

DOCUMENTACIÓN DE LAS TENDENCIAS EN EL ANÁLISIS DE PLAGUICIDAS  
EN MUESTRAS DE LECHE CRUDA

SEBASTIAN MEJÍA RAMÍREZ  
ANDRÉS FELIPE VILLEGAS CARMONA

UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA  
FACULTAD DE TECNOLOGÍA  
ESCUELA DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE TECNOLOGÍA QUÍMICA  
PEREIRA  
2012

DOCUMENTACIÓN DE LAS TENDENCIAS EN EL ANÁLISIS DE PLAGUICIDAS  
EN MUESTRAS DE LECHE CRUDA

SEBASTIAN MEJÍA RAMÍREZ  
ANDRÉS FELIPE VILLEGAS CARMONA

TRABAJO DE GRADO  
Requisito final para optar el título de Tecnólogo Químico

Director  
Qco. MSc. JUAN PABLO ARRUBLA VÉLEZ

Asesor  
Qco. Ind. CARLOS HUMBERTO MONTOYA NAVARRETE

UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA  
FACULTAD DE TECNOLOGÍA  
ESCUELA DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE TECNOLOGÍA QUÍMICA  
PEREIRA  
2012

Nota de aceptación

-----  
-----  
-----  
-----  
-----

\_\_\_\_\_  
Presidente del Jurado

\_\_\_\_\_  
Jurado

\_\_\_\_\_  
Jurado

## **DEDICATORIA**

A nuestras familias que nos alentaron en las dificultades y obstáculos vividos en nuestro proceso formativo, como en las felicidades de los logros obtenidos. Siempre significaron un apoyo incondicional en cualquier circunstancia.

A nuestros amigos y amigas que nos acompañaron en todo este tiempo, nos compartieron las alegrías y los recuerdos que hacen inolvidable este gran paso.

## **AGRADECIMIENTOS**

A los docentes de la escuela de química que nos compartieron el conocimiento y el gusto por el estudio de esta grandiosa ciencia desde el primer día de clase hasta la última practica de laboratorio, en especial a nuestro director de trabajo de grado, el profesor Juan Pablo Arrubla Vélez.

A todos los funcionarios administrativos de la escuela de química que con su dedicada labor fueron un gran apoyo en todo nuestro proceso formativo, en especial a Maria Victoria, Javier y Germán.

A los compañeros que prestaron dedicación y colaboración desde su labor de monitor de laboratorio y que con sus conocimientos nos ayudaron en la consolidación de este proyecto.

## GLOSARIO

**Adsorbente:** Tipo de material sólido capaz de retener selectivamente sustancias provenientes de matrices acuosas o gaseosas.

**Analito:** Es el componente de interés analítico de una muestra. Puede ser un elemento, un ion o una molécula. Son especies cuya concentración se desea conocer.

**Carbohidrato:** Se refiere a moléculas compuestas por carbono, hidrógeno y oxígeno.

**Columna cromatográfica:** Corresponde al sitio en donde se lleva a cabo la separación de los componentes. Allí se aloja la fase estacionaria, de modo que la fase móvil fluya a través de la primera y los analitos se distribuyan según sus afinidades.

**Cromatografía:** Método químico para la separación de los componentes de una mezcla por distribución entre dos fases inmiscibles, una estacionaria y otra móvil.

**Cromatografía de gases (GC):** Técnica analítica útil en la separación, identificación y cuantificación de los compuestos de una mezcla. Se fundamenta en la diferencia de velocidades de migración de sus compuestos individuales al ser arrastrados por un gas inerte a través de una columna de cromatografía que soporta un medio líquido fijo o estacionario.

**Cromatograma:** Representación gráfica de los picos de elución de una mezcla en un plano de coordenadas en cuya abscisa se encuentra el tiempo o volumen de retención y en ordenadas la señal del detector en mv. Es el registro obtenido al representar gráficamente la salida de los distintos componentes de una mezcla.

**Desorción:** Es el proceso que remueve sustancias retenidas desde un material adsorbente.

**Detector:** Dispositivo que responde a cierta característica del sistema que está sujeto a observación y convierte esa respuesta en una señal susceptible de medirse.

**Dosis letal 50:** Cantidad de sustancia necesaria por kilogramo de peso de una animal para matar el 50% de la población.

**Enzima:** Son moléculas de tipo proteico que catalizan reacciones químicas al interior de un organismo, siempre que sea termodinámicamente estable.

**Espectrometría de masas:** Técnica analítica empleada para identificar compuestos desconocidos, para cuantificar compuestos conocidos y para elucidar la estructura de moléculas, a través de la determinación exacta de la masa molecular y la de sus respectivos fragmentos.

**Estandarización:** Es el conjunto de procesos que buscan establecer la forma de realizar una actividad, de manera adecuada, lógica y secuencial. Consiste en la redacción y aprobación de normas que se establecen para garantizar la calidad de un proceso.

**Exactitud:** Es la medida de la cercanía entre el valor medido y el valor real de un resultado.

**Extracción:** Procedimiento químico que busca separar uno o más compuestos de interés de otros que no lo son.

**Extracción en fase Sólida (SPE):** Técnica analítica por medio de la cual se emplea una matriz sólida, ya sea para purificar una muestra y retener compuestos que no interesan, como para retenerlos.

**Extracción líquido-líquido:** Procedimiento analítico por medio del cual se separa uno o varios compuestos de una muestra, a través de la diferencia de solubilidad de los mismos entre dos solventes inmiscibles.

**Ganadería:** Actividad económica dedicada a la crianza de animales para el aprovechamiento de estos.

**Grasa:** Término genérico que hace referencia a varias clases de moléculas de tipo lipídico, ya sean saturadas o insaturadas.

**Leche cruda:** Es la leche que ha sido extraída de cualquier animal mamífero y que no ha sido sometida a ningún tipo de tratamiento antes de su consumo.

**Límite de cuantificación:** cantidad más pequeña del analito en una muestra que puede ser cuantitativamente determinada con exactitud aceptable.

**Límite de detección:** Cantidad más pequeña de analito en una muestra que puede ser detectada por una única medición, con un nivel de confianza determinado, pero no necesariamente cuantificada con un valor exacto. Es comúnmente expresado como concentración del analito.

**Matriz:** Conjunto de sustancias que constituyen el medio en el que se encuentra un analito.

**Pastoreo:** Actividad por medio de la cual, los animales consumen pasto en un área definida y destinada para tales fines.

**Plaguicida:** Se le denomina plaguicida a toda sustancia química, pura o mezclada destinada a la prevención, destrucción, repulsión o disminución de cualquier plaga.

**Platos teóricos:** Son las unidades por medio de las cuales se busca medir la eficiencia de una columna cromatográfica.

**Precisión:** Es la capacidad que tiene un instrumento de dar el mismo resultado en diferentes mediciones realizadas bajo las mismas condiciones.

**Split:** Sistema de introducción de muestra en cromatografía de gases que consiste en un inyector-divisor (Split), que toma 1  $\mu\text{L}$  de muestra e inyecta 0.01  $\mu\text{L}$ .

**Splitless:** Sistema de introducción directa (sin divisor) de muestra en cromatografía de gases. Se usa cuando la cantidad de muestra es muy poco y la concentración de los analitos es muy baja.

**Validación:** Confirmación mediante el suministro de evidencia objetiva de que se han cumplido los requisitos para una utilización o aplicación específica prevista.

**Vaporización:** Proceso que busca pasar rápidamente una muestra de la fase líquida a la fase gaseosa.

**Vitamina:** Son compuestos imprescindibles para la vida, que al ingerirlos en forma equilibrada y en dosis esenciales, promueven un correcto funcionamiento fisiológico.



## RESUMEN

En el presente documento se hace una descripción de la evolución en la producción lechera en los últimos 20 años en Colombia, a la vez que muestra el crecimiento paralelo en las áreas de suelos del país dedicados para la siembra de pasto para alimentar el ganado vacuno productor de leche.

En este sentido, se definen los plaguicidas y la función que estos cumplen como mecanismo de control, sobre las plagas que afectan la productividad de los cultivos de pasto, así como la forma en que estos llegan al ganado lechero. Se describe la importancia en la aplicación de metodologías analíticas modernas, sensibles y adecuadas para la determinación cualitativa y cuantitativa de dichos plaguicidas en la leche, para verificar si cumple con los estándares de calidad descritos por las normas vigentes.

Este documento recoge y compila las técnicas para preparación de muestras y de análisis instrumental, desarrolladas para el análisis de plaguicidas en leche cruda, además de estudiar la evolución de las metodologías de análisis en los últimos tiempos, se detallan las mejores combinaciones y adaptaciones más usadas y eficaces. Por último se muestran las tendencias agro-forestales para reducir el uso de plaguicidas y así atenuar el impacto en la salud y el medioambiente.

## CONTENIDO

INDICE DE FIGURAS.....	14
INDICE DE ANEXOS .....	15
JUSTIFICACIÓN .....	16
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	18
OBJETIVOS .....	19
CAPÍTULO 1 .....	20
GENERALIDADES.....	20
1.1 ASPECTOS GENERALES DE LA LECHE.....	20
1.1.1 Definición de leche .....	20
1.1.2 Clasificación.....	20
1.1.3 Contenido nutricional.....	21
1.1.3.1 Proteína.....	21
1.1.3.2 Grasa.....	21
1.1.3.3 Carbohidratos .....	21
1.1.3.4 Vitaminas .....	22
1.2 ESTADO DE LA AGROINDUSTRIA LECHERA EN COLOMBIA .....	22
1.3 ESTADO DE LOS CULTIVOS DE PASTO EN COLOMBIA .....	22
1.4 PLAGUICIDAS .....	24
1.4.1 Clasificación de los plaguicidas .....	24
1.4.1.1 Plaguicidas según su toxicidad .....	25
1.4.1.2 Plaguicidas según su familia química .....	25
1.4.2 Aplicaciones de los plaguicidas .....	26
1.4.3 Características químicas de los plaguicidas .....	26
1.4.3.1 Compuestos organoclorados.....	26
1.4.3.2 Compuestos organofosforados .....	28
1.4.3.3 Carbamatos.....	28
1.4.3.4 Piretroides .....	29
1.5 CARACTERÍSTICAS TOXICOLÓGICAS DE LOS PLAGUICIDAS .....	29
1.6 IMPACTO AMBIENTAL Y EN SERES VIVOS DEL USO DE PLAGUICIDAS .....	30
1.7 TENDENCIAS ACTUALES PARA EL CONTROL DE PLAGAS.....	31
CAPÍTULO 2 .....	33
TÉCNICAS DE PREPARACIÓN DE MUESTRAS .....	33

2.1 EXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO.....	33
2.1.1 Fundamento de la técnica .....	33
2.2 Extracción en fase sólida (SPE) .....	35
2.2.1 Fundamentos de la SPE .....	35
2.2.2 Parámetros involucrados en la SPE .....	36
2.2.2.1 Fuerzas intermoleculares .....	37
2.2.2.2 Rata de flujo.....	37
2.2.2.3 Fuerza eluotrópica .....	37
2.2.2.4 Propiedades del material adsorbente.....	38
2.2.3 Proponer un método preliminar.....	39
2.2.3.1 Selección del modo de extracción.....	40
2.2.3.2 <i>Cleanup</i> de la muestra.....	40
2.2.3.3 Remoción de la matriz .....	40
2.2.3.4 Selección del material adsorbente .....	41
2.2.3.5 Selección del solvente.....	42
2.3 MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA (SPME).....	43
2.3.1 Fundamentos de la SPME .....	44
2.3.2 Parámetros involucrados en la SPME .....	47
2.3.2.1 Materiales de recubrimiento .....	47
2.3.1.2 Procedimiento de extracción .....	47
2.3.1.3 Optimización de la desorción .....	49
2.3.1.4 Cuantificación .....	49
CAPÍTULO 3 .....	51
TÉCNICAS DE ANÁLISIS INSTRUMENTAL PARA LA DETERMINACIÓN DE PLAGUICIDAS .....	51
3.1 CROMATOGRAFÍA.....	51
3.1.1 Fundamentos de cromatografía.....	51
3.2 CROMATOGRAFÍA DE GASES.....	52
3.2.1 Componentes de un cromatógrafo de gases (GC).....	53
3.2.1.1 Puerto de inyección .....	54
3.2.1.1.1 Sistemas de Inyección de muestras en cromatografía de gases .....	55
3.2.1.2 Gas Portador.....	55
3.2.1.3 Columna cromatográfica.....	56
3.2.1.3.1 Soporte Sólido.....	57
3.2.1.3.2 Fase Estacionaria Líquida .....	57

3.2.1.4 Detectores.....	58
3.2.1.4.1 Clasificación de los detectores .....	59
3.2.1.4.1.1 Detectores Integrales .....	59
3.2.1.4.1.2 Detectores Diferenciales .....	60
3.2.1.4.1.3 Detectores Universales y Selectivos.....	60
3.2.1.4.1.4 Detectores destructivos y no destructivos .....	60
3.2.1.4.2 Detectores usados en el análisis de plaguicidas por cromatografía de gases .....	61
3.2.1.4.2.1 Detector de Ionización de llama (FID, Flame Ionization Detector). 61	
3.2.1.4.2.2 Detector de Captura Electrónica (ECD, Electron Capture Detector) .....	62
3.2.1.4.2.3 Detector Fotométrico de Llama (FPD, FlamePhotometric Detector) .....	62
3.2.1.4.2.4 Detector de Nitrógeno Fósforo (NPD, Nitrogen Phosphorus Detector).....	63
3.2.1.4.3 Detector de espectrometría de masas acoplado a cromatografía de gases. ....	63
3.2.1.4.3.1 Proceso de obtención del Espectro de Masas. ....	64
3.2.1.4.3.2 Sistema de Inyección de Muestras. ....	65
3.2.1.4.3.3 Fuentes de Ionización. ....	66
3.2.1.4.3.4 Analizadores de Masas .....	68
3.2.1.4.3.5 Detectores .....	70
3.3 CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTO RENDIMIENTO (HPLC). ....	73
3.3.1 Componentes de un equipo HPLC .....	76
3.3.1.1 Reservorio del solvente .....	77
3.3.1.2 Tuberías .....	78
3.3.1.3 Bomba de inyección .....	78
3.3.1.4 Sistema de gradientes .....	79
3.3.1.5 Inyectores.....	81
3.3.1.6 Detectores.....	81
3.3.1.6.1 Detector general.....	83
3.3.1.6.1.1 Detector de índice de refracción .....	83
3.3.1.6.2 Detectores selectivos .....	83
3.3.1.6.2.1 Detector UV .....	83
3.3.1.6.2.2 Detector de Onda Fija o Fotométrico .....	84
3.3.1.6.2.3 Detector de onda variable o Espectrofotométrico .....	84

3.3.1.6.2.4 Detector de fluorescencia .....	84
3.3.1.6.2.5 Detector electroquímico .....	85
3.3.1.6.2.6 Determinaciones de plaguicidas por HPLC/MS .....	85
3.3.2 Modalidades de operación de la HPLC .....	87
3.3.2.1 HPLC en fase normal (NP-HPLC, Normal phase-HPLC) .....	87
3.3.2.2 HPLC en fase reversa (RP-HPLC, Reverse Phase-HPLC).....	88
3.3.2.3 HPLC de intercambio iónico (IEX-HPLC, Ion-Exchange- HPLC).....	89
CAPITULO 4 .....	90
ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD .....	90
4.1 Estandarización .....	90
4.2 Parámetro de calidad .....	90
4.2.1 Exactitud .....	91
4.2.5 Límite de detección y límite de cuantificación .....	92
4.2.6 Linealidad y rango .....	92
4.2.7 Sensibilidad .....	93
4.2.8 Robustez.....	93
CAPITULO 5 .....	94
ESTUDIO DE CASO .....	94
5.1 Metodología 1: SPME-GC/ $\mu$ ECD.....	94
5.1.1 Preparación de la muestra .....	95
5.1.2 Análisis instrumental.....	96
5.2 Metodología 2: SPE-GC/MS .....	97
5.2.1 Preparación de muestras .....	98
5.2.2 Análisis instrumental.....	98
6. CONCLUSIONES .....	102
7. BIBLIOGRAFÍA .....	103
5. ANEXOS .....	106

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estructura Química del DDT.....	....27
<b>Figura 2.</b> Estructura química del clorpirifos.....	....28
<b>Figura 3.</b> Patrón estructural de los compuestos organofosforados.....	....28
<b>Figura 4.</b> Patrón estructural de los carbamatos.....	....28
<b>Figura 5.</b> Diagrama de proceso de extracción en fase solida.....	....36
<b>Figura 6.</b> Reacción de formación de derivados monofuncionales de la sílica.....	....38
<b>Figura 7.</b> Reacción de formación de derivados trifuncionales de la sílica.....	....39
<b>Figura 8.</b> Reacción de “endcapping” de los grupos silanol con trimetilclorosilano.....	....39
<b>Figura 9.</b> Estructura del material adsorbente cianopropil.....	....41
<b>Figura 10.</b> Estructura del material adsorbente octadecil.....	....42
<b>Figura 11.</b> Diagrama de proceso de extracción DI-SPME.....	....44
<b>Figura 12.</b> Diagrama de proceso de extracción HS-SPME.....	....45
<b>Figura 13.</b> Esquema general de un cromatógrafo de gases.....	....53
<b>Figura 14.</b> Representación de un cromatograma típico.....	....54
<b>Figura 15.</b> Representación de un cromatograma típico para un detector integral... ..	....59
<b>Figura 16.</b> Representación de un cromatograma típico para un detector diferencial.....	....60
<b>Figura 17.</b> Detector de ionización de llama.....	....61
<b>Figura 18.</b> Detector de captura de electrones.....	....62
<b>Figura 19.</b> Esquema general de un espectrómetro de masas.....	....65
<b>Figura 20.</b> Esquema de una analizador cuadrupolar.....	....69
<b>Figura 21.</b> Cromatograma de una muestra de jengibre contaminada con una solución de 0.01 ppm de 6 plaguicidas.....	....71
<b>Figura 22.</b> Espectros de masas de los plaguicidas analizados en el cromatograma anterior.....	....71
<b>Figura 23.</b> Rutas de fragmentación de plaguicidas analizados por LC/MS- tandem.....	....72
<b>Figura 24.</b> Diferentes estados en el desarrollo de la cromatografía líquida.....	....76
<b>Figura 25a.</b> Sistema de formación de gradiente a baja presión.....	....80
<b>Figura 25b.</b> Sistema de formación de gradiente a alta presión.....	....80
<b>Figura 26.</b> Cromatograma LC/MS obtenido de 10 de los plaguicidas analizados a un nivel de 0,10mg/kg.....	....86
<b>Figura 27.</b> Estructura química de cinco plaguicidas organofosforados.....	....95
<b>Figura 28.</b> Cromatograma obtenido por un análisis DI-SPME/GC- $\mu$ ECD.....	....97
<b>Figura 29.</b> Curvas de calibración de Malathion, Fenitotion, Chlorpyriphos, Fipronil y Deltametrin.....	100
<b>Figura 30.</b> Cromatogramas de Malathion, Fenitotion, Chlorpyriphos, Fipronil y Deltametrin.....	...101

## INDICE DE ANEXOS

<b>Anexo 1.</b> Tabla de fuerza eluotropa de solventes típicos para la extracción en fase sólida (SPE).....	106
<b>Anexo 2.</b> Tabla de características operacionales de materiales de recubrimiento para microextracción en fase sólida (SPME).....	106
<b>Anexo 3.</b> Descripción de las técnicas cromatográficas, así como de sus características.....	108
<b>Anexo 4.</b> Base de datos de los plaguicidas usados para el control de plagas para pastos en Colombia, registrado por el Instituto Colombiano Agropecuario...	108
<b>Anexo 5.</b> Espectros de masas de los plaguicidas Malathion, Fenitotion, Chlorpyrifos, Fipronil y Deltametrin.....	116

## JUSTIFICACIÓN

La agroindustria productora de leche en Colombia ha visto un progresivo crecimiento en los últimos 50 años en su actividad productiva. En el año 1990, el promedio de producción lechera anual se ubico en 3900 millones de litros, mientras que en el año 2005 se reportaron en promedio 6000 millones de litros anuales [1]. La ganadería bovina dedicada a la producción lechera representó para la economía colombiana el 25,4% del PIB agropecuario del país para 1994, para el año 2000 la participación de este sector era del 29,9% en el mismo rubro y para el año 2006 fue de 27% [1,2]. Además de esto, la generación de empleo de este sector pasa particularmente por los micros y pequeños productores que representan el 95% de los productores lecheros, mientras que las medianas y grandes industrias solo representan el 5% de la producción total anual, y en general representa el 2,3% del empleo generado por la agroindustria en Colombia [3].

La importante participación de la agroindustria lechera como aparato productivo del país, vuelve necesario evaluar todos los factores que determinan la calidad de la materia prima producida por este sector que será usada para la producción de gran cantidad de productos de valor agregado de alta demanda en el mercado. Es por esto que evaluar la calidad de la leche cruda como materia prima para la producción de sus derivados, es fundamental a la hora de determinar si es apta para tales usos o no. Entre dichos factores que determina la calidad de la leche, se toman en cuenta los que definen alteración de la composición química o física de la leche cruda, como lo es la condición higiénica y la adición de sustancias no propias de la leche cruda. La condición higiénica de la leche hace referencia a la medida de la carga bacteriana a través del recuento total de bacterias mesófilas aerobias totales medidas en unidades formadoras de colonias (UFC) [4].

Las sustancias presentes en la leche cruda que no tienen origen natural en la misma son básicamente de dos tipos, alterantes y contaminantes. Las sustancias alterantes son las que modifican ciertas características químicas y físicas de la leche para manipular alguno de los factores fisicoquímicos que definen la calidad de la misma. Mientras que las sustancias contaminantes, son las que llegan a la leche por distintos orígenes como contaminación cruzada o adición de forma indirecta, donde el caso representativo son los plaguicidas.

Los plaguicidas llegan a la leche producida por las vacas a través del pasto que consumen y que ha sido previamente tratado con pesticidas como agentes de control químico de plagas que afectan la calidad del mismo y su aporte energético a los bovinos. Los pesticidas interaccionan y se solubilizan principalmente en las lipoproteínas y lípidos presentes en el torrente sanguíneo de las vacas, y progresivamente se van depositando de distintas partes del organismo del animal, pero particularmente en la leche de la misma. Entendiendo la inmensa importancia que tiene la leche para la economía nacional, pero principalmente para la dieta alimenticia de los seres humanos, que en Colombia el promedio de consumo anual se ubica en 145 litros por personas [3], es que se hace de alta importancia el monitoreo de la calidad de la leche, particularmente en la presencia de



sustancias de alta peligrosidad para la salud de los seres humanos como lo son los plaguicidas.

Es por esto que se hace de vital importancia el desarrollo de técnicas analíticas sensibles que permitan determinar cualitativa y cuantitativamente la presencia de pesticidas en la leche de forma reproducible y efectiva. Por esta razón se requiere documentar las técnicas instrumentales y analíticas que sean efectivas para tales fines, así como su desarrollo en el tiempo y las perspectivas a futuro de la evolución de estas técnicas para optimizar el proceso analítico de dichas determinaciones. A su vez, esta investigación busca ser un insumo técnico y conceptual para los centros de investigación dedicados al análisis de plaguicidas en aguas y alimentos, como el grupo de investigación del recurso hídrico y alimentos de la Universidad Tecnológica de Pereira, que se pueda traducir en mejorar las metodologías de análisis de plaguicidas en leche cruda usadas en la región.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La creciente demanda de leche cruda para la producción de derivados lácteos y leche procesada ha llevado a un aumento de territorios dedicados a la siembra de pasto para alimentar ganado vacuno lechero, que ha derivado en un progresivo incremento en el uso de pesticidas como agentes de control de plagas, las cuales afectan los rendimientos en el crecimiento de los pastos y la calidad de los mismos como fuentes de alimento para el ganado lechero, que consumirá dichos pastos contaminados con plaguicidas, los cuales serán acumulados en el organismo del animal, particularmente en la leche del mismo, lo que generaría cierto grado de contaminación tóxica de la leche para consumo humano.

Teniendo en cuenta la estricta normatividad internacional, se requiere de metodologías adecuadas para la extracción y análisis, las cuales han venido evolucionando constantemente, encontrando una variada oferta de las mismas, y que permiten detectar este tipo de contaminantes a nivel de trazas; sin embargo la existencia de diversidad de protocolos, hace necesario un detallado análisis de las ventajas y desventajas de las diferentes combinaciones posibles, para la obtención de los mejores resultados.

El presente documento busca documentar las mejores combinaciones entre las más modernas técnicas de preparación de muestras e instrumentales, útiles y adecuadas en la determinación cuali y cuantitativa de plaguicidas existentes en la leche cruda, como guía técnica para los centros y grupos de investigación dedicados al análisis de plaguicidas en alimentos.

## **OBJETIVOS**

### **3.1 OBJETIVO GENERAL**

Documentar la información pertinente y disponible de las metodologías analíticas para la determinación cualitativa y cuantitativa de plaguicidas presentes en leche cruda de ganado bovino.

### **3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS**

- Justificar la elección de las técnicas pertinentes en la preparación de muestras para el análisis de plaguicidas.
- Evidenciar las ventajas, desventajas y mejores combinaciones entre las técnicas adecuadas en el análisis instrumental de plaguicidas.
- Exponer el tratamiento de datos estadísticos necesario para asegurar la calidad de los datos obtenidos en el laboratorio.
- Referir alternativas al uso de plaguicidas en pastos como procedimientos de control de plagas sostenibles económica y ecológicamente.

## CAPÍTULO 1

### GENERALIDADES

#### 1.1 ASPECTOS GENERALES DE LA LECHE

##### 1.1.1 Definición de leche

De acuerdo con el decreto 616 de 2006, La leche cruda es “el producto de la secreción mamaria normal de animales bovinos, bufalinos y caprinos lecheros sanos, obtenida mediante uno o más ordeños completos, sin ningún tipo de adición, destinada al consumo en forma de leche líquida o a elaboración posterior” [1].

##### 1.1.2 Clasificación

Existen diferentes formas de diferenciar la leche, ya sea desde su proceso de fabricación, su tratamiento térmico, o bien por su contenido de agua. A continuación se muestra la clasificación de las leches de acuerdo con la norma Colombiana (Decreto 616 de 2006).

Las leches se clasifican de la siguiente forma:

- Según su contenido graso:
  - a) **Entera:** Es aquella que conserva todas las características fisicoquímicas de la leche cruda de vaca, particularmente contenido de grasa y lactosa (expresada como índice lactométrico), pero que ha sido sometida a un tratamiento térmico con el objeto de eliminar cualquier agente patógeno.
  - b) **Semidescremada:** Es un tipo de leche cuyo contenido graso ha sido reducido de tal forma que solo contiene entre 1,5% y 1,8% de materia grasa, teniendo en cuenta que la leche entera tiene como mínimo un 3,5% de contenido lipídico.
  - c) **Descremada:** contiene menos del 0,3 % de grasa pero a su vez también pierde contenido de vitaminas liposolubles, hasta llegar al orden de trazas de vitaminas A, D y E [2].
  
- Según su proceso de fabricación:
  - a) **Pasteurizada:** Tanto la leche pasteurizada como la Ultrapasteurizada (UHT), son sometidas a tratamientos térmicos con el objeto de obtener una calidad nutricional y organoléptica más alta con completa seguridad.
  - b) **Deslactosada:** En este tipo de leche, la lactosa ha sido desdoblada por un proceso tecnológico en glucosa y galactosa, como máximo en un 85%. Esta línea de leche fue elaborada para responder a la necesidad de consumidores que presentan deficiencia para desdoblar la lactosa en sus subproductos.
  - c) **En polvo:** Siempre se busca que tras su reconstitución al ser disuelta en agua, el consumidor obtenga el producto más similar posible a la leche líquida.

Casi toda la leche en polvo que se comercializa es descremada para evitar la alteración de la grasa.

### **1.1.3 Contenido nutricional**

La leche de vaca está constituida por agua en un 90%, grasa, vitaminas, minerales, proteínas, lactosa y otros componentes minoritarios como enzimas y sustancias nitrogenadas cuyo contenido varía según la región de procedencia de la leche. El valor energético depende esencialmente del contenido de grasa y aporta un promedio de 131,8 Kcal que supone entre el 6-7% de las necesidades energéticas de un adulto [2].

#### **1.1.3.1 Proteína**

Constituyen el 3-4% del peso total y tienen un alto valor biológico. Está formada por caseínas ( $\alpha$  y  $\beta$ -caseínas) que aportan cerca del 80% del valor proteico, y las proteínas del suero que aportan aproximadamente el 20%. Las caseínas aparecen en forma de micelas formadas por complejos de fosfoproteínas y glicoproteínas. Por otro lado, las proteínas del suero son proteínas solubles, principalmente albúmina y globulinas. En cuanto al contenido de aminoácidos de estas proteínas, un litro de leche supe le necesidad de todos los aminoácidos esenciales, excepto aquellos que contienen azufre, como es el caso de la metionina y la cisteína.

#### **1.1.3.2 Grasa**

Esta al igual que las vitaminas liposolubles se encuentra formando una emulsión de microglóbulos de un diámetro promedio de  $1\mu\text{m}$ , después de la homogenización de la leche. Esto posibilita la hidrólisis rápida por parte de las enzimas digestivas, lo cual a su vez aumenta la absorción de la grasa láctea. Los ácidos grasos presentes en la leche son principalmente saturados de cadena larga, pero también se encuentra una fracción importante de ácidos grasos monoinsaturados y una pequeña fracción de poliinsaturados. De los ácidos saturados de cadena larga, los principales son el ácido mirístico, palmítico y esteárico que representan el 75% del total de los ácidos grasos de la leche.

#### **1.1.3.3 Carbohidratos**

La lactosa (que es un disacárido) junto con el agua son los principales componentes de la leche, y es éste carbohidrato el que proporciona el 25% del valor energético del alimento. Tanto su hidrólisis como su absorción en el intestino se llevan a cabo lentamente, lo cual le brinda al alimento una sensación de saciedad posterior a su ingesta. Además de la lactosa, la leche también contiene otros carbohidratos como glucosa, galactosa, aminoazúcares y azúcares fosforilados [2].

#### **1.1.3.4 Vitaminas**

Dentro de las más abundantes en la leche se encuentra la vitamina A, en forma de retinol, carotenos, riboflavina y niacina, expresado este último como equivalentes de niacina, toda vez que la leche presenta un alto contenido del aminoácido triptófano, precursor de la niacina. De igual forma, algunas de estas vitaminas se degradan por el tratamiento térmico prolongado que sufren algunos tipos de leche, como las esterilizadas. Sin embargo las leches UHT conservan casi la totalidad de su valor nutricional, excepto por la pérdida de vitamina C [2].

### **1.2 ESTADO DE LA AGROINDUSTRIA LECHERA EN COLOMBIA**

La producción de leche cruda de origen bovino en Colombia tiene una particular importancia en la economía, ubicándose como uno de los alimentos de mayor demanda en el país, a la par que sus derivados. En la década de los 70's, Colombia experimentó un crecimiento en la producción lechera a razón del 4,7% anual, en la década siguiente la tasa de crecimiento aumentó llegando a un promedio de 6,5% anual. En los noventa esta tasa de crecimiento disminuyó pero se mantuvo en un promedio de 3,8% [3]. Para el 2007 el inventario bovino fue de 23'600.000 cabezas de ganado, de las cuales aproximadamente el 5 % está destinado para producción de leche y un 42% empleado con doble propósito (leche y carne) [4]. En el mismo año la producción lechera fue de 6.170 millones de litros.

En el año 2009 se presentó un descenso del 1,8% en la producción de leche en promedio, principalmente a razón de los efectos del fenómeno del niño presentados con fuerza durante el primer semestre de este año reduciendo la producción de costa pacífica donde se concentra la mayor cantidad de cabezas de ganado usadas para la producción lechera, y sumado a esto el acopio de leche por parte de la industria se contrajo un 5,38%, debido a restricciones a la demanda. Estos factores se estabilizaron a inicios del 2010 a razón de una normalización de la compra de leche como materia prima de los sectores industriales que la necesitan [5].

El sector lechero colombiano en su conjunto se ha vuelto más productivo y competitivo. Comparando la evolución del sector con estudios realizados 12 años atrás, se observa que la productividad de leche/Ha aumentó en un 44% en los sistemas de doble propósito y 14% en las lecherías especializadas [6]. Con este panorama, la perspectiva trazada para el año 2019 es llegar a un inventario bovino de 32,5 millones de cabezas de ganado, siendo Colombia el país con más alto potencial de crecimiento de inventario ganadero en el mundo (30%) [7].

### **1.3 ESTADO DE LOS CULTIVOS DE PASTO EN COLOMBIA**

En Colombia la porción continental de territorio ocupa un área cercana a los 114,17 millones de hectáreas donde para fines agropecuarios se usan alrededor de 50,91 millones de hectáreas, de los cuales el territorio dedicado a los pastos para la ganadería

era de casi 38,6 millones de hectáreas [8]. A partir de esta actividad ganadera, al año en Colombia se producen entre 500 y 12.000 litros de leche cruda de ganado vacuno por hectárea usada para esta actividad [9], por lo que es importante evaluar la calidad de la misma.

Ante esta tendencia de crecimiento de los territorios usados para la actividad ganadera en el país, se ha venido incrementando de igual forma el uso de pesticidas de distintos tipos para la contención de las plagas que atacan a los pastos que alimentan al ganado, que para 1996 era del 16% del total usado en todas las aéreas de la agricultura [10]. Antes de ahondar en el tema de los pastos, cabe aclarar que dentro de este término se encierran todos los tipos de plantas que sirven para alimentar ganado y que se cultivan en forma masiva para satisfacer la demanda alimenticia de estos animales. Dentro de las plantas que se pueden emplear para alimentar ganado, se pueden resaltar los siguientes grupos [9]:

- ✓ Forrajes (Gramíneas de origen americano y europeo).
- ✓ Leguminosas Nativas y Exóticas.
- ✓ Plantas rastreras, arbustos y árboles cuyos frutos son consumidos por los bovinos.

En Colombia se ha acrecentado la actividad ganadera lo que ha conllevado a un incremento en las áreas de pastoreo para alimentar el ganado. Debido al desarrollo creciente de la producción ganadera, el mantener pastos abundantes y de buena calidad es prioritario. Tanto la cantidad como la calidad de estos se ve afectada por diversos factores; unos no controlables por el hombre, como las condiciones climáticas y geográficas. Otros en los que si puede intervenir, como la fertilidad del suelo, y el control de plagas.

Esto enmarcado en un contexto de producción a gran escala y de reducción de costos para incrementar utilidades, hace que la gran mayoría de los ganaderos se valgan de fertilizantes y de plaguicidas para mantener controladas las condiciones de sus pastos, logrando masificar el control sobre estas variables. Es en este campo donde las preparaciones químicas hacen su aparición. Aunque las consecuencias de la fertilización química desmedida solo se observen en el mediano-largo plazo, el uso de plaguicidas si conlleva a un impacto negativo en el corto-mediano plazo en los tres escenarios donde está presente debido a su residualidad; en los suelos, donde además de exterminar las plagas que afectan los pastos, destruye y/o inhibe el crecimiento de bacterias que se encargan de nutrir el mismo. El otro lo conforman los animales que se alimentan de los pastos, pues ingieren estos plaguicidas, lo que conlleva al desarrollo posterior de enfermedades de tipo canceroso. El último escenario lo conforma el hombre quien consume estas especies de animales o sus productos derivados.

Sin embargo, pese a los efectos nocivos de estos compuestos, muchos ganaderos ven en los plaguicidas un método económico, sencillo y contundente de controlar la aparición de plagas en sus pastizales. Para el caso del ganado bovino, su metabolismo le permite excretar los residuos de plaguicidas a través de la leche, y es por esta razón que se hace importante el implementar métodos de control de calidad en la misma, para garantizar la

inocuidad de este alimento en cuanto a presencia de plaguicidas, o por lo menos que estos se encuentren dentro de los límites máximos de residualidad (LMR). Es por ello que en la actualidad, se desarrollan constantemente nuevas metodologías para determinar cualitativa y cuantitativamente la presencia de plaguicidas en muestras de leche, mejorando aspectos como sensibilidad, porcentajes de recuperación, facilidad de extracción y por supuesto reducción de costos de estos análisis.

En la tabla 4 del anexo se profundizara en la información relacionada con las plagas que afecta a los cultivos de pastos en Colombia, los plaguicidas que se usan para su control, su concentración, la dosis de uso y su categoría toxica.

## **1.4 PLAGUICIDAS**

El desarrollo de la agricultura y la creciente demanda de alimentos, han llevado a los agricultores, en su afán por mejorar la calidad de sus productos, a implementar en su cultivo distintas técnicas de control de plagas que en últimas, es el factor más determinante en términos de la calidad del producto en cuestión. Dentro de estas se encuentran las técnicas de control biológico a través de sustancias químicas que destruyen una plaga o previenen la aparición de la misma. A estas sustancias se les conoce generalmente como plaguicidas. Un plaguicida es esencialmente una sustancia o mezcla de sustancias destinada a la prevención, destrucción, repulsión o disminución de cualquier plaga [11,12].

Dado que la cantidad de plagas que afectan la agricultura es tan variada, de diferentes orígenes e impacta de formas distintas cada una, también es muy amplia la cantidad de plaguicidas usadas para contrarrestar el impacto de dichas plagas en los cultivos. Como ejemplo, el uso de estas sustancias como agentes de control químico de las plagas en pastos destinados a la alimentación de ganado lechero, puede producir una acumulación de estos compuestos en el torrente sanguíneo gracias a la liposolubilidad de los mismos, que finalmente generará una acumulación de estas sustancias en distintas partes del organismo de la vaca, y posteriormente en la leche [13]. Para discriminar de forma adecuada a los plaguicidas se hace necesario entonces, efectuar una clasificación desde distintos parámetros, a fin de diferenciar estas sustancias, ya sea desde su aplicación, desde su composición química, su toxicidad, o su efectividad.

