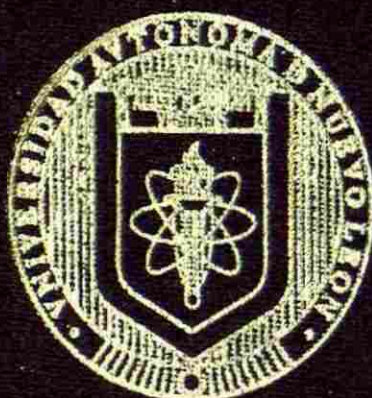


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA



DESARROLLO Y VALIDACION DE UN METODO DE EXTRACCION
EN FASE SOLIDA PARA LA DETERMINACION DE PLAGUICIDAS
CATIONICOS (CUATS) EN ALIMENTOS

POR:

Q.C.B. IDALIA FRANCISCA CARMONA ALVARADO

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER
EL GRADO DE MAESTRIA EN CIENCIAS CON
ORIENTACION TERMINAL EN QUIMICA BIOMEDICA

AGOSTO, 2006

TM

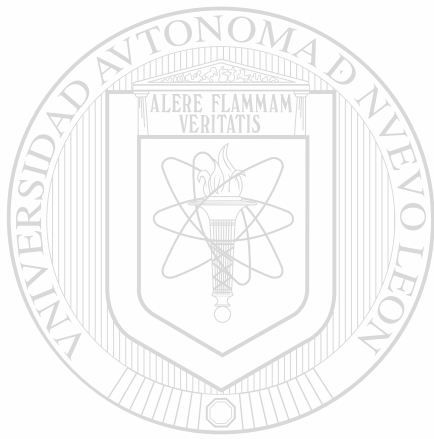
SB952

B5

C3

2006

c.1



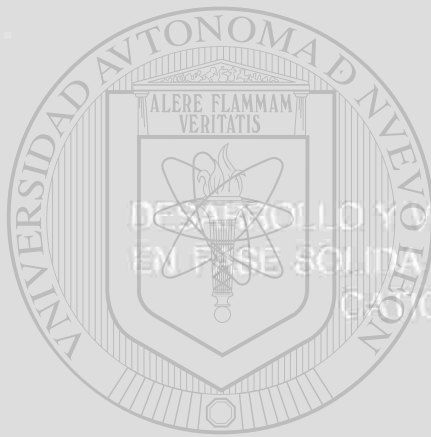
UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA



DESARROLLO Y VALIDACION DE UN METODO DE EXTRACCION
EN FASE SOLIDA PARA LA DETERMINACION DE PLAGUICIDAS
CATIONICOS (CUATS) EN ALIMENTOS

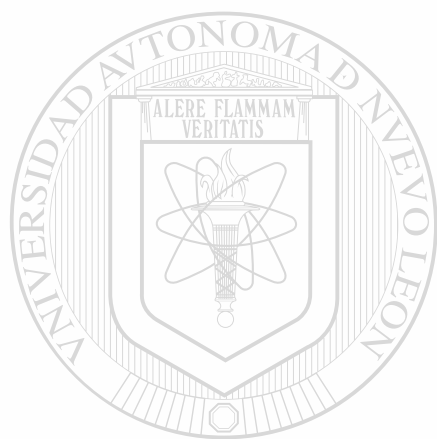
UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
POR

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER
EL GRADO DE MAESTRIA EN CIENCIAS CON
ORIENTACION TERMINAL EN QUIMICA BIOMEDICA

AGOSTO, 2008



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

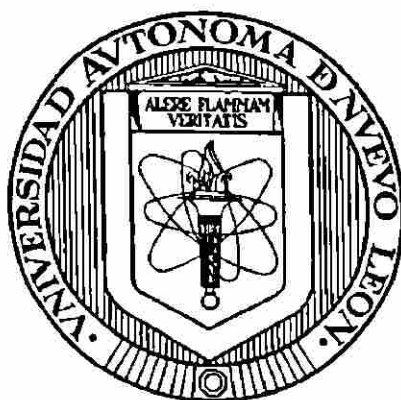
®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO DE EXTRACCIÓN EN
FASE SÓLIDA PARA LA DETERMINACIÓN DE PLAGUICIDAS
CATIÓNICOS (CUATS) EN ALIMENTOS**

Por

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS
Q.C.B. IDALIA FRANCISCA CARMONA ALVARADO

**Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRIA EN CIENCIAS con Orientación
Terminal en Química Biomédica**

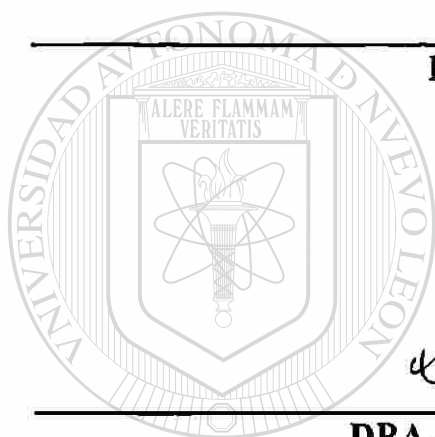
Agosto, 2006

**DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO DE EXTRACCIÓN EN
FASE SÓLIDA PARA LA DETERMINACIÓN DE PLAGUICIDAS
CATIÓNICOS (CUATS) EN ALIMENTOS**

Aprobación de Tesis:



DRA. ROCÍO CASTRO RÍOS
Director de Tesis



DRA. NOEMÍ WAKSMAN DE TORRES
Co-Director de Tesis

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



DRA. MA. DE LA LUZ SALAZAR CAVAZOS
Co-Director de Tesis



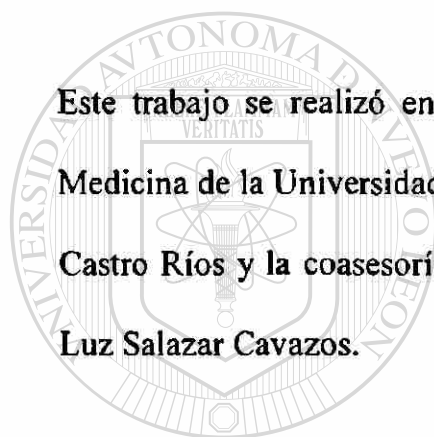
DR. DIONICIO A. GALARZA DELGADO
Subdirector de Estudios de Posgrado

DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO DE EXTRACCIÓN EN FASE
SÓLIDA PARA LA DETERMINACIÓN DE PLAGUICIDAS CATIONICOS
(CUATS) EN ALIMENTOS

Presentado por:

Q. C. B. IDALIA FRANCISCA CARMONA ALVARADO

Este trabajo se realizó en el Departamento de Química Analítica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la asesoría de la Dra. Rocío Castro Ríos y la coasesoría de la Dra. Noemí Waksman de Torres y la Dra. Ma. de la Luz Salazar Cavazos.



UANL

FIRMAS
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS
DIRECTOR CO DIRECTOR

Dra. Rocío Castro Ríos

Dra Noemí Waksman de Torres

CO DIRECTOR

Dra. Ma. de la Luz Salazar Cavazos

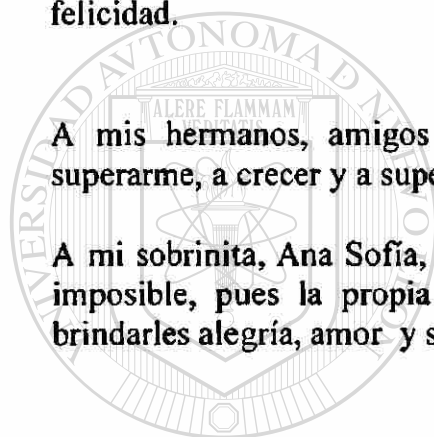
Dedico esta tesis con gran amor:

A mi esposo Rafael Santos e Hijas Idalia Berenice y Ana Karen, por ser mi gran tesoro, el sostén de mi vida e inspiración para que siguiera adelante y terminara la maestría, gracias por acompañarme paso a paso por este camino hacia un logro más en mi vida profesional, sin ustedes no lo hubiera logrado.

A mis padres, Antonio Carmona y Ma. de Jesús Alvarado, por ser un ejemplo a seguir, por su apoyo incondicional, por su amor y por el significado que ellos le dan a la palabra felicidad.

A mis hermanos, amigos de toda la vida, Nena, Toñy y Pepe por motivarme a superarme, a crecer y a superar los obstáculos de todos los días.

A mi sobrinita, Ana Sofia, por ser la luz al final del camino y recordarme que nada es imposible, pues la propia vida es un milagro. Y a su padre, Víctor Santana, por brindarles alegría, amor y seguridad.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

“La gratitud es un valor propio de almas grandes. Agradecer significa encontrar un motivo para dar gracias. Y encontrarlo es posible si tenemos los ojos bien abiertos y el corazón despierto para descubrir los miles de gestos que nos brindan los demás a todas horas.”

A Dios por ser el que guía mis pasos en este camino por darme esperanza, amor y fe.

A mis asesores: la Dra. Rocío Castro Ríos, la Dra. Ma. de la Luz Salazar y a la Dra. Noemí Waksman de Torres, por su tiempo y esfuerzo durante la realización de esta tesis.

A la Dra. Ma. de la Luz Salazar por sus conocimientos compartidos y por sus valiosos consejos. Admiro su calidad humana, la cual me brindó aliento para seguir adelante.

A la Dra. Noemí Waksman de Torres por el respeto, confianza y apoyo incondicional mostrado en el presente trabajo.

A M.C. Lidia Naccha Torres por su agradable compañía, su sabiduría y valiosos consejos. Gracias su gran amistad.

A mi amiga incondicional, Norma, por apoyarme y creer en mí, como siempre lo ha hecho. A mi compadre Héctor y a su familia por aligerar la carga con su alegría y optimismo.

A Aurora, porque todo este tiempo sirvió para fortalecer nuestra amistad.

A mis compañeras de oficina, gracias por su apoyo.

A las técnicas Graciela, Ivonne y Maribel por proporcionarme el material necesario para la realización de mi trabajo.

A Vero Camarillo, Martha y Gloria por amistad y oraciones.

A las Doras. Vero Rivas, Nora Díaz, y Yareli; a la maestra Elsa; y a los Dores. Ricardo y Alejandro, por escucharme y guiarme para la mejor preparación de mi trabajo.

Al grupo de la una por hacer más amenos mis días.

A CONACYT por el apoyo económico que me brindó para realizar este proyecto de tesis

A todo aquel que se cruzó en mi camino, que lo influyó, que de una forma u otra me apoyó, muchas gracias.

RESUMEN

Idalia Francisca Carmona Alvarado

Fecha de graduación: Agosto del 2006

**Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Medicina**

Título del Estudio: DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO DE EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA PARA LA DETERMINACIÓN DE PLAGUICIDAS CATIONICOS (CUATS) EN ALIMENTOS

Número de páginas: 79

**Candidato para el grado de Maestría
en Ciencias con orientación terminal
en Química Biomédica**

Área de Estudio: Química Analítica

Propósito y Método del Estudio

Se estableció un método de extracción y preconcentración para el análisis de paracuat (PQ), dicuat (DQ) y difenzocuat (DF) en muestras de alimentos (arroz, brócoli, lechuga y agua potable) mediante extracción en fase sólida (SPE) con cartuchos de intercambio catiónico de modo mixto. Se determinó el volumen de ruptura de los herbicidas de amonio cuaternario para comparar la capacidad de carga de los adsorbentes. Para establecer las condiciones óptimas de la extracción se evaluaron parámetros tales como: tipo de adsorbente, volumen de muestra, solvente de elución (composición, concentración, pH, modificador orgánico), velocidad de la extracción y perfil de elución. Se obtuvieron recuperaciones entre 12 % y 99 %, con precisión aceptable y aunque la recuperación para el arroz, brócoli y lechuga no fueron las óptimas, el método permitió detectar los analitos a los niveles legislados. Para el caso del germen de trigo y harina de maíz el método propuesto no resultó ser adecuado.

Contribuciones y Conclusiones

Se desarrolló y optimizó un método preciso de SPE para la determinación de cuats en arroz, brócoli, lechuga y agua que permite detectar estos plaguicidas a niveles bajos. Los parámetros que mayor influencia tuvieron en la SPE de los cuats fueron: fase estacionaria, contraión y modificador orgánico. A pesar de haber obtenido bajas recuperaciones de los cuats en matrices de arroz, brócoli y lechuga, el método permite detectarlos a los niveles legislados empleando HPLC con detección UV.

DIRECTOR



Dra. Rocío Castro Ríos

INDICE

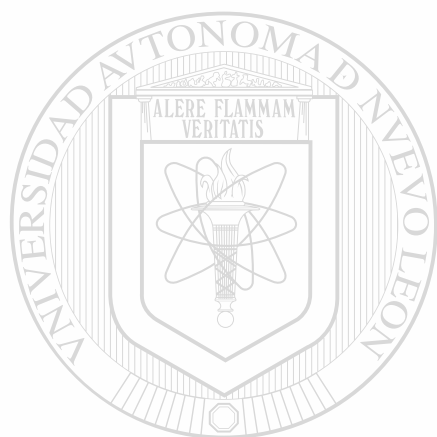
| Capítulo | Página |
|---|-----------|
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.1. Compuestos de Amonio Cuaternario (Cuats) | 1 |
| 1.1.1. Generalidades de los Cuats | 1 |
| 1.1.2. Estructura química y productos comerciales | 2 |
| 1.1.3. Historia y Usos | 3 |
| 1.1.4. Acción Herbicida | 5 |
| 1.1.5. Evaluación Medioambiental | 5 |
| 1.1.6. Toxicidad. | 6 |
| 1.1.7. Normatividad Nacional e Internacional | 9 |
| 1.1.8. Propiedades Fisicoquímicas | 11 |
| 1.2. Métodos Analíticos para la determinación de los Cuats | 14 |
| 1.2.1. Cromatografía de Líquidos | 16 |
| 1.3. Tratamiento de muestra | 18 |
| 1.3.1. Extracción en fase sólida | 22 |
| 1.3.1.1 Descripción del cartucho de SPE | 23 |
| 1.3.1.2 Etapas de la SPE | 24 |
| 1.4. Justificación | 26 |
| 1.5. Objetivos | 26 |
| 1.5.1. Objetivo General | 26 |
| 1.5.2. Objetivos específicos | 26 |
| 2. MATERIAL Y MÉTODOS | 27 |
| 2.1. Equipo, material y reactivos | 27 |
| 2.1.1. Equipo | 27 |
| 2.1.2. Materiales | 28 |
| 2.1.3. Reactivos | 29 |
| 2.2. Métodos | 30 |
| 2.2.1. Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución con Detector de Arreglo de Diodos | 30 |
| 2.2.1.1. Condiciones cromatográficas | 30 |
| 2.2.2. Preparación de la mezcla estándar de cuats | 32 |
| 2.2.3. Preparación de la curva de calibración | 32 |
| 2.2.4. Establecimiento de las condiciones óptimas de la SPE | 33 |
| 2.2.4.1. Volumen de Ruptura | 33 |
| 2.2.4.2. Solvente de Elución | 34 |

| Capítulo | Página |
|--|---------------|
| 2.2.5 Velocidad de flujo | 35 |
| 2.2.6 Perfil de elución | 35 |
| 2.2.7 Preparación de la muestra | 36 |
| 2.2.8 Evaluación | 37 |
| 2.2.9 Aplicación | 37 |
| 3. RESULTADOS | 38 |
| 3.1 Optimización del procedimiento de SPE | 38 |
| 3.1.1 Volumen de Ruptura | 38 |
| 3.1.2 Solvente de elución | 40 |
| 3.1.2.1 Elección del Contraión | 40 |
| 3.1.2.2 Concentración del contraión | 43 |
| 3.1.2.3 pH del solvente de elución | 46 |
| 3.1.2.4 Modificador Orgánico | 48 |
| 3.1.3 Velocidad de flujo | 53 |
| 3.1.4 Perfil de elución | 55 |
| 3.1.5 Condiciones óptimas de extracción | 57 |
| 3.2 Validación | 60 |
| 3.2.1 Precisión y Recuperación | 60 |
| 3.3 Análisis de muestras reales | 62 |
| 4. DISCUSIÓN | 64 |
| 4.1 Optimización del procedimiento de SPE | 64 |
| 4.1.1 Volumen de Ruptura | 66 |
| 4.1.2 Solvente de elución | 67 |
| 4.1.2.1 Contraión | 67 |
| 4.1.2.2 Concentración del contraión | 68 |
| 4.1.2.3 Efecto del pH | 69 |
| 4.1.2.4 Tipo y proporción del Modificador Orgánico | 70 |
| 4.1.3 Velocidad | 71 |
| 4.1.4 Perfil de elución | 72 |
| 4.1.4 Selección de la fase estacionaria | 72 |
| 4.2 Validación | 73 |
| 4.3 Análisis de muestras reales | 74 |
| 5. CONCLUSIONES | 75 |
| BIBLIOGRAFÍA | 76 |

LISTA DE TABLAS

| Tabla | | Página |
|--------------|--|---------------|
| 1.1 | Nombre, estructura y productos comerciales de los cuats | 2 |
| 1.2 | Clasificación de Categorías de Toxicidad Aguda del PQ y DQ | 8 |
| 1.3 | Límite Máximo de Residuos (LMR) | 10 |
| 1.4 | Propiedades Fisicoquímicas de los cuats | 13 |
| 1.5 | Ejemplo de algunos materiales utilizados para realizar la preconcentración de los cuats en matrices reales | 21 |
| 2.1 | Condiciones a optimizar para la selección de la composición del eluente | 34 |
| 2.2 | Nivel adicionado de cuats para cada alimento | 37 |
| 3.1 | Efecto del contraíón en cartuchos de Oasis MCX | 41 |
| 3.2 | Efecto del contraíón en cartuchos de Strata Screen C | 41 |
| 3.3 | Efecto de la concentración del contraíón en la recuperación en los cartuchos de Oasis MCX | 44 |
| 3.4 | Efecto de la concentración del contraíón en la recuperación en los cartuchos de Strata Screen C | 44 |
| 3.5 | Efecto del pH del solvente de elución en cartuchos de Oasis MCX | 46 |
| 3.6 | Efecto del pH del solvente de elución en cartuchos de Strata Screen C | 46 |
| 3.7 | Efecto del ACN como Modificador Orgánico en los cartuchos de Oasis MCX | 49 |
| 3.8 | Efecto del MeOH como Modificador Orgánico en los cartuchos de Oasis MCX | 49 |
| 3.9 | Efecto del ACN como Modificador Orgánico en los cartuchos de Strata Screen C | 50 |
| 3.10 | Efecto del MeOH como Modificador Orgánico en los cartuchos de Strata Screen C | 50 |

| Tabla | Página |
|--|---------------|
| 3.11 Efecto de la velocidad de flujo en Oasis MCX | 53 |
| 3.12 Efecto de la velocidad de flujo en Strata Screen C | 53 |
| 3.13 Condiciones óptimas para la SPE en los cartuchos de Oasis MCX y en los de Strata Screen C | 57 |
| 3.14 Resultados de la precisión y recuperación para el método | 60 |



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

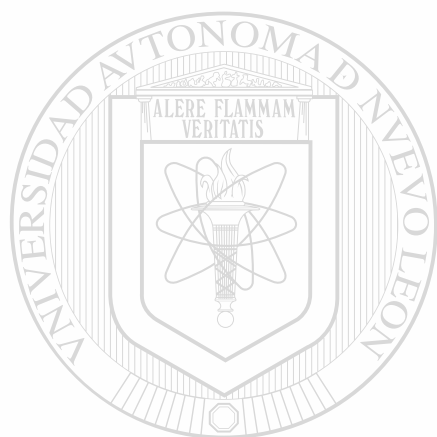
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



LISTA DE FIGURAS

| Figura | Página |
|--|-----------------|
| 1.1 Cartucho de SPE | 23 |
| 3.1 Curva de ruptura de los cuats (20 ppm) obtenida con los cartuchos a) Oasis MCX y b) Strata Screen C | 39 |
| 3.2 Efecto del contraión en a) Oasis MCX y b) Strata Screen C. Contraión (2 M, pH 3)-MeOH 50:50 v/v | 42 |
| 3.3 Efecto de la concentración del contraión en la recuperación. Elución con formiato de amonio-Metanol 50:50 v/v a)Oasis MCX y b) Strata Screen C | 45 |
| 3.4 Efecto del pH del solvente de elución a) Oasis y b) Strata Screen C Elución con formiato de amonio 2 M-MeOH 50:50 v/v | 47 |
| 3.5 Efecto del Modificador Orgánico en Cartuchos de Oasis MCX a) % de ACN y b) % de MeOH. Elución con formiato de amonio 2 M pH 3 | 51 |
| 3.6 Efecto del Modificador Orgánico en Cartuchos de Strata Screen C a) % de ACN y b) % de MeOH. Elución con formiato de amonio 2 M pH 3 | 52 [®] |
| 3.7 Efecto de la velocidad de flujo en a) Oasis MCX.y b) Strata Screen C Elución con formiato de amonio (2 M, pH 3)- ACN 50:50 v/v | 54 |
| 3.8 Perfil de elución del PQ, DF y DQ en formiato de amonio (2M, pH 3)-ACN 50:50 v/v en a) Oasis MCX y b) Strata Screen C | 56 |
| 3.9 Cromatogramas obtenidos, a 257 nm y 310 nm, para una mezcla estándar de cuats (20 ppm) bajo las condiciones óptimas de extracción en Oasis MCX resumidas en la tabla 3.13 | 58 |
| 3.10 Cromatogramas obtenidos, a 257 nm y 310 nm, para una mezcla estándar de cuats (20 ppm) bajo las condiciones óptimas de extracción en Strata Screen C resumidas en la tabla 3.13 | 59 |

| Figura | Página |
|--|---------------|
| 3.11 Cromatogramas de las muestras de a) brócoli adicionada a 0.05 ppm y b) agua potable adicionada a 0.1 ppm bajo las condiciones cromatográficas ya establecidas | 61 |
| 3.12 Cromatogramas de las muestras de a) brócoli y b) agua potable sin adicionar bajo las condiciones cromatográficas ya establecidas | 63 |



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

| Abreviatura | Significado |
|--------------------|---|
| CE | Electroforesis Capilar |
| CG | Cromatografía de Gases |
| CICOPLAFEST | Comisión Intersecretarial para el Control de Proceso y Uso de Plaguicidas, Fertilizantes y Sustancias Tóxicas |
| DER | Desviación Estándar Relativa |
| DF | Difenzocuat |
| DQ | Dicuat |
| FAO | Organización para la Agricultura y la Alimentación |
| HFBA | Ácido Heptafluorobutírico |
| HPLC | Cromatografía Líquida de Alta Resolución |
| IDA | Ingesta Diaria Admisible |
| Kg | Kilogramo |
| L | Litro |
| LD ₅₀ | Dosis Letal Media |
| LLE | Extracción Líquido Líquido |
| LMR | Límites Máximos de Residuos |
| M | Molaridad |
| mg | Miligramo |
| MIBK | Metil Isobutil Cetona |
| MS | Espectrometría de Masas |
| ng | Nanogramo |

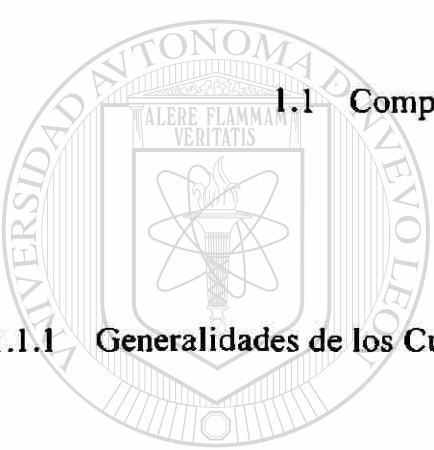
| | |
|--------|--|
| nm | Nanómetro |
| NOEL | No Efecto Nocivo |
| NPD | Detección Nitrógeno Fósforo |
| OMS | Organización Mundial de la Salud |
| OPP | Oficina del Programa de Pesticidas |
| PGC | Poros Carbón Grafito |
| pH | Potencial de hidrógeno |
| ppm | Partes por millón |
| PQ | Paracuat |
| R | Recuperación |
| SPE | Extracción en Fase Sólida |
| TAMO | Hidróxido de tetrametilamonio |
| TFA | Trifluoroacético |
| TMAN | Tetrametilamonio |
| US EPA | Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos® |
| UV | Ultra Violeta |

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 Compuestos de Amonio Cuaternario (Cuats).

