



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y
DOCTORADO EN CIENCIAS
QUÍMICAS**

**DETERMINACIÓN DE RESIDUOS DE PLAGUICIDAS
ORGANOFOSFORADOS EN HÍGADO DE RES MEDIANTE DISPERSIÓN DE
MATRIZ EN FASE SÓLIDA Y CROMATOGRFÍA DE LÍQUIDOS CON
DETECCIÓN UV.**

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Q. MARÍA DE LA LUZ REYES REYES

TUTOR:
DRA MARTHA PATRICIA GARCÍA CAMACHO



AÑO: 2006



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (**CONACYT**) y a la Dirección General de Estudios de Posgrado (**DGEP**) de la UNAM por las becas otorgadas.

A la **Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA)**, proyecto PAPIIT IN203302 “Extracción de contaminantes orgánicos en adsorbentes con matrices biológicas dispersas” por el financiamiento aportado y la beca otorgada.

Al Seminario Académico José Herrán Arellano de la Facultad de Química de la UNAM por el financiamiento otorgado.

A la Dra. Martha Patricia García Camacho
por su dirección y apoyo.

A la Dra. Lucía Angélica García Camacho y al Dr. Ignacio Rangel
por facilitarnos las muestras de hígado de res con lesiones patológicas.

A la Dra. Araceli Patricia Peña Álvarez
por su asesoría técnica.

A la UNAM
por contribuir en mi formación académica.

Esta tesis fue realizada en
el Laboratorio B-201
de la Facultad de Química de la UNAM

ÍNDICE GENERAL

Página

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE TABLAS

ÍNDICE DE FIGURAS

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

RESUMEN

ABSTRACT

INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES	
1.1. Residuos de plaguicidas en los tejidos del ganado bovino.	5
1.2. Propiedades de los plaguicidas organofosforados.	
1.2.1. Estructura química.	8
1.2.2. Toxicología.	10
1.2.3. Efectos secundarios en los organismos.	11
1.2.4. Metabolismo.	12
1.2.5. Propiedades fisicoquímicas.	13
1.3. Determinación de plaguicidas organofosforados en tejido animal.	15
1.3.1. Generalidades sobre los métodos de preparación de muestras.	16
1.3.2. Análisis de plaguicidas organofosforados por cromatografía de líquidos con detección por espectrofotometría UV de arreglo de diodos.	22
1.3.3. Metodologías publicadas para la determinación de plaguicidas organofosforados en tejidos de res.	23
1.4. Dispersión de matriz en fase sólida (DMFS).	27
1.4.1. Factores que afectan la dispersión de matriz en fase sólida.	30
1.4.2. Ventajas de la DMFS como técnica de extracción para matrices complejas.	32
1.4.3. Aplicación de la dispersión de matriz en fase sólida para el análisis de compuestos orgánicos en tejidos animales.	33

compuestos orgánicos en tejidos animales.

CAPITULO 2. DESARROLLO EXPERIMENTAL

2.1. Materiales y equipos.	36
2.2. Métodos.	38
2.2.1. Separación analítica y detección de los plaguicidas organofosforados.	40
2.2.2. Desarrollo del método de la preparación de la muestra.	41
2.2.2.1. Preparación de la columna de dispersión.	41
2.2.2.2. Observación microscópica de los adsorbentes y las fases dispersas.	41
2.2.2.3. Programa de elución selectiva de los plaguicidas organofosforados.	43
2.2.2.4. Tiempo de fortificación.	44
2.2.2.5. Ajustes en el programa de elución por incremento en la cantidad de la muestra.	44
2.2.2.6. Concentración del extracto.	45
2.2.2.7. Limpieza del extracto con adsorbentes.	46
2.2.2.8. Modificación de la matriz por incorporación de surfactante.	46
2.3. Evaluación del método.	
2.3.1. Estudios de recobro.	47
2.3.2. Linealidad y reproducibilidad del método.	47
2.3.3. Límites de detección y cuantificación del método.	48
2.4. Evaluación del método con la matriz del músculo de res.	49
2.5. Aplicación del método.	49
2.5.1. Confirmación de la presencia de clorpirifos y clorfenvinfos en las muestras de hígado por Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas.	49

CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Detección y separación analítica de los plaguicidas organofosforados.	52
3.1.1. Condiciones óptimas para la detección.	52
3.1.2. Estudio del comportamiento cromatográfico de los plaguicidas.	54

3.1.3. Linealidad, precisión, límite de detección y límite de cuantificación del sistema CLAR-DAD.	58
3.2. Preparación de la muestra.	
3.2.1. Preparación de la columna de dispersión con hígado de res.	59
3.2.2. Observación microscópica de los adsorbentes y las fases dispersas.	60
3.2.3. Programa de elución selectiva de los plaguicidas organofosforados.	63
3.2.4. Tiempo de fortificación.	72
3.2.5. Ajustes en el programa de elución por incremento en la cantidad de muestra.	73
3.2.6. Concentración del extracto.	76
3.2.7. Limpieza del extracto con adsorbentes.	81
3.2.8. Modificación de la matriz por incorporación de surfactante.	84
3.3. Evaluación del método.	
3.3.1. Estudios de recobro.	87
3.3.2. Linealidad y reproducibilidad del método.	88
3.3.3. Límites de detección y cuantificación del método.	88
3.4. Evaluación del método con la matriz de músculo de res.	89
3.5. Aplicación del método en muestras de hígados de res con lesiones patológicas.	92
3.5.1. Confirmación de la presencia de clorpirifos y clorfenvinfos en las muestras de hígado de res por Cromatografía de Gases- Espectrometría de Masas.	94
3.6. Comparación del protocolo para la determinación de residuos de plaguicidas organofosforados en hígado de res por DMFS-CLAR-DAD con el método oficial mexicano (NOM-028-ZOO-1995).	97
CONCLUSIONES	99
PERSPECTIVAS	100
BIBLIOGRAFÍA	101
APENDICE A. Características de los plaguicidas en estudio.	107
APÉNDICE B. Gráficas de regresión lineal.	112

ÍNDICE DE TABLAS

Número de tabla	Página
1.1. Límites máximos de residuos de plaguicidas organofosforados, (mg/Kg o ppm) en base húmeda en hígado y músculo de bovinos. Modificación a la NOM-004-ZOO-1994, 2001.	8
1.2. Clasificación de los plaguicidas organofosforados de acuerdo a los sustituyentes de los átomos de hidrógeno en el ácido fosfónico o fosfórico. (Lacorte and Barcelo, 2000; Hassall, 1990)	9
1.3. Toxicología de algunos plaguicidas organofosforados. (CICOPLAFEST, 1997; <i>The British Crop Protection Council and the Royal Society of Chemistry, 1994</i>)	12
1.4. Propiedades fisicoquímicas de algunos insecticidas organofosforados. (<i>The British Crop Protection Council and the Royal Society of Chemistry, 1994</i>)	14
1.5. Métodos para la determinación de plaguicidas organofosforados en músculo e hígado de res.	25
1.6. Aplicación de la DMFS en tejidos animales (2000 – 2005).	34
2.1. Ensayos para optimizar la elución.	43
3.1. Longitud de onda de máxima absorción y de cuantificación de los plaguicidas organofosforados.	52
3.2. Retención de los plaguicidas en estudio en la columna de sílice C18. Con flujo de 1 mL min ⁻¹ y composición de la fase móvil etanol: agua 80:20.	54
3.3. Tiempo de retención de los plaguicidas con un gradiente lineal de 70% a 100% de metanol en 10 minutos.	57
3.4. Linealidad del sistema CLAR-DAD.	58
3.5. Reproducibilidad del sistema CLAR-DAD. Coeficientes de variación (en %) del área para tres inyecciones de una muestra por cada nivel de concentración.	58
3.6. Límites de detección del sistema CLAR-DAD.	59
3.7. Ensayo 1: Elución con la mezcla metanol:agua 7:3. Cartucho de dispersión de 100 mg de hígado de res en 400 mg de sílice C18. Fortificación: 75 µg g ⁻¹ .	63
3.8. Ensayo 2: Elución con mezcla agua:metanol de polaridad decreciente. Cartucho de dispersión de 100 mg de hígado de res en 400 mg de sílice C18. Fortificación: 75 µg g ⁻¹ .	64
3.9. Ensayo 3: Optimización de la limpieza previa a la elución. Cartucho de dispersión de 100 mg de hígado de res en 400 mg de sílice C18. Fortificación: 75 µg g ⁻¹ .	65
3.10. Ensayo 4: Optimización de la limpieza previa a la elución. Cartucho de dispersión de 100 mg de hígado de res en 400 mg de sílice C18. Fortificación: 75 µg g ⁻¹ .	65
3.11. Ensayo 5: Optimización de la limpieza previa a la elución. Cartucho de dispersión de 100 mg de hígado de res en 400 mg de sílice C18. Fortificación: 75 µg g ⁻¹ .	66
3.12. Ensayo 6a. Elución de los plaguicidas organofosforados del cartucho de dispersión de estándares en sílice C18. Fortificación: 18.75 µg g ⁻¹ de sílice C18.	67
3.13. Ensayo 6b. Elución de los plaguicidas organofosforados del cartucho de dispersión de 100 mg de hígado de res fortificado (75 µg g ⁻¹) en 400 mg de sílice C18.	68
3.14. Recobro global y sus coeficientes de variación para los cinco plaguicidas con el programa de elución del ensayo 6b del cartucho de dispersión de 100 mg de hígado de res en 400 mg de sílice C18. Fortificación: 75 µg g ⁻¹ .	70
3.15. Recobro después de los diferentes tiempos de equilibrio para la fortificación, se presenta el promedio para tres muestras, y la dispersión está dada como coeficiente de variación porcentual.	72
3.16. Recobro de los plaguicidas de un cartucho de dispersión de 500 mg de hígado de res fortificado con 20 µg g ⁻¹ en 2.0 g de sílice C18 con diferentes porcentajes de	74

res fortificado con $20 \mu\text{g g}^{-1}$ en 2.0 g de sílice C18 con diferentes porcentajes de metanol y acetonitrilo en agua.	
3.17. Recobros de los plaguicidas en los extractos con acetonitrilo 80% antes y después de evaporar (n=3). Fortificación $20 \mu\text{g g}^{-1}$.	76
3.18. Recobro de los plaguicidas organofosforados de un cartucho de dispersión de 500 mg de hígado de res fortificado con $10 \mu\text{g g}^{-1}$ en 2.0 g de sílice C18 con acetonitrilo puro.	77
3.19. Estudio, con solución estándar, de los recobros después de la evaporación a sequedad en rotavapor a 40°C , 200 mbar y 60 rpm.	78
3.20. Recobro del método a nivel de $1 \mu\text{g g}^{-1}$ de plaguicida en hígado de res.	80
3.21. Recobros (%) de los plaguicidas organofosforados después de la limpieza con adsorbentes. Concentración en hígado $10 \mu\text{g g}^{-1}$.	81
3.22. Recobro de los plaguicidas después de la limpieza del extracto a través de un cartucho con 0.5 g de gel de sílice acondicionado con 15 mL de acetonitrilo. Fortificación $10 \mu\text{g g}^{-1}$.	82
3.23. Recobro (%) de los plaguicidas cuando se ha modificado la matriz con heptanosulfonato de sodio (HS).	85
3.24. Recobro (%) de los plaguicidas organofosforados a 6 niveles de concentración, empleando el método mostrado en la figura 3.14. La dispersión de los datos está dada como desviación estándar (n=3).	87
3.25. Recobro del método (cantidad adicionada vs cantidad recuperada, en ng). El intervalo de m y b está calculado en base a la distribución t para $\alpha=0.05$ y 17 grados de libertad.	87
3.26. Ecuaciones lineales para el área obtenida en función de la concentración.	88
3.27. Reproducibilidad del método. Coeficientes de variación (%), n = 5.	88
3.28. Límites máximo residual (LMR), límite de detección del método (LDM) y límite de cuantificación del método (LCM). Todos los valores están dados en $\mu\text{g g}^{-1}$.	89
3.29. Recobro del método aplicado a músculo. El intervalo de la pendiente y la ordenada al origen está calculado en base a la distribución t para $\alpha=0.05$ y 14 grados de libertad.	89
3.30. Ecuaciones del área del pico en función de la concentración.	90
3.31. Reproducibilidad del método. Coeficientes de variación (%) del recobro para tres muestras por cada nivel de concentración.	90
3.32. Límites máximo residual (LMR), límite de detección del método (LDM) y límite de cuantificación del método (LCM). Todos los valores están dados en $\mu\text{g g}^{-1}$.	91
3.33. Abundancia relativa de los iones monitoreados para la confirmación de clorfenvinfos y clorpirifos en las muestras de hígado de res identificadas como posibles positivos por CLAR-DAD.	95
3.34. Comparación del protocolo para la determinación de residuos de plaguicidas organofosforados en hígado de res por DMFS-CLAR-DAD con el método oficial mexicano (NOM-028-ZOO-1995).	98

ÍNDICE DE FIGURAS

Número de figura	Página
2.1. Diagrama general de la metodología.	39
2.2. Preparación de la columna para extracción de los plaguicidas organofosforados por Dispersión de Matriz en Fase Sólida.	42
3.1. Espectros de absorción de los plaguicidas organofosforados, en el intervalo de 190 a 367 nm.	53
3.2. Variación del factor de retención (k') de los plaguicidas organofosforados en estudio en función del porcentaje de metanol en la fase móvil. Columna VARIAN de 150 x 4.60 mm empacada con fase inversa RES ELUT C18, tamaño de partícula 5 μm . Flujo de 1 mL min^{-1} . Concentración de cada plaguicida 5 mg L^{-1} . Volumen de inyección 20 μl . Detección por absorción UV cercana a la longitud de absorción máxima de cada compuesto.	55
3.3. Cromatograma de los plaguicidas organofosforados en estudio. Columna VARIAN de 150 x 4.60 mm empacada con fase inversa RES ELUT C18, tamaño de partícula 5 μm . Flujo de 1 mL min^{-1} . Fase móvil metanol:agua 80:20. Concentración de cada plaguicida 5 mg L^{-1} , volumen de inyección 20 μl . Detección por absorción UV a 268 nm. 1) Metil paratión, 2) Fenitrotión, 3) Clorfenvinfos, 4) Diazinón, 5) Clorpirifos.	56
3.4. Cromatograma de los plaguicidas organofosforados en estudio. Columna VARIAN de 150 x 4.60 mm empacada con fase inversa RES ELUT C18, tamaño de partícula 5 μm . Flujo de 1 mL min^{-1} . Gradiente lineal de 70 a 100% de metanol en 10 min. Concentración de cada plaguicida 5 mg L^{-1} , volumen de inyección 20 μl . Detección por absorción UV cercana a la longitud de absorción máxima de cada compuesto.	57
3.5. Fotografías obtenidas por microscopía electrónica de barrido A : fase C18 acondicionada con metanol a 100X, B : fase C18 acondicionada con metanol a 700X, C : fase C18 acondicionada y molida en el mortero a 100X, D : fase C18 acondicionada y molida en el mortero a 700X.	61
3.6. Fotografías obtenidas por microscopía electrónica de barrido E : dispersión de hígado de res en C18 a 100X, F : dispersión de hígado de res en C18 a 700X, G : dispersión de músculo de res en C18 a 100X, H : dispersión de músculo de res en C18 a 700X.	62
3.7. Frentes de elución de los plaguicidas organofosforados. a : sin hígado. Ensayo 6a, tabla 3.12. b : con hígado. Ensayo 6b, tabla 3.13.	69
3.8. Cromatograma del extracto con el ensayo 6b. Concentración en el extracto aproximada de cada plaguicida 2 mg L^{-1} equivalente a 75 $\mu\text{g g}^{-1}$ de cada plaguicida en el hígado de res. Inyección de 20 μL . Columna VARIAN de 150 x 4.60 mm empacada con fase inversa RES ELUT C18. Tamaño de partícula 5 μm . Flujo de 1 mL min^{-1} . Gradiente lineal de 70% a 100% de metanol en 10 min.	71
3.9. Frentes de elución de los plaguicidas organofosforados de un cartucho de dispersión de 500 mg de hígado de res fortificado con 20 $\mu\text{g g}^{-1}$ en 2.0 g de sílice C18. a : elución con metanol 70%, b : elución con metanol 80%, c : elución con acetonitrilo 60%, d : elución con acetonitrilo 80%.	75
3.10. Patrón de elución de los plaguicidas organofosforados de un cartucho de dispersión de 500 mg de hígado de res en 2.0 g de sílice C18 con acetonitrilo puro. Recobros: 94% metil paratión, 94% fenitrotión, 63% clorfenvinfos, 96% diazinón y 95% clorpirifos. Fortificación 10 $\mu\text{g g}^{-1}$.	77

3.11. Preparación de la columna, elución y concentración del extracto para el análisis de bajas concentraciones de plaguicidas organofosforados en hígado de res mediante DMFS-CLAR-DAD.	79
3.12. Comparación de los cromatogramas del ensayo para la limpieza del extracto con gel de sílice. Columna VARIAN de 150 x 4.60 mm empacada con fase inversa RES ELUT C18, tamaño de partícula 5 μm . Flujo de 1 mL min^{-1} . Gradiente de 70 a 100% de metanol en 10 min. 1) Metil paratión, 2) Fenitrotión, 3) Clorfenvinfos, 4) Diazinón, 5) Clorpirifos.	83
3.13. Cromatograma del extracto de plaguicidas organofosforados en hígado de res después de la limpieza con gel de sílice acondicionada con acetonitrilo. Columna VARIAN de 150 x 4.60 mm empacada con fase inversa RES ELUT C18, tamaño de partícula 5 μm . Flujo de 1 mL min^{-1} . Gradiente lineal de 70 a 100% de metanol en 10 min. Concentración 10 $\mu\text{g g}^{-1}$.	84
3.14. Protocolo completo para la determinación de residuos de plaguicidas organofosforados en hígado de res mediante dispersión de matriz en fase sólida y cromatografía de líquidos con detección de absorción UV.	86
3.15. Cromatograma del extracto de músculo de res. $\lambda=268\text{nm}$. Columna VARIAN de 150 x 4.60 mm empacada con fase inversa RES ELUT C18, tamaño de partícula 5 μm . Flujo de 1 mL min^{-1} . Gradiente lineal de 70 a 100% de metanol en 10 min. 1) Metil paratión, 2) Fenitrotión, 3) Clorfenvinfos, 4) Diazinón, 5) Clorpirifos. Fortificación 2.5 $\mu\text{g g}^{-1}$	91
3.16. Cromatogramas del extracto de hígado de res con lesiones patológicas (H34). A: Fortificado (244nm), a: No fortificado(244nm), B: Fortificado(287nm), b: No fortificado(287 nm). Columna VARIAN de 150 x 4.60 mm empacada con fase inversa RES ELUT C18, tamaño de partícula 5 μm . Flujo de 1 mL min^{-1} . Gradiente lineal de 70 a 100% de metanol en 10 min.	93
3.17. Cromatograma del extracto de hígado de res con lesiones patológicas (H20) a 287nm. Columna VARIAN de 150 x 4.60 mm empacada con fase inversa RES ELUT C18, tamaño de partícula 5 μm . Flujo de 1 mL min^{-1} . Gradiente lineal de 70 a 100% de metanol en 10 min. Fortificación 1.2 $\mu\text{g g}^{-1}$.	93
3.18. Espectros de masas de clorfenvinfos (arriba) y clorpirifos (inferior). Inyección splitless de 1 μL de estándar (5 mg L^{-1}).	94
3.19. Cromatogramas de una solución estándar (0.1 mg L^{-1}) de clorpirifos y clorfenvinfos (superior), y de dos extractos de muestras de hígado de res. Columna DB5, Helio como gas acarreador. Inyección splitless/1 min a 280 $^{\circ}\text{C}$, volumen de inyección 1 μL . Temperatura del horno: 2 minutos isotérmico a 60 $^{\circ}\text{C}$, rampa hasta 280 $^{\circ}\text{C}$ con 20 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ seguida de 10 minutos isotérmico a 280 $^{\circ}\text{C}$. Detección, 197, 258 y 314 m/z hasta los 13.2 minutos, 267, 269, 323 y 325 m/z hasta los 13.4 minutos, 285 m/z hasta los 23 minutos. Dwell time: 100 ms.	96

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

AcOEt	Acetato de etilo
CE	Comunidad Europea
CG	Cromatografía de gases
CLAR	Cromatografía de líquidos de alta resolución
CPG	Cromatografía de permeación en gel
C18	Octadecilsilil
DMFS/MSPD	Dispersión de matriz en fase sólida/ Matrix Solid Phase Dispersion
DAD	Detector UV-VIS con arreglo de diodos
DCE	Detector de captura de electrones
DFF	Detector fotométrico de flama
DIF	Detector de ionización de flama
DNP	Detector nitrógeno fósforo
DT	Detector termoiónico
EFS	Extracción en fase sólida
ELL	Extracción líquido-líquido
EM	Espectrometría de masas
ESBM	Extracción en fase sólida sobre barras magnéticas
FDA	Food and Drug Administration
HILIC	Cromatografía de líquidos hidrofílica
HS	Heptanosulfonato de sodio
IDA	Ingesta diaria admisible
log K _{ow} , log P _{ow}	Coefficiente de reparto agua-octanol
LD ₅₀	Dosis letal que mata al 50% de una población en estudio
LD	Límite de detección
LDM	Límite de detección del método
LDEM	Límite de detección experimental del método
LC	Límite de cuantificación
LCM	Límite de cuantificación del método
LMR	Límite máximo residual
MEFS	Microextracción en fase sólida
mPa	Milipascales
MPa	Megapascales
nm	Nanómetros
NOM	Norma oficial mexicana
Pa	Pascales
PAHs	Hidrocarburos policíclicos aromáticos
PBBs	Bifenilos polibromados
PCBs	Bifenilos policlorados
PBDEs	Eteres difenil polibromados
PS-DVB	Poliestireno-Divinilbenceno
rpm	Revoluciones por minuto
SFE	Extracción con fluidos supercríticos, por sus siglas en inglés
SIM	Monitoreo selectivo de iones, por sus siglas en inglés
tr	Tiempo de retención
US EPA	Agencia para la protección al ambiente de Estados Unidos
UV	Ultravioleta
UVmax	Longitud de onda de máxima absorbancia de luz ultravioleta

RESUMEN

El control de residuos tóxicos tales como los plaguicidas organofosforados en tejidos animales es un objetivo común para áreas como la calidad de alimentos, la química ambiental, la química forense y la medicina preventiva. Sin embargo, la extracción de contaminantes presentes en este tipo de matrices mediante los métodos analíticos oficiales sigue siendo una tarea complicada y laboriosa. Estos métodos usualmente tardan horas en realizarse y consumen grandes volúmenes de disolventes que provocan contaminación ambiental y elevan los costos del análisis. Además, pueden presentar recuperaciones bajas y/o reproducibilidad pobre. Por lo tanto, en el presente trabajo se propone una metodología que permite eliminar tales desventajas gracias a la aplicación adecuada de la técnica de Dispersión de Matriz en Fase Sólida (DMFS). Con esta técnica se lleva a cabo la homogeneización, dispersión, extracción y limpieza de la muestra de forma rápida y simple, utilizando el mínimo de materiales y disminuyendo considerablemente su manipulación. El método fue desarrollado para la determinación de cinco plaguicidas organofosforados de los que se encuentran considerados en la NOM-004-ZOO-1994 y en el catálogo oficial de plaguicidas (CICLOPLAFEST. México, 1997): *metil paratión*, *fenitrotión*, *clorfenvinfos*, *diazinón* y *clorpirifos* en hígado de res. Para llevar a cabo la DMFS se utilizó una fase inversa C18 y mezclas acetonitrilo:agua para la limpieza y elución de los analitos. Una vez optimizada la metodología se pudo llevar a cabo la extracción de los compuestos de interés en tan sólo siete pasos. Al fortificar hígado de res en las concentraciones de 10, 5, 2.5, 1, 0.5 y 0.25 $\mu\text{g g}^{-1}$ se obtuvieron buenos recobros para metil paratión (93 a 82%), fenitrotión (96 a 70%), diazinón (106 a 95%) y clorpirifos (101 a 95%). El recobro para clorfenvinfos (54 a 50%) fue bajo pero reproducible. El análisis de los extractos se realizó por cromatografía de líquidos de alta resolución con detector UV de arreglo de diodos. Los límites de detección del método fueron suficientes para detectar metil paratión, diazinón y clorpirifos de acuerdo a los niveles máximos permitidos por la normatividad mexicana. Este método se aplicó también a la matriz de músculo de res y se obtuvieron recobros cercanos al 100% para los cinco plaguicidas. Además, el método se aplicó a 50 muestras de hígado de res con daños patológicos. En los cromatogramas de 6 de estas muestras se encontraron picos correspondientes a trazas de clorfenvinfos y clorpirifos. Finalmente, se hicieron ensayos para confirmar la presencia de los dos plaguicidas en las 6 muestras mediante cromatografía de gases con espectrometría de masas en el modo de monitoreo selectivo de iones.

ABSTRACT

The control of toxic residues like organophosphorous pesticides in animal tissues is a common task for fields as food quality control, environmental chemistry, forensic chemistry and preventive medicine. However, the official methods of extraction of toxic residues in this kind of matrix include considerable sample manipulation; usually take hours and consume relatively large amounts of solvents that cause environmental pollution and increment the analysis cost. In addition, those methods can produce low recoveries and/or low reproducibility. The present work propose an alternative method that permits to eliminate such inconveniences in a fast and simple way by mean of the correct application of the Matrix Solid Phase Dispersion (MSPD) technique. This technique is used to carry out the homogenization, dispersion, extraction and cleanup, by using the minimum of materials and reducing significantly the sample manipulation. The method was developed for the determination of five organophosphorous pesticides included in the Official Mexican Norm: NOM-004-ZOO-1994, and also in the Catálogo Oficial de Plaguicidas (CICLOPLAFEST. México, 1997): *methyl parathion*, *fenithrotion*, *chlorfenvinphos*, *diazinon* and *chlorpyrifos* in beef liver. An inverse phase C18 and acetonitrile:water mixes were used to carry out the MSPD. Once the method was optimized the analytes extraction could be done with only seven steps obtaining good recoveries at levels of 10, 5, 2.5, 1, 0.5 y 0.25 $\mu\text{g g}^{-1}$; for methyl parathion (93 to 82%), fenithrotion (96 to 70%), diazinon (106 to 95%) and chlorpyrifos (101 a 95%). The recovery for chlorfenvinphos (54 to 50%) was low but reproducible. The method detection limits were enough to detect methyl parathion, diazinon and chlorpyrifos at the levels of the maximum residual limits established by the mexican norms. This new method was applied to beef muscle and better recoveries for the five pesticides were obtained, they were near to 100%. Additionally the method was applied for monitoring the studied pesticides in 50 beef liver samples presenting pathologies, six of those samples were suspected to have trace amounts of chlorpyrifos and chlorfenvinphos. Finally, the presence of the two pesticides in the six samples was also investigated by using Gas Chromatography with Mass Spectrometry detection in the Selective Ion Monitoring mode.

INTRODUCCIÓN

Los plaguicidas organofosforados son ampliamente usados en el sector agropecuario para el control de insectos o ácaros que pueden infestar al ganado bovino, de tal forma que los animales están expuestos a dos fuentes principales de contaminación por residuos de plaguicidas: el consumo de alimentos que han sido contaminados con estas sustancias, y su aplicación directa al animal por baño o rocío. En tales condiciones, los animales absorben estos materiales a través de la piel o por ingestión [Salas *et al*, 2003]. Una vez en el organismo, los plaguicidas pueden acumularse en la grasa animal y a pesar de su degradación y de la formación de metabolitos primarios y secundarios inducidas por la exposición a altas temperaturas, luz, sistemas enzimáticos, microorganismos y cambios de pH, se ha encontrado que en el músculo de res algunos plaguicidas organofosforados y sus metabolitos no son eliminados completamente después de la cocción [Kuivinen and Bengtsoon, 2002]. Además, estos plaguicidas no son selectivos y pueden ser altamente tóxicos para casi todos los animales, incluyendo al ser humano, porque inhiben de forma irreversible a la enzima acetilcolinesterasa, lo que bloquea la transmisión nerviosa y produce la muerte por paro respiratorio. Su toxicidad es igualmente efectiva por exposición dérmica o por ingestión [Russo *et al*, 2002].

Estas consideraciones han sido la base para que entidades legislativas de la Comunidad Europea (CE), de Estados Unidos (Agencia de Protección al Ambiente US EPA) y de México, establezcan límites máximos permisibles de residuos (LMRs) de plaguicidas organofosforados en tejidos animales [NOM-004-ZOO-1994, 2001], así como normas para su determinación [NOM-028-ZOO-1995]. Desafortunadamente, los métodos oficiales para el análisis de plaguicidas organofosforados en tejidos animales involucran extracciones que requieren del uso de grandes volúmenes de disolventes orgánicos, así como tiempo de análisis y manipulación de la muestra considerables, los cuales se traducen en contaminación ambiental, costo elevado y posible contaminación de la muestra e inexactitud en la cuantificación [Buldini *et al*, 2002;

Kuivinen and Bengtsson, 2002; Smith, 2003]. Además, la complejidad de estos métodos no permite generar resultados analíticos a tiempo para prevenir la entrada de los alimentos contaminados al mercado [Yague et al, 2001].

A nivel analítico, otro problema existente es que los límites máximos permisibles para los plaguicidas organofosforados están cerca del nivel de determinación de los métodos analíticos existentes ($0.1 - 0.01 \mu\text{g g}^{-1}$) [Juhler, 1997], lo cual los hace difícil de analizar debido a las interferencias presentes en la muestra, como la grasa [Kuivinen and Bengtsson, 2002]. Para eliminar estas interferencias se han utilizado técnicas que emplean columnas cromatográficas de gel de sílice, alúmina o florisil; cromatografía de permeación en gel; precipitación a baja temperatura, seguida de la remoción gravimétrica de las grasas; así como, extracción de las grasas en fase sólida [Lacorte and Barcelo, 2000]. Sin embargo, estas técnicas requieren de los numerosos pasos comúnmente usados en la extracción por disolvente, generalmente tediosos. Por otro lado, algunas de ellas no han podido aplicarse para la determinación del multiresiduo de plaguicidas organofosforados debido al rango amplio de las propiedades fisicoquímicas de estos compuestos [Serrano *et al*, 1999]. Por lo tanto, en el presente trabajo se propone eliminar estas desventajas con la aplicación de la técnica de Dispersión de la Matriz en Fase Sólida (DMFS o MSPD por sus siglas en inglés) para la preparación de la muestra.

La DMFS es una técnica de extracción-purificación introducida por Steven A. Barker y colaboradores en 1989, en la cual se utilizan cantidades de muestra y de disolventes mucho menores que en los métodos clásicos. Para llevarla a cabo se coloca una pequeña cantidad de muestra de tejido ($0.1 - 5 \text{ g}$) en un mortero de material no poroso e inerte y se macera con una fase sólida apropiada para la retención de los analitos (generalmente sílice con grupos orgánicos químicamente unidos), en una relación 1:4. A continuación, la mezcla sólida resultante se usa como material para empacar columnas similares a los cartuchos para extracción en fase

sólida. Posteriormente, de acuerdo a las solubilidades de los compuestos de interés se emplea un disolvente o secuencias de disolventes para su elución de la columna. Para realizar la purificación o limpieza del extracto se suele colocar otra (s) fase sólida en el fondo de la misma columna o la aplicación en columnas seriadas [Gaunt and Barker, 2000; Crouch and Barker, 1997]. La DMFS es una técnica simple para la preparación de la muestra puesto que incluye la homogeneización, rompimiento celular, fraccionamiento y purificación, en menos pasos que cualquier otro método [Barker, 2000]. Se ha demostrado su aplicabilidad para el análisis de fármacos y contaminantes como los plaguicidas en tejidos vegetales y animales [Barker, 2000; Smith, 2003]. Sin embargo, salvo la determinación de fention y coumafos en músculo de res (Barker *et al*, 1989), no se ha reportado su aplicación para la extracción de plaguicidas organofosforados en hígado y músculo de ganado bovino.

Por lo tanto, el objetivo general del siguiente trabajo fue: *Desarrollar un método basado en la DMFS y la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución para la determinación de residuos de plaguicidas organofosforados en hígado y músculo de res, que sea más rápido, menos costoso y menos contaminante que los métodos oficiales.*

Para lo cual fue necesario alcanzar las siguientes metas:

- Optimizar las condiciones para la separación cromatográfica de los plaguicidas organofosforados.
- Aplicar la técnica de dispersión de matriz en fase sólida para extraer de manera selectiva a los plaguicidas organofosforados contenidos en hígado y músculo de res.
- Obtener un protocolo completo de extracción y análisis cromatográfico para realizar la determinación de los plaguicidas a concentraciones iguales o menores a las establecidas en las normas.
- Aplicar el método desarrollado a muestras de hígados en los que se identificaron lesiones patológicas.

Capítulo 1. Antecedentes.

1.1. Residuos de plaguicidas en tejidos del ganado bovino

Un plaguicida es toda sustancia que se destina a controlar cualquier plaga, incluidos los vectores de enfermedades humanas y de los animales, así como las especies no deseadas que causen perjuicio o interfieran con la producción agropecuaria o forestal, o que afecten de forma negativa al bienestar del hombre y de los animales. De acuerdo a su uso se pueden clasificar en agrícolas, forestales, urbanos, para jardinería, pecuarios, domésticos e industriales [CICOPLAFEST, 1997].

Los plaguicidas de uso pecuario son aquellos que se emplean en animales y/o instalaciones cuyo producto será destinado al consumo humano para poder cubrir la demanda mundial de alimentos [CICOPLAFEST, 1997]. Sin embargo, dichas sustancias representan un peligro toxicológico latente para formas de vida no perjudiciales y están consideradas como una de las causas principales de la contaminación ambiental a nivel mundial por lo que los análisis de los residuos de plaguicidas en diferentes matrices biológicas son incluidos en áreas como la química ambiental, la química forense y la medicina preventiva [Lehotay, 2000; Russo *et al*, 2002].

Una de las matrices biológicas de interés para la determinación analítica de plaguicidas son los tejidos de animales, como los del ganado bovino, que están expuestos constantemente a dichas sustancias a través de las siguientes fuentes:

- 1) Alimentos que contienen altos niveles de residuos de plaguicidas provenientes del tratamiento posterior al cultivo o por contaminación a través de aplicaciones aéreas por ejemplo.
- 2) Alimentos manufacturados a partir de material vegetal que ha sido tratado durante su crecimiento con insecticidas.
- 3) Uso de los insecticidas directamente sobre el animal para protegerlo de vectores de enfermedades. - El ganado bovino puede ser afectado por

Hipodermosis: *Hypoderma spp*, mosca de la cara: *Musca autumnalis*, mosca de los cuernos: *Haematobia irritans*, mosca de los establos o mosca brava: *Stomoxys calcitrans*, mosca barrenadora productora de miasis: *Cochliomyia hominivorax*, garrapatas del oído: *Otobius megnini*, garrapatas y piojos. [Ensminger, 1973] –

- 4) Uso de insecticidas en establos.
- 5) Tratamientos higiénicos contra insectos en las fábricas procesadoras de los productos alimenticios derivados de este tipo de ganado. [Di Muccio *et al*, 1996, Salas *et al*, 2003]

De acuerdo al catálogo oficial de plaguicidas de México (1997), los compuestos que más se emplean de acuerdo a las fuentes anteriormente enlistadas son los organofosforados como el clorfenvinfos, clorpirifos, coumafos, diazinon, etión, fentiión, tetraclorvinfos y triclorfon, el lindano que es un organoclorado y algunos piretroides [CICOPLAFEST, 1997]. En nuestro país clorpirifos es uno de los plaguicidas de mayor uso y se han encontrado residuos de éste, junto con diclorvos, forato y clorfenvinfos, en leche de vaca en concentraciones superiores a la dosis diaria aceptable [Salas *et al*, 2003].

Actualmente los plaguicidas organofosforados sustituyen a los organoclorados a causa de su carácter lipofílico y a su gran estabilidad, propiedades que les permiten bioacumularse en un amplio intervalo de niveles tróficos a lo largo de la cadena alimenticia [Kuivinen and Bengtsson, 2002; Juhler, 1997]. Sin embargo, aunque menos lipofílicos, los organofosforados también pueden concentrarse en grasa, carne y leche [CICOPLAFEST, 1997], además de ser una de las clases de plaguicidas más comúnmente involucradas en envenenamientos humanos [Tsoukali *et al*, 2005].

