

## ANÁLISIS DE LOS PLAGUICIDAS

Dr. A. E. OLSZYNA MARZYS

### A. ESBOZO HISTORICO Y PRIMEROS METODOS

Se pueden distinguir tres generaciones de plaguicidas.

Hasta 1840 la mayoría de los agricultores consideraba las plagas como algo que uno tenía que aceptar, como la voluntad de Dios.

En los últimos años de la década de 1840 M. Grison, de Versailles, Francia, descubrió que la mezcla de cal y azufre constituía una cura contra el mildew (mildíu) polvoroso (*Leptinotarsa desemlineata*), una plaga de uvas. Luego se descubrió que el polvo de azufre solo tenía el mismo efecto.

En 1865 se introdujo al "verde París" (acetoarsenito de cobre) contra el escarabajo de la patata (escarabajo de Colorado), que permaneció como insecticida principal hasta la introducción del arseniato de plomo en 1892.

Hacia 1880 se descubrió accidentalmente que una combinación de sulfato de cobre con cal, llamado "calcio burtelés", constituía un fungicida eficaz contra el mildew de primavera (*Plasmopara vitícola*).

Con estos descubrimientos el control químico de las plagas se encontró bien establecido a fines del siglo XIX. En la Exposición Colombina en Chicago en 1893 figuraban ya cuarenta y dos insecticidas patentados.

Todos estos plaguicidas de la primera generación eran sustancias inorgánicas halladas en la naturaleza, tales como minerales de azufre, cobre y arsénico, o preparaciones y mezclas artificiales que tenían arsénico, antimonio, plomo, mangano, plata o fluoruros, cloratos, cianuros, tiocianuros, isocianuros, etc., así como productos orgánicos naturales, tales como fenoles que resultan en el proceso de ahumado de ciertos tipos de madera, extracto de tabaco, rotenona de raíz de derris y piretro.

Cualquier análisis de residuos de estos plaguicidas de la *primera generación* estaba inspirado predominantemente por consideraciones comerciales como el mantenimiento de un producto apto para la venta y el costo del pesticida a bajo nivel. Las pruebas variaban desde las organolépticas hasta colorimétricas y de fotometría de llama. Aunque esta última técnica fue desarrollada por Bunsen y Kirchhoff hace más de cien años, los límites inferiores de detección obtenidos con ella 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 mediante la mancha analítica de Feigl usando dietilo-ditíocarbarnato de cinc como reactivo, por medio de la cual 0,04 parte por millón de cobre puede ser detectada en un alimento. Muchas técnicas colorimétricas fueron desarrolladas para la determinación de los plaguicidas tanto de primera como de segunda generación. Unas son muy específicas, otras representan reacciones de grupos de compuestos. Se comparan intensidades de color desarrollado correspondientes a las cantidades del compuesto en cuestión, visiblemente o por medio de fotocolorímetro.

La *segunda generación* de plaguicidas nació durante la Segunda Guerra Mundial con la introducción del DDT como insecticida, seguido por otros productos orgánicos químicos sintéticos. Nuevas sustancias activas continúan apareciendo. Varios centenares están en uso ahora, formulados en más de diez mil productos comerciales.

Debido a su uso tan extendido, el control por parte de las autoridades de la calidad de los alimentos con vista a la seguridad del consumidor, pasó a ser el propósito principal del análisis de residuos de estos plaguicidas orgánicos, lo que a su vez trajo nuevos problemas. La mayoría de aquéllos no se puede detectar orgánicamente. No se pueden determinar por métodos inorgánicos ahora muy bien desarrollados por contener 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 incorporados metales, permitiendo la aplicación de la *espectrometría de la emisión de llama o absorción atómica*. Para la vasta mayoría de los ingredientes activos tuvieron que ser desarrollados nuevos métodos analíticos, y para propósitos generales se adoptaron *ensayos biológicos*. Estos métodos, usando organismos de prueba susceptibles, son técnicas relativamente fáciles, especialmente adecuadas para los laboratorios no equipados con instrumentos costosos, o en caso de aquellos venenos para los cuales los métodos químicos de análisis de sus residuos no han sido desarrollados o son demasiado complicados.