1.1.1 Generalidades de los Cuats



Los compuestos de amonio cuaternario derivados del bupiridilio: dicuat (DQ) y paracuat (PQ) y el derivado del pirazolio: difenzocuat (DF) también conocidos como cuats, constituyen un grupo importante de pesticidas (Ibáñez, *et al.*, 1996; Castro, *et al.*, 2001; Carneiro, *et al.*, 2000) y desde su introducción hace aproximadamente 35 años (Kambhampati, *et al.*, 1994) se han utilizado ampliamente como herbicidas en forma de sales de dibromuro, dicloruro y metilsulfonato respectivamente (Ibáñez, *et al.*, 1996).

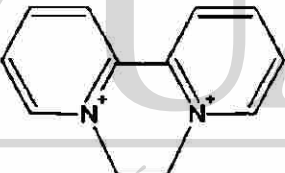
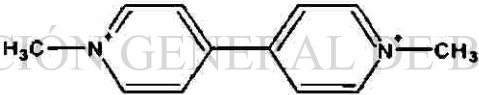
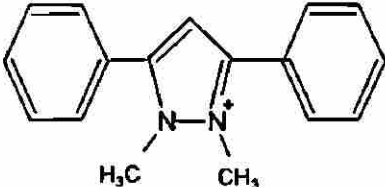
Debido a las características de toxicidad de estos compuestos, a su permanencia en los suelos, así como a la necesidad de controlarlos en agua y alimentos de acuerdo a la legislación vigente, es importante contar con metodología analítica específica y sensible que permita la determinación de estos compuestos en diferentes matrices.

1.1.2 Estructura química y productos comerciales

El paracuat y el dicuat se encuentran entre los herbicidas más utilizados a nivel mundial y se presentan en el mercado en una gran variedad de formulaciones. En la tabla 1.1 se muestra el nombre, la estructura química de los cuats y los nombres comerciales con los que se conocen (Galceran, *et al.*, 1998; US EPA, 1994; 1995 y 1997).

TABLA 1.1

Nombre, estructura y productos comerciales de los cuats

| Nombre Químico y común | Estructura | Nombre Comercial | |
|--|---|---|---|
| | | Concentrado Líquido | En combinación |
| 1,1'- etilen-2,2' bipiridinio (dicuat) |  | Aquacide Dextrone Ortho Diquat Reglone | Con PQ: Actor Preglone Weedol |
| 1,1' dimetil-4,4-bipiridinio (paracuat) |  | Cekuquat Crisquat Dextrone Esgram Gramocil Gramonol Gramoxone | Con Diurón: Dexurón Gramuron, Para-col, Tota-col Con Simazina: Pathclear Terraklene |
| 1,2-dimetil-3,5-difenil-1H-pirazolio (Difenzocuat) |  | Finaven 15 Superaven 33 | |

1.1.3 Historia y Usos

El PQ fue descubierto en 1882 y ha sido utilizado desde 1932 como un indicador de óxido-reducción bajo el nombre de metilviológeno. La primera formulación de PQ empleada para la agricultura fue producida por Industries Imperial Chemical, Ltd. en Inglaterra y fue registrada ahí en 1962.

El PQ fue registrado en los Estados Unidos en 1964 para usarse como un herbicida de contacto para el control o supresión de malas hierbas en gran número de cultivos. Este producto es fabricado por la empresa Zeneca AG Products (US EPA, 1997) y es utilizado como herbicida pre-emergente en áreas donde se plantan vegetales: cereales, algodón, césped, caña de azúcar, cacahuete, papas y árboles o como herbicida post-emergente alrededor de árboles frutales, vid, cereales, semilla de soya y caña de azúcar, durante la temporada inactiva en el cultivo de legumbres y del trébol. Además, se aplica como desecante para ayudar en la cosecha del algodón, grano seco, semilla de soya, papa, girasol, caña de azúcar y después de la cosecha en la estaca donde se enreda la planta del tomate. Se usa para el control de plantas acuáticas y algas, aplicaciones para las que también se emplea el dicuat (Galceran, *et al.*, 1998). También es aplicado en los pinos para inducir el empapado de la resina, que consiste en cubrir el pino de dicha sustancia. El PQ es utilizado también en áreas tales como aeropuertos públicos, estaciones de transformadores eléctricos y alrededor de edificios comerciales para el control de la maleza (US EPA, 1997).

El DQ es fabricado, al igual que el PQ, por la empresa Zeneca AG Products, y es producido bajo el nombre de dicuat. Actualmente, existen 43 productos conteniendo DQ, los cuales están registrados en la sección 3 de la Ley Federal de Insecticidas, Funguicidas y Rodenticidas (por sus siglas en inglés, FIFRA) de Estados Unidos. El DQ también se emplea como desecante para el control de malas hierbas en áreas no cultivadas terrestres y acuáticas, antes de la cosecha para el cultivo de alfalfa, trébol, sorgo, soya y papas y después de la cosecha en el cultivo del pepino, pimienta, tomate y sandía. Cuando es usado como desecante, puede ser aplicado por aspersión aérea o terrestre. Otros lugares en donde se usa son los invernaderos, los cultivos ornamentales y en el mantenimiento del césped de los campos de golf (US EPA, 1995).

En lo que respecta al DF, fue registrado en los Estados Unidos como pesticida en Julio de 1975. Es un herbicida post-emergente fabricado por American Cyanamid Company y comercializado como la sal de metil sulfato de difenzocuat, bajo el nombre de Avenge. Es considerado frecuentemente como un compuesto derivado del biperidilo, sin embargo, éste es un compuesto que pertenece al grupo de los pirazoles con dos anillos fenólicos que tienen actividad biológica similar al PQ y DQ y, aunque es también un herbicida de contacto, se diferencia de los dos anteriores en que actúa de modo selectivo para el control de todos los tipos de avena silvestre (*Avena fatua*) que aparecen en la siembras de trigo y cebada provocando serias pérdidas en la cosecha (US EPA, 1994).

1.1.4 Acción Herbicida

El paracuat y el dicuat, son herbicidas no selectivos de contacto que son absorbidos por las hojas con translocación a través del xilema (Galceran, 1998; US EPA, 1995; FAO, 2003; Selisker, *et al.*, 1995), dañan rápidamente los tejidos de las plantas debido a la destrucción de la membrana celular. Su acción herbicida se debe al ion positivo, el cual es reducido por fotosíntesis para formar un radical libre relativamente estable. Este radical libre se oxida fácilmente en presencia de oxígeno para volver a formar el ion original y peróxido de hidrógeno, interfiriendo en las reacciones de óxido-reducción relacionadas con la respiración y la fotosíntesis, lo que destruye el tejido de la planta. A nivel celular causan la ruptura de las membranas de las células y de los cloroplastos (Galceran, 1998; US EPA, 1997; Jones, *et al.*, 1977; Goldstein, *et al.*, 2002). El mecanismo de acción del difenzocuat es distinto ya que es un inhibidor del tejido embrionario (Galceran, 1998; US EPA, 1994).

1.1.5 Evaluación Medioambiental

Los compuestos de amonio cuaternario son especies catiónicas y son adsorbidos considerablemente por los suelos arcillosos mediante interacciones de intercambio iónico, por lo que son relativamente inmóviles (Galceran, *et al.*, 1998; US EPA, 1994; 1995 y 1997). Además, debido a su intensa adsorción por este tipo de suelos, los residuos unidos a éstos no están disponibles, por lo que dichos compuestos no son

hidrolizados ni fotodegradados en soluciones acuosas y son resistentes a la degradación microbiológica bajo condiciones aeróbicas y anaeróbicas. Sin embargo, debido a que son persistentes, pueden actuar como fuente de contaminación de los mantos acuíferos, ya que son muy solubles en el agua y son transportados al medio ambiente acuático por escurrimiento o filtración (Ibáñez, 1996; Carneiro, 2000; Galceran, 1998). Por otro lado, al estar asociados con partículas de suelo acarreadas por erosión de la tierra (US EPA, 1995 y 1997) pueden estar presentes como residuos en agua superficial y algunos de ellos encontrarse en agua potable (Ibáñez, *et al.*, 1998).

1.1.6 Toxicidad.

El parámetro aceptado para medir la toxicidad relativa de una sustancia, es el valor de la dosis letal 50 (por sus siglas en inglés, LD₅₀). Esta es una estimación estadística de la cantidad de dicha sustancia que se requiere para matar al 50 % de una población de animales de prueba. El criterio para la clasificación se basa principalmente en la toxicidad aguda oral o dérmica en ratas (Labrada, *et al.*, 1996).

En cuanto a la toxicidad de estos compuestos, la Organización Mundial de la Salud (OMS) en base a la dosis letal 50 (LD₅₀) oral y dérmica de estos compuestos en ratas, ha clasificado al PQ, al DQ y al DF como moderadamente peligrosos (Núñez, *et al.*, 2002). Así mismo la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (por sus siglas en inglés, US EPA) en estudios de toxicidad realizados en ratas ha considerado al PQ como moderadamente peligroso por la ruta oral y lo ha clasificado dentro de la categoría II y

ligeramente peligroso por la ruta dérmica clasificándolo dentro de la Categoría III. En conejos el PQ puede causar severa irritación en los ojos y mínima irritación dérmica, por lo que ha sido considerado dentro de la categoría II y IV para estos efectos. Por otro lado, el PQ fue clasificado dentro del “Grupo E” demostrando que no hay evidencia de ser cancerígeno para humanos y ni es mutagénico (US EPA, 1997).

La fácil adquisición del PQ, puede provocar envenenamientos accidentales o intencionales. De 1985 y hasta finales de 1994 fueron reportadas 17 muertes por ingestión oral al Centro Nacional de Control de Intoxicaciones de los Estados Unidos. El 76% de estos casos ha sido relacionado con incidentes suicidas, del resto de los casos, dos fueron ingestiones por causas desconocidas y dos fueron accidentales. Las ingestiones accidentales ocurrieron cuando paracuat era formulado como un líquido color café, el cual había sido confundido con un refresco de cola. Esto fue antes de 1988, por lo que el fabricante a partir de ese mismo año, añadió un colorante azul, un aditivo mal oliente y otro aditivo emético, eliminando de esta manera, la posibilidad de que ocurra un envenenamiento accidental o intencional (US EPA, 1997). En México, entre los años de 1988 y 1990, fueron reportados al Hospital General de Comitán, Chiapas, 25 casos de intoxicación con PQ, de los cuales, el 8 % eran hombres; de estos 25 casos el 64 % murieron (Tinoco, *et al.*, 1993).

En estudios realizados en ratas por la EPA, el DQ ha demostrado ser ligeramente tóxico por la ruta oral e inhalación y clasificado dentro de la categoría III para estos efectos, en conejos puede causar de ligera a severa irritación de ojos, por lo que ha sido clasificado en la categoría II de toxicidad y dentro de la categoría IV por la ruta dérmica.

Por otro lado DQ es clasificado dentro del “Grupo E” el cual indica que no hay evidencia de ser cancerígeno para humanos y ni es mutagénico (US EPA, 1995).

La dosis máxima para humanos que puede ingerirse diariamente (IDA) sin que ocasione daños detectables durante la vida de un individuo, fue establecida en $0.002 \text{ mg kg}^{-1} \text{ día}^{-1}$. Esta dosis esta basada en estudios de toxicidad crónica en perros, del cual se obtuvo la cantidad de plaguicida ingerida que no produjo efecto nocivo (por sus siglas en inglés, NOEL) de $0.2 \text{ mg kg}^{-1} \text{ día}^{-1}$. Debido a que el hombre es más sensible a los plaguicidas que los animales, para obtener la IDA se divide el valor del NOEL por un factor de seguridad, que en este caso fue de 100 (US EPA, 1995). La tabla 1.2 define las Categorías de Toxicidad Aguda por las diferentes rutas de administración (US EPA, 1995, 1997).

TABLA 1.2

Clasificación de Categorías de Toxicidad Aguda del PQ y DQ

| Cuat | Estudio en: | Ruta | Categoría ^a |
|---------|-------------|--------------------|------------------------|
| PQ | ratas | oral | II |
| | | dérmica | III |
| | | inhalación | I |
| | conejos | irritación de ojos | II |
| dérmica | | IV | |
| DQ | ratas | oral e inhalación | III |
| | conejos | irritación de ojos | II |

^aCategoría I: Altamente tóxico; Categoría II: Moderadamente tóxico

Categoría III: Ligeramente tóxico; Categoría IV: no tóxico

Por otro lado existen pocos estudios sobre la toxicidad de DF (Ibáñez, *et al.*, 1998), éste ha sido clasificado desde el 24 de febrero de 1994, por la Oficina del Programa de

Pesticidas (OPP) comité de revisión de los Estados Unidos, que pertenece a la US EPA, dentro del “Grupo E” el cual indica que no hay evidencia de provocar cáncer. De acuerdo a datos existentes, el uso de DF como herbicida no es considerado una amenaza al medioambiente, aunque resulta tener un mínimo riesgo tanto agudo como crónico para aves, mamíferos, especies acuáticas e insectos (US EPA,1994); además, debido a que el DF es utilizado para control de avena silvestre en el cultivo de cereales, la contribución de estos residuos en los alimentos a la cantidad total de residuos de pesticidas en la dieta es desconocida (Yeung, *et al.*, 1996).



1.1.7 Normatividad Nacional e Internacional

En México, la Comisión Intersecretarial para el Control de Proceso y Uso de Plaguicidas, Fertilizantes y Sustancias Tóxicas (CICOPLAFEST) ha establecido los Límites Máximos de Residuos (LMR) de plaguicidas para una gran variedad de alimentos. En la tabla 1.3 se muestran los niveles de los cuats en algunos alimentos establecidos por diferentes organismos (CICOPLAFEST, 1998; US EPA, 1995; 1997; 1994; Code of Federal Regulations 180.205; 180.226; 180.369., 2003).

Como puede observarse, el PQ y el DQ, que son los más tóxicos, se utilizan en una mayor variedad de aplicaciones. Los límites de residuos de PQ establecidos en hortalizas por la Organización para la Agricultura y la Alimentación (por sus siglas en inglés FAO), la EPA y por la CICOPLAFEST son equivalentes. La CICOPLAFEST no establece LMR para el DQ en estos alimentos pero sí en el arroz, alimento en el cual no

está permitido el PQ por este organismo. En el Catálogo Oficial de Plaguicidas de la CICOPLAFEST refiere que la IDA para el DQ y PQ es de 0.002 mg Kg⁻¹ y 0.004 mg Kg⁻¹ respectivamente.

Los LMR son importantes pues muestran el problema que representa cada pesticida en relación con los alimentos ingeridos. El DF no está registrado en nuestro país, aunque está permitido en otros países y es muy utilizado en los cultivos de cereales. La EPA lo regula únicamente en trigo con LMRs de 0.05 a 20 mg kg⁻¹ para trigo en grano y en espiga.

En agua potable la USEPA ha establecido para el DQ un nivel máximo de 20 µg L⁻¹ y recomienda 3 µg L⁻¹ como concentración para el PQ (Núñez, et al., 2002; Castro, et al., 2001).

TABLA 1.3

Límite Máximo de Residuos (LMR)

| Producto | Dicuat LMR (mg kg ⁻¹) | | | Paracuat LMR (mg kg ⁻¹) | | | Difenzocuat LMR (mg Kg ⁻¹) |
|----------|--------------------------------------|-------|-------------|--|-------|-------------|---|
| | FAO (CODEX) | USEPA | CICOPLAFEST | FAO (CODEX) | USEPA | CICOPLAFEST | USEPA |
| cebada | 5 | 0.02 | | 0.05 | 0.05 | 0.05 | 0.2 |
| maíz | 0.1 | 0.02 | | 0.1 | 0.05 | 0.05 | |
| papas | 0.2 | 0.1 | 0.1 | 0.2 | 0.5 | 0.5 | |
| arroz | 5 | | 0.02 | 10 | 0.05 | | |
| trigo | 2 | 0.02 | | 0.05 | 0.05 | 0.05 | 0.05 |
| huevos | 0.05 | 0.05 | | 0.01 | 0.01 | | |
| leche | 0.01 | 0.02 | | 0.01 | 0.01 | | |
| frijol | | | | | 0.3 | 0.3 | |
| avena | | | | 0.05 | | 0.05 | |
| alfalfa | | 3 | 0.1 | | | 5 | |
| brócoli | 0.05 | 0.05 | | 0.05 | 0.05 | 0.05 | |
| col | 0.05 | 0.05 | | 0.05 | 0.05 | 0.05 | |
| lechuga | 0.05 | 0.05 | | 0.05 | 0.05 | 0.05 | |

Por otro lado, México no cuenta con un sistema de monitoreo eficiente para los residuos de plaguicidas en alimentos que en él se consumen, pues la prioridad la tienen los alimentos exportados, y aunque la CICOPALAFEST, ha establecido LMR de plaguicidas en los alimentos, éstos están basados en datos generados por otras naciones, sin tomar en cuenta las prácticas agrícolas en el país ni los patrones de consumo de alimentos de los mexicanos.

1.1.8 Propiedades Fisicoquímicas

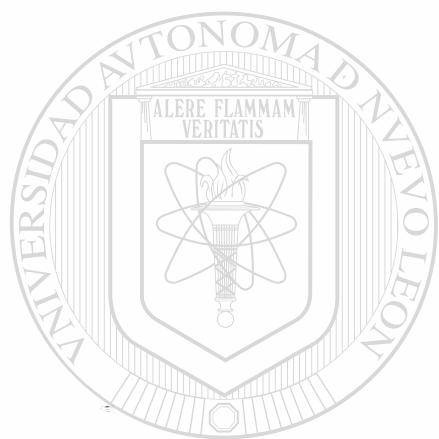
Los cuats son compuestos muy solubles en agua y poco volátiles y presentan una o dos cargas positivas en su estructura. Estas características son determinantes a la hora de establecer el procedimiento para el tratamiento de la muestra y el método para su posterior análisis

El DQ es un sólido amarillo, inodoro, con un punto de fusión de 300°C, muy soluble en agua, ligeramente soluble en alcohol y solventes polares, y prácticamente insoluble en solventes no polares. Se descompone en condiciones básicas y es susceptible a descomposición por radiación ultravioleta cuando no es adsorbido por los suelos o las plantas (USEPA,1995).

Por su parte el PQ es un polvo higroscópico, incoloro a amarillo, inodoro, con punto de fusión de aproximadamente 340°C, es muy soluble en agua, metanol y solventes polares, pero es insoluble en solventes orgánicos no polares, es corrosivo para los

metales e hidroliza bajo condiciones alcalinas y se descompone fotoquímicamente cuando no está adherido a los suelos (USEPA, 1997; Núñez, *et al.*, 2002).

