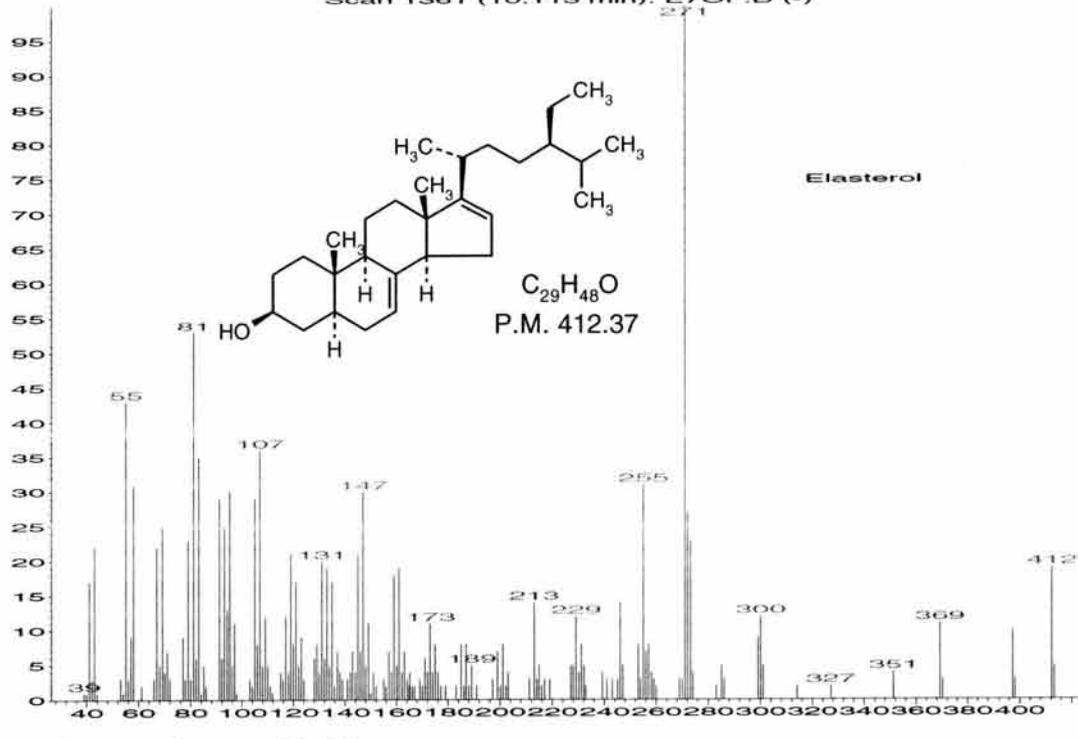
Abundance



Espectro de masas No 7E.

Abundance

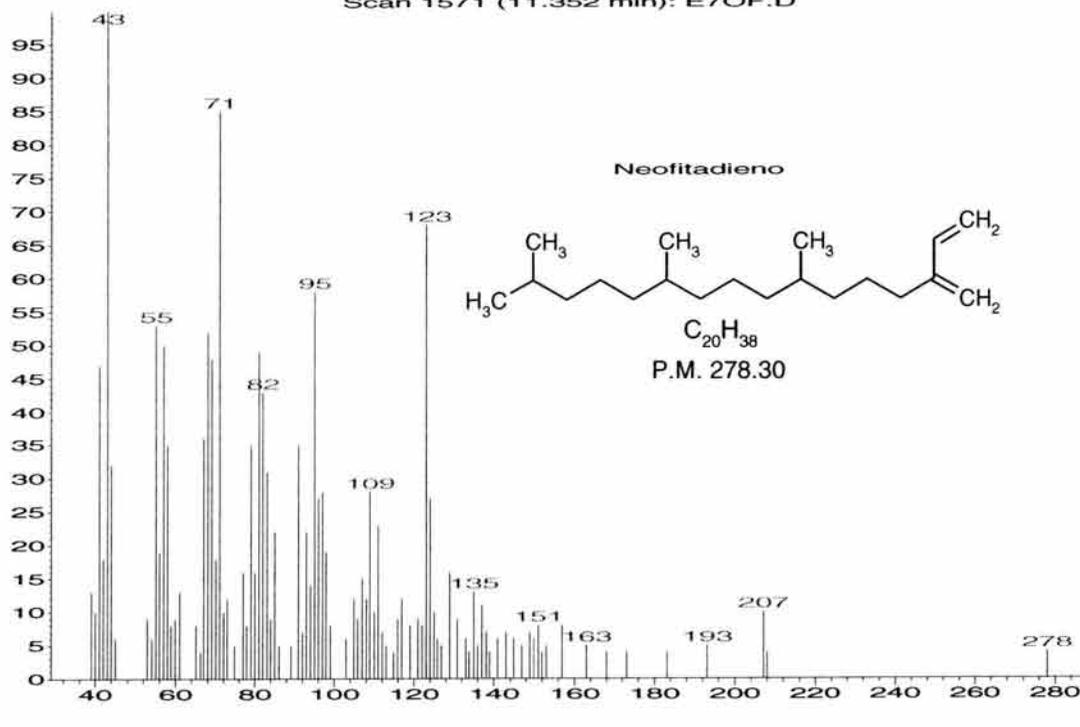
Scan 1361 (10.113 min): E7OF.D (-)



Espectro de masas No 8E.

Abundance

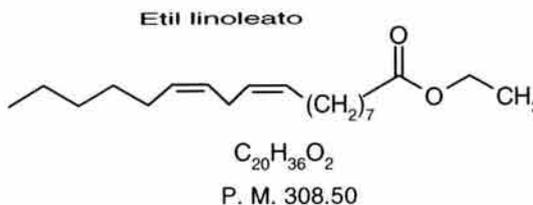
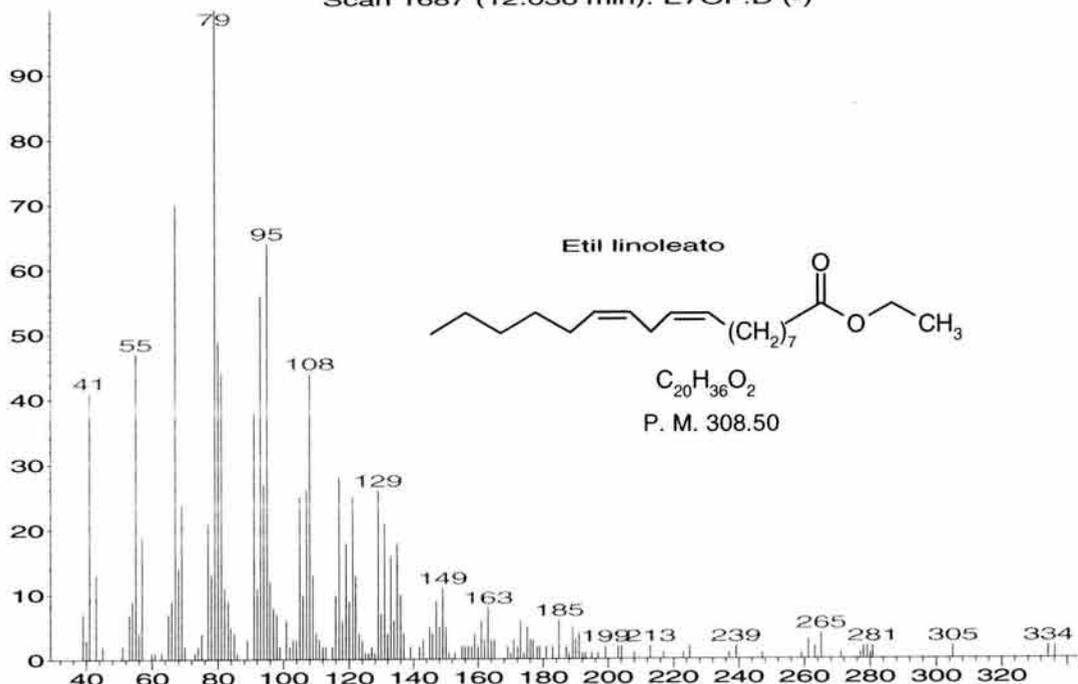
Scan 1571 (11.352 min): E7OF.D



Espectro de masas No 9E.

Abundance

Scan 1687 (12.036 min): E7OF.D (-)

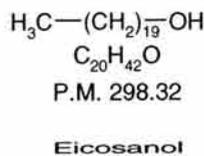
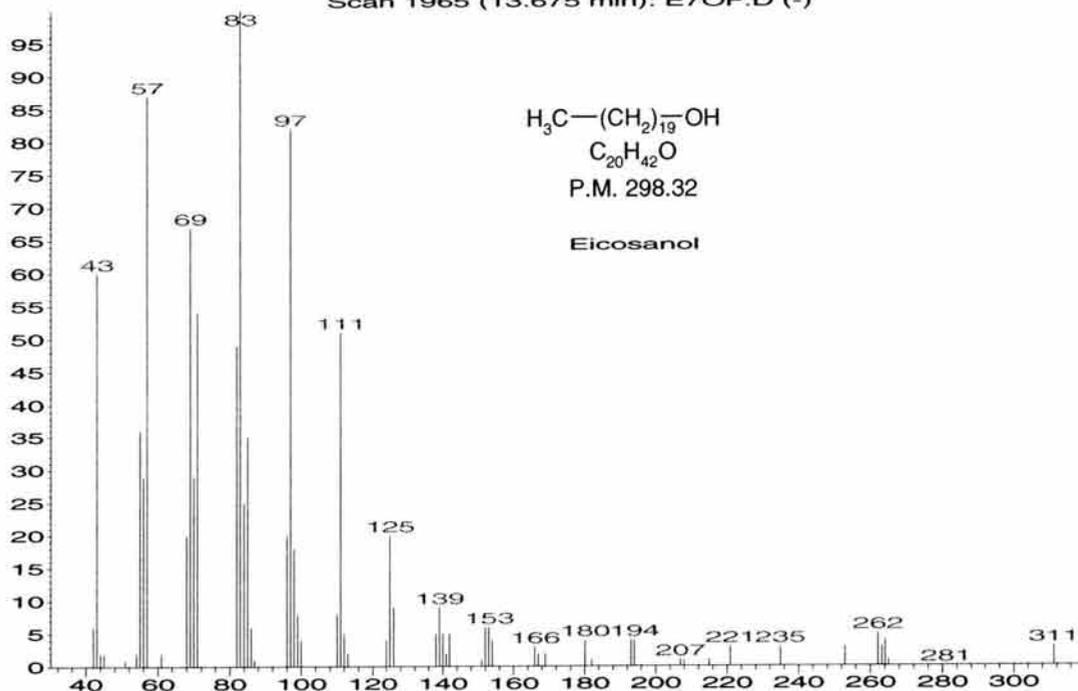


m/z-->

Espectro de masas No 10E.