Los métodos biológicos tienen también la ventaja sobre otros métodos porque detectan metabolitos tóxicos que se comportan químicamente de manera distinta de sus parientes y por lo tanto no se pueden detectar a menos que se conozca su natura-

leza. Puesto que para el entomólogo es la actividad biológica y no la presencia o ausencia de los compuestos específicos la que tiene importancia, el bioensayo es el mejor método de análisis de residuos desde su punto de vista. Sin embargo, esta técnica no es lo bastante sofisticada como para determinar la cantidad exacta del residuo y no 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 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 todavía muy usada en el caso de los compuestos inhibidores de esta enzima, como son los organofosfatos y carbamatos.

La *cromatografía en papel*, luego extendida a la *cromatografía en capa fina (delgada)*, se estableció temprano como método preferido. La cromatografía es un método de análisis inmediato por percolación de un líquido o un gas a través de una materia porosa o pulverulenta; se produce mediante intercambios repetidos entre fases, separándose los constituyentes de la fase móvil como consecuencia de sus diferentes velocidades de migración.

Los intercambios se producen, pues, entre una fase fija y otra móvil.

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), haciendo aparecer después del desarrollo con un agente cromogé-

nico (que produce color) numerosas manchas a diferentes niveles. Estos niveles corresponden a los distintos componentes distribuidos según sus distancias de migración en relación con la del frente del solvente. Dicha razón se llama valor  $R_f$ . La intensidad del 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 absorbente (lo más frecuentemente, gel de sílice o alúmina) esparcido en una delgada capa de alrededor de 0,25 mm. El adsorbente está generalmente mezclado con yeso y se iguala al espesor en un aparato especial obteniéndose una cromatoplaque. La ventaja sobre la cromatografía en papel es mayor velocidad y la separación mejor definida de los componentes. Esta técnica sigue en el campo de plaguicidas como una importante y rápida técnica confirmatoria complementando la más usada cromatografía de gas, así como técnica principal en el caso de plaguicidas no volátiles en las temperaturas usadas en la cromatografía de gas.

Un elegante método de determinación cualitativa y cuantitativa de un número de plaguicidas simultáneamente, es la *cromatografía en fase gaseosa* o más brevemente llamada cromatografía de gas.

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 pocos años esta técnica se ha convertido, especialmente con el detector de captura de electrones (DCE), en el método preferido para los plaguicidas clorados, los que se usa-

ban predominantemente en la época. Con el uso aumentado de otros plaguicidas, detectores nuevos y específicos fueron desarrollados o mejorados. Dedicaremos una atención especial a esta técnica.

## B. DESARROLLO DEL PROCEDIMIENTO DE MULTIRESIDUO

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 aun más tóxicos. Consecuentemente, algunos científicos, particularmente de la Administración de Alimentos y Drogas de los Estados Unidos han desarrollado los llamados métodos de "multiresiduo", que permiten determinar varios plaguicidas simultáneamente. Por medio de éstos métodos, un químico con adiestramiento, experiencia y equipo adecuados puede identificar y determinar cuantitativamente en pocas horas alrededor de unos sesenta plaguicidas, en una sola muestra de cualquier alimento. Esto es más de lo que podrían hacer cincuenta o más químicos que analizaran por separado cada residuo.

Dicho procedimiento, adoptado también en nuestro laboratorio, está basado en la cromatografía de gas; no obstante, esa técnica únicamente forma parte, aunque importante, del proceso total. En general el método puede dividirse en cuatro fases principales:

- 1) Muestreo
- 2) Extracción

3) Aislamiento (comúnmente llamado "limpieza") y

4) Determinación (identificación y cuantificación).

La cromatografía de gas se usa principalmente en la fase 4. El muestreo apropiado tiene la misma importancia que en cualquier trabajo analítico, y las etapas 2 y 4 están interrelacionadas. Como en cualquier análisis, y con pocas excepciones—por ejemplo, las relacionadas con la radioactividad—, es casi siempre 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 el residuo químico que se quiere determinar.

