

USO DEL ÁCIDO SULFÚRICO EN LAS DETERMINACIONES DE PLAGUICIDAS ORGANOCOLORADOS

Stefan M. WALISZEWSKI¹, Sandra GÓMEZ-ARROYO², Octavio CARVAJAL¹,
Rafael VILLALOBOS-PIETRINI² y Rosa M. INFANZÓN¹

¹ Instituto de Medicina Forense de la Universidad Veracruzana, SS Juan Pablo II s/n, 94290- Boca del Río Ver. México, correo electrónico: swal@uv.mx

² Centro de Ciencias de la Atmósfera, UNAM, Ciudad Universitaria, Coyoacán 04510 DF, México

(Recibido octubre 2003, aceptado diciembre 2004)

Palabras clave: plaguicidas organocolorados, métodos analíticos

RESUMEN

Varios trabajos describen métodos analíticos para determinar residuos de plaguicidas organocolorados en muestras ambientales. La detección por cromatografía de gases con captura de electrones exige un extracto con grado de pureza alto. Para este fin, se emplearon adsorbentes como florisil, óxido de aluminio o sílica gel. La mayoría de los plaguicidas organocolorados resisten al ácido sulfúrico, propiedad que se aprovechó para destruir los compuestos orgánicos que estaban en los extractos. Se describen las técnicas que utilizan el ácido sulfúrico en la determinación de plaguicidas organocolorados en muestras de suelo y sedimento, agua, vegetales verdes y tubérculos, granos, paja, tabaco, muestras ricas en grasa animal como tejido adiposo y grasa de leche, suero sanguíneo y semen. El estudio de la calidad analítica realizado para cada tipo de muestra, expresado por el promedio de recuperación con su desviación estándar y por el porcentaje de varianza, indica valores mayores al 90 % de recuperación y varianza menor al 10 %. De acuerdo con el criterio expresado por la Association of Official Analytical Chemists de los EUA, los valores obtenidos demuestran que el método tiene excelente recuperación y variabilidad aceptable. Además, con el uso de ácido sulfúrico el costo del análisis fue menor, debido a la eliminación de los adsorbentes y a la disminución del volumen de los disolventes utilizados.

Key words: organochlorine pesticides, analytical methods

ABSTRACT

Many papers describe the analytical methods for organochlorine pesticide residue determination in environmental samples. Gas chromatography with electron capture detection requires an efficient clean-up step of extracts. To reach this purpose, the adsorbents such as florisil, aluminium oxide and silica gel are employed. Most of organochlorine pesticides are resistant to sulfuric acid, characteristic that was used in the destruction of organic compounds of sample origin. The analytical methods that use sulfuric acid as a clean-up medium during the determination of organochlorine pesticide residues in the following samples are described: soil and sediments, vegetables and tubercles, grains, straw, tobacco, fatty samples of animal origin such as adipose tissue and milk fat, blood serum and semen. The analytical quality study done for each sample type, expressed as mean with standard deviation and percent of variation, gave values higher than 90 % of recovery and a variation smaller than 10 %. According to the criteria of the Association of Official Analytical Chemists of USA, the obtained values considered the described meth-

ods as excellent in recovery and with acceptable variability. Moreover, the use of sulfuric acid makes the method cheap, eliminating the adsorbents and diminishing the volume of solvents.

INTRODUCCIÓN

Los plaguicidas organoclorados, representados por el DDT (dicloro-difenil-tricloroetano) y por el HCH (hexaclorociclohexano) desde su introducción en la agricultura y sanidad a principios de los años 40, han beneficiado al hombre de manera significativa acumulando esfuerzos tanto en la agricultura y en la salud, como en el combate de vectores transmisores de enfermedades. El DDT, introducido en Europa durante la posguerra para combatir al escarabajo de la papa, permitió resolver la difícil situación alimentaria. Por otro lado, en Japón el empleo del HCH en los cultivos del arroz propició el aumento significativo en la producción agrícola de este grano resolviendo así el déficit alimentario.

El descubrimiento de la presencia y la acumulación de los plaguicidas organoclorados en el tejido adiposo de animales y humanos y su biomagnificación en la cadena alimentaria, originó a principio de los años 70 su restricción y prohibición. Sin embargo, el resurgimiento de brotes de malaria debido al retiro del DDT en el combate sanitario en zonas tropicales, promovió que en 1984 la OMS recomendara nuevamente su uso como insecticida de selección en la lucha contra vectores transmisores de enfermedades.

Para evaluar el daño toxicológico, así como los niveles de plaguicidas organoclorados acumulados en la cadena alimentaria y presentes en el aire inhalado, es de suma importancia disponer de técnicas analíticas que permitan evaluar la exposición real y los niveles verdaderos de los residuos de estos plaguicidas. La técnica analítica debe poseer la cualidad de ser simple, rápida, barata, exacta y reproducible. Algunos plaguicidas organoclorados son resistentes a la oxidación del ácido sulfúrico concentrado (HCB, isómeros HCH, pp'DDT, op'DDT, pp'DDE, pp'DDD, Aldrin, Heptacloro, Epóxido de Heptacloro, α -Endosulfan, β -Endosulfan, Sulfato de Endosulfan) propiedad que es aprovechada en el proceso de purificación de los extractos, degradando los compuestos endógenos lábiles sin afectar a los plaguicidas y precipitando cuantitativamente las grasas de origen animal. Los plaguicidas organoclorados que se degradan bajo la acción del ácido sulfúrico son: Dieldrin, Endrin, Clordano y Metoxiclor. Los beneficios de uso de esta técnica son:

1. Disminución notable del costo debido a la sustitución de adsorbentes caros y al abatimiento significativo del volumen de disolventes orgánicos utilizados.

