



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

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

**“DETERMINACIÓN DE RESIDUOS DE PLAGUICIDAS POR
MICRO-EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA-CROMATOGRFÍA DE
GASES/ESPECTROMETRÍA DE MASAS”**

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Q. A. SUSANA IVETT MARTÍNEZ SÁMANO

TUTOR: M. en C. FRANCISCO ROJO CALLEJAS

AÑO: 2008





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

A la Universidad Nacional Autónoma de México por la educación de excelencia y gratuita otorgada.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para el desarrollo de este proyecto de investigación y realizar mis estudios de Maestría en Ciencias Químicas.

Al M. en C. Francisco Rojo por la confianza, tiempo y conocimientos compartidos durante la realización de este trabajo.

A mis sinodales por su tiempo dedicado y comentarios en la revisión de este trabajo.

Al maestro Adolfo García por compartir sus conocimientos, apoyo y amistad.

A quiénes fueron, son y serán mis amigos, por su apoyo, fuerza y esperanza en los momentos más divertidos y no tan divertidos de ésta y otras etapas de mi vida.

Y sobre todo a mi familia: a mis padres por su eterno apoyo y comprensión en cada nueva etapa de mi vida. A mis hermanos por su compañía.

A mi madre.

A los seres que se fueron a un lugar con más luz.

A todos aquellos que forman parte de mi corazón por sus palabras, brazos y manos extendidas, que han llenado mi vida de fuerza y esperanza.

Esta tesis fue realizada en el Laboratorio 102 del Departamento de Química Analítica de la División de Estudios de Posgrado, Edificio "B", Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México

ÍNDICE

	<i>Página</i>
GLOSARIO DE ABREVIATURAS	I
RESUMEN	III
INTRODUCCIÓN	IV
1. ANTECEDENTES	
1.1. Plaguicidas organofosforados	
1.1.1. Generalidades.	1
1.1.2. Características fisico-químicas	1
1.1.3. Toxicología.	3
1.2. Análisis de plaguicidas.	6
1.3. Micro-extracción en fase sólida.	8
1.3.1. Fundamento	9
1.3.2. Tipos de extracción	9
1.3.3. Fibras	11
1.3.4. Procedimiento	13
1.3.5. Optimización del proceso de Micro-extracción en fase sólida	14
1.3.6. Aplicación de la Micro-extracción en fase sólida en el análisis ambiental	18
1.3.6.1. Análisis de plaguicidas organofosforados	19
1.4. Cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG/EM)	21
2. OBJETIVOS	24
3. DESARROLLO EXPERIMENTAL	
3.1. Reactivos.	25
3.2. Muestras.	26
3.3. Aparatos y material de vidrio	26
3.4. Instrumentos	26
3.5. Condiciones óptimas de separación en CG/MS	26
3.6. Condiciones óptimas de extracción	27
3.6.1. Selección de la fibra y velocidad de agitación	28

3.6.2. Tiempo de extracción	28
3.6.3. Tiempo de desorción	28
3.7. Linealidad	29
3.8. Precisión	29
3.9. Límite de detección y de cuantificación	29
3.10. Recobro	29
3.11. Análisis de muestras	30
4. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS	
4.1. Condiciones óptimas de separación en CG/MS	32
4.2. Condiciones óptimas de extracción	
4.2.1. Selección de la fibra	35
4.2.2. Selección de la velocidad de agitación.	37
4.2.3. Tiempo de extracción	38
4.2.4. Tiempo de desorción	39
4.3. Linealidad	41
4.4. Precisión	43
4.5. Límite de detección y de cuantificación	44
4.6. Recobro	44
4.7. Análisis de muestras	46
5. CONCLUSIONES	53
6. APENDICES	54
7. BIBLIOGRAFÍA	66

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

CAR	Carboxen
CAR/PDMS	Carboxen/polidimetilsiloxano.
CL	Cromatografía de Líquidos
CV	Coefficiente de variación
CW/DVB	Polientilenglicol/divinilbenceno
CW/TPR	Polietilenglicol/resina templada
EPA	Environmental Protection Agency, USA
fg	Femtogramo = 10^{-15} g
GC	Cromatografía de Gases, por sus siglas en inglés (Gas Chromatography)
GC/ECD	Cromatografía de Gases con detector de captura de electrones, por sus siglas en inglés (Electron capture detector).
GC/MS	Cromatografía de Gases acoplada a espectrometría de masas, por sus siglas en inglés (Gas Chromatography/Mass Spectrometry).
GC/MS-SIM	Cromatografía de Gases acoplada a espectrometría de masas con monitoreo selectivo de iones, por sus siglas en inglés
GC/FID	Cromatografía de Gases con detector de ionización de flama, por sus siglas en inglés (Flame Ionization Detector)
GC/NPD	Cromatografía de Gases con detector de nitrógeno(N)-fosforo(P)
HPLC	Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia, por sus siglas en inglés (High Performance Liquid Chromatography)
HPLC/MS	Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia acoplada a espectrometría de masas.
HPLC/UV-VIS	Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia acoplada a un detector ultravioleta visible
IC	Intervalo de confianza
log P _{ow}	Coefficiente de reparto agua-octanol
LD	Límite de Detección
LC	Límite de cuantificación
LLE	Extracción Líquido-Líquido, por sus siglas en inglés (Liquid-liquid extraction)
LSE	Extracción Líquido-Sólido, por sus siglas en inglés (Liquid-solid extraction)
min	Minutos
mL	Mililitros = 10^{-3} L
MS	Espectrometría de masas, por sus siglas en inglés (Mass spectrometry)
ng	Nanogramos = 10^{-9} g
PA	Poliacrilato
PDMS	Polidimetilsiloxano
PDMS/DVB	Polimetilsiloxano/divinilbenceno
pg	Picogramos = 10^{-12} g
rpm	Revoluciones por minuto

SCAN	Barrido total de iones
SIM	Monitoreo selectivo de iones, por sus siglas en inglés (Selected ion monitoring)
SPE	Extracción en fase sólida, por sus siglas en inglés (Solid phase extraction)
SPME	Micro-extracción en fase sólida, por sus siglas en inglés (Solid phase microextraction)
SPME-HPLC	Acoplamiento Micro-extracción en fase sólida con Cromatografía de Líquidos de Alta eficiencia
SPME/DE	Micro-extracción en fase sólida Extracción Directa, por sus siglas en inglés (Direct extraction)
SPME/HS	Micro-extracción en fase sólida/Headspace
SPME/MP	Micro-extracción en fase sólida/Extracción Protegida con Membrana, por sus siglas en inglés (Membrane-protected)
tr	Tiempo de retención

RESUMEN

En este trabajo se desarrolló un método por Micro-extracción en fase sólida en el modo de extracción directa-Cromatografía de gases/Espectrometría de masas para la cuantificación de plaguicidas organofosforados en agua.

Se llevó a cabo la optimización tanto de las condiciones de separación en el sistema cromatográfico, así como en la técnica de extracción. Para realizar la Micro-extracción en fase sólida en modo de extracción directa (SPME-Extracción directa) se utilizó una fibra de PDMS-DVB, la cual no es de uso común para extraer plaguicidas organofosforados, agitación a 800 rpm y extracción a temperatura ambiente (25 ± 2 °C) durante 40 min. La cuantificación se realizó por CG/EM e identificando cada compuesto mediante la comparación con sus estándares y su espectro de masas con la base de datos del NIST (*Nacional Institute of Standard and Technology*)

El método desarrollado presentó linealidad y precisión aceptables en el intervalo de concentración de 0.5 a 5 ng/mL y de 5 a 50 ng/mL en agua pura (ASTM Tipo "I") y agua potable, para los plaguicidas organofosforados (malatión, paratión y EPN) con coeficientes de correlación (r^2) mayores a 0.99, así como límites de detección y cuantificación aceptables.

El recobro es mayor al 90% para agua pura (ASTM Tipo "I") y mayor al 50 % tanto para agua potable como las muestras analizadas.

Se analizaron 15 muestras de diferentes zonas de La Reserva de la Biosfera Chamela-Cuitzmala, en las cuáles no se encontró la presencia de los analitos en estudio. La metodología para la determinación de los plaguicidas organofosforados (malatión, paratión y EPN) propuesta en este trabajo es sencilla, comparada con métodos clásicos como la extracción líquido-líquido o extracción en fase sólida; el número de operaciones es mucho menor, no se consumen solventes y el tiempo de análisis neto por muestra es corto

INTRODUCCIÓN

A nivel mundial, miles de productos químicos son usados diariamente y nuevos productos son sintetizados cada año. La mayoría de ellos son generados por actividades agrícolas, por el tratamiento de residuos urbanos y por otras actividades antropogénicas. Entre estos compuestos se encuentran los plaguicidas, algunos plastificantes de uso muy común como el bisfenol A y los ftalatos, compuestos organoclorados, compuestos fenólicos e hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs), entre muchos otros. La mayoría de estos compuestos han sido detectados tanto en aguas superficiales como subterráneas, lo que ha incrementado la preocupación sobre el impacto en el medio ambiente así como en la salud de personas y animales.

En México se han usado plaguicidas agrícolas desde el Siglo XIX, pero la aplicación intensiva de plaguicidas sintéticos se inició en el país hacia 1948, con la introducción del DDT y, posteriormente, de otros plaguicidas organoclorados. Después se agregaron diversos organofosforados, carbamatos y una gran variedad de herbicidas y fungicidas [Botello, 2005]. Después de casi cuarenta años surgieron agrónomos más conscientes de los problemas asociados a estos productos para el ambiente y para la salud de los aplicadores y consumidores.

El uso de plaguicidas es mayor en los estados del noroeste del país, dado que el producto agrícola está destinado a la exportación; sin embargo los estados del sur y el centro del país han seguido esta tendencia. Las regiones con mayor uso de plaguicidas son: Sinaloa, Chiapas, Veracruz, Jalisco-Nayarit-Colima, Sonora-Baja California, Tamaulipas, Michoacán, Tabasco, Estado de México y Puebla-Oaxaca. En dichas entidades, se calcula que se aplican el 80 % de total de plaguicidas usados en el país, lo que comprueba que el uso de plaguicidas tiene una fuerte concentración en algunas regiones y algunos cultivos; aunque esto varía según el cultivo, en términos generales los plaguicidas de mayor uso son los herbicidas, seguidos de insecticidas y fungicidas. Así, los herbicidas ocupan los primeros lugares de mayor venta; entre ellos, destacan paraquat y glifosato. Entre los insecticidas, los más usados son los organofosforados, en especial, paratión metílico, metamidofós y malatión. También tienen importancia algunos fungicidas como mancozeb y clorotalonil [Albert, 2005].

El agua es un recurso natural indispensable para la vida; no obstante, el progreso y los avances tecnológicos han llevado a producir miles de productos químicos con diferentes propósitos que han favorecido a mejorar la calidad de vida aunque, por otra parte, son introducidos directa o indirectamente en el agua causando problemas de contaminación. Así pues, su análisis es muy importante para asegurar y mantener la calidad necesaria para que su utilización no represente peligro a la salud de los seres vivos.

Por lo anterior, este trabajo tiene como objetivo optimizar las condiciones de extracción de plaguicidas organofosforados como malatión, paratión y EPN, utilizando la Micro-Extracción en Fase Sólida, que permite preconcentrar sin uso de disolventes orgánicos, minimizando la manipulación de las muestras, asimismo permite disminuir los límites de detección hasta el orden de ng/L [Pawliszyn, 1997 y Pawliszyn, 1999]. Para los estudios cualitativos y cuantitativos por dicha técnica de extracción se aplica la técnica instrumental Cromatografía de Gases acoplada a un Espectrómetro de Masas (GC/MS). Además el método se evalúa en cuanto a linealidad, precisión, recobro, límites de detección y de cuantificación. La matriz empleada es agua, por ser una matriz relativamente sencilla y como primera etapa en el desarrollo de metodologías para otro tipo de muestras como suelo y sedimento, así como muestras biológicas.

El método propuesto fue probado utilizando muestras provenientes de los humedales de La Reserva de la Biosfera Chamela-Cuitzmala. Esta zona es una de las regiones más importantes del país; la reserva protege ambientes acuáticos y terrestres, principalmente las selvas caducifolias y es uno de los ecosistemas mejor estudiados y en donde se evalúa el impacto de diferentes modos de uso de la tierra, entre los que se encuentra el uso agrícola [López, 2008]. Al tratarse de una zona protegida se busca regular el uso de sustancias químicas como los plaguicidas, con el fin de mantener la integridad de esta reserva en relación a la flora, fauna y sistemas acuáticos. Además es una zona con efluentes que se unen con aquellos que provienen de zonas dedicadas a los cultivos de exportación como las mencionadas anteriormente y por ello puede efectuarse el transporte de sustancias químicas empleadas en esas zonas [Bonilla, 2007].

ANTECEDENTES

1. 1. PLAGUICIDAS ORGANOFOSFORADOS

1.1.1. Generalidades

Los plaguicidas organofosforados son utilizados para controlar las plagas, que atacan los cultivos y para eliminar insectos que actúan como vectores de enfermedades. Estos compuestos se desarrollaron durante la Segunda Guerra mundial para sustituir a la nicotina en el control de áfidos [CICOPLAFEST, 2004].

La primera molécula sintetizada fue el tetraetilpirofosfato, era muy efectivo como insecticida, pero poco apropiada para su uso agrícola debido a su rápida degradación en el medio ambiente, inconveniente que se resolvió con la introducción del paratión y su análogo oxigenado el paraxón. A partir de los 80's, el paratión se convirtió en el organofosforado más utilizado en todo el mundo.

Los plaguicidas organofosforados se aplican en formulaciones que contienen aditivos y adyuvantes como surfactantes, aceites, emulsificantes y sales para incrementar su efectividad, adsorción, transmisión, inmovilización y desintoxicación. Entre 1945 y 1955 se introdujeron al mercado, pero en la actualidad son los plaguicidas de mayor uso debido a que son aceptados por su especificidad, rápida degradación después de la aplicación, acumulación esporádica en la cadena trófica y bajo potencial carcinogénico [CICOPLAFEST, 2004].

1.1.2. Características fisico-químicas

Los plaguicidas organofosforados son ésteres orgánicos del ácido fosfórico, se reconocen compuestos diferentes que pueden clasificarse en base al tipo de grupo funcional que sustituye a uno o más átomos de hidrógeno (*Figura. 1*). Las características de cada grupo pueden variar de manera sustancial y le confiere la especificidad para reaccionar contra un tipo de organismo u otro [Hassall, 1990].

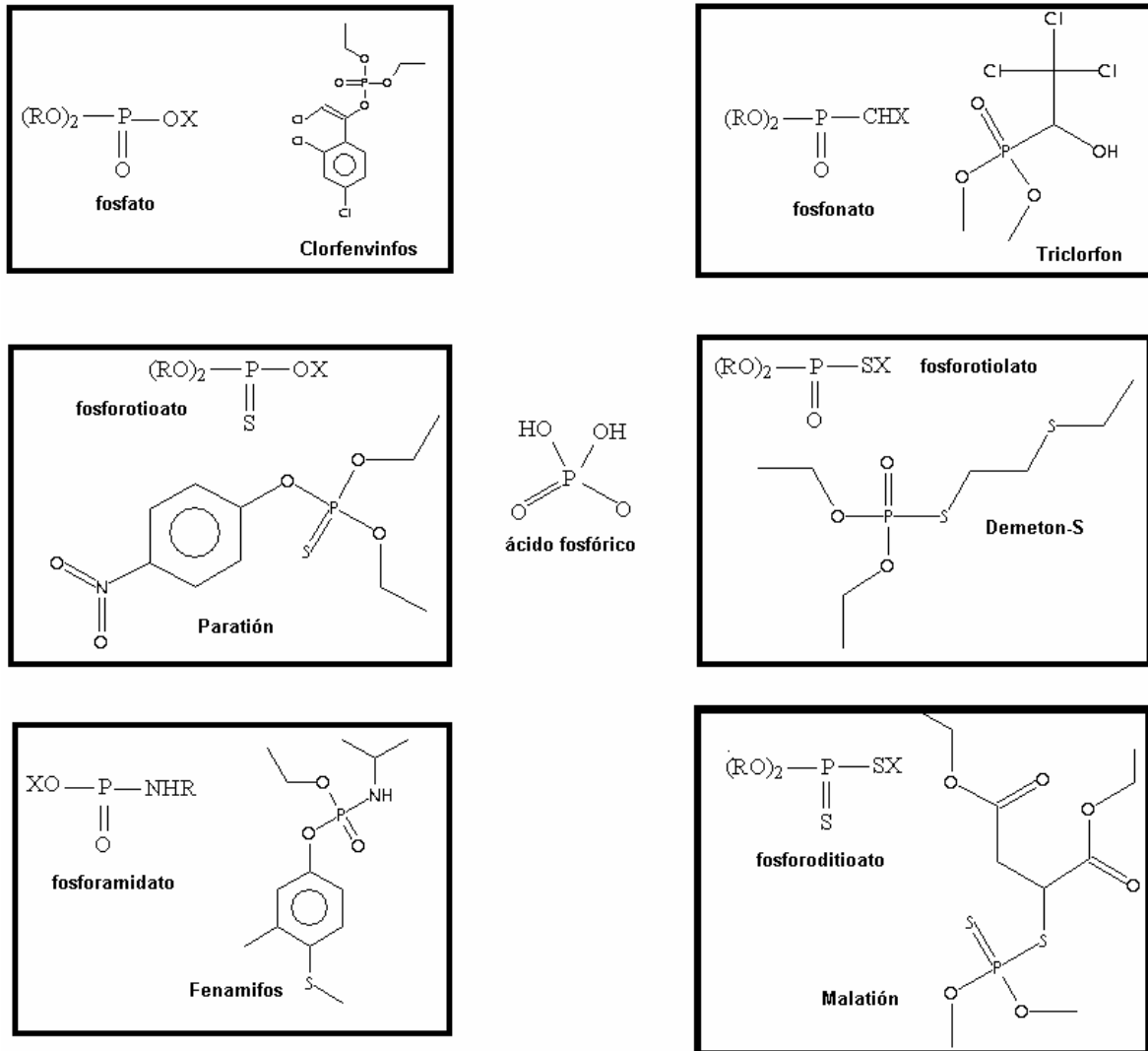


Figura 1. Estructuras básicas de los plaguicidas organofosforados [Hassall, 199].

Los compuestos pertenecientes a este grupo de plaguicidas, dadas las diferencias en cuanto a estructura, presentan gran diversidad en características como polaridad, solubilidad en agua, presión de vapor, coeficiente de reparto agua-octanol, ionización ácido-base y vida media (Tabla 1). Estos ésteres fosforados, como cualquier otro éster, se hidrolizan en mayor o menor proporción, dependiendo de su estructura química. El fragmento fosfato, tio o ditioposfato de la molécula le imparte algo de polaridad y por tanto tienen diferentes grados de liposolubilidad. La solubilidad, movilidad y volatilidad de los

plaguicidas en el ambiente dependen en su mayoría de sus constantes de ionización ácido-base (pK_a); 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 $\log P_{ow}$), como indicador del grado de hidrofobicidad del plaguicida y su tendencia a la acumulación en agua, organismos, suelo y sedimentos. La clasificación general para indicar la polaridad de los plaguicidas es: si los valores de $\log P_{ow}$ son mayores a 4, son no polares o liposolubles, mientras que si $\log P_{ow}$ son menores de 3, los compuestos son polares o no liposolubles. Los valores que se tienen entre 3-4 se consideran compuestos moderadamente polares. En general, los plaguicidas organofosforados pueden clasificarse como compuestos de polaridad media o baja, aunque varía de acuerdo a su estructura [Noble, 1993].

1.1.3. Toxicología

Estos compuestos se absorben por inhalación, ingestión y vía cutánea. El mecanismo de acción es por inhibición de la actividad de la acetilcolinesterasa; el fenómeno ocurre en las sinapsis nerviosas, en donde el neurotransmisor acetilcolina actúa sobre la membrana post-sináptica a la que despolariza. De esta manera, excita a las células efectoras: glándula, fibras musculares lisas, fibras musculares estriadas y a otras neuronas. Por lo tanto, se genera gran cantidad de impulsos a las células efectoras y esta estimulación continua causa las manifestaciones de esta intoxicación:

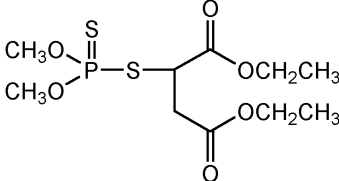
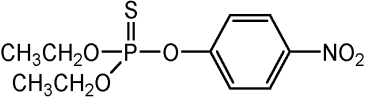
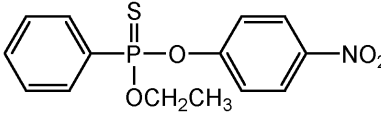
- a) Síndrome muscarínico: vómito, sudoración profusa, diarrea, salivación excesiva, lagrimeo y abundante secreción bronquial; característicamente, las pupilas están contraídas “como punta de alfiler” (miosis). Estos síntomas son causados por estimulación de las glándulas y fibras musculares lisas.
- b) Síndrome nicotínico: calambres de los músculos abdominales y de las extremidades, temblores y trastornos del ritmo cardíaco, debido a la acción sobre las fibras musculares estriadas: y
- c) Síndrome neurológico: irritabilidad, conducta psicótica, pérdida brusca de la conciencia y convulsiones. La muerte ocurre por depresión respiratoria, edema pulmonar o bradicardia extrema. Dichos síntomas dados por la sobre estimulación de otras neuronas.

Algunos compuestos organofosforados tienen efectos diferentes a los mencionados anteriormente, tal es el caso del dimetoato que se caracteriza por tener un efecto tardío: prácticamente no hay síntomas muscarínicos y, después de una aparente mejoría, aparecen síntomas acentuados de neuropatía periférica. Al igual que el dimetoato, el paratión etílico y el metílico, después de una mejoría aparente, pueden causar manifestaciones agudas caracterizadas por paresia de los músculos de la respiración, debilidad de los músculos faciales, del paladar y de las extremidades inferiores, con alteraciones electromiográficas que muestran alteración de la transmisión neuromuscular. El primer síndrome de neurotoxicidad tardía se ha relacionado con la inhibición de una estearasa diferente a la acetilcolinesterasa. Para el caso del paratión y el malatión, la causa aun no esta clara. Por su diferencia con el anterior, a este efecto tardío se le ha llamado “síndrome intermedio” [CICOPLAFEST, 2004].

En caso de intoxicación, se utilizan como antídotos específicos oximas. La obidoxima (toxogonin) y la pralidoxima (protopam) actúan reactivando la acetilcolinesterasa inhibida, lo que ocurre lentamente, por lo que su empleo debe ser simultáneo a la atropina. Ambos están disponibles en nuestro país. Se administran por vía intravenosa en dosis de 25 a 50 mg/kg en niños y 1 g en adultos (dosis total), en forma lenta, durante 50 minutos (la administración rápida puede causar espasmo laríngeo) cada 6 a 8 horas. Se administran, por goteo endovenoso, dosis subsecuentes similares por un mínimo de 48 horas (“intervalo crítico”).