Se considera factible encontrar plaguicidas organofosforados en tejidos y órganos grasos de estos animales, porque más del 50% de los plaguicidas destinados al cuidado del ganado bovino pertenece a esta familia [Coulibaly and Smith, 1993].

Además, una vez en el organismo los compuestos de baja polaridad, como en el caso de los organofosforados con elementos halógeno, ésteres tiofosfato, etc., pasan del torrente sanguíneo hacia los tejidos rápidamente y tienden a permanecer en los órganos con tal estabilidad que se ha demostrado que en músculo de res algunos plaguicidas organofosforados y sus metabolitos no pueden ser eliminados totalmente después de la cocción, aún cuando se considera que su degradación y formación de metabolitos primarios y secundarios es inducida por la exposición a altas temperaturas, luz, cambios de pH, sistemas enzimáticos y microorganismos [Kuivinen and Bengtsson, 2002].

Aunado a lo anterior, los plaguicidas organofosforados se absorben fácilmente por vía cutánea, inhalación e ingestión. La contaminación del ganado bovino a través de sus alimentos depende de la estabilidad de los compuestos, el modo y duración de la aplicación o exposición, y su ruta metabólica en el animal [Hayes and Laws, 1991]. La absorción a través de la piel, o por ingestión al limpiarse la piel con la lengua, se vuelve importante cuando la inmersión del ganado en los plaguicidas es necesario para proteger la salud y productividad de los animales; mientras que la fumigación de establos y áreas de proceso, además de que puede introducir cantidades importantes de plaguicidas en productos como la carne y leche, ha provocado envenenamiento por la vía respiratoria, aún cuando se considera que ésta no es una vía importante de exposición para los animales en condiciones ordinarias [Di Muccio *et al*, 1996; Salas *et al*, 2003].

Como consecuencia de las prácticas anteriormente mencionadas, la población humana está expuesta a este tipo de sustancias de manera indirecta, por lo que se han establecido programas de vigilancia en el comercio de alimentos [Juhler, 1997; CICOPLAFEST, 1997; Buldini *et al*, 2002]. Los límites máximos permisibles de residuos tóxicos (LMRs) en productos animales establecidos en México se describen en la Norma Oficial Mexicana: NOM-004-ZOO-1994, 2001. Estos límites representan el nivel más alto permisible de un compuesto de origen externo que pueda estar presente en cualquier porción comestible de productos animales, ya que estudios previos han

demostrado que su consumo por encima de esos niveles puede constituir un riesgo a la salud humana. Los límites máximos de residuos de plaguicidas organofosforados en la especie bovina, se presentan en la tabla 1.1.

Tabla 1.1. Límites máximos de residuos de plaguicidas organofosforados, (mg Kg⁻¹ o ppm) en base húmeda en hígado y músculo de res. Modificación a la NOM-004-ZOO-1994, 2001.

COMPUESTO	LMR (mg Kg ⁻¹)	COMPUESTO	LMR (mg Kg ⁻¹)
<i>Diazinon</i>	0.700	<i>Etion</i>	1.000 (hígado)
<i>Di-syston</i>	0.100	Etion	2.500 (músculo)
<i>Ronnel y metabolitos</i>	4.000	<i>Coumafos</i>	1.000
<i>Clorpirifos y metabolitos</i>	2.000	<i>Clorfenvinfos</i>	0.200
<i>Fenitrotion</i>	0.050	<i>Diclorvos</i>	0.020
<i>Malation</i>	4.000	<i>Fention y metabolitos</i>	0.100
<i>Paration, Trition</i>	0.700	<i>Triclorfon</i>	0.100

Para llevar a cabo estos programas de vigilancia de alimentos, se requiere de métodos analíticos que permitan la identificación rápida e inequívoca de los plaguicidas y sus productos de degradación, en concordancia con la severidad de la legislación y el incremento en el número de plaguicidas detectados [Buldini *et al*, 2002].

Por otro lado, para desarrollar un método analítico es necesario conocer las propiedades físicas y químicas del analito, puesto que éstas determinarán el tipo de técnicas que conduzcan a un proceso de extracción, limpieza y detección exitoso [Lacorte & Barcelo, 2000; Lehotay, 2000].

1. 2. Propiedades de los plaguicidas organofosforados

1. 2.1. Estructura química

Los plaguicidas organofosforados se aplican en formulaciones que contienen aditivos y adyuvantes tales como mezclas de surfactantes, aceites, emulsificantes y

sales para incrementar su efectividad, absorción, transmisión, inmovilización y desintoxicación [CICOPLAFEST, 1997]. Se introdujeron al mercado en el período de 1945-1955, pero en la actualidad son los plaguicidas de mayor uso bajo la aceptación de su especificidad, degradación rápida después de su aplicación, acumulación esporádica en la cadena trófica y bajo potencial carcinógeno [Juhler, 1997]. Sin embargo, su toxicidad aguda es más elevada que la de otros grupos de plaguicidas y depende de su estructura química; se reconocen cerca de 140 compuestos diferentes que pueden clasificarse en base al tipo de grupo funcional que sustituye a uno o más átomos de hidrógeno (tabla 1.2). Las características de cada grupo pueden variar de manera sustancial y le confieren la especificidad para reaccionar contra un tipo de organismo u otro [Lacorte and Barcelo, 2000; Hassall, 1990].

Tabla 1.2. Clasificación de los plaguicidas organofosforados de acuerdo a los sustituyentes de los átomos de hidrógeno en el ácido fosfónico o fosfórico [Lacorte and Barcelo, 2000; Hassall, 1990].

Grupo	Estructura	Ejemplos
Fosfatos u ortofosfatos	$(RO)_2-P-OX$ \parallel O	Clorfenvinfos, diclorvos, mevinfos, fosfamidón.
Fosfonato	$(RO)_2-P-CHX$ \parallel O	Triclorfon, butonato.
Fosforotioato	$(RO)_2-P-OX$ \parallel S	Bromofos, clorpirifos, coumafos, diazinón, fenitrotión, fentiión, paratión, pirimifos.
Fosforotiolato	$(RO)_2-P-SX$ \parallel O	Demeton-S-metil, metil oxidemeton, vamidotón.
Fosforoditioato	$(RO)_2-P-S-X$ \parallel S	Azinfos, dimetoato, disulfotón, malatión, menazon, forato.
Fosforamidato	$XO-P-NHR$ \parallel O	Fenamifos, schradan.

R= grupos alquilo o arilo. X= grupos alifático, aromático o heterocíclico.

1.2.2. Toxicología

El modo de acción de los plaguicidas organofosforados se basa en la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa; el fenómeno ocurre a nivel de las sinápsis nerviosas, donde el neurotransmisor acetilcolina despolariza a la membrana postsináptica para excitar a las células efectoras, como son glándulas, fibras musculares u otras neuronas. Una vez conseguido su objetivo, para que dichas células efectoras vuelvan al reposo, el neurotransmisor debe ser hidrolizado por la enzima acetilcolinesterasa [Russo *et al*, 2002].

Ahora bien, los plaguicidas organofosforados inhiben la actividad de la acetilcolinesterasa uniéndose a la enzima en el sitio preciso en donde debería unirse la molécula de acetilcolina para ser hidrolizada. Como resultado, cuando un plaguicida organofosforado se encuentra presente, la enzima en vez de acetilarse queda fosforilada. Esta diferencia es importante para que se lleve a cabo la intoxicación del organismo porque mientras que la enzima acetilada se regenera rápidamente por hidrólisis, la regeneración de la enzima fosforilada es muy lenta (Hassall, 1990 reporta un factor de un millón de veces) debido a que el enlace P-O es mucho más fuerte que el enlace C-O [Cremllyn, 1980] lo cual provoca que la estimulación de las células efectoras de un organismo intoxicado con plaguicidas organofosforados se prolongue más de lo normal.

Consecuentemente, la intoxicación aguda con los organofosforados puede provocar efectos graves que pueden ser: el síndrome muscarínico (estimulación de glándulas y fibras musculares lisas), el síndrome nicotínico (estimulación de las fibras musculares estriadas), o el síndrome neurológico (por estimulación de otras neuronas). Se observan convulsiones, fallo respiratorio y arritmias cardiacas, la muerte se debe a la anoxia [Russo *et al*, 2002; CICOPLAFEST, 1997].

En la tabla 1.3 se muestran los datos toxicológicos para los plaguicidas organofosforados considerados en este estudio [CICLOPLAFEST, 1997]; la ingesta diaria admisible (IDA) para humanos, que es una estimación de la dosis de

exposición diaria donde es poco probable que se produzca un efecto nocivo, aunque la exposición sea de por vida; así como la dosis letal oral y percutánea que mata al 50% (LD₅₀) de la población en prueba (ratas en este caso).

Tabla 1.3. Toxicología de algunos plaguicidas organofosforados [CICOPLAFEST, 1997; *The British Crop Protection Council and the Royal Society of Chemistry, 1994*].

Plaguicida	Toxicidad (grado)	IDA (mg Kg ⁻¹)	LD ₅₀ (mg Kg ⁻¹)	
			Oral	Percutánea
Clorfenvinfos	II	0.002	24 - 39	31-108
Clorpirifos	III	0.010	135 -163	> 2000
Diazinón	III	0.002	300 - 400	> 2150
Fenitrotión	III	0.005	250 - 800	890
Metil paratión	I	0.020	14 - 24	67

I: Extremadamente tóxico, máximo 5 mg Kg⁻¹ (sólido).

II: Altamente tóxico, de 5 a 50 mg Kg⁻¹ (sólido).

III: Moderadamente tóxico, de 50 a 500 mg Kg⁻¹ (sólido).

1.2.3. Efectos secundarios en los organismos

No debe olvidarse que los organofosforados pueden tener otras propiedades independientes de sus efectos anticolinesterasa, incluyendo mutagenicidad y carcinogenicidad, así como una toxicidad específica hacia órganos como el corazón, hígado, riñón, etc. Al respecto, existe el reporte de la presencia de residuos de estos compuestos en órganos del cuerpo humano, sobre todo en hígado. En el mismo documento señalan que los riñones cancerosos acumulan más plaguicidas que los tejidos sanos [Russo *et al*, 2002]. Aún más, los plaguicidas organofosforados también han sido relacionados con patologías y daño cromosomal en humanos [Bolognesi, 2003]. Por ejemplo, Webster y colaboradores (2002) concluyeron que los plaguicidas organofosforados alteran el núcleo celular y relacionaron este resultado con el desarrollo de cáncer en vejiga.

Por otro lado, puesto que aún no se tiene la certeza sobre cuales son los efectos crónicos de los plaguicidas organofosforados, la agencia para la protección al ambiente de Estados Unidos (US EPA) está haciendo pruebas para establecer su

capacidad para provocar daños congénitos, cambios en la fertilidad o capacidad reproductiva, neurotoxicidad y daños en órganos como riñón e hígado. Esto como parte de un programa de reasignación de límites máximos residuales que culminará en el 2006. [www.epa.gov/pesticides/op/primer.htm]

1.2.4. Metabolismo

Entender el metabolismo de los plaguicidas es analíticamente importante debido a que la cuantificación del total de los residuos de plaguicidas involucra la estimación del compuesto original y de sus metabolitos tóxicos, incluyendo a los que pueden ser excretados a través de la orina [Kawasaki and Tadano, 2000; Mukherjee and Gopal, 1996].

Los plaguicidas organofosforados son metabolizados rápidamente en los cuerpos vivos a través de la ruta: 1) hidrólisis, 2) oxidación, y 3) transmetilación. La hidrólisis de los ésteres de fosfato se presenta específicamente a un lado del grupo de eliminación en los enlaces triéster del plaguicida:



La fosfatasa, sin embargo, no actúa sobre los compuestos que tienen un enlace P=S, pero en el malatión y el dimetoato, se presenta la hidrólisis de la cadena lateral del éster. La reacción de hidrólisis por lo general provoca la pérdida de la acción plaguicida. Las enzimas hepáticas que metabolizan drogas provocan varias reacciones de oxidación, tales como la del enlace P=S a P=O, la del enlace tioéter, la ruptura de uno de los grupos alquilo, la O-desalquilación y la transmetilación [Kawasaki and Tadano, 2000].

Por otro lado, la conversión del fosforoditionato en fosfatos incrementa fuertemente la toxicidad para insectos y mamíferos. Cabe resaltar que la toxicidad de

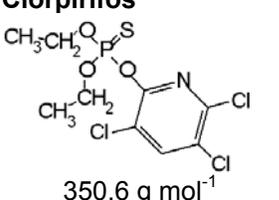
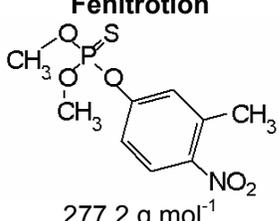
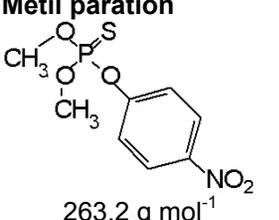
los plaguicidas organofosforados está asociada con los metabolitos primarios (oxon) obtenidos de la desulfuración oxidativa de los compuestos padre, debido a que los oxones son químicamente más activos que los organofosforotionatos y por lo tanto reaccionan más rápidamente con la acetilcolinesterasa [Coulibaly and Smith, 1994; Russo *et al*, 2002]. Los metabolitos de los plaguicidas en estudio se presentan en el apéndice A.

1. 2. 5. Propiedades fisicoquímicas

Los compuestos pertenecientes al grupo de los plaguicidas organofosforados presentan gran diversidad en características como polaridad, solubilidad en agua, presión de vapor, coeficiente de reparto agua-octanol, ionización ácido-base y vida media [Juhler, 1997]. Así, se encuentran compuestos que son altamente solubles en agua, como el mevinfos (600 g L^{-1}), y otros que son totalmente insolubles como el temefos (0.00003 g L^{-1}). Los plaguicidas organofosforados son medianamente volátiles, con presiones de vapor que varían entre 0.13 y 7000 mPa [Lacorte and Barcelo, 2000]. Ahora bien, la solubilidad, movilidad y volatilidad de los plaguicidas organofosforados en el ambiente depende en gran medida de sus constantes de ionización ácido – base (pKa). Sin embargo, la polaridad, que puede estimarse a través de su solubilidad en agua y/o su coeficiente de reparto agua-octanol ($\log K_{OW}$ o $\log P_{OW}$), es el parámetro fisicoquímico que revela el grado de hidrofobicidad de un plaguicida y su tendencia a acumularse en las células vivas, organismos y materia orgánica de suelos y sedimentos [Lehotay, 2000]. Como una regla de oro, los plaguicidas se clasifican como no polares si los valores de $\log K_{ow}$ están arriba de 4-5 y como polares si están por debajo de 1.5. Entre estos valores se considera a los compuestos como “medianamente polares”. En general, los plaguicidas organofosforados pueden describirse como compuestos de polaridad media o baja, aunque debido a su diversidad algunos compuestos no entran en esta clasificación [Lacorte and Barcelo, 2000].

En la tabla 1. 4 se muestran las propiedades fisicoquímicas de los plaguicidas que se estudiaron en el presente trabajo.

Tabla 1.4. Propiedades fisicoquímicas de algunos insecticidas organofosforados (Tomados de *The British Crop Protection Council and the Royal Society of Chemistry, 1994*).

Compuesto	UV _{max} (nm)	Log P _{ow}	Densidad (g/L)	Solubilidad en agua (mg/L)	Presión de vapor (Pa)	Estabilidad
Clorfenvinfos  359.6 g mol ⁻¹	201 244	3.85 (Z) 4.22 (E)	1.36	145 (23 °C)	1 x 10 ⁻³	Hidrolizado lentamente en agua. 700 h (pH=11).
Clorpirifos  350.6 g mol ⁻¹	198 228 289	5.11	1.117	1.4 (25 °C)	2.7x10 ⁻³	Vida media en solución acuosa metanol a pH 6 : 1930 días, a pH 9.96: 7.2 días.
Diazinón  304.3 g mol ⁻¹	199 246 254 288	3.83	1.116	60 (20 °C)	0.12x10 ⁻³	Hidroliza en medios ácidos y alcalinos, estable en medios neutros, fotodegrada en agua. Susceptible de oxidación a 100 °C.
Fenitrotión  277.2 g mol ⁻¹	201 267	3.43	1.33	21 (20 °C)	18x 10 ⁻³	Estable por dos años si se almacena a 20 – 25 °C. Se hidroliza en álcalis a 30 °C
Metil paratión  263.2 g mol ⁻¹	199 273	3.00	1.3598	55 (20 °C)	0.2x10 ⁻³	Hidroliza en álcalis. Isomeriza rápidamente a su análogo O,S-dimetil bajo calentamiento.

Log P_{ow}: Logaritmo del coeficiente de reparto octanol-agua [Noble, 1993]. Z, E: Indican los isómeros respectivos.

1.3. Determinación de plaguicidas organofosforados en tejido animal

De manera general, la determinación de plaguicidas en tejidos biológicos incluye los siguientes pasos:

1) Muestreo: Los datos más característicos sobre residuos en este tipo de matriz solamente pueden alcanzarse si se obtiene una muestra representativa, se evita su contaminación y tampoco existe pérdida de analito. El procedimiento correcto consiste en coleccionar las muestras de manera aleatoria, mezclarlas y tomar una parte representativa del homogeneizado para el análisis. El transporte al laboratorio debe realizarse bajo las condiciones adecuadas para evitar la degradación de los plaguicidas o descomposición de la matriz de la muestra. Después de recibir las muestras se deben procesar inmediatamente, o de otra manera almacenarse a 4°C o preferiblemente a -20 °C [Lacorte and Barcelo, 2000].

2) Preparación analítica de la muestra. El concepto básico de método de preparación de la muestra es convertir una matriz real en una muestra con el formato adecuado para el análisis. Las muestras biológicas tienen una composición química compleja, por lo que se requiere una *homogeneización* previa para la *extracción* de los plaguicidas que se encuentran en concentraciones muy bajas y una *purificación* para eliminar las sustancias interferentes y facilitar la determinación. Esto puede lograrse mediante varias técnicas, muchas de las cuales han cambiado muy poco a lo largo de los últimos 100 años y tienen los siguientes objetivos comunes [Smith, 2003]:

- a) La remoción de posibles interferentes en los pasos de separación o detección, y de esta manera incrementar la sensibilidad del método.
- b) La concentración del analito para obtener mayor sensibilidad en el ensayo.
- c) La derivatización, si es necesario convertir el analito en una forma más adecuada para la detección o la separación.
- d) Proveer un método robusto y reproducible que sea independiente del tipo de matriz de la muestra.

3) Separación analítica, detección y confirmación. Este tipo de técnicas han sido mejoradas en los últimos años gracias a que los métodos cromatográficos para la separación analítica ofrecen alta resolución de las mezclas complejas y a que los límites de detección absolutos son del orden de los picogramos o aún más pequeños [Pawliszyn, 2003; Smith, 2003]. Al respecto Juan A. y colaboradores (2003) en su revisión sobre los métodos de determinación de residuos de plaguicidas organofosforados en alimentos presentan una serie de referencias en las que para la separación analítica, detección y confirmación se ha empleado la cromatografía de gases con detectores específicos como el de captura de electrones, fotometría de llama, nitrógeno fósforo y espectrometría de masas; además de la cromatografía de líquidos con detectores UV-visible, fluorescencia y espectrometría de masas; así como la electroforesis capilar con fotometría de llama.

1.3.1. Generalidades sobre los métodos de preparación de muestra

Cabe destacar que en la determinación analítica global, el paso de la preparación de la muestra requiere atención especial, debido a que un tratamiento de la muestra pobre o un extracto mal preparado invalidará el ensayo completo y aún cuando se utilice el método de separación más poderoso, no se obtendrá el resultado esperado. Por esta razón, actualmente esta etapa representa uno de los campos de mayor interés en la investigación analítica [Wells, 1993; Smith, 2003].

Ahora bien, para la determinación de los residuos de plaguicidas en tejido animal se debe considerar que este tipo de muestras son una mezcla compleja no homogénea de sustancias químicas diversas que dificultan la separación y cuantificación de los analitos de interés [Hajslová and Zrostliková, 2003]. Por lo tanto el aplicar uno u otro método de preparación de la muestra dependerá básicamente de las características fisicoquímicas del plaguicida que será analizado y del tipo de matriz [Buldini *et al*, 2002; Wells, 1993].

Los parámetros fisicoquímicos de mayor importancia para definir como se efectuará la preparación de la muestra son la polaridad, la solubilidad en agua y la

presión de vapor. Por ejemplo, cuando se pretende determinar varios plaguicidas organofosforados a la vez y manejar extractos acuosos debe considerarse que un compuesto en solución acuosa puede volatilizar dependiendo del coeficiente entre la presión de vapor de un plaguicida y su solubilidad en el agua; además, los menos solubles en agua (menos de $0.5 - 1 \text{ mg L}^{-1}$) permanecerán adsorbidos sobre la superficie de los materiales de laboratorio, y los más solubles difícilmente serán extraídos por los disolventes orgánicos convencionales que extraerían fácilmente a los plaguicidas de polaridad más baja [Lacorte and Barcelo, 2000].

Respecto a la matriz, el hígado es la primera opción para la búsqueda de los plaguicidas puesto que es donde se lleva a cabo la desintoxicación. Desde ahí los compuestos más polares se desplazan hacia los riñones antes de ser excretados en la orina, mientras que los compuestos menos polares se transportan para ser almacenados en las grasas y llegar a ser eliminados en la leche. Sin embargo, debido a que el hígado es tan activo, puede continuar degradando a los plaguicidas aún después de la muerte del animal. Además, contiene una gran variedad de compuestos que pueden interferir con el análisis. Por lo tanto será más fácil encontrar pequeñas cantidades de residuos de plaguicidas después de la muerte del animal en el músculo, con la ventaja adicional de que éste tiene menos posibilidad de presentar interferencias en los extractos [Brown *et al*, 1996].

Homogeneización y extracción

En cuanto a la preparación de un tejido animal para la extracción de plaguicidas, la regla general es cortarlo en pedazos pequeños para exponer el máximo de área superficial al extractante. Después, se requiere de una ruptura mecánica de las membranas celulares usando procesos como sonicación, molido u homogeneización en un disolvente de extracción soluble en agua. Se puede remover el agua, que está presente como componente mayoritario de cualquier célula, con un agente desecante y extraer los analitos con un disolvente inmiscible en agua; los recobros de la extracción pueden incrementarse por agitación en un contenedor sellado, por calentamiento o reflujo. Entonces, se separa el extracto de la matriz

sólida por centrifugación, decantación, filtración o una combinación de estos, y el filtrado acuoso se reparte con un disolvente inmiscible en agua para transferir a los residuos de plaguicidas a la fase orgánica [Smith, 2003; Lehotay, 2000].

Afortunadamente, existen alternativas al proceso de extracción antes descrito, estas han surgido al considerar que los disolventes de extracción no sólo pueden ser líquidos orgánicos sino que también puede emplearse fluidos supercríticos y líquidos supercalentados o el compuesto de extracción puede estar unido a un material de soporte [Pawlizyn, 2003]. Así, en la literatura actual sobre determinación de contaminantes orgánicos en tejidos animales se describen los métodos de extracción por disolventes y los métodos de extracción por adsorbentes:

Extracción por disolventes

El método tradicional y que es usado como referencia fue propuesto para separar las grasas de alimentos en 1879 por Soxhlet e involucra usar el aparato que lleva su nombre para poner repetidamente a la muestra en contacto con el disolvente de extracción fresco. Tiene las ventajas de que la extracción es cuantitativa y no se requiere filtración, mientras que sus desventajas son: la corrida de una sola muestra requiere algunas horas o días para llevarse a cabo, el analito debe ser estable en el disolvente que se encuentra en reflujo y las cantidades de muestra y disolventes orgánicos (300 - 500 mL) son considerables. Además este método involucra pasos adicionales de concentración del extracto, que son lentos y laboriosos y siempre existe la posibilidad de que cualquier impureza presente en el disolvente sea concentrada [Buldini *et al*, 2002].

Métodos menos eficientes incluyen agitar a la muestra en disolventes fríos o calientes durante períodos prolongados y sus desventajas son similares a las del Soxhlet [Smith, 2003]. Recientemente, la extracción con líquidos presurizados y con fluidos supercríticos, que usa un extractante a elevadas temperaturas (80 – 200 °C) y presión (10 - 20 MPa), han surgido como posible mejora del tradicional método

Soxhlet [Buldini *et al*, 2002] junto con la extracción asistida por ultrasonido y microondas, así como la extracción con agua supercalentada [Smith, 2003].

De manera general, la selectividad en la extracción puede obtenerse al alterar la temperatura y presión de extracción, la naturaleza del disolvente, el pH o con el uso de aditivos [Lehotay, 2000]. En cuanto a la naturaleza del disolvente, se deben considerar varios aspectos, por ejemplo, los disolventes miscibles en agua extraen a la mayoría de los plaguicidas, pero también a muchos compuestos no deseables altamente polares. Mientras que el hexano da un extracto más limpio en ese aspecto, pero no puede extraer completamente a los compuestos si estos se encuentran fuertemente adsorbidos a la superficie de sólidos secos. Por otro lado, el éter dietílico es de polaridad conveniente para extraer plaguicidas de un intervalo de polaridad amplio sin extraer gran cantidad de otras sustancias y su volatilidad permite concentrar a los extractos con poca pérdida de los plaguicidas, pero es altamente inflamable y forma mezclas explosivas en el aire [Brown *et al*, 1996].

Extracción por adsorbentes

Estos métodos de extracción se basan en los principios de retención de los analitos sobre una fase estacionaria sólida y la posibilidad de su desorción selectiva [Smith, 2003]. Así, se evitan los inconvenientes asociados a la extracción con disolventes, tales como como: elevado consumo de los mismos, separación incompleta de fases, e interferencias de matriz. Las ventajas que se obtienen son reducción de la cantidad de la muestra y del tiempo de extracción. En este tipo de extracción se puede considerar a la Extracción en Fase Sólida (EFS), la Microextracción en Fase Sólida (MEFS), la Extracción en Fase Sólida Sobre Barras Magnéticas (ESBM) y la Dispersión de Matriz en Fase Sólida (DMFS) [Juan *et al*, 2003].

La EFS se lleva a cabo en discos o cartuchos tipo jeringa en los que se coloca a la fase estacionaria y a través de ellos se hace pasar la muestra [Hennion, 1999].

Existe la posibilidad de retener en la fase sólida a los analitos o a las interferencias [Buldini *et al*, 2002]. Para eluir a los analitos del cartucho se emplean volúmenes pequeños de disolvente. Además, en este tipo de extracción se tienen sistemas de fase normal y de fase reversa similares a los de la cromatografía de líquidos [Smith, 2003].

La MEFS se basa en la adsorción de los analitos sobre una fibra recubierta con una fase estacionaria, los cuales posteriormente se desorben en el inyector de un cromatógrafo de gases, o bien en un líquido. La extracción se puede realizar por inmersión de la fibra en la muestra líquida, o por “head space” (en un sistema cerrado, la fibra se coloca sobre la muestra para adsorber compuestos volátiles) [Juan *et al*, 2003].

La ESBM utiliza una barra magnética recubierta de fase de extracción que se sumerge en la muestra y se pone en agitación para adsorber a los analitos presentes en la misma. La desorción de los analitos es similar a la de la MEFS [Smith, 2003].

La DMFS consiste en mezclar y moler a la muestra sólida homogénea junto con un material granular, colocar esta mezcla en una columna y eluir a los residuos con un disolvente orgánico adecuado. Esta técnica elimina la necesidad de preparar y filtrar un homogeneizado líquido del tejido animal [Barker, 2000], pasos necesarios para realizar la extracción por EFS, MEFS o ESBM.

Purificación

Dado que en muchos de los métodos actualmente en uso, las muestras de tejido animal primero se homogeneizan con disolventes orgánicos de baja polaridad, los pigmentos y las grasas de la muestra se extraen simultáneamente. Por lo tanto, es necesario aplicar una técnica de limpieza (purificación) posterior [Smith, 2003]. Por ejemplo, una opción para evitar extraer las grasas es usar un disolvente miscible

en agua como acetonitrilo o acetona puesto que tales disolventes pueden extraer un gran número de residuos sin extraer grandes cantidades de lípidos [Lehotay, 2000].

Otra alternativa de limpieza es la cromatografía de permeación en gel (CPG) que puede usarse con columnas cromatográficas de baja presión que permiten la discriminación de los compuestos dependiendo de su tamaño molecular. Los lípidos, son excluidos de los poros del material polimérico y eluyen antes que los analitos más pequeños que se retienen en los poros de la columna. Los disolventes que se usan para la elución en CPG son acetato de etilo, ciclohexano, acetona, éter de petróleo y diclorometano [Serrano *et al*, 1999]. Sin embargo, se tienen las desventajas de que es sensible a la grasa, es muy laboriosa si no se aplica la automatización y se requieren pasos de limpieza adicional por medio de florisil o cromatografía en columna de gel de sílice para obtener extractos libres de grasa para la CG. Por otro lado, la cromatografía en columna con florisil para remover la grasa proporciona malos recobros para ciertos plaguicidas organofosforados, más bajos que los obtenidos con la extracción por fluidos supercríticos [Juhler, 1997].

Una alternativa al uso de CPG es la precipitación a baja temperatura mediante el enfriamiento con hielo y remoción gravimétrica de la grasa. Esta metodología es suficiente para la limpieza cuando se combina con la EFS en columnas prefabricadas [Kuivinen and Bengtsson, 2002]. Sin embargo, el porcentaje de la extracción puede ser negativamente afectando cuando se forman emulsiones difíciles de romper [Barker, 2000], y se requiere de una muestra líquida libre de partículas para obtener resultados reproducibles al emplear un cartucho de EFS [Juhler, 1997].

Una práctica menos común para la purificación de extractos de muestras de alimentos es la cromatografía líquida en fase normal, con columnas de sílice y diclorometano–hexano o diclorometano-pentano como eluyente. Con este sistema los plaguicidas son los primeros compuestos en eluir, y los componentes lipídicos eluyen al final del cromatograma, mejorando la eficiencia de la purificación al obtenerse eluidos concentrados y libres de grasa, adecuados para la cromatografía de gases [Serrano *et al*, 1999; Kuivinen and Bengtsson, 2002].

1.3.2. Análisis de plaguicidas organofosforados por cromatografía de líquidos con detección por espectrofotometría UV de arreglo de diodos

La mayoría de los métodos oficiales establecen que la determinación de los plaguicidas organofosforados en productos cárnicos se realice con cromatografía de gases y detectores específicos como el nitrógeno-fósforo o el fotométrico de llama. Sin embargo, algunos trabajos de investigación sugieren que la cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) con detector de arreglo de diodos UV-visible (DAD) es adecuada para el análisis de este tipo de compuestos porque se pueden alcanzar límites de detección del orden de nanogramos y se pueden obtener espectros de absorción UV-visible, de manera que los analitos pueden ser identificados por comparación de su espectro y tiempo de retención contra los de un estándar previamente inyectado [Loerger and Smith, 1993]. La selectividad puede incrementarse eligiendo una longitud de onda UV apropiada que permita la identificación y cuantificación de los plaguicidas con tiempos de retención muy cercanos así como una disminución en la contribución de las interferencias de la matriz. Además, con los instrumentos modernos se puede monitorear entre 190 y 800 nm, a una velocidad de un espectro por segundo, lo cual permite muy buena resolución espectral y es factible el análisis de la pureza de cada pico para identificar los posibles problemas de co-elución con otros plaguicidas o interferencias de la matriz. Algunas veces es posible distinguir compuestos de espectros UV muy similares como los productos de degradación de los plaguicidas y sus compuestos de origen [Lacorte and Barcelo, 2000].

También, el uso de la CLAR tiene la ventaja de que se pueden eliminar varios pasos en la preparación de la muestra que son rigurosamente necesarios para los análisis por cromatografía de gases. El sistema CLAR-DAD fue aplicado para la determinación de los plaguicidas organofosforados azinfos-metil, diazinon, y metil paratión con sus correspondientes productos de hidrólisis alcalina por Farran and De Pablo en 1988 y por Sultatos y sus colaboradores en 1982 para la determinación de tres organofosforados y sus análogos oxigenados junto con sus metabolitos inactivos en tejidos biológicos (trabajos citados por Loerger and Smith, 1993); así como por

Ioerger and Smith, 1993 y por Coulibaly and Smith en 1994 para la determinación de plaguicidas organofosforados en tejidos de res.

1.3.3. Metodologías publicadas para la determinación de plaguicidas organofosforados en tejidos de res

La determinación de los plaguicidas organofosforados en músculo e hígado de res ha sido poco estudiada. En la tabla 1.5 se muestran los métodos más recientes reportados en diferentes publicaciones para la determinación de plaguicidas organofosforados en tejidos de res; junto con otros trabajos sobre la determinación de plaguicidas organofosforados: el de Pagliuca *et al* (2005) en músculo e hígado de jabalí, y los de Russo *et al* (2002) y Tsoukali *et al* (2005) en tejidos biológicos humanos, que se incluyeron por su similitud con el tema de esta tesis.

En la tabla 1.5 puede observarse que las técnicas de extracción utilizadas en la mayoría de los métodos de preparación de muestra comprenden la homogeneización con disolventes de baja polaridad, y que la diferencia en el paso de la preparación de la muestra radica en los procedimientos para la remoción de las grasas, los cuales se pretenden hacer cada vez menos laboriosos que los que utilizan la extracción líquido-líquido tradicional; tales como la precipitación a bajas temperaturas y extracción en fase sólida [Juhler, 1997; Kuivinen and Bengtsson, 2002], o la cromatografía de permeación en gel [Holstege *et al*, 1994]. Cabe resaltar que el paso de la limpieza del extracto es fundamental para alcanzar buenos recobros de los analitos y por lo tanto obtener límites de detección acordes a los límites máximos residuales que están típicamente establecidos en el intervalo de 10 a 100 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ en la Comunidad Europea [Kuivinen and Bengtsson, 2002; Serrano *et al*, 1999, Juhler, 1997]. Aunque de los métodos enlistados sólo el de Holstege *et al* (1994) parece tener recobros cuantitativos para todos los analitos estudiados, la desventaja de este método es que requiere del equipo para realizar la cromatografía de permeación en gel. Otro método que parece más sencillo en cuanto a manipulación de la muestra es el propuesto por Juhler en 1998. Sin embargo, también requiere de

equipo especial para la extracción por fluidos supercríticos y el límite de detección no es tan bueno como el reportado en su trabajo de 1997 para los mismos compuestos. Por otro lado, Anastassiades and Lehotay (2003) presentan algunos resultados sobre remoción de material co-extraído por dispersión de matriz en fase sólida de una mezcla de hígados de res, pollo y cerdo, así como de músculo de res, pero no da muchos detalles de esta metodología porque su trabajo se enfoca principalmente a la extracción de plaguicidas organofosforados en frutas y vegetales por dispersión de matriz en fase sólida.

Ahora bien, después de revisar las posibilidades que existen para hacer más eficiente la determinación de plaguicidas organofosforados en músculo e hígado de res, llama la atención que el método oficial de México (NOM-028-ZOO-1995), aún cuando está basado en documentos de la *Food and Drug Administration (FDA)*, *the Environment Protection Agency of U. S. (US EPA)* y el *Journal of the Association of Official Analytical Chemists (JAOAC)* entre otros, se caracteriza por ser tardado, laborioso y requerir vastas cantidades de disolventes orgánicos que deberían ser eliminados por razones toxicológicas y ecológicas. A saber, en dicho método se establece que, para realizar la preparación de la muestra se debe pesar el tejido en un tubo para centrifuga, fortificarlo con el estándar interno y proceder a mezclar, centrifugar y filtrar. Posteriormente, se procede a extraer el filtrado con una mezcla de acetato de etilo-hexano, agitando y centrifugando; seguido de la concentración del extracto, reconstitución en un volumen específico y extracción con acetonitrilo. Enseguida se realiza una limpieza con una mezcla de carbón, celite y óxido de magnesio por cromatografía en columna utilizando una jeringa Pasteur. Finalmente, se concentra el eluato para su análisis por cromatografía de gases con detector termoiónico específico, usando al etilparatión como estándar interno.

Por otro lado, en cuanto a la separación y detección de los plaguicidas organofosforados, se puede ver que la mayoría de los métodos presentados en la tabla 1.5 emplean la cromatografía de gases con un detector específico y que con estos se obtienen límites de detección mejores a los alcanzados con la CLAR-UV.

Tabla 1.5. Métodos para la determinación de plaguicidas organofosforados en músculo e hígado de res.