### **1.4.1 Clasificación de los plaguicidas**

Como ya se ha dicho, es importante clasificar los plaguicidas de acuerdo a distintos criterios, con el objeto de poseer información suficiente para elegir el plaguicida que mayor efecto tenga sobre las plagas y en lo posible el menor daño produzca al medio ambiente. Por tal motivo, se plantean las siguientes clasificaciones [12].



#### 1.4.1.1 Plaguicidas según su toxicidad

Los plaguicidas diferenciados mediante este parámetro se dividen en 4 categorías [12].

- Clase IA: Extremadamente Peligrosos: Dentro de esta categoría entran productos como el Paratión y el Dieldrín.
- Clase IB: Altamente Peligrosos: Dentro de esta categoría están productos como el Eldrín y el Diclorvos.
- Clase II: Moderadamente Peligrosos: Dentro de esta categoría están plaguicidas como el conocido DDT y el Clordano.
- Clase III: Ligeramente Peligrosos: En esta categoría se encuentran productos como el Malatión.

#### 1.4.1.2 Plaguicidas según su familia química

Estos plaguicidas son divididos de la siguiente manera [12]:

- Compuestos organoclorados: Ésta es la familia de plaguicidas más ampliamente usados. Su estructura química les confiere una alta estabilidad física y química, haciéndolos insolubles en agua y altamente solubles en disolventes orgánicos. Estas características favorecen su permanencia en el medio ambiente y su lenta biodegradabilidad. Ejemplos de estos plaguicidas pueden ser entre otros el DDT, aldrín y endosulfán.
- Compuestos organofosforados: Estos compuestos son ésteres, amidas, o tiolesderivados del ácido fosfórico, fosfónico, o fosfotoico. Se descomponen con mayor facilidad y se degradan por oxidación e hidrólisis dando origen a productos solubles en agua. Pertenecen a este grupo, el paratión, clorpirifos, malatión entre otros.
- Carbamatos: Son otro tipo de plaguicidas que pueden ser divididos en tres grupos principales:
  - a) Derivados de ésteres carbamatados, empleados comúnmente como insecticidas.
  - b) Derivados del ácido tiocarbámico, utilizados como fungicidas.
  - c) Carbamatos propiamente dichos, usados como herbicidas.

Todos son relativamente inestables, se les atribuye un tiempo corto de persistencia y su degradación se realiza por oxidación. Sus metabolitos finales son solubles en agua, permitiendo que sean eliminados por vía urinaria y/o fecal.

- Piretroides: Antes de hablar de piretroides, se debe tener claridad sobre las piretrinas, que son compuestos obtenidos de la molienda, secado y pulverización

de la flor del crisantemo. Este polvo contiene entre el 1 al 3% del principio activo, cuya actividad plaguicida es relativamente selectiva. Ya en materia, los piretroides son piretrinas sintéticas con una actividad más potente. Son metabolizados por hidrólisis, oxidación y conjugación, con poca tendencia a acumularse en los tejidos. Además son rápidamente degradados en el ambiente, pues aunque son absorbidos masivamente, son eliminados fácilmente con el agua. Entre estos plaguicidas se encuentran el cypermethrin, fenvalerate, permethrin entre otros.

#### **1.4.2 Aplicaciones de los plaguicidas**

A continuación se ilustran los principales usos de los plaguicidas en la vida cotidiana del hombre [12].

- Agricultura: Se usa para el control de múltiples plagas que intervienen en diferentes etapas de la cosecha.
- Salud Pública: Control de vectores de enfermedades de alto grado de contagio e impacto social como: Malaria, Dengue, Mal de Chagas, Leishmaniasis, Tifo, entre otros.
- Ganadería y Cuidado de Animales Domésticos: En la desinfección de ganado y de animales domésticos como perros y gatos.
- Mantenimiento de Áreas Verdes: Tratamiento de parques, jardines, áreas de recreo campos de golf, etc.
- Hogar: Son incorporados como productos cosméticos, Champús, repelentes para insectos, para desinfectar alfombras, además de los conocidos insecticidas comerciales.

#### **1.4.3 Características químicas de los plaguicidas**

Dentro del desarrollo de este trabajo, se han tratado las 4 familias más importantes de plaguicidas, dentro de lo que respecta a su estructura química. Por tal motivo, a continuación se analiza con más detalle los aspectos estructurales más importantes de cada familia [10].

##### **1.4.3.1 Compuestos organoclorados**

Los compuestos orgánicos halogenados, fueron los primeros productos sintéticos en emplearse como plaguicidas, ya que uno de los primeros productos, el DDT, mostró un amplio espectro de acción y una alta efectividad, lo que impulsó el desarrollo en la producción de más plaguicidas de este tipo. Dentro de los compuestos organoclorados existen tres familias clasificadas de acuerdo a la estructura de los mismos. La primera de ellas es la de los *anillos bencénicos clorados*, y el DDT es uno de los exponentes más

importante de esta familia. Como su nombre lo indica, corresponden a esta familia, compuestos cuya estructura se compone uno o más anillos bencénicos con átomos de cloro enlazados en la mayoría de los casos en la posición *para*.

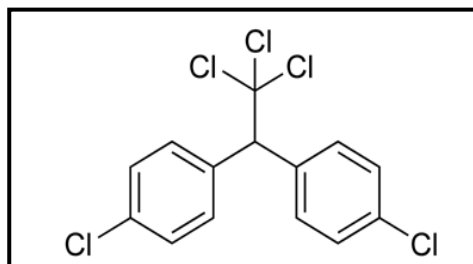


Figura 1. Estructura Química del DDT

Durante los años cincuenta y sesenta, se recopilaron pruebas sobre la resistencia que habían desarrollado diversas especies de insectos frente al DDT, y sumado a esto se desarrollaron técnicas de análisis cuantitativo de plaguicidas en matrices complejas, de gran exactitud que permitieron determinar que el DDT y sus metabolitos persistían en el medio ambiente y que se acumulaban en los tejidos grasos de organismos superiores. Un caso particular que cabe destacar es el del *Lindano (Hexaclorociclohexano)*, empleado como fungicida para granos, y cuya preparación comercial contiene 6 hexaclorociclohexanos, aunque la estereoquímica del ciclohexano permite más isómeros teóricos. La segunda categoría de estos plaguicidas es la de los *ciclodienos* en la cual se encuentra el *hexaclorociclopentadieno* que posee actividad herbicida. Cuando este se hace reaccionar con diversos dienófilos, y los productos resultantes se modifican se obtiene una gran número de plaguicidas útiles [14].

Un ejemplo de estos productos modificados es el *clordano*, empleado en agricultura y también para el control de plagas en el hogar y en jardines, además de poseer actividad herbicida. Compuestos como el aldrin, dieldrin, heptacloro y endrin también hacen parte de esta familia, caracterizados todos ellos por tener un amplio espectro de actividad insecticida, y una toxicidad que varía de moderada a aguda para los mamíferos. Como una tercera categoría puede considerarse el vasto número de plaguicidas cuyas estructuras químicas convergen en torno a constituir el grupo de los *derivados de ácidos orgánicos*. Aunque algunos de ellos dominaron el mercado de los herbicidas por muchos años, actualmente se han impuesto serias restricciones a su uso, ya que en los procesos de fabricación de los mismos, adquieren impurezas de altísima toxicidad y de efectos teratogénicos.

En el desarrollo de estos compuestos se han planteado modificaciones químicas como transformarlos en ésteres y en amidas volátiles y no volátiles. La volatilidad es un factor de gran importancia, toda vez que debido a la potencia de la sustancia, el vapor diluido y las gotas minúsculas en suspensión, pueden perjudicar seriamente las cosechas de plantas de hojas anchas, debido a corrientes de aire que fluyan hacia éstas desde el punto de aplicación del plaguicida, en este caso, particularmente del herbicida [14]. Un ejemplo de los herbicidas obtenidos mediante estas modificaciones es el ácido triclorobenzoico.

### 1.4.3.2 Compuestos organofosforados

También llamados ésteres fosfóricos, estos compuestos comparten entre todos una similitudestructural que les confiere su actividad plaguicida, debido a que la gran mayoría atacan principalmente el sistema nervioso. A continuación se ilustra un ejemplo de compuesto organofosforado y el patrón estructural que comparte dicha familia [14].

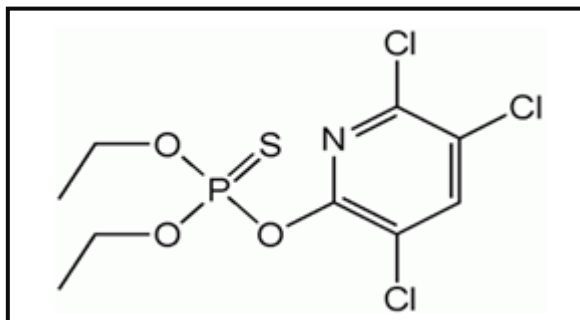


Figura 2. Estructura química del clorpirifos.

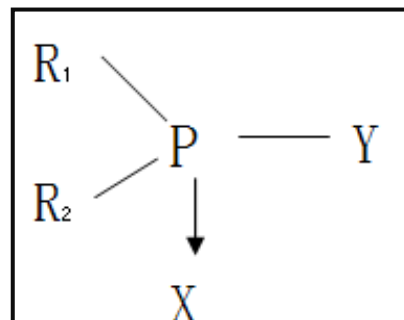


Figura 3. Patrón estructural de los compuestos organofosforados.

De acuerdo con lo relacionado en la figura, los grupos *R*<sub>1</sub> y *R*<sub>2</sub> por lo general son unidades de bajo peso molecular, como grupos alcoholilo, alcoxi, alcoholítilo o alcoholílamilo con menos de cuatro carbonos. *X* puede ser un átomo de oxígeno o azufre y *Y* es casi siempre un grupo hidrolíticamente inestable que se separa de la molécula, formando residuos que pueden atacar enzimas. Esta familia de compuestos posee gran versatilidad, pues recientemente se han desarrollado productos con alta toxicidad y selectividad, variaciones de persistencia en el medio ambiente, entre otras actividades. Frente a las prohibiciones que han surgido contra los compuestos organoclorados y su larga persistencia ambiental, los compuestos organofosforados y los carbamatos son una oportunidad en el control de plagas. Sin embargo, estos al ser una solución también requieren de más inversión, toda vez que son más costosos.

### 1.4.3.3 Carbamatos

Los carbamatos se caracterizan por presentar el siguiente patrón estructural [14]:

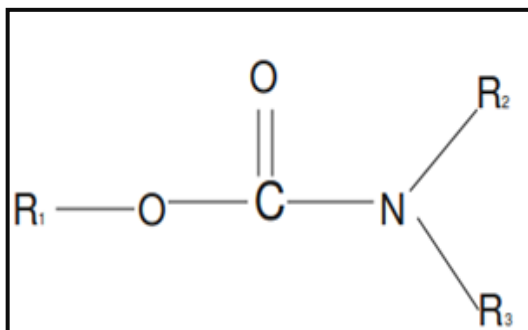


Figura 4. Patrón estructural de los Carbamatos

Su mecanismo de acción es muy similar al de los compuestos organofosforados, descritos anteriormente, pero no es idéntico. En muchos carbamatos, R1 corresponde a un grupo aromático. Por lo general R2 es un grupo metilo y R3 es Hidrógeno aunque algunas veces puede ser metilo. En muchas estructuras de plaguicidas recientes pertenecientes a esta familia, el protón de R3 es sustituido por un grupo acilo, sulfenilo o fosforilo. Estos compuestos son muy empleados en el cultivo de granos, ya que permiten bloquear la reproducción de las plagas que atacan a la especie de planta mencionada.

#### 1.4.3.4 Piretroides

Los piretroides son derivados sintéticos de dos grupos de piretrinas, que a su vez son extraídas de las flores de plantas del género *Chrysanthemum*. Las piretrinas se pueden subdividir en *piretrinas I* y *piretrinas II*, que son respectivamente derivados del ácido crisantémico y pirétrico. Aunque alrededor de este grupo de plaguicidas se han realizado a través del tiempo diversas modificaciones estructurales con el fin de conferirles estabilidad y potencializar se pueden nombrar algunas características que comparten todos ellos [14]:

- Se definen como ésteres de ácidos derivados del *ciclopropano*. Aunque esta regla excluye el *fenilvalerato*.
- Son poco tóxicos para los mamíferos quienes los metabolizan y excretan con rapidez.
- Dejan residuos muy bajos o nulos en el suelo y en el agua.
- Existe la posibilidad de fabricar isómeros
- Son poco volátiles.

### 1.5 CARACTERÍSTICAS TOXICOLÓGICAS DE LOS PLAGUICIDAS

Debido a que muchos de los plaguicidas son creados con el objeto de matar plagas tales como hongos, insectos, bacterias, u otros organismos vivos no deseables, y como los seres humanos comparten algunas funciones básicas con las mismas, estos compuestos químicos pueden también causar efectos extremadamente dañinos e incluso la muerte en los seres humanos. Ya sea por vía oral, respiratoria, cutánea o por contacto con los ojos, la sintomatología puede variar y manifestarse con determinada agudeza dentro de un lapso de tiempo posterior al contacto con el plaguicida. Sin embargo los daños más graves ocurren cuando la sustancia ingresa al cuerpo, es decir, cuando es inhalada o ingerida [12]. La aplicación persistente y desmedida de estas sustancias por parte de los agricultores, está llevando a que estos compuestos se acumulen en pequeñas cantidades en muchos alimentos de la ingesta diaria de los seres humanos, como leche, carnes, legumbres, frutas, etc.

Por tal razón los análisis para la determinación de residuos de estas plaguicidas en diversas variedades de alimentos cada vez se vuelven más precisas y sensibles. Adicionalmente, las instituciones de salud pública han endurecido sus criterios frente a la cantidad mínima permitida de estos compuestos en los alimentos. En el caso de algunos plaguicidas, como el *endosulfán*, su uso y su presencia en alimentos o en agua ya están prohibidos por dichas instituciones [15]. Muchos plaguicidas se han producido con el objeto de que actúen de forma rápida y eficaz sobre el organismo no deseado, de modo que esto ha llevado a desarrollar compuestos que logren ingresar fácilmente al órgano, sistema o ruta metabólica que deben atacar.

En el caso de muchos de los compuestos organoclorados, su objetivo es inhibir la enzima *citocromo oxidasa*, que interviene en el intercambio gaseoso durante el proceso de respiración de los animales. Además de desestabilizar el sistema nervioso. Sin embargo, el mayor problema yace en que durante su excreción pueden ser absorbidos por los intestinos, con lo cual se prolonga su actividad biológica dentro del organismo, con lo que se pueden provocar efectos a largo plazo. Es por ello que los síntomas más frecuentes debido a esta intoxicación, correspondan a convulsiones, dificultad para respirar entre otros. Los compuestos organofosforados son menos persistentes en el medio ambiente, pero son más peligrosos para los seres humanos debido a su alto grado de toxicidad. Muchos tienden a permanecer en el sistema vascular de los vegetales, por lo que son ingeridos tanto por insectos chupadores, como por las personas [12]. Uno de sus principales efectos es la inhibición de la enzima *acetilcolinesterasa*, lo que desencadena un efecto tardío (días, incluso semanas después) en el sistema nervioso, conocido como neuropatía retardada. Por lo tanto, esta anomalía se caracteriza por afectaciones considerables en el desarrollo psico-motriz, y puede llegar hasta el sistema nervioso central. Su ventaja frente a los organoclorados es que no se acumula en el organismo, por lo que se elimina con mayor facilidad. Uno de los problemas más serios ocurre cuando se presenta una intoxicación por varios plaguicidas, pues la interacción entre algunos de estos puede potencializar su toxicidad, o bloquear los procesos de desintoxicación del organismo.

Los carbamatos poseen un mecanismo de acción muy similar a los organofosforados, pero con la diferencia de que al parecer no presentan neurotoxicidad retardada, lo que implica que la inhibición de la acetilcolinesterasa es transitoria, de algunas horas solamente [15]. Algunos piretroides atacan el sistema nervioso, mientras que otros intervienen en procesos hormonales tanto de los animales como de las personas. Es por ello que los piretroides desarrollados más recientemente, actúan como reguladores de crecimiento, no se acumulan en el organismo y no persisten en el medio ambiente [14].

## **1.6 IMPACTO AMBIENTAL Y EN SERES VIVOS DEL USO DE PLAGUICIDAS**

Los estudios sobre las consecuencias de exposición prolongada a plaguicidas, por parte de los ecosistemas, incluyendo la estructura y composición de los suelos así como la biota víctima de los mismos, no han sido extensos alrededor del mundo. Sin embargo, muchos investigadores y ecologistas convergen en la tesis de que el daño que se ha causado al medio ambiente y a los organismos vivos en general, obedece más al uso

desmedido de estos compuestos y a formulaciones donde mezclan varios ingredientes activos, que a su naturaleza química [16].

Los efectos varían de una familia química a otra, pero se podrían mencionar algunos de los efectos más comunes de los plaguicidas sobre los organismos vivos y sobre el suelo en particular [16,17]

- *En el hombre.*
  - ✓ Intoxicaciones Agudas y Envenenamientos.
  - ✓ Daños genéticos irreversibles.
  - ✓ Enfermedades Crónicas degenerativas.
  - ✓ Alteraciones Endocrinas
  - ✓ Esterilidad y/o daños graves en el ADN.
  
- En la vida silvestre [17].
  - ✓ Destruyen los ecosistemas, ya que son altamente tóxicos para muchos tipos de organismos (variando según familia química y plaga que controle).
  - ✓ Destruyen y/o contaminan fuentes de alimento para animales herbívoros.
  - ✓ Debido a su alta bio-concentración, impacta todas las etapas de la cadena alimentaria.
  - ✓ En ocasiones, sus productos derivados de la degradación en el tiempo son aún más nocivos
  
- En los suelos
  - ✓ Contaminación de aguas subterráneas.
  - ✓ Esterilización parcial por eliminación de la microflora.
  - ✓ Alteración fisicoquímica a largo plazo.

Como conclusión, si bien los plaguicidas poseen efectos nocivos sobre muchos organismos, el hombre los ha potencializado debido al abuso que ha hecho de estos.

### **1.7 TENDENCIAS ACTUALES PARA EL CONTROL DE PLAGAS**

La creciente toma de conciencia sobre los aspectos negativos de los plaguicidas, está dando como resultado el desarrollo de prácticas que buscan reducir el uso de estas sustancias en la agricultura, abriéndole las puertas a propuestas novedosas, así como al rescate de prácticas tradicionales empleadas para el control de estas plagas [18]. Se abren paso alternativas rentables, amigables con el medio ambiente, y que permiten recuperar parte de la biodiversidad que se pierde debido al uso extensivo de terrenos para pastoreo. Estas tendencias se pueden resumir de la siguiente manera:

- Los cultivos asociados permiten diversificar la biota en las áreas de pastoreo, reduciendo los brotes severos de plagas que atacan los monocultivos, en este caso de pastos y forrajes. Esta técnica introduce varios tipos de cultivos con el fin de reducir los efectos causados por plagas, sin menoscabo de afectar la producción de pastos. Se fundamenta en principios ecológicos, imitando mecanismos de equilibrio y estabilidad de la naturaleza.
- Así como existe una gran variedad de plagas de distinta naturaleza (animal, vegetal, fúngica) existen también métodos muy variados para controlar las mismas. Otro método que permite controlar plagas eliminando el uso de plaguicidas es el control biológico mediante la producción masiva de enemigos naturales y el desarrollo de plaguicidas microbiológicos.
- Otro ejemplo concreto consiste en la producción masiva de machos estériles de la mosca mediterránea, con el objeto de erradicar o contener la población de este insecto [18].
- Aunque las técnicas que simulan equilibrios naturales son eficientes, y muy amigables con la restauración de la biodiversidad, existen métodos de control más prácticos y menos costosos, desde la óptica del trabajo en el campo. Este método se refiere a los plaguicidas botánicos, que consisten en preparaciones químicas con variadas actividades biológicas (repelentes, feromonas, biocidas) a partir de extractos de plantas [19].

No obstante, las prácticas tradicionales de protección de plantas continúan siendo importantes. Métodos como la labranza, la inundación y la quema siguen siendo efectivos para reducir la presencia de todo tipo de plagas. Del mismo modo, la rotación de cultivos y la eliminación de los residuos vegetales contribuyen también a reducir las pérdidas causadas por las plagas [19].

En el siguiente capítulo, se hará una exposición de las metodologías usadas en la actualidad en la preparación de muestras para el análisis de plaguicidas, más exactamente en muestras de leche cruda.



## CAPÍTULO 2

### TÉCNICAS DE PREPARACIÓN DE MUESTRAS

Dentro de la leche se encuentran diversos analitos cuyos análisis se efectúan con múltiples propósitos, lo que hace que la selección de un método de extracción que pueda recuperar los analitos de un medio acuoso como este sea de vital importancia para garantizar la confiabilidad de los resultados. Algunos de los plaguicidas que se encuentran presentes allí se inclinan por un comportamiento hidrofóbico (insoluble en agua) lo que facilita su extracción a través de un medio de la misma naturaleza. Sin embargo, otro grupo de estos se comporta de manera contraria, lo que dificulta su extracción de la leche.

La química analítica abarca un amplio espectro de tópicos dentro de los que se incluye un aspecto clave como lo es la preparación de las muestras antes de efectuar el análisis ya sea cualitativo o cuantitativo. En el presente capítulo se describirán las técnicas de extracción de plaguicidas más usadas en la actualidad como lo son la extracción líquido-líquido (LLE), la extracción en fase sólida (SPE) y la microextracción en fase sólida (SPME) [21]. En cada técnica se ilustrarán los respectivos principios fisicoquímicos que las rigen, así como también se mencionarán brevemente sus parámetros, enfocándolos hacia la extracción de plaguicidas en la matriz de estudio (Leche).

#### 2.1 EXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO

##### 2.1.1 Fundamento de la técnica

La extracción líquido-líquido permite la extracción, pre-concentración y/o limpieza de uno o más componentes de una muestra. Se basa en la distribución de la muestra entre dos fases inmiscibles en las que el analito y la matriz poseen diferentes valores de solubilidades [20]. La técnica busca separar una o varias sustancias disueltas en un disolvente mediante su transferencia a otro disolvente insoluble, o parcialmente insoluble, en el primero. La transferencia de materia se consigue mediante el contacto directo entre las dos fases líquidas. Una de las fases es dispersada en la otra para aumentar la superficie de contacto entre las mismas y aumentar el caudal de sustancia extraída [21].

De acuerdo con lo postulado en un trabajo realizado en Guatemala en el 2010, las tres etapas fundamentales de la extracción líquido-líquido son [21]:

- a) Generación del contacto de la matriz con el solvente extractante.
- b) Separación de las fases líquidas una vez hecha la transferencia de las sustancias a extraer.
- c) Recuperación del solvente.

Generalmente se efectúa sobre una fase acuosa, que contiene un compuesto de interés que es extraído gracias a su mayor solubilidad en una fase orgánica. La relación entre las

solubilidades que posee el analito en las fases inmiscibles se conoce como constante de distribución, o coeficiente de reparto [21].

Esta expresión se describe de la siguiente manera:

$$K = \frac{[A_{org}]}{[A_{ac}]}$$

Donde  $[A_{org}]$  corresponde a la concentración del analito en la fase orgánica, mientras que  $[A_{ac}]$  hace referencia a la concentración del analito en la fase acuosa. De esta forma, el coeficiente de reparto depende de las fases involucradas. Así, un cambio en el solvente modificará la solubilidad del analito en esta fase y por ende afectará el valor de esta constante. Tanto la eficacia como la selectividad de la técnica dependen de algunos factores que pueden ser controlados o en su defecto maniobrados de forma que no entorpezcan la extracción. Algunos de estos son [21]:

- Selección adecuada del solvente extractante y naturaleza del mismo.
- Presencia de agentes complexantes que incrementen la solubilidad del analito.
- Adición de sales neutras que reducen la solubilidad del analito en fase acuosa.
- pH.
- Temperatura.

La selección adecuada del solvente extractante depende a su vez de:

- Inmiscibilidad de ambas fases y polaridad el analito.
- Solubilidad en agua de menos del 10%.
- Volatilidad para su posterior evaporación.
- Compatibilidad con técnicas analíticas empleadas posteriormente.

En el caso de la leche existe una situación que hace necesario implementar métodos complementarios de extracción para garantizar el enriquecimiento y purificación de los extractos que pudieran llevarse a un análisis instrumental. Debido a la presencia considerable de materia grasa en la leche cruda, y a que muchos plaguicidas son liposolubles, la extracción termina siendo sólido líquido para este caso. En estos casos, suele emplearse un solvente que logre extraer tanto los plaguicidas hidrosolubles como los liposolubles sin menoscabo de disminuir los respectivos porcentajes de recuperación.

En este sentido, Romero desarrolló una metodología para la extracción de 15 plaguicidas (clorpirifos, clorpirifos metil, coumafos, diazinon, diclorvos, dimetoato, disulfoton, etion, fenamifos, forato, isofenfos, malation, metilparation, paration y terbufos) en leche usando acetonitrilo como agente particionante en un procedimiento de extracción líquido-líquido. Para este caso, se obtuvo un límite de detección mínimo de  $2\mu\text{g/L}$  para el diclorvos y máximo de  $17\mu\text{g/L}$  para el coufamos [22].

Así mismo, Morales plantea una metodología para la extracción de clorpirifos, con el objeto de determinar la relación existente entre los residuos de este plaguicida en leche y sangre, y los niveles de estradiol y tiroxina en vacas *Holstein*, por medio de extracción líquido-líquido, usando acetonitrilo como solvente particionante y apoyando el proceso de separación por medio de centrifugación. En este caso obtienen porcentajes de recuperación entre 80,96 y 115,97% con coeficientes de variación entre el 2,75 y el 4,82%. Los patrones se prepararon en un rango de concentraciones entre 0,008-0,1 ppm. De acuerdo con las relaciones entre señal y ruido para este método, obtuvieron un límite de detección de 1 µg/L y un límite de cuantificación de 8 µg/L [23].

Como ya se mencionó, al ser la leche una matriz compleja compuesta por diversos tipos de compuestos químicos, el empleo de acetonitrilo no solo extrae los plaguicidas sino que también extrae determinada cantidad de compuestos liposolubles no deseados, por lo que se requiere una técnica complementaria de purificación del extracto orgánica. En la siguiente sección se expondrá la técnica de extracción en fase sólida (SPE), ampliamente utilizada para la purificación de extractos y/o para la retención de analitos presentes en los mismos, en este caso plaguicidas.

## **2.2 EXTRACCIÓN EN FASE SOLIDA (SPE)**

Tradicionalmente, las extracciones líquido-líquido se han usado para la preparación de muestras para análisis de plaguicidas, pero este método es largo, consume mucho tiempo, y además es costoso. Este método no solo requiere muchos pasos para su desarrollo, también presenta varios problemas como la formación de emulsiones, gastar grandes volúmenes de solvente, extractos húmedos e impuros, como también resultados irreproducibles en muchos casos [24]. Es así que a mediados de los años 70's se introduce un método alternativo de extracción, llamado extracción en fase sólida (SPE o *solid phase extraction*) el cual consiste en un dispositivo en forma de reservorio de una jeringa, en el cual se introduce un material adsorbente (fase estacionaria) que cumple la función de atrapar o retener una sustancia que está contenida en un solvente determinado (fase móvil). Es así que la SPE comprende la interacción de tres componentes descritos: el material adsorbente, el analito y el solvente [25] (ver figura 5). En este capítulo del presente trabajo se hará una descripción de los parámetros relacionados con el proceso de la SPE usada en la preparación de muestras para análisis de plaguicidas.

### **2.2.1 Fundamentos de la SPE**

La extracción en fase sólida es una técnica ampliamente usada actualmente en la preparación de muestras para el análisis de plaguicidas de forma rápida y selectiva. El principio de la SPE es similar a la de extracción líquido-líquido (LLE), el cual consiste en un reparto de solutos entre dos fases. Sin embargo, en vez de dos fases líquidas inmiscibles, como en LLE, la SPE implica la partición entre un líquido (o matriz de la muestra solvente con los analitos) y una fase sólida o fase estacionaria (material adsorbente). La introducción de un amplio espectro de materiales absorbentes en los procedimientos de análisis dio un nuevo impulso para el desarrollo de la metodología SPE desde la década de 1960 hasta finales de los 80's [25].

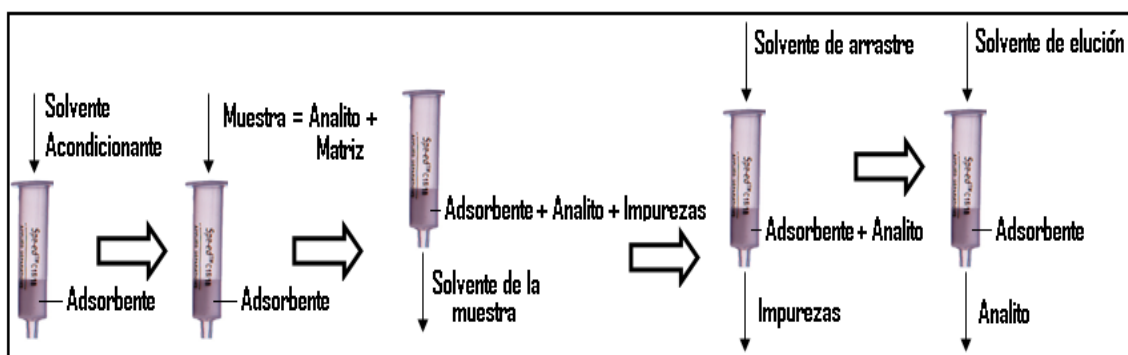


Fig. 5. Diagrama de proceso de extracción en fase sólida, SPE.

El primer paso de la SPE consiste en un acondicionamiento del material adsorbente con una sustancia apropiada que solventa los grupos funcionales de dicho material. Luego, la solución que contiene el plaguicida en este caso, se hace pasar por la columna usando si es necesaria una bomba de aire que aplique presión positiva para forzar la solución a pasar por el material de la columna. La columna contiene ahora los analitos e impurezas, los cuales se lavan con un solvente apropiado que eluye las impurezas, y preserva en analito en la columna. Finalmente los plaguicidas purificados son eluidos con un solvente suficientemente fuerte para desplazar el analito del material adsorbente. Para el proceso descrito anteriormente se tienen dos variantes.

La SPE en *fase normal* hace referencia a un sistema en el cual el material adsorbente es más polar que la fase móvil o la solución de la muestra. La SPE en *fase reversa* se refiere a un sistema en el cual el material adsorbente es menos polar que la fase móvil o la solución de la muestra [27]. La extracción en fase sólida se compone de tres modalidades de uso, consistentes en la limpieza o *cleanup*, concentración del analito y remoción de la matriz. En el *cleanup* se busca que el material adsorbente o fase estacionaria retenga el analito, mientras que el solvente o fase móvil arrastra las impurezas [26]. La concentración del analito se da cuando éste está retenido en el material adsorbente y es eluido por un volumen de solvente inferior al que inicialmente lo contenía previo atrapamiento, lo que resultará en un extracto “enriquecido” con el analito. En la remoción de la matriz, la fase estacionaria cumple un papel inverso al del *cleanup*, donde las impurezas son retenidas mientras que el solvente arrastra el analito a través de la fase estacionaria. El correcto desarrollo de la SPE depende fundamentalmente de un profundo conocimiento de las características químicas del analito tales como su índice de polaridad, peso molecular, estructura química, grupo funcional y otras como la solubilidad en solventes comunes en la técnica [26].

### 2.2.2 Parámetros involucrados en la SPE

En esta sección se describen los parámetros o mecanismos involucrados en la extracción en fase sólida.

### 2.2.2.1 Fuerzas intermoleculares

Las interacciones moleculares en la SPE ocurren fundamentalmente entre las moléculas del analito y los grupos funcionales del material adsorbente. Esas fuerzas son iónicas, puentes de Hidrógeno, dipolo-dipolo, dipolo-dipolo inducido, y fuerzas de dispersión [25]. Los puentes de hidrógeno ocurren cuando un átomo de hidrógeno se enlaza covalentemente con un elemento fuertemente electronegativo como oxígeno, o flúor. La fuerza relativa de los puentes de hidrógeno está condicionada por la electronegatividad y el tamaño del elemento electronegativo. Las fuerzas dipolo-dipolo son el resultado de la interacción de momentos dipolares de moléculas polares. Un dipolo molecular se da a través de la diferencia de electronegatividad de los átomos de las moléculas en combinación y sus geometrías moleculares. Las moléculas simétricas compuestas de átomos de diferente electronegatividad no tienen un dipolo permanente, mientras que las moléculas asimétricas tienen un momento dipolar permanente. Ambos tipos de interacción se presentan en igual medida en el análisis de plaguicidas, ya que la amplia variedad de estas sustancias hace que los diferentes tipos de polaridad de las mismas presenten las diversas interacciones descritas con su entorno [26].

### 2.2.2.2 Rata de flujo

En general se sugiere una rata de flujo de 5 ml/min, ya que la interacción polar y no polar puede llegar a ser lenta en algunos casos [27].

### 2.2.2.3 Fuerza eluotropica

En el proceso de la extracción en fase solida, se presentan dos tipos de interacciones fundamentales entre las sustancias que constituyen el sistema descrito anteriormente (analito, solvente y material adsorbente) que son la interacción entre el analito y la fase estacionaria y entre la fase móvil o solvente y el analito. Para la interacción entre solvente y el analito se establece un parámetro conocido como la fuerza eluotropica ( $\epsilon^0$ ) que es una medida de la energía de adsorción del disolvente en la silica pura comparado con un solvente determinado [27]. Este parámetro es de gran importancia en el momento de determinar si el material adsorbente atrapa o no el plaguicida presente en el solvente que funciona como fase móvil en la extracción.

Para ejemplarizar la definición anterior, se puede considerar un caso donde se tiene Florisil® como material adsorbente y se pretende atrapar un plaguicida moderadamente polar, para el cual se deberá usar un solvente con valores de  $\epsilon^0$  menores de 0.30, ya que estos valores bajos indican que la fuerza de adsorción del solvente hacia analito es baja con respecto a la marcada polaridad del Florisil®, por tanto este material podrá generar una interacción efectiva a través de alguna de las fuerzas intermoleculares anteriormente descritas para retener el analito. Planteando otro caso, para clarificar la practicidad de este parámetro, se plantea un experimento donde se tiene un material adsorbente no-polar como el octadecilsilano y se pretende extraer un plaguicida débilmente polar, para lo cual se usa un solvente de alto valor de  $\epsilon^0$  como la mezcla acetonitrilo-agua (1:10) con un

valor de  $\epsilon^\circ$  cercano a 0.65. Este valor indica que la fuerza de adsorción de este solvente con respecto a un material polar como la sílica o el Florisil® es grande, pero con un material de baja polaridad como lo es el octadecil la fuerza eluotrópica del solvente usado es débil, ya que el material descrito generara una interacción mas fuerte con el analito de baja polaridad ya que tiene más afinidad con este, por lo que se esperaría que el analito quedara atrapado en el material adsorbente mencionado [27].

Es de anotar que la polaridad no tiene un relación directa con la fuerza eluotrópica de un solvente ya que dicha fuerza no depende directamente de la polaridad de la molécula para interaccionar con un analito dado, teniendo en cuenta la naturaleza del material adsorbente de la fase estacionaria. *Xie* reporta un experimento en donde uso cartuchos Oasis HLB, que son cartuchos universales de sorbente para SPE en fase reversa, con acetonitrilo como solvente para la extracción de 6 plaguicidas (Dinotefuran, Thiamethoxam, Clathianidin, Imidacloprid, Acetamiprid y Thiachlorpid) [28].

#### 2.2.2.4 Propiedades del material adsorbente

En los años 60's, se llevaron a cabo los primeros tratamientos a los grupos silanol de la sílica con el objeto de sintetizar nuevos materiales creando así derivados alcoxisilil y mono-, di- y tri-halo sustituidos que fueron los productos iniciales de dichas síntesis con un uso práctico. Fue así que surgieron inicialmente materiales apolares a partir de la síntesis con la sílica altamente polar, posteriormente se sintetizaron materiales con grupos terminales polares y apolares que ampliaron el espectro de aplicación de la extracción en fase solida como método de separación selectivo [27]. *Zief* señala como se da la síntesis de materiales mono-funcionales, es decir con un solo sitio de interacción por sección del grupo funcional (ver figura 6).

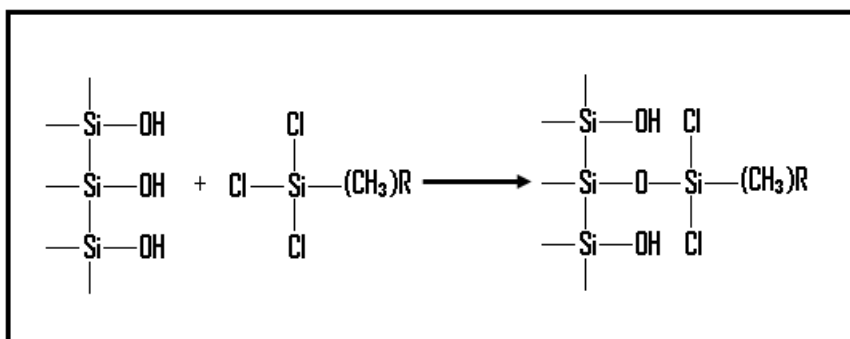


Figura 6. Reacción de formación de derivados monofuncionales de la sílica.

Así mismo, también señala las reacciones de formación de derivados trifuncionales (figura 7).

