

E - 870



# TOXI-INFECCIONES DE ORIGEN ALIMENTARIO



## ANALISIS DE RESIDUOS DE PLAGUICIDAS EN ALIMENTOS

Andrzej E. Olszyna-Marzys

Jefe, División de Control y Análisis de Alimentos del Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá (INCAP), y Asesor Principal del Laboratorio Unificado de Control de Alimentos de Guatemala, Guatemala, C. A.

*La extraordinaria multiplicación, desde la segunda guerra mundial, de compuestos químicos usados para combatir plagas en agricultura y salud pública, ha conducido a la presencia de sus residuos en el ambiente, incluyendo los alimentos, con riesgos potenciales para la salud humana y la ecología en general. Este hecho ha creado la necesidad de desarrollar técnicas analíticas muy sensibles para la detección y determinación de dichos residuos. Se presenta un esbozo histórico del desarrollo de las técnicas, así como su estado actual, basado principalmente en la cromatografía en fase gaseosa. Se expone también el esquema del método de multirresiduo de la detección y determinación simultánea de una variedad de residuos, que abarca sus fases preparatoria y determinativa, así como técnicas confirmatorias y complementarias.*

### Esbozo Histórico y Primeros Métodos

Como lo indica su nombre, los plaguicidas son agentes destinados a combatir plagas.

Por una curiosa inversión, "plaga" es "pest", en inglés, mientras que "plague" en inglés significa "peste" en castellano. Por lo tanto, es frecuente el uso en español del anglicismo (o galicismo) "pesticida", sinónimo de plaguicida. Para complacer a los puristas, en este trabajo utilizaremos, pues, el término "plaguicida".

Se pueden distinguir tres generaciones de plaguicidas usados en agricultura y salud pública.

Hasta 1840 la mayoría de los agricultores consideraban las plagas como un hecho que uno tenía que aceptar como la voluntad de Dios.

En los últimos años de esa misma década, M. Grison, de Versailles, Francia, descubrió que la mezcla de cal y azufre constituye una cura contra el mildiu (mildiú) polvoroso, plaga propia de la vid, descubriendose luego que el polvo de azufre solo tenía el mismo efecto. En 1865 se introdujo el "verde París" (acetoarsenito de cobre) contra el escarabajo de la patata (escarabajo

(escarabajo de Colorado) que permaneció siendo insecticida principal hasta la introducción del arseniato de plomo en 1892.

En los 1880 se descubrió accidentalmente que una combinación de sulfato de cobre con cal llamada "mezcla de Burdeos" era un fungicida eficaz contra el mildeu de primavera. Con estos descubrimientos el control químico de las plagas se afirmó a fines del siglo XIX. En la Exposición Colombina de Chicago de 1893, figuraban ya 42 insecticidas patentados.

Todos estos plaguicidas de la primera generación eran sustancias inorgánicas encontradas en la naturaleza, tales como minerales de azufre, cobre y arsénico, o preparaciones y mezclas artificiales que contenían arsénico, antimonio, plomo, selenio, boro, cobre, mercurio, cinc, talio, mangano, plata o fluoruros, cloratos, cianuros, tiocianuros, isocianuros, etc., así como productos orgánicos naturales, entre éstos los fenoles, que resultan del proceso de ahumado de ciertos tipos de madera, extractos de tabaco, rotenona de raíz de derris y piretro.

Cualesquiera análisis de residuos de estos plaguicidas de la primera generación se inspiraban predominantemente en consideraciones comerciales tales como mantenimiento de un producto apto para la venta y bajo costo del pesticida. Las pruebas variaban desde las organolépticas hasta las colorimétricas y de fotometría de llama. Aunque este último procedimiento fue desarrollado por Bunsen y Kirchhoff hace más de 100 años, los límites inferiores de detección obtenidos con éste y por medio de determinaciones colorimétricas, en muchos casos no han sido mejorados todavía, comparándose con las más sensibles determinaciones instrumentales. Tal es, por ejemplo, el caso de la determinación del cobre por medio de la mancha analítica de Feigl usando dietilodicitocarbamato de cinc como reactivo, por cuyo medio 0.04 partes por millón de cobre pueden ser detectadas en un alimento. Muchas técnicas colorimétricas fueron desarrolladas para la determinación de los plaguicidas, tanto de la primera como de la segunda generación. Unas son muy específicas y otras representan reacciones de grupos de compuestos. Se comparan intensidades del color desarrollado correspondientes a las cantidades del compuesto en cuestión, visiblemente o por medio del fotocolorímetro.

La segunda generación de plaguicidas nació durante la segunda guerra mundial con la introducción del DDT como insecticida, seguido por otros productos químicos orgánicos sintéticos. Nuevas sustancias activas continúan apareciendo en la actualidad. Varios centenares se usan hoy día, en fórmulas de más de 50,000 productos comerciales. Debido a su uso tan extenso, el propósito principal del análisis de sus residuos pasó a ser el de control por parte de las autoridades gubernamentales, de la calidad de los alimentos desde el punto de vista de la seguridad para el consumidor. El análisis de residuos de estos plaguicidas orgánicos trajo consigo nuevos problemas. La mayoría de ellos no se pueden detectar organolépticamente. Tampoco se pueden determinar por métodos inorgánicos, ahora muy bien desarrollados, por tener en la mayoría de los casos únicamente los elementos C, H, O, halógenos, P, S y N. Existen solamente unas pocas excepciones donde las moléculas orgánicas tienen metales incorporados, permitiendo la aplicación de la

**espectrometría de la emisión de llama o absorción atómica.** Para la vasta mayoría de los ingredientes activos, hubo necesidad de desarrollar nuevos métodos analíticos. Para propósitos generales se adoptaron los ensayos biológicos. Estos, usando organismos de prueba susceptibles, son técnicas relativamente fáciles, especialmente adecuadas para los laboratorios no equipados con instrumentos costosos, o en el caso de venenos para los cuales no se han desarrollado métodos químicos de análisis de sus residuos o bien son demasiado complicados (1).

Los métodos biológicos también tienen la ventaja sobre otros métodos en el sentido de que detectan metabolitos tóxicos que químicamente se comportan de manera distinta a otras sustancias afines y por lo tanto no se pueden detectar a menos que se conozca su naturaleza. Puesto que para el entomólogo lo importante es la actividad biológica y no la presencia o ausencia de los compuestos específicos, desde su punto de vista, el bioensayo es el mejor método de análisis de residuos. Sin embargo, esta técnica no es lo bastante sofisticada como para determinar la cantidad exacta del residuo, y tampoco es sensible por debajo de cierto nivel. No obstante, algunas de ellas sí se distinguen por su muy alta sensibilidad. Tales son las que usan *Drosophila*, un insecto de prueba muy común que permite la detección de décimas, y en algunos casos hasta de centésimas partes por millón de insecticidas, o *Daphnia* (la "pulga acuática") que es sensible a 2-5 partes por billón de ciertos insecticidas.

Una de las pruebas bioquímicas, la inhibición de la colinesterasa, sigue usándose bastante todavía en el caso de los compuestos inhibidores de esta enzima, como son los organofosfatos y carbamatos.

La **cromatografía en papel**, luego extendida a **cromatografía en capa fina (delgada)**, se estableció temprano como método preferido. La cromatografía es un procedimiento de análisis basado en la percolación de un líquido o un gas a través de una materia porosa o pulverulenta, de gran superficie, ya sea sola o actuando como soporte para una capa de líquido y constituyendo la fase estacionaria. La otra, o sea la **fase móvil**, es el líquido o gas percolado por dicha "cama estacionaria". La separación de componentes de una mezcla contenida en la fase móvil se produce mediante intercambios repetidos entre ésta y la fase fija, separándose los mismos como consecuencia de sus diferentes velocidades de migración.

En la **cromatografía en papel**, la fase fija la constituye una hoja de papel. La mezcla a analizar (en solución) es depositada en una mancha en una extremidad de la hoja, desde donde el solvente escurre por capilaridad (descendiendo o ascendiendo), y después del desarrollo con un agente cromogénico (que produce color), hace que aparezcan numerosas manchas a diferentes niveles. Estos últimos corresponden a los distintos componentes distribuidos según sus distancias de migración en relación a la del frente del solvente. Dicha razón se llama valor  $R_f$ . La intensidad de color o de la fluorescencia en la luz ultravioleta de la mancha, corresponde a la cantidad de la sustancia.

