APLICACIÓN DE LA ESPECTROSCOPIA RAMAN PARA LA CARACTERIZACIÓN DE PESTICIDAS ORGÁNICOS

Roberto Y. SATO BERRÚ¹, Cirilo MEDINA GUTIÉRREZ¹, Jorge MEDINA VALTIERRA¹,² y Claudio FRAUSTO REYES¹

¹Centro de Investigaciones en Óptica, A.C., Unidad Aguascalientes, Prol. Constitución 607, Reserva Loma Bonita, C.P. 20200, Aguascalientes, México. Correo electrónico: rsato@foton.cio.mx ²DIQ, I. Tecnológico de Aguascalientes, Av. A. López Mateos No. 1801, Aguascalientes 20256, Ags.

(Recibido noviembre 2002, aceptado noviembre 2003)

Palabras clave: espectroscopia Raman, pesticidas, tomate, β -caroteno

RESUMEN

Se presentan los espectros Raman de varios pesticidas, clasificados como organofosforados, organoclorados y bipiridilos, que han sido adecuadamente obtenidos mediante la técnica de espectroscopia Raman en el infrarrojo cercano. Los pesticidas han sido analizados como sólidos o líquidos en viales de vidrio y sobre sustratos de aluminio. Se muestra que esta técnica analítica es una herramienta alterna para la detección de pesticidas en la agricultura y muestra ventajas por ser rápida, no destructora, y además requiere de poca o ninguna preparación de la muestra. Las muestras pueden ser analizadas a través de recipientes transparentes evitando todo contacto con las sustancias tóxicas. La implementación del sustrato de aluminio resulta fácil y práctica. Este material está disponible comercialmente y no requiere de preparación previa. Se analiza una mezcla de dos pesticidas en una solución que contiene β -caroteno, extraído de la cáscara de tomate.

Key words: Raman spectroscopy, pesticides, tomato, β -carotene

ABSTRACT

Raman spectra of organophosphate, organochlorine and bipyriday pesticides are presented in this study. They have been obtained satisfactorily by the NIR-Raman spectroscopy technique. Pesticides have been analyzed in solution or as a solid in glass containers and on aluminum substrates. This analytic technique can be an alternative tool for the detection of pesticides in the agriculture, presenting advantages as be quick, not destructive and require little or no sample preparation. Moreover, samples can be analyzed through transparent containers avoiding contact with the toxic substances. The implementation of the aluminum substrate is easy and practical. Moreover, it is commercially available and does not need a previous preparation. The analysis of a mixture of two pesticides in a β -carotene solution is shown.

INTRODUCCIÓN

La información molecular que proporciona la espectroscopia Raman es básicamente del mismo tipo que la obtenida con la espectroscopia infrarroja (Herzberg 1991). Las dos técnicas se complementan y

proporcionan información acerca de las vibraciones moleculares, las que pueden usarse para los análisis cualitativo y cuantitativo de muestras orgánicas (Olsen 1990).

Cuando un haz de luz incide sobre un conjunto de moléculas una cantidad pequeña de esta radiación (~1 en 10⁷ fotones) es esparcida inelásticamente a frecuen-

cias ópticas mayores o menores que la frecuencia de los fotones incidentes. El proceso que conlleva este esparcimiento inelástico es conocido como efecto Raman. La diferencia de energía entre el fotón incidente y el fotón Raman-esparcido es igual a la energía de una vibración de la molécula (Ferraro y Nakamoto 1994). Un espectro Raman es una gráfica de la intensidad de la luz esparcida versus la diferencia de energía.

Cuando una molécula es excitada sus enlaces pueden vibrar de diferentes modos. Así, la energía de un modo vibracional depende de la estructura molecular y su ambiente. La masa atómica, el orden del enlace, los sustitutos moleculares, la geometría molecular y todos los enlaces de hidrógeno afectan la constante de fuerza vibracional, que a su vez determina la energía vibracional (Nakamoto 1997). La espectroscopia Raman vibracional, en este amplio sentido, es una técnica extremadamente versátil que se usa en el seguimiento y en el control de varios fenómenos que están enmarcados en disciplinas como química, física y ciencia de los materiales (Turrel y Corset 1996).

El problema de la contaminación ambiental es uno de los temas de interés en la actualidad (Clement *et al.* 1999). La contaminación orgánica es la más importante en magnitud y sus principales fuentes son de origen doméstico, industrial, agrícola y ganadero. Los pesticidas, entre los compuestos orgánicos, representan una gran amenaza al ambiente. Estos se presentan en una gran variedad de sustancias, como por ejemplo: insecticidas, fungicidas, acaricidas, herbicidas, rodenticidas, etc.

