

ANÁLISIS DE RESIDUOS DE PLAGUICIDAS EN AGUAS

HERNÁNDEZ, F. y BELTRÁN, J.

Grupo de Investigación de Medio Ambiente y Recursos Naturales.
Departamento de Ciencias Experimentales.
Universidad Jaime I, Castellón.

Introducción

Los plaguicidas son sustancias químicas de origen natural o sintético que se utilizan para eliminar o controlar plagas, tanto agrícolas como domésticas.

La amplia utilización de los plaguicidas, tanto en áreas agrícolas y forestales como en industriales, contribuye a la presencia de estos compuestos tóxicos en el medio ambiente, ya que, salvo excepciones como la nicotina y piretrinas, no se encuentran en el medio ambiente de forma natural. De este modo, la existencia de plaguicidas en la atmósfera, suelo y aguas, se debe atribuir a la actividad humana.

Presentan, además, un importante riesgo de bioacumulación a lo largo de la cadena trófica, llegando a alcanzar, en ocasiones, concentraciones realmente alarmantes. Por otro lado, algunas de estas sustancias muestran una elevada persistencia en el medio ambiente, debido a su lenta degradabilidad, lo que hace que puedan encontrarse residuos varios años después de haber aplicado el producto.

Su diferente composición química hace que la determinación sea difícil, ya que no existen procedimientos universales de análisis, debiendo adaptarse el procedimiento para cada caso particular dependiendo del tipo de plaguicida y muestra a analizar. Además, se encuentran al nivel de trazas en muestras, generalmente, de matriz compleja, por lo que los efectos interferentes suelen ser graves.

Para llevar a cabo los análisis se requieren procedimientos y técnicas analíticas muy sofisticados, que se encuentran en continua evolución para afrontar el reto que supone el análisis de residuos de plaguicidas en muestras de interés alimentario y/o medioambiental.

La presencia de plaguicidas en aguas subterráneas es una consecuencia de su utilización, principalmente como productos fitosanitarios en la agricultura. Aunque los datos sobre contenidos de plaguicidas en aguas son todavía escasos, sin duda, debido a la extraordinaria dificultad para la identificación y cuantificación de estos compuestos y de sus productos de degradación el número de evidencias que indican la presencia de cantidades apreciables de plaguicidas en el medio ambiente está aumentando en los últimos años.

Existen diversos criterios para la clasificación de los plaguicidas. El más importante desde el punto de vista analítico consiste en clasificarlos según su **composición química**, de modo que se pueden dividir en:

1) plaguicidas inorgánicos, en donde se incluyen compuestos de arsénico, flúor o azufre.

2) plaguicidas orgánicos de origen natural, como son la nicotina, piretrinas o cinerinas.

3) plaguicidas orgánicos de síntesis, que son la gran mayoría de los compuestos utilizados actualmente.

En este último grupo, y dependiendo de su composición química, se encuentran compuestos como: organoclorados, organofosforados, N-metil carbamatos, ditiocarbamatos, dinitrofenoles, triazinas, derivados del benzimidazol, fenil ureas, fenoxiacidos, tioéteres, piretroides, etc. (figura 1)

Por otro lado, atendiendo a su **uso y aplicación**, se pueden clasificar tal como se indica en la figura 2.

Transformación y movimiento de los plaguicidas en la zona no saturada

La zona no saturada (ZNS) constituye una barrera natural contra la contaminación de las aguas subterráneas gracias a su capacidad de atenuación del avance e intensidad del proceso contaminante en el acuífero. Durante su migración a través de la ZNS, las sustancias disueltas o en suspensión en el lixiviado están sometidas a una serie de procesos de diversa índole -intercambio iónico, adsorción, biodegradación, precipitación, etc- que condicionan su tiempo de tránsito y producen transformaciones en su composición química. En ocasiones, el producto de reacción es más tóxico que el propio plaguicida de partida. Sin embargo, la mayoría de los plaguicidas se transforman en productos menos peligrosos, que no resultan nocivos para el hombre.

El movimiento de los plaguicidas hacia el agua subterránea es un fenómeno complejo en el que influyen numerosos factores, y que se ve afectado, en gran medida, tanto por la capa edáfica (en la que existe una gran actividad biológica) como por la zona no saturada (ZNS), en la que tienen lugar una serie de procesos como la lixiviación, adsorción, etc.

Los fenómenos básicos a los que se ve sometido un contaminante desde su entrada en el medio y que afectan al destino final del plaguicida y de su impacto en el medio ambiente se pueden agrupar en:

CLASIFICACION DE PLAGUICIDAS EN FUNCION DE SU ESTRUCTURA QUIMICA

1) Insecticidas y acaricidas	2) Herbicidas	3) Fungicidas
- Organoclorados	- Inorgánicos	- Inorgánicos
- Derivados ciclodiénicos	- Orgánicos	- Azufre
- Derivados del 2,2-difeniletano	- Aceites derivados del petróleo	- Cobre
- Derivados del ciclohexano	- Derivados organoarsenicales	- Mercurio
- Policloroterpenos	- Acidos fenoxialifáticos	- Orgánicos
- Organofosforados	- Amidas sustituidas	- Ditiocarbamatos
- Esteres fosfóricos	- Nitroanilinas	- Tiazoles
- Efosfórico	- Ureas sustituidas	- Triazinas
- Fosfonatos	- Carbamatos	- Aromáticos sustituidos
- Tiofosfinatossteres tiofosfóricos	- Tiocarbamatos	- Dicarboxiimidias
- Esteres ditioposfóricos	- Heterociclos con nitrógeno:	- Dinitrofenoles
- Amidas de ácido ortofosfórico	triazinas, triazoles, derivados de la	- Quinonas
- Amidas de ácido piro	piridina, uracilos sustituidos	- Organoestánicos
- Organosulfurados	- Acidos alifáticos	
- Carbamatos	- Acidos aril alifáticos	
- N-metil carbamatos	- Derivados fenólicos	
- N,N-dimetil carbamatos	- Nitrilos sustituidos	
- Formamidas	- Bípiridilios	
- Dinitrofenoles		
- Organoestánicos		
- Piretroides sintéticos		
- Compuestos inorgánicos		

Figura 1. Clasificación de plaguicidas según su estructura química

CLASIFICACIÓN DE PLAGUICIDAS EN FUNCIÓN DE SU CAMPO DE APLICACIÓN

1) Pesticidas usados para el control de invertebrados

- Insecticidas
- Molusquicidas
- Nematicidas

2) Pesticidas usados para el control de vertebrados

- Rodenticidas
- Avicidas
- Piscicidas
- Repelentes

3) Pesticidas usados para el control de plantas

- Herbicidas
- Reguladores del crecimiento
- Defoliantes y desecantes

4) Pesticidas usados para el control de microorganismos

- Fungicidas y bactericidas
- Algucidas
- Desinfectantes.

Figura 2.

1) **Retención** del plaguicida (debido a la adsorción por el suelo), la cual no afecta a la cantidad total de plaguicida presente en el suelo pero sí que puede disminuir e incluso eliminar la cantidad disponible para el transporte. Por ello, los procesos de adsorción pueden retardar o retener los plaguicidas en su movimiento hacia el acuífero.

2) **Transformación**, mediante cambios en su estructura química (reacciones de oxidación, reducción, hidrólisis, sustitución o eliminación de grupos funcionales, complejación con iones metálicos, polimerización, etc).

Los plaguicidas también pueden sufrir la rotura de su estructura en fragmentos dando lugar a compuestos inorgánicos como productos finales de reacción (CO_2 , H_2O , haluros, amonio, fosfato, etc). En este caso, el proceso global se conoce como **degradación**, siendo ésta la única vía para que un plaguicida sea totalmente eliminado del medio ambiente. Generalmente, se usa el término transformación para indicar todos los cambios sufridos en la estructura química del plaguicida, sean del tipo que sean.

Los plaguicidas se pueden transformar por vía química, fotoquímica o bioquímica, siendo ésta última la predominante en suelos, debido a la actividad de microorganismos.

3) **Procesos de transporte**, siendo el más importante el transporte vertical de los plaguicidas por el agua a lo largo de la ZNS hasta llegar al agua subterránea (tanto en disolución como asociado a partículas coloidales). Sin embargo, hay otros modos de transporte, como son el transporte lateral; el

transporte a la atmósfera por volatilización, que es función de la presión de vapor del plaguicida y depende en gran medida de la temperatura y del viento; y el arrastre por escorrentía superficial del agua de lluvia o de riego, que depende fundamentalmente del tiempo transcurrido entre las lluvias y la aplicación del plaguicida.

Por otro lado, las **Características de la Zona No Saturada** influyen decisivamente en el movimiento de los plaguicidas hacia el agua subterránea. En este sentido, cabe destacar:

- Contenido en arcillas
- Contenido en materia orgánica
- Textura
- Estructura
- Porosidad
- Humedad del suelo
- Temperatura
- pH del suelo

Análisis de residuos de plaguicidas

El análisis de residuos de plaguicidas (ARP) no se puede realizar de forma directa en la muestra, siendo necesarias una serie de etapas previas a la determinación analítica cuya finalidad es preparar la muestra de forma adecuada para favorecer la determinación del analito. Estas etapas son muy importantes, ya que de ellas depende, en gran parte, el éxito de los análisis. Se pueden resumir del siguiente modo:

- **toma de muestra y preparación**, ya que, generalmente, no se encuentra en la forma apropiada para su análisis. Esta etapa depende de la naturaleza de la muestra.

- **extracción del plaguicida**, separándolo de otros componentes de la muestra. La extracción se suele llevar a cabo con disolventes orgánicos. Tanto el procedimiento utilizado para la extracción como el disolvente (o mezcla de disolventes) elegido dependen del tipo de muestra y de los plaguicidas a analizar.

- **clean-up**: que consiste en la eliminación de los constituyentes de la muestra que interfieren en el análisis. Generalmente, el extracto obtenido después de la extracción contiene, además de los plaguicidas, una serie de compuestos coextraídos que interfieren en la determinación, por lo que es necesario eliminarlos adecuadamente. En la mayor parte de los casos, esta etapa incluye un proceso de partición líquido-líquido y/o una posterior purificación, que suele realizarse por cromatografía líquida (adsorción o permeación en gel).

- **determinación-separación**: separación de los plaguicidas individuales y de las especies coextraídas, de acuerdo con sus diferentes coeficientes de partición entre un sólido o un disolvente no volátil (fase estacionaria) y un

líquido o un gas portador (fase móvil) que circula a través de una columna (cromatografía líquida o de gases) o a lo largo de una placa (cromatografía en capa fina).

Históricamente, ha sido la cromatografía de gases (GC) la técnica de separación predominante en el análisis de plaguicidas. La mayor parte de los métodos recomendados en ARP utilizan esta técnica. La separación de los distintos plaguicidas se produce en una columna analítica (en la actualidad, generalmente, capilar) que contiene la fase estacionaria. La fase móvil es un gas inerte que fluye a través de la columna (generalmente helio o hidrógeno).

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) está teniendo cada vez más aceptación en ARP y, actualmente, está considerada como la segunda técnica en importancia en este campo, especialmente indicada para la determinación de compuestos polares. La separación ocurre en una columna analítica empacada que contiene la fase estacionaria. La muestra se inyecta en el cromatógrafo y es arrastrada por un disolvente, que actúa de fase móvil, que es bombeado a alta presión.

La cromatografía en capa fina (TLC) se basa en la distribución del analito entre el disolvente y una capa fina de adsorbente, que generalmente es sílice o alúmina (óxido de aluminio) que se ha enlazado físicamente a una placa plana de vidrio o plástico. Como técnica de separación, la TLC es mucho menos eficiente que la GC o HPLC y, generalmente, se utiliza como técnica semicuantitativa, por lo que es menos utilizada.