Para la extracción, la muestra se homogeniza con acetonitrilo, solvente 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 granuloso que adsorbe tanto los plaguicidas como las impurezas restantes. Estas últimas incluyen sustancias colorantes naturales de las plantas. Seguidamente los plaguicidas se eluyen de la columna con mezclas selectivas de solventes, normalmente con tres mezclas de éter de petróleo en proporciones crecientes de éter etílico, y los plaguicidas se dividen en tres grupos para facilitar la cromatografía, mientras que las impurezas permanecen en la columna. Sólo entonces los plaguicidas están 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. Después de usada, la cristalería se lava con ácido crómico, agua hirviendo con detergente y se desagua varias veces con agua del chorro y con agua destilada. Luego se seca en la estufa a 130° C, se enfría 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, si fuese necesario, con reactivos especiales. Los solventes son los mismos que se utilizan para lavar la cristalería. Cabe señalar que en el análisis de residuos, las cantidades de solventes purísimos que se usan son realmente considerables.

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

La base de la separación de una mezcla de sustancias volátiles por cromatografía de gas es su distribución entre dos fases. Una de éstas es estacionaria y consiste de un sólido de gran superficie, ya sea sólo o actuando como soporte para una capa líquida. La otra es el mismo

gas percolando por dicha *cama* estacionaria.

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 de los diferentes componentes de la mezcla (*cromatografía de gas-sólido*). En el otro, de la participación de los componentes entre la capa de líquido 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 en 1952 Martin y Syngge introdujeron la cromatografía de gas (por lo 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 sesenta mil cromatógrafos de gas en el mundo y que más de veinte mil trabajos han sido publicados sobre el tema, con una tasa de incremento de publicaciones de mil ochocientos a dos mil por año.

## C APLICACION DE LA CROMATOLOGRAFIA DE GAS A LA DETERMINACION DE PLAGUICIDAS

*1. El sistema cromatográfico.* Las partes básicas de un cromatógrafo de gas 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 de la muestra (puerto de inyección).
4. Columna con su empaque.
5. Detector (con electrónica necesaria).
6. Registrador.

7. Termostatos para inyección, columna y detector.

*II. 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 en 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 con 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 identifican 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 de un planímetro, cortando y pesando los picos, o bien valiéndose de integradores conectados al aparato, mecánicos (*de disco*) o electrónicos.

**III. Columnas.** La columna es el corazón del cromatógrafo de gas, cuya tubería puede ser de cobre, aluminio, acero inoxidable y vidrio. Los dos últimos materiales son los de mayor uso, bien en forma recta, doblado en U o en espiral. Su longitud varía desde unos pocos centímetros hasta más de veinte metros (de uno a tres metros el más común) 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 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 CGL. Las fases líquidas estacionarias son normalmente líquidas 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 coeficientes de distribución. Además existen columnas capilares muy largas sin empaque.

**IV. 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 más recientes sobre la cromatografía de gas, el de Ettre y Zlatkis, señala la existencia de cuarenta y cuatro tipos distintos de detectores. Sin embargo, los más comunes son tres:

- 1) de conductividad térmica (catarómetro).
- 2) de ionización de flama y
- 3) de captura de electrones.

Los dos primeros se acercan a lo que podría denominarse *detectores universales*, mientras que el de captura de electrones es un tanto más

específico y sensible a los compuestos electronegativos.

Aunque la cromatografía de gas-líquido (CGL) fue desarrollada en la década del cincuenta, los primeros detectores, incluso el de ionización de flama, no eran útiles para la determinación de plaguicidas hasta que Coulson, en 1960, inventó el detector *microculómetro* que medía continuamente la cantidad de ácido clorhídrico producido por combustión de plaguicidas clorados en un horno de tubo. El detector de *conductometría de Coulson*, específico también para azufre o nitrógeno, ha reemplazado en la mayoría de los laboratorios al microculómetro, pero desde 1964 el detector de captura de electrones ha sido el más empleado para el análisis de residuos de plaguicidas.

El *catarómetro* es uno de los detectores más antiguos y su principio operativo consiste en que la capacidad de conducir el calor desde un filamento calentado de tungsteno depende de la composición del gas que lo rodea. Las diferencias en la disipación del calor hacen variar la resistencia del filamento, cambios que se manifiestan en el registrador. En comparación con los detectores más nuevos el catarómetro es poco sensible, y la cantidad mínima detectable es de 2 a 5 g. esto es, 100 ppm en 25  $\mu$ l de líquido. Necesita helio como gas portador.