2. Obtención de los niveles reales de plaguicidas organoclorados, ya que esta técnica permite la determinación de plaguicidas libres y conjugados. El ácido sulfúrico hidroliza los complejos de plaguicidas conjugados con las sustancias biológicamente activas, permitiendo su cuantificación.
3. Durante la determinación cromatográfica de los plaguicidas organoclorados, algunos picos que corresponden a ésteres de ftalatos se superponen a los de plaguicidas conduciendo a interpretaciones erróneas. El ácido sulfúrico concentrado degrada los ftalatos eliminando su presencia en los extractos y su interferencia durante la determinación (Waliszewski y Szymczynski 1990), lo que permite obtener resultados que aseguran valores verdaderos de la contaminación.

Los beneficios enlistados llevaron a la evaluación de los métodos analíticos utilizados en los estudios de monitoreo de los residuos de plaguicidas organoclorados que incluyen al ácido sulfúrico concentrado como medio de purificación de los extractos. Estas técnicas permiten también la disminución de la cristalería empleada y del método de laboratorio.

MATERIAL Y MÉTODOS

Los reactivos empleados fueron éter de petróleo (temp. de ebullición 40-50 °C), hexano, acetato de etilo, acetónitrilo, isooctano, ácido acético, ácido sulfúrico, todos con grado de pureza para análisis, sulfato de sodio anhidro en polvo activado durante 16 horas a 650 °C, estándares de plaguicidas organoclorados adquiridos de Supelco Inc. (EUA).

1. Se utilizó un cromatógrafo de gases marca Varian modelo 3400CX con detector de captura de electrones y una columna capilar megaboro SPB-608 de 320 μ m di y 30 m de longitud. Las condiciones de trabajo fueron: columna en un programa de temperatura de 193 °C (7 min) aumentando después la temperatura 6 °C/min hasta llegar a 250 °C, manteniendo esta temperatura durante 20 minutos. El gas de arrastre fue nitrógeno con flujo lineal de 27 cm/min; se inyectó 1 μ L del extracto en modo "splitless". Para confirmar algunos picos de plaguicidas organoclorados, se corroboró su presencia durante la determinación por cromatografía de gases-espectrometría de masas (Varian Mode-

lo 3800-Saturn 2000 GC-MS-MS), comparando los espectros de masas obtenidos de las muestras en el detector de trampa iónica con los estándares correspondientes. La determinación cualitativa y cuantitativa por cromatografía de gases se realizó por medio del paquete Workstation versión 4.5 comparando los tiempos de retención y calculando las áreas bajo los picos correspondientes de las muestras y los estándares. La cristalería que se empleó es especial para la determinación de residuos de plaguicidas.

Estudio de calidad analítica

Para valorar los métodos analíticos se realizaron estudios de adición de mezcla de estándares de plaguicidas organoclorados a las muestras homogéneas en 10 repeticiones. Las muestras fortificadas se dejaron desde 1 hasta 24 horas dependiendo del tipo, para permitir que la mezcla reaccionara con los compuestos endógenos. Los valores promedio (\bar{X}) de recuperación obtenidos, su desviación estándar (DE) y varianza se presentan en las tablas correspondientes.

Análisis estadístico

Se calcularon los niveles promedio de recuperación (\bar{X}) para cada plaguicida y tipo de muestra con su desviación estándar (DE) y varianza (V %), estimando los valores por medio del paquete estadístico Minitab versión 12.

MÉTODOS ANALÍTICOS

Suelo

Se pasaron 20 gramos de la muestra de suelo seco (secado al aire libre con la humedad constante) (Waliszewski y Szymczynski 1985, Waliszewski e Infanzón 2003), a un matraz de fondo redondo (250 mL), se agregaron 50 mL de una mezcla acetone-tri-ácido acético-agua (30:10:10 v/v/v) y se dejó reposar durante 16 horas en la oscuridad. El contenido se hirvió a reflujo en un equipo soxhlet por 15 minutos, se enfrió y el extracto se decantó en un matraz de separación (500 mL). A la muestra de suelo se le agregaron otros 50 mL de la mezcla de extracción y se hirvió nuevamente a reflujo por 15 minutos. El extracto frío se filtró al mismo matraz de separación mezclando ambos extractos. A los extractos se les agregaron 300 mL de agua destilada y se mezcló el contenido. Los plaguicidas organoclorados se extrajeron con tres porciones de 50 mL de hexano. Los extractos hexánicos reunidos en un matraz de separación se lavaron con dos porciones de 50 mL de agua para remover los restos de ácido acético y de acetone-tri. Posteriormente se secaron pasándolos por una capa