La gravedad de la intoxicación por organofosforados obliga a su sospecha clínica y manejo médico inmediato. En ningún caso se debe esperar a obtener la cuantificación de colinesterasa para iniciar el tratamiento de estos pacientes. Cuando el estudio es factible, es útil para ratificar el origen de la intoxicación; el seguimiento permite valorar la efectividad del tratamiento. Cualquiera que sea la técnica empleada para la cuantificación, la actividad de la colinesterasa proporciona datos de inhibición de la enzima; en los casos graves es común encontrar cifras de cero. La reactivación se inicia con el empleo de las oximas.

Tabla 1. Propiedades generales de los plaguicidas en estudio [Noble, 1993; Ruberson, 2001; Barbera, 1989; Tomblin, 1994])

COMPUESTO	Log P _{ow}	SOLUBILIDAD	ESTABILIDAD	ESTRUCTURA
Monocrotofos	0.6	Miscible en agua. Soluble en acetona y etanol	Vida media (20°C): 96 días (pH 5), 66 días (pH 7) y 17 días (pH 9). Descomposición a 38 °C, sensible a la luz. Almacenar a 4 °C y ambiente seco.	$\begin{array}{c} \text{O} \quad \text{CH}_3 \quad \text{O} \\ \parallel \quad \quad \parallel \\ (\text{CH}_3\text{O})_2\text{P}-\text{OC}=\text{CHCNHCH}_3 \end{array}$ <p>223.16 g/mol</p>
Dimetoato	0.8	Escasamente soluble en agua. Soluble en muchos solventes orgánicos, excepto hidrocarburos saturados.	Estable en disolución acuosa pH 2-7; hidrolizado en disoluciones alcalinas. Es fotosensible, su vida media es mayor a 175 días a pH 5. Descomposición por calentamiento.	$\begin{array}{c} \text{S} \quad \quad \text{O} \\ \parallel \quad \quad \parallel \\ (\text{CH}_3\text{O})_2\text{PSCH}_2\text{CNHCH}_3 \end{array}$ <p>229.26 g/mol</p>
Malatión	2.9	Ligeramente soluble en agua, soluble en varios solventes orgánicos.	Inestable a pH mayor a 7 o pH menor a 5	 <p>330.36 g/mol</p>
Paratión	3.8	Prácticamente insoluble en agua. Ligeramente soluble en alcoholes, ésteres, cetonas, hidrocarburos aromáticos.	Inestable en disoluciones con pH mayor a 7.5. Se hidroliza en agua, en condiciones alcalinas. La vida media de 260 días a pH 7, 272 días a pH 4 y 130 días a pH 9 (22°C)	 <p>291.26 g/mol</p>
EPN	3.8	Prácticamente insoluble en agua. Soluble en benceno, tolueno, acetona, isopropanol y metanol	Estable en disoluciones neutras y medio ácido, pero se hidroliza en condiciones alcalinas.	 <p>323.21 g/mol</p>

1. 2. ANÁLISIS DE PLAGUICIDAS

La contaminación del agua por plaguicidas provenientes de actividades agrícolas es un tema que ha preocupado por mucho tiempo. Los plaguicidas organoclorados son caracterizados por su toxicidad y persistencia en el ambiente; y otros plaguicidas como los organofosforados por su mal uso y sus salidas. Por esta razón, la presencia de plaguicidas en aguas para consumo humano y agrícola es regulada, estableciéndose concentraciones máximas para cada pesticida [Berceiro-González, 2007]. Cada país tiene una institución en materia de Agricultura y Sanidad la cual se encarga de la regulación de los residuos de plaguicidas y su control; en México la *Secretaría de Salud*, la *Secretaría de Agricultura y Recursos Naturales (SEMARNAT)* y la *Comisión Federal para la protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS)*, mientras que en otros países como los europeos, la *Legislación de la Comunidad Europea (CE)*. En Estados Unidos, y también a nivel mundial se tiene como referencia a la *Environmental Protection Agency (EPA)* y a la *Food and Agriculture Organization (FAO/WHO)*.

Actualmente, se requiere de niveles de detección analítica de los contaminantes ambientales cada vez más bajos (ng, pg ó fg), estos niveles requieren del desarrollo de métodos con bajos límites de detección (LD), simples, rápidos y de bajo costo para detectar y cuantificar estos contaminantes no solo en el agua, sino en otras muestras ambientales como el suelo, fluidos biológicos y productos agrícolas.

El análisis de compuestos traza como los plaguicidas en muestras ambientales requiere de la aplicación de procedimientos de preparación de muestras adecuados. En general, el análisis consiste en varias etapas, las cuales podemos enumerar como sigue:

- a) Pre-tratamiento de la muestra: para garantizar el tamaño y forma adecuada, por ejemplo algunos vegetales deben ser cortados o molidos.
- b) Extracción: mediante distintas técnicas se puede obtener al o los analitos de la muestra, obteniéndose un extracto crudo.
- c) Limpieza: después de realizar la extracción es posible que todavía se tengan interferencias para la determinación del analito obteniendo un extracto purificado, o bien las técnica de análisis instrumental requieren de tener un extracto totalmente

libre de interferencias que puedan alterar parte de su instrumentación, por ejemplo columnas en Cromatografía de Gases o HPLC. También es posible realizar una concentración en este paso, dado que al eliminar las interferencias sólo nos quedamos con el analito de nuestro interés.

- d) Determinación: después de obtener el extracto purificado, se realiza el análisis instrumental por alguna técnica analítica como Cromatografía de Gases, Cromatografía de líquidos y Electroforésis Capilar las cuales son de las técnicas más utilizadas.
- e) Resultados analíticos: al obtener resultados, se realizan cálculos para determinar Límites de detección (LD) y de cuantificación (LC), porcentajes de recobro (R) y coeficientes de variación (CV)

La preparación de la muestra es uno de los pasos críticos un muchos procesos analíticos. El principal problema se encuentra durante la separación de los analitos en estudio desde la matriz ambiental, esto causa extracciones ineficientes, pérdida de analitos y por lo tanto concentraciones bajas en los extractos. El desarrollo de procedimientos de extracción y preconcentración son importantes en las determinaciones analíticas de compuestos a nivel de trazas, por lo que han sido estudiados en las décadas recientes [Picó, 2003]

Los procesos de extracción, limpieza y concentración pueden realizarse mediante extracción líquido-sólido (Extracción Soxhlet o LSE, por sus siglas en inglés), extracción líquido-líquido (LLE, por sus siglas en inglés) o extracción en fase sólida (SPE, por sus siglas en inglés y dependiendo de el tipo de matriz puede utilizarse una o varias técnicas. La LSE y LLE son técnicas muy utilizadas en los métodos de *United States Environmental Protection Agency* (US EPA) pero tienen como inconveniente el uso de cantidades grandes de solventes que a menudo son tóxicos y flamables, sobre todo la LLE, además de que los tiempos de análisis son largos. La SPE consume menos solventes y tiempo de análisis en comparación con la LLE; no obstante, tiene como “desventaja” que en ocasiones se requiere de solventes tóxicos para la elución de los analitos. También se emplea la extracción por líquido presurizado (PLE, por *pressurized liquid extraction*) en una técnica en la cual se combina la temperatura elevada y la alta presión, utiliza menor cantidad de

solventes que la LLE [Beltran, 2000 y Hildebrandt, 2007] y también emplea menor tiempo de análisis. La Micro-extracción en fase sólida (SPME, por sus siglas en inglés *Solid phase microextraction*) tiene algunas ventajas sobre las técnicas de extracción convencionales, como LLE o SPE anteriores, como el nulo uso de solventes, lo cual minimiza el costo de solventes de alta pureza, fácil y rápida de usar, y se emplean volúmenes de muestra pequeños [Aguilar, 1998] además, la Cromatografía de Gases (GC) y la Cromatografía de Líquidos (HPLC), son las técnicas instrumentales más utilizadas para el análisis de residuos de plaguicidas en muestras ambientales, empleando como técnicas de preparación a las antes mencionadas [Beltran, 2000].

1. 3. MICRO-EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA

La Micro-extracción en fase sólida (SPME) fue empleada por primera vez por Pawliszyn y colaboradores en 1990. Ésta técnica analítica consiste en dos procesos: una extracción y pre-concentración de los analitos a partir de diferentes muestras. En primera instancia, una fibra de sílica unida generalmente a una fase estacionaria polimérica es expuesta a la muestra donde existen equilibrios entre la muestra y la fase estacionaria. En la segunda etapa, la fibra con el analito adsorbido es transferida al instrumento para su desorción, separación y cuantificación.

Ésta técnica se ha empleado principalmente en la extracción de compuestos orgánicos volátiles y semi-volátiles de muestras acuosas, generalmente ambientales, biológicas y alimentos, aunque es útil también en muestras sólidas y gaseosas. La primera aplicación de la SPME para el análisis de residuos de herbicidas fue reportada en 1995 por Boyd-Boland y Pawliszyn para la determinación de herbicidas que contienen grupos nitrógeno, las muestras trabajadas fueron suelo, agua y vino. Desde 1995, los métodos de SPME han sido utilizados ampliamente en diferentes clases de herbicidas en numerosas muestras ambientales (suelo y agua) y biológicas (sangre, orina y suero) [Krutz, 2003].

1.3.1. Fundamento

La Micro-extracción en fase sólida se basa en los equilibrios de reparto de los analitos entre la muestra y una fase estacionaria polimérica (fibra). El transporte de los analitos desde la matriz hasta la fibra inicia desde que la fibra entra en contacto con la muestra y termina cuando la concentración de analito ha alcanzado el equilibrio de distribución entre la fibra y la muestra [Pawliszyn, 1997].

La cuantificación por SPME asume una relación directamente proporcional entre la concentración del analito en la muestra y la cantidad de analito adsorbida por la fibra antes de alcanzar el equilibrio de reparto. La SPME no es una técnica de extracción exhaustiva, tiene un máximo de sensibilidad en el equilibrio de reparto de los analitos; se obtiene una relación proporcional entre la cantidad de los analitos adsorbidos por la fibra y la concentración inicial en la matriz de la muestra antes de alcanzar el equilibrio de partición. Por lo tanto el equilibrio completo no es necesario para el análisis cuantitativo por SPME [Pawliszyn, 1999].

El dispositivo para SPME consiste en un contenedor de fibra parecido a una jeringa, éste contiene una barra de acero inoxidable semejante a una aguja dentro de la cual está la fibra de sílice fundida, la cual puede ser expuesta o retraída dentro de la aguja por medio de un émbolo (*Figura 2*).

La fibra de sílice fundida esta recubierta con una capa relativamente delgada de alguna de las fases estacionarias poliméricas, en la cual los analitos orgánicos son adsorbidos o absorbidos desde la matriz de la muestra.

1.3.2. Tipos de extracción

Existen tres tipos o modos de trabajo en la SPME: Extracción directa (SPME/DE), Headspace (SPME/HS) y Extracción Protegida con Membrana (SPME/MP) (*Figura 3*). En el modo SPME/Extracción Directa la fibra se sumerge directamente en muestras líquidas y los analitos son transportados directamente de la matriz de la muestra hacia la fase polimérica (fibra). En el modo SPME/Headspace la fibra se expone en la fase vapor que

existe sobre una muestra, los analitos son transportados a través del aire enriqueciendo la fibra, este modo se utiliza para extracción de compuestos volátiles, de tal manera que la fibra se encuentra protegida de interferencias como compuestos de alto peso y/o de compuestos no volátiles presentes en la muestra.

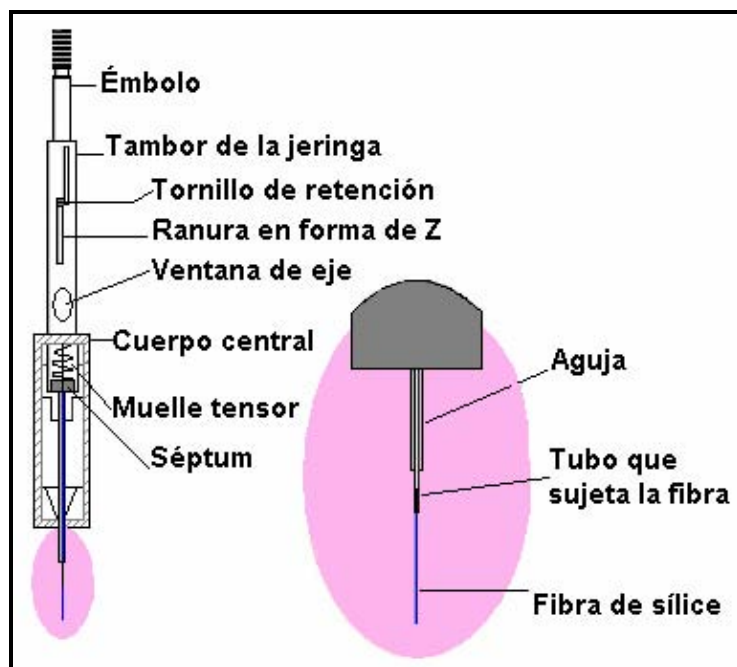


Figura 2. Esquema del dispositivo de Micro-extracción en fase sólida (SPME) [György Vas, 2004].

En el modo SPME/Extracción Protegida con Membrana, la fibra se protege utilizando una membrana que le sirve como barrera para aquellas muestras con muchas interferencias, utilizándola para aquellos compuestos con baja volatilidad para ser analizados por SPME/Headspace. Si la membrana es elaborada de un material adecuado puede incrementar la selectividad en proceso de extracción, la cinética de extracción con membrana es sustancialmente más lenta que en SPME-DE porque los analitos necesitan difundir a través de la membrana para dirigirse hacia la fibra y ser extraídos [Pawliszyn, 1997 y György Vas, 2004]. Usando la membrana e incrementando la temperatura la extracción se puede realizar en tiempos cortos.

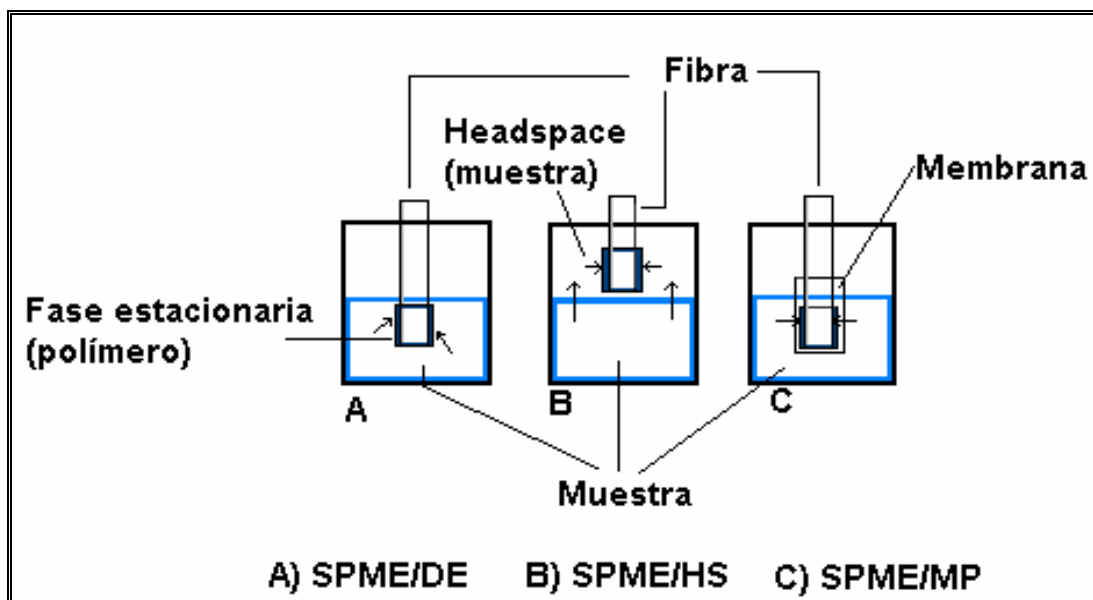


Figura 3. Tipos de extracción para SPME [Pawliszyn, 1997].

1.3.3. Fibras

Actualmente existen fibras con diversos recubrimientos y diferentes espesores, que proporcionan un intervalo amplio de polaridades (*Figura 4*), de tal forma que la SPME puede emplearse para determinar un amplio grupo de compuestos (*Tabla 2*). Los primeros recubrimientos comercializados fueron los de polidimetilsiloxano (PDMS) y poliacrilato (PA) pero los recubrimientos han ido aumentando progresivamente y actualmente cubren un amplio conjunto de aplicaciones, destacando: PDMS, la cual se considera de aplicación general, poliacrilato, polimetilsiloxano/divinilbenceno (PDMS/DVB), Carboxen (CAR o carbón activado poroso), polietilenglicol/divinilbenceno (CW/DVB), polietilenglicol/resina templada (CW/TPR), carboxen/polidimetilsiloxano (CAR/PDMS), hasta fibras con materiales especializados como fibras de intercambio iónico para remover iones metálicos y proteínas en disoluciones acuosas.

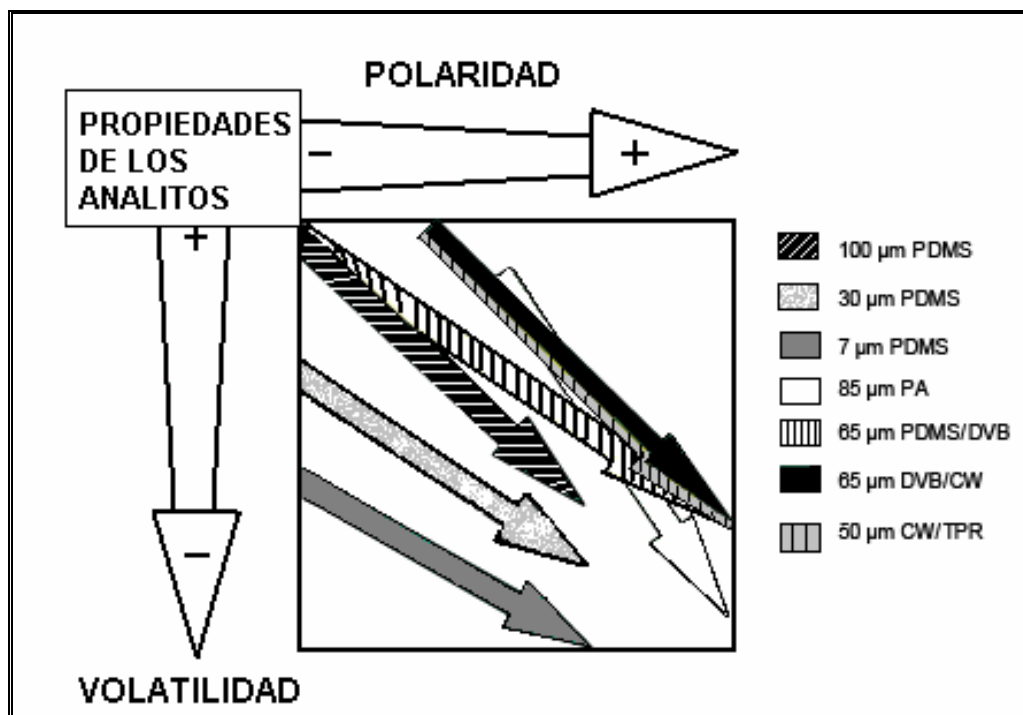


Figura 4. Relación entre tipos de fibra y analitos de interés [Pawliszyn, 1997].

La Figura 4 representa una guía para elegir el tipo de fibra a utilizar de acuerdo a dos características básicas como la volatilidad y polaridad de los analitos. Por ejemplo, la fibra PDMS puede utilizarse para aquellos analitos de tendencia no polar, pero al escoger diferente grosor se pueden analizar tanto analitos volátiles (100 μm) como poco volátiles (7 μm). Mientras que las fibras de poliacrilato (PA) y las combinaciones con carbowax (CW) se utilizan para analitos polares. La fibra PDMS/DVB puede ser utilizada para compuestos polares y no polares, con analitos de mediana y alta volatilidad, por lo que es una fibra que puede ser utilizada para el análisis de una amplia gama de compuestos.

Tabla 2. Aplicaciones para los diversos tipos de fibras.

Tipo de fibra	Polaridad de los analitos
PDMS (Polidimetilsiloxano)	No polares (VOCs, PAHs, plaguicidas y BTEX)
PA (Poliacrilato)	Polares (triazinas y fenoles)
PDMS/DVB (Polimetilsiloxano/divinilbenceno)	Polares-No polares (Hidrocarburos aromáticos y analitos volátiles pequeños como solventes)
CW/DVB (Polietilenglicol/divinilbenceno)	Polar (Alcoholes y éteres.)
CW/TPR (Polietilenglicol/resina templada)	Polar de bajo peso molecular (Surfactantes aniónicos)
CAR/PDMS (Carboxen/polidimetilsiloxano)	Polares-No polares (VOCs e hidrocarburos)

VOCs: Compuestos orgánicos volátiles (por sus siglas en inglés Volatile Organic Compounds),

PAHs: Hidrocarburos policíclicos aromáticos (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons), BTEX: benceno, tolueno, etilbenceno y xileno

1. 3.4. Procedimiento

La fibra, en primer lugar debe acondicionarse previo al análisis para remover contaminantes que pueden estar adsorbidos y que pueden interferir con los analitos de interés, esto se realiza en el inyector del Cromatógrafo de Gases de acuerdo a las indicaciones del proveedor (SUPELCO). La muestra es colocada dentro de un vial el cual se sella con un septum, el émbolo se baja hasta dónde se necesario para que la fibra (*Figura 5a*) entre en contacto con la muestra (*Figura 5b*), dependiendo el modo de extracción; presentándose la migración de los analitos desde la matriz de la muestra hacia la fase estacionaria (fibra) [Pawliszyn, 1997]. La muestra es agitada para aumentar la velocidad de transferencia de analito, evitándose bajos coeficientes de difusión; generalmente se emplea una barra magnética o por sonicación. Después de un tiempo apropiado de extracción, la fibra se retrae dentro de la aguja y ésta se remueve, posteriormente (*Figura 5c*) es insertada directamente en el inyector de un cromatógrafo de gases (*Figura 5d*) o dentro de la cámara de desorción de la interfase SPME-HPLC. La desorción del analito de la fase polimérica se

lleva a cabo por calentamiento de la misma en el puerto de inyección del GC (*Figura 5f*) o por dilución con disolventes dentro de la cámara de desorción de la interfase SPME-HPLC, donde los analitos son transferidos a la columna cromatográfica para su análisis.

