

Instituto "López-Neyra" de Parasitología
Sección de Fisiología y Bioquímica del Parasitismo

METODO "MULTIRRESIDUO" PARA LA DETERMINACION DE PESTICIDAS

por

JOSE MARIA ABENZA y MIGUEL MONTEOLIVA

INTRODUCCION

Una reciente Orden (1) del Ministerio de Agricultura, limita el libre uso de los pesticidas clorados (DDT, lindano, aldrín, etc.) hasta el 1 de enero de 1977. Desde esta fecha sólo podrán emplearse en campañas de tipo oficial. Esta Orden que simplemente formula la prohibiciones que ya existían en otros países, es consecuencia de los efectos nocivos secundarios que presentan estos plaguicidas en razón a sus características de persistencia y acumulación. El tiempo medio que requiere un pesticida para desaparecer del medio ambiente es muy variado. El malation necesita 5 a 8 días, mientras que el DDT y el dieldrin requieren de 5 a 30 años para desaparecer (2). Ahora bien, prohibir el uso de estos plaguicidas no elimina las acumulaciones

tectando estos plaguicidas por muchos años, conforme se vayan movilizandando de sus depósitos. Siguen siendo de actualidad los métodos de determinación de pesticidas clorados y más concretamente los denominados métodos multirresiduo, por cuanto que, en tratamientos concretos donde se conozca la naturaleza del pesticida empleado sólo resta determinar su concentración, pero en análisis de residuos ambientales hay que conjuntar la identificación con la determinación. Estas condiciones las reúnen los métodos cromatográficos, tanto de capa fina (3-7), la de columna (4) (6-8) o gaseosa (8-16). Mejor identificación

técnicas: cromatografía en columna y gaseosa (4) (7) (8) bien colum-

na y capa fina (6). En este trabajo hemos intentado conjugar el fraccionado en cromatografía en columna de florisil con la cromatografía gaseosa empleando un detector de captura de electrones.

MATERIAL Y METODOS

Instrumentación. Se ha utilizado un Cromatógrafo de Carbo Erba, modelo FTV 2.200 equipado con un detector de captura de electrones con Ni^{63} como fuente radiactiva. La columna de vidrio de 2 metros y de 3×6 de diámetro, rellena con Gas Chrom P con el 2% de SE-30 como fase estacionaria. Otras condiciones de empleo son:

Temperatura de la columna = $180^{\circ}C$;
60 ml./minuto.

Temperatura del detector $210^{\circ}C$. Atenuación 100×16 en el electrómetro.

Temperatura del inyector = $250^{\circ}C$; En el registrador = 1 mV anchura de papel. Velocidad registro: Determinación de tiempos de retención = 1 cm/m.; otras medidas = 0,1 cm/m.

Reactivos. Todos los reactivos empleados son de calidad cromatográfica.

Pesticidas. Los pesticidas utilizados son muestras patrones suministradas por casas comerciales.

Relleno de la columna. Florisil 60-100 mallas, BDH.

Método de extracción. Para los ensayos de recuperación, se han empleado 100 g. peras, que previamente mondadas y lavadas se les ha añadido 5 ml

de solución de CINA al 2% en agua destilada, se agita suavemente y se deja reposar para que separe la capa acuosa de la etérea. Esta última se pasa a otra ampolla de decantación donde se lava dos veces con 100 ml. de agua destilada. Por último la capa etérea se trata con unos 10 g. de sulfato sódico anhidro para deshidratarla. El extracto etéreo se concentra en un Kuderna-Danish hasta un volumen de 2 ml.