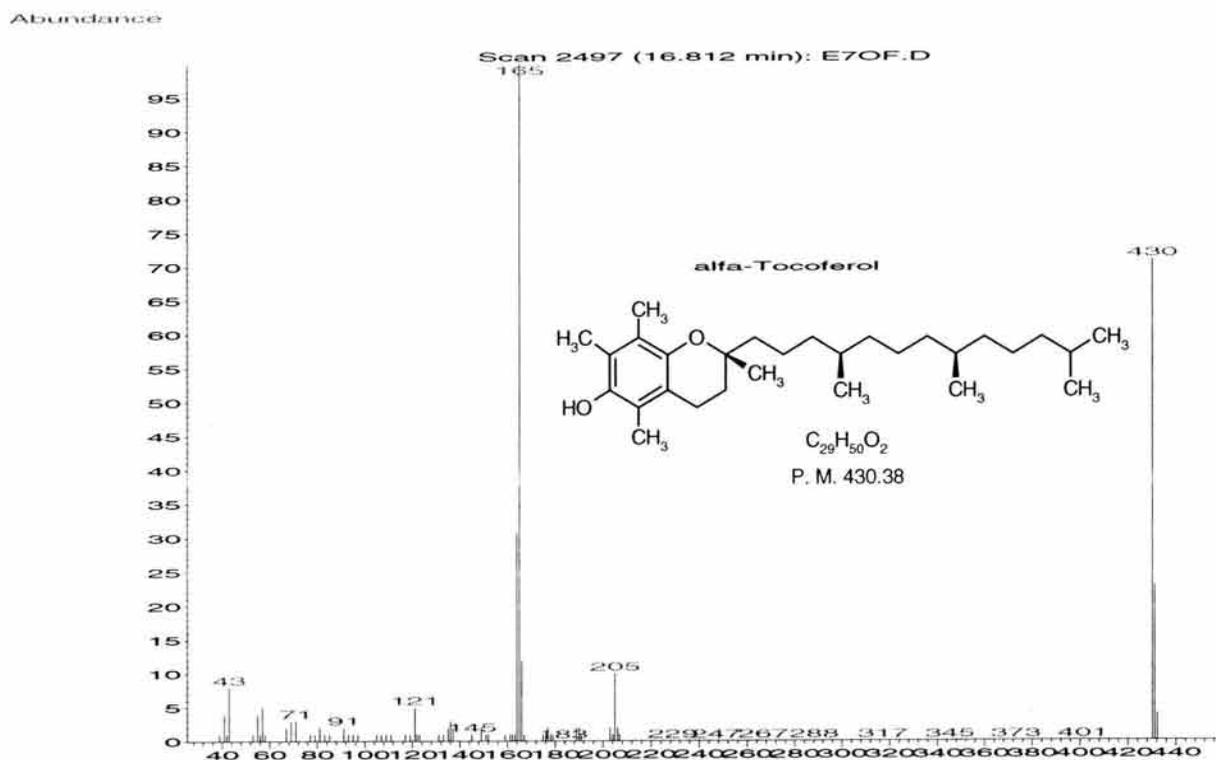
Abundance

Scan 1965 (13.675 min): E7OF.D (-)

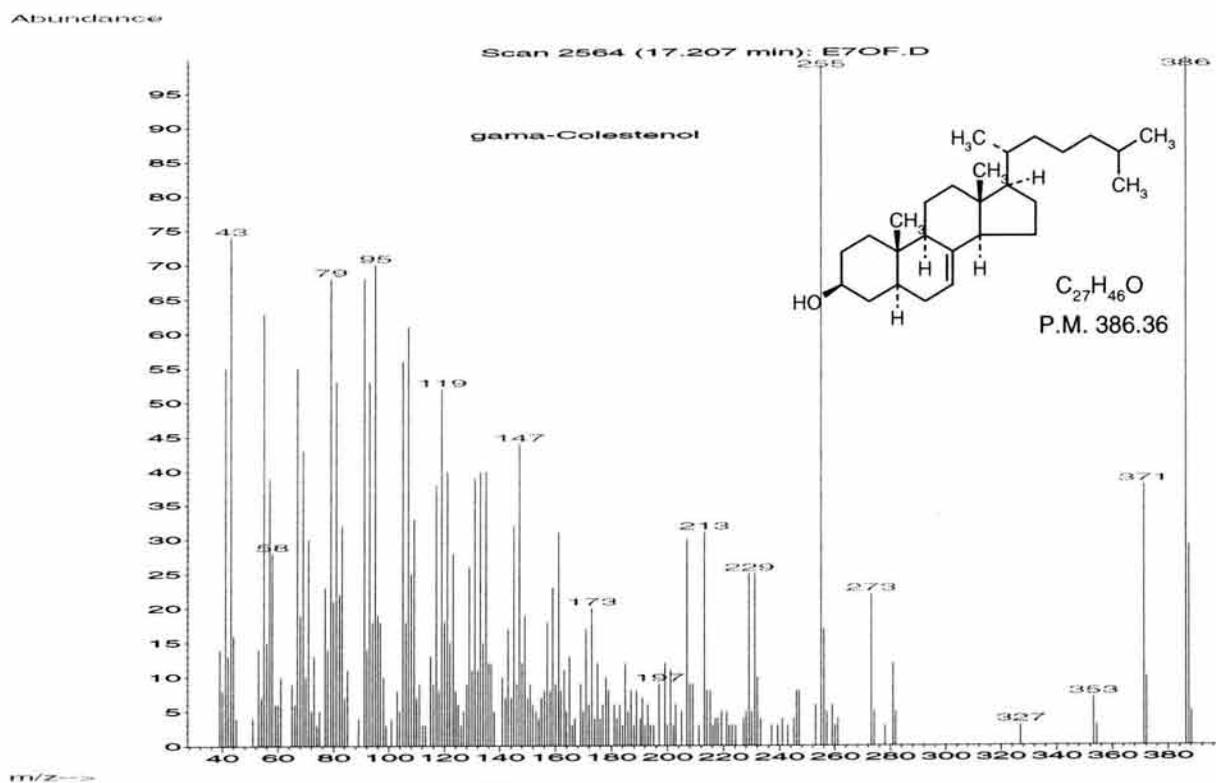


m/z-->

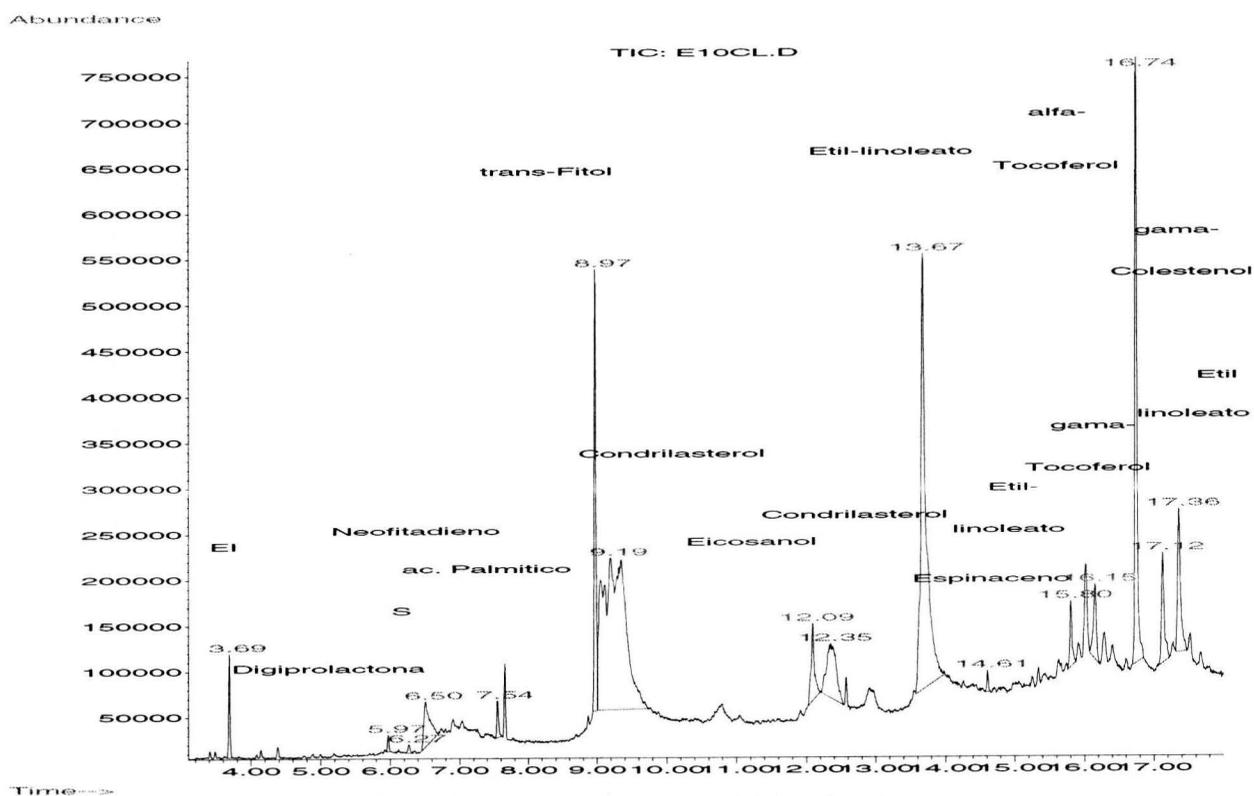
Espectro de masas No 11E.