En la *cromatografía de capa delgada* el papel fue reemplazado por una placa o lámina de vidrio o metal con un polvo adsorbente (la de uso más frecuente es el gel de sílice o alúmina) esparcido en una delgada capa de alrededor de 0.25 mm. El adsorbente generalmente está mezclado con yeso, y el espesor se iguala en un aparato especial, obteniéndose así una *cromatoplaca*. La ventaja de este método sobre la *cromatografía en papel* es la mayor velocidad y una separación mejor definida de los componentes. Esta técnica sigue en el campo de plaguicidas como un importante y rápido método confirmatorio que complementa la *cromatografía de gas*, de mayor uso, así como técnica principal en el caso de plaguicidas no volátiles en las temperaturas usadas en la *cromatografía de gas*.

La *cromatografía en fase gaseosa*, brevemente llamada *cromatografía de gas*, es un elegante método de determinación cualitativa y cuantitativa simultáneas de un número de plaguicidas.

El desarrollo de esta técnica ha sido extraordinariamente rápido, gracias en particular al perfeccionamiento de aparatos comerciales que transforman en un trabajo de rutina el análisis de mezclas muy complejas, con el único requisito de que puedan ser evaporadas.

En el término de pocos años, sobre todo con el detector de captura de electrones (DCE), esta técnica se ha convertido en el método preferido para los plaguicidas clorados, los que se usaban predominantemente en su época. Con el mayor uso de otros plaguicidas, detectores nuevos y específicos fueron desarrollados o mejorados. Dedicaremos especial atención a esta técnica.

### **Desarrollo del Procedimiento del Multirresiduo**

Si bien es cierto que a la introducción de nuevos plaguicidas siguió el desarrollo de métodos analíticos para su detección, el químico analista no sabe cuáles de los muchos plaguicidas podrían emplearse sobre el producto antes de que éste aparezca como alimento en el mercado y, en consecuencia, qué método usar. Además, por acción de la luz, del aire, o de enzimas propias de la planta o del animal, muchos de estos compuestos se convierten en otros a veces aún más tóxicos. Consecuentemente, científicos, en particular de la Administración de Alimentos y Drogas de los Estados Unidos de América han desarrollado los llamados métodos de "multirresiduo", que permiten determinar varios plaguicidas simultáneamente. Por medio de estas técnicas, un químico con adiestramiento, experiencia y equipos adecuados, puede identificar y determinar cuantitativamente alrededor de unos 60 plaguicidas en una sola muestra de cualquier alimento en el término de pocas horas. Esto es más de lo que podrían hacer 50 o más químicos que analizaran por separado cada residuo (2).

El procedimiento en cuestión, adoptado en nuestro laboratorio con variantes aplicadas a distintos tipos de materiales, está basado en la *cromatografía de gas*; no obstante, esa técnica únicamente forma parte, aunque importan-

te, del proceso total. En general, el método puede dividirse en cuatro fases principales:

- I. Muestreo
- II. Extracción
- III. Aislamiento
- IV. Determinación (identificación y cuantificación)

La cromatografía de gas se usa principalmente en la fase IV. El muestreo apropiado tiene la misma importancia que en cualquier trabajo analítico, y las etapas II y III están interrelacionadas. Como en cualquier análisis, y con pocas excepciones – por ejemplo, las relacionadas con la radiactividad – casi siempre es necesario separar el grueso de la muestra antes de poder hacer la determinación, especialmente cuando hay por lo menos un millón de veces más de alimento que del residuo químico que se desea determinar.

Según el método de la FDA, para la extracción la muestra se homogeniza con acetonitrilo, solvente que es particularmente efectivo para la extracción de plaguicidas clorados y fosforados. Sin embargo, este solvente extrae también otros compuestos tales como grasas, aceites y ceras. Estos se extraen a su vez a partir del acetonitrilo en un embudo separador con éter de petróleo; luego los plaguicidas se pasan a otra porción de éter de petróleo por adición de un gran volumen de agua.

El éter de petróleo se pasa por una columna de florisil, material granulado que adsorbe tanto los plaguicidas como las impurezas restantes. Estas últimas incluyen sustancias colorantes naturales en el caso de las plantas, además de residuos de grasa, etc. Seguidamente los plaguicidas se eluyen de la columna con mezclas selectivas de solventes; en el caso del método de la FDA con tres mezclas de éter de petróleo en proporciones crecientes de éter etílico, dividiendo los plaguicidas en tres grupos para facilitar la cromatografía, mientras que las impurezas permanecen en la columna. Sólo entonces están los plaguicidas lo suficientemente puros para la última etapa del proceso, esto es, para la determinación por medio de cromatografía de gas.

Debido a la ubicuidad de plaguicidas o impurezas con características cromatográficas similares, a las pequeñas cantidades que se determinan, y a la extraordinaria sensibilidad del cromatógrafo de gas, se necesita una cuidadosa limpieza de la cristalería y pureza de los reactivos y solventes. Así, después de usada, la cristalería se lava con ácido crómico, en seguida con agua hirviendo con detergente, y se enjuaga varias veces con agua corriente y con agua destilada. Luego se seca en la estufa a 130°C, se enfria y se lava varias veces con acetona y finalmente con hexano. La esterilización no sirve en el trabajo con plaguicidas.

Todos los reactivos sólidos se extraen con solventes en un aparato Soxhlet durante varias horas, y todos los solventes se redestilan en vidrio, con reactivos especiales si fuese necesario. Se ha logrado ahorrar estos últimos introduciendo micrométodos, pero éstos han tenido éxito únicamente en el caso de ciertos materiales determinados, tales como sangre, grasa y leche humanas.

Desde 1944, la fase de determinación ha atravesado por un gran número de formas en su proceso de evolución. El primer método fue la determinación del cloro orgánico total, que no permitía determinar varios plaguicidas individuales. A éste siguió el ensayo biológico y a continuación la cromatografía en papel, en capa fina, y por último, la cromatografía de gas. Se ha comprobado plenamente que esta última técnica es, sin lugar a dudas, muy superior a las precedentes.

En un párrafo previo se explicó ya la base de la separación de una mezcla de sustancias volátiles por cromatografía.

De los dos tipos de cromatografía de gas existentes, la técnica de la separación depende, en el primer caso, de las distintas afinidades de adsorción al sólido, constituyendo la fase estacionaria de los diferentes componentes de la mezcla (*cromatografía de gas sólido*). En el segundo caso, la técnica depende de la partición de los componentes entre la fase estacionaria en forma de una capa de líquido no volátil que cubre el sólido de soporte, y la fase gaseosa (*cromatografía de gas líquido*). Esta última es la forma más versátil y selectiva de la cromatografía en fase de gas usada para analizar gases, líquidos y sólidos susceptibles de volatilizar.

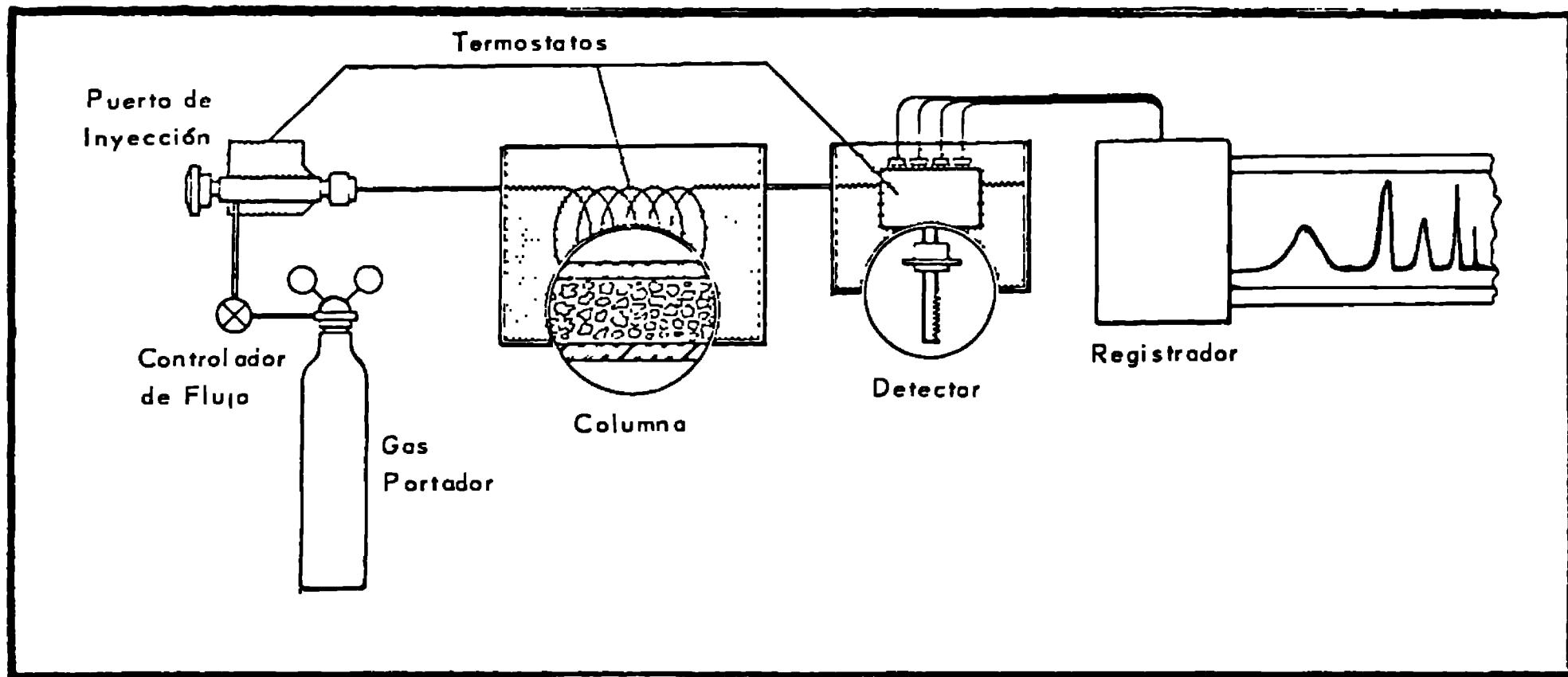
Desde que Martin y Synge introdujeron la cromatografía de gas en 1952 (por la que obtuvieron el premio Nobel), dicha técnica se ha desarrollado de manera sorprendente gracias a la sensibilidad, exactitud y sencillez que caracterizan a esta forma de separación, identificación y determinación de compuestos volátiles. Se estima que al presente existen más de 100,000 cromatógrafos de gas en el mundo y que más de 50,000 trabajos han sido publicados sobre el tema, con una tasa de incremento de publicaciones de 1,800 - 2,000 al año.