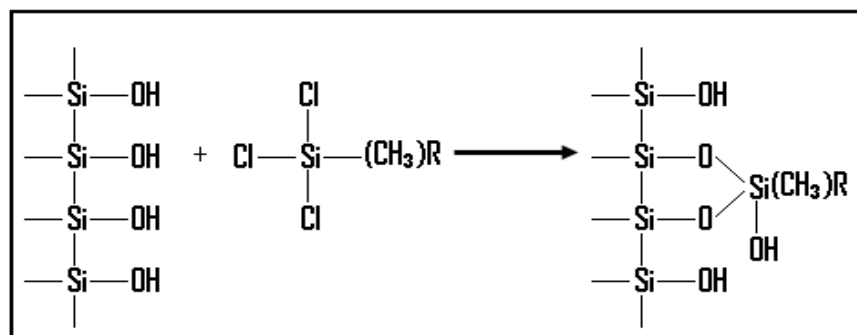


Figura 7. Reacción de formación de derivados trifuncionales de la sílica.

Como se muestra, en los dos tipos de reacción, se conservan dos grupos silanol sin ser ocupados lo que genera que haya características diferentes en la superficie del material: Aquellas que se encuentran en los grupos R unidos y las que se tienen en los grupos silanol sin reaccionar. Un ejemplo de cómo minimizar o eliminar la adsorción competitiva por estos grupos silanol remanentes es cubriéndolos por medio de una terminación tal que reaccione en esos puntos, como el caso de el trimetilclorosilano (figura 8).

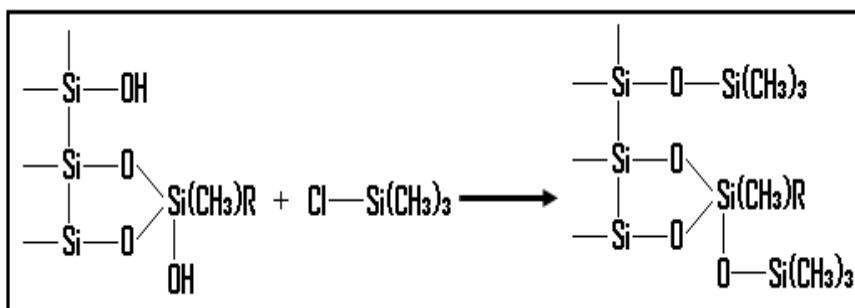


Figura 8. Reacción de “endcapping”<sup>1</sup> de los grupos silanol con trimetilclorosilano.

Los grupos que se usan en el proceso de *endcapping* son realmente importantes en la determinación de las interacciones que se dan en la superficie del material sintetizado. Generalmente se le da el nombre al material a partir del grupo funcional que genera las interacciones con el compuesto a separar.

### 2.2.3 Proponer un método preliminar

Para desarrollar un método de extracción se deben establecer parámetros como el modo de extracción, el material adsorbente a usar y los solventes de transporte y elución del analito.

<sup>1</sup>La expresión en inglés “endcapping” traduce “terminación”, y en este caso se usa para denotar que se reemplaza un grupo hidroxilo por un grupo alcoxisilil.

### 2.2.3.1 Selección del modo de extracción

Las modalidades de uso para la SPE mas usadas, que consisten en el *cleanup*, concentración de la muestra y la remoción de la matriz, y a la misma vez, depende del grado de concentración requerido para el analito, la complejidad de la matriz y la naturaleza del analito y las interferencias presentes en la matriz, el poder escoger una u otra modalidad de uso de este método de extracción. Para el análisis de plaguicidas se debe tener en cuenta la polaridad de la molécula de interés como un indicador del sistema solvente de transporte-sorbente-eluyente más adecuado para su extracción de la matriz, pero cuando se trata de análisis multiresiduo se debe buscar un material adsorbente de tipo universal para modalidad SPE en fase reversa, haciendo que los plaguicidas de interés tengan mayor afinidad por el material adsorbente que por el solvente polar, aprovechando una característica particular de los plaguicidas de que en gran parte son moderada y débilmente polar. Como el trabajo desarrollado por *Bogialli*, donde realizó un análisis multiresiduo de plaguicidas en leche de bovino usando SPE en fase reversa con un material conocido como *Carbograph 4*<sup>2</sup> y una mezcla de metanol y agua como solvente de arrastre o transporte [29].

### 2.2.3.2 Cleanup de la muestra

El proceso de cleanup consta fundamentalmente de la adsorción del analito por parte de la fase estacionaria mientras que la fase móvil arrastra las impurezas presentes y que pueden dificultar la determinación instrumental del analito [24]. Cuando el analito es más polar que las impurezas presentes, se debe usar un solvente de baja polaridad, para que este arrastre las impurezas y no arrastre al analito, para que quede atrapado en el material adsorbente de alta polaridad. Este sistema que se describe hace referencia a una extracción en fase normal, dado que la fase móvil es menos polar que la fase estacionaria y se usa cuando se tiene conocimiento de que las impurezas presentes son menos polares que el analito. Cuando las impurezas son más polares que el analito, se debe disolver en un solvente de alta polaridad, para que dichas impurezas interactúen más fuertemente con el solvente y el analito menos polar interactúe mejor con la fase estacionaria. Cuando se tiene que la fase móvil es mas polar que la fase estacionaria, se trata de una extracción en fase reversa, que finalmente busca eliminar las impurezas mas polares que el analito [27].

### 2.2.3.3 Remoción de la matriz

Este procedimiento se ejecuta cuando la complejidad de la composición de la matriz es alta, y se requieren realizar una purificación óptima del analito tras la retención de las impurezas que interfieren en la detección del mismo. *Bogialli* describe una metodología de extracción multiresiduo de herbicidas y fungicidas (Carbendazim, chloridazon, dicamba, bentazone, carbetamide, cyanazine, monuron, simazine, metsulfuron, chlorsulfuron, monolinuron, Atrazine, methazachlor, isoproturon, diuron, 2,4-D, bensulfuron, sec-

---

<sup>2</sup>*Carbograph 4* es un ejemplo de la familia de carbón grafitado negro absorbente que tiene una superficie de aprox. 200m<sup>2</sup>/g. Es el mercado a que se refiere también como Carboprep®



butylazine, Linuron, terbutylazine, propanil, propyzamide, molinate, mecoprop, dichlorprop, chloroxuron, metolachlor, 2,4-DB, 2,4,5-TB, neburon, propiconazole, prochloraz y pentachlorophenol) en muestras de leche, con una mezcla metanol-agua (altamente polar) como solvente de arraste, usando cartucho de SPE *Carbograph 4* y usando una mezcla de agua-metanol (50/50) como mezcla de transporte, seguido de 0,3 ml de metanol como mezcla de elución con un caudal de salida de 5.6 mL /min. Este experimento se desarrolló por SPE en fase reversa obteniéndose porcentajes de recuperación de 93% en promedio [29].

En otro ejemplo de remoción de la matriz fue la desarrollada por *Romero*, el cual analizó 15 plaguicidas organofosforados (clorpirifos, clorpirifos metil, coumafos, diazinon, diclorvos, dimetotato, disulfoton, etion, fenamifos, forato, isofenfos, malation, metil paration, paration y terbufos) con una mezcla de acetonitrilo-agua como mezcla de arrastre o transporte y adiciones sucesivas de mezclas hexano-acetona (90:10) y acetona-tolueno (75:25) como solventes de arrastre. Este análisis arrojó porcentajes de recuperación de un promedio de 92% [22].

#### 2.2.3.4 Selección del material adsorbente

La selección del material adsorbente depende de las características del analito, las características de la matriz de la muestra y el método analítico para su determinación. Para la SPE en fase normal un ejemplo de estos materiales es el *cianopropil* [25] (figura 9).

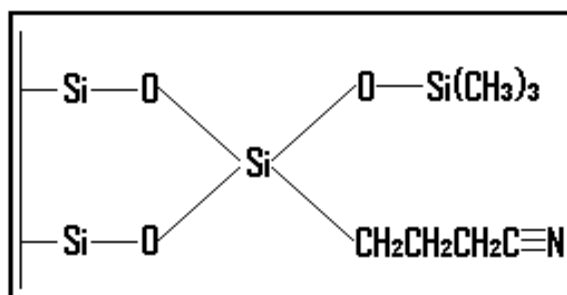


Fig. 9. Estructura del material adsorbente cianopropil

El grupo ciano (CN) es el que le brinda el carácter polar al material descrito, y es precisamente en este punto donde se dará la interacción con el compuesto a separar. Para SPE en fase reversa un material comúnmente usado para este fin es el *octadecil* (figura 10).

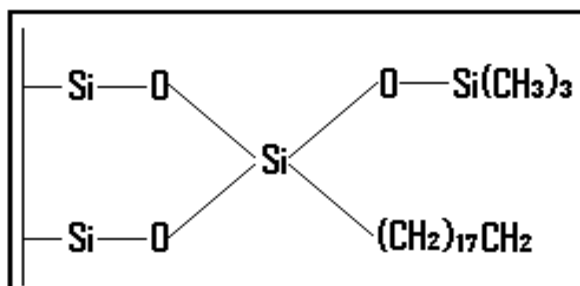


Fig. 10. Estructura del material adsorbente octadecil.

El grupo en el que se generan las interacciones es el grupo octadecil, exactamente en el carbono inicial y terminal de la cadena por la cual se compone, que como se observa es una cadena alifática, que es prácticamente apolar y es por esto que es útil en la extracción en fase reversa. Las impurezas que acompañan al analito en la matriz en ocasiones representan interferencias en el mismo proceso de separación a través de la SPE, como obstaculizar la interacción entre el analito y el material adsorbente o taponar los filtros de superior y/o inferior del reservorio. Por ejemplo los carbohidratos y polisacáridos son contaminantes solubles en solventes polares pero tienden a pasar sin retenerse en materiales adsorbentes no polares. Las proteínas son grandes macromoléculas que en muchos casos no pueden pasar a través de los poros de muchos materiales con terminaciones sintetizadas, para lo cual se usa el acetonitrilo en el proceso de extracción con el objeto de que este haga precipitar las proteínas para que quede una solución supernadante de acetonitrilo acuoso que contendrá el analito.

Las sales inorgánicas son las impurezas más comunes en matrices polares, las cuales pasan fácilmente a través de materiales no polares y casi todos los materiales polares. Las carnes y los tejidos adiposos poseen grandes cantidades de grasas, las cuales son altamente solubles en solventes polares. Una vez se hayan solubilizado en dicho solvente, el analito podrá ser atrapado en un material polar mientras que el solvente arrastrara estos componentes apolares [27].

### 2.2.3.5 Selección del solvente

En la sección 2.2.2.3 se menciona que la fuerza eluotrópica ( $\epsilon^\circ$ ) se define como la fuerza de adsorción de un solvente en la sílica. El uso de este parámetro permite saber cual es solvente más adecuado para realizar determinada extracción a ciertas condiciones conocidas en el analito y el material adsorbente. Además de la  $\epsilon^\circ$  también se puede usar el índice de polaridad que se determina para solventes cromatográficos de acuerdo a su habilidad para solvatar determinados solutos. El índice es una medida de la polaridad de determinados solventes en extracciones líquido-líquido. Adicionalmente se comprende las series eluotrópicas como un listado de compuestos ordenados según su poder de elución con respecto a un material adsorbente dado. Estas series están comúnmente acompañadas de los valores del índice de polaridad de cada una. En la tabla 1 del anexo se describe una de estas series eluotrópicas con respecto a la sílica [25].

Según los datos expuestos el acetonitrilo tiene mayor fuerza de elución que la acetona en la sílica, que es un material polar. Pero si se determinaran estos valores para un material de baja polaridad como el decilsilano o el octadecilsilano, se tendría que la acetona en ese caso tendrá mayor poder de elución que el acetonitrilo. El índice de polaridad es útil para determinar la solubilidad o no de un solvente en otro, pero no refleja el comportamiento adsorbente del solvente como si lo hace la  $\epsilon^\circ$ . En muchos casos se hacen necesarias mezclas binarias de solventes para alcanzar valores precisos de  $\epsilon^\circ$ , pero dicha fuerza no varía linealmente con proporciones que si varían linealmente, pero aun así es útil cuando se necesitan valores precisos.

Experimentalmente se ha demostrado que valores de  $\epsilon^\circ$  menores que 0,38 son los solventes más efectivos para la adsorción de componentes moderadamente polares en materiales adsorbentes polares como la sílica y sus derivados polares. Mientras que solventes con valores por encima de 0,5 se pueden usar como disolvente de compuestos no polares en materiales adsorbentes no polares como los materiales con terminaciones decil y octadecil [27]. Para la elección de un solvente de elución se debe comprender su valor de  $\epsilon^\circ$  y la del índice de polaridad del analito, por ejemplo el alto valor de  $\epsilon^\circ$  del metanol (0,73) indica que es efectivo para arrastrar o eluir moderadamente y fuertemente analitos polares de materiales adsorbentes muy polares. El cloruro de metileno, con un valor de  $\epsilon^\circ$  de 0,32, se usa para eluir analitos apolares de materiales no polares o con terminaciones apolares. Popularmente se tiene una apreciación como “polar disuelve a polar” o “apolar disuelve apolar”, pero el metanol desmiente en varios casos esta frase, el cual posee un alto valor de  $\epsilon^\circ$ , y puede diluir igualmente grupos polares y apolares por igual. Por esta razón, el metanol es un excelente solvente acondicionador para los materiales adsorbentes [27].

### **2.3 MICROEXTRACCION EN FASE SOLIDA (SPME)**

La preparación de muestras previo al análisis en los equipos adecuados, es un paso crítico a la hora de una adecuada determinación de plaguicidas. El gasto de solventes, el tiempo de extracción del analito, la complejidad de la matriz del mismo y la fiabilidad y efectividad del método de extracción son factores determinantes en los análisis semicuantitativos y cuantitativos en campos como el análisis de la calidad de los alimentos. Los análisis a través de la cromatografía de gases (GC) con detectores de captura de electrones (ECD) y con detectores de ionización de llama (FID), además de la cromatografía de gases acoplada a detector de masas (GC/MS), la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y esta misma acoplada a detector de masas (HPLC/MS) son las técnicas más usadas en el análisis cuantitativo y cualitativo de plaguicidas en diferentes matrices, que generalmente requieren de procesos de extracción y preparación de muestras eficientes y rápidos dados los volúmenes de muestras comunes.

La microextracción en fase sólida (SPME) fue desarrollada por el Dr. Januzs Pawliszyn en 1989, como un método que simplifica los procesos de extracción, recortando el tiempo de la misma y minimizando el uso de solventes. El dispositivo para la SPME consta

básicamente de una fibra de sílice fundida inerte que está recubierta de un polímero orgánico como fase estacionaria, unidos a través de un entrecruzamiento permanente sin presencia de enlaces entre los dos. La base de sílica tiene un espesor entre 100 y 200 micrómetros, mientras que el recubrimiento de la fase estacionaria mide entre 10 y 20 micrómetros. Para el uso de la SPME se tienen dos modalidades fundamentales para su aplicación, que es el muestreo de gases (Headspace, HS) y la inmersión directa en la matriz del analito (Direct Inmersion, DI) [30]. La modalidad HS-SPME se usa cuando el analito está presente en forma gaseosa o la volatilidad del mismo en la matriz líquida o sólida es muy alta, y puede ser retenido en forma en la atmósfera adyacente a la matriz del mismo, mientras que la modalidad DI-SPME implica la inmersión total del tubo de extracción en la matriz líquida. La SPME se puede acoplar fácilmente a los sistemas GC/MS y HPLC/MS, siendo este último muy útil para los análisis de plaguicidas débilmente volátiles o termolábiles, los cuales no son fáciles de analizar por GC o GC/MS, pero en general el uso del sistema SPME-MS es el idóneo porque se usa una extracción rápida, simple, limpia y efectiva con una detección sensible y que permite el análisis de prácticamente cualquier plaguicida.

### 2.3.1 Fundamentos de la SPME

El sistema de SPME es un dispositivo muy simple, está constituido por una jeringa modificada que sirve como protección a la frágil fibra de soporte, que comúnmente es una fibra de sílice inerte fundida recubierta por una delgada película de un polímero, que convencionalmente también se usan como material de recubrimiento en cromatografía. En la figuras 11 y 12 se exponen las dos modalidades de uso para la SPME, que son la HS-SPME y la DI-SPME [31].



Figura 11. Diagrama del proceso de extracción DI-SPME.

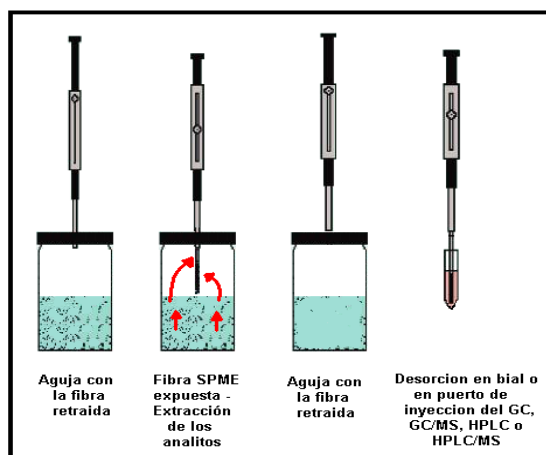


Figura 12. Diagrama del proceso de extracción HS-SPME.

El funcionamiento del dispositivo es simple para ambas variaciones de la SPME, donde el dispositivo se ubica dentro de una cámara que contiene el analito, se libera la fibra del interior de la jeringa para que interactúe con el ambiente o la solución determinada, el polímero de la fibra funciona como una esponja y ejecuta los procesos de adsorción/absorción<sup>3</sup> con el analito de la muestra. Esta interacción es similar a la que se presenta en la cromatografía entre la partición gas/líquido o líquido/líquido, pero en general los tiempos de muestreo son de unos pocos minutos. Para ambas configuraciones se hace necesario cierto nivel de agitación de la muestra para facilitar la interacción entre el analito y el material de recubrimiento, y si es en solución acuosa necesitara una agitación más intensa como agitación magnética o incluso sonicación. En la HS-SPME se necesita que el analito sea suficientemente volátil como para interactuar con el material de recubrimiento, y esto sin que la fibra tenga contacto con la matriz del analito, lo que hace que se proteja ante ambientes hostiles para la misma, como matrices con altos o bajos pH y altas cantidades de proteínas. Este modo de extracción además permite que se extraiga en mayor proporción el analito a evaluar si este tiene una volatilidad mayor que la de los demás componentes de la muestra. La elección de una u otra modalidad de extracción, implica ciertas variaciones en la cinética de la extracción. Para ambos casos de la SPME, se entiende que la extracción es completa cuando se logra un equilibrio en la distribución del analito entre la matriz que lo contiene y la fase estacionaria, *Pawliszyn* propone una ecuación que describe la condición de equilibrio:

<sup>3</sup>La adsorción hace referencia al proceso de atracción de las moléculas del analito en la superficie de la fase estacionaria, siendo este un proceso físico, donde el tipo más frecuente es el que se da en la adhesión de líquidos y gases en la superficie de materiales sólidos, que tienen la cualidad de ser materiales porosos, con gran área de superficie total, pero donde los analitos "compiten" por un lugar en la superficie y las fibras tienen una determinada capacidad de carga.

La absorción hace referencia a la retención del analito por las moléculas de la fase estacionaria en estado líquido, que se hace a través de todo el espesor del material de retención y estas condiciones el material no compite por posiciones en la fase estacionaria ya que la fibra puede contener una gran cantidad de moléculas del analito [32].

$$n = \frac{K_{fs}V_fV_sC_o}{K_{fs}V_fV_s}$$

Donde  $n$  es la cantidad de analito extraída por la fase estacionaria,  $K_{fs}$  es el coeficiente de distribución entre la fibra y la muestra de la matriz,  $V_f$  es el volumen de la fibra que sostiene el recubrimiento,  $V_s$  es el volumen de la muestra y  $C_o$  es la concentración inicial del analito en la muestra [18]. Esta ecuación indica una relación directa entre la concentración del analito en la muestra y la cantidad extraída del mismo. Asumiendo que el volumen de la muestra es mucho mayor al volumen de la fibra de soporte, la cantidad de analito extraído en la muestra es insignificante ante la cantidad que está contenida en la muestra, en este caso la ecuación se simplificaría de este modo

$$n = K_{fs}V_fC_o$$

En esta ecuación, la cantidad de analito extraída es independiente del volumen de la muestra inicial. Lo que indica que no es necesario tener un volumen de muestra fijo antes de la extracción, lo que posibilita que la muestra sea expuesta a la atmósfera (HS) o a soluciones acuosas o de disolventes comunes (DI) y la cantidad de analito extraída será directamente proporcional a la cantidad de analito en la muestra. Esto ofrece una reducción sustancial de pérdidas del analito, ya que la muestra podrá extraerse desde el sitio de origen de la misma y evitar pérdidas por descomposición o absorción en las paredes de los recipientes de muestreo. Además de esto, lo hace idóneo para el análisis de sólidos o materiales de una viscosidad muy alta. Pero es de anotar que además de la configuración en el modo de extracción, otros factores importantes a ser determinados son el grosor de la fibra y los coeficientes de difusión de la molécula del analito en la muestra [30].

Cuando la extracción se ha llevado a cabo, es decir cuando se ha llegado al equilibrio en el recubrimiento de la fibra, esta se retrae de nuevo al interior de la jeringa y se introduce la fibra directamente en el puerto de inyección del instrumento. Después del proceso de desorción en el puerto, la fase estacionaria habrá quedado limpia y podrá ser usada en un nuevo proceso, reduciendo así el gasto de solventes para sus lavados siendo favorable para el medioambiente, además de ser sumamente simple en su uso y de que su tamaño favorece su transporte con mucha facilidad. Los rendimientos en la extracción de la SPME son comparables con los obtenidos por técnicas de extracción líquida, siendo incluso superior que la LLE. En la SPME es extraída una pequeña cantidad del analito contenido en la muestra, pero se deposita todo el contenido del mismo en el equipo de análisis tras la desorción, mientras que en la LLE se extrae casi completamente todo el analito de la muestra, pero solo una pequeña cantidad de este llega al equipo de análisis [30]. Para el análisis de muestras polares, se usa comúnmente la configuración HS-SPME usando como analizador un equipo GC/MS, usando un sistema de inyección *splitless* que hace que el análisis sea más sensible. Las muestras polares y no volátiles se analizan con la configuración DI-SPME usando como sistemas de análisis GC/ECD, GC/FID o HPLC y posiblemente también por electroforesis capilar (CE) [31].

### **2.3.2 Parámetros involucrados en la SPME**

En la presente sección se describen los parámetros principales a tener en cuenta a la hora de usar la SPME como método de preparación de muestras.

#### **2.3.2.1 Materiales de recubrimiento**

El principio de extracción de los analitos se basa en los procesos de equilibrio cinético del analito en el material de recubrimiento o fase estacionaria, tal como el equilibrio gas-liquido (HS) y liquido-liquido (DI), en el caso de usar como fase estacionaria el PDMS (polímero liquido) o en el caso de gas-sólido (HS), que se usa carboxeno (polímero sólido) como fase estacionaria. Si se tuviese una agitación perfecta, para ambas configuraciones en la SPME, la extracción solo dependería de la geometría de la fibra y del coeficiente de distribución del analito en la fibra. Así mismo, el principal factor que condiciona el rendimiento de la SPME es el grosor y el tipo de material de recubrimiento. Para el análisis de plaguicidas en leche se usan fibras de PDMS, DVB (Divinilbenceno) y PDMS-DVB de 100 y 65  $\mu\text{m}$  principalmente [33.34]. En la tabla 2 del anexo se exponen los materiales de recubrimiento más usados donde se especifica el modo en el que la fase estacionaria esta unido a la fibra inerte de sílice fundido, que puede ser por una unión con enlace (bonded), unión sin enlace (non-bonding), unión por entrecruzamiento (cross-linking), unión parcial de entrecruzamiento (partial cross-linking) o unión de alto entrecruzamiento (high cross-linking), además de parámetros que definen el modo de uso y para cuales tipos de analitos es adecuado cada material [30].

Mientras más gruesa sea la fibra del material de recubrimiento, más tiempo tomara el tiempo de extracción pero, en general, son mejores los rendimientos y comúnmente se usan fibras delgadas cuando se hace trabajo en campo. Cuando la fibra ha sido usada, puede ser reutilizada posteriormente, pero se recomienda siempre hacer lavados posteriores a su uso a través de los mismos gases de arrastre del GC, ya que puede existir acumulación oxidativa de oxígeno al interior de la fibra. Igualmente se puede usar lavados por 10 minutos de metanol para acondicionar la fibra antes de su uso. Las fibras pueden ser usadas entre 20 y 150 veces dependiendo de la matriz de la muestra donde se use [31].

#### **2.3.1.2 Procedimiento de extracción**

En las figuras 11 y 12 se exponen las dos modalidades para la extracción para la SPME, en las cuales se espera que se produzca la concentración del analito en la fase estacionaria de la fibra. Después de alcanzado el equilibrio del analito en la fibra, que puede tardar unos pocos minutos a horas dependiendo de la matriz de la muestra y las propiedades del analito, se extrae la fibra para ubicarla en el puerto de inyección del GC o HPLC. La fibra deberá estar expuesta, para que se produzca la desorción térmica del analito en el puerto de inyección del GC y por el flujo de solventes en la cámara de desorción en el caso del HPLC, donde posteriormente se eluye la muestra y se aplica la cromatografía de forma convencional [31]. En matrices complejas como lodos, alimentos o material biológico se recomienda usar la modalidad HS. En las dos modalidades de la

SPME, la agitación de distintos tipos (magnética, sonicación, etc.) mejora sustancialmente los rendimientos de la extracción, aunque la agitación magnética puede ser perjudicial para la fibra cuando se usa la DI-SPME, ya que la puede romper [34]. Para el caso del análisis de plaguicidas en una matriz como la leche, se usa comúnmente la configuración DI-SPME con una adecuada agitación, previniendo que no se afecte la fibra. Fernández-Alvares realizó una serie de experimentos para determinar que material era el idóneo para la extracción de 35 plaguicidas ( $\alpha$ -Lindane,  $\beta$ -Lindane,  $\gamma$ -Lindane, Tefluthrin,  $\delta$ -Lindane, Acethochlor, Transfluthrin, Alachlor, Heptachlor, Fenitrothion, Aldrin, Chlorpyrifos, Heptachlor epoxide, Allethrin,  $\gamma$ -Chlordane, Endosulfan I,  $\alpha$ -Chlordane, 4,4'-DDE, Dieldrin, Endrin, Endosulfan II, 4,4'-DDD, Endosulfan sulfate, 4,4'-DDT, Endrin ketone, Tetramethrin, Metoxichlor,  $\lambda$ -Cyhalothrin, Cyphenothrin, Permethrin, Cyfluthrin, Cyphermetrin, Flucythrinate, Fenvalerate, Deltramethrin) por GC/ $\mu$ ED, además de cual configuración era la más indicada para este proceso. Lo que obtuvo fue que el material más adecuado fue el PDMS-DVB (ver tabla 2 del anexo) para la extracción efectiva de casi todos los plaguicidas mencionados, además de usar la DI-SPME como configuración para la preparación de la muestra, obteniendo finalmente límites de cuantificación promedio de 0,1 ng/L y límites de detección de 0,04 ng/L, los cuales pueden inferir que la técnica de preparación es altamente efectiva y la técnica de análisis instrumental es muy sensible [33].

De igual forma, Rodrigues expone una metodología para la determinación de plaguicidas en muestras de leche de bovino (Demeton-S, Sulfotep, Dimpylate, Disulfoton, Methylparathion, Parathion, Diclorvos, Fenitrothion y Chlorpyrifos) por GC/MS, usando la HS-SPME como método de preparación de muestras y PDMS, PDMS-DVB Y PA (ver tabla 2 del anexo) como materiales de recubrimiento, donde la fibra con mejor desempeño para la extracción de plaguicidas en este caso fue la PDMS-DVB. Con estas condiciones obtuvo un límite de detección promedio 3,6  $\mu$ g/L (excepto para el Methylparathion que fue de 10,9  $\mu$ g/L) y un límite de cuantificación promedio de 12  $\mu$ g/L (excepto para el Methylparathion que fue de 32  $\mu$ g/L) [34]. Estos resultados igualmente implican que la técnica aplicada es altamente eficiente en la extracción y análisis instrumental de los plaguicidas descritos.

Para que la técnica conserve la precisión y reproducibilidad, deben mantenerse constantes los factores tales como la temperatura de extracción, la velocidad de agitación de la muestra, pH de la muestra, el volumen de muestra, y las condiciones de la desorción. Además se recomienda que cuando se analicen trazas, se desactive el material de vidrio para evitar pérdidas por adhesión de los analitos a las paredes de los recipientes. Para la desorción en el puerto de inyección del GC se recomienda que sea en puerto con un calibre estrecho para garantizar un alto flujo de gas portador, para así reducir el tiempo de desorción y evitar ensanchamiento en los picos del cromatograma y ya que no se usan solventes en el proceso, se usa la modalidad de inyección *splitless* para asegurar transferencia completa del analito y aumentar la sensibilidad de la determinación.

La interfaz de HPLC consta de una válvula de inyección de seis puertos y una cámara de la desorción especial, ya que la fibra requiere el uso de un solvente o una mezcla de



estos para la desorción de los analitos antes del análisis HPLC o HPLC/MS. Después de la extracción del analito en la muestra, la fibra se inserta en la cámara de desorción en la posición de "cargar" a presión ambiente. Cuando el inyector se cambia a la posición de "inyectar", la fase móvil hace contacto con la fibra y libera los analitos y estos entran en la columna HPLC. El análisis por SPME/HPLC también tiene la ventaja de eliminar el pico del disolvente en el cromatograma. Por desgracia, se observa un ensanchamiento de los picos del cromatograma porque la desorción de los analitos de la fibra puede ser lenta [32].

### 2.3.1.3 Optimización de la desorción

La desorción térmica eficiente del analito en un puerto de inyección en el GC depende principalmente de la volatilidad del analito, el espesor de la fase estacionaria de la fibra SPME, la temperatura del inyector y el tiempo de exposición de la fibra al interior del mismo. (SPME-HPLC) La mayoría de los inyectores capilares *split/splitless* en los instrumentos modernos de GC son adecuados para la introducción directa de la fibra. El volumen de inyección afecta la forma de los picos cromatográficos, por ejemplo mayores volúmenes causan un ensanchamiento de los picos. Los inyectores *split/splitless* deben ser operados en el modo *splitless*. En general, la óptima temperatura de desorción es aproximadamente igual a la del punto de ebullición del analito menos volátil. En la práctica, la temperatura de extracción debe ser 10 a 20 ° C más baja que el límite de temperatura de la fibra [31]. Para evitar ensanchamiento de los picos, la temperatura inicial en la columna del GC debe mantenerse baja. El tiempo de desorción depende de la temperatura del inyector y el caudal lineal del gas portador alrededor de la fibra.

Existen dos técnicas para la desorción de los analitos de la fibra en las interfaces del sistema SPME/HPLC, que son la desorción dinámica y estática. En la desorción dinámica, los analitos se extraen de la fibra por la fase móvil en movimiento. La desorción estática es cuando los analitos deben ser absorbidos en la fase móvil o en un disolvente fuerte por un tiempo determinado antes de la inyección en la columna de HPLC, ya que son más fuertemente absorbido por la fibra. En ambos casos, la desorción rápida y completa de los analitos se debe conseguir usando una cantidad mínima de disolvente para la optimización de los métodos SPME/HPLC o SPME/HPLC-MS [31].

### 2.3.1.4 Cuantificación

La SPME se uso principalmente para análisis cualitativos o semicuantitativos. El análisis para la cuantificación también es posible, en este caso es recomendable el usode estándares internos, como se usan en otras formas de cuantificación en relación con la preparación de muestras y análisis instrumental. El revestimiento de la fibra retira los compuestos de la muestra por la absorción en el caso de los recubrimientos líquidos (PDMS) o por adsorción en el caso de los revestimientos sólidos (Carboxen) [31].

Los métodos tradicionales de preparación de la muestra tratan de separar por completo los analitos de interés de la muestra, pero la SPME no funciona en este modo. Con la SPME, la cantidad de analito removido por la fibra (o la extracción capilar) es proporcional a la concentración de los compuestos en la muestra, por lo cual no es necesario la extracción total de los analitos de la muestra, lo que la hace mucho más versátil que otras metodologías de preparación de muestra ya que solo se necesitara una pequeña parte de analito de una gran cantidad de muestra [31]. La decisión sobre qué método de cuantificación se va a seleccionar depende de la matriz de la muestra, su complejidad y el método de extracción (HS o DI) que se utiliza. Cualitativamente se debe aplicar la optimización de los parámetros de SPME para determinar la fibra más adecuada y las condiciones de muestreo a utilizar antes de seleccionar un método de cuantificación y la calibración del instrumento. La reproducibilidad y la precisión se pueden mejorar con fibra de SPME a través de un cuidadoso control y seguimiento de tiempo y temperatura (que debe ser precisamente constante) durante la extracción de la muestra, donde el tiempo de extracción es un parámetro crítico en el proceso de muestreo SPME. Después de que el equilibrio se ha alcanzado (por lo general unos pocos minutos en HS y con agitación para la DI), pequeños cambios en los tiempos de extracción no tiene influencia decisiva en la resultados cuantitativos [32].

## CAPÍTULO 3

### TÉCNICAS DE ANÁLISIS INSTRUMENTAL PARA LA DETERMINACIÓN DE PLAGUICIDAS

#### 3.1 CROMATOGRAFÍA

Antes de describir los aspectos concernientes a la cromatografía de gases, que es una de las variaciones de la cromatografía empleada para el análisis de plaguicidas, vale la pena hacer primero una breve mención de los fundamentos de la técnica cromatográfica en general como método de análisis.

##### 3.1.1 Fundamentos de cromatografía

La cromatografía tiene como principio la diferencia de distribución de los componentes de una mezcla entre dos fases inmiscibles. Una de ellas, la fase móvil, que puede ser un líquido o un gas, fluye a través de una fase estacionaria, que puede ser un líquido o un sólido. Durante el proceso de separación cromatográfica la fase móvil fluye de manera continua sobre la fase estacionaria. De esta manera los componentes de la mezcla, y sus respectivas diferencias de afinidad con la fase móvil y la fase estacionaria, crean un equilibrio dinámico, permitiendo que los componentes que sean más afines a la fase estacionaria, se muevan lentamente bajo el influjo de la fase móvil. Análogamente, aquellos componentes que son retenidos con poca fuerza por la fase estacionaria, se mueven con mayor rapidez al paso de la fase móvil. Como consecuencia de las diversas velocidades de desplazamiento, los componentes de la mezcla se separan en bandas o zonas discretas, que pueden analizarse cualitativa y cuantitativamente [35].

Existen diferentes tipos de separaciones cromatográficas, con diferentes tipos de fases estacionarias y móviles. Habrá consideraciones particulares para las distintas variaciones de la cromatografía, pero de manera general, el proceso consta de 4 etapas fundamentales:

1. Preparación de la placa o columna: Esto hace referencia a la disposición espacial que adoptará la fase estacionaria.
2. Siembra, inyección o desorción: Es el primer contacto entre la mezcla a separar con la fase estacionaria, para su posterior desarrollo.
3. Desarrollo o separación: Corresponde al paso de la fase móvil a través de la fase estacionaria permitiendo la separación de la muestra.
4. Detección: Implica la localización de las zonas en que se encuentran los compuestos ya separados.

Como ya se dijo, las técnicas cromatográficas se fundamentan en las diferencias de distribución de una muestra entre dos fases inmiscibles. Con respecto a esta distribución, hay un aspecto que debe tenerse muy en cuenta en una separación, y es el llamado

*coeficiente de distribución*. Si se efectúa un experimento de extracción de un determinado analito entre dos fases inmiscibles, a diferentes concentraciones, los resultados de cada extracción se verán descritos por la siguiente expresión.

$$K_D = \frac{C_1}{C_2}$$

Esta expresión se conoce como factor de reparto, coeficiente de partición, o coeficiente de distribución. En ella,  $C_1$  corresponde a la concentración de la molécula de interés (expresada en Molaridad) en la fase orgánica, y  $C_2$  corresponde a la concentración de esta en la otra fase, que en muchos casos es acuosa. Así, esta expresión es una relación de concentraciones, la cual es constante a determinadas condiciones de temperatura y presión, y se puede emplear para determinar concentraciones en alguna de las fases, y aún si se conoce el volumen de las fases, se puede llegar hasta conocer la cantidad de analito presente en cada fase [35].

### 3.2 CROMATOGRAFÍA DE GASES

Dentro de la cromatografía de gases se presentan fundamentalmente interacciones gas-sólido y gas-líquido y esta recibe su nombre particular por el uso de un gas como medio de arrastre (fase móvil). Aunque ambas comparten un fundamento general, difieren en la naturaleza de la fase estacionaria, pues en la primera es un material sólido, mientras que en la segunda se trata de un líquido. Ambas operan de tal manera que los componentes de una muestra vaporizada son separados como consecuencia del reparto entre una fase móvil gaseosa y una fase estacionaria contenida en una columna. La muestra es vaporizada e inmediatamente sembrada en la columna, mediante un dispositivo de inyección. Una vez sembrada en la columna, es eluída a causa del flujo de un gas inerte, que desempeña el rol de fase móvil.