Matriz	Analitos	Tratamiento preliminar.	Extracción y limpieza	Recobro / Fortificación ($\mu\text{g Kg}^{-1}$)	Separación -Detección	Límite de detección ($\mu\text{g Kg}^{-1}$)	Referencia
Sangre, hígado, riñón y fluido cerebro espinal humanos	Diazinón Metil paratión Malatión Paratión	Homogeneización del tejido con agua (1:2 m/v) en licuadora.	MEFS (Poliacrilato, NaCl)	0.1-1.7% / 20 - 20 000	CG-DNP	2 - 55	Tsoukali <i>et al</i> , 2005
Hígado (c) y músculo (b) de jabalí	Clorpirifos Dimetoato	Homogeneizar en Ultraturrax (10g) Agitar en 15 mL de acetona:acetonitrilo 1:4, Filtrar.	ELL con diclorometano, secar con Na_2SO_4 . EFS C18 .	60 -81% (c) y 68 -76% (b) / 5 - 50	CG-DNP Dos columnas.	1	Pagliuca <i>et al</i> , 2005
Riñón, hígado y tejido adiposo humanos	37 plaguicidas órgano-fosforados	Liofilizar por congelación. Mezclar con Na_2SO_4 y AcOEt: etanol 98:2. Sonicar, centrifugar, concentrar. Congelar.	Centrifugar, extraer con hexano, filtrar, CPG (S-X3, AcOEt: n-hexano 3:7). Evaporar, disolver en acetona: AcOEt 1:4.	60 -106 %	CG-EM	1 – 500	Russo <i>et al</i> , 2002
Músculo	Clorfenvinfos Clorpirifos Diclorvos Forato Metil clorpirifos Metidatión Me-pirimifos Malatión Protiofos	Homogeneización con AcOEt, centrifugar y filtrar a través de Na_2SO_4 .	EFS (PS-DVB/ AcOEt)	59 - 109 % / 4 - 65	CG- DFF	0.1 - 4.3	Kuivinen and Bengtsson 2002
Músculo	Clorpirifos Metil clorpirifos Malatión Metil pirimifos Protiofos	Triturar en procesador de alimentos.	Hydromatrix, CO_2 , 95°C. Florisil, heptano, acetona.	78 – 95% / 100	CG- DNP	10 – 30	Juhler, 1998
Músculo	Acefato Clorpirifos Me-clorpirifos Malatión Metamidofos Me-pirimifos Protiofos	Homogeneizar con AcOEt y Na_2SO_4 , centrifugar, decantar, filtrar y evaporar.	ELL (AcOEt:metanol 3:7), enfriar en hielo EFS (C18/ acetonitrilo:agua 1:1)	32 - 132 % / 2 - 400	CG- DNP	1 - 20	Juhler, 1997

AcOEt: Acetato de etilo. CG: Cromatografía de gases. DFF: Detector fotométrico de flama. DNP: Detector nitrógeno fósforo. CPG: Cromatografía de permeación en gel. DT: Detector termoiónico. EFS: Extracción en fase sólida. MEFS: Microextracción en fase sólida. ELL: Extracción líquido-líquido. EM: Espectrometría de masas.

Tabla 1.5 (Continuación). Métodos para la determinación de plaguicidas organofosforados en músculo e hígado de res.

Matriz	Analitos	Tratamiento preliminar.	Extracción y limpieza	Recobro / Fortificación ($\mu\text{g Kg}^{-1}$)	Separación -Detección	Límite de detección ($\mu\text{g Kg}^{-1}$)	Referencia
Músculo e hígado	Diazinón. Etión Disiston Diclorvos Fentión Fenitotrión Malatión Metiltitrión Metil y Etil paratión	Homogeneizar con AcOEt:hexano 7:3, centrifugar, filtrar, concentrar	ELL (Acetonitrilo) y filtrar a través de carbón, celite, MgO.	60 - 110 % / 100 - 2000	CG-DT	No reportado	NOM-028-ZOO-1995
Hígado	43 plaguicidas organofosforados	Homogeneizar en licuadora y congelar Licuar con etanol 5% en AcOEt, centrifugar.	CPG (S-X3 Biobeads) y EFS (Sílice gel)	96 \pm 4% / 50 - 500	CG-DCE	20 - 500	Holstege <i>et al</i> , 1994
Músculo (a) Poco graso (b) graso	Clorpirifos Coumafos Coumafos:oxón Famfur Famfur-oxón Fentión Me-clorpirifos Paratión Paraoxón Ronel	Homogeneización en licuadora con acetato de etilo : metanol 9:1 y NaCl	EFS (C18/Acetonitrilo)	45-95 % (a) y 22-79% (b) / 1000	CLAR-UV	250 - 1000	Ioerger and Smith, 1993
Músculo poco graso	Clorpirifos Coumafos Estirofos Famfur Fentión Ronel	Homogeneización en licuadora con acetato de etilo : metanol 9:1 y NaCl	Congelar a -13°C y filtrar a través de papel filtro No.2 Concentrar para EFS (C18/Acetonitrilo: agua 9:1). Filtrar con Nylon 0.45 μm .	Después de cocción. 40 - 67 % / 1000	CLAR-UV	No reportado	Coulibaly and Smith, 1994
Músculo	Coumafos Cruformato Famfur Fentión	DMFS (C18, hexano, benceno)		77 - 94 % / 100 a 2000	CG-DNP	No reportado	Barker <i>et al</i> , 1989

AcOEt: Acetato de etilo. CG: Cromatografía de gases. CLAR: Cromatografía de líquidos de alta resolución. DCE: Detector de captura de electrones. DFF: Detector fotométrico de flama. DNP: Detector nitrógeno fósforo. CPG: Cromatografía de permeación en gel. DT: Detector termiónico. EFS: Extracción en fase sólida. ELL: Extracción líquido-líquido. UV: Detector ultravioleta-visible.

Otro aspecto que vale la pena destacar es que la mayoría de los métodos enlistados en la tabla 1.5 requieren de 10 a 50 gramos de muestra y de 20 a 100 mL de disolvente sólo para la extracción. Sin embargo, la mayoría de los desarrollos actuales de las tecnologías analíticas para detectar residuos de plaguicidas se han enfocado en la simplificación, miniaturización y mejora de la extracción y limpieza de la muestra. Este es el caso del método de Barker *et al*, 1989 que utilizó la DMFS, también mostrado en la tabla 1.5, porque emplea únicamente 0.5 g de muestra de músculo de res sin acondicionamiento previo, la muele con C18, empaca la pasta y eluye a los plaguicidas organofosforados con hexano y benceno, estas fracciones las evapora y reconstituye en benceno para su análisis usando cromatografía de gases con detector de nitrógeno-fósforo.

Dado que la DMFS es una técnica de extracción que permite la simplificación de los protocolos de preparación de muestra, fue adoptada en este trabajo y a continuación se detallan sus características y aplicaciones.

1.4. Dispersión de matriz en fase sólida (DMFS)

En los últimos años se está tratando de eliminar de los protocolos de preparación de muestra los pasos laboriosos de los métodos oficiales para monitorear residuos de plaguicidas que no permiten generar resultados analíticos a tiempo para prevenir la entrada de todos los alimentos contaminados al mercado [Yague *et al*, 2001]. Se están buscando métodos que sean acordes con la cada vez más estricta normatividad en cuanto a los límites de detección y que permitan lo siguiente [Crouch, and Barker, 1997; Serrano *et al*, 1999]:

- a) Usar un tamaño de muestra inicial menor, aún para análisis de trazas.
- b) Mayor especificidad o mayor selectividad en la extracción.
- c) Mayor potencial para la automatización o para los métodos en línea.
- d) Técnicas ambientalmente amigables, con menos desperdicio y disminución en el uso de disolventes orgánicos.

Estas metas han sido alcanzadas en diferentes formas y siguen siendo el objetivo de la investigación activa. Una de las propuestas recientes considera que los

principios de la preparación de muestra son semejantes a los de las separaciones cromatográficas. Bajo ese contexto, la preparación de la muestra es el primer “plato teórico” en el proceso de una separación analítica y se tiene la posibilidad de alcanzar las distribuciones deseadas mediante la manipulación de la polaridad o del estado iónico del sistema [Smith, 2003]. A partir de lo anterior, se logró un avance exitoso para el análisis de residuos tóxicos en los alimentos: la técnica de homogeneización – dispersión – extracción - limpieza denominada Dispersión de Matriz en Fase Sólida (DMFS), introducida en 1989 que consiste básicamente en incorporar a la matriz en una columna de un sistema cromatográfico para la separación selectiva de los analitos [Barker *et al*, 1989; Tolls *et al*, 1999].

Para llevar a cabo esta técnica se requiere de materiales simples, por lo que puede realizarse en el laboratorio o en el campo, y consta de 3 pasos principales que son:

- 1) Dispersión de la muestra en el material de soporte sólido.
- 2) Empaque de la columna.
- 3) Elución selectiva de los analitos de interés.

Paso 1. Para dispersar la muestra sólida o semisólida se le debe colocar en un mortero no poroso, de vidrio o ágata, junto con un material de soporte sólido con fase unida (Barker recomienda una relación 1:4) y hacer uso del pistilo para molerlas hasta obtener una pasta homogénea [Barker *et al*, 1989]. Las muestras líquidas se pueden dispersar colocándolas en un tubo de ensayo o en un tubo de jeringa, que posteriormente servirá como columna, y mezclando la muestra y el soporte sólido con una espátula o un objeto parecido [Barker, 2000]. Este paso no requiere un esfuerzo vigoroso, es independiente del contenido de tejido conectivo u otros biopolímeros de la muestra y aún cuando la presión o dispersión de la muestra puede variar dependiendo del analista, por lo general se logra buena precisión y exactitud [Tolls *et al*, 1999; Barker, 2000].

Paso 2. La pasta que se obtiene después de la dispersión debe ser lo suficientemente seca para empacar la columna, para ello se coloca un filtro en el fondo del barril, se transfiere la pasta, se cubre con otro filtro y se comprime con un émbolo de jeringa plano. Puesto que el objetivo es llevar a cabo una elución cromatográfica para aislar a los analitos de interés u otros componentes de la muestra, los principios clásicos de llevar a cabo una buena cromatografía siguen siendo válidos. Por ello, se debe evitar la formación de canales en la columna y no se debe sobrecomprimir o compactar el material. Una estructura porosa permite mayor contacto entre el disolvente de extracción y los analitos [Barker, 2000].

Paso 3. La elución selectiva de los analitos de interés, es muy versátil y suele adaptarse a lo particular del ensayo. Las eluciones típicas para un único compuesto se enfocan en la realización de un fraccionamiento selectivo, usando disolventes de polaridad moderada o disolventes modificados por la adición de ácidos, bases o sales o porcentajes variados de otros disolventes. La evidencia indica que la mayoría de los analitos de interés eluyen en los primeros 4 mL de una columna de DMFS formada con 0.5 g de muestra y 2.0 g de soporte sólido. La mayoría de las eluciones reportadas se han llevado a cabo empleando cajas de vacío para controlar el flujo de los diferentes disolventes de elución, o bien con la aplicación de presión para iniciar el flujo en la cabeza de la columna usando una perilla de hule. También se recomienda enjuagar mortero y pistilo, después de la dispersión de la muestra, con el disolvente que será usado para eluir a la columna [Barker, 2000].

Muchos procesos de DMFS también han incluido el uso de co-columnas para obtener un fraccionamiento posterior y para ayudar en la limpieza de la muestra. [Barker, 2000]. Generalmente, se emplean materiales como sílice, florisil, alúmina o sílice C18, que tiene la capacidad de retener a los lípidos; los cuales pueden ser empacados en el fondo de la columna de DMFS o usarse en una columna externa apilada que colecte y fraccione la muestra que eluye de la primera [Morzycka, 2002; Walker *et al*, 1993].

Por otro lado, debido a que en la columna está presente toda la muestra, es posible realizar eluciones múltiples o secuenciales que permiten aislar un único compuesto, una clase de compuestos o varias clases de compuestos con la dispersión de una sola muestra. También se han presentado datos que demuestran que se puede fraccionar toda la muestra, lo que permite aislar e identificar a los componentes endógenos. Para estos propósitos, las columnas de DMFS preparadas con soportes C18 han sido eluidas con una secuencia de disolventes empezando por los menos polares (hexano) e incrementando la polaridad (acetato de etilo, acetonitrilo, metanol) hasta agua, que puede ser seguido de ácido, base o sal para alterar la fuerza iónica de los componentes de la columna [Barker, 2000].

1.4.1. Factores que afectan la dispersión de matriz en fase sólida

Ahora bien, la columna formada por DMFS resulta tener su carácter cromatográfico único debido a las interacciones analito-soporte-matriz por lo que aún cuando en la DMFS aplican los principios generales de la cromatografía convencional, los procesos que ocurren en este sistema dependen no solo de las interacciones dinámicas que involucran a la fase estacionaria, al soporte sólido y a la fase móvil, sino también de aquellas interacciones que involucran a todos los componentes de la matriz; estas últimas no están totalmente comprendidas y se necesita más investigación al respecto pero se ha demostrado que los siguientes factores pueden afectar el proceso:

Naturaleza del soporte sólido: Aunque existen fases sólidas con soporte polimérico, para la DMFS, se han hecho más estudios con sílices derivatizadas porque se espera que los grupos silanol no derivatizados en la superficie y en los poros del material del soporte contribuyan de forma importante para obtener pastas más secas, lo que facilita el empaquetado y la elución. En cuanto al tamaño de la partícula, el uso de materiales con diámetros de 3-20 μm conduce a flujos lentos o no existentes, por ello se prefieren partículas de 40 a 100 μm de diámetro. Además, a diferencia de los materiales esféricos que se usan en cromatografía de líquidos, estos materiales se

prefieren con bordes puntiagudos y de forma irregular para facilitar la ruptura de la matriz durante la molienda [Barker, 2000].

La naturaleza de la fase unida: Al mezclar la fase sólida con la muestra en el mortero se ejerce la acción abrasiva del soporte sobre la muestra, pero la fase orgánica unida es la que permite la ruptura y dispersión completas de los componentes de la muestra con base en interacciones hidrofóbicas e hidrofílicas, obedeciendo a sus polaridades relativas [Barker, 2000]. Aún más, el examen por microscopía electrónica de barrido demostró que las partículas de sílice no derivatizadas pueden romper la arquitectura de la muestra pero las células permanecen enteras, mientras que cuando se emplean materiales como el C₁₈ la ruptura celular y por lo tanto la dispersión total de la muestra es evidente. En las microfotografías también se observó lo que parece ser una película de 100 Å de material disperso sobre las partículas de sílice lo cual indica que se dispone de una superficie de 500 m² g⁻¹ para la interacción de los componentes de la muestra con los disolventes de elución. Esto permite suponer que pueden lograrse extracciones exhaustivas [Barker *et al*, 1993]. Finalmente, la C₁₈ ha sido la fase más empleada, aunque también se han empleado fases polares para aislar analitos de polaridad elevada [Blesa *et al*, 2003; Barker, 200].

La naturaleza de la matriz de la muestra: Puesto que la muestra se convierte en parte del sistema cromatográfico, aspectos como el contenido de lípidos, de proteínas totales, etc., y su distribución se reflejan en cómo se lleva a cabo la elución, porque mientras la fase unida sobre el soporte sólido es inmóvil los componentes de la matriz dispersa no lo son y ciertos analitos de interés son eluidos constantemente junto con componentes de la matriz, dependiendo del disolvente de elución y de las interacciones dinámicas entre la matriz dispersa y la fase sólida [Barker, 2000]. No obstante, en muchos casos las polaridades relativas de los analitos y los coeluidos son muy diferentes y estas posibles interferencias pueden removerse con una EFS estándar o por una simple redisolución, aunque otras veces es necesario adicionar ácidos, bases, sales, agentes quelantes o dequelantes, antioxidantes, etc. cuando se está formando la pasta o en el disolvente de elución

para asegurar que ocurran ciertas interacciones entre la fase unida al soporte sólido y/o el disolvente de elución [Walker *et al*, 1993].

La naturaleza del disolvente de elución y la secuencia de elución: La polaridad relativa de los disolventes de elución respecto a la de las fases unidas a los soportes sólidos determinan qué es lo que permanece en la columna y qué es lo que se eluye [Blesa *et al*, 2003]. La secuencia y el diseño de un perfil de elución debe enfocarse a incrementar lo más posible la retención de los componentes de la matriz sobre la columna mientras que se eluye a los analitos de interés con alto grado de especificidad [Morzycka, 2002]. El eluato puede ser lo suficientemente limpio para llevarse directamente al análisis, aunque en otras ocasiones deben aplicarse co-columnas u otras técnicas de limpieza [Barker, S. A., 2000].

1.4.2 Ventajas de la DMFS como técnica de extracción para matrices complejas

Se puede considerar a la DMFS como una técnica alterna atractiva y una versión en escala más pequeña de los métodos más clásicos para resolver problemas analíticos difíciles [Crouch and Barker, 1997]. Cabe aclarar que aún cuando se supone un decremento en la sensibilidad y homogeneidad al disminuir el tamaño de muestra, la pérdida de sensibilidad puede evitarse empleando instrumentos analíticos específicos para la determinación de los analitos; mientras que la homogeneidad se recupera al uniformar la muestra entera y tomar submuestras del homogeneizado para el análisis [Barker, 2000].

De esta manera, la técnica de DMFS presenta las siguientes ventajas sobre otras técnicas de extracción para matrices complejas: Es aplicable a tejido fácil o difícil de romper. Existe la flexibilidad suficiente en el método para adaptarlo a diferentes necesidades. Se requieren cantidades de disolvente relativamente pequeñas. Permite aislamientos rápidos con alta especificidad, la cual puede incrementarse con el uso de co-columnas u otras técnicas de limpieza. El proceso también puede automatizarse usando un mortero automático para preparar las muestras y un robot o instrumento que permita la elución por lotes. Además, permite

reducir enormemente el tiempo de análisis. Por ejemplo, la aplicación de la DMFS en problemas analíticos difíciles en el área de los alimentos puede reducir cantidad de disolvente en un 95% y el tiempo de preparación de la muestra, al igual que el gasto en insumos, en un 90% comparando con los métodos clásicos, mientras que se obtienen resultados analíticos que son iguales o mejores que los métodos “oficiales” [Barker *et al*, 1993].

1.4.3. Aplicación de la dispersión de matriz en fase sólida para el análisis de compuestos orgánicos en tejidos animales

La DMFS se ha utilizado en los procedimientos generales de preparación de muestras para una extensa variedad de matrices alimenticias y diferentes tipos de analito, por ejemplo; para la extracción de medicamentos veterinarios en leche y tejidos animales, y más recientemente en el análisis de herbicidas, plaguicidas y otros contaminantes de frutas y vegetales así como de otros alimentos procesados [Smith, 2003]. Al respecto, Steven A. Barker reportó en el 2000 una revisión de la aplicación de la DMFS en el análisis de alimentos haciendo referencia a 81 trabajos publicados sobre la determinación de residuos tóxicos en frutos, vegetales, granos, leche, huevos, así como en tejidos de mariscos, pescado, pollo, bovinos y cerdo.

Por otro lado, A. Juan y colaboradores también publicaron en el 2003 una revisión sobre los métodos de determinación de residuos de plaguicidas organofosforados en alimentos en donde citan la aplicación de la DMFS en el manejo de muestras como la leche y pescado. Adicionalmente, en la tabla 1.6 se concentran las aplicaciones de los últimos cinco años de la DMFS reportadas para la extracción de diversos compuestos en tejidos animales. Sin embargo, cabe resaltar que aún no se tienen reportes sobre la aplicación de la DMFS en determinación multiresiduo de plaguicidas organofosforados en hígado y músculo de res, salvo la determinación de fentión, famfur, cruformato y coumafos en músculo bovino [Barker *et al*, 1989] citada en la tabla 1.5, en donde se empleó C18 en relación 4:1 con la muestra, hexano y benceno como disolventes de elución y cromatografía de gases con detector de nitrógeno-fósforo.

Tabla 1.6. Aplicación de la DMFS en tejidos animales (2000 –2005)

Matriz	Analito	Dispersión	Purificación y elución	Determinación	Referencia
Grasa de pollo y de bovino, músculo e hígado de pez.	PCBs y PBDEs	Na ₂ SO ₄ , florisil	Sílice ácida, n-hexano	CG-DCE	Martínez <i>et al</i> , 2005
Alimento para pez	PBDEs, PCBs y PBBs	C18	Alúmina básica, hexano	CG-EM	Carro <i>et al</i> , 2005
Pez	PAHs	Na ₂ SO ₄ , C18	Florisil, C18, acetonitrilo	CLAR-DFF	Pensado <i>et al</i> , 2005
Hígado y riñón de rata	Microcistinas	C18	Metanol:agua 7:3	CLAR-EM	Ruiz <i>et al</i> , 2005
Músculo, tiroides e hígado de cerdo, músculo de res	Derivados de tiocarbamida	Silica virgen	Gel de sílice, metanol, cloroformo	CG-EM	Zhang, 2005
Grasa de pollo y de res, mantequilla	PCBs	Na ₂ SO ₄ , florisil	Hexano:diclorometano 9:1	CG-EM CG-DCE	Criado <i>et al</i> , 2004
Músculo de pez	Lactonas macrocíclicas	C18, alúmina neutra	Carbón activado, diclorometano, metanol	CLAR-EM	Lagaña <i>et al</i> , 2003
Músculo bovino y porcino	Cloramfenicol	C18	n-hexano, acetonitrilo, agua	CG-DCE	Kubala-Drincic <i>et al</i> , 2003
Músculo de pollo y de res	Sulfonamidas	Cristobalita	Agua caliente	CLAR-EM	Bogialli <i>et al</i> , 2003
Riñón de cerdo	Avoparcina	Hydromatrix XAD-7HP	Diatomáceas, agua: metanol 7:3 (75°C, 50atm)	HILIC-UV	Curren and King, 2002
Músculo de pez	Alquinbencen-sulfonatos lineales	C18	Intercambio aniónico	CLAR-EM	Tolls <i>et al</i> , 2002
Hígado de res	Clenbuterol	C18	MSPD-MISPE, ácido acético: acetonitrilo 1:99	CLAR-DCE CLAR-EM	Crescenzi <i>et al</i> , 2001
Pollo	Sulfonamidas	Alumina neutra	Agua:etanol 7:3	CLAR-UV	Kishida and Furusawa, 2001

PBBs: Bifenilos polibromados. PCBs: Bifenilos policlorados. PBDEs: Éteres difenil polibromados. PAHs: Hidrocarburos policíclicos aromáticos. HILIC: Cromatografía de líquidos hidrofílica. CG: Cromatografía de gases. CLAR: Cromatografía de líquidos de alta resolución. DCE: Detector de captura de electrones. DFF: Detector fotométrico de flama. DNP: Detector nitrógeno fósforo. CPG: Cromatografía de permeación en gel. EFS: Extracción en fase sólida. ELL: Extracción líquido-líquido. UV: Detector ultravioleta-visible. EM: Espectrometría de masas. MISPE: Extracción en fase sólida de impresión molecular.

Capítulo 2. Desarrollo Experimental.

2.1. Materiales y equipos

2.1.1. Sistema cromatográfico

- Cromatógrafo de líquidos de alta resolución (*VARIAN, USA*) con bomba ternaria modelo 9010.
- Automuestreador (*VARIAN, USA*) modelo 9100, con rizo de 20 μL .
- Detector UV-Vis de arreglo de diodos (*VARIAN, USA*) modelo 9065.
- Software de control y procesamiento de datos “Star Workstation” (*VARIAN, USA*) versión 4.5 1989-1996.
- Columna analítica de acero inoxidable (*VARIAN, USA*) de 150 x 4.60 mm d. i. Empacada con sílice fase inversa RES ELUT C18, tamaño de partícula 5 μm .
- Precolumna de guarda de acero inoxidable *Hichrom*, de 13 x 4.5 mm d. i., empacada con sílice fase inversa *Nucleosil C18*, (Phenomenex, USA) tamaño de partícula 10 μm .

2.1.2. Material y equipo para la preparación de muestra

- Mortero de ágata de 30 mL.
- Reservorios con filtro para empacar cartuchos para extracción en fase sólida de 6mL (*VARIAN, USA*).
- Cartucho de jeringa de 20 mL (BD, PLASTIPAK, México).
- Filtros para cartuchos de extracción en fase sólida de 6 mL, 1/2”, 20 μm (*VARIAN, USA*).
- Émbolo de jeringa de 5 mL (BD, PLASTIPAK, México).
- Cámara de vacío con regulador de presión (Ashcroft, USA).
- Rotavapor automático con bomba de vacío BÜCHI (Labotechnik AG, Suiza).

2.1.3. Otros equipos y accesorios utilizados

- Sistema de filtración por vacío para fase móvil, Micro Filtration System, (Cole Parmer, USA).
- Membranas de “Nylon” (Cole Parmer, USA) de 47 mm de diámetro y tamaño de poro de 0.45 μm .
- Baño de ultrasonido para degasificación de soluciones y fase móvil (Branson, USA) modelo 1210.
- Micropipeta de volumen variable de 100 – 1000 μL (Eppendorf, Alemania).
- Micropipeta de volumen variable de 20 – 200 μL (Eppendorf, Alemania).
- Micropipeta de volumen variable de 2 – 20 μL (Transferpette, Alemania).
- Microbalanza analítica (Mettler Toledo, Suiza) modelo AG245.
- Microscopio electrónico de barrido JSM 5600-LV (JEOL, Japón).

2.1.4. Disolventes y reactivos

- Metanol grado cromatográfico (J. T. Baker, México).
- Acetonitrilo grado cromatográfico (J. T. Baker, México).
- Agua grado cromatográfico.
- Sílice C18, Supelclean LC18 (SUPELCO, USA).
- Florisil, silicato de magnesio activado, polvo 60 -100 mallas. Adsorbente selectivo para cromatografía de gases. (J. T. Baker, México).
- Gel de sílice, polvo 60 - 200 mallas apropiado para cromatografía (J. T. Baker, México).
- Estándares de plaguicidas (Chemservice, West Chester):
 - Clorfenvinfos, pureza 99% .
 - Clorpirifos, pureza 99% .
 - Diazinón, pureza 98% .
 - Fenitrotión, pureza 98% .
 - Metil paratión, pureza 99.5% .

2. 1. 5. Preparación de soluciones estándares de plaguicidas

Se prepararon disoluciones madre de cada uno de los plaguicidas organofosforados a una concentración de 200 mg L⁻¹ con los estándares utilizando metanol como disolvente, a partir de estas se hicieron diluciones para obtener el espectro de absorción de luz ultravioleta de cada compuesto. Además, con las mismas soluciones, se prepararon mezclas para establecer las condiciones para la separación cromatográfica.

Posteriormente, se preparó una disolución de la mezcla de los cinco plaguicidas organofosforados para fortificar la muestra de tejido de res, con una concentración de 500 mg L⁻¹ en metanol. Las demás disoluciones de trabajo, fueron preparadas a partir de esta disolución madre por medio de diluciones en metanol.

Todas las disoluciones fueron almacenadas a una temperatura de 4 °C.

2.2. Métodos

El desarrollo experimental se describe en la figura 2.1, los detalles se presentan en el texto y se puede dividir en cuatro etapas:

- 1) Implementación de la separación analítica y la detección de los plaguicidas organofosforados por CLAR-DAD.
- 2) Desarrollo del método de preparación de la muestra:
 - a. Extracción.
 - b. Limpieza del extracto.
 - c. Concentración del extracto.

La optimización de estos puntos se basó en obtener el recobro máximo de los plaguicidas organofosforados.

- 3) Evaluación del método.
- 4) Aplicación.

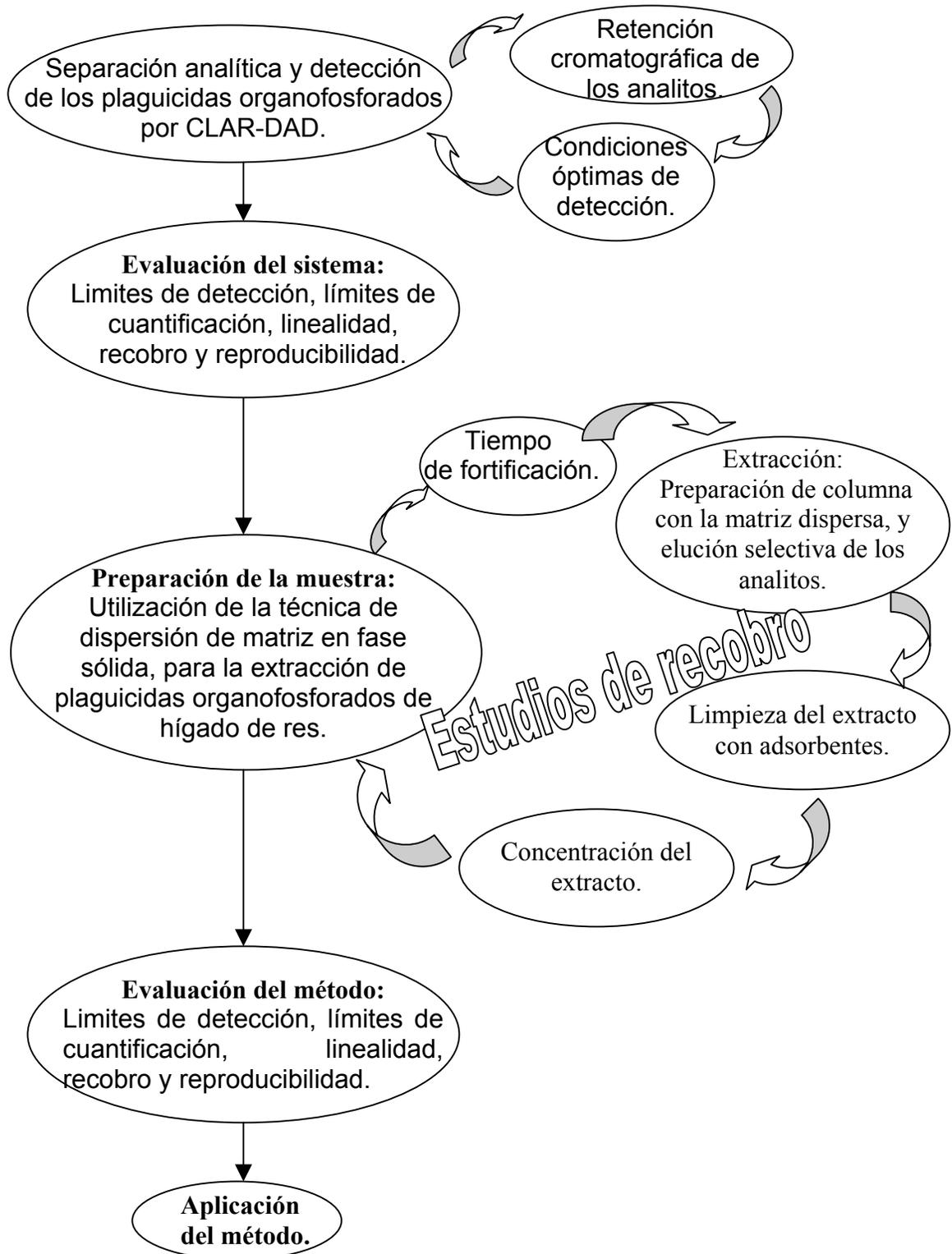


Figura 2.1. Diagrama general de la metodología.

2.2.1. Separación analítica y detección de los plaguicidas organofosforados

2.2.1.1. *Estudio de la retención cromatográfica de los plaguicidas*

Para conocer la dependencia del logaritmo del factor de retención (k') en función del porcentaje de disolvente orgánico de la fase móvil, se empleó un sistema cromatográfico de fase inversa, en el que la fase estacionaria fue la sílice C18 y la fase móvil una serie de mezclas metanol: agua 90:10, 85:15, 80:20, 75:25 y 70:30 con flujo de 1 mL min^{-1} . De esta manera, se establecieron las condiciones para la separación analítica de los compuestos de interés. Se trabajó con soluciones de 5 mg L^{-1} de cada uno de los plaguicidas.

2.2.1.2. *Condiciones óptimas para la detección*

Se obtuvo el espectro de absorción de luz ultravioleta (en el intervalo de 190 a 367 nm) de cada uno de los compuestos, a partir de la inyección de $20 \text{ }\mu\text{L}$ de una disolución de 5 mg L^{-1} en condiciones isocráticas metanol:agua 85:15. En base a estos espectros se eligió la longitud de onda adecuada para la detección y cuantificación de los analitos.

2.2.1.3. *Linealidad, precisión y límite de detección para el sistema cromatográfico*

Se inyectaron $20 \text{ }\mu\text{L}$ de disoluciones de la mezcla de los cinco plaguicidas a 0.25, 0.5, 1, 2, 5, 10, y 20 mg L^{-1} por triplicado. A partir de los datos de área del pico cromatográfico en función de la concentración se obtuvo la recta de calibración mediante el ajuste de mínimos cuadrados.

Además, se determinó el límite de detección experimental inyectando disoluciones de estándares cada vez más diluidas.

2.2.2. Desarrollo del método de la preparación de la muestra

2.2.2.1. Preparación de la columna de dispersión.

La metodología empleada para la preparación de la columna de dispersión fue una adaptación del esquema general propuesto por Barker (2000), el cual se resume en la **figura 2. 2**. La elución selectiva se describirá más adelante. El acondicionamiento de la sílice C18 consistió en lavarla en columna con 1.5 mL de metanol por cada gramo de adsorbente, y secarla perfectamente por aspiración con el sistema de vacío.

2.2.2.2. Observación microscópica de los adsorbentes y las fases dispersas.

Este estudio se llevó a cabo con el hígado y el músculo de res para corroborar que la matriz realmente se rompió como tejido a escala celular y se dispersó en la superficie de la sílice C18. Para el estudio se colocaron 100 mg de muestra de tejido en el mortero, se adicionaron 400 mg de sílice C18 acondicionada previamente con metanol y se homogeneizó haciendo uso del pistilo por 5 minutos. Finalmente, se tomó una submuestra que se mandó a observación por microscopía electrónica de barrido.

Al mismo tiempo, para diferenciar con mayor facilidad y seguridad a los tejidos de res de la fase C18 en las fotografías de las matrices dispersas en el adsorbente, se observaron por microscopía electrónica muestras de sílice C18 acondicionada, así como de sílice C18 acondicionada y triturada en el mortero.

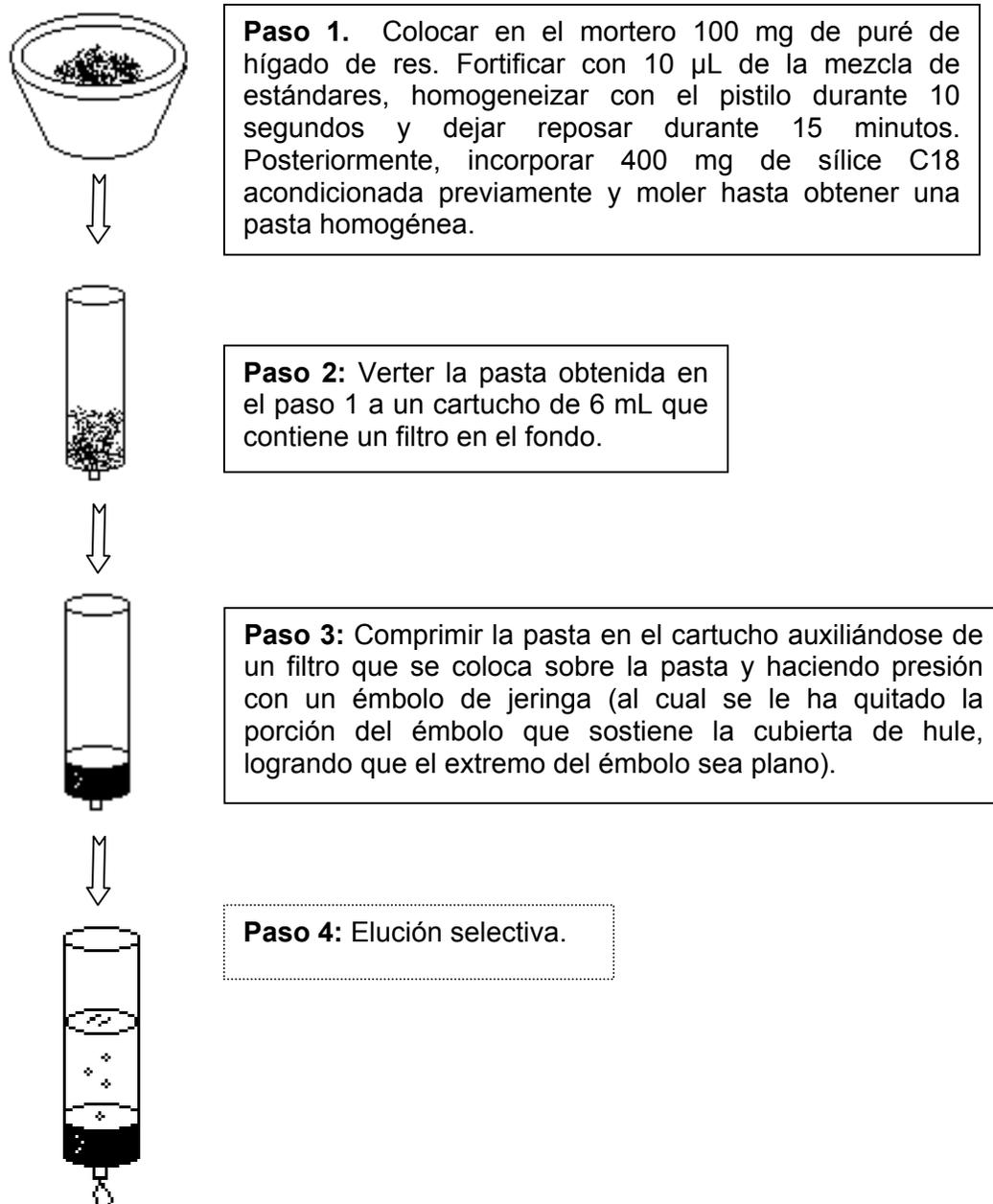


Figura 2.2. Preparación de la columna para extracción de los plaguicidas organofosforados por Dispersión de Matriz en Fase Sólida.