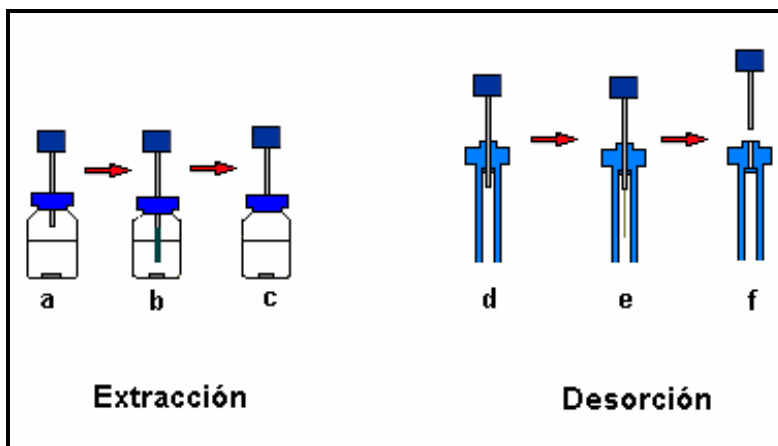


Figura 5. Esquema del proceso de extracción (por inmersión directa) y desorción térmica en el GC [Pawliszyn, 1997].

1. 3.5. Optimización del proceso de SPME

En SPME los analitos son extraídos directamente de la muestra hacia la fibra, para ello deben optimizarse las condiciones de extracción, y asegurar la máxima sensibilidad del analito por la fibra y la eficiencia de la extracción. A continuación se presentan los puntos de optimización para la extracción.

a) Selección del modo de extracción

La selección del modo de extracción debe hacerse considerando la complejidad de la muestra, la volatilidad de los analitos y la afinidad de éstos por la muestra. Por lo anterior tenemos que la SPME/DE, generalmente se utiliza para analitos de media a baja volatilidad y las muestras deben ser líquidos simples, para la SPME/HS se pueden manejar líquidos complejos y sólidos, pero los analitos deben ser de alta a media volatilidad, mientras que la SPME/MP se utiliza para muestras complejas y con analitos de baja

volatilidad [Pawliszyn, 1997]. Así, la técnica más adecuada de extracción deberá seleccionarse considerando la naturaleza de la matriz en la muestra. SPME/DE es más sensible que SPME-HS para analitos presentes en un líquido sin embargo, existe daño en la fibra y disminución en la eficiencia de la extracción debido a la adición de sales, pH de la disolución o la presencia de compuestos en una matriz compleja los cuales interfieren en la extracción de los analitos [Prosen, 1999]. SPME-HS presenta menor ruido de fondo debido a que la fibra no está en contacto directo con la muestra y por lo tanto prolonga su tiempo de vida, y es adecuada para la extracción de analitos muy volátiles en la mayoría de las muestras complejas sólidas, líquidas y gaseosas.

b) Selección de la fibra

Como ya se mencionó, existen diferentes tipos de fibras y la afinidad del analito por la fibra depende de las interacciones moleculares entre el analito y las distintas fases estacionarias que recubren las fibras, además debe considerarse el espesor de la fase polimérica, y por tanto la selección depende de los analitos a extraer [Pawliszyn, 1999]. Así, la fibra de PDMS es de uso común para analitos no polares (*Tabla 2*). Mientras que las fibras con fase polimérica gruesa requieren más tiempo para alcanzar el equilibrio de extracción, pero la ventaja de éstas es que extraen una mayor cantidad de analito, por ello proporciona mayor sensibilidad. Las fibras con cubierta de espesor grueso suelen utilizarse para analitos volátiles y las cubiertas delgadas para compuestos semivolátiles.

Los analitos polares de bajo peso molecular, pueden ser extraídos con fases estacionarias mixtas como PDMS/DVB, CAR/DVB, Carbowax y CW/TPR, porque presentan mayor capacidad de retención debido al efecto potencial de adsorción [Krutz, 2003].

c) Selección de la técnica de agitación

La agitación se utiliza para acelerar la transferencia de analitos desde la matriz de la muestra hacia la fibra; a su vez determina el tiempo de equilibrio en matrices acuosas debido a que el tiempo de equilibrio decrece con el aumento en la velocidad de agitación,

una agitación incontrolable puede causar baja reproducibilidad en este tiempo de equilibrio. [Pawliszyn, 1997]. La agitación magnética es la más común, pero existen diferentes tipos de agitación: por ultrasonido, movimiento de la fibra y mediante vortex, entre otros.

d) Optimización del tiempo de extracción

El tiempo de extracción está determinado principalmente por la velocidad de agitación y el coeficiente de partición del analito entre la fase polimérica de la fibra y la matriz de la muestra [Prosen, 1999]. Y generalmente es corto para extracciones en SPME/HS. Para extraer la máxima cantidad de analito, el tiempo de equilibrio debe ser alcanzado, pero este puede ser demasiado para algunos analitos, y aunque la SPME tiene una mayor sensibilidad en el punto de equilibrio, el equilibrio total no es necesario para un análisis preciso, dada la relación lineal entre la cantidad de analito adsorbido por la fibra y su concentración inicial en la matriz de la muestra [Pawliszyn, 1999].

El tiempo de extracción debe ser constante durante todo el análisis, es decir debe mantenerse controlado con al finalidad de obtener resultados precisos, la precisión también depende del uso de la misma cantidad de muestra y por tanto igual tamaño del vial de extracción durante todo el análisis.

d) Determinación de la temperatura de extracción

Generalmente, el incremento de la temperatura de la muestra proporciona una mayor extracción, debido a que se produce un aumento en la velocidad de extracción y simultáneamente un efecto sobre la constante de distribución que depende del analito y del intervalo de temperatura de trabajo. En agua los coeficientes de difusión son altos y el tiempo de extracción es corto, pero el coeficiente de reparto puede ser bajo. Una temperatura adecuada aporta mayor sensibilidad y velocidad de extracción de los analitos [Pawliszyn, 1997].

e) Optimización del pH

El pH de la muestra es importante para compuestos con propiedades ácido-base, afecta el equilibrio de disociación de los analitos en medio acuoso, por ello el ajuste del pH puede mejorar la sensibilidad de la extracción. Al incrementar o disminuir el pH, por medio de la adición de un buffer, puede aumentar la cantidad de analito extraído.

El cambio de pH en SPME/ED no resulta ventajoso, porque el contacto de la fibra con disoluciones con altos o bajos valores de pH pueden dañarla [Pawliszyn, 1997 y Krutz, 2003].

f) Efecto de la adición de una sal

La adición de sales, generalmente cloruro de sodio o carbonato de sodio, en la muestra aumenta el coeficiente de distribución de los analitos no ionizados por lo que la cantidad de analito aumenta; sin embargo, para analitos ionizados se observa una disminución de la eficiencia de la extracción [Campillo, 2006 y Pawliszyn, 1997]. La extracción de analitos volátiles es favorecida con la adición de sales, por lo que la adición de NaCl, Na₂SO₄ es preferible en la SPME/HS. Una desventaja de la adición de sales es que puede existir pérdida de selectividad de la fibra [Prosen, 1999].

g) Optimización de la desorción

La temperatura, tiempo de desorción y la posición de la fibra en el inyector del GC son factores que afectan la desorción completa de los analitos adsorbidos. Por otra parte, también afectan la volatilidad de estos la velocidad del flujo del gas alrededor de la fibra, así como del espesor de la fase polimérica [Gallardo, 2006 y Fidalgo, 2005]. La temperatura óptima de desorción, en general es aproximadamente igual al punto de ebullición del analito menos volátil. El inyector del cromatógrafo de gases debe tener un inserto de diámetro angosto para asegurar un flujo lineal alto. La profundidad de la exposición de la aguja debe ajustarse para colocar la fibra en el centro de la zona caliente del inyector. El tiempo de desorción generalmente es corto pues el coeficiente de difusión

de los analitos en la fibra aumenta y la constante de distribución gas/fibra disminuye rápidamente con el aumento de la temperatura.

1. 3. 6. Aplicación de la SPME en el análisis ambiental

En la Tabla 3 se presenta en forma resumida algunas de las aplicaciones de la SPME en el análisis ambiental, entre las que se encuentran principalmente el análisis de residuos de plaguicidas y otros compuestos orgánicos volátiles. Así, la técnica de SPME puede utilizarse no solo en el análisis de matrices inertes como agua y suelo, sino también en muestras biológicas como alimentos y fluidos biológicos [Beltran, 2000 y Wardencki, 2007].

En el análisis de agua, la aplicación de la SPME es amplia para el análisis de residuos de plaguicidas [Beltran, 2000 y Copobiango, 2005], no solo por que son de importancia ambiental sino porque la técnica es apropiada para el análisis de matrices acuosas. Además, frecuentemente al manejar otro tipo de matrices, la optimización de la extracción se realiza con agua [Kruz, 2003]. En la Tabla 3 se observa algunas de las aplicaciones de la SPME para el análisis de plaguicidas, así como el modo de extracción y la instrumentación utilizada para la detección. En cuanto a los sistemas de análisis (cualitativo y cuantitativo) los más utilizados son la Cromatografía de Gases (GC) y la Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia (CLAE o HPLC por sus siglas en inglés). Dentro del análisis de agua otros compuestos como fenoles y ftalatos son analizados [Konstantinou, 2007 y Xiaoyan Liu , 2007].

La determinación de plaguicidas en suelo, se basan en elaborar una mezcla de suelo con agua destilada, seguida de la inmersión de la fibra de SPME [Beltran, 2000].

Para el análisis de alimentos, se tienen numerosas aplicaciones sobre todo para caracterización de compuestos que proveen el aroma característico, pero en el ámbito ambiental los plaguicidas son de los compuestos más buscados. Los alimentos acuosos como los jugos son tratados fácilmente, mientras que los alimentos sólidos requieren un paso previo de preparación de muestra. Los vegetales suelen tratados mediante el mezclado a alta velocidad utilizando mezcla de disolventes [Fytianos, 2006], las muestras líquidas como jugos son extraídas realizando diluciones con agua destilada.

En cuanto a los fluidos biológicos (sangre y orina) se tienen aplicaciones [Gallardo, 2006 y Musshoff, 2002] en el campo ambiental, y como es de esperarse los residuos de plaguicidas son un tema amplio pero también se buscan fármacos de abuso y sustancias médicas [Gallardo, 2006].

1. 3. 6. 1. Análisis de plaguicidas organofosforados.

La extracción líquido-líquido o la extracción en fase sólida seguidas del análisis por Cromatografía de Gases o por Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia son métodos tradicionales para la determinación de residuos de plaguicidas organofosforados en muestras ambientales.

Los plaguicidas organofosforados han sido determinados por micro-extracción en fase sólida en diversas matrices. El micro-extracción en fase sólida, como ya se ha mencionado, tienen ventajas sobre las técnicas tradicionales, pero entre las ventajas más importantes se encuentra la concentración de los analitos en la fase polimérica. Esto es muy importante para el análisis de residuos de plaguicidas, porque además de concentrar, se integra la extracción y la introducción de la muestra (en el equipo analítico) en un solo proceso ininterrumpido, por tanto aumenta los porcentajes de recobro de los analitos. Con esto puede determinarse la presencia de dichos plaguicidas en niveles bajos de concentración del orden de ng/L [Magdic, 1996; Gonçalves, 2002 y Fidalgo-Used, 2005].

Tabla 3. Aplicaciones de la Micro-extracción en fase sólida (SPME)

ANALITO	MUESTRA/FIBRA	MODO DE EXTRACCIÓN	DETECCIÓN	REFEREN.
Triazinas	Suelo CW/TPR	Inmersión directa (DE)	HPLC/MS	Hildebrandt (2007)
Plaguicidas	Agua PDMS (7µm), PDMS/DVB	Inmersión directa (DE)	GC/ECD GC/NPD	Beltran (2000)
Compuestos orgánicos volátiles y semivolátiles	Agua PDMS	Headspace (HS)	GC/FID GC/MS	Beltran (2000)
Fungicidas	Suelo PA (85µm)	Inmersión directa (DE)	GC/FID GC/MS	Beltran (2000)
Metilmercurio	Pescado y agua de río PDMS (100µm)	Headspace (HS)	GC/MS	Beltran (2000)
Explosivos	Agua CW/TPR (50µm) PDMS/DVB (60µm) PA (85µm)	Inmersión directa (DE)	HPLC/UV-VIS	Beltran (2000)
Paratión	Sangre y Orina CW/DVB (65µm)	Inmersión directa (DE)	GC/MS-SIM	Gallardo (2006)
Fenoles	Agua Nano-tubos de Carbón	Inmersión directa (DE)	HPLC/UV-VIS	Xiaoyan Liu (2007)
Dimetilamina	Surfactantes catiónicos PDMS/PDPS (polidifenilsiloxano)	Inmersión directa (DE)/In- tube SPME con derivatización	HPLC/UV-VIS	Prieto-Blanco (2008)
Plaguicidas organofosforados	Sangre PDMS (100µm)	Headspace (HS)	GC/MS-SIM	Musshoff (2002)
Plaguicidas organofosforados	Pescado, agua, papas, guayaba y café PDMS (100µm)	Inmersión directa (DE)	GC/NPD	Capobiango (2005)

Las fibras más utilizadas en el análisis de los plaguicidas organofosforados son PDMS y PA [Beltran, 2000; Krutz, 2003], los autores de los trabajos indican que son las fibras que proporcionan mejores resultados para la extracción de los plaguicidas organofosforados. Las fibras PDMS y PA, son de polaridades diferentes la primera es no polar, mientras que la segunda es de tipo polar, es necesario conocer el tipo de plaguicidas organofosforados a los que cada autor se refiere ya que los plaguicidas organofosforados presentan variedad de polaridad. Para ambas fibras los compuestos que coinciden en la extracción son el metilparatión, malatión, paratión, diazinon y etión, de estos el etión es considerado como no polar, mientras que los otros como moderadamente polares; para estos últimos la fibra de poliacrilato es la ideal para la extracción [Pawliszyn, 1997; Aguilar, 1998 y Peñalver, 1999]. Algunos autores consideran el uso de la fibra de PDMS/DVB [Lambropoulou, 2002; Chanbasha, 2007] para plaguicidas organofosforados, así como para una mezcla de organofosforados y organoclorados [Gonçalves, 2002].

Dentro de los parámetros controlados, se encuentran el tiempo de equilibrio o tiempo de extracción, temperatura de extracción, el pH del medio, fuerza iónica y tiempo de desorción [Prosen, 1999; Beltran, 2000; Krutz, 2003 y Tsoukali, 2006], en otros casos se encuentra un estudio del efecto de la presencia de ácidos húmicos [Lambropoulou, 2002]. En todos los casos, logran la extracción de los plaguicidas organofosforados con precisión de 1-31% [Prosen, 1999; Beltran, 2000 y Flynt, 2006].

1. 4. CROMATOGRAFÍA DE GASES-ESPECTROMETRÍA DE MASAS (GC/MS)

Dentro de las técnicas instrumentales que más se utilizan se encuentra la Cromatografía de Gases (GC por sus siglas en inglés) acoplada a un Espectrómetro de Masas (MS por sus siglas en inglés). La GC se emplea para separar, aislar e identificar los componentes de una mezcla, el principio está sustentado en la distribución de los componentes de la mezcla entre dos fases, una móvil (gas) y una estacionaria (sólida o líquida), la fase móvil transporta a los componentes a través de la fase estacionaria. Cada componente se distribuirá de modo distinto dependiendo de su afinidad con la fase estacionaria como consecuencia de las interacciones de los componentes con ésta; aquellos

que sean más a fines son mayormente retenidos y tardan más en eluir, es decir, se mueven lentamente con el flujo de la fase móvil. Por el contrario, los componentes que se unen débilmente a la fase estacionaria eluyen más rápido. La Cromatografía de Gases es utilizada para el análisis de compuestos relativamente volátiles y no termolábiles.

Un cromatógrafo de gases consiste básicamente en un inyector split/splitless, un horno en el cual se encuentra una columna capilar, un detector y un ordenador [McNair, 1998]. El detector de un cromatógrafo de gases puede ser un detector de ionización de flama (FID), detector de captura de electrones (ECD), detector de nitrógeno-fósforo, detector (NPD), espectrométrico de masas (MS), entre otros. Al tener como detector un espectrómetro de masas, existe cierta ventaja en comparación con los demás ya que permite identificar cada analito que va eluyendo de la columna.

Un espectrómetro de masas consiste en una cámara de ionización y un analizador de masas por la relación masa carga (m/z), en este último se tienen varias opciones como el cuadruplo o las trampas de iones, el primero es el más utilizado, además de un detector y un sistema de adquisición de datos. El funcionamiento del espectrómetro de masas consiste en que los analitos de interés entran a la cámara de ionización donde son ionizados y fragmentados, en el caso de la ionización electrónica por un bombardeo de un haz de electrones cuya energía es de 70eV. Los iones fragmento generados se dirigen hacia el analizador, donde se realiza una selección en función de la relación masa/carga (m/z), y posteriormente son detectados y procesados para así obtener la información deseada.

El acoplamiento GC/MS consiste en primer lugar en la separación de los analitos de una mezcla en el cromatógrafo de gases, y el efluente del cromatógrafo entra a la cámara de ionización del espectrómetro de masas. Esta técnica es muy sensible puede alcanzarse límites de detección muy bajos (ng/L) y puede ser muy selectiva, dado que puede realizarse diversos tipos de ionización y por los distintos modos de adquisición de los datos; generalmente se utilizan dos, el barrido de iones (SCAN, por sus siglas en inglés) y el monitoreo selectivo de iones (SIM, por sus siglas en inglés). En el modo SIM se alcanza una mayor selectividad y sensibilidad en el análisis, pero puede incrementarse aún más cuando se aplican técnicas de ionización selectivas [Skoog, 2001].

El procesador nos proporciona un cromatograma y para cada analito un espectro de masas y éste es característico para cada compuesto, dado que éste es un perfil de los iones resultantes de la fragmentación de la molécula, dicha fragmentación es característica y por tanto permite identificarla entre grupos de compuestos, ya que entre estos se tienen un patrón de fragmentación característico.

En las técnicas cromatográficas la identificación de cada compuesto se realiza mediante la comparación de los tiempos de retención respecto a un estándar y en el sistema acoplado GC/MS se suma la comparación con el espectro de masas obtenido por el mismo método de ionización, generalmente se emplea una base de datos del *NIST (National Institute of Standards and Technology)*. El análisis cuantitativo en GC/MS se realiza por la relación proporcional de la respuesta de un ión seleccionado previamente con la concentración de un estándar.

La aplicación de la técnica GC/MS es amplia, en áreas como análisis clínicos, ambiental, farmacia, alimentos, forense e industrial, los analitos de interés son contaminantes, drogas, explosivos y productos de petróleo, entre otros, y en muestras como aire, agua, suelo y fluidos biológicos (*Tabla 3*).

Objetivo general

- Desarrollar una metodología para el análisis de residuos de plaguicidas organofosforados (malatión, paratión y EPN) en agua empleando como técnica de extracción la Micro-extracción en fase sólida seguida por el análisis por Cromatografía de Gases acoplado a un espectrómetro de masas.

Objetivos particulares

- Optimizar la separación mediante Cromatografía de Gases/Espectrometría de Masas de los plaguicidas organofosforados (malatión, paratión y EPN).
- Optimizar las condiciones para la extracción de plaguicidas organofosforados (malatión, paratión y EPN) con la técnica Micro-extracción en fase sólida.
- Aplicar la técnica de Micro-extracción en fase sólida para extraer a los plaguicidas organofosforados (malatión, paratión y EPN) contenidos en agua.
- Analizar muestras de agua provenientes de los humedales de La Reserva de la Biosfera Chamela-Cuitzmala y determinar la presencia de plaguicidas organofosforados en dichas muestras, así como realizar su cuantificación.

DESARROLLO EXPERIMENTAL

En el presente trabajo se realizó la determinación de plaguicidas organofosforados, aislados por Micro-extracción en fase sólida y su análisis por Cromatografía de Gases/Espectrometría de Masas (GC/MS). Para dicho análisis, se determinaron las condiciones óptimas de trabajo tanto en el sistema GC/MS y en la extracción, y posteriormente determinar la validez de los resultados obtenidos.

Los materiales, equipo, reactivos y desarrollo experimental de este trabajo se detallan a continuación.

3.1. Reactivos

<i>Compuesto</i>	<i>Grado de pureza</i>	<i>Marca</i>	<i>Lote</i>	<i>Caducidad</i>
Agua	ASTM Tipo "I" (ISO 3696:1987) 13.6 MΩ	Obtenida con equipo Nanopure (Ultrapure water system), Barnstead/Thermolyne		-
Isooctano	Nanogrado	Mallinckrodt	6051KPTH-P	-
Acetona	Ultra-alta pureza	J.T. Baker	T04268	-
Metanol	Ultra-alta pureza	J.T. Baker	V32E33	-
Monocrotofos	99.5%	ChemService	367-98B	09/08
Dimetoato	99.1%	ChemService	3666-6 A	08/09
Malatión	99.3%	ChemService	365-78 A	07/08
Paratión	99.5%	ChemService	376-52C	01/11
EPN	99.5%	ChemService	366-98B	11/09
Fibra PDMS(100μm)	-	Supelco	P333437	-
Fibra PDMS/DVB (65μm)	-	Supelco	P369647	-

3.2. Muestras

- Agua pura (ASTM Tipo "I", ISO 3696:1987)
- Agua Potable
- Agua proveniente de Humedales de Chamela-Cuitzmala

3.3. Aparatos y material.

- Parrilla con agitación CORNING PC-420D
- Balanza OHAUS® Analytical Plus, Sensibilidad 10^{-5} g
- Micropipetas de desplazamiento de aire
 - pipeta 10- 100 μ L Hamilton. SoftGrifp™. Certificado ISO 9001
 - pipeta 100-1000 μ L, Hamilton. SoftGrifp™. Certificado ISO 9001

3.4. Instrumento

Cromatógrafo de Gases HP 5890 Series II Plus, acoplado a un espectrómetro de masas 5973N cuadrupolar como detector, utilizando como gas acarreador He y una columna capilar HP-5 MS (5% de fenilmetilsiloxano) 30m x 0.25 mm x 0.25 μ m

3. 5. CONDICIONES ÓPTIMAS DE SEPARACIÓN EN CG/EM

Las condiciones óptimas de separación se determinaron inyectando 1 μ L de una disolución de 10 mg/L de los plaguicidas dimetoato, monocrotofos, malatión, paratión y EPN. Para llevar acabo la determinación se utilizó un programa de temperatura, que fue optimizado ensayando varios programas hasta encontrar el que proporcionaba una mejor separación de los analitos en el menor tiempo posible.

Una vez encontradas las condiciones óptimas de separación para los plaguicidas mencionados anteriormente, se realizó una mezcla de concentración de 10 mg/L de cada plaguicidas organofosforados y organoclorados, y así observar si con una mezcla más compleja se realiza una separación adecuada. Los plaguicidas organoclorados se eligieron,

debido a que siguen siendo los más utilizados y de mayor persistencia en el ambiente, y su presencia es posible en las muestras a analizar.