de sulfato de sodio anhidro a un matraz de fondo redondo y se concentraron en un rotavapor a unos mililitros. El extracto concentrado se traspasó cuantitativamente con hexano a un tubo con tapón ajustando el volumen a 10 mL. Se purificó el extracto agregando 1 mL del ácido sulfúrico concentrado y se agitó vigorosamente durante 1 minuto. Se dejó reposar 3 minutos para separar las fases y se filtró la fase orgánica a través de una capa de sulfato de sodio anhidro, el cual se lavó con hexano y el extracto con los enjuagues reunidos en un matraz de fondo redondo se concentraron a unas gotas. El extracto, se transfirió a un vial volumétrico aforando el volumen final a 1.0 mL con hexano. Los resultados de la recuperación se presentan en la **tabla I**.

TABLA I. RESULTADOS DEL ESTUDIO DE ADICIÓN DE ESTÁNDARES DE PLAGUICIDAS ORGANOCORADOS A LAS MUESTRAS DE 20 GRAMOS DEL SUELO (n = 10)

Plaguicida	Nivel de fortificación (mg/kg)	Límite de detección (mg/kg)	\bar{X} ± DE	Varianza %
HCB	0.005	0.001	98.3 ± 1.3	1.5
α-HCH	0.005	0.001	99.3 ± 1.3	1.7
β-HCH	0.011	0.004	98.5 ± 2.4	3.0
γ-HCH	0.011	0.002	99.8 ± 0.6	0.8
Heptaclo	0.039	0.007	97.8 ± 3.9	4.4
Epóxido de heptaclo	0.022	0.005	99.5 ± 0.6	0.9
Aldrin	0.021	0.005	98.2 ± 4.3	5.0
pp'DDE	0.030	0.005	98.8 ± 0.6	0.8
pp'DDD	0.025	0.008	98.1 ± 1.7	2.0
op'DDT	0.032	0.010	98.5 ± 2.4	3.0
pp'DDT	0.045	0.010	91.5 ± 1.6	1.9

El estudio de fortificación se realizó adicionando la solución hexánica de la mezcla de plaguicidas a la muestra de suelo. Se homogeneizó el contenido y posteriormente se permitió evaporar el disolvente. La muestra se dejó por varias horas en la oscuridad propiciando que ocurrieran las reacciones de conjugación entre los plaguicidas y las partículas del suelo. No se observaron diferencias en los cromatogramas y los valores de recuperación entre suelos con distinta cantidad de materia orgánica, indicando que el proceso de extracción y de purificación de los extractos son eficientes y apropiados. El estudio de fortificación se realizó en 10 repeticiones.

Agua

Se colocaron 500 mL de la muestra de agua en un embudo de separación y se le adicionaron 10 mL de ácido acético para acidificarla. Se mezcló el conteni-

do y los residuos de plaguicidas organoclorados se extrajeron con 50 mL de acetato de etilo, agitando vigorosamente durante unos minutos. La fase acuosa se pasó a otro embudo de separación y el extracto de acetato de etilo se colectó en un matraz de Erlenmeyer. El procedimiento de extracción se repitió dos veces más con 50 mL de acetato de etilo. Los extractos combinados se secaron agregando sulfato de sodio anhidro y se dejaron reposar durante 1 hora. Los extractos secos se pasaron a un matraz de fondo redondo, se agregaron 10 mL de isooctano y el extracto se concentró en un rotavapor hasta un volumen aproximado de 2 mL. El extracto concentrado se traspasó cuantitativamente con hexano a un tubo con tapón de teflón y se agregó 1 mL del ácido sulfúrico concentrado. El contenido se agitó vigorosamente y se dejó reposar unos minutos para obtener una buena separación de las fases y el extracto hexánico se secó pasándolo por una capa de sulfato de sodio anhidro. Para recuperar cuantitativamente los plaguicidas se enjuagó el sulfato de sodio con hexano. El extracto con los enjuagues se concentraron hasta unas gotas en un rotavapor y se traspasaron cuantitativamente con hexano a un vial, aforando a un volumen final de 1.0 mL. Los datos del estudio de fortificación se resumen en la **tabla II**.

TABLA II. RESULTADOS DEL ESTUDIO DE ADICIÓN DE ESTÁNDARES DE PLAGUICIDAS ORGANOCORADOS A LAS MUESTRAS DE 500 mL DE AGUA (n = 10)

Plaguicida	Nivel de fortificación (µg/kg)	Límite de detección (µg/kg)	$\bar{X} \pm DE$	Varianza %
HCB	0.02	0.004	99.1 ± 1.8	2.0
α-HCH	0.02	0.004	98.3 ± 1.4	1.6
β-HCH	0.08	0.020	96.7 ± 2.1	3.1
γ-HCH	0.04	0.008	97.4 ± 2.1	2.4
Heptacloro	0.14	0.035	93.2 ± 3.8	4.5
Epóxido de heptacloro	0.08	0.015	95.6 ± 2.9	3.4
Aldrin	0.08	0.010	95.6 ± 3.0	3.4
pp'DDE	0.12	0.020	95.9 ± 3.1	3.6
pp'DDD	0.10	0.020	94.7 ± 2.8	3.2
op'DDT	0.12	0.030	91.8 ± 3.7	4.4
pp'DDT	0.18	0.030	93.5 ± 4.1	4.6

Los estudios de fortificación se realizaron adicionando a las muestras de agua 1.0 mL de la solución hexánica de los estándares de los plaguicidas organoclorados. La muestra de agua de río fortificada se dejó reposar 16 horas para permitir las reacciones de disolución e interacción de los plaguicidas y los componentes del agua. El estudio de fortificación se realizó en 10 repeticiones.