A diferencia de la mayoría de las técnicas de separación cromatográficas, la fase móvil en la cromatografía de gases no interactúa con los componentes de la muestra, toda vez que su única función es transportar los componentes de la misma a través de la columna. La cromatografía gas-sólido se fundamenta en una fase estacionaria sólida en la cual los analitos son retenidos gracias al fenómeno de la *adsorción*, y su aplicación es limitada a separar compuestos de bajo peso molecular. Los materiales finamente divididos como carbón activado, alúmina activa o sílica-gel microporosos con una gran área superficial activa (superficie de contacto) son fuertes adsorbentes, motivo por el cual son muy empleados como fases estacionarias en la cromatografía gas-sólido. Esto se debe al fenómeno de *adsorción preferente*, que ocurre cuando las moléculas de dos o más sustancias están presentes en un material adsorbente y las moléculas de una de esas sustancias pueden ser retenidas más fácilmente que las de las otras. Estos materiales también suelen ser empleados como soportes de la fase estacionaria líquida, en la cromatografía gas-líquido [35].

### 3.2.1 Componentes de un cromatógrafo de gases (GC)

En la figura 13 se muestra un esquema general de las partes de un cromatógrafo de gases, seguido de una descripción del recorrido que hace la muestra, así como de una descripción de cada parte del equipo.

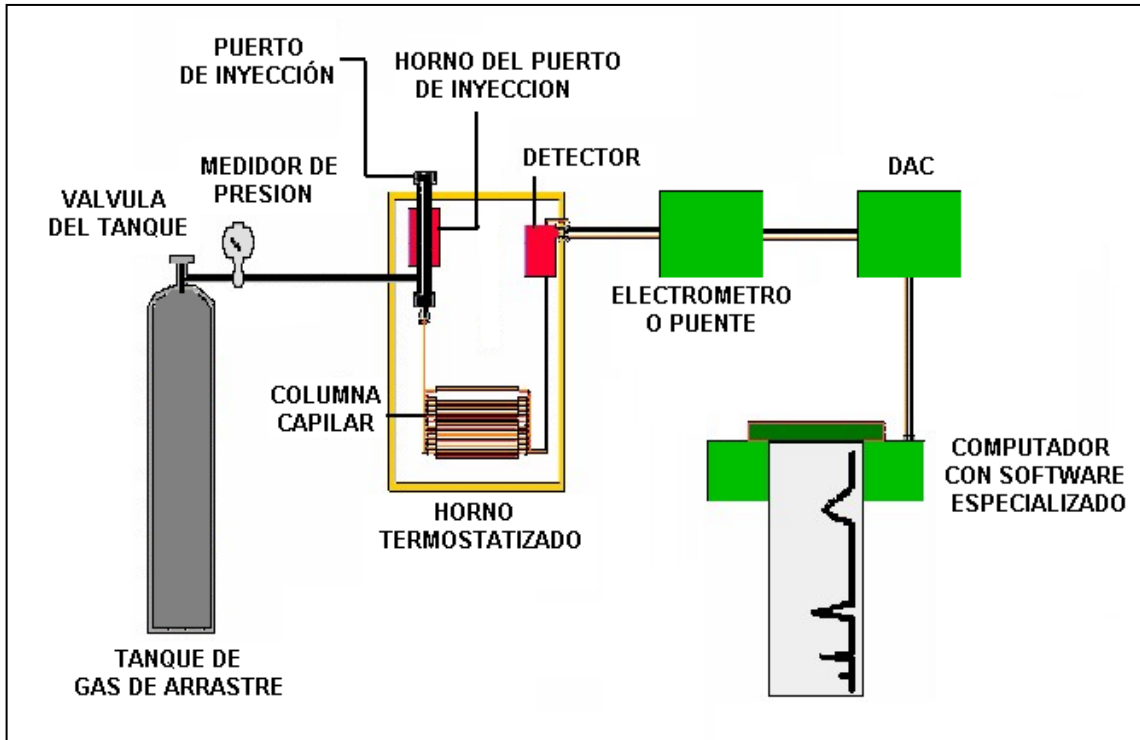


Figura 13. Esquema general de un Cromatógrafo de gases.

Todo el proceso inicia con la inyección de la muestra, efectuado por la *microjeringa*, y cuyo objetivo es depositar la misma en la cámara de inyección calorífica o *inyector*. A través de un flujo constante del *gas portador*, que pasa por el inyector, la muestra es transportada a la *columna*, donde los componentes de la misma se comienzan a distribuir en la fase estacionaria debido a las distintas formas de interacción con la misma. La columna que puede ser rellena o capilar, ubicada en el interior de un recinto termostático u *horno*.

La velocidad de movimiento de los distintos compuestos de la mezcla a lo largo de la columna, da como resultado tiempos de retención diferentes para cada compuesto. Si el coeficiente de partición favorece la fase estacionaria, la velocidad de migración del compuesto a través de la columna será baja. Análogamente, aquellos que sean retenidos débilmente por la fase estacionaria, se desplazarán con mayor velocidad a lo largo de la columna. El compuesto que tenga menor afinidad por la fase estacionaria llegará más rápidamente al final de la columna. Los primeros componentes que emergen de la columna junto con el gas portador, ingresan al *detector*, cuya señal emitida es amplificada

por el *electrómetro*, activando el *registrador*, que permite manejar un registro permanente de la separación, al trazar un gráfico llamado cromatograma, que muestra los *tiempos de retención* de cada sustancia, y la intensidad de la señal (directamente proporcional a la concentración del analito) expresada en milivoltios (mV). Este gráfico consta de una serie de picos, cuyo tiempo de retención permite identificar el compuesto, y con el área bajo el pico se determina la concentración, por ende el tamaño del pico será directamente proporcional a la intensidad de la señal recibida desde el detector y esta señal a su vez es directamente proporcional a la concentración del analito. En la figura 14 se ilustra un cromatograma típico. Si la señal es digitalizada por un convertidor análogo digital DAC (Digital Analog Converter), se puede llevar a un *computador* con un software especializado para ser mostrada en un monitor [35].

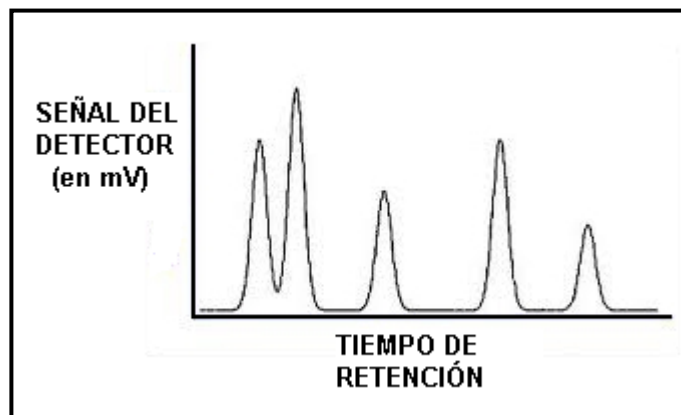


Figura 14. Representación de un cromatograma típico

### 3.2.1.1 Puerto de inyección

La introducción de la muestra se logra por medio de una microjeringa graduada en microlitros provista de una aguja hipodérmica que atraviesa un tapón de caucho (séptum) del recipiente tipo vial que contiene la muestra. De allí se extrae para luego ser depositada en el puerto de inyección. La muestra puede ser introducida allí mediante el empleo de válvulas y en forma automatizada para minimizar errores en la cantidad inyectada. Es un recinto calentado eléctricamente y recubierto de un material refractario que lo mantiene a elevadas temperaturas, lo que permite la vaporización de la muestra. Además se puede ubicar en su interior un tubo capilar de vidrio, para la retención de los sólidos que pueda poseer la muestra y así proteger la columna de posibles contaminantes de este tipo. A la salida de la cámara de inyección, la muestra en fase de vapor, se encuentra con el gas portador, que la conduce a la columna.

### 3.2.1.1.1 Sistemas de Inyección de muestras en cromatografía de gases

Dependiendo de la cantidad de muestra disponible, del tipo de columna que se emplee y en últimas de la concentración de los analitos, existen dos sistemas usados para inyectar la muestra en la columna de separación:

**a) Inyección en Split:** Al momento de trabajar con columnas capilares, es necesario reducir el volumen de muestra para no sobrecargar el sistema. Generalmente se inyecta 1 $\mu$ L de muestra por medio de un inyector-divisor (inyección en *split*) pero realmente solo ingresan 0.01 $\mu$ L a la columna. Este método impide la sobrecarga de la columna pero desperdicia una cantidad considerable de muestra.

**b) Inyección en splitless:** Cuando la cantidad de muestra disponible es muy limitada y las concentraciones de los analitos están en niveles considerablemente bajos, si se empleara inyección en Split se introduciría muy poca muestra en la columna. Para estos casos se requiere un sistema de inyección sin división (*inyección splitless*). A través de este mecanismo, la muestra completa incluyendo el disolvente se introducen en la columna a través de un vaporizador instantáneo caliente. Se evita un exceso de solvente en la columna, abriendo hacia la atmósfera el puerto de inyección, poco tiempo después de inyectada la muestra, cuando una buena parte del disolvente y la totalidad de la muestra han ingresado a la columna. Este método de inyección es el más empleado actualmente en el análisis de plaguicidas en leche cruda, debido a las bajas concentraciones como se comprueba en el trabajo publicado por *Rodrigues* [34], el cual alcanzó los siguientes criterios de mérito:

- ✓ Coeficientes de variación en un rango entre 6,15 y 29,25% para Sulfotep y demeton-S respectivamente. Estos valores son aceptables teniendo en cuenta la complejidad de la matriz de la muestra (leche).
- ✓ Coeficientes de correlación lineal que varían en un rango de 0,9253 y 0,9987.

### 3.2.1.2 Gas Portador

Se debe disponer de una fuente de gas portador, ya sea un cilindro, un depósito o un gasómetro. Deben disponer de manómetros y reductores de presión. Generalmente uno de ellos marca la presión interna del cilindro y el otro marca la presión de salida. Los gases de mayor uso para estos fines son: N<sub>2</sub>, He, Ar, Ar más metano, CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>, pero estos deben reunir ciertos requisitos para cumplir la función de arrastre eficazmente, las cuales se describen a continuación.

- Debe de poseer un comportamiento inerte frente a la fase estacionaria y los componentes de la muestra.
- Debe ser térmicamente estable.
- Su selección depende de:
  - Disponibilidad del Gas.
  - Pureza del gas.

- Consideraciones particulares del análisis y del detector empleado.

El  $N_2$  y el  $e$  son los más empleados debido a la fácil adquisición y bajo costo. El contenido de  $O_2$  en el gas de arrastre no debe superar las 20 ppm, toda vez que existe el riesgo de que al estar en contacto con la mezcla durante un tiempo a elevadas temperaturas, se pueda producir una degradación o algún tipo de alteración de la muestra.

### 3.2.1.3 Columna cromatográfica

Es al interior de esta donde se efectúa la separación, por lo que se le conoce como el “*corazón del cromatógrafo*”. Debido a la amplísima variedad de análisis que se pueden realizar por cromatografía de gases, existen diferentes tipos de columnas que pueden variar en muchos aspectos como longitud, material de la columna, diámetro interno, etc. Sin embargo, la diferencia fundamental entre un tipo de columna y otra radica en la constitución de la fase estacionaria, así:

#### a) Empacadas

- Fase estacionaria líquida, que recubre un soporte sólido, para cromatografía gas-líquido.
- Fase estacionaria sólida, en los casos de cromatografía gas-sólido.

#### b) Capilares

- Columna Capilar de pared recubierta (W.C.O.T)<sup>4</sup>
- Columna Capilar de soporte recubierto (S.C.O.T)

En el caso de las columnas capilares W.C.O.T son tubos capilares donde la pared interna está cubierta de una finísima capa de fase estacionaria. Las segundas (S.C.O.T) poseen en su parte interna una fina capa de material adsorbente, como el empleado en las columnas empacadas, donde se ha adherido la fase estacionaria. Cada tipo de columna, trae sus ventajas y desventajas frente a las demás. En el caso de las columnas empacadas, su capacidad de carga es mayor, por lo que puede trabajar con mucha más cantidad de muestra que una columna capilar. Análogamente, la ventaja de las columnas capilares frente a las empacadas es su eficacia en el proceso de separación de las mezclas determinadas.

La columna se encuentra ubicada en el interior de un recinto termostatzado u horno. Esto se debe a que la temperatura influye de manera importante en la retención de los componentes por la columna, y por ende en la separación de éstos. Por tal motivo, la temperatura debe ser uniforme a lo largo de la columna y fácilmente controlable. Se consigue uniformidad en la temperatura a lo largo de la columna haciendo circular aire caliente por todo el recinto que la contiene. Esto se hace por medio de un ventilador. En la mayoría de los equipos la temperatura se puede regular de un modo continuo a un valor deseado. De igual forma en algunos equipos se acopla un programador lineal de temperatura para calentar la columna con una o varias rampas de calentamiento.

---

<sup>4</sup> Las siglas W.C.O.T y S.C.O.T hacen referencia a la abreviatura en inglés del tipo de columna: *Wall Coated Open Tubular* y *Support Coated Open Tubular*.



Para los análisis de plaguicidas por cromatografía gaseosa, como en el caso del análisis hecho por *Fernández*, las rampas de calentamiento para la columna se programaron de la siguiente manera [33]; 60°C por dos minutos. Luego 30°/min hasta llegar a 200°C, 3°/min hasta 230°C y finalmente 4°C/min hasta 300°C, con un programa de consecución total de 34,17 minutos.

### 3.2.1.3.1 Soporte Sólido

Las sustancias empleadas para este fin son muy diversas. Sin embargo, todas se eligen con la finalidad de aumentar la superficie efectiva de contacto entre la fase estacionaria líquida a la cual sirve de soporte y los componentes de la mezcla que se encuentran en fase de vapor. Un soporte sólido debe de poseer las siguientes características:

- Superficie específica de contacto extensa.
- Estructura porosa con diámetro uniforme.
- Debe ser inerte, no tener interacción química con la muestra.
- Las partículas deben ser de tamaño uniforme.
- Debe tener resistencia mecánica y no romperse fácilmente.

No se ha encontrado un soporte que reúna todos estos requisitos. Por lo general habrá una de las características que determine el tipo de soporte a usar. Las sustancias empleadas como soporte sólido para cromatografía de gases son de tres tipos: Tierras diatomáceas, esferas de vidrio y teflón. Las tierras diatomáceas son los soportes más empleados. Reciben varios nombres según el fabricante y el tratamiento químico que reciban con objeto de mencionar algunas características mencionadas anteriormente. Según el fabricante pueden tener nombres como: Chromosorb, Gas-Chrom, Anakrom, Celite, etc. Además llevan el sufijo que indica el tipo de tratamiento químico que han recibido. Estos pueden ser: Lavado con Ácido (AW), silanizado(HMDS) o (DMCS). En el trabajo realizado por *Romero*, se emplea una columna PE-1 con relleno de polidimetilsiloxano (PDMS) de 25 m de largo, 0,33 mm de diámetro interno y 0,25µm de espesor de película [22].

### 3.2.1.3.2 Fase Estacionaria Líquida

La fase líquida debe poseer características fisicoquímicas similares a la muestra a analizar. Así, para el análisis de hidrocarburos saturados se emplea un hidrocarburo saturado como fase líquida. Es conveniente relacionar esta semejanza con base a polaridades. Además de ser semejante a la muestra, la fase líquida debe cumplir ciertos requisitos que permitan un buen desempeño de la misma, y por ende ofrecer una separación efectiva de los componentes de la muestra. Dentro de estas características las más importantes son:

- **Viscosidad:** No debe ser muy alta a la temperatura de trabajo, para proporcionar un rápido establecimiento de los equilibrios de reparto entre las fases.
- **Tensión Superficial:** Debe mojar bien el soporte, asegurando que la adherencia soporte-líquido sea suficiente para evitar que la fase móvil arrastre la fase estacionaria, provocando mala distribución en la columna.
- **Tensión de Vapor:** Debe ser mínima, con el objeto de prevenir que una evaporación de la fase estacionaria haga que la misma pase a la fase móvil. Lo cual presentaría perturbaciones en la separación y en el análisis posterior.
- **Selectividad respecto a los componentes de la fase móvil:** Esta condición es la que define en sí a la cromatografía de gases. Las constantes de reparto de los componentes a separar deben ser suficientemente diferentes para que la fase estacionaria oponga distintas resistencias al paso de los componentes a través de la columna, proporcionando así una buena separación de los componentes de la misma.
- **Reversibilidad de reparto:** El reparto de cada componente entre las fases debe ser reversible para favorecer que los procesos consecutivos de absorción y desorción, que se llevan a cabo a lo largo de la columna, sean rápidos y completos al momento de alcanzar el equilibrio. Esta condición excluye por defecto, cualquier reacción química entre los componentes de la muestra y la fase estacionaria.

Para los análisis de plaguicidas en leche, no se han encontrado autores que empleen fases estacionarias líquidas, pues la tendencia es emplear columnas capilares con recubrimientos internos como PDMS [35] y fenil-metilpolisiloxano [36,37].

#### 3.2.1.4 Detectores

Los detectores son dispositivos que determinan la presencia o no de un analito de interés y miden la cantidad del mismo en la corriente del gas portador, convirtiendo una señal no medible directamente en una señal elaborable de una propiedad física. Esta señal es elaborada por una comparación entre el gas acarreador puro (blanco) y el mismo gas llevando cada uno de los componentes previamente separados en la columna, esto es traducido en una señal eléctrica que es amplificada y registrada al momento de salir de la columna [36].

Los detectores usados en cromatografía de gases son transductores de concentración, es decir, instrumentos con la capacidad de medir, en este caso, la variación de la concentración de las sustancias eluidas en el seno del gas portador, convirtiéndola en una señal eléctrica proporcional, fácilmente medible y registrable en función del tiempo. En general, los detectores empleados en cromatografía de gases, deben reunir ciertos requisitos propios de las exigencias y de la naturaleza de la técnica cromatográfica como tal; esto implica que debe ser un transductor de concentración en fase de vapor, poseer

una adecuada sensibilidad así como un bajo nivel de ruido, estabilidad y reproducibilidad, que le confieran por ende una alta fiabilidad y manejo sencillo [35].

Por otra parte, debe ser rápido, capaz de revelar casi instantáneamente variaciones de concentración en el gas portador que emerge de la columna. Esta rapidez de respuesta es particular para cada detector, pero puede decrecer si el volumen interno del mismo es grande. En vista de ello, para obtener una rápida respuesta y evitar pérdida de resolución de las sustancias separadas, el volumen interno del detector debe ser lo más pequeño posible. En conclusión, al comparar la calidad de los detectores empleados en cromatografía de gases, se deben tener en cuenta aspectos fundamentales como: sensibilidad, rapidez de respuesta, una respuesta lineal adecuada, así como un bajo nivel de ruido pero sensible a las variaciones de flujo y temperatura.

#### 3.2.1.4.1 Clasificación de los detectores

Una de las formas de clasificar los detectores puede ser de acuerdo al modo en que ofrecen la señal, que se puede expresar de modo integral o de modo diferencial, universal o selectivo y como destructivos o no destructivos

##### 3.2.1.4.1.1 Detectores Integrales

Estos detectores ofrecen una señal en función del tiempo, proporcional a la cantidad total de analitos que han pasado por el detector; la señal se mantiene en el valor que indica la totalidad de la sustancia detectada, incluso cuando esta ya ha pasado en su totalidad por el detector. Cuando aparece una segunda sustancia, la señal correspondiente se adiciona a la anterior. El registro obtenido con este tipo de detectores corresponde a una gráfica donde cada sustancia se asemeja a un “peldaño” o pendiente [35]. Para tener mayor claridad sobre como es el registro de un detector integral, se presenta la siguiente figura:

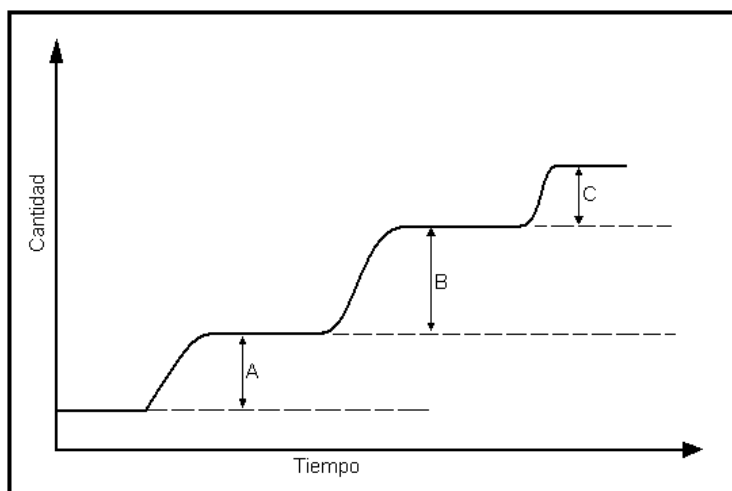


Fig. 15. Representación de un cromatograma típico para detector integral

### 3.2.1.4.1.2 Detectores Diferenciales

Estos presentan la información en una curva, que en realidad es la derivada del registro integral, pues registra la relación  $(\Delta s/ \Delta t)$ . El punto de inflexión en el registro integral, corresponde a un máximo en el registro diferencial y la línea de registro volverá a cero entre dos sustancias que estén perfectamente separadas. Para este caso, se obtendrán registros que por su forma reflejan la distribución de las concentraciones de las sustancias eluidas al salir de la columna. De esta forma la señal es proporcional a la concentración de la sustancia, y la cantidad de sustancia detectada será proporcional al área del pico [35]. La representación de un registro diferencial se muestra continuación.

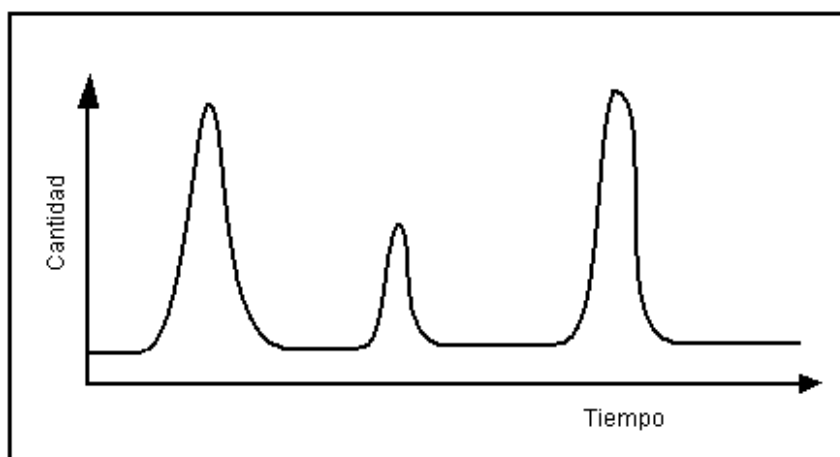


Fig. 16. Representación de un cromatograma típico para un detector diferencial

### 3.2.1.4.1.3 Detectores Universales y Selectivos

Esta clasificación, diferencia los detectores de acuerdo con el tipo de sustancias capaces de detectar, y según su especificidad de respuesta. Son considerados detectores universales aquellos capaces de detectar cualquier sustancia de modo lineal, cuya respuesta sea independiente de la naturaleza de la sustancia a detectar.

### 3.2.1.4.1.4 Detectores destructivos y no destructivos

Dentro del interés que cobra desde el punto de vista químico, existe otra clasificación de los detectores, muy importante en los casos donde se debe recurrir a técnicas auxiliares de análisis cualitativo. Se entiende por detectores no destructivos aquellos cuya capacidad de detectar una sustancia no modifica químicamente la misma. Análogamente, si la sustancia queda alterada al pasar por el detector, éste se considera destructivo [35].

### 3.2.1.4.2 Detectores usados en el análisis de plaguicidas por cromatografía de gases

Aunque muchos detectores son eficientes para reconocer plaguicidas, la probabilidad de solapamiento de señales debido a la presencia de otros compuestos arrastrados desde la matriz o por impurezas adquiridas en la extracción de los analitos de interés (plaguicidas), cobra mucha importancia al momento de analizar los registros obtenidos en el cromatograma. A continuación se exponen los detectores más empleados en el análisis de plaguicidas por la alta eficiencia documentada en este tipo de análisis [35,36].

#### 3.2.1.4.2.1 Detector de Ionización de Llama (FID, Flamelonization Detector)

El FID consta de una flama hidrógeno/aire y una placa colectora (sistema electrónico). Las muestras que salen de la columna pasan a través de la flama, la cual rompe las moléculas orgánicas y produce iones. Los iones son colectados en un electrodo parcial (electrodos filiformes) y produce una señal eléctrica. Es sumamente sensible en un amplio rango dinámico, perola única desventaja es que destruye la muestra.. Este detector es considerado dentro del grupo de los detectores universales. Su esquema de funcionamiento se muestra en la figura 17:

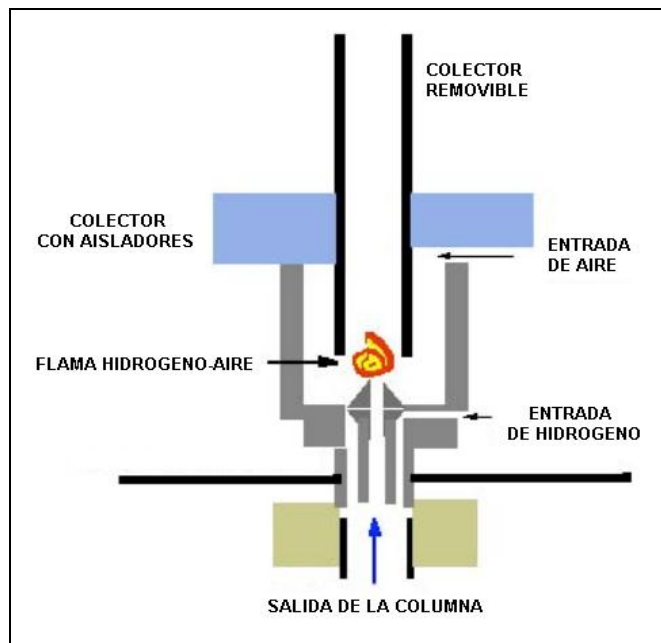


Fig. 17. Detector de ionización de llama (FID)

Al ser un detector universal, no es el detector más adecuado para el análisis de plaguicidas, toda vez que las señales se pueden solapar y arrojar falsos positivos sobre los valores de los porcentajes de recuperación. Como se verá en los siguientes apartados, la tendencia consiste en emplear detectores altamente selectivos con plaguicidas para la cuantificación de estos compuestos procedentes de leche y otras matrices.

### 3.2.1.4.2.2 Detector de Captura Electrónica (ECD, Electron Capture Detector)

Cuando los compuestos ingresan al detector se produce una disminución de la intensidad de la corriente que circula por él. Este efecto es similar a la absorbancia que presentan las sustancias coloreadas y sigue una ecuación del tipo de la Ley de Beer. Este sistema de detección es muy empelado cuando se desea obtener una alta sensibilidad y selectividad con compuestos halogenados, nitrogenados o fosforados, lo que coincide con las estructuras de una gran cantidad de plaguicidas y a la vez da respuesta a hidrocarburos y otros carbonilos conjugados. En la figura 18 se expone el esquema de funcionamiento del detector ECD.

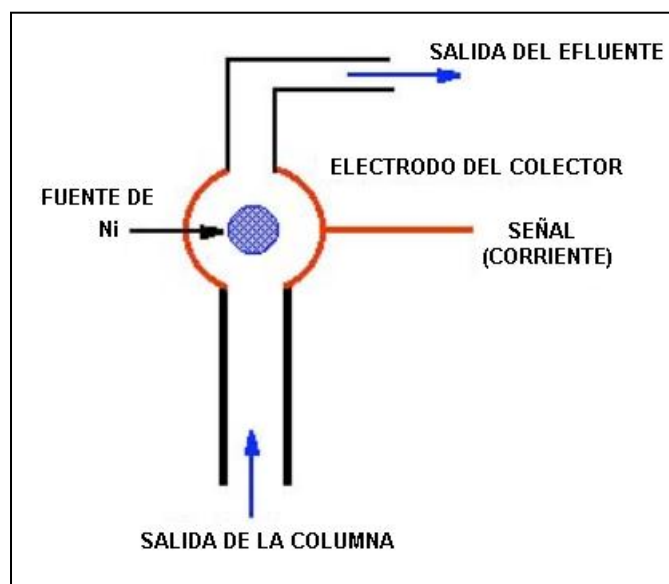


Fig. 18. Detector de Captura de Electrones.

La selectividad y sensibilidad del ECD permite incrementar la eficacia de algunos parámetros estadísticos muy tenidos en cuenta en los análisis de plaguicidas, como la desviación estándar y el coeficiente de correlación ( $R^2$ ). En el método propuesto por *Fernández*, en el análisis multiresidual de 35 plaguicidas en leche de ganado bovino, empleando un detector de microcaptura de electrones ( $\mu$ ECD), cuyo funcionamiento es similar al ECD, obtienen unos coeficientes de correlación que le brindan al método alta confiabilidad y sensibilidad. Es así como obtiene valores de  $R^2$  que oscilan entre 0.9901 para el *Alachlor* y 0.9999 para el *Methoxychlor*[33].

### 3.2.1.4.2.3 Detector Fotométrico de Llama (FPD, FlamePhotometric Detector)

Es un detector espectroscópico desarrollado para determinar la pareja Azufre-Fósforo contenidos en distintos compuestos orgánicos, como plaguicidas. El FPD consiste de una flama reductora que produce especies quimioluminiscentes, donde estas especies emiten una luz característica que es óptimamente filtrada en la longitud de onda deseada, la cual

determina que componentes son los detectados. La luz filtrada es medida por un fotomultiplicador (PMT) y transducida a una señal. Se puede agregar un segundofotomultiplicador, el cual permite una detección simultánea de una segunda señal.

#### **3.2.1.4.2.4 Detector de Nitrógeno Fósforo (NPD, NitrogenPhosphorus Detector)**

Es un detector selectivo dentro de la familia de los detectores de ionización. Se trata de un sistema diseñado para responder selectivamente ante la presencia de compuestos orgánicos que posean grupos funcionales que contengan nitrógeno o fósforo. El principal campo de empleo de estos detectores es en el análisis de compuestos con actividad biológica, como fármacos y plaguicidas en matrices complejas donde el empleo de un detector selectivo es clave para evitar el solapamiento de señales por interferencias de la matriz.

Una corriente de hidrógeno mezclada con el gas portador que emerge de la columna, y otra de aire, inciden sobre una perla alcalina termostatzada a alta temperatura, produciendo iones negativos alrededor de la misma, que en el caso de compuestos nitrogenados o fosforados, son recolectados y provocan un aumento considerable de la corriente de fondo. La amplificación de la corriente eléctrica detectada por un sistema electrónico, brinda una señal exterior sobre la cual se acopla el sistema de registro de datos.

En el estudio realizado por *Romero*, en el cual analiza plaguicidas organofosforados por cromatografía gaseosa con detector NPD, obtiene porcentajes de recuperación muy elevados para casi todos los plaguicidas, siendo la excepción el *diclorvos* con un rendimiento del 32% [22].

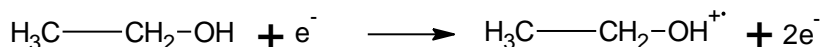
#### **3.2.1.4.3 Detector de espectrometría de masas acoplado a cromatografía de gases.**

Un espectrómetro de masas ofrece la ventaja de ser un instrumento que se puede acoplar como detector tanto a cromatógrafos de gases (GC) como a cromatógrafos líquidos (HPLC). No en vano es uno de los detectores más empleados en el análisis de plaguicidas. Sin embargo, su funcionamiento no es tan sencillo como los otros detectores que se han descrito. Es por esto que merece ser ilustrado con más amplitud.

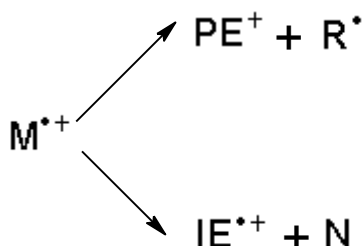
La espectrometría de masas es una técnica que se basa en la separación de especies cargadas según la relación masa/carga ( $m/z$ ), formadas a partir de la ionización de una muestra [37]. La muestra se introduce en fase gaseosa y es bombardeada con un haz de electrones de alta energía, formando iones del compuesto a analizar de la siguiente manera [38].



Cuando la muestra comienza su interacción con el haz de electrones, forma una especie iónica llamada ion molecular, que corresponde a una especie de carga positiva, con un electrón desapareado, sin alteración de la masa molecular del compuesto. Así, la formación del ion molecular del etanol sería de esta forma:



Normalmente el ion molecular sufre fragmentaciones, y debido a que es un radical catiónico con un número impar de electrones, se puede fragmentar ya sea para dar un radical un ion con un número par de electrones, o para originar una molécula neutra y un nuevo radical catiónico como se muestra a continuación [38].



La ruta indicada en la parte superior muestra la fragmentación del ion molecular dando origen a una especie con un número par de electrones y a un radical. La otra ruta indica la formación de una molécula neutra y un nuevo radical catiónico. De la misma forma  $\text{IE}^{\bullet+}$  y  $\text{PE}^+$  pueden fragmentarse sucesivamente. Todos los iones producidos son separados en un espectrómetro de masas de acuerdo con su relación masa-carga ( $m/z$ ). La masa se expresa en unidades de masa atómica (uma) o en Dalton de manera que la relación  $m/z$  se expresa en Thompson ( $\text{Th}=\text{Da}/z$ ). Los iones separados son detectados como corrientes iónicas, dando una señal proporcional a la abundancia respectiva de cada uno [38].

Al procesar esta información se obtiene un gráfico, en cuya abscisa se registra la relación  $m/z$  y la abundancia se muestra en la ordenada. El resultado es un espectro de masas que proporciona valiosísima información estructural de un compuesto que se desea identificar. Sin embargo, su mayor virtud está en la determinación precisa de la masa molecular del mismo.

### 3.2.1.4.3.1 Proceso de obtención del Espectro de Masas.

Para obtener un espectro de masas de una muestra es necesario seguir los pasos que se describen a continuación [38]:

- 1) Introducción de la muestra en forma y cantidad apropiada (Sistema Introducción de Muestras).
- 2) Formación de los iones de la muestra en la cámara de ionización.
- 3) Separación de los iones de acuerdo con su relación  $m/z$  en el analizador másico.



- 4) Detectar los iones que emergen del analizador y medir su abundancia a través del detector que convierte la presencia de los mismos en señales eléctricas.
- 5) Procesar las señales del detector que son transmitidas a un computador que representa los resultados.

El siguiente esquema representa los componentes básicos de un espectrómetro de masas.

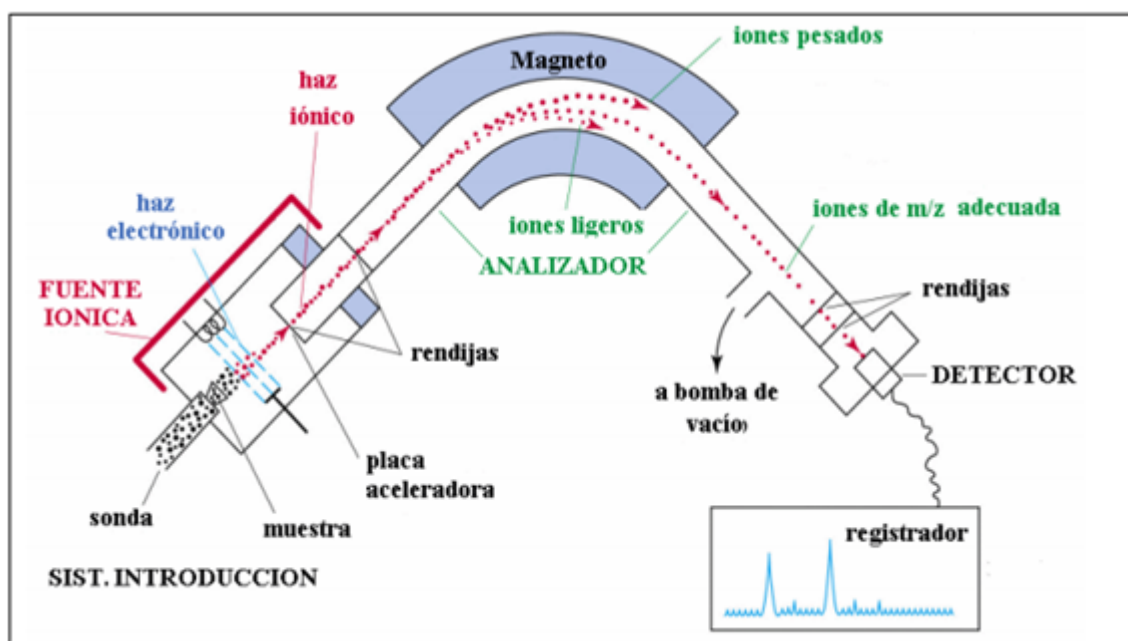


Fig. 19. Esquema general de un espectrómetro de masas.

Todos los espectrómetros de masas tienen que funcionar en condiciones de alto vacío, para lograr que los iones puedan llegar al detector sin interactuar con otras moléculas gaseosas [38].

### 3.2.1.4.3.2 Sistema de Inyección de Muestras.

Debido a que la ionización de la muestra ocurre en fase gaseosa, en la mayoría de las técnicas utilizadas para el análisis de compuestos de baja masa molecular, es necesario que la muestra se vaporice sin comprometer las condiciones del vacío [28]. Para fuentes de ionización electrónica y química, existen diversas opciones para introducir la muestra, como los siguientes sistemas:

- a) Recipiente de Calentamiento de Tabique con Válvula de Entrada.
- b) Sonda de Inyección Directa.
- c) Cromatografía de Gases.
- d) Interfase de Flujo de Partículas.

### 3.2.1.4.3.3 Fuentes de Ionización.

Existe una amplia variedad de fuentes de ionización en espectrometría de masas. Sin embargo, la elección de una fuente idónea para el análisis depende de la energía que se transfiere durante el proceso de ionización y de las propiedades fisicoquímicas de la especie a ionizar [38].