Posteriormente se realizó la selección de los iones (*Tabla 4*) a utilizar para la cuantificación de cada analito, para el análisis por monitoreo selectivo de iones (SIM por sus siglas en inglés), para este fin se tomó como guía el método 8270C publicado por la EPA para el análisis de compuestos orgánicos semivolátiles por Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas. [EPA, 1998]

Tabla 4. Iones fragmento para plaguicidas organofosforados.

Compuesto	Ión primario (m/z)	Iones secundarios (m/z)
Monocrotofos	127*	192, 67, 97, 109
Dimetoato	87*	93, 125, 143, 229
Malatión	173*	125, 127, 93, 158
Paratión	109*	97, 291, 139, 155
EPN	157*	169, 185, 141, 323

* Iones tomados para realizar el monitoreo selectivo

3. 6. CONDICIONES ÓPTIMAS DE EXTRACCIÓN

La técnica de Micro-extracción en Fase sólida que se desarrolló en este trabajo es la Extracción directa (SPME/DE), esta técnica se eligió porque los analitos de interés son compuestos semivolátiles, y dicha técnica es utilizada para este tipo de compuestos en muestras acuosas [Pawliszyn, 1997; Beltran, 2000; Krutz, 2006; Campillo, 2007].

En base a reportes previos del análisis de plaguicidas organofosforados y otros compuestos por SPME [Pawliszyn, 1997; Krutz, 2003; Prosen, 1999], las condiciones que afectan la extracción de los analitos en estudio son el tipo de fibra, la temperatura de extracción, velocidad de agitación del sistema y tiempo de extracción (equilibrio). Para la optimización del análisis se utilizó disoluciones con concentración de 30 ng/mL de cada analito [Pawliszyn, 1997], usando como solvente Agua Tipo “T”.

3. 6. 1. Selección de la fibra y velocidad de agitación

Se evaluaron dos fibras de diferente polaridad, la PDMS y la PDMS/DVB; trabajos anteriores marcan la fibra PDMS como uso común para los plaguicidas organofosforados y organoclorados [Magdic, 1996; Beltran, 2000; Tsoukali, 2005; Capobiango, 2005], pero se ha observado que la fibra de PDMS/DVB puede ser utilizada para la extracción de dichos plaguicidas [Beltran, 2000; Gonçalves, 2002; Lambropoulou, 2002; Flynt, 2006]. Las fibras fueron acondicionadas antes de cada análisis, ambas durante 30 min a 250 °C. Las condiciones iniciales de extracción fueron tomadas de la bibliografía consultada: 10 mL de muestra [Pawliszyn, 1997; Chanbasha, 2007], $25 \pm 2^\circ\text{C}$ [Lambropoulou, 2002; Fidalgo, 2005], durante 30 min [Lambropoulou, 2002] con desorción durante 3 min [Gallardo, 2006], sin adición de sal [Flynt, 2006; Hidalgo, 2005; Beltran, 2000] y con velocidad de agitación de 200, 400, 600, 800 y 1000 rpm, para determinar la velocidad óptima.

3. 6. 2. Tiempo de extracción

Después de elegir la fibra más adecuada para la extracción, se evaluaron los tiempos de extracción: 15, 30, 40, 50 y 60 min, con agitación de 800 rpm, temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ y desorción de 3 min

3. 6. 3. Tiempo de desorción

Las condiciones de extracción fueron a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, 800 rpm por 40 min, y el tiempo de desorción fue en 2, 3, 5, 6, 7 y 10 min.

Las siguientes pruebas se realizaron con las condiciones establecidas para la MEFS/ED: fibra PDMS/DVB, 800 rpm, 40 min a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, con un tiempo de desorción de 5 min.

3.7. LINEALIDAD

La prueba se realizó preparando una disolución estándar de 1000 µg/mL [EPA, 1998] de cada plaguicida en estudio en una mezcla hexano-acetona (1:1). A partir de la solución anterior se preparó una disolución de 1 µg/mL en metanol, de la cual se tomaron diferentes alícuotas y se llevaron a un volumen de 10 mL con Agua Tipo “I”, para así obtener concentraciones de 5 a 60 ng/mL.

Una segunda curva fue realizada empleando un intervalo de 0.5 a 5 ng/mL, para ello, se preparó una disolución de 0.1 µg/mL a partir de la disolución de 1 µg/mL. De la disolución anterior se tomaron diferentes alícuotas y se llevaron a un volumen de 10 mL con Agua Tipo “I”.

La linealidad también fue evaluada con agua potable empleando los mismos intervalos de concentración.

3. 8. PRECISIÓN

La repetibilidad se evaluó utilizando muestras adicionadas con 15 ng/mL y 5ng/mL. Esta prueba se realizó tanto con Agua Tipo “I” como con agua potable. Ambas muestras fueron sometidas al mismo procedimiento de extracción.

3. 9. LÍMITE DE DETECCIÓN Y LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN

Para éstas pruebas, se utilizó la curva de calibración en intervalo corto (0.5 a 5 ng/mL) para Agua Tipo “I” y agua potable. Los cálculos se realizaron en base a las ecuaciones que se encuentran en el Apéndice A4.

3.10. RECOBRO

En éste estudio se prepararon 10 muestras con Agua Tipo “I” y agua potable adicionadas con 30 ng/mL de cada plaguicida (malatión, paratión y EPN). Se trataron con el método de extracción propuesto y fue realizada la cuantificación utilizando como referencia la

curva de calibración de Agua Tipo “I”. Después de realizar la cuantificación, se realizó el cálculo del recobro relativo considerando que la cantidad adicionada debe extraerse totalmente y por ello representa el 100%, así al cuantificar cada una de las muestras se realiza la comparación entre la concentración adicionada y la concentración obtenida, para ésta última se calcula el porcentaje al cual corresponde.

3.11. ANÁLISIS DE MMUESTRAS

Las muestras reales tratadas en este trabajo, provienen de los humedales de La Reserva de las Biosfera Chamela-Cuitzmala. Dicha zona está comprendida por terrenos lagunares y costeros federales así como por predios de la Universidad Nacional Autónoma de México (Estación de Biología Chamela, IBUNAM), La Fundación Ecológica de Cuitzmala, A.C., Universidad de Guadalajara y de pequeños propietarios y una porción del ejido Rincón de Ixtán (que ocupa el 12% de la superficie).

La reserva (*Figura 6*) se ubica en la costa de Jalisco, en el Municipio de la Huerta, aproximadamente a 120 Km al norte de Manzanillo, entre el margen norte del Río Cuitzmala y el Arroyo Chamela. El área puede considerarse, en términos prácticos, dividida en secciones por la Carretera Federal 200, Melaque-Puerto Vallarta. Al este de la carretera predominan el bosque tropical caducifolio y al oeste básicamente el bosque tropical sub-caducifolio y los humedales [SEMARNAT, 1996; López, 2008].



Figura 6. Mapa de la ubicación e la Reserva de la Biosfera Chamela-Cuitzmala.

Las quince muestras analizadas fueron proporcionadas por el Instituto de Ecología, UNAM, éstas provienen desde el nacimiento del río Cuitzmala hasta su desembocadura en el Océano Pacífico y se consideran los humedales alimentados por una vena del río Cuitzmala.

Las muestras fueron analizadas con las condiciones establecidas para la SPME/DE: fibra PDMS/DVB, 800 rpm, 40 min a 25 ± 2 °C, con un tiempo de desorción de 5 min.

En el análisis de cada muestra se realizaron tres tipos de blancos, el primero de ellos es el blanco de la fibra después del acondicionamiento antes de la extracción, otro de ellos es agua potable la cual se tomó como blanco de la muestra. Cada muestra fue analizada por monitoreo SIM (*ver Tabla 4*) para los analitos estudiados en el presente trabajo.

Después del análisis cualitativo de cada muestra, éstas fueron fortificadas con 30 ng/mL de cada plaguicida. Finalmente, cada muestra fue sometida al proceso de extracción y así llevar a cabo la cuantificación.

Para las muestras se llevó a cabo el cálculo de porcentaje de recobro realizando la comparación con la curva de calibración de agua potable. Además, fue evaluada la precisión como coeficiente de variación (CV).

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

4. 1. CONDICIONES ÓPTIMAS DE SEPARACIÓN EN GC/MS

Para lograr una cuantificación exacta y precisa, con el límite de detección más bajo posible, es indispensable optimizar las condiciones de separación. Las condiciones óptimas en el sistema cromatográfico para los analitos de interés son las siguientes:

Temperatura del inyector: 250 °C

Flujo: 0.8 mL/min

Columna: Temperatura inicial: 100 °C.

Temperatura final: 260 °C, 2 min

Velocidad de calentamiento: 5 °C/min

Temperatura de la línea de transferencia: 250 °C

Detector: Tipo de ionización: Impacto electrónico (EI, por sus siglas en inglés Electrón impact)

Fuente de impacto electrónico: 70 eV

Temperatura de la fuente de ionización: 230°C

Temperatura del cuadrupolo: 150°C

Tiempo de retraso para el disolvente: 6 min

Adquisición: monitoreo SIM (*Tabla 5*)

Tabla 5. Datos de los plaguicidas organofosforados para el análisis por SIM.

Compuesto	tr (min)	Ión primario* (m/z)	Iones secundarios (m/z)
Monocrotofos	16.05	127	192, 67, 97, 109
Dimetoato	16.37	87	93, 125, 143, 229
Malatión	21.8	173	125, 127, 93, 158
Paratión	22.3	109	97, 291, 139, 155
EPN	30.6	157	169, 185, 141, 323

* Los iones utilizados fueron tomados del método 8270C publicado por la EPA en Enero de 1998.

En la Figura 6, se presenta el cromatograma obtenido a las condiciones óptimas de separación para los analitos de interés.

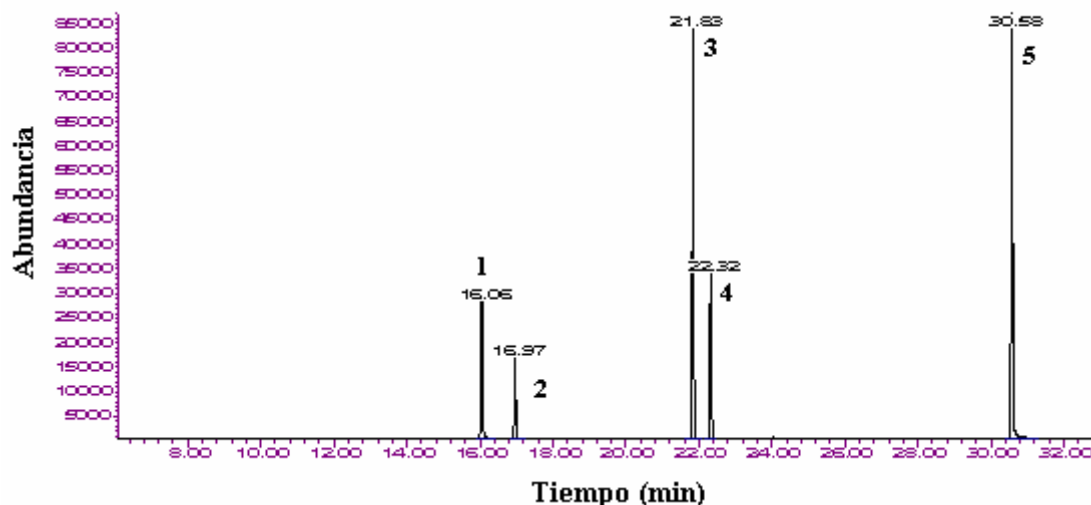


Figura 6. Cromatograma de 1 μ L disolución de 10 μ g/mL: 1) monocrotofos, 2) dimetoato, 3) malatión, 4) paratión y 5. EPN. Análisis por SCAN. Inyector 250 °C, Columna: 100° C, 1min-5°/min-260 °C, 2 min, flujo de gas acarreador 0.5mL/min

Como puede observarse la separación entre los analitos es adecuada, y también en una mezcla compleja podemos observar que las condiciones de separación son adecuadas (Figura 7). Para verificar lo anterior, fue elaborada una mezcla de plaguicidas organofosforados y organoclorados, estos últimos son utilizados debido a que suelen encontrarse en las aguas naturales a causa de su persistencia. En la Figura 7 observamos el cromatograma para la mezcla de 22 compuestos y en la Tabla 6 la identificación de cada uno de ellos mediante el sus características químicas, espectro de masas y posteriormente la confirmación con la biblioteca de Espectros de Masas del NIST (Mass Spectral Search Program for the NIST/EPA/HHH Mass Spectra Library, 2001). La mayoría de los compuestos presentados están separados adecuadamente, sin embargo para algunos plaguicidas no observamos separación a línea base tal es el caso de la pareja lindano (14.65 min)-monocrotofos (14.8 min) ó dieldrin y DDE, no obstante pueden diferenciarse entre sí.

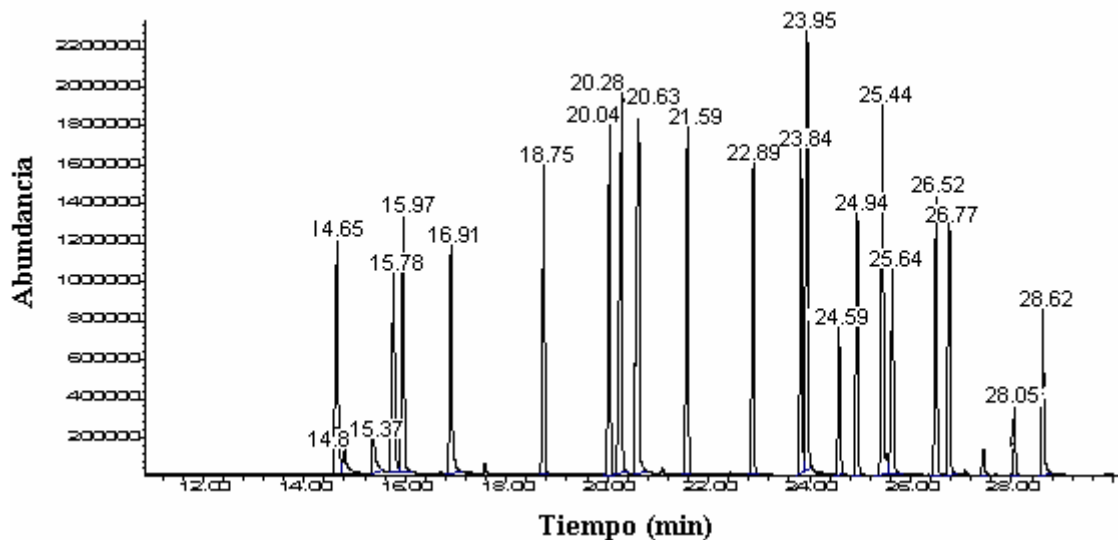


Figura 7. Cromatograma obtenido para una mezcla de 10 µg/mL de plaguicidas organofosforados y organoclorados. SCAN. Columna: 100° C-5°/min-260 °C, 2 min, flujo de gas acarreador 0.8 mL/min

Tabla 6. Identificación de plaguicidas en un estándar de 10µg/mL

Compuesto	tr (min)	Compuesto	tr (min)
α-BHC (Lindano) [OCI]	14.65	Endosulfan I [OCI]	22.89
Monocrotofos [OF]	14.8	Dieldrin [OCI]	23.84
Dimetoato [OF]	15.37	p, p'-DDE [OCI]	23.95
β-BHC [OCI]	15.78	Endrin [OCI]	24.59
γ-BHC [OCI]	15.97	Endosulfan II [OCI]	24.94
δ-BHC [OCI]	16.91	p, p'-DDD [OCI]	25.44
Heptacloro [OCI]	18.75	Endrin aldehído [OCI]	25.64
Aldrin-R [OCI]	20.04	Endosulfan sulfato [OCI]	26.52
Malatión [OF]	20.28	p,p'-DDT [OCI]	26.77
Paratión [OF]	20.63	Endrin cetona [OCI]	28.05
Heptacloro Epóxido [OCI]	21.59	EPN [OF]	28.62

OF: plaguicida organofosforado, OCI: plaguicida organoclororado.

4. 2. CONDICIONES ÓPTIMAS DE EXTRACCIÓN

En la optimización de las condiciones de extracción fueron considerados parámetros como el tipo de fibra, velocidad de agitación, tiempo de extracción y tiempo de desorción, los cuáles son considerados en la mayoría de la bibliografía consultada.

La primer parte del trabajo experimental consistió en encontrar las condiciones óptimas de extracción considerando al dimetoato y el monocrotofos, debido a que son dos plaguicidas de difícil extracción dada su alta polaridad; y las fibras utilizadas en este trabajo (PDMS y PDMS/DVB) no fueron las adecuadas para realizar su extracción. Para estos dos plaguicidas (dimetoato y monocrotofos) es necesaria otra fibra de tipo polar, como de poliacrilato (PA) o carbowax (CW), y al utilizar las fibras mencionadas, los otros plaguicidas serían extraídos con menor eficiencia. Por lo anterior, se consideró que era de mayor importancia la extracción del malatión y paratión, que son de los más utilizados y acompañarlos con un tercer plaguicida, EPN, para analizar el efecto en la extracción de la presencia de otro compuesto del mismo tipo.

4. 2. 1. Selección de la fibra

Los compuestos a extraer pueden clasificarse como medianamente polares, por tanto se requiere una fibra que permita la extracción exitosa de la mayoría de los compuestos. La evaluación de las fibras se realizó tomando en consideración lo reportado en la literatura [Pawliszyn, 1997; Lambropoulou, 2002] como condiciones iniciales, esto es cantidad de muestra (10 mL) de muestra [Pawliszyn, 1997; Chanbasha, 2007], el modo de agitación (mecánica), velocidad de agitación, temperatura de extracción ($25 \pm 2^{\circ}\text{C}$) [Lambropoulou, 2002; Fidalgo, 2005], tiempo de extracción durante (30 min) [Lambropoulou, 2002] y tiempo de desorción (3 min) [Gallardo, 2006].

Como se mencionó anteriormente la fibra de uso común para la extracción de plaguicidas es la fibra de PDMS, por lo que dicha fibra sirve de referencia para realizar la comparación de la cantidad de analito extraído con la fibra de PDMS/DVB.

En el Gráfico 1 observamos los diagramas útiles para la selección de la fibra, éstos corresponden a la intensidad de la señal de cada analito en ambas fibras. Para los tres

plaguicidas, observamos que la fibra PDMS presenta mayor cantidad de analito extraído en comparación con la fibra PDMS/DVB. Dicho comportamiento se explica por la naturaleza polar de cada fibra y la de los analitos, ya que la fibra PDMS es de tipo no polar, tiene mayor afinidad por los analitos de interés y en consecuencia se extrae mayor cantidad de cada analito, mientras que la fibra PDMS/DVB es una fibra considerada como bipolar, es decir que funciona para compuestos polares y no polares, y como observamos también puede extraer los analitos medianamente polares como el malatión y paratión, y no polares como el EPN.

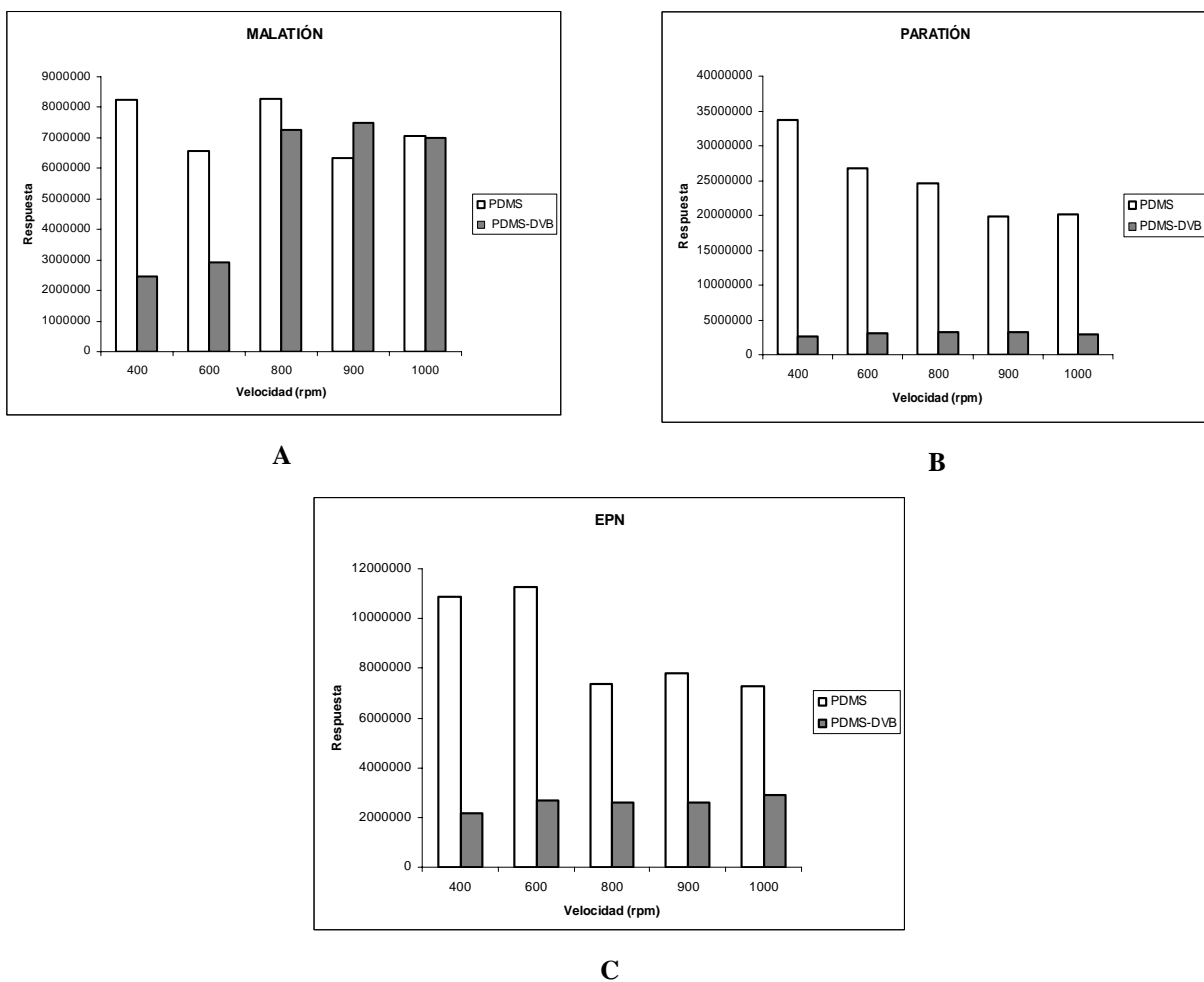


Gráfico 1. Evaluación del tipo de fibra para malatión(A), paratión (B) y EPN (C). Tiempo de extracción 30 min, 25 ± 2 °C, tiempo de desorción de 3 min a 250 °C.

Otro parámetro que explica la diferencia en cuanto a la cantidad de analito extraído, es el espesor de la cubierta polimérica de la fibra. La fibra de PDMS tiene un espesor mayor

(100 μ m) a la fibra de PDMS/DVB (65 μ m), por tanto existe mayor interacción entre la fibra de PDMS y esto es reflejado en mayor extracción de los analitos.