### **Aplicación de la Cromatografía de Gas a la Determinación de Plaguicidas**

#### **A. El sistema cromatográfico (3)**

Las partes básicas de un cromatógrafo de gas, según lo ilustra la Figura 1, son:

1. Una fuente de gas portador (de arrastre), usualmente un cilindro a presión alta
2. Controlador de flujo y regulador de presión
3. Entrada a la muestra (puerto de inyección)
4. Columna con su empaque
5. Detector (con la electrónica necesaria)
6. Registrador
7. Termostatos para inyección, columna y detector



(Cortesía de McNair y Bonelli, "Curso básico de cromatografía en fase de gas")

**FIGURA 1**

*El sistema cromatográfico*

## B. Técnica

En la *cromatografía de gas líquido* (CGL) los componentes de una mezcla son llevados a través de una columna (un tubo de vidrio o metal con su empaque) por un gas inerte (gas portador o de arrastre), normalmente nitrógeno o helio. La mezcla se reparte entre el gas y el solvente no volátil (*fase estacionaria*) cubriendo los granos clasificados de un *soporte sólido* (polvo de ladrillo, polímeros). El solvente retarda selectivamente los componentes de la mezcla de acuerdo a su coeficiente de distribución y, bajo condiciones constantes de temperatura y de flujo de gas, éstos dejan la columna en la corriente de gas con tiempos de retención constantes. Luego, mediante un detector conectado con el registrador, se registran en forma de una serie de picos como función de tiempo.

El *tiempo de retención*, marcado por la posición del pico, permite identificar el componente mientras que su *altura* o *área* corresponde a su cantidad. Las distintas partes del sistema se mantienen a temperaturas apropiadas para prevenir la condensación de la muestra o su descomposición.

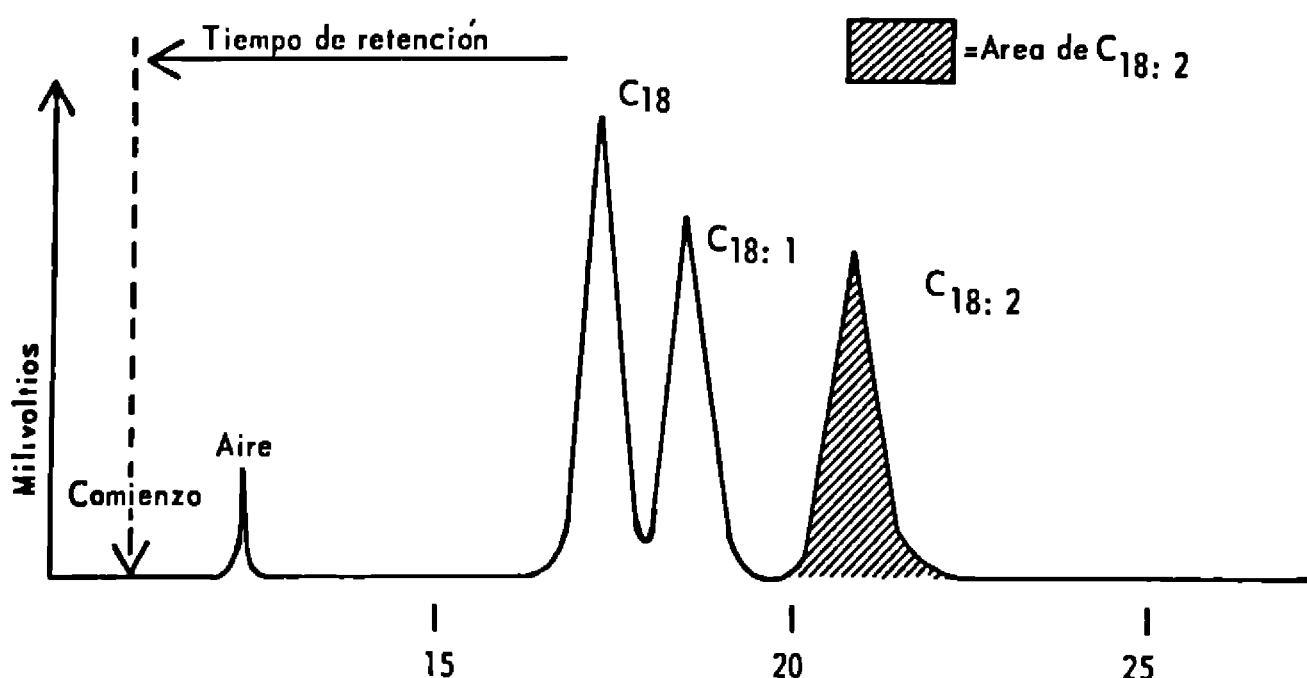
Cuando se encuentran presentes componentes fuertemente retenidos, el tiempo de análisis puede acortarse usando la *programación de temperatura*, que es el aumento regular de la temperatura de la columna en el curso del análisis.

Con excepción de picos muy delgados y claramente separados, la cantidad de sustancia guarda más proporción con la superficie del área que con la altura de un pico. La primera puede calcularse ya sea por medio del planímetro, cortando y pesando los picos, o bien valiéndose de integradores conectados al aparato, mecánicos (*de disco*), o electrónicos.

La Figura 2 proporciona un ejemplo de un cromatograma así obtenido, en este caso de ésteres de ácidos grasos.

## C. Columnas

La columna es el corazón del cromatógrafo de gas y su tubería puede ser de cobre, aluminio, teflón, acero inoxidable o vidrio; hoy día, en general los dos últimos materiales son los de mayor uso (vidrio en caso de plaguicidas), ya sea bien en forma recta, doblado en U, o en espiral. Su longitud varía desde unos pocos centímetros hasta más de 20 metros (el más común mide de 1 a 3 metros) y su diámetro interno oscila entre 0.25 mm y 10 cm. El soporte sólido de empaque que se utiliza más comúnmente consiste en varios grados de polvo de ladrillo de marca comercial Chromosorb, Anakrom, Supelcopor u otras, el cual proporciona el medio de distribución de gran superficie para la fase líquida. Precisamente es a la disponibilidad de muchas variedades de esta última fase a la que se debe la versatilidad y selectividad de la CGL. Las fases líquidas estacionarias son normalmente líquidos con una presión de vapor imperceptible bajo temperaturas de operación, en los que los componentes de las muestras tienen una solubilidad razonable y exhiben diferentes



(Cortesía de McNair y Bonelli, "Curso básico de cromatografía en fase de gas")

**FIGURA 2**

### Cromatograma típico de ésteres de ácidos grasos

coeficientes de distribución. Además existen columnas capilares muy largas, sin empaque.