El DF es un sólido cristalino, de color amarillo claro, inodoro, con punto de ebullición de 150 a 158°C, es muy soluble en agua y metanol, ligeramente soluble en acetona y dicloruro de etileno e insoluble en compuestos orgánicos (USEPA, 1994). En la tabla 1.4 se resumen las propiedades fisicoquímicas de los cuats.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

TABLA 1.4

Propiedades Físicoquímicas de los cuats.

| Parámetro | PQ | DQ | DF |
|---|--|--|---|
| Estado Físico | Cristales incoloros higroscópicos inodoros | Cristales de incoloros a amarillos inodoros | Cristales de incoloros a amarillo claro inodoros |
| Punto de Fusión, Punto de ebullición, temperatura de descomposición | Punto de fusión > 340°C (ocurre descomposición) | 300°C | 156-158°C |
| Presión de vapor | < 1×10^{-4} kPa a 25°C | < 1×10^{-8} kPa a 25°C | < 9.06×10^8 mm Hg a 35°C |
| Solubilidad en Agua | 620g/l a 20°C soluble en metanol y solventes polares insoluble en solventes orgánicos no polares | 718g/l a 25°C soluble en metanol y solventes polares insoluble en solventes orgánicos no polares | 765g/l a 23°C soluble en metanol, acetona dicloruro de etileno e insoluble en solventes orgánicos |
| Características de Hidrólisis | Es hidrolíticamente estable bajo condiciones ácidas, hidroliza bajo condiciones alcalinas | Estable a pH entre 5-7 hidroliza a pH 9 | Estable a pH 5, 7 y 9 |
| Fotólisis | Se descompone bajo la influencia de radiación ultravioleta | Susceptible a descomposición por rayos ultravioleta | |
| Características de disociación | En solución acuosa esta completamente disociado | En solución acuosa esta completamente disociado | En solución acuosa esta completamente disociado |
| Gravedad específica | | 1.61g/cm ³ | 0.796g/cm ³ |
| Fórmula Molecular | C ₁₂ H ₁₄ Cl ₂ N ₂ (sal), C ₁₂ H ₁₄ N ₂ (ion) | C ₁₂ H ₁₂ Br ₂ N ₂ | C ₁₇ H ₁₇ N ₂ S (ion), C ₁₈ H ₂₀ N ₂ O ₄ S (sal) |
| Peso Molecular | 257.2 (sal), 186.3 (ion) | 344 | 249.3 (ion), 360.4 (sal) |

1.2 Métodos Analíticos para la determinación de los Cuats

El análisis de los cuats es difícil debido a su naturaleza catiónica y aunque existe una gran variedad de técnicas analíticas para determinar residuos de estos compuestos en diferentes matrices, los métodos más frecuentemente utilizados son: la cromatografía líquida de alta resolución (por sus siglas en inglés, HPLC) con formación de pares iónicos y la electroforesis capilar (por sus siglas en inglés, CE) utilizando detección UV. La principal desventaja de estos métodos es la falta de especificidad analítica, lo cual genera dificultades en la identificación y cuantificación, especialmente en matrices complejas. El uso de la espectrometría de masas (MS) como técnica de detección permite resolver este problema mejorando la selectividad y la sensibilidad (Castro, *et al.*, 2000; Núñez, Kambhampati, *et al.*, 1994; Kim, *et al.*, 2002; Núñez, Moyano, *et al.*, 2002). La FDA recomienda el uso de espectrometría de masas usando al menos tres iones para confirmar la presencia del compuesto (Castro, *et al.*, 2001).

La naturaleza catiónica de estos compuestos los hace idóneos para su determinación por CE. Entre las ventajas de esta técnica, se encuentran su elevada eficiencia, que permite obtener muy buenas resoluciones y los tiempos de análisis considerablemente menores a los obtenidos en HPLC. Sin embargo, los límites de detección obtenidos con la CE son generalmente más altos que los obtenidos con la HPLC debido a que esta última técnica es más sensible (Galceran, 1998; Carneiro, *et al.*, 2000). Recientemente, el desarrollo de CE acoplado a espectrometría de masas ha sido de gran éxito. Este acoplamiento combina las ventajas de ambas técnicas tales como el alto poder de resolución de la CE y la mayor sensibilidad, detección e identificación potencial del MS,

el cual provee una herramienta poderosa para la separación e identificación de los cuats (Núñez, Moyano, *et al.*, 2002).

Otra de las técnicas utilizadas para el análisis de residuos de estos pesticidas catiónicos en productos agrícolas es la CG (Hogenboom, *et al.*, 2000). Uno de los métodos reportados es con detección específica nitrógeno-fósforo (GC-NPD). Sin embargo, para conseguir transformar los cuats en sustancias volátiles es necesaria una etapa de derivatización, y aunque estos métodos pueden ser sensibles y selectivos presentan los inconvenientes derivados de la manipulación de la muestra así como de la eficiencia de la etapa de derivatización (Galceran, 1998).

Por otro lado, se han desarrollado inmunoensayos específicos tipo RIA o ELISA que son sencillos, rápidos y relativamente económicos y que permiten realizar un gran número de determinaciones. Se han comercializado inmunoensayos para el PQ con límites de detección bajos, entre 0.1 y 9 $\mu\text{g L}^{-1}$, aunque se han encontrado interferencias, en general debidas a la matriz, que dificultan la correcta interpretación de los resultados. También existen reportes del desarrollo de métodos de ELISA para la determinación rápida de residuos de DF en productos tales como cebada, trigo, pan y cerveza. (Galceran, 1998; Selisker, *et al.*, 1995; Yeung, *et al.*, 1996).

1.2.1 Cromatografía de Líquidos

De las técnicas antes mencionadas, la HPLC ha resultado ser una herramienta importante para la determinación de los cuats en diversas matrices. El análisis de los cuats por cromatografía de líquidos se puede enfocar de dos maneras distintas, por un lado separarlos directamente por intercambio iónico y por otro lado, transformando estos cationes en compuestos no polares utilizando formadores de pares iónicos y fase inversa, en ambos casos generalmente se usa detección UV.

Para la separación por intercambio iónico se han utilizado diversos tipos de resinas, aunque hay que señalar que los cuats quedan fuertemente adsorbidos y su elución es difícil. La cromatografía de intercambio iónico también ha sido realizada en columnas de sílica utilizando soluciones de hidróxido de tetrametilamonio, sulfato amónico y metanol como fase móvil. (Galceran, 1998; Picó, *et al.*, 2000). En la bibliografía se han reportado entre otras, la determinación del PQ en muestras de suelo por HPLC de intercambio iónico con detección UV, aunque con límites de detección relativamente altos (0.5 mg L^{-1}), así como el análisis de cuats en muestras de agua donde los límites de detección alcanzados por estos autores fue por debajo de los 100 ng L^{-1} (Ouyang, *et al.*, 2004; Ibañez, *et al.*, 1988).

Las separaciones más comunes de los cuats, son llevadas a cabo en columnas de fase inversa (C_{18}). La utilización de este tipo de columnas requiere la formación de pares iónicos, para lo cual se han de añadir a la fase móvil reactivos tales como heptasulfonato de sodio, octasulfonato de sodio, ortofosfato de sodio. Si se pretende conseguir la separación de PQ, DF y DQ, es necesario utilizar un gradiente de elución con

acetonitrilo o metanol para conseguir una buena separación (Galceran, 1998; Picó, *et al.*, 2000). Entre los trabajos reportados en la bibliografía se encuentran el análisis del DF en tres tipos de productos de trigo, que incluían harina, pan y cereal, siendo el límite de detección obtenido de 0.02 ppm para las muestras estudiadas (Lawrence, *et al.*, 1981). La detección convencional de los compuestos de amonio cuaternario en HPLC generalmente es con detectores UV y arreglo de diodos. La detección con UV es más común.

En aguas, el método oficial de la EPA para la determinación de PQ y DQ es el 549.2 el cual utiliza columnas de fase inversa C₁₈ y una fase móvil con hexanosulfonato de sodio como formador de pares iónicos y detección UV. Los límites de detección obtenidos por este método son de 0.72 µg L⁻¹ y 0.68 µg L⁻¹ para el DQ y PQ respectivamente. La desventaja es, como se mencionó anteriormente, la falta de especificidad analítica por lo que la EPA recomienda métodos en los cuales la identidad de los analitos sea confirmada por MS (Picó, *et al.*, 2000; Método EPA 549.2).

Un ejemplo empleando MS como sistema de detección, lo constituye un método reportado en la bibliografía para la determinación del PQ, DQ, CQ (clormecuat) y DF en muestras de agua empleando HPLC con formación de par iónico acoplado a un espectrómetro de masas en tándem con ionización de electroespray. La detección se realizó con un analizador de trampa iónica, dando sensibilidades mejores que las reportadas utilizando detección UV. En este trabajo se reportan valores de sensibilidad de 0.01 a 0.07 µg L⁻¹ (Castro, *et al.*, 2001).

1.3 Tratamiento de muestra

Debido a los bajos niveles de concentración de los cuats admitidos en alimentos por diferentes organismos y a la complejidad de la matriz, es necesaria la utilización de etapas de extracción y preconcentración antes de su análisis. La extracción convencional líquido-líquido (por sus siglas en inglés, LLE) no es ideal para la concentración de estos compuestos ya que, debido a su naturaleza iónica, son altamente solubles en agua (Carneiro, *et al.*, 2000). El método más utilizado para la preconcentración de los cuats es la extracción en fase sólida (por sus siglas en inglés, SPE), ya que permite la extracción de residuos de pesticidas con una alta eficiencia y se puede alcanzar una concentración a tales niveles que los límites establecidos por diferentes organismos. (Galceran, 1998; Picó, *et al.*, 2000).

Uno de los sistemas utilizados es la formación de pares iónicos y su retención en una columna de fase inversa (C_8 o C_{18}). También se utilizan columnas de sílice y resinas en las cuales la retención tiene lugar por intercambio iónico. De éstas, la fase inversa con formación de pares iónicos es la más ampliamente recomendada por la USEPA método 549.I para PQ y DQ en agua potable. (Carneiro, *et al.*, 2000; Galceran, 1998).

El DQ y el PQ son casi siempre eluidos de las resinas catiónicas fuertes empleando eluentes que contienen sales de amonio, mientras que las resinas de intercambio catiónico débil, demuestran altas recuperaciones usando metanol ácido.

Los compuestos adsorbidos en sílica gel pueden ser eluidos utilizando cloruro de amonio saturado o sulfato de amonio en ácido sulfúrico o aumentando la fuerza iónica

directamente mediante nitrato de tetrametilamonio (TMAN) o hidróxido de tetrametilamonio (TAMO) en ácido sulfúrico (Picó, et al., 2000).

El procedimiento de concentración de los cuats en cartuchos de SPE no polares, como Sep-Pak C₁₈ mediante adsorción directa de estos compuestos, son generalmente eluidos utilizando una solución de HCl. Como una alternativa, el ácido trifluoroacético (TFA) es un práctico sustituto del HCl, al ser un ácido volátil de igual pKa. De esta forma la fase no polar se comporta como soporte de intercambio catiónico. Sin embargo, generalmente se emplea el uso de formadores de pares iónicos durante la SPE, donde varios solventes y mezclas han sido probadas, por ejemplo: metilisobutilcetona e isobutanol añadidos al contraíón empleado para la extracción, soluciones acuosas de metanol ácido, fosfato monobásico y ácido fosfórico en acetonitrilo, ácido ortofosfórico y dietilamina en agua, acetato de amonio en metanol ácido o ácido heptafluorobutírico (HFBA) en metanol (Picó, *et al.*, 2000).

En la bibliografía se han reportado métodos que usan HPLC-MS para la determinación de DQ y PQ en muestras de agua, empleando como procedimiento de extracción y preconcentración la SPE de intercambio iónico con varias resinas de intercambio catiónico fuerte y resinas de intercambio iónico como mixta. Las recuperaciones del PQ y DQ en esas resinas de intercambio iónico como mixta fueron abajo de 30%, mientras que la extracción con Dowex dieron recuperaciones aceptables (Kambhampati, *et al.*, 1994). En el estudio donde se reporta la determinación del PQ, DQ, CQ y DF (Castro, et al., 2001) se empleó un sistema de SPE on-line usando diferentes cartuchos, de los cuales los de polidivinilbenceno acoplados a HPLC-MS-MS dieron las mejores recuperaciones, permitiendo el análisis de los cuats a bajos niveles de concentración con límites de detección de 0.01 a 0.07 $\mu\text{g L}^{-1}$. Sin embargo para este tipo

de adsorbente se reportaron recuperaciones para el DF de 44% (Castro, et al., 2001). También se ha reportado un estudio basado en la adición de surfactantes catiónicos en muestras de agua para prevenir las interferencias asociadas con una disminución en la eficiencia de la SPE. En este estudio se utilizaron cartuchos de sílica para la extracción de DQ, PQ y DF y se obtuvieron recuperaciones mayores de 85 %; en este estudio se demostró que el contenido de surfactante en el agua es un parámetro importante para la recuperación de los cuats (Ibáñez, et al., 1996). En otro estudio reportado en la bibliografía para el análisis de herbicidas catiónicos en agua por HPLC y CE se emplearon cartuchos de SPE de sílica y carbón grafito (PGC), se demostró que los mejores resultados para ambas técnicas fueron obtenidos realizando la SPE en los cartuchos de PGC, se reportaron recuperaciones en el rango de 65 a 90 % (Carneiro, et al., 2000).

En la tabla 1.5 se hace un resumen de algunos de los adsorbentes utilizados en la preconcentración de los cuats.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

TABLA 1.5

Ejemplo de algunos materiales utilizados para realizar la preconcentración de los cuats en matrices reales

| Compuesto | Matriz | Material adsorbente | Eluyente | Determinación | Límite de detección | Referencia |
|------------|--------------------|--------------------------------|--|--------------------------|--------------------------------|---|
| PQ | Agua | Dowex | Acetato de amonio 0.2 M y ACN | HPLC-MS | | Journal of Chromatography A, 688 (1994) 67-73 |
| DQ | | | | | | Journal of Chromatography A, 823 (1988) 137-146 |
| PQ | Agua | Sílica Sep-Pak | 0.2% de TMAOH y 3% de Sulfato de amonio en | HPLC-UV | 0.05 µg L ⁻¹ | |
| DQ | | | ác. Sulfúrico 5 M (pH 3) y 10% de metanol | | | |
| DF | | | | | | |
| PQ | Agua | Sílica Sep-Pak | Sílica: HCl 6 M en 8% Metanol | CE-UV | CE más altos que los | Analytica Chimica Acta 408 (2000) 263-269 |
| DQ | | PCG | PCG: TFA:ACN (20:80) | HPLC-UV | obtenidos por HPLC | |
| DF | | | | | | |
| DQ, PQ | Agua | PCG | ACN:TFA (80:20) | CE-stacking | | Journal of Chromatography A, 946 (2002) 257-282 |
| DF | | | | | | |
| PQ | Frutas y Vegetales | Resina Intercambio Catiónico | Cloruro de amonio | Espectrofotometría ELISA | | Journal Agric. Food Chem 43 (1995) 544-547 |
| PQ | Agua | Sílica Sep-Pak | 0.2% de TMAOH y 3% de Sulfato de amonio en | HPLC-UV | 0.1 µg L ⁻¹ | Journal of Chromatography A, 727 (1996) 245-252 |
| DQ | | | ác. Sulfúrico 5 M (pH 3) y 10% de metanol | | | |
| DF | | | | | | |
| PQ, DQ, DF | Agua | Resinas poliméricas | HFBA 20 mM-ACN | HPLC-MS | 0.01 a 0.07 µg L ⁻¹ | Journal of Chromatography A, 914 (2001) 111-121 |
| CQ | | | | | | |
| PQ, DQ, DF | Agua | discos de extracción C8 ENVI-8 | HFBA (15 mM, pH 3)-ACN | HPLC-MS | 6 a 85 ng L ⁻¹ | Journal of Chromatography A, 869 (2000) 441-449 |
| CQ y MQ | | | | | | |
| PQ, DQ | papas | Sílica Sep-Pak | HCl 5 N-Metanol 8 % | HPCE-UV | 0.01 ppm | Journal Agric. Food Chem 41 (1993) 2315-2318 |

1.3.1 Extracción en fase sólida

La SPE es un método rápido, confiable y preciso para la preparación de muestra, limpieza y concentración del analito de interés, libre de interferencias y en una adecuada concentración para su detección y medición (Bidlingmeyer, 1992). La SPE tiene lugar mediante un mecanismo de intercambio iónico, adsorción-desorción de los analitos en la superficie del material activo de las columnas, estableciéndose un equilibrio entre la concentración de analito en la fase estacionaria y la fase móvil (Quattrochi, *et al.*, 1992).

Dentro de las ventajas de la SPE con respecto a otras técnicas como la extracción líquido-líquido se cuentan (Ibáñez, *et al.*, 1998; Bidlingmeyer, 1992):

- a) La rapidez en la preparación de la muestra
- b) un bajo costo, debido a que hay un menor consumo de solventes y reactivos y una menor generación de residuos.
- c) permite la concentración de sustancias a nivel de trazas.
- d) requiere una menor cantidad de muestra.
- e) elimina las posibles interferencias.
- f) mejora la seguridad debido a que reduce la exposición a los solvente.
- g) es de fácil automatización permitiendo un simultáneo procesamiento de lotes de muestras múltiples.

1.3.1.1 Descripción del cartucho de SPE

La SPE para muestras líquidas ha llegado a ser una técnica ampliamente usada después de la introducción en el año de 1970 de cartuchos de adsorbentes desechables conteniendo poros del tamaño de la partícula que permite el procesamiento de la muestra mediante succión suave.

Un típico cartucho de SPE consiste en pequeñas columnas o cartuchos de plástico como se muestra en la Fig 1.1. Estas columnas se rellenan con cantidades variables (desde 100 hasta 500 mg) de distintos materiales similares a los empleados para el relleno de HPLC, de mayor granulometría con tamaño de la partícula del orden de 50-60 μ m, empacado entre metal poroso o plástico fritado (Quattrocchi, 1992; Pool, *et al.*, 2000).

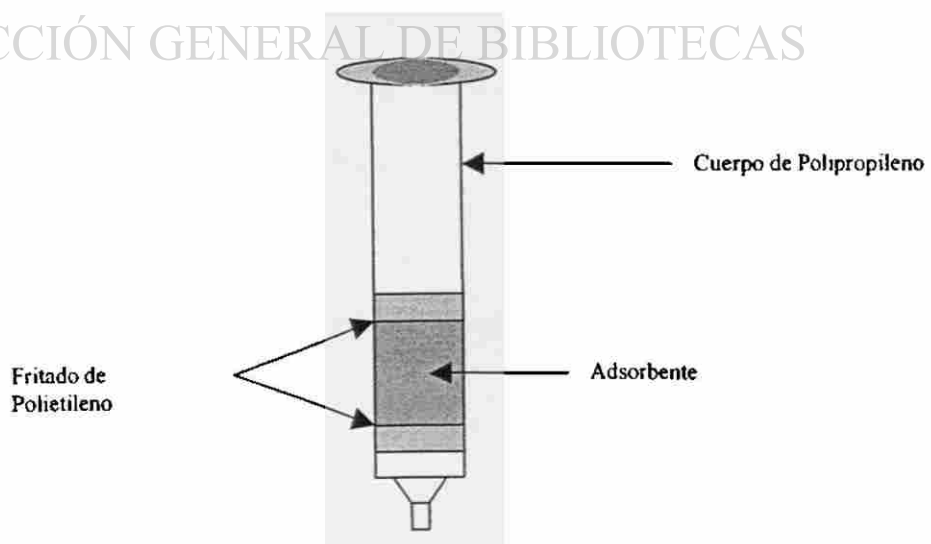


Figura 1.1 Cartucho de SPE

La muestra es colocada en el cartucho y forzada a atravesar por cualquiera de las formas siguientes (Christian, 1994).

- Un émbolo (presión positiva)
- Aplicando vacío (presión negativa)
- Por centrifugación.

1.3.1.2 Etapas de la SPE

El proceso de extracción en fase sólida se realiza en cuatro etapas. En la primera etapa, la fase estacionaria debe acondicionarse con un disolvente para activarlo y mejorar la reproducibilidad de la retención de los analitos así como para eliminar las posibles impurezas que pueda contener. Posteriormente se realiza la carga de la muestra con el objetivo de retener al máximo los analitos, en seguida, se realiza una etapa de limpieza con el fin de eliminar los componentes de la matriz que pudieran interferir en la determinación y finalmente se realiza la elución del analito para su posterior análisis (Bidlingmeyer, 1992; Poole, *et al.*, 2000).

Entre los parámetros que pueden afectar la recuperación están:

- 1) el tipo de fase estacionaria
- 2) el volumen de muestra
- 3) la velocidad de flujo de la extracción
- 4) la composición del solvente de elución
- 5) el volumen del solvente de elución.

Debido a que las concentraciones de los analitos son generalmente bajas, la correcta selección de la fase estacionaria que mejor se adapte al analito es una etapa importante a la hora de optimizar el proceso de preconcentración, además existen diferentes tipos de adsorbentes y éstos se eligen en función de las características de los analitos que se quieren determinar. Por otro lado se debe establecer el volumen de muestra a ser procesado para no exceder la capacidad de retención del adsorbente y evitar que todo el analito que entre por el cartucho salga sin ser retenido. En cuanto a la velocidad de extracción, este paso debe efectuarse a una velocidad determinada (generalmente entre 1 a 10 mL min^{-1}) ya que flujos demasiado rápidos pueden producir bajas recuperaciones del analito. Para conseguir una concentración relativamente elevada del analito es deseable recuperarlo en un mínimo volumen del solvente de elución; por esta razón es importante establecer la composición del solvente de elución en el cual se obtenga mayor porcentaje de recuperación del analito (Poole, et al., 2000; Quattrochi, et al.,

1992).

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

1.4 Justificación

Los plaguicidas de amonio cuaternario son ampliamente utilizados en México y en el mundo. En nuestro país no se cuenta con metodología analítica oficial para la determinación de éstos en alimentos, por lo que es necesario desarrollar métodos sencillos, confiables y sensibles, que además, sean adecuados a la infraestructura del país. Por otro lado, las bajas concentraciones establecidas para este tipo de compuestos obligan a la introducción de una etapa de concentración de los analitos previa a la determinación. La extracción en fase sólida es una técnica muy adecuada para este fin, por lo que en este trabajo proponemos su aplicación al análisis de estos plaguicidas.

1.5 Objetivos

1.5.1 Objetivo General

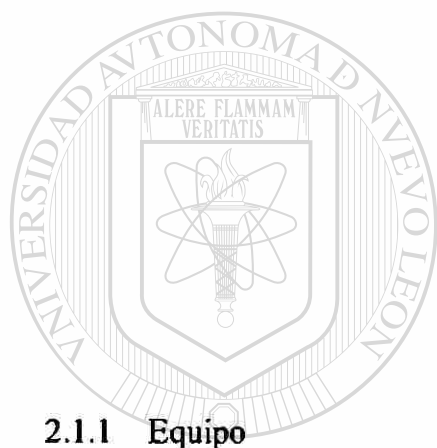
Desarrollar y evaluar un método de Extracción en Fase Sólida para la determinación de plaguicidas de amonio cuaternario en alimentos.