Una tercera contribución se refiere al mecanismo de retención de los analitos en cada fibra. En la fibra PDMS, la recubierta polimérica es un líquido, mientras que en la fibra de PDMS/DVB es un sólido, por ello la interacción entre los analitos y la fibra es diferente; así, en la fibra PDMS tiene lugar la absorción y en la fibra de PDMS/DVB la adsorción, y esta última está condicionada al número de sitios activos.

El presente trabajo es un estudio pre-eliminar para determinar compuestos de intervalo amplio de polaridades, por lo que la fibra de PDMS/DVB es de utilidad. Y, aunque la fibra PDMS/DVB presenta una menor cantidad de analito extraído, puede utilizarse para el análisis del malatión, paratión y EPN, sin embargo, es necesario realizar la optimización de las condiciones de extracción. Por ejemplo, en el caso del malatión (*Gráfico 1A*) es notable que al optimizarse otras condiciones de extracción, como la velocidad de agitación, puede incrementarse la cantidad de analito extraída.

4. 2. 2. Selección de la velocidad de agitación.

En el Gráfico 2 observamos el comportamiento de cada analito en estudio al modificar la velocidad de agitación. Para el malatión, en el Gráfico 2A, observamos que al incrementarse la velocidad de agitación, la cantidad de analito extraída se incrementa, y esto se debe al incremento de la transferencia de masa de la disolución hacia la fibra, con ello la interacción de los analitos y la fase polimérica es adecuada.

El comportamiento es similar para los otros analitos, para el paratión (*Gráfico 2B*) la cantidad de analito extraído no se modifica notablemente como en el caso del malatión, si bien existe un incremento en la respuesta del analito, después de 700 rpm no se observa diferencia significativa en la cantidad de analito extraída. El EPN, tienen un comportamiento similar al paratión, ya que no se tienen cambio notable en cuanto a la cantidad de analito extraído, pero se observa que después de 700 rpm la dispersión de las medidas disminuye (*Gráfico 2C*). Por lo anterior, observamos que para los tres plaguicidas después de 700 rpm no se tiene diferencia significativa en cuanto a la cantidad de analito extraída, y la dispersión de las medidas disminuye. También debe considerarse que la agitación sea controlada y que la barra

magnética no dañe la fibra. La velocidad de agitación considerada como óptima para la fibra de PDMS/DVB es 800 rpm

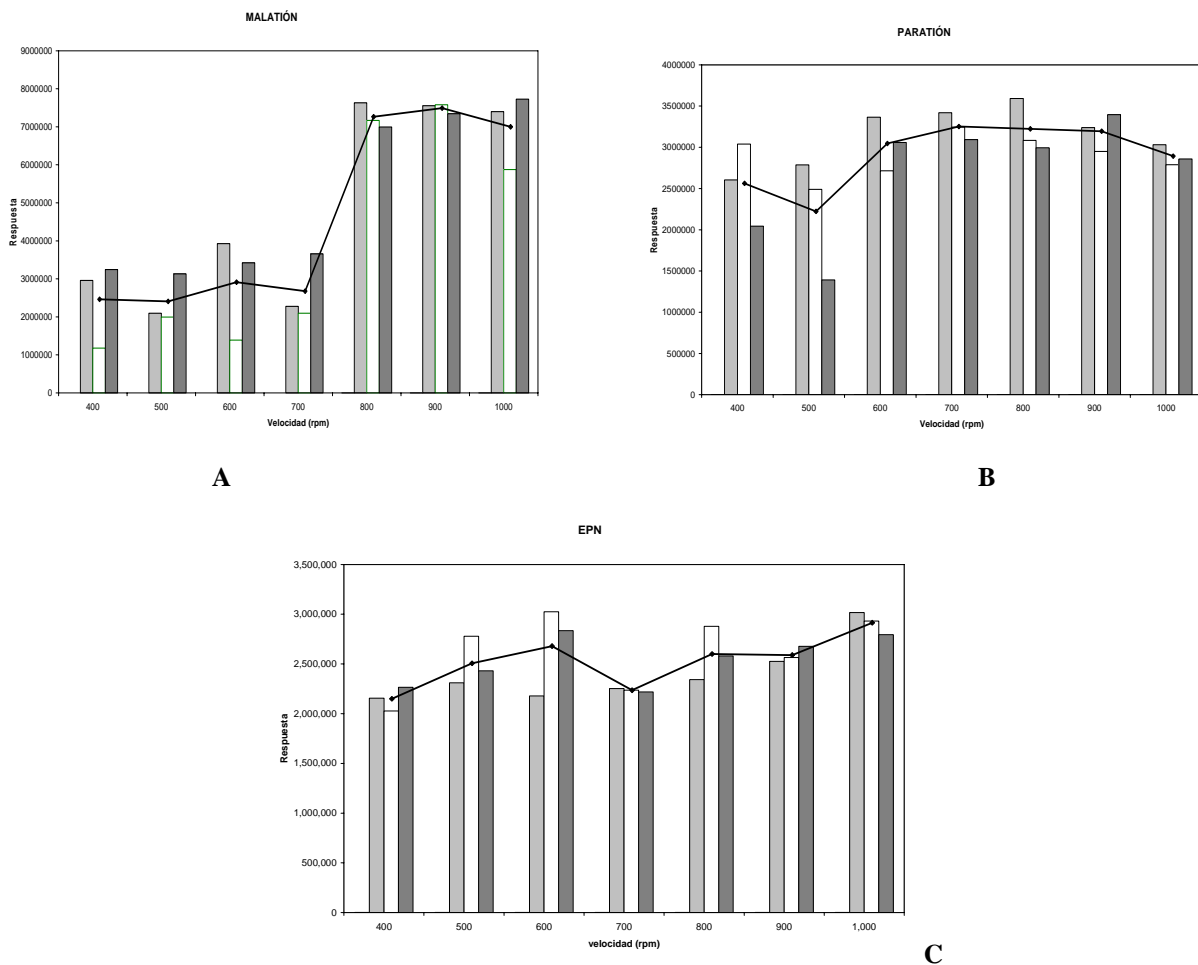


Gráfico 2. Evaluación de la velocidad de agitación para cada plaguicida, fibra PDMS-DVB, tiempo de extracción de 30 min de extracción y tiempo de desorción a 250 °C por 3 min.

4. 2. 3. Tiempo de extracción

La prueba se realizó con las condiciones establecidas como óptimas anteriormente: PDMS/DVB, 800 rpm a 25 ± 2 °C. En el Gráfico 3, observamos que la cantidad de analito extraído se incrementa al aumentar el tiempo, lo cual es debido a que se tiene un mayor tiempo de equilibrio entre los analitos y la fibra, pero al elegir un tiempo mayor de extracción, el tiempo del análisis se incrementaría y cabe recordar que un método analítico debe ser lo más rápido posible, por ello determinamos que un tiempo de extracción de 40 min es suficiente.

Para la elección de dicho tiempo se toma en cuenta que si bien, para el malatión y paratión podría utilizarse un tiempo mayor, como incluso se han reportado tiempo de más de 100 min [Gallardo, 2006], para el EPN no se tiene un cambio considerable en la cantidad de analito extraída. Por otra parte, al trabajar la técnica de inmersión directa, la fibra presenta desgaste en su superficie y esto puede disminuir la selectividad en la extracción, además dicho desgaste aumenta con el tiempo en el que ésta está interaccionando con la solución, y con 40 min el deterioro de la fibra disminuye.

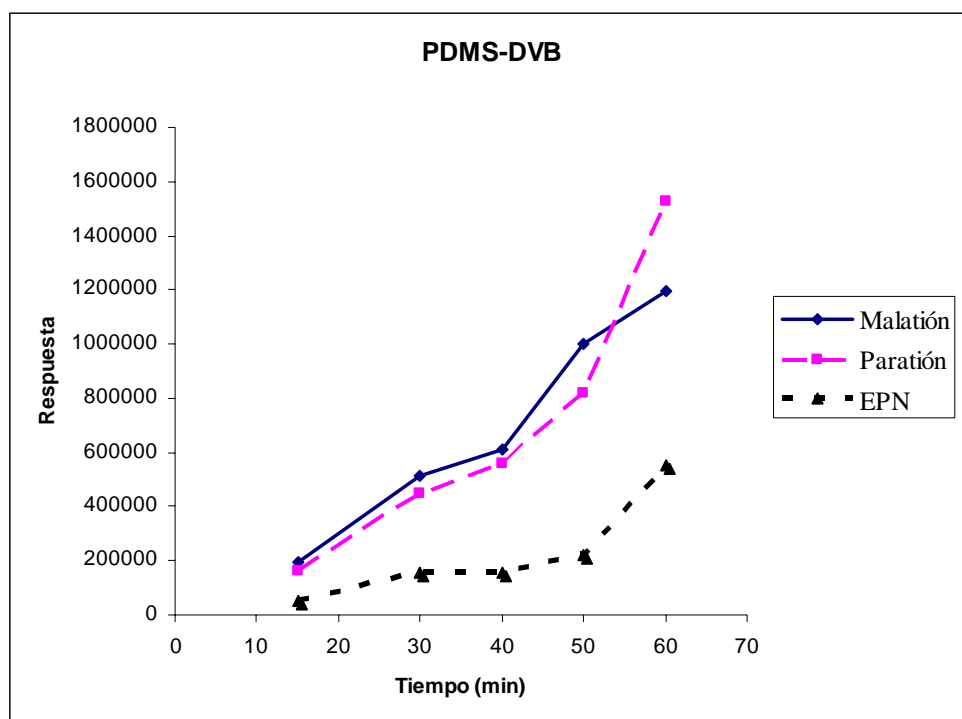


Gráfico 3. Evaluación de tiempo de extracción con PDMS/DVB. $25 \pm 2^\circ \text{C}$, 800 rpm y desorción a 250°C por 3 min.

4. 2. 4. Tiempo de desorción

Después de establecer el tiempo de extracción, fue necesario determinar el tiempo necesario para obtener un máximo de desorción de los analitos y con ello obtener una mayor respuesta.

En el Gráfico 4A corresponde al malatión y observamos que después de 5 min de desorción la variación de las medidas disminuye, y no se tienen diferencia significativa en la

cantidad de analito extraída, y para el paratión (*Gráfico 4B*) el comportamiento es similar; sin embargo, para el EPN (*Gráfico 4C*) no presenta los mismos resultados en cuanto a la disminución de la variación de las mediciones, pero respecto a la cantidad de analito extraída tiene un máximo en 5 min de desorción.

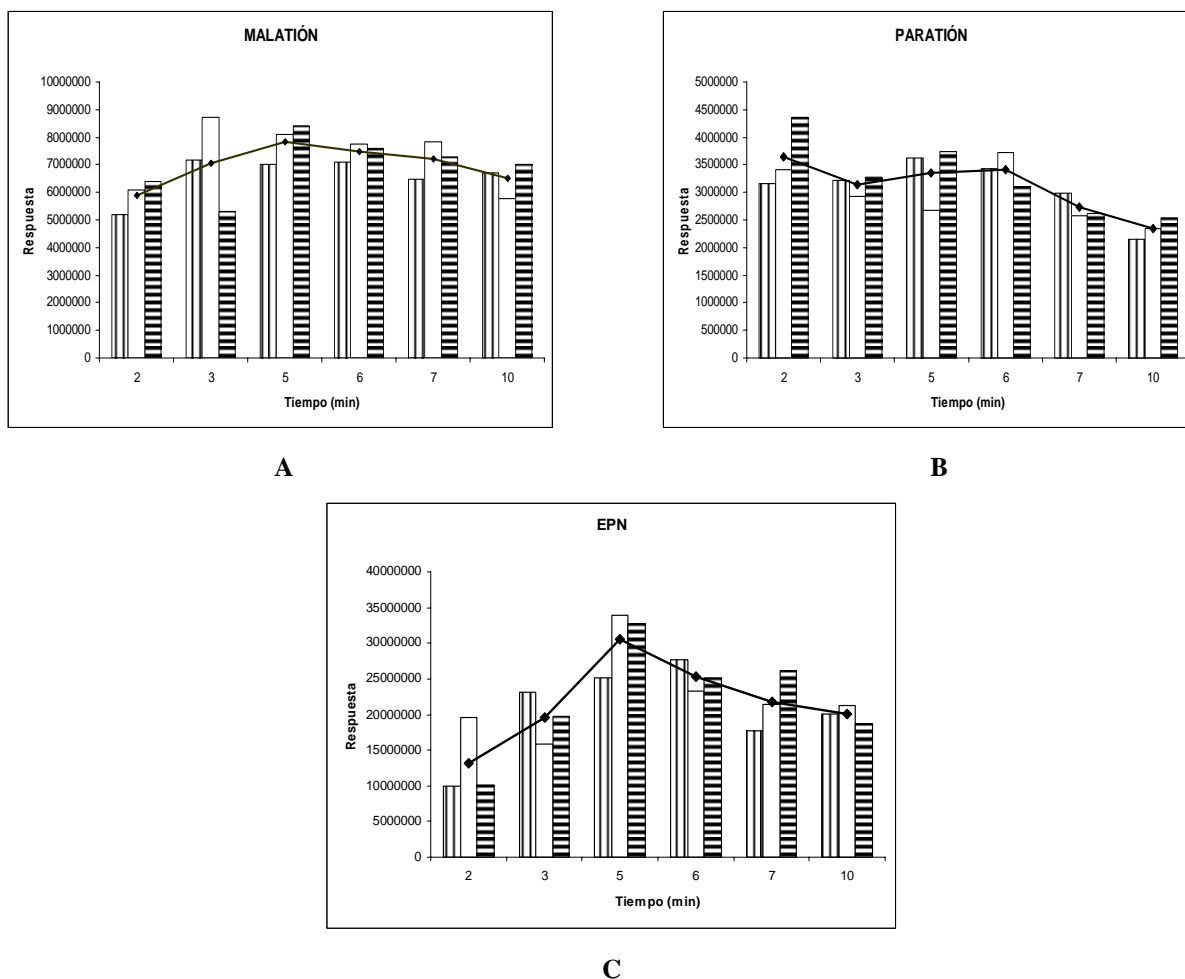


Gráfico 4. Evaluación del tiempo de desorción con PDMS/DVB, disolución de 30ng/mL de cada plaguicida, 40 min de extracción a 25 °C y 800 rpm, desorción a 250°C.

Las condiciones óptimas encontradas para la extracción del malatión, paratión y EPN son las siguientes: fibra PDMS/DVB, 800 rpm, 40 min a 25 ± 2 °C, con un tiempo de desorción de 5 min.

4.3. LINEALIDAD

Después de determinar las condiciones óptimas de extracción, se evaluó la linealidad del método para agua pura (ASTM Tipo “I”) y agua potable. Se realizaron dos curvas de calibración, la primera una de un intervalo amplio de concentración (5-60 ng/mL) y otra en un intervalo menor (0.5-5 ng/mL). Los resultados para el cálculo de la pendiente (m) y ordenada (b), así como el coeficiente de correlación (r^2) aparecen en la Tabla 7, y los gráficos para las curvas de calibrado obtenidas para malatión, paratión y EPN están ubicados en el Apéndice A2.

El intervalo lineal para el EPN y paratión es de 5 a 50 ng/mL, mientras que en el caso del malatión el intervalo lineal es de 5 a 35 ng/mL con un coeficiente de correlación (r^2) mayor a 0.99.

Tabla 7. Linealidad en el intervalo de 5-60 ng/mL para agua pura (ASTM Tipo “I”)

Compuesto	Pendiente \pm IC* $\times 10^{-3}$ (mL/ng)	Ordenada \pm IC* $\times 10^{-3}$	r^2
Malatión	190 \pm 10	200 \pm 300	0.9955
Paratión	134 \pm 9	-100 \pm 300	0.9933
EPN	390 \pm 30	-900 \pm 800	0.9929

IC*: Intervalo de confianza con un riesgo del 5%

Nota: los valores son reportados solo con las cifras significativas.

Los intervalos de confianza para la pendiente y para la ordenada se calcularon mediante las ecuaciones que se encuentran en el Apéndice A1, además se realizaron pruebas de hipótesis para determinar si la ordenada era estadísticamente igual a cero y así utilizar la ecuación para análisis cuantitativo en cromatografía ($A = Fr \cdot C$, donde A = área, Fr = factor de respuesta, C = concentración), en todos los casos podemos utilizar la ecuación anteriormente descrita dado que la ordenada es estadísticamente igual a cero.

La Tabla 8 contiene los resultados para el cálculo de linealidad en el intervalo corto de 0.5 a 5 ng/mL para cada plaguicida y en el Apéndice A2 están las curvas de calibrado.

Tabla. 8. Linealidad en el intervalo de 0.5-5 ng/mL para agua pura (ASTM Tipo “I”)

Compuesto	Pendiente \pm IC* $\times 10^{-3}$ (mL/ng)	Ordenada \pm IC* $\times 10^{-3}$	r^2
Malatión	190 \pm 10	40 \pm 40	0.9935
Paratión	120 \pm 10	40 \pm 30	0.9910
EPN	220 \pm 30	30 \pm 60	0.9901

IC*: Intervalo de confianza con un riesgo del 5%

Nota: los valores son reportados solo con las cifras significativas.

Para los tres analitos en el intervalo de bajas concentraciones (0.5 a 5 ng/mL) el coeficiente de correlación (r^2) es mayor a 0.99 los tres plaguicidas. Al igual que en las curvas de calibración del intervalo lineal de 5-60 ng/mL se calcularon los intervalos de confianza para la ordenada y la pendiente, así como el planteamiento de la prueba de hipótesis sobre la ordenada. Para el malatión la ordenada es igual a cero, mientras que para el paratión y el EPN la ordenada es diferente, por lo que se emplearía la ecuación de la recta para el cálculo de concentraciones en este intervalo.

La linealidad utilizando agua potable fue calculada con los mismos intervalos de concentración empleados en el caso del agua pura (ASTM Tipo “I”). Y, al igual que en los casos anteriores (Agua pura, ASTM Tipo “I”), fueron realizados los cálculos relativos a la pendiente y a la ordenada, los resultados están contenidos en las Tablas 9 y 10, y las curvas de calibrado en los Gráficos del Apéndice A3.

Tabla. 9. Linealidad en el intervalo de 5-60 ng/mL para agua potable

Compuesto	Pendiente \pm IC $\times 10^{-3}$ (mL/ng)	Ordenada \pm IC $\times 10^{-3}$	r^2
Malatión	118 \pm 8	2100 \pm 300	0.9924
Paratión	91 \pm 5	700 \pm 200	0.9955
EPN	260 \pm 20	400 \pm 600	0.9927

IC: Intervalo de confianza con un riesgo del 5%

Nota: los valores son reportados solo con las cifras significativas.

Tabla. 10. Linealidad en el intervalo de 0.5-5 ng/mL para agua potable

Compuesto	Pendiente \pm IC $\times 10^{-3}$ (mL/ng)	Ordenada \pm IC $\times 10^{-3}$	r^2
Malatión	200 \pm 10	70 \pm 40	0.9946
Paratión	109 \pm 9	- 10 \pm 30	0.9908
EPN	230 \pm 20	-40 \pm 60	0.9883

IC: Intervalo de confianza con un riesgo del 5%

Nota: los valores son reportados solo con las cifras significativas.

En cuanto a los resultados para agua potable, observamos que las curvas de calibración tienen tendencia lineal y el coeficiente de correlación (r^2) es mayor a 0.99, excepto para el EPN en el intervalo corto, pero el Gráfico 6 (Apéndice A3) tiene tendencia lineal. Para realizar la cuantificación de los analitos, tomando como base las curvas de calibración de agua potable es necesario considerar la ordenada al origen.

4. 4. PRECISIÓN

Al evaluar la precisión del método como repetibilidad utilizando muestras enriquecidas de agua pura (ASTM Tipo “I”), éstas presentaron un CV menor al 15%, mientras que en las muestras de agua potable enriquecida es menor al 22%.

Los coeficientes de variación obtenidos pueden parecer demasiado altos, pero en base a la bibliografía consultada los valores obtenidos se encuentran dentro de los intervalos reportados por diversos autores al trabajar con fibras diferentes a la PDMS/DVB o bien con la misma pero compuestos diferentes. Así, para muestras de agua provenientes de diversas fuentes, reportan intervalos de precisión de 2 al 19 % [Beltran, 2000 y Lambropoulou, 2002] para distintos tipos de fibras, para la fibra de PDMS-DVB en agua potable adicionada han reportado un promedio de variación de 16% [Flynt, 2006] incluso han reportado variaciones del 37%. [Prosen, 1999].

4. 5. LÍMITE DE DETECCIÓN Y LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN

Los límites de detección (LD) y cuantificación (LC) para agua pura (ASTM Tipo “I”) y agua potable, fueron determinados usando las curvas de calibración de 0.5 a 5 ng/mL para malatión, paratión y EPN. Los cálculos se realizaron conforme las ecuaciones descritas en el Apéndice A4 y la Tabla 11 contiene los resultados obtenidos.

Tabla 11. Límites de detección y límites de cuantificación obtenidos con la fibra PDMS-DVB/GC/MS

Compuesto	Agua Pura (ASTM Tipo “I”, 15.7 MΩ)		Agua potable	
	LD (ng/mL)	LC (ng/mL)	LD (ng/mL)	LC (ng/mL)
Malatión	0.37	3.7	0.53	5.3
Paratión	0.41	4.1	0.55	5.5
EPN	0.37	3.7	0.51	5.1

4. 6. RECOBRO

En este estudio fueron preparadas muestras de agua pura (ASTM Tipo “I”) y agua potable, cada muestra fue adicionada con malatión, paratión y EPN en una concentración de 30 ng/mL. Después de realizar la extracción de cada muestra con el método propuesto, fue determinada la concentración de cada plaguicida en dichas muestras usando la curva de calibración respectiva (*ver gráficos en Apéndice A2 y A3*).

Una vez cuantificados cada plaguicida, fue calculado el recobro relativo debido a que la SPME es una extracción no exhaustiva. Para el cálculo (*) se considera la concentración obtenida como la concentración proporcionada por la curva de calibración de agua pura (ASTM Tipo “I”), una vez interpolada el área de cada pico de los plaguicidas en estudio, proveniente de las muestras y la concentración añadida.