2.2.2.3. Programa de elución selectiva de los plaguicidas organofosforados

Considerando al sistema de extracción como una cromatografía en fase inversa, se planteó que la elución selectiva de los plaguicidas podría realizarse con mezclas metanol:agua de fuerza eluyente creciente. Los ensayos que se llevaron a cabo se presentan en la tabla 2.1, para cada uno de ellos se preparó una columna de dispersión de acuerdo a la figura 2.2.

De esta manera, para conocer el patrón de elución de los plaguicidas de la columna de dispersión y optimizar la selectividad, se recuperó el extracto en fracciones y se determinó el contenido de plaguicidas en cada una de ellas mediante el sistema CLAR-DAD. Estos datos permitieron calcular el recobro (cantidad recuperada entre cantidad adicionada) por fracción y global.

Tabla 2.1. Ensayos para optimizar la elución.

Ensayo	Programa	Volúmenes
1	Metanol:agua 7:3	6 fracciones de 1 mL
2	a) agua b) metanol:agua 1:1 c) metanol	2 mL de cada composición
3	a) agua	1.5 mL
	b) metanol 20%	1.5 mL
	c) metanol	2 fracciones de 1.5 mL
4	a) agua	2 mL
	b) metanol 30%	4 mL
	c) metanol 80%	6 mL
5	a) agua	7 fracciones de 1 mL de agua
	b) metanol 30%	Una fracción de 4 mL y otra de 2 mL
	c) metanol 80%	6 mL
6 (6a y 6b)	a) agua	5 fracciones de 1 mL
	b) metanol 30%	4 fracciones de 1 mL
	c) metanol 80%	4 fracciones de 1 mL

Los ensayos 1, 2, y 3 fueron importantes para eliminar componentes de la matriz dispersa que no se deseaban en el extracto. A partir de estos se

plantearon los ensayos 4 y 5, cuya diferencia fue el volumen de disolventes y el porcentaje de disolvente orgánico. Estos ensayos permitieron establecer el programa de limpieza previa a la elución de los plaguicidas de la columna de dispersión.

Con el ensayo 6a se monitoreo la elución de los plaguicidas en un cartucho empacado con sílice C18 en la que se adicionó previamente la disolución estándar y se molió haciendo uso del mortero de ágata. De los resultados se estableció el volumen necesario para maximizar los recobros. Por otra parte, en el ensayo 6b se preparó una columna de dispersión de hígado fortificado y se le aplicaron los volúmenes de elución indicados en la tabla 2.1. Después, se determinó su reproducibilidad a partir del coeficiente de variación del recobro de los plaguicidas obtenido para tres ensayos.

2.2.2.4. Tiempo de fortificación

Una vez que se estableció el programa para la elución selectiva de los analitos, se estudió el efecto del tiempo de equilibrio de la fortificación sobre el recobro de cada uno de los plaguicidas. Se estudiaron 15 minutos, 1 hora y 24 horas por triplicado. Después de la homogeneización de la muestra de puré de hígado con la disolución de los estándares, se cubrió al mortero conteniendo al pistilo con papel aluminio o parafilm para evitar la deshidratación de la muestra y se guardó en el refrigerador, para cada tiempo de equilibrio.

2.2.2.5. Ajustes en el programa de elución por incremento en la cantidad de muestra

Después de optimizar el tiempo de fortificación y el programa de elución, se procedió a disminuir los niveles de fortificación del hígado a concentraciones cercanas a los límites máximos residuales establecidos para estos alimentos.

Al disminuir los niveles de fortificación fue necesario incrementar la cantidad de matriz y de adsorbente, por lo que se decidió trabajar con 500 mg del puré de hígado y 2 g de sílice C18. Una consecuencia de este cambio fue la necesidad de adecuar los volúmenes de los disolventes para la elución selectiva. Así, se seleccionaron las siguientes condiciones:

1. Un volumen de agua de 20 mL para eliminar impurezas altamente polares como algunas proteínas y restos de sangre. Este se estableció por observación visual, hasta la desaparición de la coloración y turbidez de los eluatos.
2. Se mantuvo el paso de limpieza con 3 mL de metanol al 30%.
3. Posteriormente, se obtuvieron los frentes de elución de los plaguicidas, en 5 diferentes columnas de dispersión, con los siguientes disolventes:
 - ⇒ metanol 80%
 - ⇒ metanol 70%
 - ⇒ acetonitrilo puro
 - ⇒ acetonitrilo 80%
 - ⇒ acetonitrilo 60%

Se recuperaron volúmenes de 1 mL y se inyectaron al sistema CLAR-DAD para determinar el contenido de los analitos en cada fracción. El objetivo de estos ensayos fue investigar la posibilidad de disminuir la co-elución de interferencias poco polares como las grasas y, al mismo tiempo, establecer los volúmenes para extraer cuantitativamente a los cinco plaguicidas con los diferentes disolventes.

2.2.2.6. Concentración del extracto

Después de obtener los diferentes patrones de elución, se procedió a concentrar los extractos de hígado que presentaron el mejor recobro de los plaguicidas, con dos tipos de evaporación:

- a) Evaporación a 55 – 60 °C en baño de agua.
- b) Evaporación a sequedad a 40 °C y 200 mbar en rotavapor y reconstitución con 500 µL de acetonitrilo.

De estos métodos se optó por trabajar con el rotavapor de acuerdo al inciso b); para verificar que durante la evaporación no hubiera pérdidas de los plaguicidas se realizaron los siguientes ensayos:

1) Se determinó por triplicado el recobro antes y después de la evaporación de los extractos de hígado.

2) Se estudió por triplicado el recobro de los plaguicidas después de llevar a sequedad 6 mL de una disolución de los plaguicidas. Esta disolución se preparó adicionando 10 µL de una disolución estándar de 250 mg L⁻¹ en 6 mL de acetonitrilo, de tal forma que al reconstituir en 500 µL se obtuviera una concentración de 5 mg L⁻¹.

2.2.2.7. Limpieza del extracto con adsorbentes

Una vez seleccionado el disolvente para la elución cuantitativa de los plaguicidas y el método de evaporación se procedió a optimizar la limpieza del extracto con adsorbentes probando los siguientes ensayos:

- a) Colocando 400 mg de sílice C18 en el fondo del cartucho que contenía a la matriz dispersa.
- b) Haciendo pasar el extracto a través de un cartucho con 500 mg de florisil.
- c) Pasando el extracto a través de un cartucho con 500 mg de gel de sílice virgen.

2.2.2.8. Modificación de la matriz por incorporación de surfactante

Se decidió verificar si la adición de heptanosulfonato de sodio (HS) al hígado de res después del tiempo de equilibrio en la fortificación favorecería el recobro de clorfenvinfos. Para ello se adicionaron 100 µL de la disolución de HS

justo antes de la dispersión del hígado en la sílice C18. Se realizaron pruebas con tres concentraciones del surfactante: 0.1 M, 0.01 M y 0.001 M.

2. 3. Evaluación del método

2.3.1. Estudios de recobro

El recobro porcentual de cada plaguicida en cada ensayo se calculó con la ecuación 2.3.1.1.

$$\text{Recobro (\%)} = \frac{100 \times \text{Área del pico en el extracto}}{\text{Área del pico en disolución control}} \quad (2.3.1.1)$$

Para realizar los estudios de recobro del método desarrollado se ensayaron por triplicado muestras de hígado de res fortificadas con 0.25, 0.5, 1, 2.5, 5 y 10 $\mu\text{g g}^{-1}$. Además se trazaron las gráficas de cantidad adicionada contra cantidad recuperada (en ng) cuya pendiente permitió estimar el recobro del método en el intervalo graficado. Si el valor de la pendiente es 1 el recobro es del 100%, y la dispersión de este valor se calculó multiplicando el valor de la desviación estándar de la pendiente por el valor de la distribución t al nivel de confianza y a los grados de libertad correspondientes.

2.3.2. Linealidad y reproducibilidad del método

A partir de los resultados de las fortificaciones a los distintos niveles se trazó la gráfica de cantidad adicionada contra el área de los picos. Mediante el ajuste de mínimos cuadrados de los datos se calcularon los coeficientes de correlación, que representan la linealidad del método, para cada plaguicida.

La reproducibilidad del método se estimó a partir del coeficiente de variación del recobro con 5 repeticiones de ensayos con muestras fortificadas a $1 \mu\text{g g}^{-1}$ y $5 \mu\text{g g}^{-1}$.

2.3.3. Límites de detección y cuantificación del método

El límite de detección experimental (LDEM) se determinó fortificando a niveles cada vez menores, y estuvo dado por aquella concentración en la que se debió disminuir la relación señal:ruido de 5 a 3 para que el software pudiera registrar la señal como un pico.

El límite de detección del método (LDM) se determinó con la fórmula 2.3.3.1, que fue tomada de: Code of Federal Regulation (US EPA); Appendix B to Part16 “Definition and Procedure for the Determination of the Method Detection Limit.” Revision 1.11.

$$\mathbf{MDL} = t_{(n-1, 1-\alpha=0.99)} (\mathbf{s}) \quad (2.3.3.1)$$

$$[\mathbf{LCL-UCL}] = [0.64 \mathbf{MDL} - 2.20 \mathbf{MDL}] \quad (2.3.3.2)$$

Donde:

MDL = Límite de detección en área o respuesta del detector.

s = Desviación estándar de la respuesta del detector para $n=7$ ensayos (trabajando en el intervalo de concentraciones de 1 a 5 veces más del LDEM; $1 \mu\text{g g}^{-1}$ en este caso)

t = Estadístico *t* con $\alpha=0.01$ y 6 grados de libertad;

[LCL-UCL] = Intervalo del MDL para 95% de confianza y 7 ensayos.

El valor obtenido se interpola en la recta de calibración para obtener el LDM. El límite de cuantificación se obtuvo multiplicando el LDM por 3.104, de acuerdo a Currie (1999).

2.4. Evaluación del método con la matriz de músculo de res

La Norma Oficial Mexicana para el control de residuos de plaguicidas organofosforados en productos cárnicos de bovino establece que el monitoreo se lleve a cabo en hígado y/o en músculo. Por lo tanto, el método desarrollado también se evaluó empleando músculo de res como matriz, de acuerdo a la sección 2.3 de este capítulo; fortificando 0.5 g de carne molida de res con la mezcla de los 5 plaguicidas a concentraciones de 0.25, 0.5, 1.0, 2.5 y 5 $\mu\text{g g}^{-1}$.

2.5. Aplicación del método

El método desarrollado en este trabajo se empleó para analizar 50 muestras de hígado de res con aparentes lesiones patológicas. La finalidad de esos análisis fue participar en un estudio preliminar para investigar si la presencia de los plaguicidas está relacionada con el desarrollo de lesiones patológicas o inclusive la formación de tumores en hígado de res. Las muestras fueron seleccionadas en 2 rastros diferentes por médicos veterinarios del Laboratorio de Patología de la FES Cuautitlán y se recibieron en el laboratorio numeradas de manera consecutiva, para identificarlas se les asignó la letra H seguida del número correspondiente.

2.5.1. Confirmación de la presencia de clorpirifos y clorfenvinfos en las muestras de hígado por Cromatografía de Gases - Espectrometría de Masas

En las muestras de hígado de res con lesiones patológicas analizadas por DMFS-CLAR-DAD se encontraron picos en los tiempos de retención correspondientes al clorfenvinfos y al clorpirifos pero con muy bajas concentraciones por lo que el espectro UV visible no coincidió totalmente con el de los estándares. Por tal motivo se decidió confirmar por espectrometría de

masas la presencia de estos plaguicidas en los extractos de hígado mencionados. La metodología a seguir fue la siguiente:

- a) **Condiciones para el cromatógrafo de gases.** Se inyectó 1 μL de cada una de las disoluciones estándares de clorpirifos y clorfenvinfos (5 mg L^{-1}), encontrándose una buena separación con las siguientes condiciones: Columna DB5. Helio como gas acarreador. Inyección splitless/1 min a $280 \text{ }^\circ\text{C}$. Temperatura del horno: 2 minutos a $60 \text{ }^\circ\text{C}$, rampa hasta $280 \text{ }^\circ\text{C}$ con $20^\circ\text{C}/\text{min}$ seguida de 10 minutos isotérmico a 280°C .
 - b) **Detección.** Con el modo de escaneo se obtuvo el espectro de masas de cada compuesto. A partir de estos se seleccionaron los iones de mayor abundancia y de mayor peso molecular para trabajar con el detector de masas en modo de monitoreo selectivo iones (SIM, por sus siglas en inglés). Así, se monitoreó a los iones 197, 258 y 314 m/z hasta los 13.2 minutos, 267, 269, 323 y 325 m/z hasta los 13.4 minutos, 285 m/z hasta los 23 minutos. El tiempo de monitoreo de cada ion (Dwell time) fue de 100 ms.
 - c) **Limpieza.** Dado que los extractos de las muestras de hígado obtenidos con el método desarrollado para CLAR-DAD aún contenían lípidos que deberían ser eliminados para el análisis por CG-EM, fue necesario realizar una limpieza antes del paso de evaporación del extracto. Para ello se utilizó la técnica de extracción en fase sólida empleando cartuchos que contenían 1 g de florisil activado ($300 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 8hrs).
- NOTA: La determinación de lípidos en los extractos se realizó por cromatografía de gases y detector de ionización de llama (CG-DIF), los cromatogramas de los extractos se compararon con el cromatograma de una disolución estándar de ácidos grasos.

Capítulo 3. Resultados y Discusión.

3.1. Detección y separación analítica de los plaguicidas organofosforados

3.1.1. Condiciones óptimas para la detección

Los espectros de absorción de luz ultravioleta de cada uno de los plaguicidas organofosforados en estudio se presentan en la **figura 3.1**. Sus máximos de absorción se presentan en la **tabla 3.1**, junto con la longitud de onda más cercana al máximo de absorción de cada compuesto que el detector de arreglo de diodos tiene establecidas para el despliegue de resultados; estas últimas fueron las seleccionadas para llevar a cabo la cuantificación a través de una calibración externa.

Tabla 3.1. Longitud de onda de máxima absorción y de cuantificación de los plaguicidas organofosforados.

Plaguicida	Datos de los espectros UV-vis *		Longitud de onda para cuantificación (nm)
	Longitudes de onda de máxima absorción UV (nm)	Porcentaje del máximo de absorción	
Clorfenvinfos	201.42	100.0	244
	243.79	30.5	
Clorpirifos	199.53	100.0	287
	228.10	41.8	
	288.91	21.7	
Diazinón	200.52	100.0	244
	245.87	50.0	
Fenitrotión	200.60	100.0	268
	267.63	42.7	
Metil paratión	199.53	100.0	273
	272.31	73.2	

*Datos experimentales arrojados por el software de control y procesamiento de datos, "Star Workstation" versión 4.5, del detector de arreglo de diodos UV-vis.

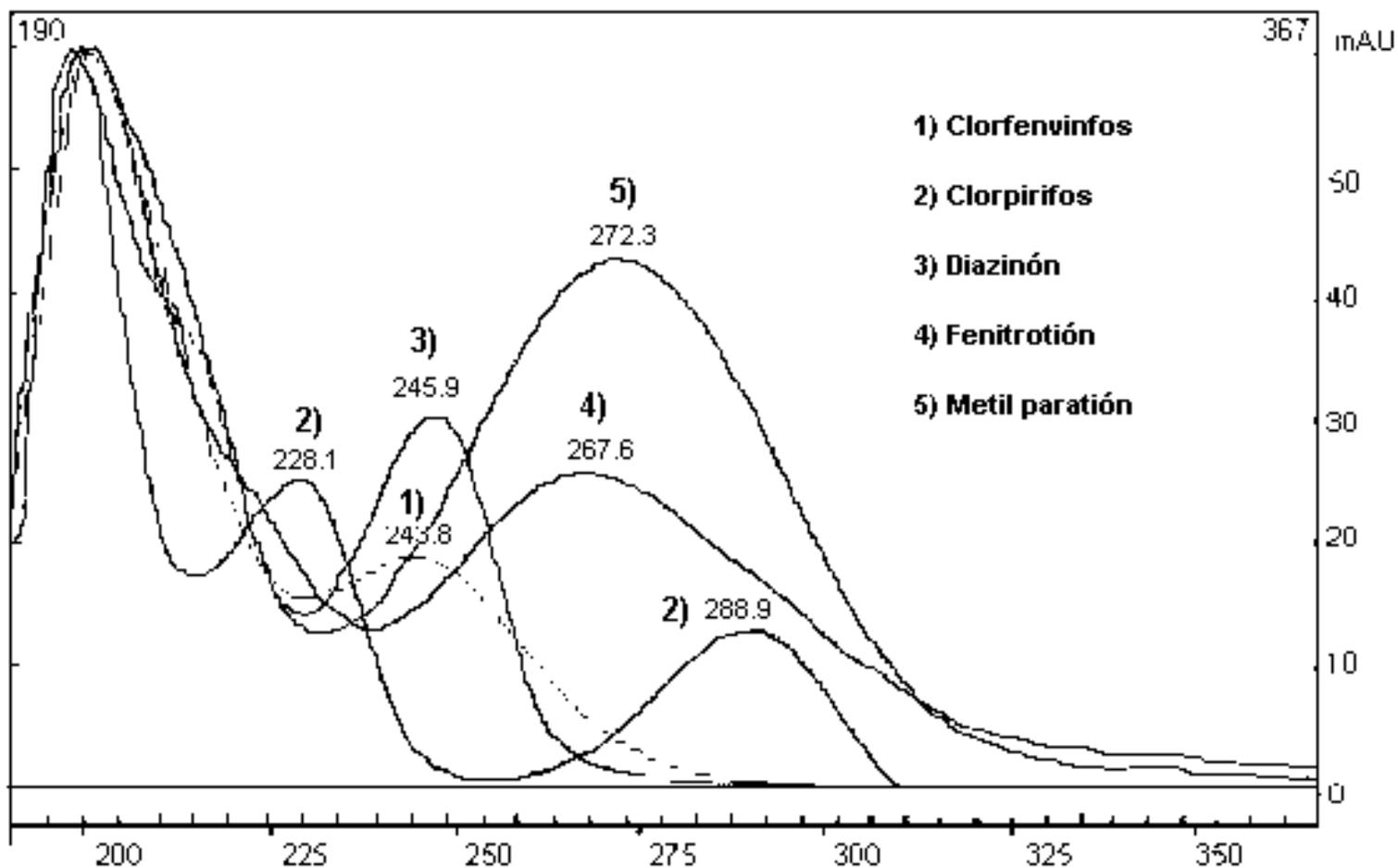


Figura 3.1. Espectros de absorción de los plaguicidas organofosforados, en el intervalo de 190 a 367 nm.

3.1.2. Estudio del comportamiento cromatográfico de los plaguicidas

En la **figura 3.2** se muestra la dependencia del factor de retención (k') de cada compuesto en función del porcentaje de metanol en la fase móvil, este estudio tuvo la finalidad de determinar el orden de elución de los compuestos en la columna de sílice C18 para establecer las condiciones de separación simultánea de los compuestos en estudio.

De la figura 3.2 se observa que las curvas son paralelas para todos los plaguicidas, presentándose suficiente diferencia entre ellas para que sea posible llevar a cabo la separación de los cinco plaguicidas de manera isocrática en todas las composiciones metanol:agua ensayadas. Por ejemplo, cuando la composición es metanol:agua 80:20, se obtiene la separación de los cinco picos que se presenta en la **figura 3.3** con los tiempos de retención que se muestran en la **tabla 3.2**.

Tabla 3.2. Retención de los plaguicidas en estudio en la columna de sílice C18. Con flujo de 1 mL min^{-1} y composición de la fase móvil metanol:agua 80:20 .

Compuesto	$\log k'$	t_r (min)
Metil paratión	0.033	2.91
Fenitrotión	0.146	3.36
Clorfenvinfos	0.267	3.99
Diazinón	0.359	4.60
Clorpirifos	0.787	9.98

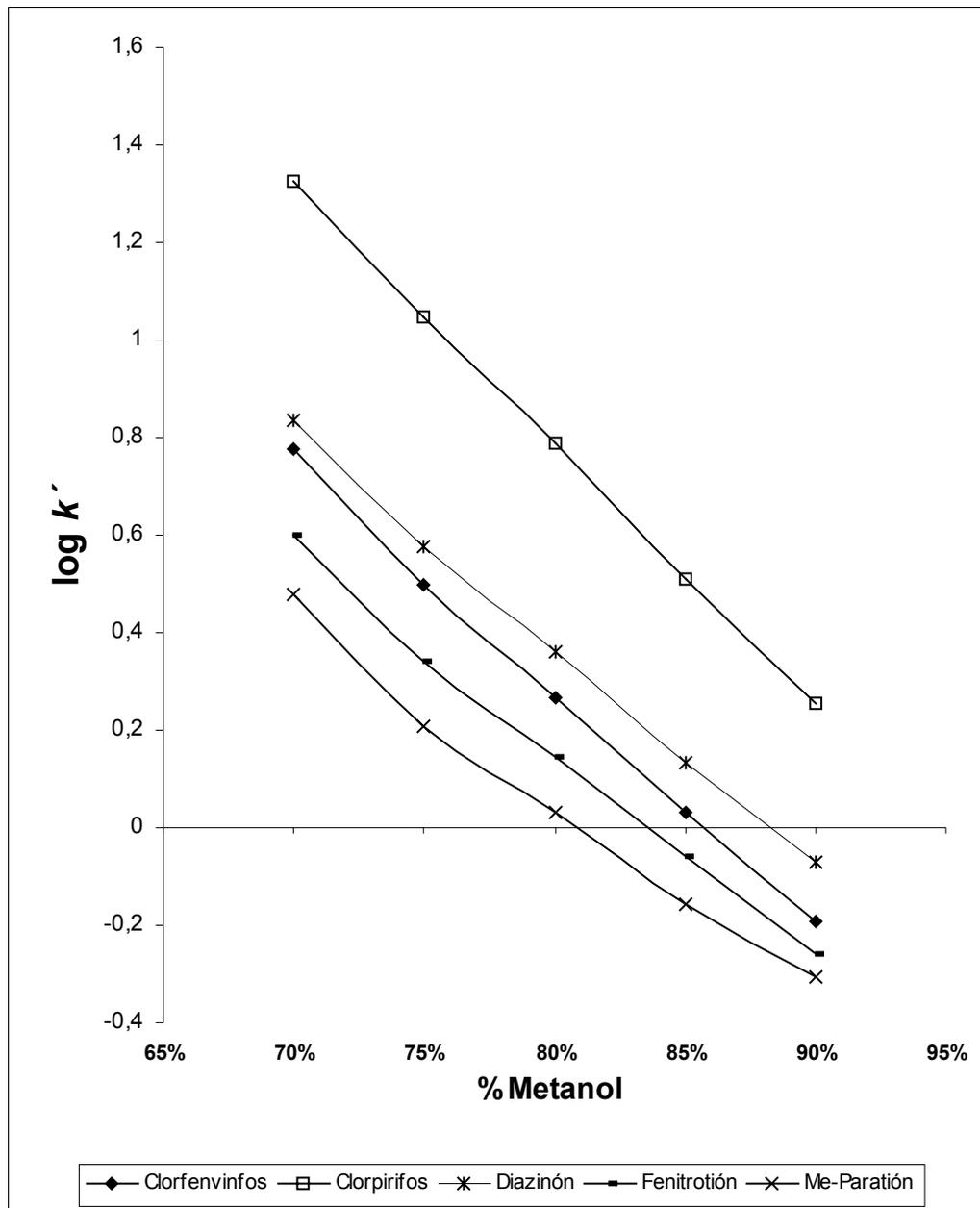


Figura 3.2. Variación del factor de retención (k') de los plaguicidas organofosforados en estudio en función del porcentaje de metanol en la fase móvil. Columna VARIAN de 150 x 4.60 mm empacada con fase inversa RES ELUT C18, tamaño de partícula 5 μm . Flujo de 1 mL min^{-1} . Concentración de cada plaguicida 5 mg L^{-1} . Volumen de inyección 20 μl . Detección por absorción UV cercana a la longitud de absorción máxima de cada compuesto.

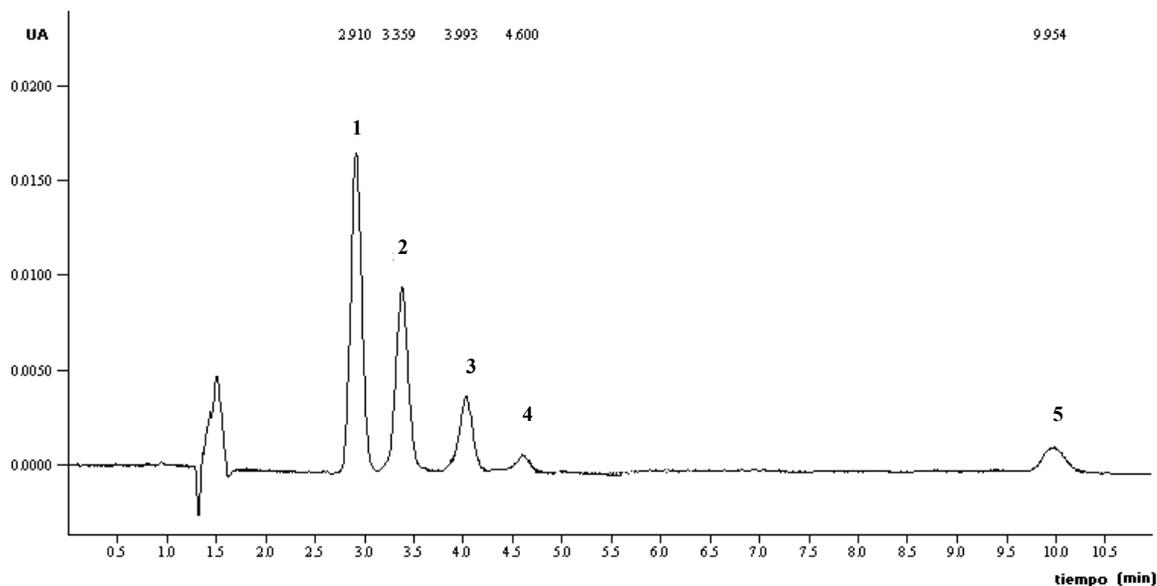


Figura 3.3. Cromatograma de los plaguicidas organofosforados en estudio. Columna VARIAN de 150 x 4.60 mm empacada con fase inversa RES ELUT C18, tamaño de partícula 5 μm . Flujo de 1 mL min^{-1} . Fase móvil metanol:agua 80:20. Concentración de cada plaguicida 5 mg L^{-1} , volumen de inyección 20 μl . Detección por absorción UV a 268 nm. Plaguicidas: 1) Metil paratión, 2) Fenitrotión, 3) Clorfenvinfos, 4) Diazinón, 5) Clorpirifos.

Sin embargo, aún cuando este resultado fue satisfactorio, se pretendió lograr una mejor y más conveniente separación. Así, el primer pico correspondiente al metil paratión debía observarse aproximadamente a los 5 minutos de haber iniciado la corrida para evitar el traslape con los picos de los compuestos más polares que pudieran estar presentes en los cromatogramas de los extractos de hígado de res. Además, dado que el tiempo de corrida debía ser el mínimo se aplicó un gradiente para eluir más rápidamente al último compuesto: gradiente lineal de 70 a 100 % de metanol en 10 minutos. El gradiente mencionado proporcionó el cromatograma de la **figura 3.4** (en este se muestran las diferentes longitudes de onda empleadas para la cuantificación) y los tiempos de retención que se presentan en la **tabla 3.3**.

Tabla 3.3. Tiempo de retención de los plaguicidas con un gradiente lineal de 70% a 100% de metanol en 10 minutos.

Compuesto	Tiempo de retención (min)
Metil paratión	4.54
Fenitrotión	5.24
Clorfenvinfos	6.12
Diazinón	6.59
Clorpirifos	9.27

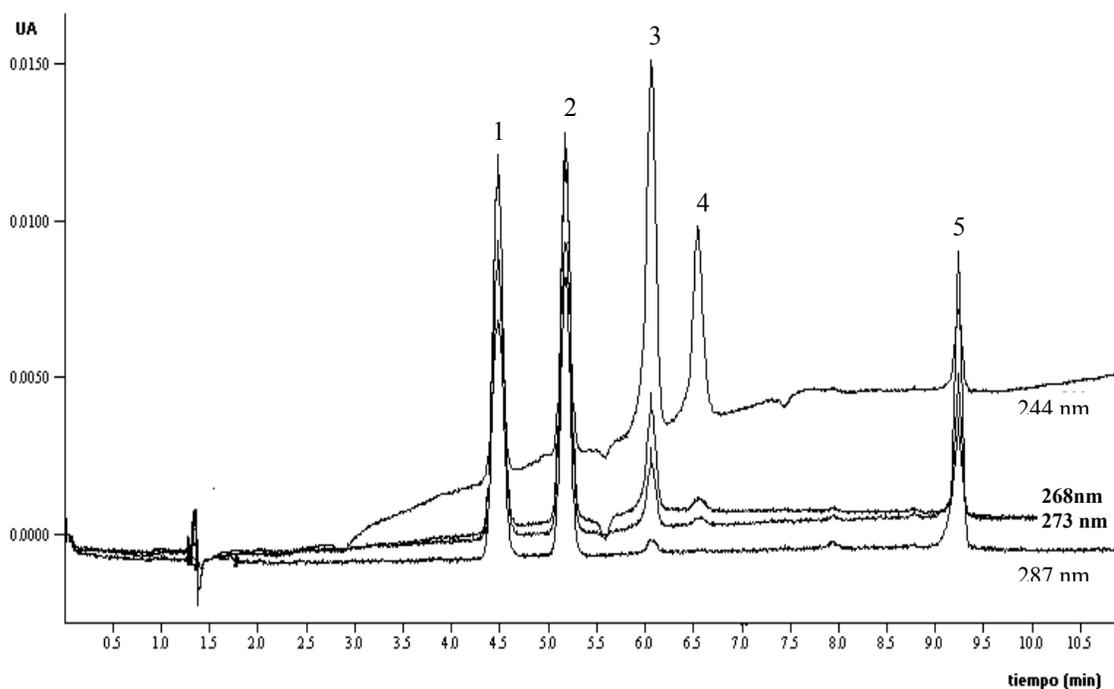


Figura 3.4. Cromatograma de los plaguicidas organofosforados en estudio. Columna VARIAN de 150 x 4.60 mm empacada con fase inversa RES ELUT C18, tamaño de partícula 5 μm . Flujo de 1 mL min^{-1} . Gradiente lineal de 70 a 100% de metanol en 10 min. Concentración de cada plaguicida 5 mg L^{-1} , volumen de inyección 20 μl . Detección por absorción UV cercana a la longitud de absorción máxima de cada compuesto. Plaguicidas: 1) Metil paratión, 2) Fenitrotión, 3) Clorfenvinfos, 4) Diazinón, 5) Clorpirifos.

3.1.3. Linealidad, precisión, límite de detección y límite de cuantificación del sistema CLAR-DAD

En la **tabla 3.4** se presentan las ecuaciones de las rectas y los coeficientes de correlación obtenidos al graficar el área de los picos contra la concentración de los plaguicidas. Las gráficas se presentan en el apéndice B.

Tabla 3.4. Linealidad del sistema CLAR-DAD.

Compuesto	Coefficiente de correlación (r^2)	Pendiente de la recta ($m \pm s$)	Ordenada al origen ($b \pm s$)
Metil paratión	0.993	2277 \pm 38	18 \pm 315
Fenitrotión	0.995	1679 \pm 25	-22 \pm 254
Clorfenvinfos	0.995	1588 \pm 23	38 \pm 245
Diazinón	0.994	1218 \pm 20	-19 \pm 181
Clorpirifos	0.994	1407 \pm 22	31 \pm 172

s= Desviación estándar

De la **tabla 3.4** se dedujo que la respuesta del detector en el intervalo de 20 a 0.25 mg L⁻¹ fue lineal con un coeficiente de correlación superior a 0.99 para todos los plaguicidas.

Además, en la **tabla 3.5** se muestran los coeficientes de variación del área obtenida a partir de tres inyecciones de cada una de las soluciones empleadas para la calibración. Observando los datos, se puede afirmar que la variabilidad del sistema cerca del límite de cuantificación se encuentra entre 4 y 5%, mientras que a niveles mayor o iguales a 5 mg L⁻¹ la variabilidad es menor al 2%. Por lo que la reproducibilidad del sistema (95-98%) es aceptable.

Tabla 3.5. Reproducibilidad del sistema CLAR-DAD. Coeficientes de variación (en %) del área para tres inyecciones de una muestra por cada nivel de concentración.

(mg L ⁻¹)	Metil paratión	Fenitrotión	Clorfenvinfos	Diazinón	Clorpirifos
20	0.88	1.38	0.97	0.20	0.05
10	1.36	1.04	0.37	1.11	0.65
5	0.96	0.61	0.66	1.28	1.16
2	2.23	3.31	4.59	4.31	3.66
1	4.36	3.14	4.52	5.20	1.56
0.50	1.59	2.38	2.99	4.28	2.86
0.25	2.24	3.26	4.02	5.47	5.57

Límite de detección del sistema CLAR-DAD.

En la **tabla 3.6** se presenta el límite de detección experimental del sistema, obtenidos de acuerdo a la metodología. (Página 41).

Tabla 3.6. Límites de detección del sistema CLAR-DAD.

Compuesto	Límite de detección experimental	
	(mg L⁻¹)	ng
Metil paratión	0.09	1.8
Fenitrotión	0.12	2.4
Clorfenvinfos	0.09	1.8
Diazinón	0.08	1.6
Clorpirifos	0.12	2.4

3.2. Preparación de la muestra

3.2.1. Preparación de la columna de dispersión con hígado de res

Se siguió el esquema de la figura 2.2. La pasta obtenida fue suficientemente homogénea y húmeda para empacar con facilidad una columna de porosidad tal que los disolventes pudieron fluir lentamente por gravedad a través de ésta.

3.2.2. Observación microscópica de los adsorbentes y las fases dispersas

Las fotografías por microscopía electrónica de barrido de la fase C18 acondicionada con metanol, así como la fase C18 acondicionada y molida se pueden apreciar a 100 y 700 aumentos en la **figura 3.5**. En las fotografías **A** y **B** se observa que las partículas de la fase C18 son irregulares en forma y que no interaccionan entre sí.

En las fotografías **C** y **D** se puede apreciar que al moler la sílice en el mortero se pierde la estructura original de la sílice C18, obteniéndose partículas de menor tamaño que al parecer forman pequeños agregados, aunque no todas las partículas de sílice sufren cambios.

En la **figura 3.6** se presentan las imágenes de la fase de dispersión con hígado y músculo de res en sílice C18 a los mismos aumentos que los de la figura 3.5.

En la fotografía **E** se puede apreciar la homogeneidad de la pasta que se obtiene al moler la sílice C18 junto con el hígado de res en el mortero. El acercamiento mostrado en la fotografía **F** permite confirmar que el hígado se adhiere a la película que recubre a la sílice de tal manera que la partícula de sílice C18 queda englobada por los componentes de la matriz al mismo tiempo que algunos pequeños fragmentos de la fase sólida se acumulan sobre dicha cubierta.