#### 3.2.1.4.3.3.1 Ionización Electrónica.

También conocida con el nombre de “Impacto Electrónico”, esta fue la técnica inicialmente más utilizada. Consiste en un filamento cargado negativamente que es calentado por una corriente que circula por este, que actúa como emisor de electrones. Los electrones son acelerados hacia un ánodo de modo que interactúen con las moléculas procedentes del sistema de introducción de la muestra. Empleando esta fuente de ionización, Rodríguez logra obtener límites de detección entre 2,2 y 10,9 µg/L, a la vez también se obtuvo un coeficiente de correlación en un rango entre 0,9720 y 0,9944 para el análisis de 10 plaguicidas organofosforados (Demeton-S, Sulfotep, Dimpylate, Disulfoton, Methylparathion, Parathion, Diclorvos, Fenitrothion y Chlorpyrifos) en leche de vaca [30]. Además obtiene picos base (iones de mayor abundancia), así como iones de referencia, los cuales se relacionan a continuación.

Plaguicida	Picos base	Iones de Referencia
Dichlorvos	220	109 y 185
Sulfotep	322	202 y 266
Demeton-S	88	170 y 171
Dimpylate	304	137 y 179
Disulfoton	274	88 y 89
MethylParathion	263	109 y 125
Fenitrothion	277	260 y 278
Chlorpyrifos	314	197 y 199
Parathion	291	109 y 292
Ethion	384	153 y 231

Tabla 1. Iones de Referencia y Picos base de plaguicidas organofosforados [30].

#### 3.2.1.4.3.3.2 Ionización Química.

Éste es un método blando que produce iones con poco exceso de energía. La fuente de ionización química (similar a la de Impacto Electrónico) crea un plasma de gas reactivo ionizado gracias al flujo de electrones. Este gas reactivo se encuentra a una concentración muy superior a la de la muestra, y generalmente se trata de metano [37]. La ionización es originada por la interacción entre las moléculas del gas reactivo y las de la muestra, mas no por la interacción de la muestra con el flujo electrónico.

### **3.2.1.4.3.3 Bombardeo con Átomos Rápidos**

También llamada FAB por sus siglas en inglés “Fast Atom Bombardment”, tiene como aspecto esencial la disolución de la muestra en una matriz líquida no volátil, tal como la glicerina [37]. Sobre esta solución incide un flujo de átomos (Xe, Ar) con elevada energía cinética, que logran extraer iones y partículas neutras hacia la fase gaseosa. Los átomos golpean la solución de la muestra, provocando una onda de choque que expulsa iones y moléculas de la solución [38]. En condiciones favorables las moléculas forman una monocapa en la superficie de la disolución que se mantiene continuamente pese al bombardeo, por difusión de otras moléculas de la muestra que migran desde el interior de la disolución hacia la superficie de la misma. Esto garantiza reproducibilidad y reduce la presencia de iones procedentes de la matriz en el espectro.

### **3.2.1.4.3.4 Ionización Mediante Desorción por Láser Asistida por Matriz**

La Desorción por láser es más conocida como MALDI por su significado en inglés (Matrix-Assited Laser Desorption Ionization). La ionización por MALDI se logra en dos etapas. En la primera, la muestra a analizar se mezcla con un solvente que contiene moléculas orgánicas pequeñas en disolución, que se emplearán como matriz. Estas deben presentar una absorción fuerte a la longitud de onda del laser. Antes de ser analizada, la mezcla se seca removiendo el solvente líquido utilizado. De esta manera se forma una matriz sólida en la que las moléculas de la muestra se encuentran aisladas unas de otras. Durante la segunda etapa de MALDI, se aplican pulsos cortos e intensos de láser sobre la matriz sólida, induciendo un rápido calentamiento debido a la acumulación de gran cantidad de energía que excita las moléculas de la matriz. Esto causa la sublimación localizada de los cristales de la matriz y la expansión de la misma en la fase gaseosa, lo que permite la entrada del compuesto en la matriz extendida. El mecanismo de origen de los iones producidos por esta técnica no está aún suficientemente elucidado [38].

### **3.2.1.4.3.5 Ionización por Electronebulización**

Reconocida en el mundo por sus siglas en inglés ESI (Electro-Spray Ionization), es considerada como una de las fuentes ionizantes más suaves. La muestra se disuelve en una fase móvil volátil, tal como una mezcla de agua-acetonitrilo o agua-metanol. A continuación se bombea a través de un fino capilar de acero inoxidable cuyo extremo se encuentra a un potencial eléctrico elevado (3-6 Kv) [38]. Este elevado potencial unido al pequeño radio de curvatura final del capilar crea un fuerte campo eléctrico, que produce reacciones de oxidación-reducción, haciendo que el líquido emerja en forma de finas gotas cargadas eléctricamente.

La nebulización ocurre a presión atmosférica y es asistida por un flujo de nitrógeno gaseoso (gas nebulizador). De esta manera se forma una niebla que atraviesa una serie de cámaras con vacío creciente de tal forma que las gotas se evaporan y se van haciendo más pequeñas por la evaporación del solvente. Al mismo tiempo, dado que el área

superficial de las gotas se reduce, se incrementa la densidad de carga eléctrica hasta llegar a un límite en que se desestabilizan y estallan.

Una de los aspectos interesantes de este tipo de fuente ionizante se observa en el trabajo publicado por *Bogialli*, donde emplea la fuente ESI obteniendo iones positivos y negativos, desarrollados simultáneamente. En este trabajo se ejecuta un análisis multiresidual de plaguicidas en leche de bovino, empleando extracción en fase sólida (SPE) y cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en TANDEM. En este análisis se involucran herbicidas y fungicidas de variadas familias químicas, logrando una sensibilidad considerablemente elevada, que se revela en límites de detección que van desde 1,4 µg/L para el 2,4 D-B (Ácido Dicloro-fenoxiacético) hasta 0,004 µg/L para el *Metazaclor*, que corresponde al grupo de las cloroacetamidas (Herbicidas de última generación) [29].

#### **3.2.1.4.3.4 Analizadores de Masas**

Una vez han sido producidos los iones en la fuente de ionización, éstos se deben separar de acuerdo con su relación m/z para luego ser detectados. Esta es la función de los analizadores de masas, que emplean campos eléctricos, magnéticos o dinámicos para lograr la separación de los iones originados. Las características principales que debe tener un analizador son: El límite o alcance de masas, la transmisión y el poder de resolución [38]. El límite de masas es el valor más alto de relación m/z que puede ser medido. La transmisión tiene que ver con la relación entre el número de iones que llega al detector y el número de iones producidos en la fuente. Finalmente, el poder de resolución es la capacidad del analizador para detectar señales diferentes correspondientes a iones cuyas diferencias de masa son pequeñas.

##### **3.2.1.4.3.4.1 Analizador de Sector Magnético**

Cuando los iones emergen de la fuente, estos son acelerados para que atraviesen un campo magnético, donde las trayectorias de los iones más ligeros se desvían más que las trayectorias de los iones más pesados [39]. De esta forma, los iones más pesados son los primeros que llegan al detector. Este analizador también es conocido como “deflector magnético” y ejerce una fuerza perpendicular a al movimiento del ion para deflectar los mismos de acuerdo con su momento (relación entre masa y velocidad).

##### **3.2.1.4.3.4.2 Analizador Cuadrupolar**

El analizador cuadrupolar se vale de la estabilidad de trayectorias en campos eléctricos oscilantes para lograr separar los iones de acuerdo con su relación m/z. el dispositivo se compone de cuatro varas o polos, que deben estar perfectamente paralelas y equidistantes una de otra, y a su vez estar colocadas de tal manera que adopten la forma de dos hipérbolas ortogonales [38]. En la figura 20 se ilustra la disposición de las varillas transportadoras de diferencias de potencial, sobre las que a su vez se hace incidir radiofrecuencia.

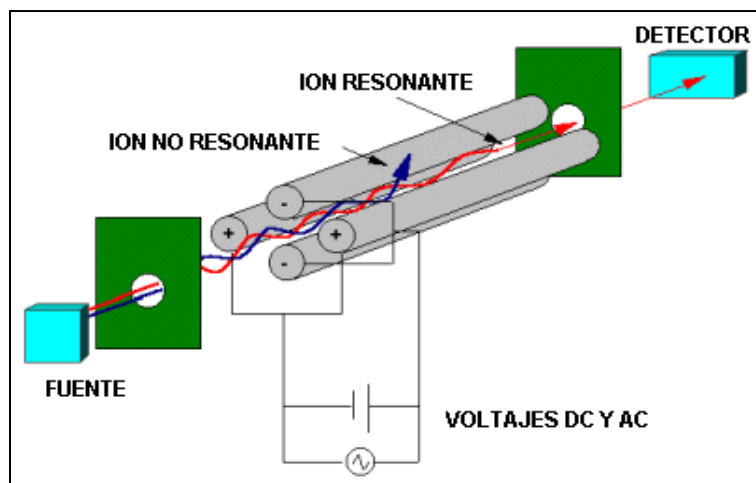


Fig. 20. Esquema de un analizador cuadrupolar.

A las varillas opuestas que corresponden a una de las hipérbolas, se aplica un potencial electrostático de igual signo y se aplica el mismo potencial de diferente signo a las otras dos varillas. Adicionalmente se aplica un potencial externo asociado a radiofrecuencia [37]. En estas condiciones, los iones se desplazarán a través del cuadrupolo siendo atraídos y repelidos continuamente por las varillas polares. Los iones comienzan a atravesar el analizador sucesivamente cuando la relación de oscilaciones en el campo electrostático generado por los polos (varillas) se hace constante. Esta oscilación estable permite el paso de ciertos iones de un extremo a otro del analizador, sin chocar contra los polos. Lo anterior, depende de la relación  $m/z$  de cada ion. Los iones que no pasan una condición de oscilación estable en el cuadrupolo, chocan contra el mismo y se pierden [37].

### 3.2.1.4.3.4.2 Analizador de Tiempo de Vuelo

El mecanismo de funcionamiento de este analizador es el siguiente. Los iones se extraen por pulsos de la fuente de ionización e inmediatamente son acelerados mediante la acción de un campo eléctrico. Lo anterior con el propósito de lograr la uniformidad en las energías cinéticas antes de que los iones ingresen al analizador. Posteriormente los iones con movimiento rectilíneo uniforme atraviesan un tubo que termina en el detector. El tiempo que tarda un ion en atravesar el tubo, es el llamado tiempo de vuelo, conocido como "TOF" por sus siglas en inglés (Time Of Flight) y depende de la relación  $m/z$  que posea el mismo [38]. En principio no existe un límite superior en el rango de valores de la masa de los analizadores de tiempo de vuelo, lo que los hace especialmente útiles combinados con fuentes de ionización blandas para el análisis de macromoléculas. Son muy sensibles gracias a que tienen una transmisión iónica eficiente, y sumado a esto, hacen barridos espectrales rápidos convirtiéndolos en componentes ideales de espectrómetros de masas acoplados con cromatógrafos.

### 3.2.1.4.3.5 Detectores

Luego de que los iones son separados en el analizador, estos deben pasar a ser detectados. La detección de los iones dependerá de la manera en la que se haya efectuado la separación, es decir del tipo de analizador empleado. Por ejemplo, un analizador cuadrupolar, o de trampa de iones separa estos de acuerdo con su relación  $m/z$  de forma secuencial, lo que indica que pasarán al detector uno después de otro [38]. De esta manera, el detector situado en la parte final del analizador solo necesita cubrir un punto o foco en el espacio, razón por la cual el espectro de masas se registra en el dominio del tiempo. Este tipo de detector es conocido como detector iónico puntual.

Por otro lado, un analizador de sector magnético separa los iones en el espacio, lo que permite que su llegada al detector pueda ser registrada de forma simultánea. El tipo de detector que se emplea en estos casos se denomina detector compuesto y el registro del arribo de los iones se efectúa en el dominio del espacio.

#### 3.2.1.4.3.5.1 Espectrometría de masas en TANDEM

La espectrometría de masas en TANDEM ha alcanzado en los últimos tiempos un lugar privilegiado como herramienta para la identificación y cuantificación de compuestos presentes en mezclas complejas. Esta técnica permite que el espectrómetro de masas pueda ser acoplado a distintos tipos de cromatógrafos (GC, HPLC, LC) lo que la hace muy versátil. Dado que el impacto electrónico era la única técnica que proporcionaba información estructural, surgió la necesidad de desarrollar análisis más sensibles y que permitieran obtener la masa molecular exacta de cada ion generado en esta fuente. La espectrometría de masas en tándem permite acoplar varios analizadores de masas en serie, de manera que adicional a la masa molecular del analito, se puede obtener información estructural valiosa. En el primer analizador se selecciona y aísla el ion molecular deseado y en el segundo se origina la fragmentación para obtener un espectro de masas por cada ion molecular seleccionado.

Como se comprueba en múltiples trabajos, uno de los instrumentos más empleados para desarrollar este tipo de análisis (en la determinación de plaguicidas) es el analizador de triple cuadrupolo ( $Q_3$ ) [28,29,40]. Gracias a la disposición en serie de los tres cuadrupolos, el mecanismo de formación del espectro de masas funciona de la siguiente manera [32]:

- a) El primer cuadrupolo selecciona el ion molecular que se desea analizar.
- b) El segundo analizador funciona como celda de colisión y produce la fragmentación.
- c) El tercero enfoca los iones generados en el segundo y los conduce finalmente hacia el detector.

Debido a este importante desarrollo en la espectrometría de masas, el análisis de plaguicidas por esta técnica ha mejorado sustancialmente, toda vez que lo hace más completo. En el caso del trabajo publicado por *Xie*, este realiza una determinación de 6

plaguicidas de tipo neonicotinoide (dinotefuran, thiamethoxam, clothianidin, imidaclorpid, acetamiprid, y thiacloprid) combinada con cromatografía líquida (LC) acoplada a espectrometría de masas en tandem (MS). El cromatograma obtenido se muestra en la figura 21 [28].

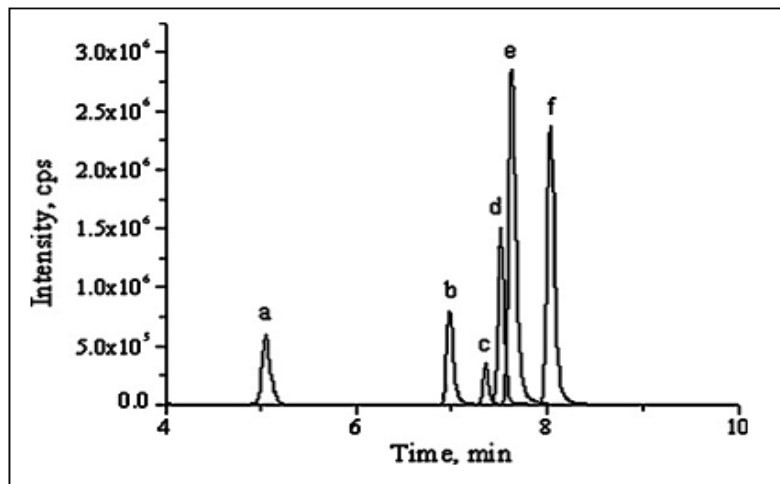


Figura 21. Cromatograma de una muestra de jengibre contaminada con una solución de 0.01 ppm de 6 plaguicidas. a) Dinotefuran, b) Thiamethoxam, c) Clothianidin, d) Imidaclorpid, e) Acetamiprid, y f) Thiacloprid [28].

Además de los cromatogramas, Xie también consigue los espectros de masas de los 6 plaguicidas, los cuales se relacionan en la siguiente página en la figura 22.

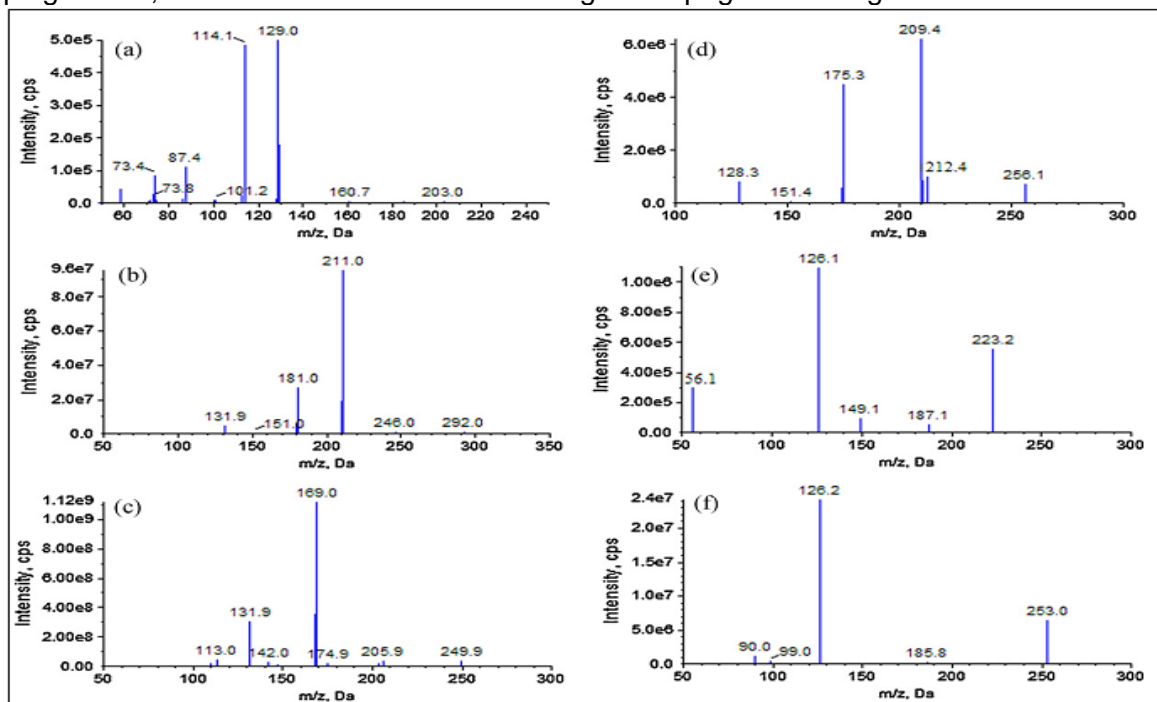


Figura 22. Espectros de masas de los plaguicidas analizados en el cromatograma anterior (el orden literal es el mismo al que se maneja en el cromatograma) [28].

Un aporte interesante de este trabajo, es presentar los patrones de fragmentación de los plaguicidas analizados. Estas rutas consisten en secuencias donde se exponen paso a paso las pérdidas de masas y la estructura resultante de cada ion que genera la señal exhibida en el espectro. Estas rutas se muestran en la figura 23.

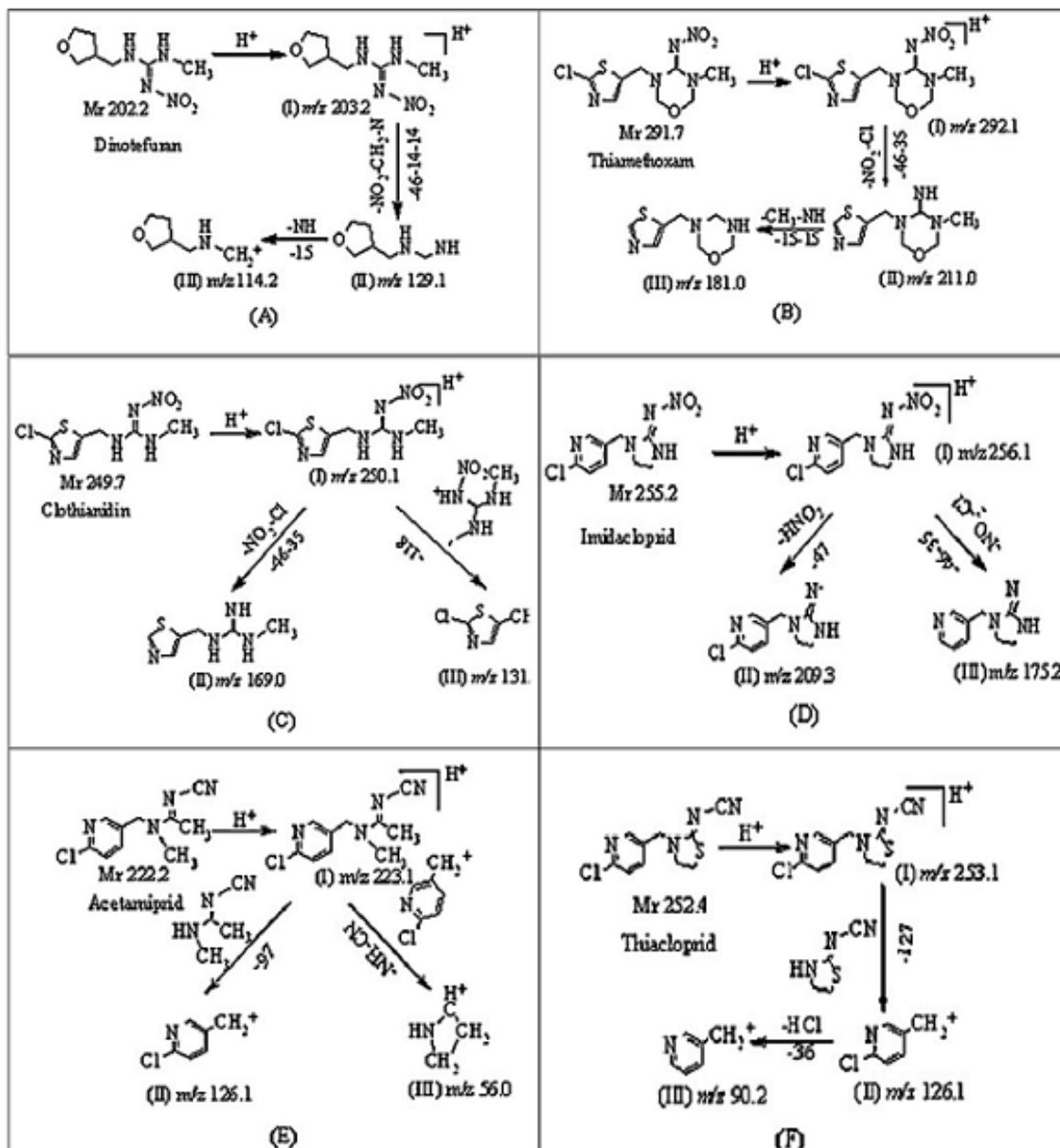


Fig. 23. Rutas de fragmentación de plaguicidas analizados por LC/MS-tandem [29].

Como se observa en las 6 rutas de fragmentación, el común denominador yace en el primer paso, en el cual todas las especies son protonadas ( $H^+$ ) con el objeto de desestabilizar su estructura, lo que genera las fragmentaciones posteriores. Para los 4 primeros plaguicidas de la lista (Dinotefuran, Thiamethoxam, Clothianidin e Imidacloprid)



es común luego de la protonación, la pérdida de 46 unidades de masa, correspondientes al desprendimiento del grupo NO<sub>2</sub>. Algunas de estas rutas no siguen una secuencia lineal en sus fragmentaciones, es decir, que una vez protonadas las especies originen un fragmento, que lleve a otro y así sucesivamente. Esto se observa en el Dinotefuran (A), Thiamethoxam (B) y Thiacloprid (F) que después de la protonación generan una cadena de fragmentaciones subsiguientes. En los casos C, D y E, las estructuras protonadas pueden experimentar dos vías de rompimiento, lo cual no sigue la secuencia de los tres casos mencionados anteriormente (A, B, F).

En el *anexo 5* se exponen una serie de curvas de calibración correspondientes a 5 plaguicidas organofosforados (chlorpirifos, malathion, deltametrin, fipronil y fenitrotion) analizados en un rango de concentración entre 0,025 y 0,8 ppm, los cuales fueron analizados por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas en el laboratorio de calidad de productos naturales de la Universidad Tecnológica de Pereira.

Estos plaguicidas fueron escogidos a través de la tabla correspondiente al *anexo 4*, que indican los plaguicidas usados en el control de plagas en pastos en el departamento de Risaralda. Una vez seleccionados, el listado de plaguicidas se discrimina por factores como su termolabilidad y volumen de consumo por los agricultores del departamento, obteniendo finalmente este grupo de 5 plaguicidas organofosforados. Estas curvas de calibración podrán servir de insumo técnico para el desarrollo de un trabajo experimental, por cuanto posee unos aceptables criterios de mérito para su uso en la determinación cuantitativa de dichos plaguicidas. En el capítulo 5 se expondrá un estudio de caso desarrollado por los autores del actual documento como una propuesta metodológica para el análisis cuantitativo y cualitativo de estos plaguicidas mencionados, desde la preparación de la muestra hasta su análisis instrumental.

Aunque la cromatografía de gases es una excelente técnica para la determinación analítica de plaguicidas, gracias a su rapidez de análisis, su sensibilidad y su capacidad para separar mezclas complejas, posee algunas limitantes. Una de ellas yace en el hecho de que algunos plaguicidas no soportan altas temperaturas para ser llevados a la fase gaseosa y se degradan (termolábiles). Debido a esto, algunos plaguicidas no se pueden analizar por cromatografía gaseosa y por lo tanto el espectro de compuestos que abarca esta técnica se ve reducido. En el siguiente tema, se expondrá un tipo de cromatografía que permite analizar compuestos termolábiles por cuanto no requiere de altas temperaturas para la separación de mezclas. A continuación se ilustran con detalle los aspectos más importantes de la Cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) como técnica aplicada al análisis de plaguicidas contenidos en una matriz como la leche.

### **3.3 CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIENCIA (HPLC).**

Desde el surgimiento de los conceptos generales descritos por Swett acerca la cromatografía, este campo de la química analítica ha visto un vertiginoso ascenso en las innovaciones técnicas y científicas aplicadas a la misma para desarrollar y mejorar los procesos basados en el principio cromatográfico. A partir de todos estos avances en las

formas de aplicación de la cromatografía, se da unos años después el desarrollo de un método que reuniría los principios de las metodologías desarrolladas hasta el momento para fusionarlos en uno solo y ese método es conocido como cromatografía líquida moderna. La cromatografía líquida (LC) se refiere a todo método cromatográfico donde la fase móvil sea un líquido, en contraste a la cromatografía de gases, donde la fase móvil es precisamente un gas. Ejemplos de esto son la cromatografía en columna (sea por adsorción, partición o intercambio iónico), la cromatografía en capa delgada y la cromatografía en papel además de la moderna LC. Las diferencias entre estas metodologías y la moderna LC radican en los equipos usados más sofisticados, mejores materiales, técnicas más elaboradas y el fundamento teórico del método [41]. Respecto al análisis de plaguicidas, la LC ofrece mayores ventajas en cuanto a la precisión, la versatilidad, la velocidad y la capacidad de analizar complejas mezclas de estas sustancias.

La LC contiene algunas ventajas operacionales frente a la GC, particularmente en la capacidad de analizar ciertos plaguicidas que por GC se hacen muy difíciles o simplemente imposible, tal como compuestos de este tipo que sean débilmente volátiles y no pasen por la columna de separación o que sean muy sensibles al aumento de temperatura y se descompongan con facilidad por este hecho (termolábiles). Se tiene un estimado común de que solo el 20% de los compuestos orgánicos conocidos pueden llegar a ser analizados por GC, dadas las limitaciones descritas anteriormente, mientras que virtualmente cualquier tipo de compuesto puede ser analizado por un equipo de LC ya que operativamente, estos equipos no dependen de la volatilidad de los compuestos y no afectan a los que son termolábiles.

La LC tiene la capacidad de separar complejas mezclas de compuestos gracias a que posee dos fases estacionarias que realizan una interacción selectiva con las moléculas de interés, para las cuales existen una gran variedad de fases para un amplio espectro de aplicaciones y finalmente de que realiza estas operaciones a menores temperaturas que en técnicas como la GC. La separación realizada en la LC es el resultado de la interacción del analito con la fase estacionaria y la fase móvil, mientras que en la GC no existe interacción con la fase móvil (gas inerte), lo que significa que es un parámetro más a controlar y optimizar [41].

Así mismo, la cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC, High Performance Liquid Chromatography) es un método fundamentado en los principios de la cromatografía y usando la particularidad de la cromatografía líquida en cuanto al uso de una fase móvil líquida. La HPLC se caracteriza por ser una técnica de una aplicación casi que universal respecto al tipo de compuestos que se puede analizar por este método, siendo muy reducido el grupo de los que no se pueden analizar, una notable precisión en los ensayos además de una gran cantidad de equipos disponibles, columnas y materiales usados en los procedimientos que son los que posibilitan la gran cantidad de los análisis posibles en HPLC [41].

El desarrollo de la HPLC comienza por los años 1900`s con la implementación de la primera aplicación de la cromatografía líquida en un montaje conocido como columna cromatográfica clásica (Fig. 24a-d.) que consistía en un cilindro de vidrio relleno de un fino polvo, como la tiza (Fig. 24a), donde en la parte superior de la columna de vidrio se aplicaba la muestra de interés (Fig. 24b) y luego se adiciona el solvente que arrastrara la muestra al interior de la columna (Fig. 24c). El solvente comienza a avanzar en la columna por gravedad y los componentes de la mezcla (A, B y C en el ejemplo) avanzan a diferentes velocidades entre el material y se comienza a producir la separación de la mezcla (Fig. 24d). En este momento, se procedía a evaporar el solvente usado y tomar cada una de las partes de la mezcla separada para ser pesada para un análisis cuantitativo determinado, pero este proceso debía llevarse a cabo en columnas por separado una vez se determinase a qué altura se separaba alguno de los componentes de la mezcla, por lo que podía ser un proceso que consumía mucho tiempo ya que era completamente manual, pero incluso a este nivel, la cromatografía líquida ofrecía unas potencialidades muy amplias comparadas con otras técnicas de separación de mezclas.

En los años 40`s se introduce otra variación de la cromatografía líquida denominada cromatografía en papel, en donde el material de relleno de la columna descrito (fase estacionaria) es remplazado por una tira de papel (Fig. 24e), en donde básicamente la mezcla era “sembrada” en la parte inferior de la tira de papel y esta se ubicaba en el fondo de un recipiente que contenía el solvente determinado, el cual era absorbido en el material del papel por acción capilar y simultáneamente arrastra los componentes de la mezcla a través del papel. Este principio fue modificado posteriormente para usar una placa de sílica gel en vez de una tira de papel, en la cual se replicaba la operación descrita y así nació la técnica conocida como cromatografía en capa delgada (TLC, Thin-Layer Chromatography). La aplicación de estos dos métodos permitía una fácil identificación de varios componentes simultáneamente de una mezcla, los cuales se podían diferenciar fácilmente por acción de un agente colorimétrico y así definir la cantidad de componentes de una mezcla.

La HPLC (Fig. 24f) representa la culminación de la integración de los principios descritos en las metodologías señaladas a través de un sistema de separación automático y de cuantificación sumamente sensible. El proceso en el diagrama comienza con el bombeo continuo del solvente a través del detector al igual que la muestra, donde este está constantemente analizando los componentes que se van separando en la misma, dando como resultado un diagrama de señal de respuesta del detector vs tiempo, el cual se denomina cromatograma (fig. 24g) [41].

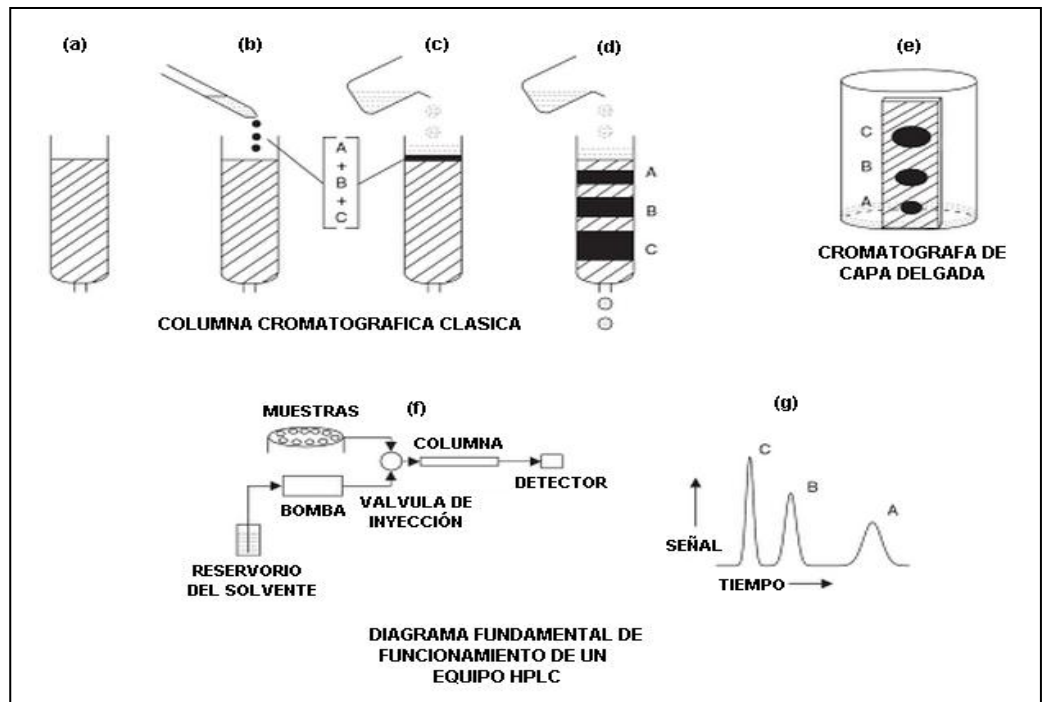


Fig. 24. Diferentes estados en el desarrollo de la cromatografía líquida.

Todo el proceso es manejado por computadora, donde el único proceso manual es ubicar la muestra en el equipo. La HPLC se caracteriza por usar bombas de alta presión para agilizar el proceso de separación y detección de la muestra. En la siguiente sección se hará una descripción suficiente de los componentes constituidos de un equipo de HPLC común.

### 3.3.1 Componentes de un equipo HPLC

La HPLC moderna se basa en el concepto descrito por Tswett en cuanto a los procesos de separación implícitos en el principio de la cromatografía, en donde la adsorción de las moléculas del analito está condicionada a la afinidad (o tipos de interacción) que tenga este con la superficie de la fase estacionaria, por ende los analitos que tengan baja afinidad con la fase estacionaria no serán retenidos suficientemente y viceversa [42,43].

Un equipo HPLC típico tiene los siguientes componentes fundamentalmente [42]:

- Reservorio del solvente: Debe contener la cantidad suficiente de solvente para que el proceso se realice en operación continua. Este reservorio comúnmente tiene un sistema de desgasificación y filtros que aislen el solvente del ambiente circundante.

- Tuberías: Usadas para la conexión de los diferentes dispositivos al interior del equipo HPLC por donde circulara el efluente desde el reservorio hasta el detector y el colector de fracciones.
- Bomba de inyección: Posibilita la inyección continua y constante de un flujo de solvente al interior del sistema HPLC. Las bombas de inyección modernas pueden arrastrar mezclas de solventes de diferentes reservorios.
- Inyector: Permite la introducción (inyección) de la mezcla de analitos en la corriente de solventes antes de entrar a la columna cromatografía. Los sistemas de inyección actuales son automuestreadores a los cuales se les programa para que tomen volúmenes precisos y en el orden en el que el analista desea que se hagan las inyecciones.
- Columna: Se le considera como el corazón del equipo HPLC. Es allí donde ocurre el proceso de separación de los analitos en las mezclas determinadas. Esto ocurre a través de la interacción que ocurre entre la fase estacionaria y la fase móvil que contiene los analitos de interés. La gran mayoría de desarrollos obtenidos en la HPLC se refieren a optimizar los sistemas e interacción analito-fase estacionaria-fase móvil al interior de la columna.
- Detector: Detecta las variaciones en la señal determinada, por la presencia de una sustancia distinta a la del solvente (blanco de medición) donde esta variación es directamente proporcional a la concentración del analito en la mezcla. Los detectores más comunes actualmente en el análisis de plaguicidas en HPLC son los detectores UV y masas.
- Sistema de adquisición y control de datos: A través de un software especializado se pueden controlar todos los parámetros operacionales del equipo HPLC (composición del efluente con mezclas de diferentes solventes, temperatura, secuencias de inyección, etc.) como también sistemas de monitoreo del detector y su rendimiento.

### 3.3.1.1 Reservorio del solvente

El reservorio es un recipiente adecuado que contiene el solvente determinado para el análisis por HPLC, en ocasiones pueden ser recipientes de uso común en el laboratorio (vidrio o polímero resistente) que garanticen el aislamiento adecuado del solvente. Normalmente se ubica a centímetros por encima de la bomba de inyección para que por gravedad los solventes siempre estén llenando los conductos desde el reservorio hasta este. Los recipientes usados deben garantizar el aislamiento del solvente del espacio circundante, para evitar la contaminación del mismo. Comúnmente se usa un filtro de acero (2 a 10  $\mu\text{m}$  de porosidad) al final del conducto de salida del solvente hacia la bomba para proteger a esta del ingreso de materiales que puedan afectar su desempeño. El tamaño del recipiente del tipo de análisis que se utilice: pocos mililitros en el modo microbore, de 0,5 a 1 litro en el modo de operación convencional y varios litros en HPLC preparativa. Los procesos que necesitan sistemas de desgasificación continuos, necesitan una tapa especialmente diseñada para tal fin, en donde existe una entrada para el ingreso del gas inerte desgasificador, una salida para el solvente y una válvula que permite una presión positiva al interior del recipiente [43].