El detector de *ionización de flama* es mucho más sensible a todos los compuestos orgánicos (hasta  $2 \times 10^{-11}$  g). Es insensible a los gases fijos y al agua, por lo tanto es útil para el análisis de soluciones acuosas diluidas. En este detector se usa hidrógeno y aire para producir una flama y el electrodo colector con un potencial DC, colocado por encima de ella, mide su conductividad. Con hidrógeno puro, dicha conductividad es muy baja, pero ésta aumenta cuando se queman compuestos orgá-

nicos que salen de la columna; la corriente que pasa se amplifica, alimentándose así el registrador.

El principio contrario se aplica en el detector de *captura de electrones* ya que en este caso se mide la pérdida de señal más bien que una corriente eléctrica positiva. Cuando el gas de arrastre (nitrógeno) pasa por el detector, una fuente radiactiva (tritio o  $Ni^{63}$ ) ioniza las moléculas de nitrógeno 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 electro-negativos, 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 en una fracción de picogramo (o sea de  $10^{-12}$  g), particularmente en el caso de hálidos.

**V. Nuevos detectores específicos.** La introducción de detectores de gran sensibilidad, tales como de ionización de flama y de captura de electrones, ha permitido una reducción drástica del tamaño de la muestra y, por consiguiente, una separación más perfecta de sus componentes.

Desgraciadamente estos detectores ionizantes responden casi a todos los componentes de tipo similar (no polares con la ionización de flama y

electronegativos en el caso de la captura de electrones), lo que no les permite medir pequeños componentes trazas en presencia de grandes excedentes de otros compuestos, a menos que éstos se separen antes por otros medios.

Los nuevos detectores *específicos* permiten medir específicamente y con precisión perfiles de picos de ciertos compuestos, a pesar de que al mismo tiempo estén presentes en el detector grandes excedentes de otros. Además, con un electrómetro y registrador de canal doble y dos plumas, una operación simultánea de combinaciones apropiados de detectores puede indicar virtualmente todos los componentes de una mezcla en un canal, mientras que el otro proporciona identificación específica elemental.

Ejemplos de estos nuevos detectores específicos son el detector de *fotometría de flama de Melpar* y el de *conductividad eléctrica de Coulson*, los cuales fueron introducidos comercialmente durante el año 1968.

El uso creciente de plaguicidas organofosforados llevó a trabajar en un detector selectivo de fósforo. El primero de éstos fue un detector de ionización de flama modificado (*termoiónico*). 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 Melpar se basa en el hecho de que cada elemento produce un espectro de emisión característico 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 desdoblan 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 emisión de 526  $m\mu$  característica de ese elemento; el filtro de 394  $m\mu$  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 aquellos que contienen fósforo o azufre, según se desea.

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

El otro nuevo detector, *Coulson*, es específico para compuestos orgánicos de nitrógeno, halógenos y azufre. Un horno de porólisis oxida o reduce esos compuestos con oxígeno o hidrógeno, respectivamente. Los productos de la reacción forman electrolitos cuando se disuelven en el agua deionizada circulando en la célula 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.

Al igual que el Melpar, el Coulson

puede usarse también en combinación con otros detectores, *menos específicos*, pero más sensibles. Por ejemplo, en un extracto de un roedor expuesto a plaguicidas clorados, la curva A obtenida por captura de electrones tiene una multitud de picos, mientras que la curva B (Coulson) tiene dos solamente, que corresponden a DDE y DDT. De las posiciones de los picos en la curva B se pueden seleccionar picos que aparecen en posiciones idénticas en las curvas A y medirse con más precisión, ya que el detector de captura de electrones es diez veces más sensible.

Puede agregarse que el cromatógrafo *Micro Tek MT220* de cuatro columnas, recientemente adquirido por el INCAP, tiene todos los detectores descritos (salvo el catarómetro, que en la actualidad se considera obsoleto). Además, su detector de ionización de flama es doble, lo que permite usarlo como dos detectores separados o como un detector diferencial para su operación combinada con la programación de temperatura.

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 EC (detector de captura de electrones). Una de las plumas del registrador, la conectada con el EC, 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 EC. 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 restar:do esta cantidad del pico compuesto en el EC.