Las muestras de aguas negras, por la presencia de gran cantidad de sustancias orgánicas necesitan doble purificación con ácido sulfúrico concentrado. El extracto orgánico se pasa a otro tubo y se repite la adición de 1 mL de ácido sulfúrico al extracto ya tratado.

Muestras de vegetales verdes y tubérculos

Las muestras de vegetales que forman tubérculos como la zanahoria y la papa se conocen por sus propiedades de acumular específicamente los compuestos lipofílicos presentes en los suelos. Asimismo, las plantas que constituyen el forraje adsorben en su superficie a los plaguicidas que se volatilizan del suelo (Rüdel 1997, Smith *et al.* 2001, Waliszewski e Infanzón 2003).

Se homogeneizaron cien gramos de muestra, previamente molida, con 150 mL de acetonitrilo durante unos minutos en un homogeneizador Ultra-turrax (Waliszewski 1995). El extracto se filtró a través de un papel filtro a un embudo de separación de 1000 mL de capacidad. Se repitió la homogeneización de la muestra con adición de 100 mL de acetonitrilo y se filtró. Los extractos obtenidos fueron mezclados en un embudo de separación. A los extractos se les agregaron 500 mL de una solución acuosa de sulfato de sodio al 5 %. Los residuos de los plaguicidas organoclorados se extrajeron con tres porciones de 50 mL de éter de petróleo. Los extractos se secaron pasándolos por una capa de sulfato de sodio y se concentraron en un rotavapor hasta aproximadamente 2 mililitros. El extracto concentrado se traspasó cuantitativamente a un tubo con tapón de teflón aforando el volumen a 10 mL. Posteriormente se agregó 1 mL de ácido sulfúrico concentrado y se agitó vigorosamente durante un minuto. Se dejó reposar el contenido por unos minutos para lograr una buena separación de las fases. La fase de éter se secó pasándola por una capa de sulfato de sodio anhidro recolectando el filtrado en un tubo con tapón. En el cromatógrafo de gases se inyectó 1 µL del filtrado para la determinación cualitativa y cuantitativa de los plaguicidas organoclorados.

Se realizó un estudio de calidad analítica adicionando a las muestras homogéneas 1 mL de la solución de hexano de los plaguicidas organoclorados. Las muestras fortificadas se mezclaron y se dejaron reposar en el refrigerador (+ 8 °C) durante 16 horas, para permitir que los plaguicidas reaccionaran con el contenido de las plantas, similar a los procesos que ocurren en el ambiente agrícola. Durante el análisis no se observaron diferencias significativas en la imagen cromatográfica entre las muestras de zanahoria, de papa y de plantas de maíz. Los valores obtenidos de la recuperación en 10 repeticiones, su desviación estándar y varianza se resumen en la **tabla III**.

TABLA III. NIVEL DE FORTIFICACIÓN Y LÍMITE DE DETECCIÓN (mg/kg), PROMEDIO (\bar{X}), DESVIACIÓN ESTÁNDAR (DE) VARIANZA (V%) DE LA ADICIÓN DE ESTÁNDARES DE PLAGUICIDAS ORGANOCOLORADOS A MUESTRAS DE ZANAHORIAS, PAPAS Y PLANTAS DE MAÍZ

Plaguicida	Nivel de fortificación	Límite de detección	Zanahorias			Papas			Plantas de maíz		
			\bar{X} %	± DE	V	\bar{X} %	± DE	V%	\bar{X} %	± DE	V%
HCB	0.007	0.001	96.8 ±	2.8	3.2	88.9 ±	5.2	5.8	96.7 ±	2.4	2.7
α-HCH	0.007	0.001	94.5 ±	3.2	3.7	92.8 ±	3.7	4.5	98.7 ±	2.8	3.2
β-HCH	0.010	0.002	92.8 ±	6.3	7.6	94.3 ±	5.3	6.2	93.1 ±	4.8	6.1
γ-HCH	0.010	0.002	93.7 ±	4.8	6.1	95.3 ±	3.7	4.3	97.0 ±	1.5	1.6
Heptacloro	0.038	0.007	94.3 ±	5.4	6.2	94.7 ±	4.2	4.9	92.1 ±	4.3	4.9
Epóxido de heptacloro	0.025	0.005	96.8 ±	3.9	4.7	91.8 ±	4.9	5.6	94.2 ±	5.8	6.9
Aldrín	0.025	0.005	94.7 ±	3.8	4.5	95.3 ±	3.1	3.5	96.2 ±	3.0	3.4
pp'DDE	0.030	0.005	91.8 ±	4.2	5.0	96.7 ±	3.9	4.7	95.9 ±	3.6	4.2
op'DDT	0.039	0.010	90.3 ±	6.3	7.2	93.2 ±	4.0	4.6	91.7 ±	5.2	5.9
pp'DDT	0.050	0.015	90.8 ±	5.8	7.0	91.0 ±	3.1	3.5	92.1 ±	4.8	5.7