#### D. Detectores

El detector sirve para indicar la presencia y medir la cantidad de componentes en el efluente de la columna. No existe un detector ideal. Uno de los libros recientes sobre cromatografía de gas señala la existencia de 44 tipos distintos de detectores (4). Sin embargo, los más comunes son seis: de conductividad térmica (catarómetro); de ionización de flama; de captura de electrones; de conductometría de Coulson; termiónico, y de fotometría de llama (Melpar). Los dos primeros se acercan a lo que podría denominarse "detectores universales" mientras que el de captura de electrones es un tanto más específico, siendo sensible a los compuestos electronegativos. Los tres restantes son aún más específicos, ya sea en el caso de halógenos, fósforo o azufre.

Aunque la cromatografía de gas líquido (CGL) fue desarrollada en la década de 1950, los primeros detectores, incluso el de ionización de flama, no eran útiles para la determinación de plaguicidas hasta que en 1960 Coulson inventó el detector microculómetro, que media continuamente la cantidad de ácido clorhídrico producido por combustión de plaguicidas clorados en un

horno de tubo. En la mayoría de laboratorios, el detector de conductometría de Coulson, específico también para azufre o nitrógeno, ha reemplazo al microculómetro, pero desde 1964 el detector de captura de electrones ha sido el más empleado para análisis de residuos de plaguicidas.

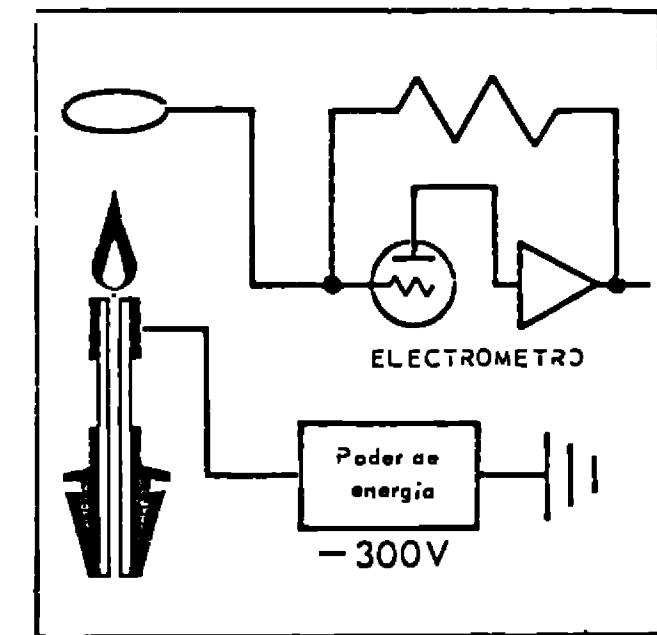
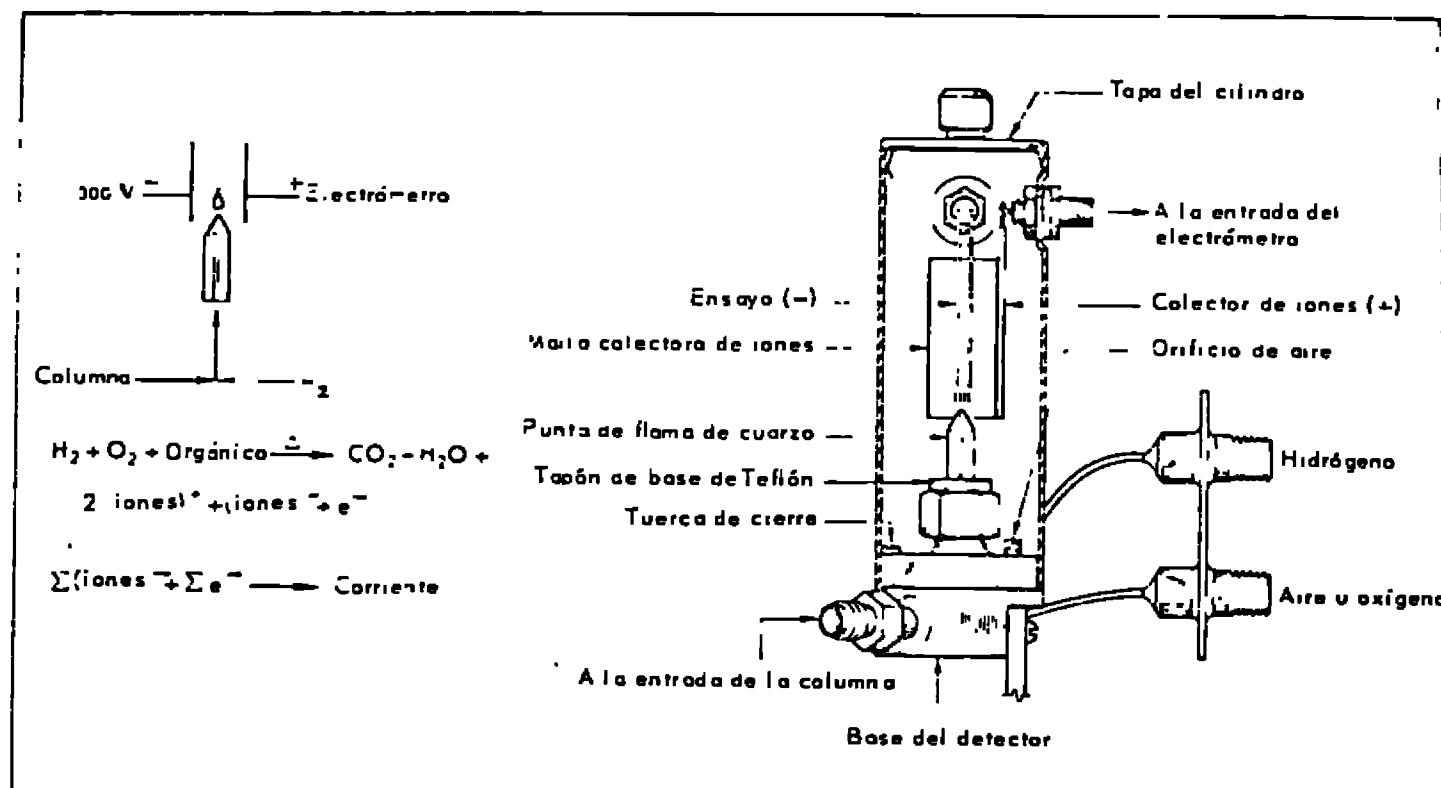
Mientras que en el detector de ionización de llama (Fig. 3), el más usado de todos, se mide el aumento de la corriente eléctrica producido por la ionización de los componentes de una mezcla volátil pasando entre dos electrodos, el principio contrario se aplica en el detector de captura de electrones (Fig. 4), ya que en este caso se mide la pérdida de señal más bien que una corriente eléctrica positiva. Cuando el gas de arrastre (por ejemplo nitrógeno) pasa por el detector, una fuente radiactiva (tritio, Ni<sup>63</sup> o Scandio) ioniza las moléculas del mismo produciendo electrones lentos que migran al ánodo bajo un voltaje fijo llamado *voltaje de elemento*. Una vez colectados, esos electrones lentos producen una corriente constante amplificada por el electrómetro. Si se introduce una muestra que contiene moléculas capaces de absorber electrones, esa corriente se reduce. La pérdida de corriente guarda relación proporcional a la cantidad y afinidad electrónica del compuesto.

El detector de captura de electrones es extraordinariamente sensible a ciertos compuestos electronegativos, tales como hálidos, álkilos, carbonilos conjugados, nitrilos, nitratos y organometales, pero es virtualmente insensible a hidrocarburos, alcoholes, cetonas, etc. Estas características lo hacen especialmente valioso para el análisis de plaguicidas, que pueden ser detectados hasta una fracción de picogramo (o sea de  $10^{-12}$  g), particularmente en el caso de los hálidos.

El uso creciente de plaguicidas organofosforados condujo a trabajar en un detector selectivo de fósforo. El primero de éstos fue un detector de ionización de flama modificado (termiónico). Este consiste en un detector de flama normal con la adición de una pequeña tableta de sal alcalina colocada en la punta de cuarzo. Con un control preciso de tasas de hidrógeno y flujo de aire, el detector se hace muy sensible a los compuestos que contienen fósforo y casi insensible a otras materias orgánicas.

El detector de fotometría de flama de Melpar (Fig. 5) se basa en el hecho de que cada elemento produce un espectro de emisión característica cuando a sus átomos se les suministra energía de excitación. En este caso la energía se produce por la ignición de una muestra vaporizada y mezclada con aire y oxígeno, en una flama rica en hidrógeno. La intensidad de las longitudes de ondas de luz emitidas es proporcional al número de átomos excitados, así como a la concentración del compuesto. La intensidad es detectada por medio de un fotomultiplicador, amplificada y registrada.