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 Florisil. Por ejemplo, p,p'-DDE, que frecuentemente, y según el tipo de columna, 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 diferentes patrones de retención, de manera que las parejas no se separan en una de las columnas: se separan en la otra, una de las dos columnas más utilizadas por nosotros, pudiéndose observar que el lindano no se separa del  $\beta$ -BHC y o,p'-DDT de la endrina. En cambio estos compuestos sí se separan en la segunda columna, mientras que  $\beta$ -BHC casi no se separa del heptacloro. Si todavía hay 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.

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 presentadas. Estas pueden implicar únicamente el uso de diferentes combinaciones de solventes y materiales de cromatografía en columna para la extracción y limpieza, como el caso de los insecticidas fosforados más polares. En otros, cuando los miembros de determinado grupo no son lo suficientemente vo-

látiles o estables en las temperaturas del cromatógrafo, se preparan derivados estables volátiles, usualmente éteres de distintos tipos, como en 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 multiresiduo aplicables a los insecticidas clorados y fosforados.

#### D. MODERNAS TÉCNICAS AUXILIARES Y CONFIRMATORIAS

Aunque la cromatografía en fase gaseosa constituye hoy en día la base de la mayoría de los procedimientos analíticos de determinación de residuos de pesticidas, siempre se necesitan métodos alternativos para confirmar los resultados así obtenidos, tanto como para su uso por parte de laboratorios que no cuentan con aquella técnica.

Rutinariamente y como el primer paso de confirmación se emplean 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 standard de plaguicida, uno 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 arriba indicados es la *cromatografía en capa delgada*.

Empleada conjuntamente con aparatos tales como un densitómetro, puede proveer resultados cuantitativos bastante exactos, aunque su sensibilidad es normalmente mucho más bajo que en el caso de la CG y por

lo tanto extractos de muestra se tienen que concentrar antes de su aplicación a la placa. Además, dicha técnica es muy útil en muchos casos para las rápidas pruebas de *tamizaje*, y se usa frecuentemente para el propósito de la *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 involucrando agentes cromogénicos o la luz ultravioleta.

Aún poco desarrollada en su aplicación en el ramo de residuos de plaguicidas, ha entrado recientemente en este campo la cromatografía *Líquido = líquido*, usando altas presiones ejercidas sobre las columnas de fase estacionaria.

En el caso de residuos de plaguicidas clorados, ocurren frecuentemente identificaciones equivocadas en la cromatografía de gas con detección por captura de electrones y aun en la CCD, resultado de interferencias por parte de compuestos plaguicidas co-extraídos, 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, decloración, 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 de reacción se extrae con un disolvente y el extracto se inyecta nuevamente en el cromatógrafo de gas. El pico original debe haber desaparecido y un nuevo pico aparece. Paralelamente se debe llevar a cabo el mismo procedimiento con una solución de plaguicida standard con el propósito de comparación.

Otro método de identificación es la determinación del *valor "p"* de un compuesto. Este valor es el coe-

ficiente de partición de un compuesto entre dos líquidos inmiscibles, por ejemplo, hexano y acetonitrilo; aunque con una definición un tanto distinta. Valores "p" han sido determinados y publicados para muchos plaguicidas usando varios pares de disolventes. Su desventaja es que en el caso de compuestos de iguales polaridades los valores "p" quedan muy cerca uno del otro y no se pueden determinar.

Una técnica más antigua que la cromatografía de gas y que se ha desarrollado independientemente de esta última es la *polarografía*. Esta técnica es una rama de la química electroanalítica que trata con la medición e interpretación de las relaciones entre la corriente y el voltaje durante la electrólisis de una solución entre dos electrodos, uno de los cuales es muy pequeño. Ese último consiste normalmente de una goteadora de mercurio llamada "DME" que tiene la propiedad de ser fácilmente polarizable y da resultados exactamente reproducibles. El otro electrodo es no polarizable y se llama electrodo de referencia.

El procedimiento consiste en aplicar gradualmente una diferencia creciente de potencial en solución entre los dos electrodos y en medir la corriente en la solución entre los mismos. Si la solución contiene una sustancia oxidable o reducible, una reacción se producirá sobre la DME cuando se alcance el potencial de reducción u oxidación de la especie electroactiva. Este potencial es característico de la sustancia que se reduce u oxida. La curva potencial-corriente se caracteriza entonces por una *grada* representando el aumento de la corriente cuya altura depende de la concentración de la sustancia en la solución. Este aumento de la corriente se llama "corriente de difusión".