Las fotografías **G** y **H** son análogas de las fotografías E y F, en ellas se observa que es más difícil romper la estructura fibrosa del músculo por lo que la pasta es menos homogénea que la del hígado, sin embargo la interacción de los restos de tejido con la sílice C18 sigue siendo evidente.

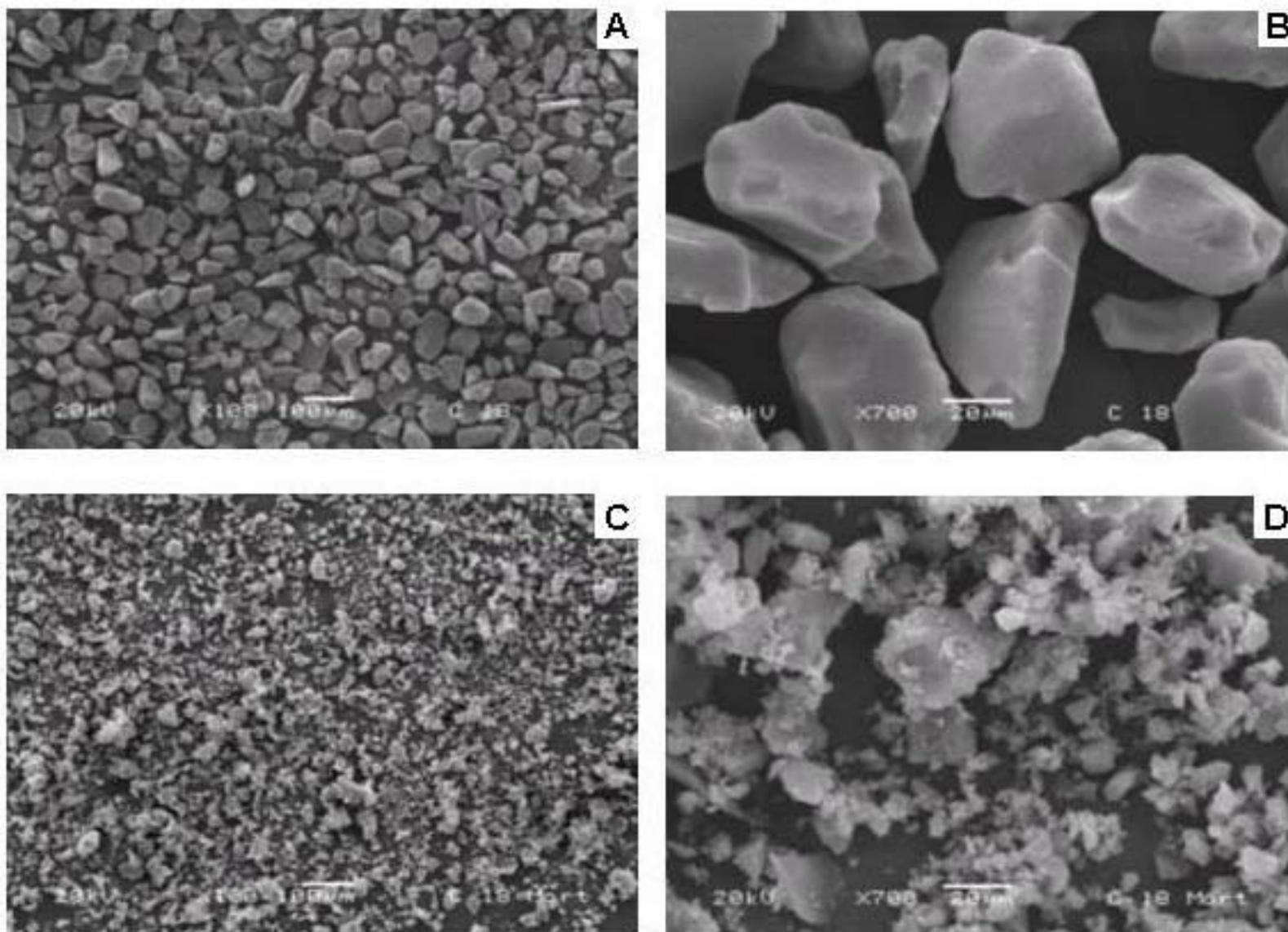


Figura 3.5. Fotografías obtenidas por microscopía electrónica de barrido **A:** fase C18 acondicionada con metanol a 100X, **B:** fase C18 acondicionada con metanol a 700X, **C:** fase C18 acondicionada y molida en el mortero a 100X, **D:** fase C18 acondicionada y molida en el mortero a 700X.

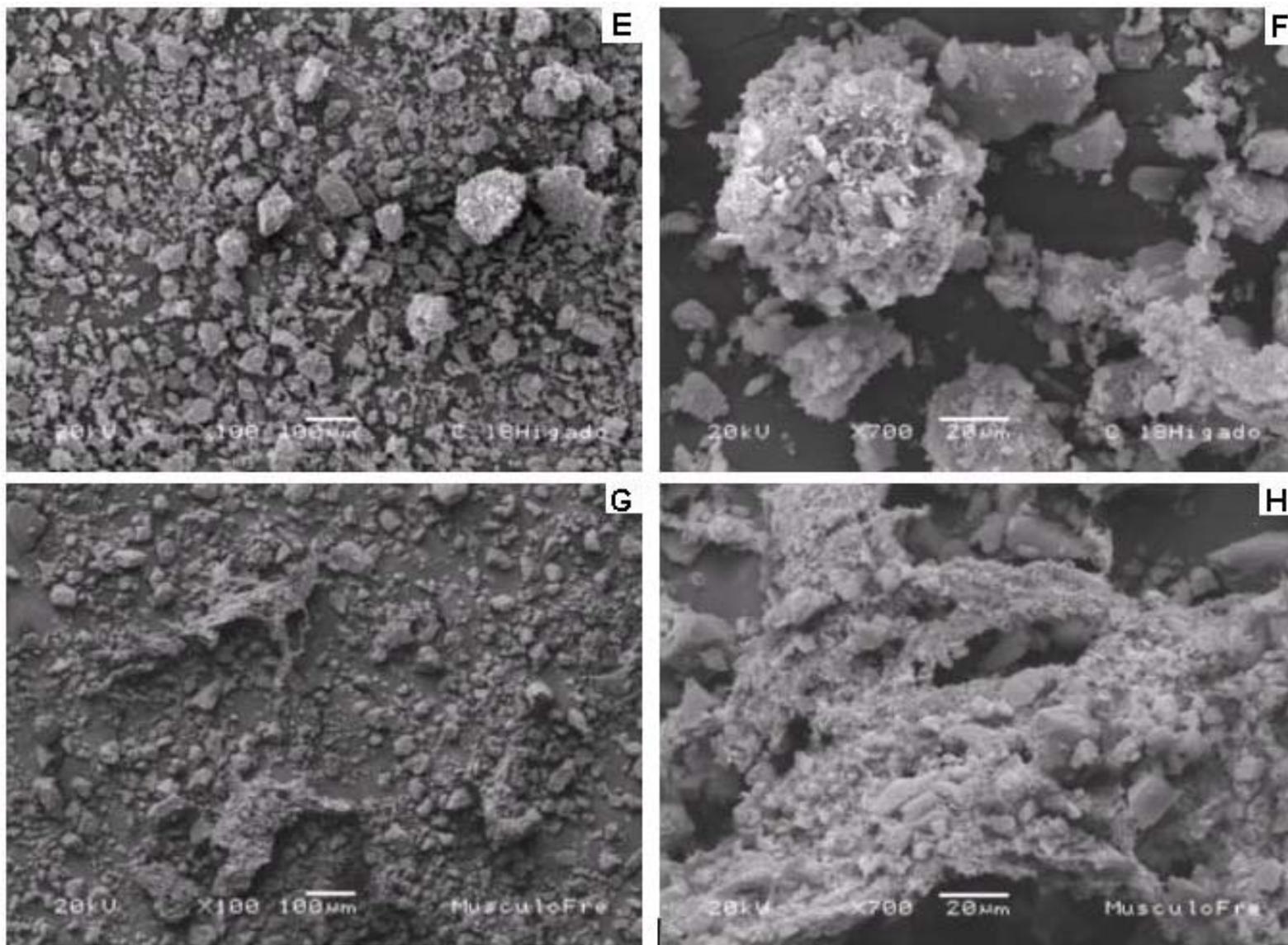


Figura 3.6. Fotografías obtenidas por microscopía electrónica de barrido **E:** dispersión de hígado de res en C18 a 100X, **F:** dispersión de hígado de res en C18 a 700X, **G:** dispersión de músculo de res en C18 a 100X, **H:** dispersión de músculo de res en C18 a 700X.

3.2.3. Programa de elución selectiva de los plaguicidas organofosforados

Se esperaba que el orden de la elución de los plaguicidas organofosforados del cartucho de dispersión fuera similar al de la elución de los compuestos en la columna analítica. Por ello se planteó el ensayo **1** (**tabla 3.7**) para eluir a los analitos con una mezcla de metanol:agua 7:3.

Tabla 3.7. Ensayo 1: Elución con la mezcla metanol:agua 7:3. Cartucho de dispersión de 100 mg de hígado de res en 400mg de sílice C18. Fortificación: 75 µg g⁻¹.

Plaguicida	Recobro (%)						
	Fracciones de 1 mL de metanol:agua 7:3						Global
	1	2	3	4	5	6	
Metil paratión	NI	38	4	ND	ND	ND	42
Fenitrotión	NI	62	29	8	ND	ND	99
Clorfenvinfos	NI	25	31	15	3	1	75
Diazinón	NI	14	23	15	3	3	58
Clorpirifos	NI	3	6	6	6	4	25

NI = No inyectado. ND = No detectado.

De acuerdo a los resultados presentados en la **tabla 3.7** se verificó que el orden de elución fue como se esperaba. Sin embargo, la primera fracción de 1 mL presentó coloración y turbidez considerables por lo que no se inyectó al sistema cromatográfico. Por esta razón se dedujo que era necesario realizar un paso de limpieza previa a la elución de los plaguicidas organofosforados, los cuales fueron detectados desde la segunda fracción. Por otra parte, al observar los recobros obtenidos se infirió que un alto porcentaje de metil paratión se perdió en la fracción inicial (1), lo cual indicó que la solución de limpieza debía tener una fuerza de elución menor para evitar eluir a este plaguicida en el primer mililitro.

En la tabla 3.7 también se observa que el fenitrotión sí se recobró cuantitativamente con 4 mL del eluyente, mientras que los recobros para clorfenvinfos, diazinón y clorpirifos fueron menores en proporción a su

decremento de polaridad, por lo que se infirió que la elución de estos compuestos fue más lenta y no fue completada con el volumen de eluyente total que se hizo pasar a través del cartucho. Por lo tanto se consideró que era necesario incrementar el volumen del eluyente, o bien incrementar su fuerza de elución; para ello se planteó el ensayo 2.

Tabla 3.8. Ensayo 2: Elución con mezcla agua:metanol de polaridad decreciente. Cartucho de dispersión de 100 mg de hígado de res en 400 mg de sílice C18. Fortificación: 75 $\mu\text{g g}^{-1}$.

Plaguicida	Recobro (%)			
	Fracciones de 2 mL			Global
	a) Agua	b) Metanol 50%	c) Metanol 100%	
Metil paratión	NI	NI	65	65
Fenitrotión	NI	NI	69	69
Clorfenvinfos	NI	NI	66	66
Diazinón	NI	NI	65	65
Clorpirifos	NI	NI	72	72

NI = No inyectado.

En el ensayo 2 (**tabla 3.8**) se hizo una limpieza previa a la elución de los plaguicidas con 2 mL de agua, lo que permitió eliminar coloración y turbidez. Sin embargo en la fracción b) se observó una película blanca que separaba dos fases por lo que no pudo inyectarse. La fracción c) presentó turbidez por lo que antes de inyectarlas se filtraron a través de membrana de nylon de 0.45 μm .

Además, en la tabla 3.8 se observa que el recobro global de los plaguicidas fue bajo por lo cual se propuso incrementar el porcentaje de agua en la fracción b) para eliminar mejor a las interferencias polares, y la última fracción (c) efectuarla con un volumen mayor de metanol puro para maximizar la elución de los plaguicidas. La limpieza con una disolución metanol:agua 20:80 evitaría la pérdida de los plaguicidas más polares. Estas modificaciones constituyeron el ensayo 3 cuyos resultados se muestran en la **tabla 3.9**.

Tabla 3.9. Ensayo 3: Optimización de limpieza previa a la elución. Cartucho de dispersión de 100 mg de hígado de res en 400 mg de sílice C18. Fortificación: 75 µg g⁻¹.

Plaguicidas	Recobro (%)				Global
	Fracciones de 1.5 mL				
	a) Agua	b) Metanol 20%	c) Metanol 100 %	d) Metanol 100 %	
Metil paratión	NI	NI	85	NC	85
Fenitrotión	NI	NI	90	NC	90
Clorfenvinfos	NI	NI	88	NC	88
Diazinón	NI	NI	88	NC	88
Clorpirifos	NI	NI	105	NC	105

NI = No inyectado, NC = No cuantificable.

En efecto, se puede observar en la **tabla 3.9** que con el ensayo 3, los recobros aumentaron para todos los plaguicidas al eluir el cartucho con metanol puro (fracciones c y d). Sin embargo, el extracto presentó coloración amarillenta y viscosidad aparentemente mayor a la del agua, posiblemente debido a la presencia de grasas. Por lo tanto, se planteó recuperar a los plaguicidas organofosforados con un eluyente de menor fuerza para evitar el arrastre de una gran cantidad de lípidos. De esta manera, el problema de coloración se resolvió aplicando las mezclas de eluyente tal como se muestra en la **tabla 3.10** correspondiente a los resultados del ensayo 4.

Tabla 3.10. Ensayo 4: Optimización de limpieza previa a la elución. Cartucho de dispersión de 100 mg de hígado de res en 400 mg de sílice C18. Fortificación: 75 µg g⁻¹.

Plaguicida	Recobro (%)			Global
	a) 2mL Agua	b) 4 mL Metanol 30%	c) 6 mL Metanol 80%	
Metil paratión	NI	NI	90	90
Fenitrotión	NI	NI	96	96
Clorfenvinfos	NI	NI	79	79
Diazinón	NI	NI	80	80
Clorpirifos	NI	NI	84	84

NI= No inyectado.

En el ensayo 4 (**tabla 3.10**), se incrementó la proporción de metanol un 10% y para la etapa intermedia de limpieza (b) se duplicó el volumen de la

fracción (4 mL) con el propósito de eliminar la coloración antes de extraer a los plaguicidas. En la fracción (c) se disminuyó el porcentaje de metanol para la elución de los plaguicidas de 100% a 80%. Se supuso que el volumen de esta fracción debía ser mayor para eluir completamente a los plaguicidas, por lo que se usaron 6 mL en vez de 2 o 3. Con este programa de elución se observaron mejores recobros para los plaguicidas y la apariencia del extracto fue óptima para su inyección al sistema CLAR-DAD.

En el ensayo 5 (**tabla 3.11**), como primer paso se lavó con agua hasta eliminar totalmente coloración y turbidez, para lo cual fue necesario emplear 7 fracciones de 1 mL; aunque con 5 mL el eluyente ya era aceptablemente incoloro y transparente. Posteriormente, se hizo pasar metanol al 30% en agua a través del cartucho hasta observar un eluyente totalmente libre de color (la coloración eliminada por este eluyente es diferente a la eliminada por el agua pura) para lo cual fue necesario el empleo de 6 mL divididos en dos volúmenes: 4 y 2 mL. El volumen de 6 mL de metanol 80% para la elución de los plaguicidas fue el mismo que se empleó en el ensayo 4 y los recobros también se mejoraron aún más a excepción del de clorpirifos que fue un poco menor comparado con el del ensayo 4.

Tabla 3.11. Ensayo 5: Optimización de limpieza previa a la elución. Cartucho de dispersión de 100 mg de hígado de res en 400 mg de sílice C18. Fortificación: 75 µg g⁻¹.

Plaguicidas	Recobro (%)				Global
	a) 7 mL de agua	b) 4 mL de metanol 30%	c) 2 mL de metanol 30 %	d) 6 mL de metanol 80 %	
Metil paratión	NI	NI	NC	106	106
Fenitrotión	NI	NI	ND	110	110
Clorfenvinfos	NI	NI	ND	94	94
Diazinón	NI	NI	ND	91	91
Clorpirifos	NI	NI	ND	81	81

NI= No inyectado. ND= No detectado. NC= No cuantificable.

Finalmente, con el ensayo **6a** se determinó el volumen exacto de cada fracción que debía emplearse para obtener un recobro cuantitativo de los cinco plaguicidas. En este caso se trabajó con una solución estándar en lugar de la muestra de hígado. Los resultados se presentan en la **tabla 3.12**.

Tabla 3.12. Ensayo 6a. Elución de los plaguicidas organofosforados del cartucho de dispersión de estándares en sílice C18. Fortificación: 18.75 µg g⁻¹ de sílice C18.

Plaguicida	Recobro (%)														Global
	Fracciones consecutivas de 1 mL														
	Agua					Metanol 30%				Metanol 80%					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13		
Metil paratión	NI	NI	NI	NI	ND	ND	ND	1.4	1.4	87	9	ND	ND	99	
Fenitrotión	NI	NI	NI	NI	ND	ND	ND	ND	ND	83	17	ND	ND	100	
Clorfenvinfos	NI	NI	NI	NI	ND	ND	ND	ND	ND	61	35	ND	ND	96	
Diazinón	NI	NI	NI	NI	ND	ND	ND	ND	ND	51	44	3	ND	98	
Clorpirifos	NI	NI	NI	NI	ND	ND	ND	ND	ND	22	46	23	4	95	

NI = No inyectado. ND = No detectado

En la **tabla 3.12** se observa que la elución de los plaguicidas obedece a su polaridad de tal manera que en las fracciones 8 y 9 el metil paratión, que es el compuesto más polar, ya comienza a eluir, mientras que los demás compuestos empiezan a eluir a partir de la fracción 10 con metanol 80%. Debe observarse que el porcentaje eluido en esta fracción decrece al disminuir la polaridad de los compuestos y que en las fracciones posteriores la elución de los plaguicidas es completada de forma gradual y sigue el orden esperado.

Posteriormente, se procedió a verificar si los resultados obtenidos con el ensayo 6a se reproducían en un cartucho que sí contuviera hígado de res fortificado. Para formar la columna se siguió el proceso descrito en la figura 2.2; con la variante de que en este caso se eliminaría la fracción 9 mostrada en la **tabla 3.12**, es decir sólo se aplicarían 3mL de metanol 30%, para eluir lo menos posible al metil paratión en esta fracción. La secuencia resultante para la elución (ensayo 6b) y los resultados se presentan en la **tabla 3.13**.

Tabla 3.13. Ensayo 6b. Elución de los plaguicidas organofosforados del cartucho de dispersión de 100 mg de hígado de res fortificado ($75 \mu\text{g g}^{-1}$) en 400 mg de sílice C18.

Plaguicida	Recobro (%)														Global
	Fracciones consecutivas de 1 mL														
	Agua					Metanol 30%				Metanol 80%					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13		
Metil paratión	NI	NI	NI	NI	ND	ND	ND	1.5	NA	46	41	NC	ND	89	
Fenitrotión	NI	NI	NI	NI	ND	ND	ND	ND	NA	41	53	1	ND	95	
Clorfenvinfos	NI	NI	NI	NI	ND	ND	ND	ND	NA	26	65	2	ND	92	
Diazinón	NI	NI	NI	NI	ND	ND	ND	ND	NA	23	68	3	ND	94	
Clorpirifos	NI	NI	NI	NI	ND	ND	ND	ND	NA	10	79	8	NC	97	

NA = No aplicado a la columna de dispersión, NC = No cuantificable, ND = No detectado, NI = No inyectado.

Los recobros mostrados en la tabla 3.13 fueron aceptables para los cinco plaguicidas; por ello se decidió que este programa de elución sería el adecuado para la elución selectiva de los plaguicidas de los cartuchos formados por la dispersión de hígado de res en sílice C18. Los pasos correspondientes al programa de elución aplicado en el ensayo 6b, se enlistan a continuación:

- a) 5 mL de agua.
- b) 3 mL de metanol: agua 3:7.
- c) 4 mL de metanol: agua 8:2.

Adicionalmente, en la **figura 3.7** se ilustran los frentes de elución obtenidos a partir de los recobros acumulados de las fracciones con metanol: agua 80:20 para los cinco plaguicidas organofosforados de los cartuchos de dispersión con y sin hígado de bovino que se obtienen a partir de los recobros mostrados en las tablas 3.13 y 3.12 respectivamente.

Tanto en las tablas 3.12 y 3.13 como en la **figura 3.7** se observa que la elución de los plaguicidas es más lenta cuando se incorpora la matriz (hígado de res) a la columna y que los recobros, aunque siguen siendo bastante aceptables, disminuyen ligeramente.

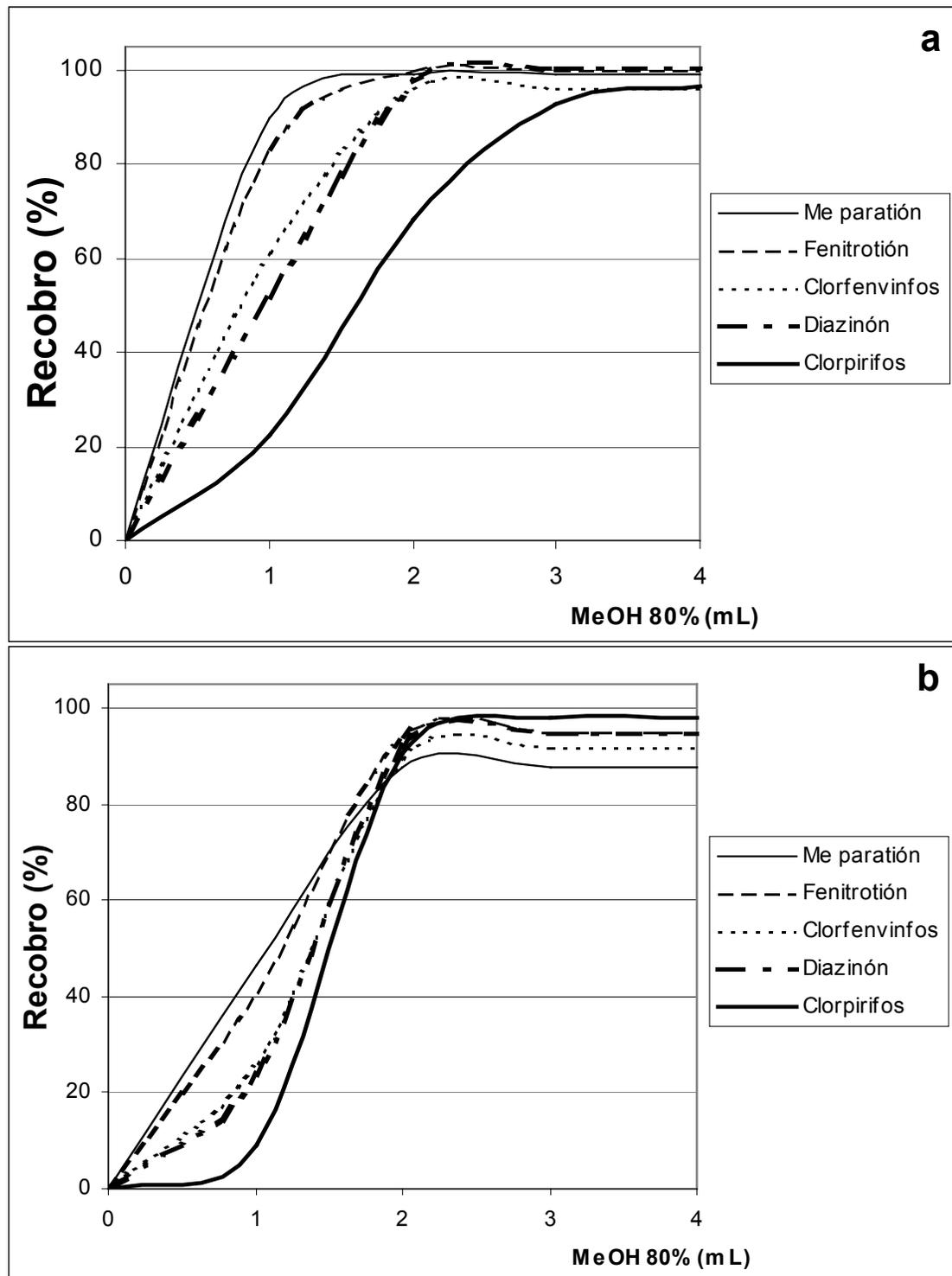


Figura 3.7. Frentes de elución de los plaguicidas organofosforados. a: sin hígado. Ensayo 6a, tabla 3.12. b: con hígado. Ensayo 6b, tabla 3.13.

Finalmente, se evaluó la reproducibilidad en el recobro con el programa de elución del ensayo 6b, con tres réplicas, los resultados se presentan en la **tabla 3.14**.

Tabla 3.14. Recobro global y sus coeficientes de variación para los cinco plaguicidas con el programa de elución del ensayo 6b del cartucho de dispersión de 100 mg de hígado de res en 400 mg de sílice C18. Fortificación: 75 µg g⁻¹.

Plaguicida	Recobro global (%)			Promedio	Desv. Est.	C. V. (%)
	1	2	3			
Metil paratión	88,3	88,5	86,8	87,9	0,9	1,1
Fenitrotión	82,4	88,1	89,5	86,7	3,8	4,3
Clorfenvinfos	91,8	95,2	105,5	97,5	7,1	7,3
Diazinon	94,1	85,2	91,8	90,4	4,6	5,1
Clorpirifos	96,8	97,5	96,6	97,0	0,5	0,5

Desv Est: Desviación estándar.

C.V: Coeficiente de variación.

De los datos mostrados en la **tabla 3.14** se infirió que la reproducibilidad en el recobro con metanol 80% fue satisfactoria pues los resultados no variaron más del 10%. Por lo tanto, los estudios para optimizar el tiempo de fortificación de la muestra se hicieron con el programa de elución del ensayo 6b.

En la **figura 3.8** se presenta el cromatograma correspondiente a la inyección de 20 µL de una de las réplicas de la elución con 4 mL de metanol al 80%.

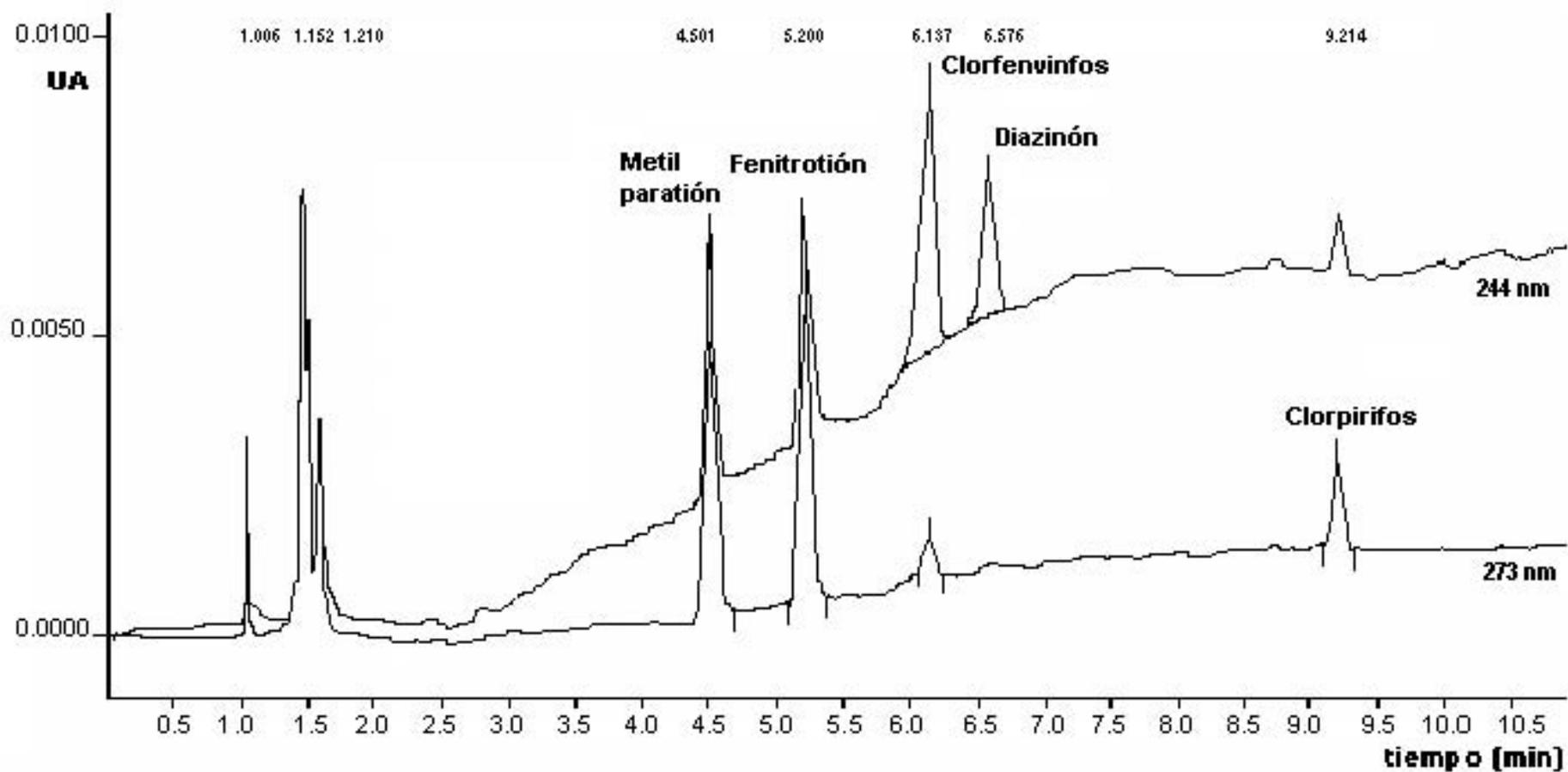


Figura 3.8. Cromatograma del extracto con el ensayo 6b. Concentración en el extracto aproximada de cada plaguicida 2 mg L^{-1} equivalente a $75 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ de cada plaguicida en el hígado de res. Inyección de $20 \text{ } \mu\text{L}$. Columna VARIAN de $150 \times 4.60 \text{ mm}$ empacada con fase inversa RES ELUT C18. Tamaño de partícula $5 \text{ } \mu\text{m}$. Flujo de 1 mL min^{-1} . Gradiente lineal de 70% a 100% de metanol en 10 min.

3.2.4. Tiempo de fortificación

En la **tabla 3.15** se presentan los recobros obtenidos al trabajar con las condiciones planteadas en la figura 2.2 del desarrollo experimental y el ensayo 6b, dejando equilibrar 15 minutos, 1 hora y 24 horas después de añadir los estándares a las muestras de hígado (100 mg de hígado de res fortificados con $75 \mu\text{g g}^{-1}$).

Tabla 3.15. Recobro después de los diferentes tiempos de equilibrio para la fortificación, se presenta el promedio para tres muestras, y la dispersión está dada como coeficiente de variación porcentual.

	Recobro (%)		
	15 minutos	1 hora	24 horas
Metil paratión	88 ± 1	96 ± 7	104 ± 4
Fenitrotión	87 ± 4	99 ± 5	108 ± 7
Clorfenvinfos	98 ± 7	90 ± 5	60 ± 7
Diazinón	90 ± 5	92 ± 6	100 ± 2
Clorpirifos	96.9 ± 0.4	101 ± 6	95 ± 12
Recobro promedio	92 ± 5	96 ± 4	90 ± 20

En la **tabla 3.15** se observa que a 24 horas el recobro de clorfenvinfos disminuyó considerablemente, lo cual se atribuyó a una degradación del compuesto puesto que el recobro de los otros plaguicidas sigue siendo bastante aceptable. También se observa que la dispersión de los resultados para clorpirifos es considerablemente mayor comparada con las de las otras dos columnas. Por lo tanto este tiempo de fortificación fue descartado para llevar a cabo los siguientes ensayos.

Por otro lado, al comparar los recobros después de 15 minutos y después de 1 hora se observó que los valores para metil paratión y fenitrotión fueron mejores con 1 hora después de la adición de los estándares. Sin embargo, para los tres plaguicidas restantes no se presentó una diferencia

estadísticamente significativa (prueba t biaxial con $\alpha=0.05$). Aún más, el promedio del recobro de los 5 plaguicidas a los 15 minutos tampoco presentó diferencia estadísticamente significativa con el de 1 hora.

Lo anterior, aunado al hecho de que se podrían analizar más muestras en un día de trabajo con el menor tiempo de fortificación, fueron la base para elegir un tiempo de equilibrio para la fortificación de las muestras de 15 minutos.

3.2.5. Ajustes en el programa de elución por incremento en la cantidad de muestra

Para poder analizar niveles de fortificación lo suficientemente bajos en el hígado de res a concentraciones cercanas a los límites permisibles, fue necesario incrementar la cantidad de muestra y adsorbente para realizar la dispersión. Además, fue necesario disminuir el volumen final del extracto para lograr el enriquecimiento apropiado para la detección en el sistema analítico CLAR-DAD. Así, se decidió trabajar con 500 mg de hígado y 2.0 g de sílice C18 por muestra, de acuerdo al diagrama de la figura 2.2 (página 42), y se ajustaron los volúmenes del programa de elución. Las modificaciones en las cantidades para la preparación de la columna no afectaron el aspecto de la pasta que se obtuvo una vez realizada la dispersión, por lo que la facilidad del empaquetado y la porosidad de la columna fueron similares a las obtenidas anteriormente, lo cual era de esperarse puesto que la relación matriz: sílice C18 se mantuvo constante al modificar las cantidades.

Respecto a los ajustes al programa de elución, se observó que para obtener un eluyente traslucido se necesitó por lo menos de 20 mL de agua como **fracción a)** y para la **fracción b)** se requirieron 3 o 4 mL de metanol 30% para eliminar la coloración amarilla. Sin embargo, para la **fracción c)** que es la que

permite recuperar a los plaguicidas organofosforados, se hizo el estudio descrito en la sección 2.2.2.5 del capítulo de desarrollo experimental (página 44), los recobros globales y los frentes de elución de estos experimentos se muestran en la **tabla 3.16** y la **figura 3.9** respectivamente.

Tabla 3.16. Recobro de los plaguicidas de un cartucho de dispersión de 500 mg de hígado de res fortificado a $20 \mu\text{g g}^{-1}$ en 2.0 g de sílice C18 con diferentes porcentajes de metanol y acetonitrilo en agua.

Plaguicida	Recobros totales (%)			
	10 mL de metanol 80%	10 mL de metanol 70%	10 mL de acetonitrilo 80%	10 mL de acetonitrilo 60%
Metil paratión	93	85	99	99
Fenitrotión	95	85	94	90
Clorfenvinfos	61	36	62	60
Diazinón	74	43	84	48
Clorpirifos	46	10	89	23

En la **tabla 3.16** se observa que los recobros fueron mejores cuando se empleó acetonitrilo 80% en vez de metanol 80% y que los recobros con las mezclas de mayor proporción de agua (metanol 70% y acetonitrilo 60%) fueron menores, en especial para clorpirifos.

Al analizar la **figura 3.9**, se observa que en todos los casos la elución de los plaguicidas se efectuó en el mismo orden que su polaridad, como consecuencia los 10 mL metanol 70% y acetonitrilo 60% sólo permitieron eluir completamente a los dos plaguicidas más polares que son metil paratión y fenitrotión. Por otro lado, mientras que con metanol 70% el recobro máximo para clorpirifos se ha alcanzado a los 8 mL, con acetonitrilo 60% aún se observa incremento en su recobro al incrementar el volumen. Finalmente, la velocidad de elución con acetonitrilo fue mayor que con metanol para todos los plaguicidas; por esta razón se optó por acetonitrilo 80% como la mezcla para extracción de los plaguicidas organofosforados.