Y por la siguiente ecuación podemos obtener el % de analito extraído:

$$* \% \text{Recobro} = \frac{\text{Concentracion}_{\text{obtenida}}}{\text{Concentracion}_{\text{añadida}}} \times 100 *$$

Tabla 12. Porcentajes de recobro obtenidos con la fibra PDMS-DVB/GC/MS

COMPUESTO	% RECOBRO	
	AGUA PURA (ASTM Tipo "P", 15.7 MΩ)	AGUA POTABLE
Malatión	101 (11)*	99 (12)*
Paratión	100 (18)*	82 (12)*
EPN	94 (12)*	57 (15)*

* Coeficiente de variación (%)

Así, en la Tabla 12 se encuentran los porcentajes de recobro obtenidos para cada plaguicida tanto en agua pura como en agua potable, en el primer caso observamos que en agua pura el recobro es del 100 % tanto para el malatión como el paratión, mientras que el EPN presenta un recobro un tanto menor pero aceptable, este último debemos recordar que es un plaguicida de tendencia no polar por lo que la afinidad de éste con la fibra es menor comparada con los otros dos plaguicidas en estudio y por ello su extracción nos es completa. Para el agua potable los recobros disminuyen en el caso del EPN y del paratión lo cual puede explicarse por la composición del agua potable, sobre todo la presencia de sales y compuestos orgánicos que intervienen en el proceso de extracción.

En general, los resultados obtenidos reflejan que el EPN no es extraído con eficiencia de una disolución al utilizar la fibra PDMS/DVB, considerando la polaridad de la fibra, para este compuesto no es la adecuada. Por otra parte probablemente existe competencia por los sitios activos para la adsorción en la fibra, además de que su conformación de dos anillos lo hace un compuesto un tanto voluminoso por lo que tiende ocupar una espacio mayor en la fibra bloqueando los sitios activos para si mismo y el paratión ya que tienen la misma

tendencia de polaridad, pero presenta precisión aceptable; mientras que en el caso del malatión y paratión la fibra, presenta una extracción satisfactoria con buena precisión la cual se encuentra en el intervalo del 15 al 22%. El malatión el de mayor recobro porque resulta con mayor afinidad por la fibra dada su estructura, que puede interaccionar con mayor facilidad con los grupos funcionales de la fase polimérica.

4. 7. ANÁLISIS DE MUESTRAS

El método optimizado fue utilizado para el análisis de muestras reales provenientes de los humedales de Chamela-Cuitzmala. Para el análisis de las muestras fueron consideradas dos etapas, la primera en realizar fue el análisis cualitativo de cada una de ellas para determinar la presencia de los compuestos en estudio. Inicialmente se realizó el blanco de fibra para observar la limpieza adecuada de la misma, una vez obtenido el blanco de fibra (*Gráfico 13*) se realizó el blanco para las muestras el cual consistió de agua potable (*Gráfico 14*) y finalmente la muestra.

Después de realizar la extracción de las muestras bajo las condiciones óptimas encontradas, no se encontraron analitos de interés. Por lo anterior, las muestras fueron enriquecidas y sometidas al proceso de extracción.

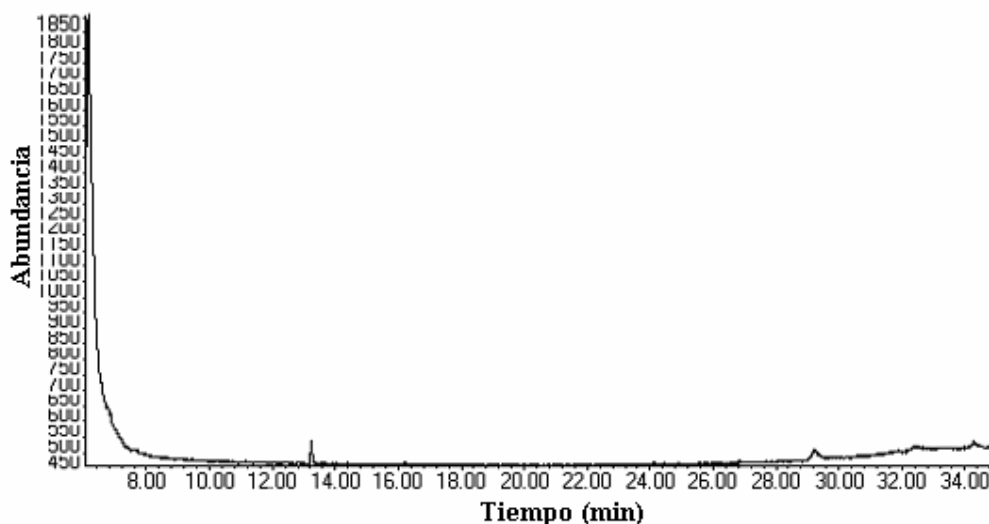


Gráfico 13. Cromatograma del blanco de la fibra, después del acondicionamiento durante 30 min a 250 °C y los iones (m/z) monitoreados son: 173 para malatión, 109 para paratión y 157 para EPN.

En el cromatograma del blanco de la fibra (*Gráfico 13*) observamos que no existen interferencias provenientes de la fibra que puedan intervenir en la determinación de la presencia y cuantificación de los analitos en estudio, esto después de realizar una comparación con el cromatograma de la disolución estándar (*Gráfico 15*), sin embargo observamos picos de señal muy pequeña que no interfieren en la determinación de los analitos y que probablemente sean producto de la fibra debido a la desorción de la misma.

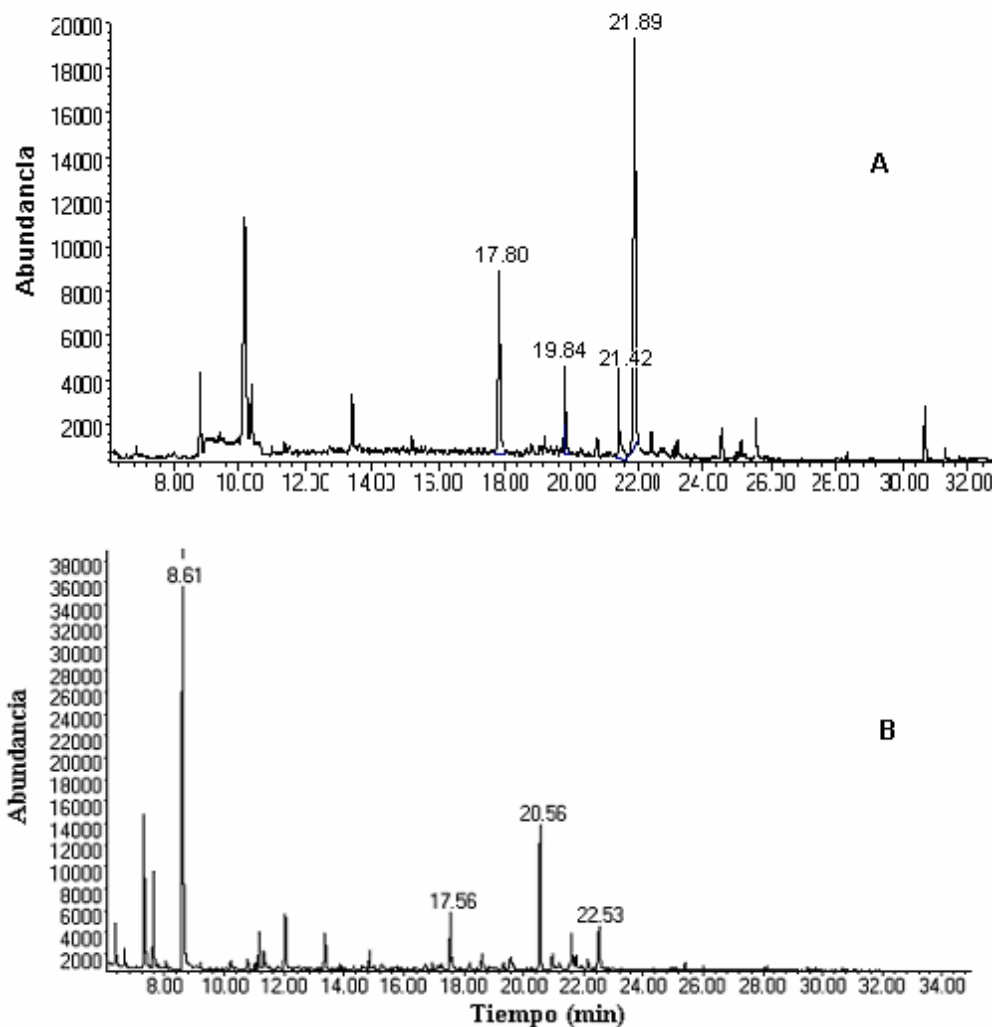


Gráfico 14. Cromatograma SIM (los iones monitoreados son: m/z 173 para malatión, m/z 109 para paratión y m/z 157 para EPN) del (A) blanco de agua pura (ASTM Tipo "I") y (B) agua potable con exposición hacia la fibra PDMS/DVB durante 40 min 25 °C con agitación a 800 rpm y desorción a 250 °C por 5 min.

En el Gráfico 14, el cual corresponde cuanto al cromatograma del blanco de la solución estándar, es decir agua pura (ASTM Tipo "I") observamos picos que no interfieren en la determinación de cada analito, solo aparecen aquellos compuestos que probablemente presenten un ión en común con los monitoreados, y este podría ser el caso del decametil-ciclopentasiloxano ($t_r = 8.61$ min), como producto del desgaste natural el cual presenta de la fibra al ser expuesta en el inyector del cromatógrafo de gases, y talvez ftalatos ($t_r = 13.9$ y 21.58 min), estos últimos se encuentran generalmente en el tipo de matriz a trabajar; cabe mencionar que esto se propone por la comparación de espectros de masas que realiza la biblioteca con la biblioteca de Espectros de Masas del NIST (Mass Spectral Search Program for the NIST/EPA/HH Mass Spectra Library, 2001).

En el análisis de las muestras enriquecidas, fue necesario extraer una disolución estándar de 30 ng/mL (Gráfico 15) de los plaguicidas en estudio para verificar los tiempos de retención, pero fueron agregados otros plaguicidas organofosforados, con esto se quiere probar que la fibra es de utilidad para la extracción de otros plaguicidas organofosforados y además de que pueden extraerse los analitos en estudio a pesar de la presencia de compuestos parecidos químicamente.

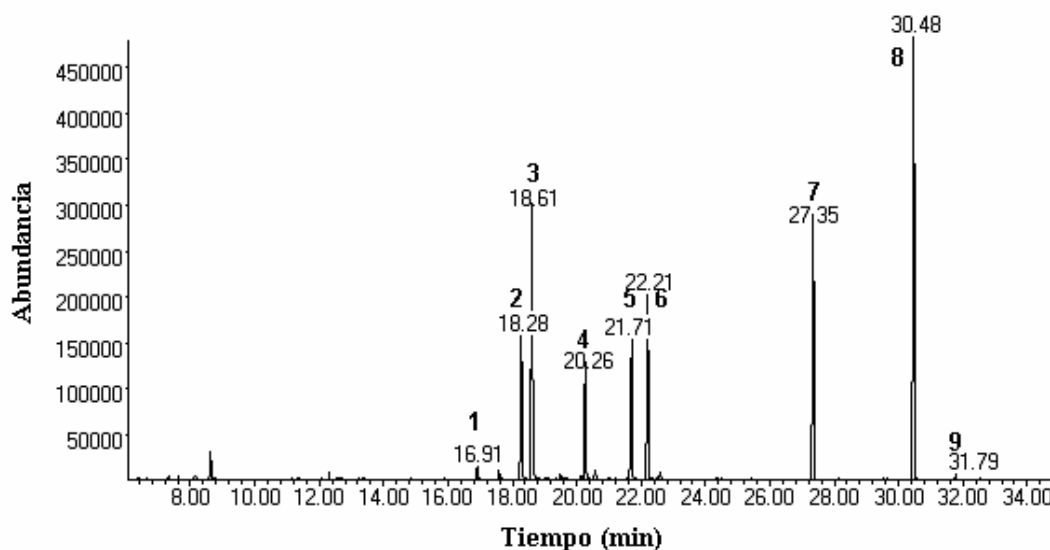


Gráfico 15. Cromatograma (SIM) del estándar de 30 ng/mL de malatión, paratión y EPN, en una mezcla con otros plaguicidas organofosforados extraídos con la fibra PDMS/DVB durante 40 min a 25 °C con agitación a 800 rpm y desorción a 250 °C por 5 min. 1) Demeton-S (m/z 88), 2) Diazinon (m/z 179), 3) Disulfoton (m/z 97), 4) metil-paratión (m/z 125), 5) malatión (m/z 173), 6) paratión (m/z 109), 7) etión (m/z 231), 8) EPN (m/z 157) y 9) azinfos-metil (m/z 160)

Las muestras no enriquecidas (*Gráfico 16*) fueron analizadas por monitoreo selectivo de iones (SIM) y posteriormente las muestras enriquecidas (*Gráficos 17 y 18*).

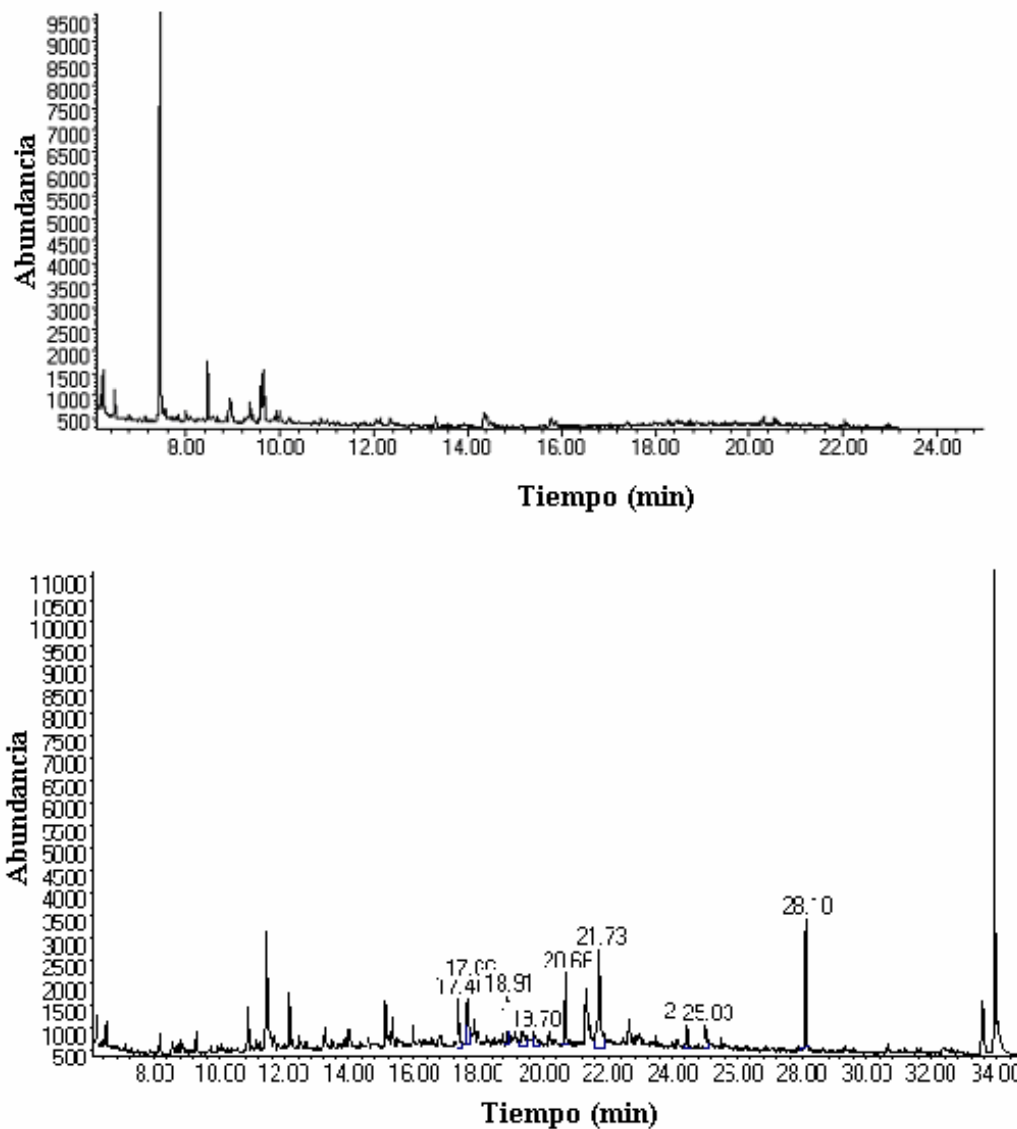


Gráfico 16. Cromatograma (SIM) de dos muestras sin adición con exposición hacia la fibra PDMS/DVB durante 40 min a 25 ± 2 °C con agitación a 800 rpm y 5 min de desorción a 250°C

Para las muestras sin adición (*Gráfico 16*) observamos señales muy pequeñas que al igual que en el blanco de la muestra pertenecen a la fibra. Las señales más intensas probablemente correspondan a compuestos provenientes de la fase polimérica, o bien compuestos como dietil y dibutil ftalato.

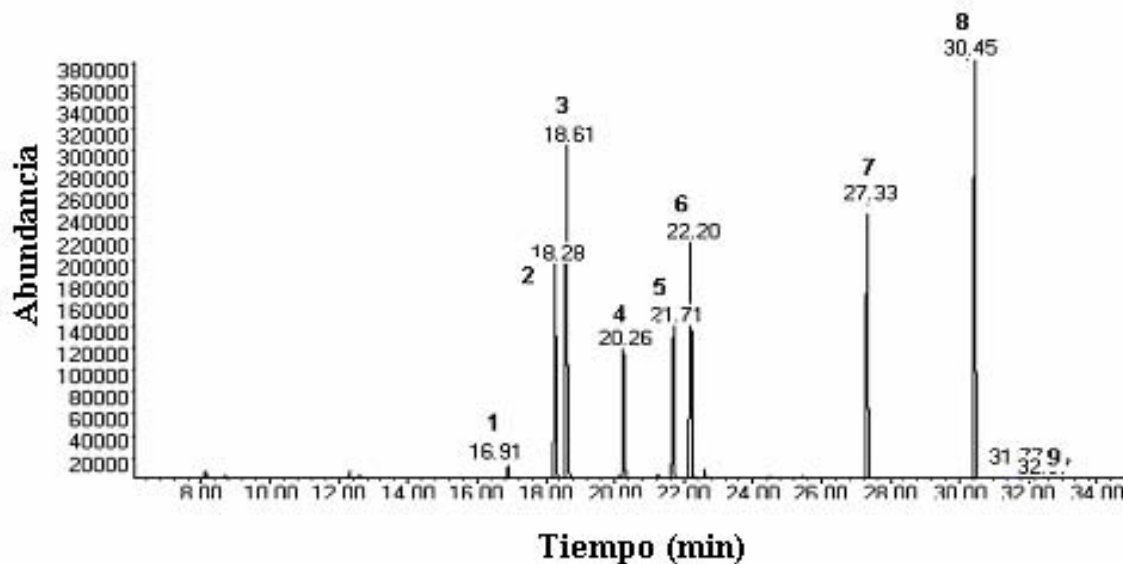
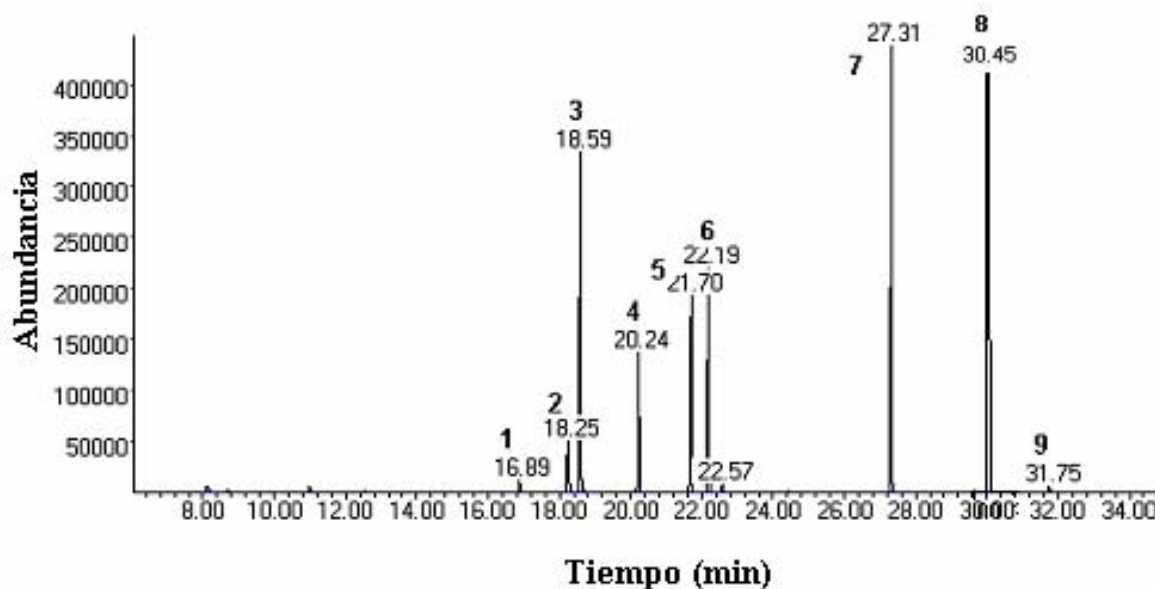


Gráfico 17. Cromatogramas (SIM) de dos muestras adicionadas con 30 ng/mL de malatión, paratión y EPN, mezclados con otros plaguicidas con exposición hacia la fibra PDMS/DVB durante 40 min a 25 °C con agitación a 800 rpm y desorción a 250°C por 5 min. 1) demeton-S, 2) diazinon, 3) disulfoton, 4) metil-paratión, 5) malatión, 6) paratión, 7) etión, 8) EPN y 9) azinfos-metil

Por otra parte las muestras adicionadas presentan picos que no pudieron ser identificados, pero no interfieren en la determinación de los analitos en las muestras.

Antes de realizar la determinación de la concentración de cada analito en las muestras, previamente se realizó el análisis cualitativo mediante los tiempos de retención de cada analito. Los cromatogramas de la disolución estándar y las muestras presentan el mismo patrón.

Para las muestras enriquecidas, las concentraciones obtenidas están contenidas en la Tabla 5 para las muestras adicionadas.

Tabla 5. Concentraciones obtenidas para muestras adicionadas con 30 ng/mL de malatión , paratión y EPN (n = 15).

	Concentración obtenida (ng/mL)	Intervalo de confianza (IC)	CV (%)	Recobro (%)
<i>Malatión</i>	23	± 3	21	77
<i>Paratión</i>	33	± 5	26	109
<i>EPN</i>	27	± 4	24	85

Los analitos cuantificados fueron malatión, paratión y EPN, compuestos para los cuales se realizaron las pruebas estadísticas. Cabe señalar, que en esta etapa fueron adicionados otros plaguicidas organofosforados con la finalidad de saber si las condiciones de extracción encontradas como óptimas pueden ser utilizadas para la extracción de otro tipo de plaguicidas, y para observar el efecto en la extracción del malatión, paratión y EPN con la presencia de otros compuestos del mismo tipo (organofosforados).