Muestras secas: paja, granos, mezclas de alimentos para engorda, tabaco

Se pesaron 10 gramos de muestra (Waliszewski *et al.* 1985, Waliszewski y Szymczynski 1986, Waliszewski e Infanzón 2003), en un matraz Erlenmeyer (250 mL) y se le agregaron 150 mL de una mezcla de acetonitrilo-agua (65:35). La muestra se dejó reposar durante 16 horas en la oscuridad. El contenido se homogeneizó en un aparato Ultra-turrax durante 3 minutos. El sobrenadante se decantó pasándolo a un matraz de separación (1000 mL). El proceso de extracción se repitió dos veces más, con adición de 100 mL de la mezcla de acetonitrilo-agua. A los extractos se les agregaron 500 mL de una solución acuosa de sulfato de sodio al 5 % y se mezclaron. Los plaguicidas organoclorados se extrajeron con 3 porciones de 100 mL de hexano. Los extractos de hexano se secaron pasándolos por una capa de sulfato de sodio y se concentraron en un rotavapor a un volumen aproximado de 5 mL. El extracto concentrado se traspasó cuantitativamente con hexano a un tubo con tapón ajustando el volumen a 10 mL. El extracto se purificó agregando 1 mL de ácido sulfúrico concentrado y se agitó vigorosamente durante 1 minuto. Se dejó reposar por 3 minutos para separar las fases y se filtró la fase orgánica a través de una capa de sulfato de sodio. Se enjuagó el sulfato de sodio con hexano y el extracto con los enjuagues recolectados en un matraz de fondo redondo se concentraron a unas gotas. El extracto se transfirió a un vial volumétrico aforando el volumen final a 1 mL con hexano.

Para la purificación de los extractos de las muestras secas de paja, granos, mezclas de alimentos para engorda y tabaco se utilizó ácido sulfúrico, cuya ventaja consiste en precipitar las sustancias orgánicas vegetales e hidrolizar el complejo de plaguicidas con los compuestos orgánicos endógenos (Waliszewski y Szymczynski 1982, 1983) proporcionando un cromato-

grama limpio de interferencias y la recuperación cuantitativa de los plaguicidas presentes.

Se realizó un estudio de calidad analítica adicionando 1 mL de la solución de hexano de los plaguicidas organoclorados a las muestras homogéneas de paja, granos, mezclas de alimentos para engorda y tabaco. Las muestras fortificadas se mezclaron y se dejaron reposar en condiciones ambientales durante 1 hora, para permitir que los plaguicidas reaccionaran con el contenido de las mismas similar a los procesos que ocurren en el ambiente agrícola. Los resultados del estudio de recuperación, repetidos en 10 muestras, se presentan en la **tabla IV**.

Tejidos adiposos humano y bovino, mantequilla, leche materna y leche de vaca

La muestra de leche materna o leche de vaca se centrifugó para separar la grasa. La muestra de aproximadamente 2 g de grasa de tejido adiposo humano o bovino, mantequilla o grasa de leche materna o vaca (Waliszewski y Szymczynski 1982, Waliszewski *et al.* 2003a, b), se colocó en un mortero y se trituró con suficiente cantidad de sulfato de sodio hasta obtener un polvo seco y homogéneo. Este procedimiento se realizó para absorber los restos de agua y aumentar la superficie de contacto con el disolvente. La muestra se pasó a una columna cromatográfica de 1 cm di y 50 cm de longitud, con un disco poroso de cristal o un tapón de fibra de vidrio y un receptáculo para su retención. La muestra en la columna se compactó, eliminando las burbujas de aire. Las grasas de la muestra que contenía los residuos disueltos de plaguicidas organoclorados se extrajeron con 100 mL de hexano a un flujo de 3 mL/min. El eluato se concentró hasta aproximadamente 30 mL en un rotavapor con temperatura del baño de agua de 40 °C. El extracto concentrado se dejó reposar media hora a temperatura ambiente. Se tomaron 10 mL del extracto y se transfirieron

TABLAIV. NIVEL DE FORTIFICACIÓN Y LÍMITE DE DETECCIÓN (mg/kg), PROMEDIO (\bar{X}), DESVIACIÓN ESTÁNDAR (DE) Y VARIANZA (V%) DE LA ADICIÓN DE ESTÁNDARES DE PLAGUICIDAS ORGANOCOLORADOS A MUESTRAS DE GRANOS, PAJA Y TABACO