Fraccionamiento en columna. Se emplea una columna de vidrio de 10 cm. de altura y 5 mm. Ø interior rellena de Florisil (éste previamente ha sido activado a 650°C

hasta el momento de su uso). Sobre la columna de Florisil, se coloca siempre unos gramos de sulfato sódico anhidro. En primer lugar la columna se lava con eter de petróleo. Después se introduce en la columna los 2 ml. del extracto anterior o bien 2 ml. de soluciones patrones y posteriormente se procede a la elución de los pesticidas pasando sucesivamente

- (I) Eter de petróleo/eter sulfúrico (94:6)
- (II) Eter de petróleo/eter sulfúrico (85:15)
- (III) Eter de petróleo/eter sulfúrico (65:35)
- (IV) Eter de petróleo/eter sulfúrico (50:50)

Para los ensayos de recuperación, se rec de cada fracción. que se concentran a 2 ml. en el Kuderna-Danish, que mediante vacío se llevan a sequedad y el residuo se redissuelve en 5 ml. de hexano, del cual se toman 5 microlitros qu se inyectan en el cromatógrafo.

Para los ensayos de comportamiento de la columna de Florisil, los eluatos se recogen en fracciones de 10 ml. de hexano y de esta solución se toman 5 microlitros que se inyectan en el cromatógrafo.

TABLA NUM. I

PESTICIDAS ESTUDIADOS:

<i>Nombre común</i>	<i>Sinonimia</i>	<i>Nombre sistemático (BSI)</i>
Aldrin	HHDN	1, 2, 3, 4, 10, 10-hexacloro-1, 4, 4a, 5, 8, 8a-hexahidro-exo-1, 4-endo-5, 8-dime. tanonaftaleno.
Clorobencilato	Akar	4,4'-diclorodifenilglicolato de etilo
DDT	Zeldano, Gerasol	1, 1, 1-tricloro-2, 2, -di-(4-clorofenil) etano.
Diazinon	Neocidol	dietil 2-isopropil . 6 - metil-4-pirimidinil fosforotonato

(Continuación de la Tabla núm. I)

Nombre común. Sinonimia		Nombre sistemático (BSI)
Endrin	—	1, 2, 3, 4, 10, 10-hexacloro-6, 7-epoxi-1, 4, 4a, 5, 6, 7, 8, 8a-octahidro-exo-1, 4-exo-5, 8-dimetanonaftaleno.
Etion	Nialato	tetraetil. SS'-metilen-bis (fosforotiolotionato).
Fenitrotion	Folition, Sumition	dimetil 3-metil-4-nitrofenil fosforotio- nato.
Heptacloro	—	1, 4, 5, 6, 7, 8, 8-heptacloro-3a, 4, 7, 7a- -tetrahidro-4, 7-metano indeno.
Lindano	gamma-BHC, g. HCH gamma-hexano	1, 2, 3, 4, 5, 6-hexaclorociclohexano.
Malation	Malaton, carbofos	S-(1, 2-di(etoxicarbonil)etil) dimetilfos- forotiolotionato.
Metidation	Supracide	S-(2, 3-dihidro-5-meetoxi-2-oxo-1, 3, 4- -tiadiazol.3-ilet) dimetil fosforotiolotio- nato.
Metoxicloro	DMDT, Marlate	1, 1, 1-tricloro-2, 2-di (4-metoxifenil)eta- no.
Tetradifon	Tedion	2, 4, 4', 5-tetraclorodifenil sulfona.
DDE	—	1, 1-dicloro-2, 2-di-(4-clorofenil)eteno.
TDE	DDD, Rotano	1, 1-dicloro-2, 2-di-(4-clorofenil) etano.
Imidan	Fosmet	OO--dimetil ftalimido-metil fosforotio- lotionato.
Quinotionato	Eradex, Tioquinox	2-tio-1, 3-ditio-1, 3-ditio-(4, 5-b) quinoxalina.

TABLA NUM. II

RESPUESTA DEL DETECTOR DE CAPTURA DE ELECTRONES: Altura del pico en mm. en función de los nanogramos inyectados.