### 3.3.1.2 Tuberías

Son conductos que conectan el reservorio con la bomba de inyección, las válvulas de distribución, la columna cromatografía, el detector (o los detectores conectados en serie) y eventualmente un contenedor de fracciones. El material de los que estén hechos los conductos dependen fundamentalmente de la presión del caudal del efluente que tienen que transportar además de que deben de ser inertes, es por esto que existen tuberías de acero inoxidable (de referencia 316 o 304) y de polímeros (polipropileno o teflón), siendo las tuberías de acero 316 y teflón las más usadas. Las tuberías de acero se conectan entre los componentes que reciben efluente a alta presión (entre la bomba y el inyector, el inyector y la columna y entre detectores conectados en serie) y los poliméricos usados cuando la presión es atmosférica o ligeramente superior (del reservorio del solvente a la bomba, ultimo detector y frasco de desperdicios). Otro parámetro a tener en cuenta es la longitud de las columnas, ya que si son muy largas pueden producir ensanchamientos en los picos del cromatograma, donde es particularmente importante revisar este aspecto en las conexiones entre la bomba de inyección y el detector (Inyector-bomba de inyección-columna-detector) [43].

### 3.3.1.3 Bomba de inyección

La bomba de inyección extrae las cantidades de solvente necesarias del reservorio hacia el inyector y de allí hacia la columna. Las bombas usadas en la actualidad permiten modificar la escala del volumen de la fase móvil a usar en el análisis. Existen bombas capaces hacer pasar caudales del orden de microlitros/minutos en análisis de cromatografía *microbore*, de cientos de mililitros para cromatografía convencional y de un litro y superiores para separaciones semipreparativas y preparativas. Básicamente existen dos tipos de bombas, las de pistón (bombas reciprocantes o de entrega de solvente por pulsos) y las de desplazamiento continuo (Bombas de jeringa). Las primeras son las más comunes ya que son más fáciles de adaptar al volumen de muestras común de un laboratorio.

Los materiales de los cuales está hecha la bomba de inyección tienen que ser resistentes al ataque químico y al desgaste mecánico. Usualmente los materiales que están en contacto con los solventes son acero inoxidable, zafiro, rubí y teflón, pero en general se usa el acero inoxidable como cuerpo de la bomba pero no necesariamente como recubrimiento interno. Existen muestras en las que se puede generar interacción indeseada con el acero de la bomba, como las muestras de origen biológico, para lo cual se reemplaza por bombas de titanio. Habitualmente los pistones están constituidos de zafiro y las válvulas de retención están hechas de una pequeña esfera de rubí que se apoya en un asiento de zafiro y una malla de acero inoxidable que retiene la esfera de sus movimientos [43].

### 3.3.1.4 Sistema de gradientes

Comúnmente la HPLC en modo isocrático<sup>5</sup> posibilita la separación de un número limitado de picos en el cromatograma, en general por la polaridad variada de los componentes de la mezclas. Para sistemas más complejos, de muchos componentes y con una polaridad muy variada, la modalidad isocrática puede que no de buenos resultados. Es en caso donde se usa el sistema de gradientes, el cual es comparable operacionalmente con la programación de la rampa de calentamiento del horno en GC. Lo que se hace en el sistema de gradientes para HPLC es variar la composición porcentual del solvente respecto al solvente que tenga más afinidad de arrastre a los analitos de interés, comenzando la elución con una mezcla con alto porcentaje de un solvente “débil” y que vaya aumentando porcentualmente la composición hacia el solvente más “fuerte”. La variación en esta composición se gradúa por un intervalo de variación, es decir por la velocidad de cambio porcentual en la composición de un solvente “débil” a “fuerte”, Este cambio de concentración en la mezcla de solventes debe ir siempre desde el mas “débil” hacia el mas “fuerte”

No debe confundirse la programación del sistema de gradiente del solvente con la programación de caudales. La primera involucra una variación de la fuerza de elución efectiva de la fase móvil sobre el analito en la fase estacionaria durante la corrida cromatográfica, mientras que la segunda solo implica modificar el caudal del efluente del solvente.

Existen fundamentalmente dos formas de configurar los sistemas de gradientes, y son los gradientes de baja presión y los gradientes de alta presión (ver Fig. 25a-b). Los gradientes de baja presión funcionan con solo una bomba y válvulas solenoides que entregan cada solvente en una cámara de mezclado pequeña (Fig. 25a), el cual permite mezclar entre 2 y 4 solventes diferentes regulando el ciclo de apertura de cada válvula individual. La ventaja de este método es fundamentalmente el costo (ya que solo usa una bomba), pero además también ofrece una adecuada precisión del gradiente de solventes ya que todos son entregados por el mismo dispositivo a la columna. Este sistema requiere la desgasificación continua de cada solvente, ya que la solubilidad de un gas en cada solvente individual es diferente que en la mezcla deseada. Los gradientes de alta presión usan una bomba de presión para cada solvente individual (Fig. 25b), donde cada bomba es maneja por un programador de gradiente para cada una y el solvente necesario se mezcla a alta presión con los demás componentes de la mezcla de solventes en una cámara de bajo volumen. El principal inconveniente de este sistema es el costo que supone tener una bomba por cada solvente además de que las bombas deben ser muy precisas y exactas para que el gradiente mantenga su calidad en todo momento, en especial a bajos caudales [43].

---

<sup>5</sup>En este caso, isocrático hace referencia a que se mantiene constante el parámetro de funcionamiento del sistema, es decir, para la HPLC se estaría hablando del caudal del solvente y la composición del mismo [42].

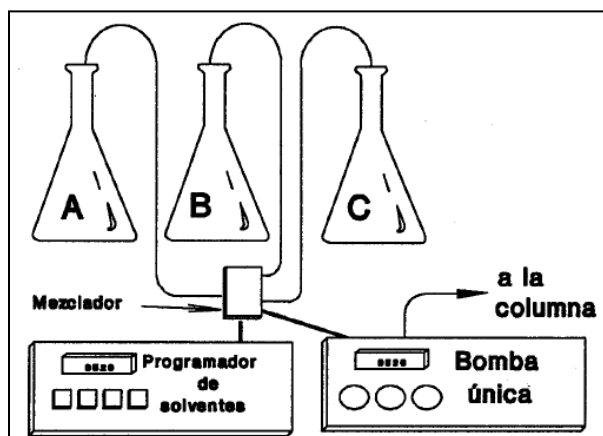


Fig. 25a. Sistema de formación de gradiente a baja presión.

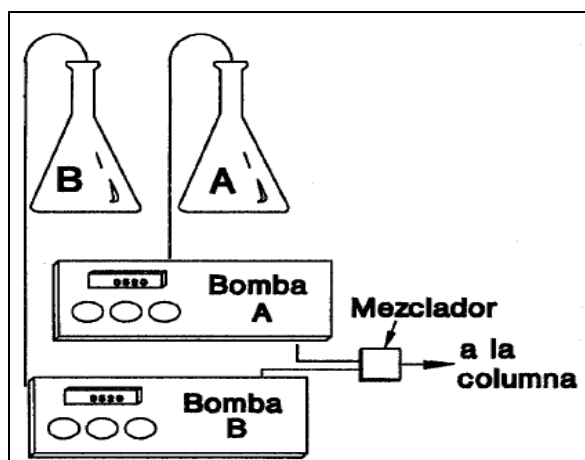


Fig. 25b. Sistema de formación de gradiente a alta presión.

En este sentido *Bogialli* desarrolló una metodología para determinar la presencia de ciertos plaguicidas tipo fungicida y herbicida (carbendanzim, chloridazon, cyanazine, monuron, methazachlor, isoproturon, diuron, linuron, terbutylazine, propyzamide, molinate, chloroxuron, metolachlor, neburon, propiconazole, prochloraz y pentachlorophenol), que pudieran estar presentes en muestras de leche cruda de bovino, usando cromatografía líquida. Para este caso uso un perfil de gradientes que consistía en dos soluciones, donde la solución A era conformada por 1 mmol/L de ácido fórmico en metanol y la solución B era una dilución acuosa de 1mmol/L de ácido fórmico, en donde los porcentajes de las mezclas en el tiempo fueron (con t en minutos):  $t_0$  = A:30% ; B:70,  $t_{35}$ : A:100%,  $t_{39}$ : A:30% ; B:70%,  $t_{48}$ : A:30% ; B:70%. Con este gradiente obtuvo porcentajes de recuperación entre 85 y 102% para los plaguicidas descritos [29].



### 3.3.1.5 Inyectores

El inyector es fundamentalmente el sistema que permite introducir la muestra en el equipo HPLC sin interrumpir el caudal del solvente (o mezcla de solventes) en el sistema. Para que permita un análisis óptimo el inyector debe ser fácil de operar, debe ser inerte químicamente, debe soportar altas presiones, debe ser preciso en cuanto a la cantidad de muestra introducida en el sistema y no debe provocar diluciones importantes en la solución inyectada.

La inyección de muestra a partir de inyectores de septum se ha ido retirando paulatinamente de los sistemas modernos de HPLC, ya que se presentaban contaminaciones de la columna y demás sistemas del equipo por el desprendimiento del material del septum, además de la contrapresión que debía vencerse para poder inyectar la muestra, para lo cual en muchos casos se requería disminuir los caudales altos momentáneamente. Actualmente los inyectores en HPLC son válvulas que orientan el caudal del efluente del solvente hacia la columna y que permiten la introducción de la muestra a través de una conexión al caudal conocida como *loop*, que conecta dos entradas de la válvula que posibilitan la inyección de la muestra al sistema sin interrumpir el caudal. Los inyectores están constituidos por un cuerpo fijo, un rotor con un sello que gira y un loop de muestra externo que contiene la muestra a analizar. El loop es intercambiable que posibilita cambiar la cantidad de muestra inyectada por medidas estandarizadas (entre 5 y 2000  $\mu$ l). Las válvulas de inyección comúnmente tienen 6 vías y el funcionamiento para la carga de la muestra es simple, donde se gira el rotor en la posición de carga, en la que el caudal del solvente pasa directamente hacia la columna mientras las conexiones del loop quedan aisladas de este sistema y abiertas para la inyección a presión atmosférica de la muestra por medio de una jeringa. Una vez esto ocurre, se gira el rotor a la posición de inyección en la que el caudal de solvente se desvía hace una de las entradas del loop, que ya contiene la muestra, y el solvente arrastra consigo la muestra ubicada en el mismo al interior de la columna [43].

### 3.3.1.6 Detectores

El detector en los equipos de HPLC son los sistemas que determinan el momento de salida de cada componente de la columna y la cantidad del mismo en ese instante. Los detectores deben tratar ciertas características para que puedan ser usados en los sistemas HPLC [43]:

*Amplio rango dinámico de respuesta:* Para un detector en HPLC, el rango dinámico está definido como el rango de concentraciones de una sustancia en análisis en la que un cambio en la concentración produce un cambio en la señal, lo cual incluye la respuesta lineal como no lineal donde el mínimo valor de este rango se le conoce como límite de detección.

*Poseer una respuesta lineal:* El detector debe medir alguna cualidad o propiedad del analito que aumente en la medida que aumente la concentración del mismo. El rango lineal de un detector es el rango de concentraciones donde se obtiene una respuesta lineal del mismo, donde se incluye al rango dinámico.

*No contribuir al ensanchamiento de bandas extracolumnar:* Normalmente, el ensanchamiento de las bandas cromatográficas tiene su origen en las interacciones ocurridas en la columna y es desde allí desde se manipulan ciertas condiciones para corregir esta situación. Se espera que el detector no influya en forma alguna en este hecho y para ello se usa una celda de contención de la muestra con el tamaño adecuado para que no induzca el ensanchamiento en las bandas.

*Responder a todos los solutos:* Es una de las mayores dificultades en HPLC ya que se deben buscar sistemas de detección que determinen la cualidad diferencial de un líquido (fase móvil) y un sólido (analitos disueltos). Esto configura una de las mayores diferencias entre la HPLC y la GC, ya que en la GC es muy fácil diferenciar entre un gas y un sólido por lo que es frecuente encontrar detectores específicos para determinados tipos de compuestos.

*Tener la sensibilidad apropiada:* Generalmente, la relación entre la universalidad en detección de un detector y la sensibilidad del mismo es inversa. Mientras mas analitos este en capacidad de detectar, menor es la sensibilidad y viceversa.

*Poseer una buena relación señal/ruido:* El ruido del detector (perturbaciones en la línea base cromatográfica) depende fundamentalmente a las particularidades electrónicas del mismo, a las variaciones de temperatura, oscilaciones en la tensión de la línea eléctrica o fluctuaciones en el caudal de entrada.

*No destruir la muestra:* Es una característica de casi todos los detectores en HPLC y resulta muy útil cuando se desea tener el analito separado por ejemplo en la HPLC preparativa.

*Tener una constante de tiempo baja:* Indica la velocidad con la que este responde a un cambio instantáneo en la concentración del analito de interés.

Los detectores en HPLC son de dos tipos fundamentalmente, los detectores generales y los detectores selectivos. Los detectores generales miden el cambio de algún parámetro físico en la fase móvil con el analito en comparación con la fase móvil pura, como en el caso del detector de índice de refracción y el de conductividad. Los detectores selectivos son sensibles a algún parámetro físico particular del analito, por ejemplo los detectores UV, que generan una señal en forma de absorbancia directamente proporcional a la concentración del analito en una longitud de onda dada. En la presente sección se dará una descripción de los detectores más comunes entre estos dos grupos [43].

### **3.3.1.6.1 Detector general**

#### **3.3.1.6.1.1 Detector de índice de refracción**

Este detector determina la diferencia entre el índice de refracción del solvente y el del analito. Se le considera un detector universal, ya que es altamente improbable que un solvente tenga el mismo índice de refracción que el del analito además de que no destruye la muestra. El problema de este detector es que no es muy sensible, se ve muy afectado por los cambios de temperatura y no se puede usar un sistema de gradiente en él, ya que al cambiar la composición de la fase móvil, cambia su índice de refracción y este es el blanco en la determinación del índice de refracción del analito y como consecuencia de esto no es posible estabilizar efectivamente la línea base del cromatograma. Se conocen tres tipos fundamentales de detectores de índice de refracción, que son el Fresnel, Deflexión e Interferométrico.

El detector tipo Fresnel es un detector diferencial que tiene dos celdas para, una por donde pasa el solvente mas la muestra y en la otra por donde pasa solo el solvente. La determinación se realiza comparando los índices de refracción de las dos celdas, usando un prisma para cada celda que abarca todo el rango de índices de refracción (1,33 – 1,63) en donde uno de ellos funciona con solventes en fase reversa y el otro en fase normal (sección 3.3.2).

El detector por deflexión funciona bajo el mismo principio diferencial que el detector tipo Fresnel, pero este solo usa un prisma para todo el rango de índices de refracción además de celdas más grandes, del orden de 8 a 10 µl. El detector Interferométrico usa una radiación de luz polarizada que es dividida en dos haces por un divisor de onda, luego estas ondas se focalizan para que atraviesen la celda con la muestra y la de referencia. Finalmente se recombina por una lente para llegar al fotomultiplicador, el cual detecta los cambios en la cantidad (concentración) del analito que pasa por la celda a través de variaciones en la intensidad de luz que llega al fotomultiplicador.

### **3.3.1.6.2 Detectores selectivos**

#### **3.3.1.6.2.1 Detector UV**

Es el detector más usado en HPLC, tiene una alta sensibilidad y permite detectar analitos por el orden de nanogramos con un buen rango lineal, no es destructivo y puede usarse con gradientes de solventes, con la única condición de que estos no sean coloreados a la longitud de onda de trabajo, además de que no es muy sensible al cambio de caudal del efluente ni a la temperatura. Normalmente opera en un rango espectral de 190-350 nm. Como se puede suponer, el principio y la determinación cuantitativa se plantean a través de la ley de Beer, que dice infiere una relación proporcional entre la concentración del analito y su capacidad de absorber las radiaciones electromagnéticas, de acuerdo a la siguiente expresión:

$$A = a \times b \times C$$

Donde  $A$  es la absorbancia,  $a$  es la absortividad molar del analito,  $b$  es la distancia que recorre el haz de luz transversalmente en la celda que contiene al analito medido en centímetros y  $C$  es la concentración del analito en la muestra.

Un ejemplo representativo en la aplicación de este detector para el análisis de plaguicidas es a través del trabajo desarrollado por *Ashnagar* en donde determinó 7 pesticidas organoclorados (lindane, aldrín, dieldrine, o,p'-DDT, p,p'-DDT, p,p'-DDE, p,p'-DDD) a través de un sistema HPLC/UV en fase reversa (ver sección 3.3.2) en el cual usaron como solvente de arrastre una solución de acetonitrilo-agua (60:40 V/V). Los análisis arrojaron una desviación estándar que va desde 0,012 hasta 0,128 mg/kg, lo cual indica que la metodología aplicada tiene una adecuada reproducibilidad, evaluando solamente este parámetro [44].

#### **3.3.1.6.2.2 Detector de Onda Fija o Fotométrico**

El detector opera a longitudes de ondas fijas, determinadas por las líneas de emisión característica de la lámpara que se usa, que comúnmente es de mercurio de baja presión, particularmente la línea de emisión de 254 nm. Generalmente no se usa monocromador, ya que esta tarea la hace la misma fuente de emisión descrita pero si se usan filtros de interferencia para eliminar longitudes de onda indeseadas que se salen de la línea de trabajo deseada. Algunos filtros permiten trabajar a longitudes de onda que no tiene la lámpara de mercurio comúnmente, por ejemplo el filtro de óxido de fósforo que permite obtener radiaciones a 280 nm, que no se obtienen por la lámpara de mercurio.

#### **3.3.1.6.2.3 Detector de onda variable o Espectrofotométrico**

Funciona bajo el mismo principio de emisión de una fuente de radiación que produce las longitudes de onda necesarias, pero en este caso se hace uso de una red de difracción que permite seleccionar libremente la longitud de onda de trabajo en un rango espectral determinado, lo que permite seleccionar la longitud de onda de máxima absorción del analito de interés. Comúnmente se usan lámparas de deuterio y xenón de emisión continua, que dirige su radiación por medio de una red de espejos hacia un monocromador, generalmente una red holográfica de difracción, el cual dirige la emisión de luz escogida hacia la celda de medida y de allí hacia el fotomultiplicador

#### **3.3.1.6.2.4 Detector de fluorescencia**

EL detector de fluorescencia se usa para el análisis de sustancias que poseen la propiedad de ser fluorescentes naturalmente o ser conferidas por la acción de un reactivo fluorogénico. Su alta selectividad y sensibilidad permite realizar análisis de trazas. Esta selectividad está sujeta a dos factores implícitos en los análisis, el primero es que muchas sustancias no poseen fluorescencia natural por lo que es necesario usar un reactivo derivatizante que produzca una especie fluorescente, lo cual implica que la molécula del analito tenga un grupo funcional que sea reactivo a alguno de estos agentes derivatizantes. Además de esto se usan dos emisiones de longitudes de onda diferentes,

una de emisión y otra de absorción, donde al excitar la muestra con determinada longitud de onda puede que existan especies que absorban esta emisión, pero que no van a emitir la longitud de onda elegida. Comúnmente se usan lámparas de Xenón como fuentes de emisión de radiación para la excitación de la especie de estudio y al igual que con los detectores UV se puede hacer uso de filtros monocromadores para seleccionar la longitud de onda deseada en el espectro de emisión de la lámpara, tanto de excitación como de emisión.

#### **3.3.1.6.2.5 Detector electroquímico**

Es un detector altamente sensible, casi 1000 veces más sensible que los detectores UV y además es ampliamente selectivo, no solo porque tiene la capacidad de oxidar y reducir los compuestos de análisis, sino porque puede ejecutar una cuidadosa selección del potencial aplicado para analizar analitos particulares. La detección de compuestos electro-oxidables y electro-reducibles ocurre en la superficie de un electrodo interpuesto en el paso del efluente que sale de la columna.

Este detector emplea tres electrodos: el de trabajo, el de referencia y el auxiliar. La reacción redox ocurre en el electrodo de trabajo mientras el electrodo auxiliar provee una carga de neutralización complementaria. Entre estos dos electrodos se fija el potencial de la reacción determinada, mientras que el electrodo de referencia mide un potencial fijo y estable el cual se compara con el obtenido en el electrodo de trabajo y un potencióstato ofrece una diferencia de potencial estable entre el electrodo de trabajo y el electrodo auxiliar, y es este potencial con el que se compara contra la determinación del electrodo de referencia. La señal final que se obtiene por un amplificador de corriente de nanoamperes proviene del flujo de corriente entre el electrodo auxiliar y el electrodo de referencia.

Este método tiene una limitación respecto al solvente a usar como fase móvil, ya que este tiene que ser un solvente que conduzca la electricidad, por lo que la metodología se reduce la HPLC de fase reversa y de intercambio iónico; por otra parte el detector destruye el analito en el análisis. La desgasificación es muy importante en el modo reductivo, ya que la presencia de oxígeno disuelto en la solución de la muestra da lugar a un gasto de potencial en la reducción de este oxígeno disuelto, generándose señales ruidosas y bajos niveles de detección. Para esto se emplea la desgasificación por medio de una corriente de helio, la cual no es necesaria en el modo oxidativo y en la cual se puede aplicar una desgasificación menos intensa.

#### **3.3.1.6.2.6 Determinaciones de plaguicidas por HPLC/MS**

En la sección 3.2.1.4.3 del presente documento se hizo una exposición suficiente del fundamento teórico de la espectrometría de masas y de su uso en la determinación de plaguicidas como sistema analizador, acoplado a un equipo de cromatografía de gases (GC/MS) como sistema de separación de muestras. En la presente sección se hará

referencia a los trabajos representativos para el análisis cuantitativo y cualitativo de plaguicidas a través del sistema HPLC/MS.

Un ejemplo claro en este sentido, es el de la metodología desarrollada por *Hongzhed* donde analizó cuantitativa y cualitativamente 29 plaguicidas (bentazone, flumorph, fomesafen, clethodim, fipronil, butilene fipronil, triflumuron, hexaflumuron, teflubenzuron, imidacloprid, allidochlor, cyanazine, simazine, nicosulfuron, sulfometuron-metyl, chlorsulfuron, rimsulfuron, metazachlor, tribenuron-methyl, diuron, diphenamid, clomazone, chlorimuron-ethyl, mefenacet, primisulfuron-methyl, eluthiacet-methyl, diflufenican, piperophos y trifluralin) y dos medicamentos veterinarios (chloramphenicol y enrofloxacin) analizándolos a través de un equipo de LC/MS-tandem, obteniendo el siguiente cromatograma que contiene algunos de los plaguicidas analizados:

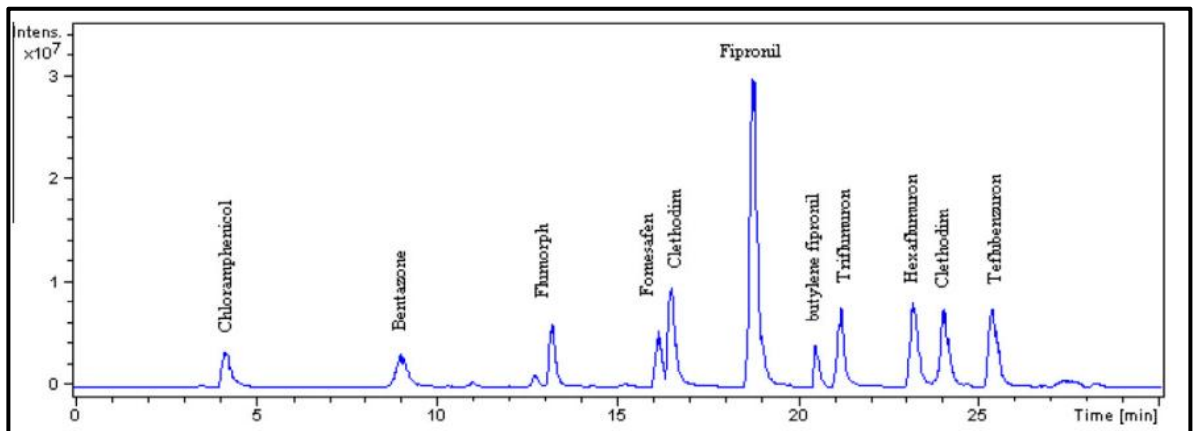


Fig. 26. Cromatograma LC/MS obtenido de 10 de los plaguicidas analizados a un nivel de 0,10mg/kg[45].

Este análisis arrojó un coeficiente de correlación comprendido entre 0,9931 y 0,999, un límite de detección en un rango entre  $0,01 \times 10^{-3}$  y  $1,5 \times 10^{-3}$  mg/kg excepto el fomesafen que resulto tener un LDD de  $4,8 \times 10^{-3}$ , de igual forma el limite de cuantificación para los plaguicidas dados se ubico en un rango entre  $0,15 \times 10^{-3}$  y  $11,6 \times 10^{-3}$  mg/kg. De igual forma se obtuvieron porcentajes de recuperación que muestran que esta técnica es adecuada para el análisis de los plaguicidas descritos, los cuales se determinaron a través de tres niveles conocidos (0,05, 0,10 y 0,19 mg/kg) de las sustancias descritas, donde se obtuvieron porcentajes de recuperación para el primer nivel (0,05 mg/kg) entre 71 y 89%, para el segundo nivel (0,10 mg/kg) entre 82 y 89%, para el ultimo nivel (0,19 mg/kg) entre 82 y 107%. Los resultados obtenidos indican que esta técnica es adecuada para el análisis de los plaguicidas descritos a las condiciones establecidas por el autor [45].

En este mismo sentido, *Dagnac* aporta una metodología para el análisis de 45 plaguicidas (acetochlor, alachlor, atrazine, atrazine-d<sub>5</sub>, bentazone, bromacil, bromoxinyl, carbetamide, chlorfenvinphos, chloridazon, chloroxuron, chlorpyriphos, chlortoluron, cyanacine, desethylatrazine (DEA), desethylterbutylazine (DEBTA), desisopropylatrazine (DIA),

diazinon, dimefuron, dinoterb, diuron, ethidimuron, fipronil, imidacloprid, ioxynil, isoproturon, linuron, malathion, metabromuron, metamidron, metazachlor, methabenzthiazuron, methyl-pirimiphos, metolachlor, mevinphos, monolinuron, phosalone, prometryn, propazine, quinmerac, simazine, terbutryn, terbutylazine, triadimefon y triazophos) en leche cruda, usando un equipo LC-MS/MS de triple cuadrupolo equipado en una fuente termostataada de electrospray ionizado (heated electrospray ionization source – HESI), que usaba una gradiente de 2 solventes que eran agua/acido formico (0, 15%)/formiato de amonio (3mM) y la siguiente era metanol/acido formico (0,15%)/formiato de amonio (3mM). En este análisis se obtuvo un límite de detección en un rango entre 6,4 ng/L y 214 ng/L, además de un limite de cuantificación en un rango entre 21 ng/L y 713 ng/L. Estos resultados indican una alta sensibilidad del método, dada la escala a la que se analiza, lo que posibilita el inferir que se trata de un método altamente eficaz para el análisis multiresiduo de plaguicidas en leche.

### **3.3.2 Modalidades de operación de la HPLC**

La principal característica de las diferentes técnicas de HPLC que existen son los tipos de interacciones que se dan en el proceso de separación de las mezclas. Estas interacciones son fundamentalmente de *fuerzas iónicas, fuerzas polares y fuerzas dispersivas*.

Cada técnica de HPLC se fundamenta en un tipo particular de las interacciones descritas, donde las fuerzas polares son las interacciones dominantes en la HPLC de fase normal, las fueras dispersivas son las más abundantes en las interacciones de la HPLC de fase reversa y las fuerzas iónicas son las principales interacciones que se presentan en la HPLC de intercambio iónico. Existe una cuarta técnica de HPLC conocida como HPLC por tamaño de exclusión, la cual no se fundamenta en ningún tipo de interacción electrostática como las descritas anteriormente a la hora de producir la separación de los componentes de la mezcla determinada [42].

#### **3.3.2.1 HPLC en fase normal (NP-HPLC, Normal phase-HPLC)**

Se fundamenta en las interacciones de carácter polar que se dan en la mezcla de solventes y analitos con la fase estacionaria, donde mientras más fuertes sea esta interacción entre analito y fase estacionaria, más tiempo será retenido en la columna. Pero en la NP-HPLC se presenta una separación competitiva, entre los espacios donde se puede dar la interacción de las moléculas de la fase estacionaria con las moléculas del solvente y del analito, por tanto, mientras más fuerte sea la interacción entre solvente y fase estacionaria, más débil será la retención del analito en la columna.

La NP-HPLC está basada en el uso de solventes no polares (hexano, heptano, etc.) con pequeñas cantidades de solvente polar (metanol, isopropanol, etc). La variación de la concentración de estas cantidades de solvente polar permite que se dé una retención más efectiva de los analitos en la columna. Las interacciones de tipo polar que se presentan en estas situaciones son relativamente fuertes, tanto que si se varia en solo un 1%v/v la concentración de la fracción de solvente polar en la mezcla de solventes respecto a la

necesaria, se puede presentar un cambio significativo en la retención del analito en la columna.

Tradicionalmente esta técnica se basaba en el uso de materiales de empaque de la columna como sílica ( $\text{SiO}_2$ ) o alúmina ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ). Las superficies de estos materiales son densamente polares, por la alta presencia de grupos OH en su superficie, esto hace que la retención del analito en esta superficie sea muy sensible a la variación de la composición de la fase móvil. En los últimos años de desarrollo en esta técnica, se han ido incorporando terminaciones a las moléculas de la sílica o la alúmina con la intención de reducir la polaridad del material para algunas aplicaciones particulares. Tal es el caso de la modificación de la sílica con trimetoxiglusidoxipropilsilanos (también conocidos como fases diol), el cual es un material con una polaridad superficial mucho menor que la sílica. El uso de fases estacionarias tipo diol junto con solventes de baja polaridad en los modificadores (acetato de etilo y ésteres en lugar de alcoholes) posibilitan incrementar la robustez y la reproducibilidad del análisis comparado con el uso de solo sílica y modificadores de solventes altamente polares. La NP-HPLC también debe tener en cuenta la solubilidad del analito en el solvente o fase móvil, ya que como se indicó esta técnica usa principalmente solventes no polares, lo que posibilitan el análisis de sustancias altamente hidrofóbicas o no polares.

### **3.3.2.2 HPLC en fase reversa (RP-HPLC, Reverse Phase-HPLC)**

Esta técnica de la HPLC se fundamenta en el uso de fuerzas dispersivas (interacciones de van der Waals) entre las moléculas del analito, la fase estacionaria y la fase móvil. Las polaridades de la fase móvil y la fase estacionaria son contrarias, es decir, si una es polar la otra es apolar y viceversa. Esta técnica es la más ampliamente usada en las determinaciones por HPLC, en especial en las determinaciones de analitos de bajo peso molecular, ya que permite la determinación de componentes de una mezcla muy similares entre sí con una variación relativamente fácil de la selectividad y la retención.

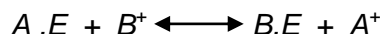
Las fuerzas de van der Waals son las interacciones intermoleculares más débiles que se presentan en todas las técnicas de HPLC. Estos bajos niveles de interacción energética entre las moléculas del sistema permiten una diferenciación clara en las interacciones moleculares de sustancias químicamente similares. Esta diferenciación se puede explicar haciendo uso de un ejemplo análogo de dos sistemas de detección (descritos en la sección de detectores de este documento) de HPLC como los son la UV y la fluorescencia. Mientras que la fluorescencia realiza sus determinaciones sobre la comparación de una medida de una variación en la señal determinada contra un blanco de señal igual a cero, la UV lo hace sobre la comparación de la absorbividad del solvente como blanco, por ende las determinaciones con detector de fluorescencia son ampliamente más sensibles que con detector UV, ya que la energía de fondo neta (energía de comparación para la medida o blanco) es igual a cero mientras que en UV es muy alta, lo que lo hace poco sensible. Así mismo, ocurre análogamente en RP-HPLC, donde la sensibilidad resultante de la interacción de baja energía entre el analito y la superficie de la fase estacionaria es muy alta, lo que se le atribuye a la baja diferencia energética en la interacción de los dos componentes del sistema.



Los materiales usados en las columnas de la RP-HPLC son materiales con una superficie fuertemente hidrofóbica, donde se supone el mismo principio que para las demás interacciones positivas de la HPLC (NP, RP y IEX) que mientras más grande sea la superficie efectiva de contacto del material de la columna, más tiempo será retenido el analito y mejor será la separación del mismo en el proceso. Los materiales usados son derivados de la sílica que se transforman en compuestos de terminación apolar e hidrofóbica.

### 3.3.2.3 HPLC de intercambio iónico (IEX-HPLC, Ion-Exchange- HPLC).

Como su nombre lo indica, esta técnica de HPLC se fundamenta en la interacción de tipo electrostática que se da entre los componentes del sistema donde se presenta dicha interacción por la acción de las cargas opuestas entre el analito y los iones de carga contraria de la fase estacionaria hidrofóbica. Para entender este hecho, se plantea la siguiente ecuación:



Donde la constante de equilibrio de este proceso estará determinada por la siguiente expresión:

$$K = \frac{[A^+][B.E]}{[A.E][B^+]}$$

La cual determina la afinidad de ambos cationes por los puntos de intercambio en la fase estacionaria, por tanto si la constante es igual a 1, no se esperaría que se dé ningún tipo de interacción en ese caso. Por tanto, mientras más alta de 1 sea la constante de equilibrio, más alta será la capacidad del catión  $B^+$  de sustituir al componente A en la fase estacionaria. Dependiendo de la carga que tengan estos puntos de intercambio, la fase estacionaria puede ser un intercambiador aniónico (centros de carga positiva de intercambio en la superficie) o intercambiadores catiónico (centros de carga negativa de intercambio en la superficie).

Los materiales de las fases estacionarias más comunes para la IEX-HPLC son los hechos con estireno-divinilbenceno a través de un entrelazado entre las moléculas de estos, usados como centros de intercambio iónico en las resinas. Otras cuatro moléculas usadas como centros de intercambio iónico comúnmente son el  $SO_3^-$  (intercambiador catiónicofuerte),  $CO_2^-$  (intercambiador catiónicodébil), aminas cuaternarias (intercambiador aniónico fuerte) y las aminas terciarias (intercambiador aniónico débil). La retención del analito y la selectividad de la IEX-HPLC dependen fuertemente del pH y la fuerza iónica de la fase móvil.

## CAPITULO 4

### ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD

#### 4.1 ESTANDARIZACIÓN

El proceso de estandarización de una metodología analítica consiste en verificar y documentar, que ésta conduzca en un alto grado de seguridad, a la obtención de resultados precisos y exactos dentro de los atributos y especificaciones de calidad preestablecidos. La estandarización de un método analítico es un proceso riguroso que dependiendo de la técnica a la que pertenezca el método, la matriz, el analito, la cantidad de parámetros de la estandarización, y de la logística empleada para su desarrollo, puede requerir de un tiempo más o menos considerable [46].

#### 4.2 PARÁMETRO DE CALIDAD

Los parámetros de calidad son los criterios cuantitativos que se utilizan para decidir si un método es adecuado o no para resolver un determinado problema analítico. Son por lo tanto los criterios que se utilizan en la validación de los métodos analíticos (para demostrar su validez en la resolución de un problema de este tipo). Los parámetros de calidad son la materialización, expresión numérica de características o indicadores de calidad de los métodos tales como la precisión, exactitud, sensibilidad, selectividad, linealidad, rango, límite de detección y límite de cuantificación [47].

<b>Característica</b>	<b>Parámetro de calidad</b>
<b>Precisión</b>	Desviación estándar absoluta, desviación estándar relativa, coeficiente de variación, varianza.
<b>Exactitud</b>	Error relativo, error absoluto, porcentaje de recuperación
<b>Sensibilidad</b>	Pendiente de recta de calibrado
<b>Selectividad</b>	Coeficiente de selectividad
<b>Robustez</b>	Desviación estándar absoluta, desviación estándar relativa, coeficiente de variación, varianza.

**Tabla 2 Parámetros de calidad estudiados en los métodos analíticos.**

Fuente: Adaptado de Skoog 2001.

### 4.2.1 Exactitud

Se define exactitud como la cercanía de la medida de una variable a su valor verdadero [46]. Cuando un método posee un alto valor de exactitud, la medida de la muestra proporciona un valor que idealmente es idéntico al valor verdadero (previamente conocido). Generalmente la exactitud de un método se calcula mediante estudios de porcentajes de recuperación, pero también se puede determinar por análisis de un material estándar o de referencia, así como por comparación con un método previamente validado.

### 4.2.2 Precisión

Se define precisión como el grado de concordancia entre los resultados de pruebas individuales cuando el procedimiento es aplicado repetidas veces para una muestra homogénea. Generalmente, la precisión de un método se expresa en términos de desviación estándar (SD) o desviación estándar relativa en porcentaje (coeficiente de variación, RSD). La precisión de un método puede estimarse de varias formas:

- *Repetibilidad Instrumental*: Grado de concordancia entre los resultados obtenidos cuando una misma muestra es analizada repetidamente por el mismo analista, en el mismo equipo y a bajo las mismas condiciones en un corto periodo de tiempo.
- *Repetibilidad del Método*: grado de concordancia entre los resultados obtenidos cuando el método es aplicado repetidamente por el mismo analista, en el mismo equipo y en un corto periodo de tiempo.
- *Precisión Intermedia*: Grado de concordancia entre los resultados que se obtienen cuando se realizan pequeñas variaciones en el laboratorio como distintos días, diferentes analistas o equipos.
- *Reproducibilidad*: grado de concordancia entre resultados obtenidos cuando el método es aplicado en distintos laboratorios.

Los estudios de precisión de un método analítico deben realizarse con un número suficiente de alícuotas que permita un cálculo estadístico correcto de la desviación estándar y del coeficiente de variación.