Plaguicida	Nivel de fortificación	Límite de detección	Granos			Paja			Tabaco		
			\bar{X} %	± DE	V%	\bar{X} %	± DE	V%	\bar{X} %	± DE	V%
HCB	0.007	0.001	96.8 ± 2.8	3.2	88.9 ± 5.2	5.8	96.1 ± 2.8	2.9			
α-HCH	0.007	0.001	94.5 ± 3.2	3.7	92.8 ± 3.7	4.5	98.2 ± 2.7	2.7			
β-HCH	0.010	0.002	92.8 ± 6.3	7.6	94.3 ± 5.3	6.2	92.9 ± 5.7	5.3			
γ-HCH	0.010	0.002	93.7 ± 4.8	6.1	95.3 ± 3.7	4.3	96.2 ± 3.8	3.7			
Heptacoloro	0.038	0.007	94.3 ± 5.4	6.2	94.7 ± 4.2	4.9	91.6 ± 3.8	4.5			
Epóxido de heptacoloro	0.025	0.005	96.8 ± 3.9	4.7	91.8 ± 4.9	5.6	92.7 ± 6.4	6.6			
Aldrín	0.025	0.005	94.7 ± 3.8	4.5	95.3 ± 3.1	3.5	93.3 ± 5.2	6.0			
pp'DDE	0.030	0.005	91.8 ± 4.2	5.0	96.7 ± 3.9	4.7	96.6 ± 1.5	1.4			
op'DDT	0.039	0.010	90.3 ± 6.3	7.2	93.2 ± 4.0	4.6	96.5 ± 1.6	1.5			
pp'DDT	0.050	0.015	90.8 ± 5.8	7.0	91.0 ± 3.1	3.5	98.5 ± 0.5	0.5			

ron a un matraz de 50 mL, previamente pesado. El contenido del matraz se evaporó en un rotavapor a sequedad para eliminar el disolvente y se determinó por diferencia de peso la cantidad de sustancias no volátiles consideradas como grasa. Se tomaron otros 10 mL del extracto original y se transfirieron cuantitativamente a un tubo de ensayo con tapón de teflón, se agregó 1 mL de ácido sulfúrico concentrado para precipitar las grasas. El contenido se agitó vigorosamente durante un minuto y se dejó reposar 3 minutos para obtener una buena separación de las fases. El extracto purificado se secó, pasándolo por una capa de sulfato de sodio y se concentró en el rotavapor hasta unas gotas. El extracto concentrado se pasó cuantitativamente a un vial de 1 mL aforándolo a un volumen final de 1 mL. Se inyectó 1 µL del extracto y se procedió a hacer los análisis cualitativo y cuantitativo de los plaguicidas organoclorados por cromatografía de gases con detección por captura de electrones.

Se realizó un estudio de calidad analítica con 10

repeticiones, adicionando 1 mL de solución hexánica de los estándares a una muestra homogénea de tejido adiposo de bovino y a una muestra de grasa de leche de vaca, con residuos de plaguicidas organoclorados menores al nivel de detectabilidad. La muestra fortificada se mezcló y se dejó reposar en condiciones ambientales durante 1 hora para someter a los plaguicidas a las reacciones con el contenido de la misma. Los resultados del estudio de recuperación se presentan en la **tabla V**.

Flúidos fisiológicos: suero sanguíneo, semen

La muestra de sangre tomada sin anticoagulante se dejó coagular. Se centrifugó para separar los elementos celulares del suero. Se pesó la cantidad de suero para medir el peso de la muestra. Se determinó la cantidad de lípidos para poder referir la concentración de los plaguicidas en base húmeda o lipídica. La muestra de semen se pasó a un tubo y se pesó en la balanza analítica (Szymczynski y Waliszewski 1982, Walis-

TABLA V. NIVEL DE FORTIFICACIÓN Y LÍMITE DE DETECCIÓN (mg/kg), PROMEDIO (\bar{X}), DESVIACIÓN ESTÁNDAR (DE) Y VARIANZA (V%) DE LA ADICIÓN DE ESTÁNDARES DE PLAGUICIDAS ORGANOCOLORADOS A MUESTRAS DE TEJIDO ADIPOSITO DE BOVINO Y GRASA DE LECHE DE VACA

Plaguicida	Nivel de fortificación	Límite de detección	Tejido adiposo de bovino		Grasa de leche de vaca	
			\bar{X} %	± DE	V%	\bar{X} %
HCB	0.010	0.001	92.9 ± 7.1	7.4	94.7 ± 6.1	6.8
α-HCH	0.010	0.001	92.7 ± 6.9	7.1	95.3 ± 4.6	5.1
β-HCH	0.010	0.002	91.3 ± 8.2	7.9	92.7 ± 7.7	8.2
γ-HCH	0.010	0.002	93.9 ± 6.6	6.7	93.3 ± 4.7	5.1
Heptacoloro	0.038	0.007	95.1 ± 5.9	6.1	92.3 ± 5.3	5.4
Epóxido de heptacoloro	0.025	0.005	95.9 ± 4.8	5.0	92.7 ± 4.3	4.8
Aldrín	0.025	0.005	94.1 ± 4.6	4.9	96.1 ± 4.8	5.2
pp'DDE	0.020	0.002	94.3 ± 6.1	6.5	95.6 ± 4.9	4.7
op'DDT	0.020	0.002	97.2 ± 6.9	7.2	94.8 ± 6.4	6.6
pp'DDT	0.020	0.002	96.6 ± 6.7	7.0	93.7 ± 5.4	5.5