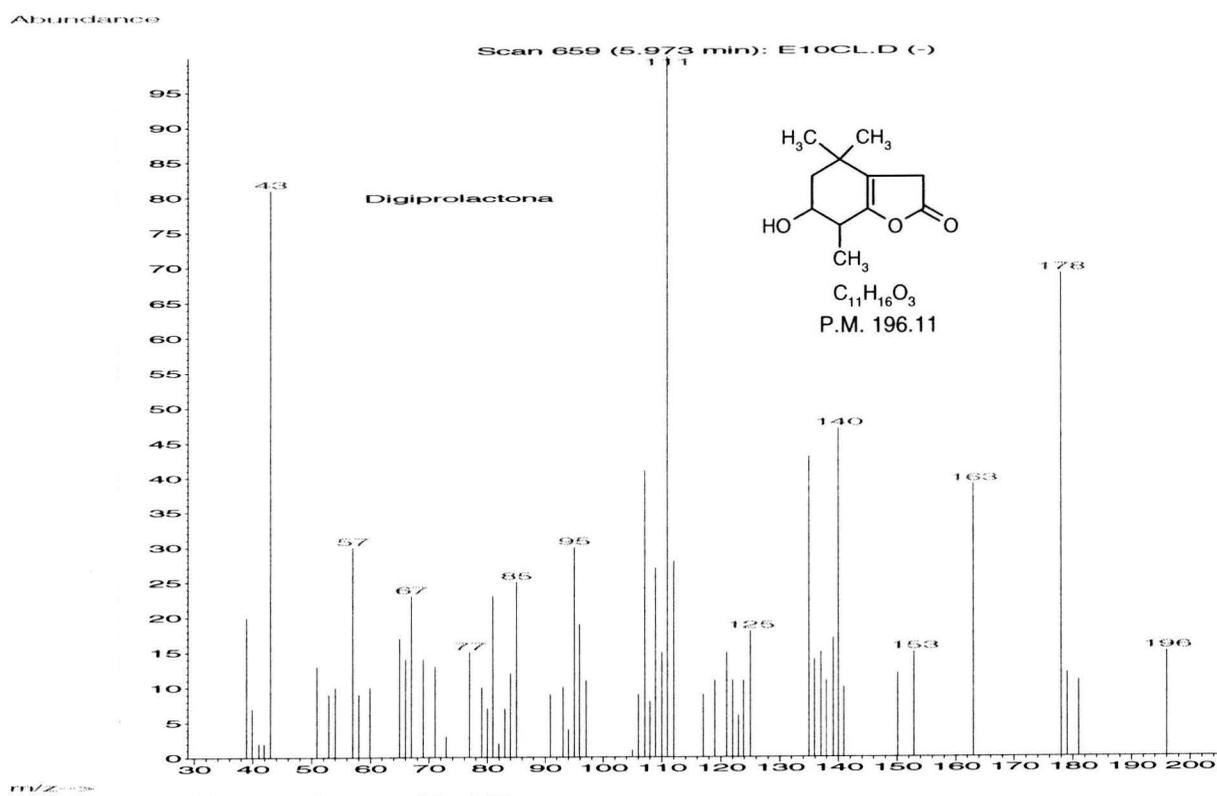
Espectro de masas No 14E.



Espectro de masas No 15E.



Cromatograma No E-4. Extracción para plaguicidas clorados.

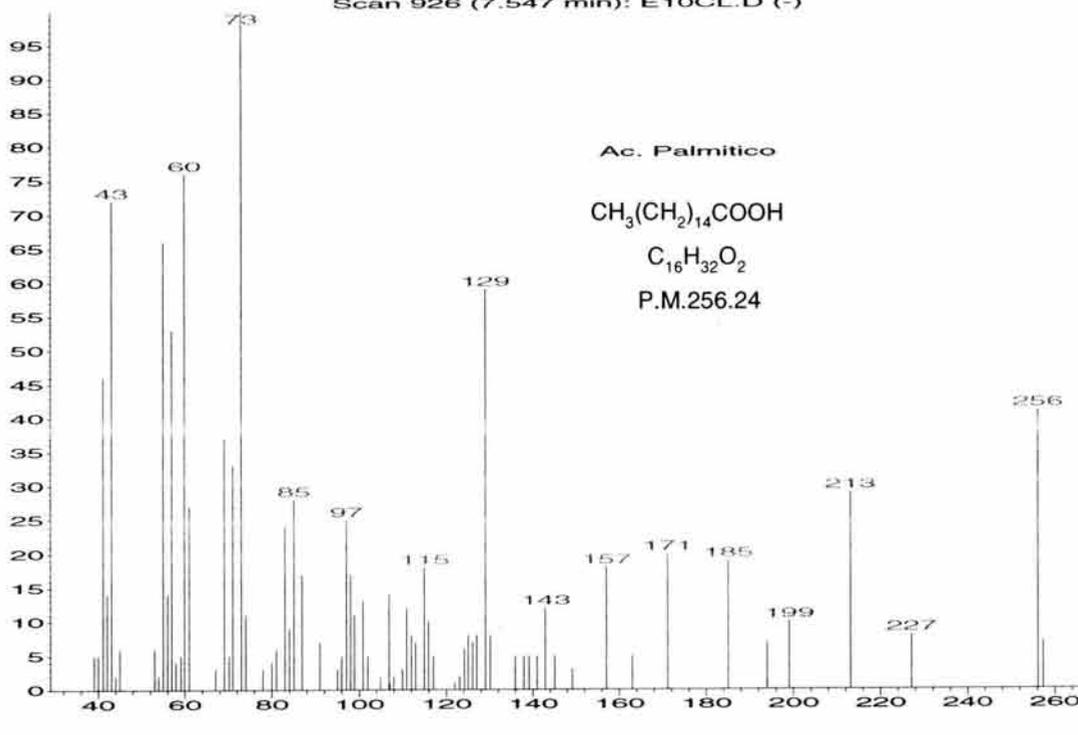


Espectro de masas No 16E.



Abundance

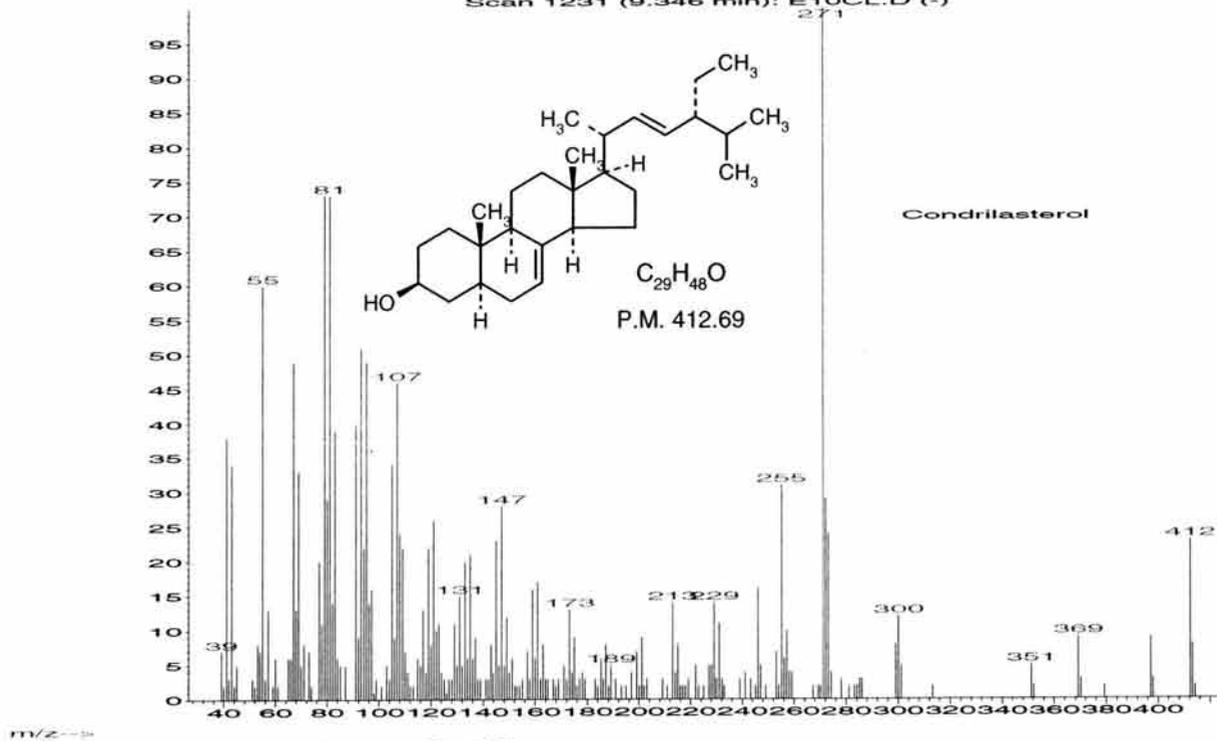
Scan 926 (7.547 min): E10CL.D (-)



Espectro de masas No 17E.