<i>Pesticida</i>	nanogramos inyectados											
	25,00	20,00	15,00	10,00	7,50	5,00	3,75	2,50	1,87	1,25	0,63	0,31
Aldrin	—	—	—	—	—	—	—	155	133	111	61	31
Heptacloro	—	—	—	—	—	—	—	166	146	124	74	36
Lindano	—	—	—	—	—	—	—	180	169	124	105	64
DDE	—	—	—	—	—	160	140	120	—	70	37	—
Endrin	—	—	—	—	—	152	131	110	—	63	33	—
Clorobencilato	49	41	33	25	—	18	—	10	—	—	—	—
Diazinon	65	56	45	25	—	22	—	15	—	—	—	—
Metidation	109	97	81	67	—	53	—	32	—	—	—	—
Metoxicloro	140	124	100	76	—	38	—	18	—	—	—	—
TDE	—	—	—	145	124	103	—	59	—	30	—	—
DDT	—	—	—	160	135	110	—	61	—	30	—	—
Folition	157	153	142	134	—	118	—	96	—	65	—	—
Etion	134	127	120	114	—	86	—	58	—	37	—	—
Tetradifon	105	95	84	76	—	65	—	51	—	33	—	—
Quinotionato	96	81	65	51	—	31	—	18	—	9	—	—
Malation	84	77	70	63	—	51	—	38	—	23	—	—
Imidan	37	32	28	23	—	17	—	6	—	—	—	—

TABLA NUM. III

LIMITES DE DETECCION EN LAS CONDICIONES ENSAYADAS: nanogramos para una altura de pico de 10 mm.

<i>Pesticida</i>	<i>nanogramos</i>	<i>naturaleza</i>	Composición centesimal						
			C	H	Cl	N	N	S	O
Lindano	0,07	organoclorado	24,74	2,08	73,14	—	—	—	—
Heptacloro	0,09	"	32,17	1,35	66,48	—	—	—	—
Aldrin	0,10	"	39,50	2,21	58,30	—	—	—	—
Endrin	0,20	"	37,84	2,12	55,85	—	—	—	4,20
DDT	0,42	"	47,43	2,56	50,01	—	—	—	—
DDE	0,18	"	52,83	2,51	46,65	—	—	—	—
TDE	0,44	"	52,54	3,15	44,31	—	—	—	—
Tetradifon	0,54	"	40,48	1,70	39,83	—	—	9,01	8,99
Metoxicloro	1,34	"	55,59	4,37	39,77	—	—	—	9,26
Clorobencilato	3,09	"	59,09	4,34	21,81	—	—	—	14,76
Folition	0,20	organofosforado	38,99	4,36	—	5,05	11,17	11,57	28,85
Etion	0,45	"	28,11	5,77	—	—	16,11	33,36	16,65
Malation	0,72	"	36,35	5,80	—	—	9,38	19,41	29,06
Meitidation	1,07	"	23,84	3,64	—	9,27	10,26	31,78	21,19
Diazinon	2,64	"	47,36	6,95	—	9,20	10,18	10,54	15,77
Imidan	3,81	"	41,64	3,78	—	4,41	9,77	20,18	20,18
Quinotionato	1,46	ttiocarbonato	45,76	1,69	—	11,66	—	40,67	—