La cromatografía con fluidos supercríticos (SFC) es una nueva técnica de separación cromatográfica, en la que se utiliza un fluido supercrítico como fase móvil. Con esta técnica se pueden conseguir separaciones de compuestos que no pueden analizarse por GC debido a su baja volatilidad o a su inestabilidad térmica. Por otro lado, el analito fluye más rápidamente en el fluido supercrítico que en el líquido usado para HPLC, por lo que el disolvente puede bombearse a mayor velocidad, siendo el tiempo de análisis menor. Además, muchos de los detectores usados en GC pueden también usarse en SFC.

- **determinación-detección:** después de la separación se produce una respuesta en un detector apropiado que puede usarse para medir la cantidad de plaguicida que fluye por la columna. Existen numerosos tipos de detectores, que se basan en distintos principios. Algunos de ellos sólo detectan cierto tipo de compuestos, por lo que permiten una detección selectiva.

En las legislaciones de la mayoría de los países están establecidos los límites máximos de residuos de plaguicidas en productos alimenticios, así como en las aguas de consumo público y otras muestras de interés ambiental. Para comprobar el cumplimiento de estos límites se requieren análisis fiables. El principal problema se plantea cuando en una muestra se detecta un plaguicida en concentración superior a la permitida. En estos casos, es necesario **confirmar la identidad del plaguicida** de forma inequívoca. Para la identificación de los plaguicidas se utilizan, en primera instancia, los tiempos de retención, bien absolutos o bien relativos a algún compuesto de referencia;

sin embargo, este criterio no es suficiente cuando se sospecha que se ha rebasado el valor permitido en la muestra analizada. Si el análisis se ha realizado por GC, se debe confirmar la identidad del plaguicida mediante el uso de otra columna de polaridad diferente u otro detector en un segundo análisis; también se puede aplicar otra técnica distinta, como HPLC o incluso TLC. En los últimos años, el uso combinado de la GC o HPLC con la espectrometría de masas se ha convertido en la técnica más poderosa para la identificación de residuos de plaguicidas, ya que proporciona información estructural sobre el compuesto al que corresponde el pico detectado.

Métodos analíticos para la determinación de residuos de plaguicidas

Métodos multi-residuales (MMR)

Permiten la identificación y cuantificación de varios plaguicidas, así como de algunos metabolitos, simultáneamente, aplicando un único procedimiento de análisis. Se utilizan, fundamentalmente, para la inspección de alimentos y en programas de control de residuos.

Métodos individuales o específicos

Son métodos especialmente diseñados para analizar un único plaguicida, y, en ocasiones, también sus metabolitos o productos de degradación. Aunque son menos eficaces que los MMR, resultan necesarios para el análisis de plaguicidas que no pueden ser determinados por MMR. Sin embargo, no se consideran adecuados para llevar a cabo programas de control de residuos de plaguicidas, pues en estos casos son preferibles los MMR.

Métodos semicuantitativos y cualitativos

Los métodos semicuantitativos indican el rango de concentración del plaguicida en la muestra, mientras que los cualitativos únicamente muestran si existe o no un plaguicida por encima de una concentración determinada, lo cual viene determinado por la sensibilidad del método. Sus principales ventajas se encuentran en su bajo coste, rapidez y sencillez.

Entre estas técnicas destacan principalmente los métodos basados en inmunoensayo. Dichas técnicas que están siendo utilizadas ampliamente con el fin de detectar diferentes tipos de compuestos en muestras acuosas, utilizan moléculas de anticuerpos creadas mediante biotecnología para que reconozcan una molécula (o grupo) específica. El inmunoensayo presenta la ventaja de la especificidad del anticuerpo para monitorizar la concentración de una molécula o grupo de moléculas en una mezcla compleja de muy diversos contaminantes. En la actualidad la mayoría de los test de inmunoensayo existentes en el mercado se han diseñado para la determinación de triazinas, como demuestra la amplia bibliografía existente, aunque también existen otros

sistemas para determinación, entre otros, de plaguicidas tales como alachlor, aldicarb, compuestos ciclodiénicos, ciertos organofosforados, etc.

Toma de muestras y preparación

Los niveles de concentración de plaguicidas en muestras medioambientales son, generalmente, próximos a los límites de determinación de los métodos analíticos más sensibles utilizados hoy en día. Por ello, las pérdidas de analito o la contaminación de las muestras, que pueden tener lugar a lo largo de todo el proceso de análisis, adquieren especial relevancia, por lo que deben extremarse las precauciones para evitar estos efectos indeseables.

Por ejemplo, si el material utilizado para la toma de muestras y para su transporte hasta el laboratorio no es el adecuado pueden tener lugar pérdidas por adsorción sobre las paredes del recipiente, o contaminaciones con sustancias interferentes.

En general, son más aconsejables los recipientes de vidrio, provistos con tapón esmerilado. No es aconsejable el uso de material de plástico pues puede absorber cantidades importantes de plaguicidas además de contaminar las muestras con trazas de compuestos orgánicos (p.e. plastificantes) que producen interferencias en la posterior determinación por GC, especialmente si se usa el detector de captura de electrones.

Un tema de gran interés es el ARP en la zona no saturada, ya que permite obtener información sobre los procesos y evolución que sufren los plaguicidas antes de alcanzar el agua subterránea. Además, y desde el punto de vista analítico, se deben considerar dos tipos de muestras en la ZNS: agua intersticial y suelo(subsuelo), siendo uno de los mayores problemas del análisis en ZNS el asociado con la toma de muestras, debido a la dificultad de obtener muestras representativas, por lo que éste debe ser el primer aspecto a resolver con el fin de que los análisis realizados tengan la utilidad requerida.

Para la toma de muestras de agua intersticial en la ZNS se pueden utilizar métodos destructivos (obtención del suelo y posterior extracción de la disolución) o bien emplear tomamuestras de succión mediante vacío, provistos con cápsulas de porcelana porosa, que se pueden instalar a diferentes profundidades. Los volúmenes de agua recogidos con estos tomamuestras dependen de numerosos factores, entre los que cabe destacar las condiciones climatológicas (lluvias, temperatura), profundidad a la que están instalados, y las características del suelo. En ocasiones, apenas se llegan a recoger algunos mililitros, lo cual resulta insuficiente para el posterior análisis de plaguicidas. A pesar de las ventajas experimentales que proporciona el uso de tomamuestras de succión para la obtención de muestras de agua intersticial, la aplicabilidad de los mismos en la determinación de residuos de pesticidas debe ser estudiada para cada compuesto en particular, ya que pueden existir problemas de representatividad de la muestra obtenida (debido principalmente a procesos de adsorción sobre el material poroso).

En el caso de muestras de suelo es necesario realizar perforaciones para la obtención de las muestras de suelo a diferentes profundidades, pudiéndose de nuevo emplear procedimientos destructivos y no destructivos.

En la figura 3 se muestra un resumen de los diferentes procedimientos de muestreo en la zona no saturada.

De nuevo en la preparación de las muestras, es necesario distinguir las muestras de agua y las de suelo, ya que se deben someter a procedimientos de extracción completamente diferentes.

La preparación de las muestras (en la mayor parte de los casos consiste en una extracción con disolventes) debe realizarse inmediatamente después de la llegada al laboratorio, o mejor después de la toma de muestra. Este es un aspecto de gran importancia en ARP.

Si no fuera posible extraer las muestras inmediatamente, se recomienda su almacenamiento en congelador a $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ para evitar la hidrólisis (p.e. en compuestos organofosforados) u otros cambios en los plaguicidas.

En el caso de las muestras de agua, los problemas originados en la conservación de la muestra se pueden evitar con el aislamiento inmediato de los plaguicidas por extracción en fase sólida, como se verá más adelante.

Extracción de plaguicidas

La mayoría de los métodos analíticos para la determinación de residuos de plaguicidas aplican una primera etapa que consiste en la extracción de los plaguicidas presentes en la muestra. Este proceso se lleva a cabo, generalmente, mediante disolventes orgánicos en los que sean solubles los plaguicidas a analizar.

Los disolventes hidrofílicos deben usarse para la extracción de plaguicidas hidrofílicos (de mayor polaridad), mientras que los disolventes lipofílicos son más aconsejables para los plaguicidas apolares. La polaridad del plaguicida y del disolvente extractante es, por tanto, uno de los parámetros de mayor importancia a la hora de elegir un determinado sistema, ya que influye en la solubilidad del plaguicida en el disolvente. En la figura 4 se indican las polaridades de algunos disolventes de uso frecuente en el laboratorio.

Otro factor de interés en la elección de un disolvente extractante es su facilidad para ser evaporado. Generalmente, se prefieren disolventes

TOMA DE MUESTRAS EN LA ZONA NO SATURADA

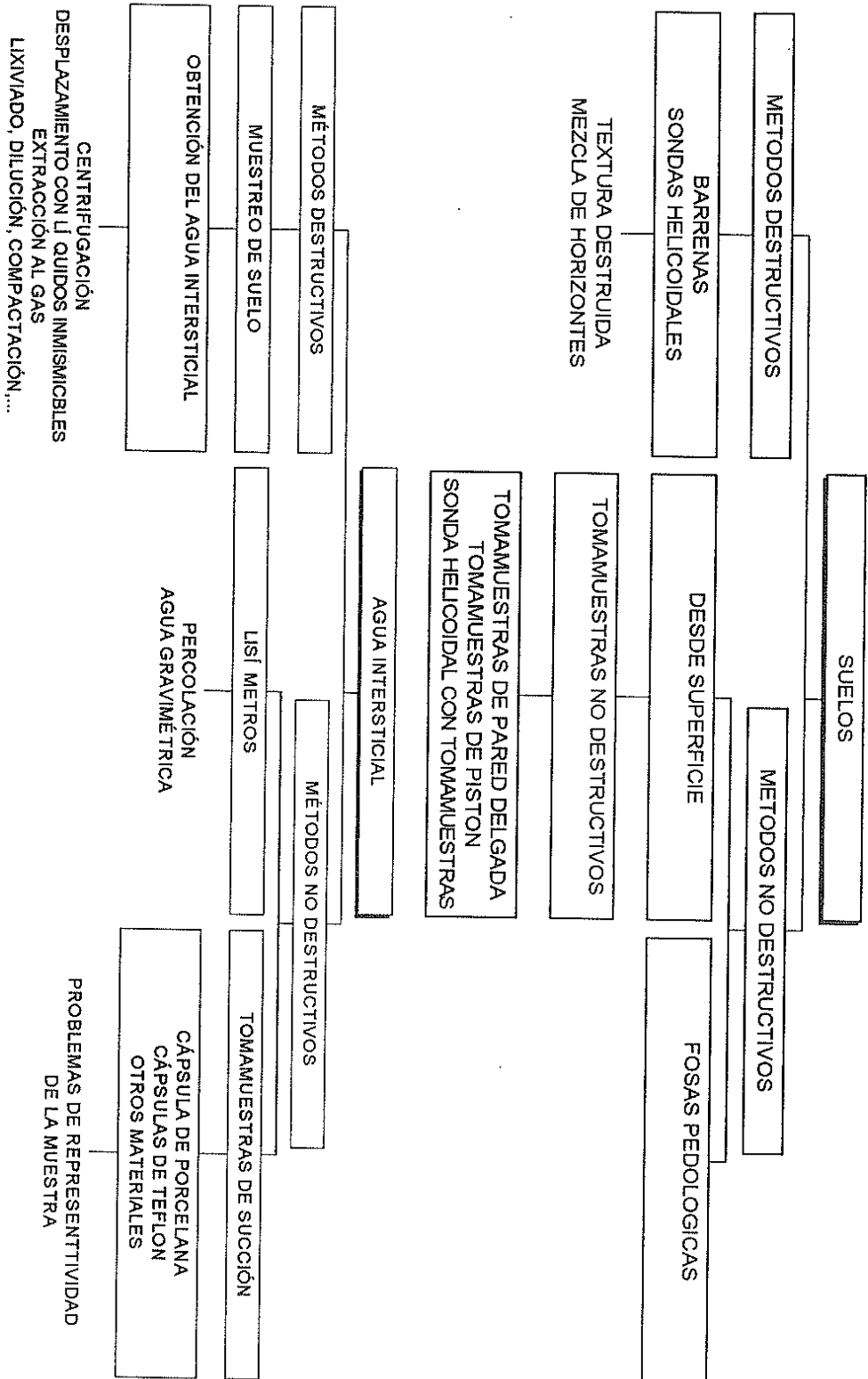


Figura 3

	densidad	T. ebullición	P ¹	E ²	solubilidad en agua (g/100 ml)
Hexano	0.659	68.9	0.1	0.01	0.014
Diclorometano	1.325	40.0	3.1	0.42	1.3
Acetato de etilo	0.901	77.1	4.4	0.58	7.7
Metanol	0.792	64.9	5.1	0.95	miscible
Acetona	0.791	56.2	5.4	0.56	miscible

¹ parámetro de Rohrdcheider de polaridad

² fuerza elutrópica

Figura 4. Propiedades físico-químicas de los disolventes utilizados como eluyentes en EFS.

fácilmente volátiles pues se pierde menos tiempo en la evaporación y hay menos peligro de pérdidas de plaguicidas al poder trabajar a temperaturas más bajas.