Aunque los pesticidas han sido diseñados para ofrecer una especificidad de acción alta, su empleo genera innumerables efectos indeseados como la generación de organismos resistentes, la persistencia ambiental de residuos tóxicos y la contaminación de recursos hídricos con degradación de la flora y fauna (Rea 1996). La contaminación de los cursos de agua se produce en forma directa por la aplicación de pesticidas en las aguas (arrozales) y por descarga de remanentes y residuos. Las aguas contaminadas distribuyen el agente tóxico a la flora y fauna produciendo la muerte de especies, el aumento de la intoxicación humana (Tuormaa 1995), la pérdida del curso de agua como recurso utilizable y la probable contaminación de las reservas hídricas (acuíferos). La persistencia de estos agentes (resistencia química a la degradación) favorece la contaminación de las aguas, su incorporación a suelos, vegetales y animales comestibles, que al ser consumidos actúan como transportadores de los pesticidas facilitando su acumulación en los organismos.

Las diferentes clases de pesticidas son analizadas por diversas técnicas como cromatografía de gases (GC), cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), entre otras (McGarvey 1993, Sherma 1993, Pérez *et al.* 2000, Adou *et al.* 2001) y cada técnica cuenta con el acopla-

miento de algún nuevo sistema para la detección de un determinado conjunto de pesticidas (León-González *et al.* 1991, Carabias *et al.* 1992, Johnson *et al.* 1997). En dichas técnicas se requiere un tiempo considerable para el análisis de las sustancias.

La espectroscopia Raman tiene un amplio rango de aplicaciones y permite determinar muchas sustancias, ya sean sólidos, líquidos o gases (Mulvaney y Keating 2000). Por otra parte, la técnica SERS (Surface Enhanced Raman Spectroscopy) ha ampliado el rango de estudios en la detección de sustancias orgánicas a bajas concentraciones, principalmente contaminantes (Vo-Dinh *et al.* 1984, Carrabba *et al.* 1987, Garrel 1989).

A mediados de 2002 en este Centro de Investigación, se inició un estudio sobre la detección de pesticidas utilizados en la agricultura. En este trabajo se aplicó la técnica de espectroscopia Raman para implementar un método de análisis rápido, fácil y eficiente para detectar y posteriormente cuantificar vestigios de pesticidas orgánicos presentes en frutas y vegetales.

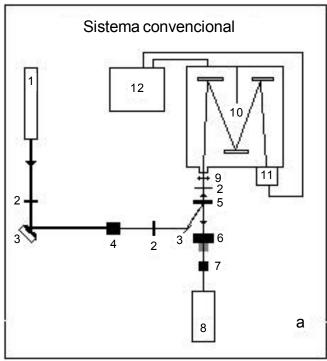
MATERIALES Y MÉTODOS

Equipos usados

Los pesticidas se analizaron con dos sistemas Raman. El primero es convencional y fue ensamblado en este laboratorio, consta de los siguientes elementos: un láser de HeNe (Melles Griot) como fuente de excitación, que tiene una línea de emisión en 632.8 nm y la potencia máxima es de 17 mW; un filtro de interferencia (Edmund Scientific-FWHM ±2 nm); un filtro holográfico (Super Notch-PlusTM); un monocromador Jobin-Yvon (modelo HR 460, con resolución espectral de 0.05 nm), con una rejilla de difracción de 1200 líneas/mm; una cámara CCD (256x1024 pixeles) enfriada por aire y el programa SpectraMax (Galactic). El segundo sistema es un espectrometro MicroRaman Renishaw, modelo 1000B, que está equipado con un diodo láser (Renishaw serie HPNIR) con excitación en 830 nm y una potencia máxima de 500 mW; un monocromador con una rejilla de 600 líneas/mm, resolución de 4 cm⁻¹; un filtro holográfico; una cámara CCD (RenCam) enfriada termoeléctricamente a −70 °C, con 576x384 pixeles; programa GRAMS/32 y tiene acoplado un microscopio Leica (modelo DMLM) con una cámara de video para la visualización de las muestras. En la figura 1 se muestran esquemáticamente los dos sistemas.