Cualquier compuesto o ion que contiene grupos altamente polares o conjugados no saturados puede en

principio ser reducido u oxidado sobre el DME. De esta manera se pueden determinar en la misma solución simultáneamente iones inorgánicos (cinc, cobre, plomo, etc.) y compuestos orgánicos tales como plaguicidas clorados, fosforados o carbamatos.

Una de las aplicaciones más prometedoras de la polarografía es su combinación directa con la cromatografía en fase gaseosa, capa delgada o papel, resultando en *cromato-polarografía*, lo que permite una identificación más segura y determinación más exacta de residuos de plaguicidas.

Siempre en el campo de técnicas instrumentales, con el desarrollo de espectrofotómetros comerciales la antigua técnica de colorimetría y luego fotocolorimetría ha sido expandida de la región de luz visible a las regiones vecinas, resultando en la *espectrofotometría ultravioleta e infrarroja*, y la *espectrofluometría*.

En la primera se aprovecha la absorción de la luz ultravioleta que resulta en la excitación de los electrones desde su estado básico a niveles más altos de energía. Los mayores contribuyentes a los espectros electrónicos son los electrones formando enlaces sencillos y múltiples así como parejas de electrones no compartidos, resultando en una correlación entre el espectro UV y la estructura que se puede utilizar para la identificación y determinación cuantitativa de un número de plaguicidas al nivel de nanogramo.

En la espectrofotometría infrarroja, las bandas de absorción son producidas por vibraciones de grupos funcionales. Las tablas de correlaciones entre las dos son bien conocidas, y han sido usadas rutinariamente por químicos orgánicos o analíticos para caracterizar e identificar compuestos de identidad desconocida al nivel de miligramo. En años recientes se han desarrollado microtécnicas que han permitido su utilización al nivel de microgramo.

En la espectrofluometría, se mide la intensidad de fluorescencia de determinada longitud de onda producida por irradiación de un compuesto; se utiliza en unos pocos casos en el análisis cuantitativo de ciertos plaguicidas.

Tanto en la espectrofotometría ultravioleta como infrarroja y particularmente en esta última, se necesita la extracción y aislamiento del compuesto de interés de sus impurezas. Dicha separación se lleva a cabo por medio de cromatografía de gas, atrapando fracciones que salen del cromatógrafo según indicación de sus picos característicos, o por medio de cromatografía de capa delgada. La primera técnica se usa más con espectrofotometría ultravioleta; la segunda con la infrarroja.

La baja gradual del costo de los espectrofotómetros infrarrojos ha contribuido a su disponibilidad para la mayoría de los analistas de residuos de plaguicidas, en contraste a la *espectrometría de masa* y la *resonancia magnética nuclear*. La sensibilidad de las mediciones infrarrojas con fines de identificación es únicamente excedida por la espectrometría de masa, siendo esa primer técnica mucho menos cara. Sin embargo, no cabe duda de que la recién lograda combinación de la espectrometría de masa ha provisto al químico analítico con la herramienta más poderosa de identificación de compuestos orgánicos, especialmente adaptada al campo de análisis de residuos de plaguicidas, el cual se encuentra complicado por la posible producción de numerosos metabolitos.

En la espectrometría de masa, un rayo electrónico incidente se usa para quitar electrones de los átomos de una muestra colocada en una cámara de ionización. Los iones positivos resultantes son entonces acelerados por medio de un alto potencial dentro de un campo magnético. Dichó campo se encuentra en ángulo recto

en relación a la dirección del movimiento de los iones, de manera que estas partículas se mueven con una trayectoria circular. Con un voltaje acelerante y la fuerza del campo constantes, todas las partículas de la misma masa siguen una trayectoria del mismo radio y son enfocados sobre un colector que normalmente está conectado con un electrómetro. La señal resultante se amplifica aún más y se registra. Si se cambia el voltaje acelerante o la fuerza de campo dentro de determinados límites, iones de masas distintas se enfocan sobre el colector, obteniéndose una serie de picos conocidos como espectro de masa.

Nos queda mencionar dos técnicas de índole totalmente opuesta, de relativamente poca aplicación hasta la fecha en la química analítica de plaguicidas: la *resonancia magnética nuclear* y las *técnicas inmunológicas*.