### 4.2.3 Selectividad o especificidad

La selectividad es uno de los aspectos más importantes de un método analítico y puede definirse como la capacidad que posee el mismo para medir específicamente un analito en presencia de otros componentes que pueden formar parte de la muestra. La determinación de la selectividad de un método se lleva a cabo comparando los resultados de un análisis obtenido para una muestra que contiene los posibles componentes interferentes que se pueden encontrar en una muestra real (impurezas, compuestos de degradación, componentes de la matriz) con los resultados obtenidos para una muestra pura o sin interferencias.

#### 4.2.4 Límite de detección y límite de cuantificación

El límite de detección (LOD) se puede definir como la concentración más baja del analito presente en una muestra que puede ser detectable, pero no necesariamente cuantificable, en las condiciones experimentales de trabajo. El límite de cuantificación (LOQ) se puede definir como la concentración mas baja del analito presente en una muestra que puede ser determinada con una precisión y exactitud aceptable en las condiciones experimentales de trabajo. Ambos se expresan normalmente en términos de concentración de analito en la muestra, y en un método instrumental se pueden determinar de varias formas. En algunos casos se determinan como la relación señal/ruido (S/R) obtenida entre resultados de muestras con concentraciones conocidas de analito y resultados obtenidos en muestras blanco y se establece que el LOD es la concentración que proporciona una relación S/R de 2 o 3 y que el LOQ es la concentración que proporciona una relación S/R de 10. En otros casos se estiman a través de la desviación estándar multiplicada por un factor de 10 proporciona una estimación de la señal mínima cuantificable, siendo este ultimo el modo mas usado para obtener este parámetro estadístico.

Un ejemplo de esto, esta descrito en el trabajo desarrollado por *Filhoen* donde determino la presencia de 16 plaguicidas (trichlorfon, diazinon, methyl parathion, malathion, fenthion, ethyon, bifenhin, permethrin, cypermethrin, imizalil y prochloraz) usando DI-SPME/GC-MS (SIM) en muestras de agua subterránea, para el cual encontró un limite de detección en un rango de 0,02 a 0,3 ng/mL y un limite de cuantificación de 0,05 a 1 ng/mL. Lo que infiere que se trata de un método de alta sensibilidad, dada la escala a la que se posibilita hacer los análisis [49].

#### 4.2.5 Linealidad y rango

La linealidad de un método analítico es su habilidad para proporcionar resultados que sean, directamente o mediante transformación matemática, proporcionales a la concentración de analito presente en la muestra dentro de un rango determinado. El rango de un método analítico puede definirse como el intervalo de concentraciones, incluyendo la más baja y la más alta en el cual se pueden realizar determinaciones del analito con adecuada precisión, exactitud y linealidad [47].

La linealidad de un método analítico se determina mediante el tratamiento matemático de los resultados obtenidos en el análisis de disoluciones patrón con diferentes concentraciones conocidas de analito incluidas en el rango. El rango de un método debe ser comprobado realizando un estudio conveniente de precisión, exactitud y linealidad en los extremos del mismo. El trabajo desarrollado por *Rodrigues* describe en el método desarrollado para la determinación de plaguicidas en muestras de leche, un intervalo de linealidad que se ubica en un rango entre 6,5 - 32 µg/L y 32,9 - 56 µg/L.

#### 4.2.6 Sensibilidad

Es la capacidad de un método para distinguir pequeñas diferencias en la concentración del analito. Los factores que terminan la sensibilidad son la pendiente de la recta de calibrado y la precisión, de manera que si dos métodos tienen igual precisión será más sensible el que tenga una recta con mayor pendiente, y si dos métodos tienen igual pendiente será más sensible el que presente mayor precisión. La sensibilidad de un método puede expresarse como:

- Sensibilidad de la calibración ( $m$ ): Es la pendiente de la recta de calibrado.
- Sensibilidad Analítica ( $\gamma$ ): Se expresa como la pendiente de la recta de calibrado dividida entre la desviación estándar de las medidas (precisión).

La sensibilidad de calibración tiene la ventaja de que es independiente de la concentración. Por su parte, la sensibilidad analítica tiene la ventaja de ser insensible a los factores de amplificación.

#### 4.2.7 Robustez

Es la capacidad del método analítico para no ser afectado por pequeños pero deliberados cambios en las condiciones experimentales. El estudio de la robustez del método trata de evaluar cómo la variación aleatoria de las condiciones experimentales repercute en la variabilidad de los resultados obtenidos, expresada como desviación estándar absoluta, desviación estándar relativa y coeficiente de variación de los mismos. Para evaluar la robustez del método hay que identificar cuáles son los factores experimentales [47].

En el siguiente capítulo se ilustrará una propuesta metodológica para el análisis de 5 plaguicidas organofosforados escogidos de acuerdo a los factores descritos al final del capítulo 3.

## **CAPITULO 5**

### **ESTUDIO DE CASO**

En el presente capítulo se dará una descripción suficiente de una propuesta metodológica para el análisis de plaguicidas organofosforados en muestras de leche cruda de bovino. Este método se plantea teniendo en cuenta las condiciones técnicas de la instrumentación disponible en los laboratorios destinados a la investigación de la Escuela de Química en la Universidad Tecnológica de Pereira. El desarrollo del presente capítulo se dividirá en dos apartados, comprendidos en dos propuestas metodológicas para la determinación de plaguicidas en muestras de leche cruda, en las cuales se hará énfasis en el procedimiento para la extracción, así como las condiciones operativas necesarias para su análisis instrumental

#### **5.1 METODOLOGIA 1: SPME-GC/ $\mu$ ECD**

Como se describió en el capítulo 1, en el apartado referente a las características fisicoquímicas de la leche, el contenido total de grasa en la leche cruda se encuentra en un rango entre 3 y 4% del peso total de la misma. Este parámetro es definitivo por cuanto es en la fase grasa donde los plaguicidas interactúan para acumularse en el organismo del bovino, más exactamente en la leche del mismo. Es por esto que el proceso de extracción de los plaguicidas de la leche cruda como matriz inicial es definitivo para la selección de los parámetros inmersos en el proceso de extracción por la técnica escogida.

En el capítulo 2 se describieron 3 metodologías usadas comúnmente en la preparación de muestras para el análisis de plaguicidas (LLE, SPE y SPME), haciendo énfasis en características operativas además de sus aplicaciones en la extracción de plaguicidas de matrices complejas como lo es la leche. En este sentido, para el desarrollo de una metodología que permita la determinación cuantitativa y cualitativa de plaguicidas organofosforados en muestras de leche cruda en el departamento de Risaralda, se debe tener en cuenta distintos factores para la selección del método adecuado para tales determinaciones, como lo pueden ser: facilidad y practicidad en la aplicación del método, bajos costos de operación, eficiente en la recuperación del analito y accesible para su adquisición. Es de mencionar, que este método es planteado para ser usado y aplicado en las instalaciones de los laboratorios de investigación de la escuela de Química en la Universidad Tecnológica de Pereira.

De acuerdo a los autores citados, a los resultados obtenidos por estos y la conjugación de los mismos con los factores descritos anteriormente, se concluye que la microextracción en fase sólida (SPME) es el método que ofrecería mejores resultados ante la posible exigencia de desarrollar un análisis de los plaguicidas organofosforados descritos. En este sentido, daremos paso a una propuesta metodológica para la extracción de los analitos de interés en muestras de leche cruda a partir de la SPME como método de preparación de muestra previo al análisis instrumental.

Inicialmente se tienen las estructura química de los 5 plaguicidas de interés (chlorpyriphos, malathion, deltamethrin, fipronil y fenitroton) expuestos en la figura 27, para los cuales en el trabajo desarrollado por *Rodriguesse* referencia un procedimiento destacado para la extracción de plaguicidas organofosforados, con el cual se determinaría el porcentaje de recuperación además de las otras variables estadísticas necesarias para definir la técnica como reproducible, eficiente y sensible.

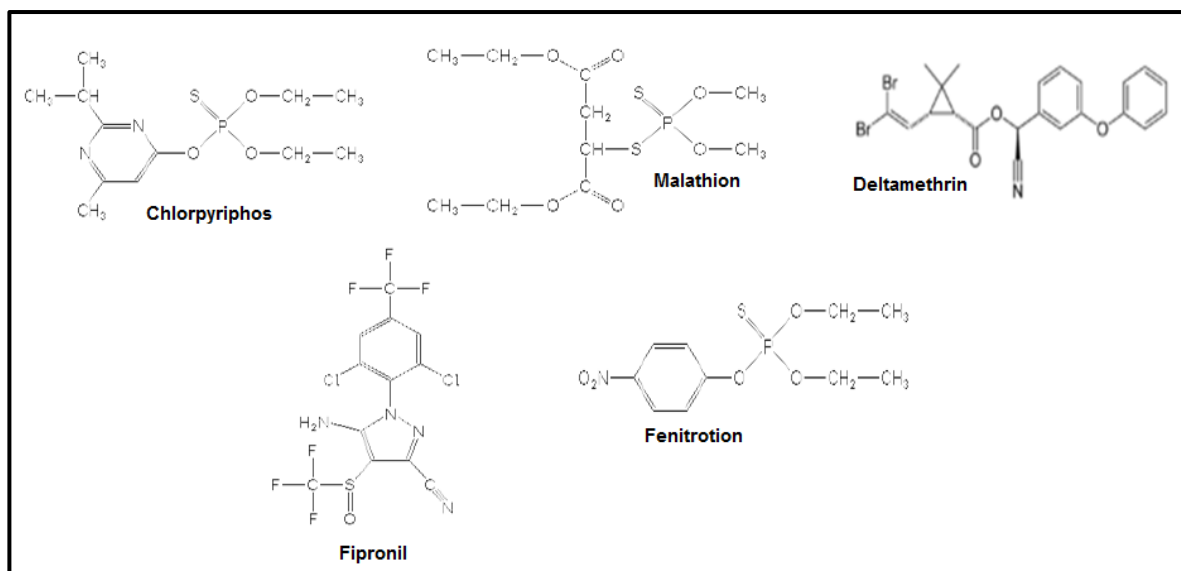


Fig. 27. Estructura química de cinco plaguicidas organofosforados.

### 5.1.1 Preparación de la muestra

Se tomó una alícuota de 12 mL de leche cruda de vaca previamente contaminada con el estándar de plaguicidas adecuado para la determinación, la cual se ubica en un recipiente cerrado que sea adecuado para que se dé el equilibrio líquido-gas en la atmósfera del recipiente. Este periodo puede durar entre 20 y 30 minutos con agitación constante, posiblemente magnética. La fibra adecuada para el análisis de este tipo de plaguicidas es referenciada por diversos autores como la PDMS-DVB[33,34]. Una vez este periodo de espera haya pasado, se inserta la fibra en el recipiente determinado, para el cual se puede hacer uso de alguna de las dos configuraciones (DI o HS) para la extracción del analito, teniendo en cuenta que las dos necesitan agitación permanente de la muestra de leche, particularmente la HS ofrece la ventaja de no poner en riesgo la fibra por efectos de dicha agitación además de no someter a la fibra al desgaste que supone la inmersión de la misma, pero aun así la configuración DI ofrece la ventaja de reducir el tiempo de espera para que se de el equilibrio del analito en la superficie de la fibra. Este proceso se debe hacer a una temperatura de 90°C, para garantizar la volatilización suficiente de los analitos de interés, además de una agitación constante de 600 rpm. El tiempo de este proceso puede variar, entre 45 minutos por muestra si es en la configuración HS o 15-20 minutos por muestra si es en la configuración DI.

Cuando este proceso termina, se retira la fibra del recipiente y se ubica directamente en el puerto de inyección del cromatógrafo de gases, para el cual el autor recomienda que se realice una desorción a una temperatura de 250°C durante 5 min. Finalmente vendrá el proceso de análisis instrumental que se describe a continuación.

### **5.1.2 Análisis instrumental**

La elección de los 5 plaguicidas mencionados en el apartado anterior, fue realizada con base en distintos criterios. El empleo de estos compuestos en el control de plagas en pastos en el departamento de Risaralda, así como su versatilidad de análisis, y teniendo en cuenta los equipos disponibles en los laboratorios de la Escuela de Química de la Universidad Tecnológica de Pereira, fueron los factores que conllevaron a la conclusión de que la cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas sería la técnica más apropiada para el desarrollo de un trabajo de análisis experimental.

Como primera medida, la cromatografía gaseosa requiere poca cantidad de muestra para llevar a cabo la separación de la mezcla. Además, durante el proceso de separación, los 5 plaguicidas seleccionados se pueden separar de una manera eficiente, sin presentar solapamientos en las señales del cromatograma.

Como se evidencia en el trabajo de Fernández, donde se analizan los plaguicidas fenitrothion, chlorpyrifos, y deltamethrin mostrando tiempos de retención de 10.1, 10.6 y 27.5 minutos respectivamente. En este trabajo se emplea Split/Splitless como sistema de inyección de muestra y unas rampas de calentamiento programadas de la siguiente manera: 60°C por dos minutos. A continuación se calienta el horno a una rata de 30°C por minuto (°C/min) hasta llegar a 200°C. Posteriormente las ratas son de 3°C/min hasta 230°C y finalmente 4°C/min hasta los 300°C. La separación se efectúa en una columna capilar HP-5 MS 5% phenyl-methylpolisiloxane de 30m de largo con 0,25mm de diámetro interno y 0,25µm de recubrimiento interno, empleando Nitrógeno como gas portador. Utilizando un detector µECD, obtiene un coeficiente de correlación de 0,9968 para el fenitrothion, 0,9992 para chlorpyrifos y 0,9984 para Deltamethrin.

En los resultados publicados por este autor se observan valores de coeficiente de correlación adecuados, lo que indica un buen factor de respuesta del equipo.



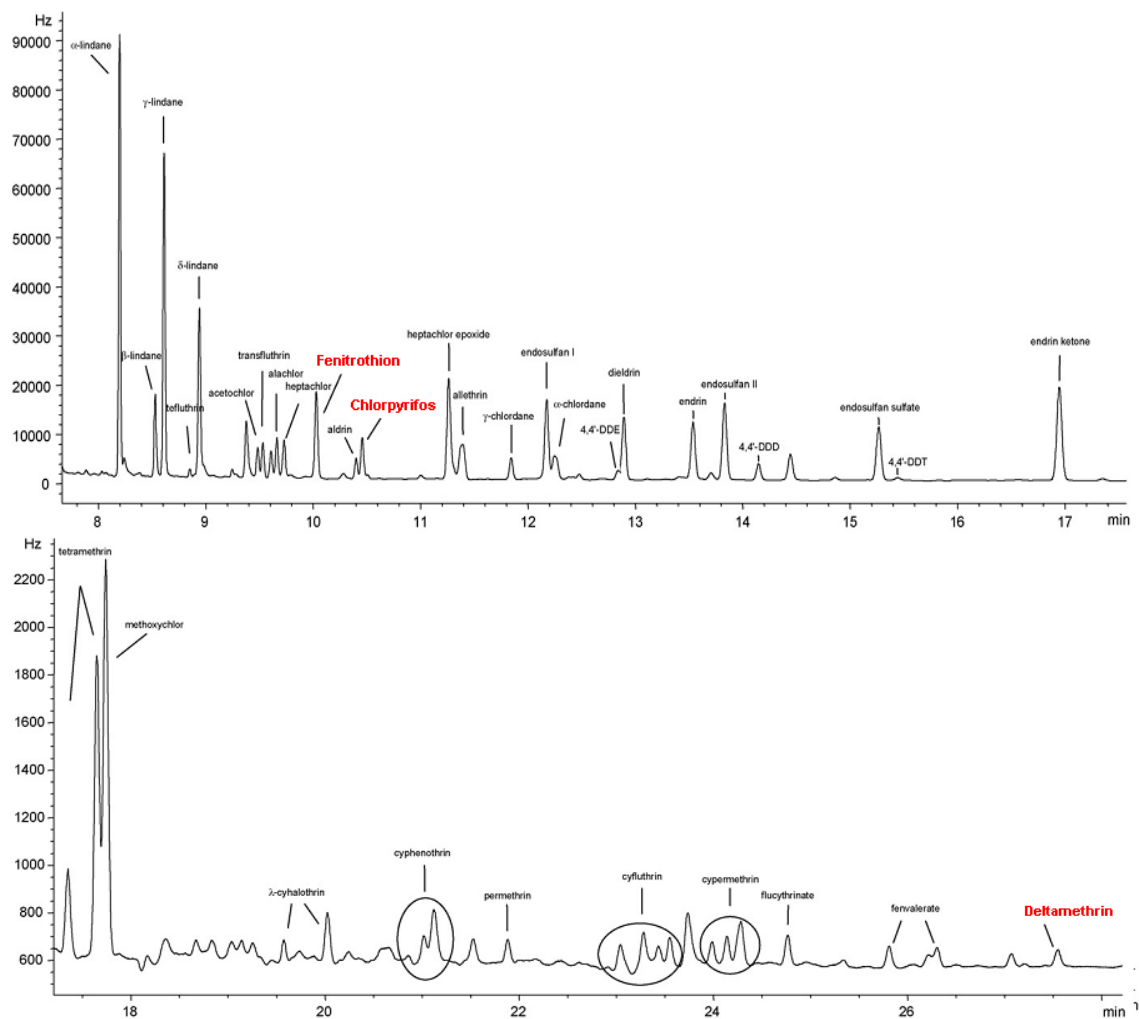


Fig. 28. Cromatograma obtenido por un análisis DI-SPME/GC- $\mu$ ECD[33].

A continuación se expone una metodología propuesta para determinación de los plaguicidas descritos a partir de SPE como metodología para la preparación de muestras y GC/MS como técnica instrumental para la determinación cualitativa y cuantitativa de los mismos.

## 5.2 METODOLOGÍA 2: SPE-GC/MS

Esta metodología fue desarrollada por los autores del presente trabajo, la cual se fundamenta en la SPE como técnica preparativa para la GC/MS como técnica analítica de las muestras de leche cruda que se necesiten analizar. De la misma forma que la anterior, se plantea el análisis de los 5 plaguicidas descritos bajo los mismos criterios de selección.

### 5.2.1 Preparación de muestras

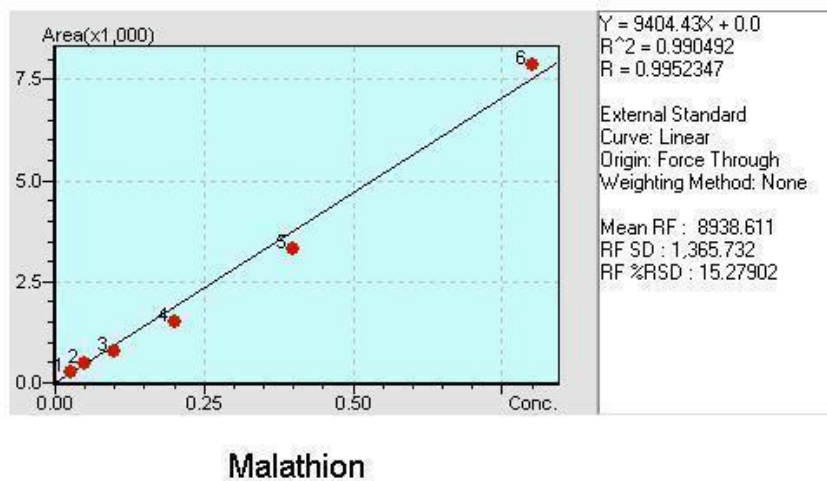
El procedimiento a seguir para la extracción de los plaguicidas de interés se describe a continuación:

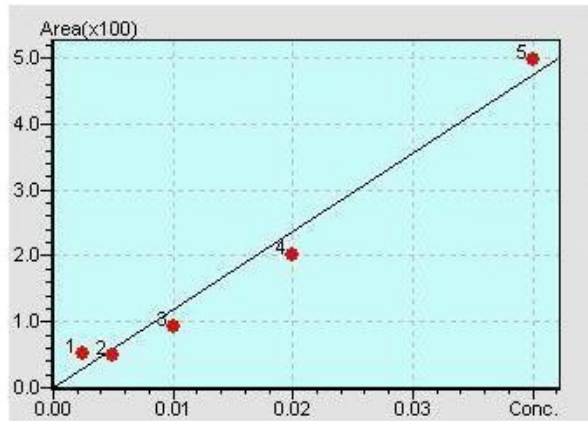
- Se toman 25ml de leche cruda y se mezclan con una solución de 50ml Acetonitrilo/5g de NaCl.
- La mezcla se coloca en agitación magnética por 20 minutos.
- Posteriormente se centrifugan por 20 minutos a 4200 RPM.
- Luego de la centrifugación la fase orgánica se hace pasar por el cartucho LC-18 y se recoge sobre sulfato de sodio Anhidro.
- De este solución filtrada se toman 5 ml y se aforan en agua hasta 50ml.
- Ahora los 50ml de solución se hacen pasar por otro cartucho LC-18 para atrapar los plaguicidas.
- Los plaguicidas se eluyen con una mezcla Hexano-Acetona 9:1 y Acetona-Tolueno 75:25. Posteriormente el eluato se concentra por rotaevaporación y se lleva a un vial en un volumen de 1ml para ser analizado por GC/MS.

### 5.2.2 Análisis instrumental

Para el análisis de los 5 plaguicidas descritos se deben analizar en un equipo GC/MS, se deben configurar el modo de inyección splitless, seguido de unas rampas de calentamiento de este modo: 50°C por 1 minuto. 25°C/min hasta 125°C, luego 10°C/min hasta 320 °C y por ultimo 320°C dos minutos. El equipo estaba conformado por una columnaRtx-5Sil-MS. (longitud 30m, diámetro 0.25mm y recubrimiento Interno 0.25 µm)

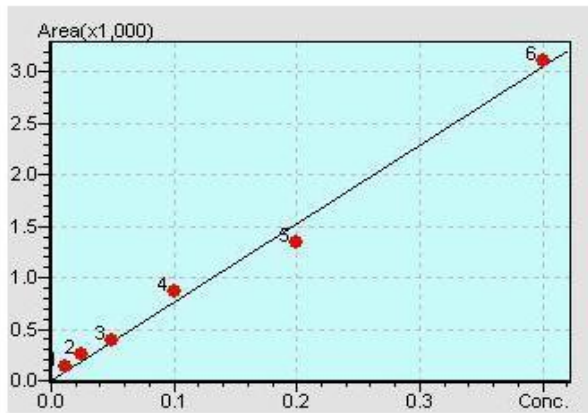
En estas condiciones se desarrolló un análisis en el laboratorio de calidad de productos naturales de la universidad tecnológica de Pereira para construir las curvas de calibración de los plaguicidas descritos, las cuales se exponen a continuación.





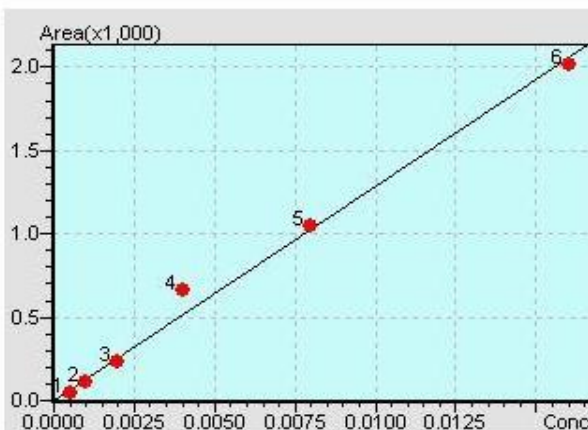
$Y = 11859.82X + 0.0$   
 $R^2 = 0.9801095$   
 $R = 0.9900048$   
 External Standard  
 Curve: Linear  
 Origin: Force Through  
 Weighting Method: None  
 Mean RF : 12497.5  
 RF SD : 4,910.817  
 RF %RSD : 39.29439

Fenitrothion



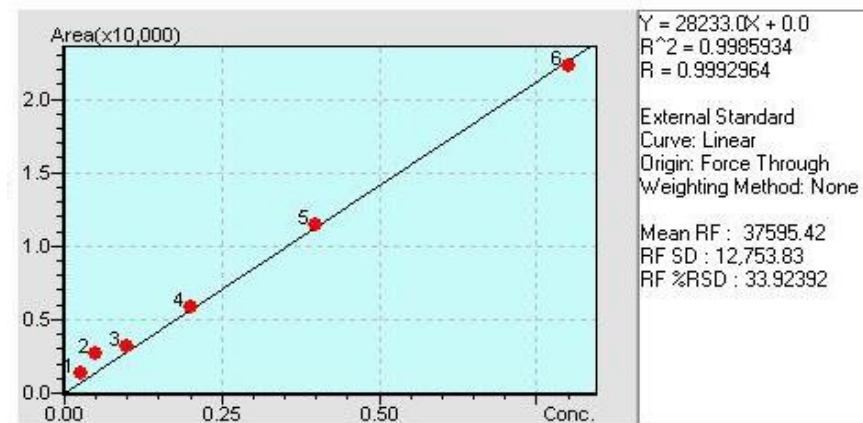
$Y = 7632.597X + 0.0$   
 $R^2 = 0.9915006$   
 $R = 0.9957412$   
 External Standard  
 Curve: Linear  
 Origin: Force Through  
 Weighting Method: None  
 Mean RF : 8736.389  
 RF SD : 1,745.960  
 RF %RSD : 19.98492

Chlorpyrifos



$Y = 128586.1X + 0.0$   
 $R^2 = 0.9923677$   
 $R = 0.9961765$   
 External Standard  
 Curve: Linear  
 Origin: Force Through  
 Weighting Method: None  
 Mean RF : 123427.1  
 RF SD : 23,575.75  
 RF %RSD : 19.10095

Fipronil



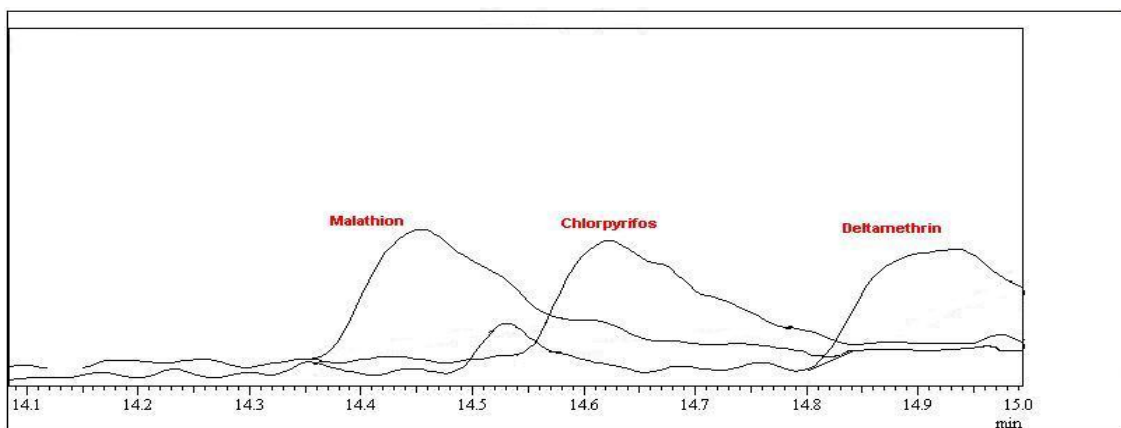
### Deltametrin

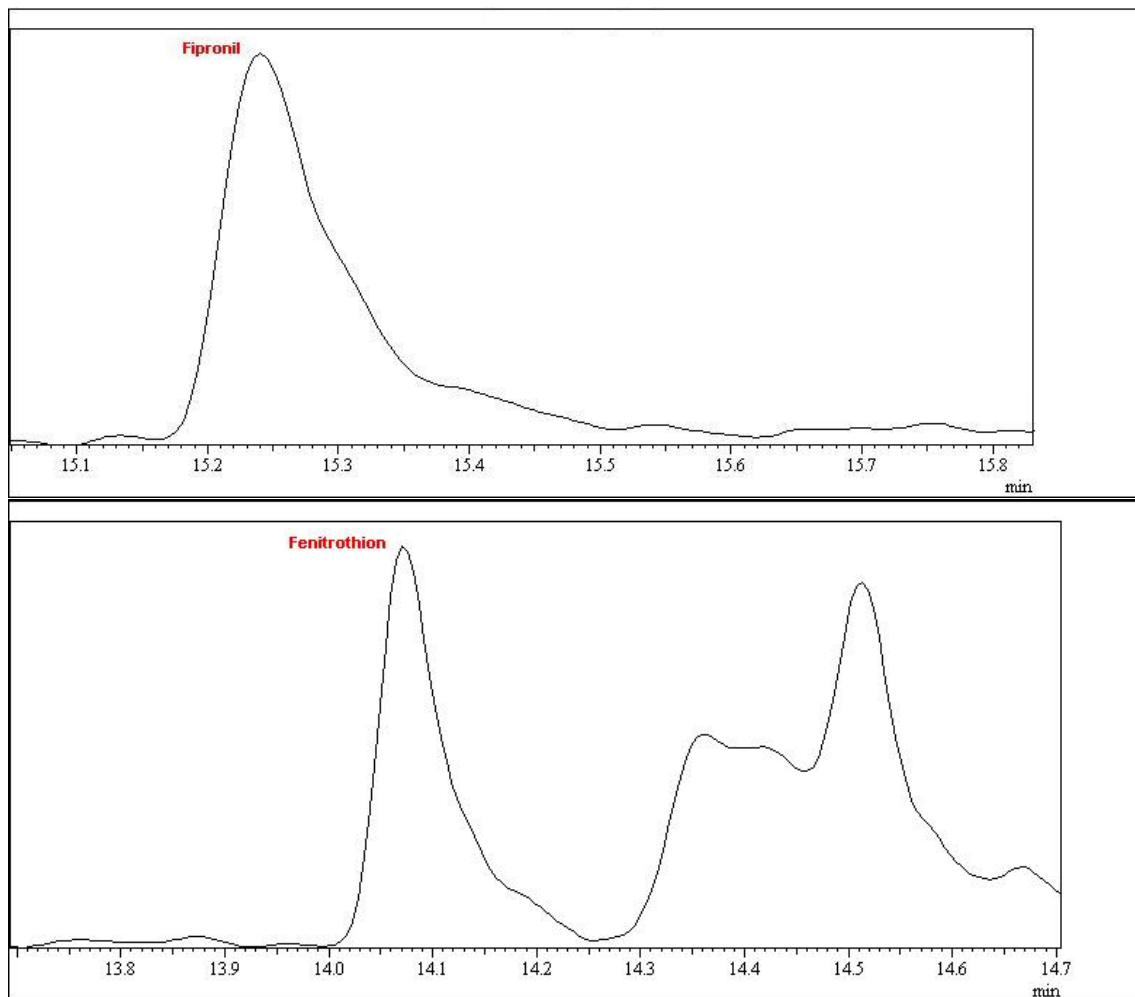
Fig. 29. Curvas de calibración de Malathion, Fenitrothion, Chlorpyrifos, Fipronil y Deltametrin.

En la siguiente tabla se exponen las concentraciones de los plaguicidas analizados en cada nivel.

Concentraciones de Plaguicidas en las curvas de Calibración (ppm)						
	1	2	3	4	5	6
<b>Malathion</b>	0.025	0.05	0.1	0.2	0.4	0.8
<b>Fenitrothion</b>	0.0025	0.005	0.01	0.02	0.04	0.08
<b>Clorpyrifos</b>	0.012	0.025	0.05	0.1	0.2	0.4
<b>Fipronil</b>	0.0005	0.001	0.002	0.004	0.008	0.016
<b>Deltametrin</b>	0.025	0.05	0.1	0.2	0.4	0.8

En estas curvas el coeficiente de correlación indica que la relación de los datos graficados es lineal lo que implica que son adecuadas para las determinaciones de porcentaje de recuperación necesarias para definir la técnica como reproducible o no, además de los parámetros estadísticos necesarios. A continuación se exponen los cromatogramas obtenidos en este mismo análisis.





**Fig 30. Cromatogramas de Malathion, Fenitrothion, Chlorpyrifos, Fipronil y Deltametrin.**

Referenciando los tiempos de retención de cada plaguicida se facilita la determinación de a cual corresponde cada espectro de masas que resulta en el análisis por medio del espectrómetro de masas. En el anexo 5, se exponen los espectros de masas típicos para estos plaguicidas.

Los métodos descritos se plantean como insumos técnicos para el desarrollo práctico de metodologías que permitan analizar plaguicidas en muestras de leche de forma eficiente, sensible y reproducible. Ambos métodos cuentan con criterios de merito suficiente para usados para tal objeto.

## 6. CONCLUSIONES

1. Se documentó la información necesaria y concerniente a las técnicas más empleadas y efectivas en la preparación de muestras para el análisis de plaguicidas en leche cruda de ganado bovino, las cuales son la extracción líquido-líquido (LLE), extracción en fase sólida (SPE) y la microextracción en fase sólida (SPME), con porcentajes de recuperación de analito entre 80 y 115% para la LLE, 90 y 110% para la SPE, 92 y 115% para la SPME, así como reproducibilidades con coeficientes de varianza inferiores a 5% para todos los casos expuestos.
2. Se encontró que las tendencias en el análisis instrumental de plaguicidas, se centran en la cromatografía de gases (GC) y la cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), que ofrecen los mejores resultados al ser acopladas a la espectrometría de masas (GC-MS, HPLC-MS) como sistema de detección, cualificación y cuantificación.
3. Las Técnicas GC MS y HPLC MS, presentan figuras de mérito fáciles de calcular y con resultados coherentes con lo exigido en las buenas prácticas de laboratorio, con  $C_v \leq 5\%$  y  $r^2$  promedio de 0,996 para la GC-MS y para la HPLC-MS un  $r^2$  de 0,999 asegurando la disminución de la incertidumbre en el análisis experimental que permiten obtener resultados verdaderos, comparables con la legislación vigente para los análisis de plaguicida en muestras de leche.
4. Los métodos de control de plaga alternativos al uso de plaguicidas más usados se fundamentan en la diversificación de la biota en las áreas de pastoreo, que reduzcan los ataques de plagas a los monocultivos de pasto, así como el uso de organismos enemigos naturales de las plagas comunes en el pasto y el uso de plaguicidas de origen microbiológico.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

1. *Ministerio de Protección Social*. Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos. Decreto 616 de 2003.
2. ARANCETA, J.; SERRA, LL.2004.*Leche, lácteos y salud*. Editorial Médica Panamericana. Pág.19-22.
3. MARTÍNEZ. C. H.2005.*Agroindustria y competitividad*. Observatorio de Agrocadenas Colombia. 2008. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural.
4. *Fondo para el financiamiento del sector agropecuario*. GANADERÍA. Sistema de Información Sectoral. Pág 4-5.
5. SUAREZ, R.; BAZZANI, A.2010. *Coyuntura de la leche en Colombia*.Asociación Nacional de Productores de Leche – Área de Estudios Económicos. Pág. 1-2.
6. HOLMANN F; RIVAS L; CARULLA J; RIVERA B; GIRALDO L.A; GUZMÁN S; MARTÍNEZ M; MEDINA A.2006.*Producción de leche y su relación con los mercados: caso Colombiano*.Centro Internacional de Agricultura Tropical. X Seminario de Pastos y Forrajes. Pág 150.
7. *Proexport Colombia; Fedegan*. 2010. *Sector cárnico en Colombia*. Pág 4-5. Enero de.
8. RESTREPO J. C. 2010.*Una política integral de tierras para Colombia*.Ministerio de Agricultura y desarrollo rural.Pág. 9.
9. MURGUEITIO, E; CALLE, Z.2003. *Diversidad biológica en sistemas de ganadería bovina en Colombia*. “Agroforestería para la Producción Agroindustrial en Latinoamérica”. Fundación Cipav. Pág. 20-50
10. BONILLA, A. J. P.; PEINADO, S. J. E; URDANETA, R. M. A; CARRASCAL, G. E. 2000. *Reducción del escurrimiento de pesticidas en el mar caribe*.Ministerio del Medio Ambiente-Colombia. Proyecto PNUMA/UCR/CAR Global EnvironmentalFacility (Informe Final). Pág. 26.
11. *Ministerio de Ambiente Vivienda y Desarrollo Territorial - Colombia*. *Dirección de Ecosistema*. 2003.*Legislación ambiental relacionada con la contaminación del recurso del suelo con Colombia*. Pág. 13.
12. RAMÍREZ, J.A; LACASAÑA, M.2001. *Plaguicidas: clasificación, uso, toxicología y medición de la exposición*. Arch. Prev. Riesgos Labor. Pág. 67-75.
13. BARRIUSO E.2000. *Contaminaciones con pesticidas utilizados en agricultura: El comportamiento de los pesticidas en el suelo como base de la interpretación y la previsión de los riesgos de contaminación*. XVII Congreso Argentino de la Ciencia del Suelo. Mar del Plata (Argentina). Pág. 11-14.
14. ISERN, M. D.2002. *La química de los plaguicidas y su metodología analítica*.Colección de Cuadernillos Educativos UCEL. Universidad del Centro Educativo Latinoamericano, Rosario, Argentina. Pág. 8-12.
15. MOTA, D.; SANDOVAL, R.; COTTON M; HINES, R.2003. *Manual básico de entrenamiento para aplicadores de plaguicidas*. Michigan StateUniversity. Pág. 69.
16. NIVIA, E. 2007.*Impactos sociales y ambientales del uso de plaguicidas en Colombia*.Seminario Internacional: Agroquímicos, Transgénicos y sus Alternativas en América Latina y el Caribe. RAP-AL, Red de Acción en Plaguicidas y sus Alternativas en América Latina.
17. GARCÍA, I; DORRONSORO, C. *Contaminación del suelo*. Departamento de Edafología y Química Agrícola. Universidad de Granada -España

18. ALEXANDRATOS N. 2010. *Agricultura mundial hacia el año 2010*. Estudio de la FAO. Pág. 212-213.
19. PÉREZ, D; IANNACONE, J. 2006. *Efectividad de extractos botánicos de diez plantas sobre la mortalidad y repelencia de larvas de RHYNCHOPHORUS PALMARUM L. insecto plaga del PIJUAYO BACTRIS GASIPAES KUNTH en la amazonía del Perú*. Revista Agricultura Técnica.
20. CORREA, N. Y. M.; MOSQUERA M. O. M.; NIÑO, O. J. 2008. *Manual de prácticas de laboratorio de química orgánica I*. Publicaciones Universidad Tecnológica de Pereira.
21. DÍAS F, N.K. 2010. *Generación de datos experimentales a nivel de laboratorio que permitan caracterizar el sistema ternario metanol-biodiesel-agua en equilibrio líquido-líquido a temperatura ambiente y 640 mm Hg*. Universidad de San Carlos, Guatemala; Facultad de Ingeniería, Escuela de Ingeniería Química. Pág 9-11.
22. ROMERO, B. E.; MEZA, N. H.; POVEDA, C. V. *Metodología para la determinación de residuos de plaguicidas organofosforados en leche de consumo nacional mediante cromatografía de gases y extracción en fase sólida*. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Revista Tecnología en Marcha. Vol 8. No.2. Pág. 103-106.
23. MORALES V, C; RODRÍGUEZ O, N; RESTREPO V, L.F; LÓPEZ C, C. 2010. *Relación entre residuos de clorpirifos en leche y sangre de vacas Holstein y niveles séricos de estradiol y tiroxina*. Revista Electrónica de Veterinaria, Vol 11, No. 1. Pág 6-9.
24. OLGUÍN, P. L. P.; RODRÍGUEZ, M. H. M. 2004. *Cromatografía de gases*. Métodos en Biotecnología. Instituto de Biotecnología. Universidad Autónoma de México.
25. ŻWIR-FERENC, A.; BIZIUK, M. 2006. *Solid phase extraction technique trends, opportunities and applications*. Polish Journal of Environmental Studies. Vol 5. No.5.
26. VEGA, M. D.; SOSA, F. Z.; SANTANA, R. J. 2006. *Sample extraction method combining micellar extraction-SPME and HPLC for the determination of organochlorine pesticides in agricultural soils*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 54. Pág. 7747-7752.
27. ZIEF, M.; KISSER, R. *Solid phase extraction for sample*. J.T. Baker Manual. Pág. 7-15.
28. XIE, W.; HAN, C.; QIAN, Y.; DING, H.; CHEN, X.; XI, J. 2011. *Determination of neonicotinoid pesticides residues in agricultural samples by solid-phase extraction combined with liquid chromatography TANDEM mass spectrometry*. Journal Of Chromatography A. 1218. Pág. 4426-4433.
29. BOGIALLI, S.; CURINI, R. DI CORCIA, A.; LAGANÀ, A.; STABILE, A.; STURCHIO, E. 2006. *Development of a multiresiduo method for analyzing herbicide and fungicide residues in bovine milk based on solid-phase extraction and liquid chromatography-TANDEM mass spectrometry*. Journal of Chromatography A. 1102. Pág 1-6.
30. PAWLISZYN, J.; PAWLISZYN, B.; PAWLISZYN, M. 1997. *Solid phase microextraction (SPME)*. The Chemical Educator. Vol. 2. No. 4. Springer Verlag, New York.
31. VAS, G.; VÉKEY, K. 2004. *Solid-phase microextraction: A powerful sample preparation tool prior to mass spectrometric analysis*. Journal of Mass Spectrometry. Pág 233-254.
32. SHIREY, R. E.; MINDRUP, R. F. 1999. *SPME – Adsorption vs Absorption*. Selection Fiber Guide. Supelco. Sigma-Aldrich.