Los procedimientos para la **extracción de plaguicidas en muestras acuosas** incluyen:

1) partición o extracción líquido-líquido, también llamada extracción con disolventes

2) adsorción sobre un soporte sólido seguida de elución con un disolvente orgánico, también llamada extracción en fase sólida

1) Extracción líquido-líquido (ELL)

En este procedimiento, la muestra de agua conteniendo los plaguicidas se coloca en un embudo de decantación y se extrae sucesivamente, generalmente tres veces, con un disolvente orgánico inmisible con el agua. El embudo debe agitarse vigorosamente durante dos o tres minutos cada vez, dejando entonces reposar hasta la completa separación de las dos fases (generalmente, entre 5 y 30 minutos). En este proceso, los plaguicidas se reparten entre las dos fases, y el objetivo es que la práctica totalidad de los mismos pasen a la fase orgánica, para proceder posteriormente a su determinación.

Además del tipo de disolvente, se deben tener en cuenta otros parámetros tales como pH, fuerza iónica, relación de volúmenes agua/disolvente, número de extracciones, tipo de plaguicidas y su concentración, para aplicar el procedimiento más satisfactorio.

Un problema que presenta la ELL es la aparición de emulsiones, especialmente en muestras de aguas residuales.

Existen dos disolventes ampliamente utilizados para la extracción de plaguicidas en aguas: hexano y diclorometano. La extracción con diclorometano se puede usar para la determinación de plaguicidas organofosforados (OP), organonitrogenados (ON) y N-metilcarbamatos. También es eficaz para organoclorados (OC) y triazinas. La extracción con hexano o mezclas hexano-éter etílico, o hexano-diclorometano, se suele usar para la determinación de plaguicidas OC y piretroides en aguas.

2) Extracción en fase sólida (EFS)

Una alternativa a la extracción con disolventes es la recuperación del plaguicida haciendo pasar la muestra de agua a través de un cartucho conteniendo un adsorbente sólido. La posterior desorción del plaguicida puede efectuarse por elución con un disolvente adecuado o mezcla de disolventes, o bien aumentando la temperatura (desorción térmica). Estos procedimientos se conocen como extracción en fase sólida (EFS), aunque también se usan otros nombres tales como adsorción líquido-sólido, extracción líquido-sólido o extracción con adsorbentes.

La relación entre el volumen de agua pasado y el disolvente usado para la elución proporciona el factor de concentración que tiene lugar en el proceso de EFS. Además, la composición del extracto orgánico que resulta después de la elución es más sencilla que la de la muestra de agua original, con lo que las posibles interferencias disminuyen.

En general, en la EFS se deben buscar las condiciones experimentales óptimas para que quede retenido el analito (en nuestro caso, los plaguicidas) mientras la muestra de agua pasa a través del adsorbente. Puede considerarse como una cromatografía líquida de baja resolución, aplicada en dos situaciones extremas: máxima retención durante la extracción y mínima retención durante la desorción. Ello puede realizarse con dos fases móviles extremas (por ejemplo, "agua pura" y "disolvente orgánico puro").

Sin duda, los adsorbentes más utilizados son los que se conocen como sílices enlazadas (bonded silica), que se preparan haciendo reaccionar los grupos funcionales de la sílice (grupos silanol, SiOH) con diferentes organoclorosilanos para formar una fase enlazada covalentemente (bonded-phase). El compuesto resultante puede tener carácter no polar (extracción en fase reversa), polar (extracción en fase normal) o también de intercambiador iónico (extracción en fase reversa, por formación de pares iónicos).

La EFS en fase reversa es la más usada para la extracción de plaguicidas. Este tipo de extracción se usa para la retención de compuestos no polares presentes en muestras muy polares, como es el caso de la mayoría de plaguicidas en muestras de agua. Los adsorbentes usados para la extracción en fase reversa exhiben carácter no polar, y los más conocidos son los que tienen un grupo octadecil (C₁₈) enlazado a los grupos silanol de la sílice, así como los que tienen un grupo octil (C₈). Las sílices enlazadas tipo C₁₈ tienen una gran aplicación en el campo de plaguicidas.

Además de las C₁₈ y C₈, existen otras sílices enlazadas también utilizadas para la preconcentración de determinados plaguicidas presentes en aguas. Merecen destacarse las sílices enlazadas con grupos butil, ciclohexil, fenil y ciano (en las que el mecanismo de EFS es de fase reversa) o también con grupos diol, amino y ciano (en EFS en fase normal).

Debido a que las sílices enlazadas pueden retener una amplia variedad de compuestos orgánicos, pueden utilizarse como una alternativa a los métodos estandarizados de ELL. Si bien, es necesario comprobar

rigurosamente el comportamiento de cada plaguicida mediante ensayos de recuperación.

Metodología usada en EFS

Un procedimiento típico de EFS incluye varias etapas, tal como muestra la figura 5.

Las dos etapas más críticas son la aplicación de la muestra (retención) y la elución de los plaguicidas (desorción).

Wells y Michael (1987) han propuesto un procedimiento a fin de optimizar un proceso de EFS reversa aplicado al análisis de plaguicidas en aguas. Consiste en mantener constante la retención, en primer lugar, y optimizar el proceso de elución. Una vez optimizada la elución, se estudian y optimizan las variables que afectan a la retención. Este procedimiento se resume en la figura 6.

Por último, indicar que la realización práctica de la EFS, se puede llevara cabo utilizando los habituales cartuchos (de vidrio o plástico) o mediante los nuevos discos de extracción que al no tener ningún tipo de soporte (ni plástico ni de vidrio) evitan problemas de contaminación, al tiempo que permiten un mayor flujo a través del adsorbente, reduciendo el tiempo de extracción.

3) Procedimientos de microextracción

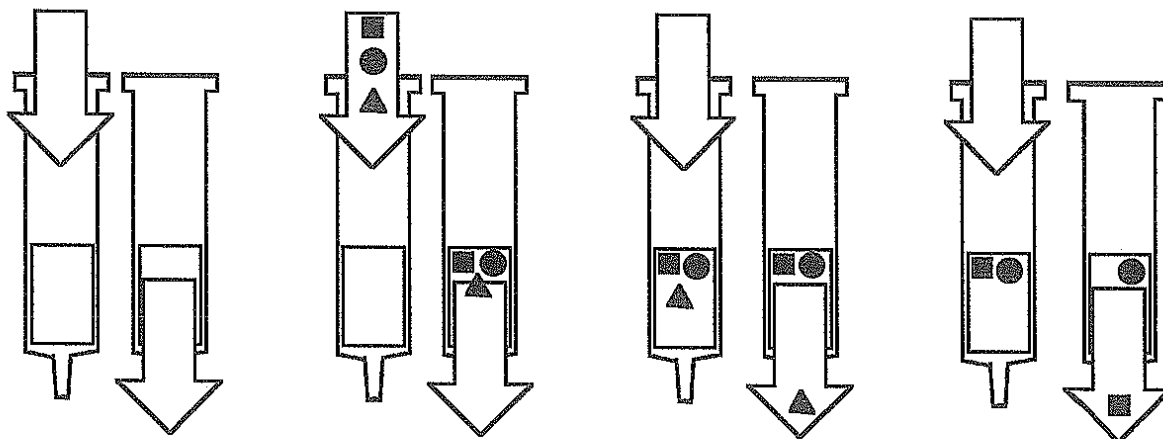
En ciertos casos particulares, entre los que cabe incluir las muestras de agua intersticial de la zona no saturada, que generalmente son muestras con un escaso volumen (habitualmente entre 0.5 y 2 ml), es necesaria la aplicación de procedimientos de extracción a escala micro con tan solo unos mililitros. Estos procedimientos (microextracción líquido-líquido o microextracción en fase sólida) presentan el inconveniente de la baja sensibilidad al no contar con factores grandes de concentración, lo que se puede subsanar aplicando procedimientos cromatográficos basados en la inyección de grandes volúmenes de muestra.

La microextracción líquido-líquido se lleva a cabo mediante agitación de volúmenes iguales de muestra acuosa y disolvente orgánico, posterior separación de las fases, secado de la fase orgánica e inyección directa del extracto en el sistema GC. El procedimiento se puede automatizar y realizar

la extracción en el propio sistema de inyección GC, mediante agitación mecánica y control de la aspiración de la jeringa.

En el caso de la extracción en fase sólida, la reducción a escala micro se puede realizar reduciendo los volúmenes de muestra y disolvente orgánico.

EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA



acondicionamiento

1) mojado del sólido con un disolvente miscible con el agua (metanol, ACN, acetona)
2) se reemplaza dicho líquido con agua

retención

aplicación de la muestra
■ componentes de interés
σ no deseados
● otros

lavado

eliminación de componentes no deseados σ

elución

elución del componente de interés ■
- importante la polaridad del eluyente
- EFS fase inversa (C₁₈): metanol, acetona, acetato de etilo
- off-line
- on-line (HPLC)

Figura 5.

ESQUEMA PARA LA OPTIMIZACIÓN DE UN PROCEDIMIENTO DE EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA

1. Control de la retención
 - Volumen constante de muestra y concentración de los analitos
 - Tipo y cantidad de adsorbente
2. Optimización de la elución
 - Efecto del eluyente. Uso de diferentes disolventes
 - Efecto del volumen de eluyente. Elución con varias fracciones
3. Optimización de la retención
 - Efecto de la adición NaCl
 - Efecto del pH de la muestra
 - Efecto del tipo de adsorbente
 - Efecto del volumen de muestra.
 - Efecto de la masa de adsorbente.
 - Efecto de la concentración de pesticida en la muestra.

Figura 6.

Los procedimientos de **extracción de plaguicidas en muestras de suelo**, generalmente constan de dos etapas: una primera en la que se realiza la extracción del plaguicida mediante un disolvente orgánico (generalmente hexano, o acetona o mezclas de ambos), y una segunda etapa en la que se realiza una cierta purificación además de cambiar el disolvente a otro más adecuado para su evaporación, concentración y determinación cromatográfica (generalmente hexano) (figura 7).