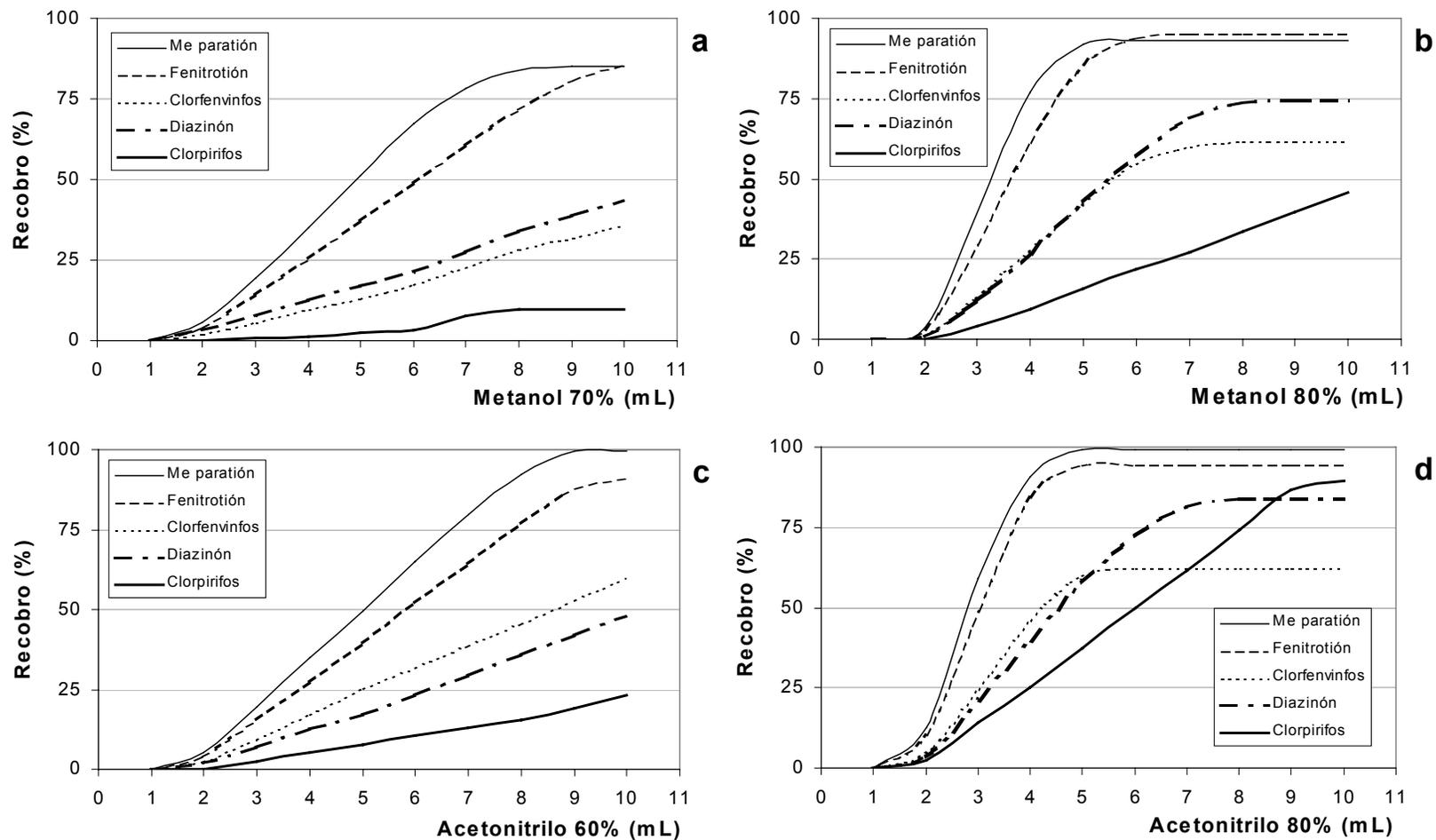


Figura 3.9. Frentes de elución de los plaguicidas organofosforados de un cartucho de dispersión de 500 mg de hígado de res fortificado a $20 \mu\text{g g}^{-1}$ en 2.0 g de sílice C18. **a:** elución con metanol 70%, **b:** elución con metanol 80%, **c:** elución con acetonitrilo 60%, **d:** elución con acetonitrilo 80%.

3.2.6. Concentración del extracto

La concentración del extracto obtenido de la elución con acetonitrilo 80%, tuvo la finalidad de poder analizar niveles bajos de los plaguicidas en el hígado de res. Al efectuar ésta, bajo condiciones suaves de calentamiento, es decir 55-60 °C en baño de agua, se requirió de 6 horas para evaporar 3 mL y el extracto concentrado se volvió turbio y blanquecino. El fenómeno se repitió al aplicar el mismo tratamiento al extracto con metanol 80%.

En el ensayo para concentrar ambos extractos en el rotavapor, manteniendo la temperatura constante a 40 °C, se observó que con el paso del tiempo en la evaporación el extracto se enriquecía en agua, puesto que el acetonitrilo y el metanol son mucho más volátiles que el agua. Lo anterior significó que la solubilidad de los plaguicidas en el concentrado del extracto disminuyera, sobre todo la del clorpirifos que presenta el menor valor de solubilidad en agua, ocasionando que el concentrado se volviera blanquecino.

Por otro lado, una vez que se logró evaporar a sequedad en el rotavapor y el extracto se resuspendió en 500 µL de acetonitrilo, se observó que la disminución en el recobro de diazinón y clorpirifos fue considerable (**Tabla 3.17**). Por esta razón, se decidió efectuar la extracción de los plaguicidas con disolventes libres de agua. Así, se preparó una columna de dispersión con 500 mg de hígado de res, se limpió con 20 mL de agua y 3 mL de acetonitrilo 25%, en vez del metanol 30% (para usar sólo un disolvente orgánico en la extracción), y se obtuvo la curva de elución con acetonitrilo puro que se muestra en la **fig. 3.10** obtenida con los datos de la **tabla 3.18**.

Tabla 3.17. Recobros de los plaguicidas en los extractos con acetonitrilo 80% antes y después de evaporar (n=3). Fortificación 20 µg g⁻¹.

Compuesto	Sin evaporar	Después de evaporar
Metil paratión	100 ± 9	87 ± 7
Fenitrotión	90 ± 10	82 ± 6
Clorfenvinfos	60 ± 6	50 ± 1
Diazinón	80 ± 10	30 ± 20
Clorpirifos	80 ± 10	41 ± 4

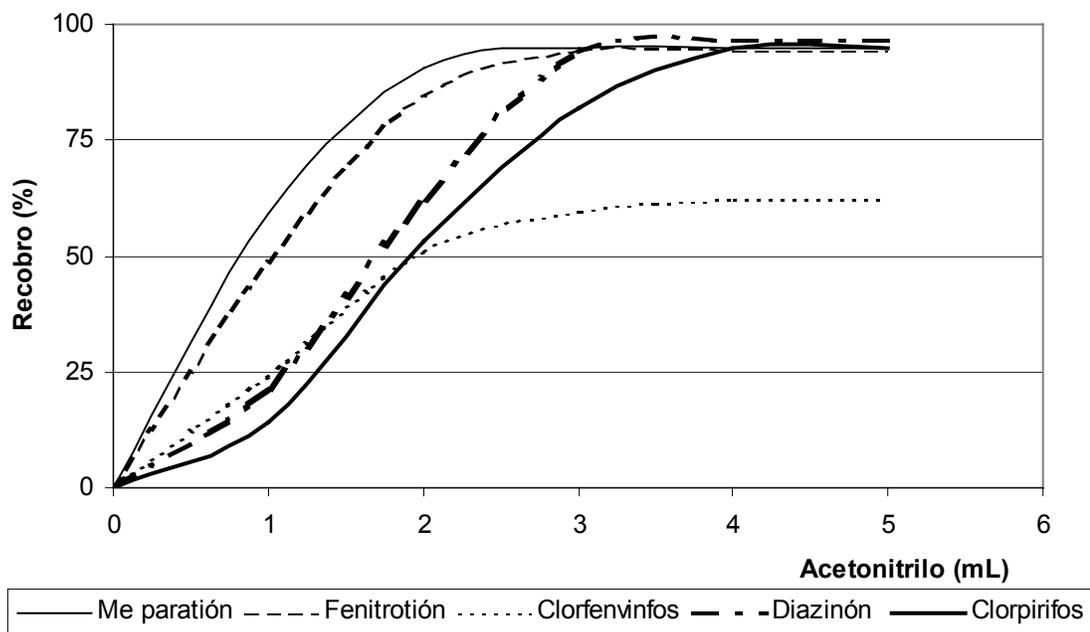


Figura 3.10. Patrón de elución de los plaguicidas organofosforados de un cartucho de dispersión de 500 mg de hígado de res en 2.0 g de sílice C18 con acetoneitrilo puro. Recobros: 94% metil paratión, 94% fenitrotión, 63% clorfenvinfos, 96% diazinón y 95% clorpirifos. Fortificación: $10 \mu\text{g g}^{-1}$.

Tabla 3.18. Recobro de los plaguicidas organofosforados de un cartucho de dispersión de 500 mg de hígado de res fortificado con $10 \mu\text{g g}^{-1}$ en 2.0 g de sílice C18 con acetoneitrilo puro.

Plaguicida	Recobro (%)					Global
	Fracciones de acetoneitrilo puro (mL)					
	1°	2°	3°	4°	5°	
Metil paratión	59.15	31.41	4.24	ND	ND	95
Fenitrotión	48.38	35.96	10.08	ND	ND	94
Clorfenvinfos	24.17	26.80	8.64	2.44	ND	62
Diazinón	21.25	40.87	31.85	2.46	ND	96
Clorpirifos	13.97	39.24	28.98	12.62	ND	95

ND = No detectado.

De estos resultados, se puede observar que la elución de los cinco plaguicidas fue rápida puesto que después del 3° mL de acetoneitrilo ya no se

detecta al metil paratión ni al fenitrotión y después del 4° mL de acetonitrilo ya no se detecta a los demás plaguicidas. Por lo tanto, se puede asumir que la elución de los plaguicidas con acetonitrilo puro fue completa. Sin embargo, se decidió aplicar un volumen total de 6 mL de acetonitrilo para eluir a los analitos en los ensayos posteriores. Además, los recobros oscilaron alrededor de 95%, exceptuando el de clorfenvinfos cuyo valor máximo fue cercano al 60%. Al respecto, el bajo recobro de clorfenvinfos pudiera atribuirse a algún tipo de interacción del plaguicida con el hígado de res puesto que no se puede explicar en base al orden de polaridad relativa de los compuestos; además en la **figura 3.9** se observa que dicho recobro también fue bajo cuando se utilizó metanol al 80% o acetonitrilo 80%, por lo que se descartó que el bajo recobro se debiera a algún tipo de diferencia en la selectividad del acetonitrilo respecto al metanol.

Por otro lado, se determinó el recobro de los plaguicidas después del proceso de evaporación a sequedad en el rotavapor usando una solución de estándares en acetonitrilo puro preparada como se indicó en la sección 2.2.2.6. del capítulo de desarrollo experimental (página 45). Los resultados que se muestran en la **tabla 3.19** comprueban que el recobro después de la evaporación de la solución de estándares fue cuantitativo, por lo cual se decidió adoptar este método para la concentración de los extractos.

Tabla 3.19. Estudio, con solución estándar, de los recobros después de la evaporación a sequedad en rotavapor a 40°C, 200 mbar y 60 rpm.

Plaguicida	Recobro 1	Recobro 2	Recobro 3	Promedio ± C.V.
Metil paratión	97.9	99.1	104.4	100 ± 3
Fenitrotión	98.2	102.3	106.7	102 ± 4
Clorfenvinfos	99.6	100.6	109.5	103 ± 5
Diazinón	98.7	99.3	105.9	101 ± 4
Clorpirifos	101.2	99.5	106.0	102 ± 3

C.V.(%)= Coeficiente de variación como porcentaje.

Por lo tanto, hasta este punto, el método para la determinación de plaguicidas organofosforados en hígado de res mediante DMFS-CLAR-DAD es el presentado en la **figura 3.11**.

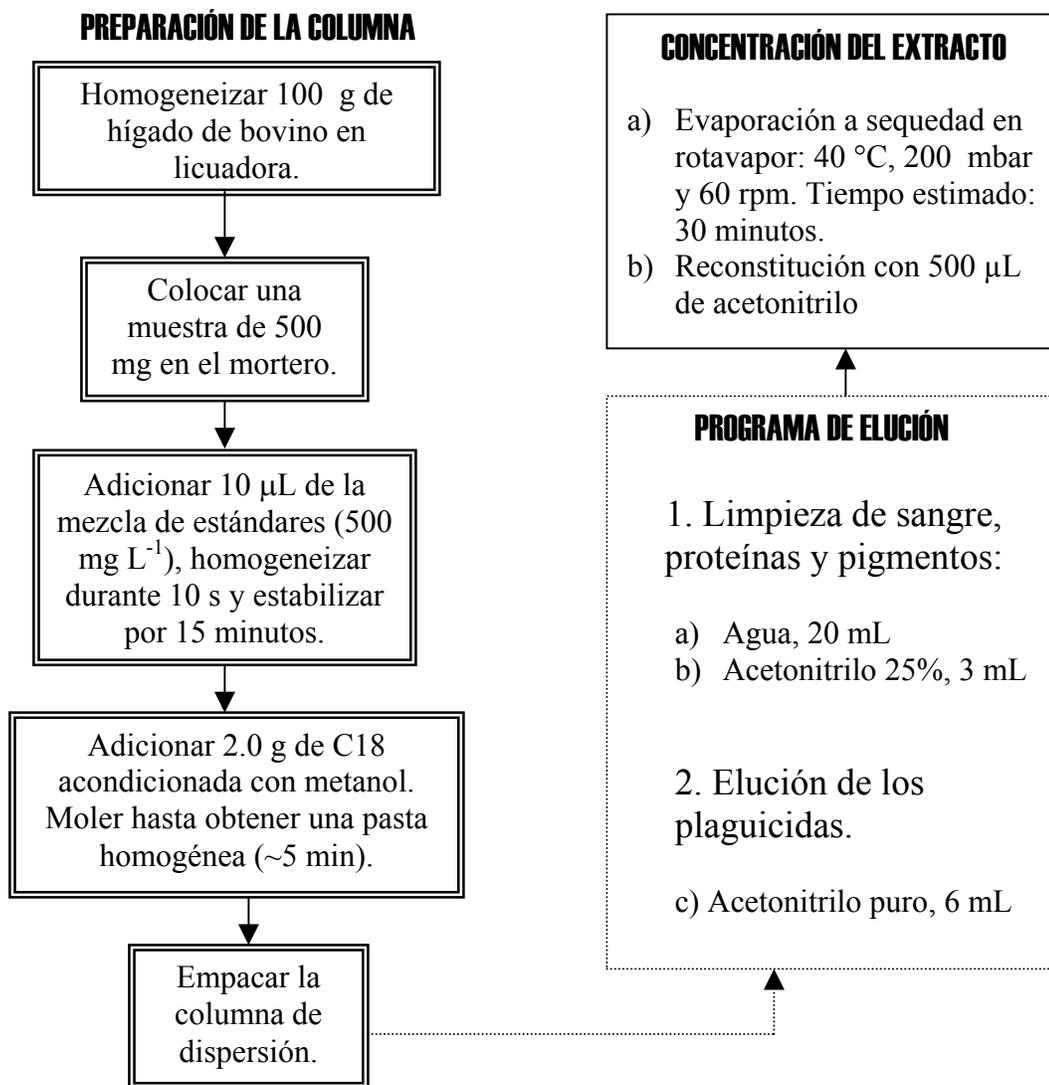


Figura 3.11. Preparación de la columna, elución y concentración del extracto para el análisis de bajas concentraciones de plaguicidas organofosforados en hígado de res por DMFS-CLAR-DAD.

Se estudió por triplicado el recobro del método descrito en la **figura 3.11** a nivel de $1 \mu\text{g g}^{-1}$ de plaguicida en hígado de res. Los resultados se presentan en la **tabla 3.20**, donde se observa que los recobros fueron similares a los obtenidos antes de efectuar el paso de la evaporación (ver recobro global en la tabla 3.18)

Tabla 3.20. Recobro del método a nivel de $1 \mu\text{g g}^{-1}$ de plaguicida en hígado de res.

Plaguicida	Recobro 1 (%)	Recobro 2 (%)	Recobro 3 (%)	Promedio \pm C.V.(%)
Metil paratión	90.55	92.58	93.46	92 \pm 1
Fenitrotión	112.19	94.16	91.45	100 \pm 10
Clorfeninfos	36.68	63.15	46.24	50 \pm 30
Diazinón	102.11	94.70	108.27	102 \pm 7
Clorpirifos	92.38	93.73	99.85	95 \pm 4

Cabe destacar que, al reconstituir el residuo obtenido de la evaporación, se observó la precipitación de algunas impurezas, las cuales pudieran eliminarse filtrando a través de membrana de nylon de $45 \mu\text{m}$. El recobro promedio después del filtrado de una solución estándar para los 5 plaguicidas fue de $99 \pm 2.5 \%$. Sin embargo, este paso fue laborioso y poco eficiente especialmente si el extracto tenía gran cantidad de impurezas como lípidos o proteínas. En estos casos, la filtración requirió ejercer una gran presión, por ello se decidió posteriormente adicionar un paso a la limpieza previa a la elución de los plaguicidas e incorporar un paso de limpieza al extracto, previo a la evaporación.

El establecimiento de la composición del eluyente para realizar el paso adicional de limpieza previa a la elución de los plaguicidas se basó en el frente de elución de los compuestos con acetonitrilo 60%. Al observar la gráfica que se presenta en la **figura 3.9** se puede ver que al hacer pasar 1 mL de esta mezcla de disolventes a través del cartucho no hay fuga de metil paratión, el compuesto más polar y por consecuencia tampoco hay fuga de los demás

plaguicidas, aunque se espera que eluyan algunas impurezas. De esta manera, este paso se incluyó después de la limpieza que se realiza con los 3 mL de acetonitrilo 25% (ver **figura 3.11**); mientras que la limpieza previa a la evaporación del extracto se planteó efectuarla con adsorbentes.

3.2.7. Limpieza del extracto con adsorbentes

Para limpiar el extracto constituido por los 6 mL de acetonitrilo puro, se probaron adsorbentes como el florisil, el gel de sílice y la sílice C18. Los resultados se muestran en la **tabla 3.21**

Tabla 3.21. Recobros (%) de los plaguicidas organofosforados después de la limpieza con adsorbentes. Concentración en hígado 10 µg g⁻¹.

Plaguicida	Limpieza a través de 1g de gel de sílice virgen			400 mg de C18 en el fondo de la columna	Limpieza a través de 500 mg de florisil
	Blanco (sin plaguicidas)	Blanco (sin hígado)	Recobro del método		
Metil paratión	-	95	89	88	75
Fenitrotión	-	93	89	88	87
Clorfenvinfos	-	94	55	50	55
Diazinón	-	96	96	86	73
Clorpirifos	-	103	95	97	86

En la **tabla 3.21** se observa que los recobros con sílice C18 y sílice virgen fueron mejores que los obtenidos con florisil. Esto coincide con reportes en los que se menciona que el florisil arroja bajos recobros para la limpieza en organofosforados en grasa [Hopper, 1997].

Además, al evaporar el extracto que se había pasado por el cartucho con florisil se observaron residuos del adsorbente adheridos al matraz, mientras que con el gel de sílice virgen se logró evaporar el extracto a sequedad sin dificultad alguna en 30 minutos.

Por otro lado, el colocar sílice C18 en el fondo de la columna de dispersión pareció no tener efecto alguno en la limpieza del extracto puesto que al concentrarlo se hallaron las mismas impurezas que cuando no se empleó ningún adsorbente. Por estas razones, se prefirió optar por la limpieza con el gel de sílice virgen.

Debe aclararse que al observar los cromatogramas de los ensayos en los que se utilizó el gel de sílice virgen para limpiar el extracto, **figura 3.12**, se presentaron grupos de picos alrededor de 6.6 y 7.5 minutos tanto en los blancos (ensayo sin plaguicidas y ensayo sin hígado) como en el ensayo completo. De lo anterior, se dedujo que esas interferencias procedían del gel de sílice virgen.

Para verificar que las impurezas provenientes del gel de sílice virgen podían ser eliminadas se repitió el experimento, utilizando un cartucho con 0.5 gramos del adsorbente y se limpió previamente haciéndole pasar 15 mL de acetonitrilo. Como puede observarse en la **tabla 3.22** y la **figura 3.13**, este tratamiento fue suficiente para eliminar esas impurezas.

Tabla 3.22. Recobro de los plaguicidas después de la limpieza del extracto a través de un cartucho con 0.5 g de gel de sílice acondicionado con 15 mL de acetonitrilo. Fortificación 10 µg g⁻¹.

Plaguicida	R1	R2	R3	R4	R5	Promedio	Desv. Est.	C. V. (%)
Metil paratión	96,2	88,7	98,9	97,3	99,8	96 %	4	5
Fenitrotión	93,2	90,6	109,4	97,8	100,5	98 %	7	7
Clorfenvinfos	58,8	31,9	54,8	32,0	37,0	43 %	13	30
Diazinón	93,1	86,4	99,7	92,9	81,8	91 %	7	8
Clorpirifos	100,1	94,2	102,7	97,7	87,1	96 %	6	6

R = Recobro (%)

Desv. Est. = Desviación estándar

C. V. (%) = Coeficiente de variación como porcentaje.

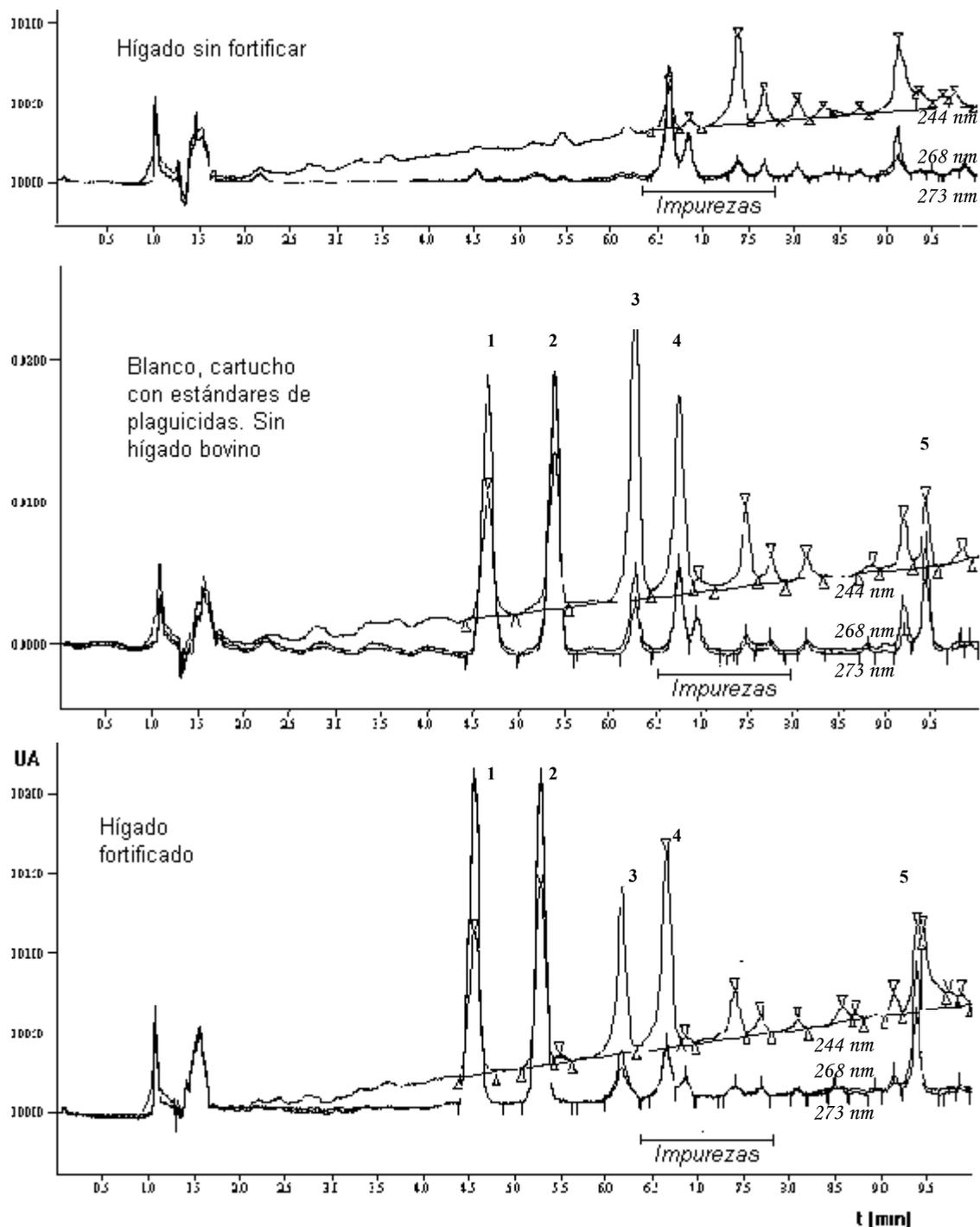


Figura 3.12. Comparación de los cromatogramas del ensayo para la limpieza del extracto con gel de sílice. Columna VARIAN de 150 x 4.60 mm empacada con fase inversa RES ELUT C18, tamaño de partícula 5 μm . Flujo de 1 mL min^{-1} . Gradiente lineal de 70 a 100% de metanol en 10 min. Plaguicidas: 1) Metil paratión, 2) Fenitrotión, 3) Clorfenvinfos, 4) Diazinón, 5) Clorpirifos.

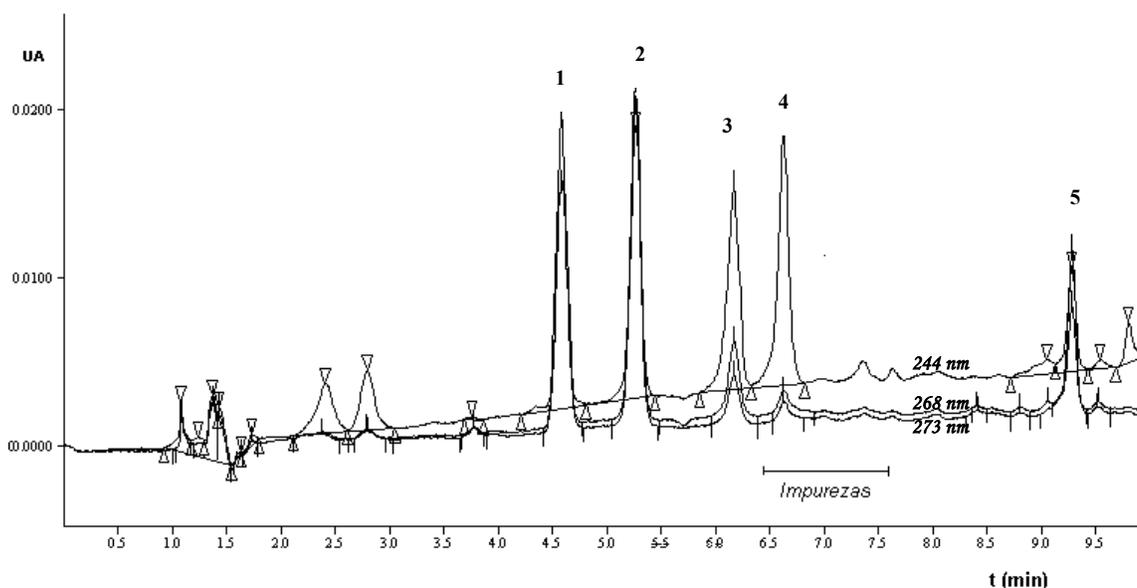


Figura 3.13. Cromatograma del extracto de plaguicidas organofosforados en hígado de res después de la limpieza con gel de sílice acondicionada con acetonitrilo. Columna VARIAN de 150 x 4.60 mm empacada con fase inversa RES ELUT C18, tamaño de partícula 5 μm . Flujo de 1 mL min^{-1} . Gradiente lineal de 70 a 100% de metanol en 10 min. 1) Metil paratión, 2) Fenitrotión, 3) Clorfenvinfos, 4) Diazinón, 5) Clorpirifos. Concentración 10 $\mu\text{g g}^{-1}$.

3.2.8. Modificación de la matriz por incorporación de surfactante

En la **tabla 3.21** y a lo largo del desarrollo del método se observó que se obtuvieron muy buenos recobros de los analitos exceptuando a clorfenvinfos. Por esta razón, como un intento para mejorar el recobro de este plaguicida, se decidió modificar la matriz con un surfactante. Se debe considerar que estos plaguicidas son poco estables en medios ácidos y alcalinos, por lo que la modificación de la matriz debe realizarse con sustancias neutras, o bien de acidez o basicidad débil para asegurar la integridad del analito. Los recobros para los plaguicidas después de modificar la matriz con el heptanosulfonato de sodio a tres concentraciones diferentes se presentan en la **tabla 3.23**.

Tabla 3.23. Recobro (%) de los plaguicidas cuando se ha modificado la matriz con heptanosulfonato de sodio (HS).

Plaguicida	HS 0.1M	HS 0.01M	HS 0.001M	Sin surfactante
Metil paratión	81	82	83	96 ± 4
Fenitrotión	85	99	88	98 ± 7
Clorfenvinfos	48	44	41	43 ± 13
Diazinón	84	80	83	91 ± 7
Clorpirifos	87	90	91	96 ± 6

HS: Heptanosulfonato de sodio.

Como se puede observar, existió una ligera tendencia de incremento en recobro de clorfenvinfos al aumentar la concentración del surfactante, pero no es un cambio importante si se compara con los recobros obtenidos sin surfactante. Además, con la adición de heptanosulfonato de sodio los recobros de los otros plaguicidas disminuyeron. Por lo cual se decidió evaluar el método sin la incorporación de modificadores de matriz.

Protocolo final de extracción

El método global para la determinación de plaguicidas organofosforados en hígado de res mediante dispersión de matriz en fase sólida y cromatografía de líquidos con absorción UV, es el mostrado en la **figura 3.14**.

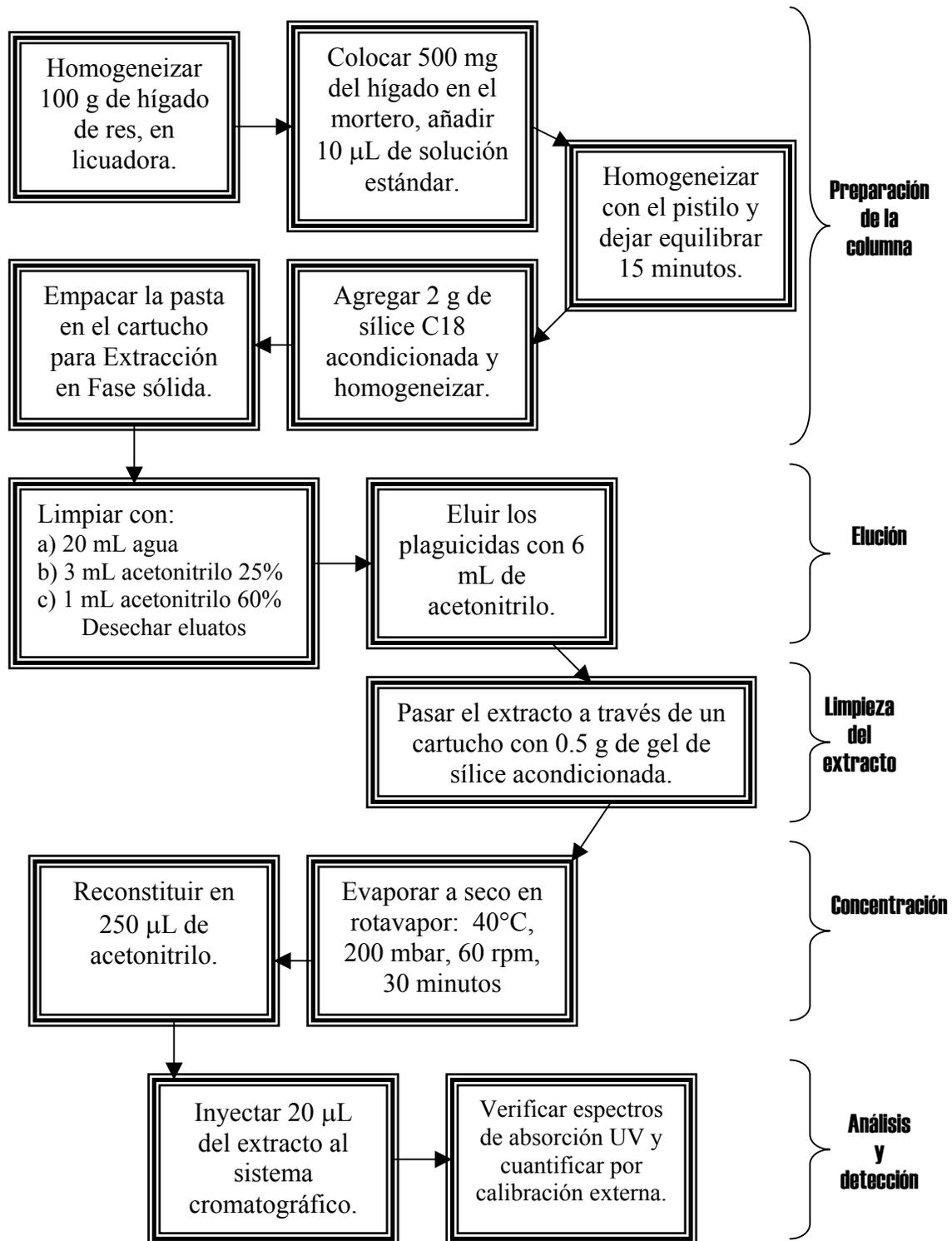


Figura 3.14. Protocolo completo para la determinación de residuos de plaguicidas organofosforados en hígado de res mediante dispersión de la matriz en fase sólida y cromatografía de líquidos con detección de absorción UV.

3.3. Evaluación del método

3.3.1. Estudios de recobro

Los recobros obtenidos a 6 niveles de concentración de los plaguicidas en hígado, se presentan en la **tabla 3.24**.

Tabla 3.24. Recobro (%) de los plaguicidas organofosforados a 6 niveles de concentración, empleando el método mostrado en la figura 3.14. La dispersión de los datos está dada como desviación estándar (n=3).

Plaguicida	Recobro promedio	Concentración en hígado ($\mu\text{g g}^{-1}$)					
		0.25	0.50	1.00	2.50	5.00	10.00
Metil paratión	90 ± 8	82 ± 10	96 ± 10	88 ± 6	85 ± 3	97 ± 5	93 ± 3
Fenitrotión	95 ± 17	70 ± 15	106 ± 22	99 ± 11	99 ± 13	99 ± 10	96 ± 7
Clorfenvinfos	48 ± 16	50 ± 30	41 ± 14	57 ± 16	32 ± 7	54 ± 5	54 ± 12
Diazinón	99 ± 10	106 ± 15	100 ± 10	100 ± 10	94 ± 10	95 ± 8	95 ± 6
Clorpirifos	97 ± 11	95 ± 22	99 ± 21	97 ± 4	92 ± 8	97 ± 5	101 ± 3

En la tabla 3.24 se observa que los recobros fueron aceptables en todo el intervalo de concentraciones, excepto para clorfenvinfos. Las observaciones anteriores fueron corroboradas al obtener la relación de la cantidad adicionada contra la cantidad recuperada para cada compuesto, los resultados se presentan en la **tabla 3.25**.

Tabla 3.25. Recobro del método (cantidad adicionada vs cantidad recuperada, en ng). El intervalo de m y b está calculado en base a la distribución t para $\alpha=0.05$ y 17 grados de libertad.

Compuesto	Coefficiente de correlación (r^2)	Recobro = Pendiente de la recta (m)	Ordenada al origen (b)
Metil paratión	0.997	0.935 ± 0.023	-19 ± 55
Fenitrotión	0.991	0.963 ± 0.040	16 ± 95
Clorfenvinfos	0.946	0.548 ± 0.057	-63 ± 135
Diazinón	0.994	0.948 ± 0.010	11 ± 75
Clorpirifos	0.997	1.007 ± 0.023	-37 ± 54

De la tabla 3.25 se dedujo que para todos los plaguicidas el recobro fue lineal en el intervalo analizado, que todas las rectas pasaron por el origen y que se obtuvieron recobros cercanos al 100% para todos los plaguicidas a excepción del clorfenvinfos entre 49 y 60%.

3.3.2. Linealidad y reproducibilidad del método

Con los datos usados para los estudios de recobro, se llevó a cabo el ajuste por mínimos cuadrados del área obtenida en función de la concentración, los resultados se presentan en la **tabla 3.26**.

Tabla 3.26. Ecuaciones lineales para el área obtenida en función de la concentración. Las gráficas se presentan en el apéndice B.