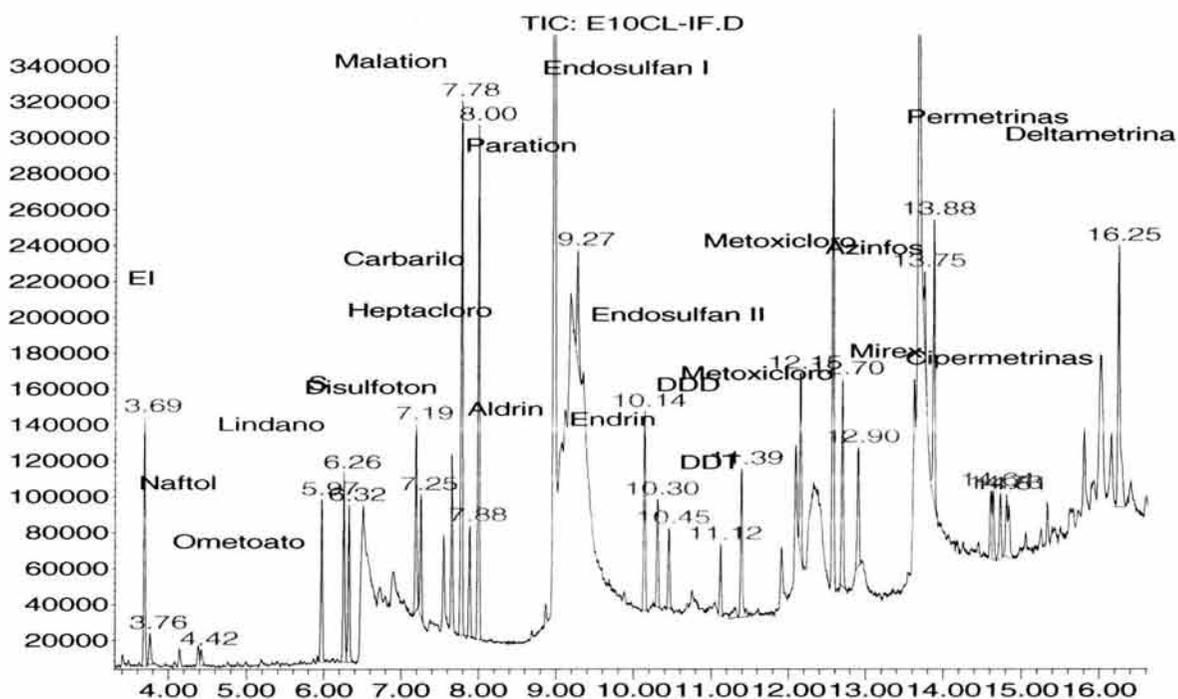
Abundance

Scan 1231 (9.346 min): E10CL.D (-)



Espectro de masas No 18E.

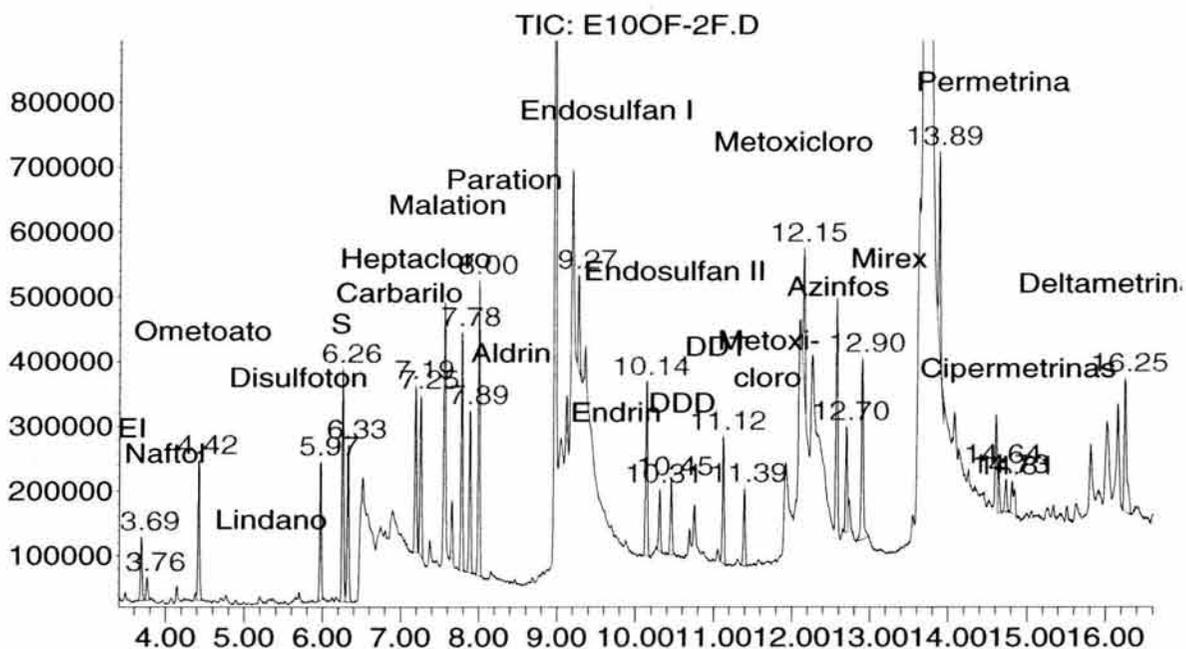
Abundance



Time-->

Cromatograma No E-5. Extracción para plaguicidas clorados de la espinaca adicionada con 4 ppm de plaguicidas aproximadamente. (usando un inserto desactivado)

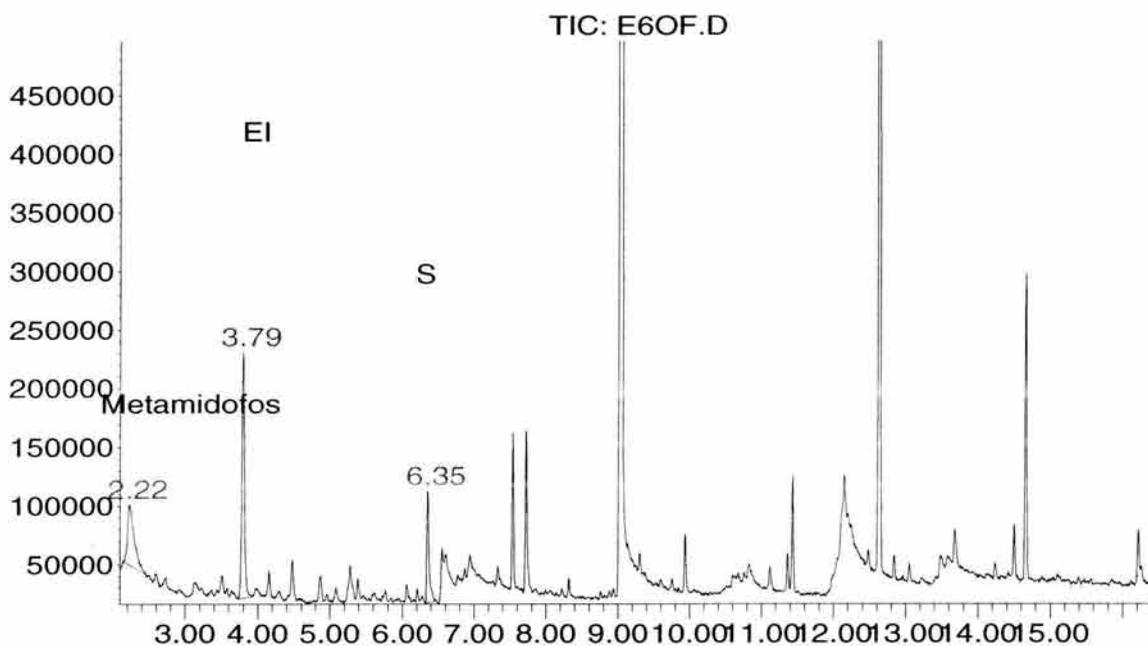
Abundance



Time-->

Cromatograma No E-6. Extracción para plaguicidas fosforados de la espinaca adicionada con 4 ppm de plaguicidas aproximadamente. (usando un inserto desactivado)