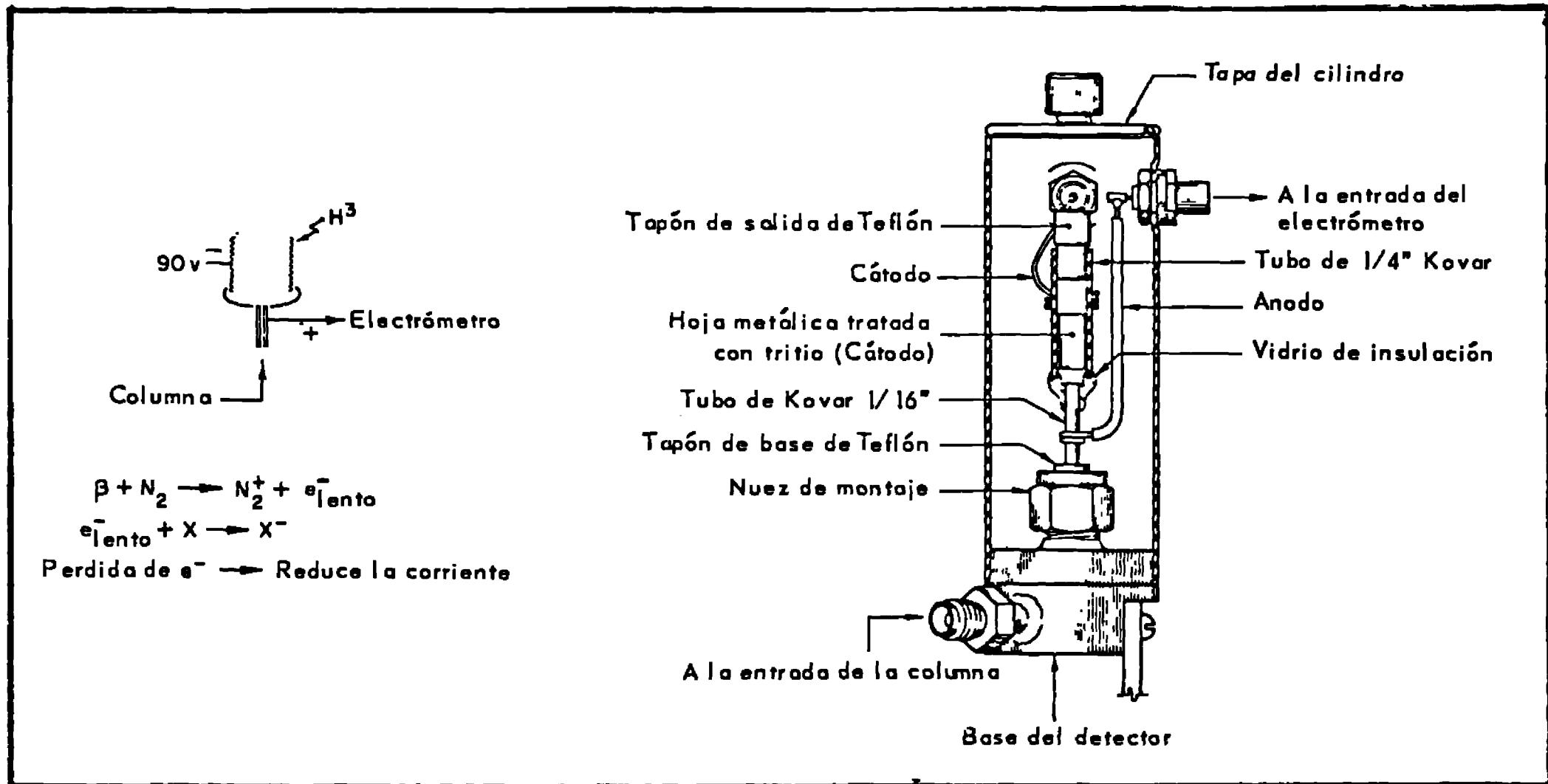
Los compuestos de fósforo y de azufre se desdoblán en la flama dando emisiones ópticas características. Una u otra pueden ser seleccionadas por la inserción de filtros ópticos intercambiables que transmiten sólo las longitudes de ondas características del elemento en cuestión. Los compuestos que contienen fósforo se detectan por el uso del filtro que únicamente transmite la emi-



(Cortesía de McNair y Bonelli, "Curso básico de cromatografía en fase de gas")

FIGURA 3

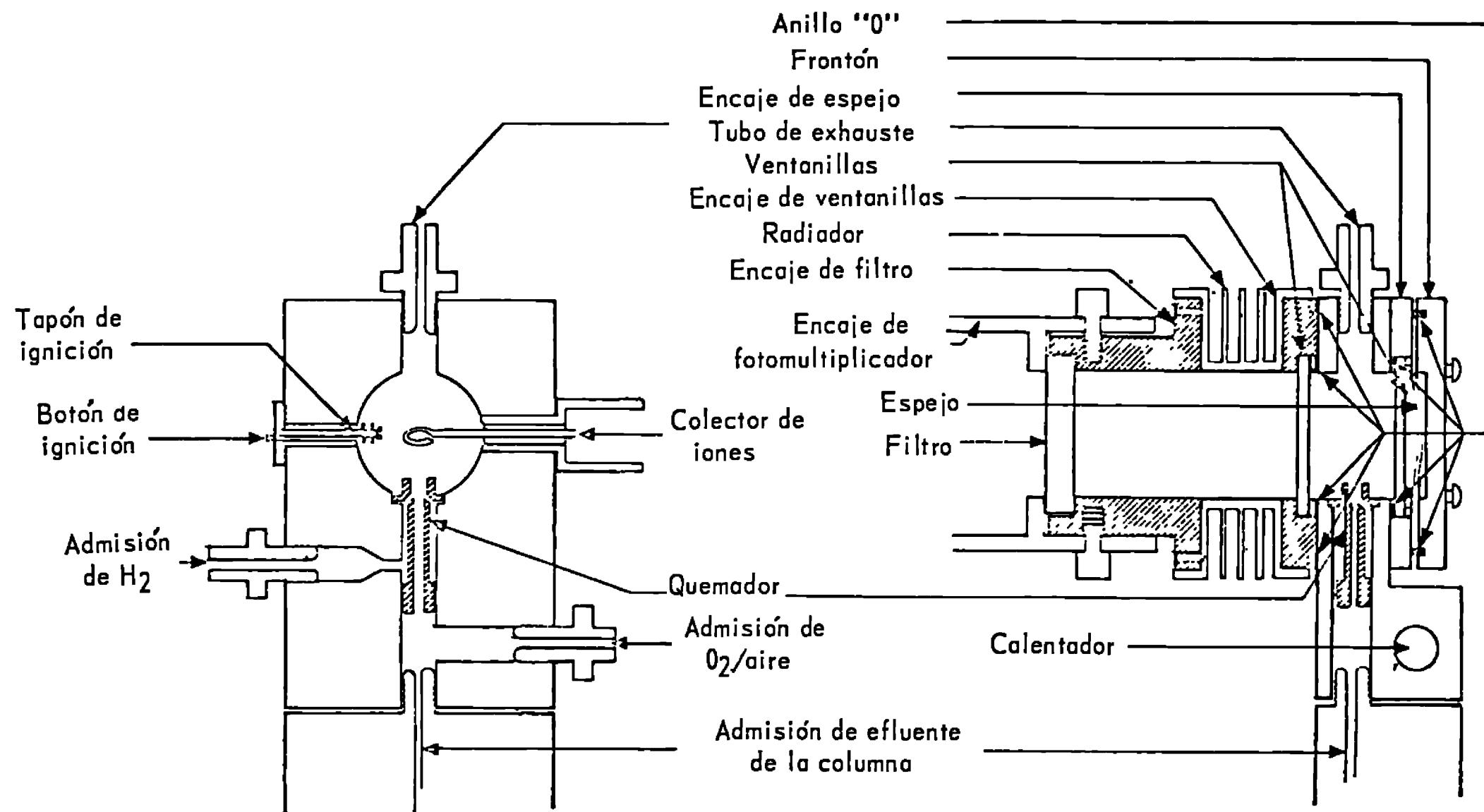
Detector de ionización de flama



(Cortesía de McNair y Bonelli, "Curso básico de cromatografía en fase de gas")

FIGURA 4

Detector de captura de electrones



(Cortesía de Tracor, Inc., Austin, Texas)