zewski y Szymczynski 1983). La muestra de suero o de semen de aproximadamente 5 mL, se pasó a un tubo de 25 mL con tapón de teflón y se le agregó el ácido acético concentrado en proporción 1:1 (Waliszewski y Szymczynski 1991). La muestra se dejó reposar durante 30 minutos para permitir los procesos de hidrólisis y de liberación de los plaguicidas enlazados en los complejos con las sustancias endógenas. Posteriormente, los plaguicidas organoclorados se extrajeron con tres porciones de 10 mL de una mezcla hexano y acetona (9:1). Los tres extractos se colectaron en un embudo de separación de 100 mL y el contenido se lavó con dos porciones de 25 mL de agua destilada para remover las trazas de ácido acético, acetona y sustancias hidrosolubles. La fase orgánica se secó pasándola por una capa del sulfato de sodio a un matraz de fondo redondo. El extracto se concentró hasta aproximadamente 10 mL en el rotavapor y se traspasó a un tubo con tapón de teflón. Al extracto concentrado se le agregó 1 mL de ácido sulfúrico concentrado. El contenido se agitó vigorosamente para precipitar las grasas y destruir los compuestos orgánicos endógenos. Se dejó reposar por 3 minutos para obtener una buena separación de las fases y se filtró por una capa de sulfato de sodio. El extracto purificado con los enjuagues se recolectó en un matraz de fondo redondo y se concentró en el rotavapor hasta unas gotas. El extracto concentrado se pasó cuantitativamente a un vial de 1 mL para aforarlo a un volumen final de 1 mL. Se inyectó 1 μ L del extracto al cromatógrafo de gases para proceder a los análisis cualitativo y cuantitativo de los plaguicidas organoclorados.

Se realizó el estudio de calidad analítica con una muestra homogénea de suero sanguíneo de bovino que contenía residuos mínimos de plaguicidas organoclorados, menores al límite de detección. A ésta, se le agregó 1 mL de la solución de hexano de los plaguicidas organoclorados. La muestra fortificada se mezcló y se dejó reposar durante 16 horas en el refrigerador a 8 °C para permitir las reacciones con el contenido de las mismas. Los resultados del estudio de recuperación, realizado en 10 repeticiones, se presentan en la **tabla VI**.

Capacidad del ácido sulfúrico concentrado para eliminar las grasas

Para determinar la capacidad purificadora del ácido sulfúrico concentrado comparado con la capacidad de adsorción del florisil, óxido de aluminio y kieselgel en las muestras ricas en grasas (grasa de leche y tejido adiposo) se realizó, en 10 repeticiones, la determinación gravimétrica de la cantidad de sustancias no volátiles presentes en el extracto purificado (eluato). Los resultados se presentan a continuación:

1. Se trató con 1 mL de ácido sulfúrico el extracto que contiene los 500 mg de grasa de bovino disueltos en 10 mL de hexano. En el extracto purificado se determinó graviméricamente la cantidad de sustancias no volátiles. Se obtuvieron valores promedio y su desviación estándar de 8 ± 5 mg (Waliszewski 1990a).
2. Los 500 mg de la misma muestra de grasa, se purificaron pasándolos por la columna cromatográfica con 10 g de florisil, activado durante 16 horas a 130 °C (Waliszewski 1990b). El florisil en la columna fue desactivado pasando 25 mL de una mezcla de 30 % de éter etílico en éter de petróleo y después para estabilizar el adsorbente, se pasaron 20 mL de éter de petróleo. A la columna se le agregó 1 mL del extracto con 500 mg de grasa de bovino con una pipeta. Los plaguicidas organoclorados se recuperaron de la columna con 120 mL de la mezcla al 6 % de éter etílico en éter de petróleo. El eluato se evaporó a sequedad y se determinó graviméricamente la cantidad de sustancias no volátiles, obteniendo el valor promedio y su desviación estándar de 230 ± 45 mg (Szymczynski y Waliszewski 1983, Waliszewski y Szymczynski 1983).
3. Los 500 mg de la misma muestra de grasa de bovino se purificaron pasándolos por la columna cromatográfica con 10 g de Al_2O_3 básico Merck, activado durante 16 horas a 130 °C (Waliszewski 1990b). El Al_2O_3 en la columna fue desactivado pasando 25 mL de una mezcla de 30 % de éter etílico en éter de petróleo y después para estabilizar el adsorbente se pasaron 20 mL de éter de petróleo. A la columna se le adicionó 1 mL del extracto con 500 mg de grasa de bovino. Los plaguicidas organoclorados se recuperaron de la

TABLA VI. RESULTADOS DEL ESTUDIO DE ADICIÓN DE ESTÁNDARES DE PLAGUICIDAS ORGANOCORADOS A LAS MUESTRAS DE SUERO SANGUÍNEO DE BOVINO EN BASE LIPÍDICA

Plaguicida	Nivel de fortificación (mg/kg)	Límite de detección (mg/kg)	$\bar{X} \pm DE$	Varianza %
HCB	0.02	0.004	93.3 ± 4.7	4.9
α -HCH	0.02	0.004	94.5 ± 4.6	4.7
β -HCH	0.08	0.020	93.7 ± 4.4	4.4
γ -HCH	0.04	0.008	96.3 ± 4.8	5.1
Heptacloro	0.14	0.035	92.3 ± 5.2	5.5
Epóxido de heptacloro	0.08	0.015	96.3 ± 4.8	5.2
Aldrin	0.08	0.010	94.5 ± 3.7	4.1
pp'DDE	0.02	0.002	91.9 ± 7.3	7.6
op'DDT	0.03	0.003	90.1 ± 8.7	8.4
pp'DDT	0.03	0.003	91.1 ± 7.7	8.2

columna con 120 mL de la mezcla al 6 % de éter etílico en éter de petróleo. El eluato se evaporó a sequedad y se determinó gravimétricamente la cantidad de sustancias no volátiles obteniendo el resultado promedio y su desviación estándar de 260 ± 58 mg.