Observamos (*Gráficos 15, 17 y 18*) que los plaguicidas organofosforados pueden ser extraídos con la fibra que se utilizó, sólo el demeton-S y el gutión (azinfos-metil) no son extraídos en su totalidad, y por tanto para estos últimos tendría que realizarse algunas modificaciones en el proceso de extracción. Aparentemente, otros compuestos del mismo tipo no interfieren totalmente en la adsorción de la fibra, aunque, como ya se observó en el recobro, en algunos disminuye el rendimiento de extracción. Para observar el efecto real en la extracción, debe realizarse un estudio más completo considerando otros aspectos, como el realizar los estudios descritos en este trabajo con todos los plaguicidas organofosforados,

también verificar los componentes presentes en las muestras reales trabajadas como la cantidad de sales, compuestos orgánicos, partículas disueltas, ácidos húmicos, entre otros. Los agentes descritos anteriormente pueden tener interacción con los plaguicidas cambiando las propiedades fisicoquímicas de la matriz acuosa y/o de la fibra, provocando la reducción de la difusión de los analitos, y como consecuencia la disminución del porcentaje de recobro.

En relación al recobro observamos que se tienen concentraciones cercanas a lo añadido, aunque en el caso del malatión es evidente que resulta más afectado por la presencia de otros componentes, además se presenta un incremento en el recobro para el EPN y un poco mayor al 100% para paratión, lo cual no es atribuible a la presencia de dichos compuestos en la muestra, ya que fue realizado un análisis previo de las muestras sin adición. Éste aspecto, puede explicarse mediante un fenómeno parecido al “salting-out”, esto porque las muestras contienen compuestos (sales principalmente) que disminuyen la solubilidad de los analitos en la matriz, provocando una mayor extracción de los mismos.

Los resultados muestran que los efectos análogos al “salting-out” deben ser superados, utilizando técnicas como el uso de adiciones patrón y estándar interno. Si bien los resultados permiten predecir que el aumento de la fuerza iónica en la muestra incrementaría el recobro y bajaría el límite de detección, reportes anteriores indican que la fibra se deteriora y pierde selectividad, por lo que esta no es una opción viable.

CONCLUSIONES

La metodología para la determinación de los plaguicidas organofosforados (malatión, paratión y EPN) propuesta en este trabajo es sencilla, comparada con métodos clásicos como la extracción líquido-líquido o extracción en fase sólida; el número de operaciones es mucho menor, no se consumen solventes y el tiempo neto por muestra es menor.

La determinación de los plaguicidas utilizando como técnica de análisis la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas y la técnica de micro-extracción en fase sólida, empleando la fibra de PDMS/DVB, puede utilizarse para determinar rápidamente la presencia de malatión, paratión y EPN. Para el malatión el procedimiento reporta buena linealidad de 0.5 a 35ng/mL. En el caso del paratión y EPN tiene buena respuesta en el intervalo 0.5 a 50 ng/mL. Además, se puede realizar la identificación y cuantificación con precisión (<15-22 %) y recobro (57-109 %) aceptables. Los límites de detección (0.4 ng/mL) aunque son bajos pueden ser mejorados.

La metodología planteada puede ser utilizada para el monitoreo de plaguicidas organofosforados como el malatión, paratión y EPN, así como otros plaguicidas del mismo grupo en muestras de agua reales como el caso del los humedales, de una manera rápida y sencilla. Concluimos que para la cuantificación exacta de dichos plaguicidas, debido a la presencia de otros componentes como pueden ser compuestos orgánicos, microorganismos, sales y partículas suspendidas, que afectan el recobro es necesario modificar el procedimiento propuesto y recurrir a los uso de técnicas como pueden ser las adiciones patrón, e incluso el “salting-out” aunque de este se sabe que provoca el deterioro de las fibras

En las muestras analizadas procedentes de la Reserva de la Biosfera Chamela-Cuitzmala, no se encontró la presencia de plaguicidas organofosforados, al menos no en los límites de detección alcanzados en el presente trabajo, lo cual es bueno considerando la importancia de este sitio. Con el método propuesto en este trabajo, dada su sencillez, puede utilizarse para seguir una ruta para verificar, vigilar y ubicar las posibles fuentes de contaminación al utilizar plaguicidas como los campos agrícolas y pastizales inducidos encontrados en la zona de la reserva. Y con ello conducir a la evaluación y rehabilitación de dicha zona considerando la presencia de otro tipo de compuestos contaminantes.

APÉNDICES

APÉNDICE A1

Cálculo de la pendiente y la ordenada:

Se realiza con el método de mínimos cuadrados, en este caso el método fue realizado por el programa Origin ® 7.0 SR0 (1991-2002)

El método consiste en encontrar la mejor recta posible que pase por los puntos experimentales, pero optimizando los errores de la variable dependiente. La línea recta se calcula basándose en este principio: como resultado se encuentra que la línea debe pasar por el “centro de gravedad” de los puntos (\bar{x}, \bar{y}) . Se puede demostrar que la recta de mínimos cuadrados está dada por:

$$\text{La pendiente de la recta de mínimos cuadrados: } m = \frac{\sum_{i=1}^n [(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})]}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

$$\text{La ordenada en el origen de la recta de mínimos cuadrados: } b = \bar{y} - m\bar{x}$$

Donde \bar{x} y \bar{y} son, respectivamente, las medias de las x y de las y .

Las ecuaciones presentadas son obtenidas a partir de las ecuaciones normales del método. Así, considerando que la recta de mínimos cuadrados tiene la ecuación de la recta $y = mx + b$ donde las constantes m y b se determinan solucionando simultáneamente el sistema de ecuaciones:

$$\sum_{i=1}^n y_i = bn + m \sum_{i=1}^n x_i$$

Ecuaciones normales

$$\sum_{i=1}^n x_i y_i = b \sum_{i=1}^n x_i + m \sum_{i=1}^n x_i^2$$

Los valores de m y b se obtienen a partir de las ecuaciones normales, las siguientes son la solución a las ecuaciones normales:

$$b = \frac{\left(\sum_{i=1}^n y_i\right)\left(\sum_{i=1}^n x_i^2\right) - \left(\sum_{i=1}^n x_i\right)\left(\sum_{i=1}^n x_i y_i\right)}{n\left(\sum_{i=1}^n x_i^2\right) - \left(\sum_{i=1}^n x_i\right)^2}$$

$$m = \frac{n\sum_{i=1}^n x_i y_i - \left(\sum_{i=1}^n x_i\right)\left(\sum_{i=1}^n y_i\right)}{n\sum_{i=1}^n x_i^2 - \left(\sum_{i=1}^n x_i\right)^2}$$

El resultado de m también puede escribirse como: $m = \frac{\sum_{i=1}^n [(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})]}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$

Intervalo de confianza sobre la ordenada al origen y pendiente.

Así mismo, se calculan los intervalos de confianza (IC) para la pendiente y la ordenada:

Intervalo de confianza sobre la ordenada $\beta = b \pm t_{\alpha/2} \cdot s_e \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{\bar{x}^2}{S_{xx}}}$

Intervalo de confianza sobre la pendiente $\mu = m \pm t_{\alpha/2} \cdot s_e \frac{1}{\sqrt{S_{xx}}}$

donde $t_{\alpha/2}$ es el valor de la función t de Student, con un riesgo α y n-2 grados de libertad.

n es el número de parejas experimentales y S_e , \bar{x}^2 y S_{xx} se calculan según:

$$S_{xx} = \sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n} \quad S_{yy} = \sum y^2 - \frac{(\sum y)^2}{n} \quad S_{xy} = \sum xy - \frac{(\sum x)(\sum y)}{n}$$

$$s_e^2 = \frac{S_{yy} - \frac{(S_{xy})^2}{S_{xx}}}{n-2} \quad \bar{x} = \frac{\sum x}{n}$$

Intervalo de confianza sobre los valores de calibración

Éste intervalo es conocido como cinturón de confianza y nos proporciona información sobre si un punto de la calibración (x_{stdr} , y_{stdr}) está fuera de la recta y lo podemos rechazar (con un riesgo α) como valor aberrante:

$$y_{stdr} = (m \cdot x_{stdr} + b) \pm t_{\alpha/2} \cdot s_e \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{(x_{stdr} - \bar{x})^2}{S_{xx}}}$$

Intervalo de predicción de una regresión lineal

La curva de calibración la utilizamos posteriormente para medir muestras (al conocer x_{mtra} podemos estimar y_{mtra}) problema. Este intervalo de predicción lo utilizamos mucho, ya que es el que permite estimar la incertidumbre de las mediciones de problemas que realicemos y está dado por:

$$y_{mtra} = (m \cdot x_{mtra} + b) \pm t_{\alpha/2} \cdot s_e \sqrt{1 + \frac{1}{n} + \frac{(x_{mtra} - \bar{x})^2}{S_{xx}}}$$

NOTA 1: El cálculo de los intervalos de confianza sobre la ordenada y la pendiente fueron calculados considerando un riesgo del 5%.

Pruebas de hipótesis sobre las estimaciones de una recta

Estas pruebas pueden ser realizadas sobre la ordenada, la pendiente, un valor de calibración o una muestra problema. En este trabajo se realizó prueba de hipótesis sobre la ordenada, donde la H_0 (hipótesis nula) es que la ordenada al origen sea igual a cero y la hipótesis alterna (H_1) que la ordenada al origen sea diferente de cero. Por lo anterior el

estadístico de prueba es: $t_{exp} = \frac{(b - \beta)}{s_e \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{\bar{x}^2}{S_{xx}}}}$. El criterio de decisión depende de la hipótesis

alterna:

Hipótesis alterna	Rechazamos la hipótesis nula si:
variable menor a la referencia	$t_{exp} < -t_{\alpha}$
variable mayor a la referencia	$t_{exp} > t_{\alpha}$
variable diferente a la referencia	$t_{exp} < -t_{\alpha/2}$ ó $t_{exp} > t_{\alpha/2}$

APÉNDICE A2

Gráfico A2.1. Curva de calibración para malatión en agua pura (ASTM Tipo "I"), con intervalo de concentración de 5-60 ng/mL.

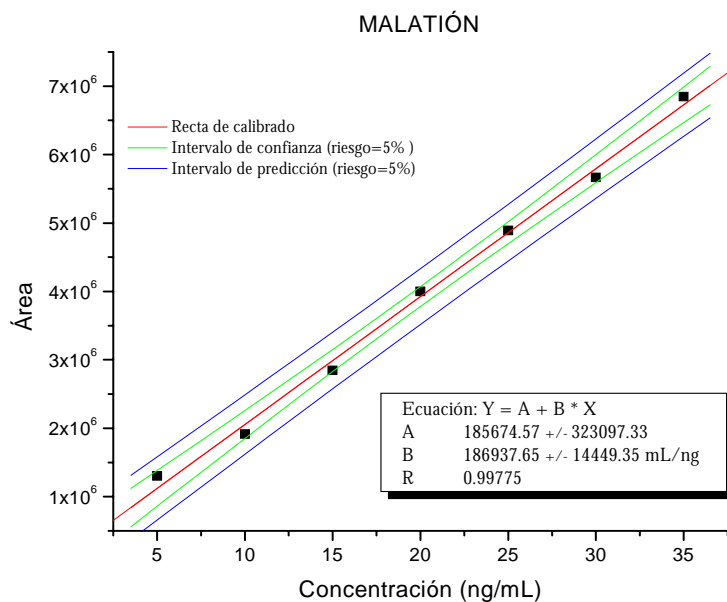


Gráfico A2.2. Curva de calibración para paratión en agua pura (ASTM Tipo "I"), con intervalo de concentración de 5-60 ng/mL.

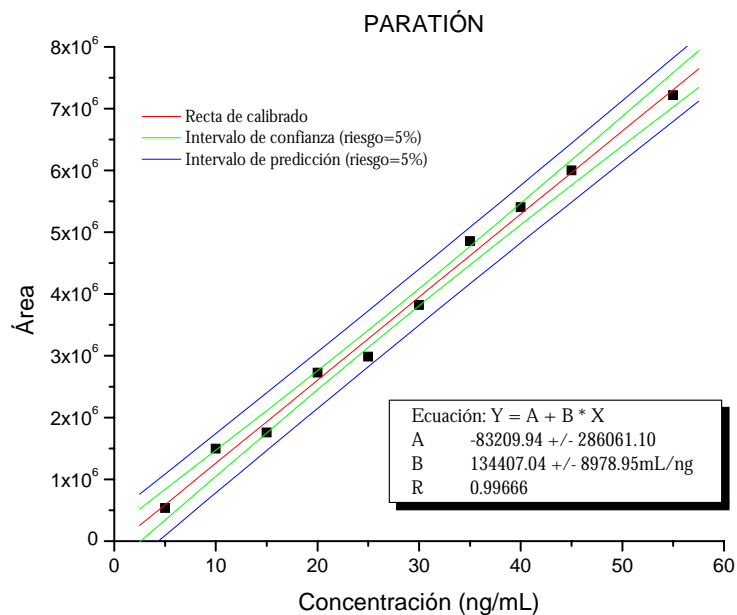


Gráfico A2.3. Curva de calibración para EPN en agua pura (ASTM Tipo "I"), con intervalo de concentración de 5-60 ng/mL.

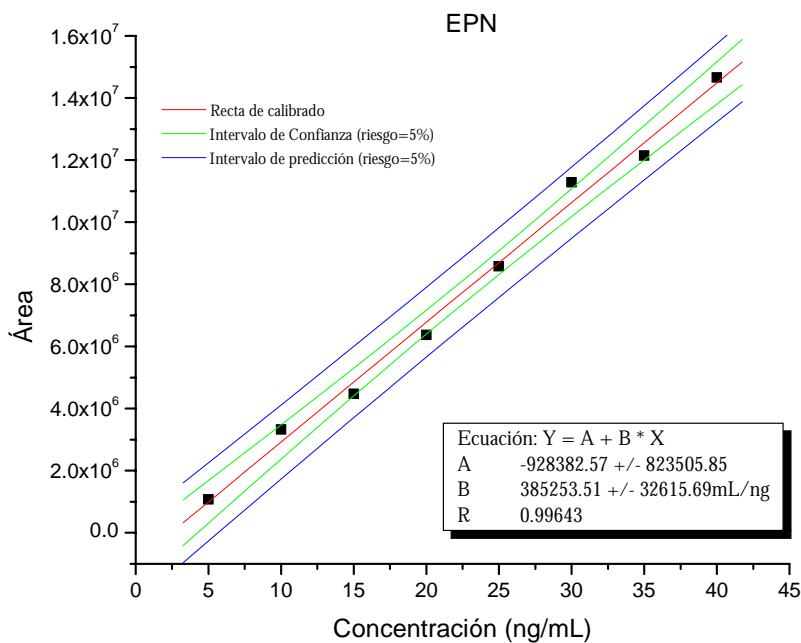


Gráfico A2.4. Curva de calibración para malatión en agua pura (ASTM Tipo "I"), con intervalo de concentración de 0.5-5 ng/mL.

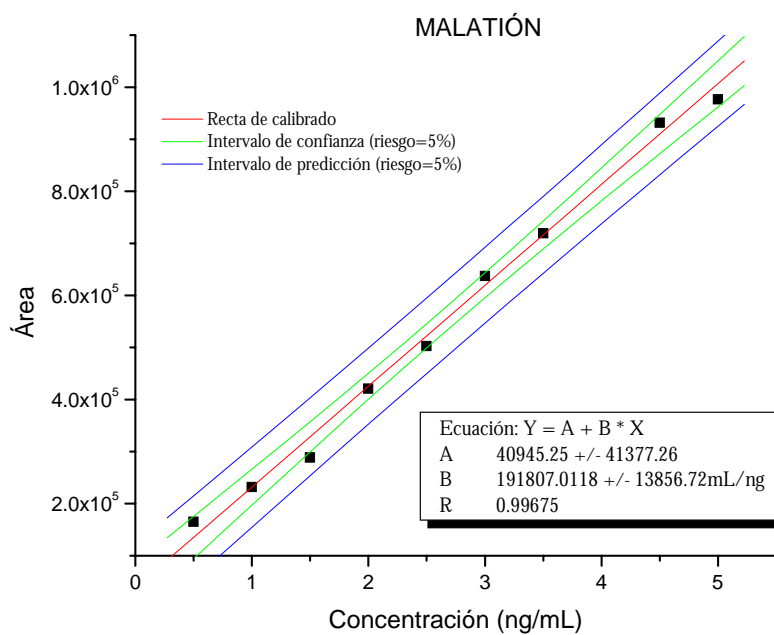


Gráfico A2. 5. Curva de calibración para paratió en agua pura (ASTM Tipo “I”), con intervalo de concentración de 0.5-5 ng/mL.

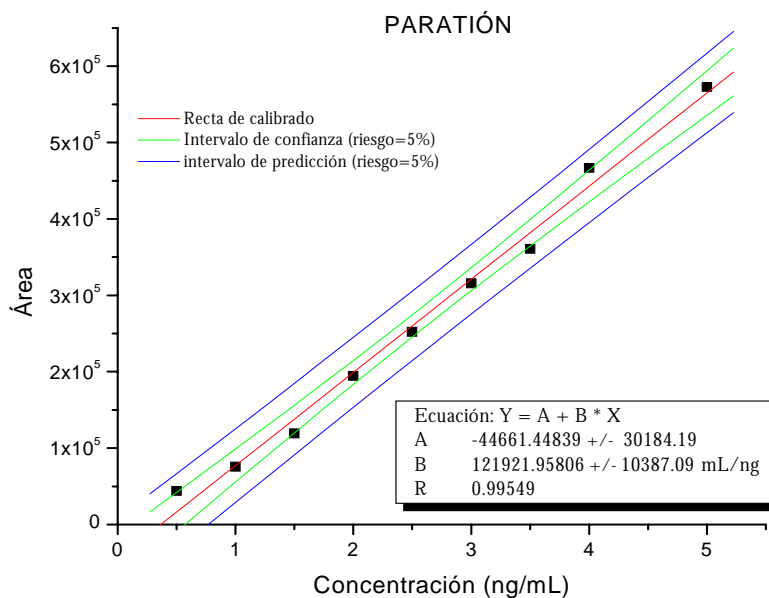
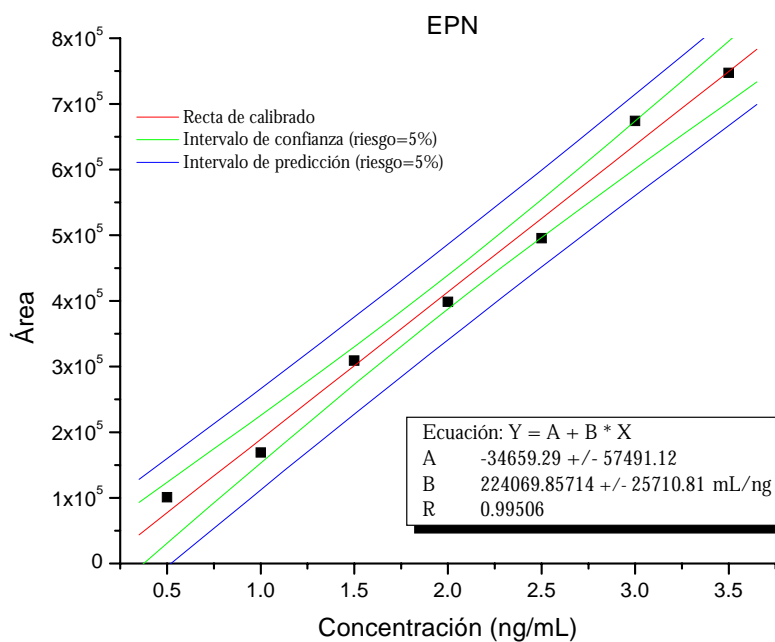


Gráfico A2. 6. Curva de calibración para EPN plaguicida en agua pura (ASTM Tipo “I”), con intervalo de concentración de 0.5-5 ng/mL.



APÉNDICE A3

Gráfico A3. 1. Curva de calibración para malatión en agua potable, con intervalo de concentración de 5-60 ng/mL.

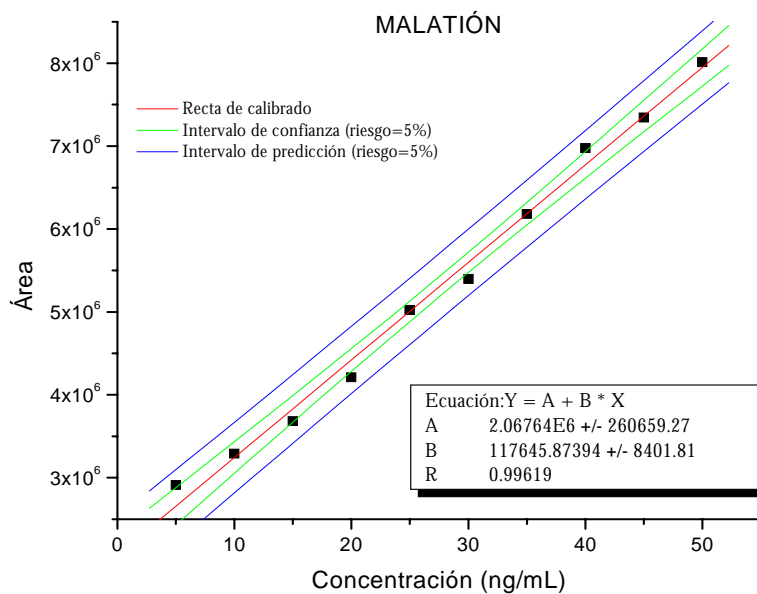


Gráfico A3. 2. Curva de calibración para paratión en agua potable, con intervalo de concentración de 5-60 ng/mL.

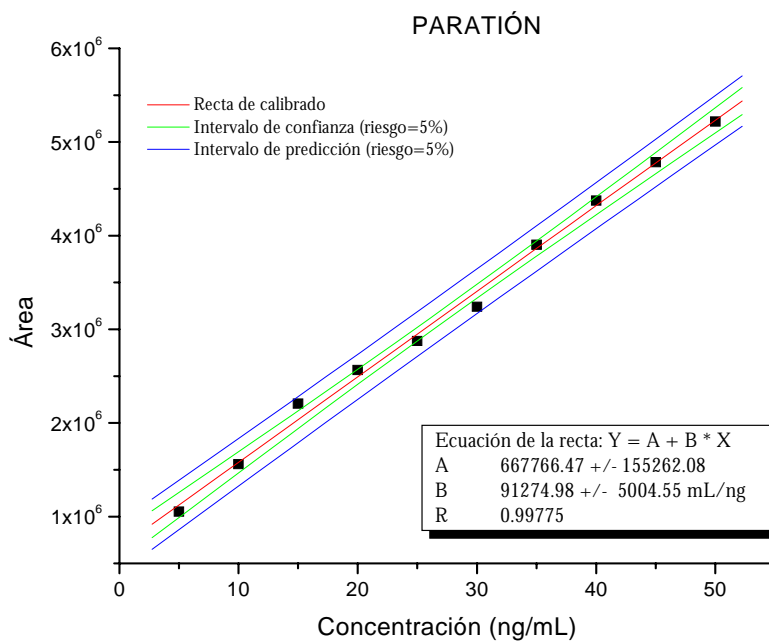


Gráfico A3. 3. Curvas de calibración para EPN en agua potable, con intervalo de concentración de 5-60 ng/mL.