Muestras químicas

En este trabajo se utilizaron pesticidas de alta pureza, como paratión metílico 98.1 %, malatión 96.4 %, fentión 100 %, dibromuro monohidratado de diquat 99 %, dicloruro tetrahidratado de paraquat 98 %, certificados por AccuStandard (New Haven, EUA), dieldrina 98 %, lindano 99 % y el 4,4'-(dicloro-difenilo)dicloroetano



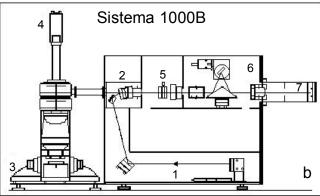


Fig. 1. a) Sistema convencional: (1) láser de He-Ne-632.8nm, (2) diafragmas, (3) espejos, (4) filtro de interferencia, (5) filtro notch, (6) objetivo de microscopio, 5X, (7) muestra con opción-6, (8) microscopio y muestra, (9) lente convergente, f = 50mm, (10) monocromador, (11) cámara CCD y (12) fuente de la CCD. b) Sistema 1000B: (1) haz laser-830nm, (2) filtro notch, (3) microscopio y muestra, (4) cámara de vídeo, (5) rendija, (6) monocromador y (7) cámara CCD

(DDD) 98.5 %, adquiridos de Chem Service (EUA). Los compuestos considerados se clasifican, desde el punto de vista químico, en organofosforados, organoclorados y bipiridilos y fueron suspendidos en metanol de grado cromatográfico (J.T Baker, México) a concentración de 1000 mg/L.

Los pesticidas fueron analizados con los dos sistemas Raman previamente calibrados a la línea Raman del silicio en 520 cm⁻¹. Se analizaron a través de los mismos viales de vidrio en los que fueron adquiridos comercialmente y se usaron sustratos de aluminio para

analizar las disoluciones de algunos ellos. Con respecto a la utilización del sustrato, se colocó una pequeña cantidad (~3 μL) de cada disolución sobre sustratos de aluminio (hoja de aluminio). Se permitió que la microgota se evaporara sobre el sustrato a temperatura ambiente (24 °C) dejando un anillo de residuo. Con el microscopio del equipo Raman, el haz láser se hizo incidir sobre un borde de este anillo residual y se enfocó con ayuda de los objetivos ópticos. La luz que esparce la muestra es colectada por el objetivo 50X y enviada al equipo Raman a través del sistema óptico. Los espectros son registrados mediante el programa de adquisición de datos cargado en una computadora.

Simulación de extracción y contaminación con pesticidas

Se realizó una extracción simple de cáscara de tomate usando metanol como disolvente. La cáscara de tomate, previamente secada a temperatura ambiente, se colocó en un vial de vidrio en contacto con metanol. Después de 24 horas se observó que el disolvente adquiere la coloración rojiza del tomate. Luego, se procedió a separar las dos fases, se desechó el material sólido y se colocó la fase líquida en otro vial. Este extracto sirvió como referencia en el análisis y además se tomó del mismo extracto 0.5 mL para ser contaminado con 0.5 mL de la solución de malatión y 0.2 mL de la solución de paratión metílico. Después de agitar brevemente las muestras, una pequeña porción de cada una de ellas se colocó en el sustrato de aluminio para su análisis en el sistema 1000B. Los espectros fueron obtenidos después de que el metanol se evaporó a temperatura ambiente.

RESULTADOS

En la **figura 2** se muestran los espectros Raman de dos pesticidas (paratión metílico y malatión) obtenidos en el sistema convencional con fuente de excitación en 632.8 nm; los tiempos de adquisición de datos fueron de 10 s y 5 s, respectivamente; la apertura de la rendija del monocromador fue de 1.0 mm y la potencia del haz láser sobre la muestra fue de ~10 mW.

Los espectros Raman de los compuestos químicos organofosforados (paratión metílico, malatión y fentión), organoclorados (dieldrina, DDD y lindano) y bipiridilos (diquat y paraquat) se muestran en las **figuras 3** a **6**. Todos estos espectros son de sustancias estándares y fueron obtenidos en el sistema 1000B con fuente de excitación en 830 nm; los tiempos de adquisición de datos fueron de 10 s; la apertura de la rendija del monocromador fue de 0.35 mm y la potencia del haz láser sobre la muestra fue de ~60 mW.

Algunos ejemplos de aplicación de la técnica Raman se presentan en el análisis de muestras vegetales, de

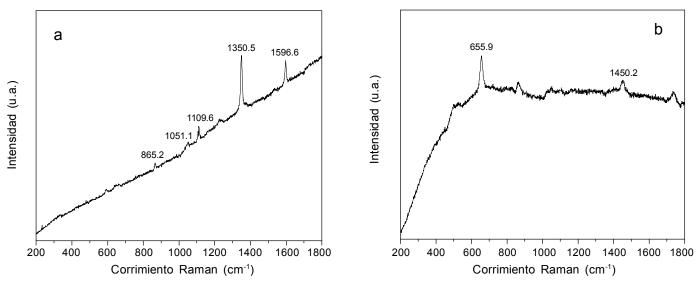
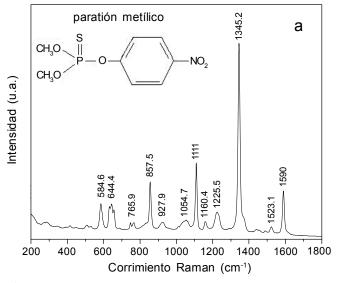