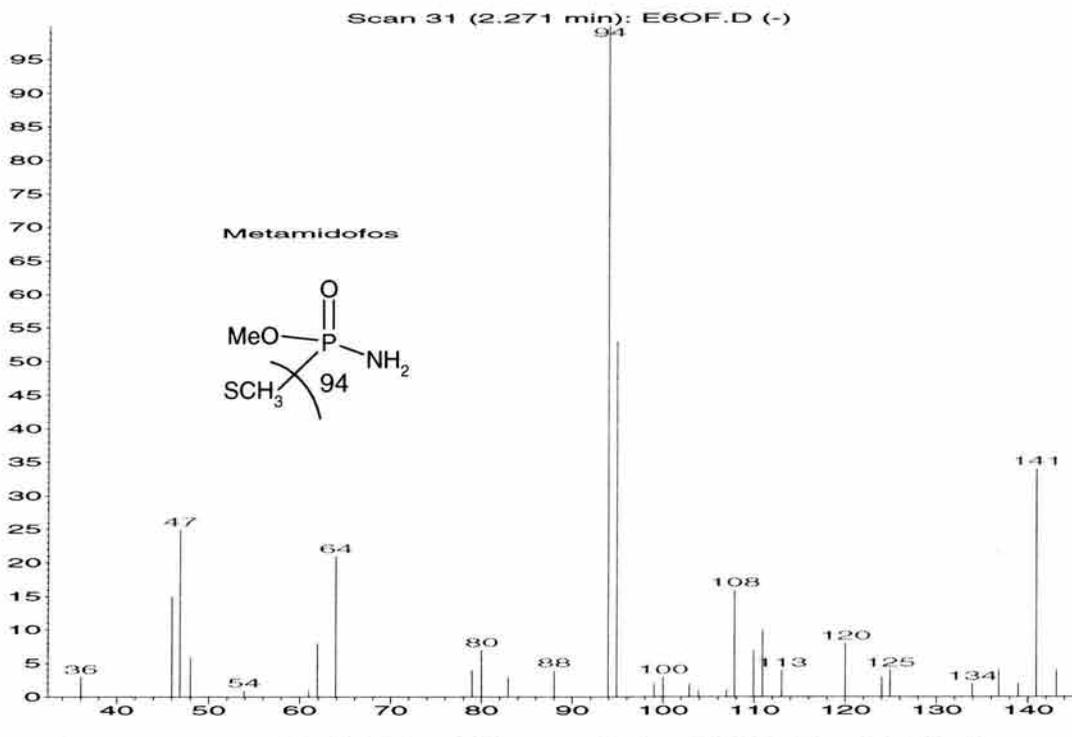
Abundance



Time-->

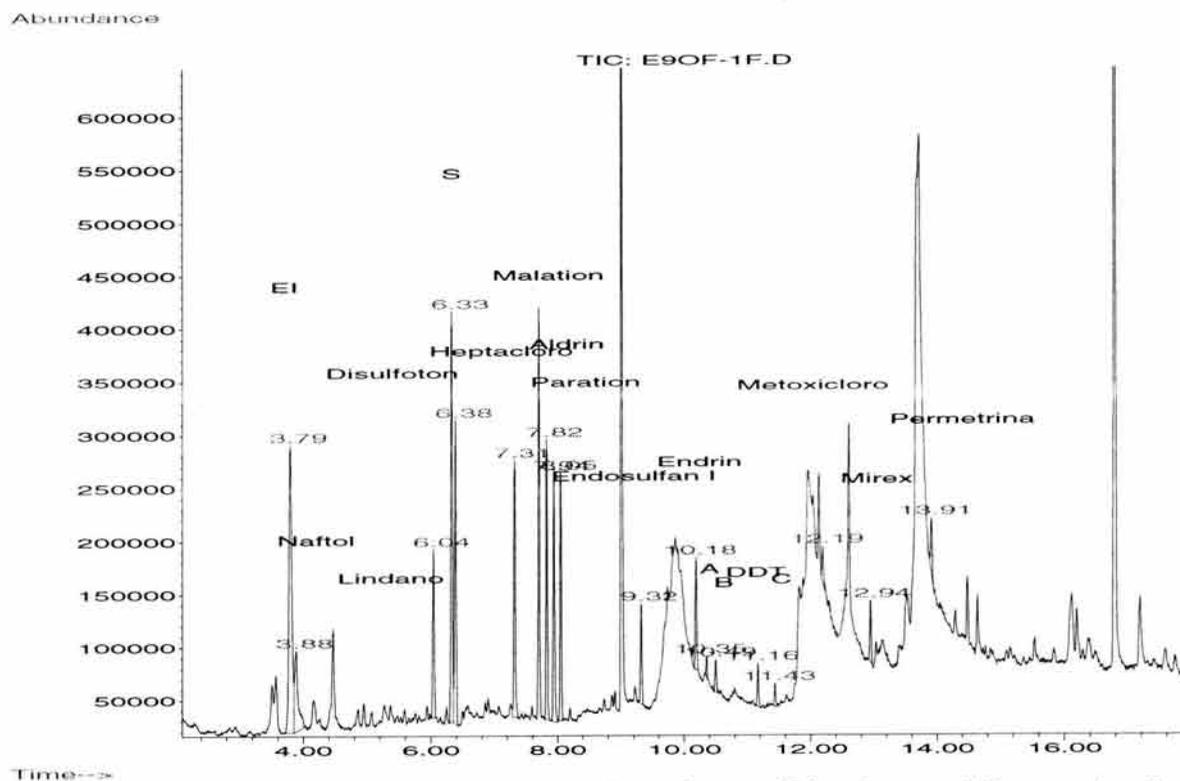
Cromatograma No E-7. Espinaca procedente de Milpa Alta en la cual se detectó metamidofos.

Abundance

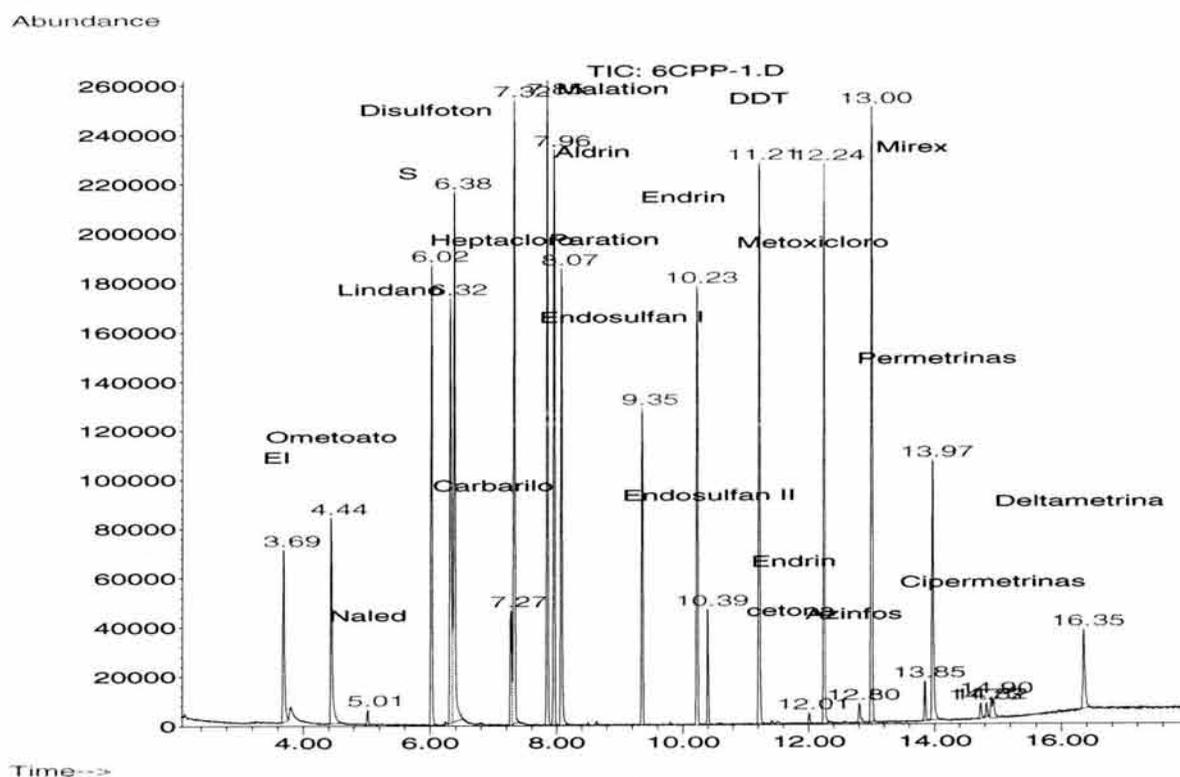


Espectro de masas No 19E. Plaguicida metamidofos, C₂H₈NO₂PS, P.M. 141.13

Apéndice F. Degradación de plaguicidas.

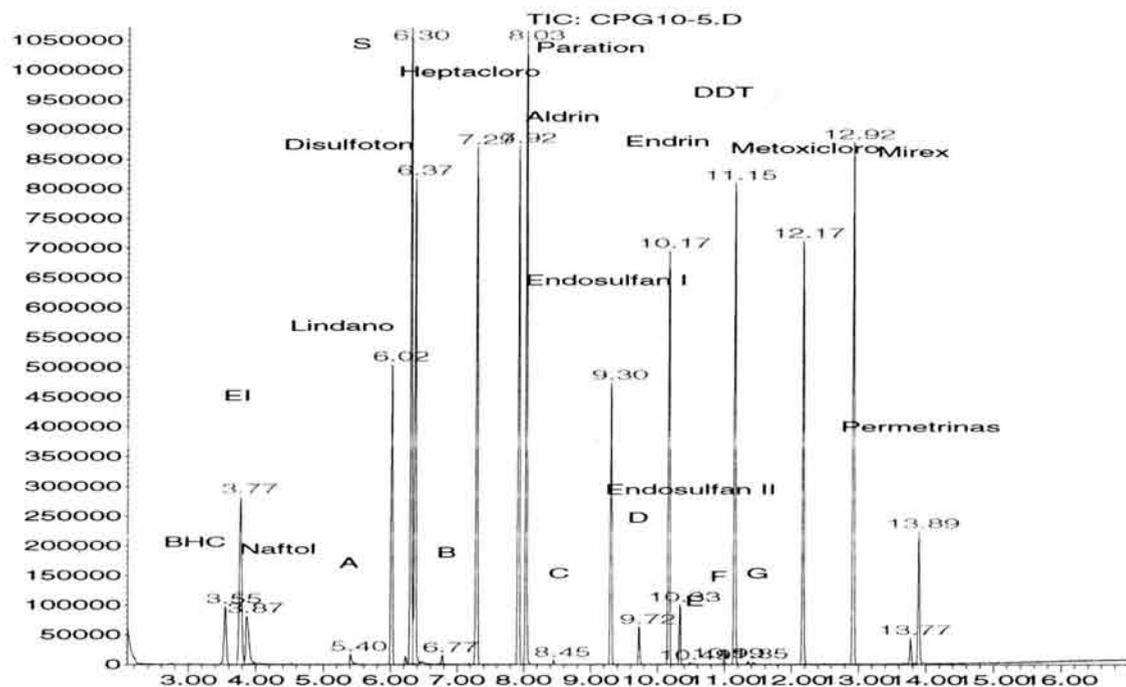


Cromatograma No F-1 Muestra de espinaca adicionada con 1.6 ppm de plaguicidas aproximadamente. (el inserto estaba activo)



Cromatograma No F-2. Estándar de 30 ppm usando un inserto inicial desactivado comercialmente.