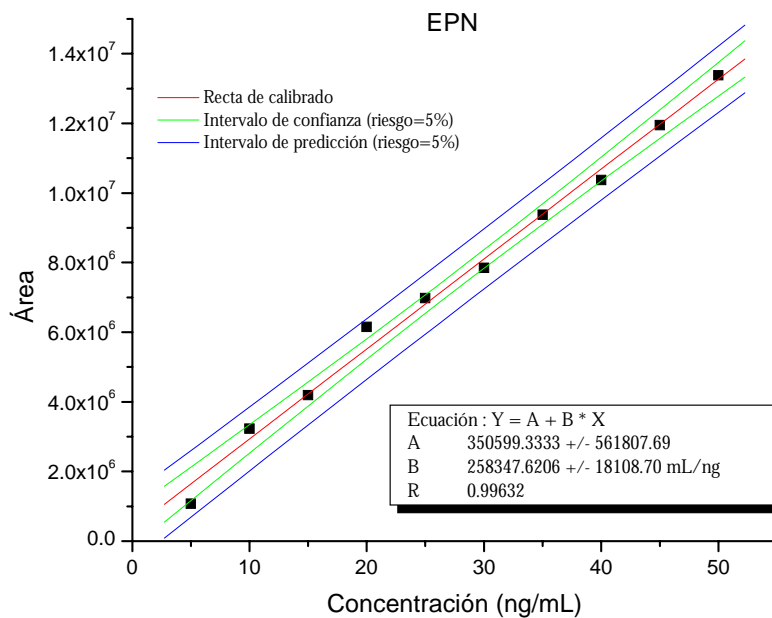


Gráfico A3. 4. Curvas de calibración para malatión en agua potable, con intervalo de concentración de 0.5-5 ng/mL.

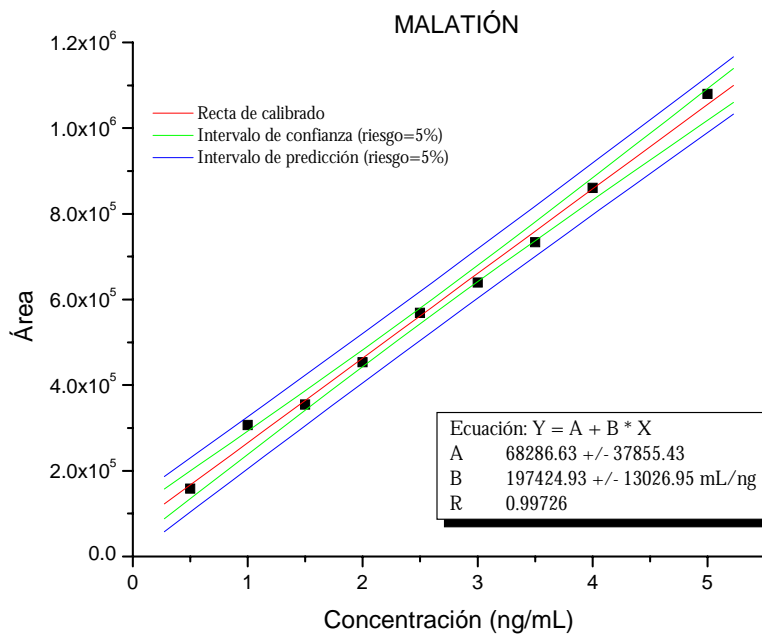


Gráfico A3. 5. Curva de calibración para paratión en agua potable, con intervalo de concentración de 0.5-5 ng/mL.

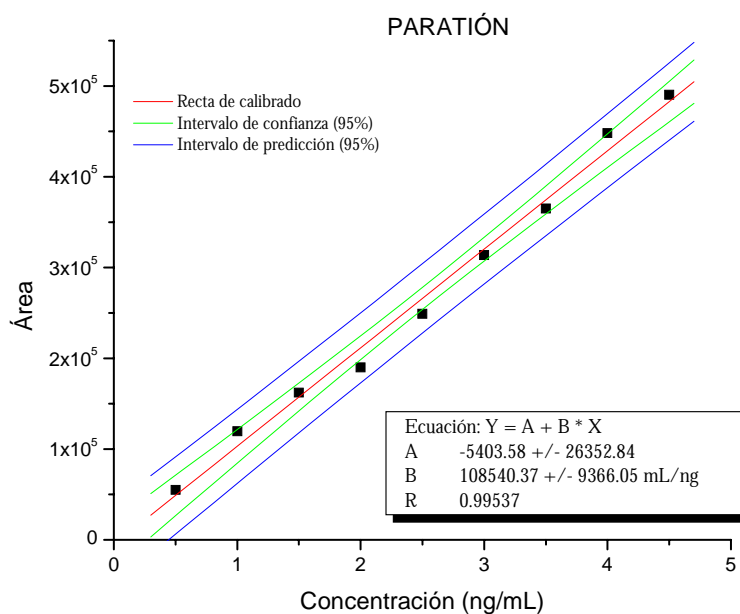
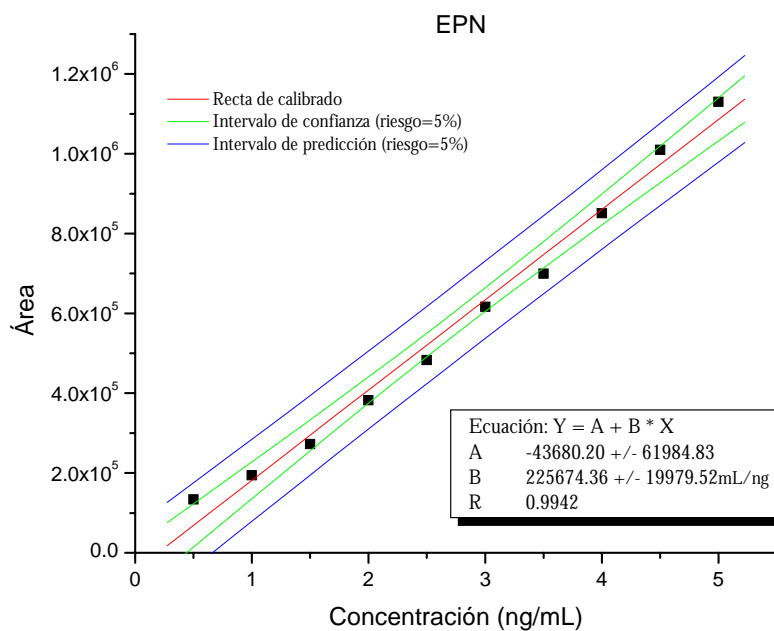


Gráfico A3. 6. Curva de calibración para EPN en agua potable, con intervalo de concentración de 0.5-5 ng/mL.



NOTA 2: Los intervalos o cinturones de confianza y de predicción en cada curva de calibración, así como las pruebas de hipótesis fueron calculados considerando un riesgo del 5%.

APÉNDICE A4

Límite de detección y límite de cuantificación

En términos generales, el límite de detección (LD ó LOD) de un analito se puede describir como aquella concentración una señal en el instrumento (y) significativamente diferente de la señal del blanco o ruido de fondo. Por lo que generalmente se define como la concentración de analito que proporciona una señal igual al blanco (y_B), más tres veces la desviación estándar del blanco (S_B):

$$\text{Límite de detección (LOD ó LD)} = y_B + 3s_B$$

Para estimar el límite de detección se utiliza la ecuación 1 con los valores de $y_B = b$, donde b es la ordenada en el origen de la recta de mínimos cuadrados y , $s_B = s_{x/y}$, donde $s_{x/y}$ está

dada por la siguiente ecuación: $s_{x/y} = \sqrt{\frac{\sum_i (y_i - \bar{y}_i)^2}{n-2}}$

Para definir el límite de cuantificación (LC ó LOQ). El cual es considerado como el límite inferior para medidas cuantitativas precisas, generalmente se utiliza la siguiente ecuación:

$$\text{Límite de cuantificación (LOQ ó LC)} = y_B + 10s_B$$

Para el cálculo con la curva de calibración se presenta la plantilla de donde se obtuvo la información, la cual está basada en las ecuaciones descritas anteriormente.

APÉNDICE A5

PRECISIÓN

Medidas de dispersión

Varianza poblacional

$\hat{\sigma}^2 = s^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}$ donde s^2 es el estimador de la varianza poblacional (σ^2) obtenido a partir de una muestra.

Desviación estándar poblacional

$\hat{\sigma} = s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$ donde s es el estimador de la desviación estándar poblacional (σ) obtenido a partir de una muestra.

Ecuación comúnmente usada para el cálculo de la desviación estándar poblacional:

$$s = \sqrt{\frac{n \sum_{i=1}^n x_i^2 - \left(\sum_{i=1}^n x_i\right)^2}{n(n-1)}}$$

Coefficiente de variación porcentual (medida relativa)

$$V = 100 * \frac{s}{\bar{x}}$$

Distribuciones muestrales

Distribución muestral de la media

$$\mu = \bar{x} \pm t_{\alpha/2} * \frac{s}{\sqrt{n}}$$

Donde n es el número de datos experimentales, \bar{x} y s son la media y desviación estándar estimadas y $t_{\alpha/2}$ es la variable de la distribución t de student con un riesgo α y $n-1$ grados de libertad. Una consecuencia de esta distribución es el efecto del número de réplicas (mediciones de una sola muestra) sobre la incertidumbre experimental, el cual se ilustra en la siguiente figura para diferentes niveles de riesgo (1%, 5% y 10%).

Hipótesis relativas a una variancia

Utilizamos esta prueba cuando queremos saber si la dispersión de nuestros resultados experimentales cumple determinada condición. Para desarrollarla calculamos la ji-cuadrada experimental y la comparamos contra valores de tablas. El valor experimental se obtiene con: $\chi_{\text{exp}}^2 = \frac{(n-1)s^2}{\sigma_o^2}$, donde s^2 es la variancia experimental y σ_o^2 es la variancia

contra la que estamos comparando nuestros valores, por ejemplo, si queremos saber si la dispersión de nuestros valores es menor al 5%, usaremos $\sigma_o^2 = (0.05 * \bar{x})^2$. La hipótesis nula es que nuestra variancia experimental es igual al valor contra el que estamos comparando. La decisión de aceptarla o rechazarla depende de cual sea la hipótesis alterna y para ello se utiliza la siguiente tabla:

Hipótesis alterna	Rechazamos la hipótesis nula si:
$\sigma^2 < \sigma_o^2$	$\chi_{\text{exp}}^2 < \chi_{1-\alpha}^2$
$\sigma^2 > \sigma_o^2$	$\chi_{\text{exp}}^2 > \chi_{\alpha}^2$
$\sigma^2 \neq \sigma_o^2$	$\chi_{\text{exp}}^2 < \chi_{1-\alpha/2}^2$ ó $\chi_{\text{exp}}^2 > \chi_{\alpha/2}^2$

BIBLIOGRAFÍA

A

Aguilar, Peñalver, Pocurull, Marcé, Borrul. *Solid-phase microextraction and gas chromatography with mass spectrometric detection for the determination of pesticides in aqueous samples*. Journal of Chromatography A, 795 (1998) 105–115.

Albert, L. *Panorama de los plaguicidas en México*. Servicios de Salud de Nayarit y Comisión Federal de Protección contra riesgos Sanitarios (COFEPRIS). Nayarit, México, 2005.

B

Barberá, Claudio. *Pesticidas agrícolas*. OMEGA. Barcelona, España, 1989.

Beceiro-González E., Concha-Graña E., Muniategui-Lorenzo S., Alpendurada M. F. *Optimisation and validation of a solid-phase microextraction method for simultaneous determination of different types of pesticides in water by gas chromatography–mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 1141 (2007) 165–173.

Beltran J., López F. J., Hernández F. *Solid-phase microextraction in pesticides residue analysis*. Journal of Chromatography A, 885 (2000) 389-404.

Berijani S., Assadi Y., Anbia M. *Dispersive liquid–liquid microextraction combined with gas chromatography- flame photometric detection Very simple, rapid and sensitive method for the determination of organophosphorus pesticides in water*. Journal of Chromatography A, 1123 (2006) 1–9.

Bonilla M., Sara. *Evaluación para identificar prioridades de rehabilitación en el humedal de Cuitzamala, Jalisco*. (Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas). UNAM. Instituto de Ecología, México, 2007.

Botello, A. V. *Golfo de México, Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnóstico y Tendencias*. Centro EPOMEX, Universidad autónoma de Campeche, México, 2005

C

CICLOPLAFEST. Comisión Intersecretarial para el control del proceso y uso de plaguicidas, fertilizantes y sustancias tóxicas. Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. Secretaría del Medio Ambiente, recursos Naturales y Pesca. Secretaría de Salud. Secretaría de Comercio y Fomento Industrial. *Catálogo Oficial de plaguicidas*, 2004.

Campillo, Natalia. *Pesticide analysis in herbal infusions by solid-phase microextraction and gas chromatography with atomic emission detection*. Talanta 71 (2007) 1417–1423.

Capobianco H. and Cardeal Z. *A Solid-Phase Microextraction Method for the Chromatographic Determination of Organophosphorus Pesticides in Fish, Water, Potatoes, Guava and Coffee*. Journal of the Brazilian Chemical Society, No. 5, Vol. 16 (2005), 907-914.

Chanbasha B., Alnedhary A., Madhava Rao. *Determination of organophosphorus pesticides in wastewater sample using binary-solvent liquid-phase microextraction and solid-phase microextraction: A comparative study*. Analytica Chimica Acta, 605(2007) 147-152.

E

Environmental Protection Agency, US. *Pesticides Home*. <http://www.epa.gov/pesticides>

EPA: Environmental Protection Agency. METHOD 8141B. *Organophosphorus compounds by gas chromatography*. USA, November 2000.

EPA: Environmental Protection Agency. METHOD 8270D. *Semivolatile organic compounds by gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS)*. USA, Enero 1998.

F

Fidalgo-Used, Natalia. *Determination of organophosphorus pesticides in spiked river water samples using solid phase microextraction coupled to gas chromatography with EI-MS and ICP-MS detection*. Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 20 (2005) 876–882.

Flynt E., Dupuy A., Kennedy C., Bennett S. *Solid-Phase Microextraction of Organophosphate Pesticides in Source Waters for Drinking Water. Treatment Facilities*. Journal of Chromatographic Science, 44 (2006) 484-488.

Fort D. J., Powers, J.K. Delphon S.L. *Solid Phase Microextraction of Organophosphate Insecticides and Analysis by Capillary GC/MS*. Supelco. Application Note 94 (1999)

Fytianos K., Raikos N., Theodoridis G. *Solid phase microextraction applied to the analysis of organophosphorus insecticides in fruits*. Chemosphere, 65 (2006) 2090-2095.

G

Gallardo E., Barroso M., Margalho C., Cruz A. *Solid-phase microextraction for gas chromatographic/mass spectrometric analysis of dimethoate in human biological samples*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 20 (2006) 865-869.

Gallardo E., Barroso M., Margalho C., Cruz A. *Determination of parathion in biological fluids by means of direct solid-phase microextraction*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 386(2006) 1717-1726.

Garrido-Frenich A., Romero-González, R., Martínez-Vidal J.L., Plaza-Bolaños P., Cuadros-Rodríguez L., Herrera-Abdo M. A.. *Characterization of recovery profiles using gas chromatography-triple quadrupole mass spectrometry for the determination of pesticide residues in meat samples*. Journal of Chromatography A, 1133 (2006) 315–321.

Gonçalves C., Alpendurada M. F. *Comparison of three different poly(dimethylsiloxane)-divinylbenzene fibres for the analysis of pesticides multiresidues in water samples: structure and efficiency*. Journal of Chromatography A, 963 (2002) 19-26.

Gonçalves C., Alpendurada M. F. *Multiresidue method for the simultaneous determination of four groups of pesticides in ground and drinking waters, using solid-phase microextraction–gas chromatography with electron-capture and thermionic specific detection*. Journal of Chromatography A, 968 (2002) 177–190.

György Vas, Károly Vékey. *Solid-phase microextraction: a powerful sample preparation tool prior to mass spectrometric analysis*. Journal of Mass Spectrometry, 39 (2004) 233-254.

H

Hassall, K.A. *The biochemistry and uses of pesticides. Structure, metabolism, mode of action and uses in crop protection*. Ed. MacMillan. 2da ed, Hong Kong, 1990.

Hildebrandt A., Lacorte S., Barceló D. *Assessment of priority pesticides, degradation products, and pesticide adjuvants in groundwaters and top soils from agricultural areas of the Ebro river basin*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 387(2007) 1459–1468.

J

Johnson, Richard A. **Probabilidad y estadística para ingenieros de Millar y Freund**. Ed. Prentice-Hall Hispanoamericana. 5° ed., México, 1997.

Juhler, R.K. *Optimized method for the determination of organophosphorus pesticides in meat and fatty matrices*. Journal of Chromatography A, 786 (1997) 145-153.

K

Konstantinou I. K., Albanis T., Lambropoulou D. *Recent developments in headspace microextraction techniques for the analysis of environmental contaminants in different matrices*. Journal of Chromatography A, 1152 (2007) 70-96.

Krutz L. J., Senseman S. A., Sciumbato A. S. *Solid-phase microextraction for herbicide determination in environmental samples*. Journal of Chromatography A, 999(2003) 103-121.

L

Lambropoulou D., Sakkas, Albanis T. *Validation of an SPME method, using PDMS, PA, PDMS-DVB, and CW-DVB SPME fiber coatings, for analysis of organophosphorus insecticides in natural waters*. Analytical Bioanalytical Chemistry, 374 (2002) 932-941.

Lambropoulou D., Sakellarides T., Albanis T. *Determination of organophosphorus insecticides in natural waters using SPE-disks and SPME followed by GC/FTD and GC/MS*. Fresenius' Journal of analytical Chemistry, 368 (2000) 616-623.

Lambropoulou D. *Application of solid-phase microextraction in the monitoring of priority pesticides in the Kalamas River (N.W. Greece)*. Journal of Chromatography A, 963 (2002) 107-116.

López T. Diana M. *Elaboración de criterios para la restauración de la cuenca del Río Cuitzamala, Jalisco con base en el análisis de agua*. (Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas). UNAM. Instituto de Ecología, México, 2008.

M

Mc Nair, H.M. & Miller, J.M. *Basic Gas Chromatography*. Ed. John Wiley & Sons Inc., New York, USA, 1998

Miller J. N., Miller J. C. *Estadística y Quimiometría para Química Analítica*. Prentice Hall, 4ª ed. Madrid, España, 2002.

Magdic S., Boyd-Boland A., Jinno K., Pawliszyn J. *Analysis of organophosphorus insecticides from environmental samples using solid-phase microextraction*. Journal of Chromatography A, 736 (1996) 219-228.

Musshoff F., Junker H. and Madea B. *Simple Determination of 22 organophosphorus pesticides in human blood using headspace Solid-phase Micro-extraction and gas Chromatography with Mass Spectrometric Detection*. Journal of Chromatographic Science, 40 (2002) 29-34.

N

Noble, Alan. *Partition coefficients (n-octanol-water) for pesticides. Review*. Journal of Chromatography, 642 (1993) 3-14.

O

Office of Pesticides Programs. *Organophosphorus Cumulative Risk Assessment*. Environmental Protection Agency, 2006.

P

Pawliszyn, J. *Solid Phase Microextraction: Theory and Practice*. Wiley-VCH Inc, New York, USA, 1997.

Pawliszyn, J. *Applications of Solid Phase Microextraction*. The Royal Society of Chemistry. Cambridge, UK, 1999.

Peñalver A., Pocurull E., Borrull F., Marcé R. M. *Trends in solid-phase microextraction for determining organic pollutants in environmental samples*. Trends in Analytical Chemistry, No. 8, Vol. 18 (1999) 557-568

Picó, J. A, Font G. *Revisión de los métodos de determinación de residuos de plaguicidas organofosforados en alimentos*. Revista toxicológica. 20 (2003) 166-175.

Prieto-Blanco M. C., Cháfer-Pericás C., López-Mahía P. and Campíns-Falcó. *Automated on-line in-tube Solid-phase Microextraction-assisted derivatization coupled to liquid chromatography for quantifying residual dimethylamine in cationic polymers*. Journal of Chromatography A, 1188 (2008) 118-123

Prosen, Helena. *Solid-phase microextraction*. Trends in Analytical Chemistry, No. 4 Vol. 18 (1999) 272-281

R

Restrepo, Iván. *Los plaguicidas en México*. Comisión Nacional de Derechos Humanos. Ed. Amanuense, México, 1992

Rodríguez I., Calvo F., Quintana J. B. *Suitability of solid-phase microextraction for the determination of organophosphate flame retardants and plasticizers in water samples*. Journal of Chromatography A, 1108 (2006) 158–165.

Ruberson, Jonh (Edited by). *Handbook of Pesticide Toxicology. Vol. 2*. K. Academic Press. 2da ed., USA 2001.

S

Sánchez-Brunete C., Albero B., Martín G. and Tadeo J. L. *Determination of Pesticide Residues by GC-MS using analyte protectants to counteract the matrix effect*. Analytical sciences, 21 (2005) 1291-1296.

Sauret-Szczepanski N., Mirabel P., Wortham H. *Development of an SPME-GC-MS/MS method for the determination of pesticides in rainwater: Laboratory and field experiments*. Environmental Pollution, 139 (2006) 133-142.

Secretaría de Medio Ambiente, Recursos Naturales (SEMARNAT). Instituto Nacional de Ecología. **Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Reserva de la Biosfera Chamela-Cuixmala, 1996.**

Skoog D. D., Holler F. J., Mieman, T. A. *Principios de análisis instrumental*. Mc Graw Hill, 5ª ed. Madrid, España, 2001.

T

Tomlin, Clive (Edited by). *The pesticide manual. Incorporating the Agrochemicals Handbook*. British Crop Protection. The Royal Society of Chemistry. Cambridge, The British, 1994.

Tsoukali H., Theodoridis G., Raikos N. Grigoratou I. *Solid phase microextraction gas chromatographic analysis of organophosphorus pesticides in biological samples*. Journal of Chromatography B, 822 (2006) 194-200.

W

Watson, J. T. *Introduction to Mass Spectrometry*. Ed. Lippincott-Raven. New York, USA, 1997.

Wardencki W., Curylo J., Namiesnik J. *Trends in solventless sample preparation techniques for environmental analysis*. Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 70 (2007) 275-288.

X

Xiaoyan Liu, Yongsheng Ji, Yonghui Zhanl. *Oxidized multiwalled carbon nanotubes as a novel solid-phase microextraction fiber for determination of phenols in aqueous samples*. Journal of Chromatography A, 1165(2007) 10-17.

Xia Shen, Jibao Cai, Yun Gao and Qingde Su. *Determination of Organophosphorus Pesticides in Soil by MMSPD-GC-NPD and Confirmation by GC-MS*. Chromatographia, 64(2006) 71-77.