TABLA NUM. IV

FRACCIONADO EN COLUMNA DE FLORISIL y tiempos de retención en minutos y segundos

<i>Pesticida</i>	<i>T. R.</i>	<i>Característica de elución de la columna</i>	<i>Máxima altura pico dentro de la fracción</i>
Fracción I: 10 ml. eter petróleo/eter sulfúrico 94/6			
Lindano	1,24"	pico simétrico	F-3
Diazinon	1'36"	pico simétrico difuso	F-7 a F-15
Heptacloro	2'12"	pico simétrico	F-4
Aldrin	2'42"	ligera cola	F-2
DDE	4'50"	pico simétrico	F-3
Endrin	5'12"	ligera cola	F-4
Quinotlonato	5'48"	pico simétrico	F-2
TDE	6'05"	"	F-2
Etion	6'48"	"	F-3
DDT	8'00"	"	F-4
Metoxicloro	12'48"	"	F-5
Fracción II: 100 ml. de eter petróleo/eter sulfúrico 85/15			
Diazinon	1'36"	difuso	F-7 a F-15
Folition	2'15"	difuso	F-17 a F-24
Clorobencilate	6'05"	larga cola	F-16 a F-22
Tetradifon	13'36"	larga cola	F-17
Fracción III: 100 ml. eter petróleo/eter sulfúrico 65/35			
Folition	2'15"	difuso	F-17 a F-24
Malation	2'36"	difuso	F-21 a F-28
Metidation	3'30"	larga cola	F-27
Clorobencilate	6'05"	larga cola	F-16 a F-22
Tetradifon	13'36"	larga cola	—
Fracción IV: 100 ml. eter petróleo/eter sulfúrico 50/50			
Metidation	3'30"	larga cola	—
Imidan	10'20"	corta cola	F-34

TABLA NUM. V

TANTO POR CIENTO DE RECUPERACION (5 ensayos)

<i>Pesticida</i>	<i>Media</i>	<i>SD</i>	<i>Pesticida</i>	<i>Media</i>	<i>SD</i>
Lindano	87,4%	5,4	Quinotionato	77,5	3,8
Diazinon	77,1	3,0	TDE	86,5	4,4
Heptacloro	91,1	3,6	Clorobencilato	64,8	6,6
Folition	89,7	6,7	Etion	89,1	4,6
Malation	80,2	5,5	DDT	90,3	3,8
Aldrin	84,6	3,6	Imidan	53,8	3,0
Metidation	75,7	6,0	Metoxicloro	83,0	2,8
DDE	88,1	4,7	Tetradifon	103,9	3,7
Endrin	88,6	4,6			

DISCUSION

El detector de captura de electrones especialmente diseñado para la detección de compuestos halogenados (pesticidas organoclorados)

en su molécula oxígeno, azufre o fósforo aunque su sensibilidad sea menor en estos últimos. En la tabla III puede observarse que hay una cierta correlación entre los límites de detección de los pesticidas clorados y el tanto por ciento de cloro que entra en la molécula. En el grupo de fosforados es más difícil encontrar esta relación puesto que en la captación de electrones influyen de forma diferente los diversos elementos que entran en la molécula. Sin embargo la pérdida de sensibilidad para los organofosforados no es obstáculo para utilizar este detector como detector general dado a que en términos de aplicación es mucho más importante la identificación de la naturaleza del pesticida (por su distinta toxicidad) que la cuantificación exacta del mismo. Prácticamente la determinación cuantitativa sólo requiere tener la seguridad de que los residuos encontrados no superan los límites de residuos recomendados por los Organismos Saniarios. Los límites prácticos de residuos en alimentos de la OMS (17) oscilan entre 0,002 a 1,0 partes por millón en alimentos de origen vegetal o animal o sea de 2 a 1.000 microgramos por kilo o litro.

En análisis directo la concentración límite mínima está a nivel de la sensibilidad del método (tabla III) para los plaguicidas fosfo-

rados, pero los métodos de extracción normalmente utilizados concentran el pesticida 20 a 100 veces lo que hace factible la determinación cuantitativa.

De la observación de la tabla II se deduce que no hay una linealidad absoluta en la respuesta del detector a la concentración del plaguicida. No es inconveniente puesto que para una mayor exactitud en las medidas puede diluirse la muestra hasta obtener la concentración que cae dentro de la zona de proporcionalidad.

En la tabla IV se exponen los resultados obtenidos en el fraccionamiento de los pesticidas estudiados en columna de Florisil. Hay una primera fracción que eluye con 100 ml. de eter de petróleo/eter sulfúrico (94/6) que agrupa casi todos los clorados así como el Eradex y el Etion. Su elución de la columna en pequeñas fracciones de 5 ó 10 ml. da un fraccionado con picos simétricos y algunas diferencias en el volumen de retención y que pueden permitir su diferenciación en caso de no identificarse por los tiempos de retención.