PROCEDIMIENTOS DE EXTRACCIÓN DE PLAGUICIDAS EN MUESTRAS DE SUELO

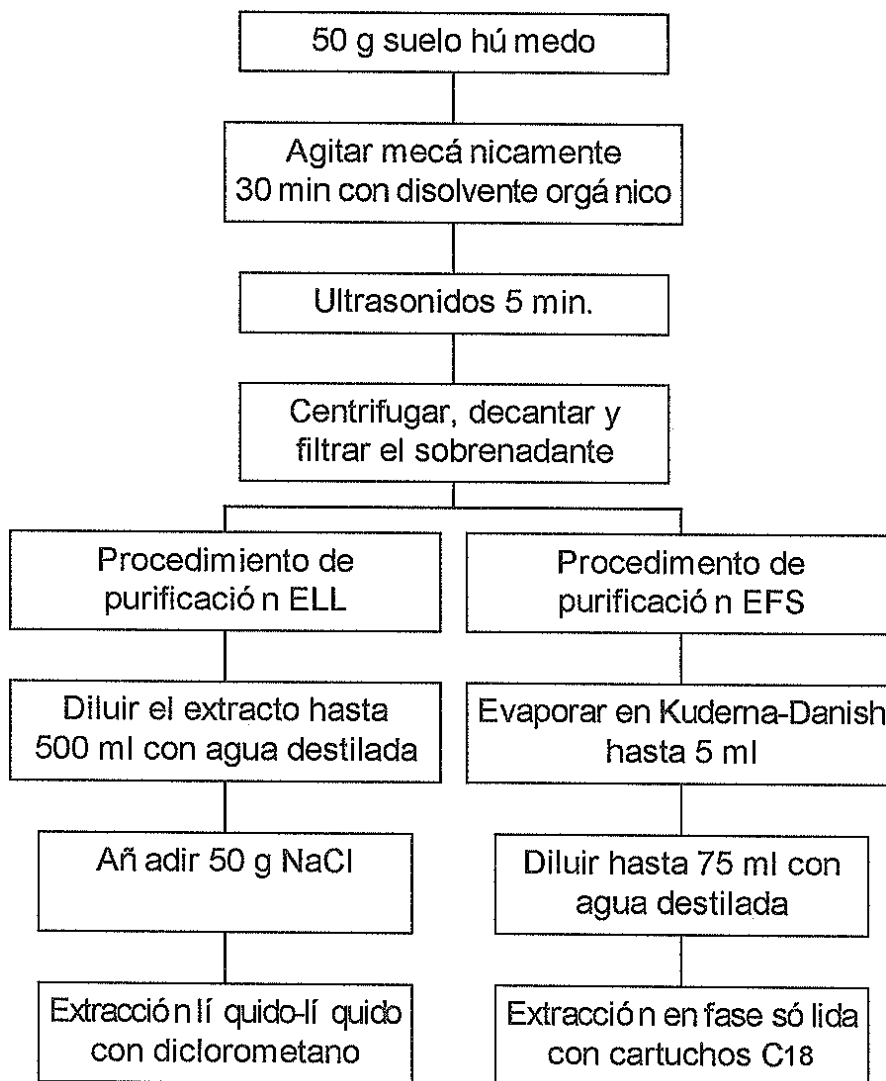


Figura 7.

La extracción de los plaguicidas se lleva a cabo mediante agitación del suelo con disolventes orgánicos (acetona para compuestos de mayor polaridad, como organofosforados o triazinas; o hexano y mezclas hexano-acetona, para plaguicidas más apolares, como los organoclorados). La agitación indicada se lleva a cabo mecánicamente o por ultrasonidos. Tras dejar sedimentar, se decanta el disolvente y se repite la extracción con nuevas porciones de extractante.

La posterior purificación y cambio de disolvente se lleva a cabo mediante dos procedimientos diferentes:

1) partición líquido-líquido: generalmente mediante adición de agua al extracto y partición con un disolvente orgánico diferente (hexano o diclorometano). El procedimiento completo es similar al indicado para la extracción de muestras acuosas.

2) extracción en fase sólida: generalmente se debe concentrar el extracto para eliminar la mayor parte de disolvente orgánico, se añade suficiente cantidad de agua y se procede a realizar la extracción en fase sólida como se ha indicado anteriormente.

Se puede citar además, como una técnica relevante la extracción de plaguicidas en suelos mediante fluidos supercríticos, que utiliza generalmente, CO₂ en condiciones supercríticas como extractante, de modo que se combinan características de líquido y gas. Estos procedimientos se encuentran generalmente automatizados y combinados con posterior tratamiento por EFS y determinación por GC.

Purificación (Clean-up)

El clean up, también conocido como purificación o aislamiento, consiste en la eliminación de los constituyentes de la muestra que interfieren en el análisis del plaguicida de interés. Esta etapa es una de las más importantes en todo procedimiento de análisis de residuos de plaguicidas, ya que después de la extracción inicial, junto con los plaguicidas, se encuentran otros compuestos interferentes o especies coextraídas. Estos materiales interferentes pueden comprender compuestos como aminas, fenoles, ácidos orgánicos, azúcares, grasas vegetales y animales, clorofila y otros materiales coloreados. La aplicación de estos procedimientos de purificación son especialmente importantes en las muestras de suelo donde el extracto presenta, generalmente, una elevada concentración de sustancias interferentes (ácidos húmicos y fúlvicos y pigmentos).

Para la eliminación de los compuestos interferentes existen, fundamentalmente, dos mecanismos:

1) Partición líquido-líquido

Es el proceso de distribución del plaguicida entre dos disolventes no miscibles, de modo que el plaguicida aparecerá en una de las fases y los interferentes en la otra, la cual puede entonces desecharse. En este proceso, la separación del plaguicida y de las especies coextraídas se produce en base a sus diferencias de solubilidad y se puede lograr mediante la adecuada selección del disolvente.

2) Cromatografía preparativa

En muchos casos, la partición líquido-líquido va seguida de un clean-up adicional por cromatografía líquida preparativa.

La técnica más usada con fines de purificación en ARP en aguas es la Cromatografía de adsorción, que se basa en la interacción entre la especie química disuelta en un disolvente y una superficie con propiedades adsorbentes. La fase estacionaria es, por tanto, un material sólido adsorbente (Florisol, alúmina, sílicagel, carbón), mientras que la fase móvil es un disolvente o mezcla de disolventes.

La separación de los distintos compuestos de la muestra se basa en su diferente adsorción sobre la superficie del adsorbente, y ello depende, fundamentalmente, de la polaridad de dichos compuestos.

La fase sólida se coloca en una columna de vidrio (p.e. 30cm x 2cm) y, entonces, se deposita una alícuota del extracto de la muestra en la parte superior de la columna, eluyendo con algún disolvente orgánico. El movimiento a través de la columna se produce por acción de la gravedad. A medida que los compuestos se desplazan a través de la columna quedan más o menos retenidos dependiendo de su estructura química.

También se pueden usar pequeños cartuchos desechables (similares a los empleados para la EFS), suministrados por las casas comerciales, que contienen el adsorbente adecuado. Los materiales más utilizados para cromatografía de adsorción en procedimientos de clean-up son la sílica-gel, alúmina y Florisol.

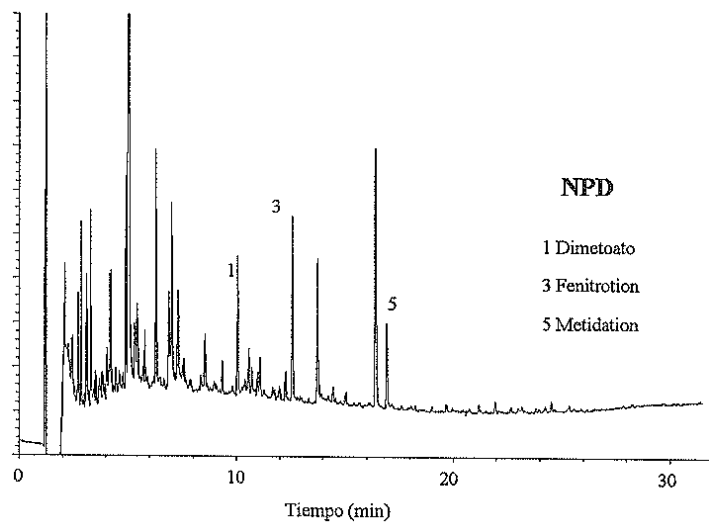
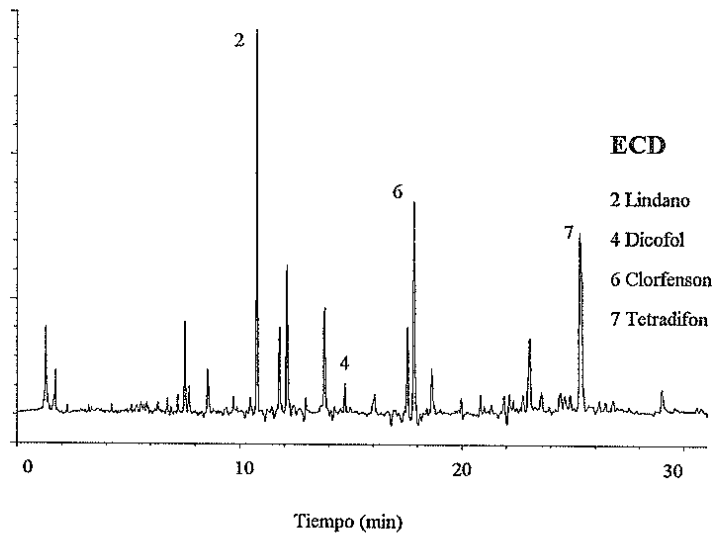
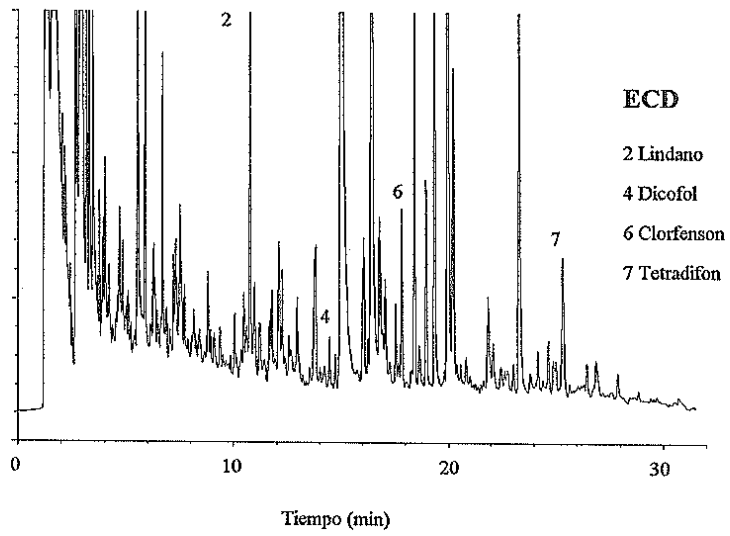
El clean-up sobre Florisol (silicato de magnesio) es uno de los métodos más aplicados para el análisis de plaguicidas OC en aguas. Así, el "Standard Methods" (1989) utiliza el extracto hexánico de la muestra y efectúa el clean-up sobre Florisol, eluyendo en tres fracciones diferentes: la 1ª con 200 ml de éter etílico al 6% en éter de petróleo, la 2ª con 200 ml de mezcla al 15%, y la 3ª con 200 ml de mezcla al 50%, en la cual eluyen finalmente los plaguicidas más polares Endosulfan II y Captan.

En un segundo Método, recomendado para aguas residuales urbanas e industriales, realiza el clean-up de modo análogo eluyendo en tres fracciones de 200 ml, con éter etílico al 6% en hexano, al 15% y al 50%, respectivamente.

Un ejemplo del efecto de la purificación obtenida mediante cromatografía preparativa sobre sílicagel, en la determinación de residuos de plaguicidas OC y OP en suelos se muestra en la figura 8.

También se puede aplicar la Cromatografía de permeación en gel (GPC), en la cual los compuestos se separan en base a sus diferencias en el tamaño molecular. Es especialmente útil cuando se deben determinar moléculas pequeñas, tales como plaguicidas OC en matrices complejas con moléculas de elevado Pm como aceites, grasas y polímeros aunque es de gran utilidad para otros muchos tipos de plaguicidas.