En la primera, explota la interacción resonante entre un campo de radiofrecuencia y protones en una muestra colocada en un campo magnético para la identificación de compuestos mediante la variación de la frecuencia o del campo magnético.

La aplicación de técnicas inmunológicas se ha limitado hasta ahora a la investigación de la posibilidad de detección de unos pocos metabolitos de plaguicidas. Esta técnica se podría desarrollar potencialmente como método suplementario para tamizaje rápido y pruebas confirmatorias.

Por fin, cabe mencionar el creciente uso e importancia de la *automatización*, así como el uso de *integradores* y *computadoras* electrónicos. Una variedad de instrumentos de este tipo especialmente aplicables a cromatógrafos de gas y otros instrumentos, ha sido lanzada al mercado permitiendo aumentar muy considerablemente el rendimiento de un laboratorio, eliminando al mismo tiempo muchos de los errores hu-

manos en el cálculo e interpretación de los resultados.

## LA QUIMICA DE LOS PLAGUICIDAS

### I. INTRODUCCION

- A. Alcance de la industria
  1. 2 billones de libras por año.
  2. Más de 90.000 formulaciones, representando más de 900 tipos de especies químicas.
- B. Razones del interés en los plaguicidas
  1. Son esenciales.
  2. La mayoría es muy venenosa.
  3. Pueden ser modificados químicamente para volverse más peligroso o menos, por:
    - a. Metabolismo
    - b. Reacciones químicas
      4. Algunos se encuentran en humanos y animales.
      5. Persistencia.
      6. Ciertos compuestos actúan conjuntamente para aumentar su toxicidad combinada muchas veces.
      7. Algunos son relativamente seguros.
      8. Residuos de los compuestos persistentes se encuentran por todos lados.
- C. Sistema de clasificación
  1. Uso
    - a. Insecticida - mata insectos
    - b. Herbicida - mata malezas
    - c. Fungicida - impide enfermedades de plantas.
    - d. Rodenticida - mata ratas y otros roedores.
  2. Química - de acuerdo con su especie o tipo químico.

### II. CONSIDERACIONES QUIMICAS BASICAS

- A. Compuestos inorgánicos
  1. Estructuras sencillas
  2. Dos o tres componentes

3. Unidos por enlaces electrónicos

4. Solubles en agua

5. Se ionizan en el agua para volverse compuestos individuales.

6. Actúan rápidamente.

#### B. Compuestos orgánicos

1. Siempre contienen carbono e hidrógeno.

2. Pueden contener heteroátomos -elementos otros que carbono e hidrógeno.

3. Se disuelven en solventes orgánicos.

4. Usualmente actúan lentamente.

5. Unidos por enlaces covalentes - compartiendo cargas eléctricas.

a. Covalentes

b. Coordinatos covalentes

6. Pueden tener un gran número de componentes.

7. Usualmente tienen un número muy limitado de puntos de reacción o enlaces débiles

8. Usualmente son estructuras complejas.

### III. INSECTICIDAS

#### A. Organoclorados (hidrocarburos clorados)

1. Adición de cloro a los compuestos orgánicos

2. Muy estables y persistentes

3. No selectivos-espectro amplio

4. Se concentran en tejidos humanos y animales

5. Subgrupos

##### a. Clorobenzilato-grupo DDT

1) Miembros principales

a) DDT's

b) Metoxicloro

c) Pertano

d) Keltano

2) Isomerismo

a) p,p'-DDT

b) o,p'-DDT

3) Degradación

a) DDE

b) DDD (TDE)

c) DDA

##### b. Ciclohexano-grupo de HCH (BHC)

1) Isómetros

2) Estabilidad

##### c. Ciclodieno - grupo de aldrina

1) Miembros principales

a) Aldrina

b) Dieldrina

c) Endrina

d) Heptacloro

e) Clordano

2) Isomerismo

a) Dieldrina

b) Endrina

3) Degradación

a) Decloración

b) Heptacloro Epóxido

##### d. Fumigantes

1. Miembros principales

a) Bromuro de metilo

b) Dibromuro de etileno

c) Dicloruro de etileno

#### B. Organofosfatados

1. Esteres de ácido fosfórico

2. Extremadamente tóxicos en la mayoría de los casos

3. Muy inestables - no persistentes

4. No se concentran en los tejidos

5. Insecticidas del espectro amplio.

6. Caros

7. Subgrupos

##### a. Alqueno - tipo vinilo

1) Bidrina

2) Diclorvos (DDVP)