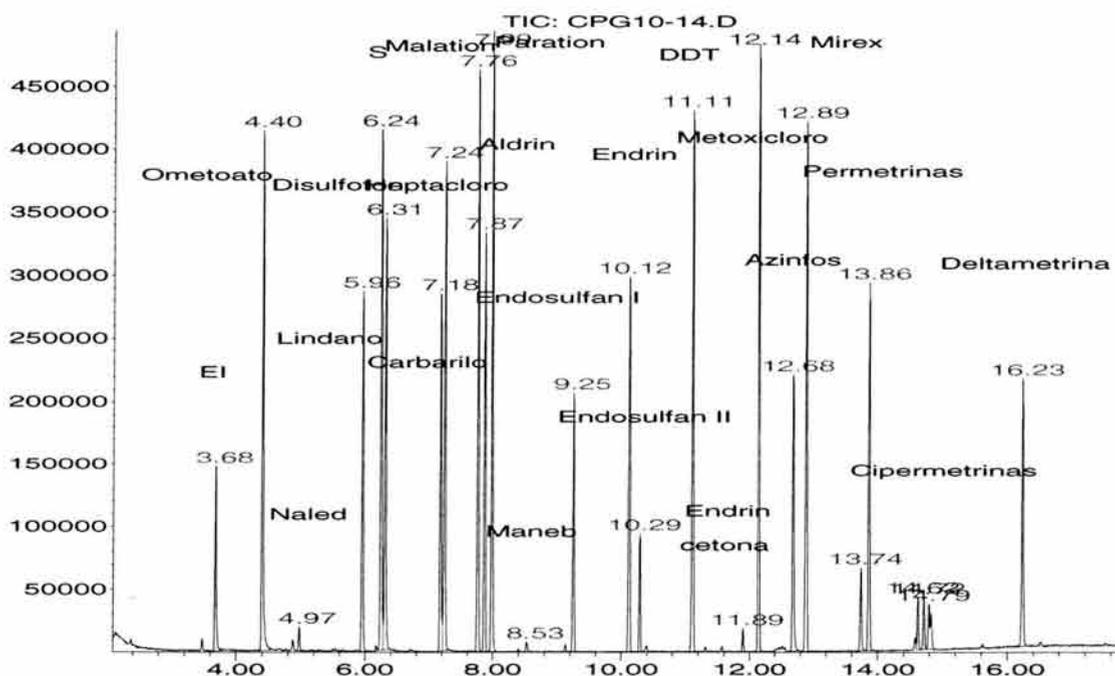
Abundance



Time-->

Cromatograma No F-3. Estándar de 30 ppm usando un inserto activo¹. Los compuestos de degradación presentes son: Naftol; A: 3-Fenoxibenzadehído; B: Endosulfan éter; C: Isodrin; D: DDE; E: DDD; F: Metoxicloro olefina; G: o,p-Metoxicloro

Abundance

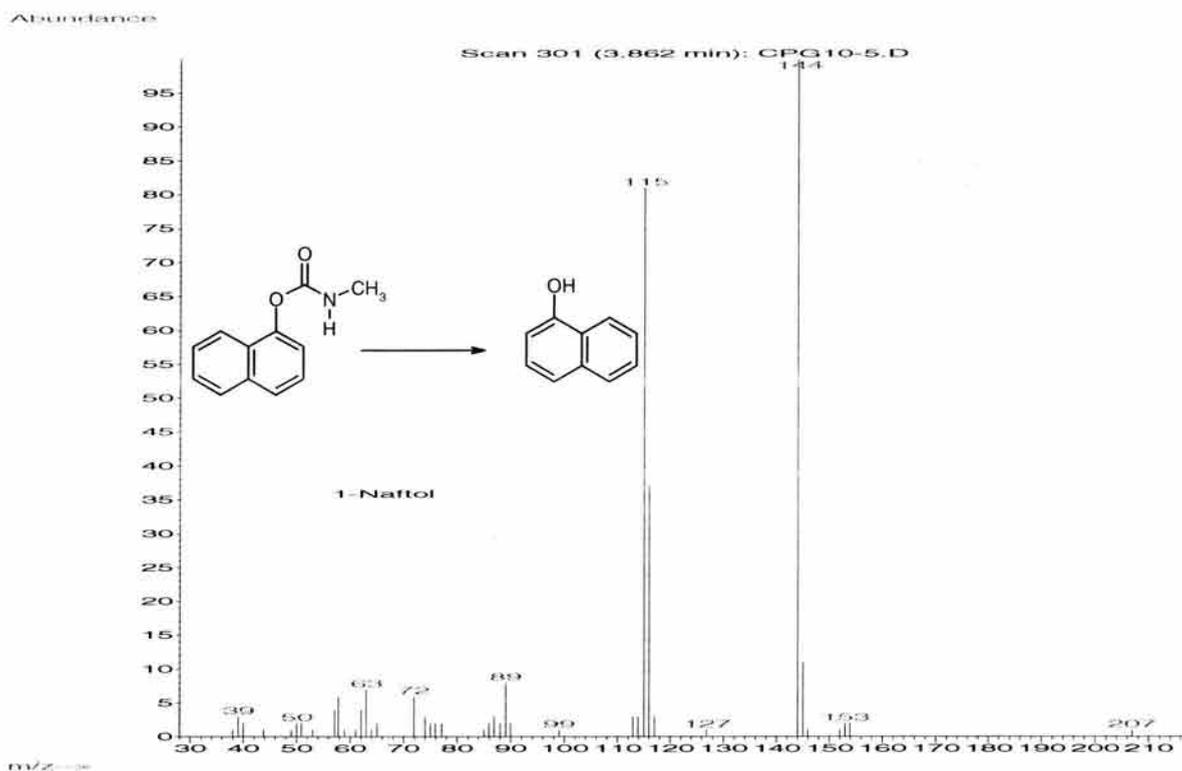


Time-->

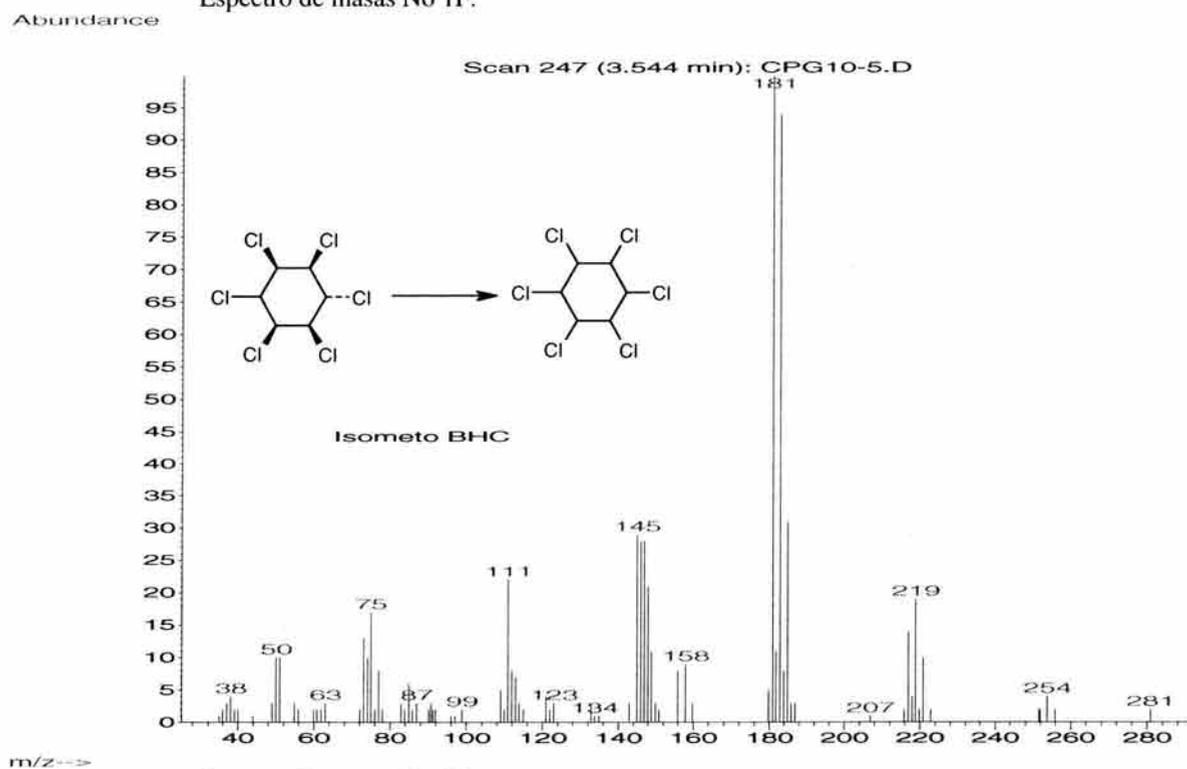
Cromatograma No F-4. Estándar de 30 ppm usando un inserto desactivado en el laboratorio. Todos los plaguicidas no presentan degradación y se obtiene una mejor forma de pico con mayor área y altura.