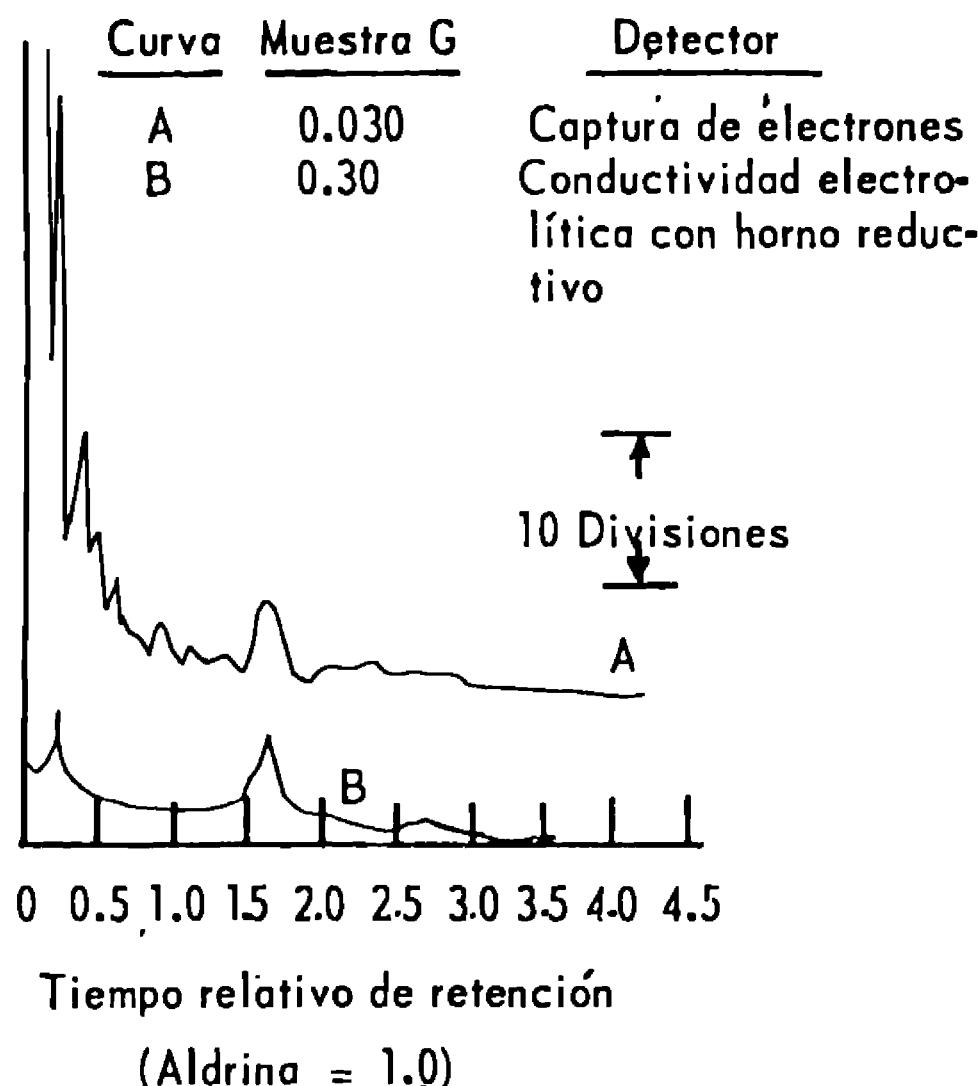
FIGURA 5

Secciones del detector de fotometría de flama

sión de  $526 \text{ m}\mu$  característica de ese elemento; el filtro de  $394 \text{ m}\mu$  es específico para azufre.

El sistema permite también su operación como un detector regular de ionización de flama. Con un electrómetro y registrador de canal doble, el canal de ionización indica la presencia de casi todos los componentes de la mezcla, mientras que el canal de fotometría muestra sólo aquéllos que contienen fósforo o azufre, según se desea. La Figura 6 representa los chromatogramas de un aceite obtenidos simultáneamente de la manera descrita.

El Melpar permite la detección de compuestos que contienen fósforo o azufre al nivel de nanogramo, aún con el excedente de miles de veces de otros productos químicos.

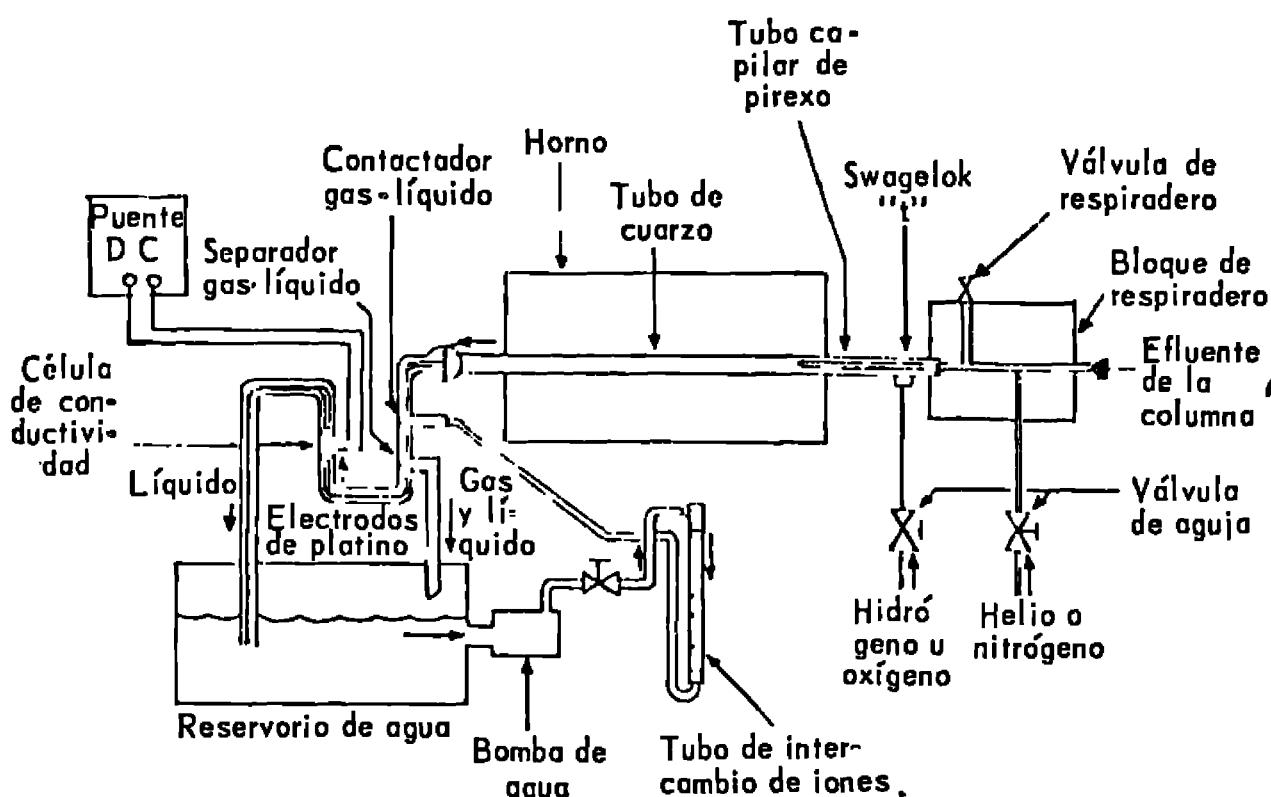


(Cortesía de Tracor, Inc., Austin, Texas).

FIGURA 6

Extracto mal purificado de un roedor expuesto a los pesticidas clorinados

El otro nuevo detector, Coulson, es específico para compuestos orgánicos de nitrógeno, halógenos y azufre. Un horno de pirólisis oxida o reduce esos compuestos con oxígeno o hidrógeno, respectivamente. Los productos de la reacción forman electrolitos cuando se disuelven en el agua deionizada que circula en la celda del detector. Los cambios de la conductividad entre dos electrodos de platino se miden por medio de un puente DC y se reflejan como picos en el registrador. El sistema se muestra en la Figura 7.



(Cortesía de Tracor, Inc.,  
Austin, Texas)

FIGURA 7

Diagrama de flujo del detector de conductividad electrolítica de Coulson

Según el arreglo que hemos adoptado en nuestro laboratorio, los compuestos que salen de la columna son llevados por el gas de arrastre y pasan primero por el DCE (detector de captura de electrones). Una de las plumas del registrador, la conectada con el DCE, registra los picos que corresponden a plaguicidas, tanto clorados como fosforados. Casi inmediatamente la mezcla (dentro de una fracción de segundo) atraviesa el Melpar, cuya pluma registra únicamente los picos correspondientes a los plaguicidas fosforados, exactamente opuestos a los picos de los mismos compuestos trazados por la pluma del DCE, tal como lo indica la Figura 8. Gracias a este arreglo, en el caso de dos plaguicidas, uno clorado y otro fosforado, ambos con el mismo

valor de retención, por ejemplo, se puede identificar cuál es, y si los dos estuvieran presentes, calcular la cantidad de plaguicida fosforado por el Melpar, y del clorado, restando esta cantidad del pico compuesto en el DCE. El mismo efecto se puede lograr por medio de un "splitter" que lleva parte de la fase móvil al detector EC y la restante al Melpar.