Además de la partición líquido-líquido y de la cromatografía preparativa, existen otros mecanismos de clean-up, como son el tratamiento químico del extracto con reactivos químicos adecuados (por ejemplo, ácido sulfúrico), o la técnica de "sweep co-distillation", usada para el aislamiento de herbicidas triazínicos en suelos.



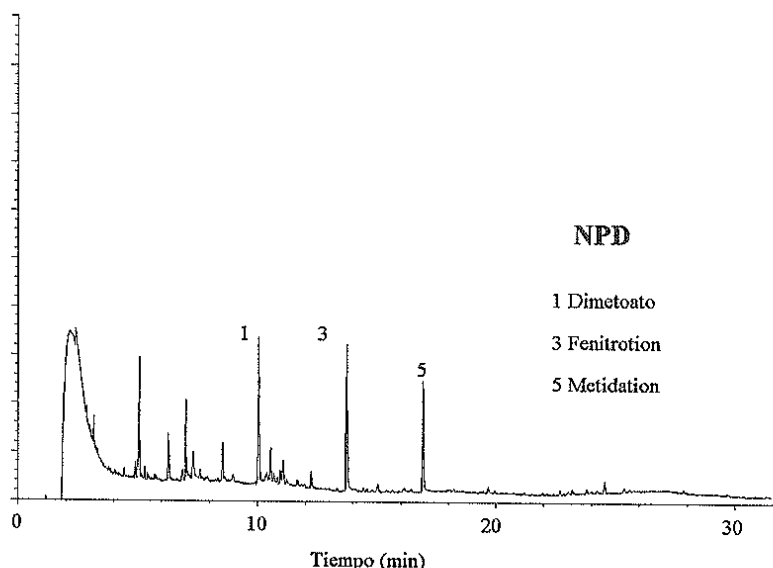


Figura 8. Cromatogramas ECD y NPD de un suelo superficial obtenidos mediante extracción con acetona: sin purificación (parte superior) y después de la purificación sobre silicagel (parte inferior).

Determinación analítica

La determinación analítica de los plaguicidas se lleva a cabo, generalmente, por técnicas cromatográficas. Tal como se ha indicado anteriormente, la GC y HPLC son las más utilizadas.

Cromatografía de gases

La cromatografía de gases (GC) es la técnica más usada para la determinación de residuos de plaguicidas, de modo que, en la actualidad, no es posible imaginar el análisis de plaguicidas sin un cromatógrafo de gases.

Las ventajas que presenta, como alta sensibilidad, detección selectiva, elevada eficiencia en la separación, versatilidad, análisis rápido, pequeño tamaño de muestra para efectuar el análisis y sencillez, son ampliamente reconocidas por toda la comunidad científica. Ninguna otra técnica analítica puede conseguir un poder de separación y sensibilidad equivalente para compuestos orgánicos volátiles. Sin embargo, para efectuar correctamente la separación es necesaria una optimización de las condiciones para lo que se requiere personal altamente cualificado.

La principal limitación de esta técnica estriba en la estabilidad térmica de las muestras y de los substratos cromatográficos, de modo que, en general, su uso está restringido a temperaturas máximas de 400°C y $P_m < 1000$. Para que una muestra sea adecuada para el análisis por GC se requiere que sea térmicamente estable (bien la muestra o bien algún derivado de la misma obtenido previamente por derivatización) a la temperatura necesaria para su volatilización.

En GC las muestras se separan mediante un proceso de distribución entre una f.e. y una f.m. por adsorción, partición o una combinación de ambos.

En la actualidad, como fase estacionaria se usa, casi exclusivamente, una fase líquida recubriendo las paredes internas de una columna capilar en forma de una película fina, la técnica se denomina cromatografía gas-líquido (GLC). En GLC la separación se produce como consecuencia del proceso de partición de un componente entre las fases, con la fase móvil (gas) en movimiento en relación a la f.e. líquida.

Existen dos aspectos estrechamente relacionados con la determinación de residuos de plaguicidas, que son el tipo de columna cromatográfica y el sistema de detección utilizado.

En el análisis de plaguicidas es de gran importancia la adecuada selección de la columna, pudiendo utilizarse tanto las columnas de relleno (empacadas) como las más recientes columnas capilares, aunque actualmente estas han desplazado casi por completo a las primeras, debido a que con las columnas capilares se consigue un gran aumento en la capacidad de separación por lo que también se usa la denominación de cromatografía gaseosa de alta resolución (HRGC) para describir la GC capilar. En la actualidad, se utilizan generalmente columnas capilares de sílice fundida, de gran flexibilidad.

Las fases estacionarias líquidas utilizadas en columnas capilares son similares a las empleadas en empacadas, aunque se diferencian en la cantidad de fase empleada: en empacadas se mide en porcentaje en peso, mientras que en capilares se mide en espesor de película (entre 0.1 y 1 mm).

El grupo más importante de f.e. líquidas son los polisiloxanos. Su alta estabilidad térmica y disponibilidad en diferentes polaridades, abarcando desde los no polares hasta algunos de los más polares disponibles hoy en día, contribuyen a su popularidad.

Las características más importantes de una f.e. líquida a la hora de su selección para una aplicación concreta son: rango de temperatura de trabajo, viscosidad en dicho rango de temperaturas y capacidad para interaccionar selectivamente con diferentes solutos. En cuanto a ésta última característica, es la polaridad de la f.e. el factor fundamental. Las diferentes f.e. comercializadas actualmente presentan muy diversas polaridades, y se pueden caracterizar mediante su índice de polaridad.

En cuanto a los detectores, cabe señalar que no existe ninguno que cumpla todos los requisitos necesarios para el análisis de residuos de plaguicidas y, en general, se requieren 2 ó más detectores, para cubrir las necesidades básicas en este campo.

Cuatro son los detectores típicos más usados en ARP: se trata del de captura electrónica (ECD), el fotométrico de llama (FPD), el nitrógeno-fosforo (NPD) -también conocido como detector de ionización en llama alcalina (AFID) y, finalmente, el detector de conductividad electrolítica de Hall (HECD).

Con estos cuatro detectores se cumplen prácticamente todas las necesidades en el análisis de plaguicidas por GC. Si bien, la Espectrometría de Masas (MS) supone el complemento necesario para la correcta

identificación del plaguicida detectado, de modo que su uso resulta obligado, hoy en día, para todos aquellos laboratorios especializados en ARP.

1) Plaguicidas OC

El ECD es el detector a escoger para compuestos OC, tales como el DDT, lindano, dicofol, tetradifon, etc. Tiene buena sensibilidad pero requiere extractos muy limpios, ya que, de lo contrario, se obtienen cromatogramas llenos de picos. Por ello, es necesario efectuar un buen clean-up de todos los extractos y es recomendable el uso de GC capilar para la eliminación de interferencias.

Para estos compuestos también se puede usar el detector HECD en modo halógeno. La detección mediante MS permite la identificación de los residuos detectados, aunque también se pueden aplicar procedimientos de derivatización química como tests de confirmación.

2) Plaguicidas OP

La selectividad de los detectores de NPD (AFID) y FPD hace que estos sean los más usados para el análisis de estos plaguicidas. En general, el detector de FPD en modo P es más selectivo que el NPD, aunque es algo menos sensible.

Por otro lado, la mayoría de los plaguicidas OP pueden detectarse también por ECD aunque, como se ha indicado anteriormente, se requiere en este caso un clean-up más riguroso.

3) Herbicidas fenoxiácidos

Estos herbicidas (2,4-D, 2,4,5-T, MCPA, etc) se pueden detectar por ECD previa formación de los metil ésteres. La esterificación con bromuro de pentafluorobencilo (PFBB) aumenta la respuesta al ECD de forma considerable.

4) N-metil carbamatos

El análisis de estos compuestos (aldicarb, metiocarb, etc) resulta difícil por GC debido a su falta de estabilidad térmica y a la ausencia de detectores sensibles. Se puede realizar el análisis por ECD previa derivatización con ácido triluoroacético o con anhídrido pentafluoropropiónico, con o sin catálisis.

También se pueden detectar en su estado original, sin efectuar derivatización, usando un detector de HECD o NPD, usando temperaturas inferiores a 200 °C.

Sin embargo, el mejor modo de realizar los análisis de estos compuestos es mediante HPLC, como se verá después.

5) Triazinas

Aunque el ECD responde moderadamente a estos compuestos, se prefiere utilizar un detector sensible al nitrógeno (NPD) debido a su respuesta más uniforme y a su mejor selectividad.

6) Piretroides

Los métodos de análisis de piretroides están limitados por la falta de heteroátomos adecuados para su detección. Los nuevos piretroides con halógenos o grupos ciano pueden detectarse adecuadamente por ECD.

Como conclusión, indicar que el tipo de muestra y analito, así como el procedimiento de extracción utilizado y la extensión del clean-up, condicionarán la selectividad requerida en el detector.

La sensibilidad de un determinado procedimiento analítico se puede aumentar mediante derivatización química. Esta técnica es muy utilizada con el detector de ECD. Por otro lado, se pueden llevar a cabo reacciones químicas, tales como oxidación, reducción, alquilación, acilación e hidrólisis, para la confirmación rápida de los residuos de plaguicidas detectados.

Además, deben tenerse en cuenta una serie de aspectos prácticos para conseguir la optimización de las condiciones cromatográficas y la adecuada separación y cuantificación de plaguicidas.

En los últimos años, existe una tendencia a la aplicación de ciertas técnicas de introducción de grandes volúmenes de muestra en GC. La posibilidad de aumentar la cantidad de muestra introducida en el sistema GC desde los 1-2 ml convencionales hasta valores de 200-2000 ml permite alcanzar dos finalidades, que son especialmente importantes en ARP: en primer lugar resulta evidente el aumento de sensibilidad (del orden de 100-1000 veces) que se puede conseguir, con lo que los límites de detección se pueden disminuir en un orden similar; en segundo lugar y derivado de este espectacular aumento de sensibilidad, se puede reducir de manera drástica el tratamiento de la muestra en cuanto a extracción y concentración de los extractos, permitiendo la aplicación, sin pérdida de sensibilidad, de los citados procedimientos de microextracción.

La introducción en el sistema GC de grandes volúmenes de muestra se puede llevar a cabo mediante diferentes modos de introducción dependiendo de la técnica empleada para la evaporación y eliminación del disolvente (figura 9).

El modo denominado *retention gap convencional* se basa en la introducción de la muestra a una temperatura suficientemente baja como para que no se produzca apenas evaporación del disolvente durante la introducción, de modo que se forma una película de líquido en la precolumna (capilar de sílice fundida sin fase estacionaria) que se extiende hasta finalizar la introducción. La evaporación se produce lentamente desde la parte trasera de esta zona inundada de la precolumna. Una vez eliminado el disolvente se procede a aumentar la temperatura de modo que los analitos comienzan el proceso cromatográfico en la columna.

Para evitar el inconveniente del largo tiempo necesario para la introducción y posterior eliminación del disolvente, se puede realizar la introducción a mayor temperatura, de modo que el disolvente comienza a evaporar de forma más rápida durante la introducción de muestra. Si la

temperatura se mantiene unos grados por debajo de la temperatura de evaporación del disolvente, se produce una evaporación parcial del mismo durante la introducción dando lugar a una zona inundada de relativamente reducido tamaño (*partially concurrent eluent evaporation*), si por el contrario la temperatura se mantiene por encima de la temperatura de ebullición del disolvente (*concurrent eluent evaporation*), este se evapora totalmente en el momento de la introducción, de modo que no existe zona inundada y la introducción es más rápida y el tamaño de la fracción introducida independiente del tamaño de la precolumna (y en teoría de tamaño indefinido).

Los modos de introducción indicados presentan ventajas e inconvenientes y son aplicables dependiendo de las características de los analitos de que se trate en cada caso. La presencia de la denominada zona inundada, permite la obtención de efectos de *solvent trapping* de modo que se retienen más adecuadamente los compuestos de mayor volatilidad, que no pueden ser analizados por la técnica de *concurrent eluent evaporation*.