1.5.2 Objetivos específicos

1. Establecer las condiciones óptimas para la extracción en fase sólida.
2. Evaluar el procedimiento de SPE propuesto.
3. Aplicar el método de SPE al análisis de muestras reales.

CAPÍTULO 2

MATERIAL Y MÉTODOS



2.1 Equipo, material y reactivos

2.1.1 Equipo

- a) **Cromatógrafo de Líquidos Waters 2690 equipado con un sistema de bombeo cuaternario, automuestreador, horno para columna, detector UV de arreglo de diodos (Waters 996)**
- b) **Balanza Analítica, AND HR-200**
- c) **Baño de ultrasonido, Branson 3510**
- d) **Estación de vacío para SPE con 12 estaciones, Phenomenex**
- e) **Potenciómetro 50 pH Meter, Beckman**

2.1.2 Materiales

- a) Columna Kromasil C₁₈, 150 x 2.1mm, 5mm, Phenomenex.
- b) Cartuchos de extracción en fase sólida Oasis MCX, Waters (6cc, 60mg, n-vinilpirrolidona y divinilbenceno)
- c) Cartucho de extracción en fase sólida Strata Screen C, Phenomenex (3cc, 150mg, polidivinilbenceno)
- d) Viales de vidrio de 2mL con tapón de rosca y septum de teflón / silicón, Supelco
- e) Sistema de filtración, Milipore
- f) Pipetas Automáticas de 10 a 200 mL y de 100 a 1000 mL, Eppendorf
- g) Puntillas para pipeta automática
- h) Pipetas volumétricas de 3 mL y 4 mL
- i) Tubos de ensayo de 13x100 mm

- j) Agitadores de vidrio
- k) Vasos de precipitado de 50 mL, 100 mL y 250 mL.
- l) Probeta de plástico de 25 mL
- m) Probeta de vidrio de 50 mL
- n) Recipientes de plástico de 60 mL y 500 mL
- o) Frascos de vidrio color ámbar de 1L
- p) Matraz de aforación de 500 mL
- q) Membranas para filtración Millipore, Waters, 47 mm, Nylon, 0.45 µm
- r) Papel filtro Whatman No. 40 de 7 cm de diámetro

2.1.3 Reactivos

- a) **Formiato de Amonio 98%, Riedel-de Haën**
 - b) **Acetonitrilo, grado HPLC, Fisher Scientific**
 - c) **Metanol, grado HPLC, Fisher**
 - d) **Ácido heptofluorobutírico 99%, Aldrich**
 - e) **Hidróxido de amonio 25%, Fluka**
 - f) **Tolueno 99.5%, Riedel-de Haën**
 - g) **Ácido fórmico 89-90%, Merck**
 - h) **Difenzoquat metisulfonato HPLC 99.9%, Pestanal, Riedel-de Haën**
 - i) **Diquat monohidratado 100%, estándar analítico, Pestanal, Riedel-de Haën**
 - j) **Paraquat dicloruro hidratado HPLC 99.9%, Pestanal, Riedel-de Haën**
 - k) **Etilviológeno 99%, Fluka**
-
- l) **Hexametildisiloxano 98.5%, Fluka**

2.2 Métodos

2.2.1 Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución con Detector de Arreglo de Diodos

2.2.1.1 Condiciones cromatográficas

El análisis de los cuats se realizó utilizando un Método de Cromatografía de líquidos en Fase Inversa por formación de pares iónicos con detección UV, previamente validado en el Departamento de Química Analítica de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L.

Las condiciones cromatográficas empleadas para la optimización del método de SPE fueron:

Columna: Kromasil C₈ (150 x 2.1 mm, 5 µm; phenomenex)

Temperatura de la Columna: 35 °C

Volumen de Inyección: 10 µL

Fase móvil: Solvente A: HFBA (ácido heptafluorobutírico, 20 mM, pH 3) Solvente B: Acetonitrilo

| Gradiente | Tiempo | %B |
|-----------|--------|-----|
| | 0 | 8% |
| | 11.00 | 8% |
| | 13.00 | 70% |
| | 16.00 | 70% |

Flujo 0.3 mL min⁻¹

Con estas condiciones la detección por UV de los analitos se realizó a una longitud de onda de 257 nm para el PQ, DF y EV; y a 310 nm para el DQ.


Debido a que la matriz de las muestras reales es más compleja, las condiciones cromatográficas empleadas para el análisis de los cuats fueron:

Columna: Kromasil C₈ (150 x 2.1 mm, 5 μm; phenomenex)

Temperatura de la Columna: 45 °C

Volumen de Inyección: 30 μL

Fase móvil: Solvente A: HFBA (ácido heptafluorobutírico, 20 mM, pH 3) Solvente B: Acetonitrilo



| Gradiente | Tiempo | %B |
|-----------|--------|-----|
| | 0 | 5% |
| | 12.00 | 5% |
| | 12.01 | 10% |
| | 21.00 | 10% |
| | 21.50 | 40% |

Flujo 0.35 mL min⁻¹

Con estas condiciones la detección por UV de los analitos se realizó a una longitud de onda de 257 nm para el PQ, DF y EV; y a 310 nm para el DQ.

2.2.2 Preparación de la mezcla estándar de cuats

Se prepararon soluciones stock individuales de PQ, DF y DQ cada uno a una concentración de 400 ppm en agua grado HPLC.

La mezcla estándar de cuats que se empleó para la optimización de la SPE se preparó a partir de cada una de las soluciones stock a una concentración final de 20 ppm, en una mezcla de solución amortiguadora de ácido fórmico/formiato de amonio (100 mM, pH 3)-metanol (50:50 v/v). La mezcla estándar de cuats fue almacenada en viales de plástico para prevenir la adsorción y refrigerada hasta su uso. Todo el material de vidrio que llegó a estar en contacto con los analitos fue necesario silanizarlo para prevenir la adsorción de los cuats en la superficie del vidrio.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

2.2.3 Preparación de la curva de calibración

La curva de calibración se construyó a 5 niveles de concentración con tres replicados en un intervalo de 0.5 a 6 ppm, diluyendo el estándar de cuats de 40 ppm. con una mezcla de formiato de amonio (2 M, pH 3)-ACN. Todas las soluciones se prepararon por pesada.

2.2.4 Establecimiento de las condiciones óptimas de la SPE

La SPE se realizó con cartuchos de modo mixto utilizando una estación de vacío de 12 posiciones. Para la optimización de la SPE, se evaluaron el volumen de la muestra, el solvente de elución (composición y volumen), la velocidad de extracción.

Todos los experimentos se realizaron por duplicado y se evaluó la recuperación obtenida por comparación de las áreas de los analitos con aquellas obtenidas por inyección directa de la mezcla de estándares.

La Fase estacionaria se seleccionó mediante la comparación del porcentaje de recuperación obtenido de los cuats entre ambos cartuchos.

2.2.4.1 Volumen de Ruptura

Para establecer el máximo volumen de muestra que puede pasarse por el cartucho[®], se determinó el volumen de ruptura en los cartuchos de Oasis MCX y en los de Strata Screen C. Los cartuchos fueron acondicionados con 5 mL de metanol y 5 mL de una mezcla de solución amortiguadora de ác. fórmico/formiato de amonio (100 mM, pH 3)-metanol (50:50 v/v). Los cartuchos se cargaron con un volumen de 200 mL de una mezcla de cuats a una concentración de 20 ppm y se colectaron fracciones de 5 mL; de cada fracción se tomó 1 mL y se le adicionaron 200 μ L de HFBA 1M, para posteriormente realizar el análisis cromatográfico.

2.2.4.2 Solvente de Elución

Para establecer las condiciones óptimas de elución, se evaluaron los siguientes parámetros: contraión, concentración del contraión, el pH de elución y modificador orgánico. Los criterios para seleccionar las condiciones óptimas de trabajo fueron la recuperación y la precisión. En la tabla 2.1 se muestran los parámetros y las condiciones que se optimizaron.

TABLA 2.1

Condiciones a optimizar para la selección de la composición del eluente.

| parámetro | condición |
|-----------------------------|--|
| contraión | NH ₄ COOH, 2 M |
| | Ca(C ₂ H ₃ O ₂) ₂ , 2 M |
| | Mg(C ₂ H ₃ O ₂) ₂ , 2 M |
| concentración del contraión | NH ₄ COOH |
| | 1M, 2M y 6 M |
| pH de elución | NH ₄ COOH, 2 M |
| | pH 2, pH 3 y pH 6 |
| modificador orgánico | ACN |
| | MeOH |

Los cartuchos de Oasis MCX y los de Screen C fueron acondicionados con 2 mL de metanol y con 2 mL de agua desionizada. Los cartuchos se cargaron con un volumen de 10 mL de la mezcla estándar de cuats de 20 ppm, posteriormente se realizó la elución con 5 mL del solvente y se colectó una fracción única de 5 mL. Se tomó 1 mL de dicha fracción y se le agregaron 200 µL de HFBA y 100 µL de EV, para su posterior análisis por HPLC.

2.2.5 Velocidad de flujo

Para establecer la velocidad de flujo óptima para la extracción, se acondicionó el cartucho con 2 mL de MeOH y 2 mL de H₂O, la carga de la muestra se realizó con 10 mL de la mezcla de cuats de 20 ppm y la elución con 4 mL de mezcla de ACN-formiato de amonio 2M, pH 3 (50:50, v/v). Las extracciones se realizaron por duplicado a diferentes velocidades (2.5, 5 y 10 mL min⁻¹) y se evaluó la recuperación en cada una de ellas buscando obtener el máximo de recuperación en un mínimo de tiempo.

2.2.6 Perfil de elución

Para determinar el volumen de eluyente a ser colectado para recuperar el máximo de analito, se estableció el perfil de elución. Para ello, se acondicionaron los cartuchos con 2 mL de MeOH y 2 mL de H₂O, se pasaron 10 mL de la mezcla de cuats de 20 ppm y la elución se realizó con 25 mL de una mezcla de ACN-formiato de amonio 2M, pH 3 (50:50, v/v). Se colectaron fracciones de 1 mL y se agregaron 200 µL de HFBA y 50 µL de EV. Se analizaron por HPLC y se graficó el porcentaje de recuperación de cada analito contra el volumen de eluyente.

2.2.7 Preparación de la muestra

Las muestras analizadas fueron: arroz, brócoli, lechuga, germen de trigo, harina de maíz y agua potable.

Una porción de muestra previamente molida y homogenizada se suspendió en una mezcla de ácido fórmico (0.1 %, pH de 3)-MeOH 50:50 v/v, se agitó por 20 min en un baño de ultrasonidos, se filtró y lavó con una mezcla ácido fórmico (0.1 %, pH de 3)-MeOH 50:50 v/v. Del filtrado obtenido se tomaron 60 mL y se realizó la SPE. La elución se realizó con 3 mL del eluyente, posteriormente se evaporó hasta sequedad con nitrógeno, y se resuspendió con 400 μ L de HFBA. Las disoluciones se filtraron con membrana de nylon (0.45 μ m) y se analizaron por HPLC.

Para las muestras de brócoli, lechuga y germen de trigo la cantidad de muestra extraída fue de 100 g y el volumen de ácido fórmico-MeOH fue de 100 mL. Para las muestras de arroz y harina de trigo se pesaron 150 g y 123g respectivamente y la muestra de arroz se suspendió en 150 mL y la de harina de maíz en 350 mL de la mezcla de ácido fórmico-MeOH. Para la muestra de agua no se le aplicó ningún tratamiento previo, solo se tomaron 60 mL y se realizó la SPE como se mencionó anteriormente.

2.2.8 Evaluación

Para la evaluación de la precisión y la recuperación se realizó el análisis por triplicado de muestras libres de cuats adicionadas al nivel del límite máximo de residuo permitido para cada una de las muestras: arroz a 0.02 mg kg^{-1} , brócoli, lechuga, germen de trigo y harina de maíz a 0.05 mg kg^{-1} y el agua se adicionó a un nivel de $0.1 \mu\text{g mL}^{-1}$ (tabla 2.2) siguiendo el protocolo descrito en la sección 2.2.6 y cuantificadas con el uso de una curva de calibración elaborada el mismo día de trabajo.

TABLA 2.2

Nivel adicionado de cuats para cada alimento.

| Producto | mg kg^{-1} | | |
|-----------------|---------------------|------|------|
| | DQ | PQ | DF |
| arroz | 0.02 | 0.02 | 0.02 |
| brócoli | 0.05 | 0.05 | 0.05 |
| lechuga | 0.05 | 0.05 | 0.05 |
| germen de trigo | 0.05 | 0.05 | 0.05 |
| harina de maíz | 0.05 | 0.05 | 0.05 |

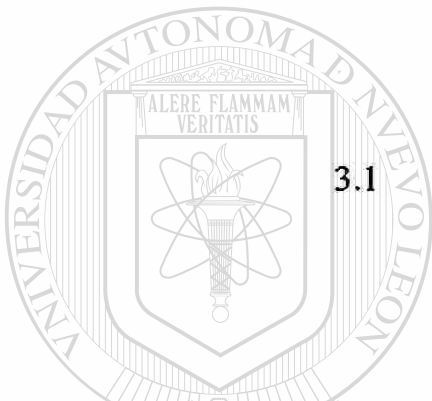
| Producto | $\mu\text{g mL}^{-1}$ | | |
|----------|-----------------------|-----|-----|
| | DQ | PQ | DF |
| Agua | 0.1 | 0.1 | 0.1 |

2.2.9 Aplicación

El método de SPE se aplicó al análisis de muestras de arroz, brócoli, lechuga y agua; se obtuvieron dos muestras de cada alimento de diferente lugar y se analizaron por duplicado sin adicionarles el estándar de cuats siguiendo el protocolo descrito en la sección 2.2.6.

CAPÍTULO 3

RESULTADOS



3.1 Optimización del procedimiento de SPE

3.1.1 Volumen de Ruptura

UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

En la figura 3.1 se muestran las curvas de ruptura obtenidas para los cuats[®] en los cartuchos de Oasis MCX y Strata Screen C bajo las condiciones de extracción descritas en la sección 2.2.4.1. y utilizando una mezcla de cuats de 20 ppm.

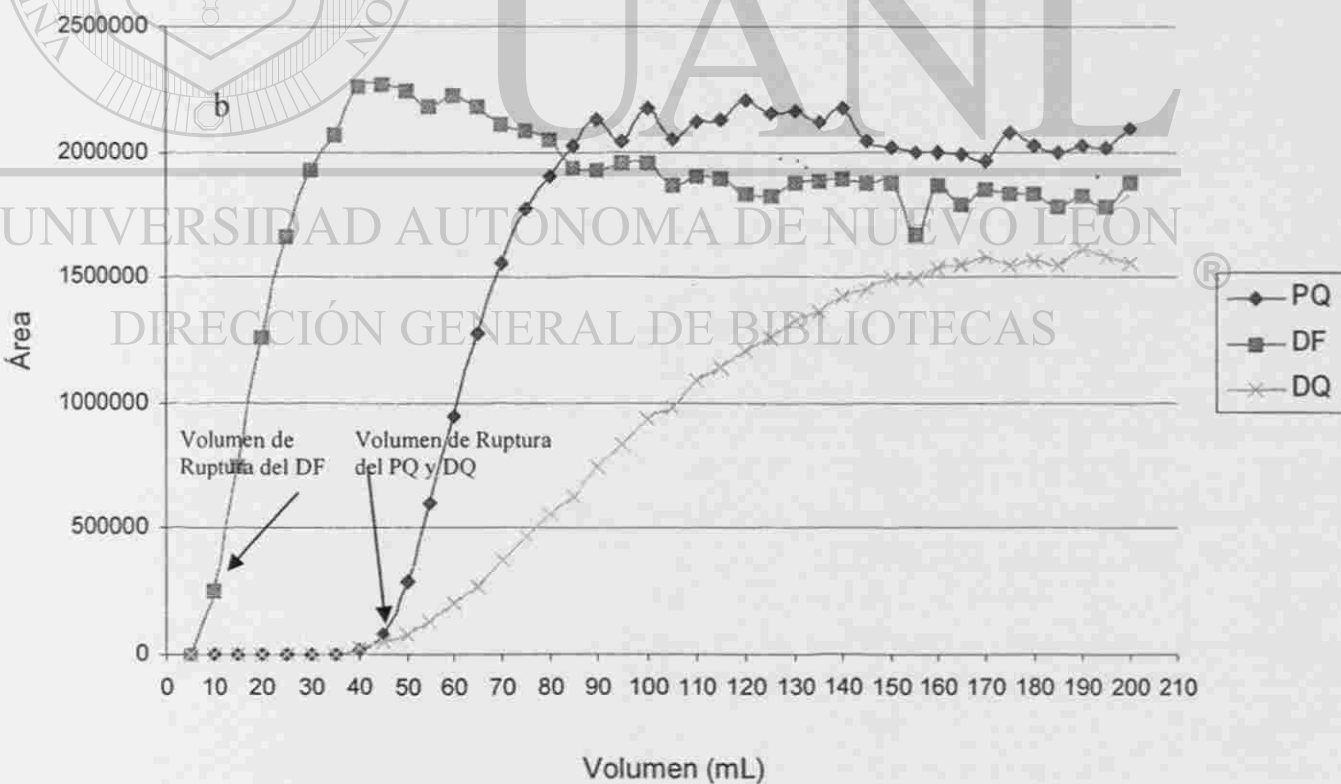
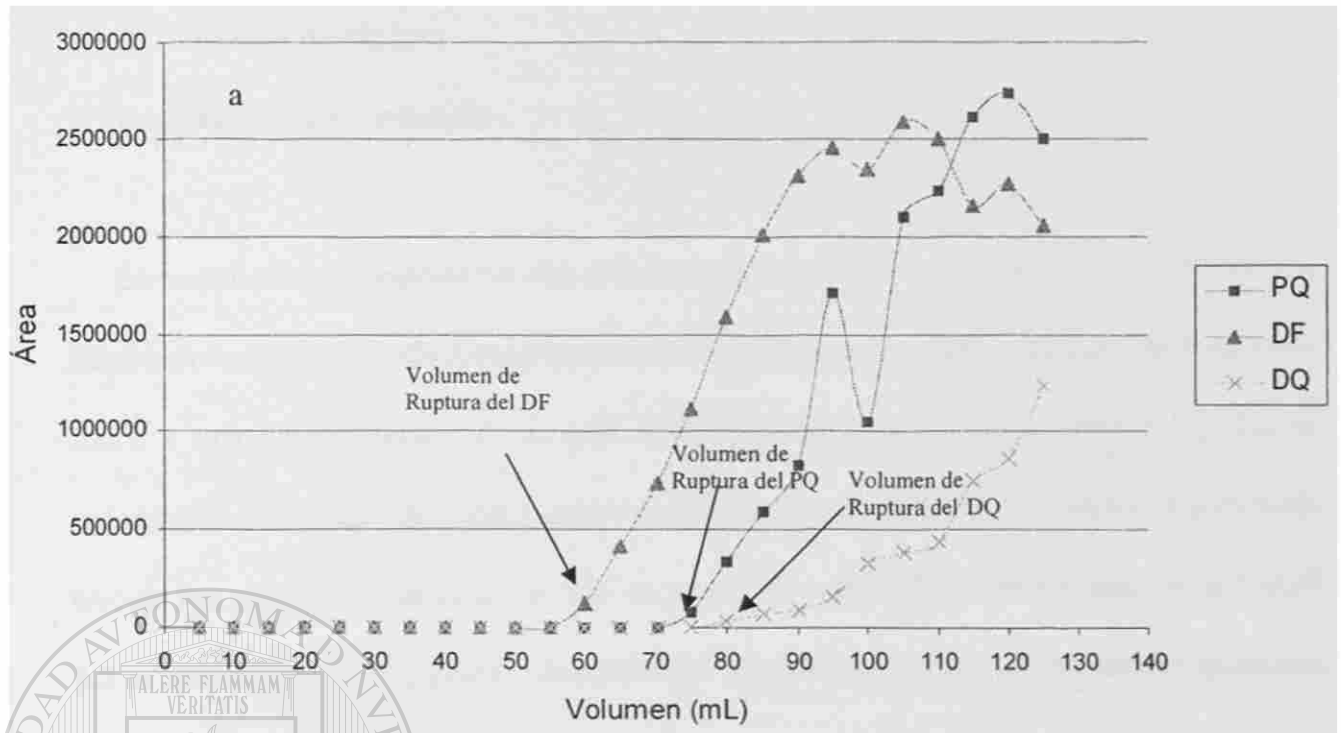
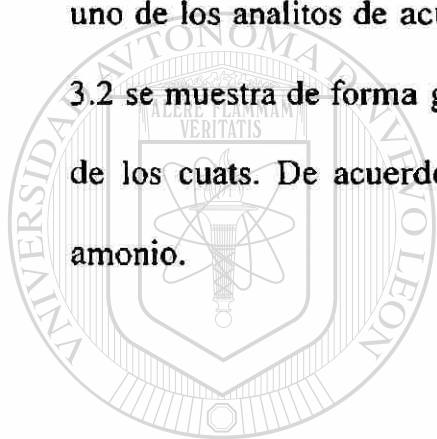


Figura 3.1. Curva de ruptura de los cuats (20 ppm) obtenida con los cartuchos a) Oasis MCX y b) Strata Screen C

3.1.2 Solvente de elución

3.1.2.1 Elección del Contraión

En cuanto a la composición del solvente de elución, se realizaron extracciones por duplicado con mezclas de formiato de amonio, acetato de calcio y acetato de magnesio, todos a una concentración 2 M, (pH 3)-MeOH 50:50 v/v. En la tabla 3.1 y 3.2 se presenta el porcentaje de recuperación obtenido y el coeficiente de variación para cada uno de los analitos de acuerdo al tipo de contraión utilizado, mientras que en la Figura 3.2 se muestra de forma gráfica el efecto del contraión en el porcentaje de recuperación de los cuats. De acuerdo a estos resultados el contraión elegido fue el formiato de amonio.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