Compuesto	Coefficiente de correlación (r^2)	Pendiente de la recta ($m \pm s$)	Ordenada al origen ($b \pm s$)
Metil paratión	0.997	4259 \pm 61	- 174 \pm 291
Fenitrotión	0.991	3233 \pm 77	120 \pm 473
Clorfenvinfos	0.946	1741 \pm 104	- 519 \pm 660
Diazinón	0.994	2309 \pm 44	41 \pm 229
Clorpirifos	0.997	2835 \pm 37	-170 \pm 169

De los coeficientes de correlación presentados en la **tabla 3.26**, se deduce que la linealidad del método fue bastante aceptable en este intervalo de concentraciones para los cinco plaguicidas. Sin embargo, de acuerdo a la **tabla 3.27** que contiene los coeficientes de variación provenientes de 5 inyecciones a 1 y 5 $\mu\text{g g}^{-1}$, la reproducibilidad para clorfenvinfos y diazinón fue menor que la de los otros analitos, tal vez porque a 244nm se detectaron más interferentes.

Tabla 3.27. Reproducibilidad del método. Coeficientes de variación (%), n = 5

	Metil paratión	Fenitrotión	Clorfenvinfos	Diazinón	Clorpirifos
1 $\mu\text{g g}^{-1}$	7.61	7.54	14.83	10.11	4.61
5 $\mu\text{g g}^{-1}$	6.70	10.50	14.97	8.52	4.47

3.3.3. Límites de detección y cuantificación del método

En la **tabla 3.28** se presentan los límites de detección del método experimental y teórico, así como el límite de cuantificación para cada plaguicida. Ver metodología en la página 48. En base a estos resultados, con este método se podría monitorear a metil paratión, diazinón y clorpirifos por debajo del límite permitido (LMR) por la norma oficial mexicana NOM-004-ZOO-1994, 2001.

Tabla 3.28. Límites máximo residual (LMR), límite de detección del método (LDM) y límite de cuantificación del método (LCM). Todos los valores están dados en $\mu\text{g g}^{-1}$.

Plaguicida	LMR	LDM *			LCM	
		Experimental	I	II	I	II
Metil paratión	0.70	0.12	0,25 - 0.85	0,39	0.76 - 2.6	1.18
Fenitrotión	0.05	0.25	0,27 - 0.93	0,42	0.82 - 2.83	1.27
Clorfenvinfos	0.20	0.25	0,37 - 1.28	0,58	1.12 - 3.89	1.76
Diazinón	0.70	0.25	0,44 - 1.50	0,68	1.13 - 4.56	2.07
Clorpirifos	2.00	0.25	0,22 - 0.75	0,34	0.67 - 2.28	1.03

* Análisis de 7 muestras fortificadas a $1 \mu\text{g g}^{-1}$ de cada plaguicida.

II: Valor esperado para el límite con una confiabilidad del 99%. (Ecuación 2.3.3.1)

I: Intervalo en el que se espera encontrar al límite con una confiabilidad del 95%. (Ecuación 2.3.3.2)

3.4. Evaluación del método con la matriz de músculo de res

Recobro

En la **tabla 3.29** se presentan las ecuaciones de la cantidad recuperada en función de la cantidad adicionada, puesto que la pendiente de éstas fue cercana a 1 se dedujo que el recobro para los cinco plaguicidas fue cercano al 100%.

Tabla 3.29. Recobro del método aplicado a músculo. El intervalo de la pendiente y la ordenada al origen está calculado en base a la distribución t para $\alpha=0.05$ y 14 grados de libertad.

Compuesto	Coefficiente de correlación (r^2)	Pendiente de la recta (m)	Recobro (%) = $m \times 100$	Ordenada al origen (b)
Metil paratión	0.995	0.985 ± 0.033	98.5 ± 3.3	-4 ± 43
Fenitrotión	0.995	1.012 ± 0.033	101.2 ± 3.3	-22 ± 43
Clorfenvinfos	0.997	0.978 ± 0.025	97.8 ± 2.5	-7 ± 32
Diazinón	0.997	0.954 ± 0.021	95.4 ± 2.1	12 ± 27
Clorpirifos	0.998	0.992 ± 0.018	99.2 ± 1.8	-10 ± 23

Linealidad y reproducibilidad

Al revisar los coeficientes de correlación presentados en la **tabla 3.30**. Se observa que la linealidad del método en el intervalo de concentraciones

analizado fue bastante aceptable, además todas las rectas pasaron por el origen de acuerdo a la prueba t de Student con nivel de confianza del 95%. Lo anterior indicó ausencia de interferencias en la cuantificación.

Tabla 3.30. Ecuaciones del área del pico en función de la concentración. Las gráficas se presentan en el apéndice B.

Compuesto	Coefficiente de correlación (r^2)	Pendiente de la recta ($m \pm s$)	Ordenada al origen ($b \pm s$)
Metil paratión	0.995	5033 \pm 19	19 \pm 266
Fenitrotión	0.995	3740 \pm 75	-4 \pm 250
Clorfenvinfos	0.996	3446 \pm 62	245 \pm 213
Diazinón	0.997	2357 \pm 34	-68 \pm 96
Clorpirifos	0.998	3098 \pm 38	-140 \pm 94

En la **tabla 3.31** se presentan los coeficientes de variación en el recobro para tres repeticiones por cada concentración. A partir de estos se dedujo que el método fue aceptablemente reproducible (C.V. \leq 12%) en el intervalo de concentraciones analizadas.

Tabla 3.31. Reproducibilidad del método. Coeficientes de variación (%) del recobro para tres muestras por cada nivel de concentración.

$\mu\text{g g}^{-1}$	Metil paratión	Fenitrotión	Clorfenvinfos	Diazinón	Clorpirifos
5.00	5.61	4.54	2.69	3.43	3.18
2.50	6.61	7.56	5.52	3.15	0.87
1.00	0.88	11.74	6.60	9.25	6.92
0.50	4.70	0.49	6.12	0.74	8.27
0.25	7.05	10.54	11.81	6.33	12.46

Limites de detección y cuantificación del método

De acuerdo a los valores presentados en la tabla **3.32**, el método desarrollado permite monitorear residuos de metil paratión, diazinón y clorpirifos en músculo de bovino por debajo de los LMRs establecidos en la norma NOM-004-ZOO-1994, 2001. Inclusive se alcanzan valores más bajos que los obtenidos para hígado, lo cual se atribuye a que el hígado es una matriz con

mayor proporción de grasa y también a que metabólicamente es más compleja, pues en ella se llevan a cabo un sin número de reacciones enzimáticas.

Tabla 3.32. Límites máximo residual (LMR), límite de detección del método (LDM) y límite de cuantificación del método (LCM) Todos los valores están dados en $\mu\text{g g}^{-1}$.

Plaguicida	LMR	LDM *			LCM	
		Experimental	I	II	I	II
Metil paratión	0.70	0.12	0,09 - 0.31	0,14	0.27 – 0.94	0.42
Fenitrotión	0.05	0.25	0,29 - 0.98	0,45	0.88 - 2.98	1.37
Clorfenvinfos	0.20	0.25	0,26 – 0.91	0,41	0.79 – 2.76	1.25
Diazinón	0.70	0.25	0,20 – 0.69	0,31	0.61 – 2.10	0.94
Clorpirifos	2.00	0.25	0,13 – 0.44	0,20	0.39 – 1.34	0.61

* Análisis de 7 muestras fortificadas a $1 \mu\text{g g}^{-1}$ de cada plaguicida.

II: Valor esperado para el límite con una confiabilidad del 99%. (Ecuación 2.3.3.1)

I: Intervalo en el que se espera encontrar al límite con una confiabilidad del 95%. (Ecuación 2.3.3.2)

En la **figura 3.15** se presenta el cromatograma del extracto de músculo fortificado con los cinco plaguicidas organofosforados ($2.5 \mu\text{g g}^{-1}$) junto con el cromatograma del músculo sin fortificar.

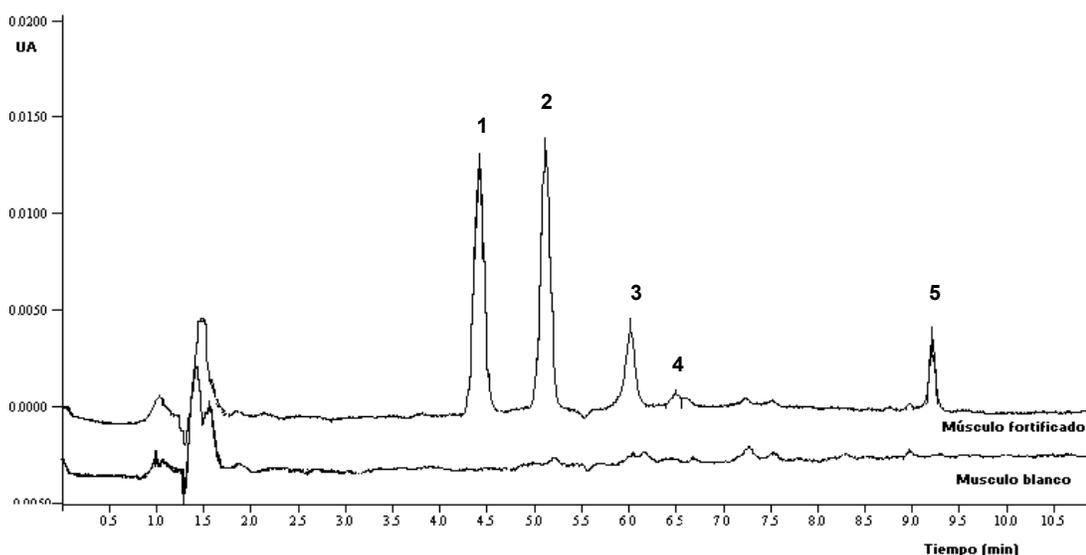


Figura 3.15. Cromatograma del extracto de músculo de res. $\lambda=268\text{nm}$. Columna VARIAN de $150 \times 4.60 \text{ mm}$ empacada con fase inversa RES ELUT C18, tamaño de partícula $5 \mu\text{m}$, flujo de 1 mL min^{-1} , gradiente lineal de 70 a 100% de metanol en 10 min. 1) Metil paratión, 2) Fenitrotión, 3) Clorfenvinfos, 4) Diazinón, 5) Clorpirifos. Fortificación $2.5 \mu\text{g g}^{-1}$.

3.5. Aplicación del método en muestras de hígados de res con lesiones patológicas

Se sabe que los plaguicidas organofosforados pueden concentrarse en grasa, carne y leche [CICOPLAFEST, 1997]. Además, en nuestro país, se han encontrado residuos de clorpirifos, diclorvos, forato y clorfenvinfos en leche de vaca en concentraciones superiores a la dosis diaria aceptable [Salas *et al*, 2003]. También, en humanos su presencia ha sido relacionada con cáncer de vejiga [Webster *et al*, 2002] y se han encontrado residuos de este tipo de plaguicidas en hígado y en riñones cancerosos, en concentraciones superiores a las encontradas en riñones sanos [Russo *et al*, 2002]. Por todo lo anterior, los autores de este trabajo usaron el protocolo presentado en la figura 3.14, para analizar muestras de hígado de res que presentaron lesiones patológicas leves, con el fin de detectar en algunas de ellas a los plaguicidas.

De las muestras analizadas, 6 de ellas mostraron contener residuos de clorpirifos y/o clorfenvinfos, puesto que en los cromatogramas se observó la presencia de picos localizados en el tiempo de retención correspondiente a los estándares; además, con espectros de absorción UV-Vis similares a los de los compuestos en cuestión. En las **figuras 3.16** y **3.17** se presentan los cromatogramas de dos de dichas muestras junto con su correspondiente fortificación con $1.2 \mu\text{g g}^{-1}$ de los cinco plaguicidas. Al igual que en los cromatogramas de estas figuras, la intensidad de los picos de ambos plaguicidas en los cromatogramas de las seis muestras sin fortificar sugirió concentraciones cercanas a los límites de detección del método aquí desarrollado. Por esta razón, se decidió corroborar los resultados obtenidos por CLAR-DAD analizando a los extractos de las 6 muestras por cromatografía de gases con espectrometría de masas, puesto que este tipo de detección permite confirmar la naturaleza química de una sustancia a través del patrón de fraccionamiento molecular. Los resultados se presentan en la siguiente sección.

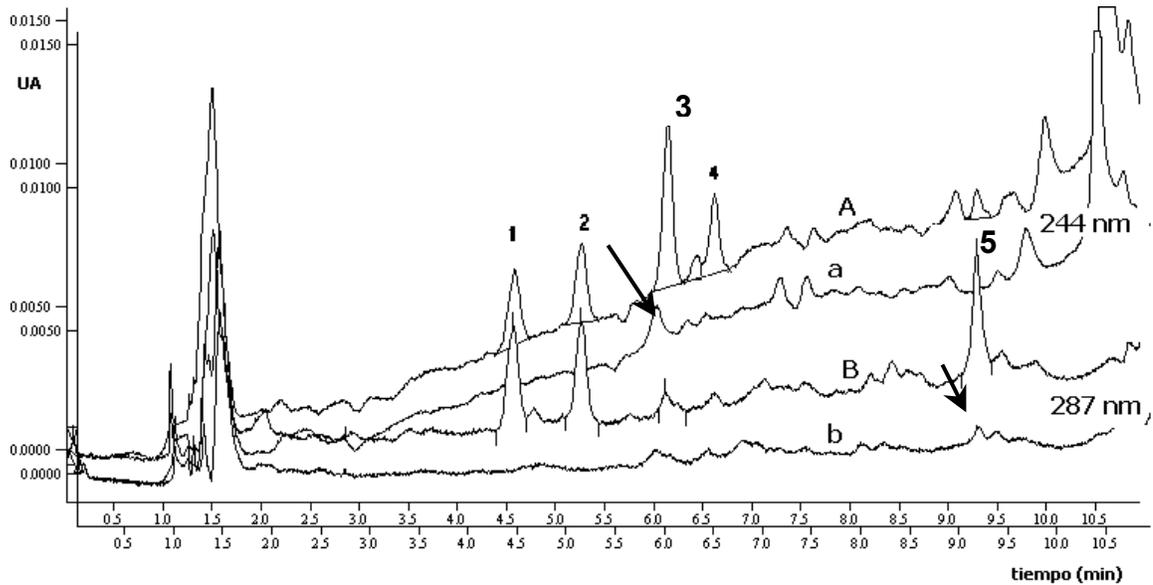


Figura 3.16. Cromatogramas del extracto de hígado de res con lesiones patológicas (H34). A: Fortificado (244nm), a: No fortificado (244nm), B: Fortificado (287nm), b: No fortificado (287nm). Columna VARIAN de 150 x 4.60 mm empacada con fase inversa RES ELUT C18, tamaño de partícula 5 μm . Flujo de 1 mL min^{-1} . Gradiente lineal de 70 a 100% de metanol en 10 min. 1) Metil paratión, 2) Fenitrotión, 3) Clorfenvinfos, 4) Diazinón, 5) Clorpirifos. Fortificación 1.2 $\mu\text{g g}^{-1}$. Las flechas señalan los picos que pueden corresponder a los plaguicidas.

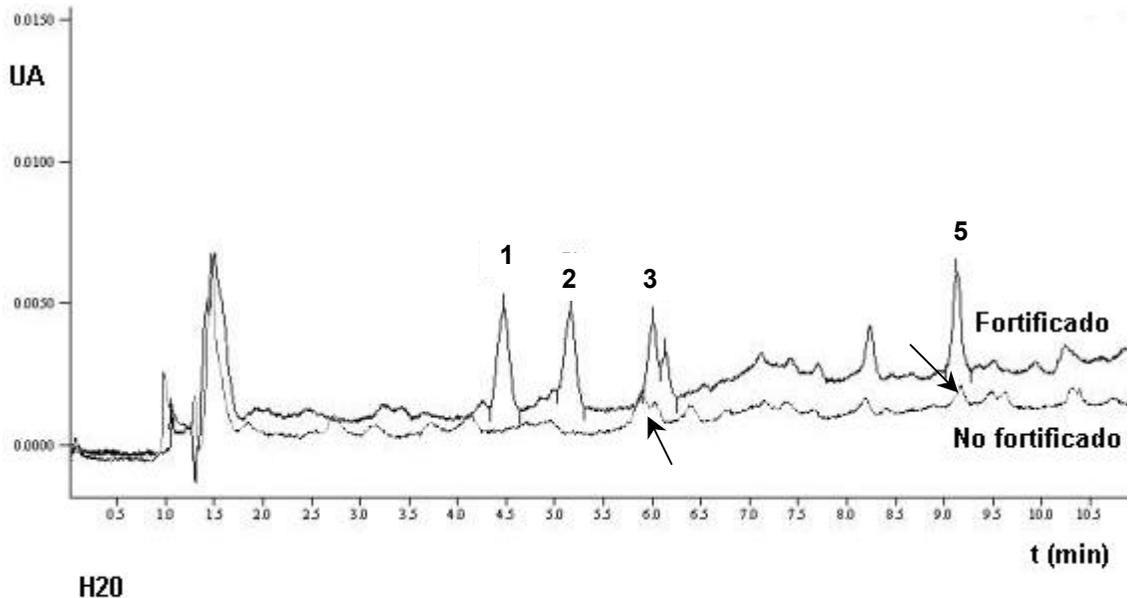


Figura 3.17. Cromatograma del extracto de hígado de res con lesiones patológicas (H20) a 287nm. Columna VARIAN de 150 x 4.60 mm empacada con fase inversa RES ELUT C18, tamaño de partícula 5 μm . Flujo de 1 mL min^{-1} . Gradiente de 70 a 100% de metanol en 10 min. 1) Metil paratión, 2) Fenitrotión, 3) Clorfenvinfos, 5) Clorpirifos. Fortificación 1.2 $\mu\text{g g}^{-1}$. Las flechas señalan los picos que pueden corresponder a los plaguicidas.

3.5.1. Confirmación de la presencia de clorpirifos y clorfenvinfos en las muestras de hígado de res por Cromatografía de Gases – Espectrometría de Masas

Con las condiciones cromatográficas descritas en la página 50, los tiempos de retención para clorpirifos y clorfenvinfos fueron 12.8 minutos y 13.3 minutos respectivamente. Los espectros de masas de ambos compuestos se presentan en la **figura 3.18**.

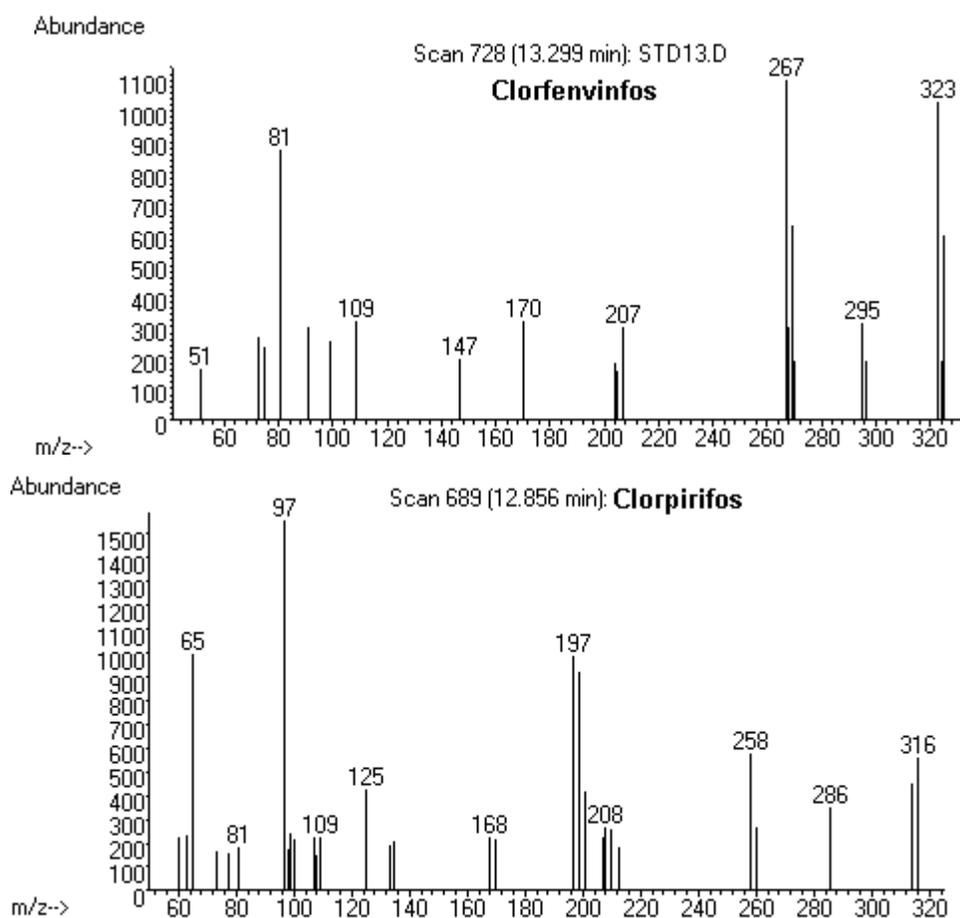


Figura 3.18. Espectros de masas de clorfenvinfos (arriba) y clorpirifos (inferior). Inyección splitless de 1 μ L de estándar (5 mg/L).

De los espectros mostrados en la figura 3.18 se seleccionaron los iones moleculares, que corresponden al peso molecular menos un átomo de cloro, junto con otros iones de mayor abundancia y de elevado peso molecular, para lograr la mayor sensibilidad y selectividad posible. Así, las condiciones para la detección con el espectrómetro de masas en modo SIM son las descritas en la página 50. Con estas condiciones se analizó la mezcla de estándares de clorpirifos y clorfenvinfos a una concentración de 0.1 mg L⁻¹. En la **figura 3.19** se presenta el cromatograma obtenido, en él se observan dos picos bien definidos en los correspondientes tiempos de retención de los dos plaguicidas.

En la figura 3.19 también se muestran los cromatogramas de los extractos de las muestras de hígado sin fortificar presentadas en la figura 3.17. Cabe aclarar que para inyectar los extractos al sistema CG-EM, fue necesario limpiarlos por EFS, como se describe en la página 50, y que a pesar de que siempre se trabajó en las mismas condiciones, uno de los extractos de las muestras de hígado no se inyectó al sistema CG-EM por presentar impurezas (detectadas con el sistema CG-DIF) que no pudieron eliminarse con la metodología mencionada. Los resultados de abundancia relativa de los iones monitoreados para las cinco muestras se presentan en la **tabla 3.33**.

Tabla 3.33. Abundancia relativa de los iones monitoreados para la confirmación de clorfenvinfos y clorpirifos en las muestras de hígado de res identificadas como posibles positivos por CLAR-DAD.

m/z	Abundancia relativa (%)					
	Estándares	Muestras patológicas de hígado de res				
	Clorpirifos	H4	H20	H28	H29	H34
197	100	100	100	100	100	100
258	61	82	82	86	85	83
314	80	87	80	85	82	81
m/z	Clorfenvinfos	H4	H20	H28	H29	H34
267	100	100	100	100	100	100
269	88	78	49	54	36	47
323	86	73	37	48	30	41
325	86	94	61	67	44	61

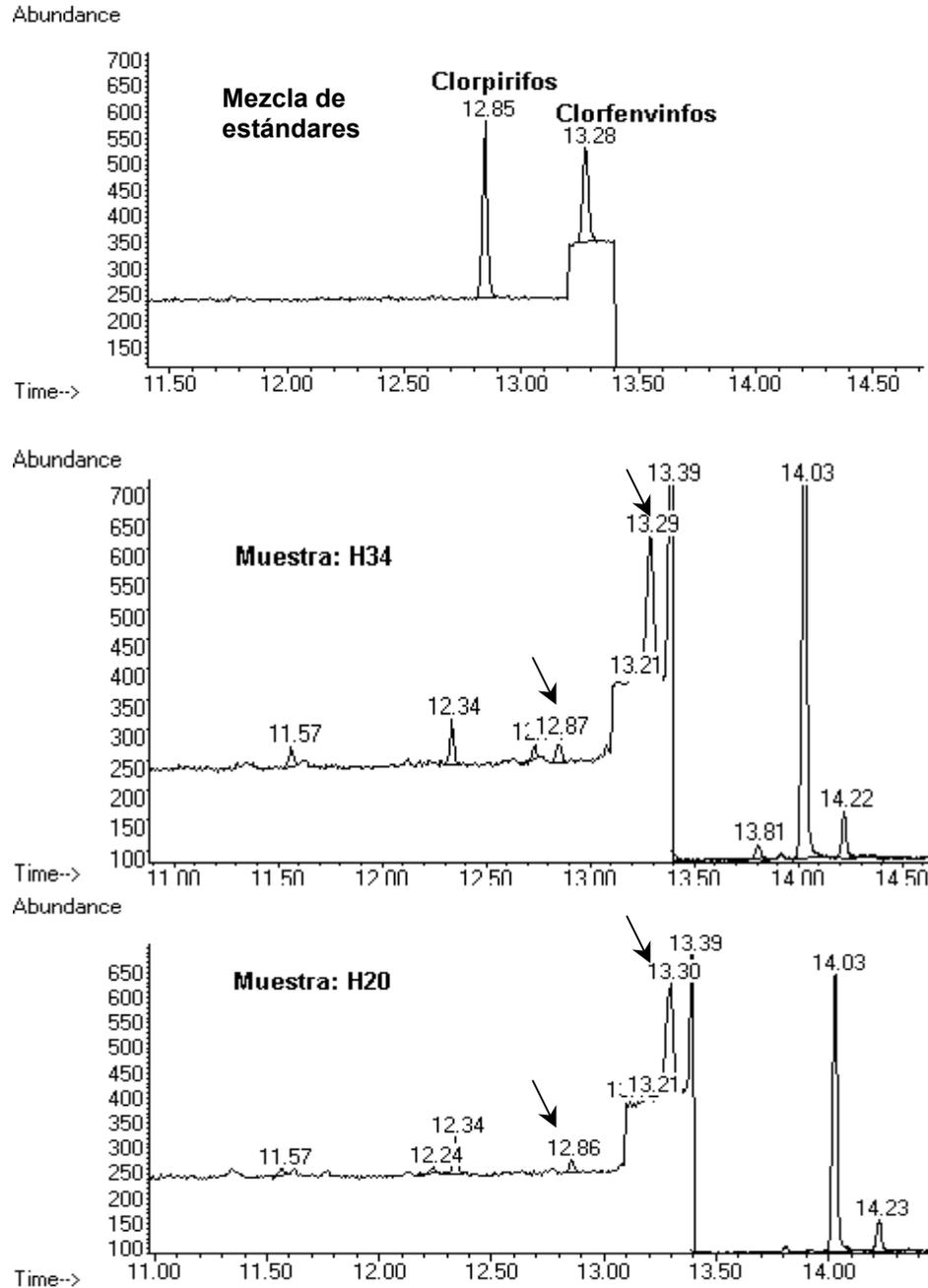


Figura 3.19. Cromatogramas de una solución estándar (0.1 mg/L) de clorpirifos y clorfenvinfos (superior), y de dos extractos de muestras de hígado de res. Columna DB5, Helio como gas acarreador. Inyección splitless/1 min a 280 °C, volumen de inyección 1 µL. Temperatura del horno: 2 minutos isotérmico a 60 °C, rampa hasta 280 °C con 20°C/min seguida de 10 minutos isotérmico a 280°C. Detección, 197, 258 y 314 m/z hasta los 13.2 minutos, 267, 269, 323 y 325 m/z hasta los 13.4 minutos, 285 m/z hasta los 23 minutos. Dwell time: 100 ms. Las flechas señalan los picos que pueden corresponder a los plaguicidas.

Como se puede ver en la **figura 3.19**, en los cromatogramas de ambas muestras de hígado de res se presentaron picos en los tiempos de retención de los dos plaguicidas en estudio. Sin embargo, para las cinco muestras analizadas, al comparar la abundancia relativa de los iones en cada uno de los picos, ver la **tabla 3. 33**, no es posible afirmar la presencia de los compuestos puesto que los datos no concuerdan totalmente con los de los estándares, aunque tampoco se descarta la presencia de los mismos porque la diferencia en las proporciones podrían deberse a interferencias que coeluyan con los plaguicidas, sobre todo en el caso de clorfenvinfos. Además, en el caso de clorpirifos, los picos son tan pequeños que la abundancia relativa podría afectarse por ruido de la línea base.

A pesar de lo anterior, el hecho de encontrar indicios de ambos plaguicidas tanto por CLAR-DAD como por CG-EM en las muestras analizadas indica alta probabilidad de la presencia de los plaguicidas en ellas. Por lo tanto, podría haber una relación entre la presencia de patologías en hígado de res y la acumulación de los plaguicidas mencionados en ese tejido. Al respecto, Russo *et al*, 2002 menciona que la mayor acumulación de plaguicidas en los tejidos humanos afectados patológicamente está relacionada con la disminución de la actividad enzimática en los mismos. Sin embargo, este es un tema que aún requiere de más investigación tanto en la optimización de metodologías para el análisis de plaguicidas organofosforados en tejidos biológicos [Musshoff *et al*, 2002; Tsoukali *et al*, 2005] como en el efecto que estos plaguicidas ocasionan en los tejidos donde pueden acumularse [Kalender *et al*, 2005; Bolognesi, 2003]

3.6. Comparación del protocolo para la determinación de residuos de plaguicidas organofosforados por DMFS-CLAR-DAD con el método oficial mexicano (NOM-028-ZOO-1995)

En la **tabla 3.34** se presentan algunos parámetros de comparación del método oficial mexicano para la determinación de residuos de plaguicidas organofosforados en hígado y/o músculo de res con el método desarrollado en este trabajo.

Tabla 3.34. Comparación del protocolo para la determinación de residuos de plaguicidas organofosforados en hígado de res por DMFS-CLAR-DAD con el método oficial mexicano (NOM-028-ZOO-1995)

Parámetro		NOM-028-ZOO-1995	DMFS-CLAR-DAD
Tiempo de análisis aproximado		460 minutos	90 minutos
Cantidad de disolventes		700 mL	45 mL
Número de reactivos		14	7
Intervalo de recobro (%)	Clorfenvinfos	No reportado	50 – 54
	Clorpirifos	60 – 100	95 – 110
	Diazinon	60 – 100	95 – 106
	Fenitrotión	80 – 110	70 – 96
	Metil paratión	70 – 110	82 – 93
Intervalo de fortificación (ng g ⁻¹)		150 – 1 000	250 – 10 000
Cantidad de muestra (g)		50	0.5

De acuerdo a los datos presentados en la tabla 3.14 se pudo afirmar que el método desarrollado permite un ahorro considerable en tiempo y reactivos. Además, aún cuando el recobro de fenitrotión fue 10% menor al establecido en la norma, los recobros de clorpirifos, diazinón y metil paratión presentaron mayor reproducibilidad a la especificada en la norma y se mantuvieron dentro del intervalo estipulado en la misma.

Así mismo, en la tabla 3.14 se puede apreciar que el método desarrollado puede analizar intervalos de concentraciones ligeramente mayores que el método oficial, aún cuando utiliza un detector no específico. Sin embargo, si se aumentara la cantidad de muestra de 0.5 g a aproximadamente 1 g, se podría alcanzar el mismo nivel de fortificación del método oficial. Cabe resaltar que en éste último la cantidad de muestra utilizada es 100 veces mayor y se emplea al detector termoiónico específico que es mucho más sensible.

CONCLUSIONES

La metodología para la extracción de los plaguicidas organofosforados en hígado de res aquí propuesta es más simple que los métodos tradicionales incluyendo al método oficial mexicano en cuanto al número de operaciones involucradas para obtener el extracto y el volumen de disolventes orgánicos; lo cual permite economizar en tiempo y dinero. Aún más, se obtuvo buena reproducibilidad para la determinación de los cinco plaguicidas, el recobro de los analitos fue bastante aceptable, con excepción del clorfenvinfos, y los límites de detección son suficientes para detectar a metil paratión, diazinón y clorpirifos de acuerdo a los niveles máximos permisibles por la normatividad mexicana, por lo que la metodología desarrollada en este trabajo podría usarse como método alternativo para la extracción en las metodologías de monitoreo de estos plaguicidas en dicha matriz.

Por otro lado, se pudo observar que la matriz sí influye en el recobro de los analitos, en este caso se obtuvieron mejores resultados al evaluar el método con músculo que con hígado de res, lo cual es comprensible al recordar que el hígado es una matriz mucho más compleja que el músculo a nivel estructural y de metabolismo porque en él se llevan a cabo innumerables reacciones enzimáticas, además su constitución en grasa es considerable.

PERSPECTIVAS

Puesto que existen normatividades de control de calidad que exigen límites de detección y cuantificación menores a los que se obtuvieron en este trabajo, se necesita optimizar y adecuar el método propuesto a dichos requerimientos, se sugiere aumentar la cantidad de muestra, o si es posible, cambiar la forma de detección por una más selectiva. Así mismo, este tipo de estudios se vería completado al incluir a los metabolitos de los plaguicidas.

Por otra parte, el método desarrollado en este trabajo representa una herramienta indispensable para el arranque de un estudio biológico para relacionar la presencia de estos plaguicidas con la alteración histológica en los bovinos. Para llevar a cabo lo anterior será necesario llevar a cabo la validación del método, puesto que el análisis de las muestras con lesiones patológicas dio indicios sobre la presencia de algunos insecticidas pero se requieren más estudios para confirmar esos resultados.

BIBLIOGRAFÍA

A

Anastassiades M., and Lehotay S. J. (2003) *Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "Dispersive Solid-Phase Extraction" for the determination of pesticide residues in produce.* **J. AOAC Int.**,**86(2):412-431.**

B

Barker S. A., Long A. R., and Short C. R. (1989). *Isolation of drug residues from tissues by solid phase dispersion.* **J. Chromatogr.**, **475: 353-361.**

Barker S. A., Long A. R., and Hines II M. E. (1993). *Disruption and fractionation of biological materials by matrix solid-phase dispersion.* **J. Chromatogr.**, **629: 23-34.**

Barker S. A. (2000). *Review: Applications of matrix solid-phase dispersion in food analysis.* **J. Chromatogr. A**, **880: 63-68.**

Barker S. A. (2000). *Review: Matrix solid-phase dispersion.* **J. Chromatogr. A**, **885:115-127.**

Blesa J., Soriano J. M., Moltó J. C., Marín R., Mañes J. (2003). *Determination of aflatoxins in peanuts by matrix solid-phase dispersion and liquid chromatography.* **J. Chromatogr. A**, **1011: 49-54.**

Bogialli S., Curini R., Di Corcia A., Nazzari M., and Samperi R. (2003). *A liquid chromatography- Mass Spectrometry assay for analyzing sulfonamide antibacterials in cattle and fish muscle tissues.* **Anal. Chem.**, **75 (8): 1798-1804**

Bolognesi C. (2003). *Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies.* **Mutat. Res.**, **542: 251-272.**

Brown P., Charlton A., Cuthbert M., Barnett L., Ross L., Green M., Gillies L., Shaw K., Fletcher K. (1996) *Identification of pesticide poisoning in wildlife.* **J. Chromatogr. A**, **754: 463 - 478.**

Buldini P. L., Ricci L., Sharma J. L. (2002). *Review: Recent applications of sample preparation techniques in food analysis.* **J. Chromatogr. A**, **975:47-70.**

C

Carro A. M., Lorenzo R. A., Fernández F., Rodil R., and Cela R. (2005). *Multiresidue screening of chlorinated and brominated compounds from aquaculture samples using matrix solid - phase dispersion - gas chromatography - mass spectrometry.* **J. Chromatogr. A**, **1071(1-2): 93-98.**

CICOPLAFEST: Comisión Intersecretarial para el control del proceso y uso de plaguicidas, fertilizantes y sustancias tóxicas. Secretaria de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural, Secretaria de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca, Secretaria de Salud, Secretaria de Comercio y Fomento Industrial. (1997). **Catálogo Oficial de Plaguicidas. México, D. F.**

Code of Federal Regulation (CFR) Title 40, Vol 20. Appendix B to Part 136 – Definition and Procedure for the determination of the Method Detection Limit-- Revision 1.11. From the U. S. Government Printing Office via GPO Access. [40CFR136]

Coulibay K., and Smith J. S. (1993) *Thermostability of organophosphate pesticides and some of their major metabolites in water and beef muscle.* **J. Agric. Food Chem., 41: 1719-1723.**

Coulibay K., and Smith J. S. (1994) *Effect of pH and cooking temperature on the stability of organophosphate pesticides in beef muscle.* **J. Agric. Food Chem., 42: 2035-2039.**

Criado M. R., Hernández D., Rodríguez I., and Cela R. (2004) *Application of matrix solid-phase dispersion to the determination of polychlorinated biphenyls in fat by gas chromatography with electron-capture and mass spectrometric detection.* **J. Chromatogr. A, 1056 (1-2): 187-194.**

Crecenzi C., Bayoundh S., Cormack P. A. G., Klein T., and Ensing K. (2001). Determination of clenbuterol in bovine liver by combining matrix solid-phase dispersion and molecularly imprinted solid phase extraction followed by liquid chromatography/electrospray ion trap multiple-stage mass spectrometry. **Anal. Chem., 73(10): 2171-2177.**

Cremllyn R. (1980). Pesticides, preparation and mode of action. **John Wiley and Sons. Great Britain. Pp. 80-95.**

Crouch M. D., and Barker S. A. (1997). *Analysis of toxic wastes in tissues from aquatic species, applications of matrix solid-phase dispersion.* **J. Chromatogr. A, 774: 287-309.**

Curren M. S. S., and King J. W. (2002) *New sample preparation technique for the determination of avoparcin in pressurized hot water extracts from kidney samples.* **J. Chromatogr. A, 954: 41-49.**

Currie L. A. (1999). *Nomenclature in evaluation of analytical method including detection and quantification capabilities.* **Anal. Chim. Acta, 391:105-126.**

D

Di Muccio A., Pelosi P., Camoni I., Attard D., Dommarco R., Generali T., Ausili A. (1996) *Selective, solid-matrix dispersion extraction of organophosphate pesticide residues from milk.* **J. Chromatogr. A, 754: 497-506.**

E

Ensminger M. E. (1973). **Manual del ganadero.** Centro Regional de ayuda técnica para el desarrollo internacional (AID) México-Buenos Aires. Argentina.