Por último se pueden realizar introducciones de mayor volumen de muestra utilizando para ello un inyector de temperatura programable utilizando liners rellenos de adsorbentes, de modo que se realiza la introducción de la muestra a baja temperatura, se retienen los analitos y se elimina el disolvente. En ese momento se comienza a elevar la temperatura del inyector hasta que los analitos son desorbidos al interior de la columna.

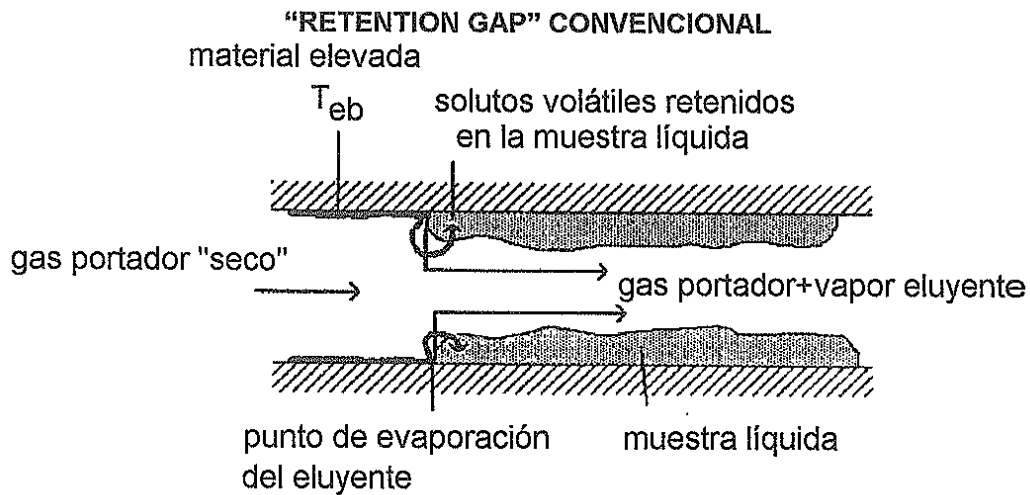
Las diferentes técnicas de introducción de grandes volúmenes de muestra, han permitido además desarrollar procedimientos de acoplamiento entre cromatografía líquida y cromatografía de gases, de modo que se utiliza el gran poder de la CL como preparación de muestras unido en línea al gran poder de determinación de la GC.

Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)

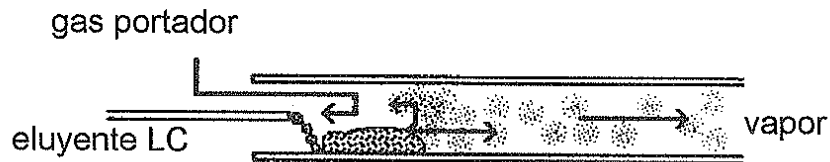
La GC presenta una limitación para el análisis de plaguicidas, que es la baja estabilidad térmica de algunos de estos compuestos que se descomponen a las temperaturas normales de trabajo en GC, como es el caso del butocarboxim, carbaril, etc.

Estos compuestos se pueden determinar más adecuadamente por HPLC, ya que, al trabajar a temperatura ambiente, no presenta los inconvenientes de degradación de plaguicidas a altas temperaturas.

La HPLC presenta, además, otras ventajas importantes sobre la GC. Así, permite la separación y cuantificación directa de compuestos no volátiles y termolábiles sin necesidad de derivatización; es altamente flexible y de aplicación general; puede adaptarse para un amplio rango de compuestos a causa del papel activo de la fase móvil en la separación y de la variedad de columnas existentes; el análisis es no destructivo; no requiere un clean-up extensivo; rapidez en los análisis, con una duración de los cromatogramas significativamente menor que en GC.

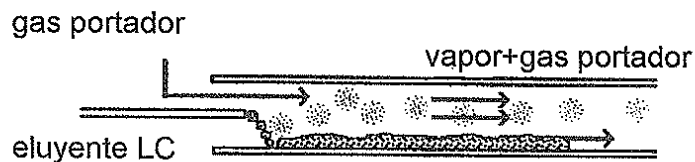


"CONCURRENT ELUENT EVAPORATION"
 Transferencia a temperatura por encima del punto de ebullición del disolvente



- la presión de vapor detiene el flujo de eluyente
- el flujo de gas portador se interrumpe
- evaporación del eluyente desde el frente
- sin efecto de disolvente

PARTIALLY CONCURRENT ELUENT EVAPORATION
 Transferencia a temperatura por debajo del punto de ebullición del disolvente



- el eluyente fluye por la precolumna
- el flujo de gas portador continua
- evaporación del eluyente desde detrás
- efecto de disolvente eficaz

Figura 9.

Desde mediados de los 70, cada vez se ha tendido más al uso de plaguicidas fácilmente degradables, con el fin de evitar los problemas de persistencia y acumulación de estos compuestos tóxicos en el medio ambiente. Muchos de estos plaguicidas (como los carbamatos, ureas, fenoles, fenoxiácidos y piretroides sintéticos) son polares y/o termolábiles, no siendo adecuada su determinación directa por GC. Sin embargo, la HPLC es una excelente técnica para el análisis de estos plaguicidas. Además, permite un análisis semipreparativo, así como la preconcentración de la muestra, lo cual puede resultar muy útil en el análisis de residuos.

El uso combinado de GC y HPLC, junto con el espectacular avance experimentado por los sistemas de detección, permiten abordar con las suficientes garantías de exactitud y sensibilidad el análisis de residuos de la mayoría de plaguicidas utilizados en la actualidad. Se trata, por tanto, de técnicas complementarias que resultan imprescindibles en todo laboratorio de análisis de residuos de plaguicidas.

En contraste con la GC, en donde la f.m. es inerte y no afecta a la separación de los analitos, en HPLC la f.m. juega un papel activo y es crítica para la separación.

Las separaciones en HPLC se pueden conseguir de cinco modos diferentes, usando distintos tipos de columnas: cromatografía líquido-sólido, líquido-líquido, de fase enlazada, intercambio iónico, y de exclusión.

Existen dos variaciones en cada uno de los 5 modos de operación en HPLC. Esta distinción se basa en las polaridades relativas de la f.e. y la f.m.:

- cromatografía en fase normal (NP), en la que la f.e. es más polar que la f.m. En este caso, los solutos menos polares eluyen primero.
- cromatografía en fase reversa (RP), en la que la f.e. es menos polar que la f.m. En este caso, los solutos más polares eluyen al principio.

La Cromatografía en fase enlazada (BPC) es la más utilizada en ARP, especialmente en su modalidad de fase reversa (RP-BPC). En ella, se usa una f.e. que está químicamente enlazada a la silicagel por reacción de los grupos silanol con un clorosilano sustituido.

Los compuestos ionizados son muy solubles en agua y, generalmente, no se retienen bien en la columnas de RP-BPC. En estos casos, la retención y la separación se pueden aumentar añadiendo un tampón de pH adecuado para suprimir la ionización (cromatografía de supresión iónica) o formando un par iónico lipofílico entre el analito y un contraión de carga opuesta (cromatografía de pares iónicos). Las especies no iónicas resultantes se pueden separar usando las mismas técnicas que para compuestos no iónicos.

Las columnas de HPLC están rellenas de pequeñas partículas (generalmente entre 3 y 10 μm) de f.e. El uso de estas micropartículas hace que sea necesario bombear la f.m. a alta presión para que pase a través de la columna, al tiempo que se requieren unos flujos muy exactos y reproducibles para que las condiciones de la separación sean también reproducibles.

La columna utilizada condiciona el mecanismo de separación que tiene lugar en HPLC. Se pueden distinguir varios tipos de columnas, que dan origen a los distintos modos de operación en HPLC, tal como se ha visto anteriormente. Las más usadas en ARP son las de fase reversa (RP), que consisten en columnas de fase enlazada base sílica del tipo C18 y C8. Otros rellenos del tipo RPC enlazada llevan grupos C1, C2, C4, C12, C30, ciano, fenilo, diol o cilcohexilo.

En la cromatografía de fase reversa la f.e. es hidrofóbica y no polar y la f.m. es relativamente polar (generalmente agua-metanol o agua-acetonitrilo). Al tratarse de columnas de fase enlazada son más estables y proporcionan resultados reproducibles comparadas con las columnas de fase no enlazada con la f.e. retenida mecánicamente.

Una de las mayores desventajas de la técnica HPLC en análisis de residuos de plaguicidas es la falta de detectores específicos y sensibles. La mayor dificultad es que el detector debe responder a cantidades extremadamente pequeñas de analito no presentando respuesta, sin embargo, frente al gran exceso de disolvente presente como fase móvil.

La función del detector es monitorizar de modo continuo e instantáneo la f.m. que eluye de la columna. El detector proporciona una señal eléctrica como consecuencia de la medida de alguna propiedad de los analitos y de la f.m.

Los detectores más utilizados en ARP son el Ultravioleta-visible, bien de longitud de onda fija, bien de longitud de onda variable. En la actualidad, se está utilizando cada vez más un detector UV-VIS capaz de proporcionar una información tridimensional, es decir, valores de absorbancia, longitud de onda y tiempo. Se trata del detector de barrido de diodos (PDA). Su principal ventaja es que permiten la medida simultánea a todas las longitudes de onda lo que hace posible la obtención de espectros completos cada 0.01 segundos. Se puede, por ello, realizar la determinación de cada compuesto a la longitud de onda óptima, pudiendo seleccionar, en cada caso, las condiciones más adecuadas para la detección. La posibilidad de obtener el espectro completo de los eluatos abre un nuevo camino en cuanto a identificación y selectividad del procedimiento.

Detector de fluorescencia. Es del orden de 100 a 1000 veces más sensible que el de UV-VIS. Además, la selectividad es buena ya que se seleccionan tanto la λ de excitación como la de emisión, y, por otro lado, son pocos los compuestos que presentan fluorescencia natural.

Se puede aplicar para el análisis de compuestos que presentan fluorescencia natural. Sin embargo, son muy pocos los plaguicidas con estas características. No obstante, su principal aplicación es el análisis de plaguicidas no fluorescentes previa formación de derivados fluorescentes adecuados. Estos derivados se pueden formar en el modo pre-columna o en pos-columna.

Detector electroquímico. El más utilizado en ARP es el amperométrico, utilizando un electrodo de carbón.

Otros detectores. Entre ellos destacan, el detector de espectrometría de masas, que permite la identificación de compuestos desconocidos por determinación del peso molecular, fórmula empírica y modos de fragmentación.

Los detectores de cromatografía de gases operan en fase gaseosa y, por ello, requieren la vaporización previa del eluato que sale de la columna. Entre los que se han acoplado con mayor frecuencia a equipos de HPLC se encuentran el fotométrico de llama y el ECD.

El detector de fotoconductividad es sensible y selectivo para compuestos halogenados, sulfurados y nitrogenados que formen iones estables cuando se someten a fotólisis.

Derivatización en HPLC

Esta técnica se utiliza para mejorar la detección de numerosos analitos. Para ello se puede efectuar una reacción de derivatización en pre-columna o en post-columna

La derivatización en pre-columna se lleva a cabo generalmente en el modo off-line, es decir, antes de inyectar la muestra en la columna analítica y fuera del sistema cromatográfico. La reacción se realiza, por tanto, antes de la separación de los componentes de la muestra. Tiene la ventaja de que se pueden utilizar reacciones largas y en condiciones extremas y con reactivos que tengan las mismas propiedades, en cuanto a detección, que los derivados formados.

La derivatización en post-columna se lleva a cabo en el modo on-line, e implica la mezcla del eluyente de la columna con un flujo constante de disolución de reactivo, formándose derivados más fácilmente detectables. La reacción debe ser rápida para evitar el ensanchamiento de los picos cromatográficos. Se lleva a cabo en un reactor localizado entre la columna y el detector, y puede ser un simple tubo capilar o un reactor sólido.