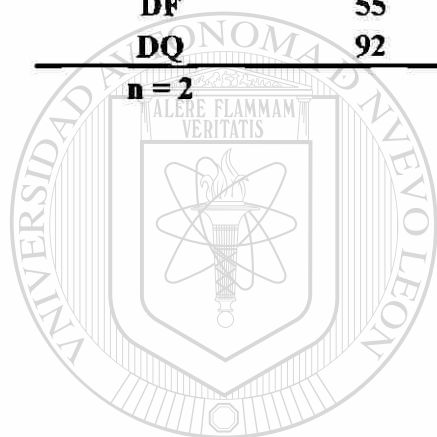
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

TABLA 3.1

Efecto del contraión en cartuchos de Oasis MCX

| Analito | NH ₄ COOH | | Ca (C ₂ H ₃ O ₂) ₂ | | Mg (C ₂ H ₃ O ₂) ₂ | |
|---------|----------------------|------|---|------|---|------|
| | % R | %DER | % R | %DER | % R | %DER |
| PQ | 94 | 8 | 53 | 1 | 54 | 7 |
| DF | 55 | 11 | 4 | 12 | 20 | 28 |
| DQ | 92 | 9 | 48 | 2 | 41 | 31 |

n = 2



UANL

TABLA 3.2

Efecto del contraión en cartuchos de Strata Screen C

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

| Analito | NH ₄ COOH | | Ca (C ₂ H ₃ O ₂) ₂ | | Mg (C ₂ H ₃ O ₂) ₂ | |
|---------|----------------------|------|---|------|---|------|
| | % R | %DER | % R | %DER | % R | %DER |
| PQ | 72 | 4 | 45 | 1 | 39 | 6 |
| DF | 118 | 6 | 57 | 1 | 87 | 3 |
| DQ | 46 | 4 | 43 | 5 | 37 | 14 |

n = 2

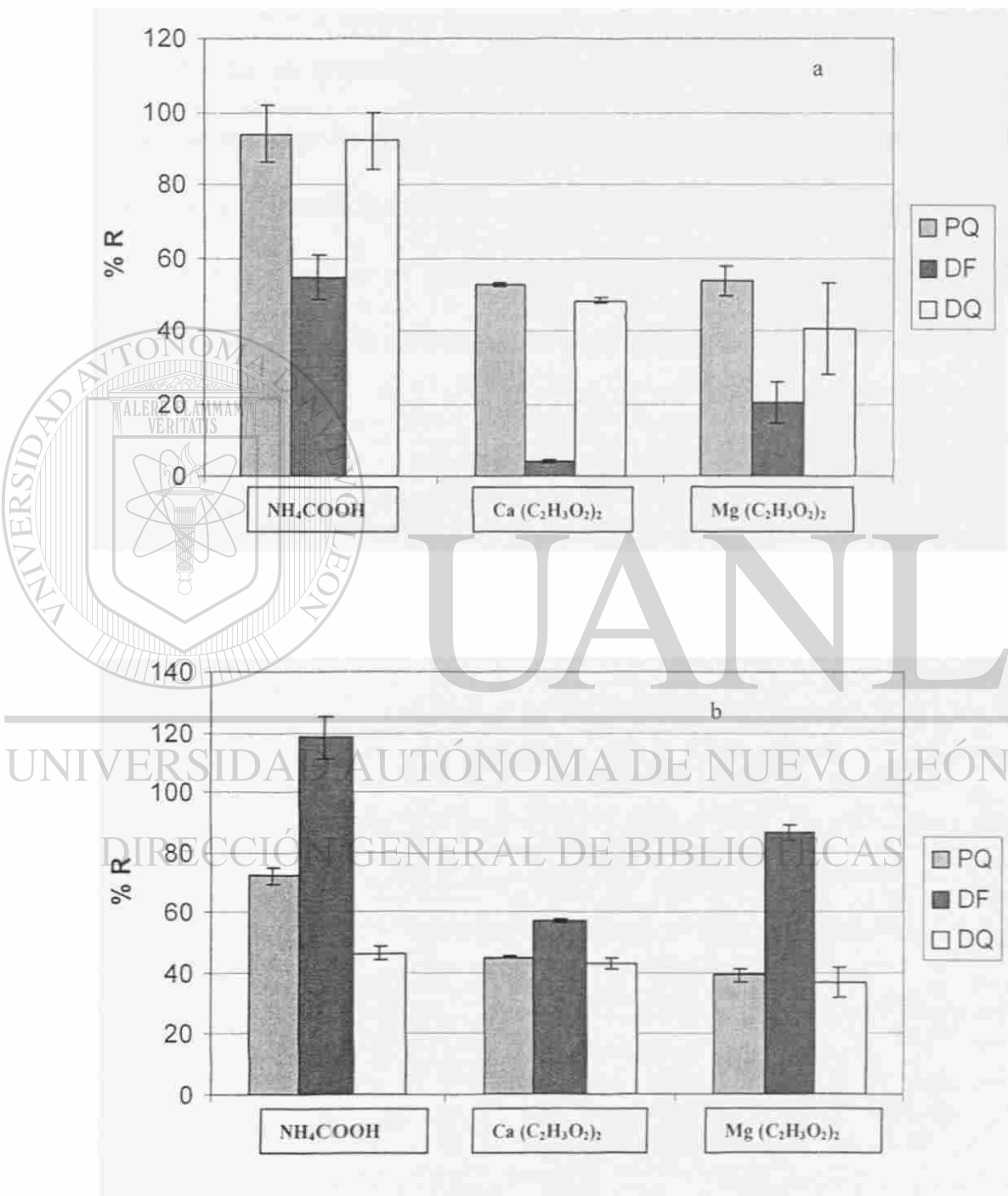


Figura 3.2 Efecto del contraíón en a) Oasis MCX y b) Strata Screen C.
 Contraíón (2 M, pH 3)-MeOH 50:50 v/v

3.1.2.2 Concentración del contraión

En la tabla 3.3 y 3.4 se presenta el porcentaje de recuperación y el coeficiente de variación obtenidos en el estudio del efecto de la concentración del contraión al realizar la elución con mezclas de formiato de amonio a diferentes concentraciones-metanol (50:50 v/v) en los cartuchos de Oasis y en los de Strata Screen C. En la figura 3.3 se representa en forma gráfica el porcentaje de recuperación obtenido de los cuats. De acuerdo a estos resultados, la concentración elegida en ambos cartuchos es de 2 M.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



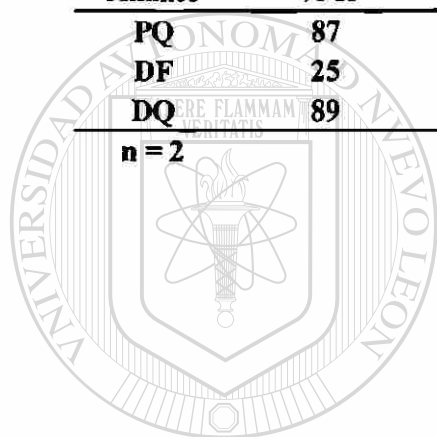
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

TABLA 3.3

Efecto de la concentración del contraíón en la recuperación en los cartuchos de Oasis MCX

| Analito | 1 M | | 2 M | | 6 M | |
|---------|-----|------|-----|------|-----|------|
| | % R | %DER | % R | %DER | % R | %DER |
| PQ | 87 | 17 | 94 | 1 | 65 | 8 |
| DF | 25 | 11 | 30 | 7 | 46 | 19 |
| DQ | 89 | 8 | 91 | 2 | 61 | 10 |

n = 2



U A N L

TABLA 3.4

Efecto de la concentración del contraíón en la recuperación en los cartuchos de Strata Screen C

| Analito | 1 M | | 2 M | | 6 M | |
|---------|-----|------|-----|------|-----|------|
| | % R | %DER | % R | %DER | % R | %DER |
| PQ | 34 | 0.1 | 70 | 2 | 44 | 17 |
| DF | 22 | 19 | 91 | 11 | 83 | 5 |
| DQ | 19 | 2 | 52 | 4 | 47 | 2 |

n = 2

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

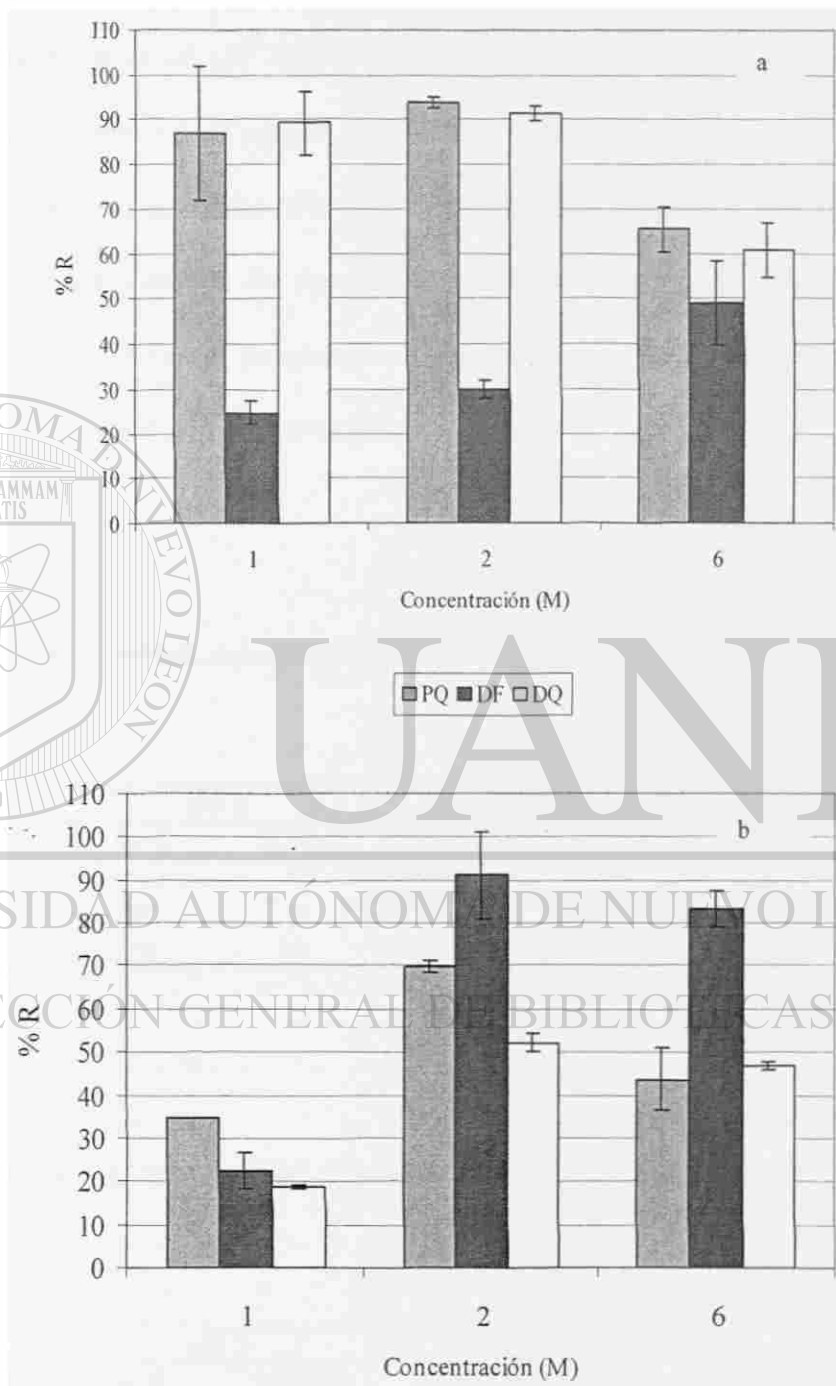
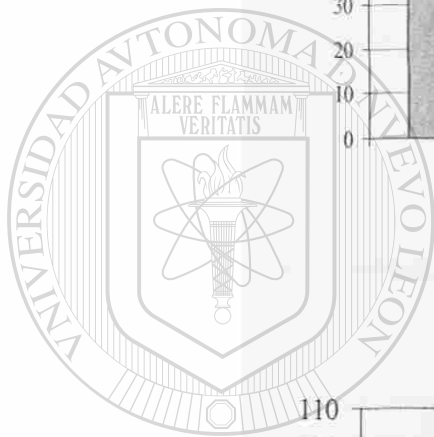


Figura 3.3 Efecto de la concentración del contraión en la recuperación.
Elución con formiato de amonio-Metanol 50:50 v/v
a)Oasis MCX y b) Strata Screen C

3.1.2.3 pH del solvente de elución

Para seleccionar el pH óptimo de extracción se realizó la elución, en ambos cartuchos, con formiato de amonio 2 M-MeOH 50:50 v/v a diferentes valores de pHs (2, 3 y 6), los datos se presentan en la tabla 3.5 y 3.6. En la Figura 3.4 se muestra en forma gráfica la recuperación de los compuestos a diferentes valores de pHs del solvente de elución. Al comparar el porcentaje de recuperación y el coeficiente de variación obtenidos, se eligió como óptimo el pH de 3.

TABLA 3.5

Efecto del pH del solvente de elución en cartuchos de Oasis MCX

| Analito | pH 2 | | pH 3 | | pH 6 | |
|---------|------|------|------|------|------|------|
| | % R | %DER | % R | %DER | % R | %DER |
| PQ | 74 | 30 | 103 | 17 | 94 | 1 |
| DF | 87 | 5 | 47 | 32 | 30 | 7 |
| DQ | 90 | 24 | 91 | 17 | 91 | 2 |

n = 2

TABLA 3.6

Efecto del pH del solvente de elución en cartuchos de Strata Screen C

| Analito | pH 2 | | pH 3 | | pH 6 | |
|---------|------|------|------|------|------|------|
| | % R | %DER | % R | %DER | % R | %DER |
| PQ | 92 | 2 | 101 | 2 | 70 | 2 |
| DF | 85 | 5 | 103 | 0.5 | 84 | 12 |
| DQ | 85 | 3 | 83 | 3 | 54 | 4 |

n = 2

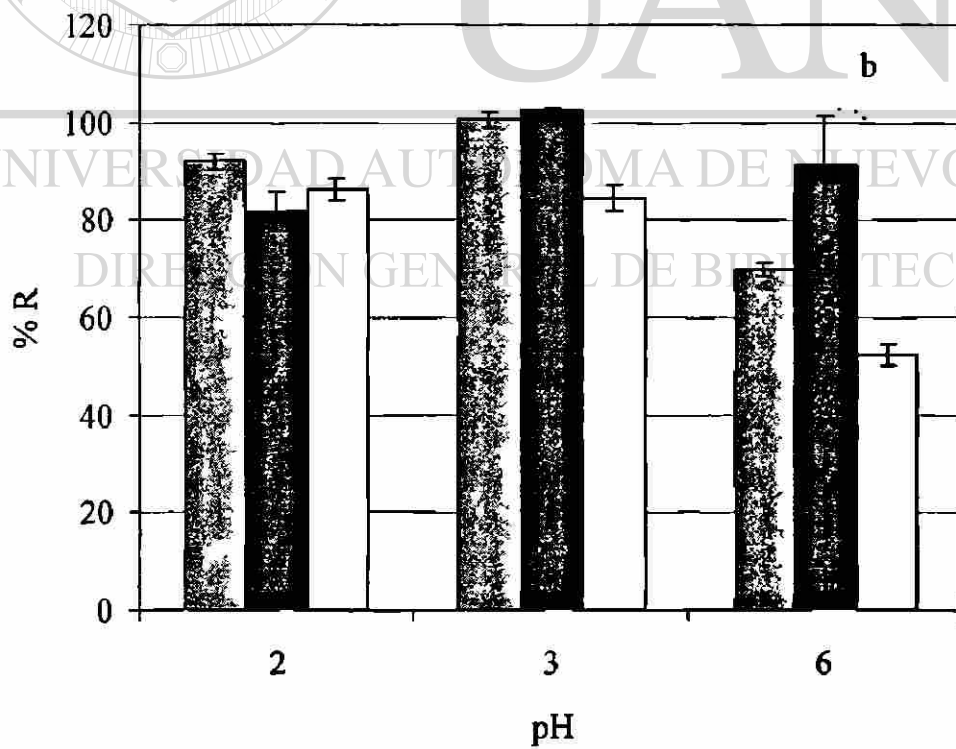
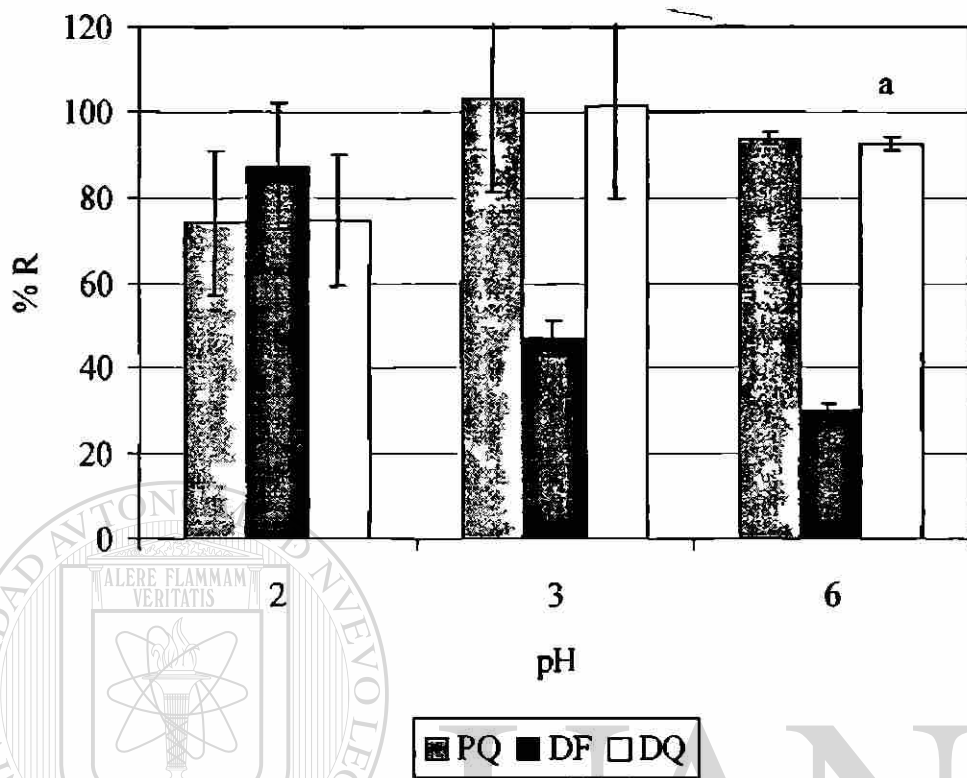


Figura 3.4. Efecto del pH del solvente de elución a) Oasis y b) Strata Screen C
Elución con formiato de amonio 2 M-MeOH 50:50 v/v

3.1.2.4 Modificador Orgánico

En las tablas 3.7, 3.8, 3.9 y 3.10 se muestra el porcentaje de recuperación y el coeficiente de variación obtenidos al hacer la elución en los cartuchos de Oasis MCX y Strata Screen C con formiato de amonio 2 M a pH 3 con diferentes proporciones de MeOH y ACN como modificador orgánico. En las Figuras 3.5 y 3.6 se muestran en forma gráfica estos resultados. Al comparar el porcentaje de recuperación y el coeficiente de variación obtenidos, se eligió como óptimo para los cartuchos de Oasis MCX la proporción de ACN 50% y para los cartuchos de Strata Screen C ACN 25 %.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