G

Gaunt P., and Barker S. A. (2000). *Matrix solid phase dispersion extraction of triazines from catfish tissues; examination of the effect of temperature and dissolved oxygen on the toxicity of atrazine.* **Int. J. Environment and Pollution, 13 (1-6): 284-312.**

H

- Hajslová J., and Zrostliková, J. (2003) *Matrix effects in (ultra)trace analysis of pesticide residues in food and biotic matrices*. **J. Chromatogr. A**, **1000**: 181-197.
- Hassall K. A. (1990). **The biochemistry and uses of pesticides. Structure, metabolism, mode of action and use in crop protection**. 2nd edition. Ed. McMILLAN. Hong Kong. Pp. 81-123
- Hayes W. J. Jr. and Laws E. R. Jr. (Eds) **Handbook of pesticide toxicology. Vol 1 "General principles"** Academic Press USA. 1991. pp. 271
- Hennion M. C. (1999) Review: Solid phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography. **J. Chromatogr. A**, **856**: 3-54.
- Hopper M. L. (1997) *Extraction and clean up of organochlorine and organophosphorus pesticide in fats by supercritical fluid techniques*. **J. AOAC Int.**, **80 (3)**: 639-646.
- Holstege D. M., Scharberg D. L., Tor E. R., Hart L. C. and Gales F. D. (1994) *A rapid muliresidue screen for organophosphorus, organochlorine, and N-methyl carbamate insecticides in plant and animal tissues*. **J. AOAC Int.**, **77(5)**: 1263-1269

I

- Ioerger B. P. and Smith J. S. (1993) *Multiresidue method for the extraction and detection of organophosphate pesticides and their primary and secondary metabolites from beef tissue using HPLC*. **J. Agric. Food Chem.**, **41**: 303-307.

J

- Juan A., Picó Y., Font G. (2003). *Revisión de los métodos de determinación de residuos de plaguicidas organofosforados en alimentos*. **Rev. Toxicol.**, **20**:166-175.
- Juhler R. K. (1997) *Optimized method for the determination of organophosphorus pesticides in meat and fatty matrices*. **J. Chromatogr. A**, **786**: 145-153.
- Juhler R. K. (1998). *Supercritical fluid extraction of pesticides from meat: a systematic approach for optimisation*. **Analyst**, **123**:1551-1556.

K

- Kalender S., Ogutcu A., Usunhisarcikli M., Açikgoz F., Durak D., Ulusoy Y., Kalender Y. (2005). *Diazinon-induced hepatotoxicity and protective effect of vitamin E on some biochemical indices and ultrastructural changes*. **Toxicol.**, **211**: 197-206.
- Kawasaki S., and Tadano, J. (2000) *Biological matrices: Pesticides Content. Sampling, Sample preparation and Preservation*. En **Enciclopedia of Analytical Chemistry Applications. Theory and Instrumentation**. Edited by R. A. Meyers. Ed. Jonh Wiley and Sons. LTD. Vol. 7. Pp. 6114-6123.

- Kishida K., and Furusawa N. (2001) *Matrix solid phase dispersion and high-performance liquid chromatographic determination of residual sulfonamides in chicken.* **J. Chromatogr. A**, **937**: 49-55.
- Kubala-Drincic H., Bazulic D., Sapunar-Postruznik J., Grubelic M., and Stuhne G. (2003). *Matrix solid-phase dispersion extraction and gas chromatographic determination of chloramphenicol in muscle tissue.* **J. Agric. Food Chem.**, **51(4)**: 871-875.
- Kuivinen J. and Bengtsson S. (2002) *Solid-phase extraction and cleanup of organophosphorus pesticide residues in bovine muscle with gas chromatographic detection.* **J. Chromatogr. Sci.**, **40**: 392-396.

L

- Lacorte S., and Barcelo D. (2000). *Organophosphorus pesticides in water and food, analysis of.* En **Enciclopedia of Analytical Chemistry Applications. Theory and Instrumentation.** Edited by R. A. Meyers. Ed. John Wiley and Sons. LTD. Vol. 7. Pp. 6421-6444
- Lagaña A., Bacaloni A., Castellano M., Curini R., De Leva I., Fabeli A., and Materazzi S. (2003). *Sample preparation for determination of macrocyclic lactone mycotoxins in fish tissue, based on on-line matrix solid-phase dispersion and solid-phase extraction cleanup followed by liquid chromatography/tandem mass spectrometry.* **J. AOAC Int.**, **86 (4)**: 729-736.
- Lehotay S. J. (2000) *Multiclass, multiresidue analysis of pesticides, strategies for.* En **Enciclopedia of Analytical Chemistry Applications. Theory and Instrumentation.** Edited by R. A. Meyers. Ed. John Wiley and Sons. LTD. Vol. 7. Pp. 6364-6378
- Long A. R., Soliman M. M., Barker S. A. (1991) *Matrix solid phase dispersion (MSPD) extraction and gas chromatographic screening of nine chlorinated pesticides in beef fat.* **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, **74(3)**: 493-496

M

- Martínez A., Ramil M., Montes R., Hernans D., Rubí E., Rodríguez I., and Cela Torrijos R. (2005) *Development of a matrix solid-phase dispersion method for the screening of polybrominated diphenyl ethers and polychlorinated biphenyls in biota samples using gas chromatography with electron capture detection.* **J. Chromatogr. A**, **1072 (1)**: 83-91.
- Modificación a la Norma Oficial Mexicana **NOM-004-ZOO-1994**. *Grasa, hígado, músculo y riñones en aves, bovinos, caprinos, cérvidos, equinos, ovinos y porcinos. Residuos Tóxicos. Límites máximos permisibles y procedimientos de muestreo.* Ciudad de México, DF., a 10 de abril de 2001.- Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación.
- Morzycka B. (2002). *Simple method for the determination of trace levels of pesticides in honey bees using matrix solid-phase dispersion and gas chromatography.* **J. Chromatogr. A**, **982**: 267- 273.

Musshoff F., Junker H., and Madea B. (2002). *Simple determination of 22 organophosphorous pesticides in human blood using headspace solid-phase microextraction and gas chromatography with mass spectrometric detection.* **J. Chromatogr. Sci.**, **40**: 29-34.

Mukherjee I., and Gopal M. (1996) *Review: Chromatographic techniques in the analysis of organochlorine pesticide residues.* **J. Chromatogr. A**, **754**: 33-42.

N

Noble A. (1993) *Review: Particion coefficients (n-octanol-water) for pesticides.* **J. Chromatogr.**, **642**: 3-14.

Norma Oficial Mexicana, **NOM-028-ZOO-1995**. *Determinación de residuos de plaguicidas organofosforados en hígado y músculo de bovinos, equinos, porcinos, ovinos, caprinos, cérvidos y aves, por cromatografía de gases.* México DF., 18 de diciembre de 1995.

P

Pawliszyn J. (2003) *Sample preparation: Quo vadis?* **Anal. Chem.**, **75(11)**: 2543-2558.

Pagliuca G., Gazzotti T., Zironi E., Sticca P. (2005) *Residue analysis of organophosphorus pesticides in animal matrices by dual column capillary gas chromatography with nitrogen-phosphorus detection.* **J.Chromatogr.A**,**1071**:67-70.

Pensado L., Casais M. C., Mejuto M. C., Cela R. (2005). *Application of matrix solid-phase dispersion in the analysis of priority polycyclic aromatic hydrocarbons in fish samples.* **J. Chromatogr. A**, **1077**: 103-109.

R

Ruiz M. J., Cameán A. M., Moreno I. M., and Pico Y. (2005). *Determination of microcystins in biological samples by matrix solid-phase dispersion and liquid chromatography-mass spectrometry.* **J. Chromatogr. A**, **1073 (1-2)**: 257-262.

Russo M. V., Campanella L., Avino P. (2002). *Determination of organophosphorus pesticide residues in human tissues by capillary gas chromatography-negative chemical ionization mass spectrometry analysis.* **J. Chromatogr. B**, **780**: 431- 441.

S

Salas J. H., Gonzáles M. M., Noa M., Pérez N. M., Díaz G., Gutiérrez R., Zazueta H., and Osuna I. (2003) *Organophosphorus pesticide residues in mexican commercial pasteurized milk.* **J. Agric. Food Chem.**, **51**: 4468-4471.

Serrano R., López F. J., Hernández F. (1999) *Multiresidue determination of persistent organochlorine and organophosphorus compounds in whale tissues using automated liquid chromatographic clean up and gas chromatographic-mass spectrometric detection.* **J. Chromatogr. A**, **885**: 633- 643.

Smith R. M. (2003). *Review: Before the injection-modern methods of sample preparation for separation techniques.* **J. Chromatogr. A**, **1000**: 3- 27.

T

The British Crop Protection Council and the Royal Society of Chemistry. (1994). **The pesticide manual. A world compendium. Incorporating the agrochemicals handbook.** 10th ed. Edited by Olive Tomlin.

Tolls J., Haller M., Sijm D. T. H. M. (1999). *Extraction and isolation of linear alcohol ethoxylates from fish.* **J. Chromatogr. A**, **839**: 109-117.

Tolls J., Samperi R., and Di Corcia A. (2002). *Bioaccumulation of LAS in Ferat Fish studied by a novel LC-MS/MS method.* **Environ. Sci. Technol.**, **37(2)**: 314-320.

Tsoukali H., Theodoridis G., Raikos N., Grigoratou I. (2005). *Solid phase microextraction gas chromatographic analysis of organophosphorus pesticides in biological samples.* **J. Chromatogr. B**, **822**: 194-200.

W

Walker C. C., Lott H. M., and Barker S. A. (1993). *Review: Matrix solid-phase dispersion extraction and the analysis of drugs and environmental pollutants in aquatic species.* **J. Chromatogr.** **642**: 225- 242.

Webster L. R., McKenzie G. H., Moriaty H. T. (2002). *Organophosphate-based pesticides and genetic damage implicated in bladder cancer.* **Cancer Genet. Cytogenet.**, **133**: 112-117.

Wells D. E., (1993) *Extraction, clean up and recoveries of persistent trace organic contaminants from sediment and biota samples* en D. Barcelo (Editor) **Environmental Analysis. Applications and Quality Assurance.** Elsevier Prentice Publishers. Chapter 3. Pp. 79-107

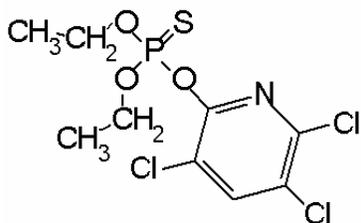
Y

Yague C., Bayarri S., Lázaro R., Conchello P., Ariño A., and Herrera A. (2001). *Multiresidue Determination of organochlorine pesticides and polichlorinated biphenyls in milk by gas chromatography with electron capture detection after extraction by matrix solid-phase dispersion.* **J. AOAC. Int.**, **84(5)**: 1561-1568.

Z

Zhang L., Yuan L., Meng-Xia X, and Yue-Ming Q. (2005). *Simultaneous determination of thyreostatic residues in animal tissues by matrix solid-phase dispersion and gas chromatography-mass spectrometry.* **J. Chromatogr. A**, **1074 (1-2)**: 1-7

Clorpirifos



Nombre común: Clorpirifos (BSI, E-ISO, ANSI, ESA, BAN), clorpirifos((m) F-ISO, JMAF), chlorpyriphos-ethyl ((m)- France).

Nombre IUPAC: O,O-dietil O-3,5,6-tricloro-2-piridil fosforotioato. **Nombre C. A.:** O,O-dietil O-[3,5,6-tricloro-2-piridinil] fosforotioato.

CAS RN [2921-88-2]. **Código de desarrollo:** Dowco 179 **Código Oficial:** OMS 971; ENT 27 311.

PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS. Peso molecular: 350.6. **Fórmula molecular:** C₉H₁₁Cl₃NO₃PS. **Forma:** Cristales incoloros con un ligero olor a mercaptano. **Punto**

de fusión: 42-43.5 °C. **Presión de vapor:** 2.7 mPa (25°C). **Kow:** 50 000. **Solubilidad:** En agua: 1.4 mg/l (25 °C). En benceno 7900, acetona 6500, cloroformo 6300, disulfuro de carbono 5 900, éter etílico 5 100, xileno 5000, isooctanol 790, metanol 450 (todos mg /Kg, 25 °C). **Estabilidad:** La velocidad de hidrólisis incrementa con el pH, y la presencia de cobre y posiblemente otros metales que pueden formar quelatos. DT₅₀ 1.5 d (agua, pH 8, 25 °C) a 100 d (buffer de fosfatos, pH 7, 15 °C)

COMERCIALIZACIÓN. Historia: Insecticida reportado por E. E. Kenga, et al. (*J. Econ. Entomol.*, 1965, 58, 1043). Introducido por Dow Chemical Co. (ahora DowElanco). **Patentes:** US 3244586. **Manufactura:** DowElanco; Excel; Makhteshim-Agan; Sanachem.

APLICACIONES. Modo de acción: Insecticida no sistémico con acción por contacto, digestiva o respiratoria. Inhibidor de la colinesterasa. **Usos:** Control de insectos coleópteros, dípteros, homópteros y lepidópteros en el suelo o en el follaje de una gran variedad de cultivos incluyendo frutas cítricas, nogal, fresas, plátanos, peras, vegetales, papas, betabel, cacahuates, tabaco, cereales, espárragos, maíz, sorgo, alfalfa, algodón, arroz, cultivo ornamental, cultivo de viveros, cultivo forestal, etc.; insectos de suelo; moscas del champiñón; insectos plaga en granjas y de uso doméstico. Tratamiento de productos almacenados. **Fitotoxicidad:** No es fitotóxico para la mayoría de las especies vegetales cuando se emplea como está indicado. Pueden resultar dañadas especies como azaleas, camelias y rosas. **Tipo de formulación:** GR, EC, WP, DP, UL; Micro cápsula. **Compatibilidad:** Incompatible con materiales alcalinos. **Nombre comercial principal:** 'Dursban' (DowElanco). 'Piridane' (Diachem), 'Pyrinex' (Makhteshim-Agan), 'Silrifos' (Siapa), 'Spannit' (Pan Britannica), 'Talon' (FCC), 'Tricel' (Excel). **Mezclas:** [Clorpirifos +] diflubenzuron, cipermetrina, dimetoato, disulfotón, lindano, pirimicarb, thiram.

ANÁLISIS. Análisis por HPLC (CIPAC Handbook, 1985, IC, 2028, *AOAC Methods*, 1990, 981.03). Determinación de residuos por GLC (A. Ambrus et al., *J. Assoc. Off. Anal. Chem*, 1981, 64, 733; *AOAC Methods*, 1990, 985. 22, *Man. Pestic. Residue Anal.*, 1987, I, 6, S8, S9, S13, S19. *Anal. Methods Residues Pestic.*, 1988, Part I, M2, M5, M12)

TOXICOLOGÍA EN MAMIFEROS. Revisiones: *Pesticide residues in food-1982*. FAO Plant Production and Protection Paper, 46, 1983. *Pesticide residues in food -1982 evaluations*. FAO Plant Production and Protection Paper 49, 1983. **LD₅₀ oral:** para ratas 135-163, conejos 1000-2000 mg/Kg. **Piel y ojos:** LD₅₀ aguda percutánea para ratas >2000, conejos c. 2000 mg/Kg. **Inhalación:** LC₅₀ (4-6 h) para ratas >0.2 mg/L de aire (14 ppb). **NOEL** (2 y) basada en la actividad de la colinesterasa en el plasma sanguíneo, para ratas 0.03 y perros 0.01 mg/kg diario. **ADI** (JMPR) 0.01 mg/Kg b. w. (1982). **Clase Toxicológica:** WHO II. EPA II o III. **Otros:** No teratogénico.

ECOTOXICOLOGÍA

Pájaros: LD₅₀ oral aguda 32-102 mg/ Kg para pollo.

Peces: LC₅₀ (96 h) para la trucha arcoiris 0.003 mg/L.

Abejas: Tóxico para las abejas.

Dafnia: EC₅₀ (48 h) 1.7 µg/L.

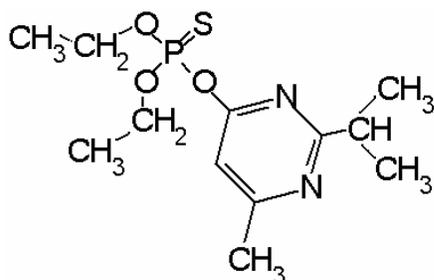
DESTINO AMBIENTAL.

Animales. En ratas, perros y otros mamíferos, después de la administración oral, se lleva a cabo su metabolismo rápidamente, siendo el principal metabolito el 3,5,6-tricloro-2-piridinol. Se excreta en la orina principalmente.

Plantas: No es sistémico en los vegetales, no es absorbido a través de las raíces; los residuos tomados por las plantas son metabolizados rápidamente a 3,5,6-tricloro-2-piridinol el cual es conjugado y secuestrado.

Agua y suelo. En el suelo el clorpirifos es degradado de forma lenta, con una vida media de c. 60 – 120 días, a 3,5,6-tricloropiridin-2-ol, el cual es posteriormente degradado al compuesto organoclorado y a dióxido de carbono.

Diazinón



Nombre común: Diazinón (BSI, E-ISO, (m) F-ISO, ANSI, ESA, BAN, JMAF), *dymplato* (nombre BAN inicial).

Nombre IUPAC: O,O-dietil O-2-isopropil-6-metilpirimidil-4-il fosforotioato.

Nombre C. A.: O,O-dietil O-[6-metil-2-(1-metiletil)-4-pirimidil] fosforotioato. **CAS RN** [333-41-5]. **Código de desarrollo:** G 24 480 **Código Oficial:** OMS 469; ENT 19 507.

PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS. Composición: Grado técnico 95% de pureza. **Peso molecular:** 304.3. **Fórmula molecular:** C₁₂H₂₁N₂O₃PS. **Forma:** Aceite claro incoloro. (El grado técnico es un líquido amarillo). **Punto de ebullición:** 83-84 °C / 0.0002 mmHg; 125°C/1 mmHg. **Presión de vapor:** 1.2

x 10⁻² Pa (25°C) (OECD 104). **Gravedad Específica / Densidad:** 1.116- 1.118 (20 °C). **Kow, Log P:** 3.30 (OECD 107). **Solubilidad:** En agua: 60 mg/l (20 °C) Completamente miscible con la mayoría de los disolventes orgánicos comunes, por ejemplo, éteres, alcoholes, benceno, tolueno, hexano, ciclohexano, diclorometano, acetona, aceite de petróleo. **Estabilidad:** Susceptible a la oxidación por arriba de los 100 °C. Estable en medio neutro pero se hidroliza lentamente en medio alcalino y más rápidamente en medio ácido. DT50 (20 °) 11.77 h (pH 3.1), 185 d (pH 7.4); 6.0 d (pH 10.4). Descompone arriba de los 120 °C

COMERCIALIZACIÓN. Historia: Insecticida reportado por R. Gasser. (Z. Naturforsch. Teil B, 1953, 8, 225). Introducido por J. R. Geigy S. A. (ahora Ciba-Geigy AG). **Patentes:** BE 510817; GB 713278 **Manufactura:** All-India Medical; Atochem; Ciba-Geigy; Drexel, Elf Atochem; Makhteshim-Agan; Nippon Kayaku

APLICACIONES. Modo de acción: Insecticida y acaricida no sistémico con acción por contacto, digestiva o respiratoria. Inhibidor de la colinesterasa. **Usos:** Control de insectos succionadores y trituradores en una gran variedad de cultivos incluyendo los árboles frutales deciduos, frutas cítricas, vinos, olivos, plátanos, peras, vegetales, papas, betabel, caña de azúcar, café, cacao, tabaco, maíz, sorgo, alfalfa, algodón, arroz, cultivo ornamental, cultivo de viveros, cultivo forestal, etc.; insectos de suelo; moscas del champiñón; moscas, piojos, garrapatas, pulgas, cucarachas, chinches, hormigas y otros insectos plaga en granjas y de uso doméstico. El tratamiento de la semilla de maíz, para el control de moscas de la fruta y para darle propiedades repelentes de pájaros. También se usa como ectoparásito veterinario. **Fitotoxicidad:** No es fitotóxico cuando se emplea como está indicado. Pueden formarse manchas café-rojizas en las variedades de manzana amarilla y verde. **Tipo de formulación:** GR, EC, WP, DP, DS, FT, CS, KN; Aerosol, Agente de recubrimiento. **Compatibilidad:** Compatible con muchos otros plaguicidas, pero es incompatible con los compuestos que contienen cobre. **Nombre comercial principal:** 'Basudin' (Ciba-Geigy). 'Dianon' (Nippon Kayaku), 'Diazol' (Makhteshim-Agan). 'Ectoban' (Para uso veterinario) (Agropharm), 'Knox-out' (Elf Atochem). **Mezclas:** [Diazinón +] disulfotón, piretrina, lindano, aceites de petróleo.

ANÁLISIS. Análisis por GLC con FID (CIPAC Handbook, 1980, IA, 1199, *Anal Methods Pestic. Plant Growth Regul.*, 1972, 6, 345; *AOAC Methods*, 1990, 971.08, 982.06) Determinación de residuos por GLC con TID o MCD (ibid., 968.24, 970.33, 970.52; Analyst [London] 1980, 105, 515; *Man. Pestic. Residue Anal.*, 1987, I, 5, 6, 58, 510, 513, 517, 519. *Anal. Methods Residues Pestic.*, 1988, Part I, M2, M5, M12

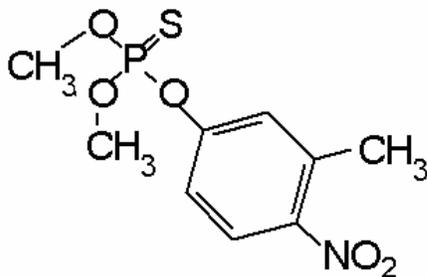
TOXICOLOGÍA EN MAMIFEROS. Revisiones: *Pesticide residues in food*. FAO Plant Production and Protection Paper, in press. *Pesticide residues in food -1993 evaluations. Part II - Toxicology*. World Health Organization, in preparation. **LD₅₀ oral:** para ratas 300-400, ratones 80-135. **Piel y ojos:** LD₅₀ aguda percutánea para ratas >2150, conejos 540 -650 mg/Kg. Irritante ligero para la piel y ojos (conejos). **Inhalación:** LC₅₀ (4 h) para ratas 3.5 mg/L de aire. **NOEL** (90 d) para ratas 0.1 y para perros 0.02 mg/kg diario. **ADI** (JMPR) 0.002 mg/Kg b. w. (1993). **Clase Toxicológica:** WHO II. EPA II o III.

ECOTOXICOLOGÍA. Pájaros: LD₅₀ oral aguda 3.5 mg/ Kg. **Peces:** LC₅₀ (96 h) para la trucha arcoiris 2.6 -3.2 mg/L; carpa 7.6-23.4 mg/L. **Abejas:** Altamente tóxico para las abejas. **Dafnia:** EC₅₀ (24 h) 1.4 mg/L.

DESTINO AMBIENTAL. Animales. Los principales metabolitos son dietil tiofosfato y dietil fosfato. **Plantas** Los estudios con diazinón marcado con ¹⁴ C muestran una absorción y translocación rápida en las plantas. El metabolismo procede mediante la hidrólisis y la posterior transformación y degradación de los derivados de hidroxipirimidina a CO₂.

Agua y suelo. La degradación involucra la oxidación del azufre (formación del diaxozon) y la hidrólisis (J. Pardue et al., J. Agric. Food Chem., 1970, 18, 405-408). DT 50 e. 11-21 d (laboratorio). Diazinón es fácilmente adsorbido fuertemente en el suelo, KOM 332 mg/g o. M. Su movilidad es baja.

Fenitrotión



Nombre común: Fenitrotión (BSI, E-ISO, (m) F-ISO, ESA, BAN), MEP (JMAF). **Nombre IUPAC:** O,O-dimetil O-4-nitro-*m*-tolil fosforotioato. **Nombre C. A. :** O,O-dimetil O-[3-metil-4-nitrofenil] fosforotioato. **CAS RN** [122-14-5]. **Código de desarrollo:** Bayer 41831; S-5660; S1102A (todos para Bayer). **Código Oficial:** OMS 43; OMS 223; ENT 25 715.

PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS. **Peso molecular:** 277.2. **Fórmula molecular:** C₉H₁₂NO₃PS. **Forma:** Líquido aceitoso café claro o café rojizo con un olor característico suave. **Punto de fusión:** 3.4 °C. **Punto de ebullición:** 140-145 °C. **Presión de vapor:** 18 mPa (25°C). **Gravedad específica / densidad:** 1.328 (20 °C). **Kow, Log P:** 3.43 (20 °C). **Punto de ignición:** 188 °C. **Solubilidad:** En agua: 21 mg/L (20 °C). Altamente soluble en alcoholes, ésteres, cetonas, hidrocarburos aromáticos, e hidrocarburos clorados. En hexano 24, isopropanol 128 (g /l, 20 °C). **Estabilidad:** Relativamente estable a la hidrólisis en condiciones normales. DT₅₀. Calculada, 108.8 d (pH 4), 84.5 d (pH 7), 75 d (pH 9) (22 °C).

COMERCIALIZACIÓN. Historia: Insecticida reportado por Y. Nishizawa et al. (*Bull. Agric. Chem. Soc. Jpn.*, 1960, 24, 744; *Agric. Biol. Chem.*, 1961, 25, 605). Introducido por Sumimoto Chemical Co. E independientemente por Bayer AG, y más tarde por American Cynamid Co. (La cual ya no lo manufactura ni lo comercializa). **Patentes:** BE 594669 para Sumimoto; BE 596091 para Bayer. **Manufactura:** All-India Medical; Cheminova; Jin Hung; Rallis India.

APLICACIONES. Modo de acción: Insecticida no sistémico con acción por contacto o digestiva. Inhibidor de la colinesterasa. **Usos:** Control de insectos en cereales, fruta suave, fruta tropical, vinos, arroz, caña de azúcar, vegetales, pastizales y cultivo forestal; también se usa como insecticida para cuidar la salud pública (larvas de mosquito) para control de insectos domésticos; insectos plaga en granjas y en el tratamiento de productos almacenados. **Fitotoxicidad:** No es fitotóxico cuando se emplea como está indicado. Pueden resultar dañadas especies como el algodón y algunas frutas por altas proporciones de aplicación, algunas especies de manzana pueden presentar manchas café-rojizas. **Tipo de formulación:** GR, EC, WP, DP, UL; AL. **Compatibilidad:** Compatible con la mayoría de los insecticidas y fungicidas. Incompatible con los compuestos alcalinos. **Nombre comercial principal:** 'Folithion' (Bayer), 'Sumithion' (Sumimoto), 'Dicofen' (Pan Británica). **Mezclas:** [Fenitrotión +] beta-ciflutrin, triclofon, formotion, tetrametrin, fenpropathrin, fenobucarb, fenvalerato, malation, piperonil butoxido + tetrametrin, permethrin + resmethrin, deltametrin + endosulfan + profenofos.

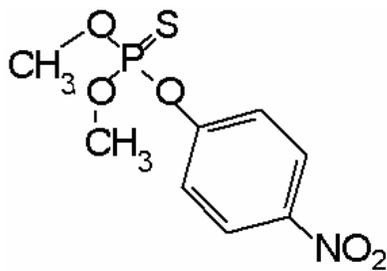
ANÁLISIS. Análisis por GLC con FID (CIPAC Handbook, 1985, IC, 2117, *AOAC Methods*, 1990, 981.07, 989.02) o por el método de Averell & Norris (CIPAC Handbook, 1980, IA, 1255; *FAO Specifications (CP/62)*). Determinación de residuos por GLC (*Pestic. Anal. Manu.*, 1979, I, 201-A, 201-G, 201-H, 201-I. *Anal. Methods Residues Pestic.*, 1988, Part I, M2, M5. *Analyst* [London], 1980, 105, 515; 1985; 110, 765).

TOXICOLOGÍA EN MAMÍFEROS. Reviews: *Pesticide residues in food-1988*. *FAO Plant Production and Protection Paper*, 92, 1988. *Pesticide residues in food -1988 evaluations. Part II - Toxicology. FAO Plant Production and Protection Paper* 93/2. **LD₅₀ oral:** para ratas 1700 mg/Kg. **Piel y ojos:** LD₅₀ aguda percutánea para ratas 810 mg/Kg. **Inhalación:** LC₅₀ (4 h) para ratas >2210 mg/m³. **NOEL** (2 años) para ratas 10 y (1 años) perros 50 mg/kg dieta. **ADI** (JMPR) 0.005 mg/Kg b. w. (1988). **Clase Toxicológica:** WHO II. EPA II.

ECOTOXICOLOGÍA. Pájaros: LD₅₀ oral aguda 1192 mg/ Kg para patos. **Peces:** LC₅₀ (48 h) para carpa 4.1 mg/L. **Abejas:** Tóxico para las abejas.

DESTINO AMBIENTAL. Animales: El fenitrotión es rápidamente secretado en la orina y las eses. Después de 3 días, c. 90% ha sido excretado por ratas, ratones y conejos. Los metabolitos más importantes son dimetilfenilnitrooxon y 3-metil-4-nitrofenol. **Plantas:** El fenitrotión es aplicado en los bosques y se degrada con DT₅₀ 4 d; 70-85% se degrada en 2 semanas. Los metabolitos principales son 3-metil-4-nitrofenol, el análogo oxigenado y sus productos de descomposición desmetilfenitrotion, ácido dimetilfosforotíonico y el ácido fosforotíonico **Agua y suelo.** DT₅₀ 12-28 días en la superficie y 4-20 días a mayor profundidad. Los metabolitos principales en la superficie son 3-metil-4nitrofenol y CO₂, mientras que a mayor profundidad es aminofenitrotión.

Paratión-metil



Nombre común: Paratión-metil (BSI, E-ISO, (m) F-ISO, metil paratión (ESA, JMAF), metaphos (USSR) **Nombre IUPAC:** O,O-dimetil O-4-nitrofenil fosforotioato. **Nombre C. A.:** O,O-dimetil O-[4-nitrofenil] fosforotioato. **CAS RN** [298-00-0]. **Código de desarrollo:** E-120; BAY 11405. **Código Oficial:** OMS 213; ENT 17 292.

PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS. **Peso molecular:** 263.2. **Fórmula molecular:** C₈H₁₀NO₃PS. **Forma:** Cristales incoloros inodoros (técnico, líquido oscuro). **Punto de fusión:** 35-36 °C. **Punto de ebullición:** 154 °C/ 136 Pa. **Presión de vapor:** 0.2 mPa (20°C). **Gravedad específica / densidad:**

1.358 (20 °C), técnico, 1.20-1.22. **Kow, Log P:** 3.0. **Punto de ignición:** >150 °C. **Solubilidad:** En agua: 55 mg/l (20 °C). Altamente soluble en los disolventes orgánicos comunes como el diclorometano, tolueno >200, hexano 10-20 (g /l, 20 °C). Ligeramente soluble en éter de petróleo y algunos tipos de aceite mineral. **Estabilidad:** Se hidroliza en medio ácido o alcalino. DT₅₀. (25 °C) 68 d (pH 5), 40 d (pH 7), 33 d (pH 9). Se isomeriza bajo calentamiento al análogo O, S-dimetil. Fotodegradación en la luz.

COMERCIALIZACIÓN. Historia: Insecticida reportado por G. Schader. (*Angew. Chem. Monograph. No. 52 (2nd ed), 1952.*). Introducido por Bayer AG. **Patentes:** DE 814142. **Manufactura:** Bayer; Cheminova; Rallis India; Velpol.

APLICACIONES. Modo de acción: Insecticida no sistémico con acción por contacto, digestiva o respiratoria. Inhibidor de la colinesterasa. **Usos:** Control de insectos succionadores o trituradores en una gran variedad de cultivos, incluyendo cereales, frutas, vid, vegetales, cultivo forestal, ornamental y agrícola. **Fitotoxicidad:** No es fitotóxico cuando se emplea como está indicado. Pueden resultar dañadas especies como la alfalfa, sorgo, ciertas variedades de manzana, durazno, rosas y otras plantas ornamentales. **Tipo de formulación:** EC, WP, DP, UL; CS. **Compatibilidad:** Compatible con la mayoría de los plaguicidas. Incompatible con los compuestos alcalinos. **Nombre comercial principal:** 'Folidol-M' (Bayer), 'Metacide' (Bayer), 'Cekumethion' (Cequisa), 'Fostox metil' (Siapa), 'Penncap-M' (Elf Atochem). **Mezclas:** [Paratión metil +] paratión; endosulfan; monocrotofos; dicofol; dicofol + sulfur; lindano; carbofenotion + sulfur; fenson; fosalone; tetradifon; ometoato; dicofol + etion; cipermetrina; propargita; sulfur + acetite de petróleo.

ANÁLISIS. Análisis por GLC (CIPAC Handbook, 1985, IC, 2169, *AOAC Methods*, 1990, 977.04, 980.11) o por HPLC (ibid., 977.05 y 1B, 1879) o por hidrólisis hasta 4-nitrofenol el cual se determina colorimétricamente (CIPAC Handbook, 1970, 1, 568; 1980, 1A, 568) Determinación de residuos por GLC (Man. Pestic. Residue Anal., 1987, I, 3, 5, 6, S (S13, S17, S19; *Anal. Methods Residues Pestic.*, 1988, Part I, M2, M5. *AOAC Methods*, 1990, 968.24, 970.52, 970.53).

TOXICOLOGÍA EN MAMÍFEROS. Revisiones: *Pesticide residues in food-1984*. FAO Plant Production and Protection Paper, 62, 1985. *Pesticide residues in food -1984 evaluations. FAO Plant Production and Protection Paper 67, 1985.* **LD₅₀ oral:** para ratas 6 mg/Kg. **Piel y ojos:** LD₅₀ aguda percutánea para ratas 45 mg/Kg. **Inhalación:** LC₅₀ (4 h) para ratas 0.17 mg/L aire (aerosol). **NOEL** (2 años) para ratas 2 y (1 año) perros 50 mg/kg dieta. **ADI** (JMPR) 0.02 mg/Kg b. w. (1988). **Clase Toxicológica:** WHO I. EPA I.

ECOTOXICOLOGÍA

Pájaros: LD₅₀ oral aguda 1044 mg/ Kg para patos.

Peces: LC₅₀ (48 h) para trucha arcoiris 2.7 mg/L.

Abejas: Tóxico para las abejas.

DESTINO AMBIENTAL. Animales: Después de la administración oral el metil paratión es casi completamente excretado en la orina dentro de las siguientes 24 horas. Los metabolitos principales en el hombre son 4-nitrofenol y dimetil fosfato. **Plantas:** Los principales metabolitos formados en las plantas son p-nitrofenol glucopiranosido y P-S demetil paratión metil. **Agua y suelo.** De acuerdo al valor de Koc y a los estudios de lixiviación, el metil paratión puede clasificarse como un compuesto con movilidad de media a baja. En los suelos biológicamente activos, el metil paratión es degradado rápidamente. Como para los fosforotioatos, en general, el metabolismo es mediante la oxidación al fosfato, la desmetilación de los grupos ester, y la hidrólisis al ácido fosforotiónico, ácido fosfórico, y 4-nitrofenol.

Tomado de: The British Crop Protection Council and The Royal Society of Chemistry, 1994.