El caso más conocido en ARP es la determinación de N-metil carbamatos por HPLC con derivatización en post-columna y detección por fluorescencia.

Aplicación de HPLC al análisis de residuos de plaguicidas

Entre las aplicaciones más importantes destacan:

Fungicidas post-cosecha

Entre éstos se encuentran el bifenilo, benomilo, carbendazima, o-fenilfenol, tiabendazol y metil-tiofanato.

La detección por UV tiene lugar a 254 o 288 nm.

Columna fase enlazada C18. HPLC fase reversa.

Fase móvil: metanol/agua/amoniaco (60:40:0.6 v/v)

Herbicidas derivados de la urea

Plaguicidas como el monuron, monolinuron, diuron, linuron, cloroxuron, etc, se pueden determinar por HPLC con detección UV en muestras de productos vegetales y suelos (extracción con metanol) y aguas (diclorometano).

Detección UV.

Columna C18 fase reversa.

Fase móvil: metanol/agua/amoniaco (60:40:0.6 v/v). La adición de una pequeña cantidad de amoniaco a la f.m. ayuda a solucionar el problema de interferencias.

N-metil carbamatos

Compuestos tales como carbaril, pirimicarb, propoxur, metiocarb, aldicarb, dioxacarb, barban, bendiocarb, etc, se determinan habitualmente por HPLC con detección fluorescente, usando la técnica de derivatización en post-columna. También se puede utilizar la detección UV, pero presenta menor sensibilidad.

Herbicidas triazínicos

Las triazinas se deben someter generalmente a una derivatización antes de su determinación por GC. Sin embargo, la técnica de HPLC permite la determinación rápida y directa de estos compuestos. Se pueden separar y determinar hasta 19 triazinas, con una columna de fase enlazada tipo ciano, o con columna de fase reversa C18, usando en todos los casos detección UV.

Herbicidas fenoxiácidos

Compuestos como el 2,4-D, MCPA, 2,4,5-T, etc, se pueden determinar por HPLC, usando un reactivo formador de pares iónicos o mediante supresión iónica, y detección por UV.

Técnicas cromatográficas acopladas

La cromatografía multidimensional hace uso de dos o más columnas acopladas para conseguir separaciones no alcanzables con un único sistema. Se define esta técnica como un proceso de separación en el que una muestra es sometida a una secuencia de separaciones, cada una de las cuales actúa sobre el todo o parte de los componentes separados en una etapa previa cromatográfica, que difieren en su selectividad relativa y/o capacidad.

En las técnicas cromatográficas acopladas se efectúa una pre-separación de la muestra en una primera columna cromatográfica; posteriormente, una parte muy pequeña de la muestra conteniendo los analitos se transfiere "on-

line" por medio de una interfase hacia la segunda columna cromatográfica en la que tiene lugar la separación de los mismos.

Las técnicas cromatográficas acopladas se encuentran entre las técnicas más sensibles y selectivas disponibles para la determinación de residuos de pesticidas en muestras medioambientales. Las más utilizadas en la actualidad en ARP son la cromatografía líquida acoplada a cromatografía líquida (CL-CL) también denominada CL con "column switching", y la cromatografía líquida acoplada a cromatografía de gases capilar (CL-CG).

En la figura 10 se muestra un esquema básico de una técnica cromatográfica acoplada.

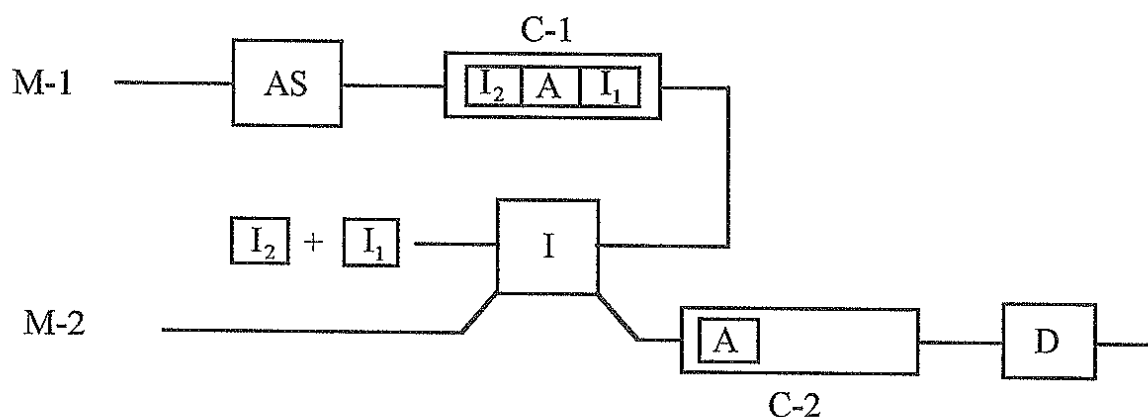


Figura 10. Representación esquemática de un sistema cromatográfico acoplado.

M-1 y M-2 fases móviles. AS sistema de inyección o autoinyector. C-1 y C-2 primera y segunda columna. I interfase. I₁ e I₂ interferentes de la muestra. A analitos de interés. D sistema de detección.

Los procedimientos cromatográficos con columnas acopladas consisten generalmente en cuatro etapas:

- Introducción de un volumen de muestra relativamente grande en la primera columna del sistema, mejorando, de este modo, la sensibilidad global del procedimiento analítico. En combinación con una apropiada compresión de pico durante la etapa de transferencia (tercera etapa) los volúmenes de inyección pueden aumentarse desde microlitros hasta mililitros, pudiendo mejorar la sensibilidad en varios órdenes de magnitud.

- Preseparación de una gran parte de los interferentes de la muestra de los analitos de interés en la primera columna, mejorando la selectividad del procedimiento al descartar la mayor parte de los interferentes. Para mejorar lo más posible la selectividad es importante que el mecanismo de separación de ambas columnas difiera considerablemente. Esto se puede conseguir fácilmente acoplando CL con CG, pero es menos obvio en acoplamiento CL-CL.

- Transferencia de la fracción de interés a la segunda parte del sistema de separación por medio de una técnica de compresión de pico, de modo que aumente tanto la selectividad, minimizando el volumen de transferencia, como la sensibilidad, mejorando la forma del pico cromatográfico. Para la interconexión entre ambas columnas de separación, se necesita generalmente un método de focalización del pico. En CL-CG se usa generalmente una técnica de focalización por enfriamiento (*cold trapping*), mientras que en CL-CL se consigue la compresión de pico utilizando gradientes escalonados durante la transferencia de los analitos desde la primera a la segunda columna.

- Análisis de la muestra transferida a la segunda columna realizándose una separación y detección convencional de los analitos de interés, después de haber eliminado la mayor parte de los interferentes.

Además de la mejora en selectividad y sensibilidad, las técnicas cromatográficas acopladas permiten integrar la preparación de muestra, la separación y la detección en un único sistema cromatográfico, ofreciendo un alto grado de automatización para el procedimiento analítico global.

La aplicación de estas técnicas en el desarrollo de MMR para ARP resulta, a veces, problemática debido a su elevada selectividad. La heterogeneidad de los pesticidas, desde el punto de vista químico, y por consiguiente cromatográfico, hace difícil la aplicación de las cuatro etapas indicadas en un amplio grupo de compuestos.

A continuación, se comentan brevemente las técnicas acopladas más importantes.

1) Cromatografía de Gases - Cromatografía de Gases (CG-CG).

Aunque los primeros procedimientos de acoplamiento de dos columnas de CG se llevaron a cabo al principio de los 70, actualmente apenas hay aplicaciones de esta técnica en ARP, quizás debido, en parte, a la introducción de la CG capilar.

Existen algunas aplicaciones CG-CG para la determinación de microcontaminantes orgánicos que presentan serios problemas de separación debido a sus propiedades muy semejantes, como bifenilos policlorados (PCB) y dioxinas.

Probablemente su uso en el futuro se dirija a la separación de pesticidas ópticamente activos, acoplando columnas no quirales a columnas quirales.

2) Cromatografía Líquida - Cromatografía de Gases (CL-CG).

El acoplamiento CL-CG, que se introdujo hace más de una década, se ha convertido en una técnica común para la determinación de contaminantes en una gran variedad de matrices. La aparición de una interfase que permite la transferencia de grandes volúmenes de disolventes orgánicos apolares desde un cromatógrafo de líquidos a un cromatógrafo de gases capilar, ha favorecido

el desarrollo de numerosas aplicaciones CL-CG en el análisis de alimentos y muestras medioambientales. Actualmente, se utilizan dos interfases de acoplamiento: interfase tipo *on-column* e interfase *tipo loop*.

Interfase *on-column*: emplea un inyector *on-column*. Se desarrollaron para evitar la distorsión de picos por ensanchamiento de bandas (*flooding effect*), debido al flujo de la muestra líquida hacia el interior de la columna de gases. Con este tipo de interfase se pueden realizar tres modos de introducción dependiendo de las condiciones de presión y temperatura. En el primer modo (*retention gap convencional*) la muestra líquida se introduce en el sistema de forma similar a una inyección *on-column* (mediante un capilar, línea de transferencia, que proviene del sistema CL) en una columna sin fase estacionaria (*retention gap*) a una temperatura muy por debajo de la temperatura de ebullición del disolvente, de modo que se forma un película de líquido en el interior, proporcionando los efectos de *solvent trapping* necesarios para reconcentrar las bandas de muestra. Posteriormente, se desarrolló una variante de la técnica (*partially concurrent eluent evaporation*), que hace uso de la evaporación parcial del eluyente del cromatógrafo líquido durante la introducción del mismo en la precolumna de cromatógrafo de gases sin relleno, lo cual permite la introducción de mayores volúmenes de muestra y el uso de precolumnas más cortas. Poco después, se aplicó la evaporación simultánea de disolvente (*concurrent solvent evaporation*), en donde todo el eluyente del cromatógrafo líquido es evaporado durante la transferencia al cromatógrafo de gases, permitiendo la introducción de fracciones teóricamente de volumen ilimitado, aunque la pérdida del frente de disolvente produce un ensanchamiento de los picos de los compuestos más volátiles e incluso pérdidas de alguno de ellos.

Interfase tipo *loop*: El uso de la interfase anterior para transferir grandes fracciones de eluyente tienen dos desventajas claras: la primera es que los tiempos de transferencia de grandes volúmenes son largos debido al paso lento de los grandes volúmenes de vapores de disolvente a través de la columna de CG capilar. La segunda, es que el ajuste de condiciones que permitan una evaporación simultánea global del disolvente se hace más difícil. La introducción de la interfase tipo "loop" en la que la propia precolumna sin fase estacionaria se extiende fuera del sistema CG para convertirse en línea de transferencia unida al sistema LC, simplifica enormemente la transferencia y acorta los tiempos de evaporación de disolvente. La introducción de la muestra en el cromatógrafo de gases se realiza mediante la presión positiva ejercida por el gas portador que fluye desde detrás de la muestra.

Estas ventajas hacen que la mayoría de las aplicaciones CL-CG se lleven a cabo mediante evaporación simultánea de disolvente e interfase tipo "loop". Sin embargo, la evaporación parcial simultánea de disolvente e interfase tipo "on-column" sigue siendo el método de elección si se deben analizar compuestos volátiles.

Por lo que respecta al sistema CL empleado, hasta la fecha, prácticamente todas las aplicaciones CL-CG emplean cromatografía líquida en fase normal, ya que el acoplamiento de CL en fase reversa con eluyentes acuosos crea muchos problemas para su transferencia a un sistema de CG, debido a la problemática de la introducción de agua en el sistema cromatográfico y de mojabilidad de las precolumnas utilizadas.