4. Los 500 mg de la misma muestra de grasa de bovino, se purificaron pasándolos por la columna cromatográfica con 10 g de kieselgel Merck, activado durante 16 horas a 130°C y posteriormente desactivado con 10 % de agua (Waliszewski 1990b). A la columna se le añadió 1 mL del extracto con 500 mg de grasa de bovino. Los plaguicidas organoclorados se recuperaron con 120 mL de una mezcla al 6 % de éter etílico en éter de petróleo. El eluato se evaporó a sequedad y se determinó gravimétricamente la cantidad de sustancias no volátiles obteniendo el resultado promedio y su desviación estándar de 305 ± 56 mg.

Estos estudios indican la incapacidad de los adsorbentes para retener cuantitativamente las grasas presentes en las muestras de tejido adiposo. Su presencia en el eluato concentrado origina una elevación permanente de la línea básica del detector de captura de electrones y el cubrimiento de la fuente radioactiva, que incapacita al cromatógrafo para cuantificar los plaguicidas. El ácido sulfúrico precipita casi cuantitativamente las grasas, eliminando las desventajas de los adsorbentes. Por esta razón, se excluyó a los adsorbentes y los disolventes necesarios para la recuperación de los plaguicidas. De este modo se obtuvo una significativa mejoría en la calidad de los extractos y la disminución del costo de un análisis.

REFERENCIAS

- Rüdel H. (1997). Volatilization of pesticides from soil and plant surfaces. *Chemosphere* 35, 143-152.
- Smith K.E.C., Thomas G.O. y Jones K.C. (2001). Seasonal and species differences in the air-pasture transfer of PAHs. *Environ. Sci. Technol.* 35, 2156-2165.
- Szymczynski G.A. y Waliszewski S.M. (1982). A method for the determination of chlorinated pesticides in human semen. *J. Androl.* 3, 149-150.
- Szymczynski G.A. y Waliszewski S.M. (1983). Chlorinated pesticide residues in testicular tissue samples. *Pesticides in human testicles.* *Andrologia* 15, 696-698.
- Waliszewski S.M. y Szymczynski G.A. (1982). Simple, low-cost method for determination of selected chlorinated pesticides in fat samples. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 65, 677-679.
- Waliszewski S.M. y Szymczynski G.A. (1983). Determination of selected chlorinated pesticides, bound and free in human semen. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 12, 577-580.
- Waliszewski S.M. y Szymczynski G.A. (1985). Inexpensive, precise method for the determination of chlorinated pesticide residues in soil. *J. Chromatogr.* 321, 480-483
- Waliszewski S.M., Szymczynski G.A. y Rogowska Z. (1985). Rapid and low-cost method for monitoring of selected chlorinated pesticides in feed mixtures. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 34, 518-526.
- Waliszewski S.M. y Szymczynski G.A. (1986). Determination of chlorinated pesticides in tobacco. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 36, 230-233.
- Waliszewski S.M. (1990a). Some gains from the use of sulfuric acid in the determination of persistent organochlorine pesticide residues. M. Mansour, (Ed.) *Proceedings of International 3rd Workshop on Study and prediction of pesticides behaviour in soils, plants and aquatic systems*, Munich, Alemania, pp. 390-393.
- Waliszewski S.M. (1990b). Revisión bibliográfica de técnicas para determinación de pesticidas organofosforados. *Textos Universitarios*, Universidad Veracruzana, Xalapa, Ver. México.
- Waliszewski S.M. y Szymczynski G.A. (1991). Persistent organochlorine pesticides in blood serum and whole blood. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 46, 803-809.
- Waliszewski S.M. (1995). HCH isomers and HCB residues in root vegetables after the application of lindane (γ -HCH) to the soil. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 11, 13-19.
- Waliszewski S.M. e Infanzón R.M. (2003). Diferencias en concentración de plaguicidas organoclorados persistentes en suelo, paja y granos de trigo. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 19, 5-11
- Waliszewski S.M., Villalobos-Pietrini R., Gómez-Arroyo S. e Infanzón R.M. (2003a). Persistent organochlorine pesticide levels in cow's milk samples from tropical regions of Mexico. *Food Additives and Contam.* 20, 270-275.
- Waliszewski S.M., Villalobos-Pietrini R., Gómez-Arroyo S. e Infanzón R.M. (2003b). Persistent organochlorine pesticides in Mexican butter. *Food Additives and Contam.* 20, 361-367.