¹ Nota: El inserto fue activado al inyectar continuamente tanto disoluciones estándar de plaguicidas como muestras (extractos de espinaca).

A continuación se presentan los espectros de masas de los productos de degradación de los plaguicidas antes mencionados²:



Espectro de masas No 1F.

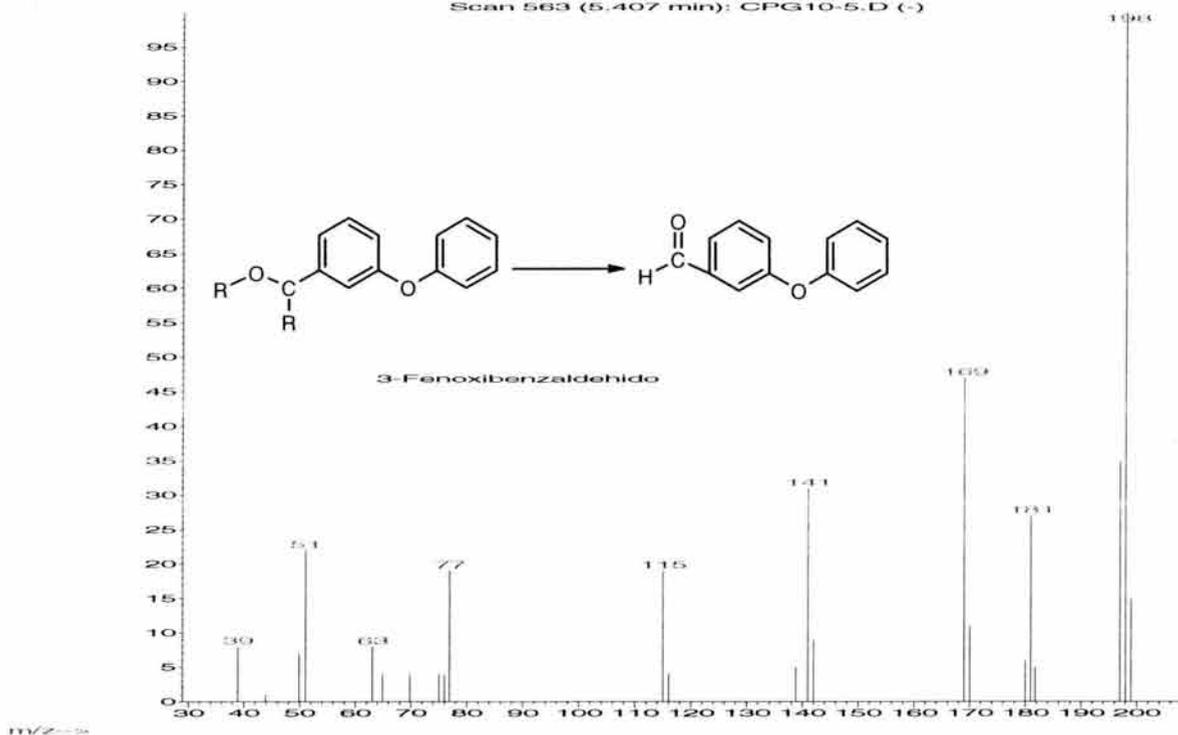


Espectro de masas No 2F.

² Nota: Los plaguicidas Lindano y Aldrin presentan una isomerización y no una degradación como los demás plaguicidas mencionados.

Abundance

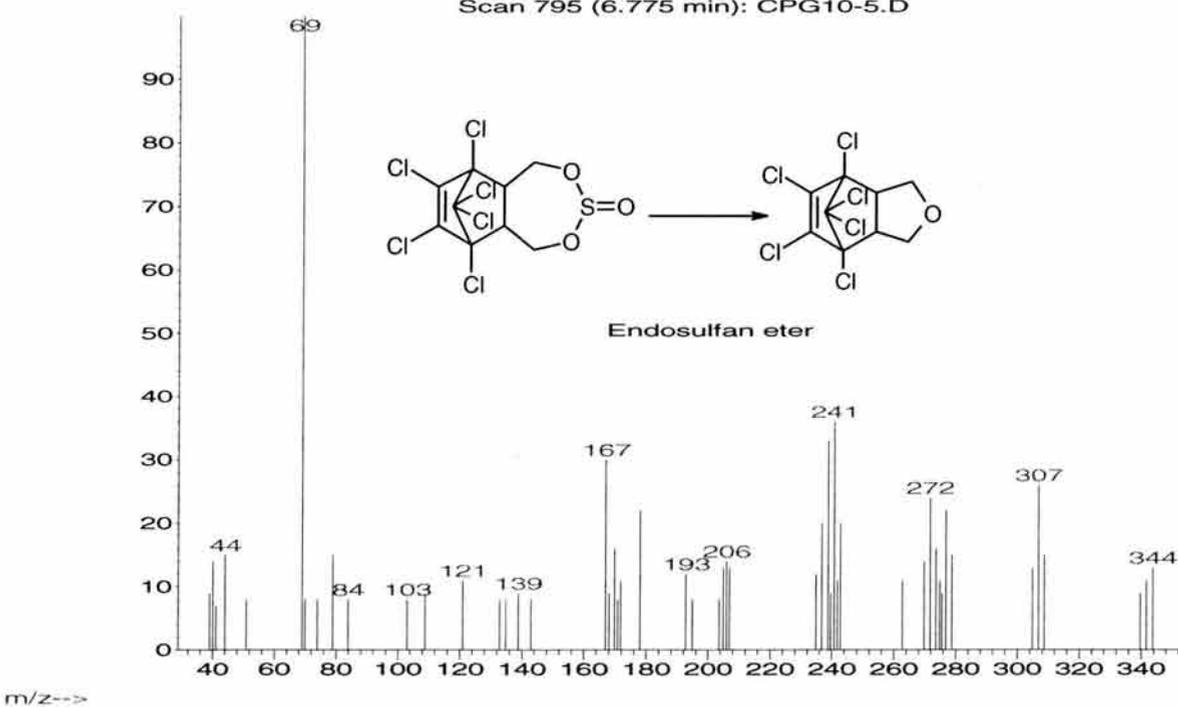
Scan 563 (5.407 min): CPG10-5.D (-)



Espectro de masas No 3F.