Es interesante hacer notar que una de las primeras aplicaciones del acoplamiento CL-CG trata de la determinación del herbicida atrazina. Otros ejemplos de aplicaciones CL-CG en ARP son el análisis del pesticida experimental CGA 80000 en tejidos biológicos por CL-CG-ECD; la determinación de dicamba y otros herbicidas ácidos en hojas de tabaco mediante derivatización seguida de CL-CG y varias determinaciones de pesticidas organoclorados y PCBs en varios tipos de muestras.

El potencial del acoplamiento CL-CG reside principalmente en su gran selectividad. Numerosos procedimientos analíticos incluyen una preseparación o purificación de la muestra mediante CL "off-line". La elevada eficacia obtenida por la CL permite la preseparación de grupos de compuestos muy semejantes, así como una purificación en el análisis de trazas en matrices altamente complejas, donde es necesario aislar los compuestos de interés de la gran cantidad de interferentes, como ocurre en ARP.

3) Cromatografía Líquida - Cromatografía Líquida (CL-CL).

La primera aplicación de CL con columnas acopladas se propuso en 1973. Actualmente, se realizan dos modos diferentes de acoplamiento: con precolumna enriquecedora (*trace enrichment*) (PC-CL) y con columnas acopladas (CL-CL).

PC-CL.

La aparición de PC-CL en fase reversa para el análisis directo de muestras acuosas ha producido una proliferación de aplicaciones de la técnica de "*column-switching*", ya que, además del análisis automatizado, proporciona un satisfactorio enriquecimiento de los analitos, reemplazando a las etapas de concentración por extracción líquido-líquido o por extracción en fase sólida manual. Para ese tipo de muestras se obtiene suficiente sensibilidad con la inyección directa de 0.1-0.5 ml de muestra; sin embargo, para el análisis de contaminantes en muestras acuosas a nivel de sub-ppb se requiere la inyección de volúmenes de muestra entre 50-500 ml, que se deben suministrar mediante una bomba de CL. Esta última aproximación se ha aplicado ampliamente para la determinación de residuos de contaminantes en muestras acuosas como lo indica la abundante bibliografía sobre el tema.

En la mayoría de las aplicaciones, las precolumnas utilizadas presentan unas dimensiones entre 5-10 mm x 2-4.6 mm d.i.. Estos pequeños tamaños reducen el coste, permiten un muestreo rápido y previenen el ensanchamiento

de bandas durante la transferencia del analito a la columna analítica. Generalmente, se empaquetan con rellenos de 10-40 mm de tamaño de partícula, en lugar de 3-10 mm, para prevenir la obturación durante el análisis. El principal inconveniente de la técnica es la relativa falta de selectividad de proceso.

CL-CL.

En un intento de mejorar la selectividad de la CL con "column switching", la pequeña precolumna se ha ampliado a las dimensiones de una auténtica columna separadora, lo cual permite llevar a cabo una separación cromatográfica completa, más que una etapa de enriquecimiento (figura 11).

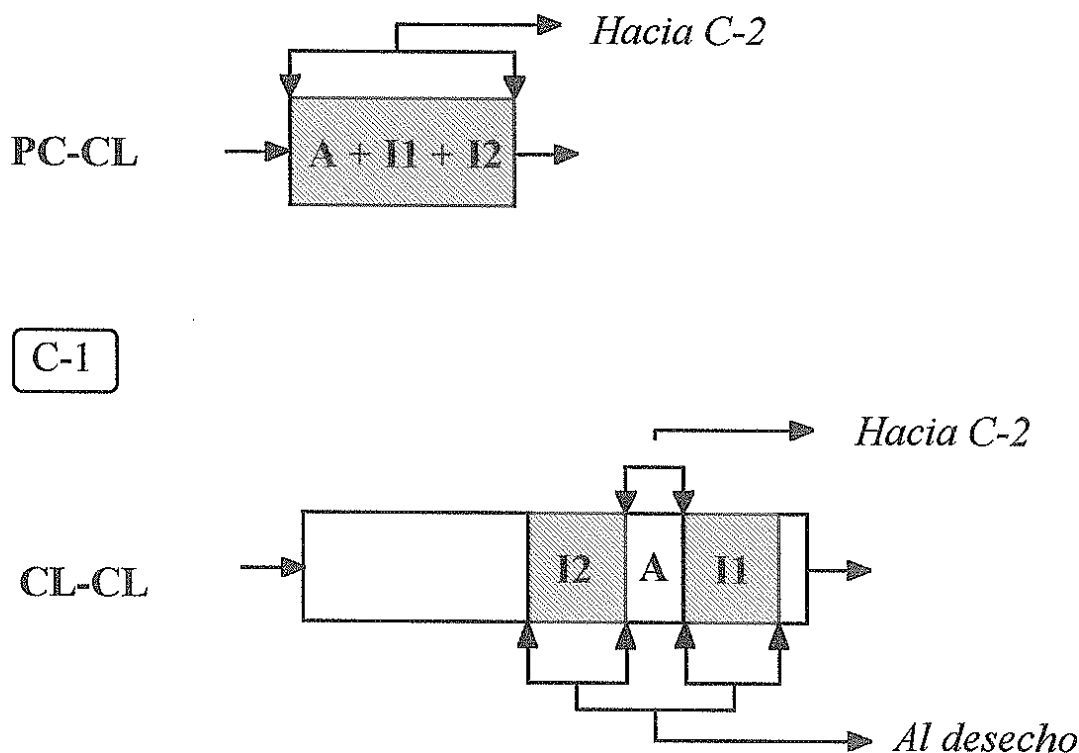


Figura 11. Representación esquemática de la diferencia de selectividad entre las técnicas acopladas PC-CL y CL-CL.

Por otro lado, la combinación de dos columnas de separación que contengan fases estacionarias con similar selectividad, también parece una buena aproximación. Este sistema es fácil de montar, y ya en 1976 se propuso un sistema CL-CL en fase normal para la purificación "on-line" de pesticidas organoclorados en extractos lácteos (, que posteriormente se automatizó.

La CL-CL es una técnica muy adecuada para la determinación selectiva de un número limitado de analitos presentes en una matriz compleja. El aislamiento de una fracción apropiada de la primera columna y su

transferencia a la segunda, proporciona generalmente la selectividad requerida en el análisis de trazas.

Recientemente se han desarrollado algunas aplicaciones para la determinación de pesticidas polares en diferentes matrices utilizando CL-CL.

Aplicación de CL-CL al análisis de residuos de plaguicidas

- Fungicida iprodiona en muestras de agua superficial. Se realiza un extracción líquido-líquido con diclorometano, 2ml del extracto se inyectan en la columna enriquecedora, se realiza un lavado para eliminar interferentes y se transfiere a la columna separadora.

- N-metil carbamatos en alimentos: cromatografía con columnas acopladas sobre fases C₁₈.

- Herbicidas polares en agua subterránea: bromacilo, diuron y 3,4-dicloroanilina. Extracción con diclorometano, inyección de 100 ml en un sistema CL-CL con columnas C₁₈.

- Herbicidas bentazona y cianazina en aguas superficiales: tras concentrar el agua de 100 a 2 ml por evaporación, se inyecta una alícuota de 100 ml en el sistema CL-CL con columnas tipo C₁₈. El procedimiento permite alcanzar niveles de detección de hasta 0.1 ppb.

- Procedimiento multiresidual para plaguicidas polares en cereales: 9 compuestos analizados con columnas C₁₈ (50 cm) y elución con mezclas MeOH/acetato sódico, con límites de detección del orden de 0.05 mg/Kg.

- Procedimiento multiresidual para herbicidas fenoxiácidos en aguas: determinación de hasta 8 compuestos mediante inyección directa de 400 ml de muestra en un sistema CL-CL con una primera columna ISRP (2 cm) (internal surface reverse phase) y una segunda columna tipo C₁₈. Las fases móviles MeOH/agua acidificada con ácido trifluoroacético.

- Determinación de los herbicidas glifosato, glufosinato y AMPA en aguas y suelos: inyección de 2 ml de muestra, previamente derivatizada con FMOC, en una primera columna C₁₈ (3 cm) y transferencia a una segunda columna tipo amino (25 cm). Las fases móviles consisten en mezclas de acetonitrilo/tampón fosfato en diferentes concentraciones.

Como se ha podido observar a lo largo de este trabajo, el análisis de residuos de plaguicidas es un tema complejo y difícil, no existiendo procedimientos ni técnicas universales para su análisis. En consecuencia, se debe considerar cada caso particular y establecer las condiciones adecuadas de extracción y clean-up, debiéndose optimizar también la separación cromatográfica y las condiciones para la detección, identificación y cuantificación del plaguicida.

Por otro lado, la complejidad de los equipos instrumentales necesarios (2 ó 3 cromatógrafos de gases con diferentes detectores y 1 ó 2 HPLC) y el elevado coste de los reactivos y disolventes empleados (especiales para

análisis de residuos) eleva el precio de los análisis considerablemente, en comparación con el análisis de compuestos inorgánicos. Además, se necesita personal cualificado para el uso y mantenimiento de los sofisticados equipos cromatográficos.

Bibliografía básica

- 1) RODIER, (1981) "Análisis de las Aguas", Omega, .
- 2) "Pesticide Residue Analysis", (1984). Proceedings of a Joint FAO/WHO Course, Eger, Hungary, April 1983. FAO/WHO.
- 3) COOLIN, F. POOLE, SHEILA, A. SCHUETTE, (1984). "Contemporary Practice of Cromatography", Elsevier.
- 4) J. RICHARD, G.A. JUNK, (1986). *Mikrochim. Acta*, 1, 387-94.
- 5) "Evaluation of Pesticides in Groundwater" (1986). ACS Symposium Series, 315, M. Joan Comstock Series Editor, American Chemical Society.
- 6) "Manual of Pesticides Residue Analysis" (1987) Hans-Peter Thier and Hans Zeumer Ed., Pesticides Commission DFG, VCH.
- 7) MARTHA J.M. WELLS, JERRY L. MICHAEL, (1987). *J. Cromatogr. Science*, 25, 345-350.
- 8) F. HERNÁNDEZ, F.J. LÓPEZ, J. MEDINA, J.C. BARBERÁ, (1987). *J. Assoc. Offic. Anal. Chem.*, 70, 727-33.
- 9) "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater", American Public Health Association, 17th Edition, Washington (1989).
- 10) F. LISKA, J. KRUPCIK, P.A. LECLERCQ, (1989). *J. High Resol. Chromatogr.*, 12, 577-90.
- 11) F. HERNÁNDEZ, J. BELTRÁN, J.V. SANCHO, (1990). *Phytoma España*, 17, 16-27.
- 12) J. BELTRÁN, F. HERNÁNDEZ, J.V. SANCHO, (1990). *CTA*, 11, 5-10.
- 13) J.V. SANCHO, F. HERNÁNDEZ, J. BELTRÁN, (1990). *CTA*, 11, 11-21.
- 14) "Pesticide Analytical Manual", (1990). Vol I, Chap 5 "High Performance Liquid Chromatography", FDA, July.
- 15) "Pesticide Residues in Food", (1990). Technologies for Detection, Technomic Publishing Co., Pensilvania.
- 16) P. NAVARRETE (ITGE),(1991). "Incidencia de las prácticas agrícolas en la calidad de las aguas subterráneas", Curso "Contaminación de Aguas Subterráneas", Laboratorio de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Universitat Jaume I, Castellón, Abril-Junio.
- 17) J. BELTRÁN, F. HERNÁNDEZ, I. MORELL, P. NAVARRETE, E. AROCA, (1993). "Analysis of several pesticides along the unsaturated zone in an experimental citrus grove of Castellón (Spain)", *Science of the Total Environment*, 132. 297-312.
- 18) P. VAN ZONEN, E.A. HOGENDOORN, G.R. VAN DER HOFF, R.A. BAUMANN, (1992). *Tr. in Anal. Chem.* 11 11.
- 19) K. GROB, On-line coupled LC-GC, (1991). Hüthig, Heidelberg.