TABLA 3.7

Efecto del ACN como Modificador Orgánico en los cartuchos de Oasis MCX

| Analito | 95% | | 75% | | 50% | | 25% | | 10% | | 0% | |
|---------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|----|------|
| | %R | %DER | %R | %DER | %R | %DER | %R | %DER | %R | %DER | %R | %DER |
| PQ | 3 | 72 | 10 | 0.02 | 99 | 7 | 96 | 2 | 97 | 6 | 80 | 0.7 |
| DF | 18 | 2 | 12 | 11 | 108 | 5 | 23 | 36 | 0 | nd | 0 | nd |
| DQ | 6 | 19 | 14 | 4 | 111 | 6 | 99 | 7 | 94 | 7 | 89 | 0.1 |

n = 2

TABLA 3.8

Efecto del MeOH como Modificador Orgánico en los cartuchos de Oasis MCX

| Analito | 100% | | 90% | | 75% | | 50% | | 0% | |
|---------|------|------|-----|------|-----|------|-----|------|----|------|
| | %R | %DER | %R | %DER | %R | %DER | %R | %DER | %R | %DER |
| PQ | 26 | 56 | 15 | 61 | 38 | 10 | 114 | 8 | 80 | 0.7 |
| DF | 11 | 7 | 14 | 65 | 71 | 14 | 60 | 12 | 0 | nd |
| DQ | 53 | 19 | 16 | nd | 55 | 7 | 112 | 9 | 89 | 0.1 |

n = 2

nd= no detectado

Tabla 3.9

Efecto del ACN como Modificador Orgánico en los cartuchos de Strata Screen C

| Analito | 95% | | 75% | | 50% | | 25% | | 10% | | 0% | |
|---------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|----|------|
| | %R | %DER | %R | %DER | %R | %DER | %R | %DER | %R | %DER | %R | %DER |
| PQ | nd | nd | 24 | 13 | 78 | 13 | 84 | 0.1 | 63 | 4 | 17 | 16 |
| DF | 125 | 6 | 57 | 4 | 77 | 30 | 90 | 2 | 6 | 1 | 1 | 9 |
| DQ | nd | nd | 17 | 13 | 64 | 8 | 72 | 3 | 61 | 34 | 34 | 11 |

n = 2

nd= no detectado

Tabla 3.10

Efecto del MeOH como Modificador Orgánico en los cartuchos de Strata Screen C

| Analito | 100% | | 90% | | 75% | | 50% | | 0% | |
|---------|------|------|-----|------|-----|------|-----|------|----|------|
| | %R | %DER | %R | %DER | %R | %DER | %R | %DER | %R | %DER |
| PQ | 0 | nd | nd | nd | 1 | 93 | 72 | 4 | 17 | 16 |
| DF | 11 | 25 | 12 | 85 | 11 | 6 | 118 | 6 | 1 | 9 |
| DQ | 0 | nd | nd | nd | 0 | nd | 46 | 4 | 34 | 11 |

n = 2

nd= no detectado

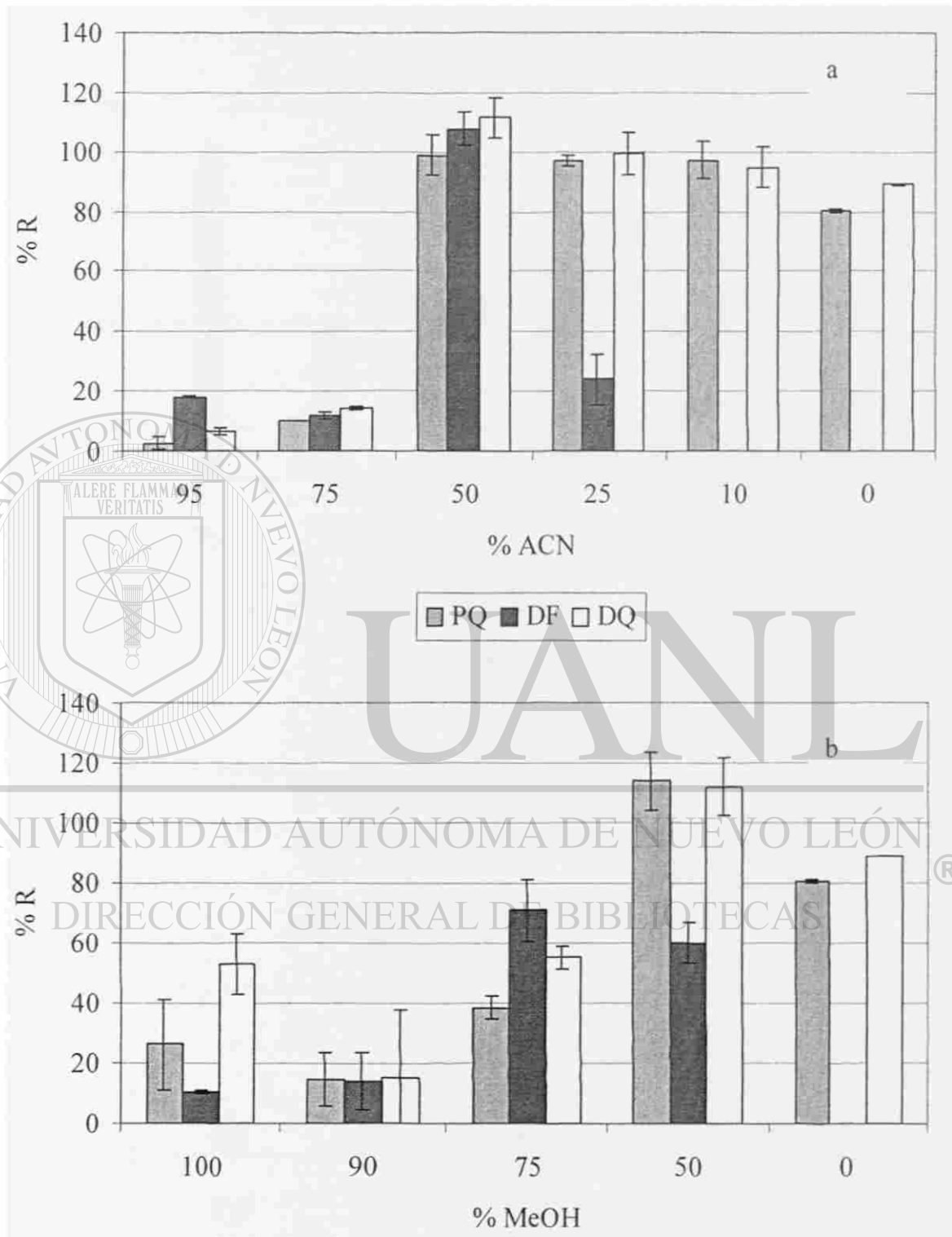


Figura 3.5 Efecto del Modificador Orgánico en Cartuchos de Oasis MCX a) % de ACN y b) % de MeOH. Elución con formiato de amonio 2 M pH 3

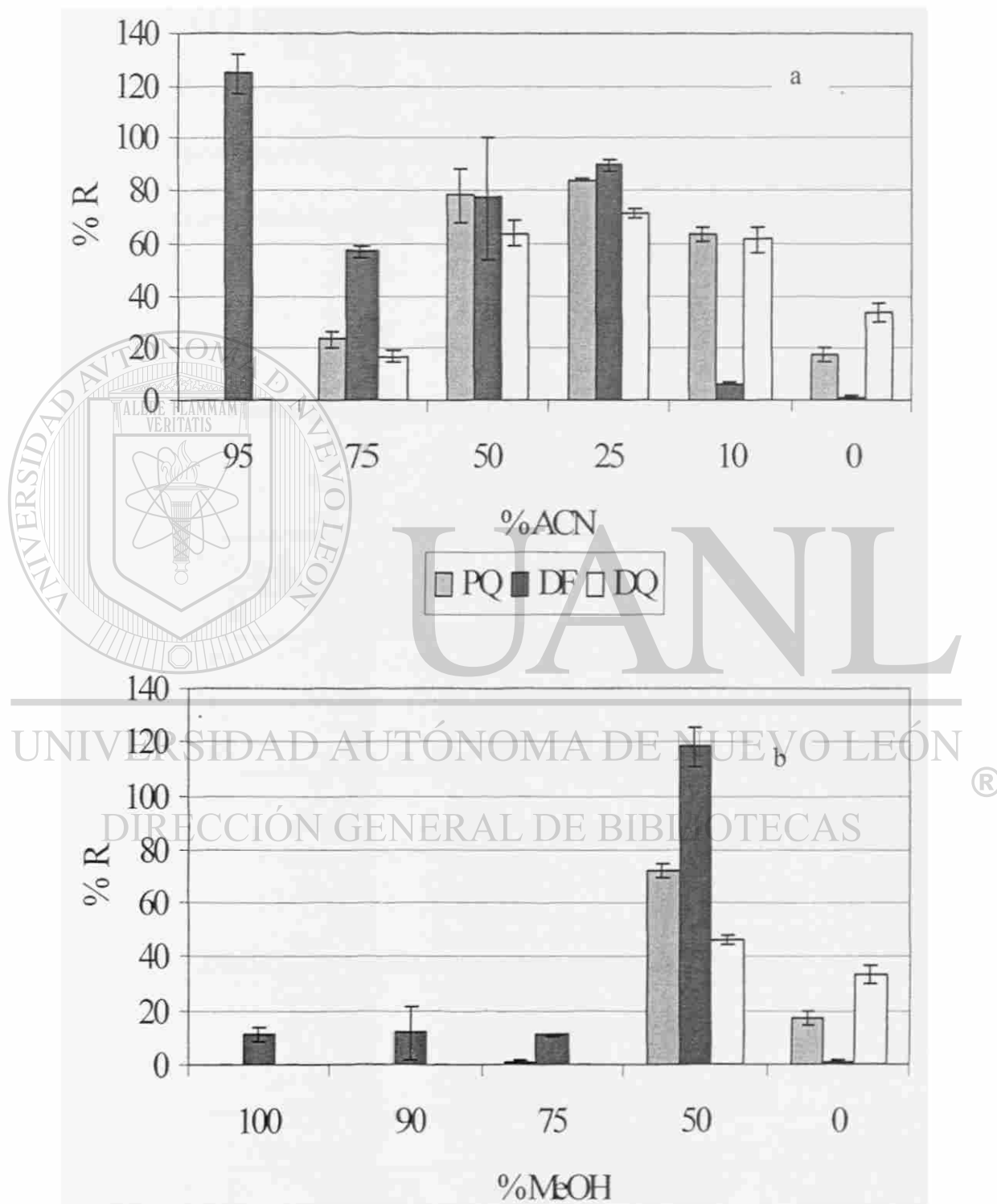


Figura 3.6 Efecto del Modificador Orgánico en Cartuchos de Strata Screen C a) % de ACN y b) % de MeOH. Elución con formiato de amonio 2 M pH 3

3.1.3 Velocidad de flujo

En la tabla 3.11 y 3.12 en la figura 3.7, se muestra el efecto de la velocidad de la extracción (2.5, 5 y 10 mL min⁻¹) en la recuperación obtenida de los compuestos y sus coeficientes de variación en los cartuchos de Oasis MCX y en los de Strata Screen C. La elución se realizó en formiato de amonio (2 M, pH 3)-ACN 50:50 v/v.

TABLA 3.11

Efecto de la velocidad de flujo en Oasis MCX

| Analito | 2.5 mL min ⁻¹ | | 5 mL min ⁻¹ | | 10 mL min ⁻¹ | |
|---------|--------------------------|------|------------------------|------|-------------------------|------|
| | % R | %DER | % R | %DER | % R | %DER |
| PQ | 99 | 3 | 97 | 0.2 | 96 | 1 |
| DF | 92 | 1 | 82 | 1 | 87 | 1 |
| DQ | 98 | 3 | 96 | 0.02 | 95 | 2 |

n = 2

TABLA 3.12

Efecto de la velocidad de flujo en Strata Screen C

| Analito | 2.5 mL min ⁻¹ | | 5 mL min ⁻¹ | | 10 mL min ⁻¹ | |
|---------|--------------------------|------|------------------------|------|-------------------------|------|
| | % R | %DER | % R | %DER | % R | %DER |
| PQ | 78 | 2.5 | 75 | 5.3 | 73 | 0.5 |
| DF | 80 | 1.6 | 69 | 5.3 | 70 | 2.4 |
| DQ | 76 | 2.2 | 75 | 5 | 71 | 0.3 |

n = 2

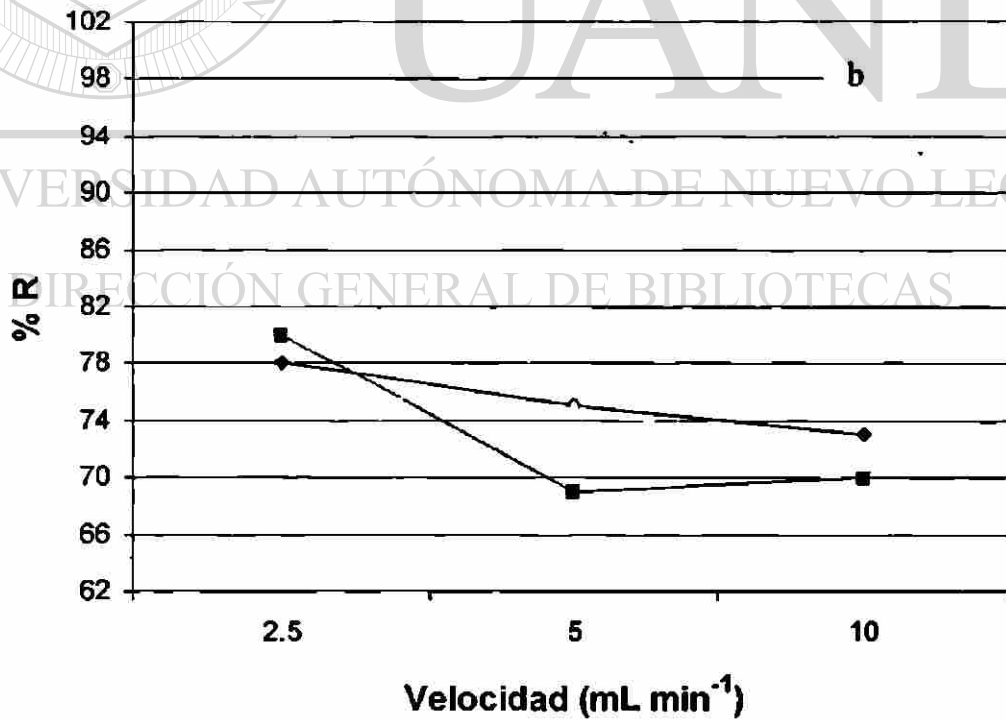
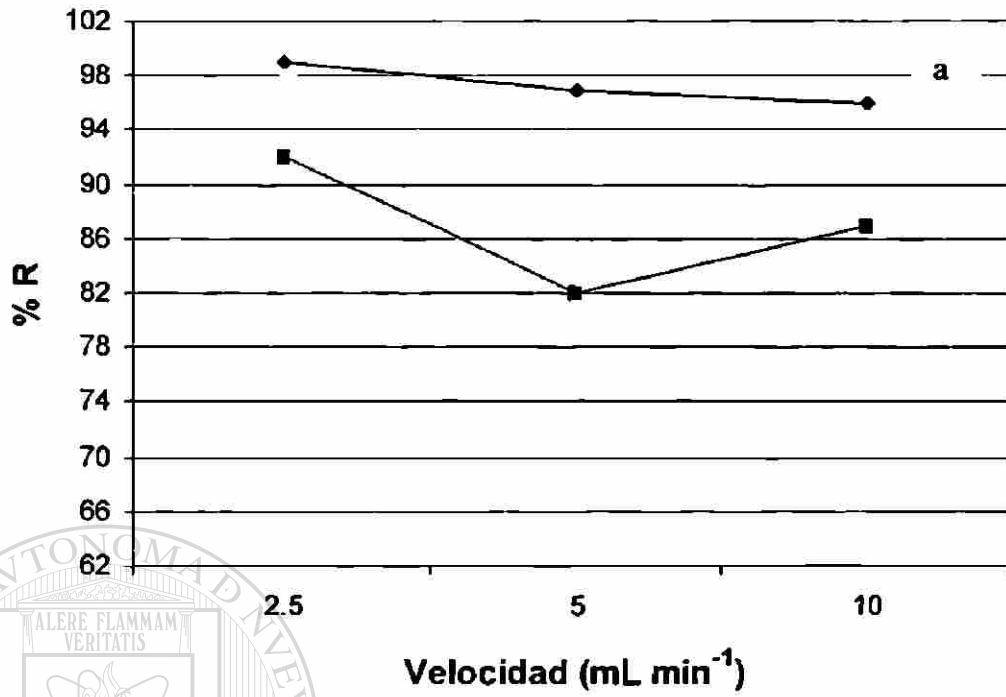
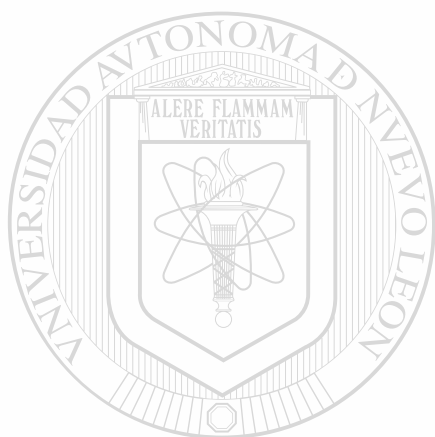


Figura 3.7 Efecto de la velocidad de flujo en a) Oasis MCX.y b) Strata Screen C Elución con formiato de amonio (2 M, pH 3)- ACN 50:50 v/v

3.1.4 Perfil de elución

En la figura 3.8 se muestra el perfil de elución obtenido para los cuats en ambos cartuchos con formiato de amonio (2 M, pH 3)-ACN 50:50, v/v. De acuerdo a esta gráfica se seleccionó para los cartuchos de Oasis y Strata Scen C un volumen de 3 mL



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

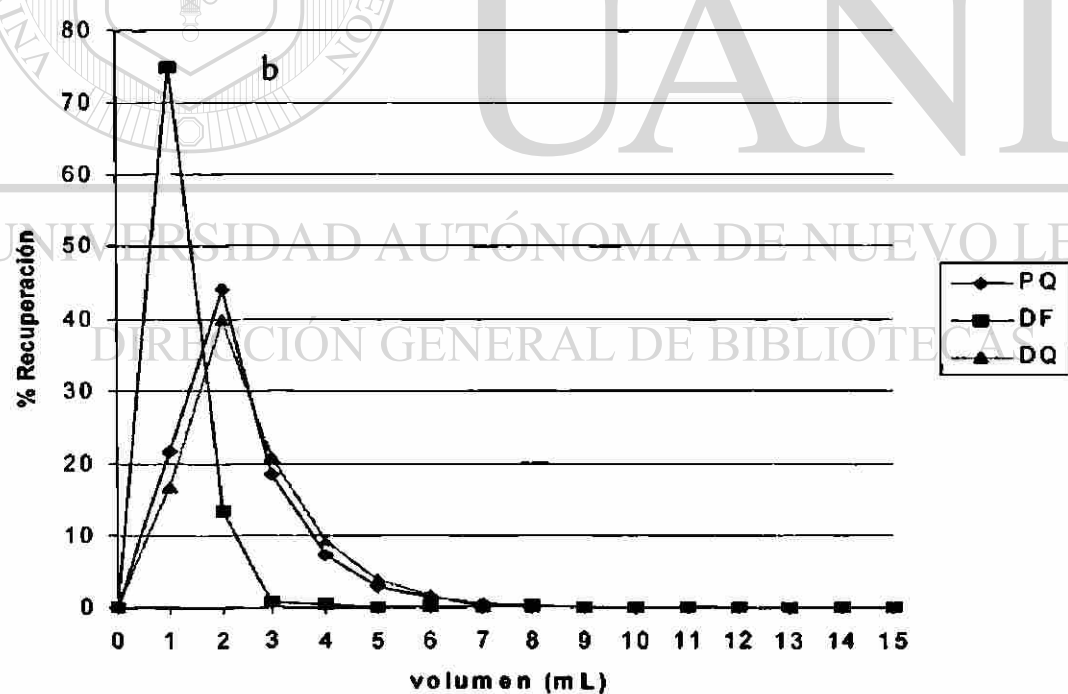
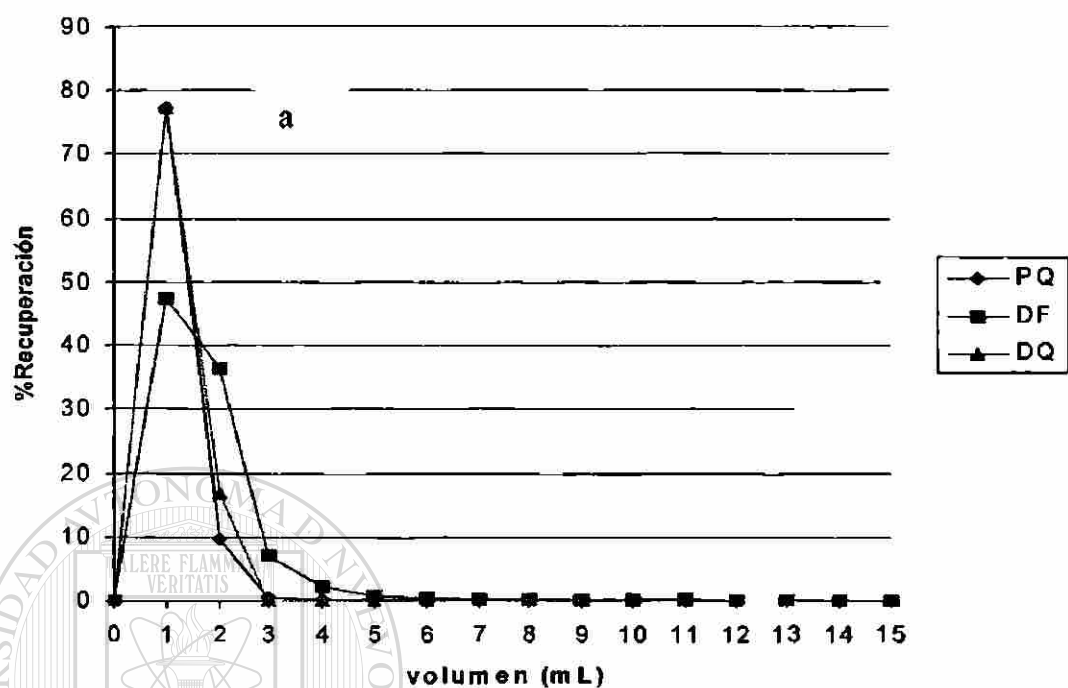


Figura 3.8 Perfil de elución del PQ, DF y DQ en formiato de amonio(2M, pH 3)-ACN 50:50 v/v en a) Oasis MCX y b) Strata Screen C

3.1.5 Condiciones óptimas de extracción

En la tabla 3.13 se resumen las condiciones óptimas para la SPE de los cuats en los cartuchos de Oasis MCX y en los de Strata Screen C establecidas en este trabajo. En la figura 3.9 y 3.10 se muestra el cromatograma obtenido para una mezcla de estándares de cuats (20 ppm), bajo las condiciones óptimas de extracción en los cartuchos de Oasis MCX. y para Strata Screen C.