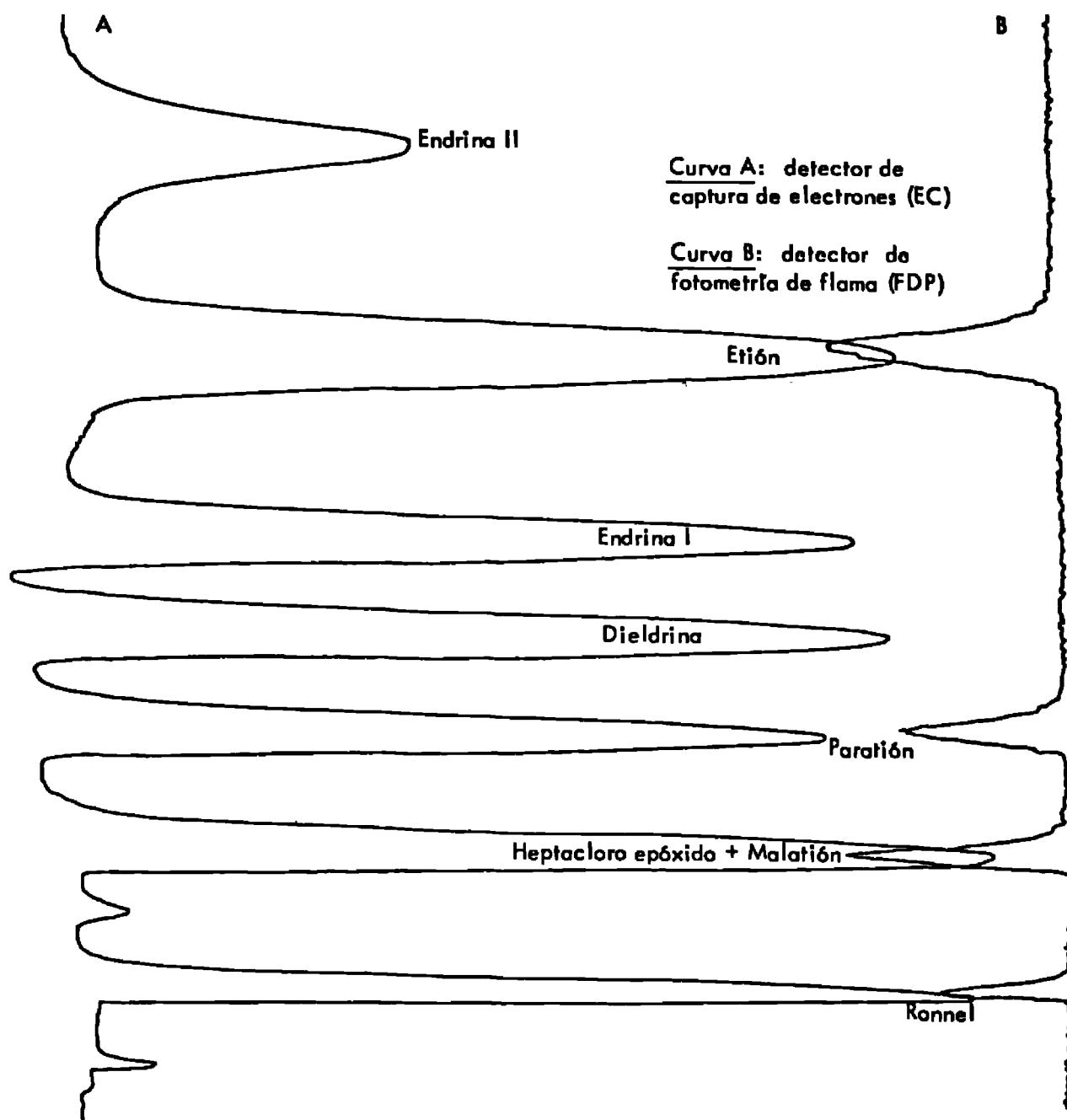


FIGURA 8

Ejemplo del uso de dos detectores para la detección de una mezcla de plaguicidas clorados y fosfatados

En el caso de dos compuestos clorados y fosforados que tengan el mismo valor de retención, ya es factible lograr cierta clasificación usando los tres solventes en la cromatografía con la columna de florisol. Por ejemplo, *p,p'*-DDE (un metabolito del DDT), que frecuentemente, y según el tipo de colum-

na, sale en el mismo lugar que la dieldrina, se eluye de la columna de florisil con 6% de éter etílico en éter de petróleo. Sin embargo, para eluir la dieldrina se necesita 15% de éter etílico, y así estos dos compuestos se encuentran separados en dos fracciones distintas antes de su inyección en el cromatógrafo. Finalmente, y como procedimiento de rutina, usamos dos columnas distintas con patrones diferentes de retención, de manera que las parejas que no se separan en una de las columnas, se separan en la otra. Por ejemplo, la Figura 9 muestra una de las dos columnas más utilizadas por nosotros, pudiéndose observar que el lindano no se separa del  $\alpha$ -BHC y  $\alpha, p'$ -DDT de la endrina. En cambio estos compuestos sí se separan en la segunda columna (Fig. 10), mientras que  $\beta$ -BHC casi no se separa del heptacloro. Si todavía queda alguna duda, la confirmación final se puede llevar a cabo valiéndose de un detector de conductometría de Coulson o bien por *cromatografía en capa fina*.

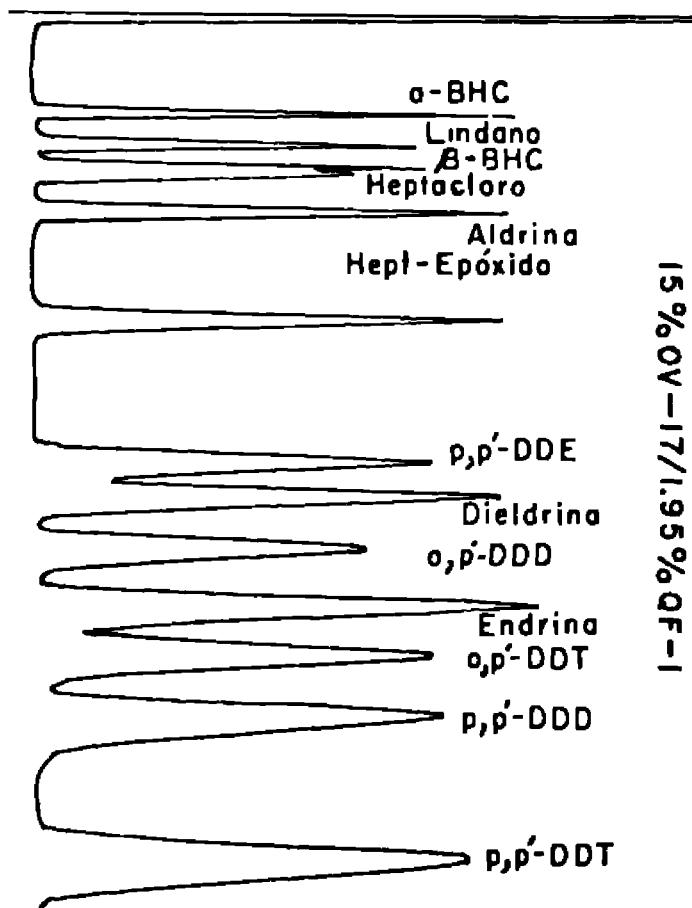


FIGURA 9

Cromatograma típico de una mezcla de 13 plaguicidas clorados sobre una columna con fase líquida mixta

El procedimiento arriba descrito se aplica específicamente a la determinación de residuos de insecticidas clorados y menos polares fosforados. Para otros grupos de plaguicidas tienen que aplicarse distintas variaciones de las técnicas aquí expuestas. Estas pueden implicar únicamente el uso de diferen-