3) Triclorfón

##### b. Alcano - tipo saturado

1) Malatión

2) Forato (timeto)

3) Dimetoato

##### c. Aromático - tipo anillo

1) Paratión

2) Diazinón

3) Paratión-metilo

4) Ronnel

5) Gutión

6) EPN

##### d. Pirfosfato

1) TERP

8. Degradación

a. Hidrólisis al ácido y alcohol

b. Dealquilación - pérdida o reempla-

- zo de un grupo alquilico.
- c. Oxidación
- C. Carbamatos
1. Esteres del ácido carbámico
  2. Toxicidad baja (hay excepciones).
  3. Bastante inestables-no persistentes.
  4. No se concentran en los tejidos.
  5. Plaguicidas del espectro amplio.
  6. Subgrupos
    - a. Monometilo
      - 1) Carbarilo (Sevin)
      - 2) Temik
      - 3) Zectrano
    - b. Dimetilo
      - 1) Dimetilán
  7. Degradación
    - a. Hidrólisis al alcohol e isocianuro de metilo
    - b. Pueden oxidarse

#### IV HERBICIDAS

- A. Generalidades
1. Aumento considerable del uso.
  2. Comprende el número más grande de distintas especies químicas
  3. Toxicidad, metabolismo y degradación química no han sido bien investigadas.
  4. Productos de descomposición potencialmente peligrosos han sido hallados.
  5. Consumimos herbicidas.
- B. Carbamatos
1. Anillos substituidos
  2. Actúan de manera algo similar a los carbamatos insecticidas.
  3. Hidrólisis produce anilina
  4. CIPC
- C. Tiocarbamatos
1. Contienen azufre en la molécula
  2. Pueden oxidarse

3. Actúan de manera similar a los carbamatos
  4. Ordram
- D. Ureas substituidas
1. Observar urea como raíz
  2. Compuestos muy estables
  3. Monurón
- E. Metalo - orgánicos
1. Uso muy extenso
  2. Compuestos seguros
  3. Acido cacodílico
  4. Inactivados por el suelo
- F. Triazinas substituidas
1. Amino triazolo
    - a. Muy reactivo
    - b. Puede ser bociogénico
      2. Simazina
        - a. Muy estable
- G. Anilinas substituidas
1. Hidroliza a la anilina
  2. Comprenden compuestos tanto seguros como no muy seguros.
  3. Trifuralina
  4. Stam (propanilo)
  5. Generalmente persistentes no reactivos
- H. Fenoles
1. Reactivos
  2. Fácilmente reducidos a la anilina.
  3. Pueden ser peligrosos
  4. DNOC
- I. Acidos orgánicos
1. Acidos de cadena sencilla substituidos
  2. Muy estables - persistentes
  3. 2,4-D
    - a. Se acumula en los tejidos
    - b. Más tóxico que el DDT
    - c. Origen - regulador del crecimiento de las plantas.

#### V. FUNGICIDAS

- A. Usualmente el grupo menos tóxico de todos los plaguicidas - algunas excepciones.

B. *Poca investigación de la degradación.*

C. *Metales pesados*

D. **Organohalógenos**

1. **Pentacloronitrobenceno**

- a. Muy estable y resistente
- b. Se reduce a la anilina

2. **Pentaclorofenol**

- a. Conservador de madera
- b. Muy estable
- c. Ubicuo
- d. Peligroso

E. **Quinones**

1. **Cloranilo**

- a. Estable - persistente
- b. Virtualmente no tóxico
- c. Irritante para las membranas

F. **Triazinas**

1. **Direno**

- a. Tanto fungicida como herbicida
- b. Reacciones similares a las de simazina.

G. **Organosulfuros**

1. **Tiram**

- a. El más popular
- b. Compuesto quelante - captura metales
- c. No tóxico

H. **Tiocarbamatos**

1. **Carbamatos conteniendo azufre.**

2. **Un metal en la molécula**

3. **Muy populares y útiles**

4. **Unos miembros peligrosos**

5. **Miembros**

- a. **Ferbam**
- b. **Ziram**
- c. **Zineb**
- d. **Nabam**
- e. **Maneb**