Tabla 3.13

Condiciones óptimas para la SPE en los cartuchos de Oasis MCX y en los de Strata Screen C

| | Oasis MCX | Strata Screen C |
|---------------------------------|------------------------|------------------------|
| contraíón | NH ₄ COOH | NH ₄ COOH |
| concentración | 2 M | 2 M |
| pH | 3 | 3 |
| modificador orgánico | ACN 50 % | ACN 25 % |
| velocidad de flujo | 5 mL min ⁻¹ | 5 mL min ⁻¹ |
| volumen del solvente de elución | 3 mL | 3 mL |

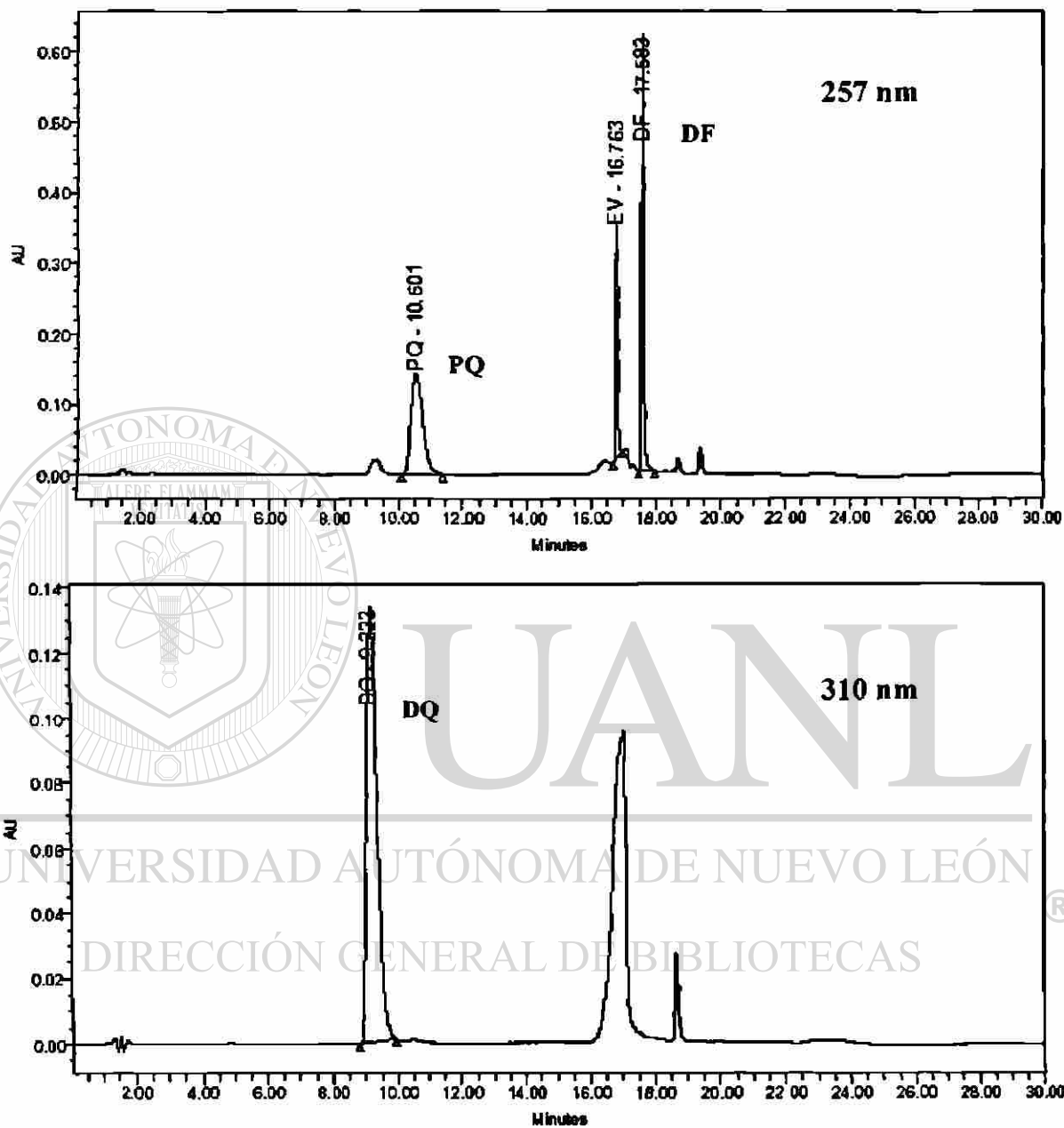


Figura 3.9 Cromatogramas obtenidos, a 257 nm y 310 nm, para una mezcla estándar de cuats (20 ppm) bajo las condiciones óptimas de extracción en Oasis MCX resumidas en la tabla 3.13.

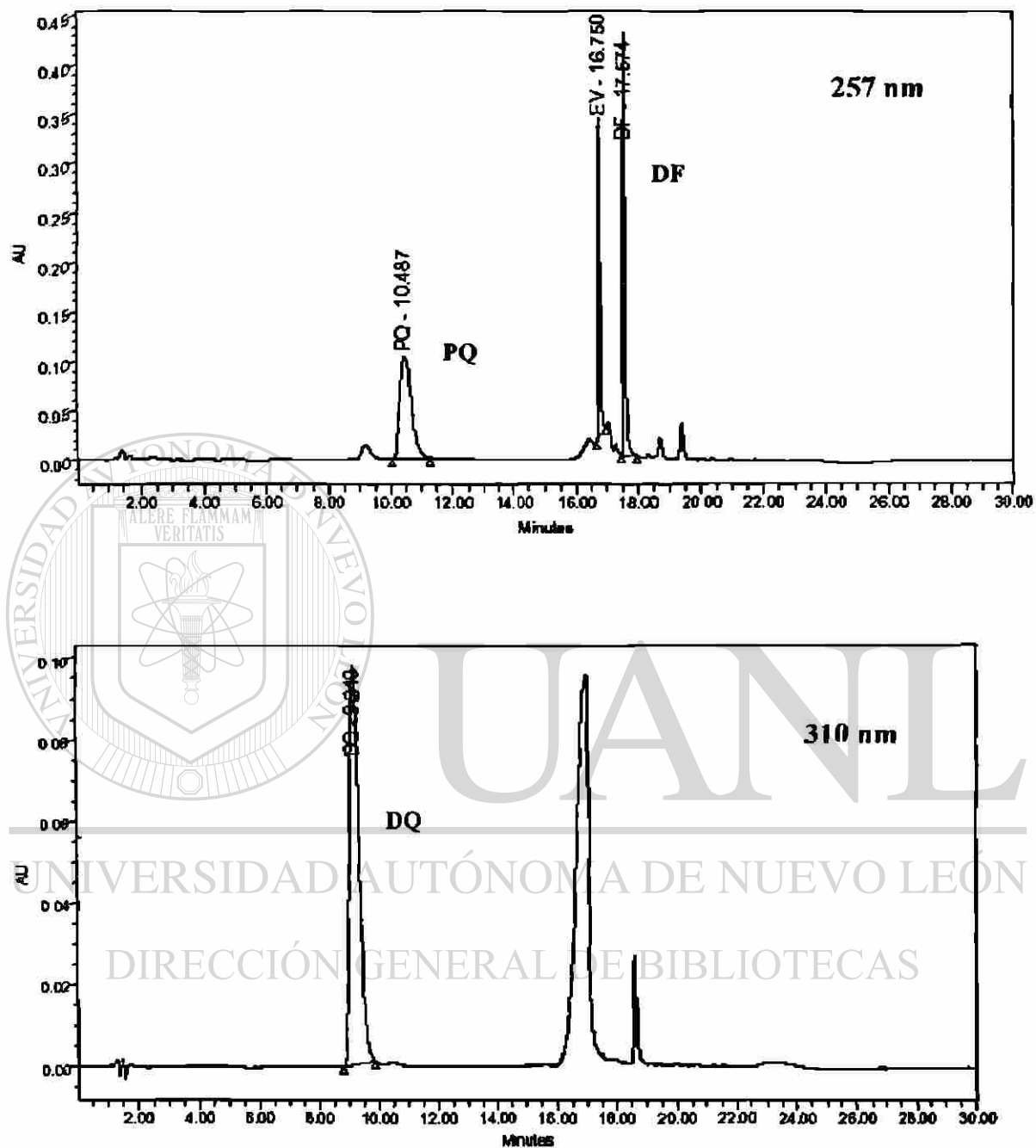


Figura 3.10 Cromatogramas obtenidos, a 257 nm y 310 nm, para una mezcla estándar de cuats (20 ppm) bajo las condiciones óptimas de extracción en Strata Screen C resumidas en la tabla 3.13.

3.2 Validación

3.2.1 Precisión y Recuperación

Los resultados de precisión y recuperación para el método aplicado en matrices: brócoli, arroz, lechuga y agua se presentan en la tabla 3.14

TABLA 3.14

Resultados de la precisión y recuperación para el método

| Muestra | PQ | | DF | | DQ | |
|--------------|----|------|-----|------|-----|------|
| | %R | %DER | % R | %DER | % R | %DER |
| Brócoli | 20 | 23 | 18 | 12 | 20 | 28 |
| Arroz | 12 | 13 | 25 | 11 | 15 | 9 |
| Lechuga | 20 | 10 | 40 | 6 | 20 | 11 |
| Agua potable | 99 | 13 | 98 | 14 | 99 | 13 |

n = 3

En la Figura 3.11 se presentan los cromatogramas obtenidos de la extracción de las muestras de brócoli y agua adicionadas.

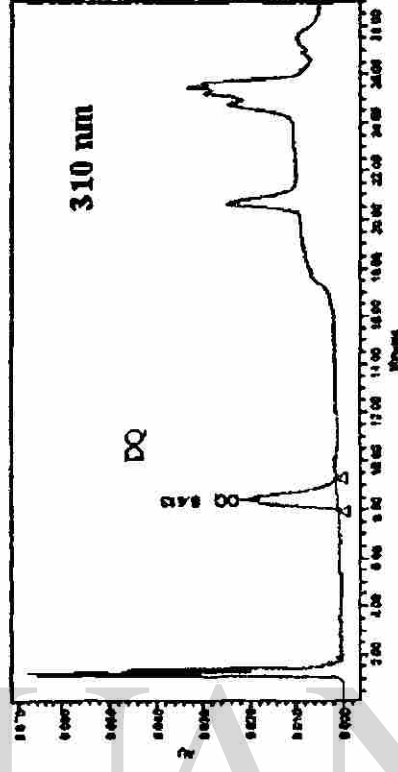
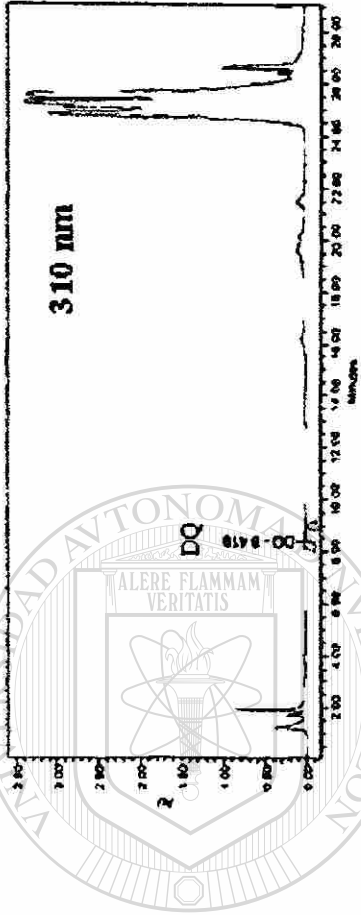
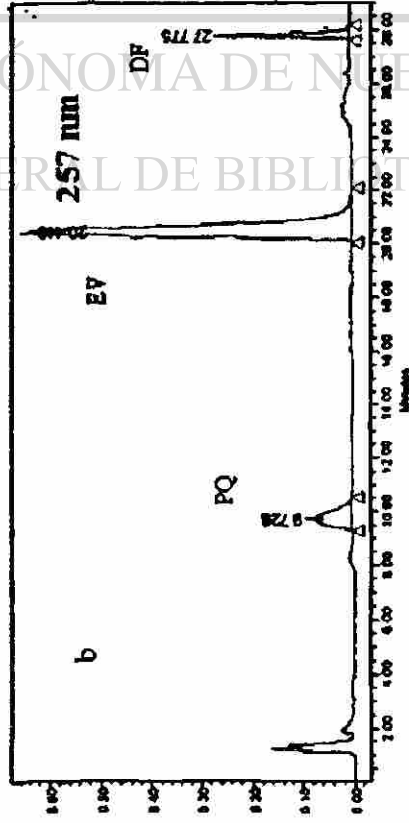
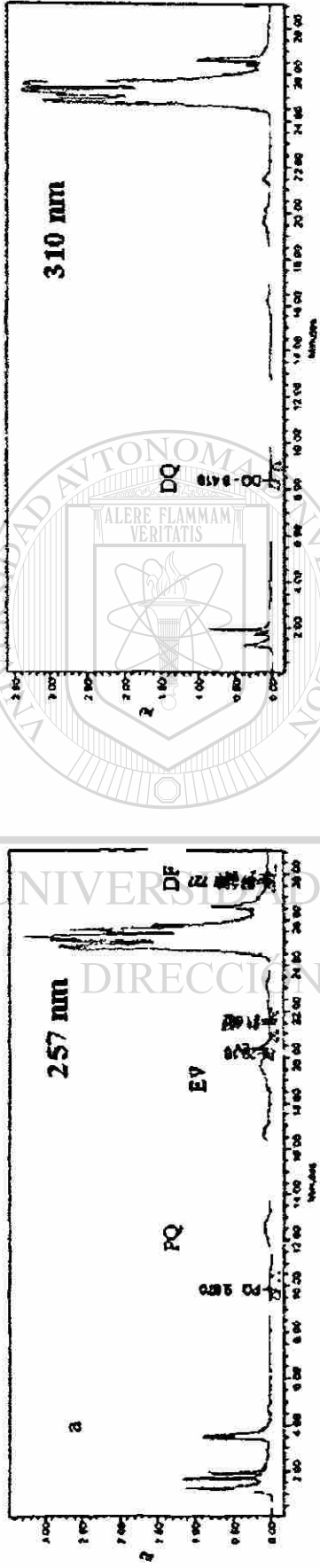
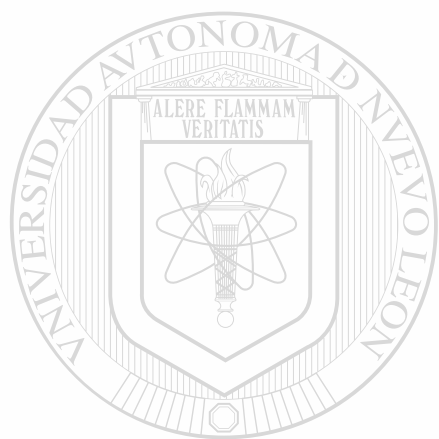


Figura 3.11 Cromatogramas de las muestras de a) brócoli adicionada a 0.05 ppm y b) agua potable adicionada a 0.1 ppm bajo las condiciones cromatográficas ya establecidas.

3.3 Análisis de muestras reales

Se obtuvieron dos muestras de cada alimento (arroz, brócoli, lechuga y agua) de diferente lugar y se analizaron por duplicado.

Los cromatogramas de las muestras sin adicionar no presentaron señales evidentes de los analitos, Figura 3.12



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

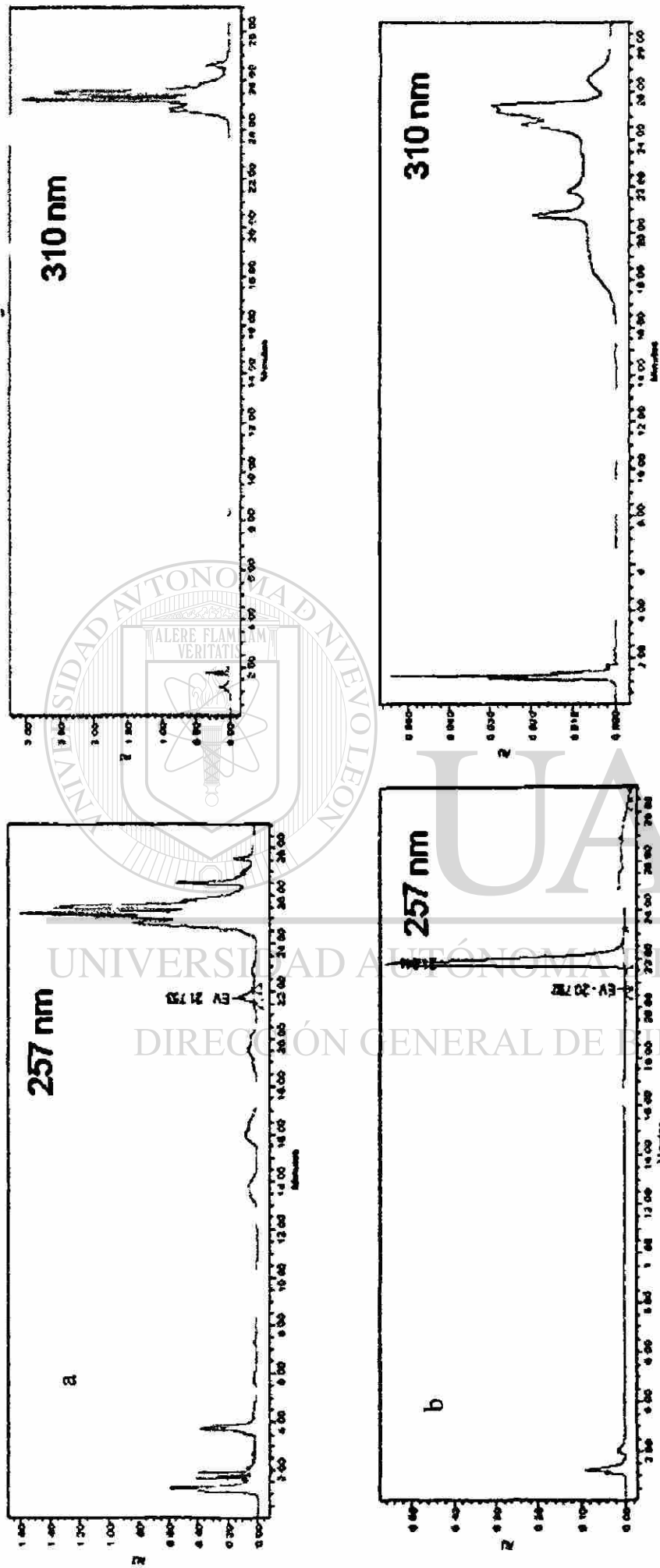
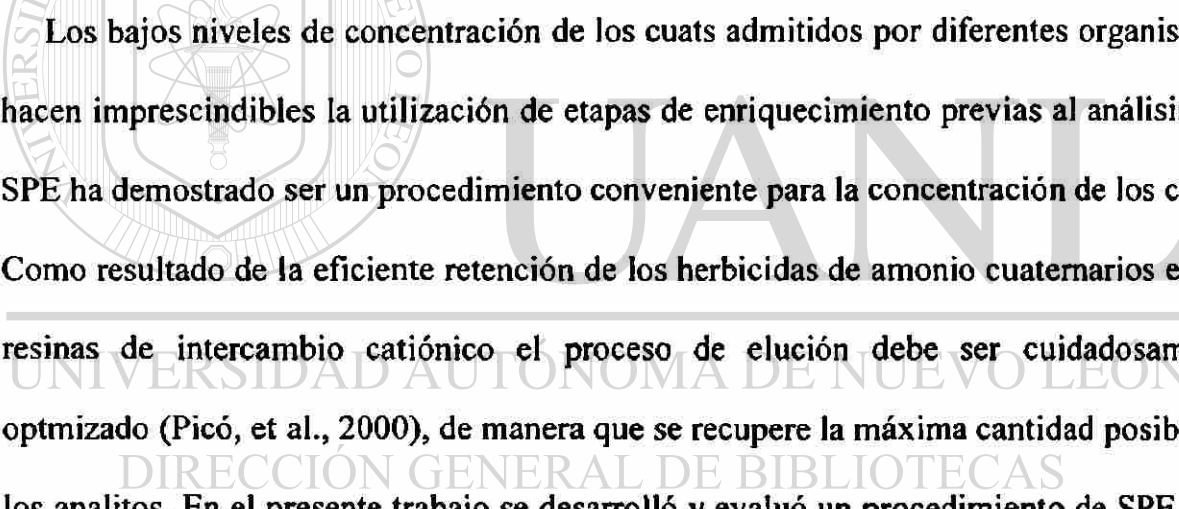


Figura 3.12 Cromatogramas de las muestras de a) brócoli y b) agua potable sin adicionar bajo las condiciones cromatográficas ya establecidas

Capítulo 4

DISCUSIÓN



Los bajos niveles de concentración de los cuats admitidos por diferentes organismos, hacen imprescindibles la utilización de etapas de enriquecimiento previas al análisis. La SPE ha demostrado ser un procedimiento conveniente para la concentración de los cuats. Como resultado de la eficiente retención de los herbicidas de amonio cuaternarios en las resinas de intercambio catiónico el proceso de elución debe ser cuidadosamente optimizado (Picó, et al., 2000), de manera que se recupere la máxima cantidad posible de los analitos. En el presente trabajo se desarrolló y evaluó un procedimiento de SPE para la determinación de los cuats en muestras de arroz, brócoli, lechuga y agua.

4.1 Optimización del procedimiento de SPE

Como se mencionó en la introducción (sección 1.3.1.2), los parámetros que afectan la retención de los analitos en el adsorbente son: el tipo de fase estacionaria, el volumen de

muestra extraído, la velocidad a la que se pasa la muestra durante la extracción y la naturaleza y volumen del solvente utilizado para la elución.

Para determinar las condiciones óptimas para la extracción de los cuats, se estudiaron individualmente las variables mencionadas anteriormente. Los experimentos se realizaron por duplicado y los criterios para seleccionar las condiciones óptimas de trabajo fueron la recuperación y la precisión.

Los cuats son compuestos muy solubles en agua y poco volátiles además, como se mencionó anteriormente poseen una o dos cargas positivas en su estructura, esta última característica es determinante a la hora de seleccionar la fase estacionaria para la concentración de los analitos. En el presente trabajo se evaluaron dos fases estacionarias de modo mixto, Oasis MCX de Waters y Strata Screen C de Phenomenex. Estos adsorbentes poliméricos modo mixto, son copolímeros de N-vinilpirrolidona-divinilbenceno con grupos funcionales de ácido sulfónico. Esta composición les permite retener los analitos mediante mecanismos de intercambio iónico y de fase inversa, esto permite obtener buenas recuperaciones y reproducibilidad, fuerte retención y selectividad para compuestos catiónicos y neutros (Waters, 2003).

4.1.1 Volumen de Ruptura

Una etapa importante en el desarrollo de un método de SPE es el establecimiento de las curvas de ruptura de cada uno de los analitos, ya que permite determinar el volumen de muestra máximo que puede pasarse por el cartucho sin tener pérdidas importantes.

Durante la fase inicial los analitos son cuantitativamente retenidos por el adsorbente hasta el punto que el volumen de muestra excede la capacidad de retención del adsorbente y todo el analito que entra sale sin ser retenido. Es entonces cuando se dice que el cartucho está saturado y no es capaz de admitir más analito (Poole, et al., 2000; Fonseca, 2003).