El incremento de polaridad del eluyente aumentando el porcentaje de eter sulfúrico permite eluir de la columna otros pesticidas pero con pérdida de la definición de los picos en el fraccionado, y en algunos casos incluso montan sobre dos fracciones generales.

En consecuencia, para la identificación de una sustancia nocida hay que fraccionar en columna de Florisil con los cuatro eluyentes indicados y una vez concentrados someter cada grupo por separado a la cromatografía gaseosa. El valor cuantitativo total de cada pesticida se obtiene sumando los valores parciales correspondientes a cada fracción.

Los ensayos de recuperación se han realizado empleando lotes de peras a los que previamente se les ha hecho un análisis en blanco para asegurarse de la inexistencia de pesticidas en las mismas. Los lotes así controlados se han adicionado de cantidades conocidas de los plaguicidas estudiados y se han sometido a la técnica de extracción y análisis indicadas en los métodos. Los resultados se expresan en la tabla V. Las recuperaciones son del orden del 80% o más, salvo en el caso del clorobencilato (64,8%) y del Imidan del que sólo se recupera la mitad.

RESUMEN

Se ha estudiado un método general de identificación y determinación de pesticidas combinando la cromatografía gaseosa con el

fraccionamiento en columna de Florisil. Por los tiempos de retención próximos en la cromatografía gaseosa pueden confundirse Aldrin y Malation, Folition y Heptacloro, Diazinon y Lindano, Clorobencilato y TDE, y DDE y Endrin. En el fraccionado en 4 grupos en columna de Florisil, pueden diferenciarse los que salen en fracción diferente. Esta diferencia es más completa si la elución se hace en fracciones de 5 ml. con los mismos eluyentes.

REFERENCIAS

- 1.—Boletín Oficial del Estado de 24 de diciembre de 1975.
- 2.—BALUJA G. (1963). *Medicamenta*, 61; 125.
- 3.—NAGASAWA, K., YOSHIDOME, H., (1969). *J. Chromatogr.* 39; 282.
- 4.—SUZUKI, F., MIYASHITA, K., NAGAGOSHI, H., KASHIWA, T., (1973). *Agr. biol. Chem.* 37; 1959.
- 5.—EBING W., (1969). *J. Chromatogr.*, 44; 81.
- 6.—WALES, P. J., MENDOZA, C. E., MCLEOD, H. A., MCKINLEY W. P., (1969). *Analyst*, 93; 691.
- 7.—HAMILTON, D. J., SIMPSON, B. W., (1969). *J. chromatogr.* 39; 186.
- 8.—WILLMOTT, F. W., DOLPHIN, R. J. (1974). *J. chromatogr.*, 12; 695.
- 9.—MCLEOD, H. A., BUTTERFIELD, A. G., LEWIS D., PHILLIPS W. E. J., COFFIN, D. E. (1975). *Anal. chem.* 47; 674.
- 10.—LEVI, I., NOWICKI, T. W., (1974). *J. ass. off. amer*
- 11.—WINDHAM, E. S., (1969). *J. ass. off. amer. chem.*, 52; 1237.
- 12.—THOMPSON, J. F. WALKER, A. C., MOSEMAN, R. F. (1969). *J. ass. off. amer. chem.*, 52; 1263.
- 13.—MALONE, B., BURJE, J. A., (1969). *J. ass. off. amer. chem.*, 52; 790.
- 14.—LEONI, V., PUOCETTI, G., (1969). *J. chromatogr.*, 43; 388.
- 15.—STEMP, A. R., LISKA, B. J., (1965). *J. dairy sci.*, 48; 985.
- 16.—RIPLEY, B. D., WILKINSON, R. J., CHAU, A. S. Y. (1974). *J. ass. off. amer. chem.* 57; 1031.
- 17.—Residuos de plaguicidas en los alimentos (1973). *Org. Mund. Salud. Ser. Inf. Tecn.* núm. 525.