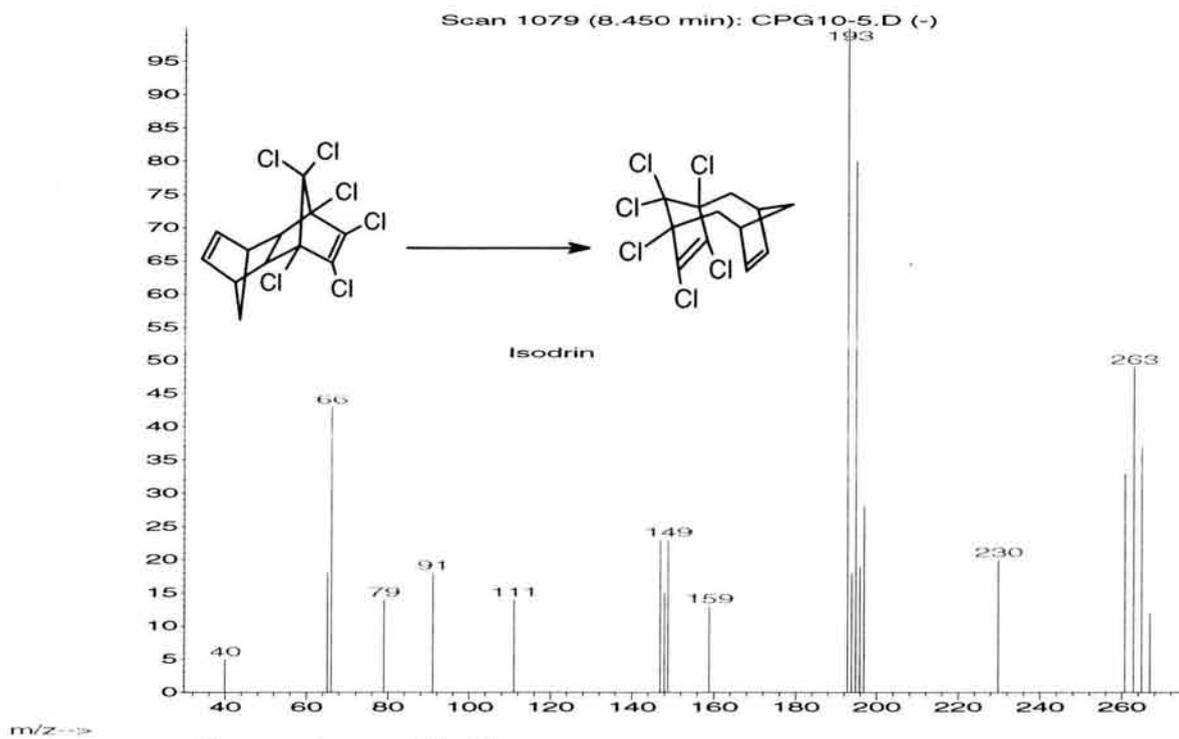
Abundance

Scan 795 (6.775 min): CPG10-5.D

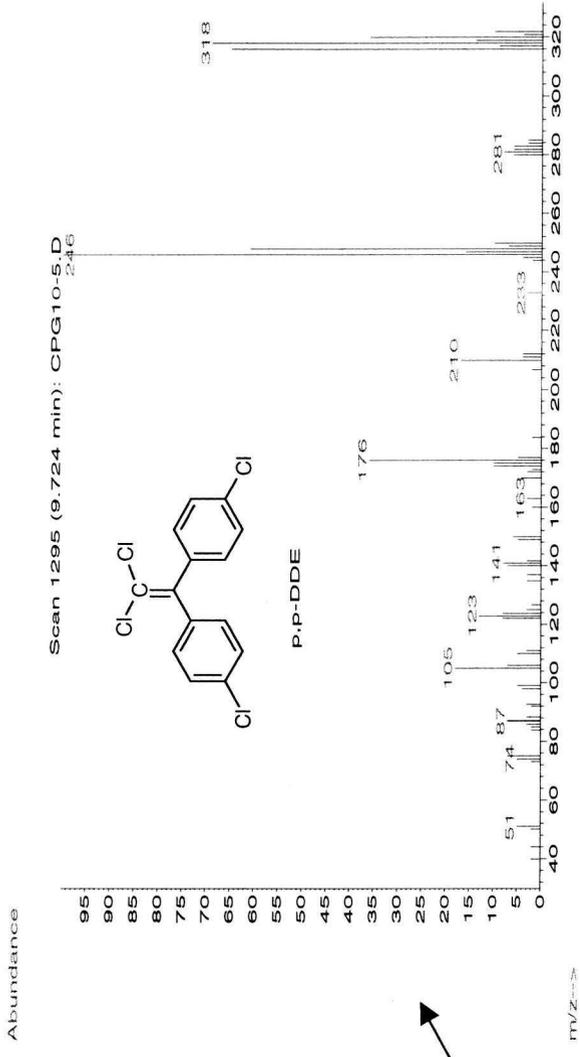


Espectro de masas No 4F

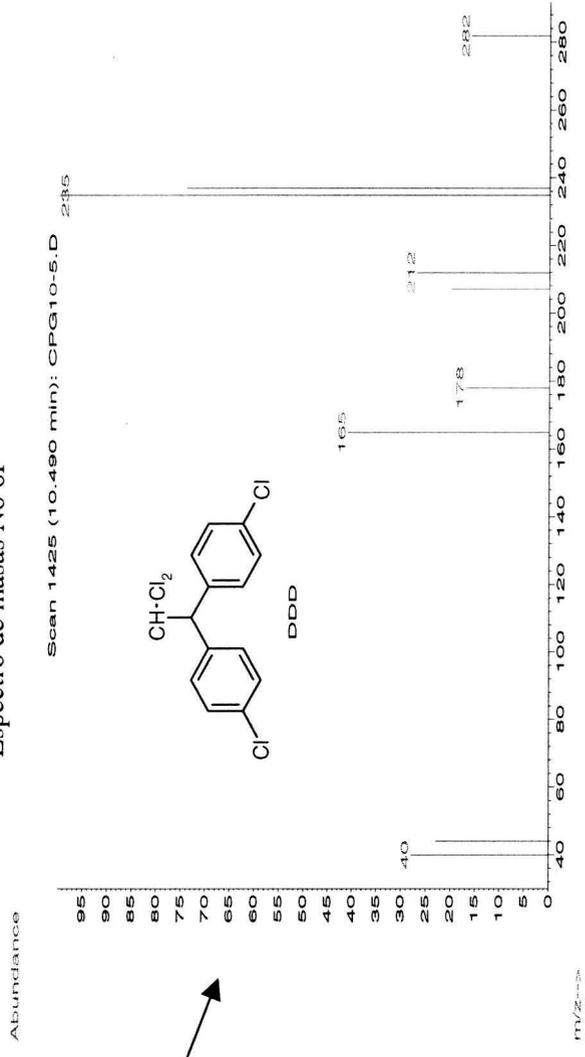
Abundance



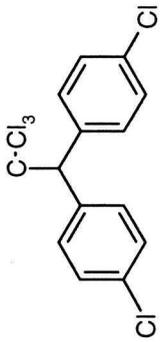
Espectro de masas No 5F



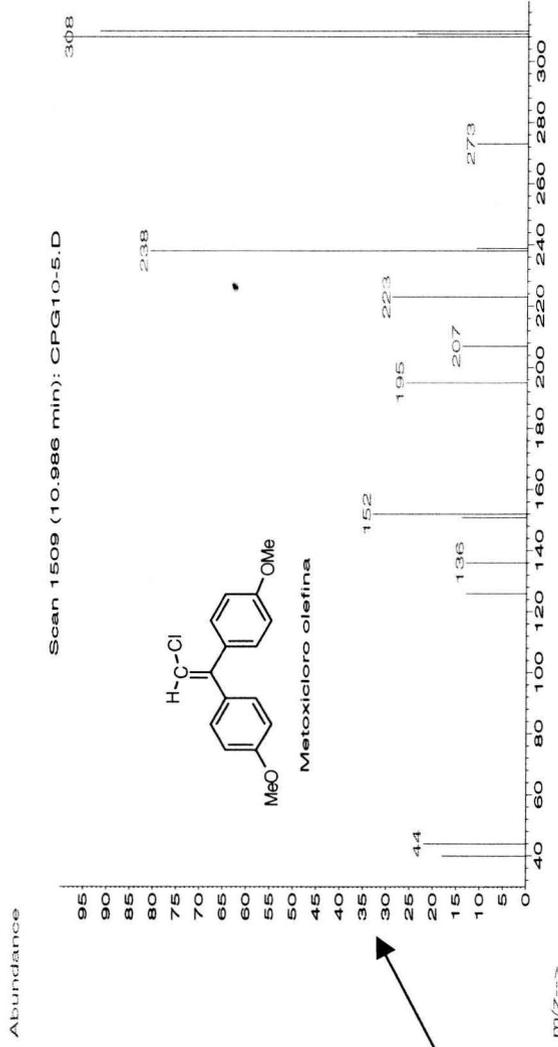
Espectro de masas No 6F



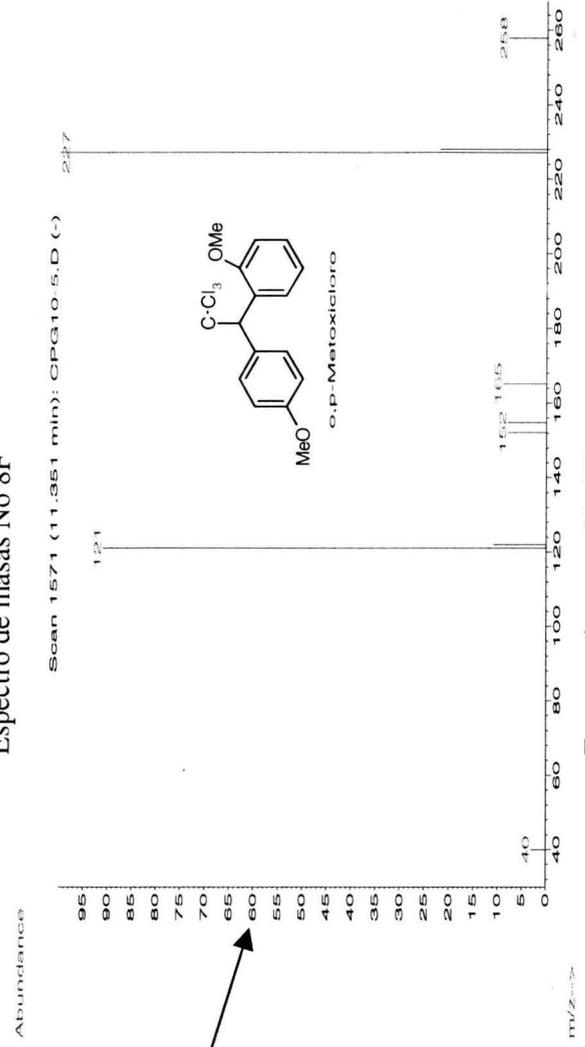
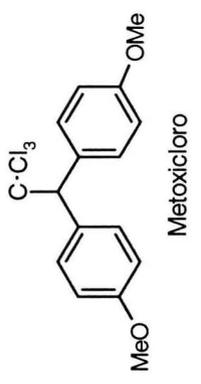
Espectro de masas No 7F



DDT



Espectro de masas No 8F



Espectro de masas No 9F



Ejemplo de cálculo de porcentaje de descomposición para DDT conforme el Método 8081A de la EPA:

$$\%Descomposición = \frac{\sum \text{áreas de los picos de degradación (DDD + DDE)}}{\sum \text{áreas de todos los picos (DDD + DDE + DDT)}} * 100$$

Silanización del inserto:

Lavar el inserto asegurándose que quede bien limpio (de ser necesario hasta con ácido nítrico concentrado), colocarlo en una ampolleta y adicionar 3 gotas de hexametildisilazano, sellar la ampolleta. Colocar dicha ampolleta en un horno y elevar la temperatura hasta 150 ° C después de 1 h a dicha temperatura elevarla hasta 300 ° C y mantener a dicha temperatura por 24 h.

Se saca la ampolleta del horno y se deja enfriar. El inserto se lava 3 veces en ultrasonido con los siguientes disolventes, tolueno, cloruro de metileno y acetona 15 minutos con cada disolvente, los cuales han sido secados previamente con sulfato de sodio anhidro; posteriormente se seca el inserto al vacío.

Silanización de la lana de vidrio:

En un vial de 40 ml con tapa de teflón se coloca la lana de vidrio y se llena con una solución de 5 – 10 % de dimetildiclorosilano + trimetilclorosilano (1:1) en tolueno. Mantener el vial a 80 ° C por 24 h.

Lavar la lana de vidrio en ultrasonido con tolueno por 15 minutos, repetir el procedimiento con los siguientes disolventes, cloruro de metileno, acetona, metanol y acetona. Secar en estufa a una temperatura de 50 a 60 ° C. (48)