33. FERNANDEZ. M. A.; LLOMPART, M.; LAMAS, J. P.; LORES, M.; GARCIA-JARES, C.; CELA, R.; DAGNAC, T. 2008. *Development of a Solid-phase microextraction gas chromatography with microelectron-capture detection method for a multiresiduo analysis of pesticides in bovine milk*. *Analytica Chimica Acta*. 617. Pág. 37-50.
34. RODRIGUES, F DE M.; MESQUITA, P. R.R.; DE OLIVEIRA, L. S.; DE OLIVEIRA, F. S.; MENEZES, F. A.; PEREIRA, A DE P. P.; DE ANDRADE, J. B. 2011. *Development of a headspace solid-phase microextraction/gas chromatography-mass spectrometry method for determination of organophosphorus pesticide residue in cow milk*. *Microchemical Journal*. 98. Pág. 56-61.
35. CASTRO E, F.2010. *Técnicas cromatográficas – Apuntes de clase*. Análisis Instrumental II. Universidad Tecnológica de Pereira.
36. OLGUÍN, P. L. P.; RODRÍGUEZ, M. H. M.2004. *Cromatografía de gases. Métodos en Biotecnología*. Instituto de Biotecnología. Universidad Autónoma de México.
37. SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. *Spectrometric identification of organic compounds*. Sixth Edition. Pág. 1-5.
38. HOFFMAN, E AND STROOBANT V. 2007. *Mass spectrometry; Principles and applications*. Editorial Wiley. Tercera edición. ISBN: 978-0-470-03310-4. Pág. 1-34.
39. WADE L.G.2007. *Química orgánica*. Editorial Prentice Hall. Quinta Edición. Pág. 521.
40. DAGNAC, T; GARCÍA-CH, M; PULLEIRO P; GARCÍA-J, C; LLOMPART M.2009. *Dispersive solid phase microextraction followed by liquid chromatography-TANDEM mass spectrometry for the multiresidue analysis of pesticides in raw bovine milk*. *Journal Of Chromatography A*. 1216. Pág. 3702-3709.
41. SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; DOLAN, W. J. 2010. *Introduction to modern liquid chromatography*. Wiley-Intercience Publication. Tercera Edición. ISBN 978-0-470-16754-0.
42. KAZAKEVICH, Y.; LOBRUTTO, R. 2007. *HPLC for pharmaceutical scientists*. Wiley-Intercience Publication. ISBN-10: 0-471-68162-8.
43. QUATTROCCHI, O. A.; ABELAIRA, DE A. S.; LABA, R. F.1992. *Introducción a la HPLC – Introducción y práctica*. Argentina.
44. ASHNAGAR, A. GHARIB NASERI, N. CHERAGHI FARMAD, M. 2009. *Determination of organochlorine pesticide residues in cow's milk marketed Ahwas city in Iran*. *International Journal of PharmTech Research*. ISSN: 0974-4304. Vol. 1. No. 2. Pág. 247-251.
45. HONGZHE, T. 2011. *Determination of chloramphenicol, enrofloxacin and 29 pesticides residues in bovine milk by liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. *Chemosphere* 83. Pág. 349-355.
46. COY, G.A. 1999. *Protocolo. Estandarización de métodos analíticos*, ed. I.D.E.A.M.P.F Ambiental, Bogotá
47. SIERRA. A. PÉREZ. Q. D. GÓMEZ. R. S. MORANTE. Z. S.2010. *Análisis Instrumental*. Netbiblo ISBN 978-84-9475-377-6. Pág 5-9
48. Instituto Colombiano Agropecuario – ICA. Registro anual de venta de plaguicidas a nivel nacional. 2010.
49. FILHO, A. M. DOS SANTOS, F. N. PEREIRA, P. A. DE P.2010. *Development, validation and application of a method bases on DI-SPME and GC-MS for determination of pesticides of different chemical groups in surface and groundwater samples*. *Microchemical Journal* 96. Pág. 139-145.

## 5. ANEXOS

**Anexo 1.** Tabla de fuerza eluotropica de solventes típicos para la extracción en fase solida (SPE).

**Tabla 1.**  
**Fuerza Eluotropica del Solvente / Polaridad [27]**

Solvente	$\epsilon^{\circ 1}$	$p^{\circ 2}$
Acido Acético Glaciar	> 0,73	6,2
Agua	> 0,73	10,2
Metanol	0,73	6,6
2-Propanol	0,63	4,3
20% Metanol, 80% Cloruro de Metileno	0,63	----
20% Metanol. 80% Dietileter	0,65	----
40% Metanol, 60% Acetonitrilo	0,67	----
Piridina	0,55	5,30
Alcohol Isobutilico	0,54	3,00
Acetonitrilo	0,50	6,20
Acetato de Etilo	0,45	4,30
Acetona	0,43	5,40
Metiletil Cetona	0,39	4,50
Tetrahidrofurano	0,35	4,20
Cloruro de Metileno	0,32	3,40
Cloroformo	0,31	4,40
Terbutilmetil Éter	0,29	----
Éter anhídrido	0,29	2,90
Benceno	0,27	3,00
Tolueno	0,22	2,40
Tetracloruro de Carbono	0,14	1,60
Ciclohexano	0,03	0,00
Pentano	0,00	0,00
n-Hexano	0,00	0,06
n-Heptano	0,00	0,20

<sup>1</sup> Determinado como la fuerza de elución de un solvente en la silica.

<sup>2</sup> Índice de polaridad. Medida de la habilidad del solvente de actuar como donador de protón, aceptor de protón o dipolo.

**Anexo 2.** Tabla de características operacionales de materiales de recubrimiento para microextracción en fase solida (SPME; *Pagina siguiente*).

**Tabla 2.**  
**Materiales de recubrimiento como fase estacionaria para SPME [31]**

Recubrimiento de la fibra (Fase estacionaria)	Espesor de la fase estacionaria (µm)	Polaridad	Método de unión del recubrimiento	Máxima temperatura de operación (°C)	Técnica de análisis	Componentes a ser analizados
PDMS <sup>1</sup>	100	No polar	Non-bonded	280	GC/HPLC	Volátiles
PDMS	30	No polar	Non-bonded	280	GC/HPLC	No polares semivolátiles
PDMS	7	No polar	Bonded	340	GC/HPLC	Medianamente polares semivolátiles
PDMS-DVB <sup>2</sup>	65	Bipolar	Cross-linking	270	GC	Polares volátiles
PDMS-DVB	60	Bipolar	Cross-linking	270	HPLC	Uso general
PDMS-DVB <sup>3</sup>	65	Bipolar	Cross-linking	270	GC	Polares volátiles
PA <sup>4</sup>	85	Polar	Cross-linking	320	GC/HPLC	Polares semivolátiles (fenoles)
CAR <sup>5</sup> - PDMS	75	Bipolar	Cross-linking	320	GC	Gases y volátiles
CAR - PDMS	85	Bipolar	Cross-linking	320	GC	Gases y volátiles
CW <sup>6</sup> - DVB	65	Polar	Cross-linking	265	GC	Analitos polares (alcoholes)
CW - DVB	70	Polar	Cross-linking	265	GC	Analitos polares (alcoholes)
CTR <sup>7</sup>	50	Polar	Cross-linking	240	HPLC	Surfactantes
DVB-PDMS-Carboxen	50/30	Bipolar	Cross-linking	270	GC	Compuestos aromatizantes y saborizantes

<sup>1</sup> Polidimetilsiloxano (PDMS)

<sup>2</sup> Divinilbenceno (Divinylbenzene, DVB)

<sup>3</sup> Conocido como PDMS-DVB StableFlex, es una fibra de 2 cm de longitud.

<sup>4</sup> Poliacrilato (Polyacrylate, PA)

<sup>5</sup> Carboxeno (Carboxen, CAR)<sup>6</sup> Carbowax (CW)

<sup>7</sup> Resina templada de Carbowax (Carbowax Template Resine CTR)

**Anexo 3.** Descripción de las técnicas cromatográficas, así como de sus características operacionales.

**Tabla 3.**  
**Clasificación de las técnicas cromatográficas [35]**

<b>Nombre del proceso</b>	<b>Tipo de fases</b>	<b>Fase Estacionaria</b>	<b>Fase Móvil.</b>
Cromatografía de absorción	Sólido-Líquido	Absorbente Sólido	Solvente o Mezcla de Solventes
Cromatografía en capa delgada	Sólido-Líquido	Polvo fino sostenido sobre placa de vidrio o metal	Solvente o Mezcla de Solventes
Cromatografía de intercambio iónico	Sólido-Líquido	Resina de Intercambio iónico	Solución
Cromatografía de Partición	líquido-líquido	Líquido absorbido en un sólido poroso	Solventes Inmiscibles
Cromatografía en Papel	líquido-líquido	Matriz de papel	Disolvente Inmiscible
Cromatografía de Gel	líquido-líquido	Líquido sostenido en los intersticios de un polímero Sólido.	Solvente
Cromatografía gas sólido	Sólido-Gas	Absorbente Sólido	Gas Inerte
Cromatografía gas líquido	Líquido-Gas	Disolvente sobre matriz sólida	Gas Inerte
Cromatografía de Fluidos supercríticos.	Líquido-Fluido supercrítico	Líquido	Fluido supercrítico

**Anexo 4.** Base de datos de los plaguicidas usados para el control de plagas para pastos en Colombia, registrado por el Instituto Colombiano Agropecuario (pagina siguiente).

**TABLA 4**  
**Registro de plaguicidas empleados para el control de plagas en pastos en**  
**Colombia [48]**

INGREDIENTE ACTIVO	OBJETO DE CONTROL	CAT TOXIC	NOMBRE CIENTIFICO (PLAGA, ENFERMEDAD Ó ARVENSE )	NOMBRE COMUN(PLAGA, ENFERMEDAD Ó ARVENSE )	DOSIS
Carbaryl	INSECTICIDA	III	Spodoptera frugiperda	Gusano cogollero	0,6 - 1,2 kg/ha
Carbaryl	INSECTICIDA	III	Mocis sp	Falso gusano medidor	0,6 - 1,2 kg/ha
Clorpirifos	INSECTICIDA	III	Nylanderia fulva	Hormiga loca	3,5 l/ha
Clorpirifos	INSECTICIDA	III	Aeneolamia sp	Mión ó Salivita	1,0 l/ha
Clorpirifos	INSECTICIDA	III	Collaria columbiensis	Chinche de los pastos	0,25 - 0,5 l/ha
Mancozeb	FUNGICIDA	III	Puccinia spp	Roya negra	2,5 - 3,0 kg/ha
Deltametrina	INSECTICIDA PIRETROIDE	III	Collaria sp	Chinche de los pastos	0,4 - 0,5 l/ha
M.S.M.A.	HERBICIDA	II	Digitaria sanguinalis	Guarda rocío	3,5 - 4,5 l/ha
M.S.M.A.	HERBICIDA	II	Echinochloa colonum	Liendre puerco	3,5 - 4,5 l/ha
M.S.M.A.	HERBICIDA	II	Eleusine indica	Pata de gallina	3,5 - 4,5 l/ha
M.S.M.A.	HERBICIDA	II	Avena fatua	Avena silvestre	3,5 - 4,5 l/ha
M.S.M.A.	HERBICIDA	II	Paspalum dilatatum	Pasto dallis	3,5 - 4,5 l/ha
M.S.M.A.	HERBICIDA	II	Panicum purpuracens	Pasto pará	3,5 - 4,5 l/ha
M.S.M.A.	HERBICIDA	II	Panicum maximum	Pasto guinea	3,5 - 4,5 l/ha
M.S.M.A.	HERBICIDA	II	Leptochloa filiformis	Pajamona	3,5 - 4,5 l/ha
M.S.M.A.	HERBICIDA	II	Sorghum halepense	Pasto johnson	3,5 - 4,5 l/ha
M.S.M.A.	HERBICIDA	II	Setaria sp	Rabo de zorra	3,5 - 4,5 l/ha
M.S.M.A.	HERBICIDA	II	Paspalum paniculatum	Pasto cabezón	3,5 - 4,5 l/ha
M.S.M.A.	HERBICIDA	II	Cyperus rotundus	Coquito	3,5 - 4,5 l/ha
M.S.M.A.	HERBICIDA	II	Cyperus ferax	Cortadera	3,5 - 4,5 l/ha
M.S.M.A.	HERBICIDA	II	Portulaca oleracea	Verdolaga	3,5 - 4,5 l/ha
M.S.M.A.	HERBICIDA	II	Kallstroemia maxima	Atarraya	3,5 - 4,5 l/ha
M.S.M.A.	HERBICIDA	II	Amaranthus sp	Bledo	3,5 - 4,5 l/ha
M.S.M.A.	HERBICIDA	II	Physalis sp	Uchuva	3,5 - 4,5 l/ha
M.S.M.A.	HERBICIDA	II	Desmodium sp	Cadillo pegajoso	3,5 - 4,5 l/ha
M.S.M.A.	HERBICIDA	II	Xanthium occidentale	Falso cadillo	3,5 - 4,5 l/ha
M.S.M.A.	HERBICIDA	II	Boerhaavia sp	Lagaña	3,5 - 4,5 l/ha
Malathion	INSECTICIDA	III	Antonina graminis	Cochinilla de los pastos	1,5 - 2,0 l/ha

Malathion	INSECTICIDA	III	Aeneolamia spp	Mión de los pastos	1,5 - 2,0 l/ha
Malathion	INSECTICIDA	III	Blissus sp	Chinche de las raíces	1,5 - 2,0 l/ha
Malathion	INSECTICIDA	III	Arctia sp	Gusano Santamaría	1,5 - 2,0 l/ha
Malathion	INSECTICIDA	III	Collaria columbiensis	Chinche de los pastos	1,5 - 2,0 l/ha
Malathion	INSECTICIDA	III	Rhammatocerus spp	Langosta	1,5 - 2,0 l/ha
Fenitrotion	INSECTICIDA	III	Rhammatocerus schistocercoides	Grillo de los pastos	1,0 - 2,0 cm <sup>3</sup> / l de agua
Fenitrotion	INSECTICIDA	III	Collaria sp	Chinche de los pastos	1,0 - 2,0 cm <sup>3</sup> / l de agua
Metanoarsenato monosodico	HERBICIDA	III	Paspalum paniculatum	Pasto cabezón	3,5 l/ha/ 400 l de agua
Metanoarsenato monosodico	HERBICIDA	III	Echinochloa colonum	Liendre puerco	3,5 l/ha/ 400 l de agua
Metanoarsenato monosodico	HERBICIDA	III	Digitaria sanguinalis	Guarda rocío	3,5 l/ha/ 400 l de agua
Metanoarsenato monosodico	HERBICIDA	III	Eleusine indica	Pata de gallina	3,5 l/ha/ 400 l de agua
Metanoarsenato monosodico	HERBICIDA	III	Setaria sp	Rabo de zorra	3,5 l/ha/ 400 l de agua
Metanoarsenato monosodico	HERBICIDA	III	Leptochloa filiformis	Pajamona	3,5 l/ha/ 400 l de agua
Metanoarsenato monosodico	HERBICIDA	III	Sorghum halepense	Pasto Johnson	3,5 l/ha/ 400 l de agua
Metanoarsenato monosodico	HERBICIDA	III	Brachiaria mutica	Pasto pará	3,5 l/ha/ 400 l de agua
Metanoarsenato monosodico	HERBICIDA	III	Paspalum dilatatum	Pasto dallis	3,5 l/ha/ 400 l de agua
Metanoarsenato monosodico	HERBICIDA	III	Cyperus rotundus	Coquito	3,5 l/ha/ 400 l de agua
Metanoarsenato monosodico	HERBICIDA	III	Cyperus ferax	Cortadera	3,5 l/ha/ 400 l de agua
Metanoarsenato monosodico	HERBICIDA	III	Amaranthus sp	Bledo	3,5 l/ha/ 400 l de agua
Metanoarsenato monosodico	HERBICIDA	III	Portulaca oleracea	Verdolaga	3,5 l/ha/ 400 l de agua
Metanoarsenato monosodico	HERBICIDA	III	Kallstroemia maxima	Atarraya	3,5 l/ha/ 400 l de agua
Metanoarsenato monosodico	HERBICIDA	III	Physalis sp	Uchuva	3,5 l/ha/ 400 l de agua
Metanoarsenato monosodico	HERBICIDA	III	Boerhaavia sp	Lagaña	3,5 l/ha/ 400 l de agua
Metanoarsenato monosodico	HERBICIDA	III	Xanthium occidentale	Falso cadillo	3,5 l/ha/ 400 l de agua
Lambda cihalotrina	INSECTICIDA	III	Collaria columbiensis	Chinche de los pastos	0,5 - 0,75 cm <sup>3</sup> / l de

					agua
Mancozeb	FUNGICIDA	III	Puccinia spp	Royas	2,0 - 2,5 kg/ha
Clorpirifos	INSECTICIDA	III	Nylanderia fulva	Hormiga loca	3,5 l/ha
Clorpirifos	INSECTICIDA	III	Aeneolamia sp	Mión ó Salivita	1,0 l/ha
Clorpirifos	INSECTICIDA	III	Collaria columbiensis	Chinche de los pastos	0,25 - 0,5 l/ha
Clorpirifos	INSECTICIDA	III	Pennisetum clandestinum	Pasto kikuyo	0,25 - 0,5 l/ha
Carbaryl	INSECTICIDA	III	Paratrechina fulva	Hormiga loca	12 kg/ha
Betaciflutrin	INSECTICIDA	III	Collaria scenica	El chinche de los pastos	300 cm <sup>3</sup> /ha
2,4-D Amina	HERBICIDA	II	Amaranthus spinosus	Bledo	1,0 - 2,0 %
2,4-D Amina	HERBICIDA	II	Ipomoea heredifolia	Batatilla	1,0 - 2,0 %
2,4-D Amina	HERBICIDA	II	Rumex crispus	Lengua de vaca	1,0 - 2,0 %
2,4-D Amina	HERBICIDA	II	Verbena litoralis	Verbena	1,0 - 2,0 %
2,4-D Amina	HERBICIDA	II	Bidens pilosa	Masiquía	1,0 - 2,0 %
2,4-D Amina	HERBICIDA	II	Jussiaea linifolia	Palo de agua	1,0 - 2,0 %
2,4-D Amina	HERBICIDA	II	Chenopodium paniculatum	Cenizo	1,0 - 2,0 %
2,4-D Amina	HERBICIDA	II	Urtica urens	Ortiga	1,0 - 2,0 %
Etofenprox	INSECTICIDA	III	Collaria scenica	Chinche de los pastos	0,40 - 0,50 l/ha
Clorpirifos	INSECTICIDA	III	Collaria columbiensis	Chinche	1,0 l/ha
Clorpirifos	INSECTICIDA	III	Aeneolamia sp	Mion	1,0 l/ha
Glifosato	HERBICIDA	IV	Bidens pilosa	Masiquía	1,0 - 1,5 kg/ha
Glifosato	HERBICIDA	IV	Commelina diffusa	Siempreviva	1,0 - 1,5 kg/ha
Glifosato	HERBICIDA	IV	Echinochloa colonum	Liendre puerco	1,0 - 1,5 kg/ha
Glifosato	HERBICIDA	IV	Galinsoga ciliata	Guasca	1,0 - 1,5 kg/ha
Glifosato	HERBICIDA	IV	Cyperus diffusus	Cortadera	2,0 kg/ha
Glifosato	HERBICIDA	IV	Ipomoea spp	Batatilla	2,0 kg/ha
Glifosato	HERBICIDA	IV	Oryza sativa	Arroz rojo	2,0 kg/ha
Glifosato	HERBICIDA	IV	Cynodon dactylon	Pasto Argentina	2,0 - 3,0 kg/ha
Glifosato	HERBICIDA	IV	Cyperus rotundus	Coquito	2,0 - 3,0 kg/ha
Glifosato	HERBICIDA	IV	Paspalum conjugatum	Pasto horqueta	2,0 - 3,0 kg/ha
Glifosato	HERBICIDA	IV	Paspalum fasciculatum	Gramalote	2,0 - 3,0 kg/ha
Glifosato	HERBICIDA	IV	Paspalum virgatum	Maciega	2,0 - 3,0 kg/ha

Glifosato	HERBICIDA	IV	Paspalum paniculatum	Pajón	2,0 - 3,0 kg/ha
Glifosato	HERBICIDA	IV	Pennisetum clandestinum	Pasto kikuyo	2,0 - 3,0 kg/ha
Glifosato	HERBICIDA	IV	Cynodon dactylon	Pasto Argentina	1%
Glifosato	HERBICIDA	IV	Cyperus rotundus	Coquito	1%
Glifosato	HERBICIDA	IV	Paspalum conjugatum	Pasto horqueta	1%
Glifosato	HERBICIDA	IV	Paspalum fasciculatum	Gramalote	1%
Glifosato	HERBICIDA	IV	Paspalum virgatum	Maciega	1%
Glifosato	HERBICIDA	IV	Paspalum paniculatum	Pajón	1%
Glifosato	HERBICIDA	IV	Pennisetum clandestinum	Pasto kikuyo	1%
Glifosato	HERBICIDA	IV	Post emergencia de malezas	Plateo	3,0 l/ha
Imidacloprid	INSECTICIDA	III	Collaria scenica	Chinche de los pastos	150 ml/ha
Pyridafention	INSECTICIDA	III	Collaria columbiensis	Chinche de los pastos	1,5 L/ha
Fenitrothion	INSECTICIDA	II	Collaria columbiensis	Chinche	1,5 l/ha
Fipronil	INSECTICIDA	III	Collaria spp	Chinche de los pastos	30 - 60 g/ha
Glifosato	HERBICIDA	IV	Amaranthus dubius	Bledo	3,0 l/ha
Glifosato	HERBICIDA	IV	Bidens pilosa	Papunga	3,0 l/ha
Glifosato	HERBICIDA	IV	Boerhaavia erecta	Rodilla de pollo	3,0 l/ha
Glifosato	HERBICIDA	IV	Cenchrus brownii	Cadillo	3,0 l/ha
Glifosato	HERBICIDA	IV	Chloris sp	Falso rodes	3,0 l/ha
Glifosato	HERBICIDA	IV	Commelina diffusa	Suelda con suelda	3,0 l/ha
Glifosato	HERBICIDA	IV	Cynodon dactylon	Pasto Argentina	3,0 l/ha
Glifosato	HERBICIDA	IV	Cyperus iria	Limoncillo	3,0 l/ha
Glifosato	HERBICIDA	IV	Cyperus luzulae	Cortadera	3,0 l/ha
Glifosato	HERBICIDA	IV	Cyperus spp	Cortadera	3,0 l/ha
Glifosato	HERBICIDA	IV	Cyperus ferax	Cortadera	3,0 l/ha
Glifosato	HERBICIDA	IV	Desmodium sp	Pega pega	3,0 l/ha
Glifosato	HERBICIDA	IV	Desmodium tortuosum	Pega pega	3,0 l/ha
Glifosato	HERBICIDA	IV	Digitaria sanguinalis	Guarda rocío	3,0 l/ha
Glifosato	HERBICIDA	IV	Echinochloa colonum	Liendre puerco	3,0 l/ha
Glifosato	HERBICIDA	IV	Eclipta alba	Botoncillo	3,0 l/ha
Glifosato	HERBICIDA	IV	Eleusine indica	Pata de gallina	3,0 l/ha
Glifosato	HERBICIDA	IV	Emilia sonchifolia	Liberal	3,0 l/ha
Glifosato	HERBICIDA	IV	Euphorbia hirta	Lechosa	3,0 l/ha
Glifosato	HERBICIDA	IV	Eragrostis	Cola de zorro	3,0 l/ha



			glomerata		
Glifosato	HERBICIDA	IV	Fimbristylis annua	Barba de indio	3,0 l/ha
Glifosato	HERBICIDA	IV	Ipomoea batatas	Batatilla	3,0 l/ha
Glifosato	HERBICIDA	IV	Ipomoea spp	Batatilla	3,0 l/ha
Glifosato	HERBICIDA	IV	Ischaemum rugosum	Falsa caminadora	3,0 l/ha
Glifosato	HERBICIDA	IV	Leptochloa filiformis	Paja mona	3,0 l/ha
Glifosato	HERBICIDA	IV	Ludwigia linifolia	Palo de agua	3,0 l/ha
Glifosato	HERBICIDA	IV	Malva sp	Malva	3,0 l/ha
Glifosato	HERBICIDA	IV	Momordica charantia	Balsamina	3,0 l/ha
Glifosato	HERBICIDA	IV	Murdannia nudiflora	Piñita	3,0 l/ha
Glifosato	HERBICIDA	IV	Oryza sativa	Arroz rojo	3,0 l/ha
Glifosato	HERBICIDA	IV	Panicum laxum	Paja blanca	3,0 l/ha
Glifosato	HERBICIDA	IV	Paspalum sp	Pasto horqueta	3,0 l/ha
Glifosato	HERBICIDA	IV	Paspalum conjugatum	Pasto horquilla	3,0 l/ha
Glifosato	HERBICIDA	IV	Paspalum hydrophilum	Invasora ó Canutillo	3,0 l/ha
Glifosato	HERBICIDA	IV	Paspalum maximum	Pajón	3,0 l/ha
Glifosato	HERBICIDA	IV	Paspalum paniculatum	Pajón	3,0 l/ha
Glifosato	HERBICIDA	IV	Paspalum pilosum	Paja peluda	3,0 l/ha
Glifosato	HERBICIDA	IV	Pennisetum clandestinum	Kikuyo	3,0 l/ha
Glifosato	HERBICIDA	IV	Polygonum segetum	Gualola	3,0 l/ha
Glifosato	HERBICIDA	IV	Portulaca oleracea	Verdolaga	3,0 l/ha
Glifosato	HERBICIDA	IV	Rottboellia cochinchinensis	Caminadora	3,0 l/ha
Glifosato	HERBICIDA	IV	Rumex crispus	Lengua de vaca	3,0 l/ha
Glifosato	HERBICIDA	IV	Sida acuta	Escoba	3,0 l/ha
Glifosato	HERBICIDA	IV	Sida rhombifolia	Escoba	3,0 l/ha
Glifosato	HERBICIDA	IV	Sesbania exaltata	Sesbania	3,0 l/ha
Glifosato	HERBICIDA	IV	Urochloa fasciculatum	Granadilla	3,0 l/ha
Clorpirifos	INSECTICIDA	III	Nylanderia fulva	Hormiga loca	3,5 l/ha
Clorpirifos	INSECTICIDA	III	Aeneolamia sp	Mión o salivita	3,5 l/ha
Clorpirifos	INSECTICIDA	III	Collaria columbiensis	Chinche de los pastos	0,25 - 0,5 l/ha
Mancozeb	FUNGICIDA	III	puccinia spp	Royas	2,5 - 3,0 kg/ha
Mancozeb	FUNGICIDA	III	Puccinia spp	Royas	2,5 - 3,0 kg/ha
Clorpirifos	INSECTICIDA	III	Atta spp	Hormiga arriera	100 g / m2 de hormiguero

Deltametrina	INSECTICIDA	III	Rhammatocerus schistocercoides	Grillo de los pastos ( langosta)	0,2 - 0,25 l/ha
Beta-ciflutrin	INSECTICIDA	III	Collaria scenica	Chinche de los pastos	0,3 l/ha
Tiametoxam	INSECTICIDA	II	Collaria sp	Chinche de los pastos	75 g/ha
Lambda cihalotrina	INSECTICIDA	III	Collaria columbiensis	Chinche de los pastos	0,15 - 0,23 l/ha
Glifosato	HERBICIDA	IV	Amaranthus spp	Bledo	1,5 kg/ha
Glifosato	HERBICIDA	IV	Bidens pilosa	Masiquía	1,5 kg/ha
Glifosato	HERBICIDA	IV	Commelina diffusa	Siempreviva	1,5 kg/ha
Glifosato	HERBICIDA	IV	Echinochloa colonum	Liendre puerco	1,5 kg/ha
Glifosato	HERBICIDA	IV	Galinsoga ciliata	Guasca	1,5 kg/ha
Glifosato	HERBICIDA	IV	Cyperus spp	Cortadera	1,5 kg/ha
Glifosato	HERBICIDA	IV	Ipomoea spp	Batatilla	1,5 kg/ha
Glifosato	HERBICIDA	IV	Oryza sativa	Arroz rojo	1,5 kg/ha
Glifosato	HERBICIDA	IV	Cynodon dactylon	Pasto Argentina	1,5 kg/ha
Glifosato	HERBICIDA	IV	Cyperus rotundus	Coquito	1,5 kg/ha
Glifosato	HERBICIDA	IV	Paspalum conjugatum	Pasto horqueta	1,5 kg/ha
Glifosato	HERBICIDA	IV	Paspalum fasciculatum	Gramalote	1,5 kg/ha
Glifosato	HERBICIDA	IV	Paspalum virgatum	Maciega ó Pajón	1,5 kg/ha
Glifosato	HERBICIDA	IV	Paspalum paniculatum	Pajón	1,5 kg/ha
Glifosato	HERBICIDA	IV	Pennisetum clandestinum	Pasto kikuyo	1,5 kg/ha
Glifosato	HERBICIDA	IV	Digitaria sanguinalis	Guarda rocío	1,5 kg/ha
Glifosato	HERBICIDA	IV	Eclipta alba	Botoncillo	1,5 kg/ha
Glifosato	HERBICIDA	IV	Phyllanthus niruri	Viernes santo	1,5 kg/ha
Glifosato	HERBICIDA	IV	Paspalum pilosum	Paja peluda	1,5 kg/ha
Glifosato	HERBICIDA	IV	Fimbristylis miliacea	Barba de indio - Arrocillo	1,5 kg/ha
Glifosato	HERBICIDA	IV	Cucumis melo	Meloncillo	1,5 kg/ha
Glifosato	HERBICIDA	IV	Phaseolus lathyroides	Frijolillo	1,5 kg/ha
Glifosato	HERBICIDA	IV	Corchorus orinocensis	Espadilla	1,5 kg/ha
Glifosato	HERBICIDA	IV	Caperonia palustris	Verbena	1,5 kg/ha
Glifosato	HERBICIDA	IV	Desmodium tortuosum	Pega pega	4.5 - 5.0 kg/ha
Glifosato	HERBICIDA	IV	Indigofera sp	Añil	4.5 - 5.0 kg/ha
Glifosato	HERBICIDA	IV	Gossypium hirsutum	Algodón	4.5 - 5.0 kg/ha
Glifosato	HERBICIDA	IV	Guazuma ulmifolia	Guazuma	4.5 - 5.0 kg/ha

Glifosato	HERBICIDA	IV	Croton leptostachyus	Croton	4.5 - 5.0 kg/ha
Glifosato	HERBICIDA	IV	Acacia farnesiana	Espino - Corona de Cristo	4.5 - 5.0 kg/ha
Glifosato	HERBICIDA	IV	Citrus spp	Limoncillo	4.5 - 5.0 kg/ha
Glifosato	HERBICIDA	IV	Ficus sp	Ficus	4.5 - 5.0 kg/ha
Glifosato	HERBICIDA	IV	Amaranthus spp	Bledo	1,5%
Glifosato	HERBICIDA	IV	Bidens pilosa	Masiquía	1,5%
Glifosato	HERBICIDA	IV	Commelina diffusa	Siempreviva	1,5%
Glifosato	HERBICIDA	IV	Echinochloa colonum	Liendre puerco	1,5%
Glifosato	HERBICIDA	IV	Galinsoga ciliata	Guasca	1,5%
Glifosato	HERBICIDA	IV	Cyperus spp	Cortadera	1,5%
Glifosato	HERBICIDA	IV	Ipomoea spp	Batatilla	1,5%
Glifosato	HERBICIDA	IV	Oryza sativa	Arroz rojo	1,5%
Glifosato	HERBICIDA	IV	Cynodon dactylon	Pasto Argentina	1,5%
Glifosato	HERBICIDA	IV	Cyperus rotundus	Coquito	1,5%
Glifosato	HERBICIDA	IV	Paspalum conjugatum	Pasto horqueta	1,5%
Glifosato	HERBICIDA	IV	Paspalum fasciculatum	Gramalote	1,5%
Glifosato	HERBICIDA	IV	Paspalum virgatum	Maciega ó Pajón	1,5%
Glifosato	HERBICIDA	IV	Paspalum paniculatum	Pajón	1,5%
Glifosato	HERBICIDA	IV	Pennisetum clandestinum	Pasto kikuyo	1,5%
Glifosato	HERBICIDA	IV	Digitaria sanguinalis	Guarda rocío	1,5%
Glifosato	HERBICIDA	IV	Eclipta alba	Botoncillo	1,5%
Glifosato	HERBICIDA	IV	Phyllanthus niruri	Viernes santo	1,5%
Glifosato	HERBICIDA	IV	Paspalum pilosum	Paja peluda	1,5%
Glifosato	HERBICIDA	IV	Fimbristylis miliacea	Barba de indio - Arrocillo	1,5%
Glifosato	HERBICIDA	IV	Cucumis melo	Meloncillo	1,5%
Glifosato	HERBICIDA	IV	Phaseolus lathyroides	Frijolillo	1,5%
Glifosato	HERBICIDA	IV	Corchorus orinocensis	Espadilla	1,5%
Glifosato	HERBICIDA	IV	Caperonia palustris	Verbena	1,5%
Mancozeb	FUNGICIDA	III	Puccinia sp	Roya negra	450 g/ 200 l de agua
Malathion	INSECTICIDA	III	Antonina graminis	Cochinilla de los pastos	2,0 l/ha
Malathion	INSECTICIDA	III	Aeneolamia spp	Mión de los pastos	2,0 l/ha
Malathion	INSECTICIDA	III	Blissus sp	Gusano de las raíces	2,0 l/ha
Malathion	INSECTICIDA	III	Arctia sp	Gusano	2,0 l/ha

				Santamaría	
Malathion	INSECTICIDA	III	Collaria columbiensis	Chinche de los pastos	1,5 l/ha
Malathion	INSECTICIDA	III	Rhammatocerus spp	Langosta	1,5 l/ha
Mancozeb	FUNGICIDA	II	Puccinia sp	Roya negra	2,5 kg/ha
Deltametrina	INSECTICIDA	III	Collaria sp	Chinche de los pastos	0,4 – 0,5 l/ha

**Anexo 5.** Espectros de masas de los plaguicidas Malathion, Fenitothion, Chlorpyrifos, Fipronil y Deltametrin.