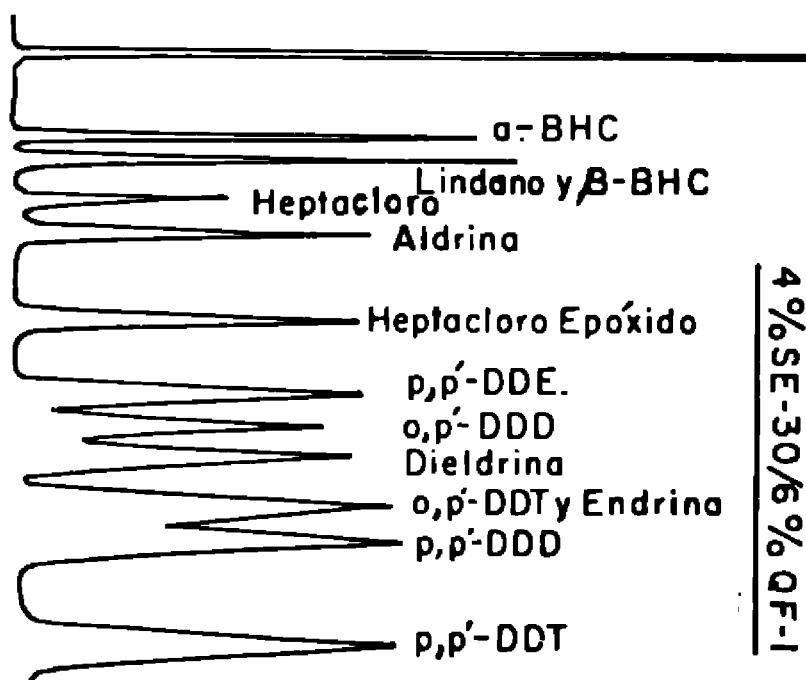


FIGURA 10

Cromatograma típico de una mezcla de 13 plaguicidas clorados sobre una columna con fase líquida mixta

tes combinaciones para la extracción y limpieza, como es el caso de los insecticidas fosforados más polares. En otros casos, cuando los miembros de determinado grupo no son lo suficientemente volátiles o estables en las temperaturas del cromatógrafo, se preparan derivados estables volátiles, usualmente ésteres de distintos tipos, como sucede en el caso de los herbicidas derivados del ácido fenoxiacético o insecticidas y herbicidas del grupo de carbamatos.

Sin embargo, los principios y los problemas de muestreo, extracción, aislamiento (limpieza) y por fin, de la determinación, incluyendo la identificación y cuantificación, son muy similares a los descritos en el caso del método de multirresiduo aplicable a los insecticidas clorados y fosforados.

#### Técnicas Auxiliares y Confirmatorias

Aunque la cromatografía en fase gaseosa constituye hoy día la base de

la mayoría de procedimientos analíticos de determinación de residuos de pesticidas, siempre se necesitan métodos alternativos para confirmar los resultados obtenidos con la primera, para determinar los compuestos que no se pueden establecer por medio de la cromatografía de gas, y por fin, para el uso por parte de los laboratorios que no cuentan con el equipo requerido por esa técnica (5).

Rutinariamente, y como el primer paso de confirmación, se usan dos o incluso tres columnas distintas en el cromatógrafo de gas. Cuando los tiempos de retención de un compuesto con estas columnas son idénticos a los tiempos de retención de cierto estándar de plaguicida, se puede estar razonablemente seguro de que el plaguicida en cuestión se encuentra presente en la muestra.

La técnica alternativa tal vez más usada en los tres casos indicados es la ya mencionada cromatografía en capa delgada.

Usada conjuntamente con aparatos tales como un densímetro, puede proporcionar resultados cuantitativos bastante exactos, aunque su sensibilidad es normalmente mucho más baja que en el caso de la CG y, por lo tanto, es necesario concentrar extractos de muestra antes de su aplicación a la placa. Además, dicha técnica es muy útil en muchos casos para las rápidas pruebas de "tamizaje", y a menudo se usa para el propósito de "limpieza" previa a la cromatografía de gas.

Para los organofosfatos, un buen método confirmatorio lo constituye la cromatografía en capa delgada (CCD) con detección enzimática, en vez de las más comúnmente usadas, que involucran agentes cromogénicos o luz ultravioleta.

En el caso de residuos de plaguicidas clorados, frecuentemente ocurren identificaciones equivocadas en la cromatografía de gas con detección por captura de electrones, y aún en la CCD, siendo el resultado de interferencias por parte de compuestos plaguicidas coextraídos, productos naturales y contaminantes externos. Una técnica útil en estos casos es la derivatización, o sea la conversión química en productos derivados. Adición, oxidación, reestructuración, decoloración, reducción y dehidrocloración son los procedimientos más frecuentemente usados. El extracto es normalmente evaporado hasta seco y se procede con la reacción. Luego la mezcla se extrae con un disolvente y el extracto se inyecta de nuevo en el cromatógrafo de gas. El pico original debe haber desaparecido y en su lugar aparece un nuevo pico. Paralelamente y con propósitos de comparación, se debe llevar a cabo el mismo procedimiento con una solución del plaguicida estándar.

Otro método de identificación es la determinación del valor "p" de un compuesto. Este valor es el coeficiente de partición de un compuesto entre dos líquidos inmiscibles; por ejemplo hexano y acetonitrilo, aunque con una definición un tanto distinta. Se han determinado y publicado valores "p" para muchos plaguicidas, usando varios pares de disolventes. Su desventaja estriba en que, en el caso de compuestos de iguales polaridades, los valores "p" quedan muy cerca el uno del otro y no se pueden determinar (6).

## Otras Técnicas Analíticas Aplicables a la Determinación de Ciertos Residuos de Plaguicidas

La cromatografía de gas, apoyada por sus técnicas confirmatorias, ha logrado dominar a tal grado el paso final (identificación y cuantificación), que otras técnicas encuentran relativamente mucho menos aplicación en este campo. Sin embargo, en casos específicos, tanto las técnicas más antiguas que precedieron a la cromatografía de gas, como las más nuevas encuentran aplicación.

Entre las comprendidas en el primer grupo se puede citar la extensión de colorometría a espectrofotometría visible, ultravioleta, infrarroja y espectrofluorometría, así como la polarografía y la chromatopolarografía. Para plaguicidas no volátiles en la fase gaseosa está logrando creciente aplicación la moderna técnica de cromatografía en fase líquida, usando altas presiones ejercidas sobre columnas de fase estacionaria. A los nuevos métodos particularmente aplicables a la identificación de metabolitos de plaguicidas y otros compuestos desconocidos, pertenecen la espectrometría de masa combinada con la cromatografía de gas, la resonancia magnética nuclear, y las técnicas immunológicas. La cobertura de este tema no nos permite entrar en detalles con respecto a estos últimos métodos.

Por último, cabe mencionar el creciente uso e importancia de la automatización, así como el empleo de integradores y computadores electrónicos. Se ha lanzado al mercado una variedad de instrumentos de este tipo especialmente aplicables a cromatógrafos de gas y otros instrumentos. Esto ha permitido aumentar en forma muy considerable el rendimiento de un laboratorio, eliminando al mismo tiempo muchos de los errores humanos que ocurren en el cálculo e interpretación de los resultados.

### Resumen y Conclusión

Enfrentando la creciente multiplicidad y complicidad de agentes químicos usados en la agricultura, la industria, y la salud pública, compuestos que a menudo dejan residuos en el ambiente potencialmente peligrosos, aun cuando se encuentran presentes en cantidades muy pequeñas, la ciencia y particularmente la química analítica ha respondido con técnicas que permiten detectar, identificar y cuantificar dichos residuos hasta concentraciones de una parte por billón, y aún menos. La técnica central de más aplicación y utilidad en este campo es la cromatografía en fase gaseosa. En su apoyo se están introduciendo más y más instrumentación y automatización. Sin embargo, el elemento esencial y crucial en esta rama de la química analítica más complicada y laboriosa es el químico mismo, inteligente, bien entrenado y con suficiente experiencia. Del uso apropiado que él haga de los métodos e instrumentos, por un lado, y de la interpretación adecuada de los resultados obtenidos, por el otro, depende en última instancia el éxito del control de la contaminación del ambiente, incluyendo en primer lugar los alimentos, con los residuos de plaguicidas.

## Referencias

1. Breitner, H. J. O. Pesticide residue analysis. Presentado en: Reunión Latinoamericana y del Caribe sobre Residuos de Plaguicidas, Brasilia, D. F., Brasil, 9 a 15 de abril de 1972.
2. Cook, J. W. Pesticide multiresidue methodology. FDA Papers, November, 1968, p. 4-10.
3. McNair, H. M. & E. J. Bonelli. Basic Gas Chromatography. 5a. ed. Walnut Creek, California, Varian Aerograph, 1969, 303 p.
4. Ettre, L. S. & A. Zlarkis. The Practice of Gas Chromatography. New York, N. Y., Interscience Publishers, 1967, 591 p.
5. Ettre, L. S. & W. H. McFadden. Ancillary Techniques of Gas Chromatography. New York, N. Y., Wiley-Interscience, 1969, 395 p.
6. Van der Velden, H. Modern methods of pesticide residue analysis. Mitt. Lebu. Hyg., 43:153, 1972.