Como se mencionó en la sección 2.2.4.1 los cartuchos se cargaron con 200 mL de una mezcla de cuats a una concentración de 20 ppm y se colectaron fracciones de 5 mL. Se graficó el área de cada analito contra el volumen de muestra procesado. El punto en la curva en el cual es detectada alguna cantidad de analito, corresponde al volumen de ruptura (Poole, et al., 2000).

Como puede observarse en la Figura 3.1, los volúmenes de ruptura obtenidos para el PQ, DQ y DF en los cartuchos de Oasis MCX son de 75, 80 y 60 mL respectivamente, mientras que los obtenidos en los cartuchos de Strata Screen C son de 45 mL para el PQ y DQ, y de 10 mL para el DF.

PQ y DQ mostraron mayor retención que el DF en ambos cartuchos, esto es debido a que poseen doble carga positiva en su estructura y por lo tanto tienen mayor interacción con el adsorbente. Por otro lado, se observa que los cartuchos de Oasis presentan mayor volumen de ruptura que los cartuchos de Strata Screen C, esto posiblemente se deba a

que los cartuchos de Oasis MCX tengan más sitios activos que los Strata Screen C, lo que les daría una mayor capacidad de retención de los cuats.

4.1.2 Solvente de elución

4.1.2.1 Contraión

En este trabajo, para evaluar el efecto del contraión en la recuperación de los cuats, se realizaron extracciones en ambos cartuchos con formiato de amonio, acetato de calcio y acetato de magnesio, todos a una concentración de 2 M y a un pH de 3.

En la figura 3.2 se observa que en ambos cartuchos se obtuvo el mayor porcentaje de recuperación de los cuats al realizar la elución con formiato de amonio, por lo que se eligió el formiato de amonio para el presente trabajo. En los cartuchos de Oasis se obtienen porcentajes de recuperación del 55 al 94% para el PQ, DF y DQ con coeficientes de variación de 8, 11 y 9 % respectivamente, mientras que en los cartuchos de Strata Screen C los porcentajes de recuperación para el PQ es de 72 %, DF 118 % y DQ 46 % con coeficientes de variación de 4 a 6%. Por otro lado se puede observar que el mayor porcentaje de recuperación del PQ y DQ es en los cartuchos de Oasis, mientras que el porcentaje de recuperación del DF es mayor en los cartuchos de Screen C.

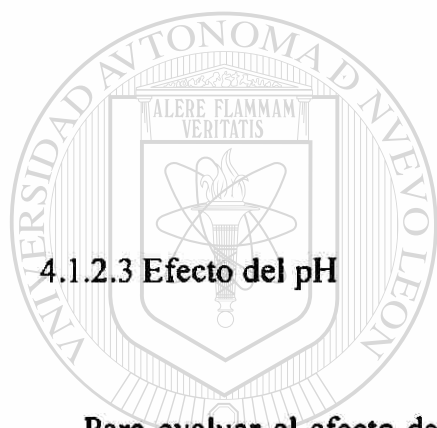
Estos resultados coinciden con lo reportado por Quattrocchi donde se indica que a una misma fuerza iónica, el tipo de contraión influye sobre la fuerza de elución, así la fuerza del contraión para el intercambio catiónico crece en el orden $Ba^{++} < Pb^{++} < Sr^{++} < Ca^{++} <$

$Ni^{++} < Cd^{++} < Cu^{++} < Co^{++} < Zn^{++} < Mg^{++} < UO_2^{++}$ y para los cationes monovalentes: $Tl^+ < Ag^+ < Cs^+ < Rb^+ < K^+ < NH_4^+ < H^+ < Li^+$ ³¹ Esta secuencia debería considerarse sólo como una aproximación, pues depende, en parte, de la resina y de las condiciones experimentales (Quattrocchi, et al., 1992; Skoog, et al, 2001). Picó y col. reportan que según Sensei algunos cationes remueven al PQ de la arcilla pero con diferente eficiencia, por ejemplo $NH_4^+ > K^+ > Ca^{++} > Mg^{++} > Na^+$ (Picó, et al ., 2000)

4.1.2.2 Concentración del contraión

Para observar el efecto de la concentración del contraión en el porcentaje de recuperación y establecer la concentración del mismo en el solvente de elución, las condiciones de partida fueron con formiato de amonio (1 M, 2 M y 6 M)-metanol 50:50 v/v, a un pH aproximadamente de 6 (sin ajustar). En la figura 3.3 se puede observar que en los cartuchos de Oasis MCX se obtiene mayor porcentaje de recuperación del PQ y DQ (94 % y 91 %) a una concentración de 2 M, con coeficientes de variación de 1 y 2 respectivamente. El mayor porcentaje de recuperación para el DF (46 %) se obtiene a una concentración de 6 M aunque con un coeficiente de variación de 19 %. La concentración seleccionada fue 2 M debido a que es donde se obtiene mayor porcentaje de recuperación del PQ y DQ; aunque el porcentaje de recuperación del DF es bajo, esto no genera un problema analítico importante ya que no presenta problemas en su

detección. Así mismo, en los cartuchos de Strata Screen C los porcentajes de recuperación del PQ, DF y DQ (70, 91 y 52 % respectivamente) fueron mejores a una concentración de formiato de amonio 2 M y los coeficientes de variación obtenidos menores del 11%. Nuevamente haciendo una comparación del porcentaje de recuperación obtenido de los cuats a esta concentración de 2 M entre ambos cartuchos se observa que es mayor para el PQ y el DQ en los cartuchos de Oasis y para el DF en los de Screen C.



4.1.2.3 Efecto del pH

Para evaluar el efecto del pH se realizó la elución en ambos cartuchos con formiato de amonio 2 M a diferentes valores de pH (2, 3 y 6). De acuerdo a los resultados obtenidos en los cartuchos de Oasis (figura 3.4) la mejor recuperación del PQ (103 %) y del DQ (91 %) fue obtenida a un pH de 3, aunque los coeficientes de variación no fueron los más bajos, no así para el DF, compuesto con el que se obtuvo una recuperación del 87% a un pH de 2 y con un coeficiente de variación de 5 %; sin embargo el pH seleccionado en los cartuchos de Oasis fue de 3 debido a que es con el que se obtiene mayor recuperación del PQ y del DQ; aunque el porcentaje de recuperación del DF es bajo, esto no genera un problema analítico importante ya que no presenta problemas en su detección. En los cartuchos de Strata Screen C, figura 3.4, al trabajar a un pH de 3 se obtienen los mayores porcentajes de recuperación para el PQ (101 %), DF (103 %) y DQ

(83 %) y los coeficientes de variación son los más bajos. De acuerdo a los resultados obtenidos en ambos cartuchos, se eligió el pH de 3.

4.1.2.4 Tipo y proporción del Modificador Orgánico

En cuanto al tipo y proporción de Modificador Orgánico, se realizaron una serie de extracciones en los cartuchos de Oasis MCX y en los cartuchos de Strata ScreenC utilizando formiato de amonio 2M a un pH 3 que fueron las condiciones elegidas en las pruebas anteriores, como modificador orgánico se empleó ACN o MeOH a diferentes proporciones. De acuerdo a la literatura, debido a su mayor fuerza eluotrópica, a mayor proporción de modificador (ACN, MeOH), hay menor retención de los analitos y por lo tanto mayor recuperación (Quattrocchi, et al., 1992). La figura 3.5 muestra que al trabajar con una proporción de 50 % de ACN en los cartuchos de Oasis se obtiene el mayor % de recuperación de los cuats (entre 99 y 111%) con buenos coeficientes de variación y cuando se aumenta el contenido de ACN la recuperación disminuye. También se puede observar que con porcentajes bajos de modificador (< 10 %) no se recupera nada del DF, esto puede ser debido a su carácter menos polar en comparación con los otros dos herbicidas (Ibáñez, et al., 1996). En esta misma figura se muestran los resultados obtenidos en los cartuchos de Oasis, empleando MeOH como modificador orgánico, en ella se observa que se obtuvo mayor porcentaje de recuperación del PQ y el

DQ a una proporción de 50 % con CV de variación de 8 y 9 % respectivamente, mientras que a un 75 % de MeOH se obtuvo la mayor recuperación del DF.

En cuanto a la recuperación de los cuats en los cartuchos de Strata Screen C, en la figura 3.6 se puede observar que con un 25 % de ACN se obtuvo el mayor porcentaje de recuperación para los tres compuestos (entre 72 y 90%) con coeficientes de variación bajos. Estos porcentajes de recuperación son menores comparados con los obtenidos en los cartuchos de Oasis. También se observa que conforme aumenta la proporción de modificador orgánico, aumenta la recuperación sólo del DF y con proporciones menores del 25 %, la recuperación de los cuats va disminuyendo.

Por otro lado al hacer la elución con 50 % de MeOH se obtuvieron los mayores porcentajes de recuperación de los cuats; con mayores proporciones de MeOH no se logra recuperar el PQ y el DQ y la recuperación del DF disminuye. Aquí se observa que aunque los porcentajes de recuperación fueron mayores cuando se utilizó 50 % de MeOH, estos son menores a los obtenidas en los cartuchos de Oasis.

4.1.3 Velocidad

Para demostrar el efecto de la velocidad de extracción en la recuperación de los cuats, se realizaron extracciones por duplicado en ambos cartuchos bajo las condiciones seleccionadas en los puntos anteriores, a tres velocidades (2.5 mL min⁻¹, 5 mL min⁻¹ y 10 mL min⁻¹). De acuerdo a los resultados obtenidos, en la figura 3.7 se observa que cuando se incrementa la velocidad de extracción la recuperación de los analitos

disminuye levemente; por lo que, se seleccionó una velocidad de 5 mL min^{-1} , ya que se obtienen recuperaciones aceptables (de 69% a 97%) en un tiempo razonable.

Cabe mencionar que los porcentajes de recuperación de los cuats en los cartuchos de Screen C a esta velocidad de 5 mL min^{-1} son menores que los obtenidos en los de Oasis.

4.1.4 Perfil de elución

En la figura 3.8 se muestran los perfiles de elución obtenidos para los cuats en ambos cartuchos bajo las condiciones finales seleccionadas para cada variable en los puntos anteriores, se observa que los tres compuestos eluyen rápidamente; de acuerdo a estos resultados, los volúmenes de elución seleccionados en ambos cartuchos fueron los primeros 3 mL. De esta forma se consigue recuperar una fracción relativamente elevada de los analitos.

4.1.4 Selección de la fase estacionaria

Haciendo una comparación de porcentajes de recuperación obtenido de los cuats en ambos cartuchos bajo las condiciones óptimas (tabla 3.13) se puede apreciar que en general se obtiene mejor recuperación de los cuats en los cartuchos de Oasis MCX, por lo que se seleccionaron estos cartuchos para el resto del trabajo. Si bien, bajo estas

condiciones la recuperación del DF no es la mejor se seleccionaron éstas por las consideraciones mencionadas anteriormente.

4.2 Validación

Se trabajó con muestras de arroz, brócoli, lechuga, germen de trigo, harina de maíz y agua, libres de cuats adicionadas al nivel del límite máximo de residuo permitido para cada una de las muestras; el agua se adicionó a un nivel de 0.1 ppm

Para evaluar la Precisión y Recuperación se utilizó el área de la señal cromatográfica correspondiente a cada analito y se cuantificó con el uso de una curva de calibración elaborada el mismo día de trabajo.

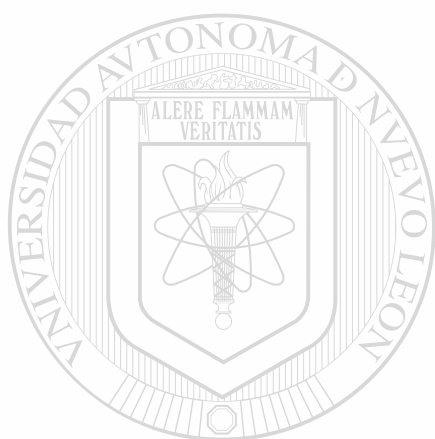
En la tabla 3.14 se observa que se obtuvieron recuperaciones bajas para el brócoli, arroz y lechuga mientras que para el agua potable se obtienen recuperaciones en el rango de 98 a 99 %. Esto posiblemente se deba a que la matriz del agua es menos compleja que la del arroz, brócoli y lechuga. Cabe mencionar que para las muestras de germen de trigo y harina de maíz el método no resultó ser el adecuado, ya que se obtuvo muy bajas recuperaciones de los analitos con coeficientes de variación muy altos.

Los CV del PQ y DQ en las muestras de brócoli fueron de 23 y 28 % que fueron los más altos, mientras que para el resto de las muestras se obtuvieron CV satisfactorios.

Cabe mencionar que, aunque las recuperaciones no fueron las óptimas, se logró detectar los analitos a los niveles del LMR permitido para cada muestra.

4.3 Análisis de muestras reales

En ninguna de las muestras analizadas se detectó la señal de los cuats. En la figura 3.12 se muestran como ejemplo los cromatogramas obtenidos para el brócoli y agua potable.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES

1. Se desarrolló y optimizó un método preciso de SPE para la determinación de cuats en arroz, brócoli, lechuga y agua.
2. Los parámetros que mayor influencia tuvieron en la SPE de los cuats fueron: fase estacionaria, contraión y modificador orgánico.
3. A pesar de haber obtenido bajas recuperaciones de los cuats en matrices de arroz, brócoli y lechuga, el método permite detectarlos a los niveles legislados empleando HPLC con detección UV.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

BIBLIOGRAFÍA

Bidlingmeyer B. A., Practical HPLC Methodology and Applications. Publication. John Wiley & Sons, Inc. Canada, (1992).

Carneiro M.V., Puignou L., Galceran M.T.. Comparison of silica and porous graphitic carbon as solid-phase extraction materials for the analysis of cationic herbicides in water by liquid chromatography and capillary electrophoresis. *Analytica Chimica Acta*, 408 (2000) 263-269.

Castro R., Moyano E., Galceran M.T.. Determination of quaternary ammonium pesticides by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 914 (2001) 111-121.

Castro R., Moyano E., Galceran M.T.. On-line ion-pair solid-phase extraction-liquid chromatography-mass spectrometry for the analysis of quaternary ammonium herbicides. *Journal of Chromatography A*, 869 (2000) 441-449.

CICOPLAFEST. (Comisión Intersecretarial para el Control del Proceso y uso de Plaguicidas, Fertilizantes y sustancias Tóxicas), Catálogo oficial de Plaguicidas, México, D.F., Julio de 1998.

Code of Federal Regulations. Title 40, Volume 21. Revised as of July 1, 2003 From the U.S Government Printing office Via Gpo Acces. CITE: 40CFR180.205 Pag 373-374.

Code of Federal Regulations. Title 40, Volume 21. Revised as of July 1, 2003 From the U.S Government Printing office Via Gpo Acces. CITE: 40CFR180.226. Page 381.

Code of Federal Regulations. Title 40, Volume 21. Revised as of July 1, 2003 From the U.S Government Printing office Via Gpo Acces. CITE: 40CFR180.369. Page 419.

Christian G.D.. Analytical Chemistry. 5th ed. Publication John Wiley & Sons, Inc. Canada (1994). pp 499-584

FAO SPECIFICATIONS AND EVALUATIONS FOR AGRICULTURAL PESTICIDES. Paraquat Dichloride pdf 2003. consultado en Enero del 2006 en http://www.fao.org/WAICENT/FAOINFO/AGRICULT/AGP/AGPP/Pesticid//S pecs/Pdf/Final_Paraquat.

Fonseca Ortiz Omaralis. Desarrollo de un Analizador Automático para la determinación de plomo en Muestras Medioambientales. Tesis de Doctorado, Univerdidad Autónoma de Barcelona, Bellaterra, 2003.

Galceran M.T., Análisis de amonio cuaternario (quats) utilizados como herbicidas y controladores del crecimiento. Plaguicidas. Aspectos ambientales, anaíticos y toxicológicos Ed. I Morell y L. Candela. 1998. pp. 239-257.

Goldstein S., Samuni A., Aronovitch Y., Godinger D., Russo A., Mitchell J.B.. Kinetics of Paraquat and Copper Reactions with Nitroxides: The Effects of Nitroxides on the Aerobic and Anoxic Toxicity of Paraquat. Chem Res.Toxicol. 15(2002)686-691.

Hogenboom A.C., Hofman M.P., Kok S.J., Niessen W.M.A., Binkman U.A.Th..Determination of pesticides in vegetables using large-volume injection colum liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography A, 892 (2000) 379-390.

Ibañez M., Picó Y., Mañes J.. Influence of organic matter and surfactants on solid-phase extraction of diquat, paraquat and difenzoquat from waters. Journal of Chromatography A, 727 (1996) 245-252.

Ibañez M., Picó Y., Mañes J..Improving the solid-phase extraction of "quat" pesticides from water samples. Removal of interferences. Journal of Chromatography A, 823 (1998) 137-146.

Jones R.W., Garland P.B..Sites and Specificity of the Reacction of Bipyridylum Compounds with Anaerobic Respiratory Enzymes of *Escherichia coli*. Journal Biochem 164 (1977) 199-211.

Kambhampati I., Roinestad K.S., Hartman T.G., Rosen J.D., Fukuda E.K., Lippincott R.L., Rosen R.T.. Determination of diquat and paraquat in water using high-performance liquid chromatography with confirmation by liquid chromatography-particle beam mass spectrometry. Journal of Chromatography A, 688 (1994) 67-73.

Lawrence J. F., Panopio L. G., McLeod H. A.. Analysis of Difenzoquat Herbicide in Wheat Products by Reversed-Phase Liquid Chromatography. Journal Agric. Food Chem. 29 (1981) 887-889.

- Labrada R., Caseley J.C., Parker C.. Manejo de Malezas para Países en Desarrollo. (Estudio FAO Producción y Protección Vegetal-120) Roma, 1996 ISSN 1014-1227 adquirido en <http://www.fao.org/docrep/T1147S/t1147s0e.htm>.
- Núñez O., Kim J.B., Moyano E., Galceran M.T., Terabe S.. Analysis of herbicides paraquat, diquat and difenzoquat in drinking water by micellar electrokinetic chromatography using sweeping and cation selective exhaustive injection. Journal of Chromatography A, 961 (2002) 65-75.
- Núñez O., Moyano E., Galceran M.T.. Capillary electrophoresis-mass spectrometry for the analysis of quaternary ammonium herbicides. Journal of Chromatography A, 974 (2002) 243-255.
- Ouyang Y., Mansell R.S., Kizza P.N.. A Simple High Performance Liquid Chromatography Method for Analyzing Paraquat in Soil Solution Samples. Journal of Environmental Quality, 33 (2004) 406-408.
- Picó Y., Font G., Moltó J.C., Mañes J.. Solid-phase extraction of quaternary ammonium herbicides. Journal of Chromatography A, 885 (2000) 251-271.
- Poole C.F., Gunatilleka A.D., Sethuraman R.. Contributions of theory to method development in solid-phase extraction. Journal of Chromatography A, 885 (2000) 17-39.
- Quattrocchi O.A., Abelaira de A.S.I., Laba R.F.. Introducción a la HPLC Aplicación y Práctica. Artes Gráficas Farro S.A. Buenos Aires, (1992). Capítulos 7 y 9.
- Selisker M.Y., Herzog D.P., Erber R.D., Fleeker J.R., Itak J.A.. Determination of Paraquat in Fruits and Vegetables by a Magnetic Particle Based Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. J.Agric. Food Chem. 1995, 43, 544-547.
- Skoog D.A., Holer F.J., Nieman T.A.. Principios de Análisis Instrumental. McGraw Hill. España, (2001). pp 812-815.
- Tinoco R., Parsonet J., Halperin D.. Paraquat poisoning in southern México. Archives of environmental health, VI. 48, No. 2, (1993) 78-80.
- US EPA. Method 549.2. Determination of diquat and paraquat in drinking water by liquid-solid extraction and high performance liquid chromatography with ultraviolet detection. National Exposure Research Laboratory Office of Research and Development U.S. Environmental Protection Agency, Cincinnati, Ohio 45268, 1997. pp 549.2-1 a 549.2-21.
- US EPA Capítulo 12 Paraquat y Diquat. consultado en Enero del 2006 en <http://www.gov/oppfod1/safety/spanish/healthcare/handbook/Spoch12.pdf>.

US EPA Reregistration Eligibility Decision (RED) Difenzoquat EPA 738-R-94-018
September 1994 consultado en Enero del 2006 en
www.epa.gov/oppsrrd1/REDs/0223.pdf.

US EPA Reregistration Eligibility Decision (RED) Paraquat Dichoride EPA 738-F-96-
018 August 1997 consultado en Enero del 2006 en
www.epa.gov/oppsrrd1/REDs/0262red.pdf.

US EPA Reregistration Eligibility Decision (RED). Diquat Dibromide EPA 738-R-95-
016. July 1995 consultado en Enero del 2006 en
www.epa.gov/oppsrrd1/REDs/0288pdf.

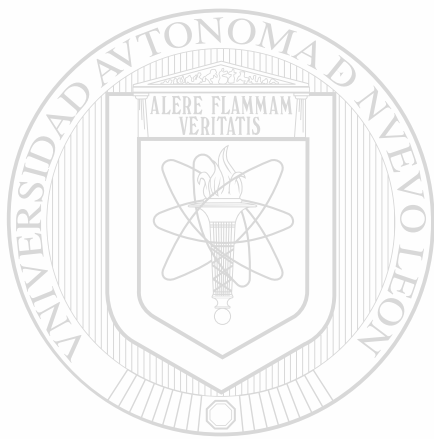
Waters Corporation. Oasis © Sample Extractio Products. 2003.

Wigfield Y.Y., McCormack K.A., Grant R..Simultaneous Determination of Residues of
Paraquat and Diquat in Potatoes Using High-Performance Capillary
Electrophoresis with Ultraviolet Detection. Journal Agric. Food Chem. 41 (1993)
2315-2318.

Yeung J.M., Mortimer R.D., Collins P.G..Development and Applicaton of a Rapid
Immunoassay for Difenzoquat in Wheat and Barley Products. J. Agric. Food
Chem. 44 (1996) 376-380.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