Fig. 2. Espectros Raman de paratión metílico (a) y malatión (b) obtenidos a través de viales de vidrio y con el sistema convencional (láser 632.8 nm)

suelos e inclusive de tejido adiposo de ser humano contaminados con pesticidas. Sin embargo, los detalles en cada técnica de extracción varían según el caso. En este trabajo se utilizó cascara de tomate para su análisis con la técnica Raman. El tratamiento de la muestra fue descrito anteriormente. El β -caroteno es un elemento constitutivo en toda sustancia orgánica y es uno de los responsables de las coloraciones en las frutas, verduras y hortalizas, además de ser el precursor de la vitamina A. En la **figura 7a** se observa el espectro Raman característico del β -caroteno (Tarabara *et al.* 1998), el cual fue obtenido al analizar una gota del extracto de referencia (no contaminado) sobre el sustrato en el sistema 1000B.

En la **figura 7b** se evidencia el espectro Raman del extracto de cáscara de tomate contaminado con dos pesticidas. En este espectro se notan los picos más intensos y característicos del paratión metílico (857, 1347 y 1590 cm⁻¹) y del malatión (655 cm⁻¹) conjuntamente con el espectro Raman del β -caroteno. Las mediciones se realizaron en las mismas condiciones experimentales. No se usó ninguna técnica adicional para concentrar en un volumen reducido a los pesticidas, aunque esto podría aumentar la sensibilidad del método analítico propuesto.

Como se puede apreciar en la **figura 7b** los picos característicos del β -caroteno son más intensos que los de los pesticidas, lo que ocasiona que estos últimos no se



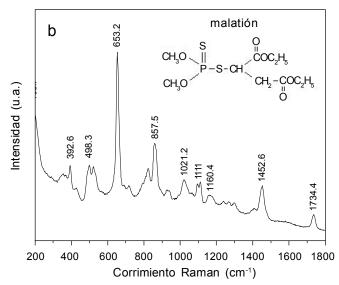


Fig. 3. Espectros Raman de paratión metílico (a) y malatión (b) obtenidos sobre substratos de aluminio y con el sistema infrarrojo (sistema 1000B)

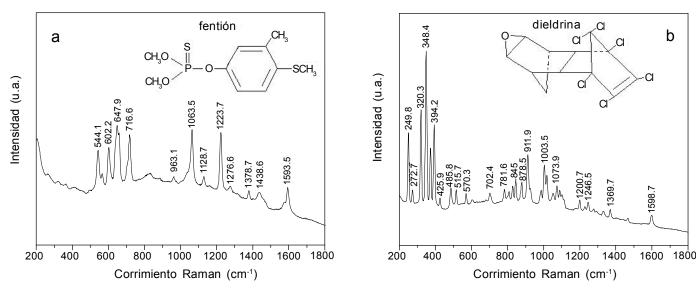


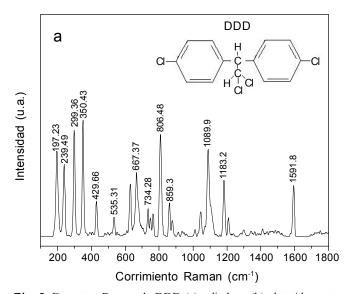
Fig. 4. Espectros Raman de fentión (a) y dieldrina (b) obtenidos sobre substratos de aluminio y con el sistema infrarrojo (sistema 1000B)

detecten con claridad. Para solucionar este problema, se realizó una sustracción de espectros y corrección de la línea base para disminuir o eliminar el espectro que se desee. Con estas correcciones propuestas y usando el programa del equipo se obtiene un espectro en el que se pueden apreciar con mayor definición los picos más intensos y característicos del paratión metílico y del malatión (**Fig. 8**).

DISCUSIÓN

Los espectros que se obtuvieron con el sistema convencional presentan un fondo de fluorescencia muy grande, lo cual ocasiona que la ganancia de la señal Raman sea muy pobre y en algunos pesticidas el fondo de fluorescencia cubre totalmente al espectro Raman (la fluorescencia es debida a la excitación y desexcitación de los niveles electrónicos). Estos mismos pesticidas se analizaron con el sistema NIR-Raman (sistema 1000B), en el cual la fluorescencia se reduce enormemente, obteniéndose los espectros con mayor definición. Sin embargo, ambos sistemas Raman se complementan en el análisis de diversas muestras.

Las moléculas con enlaces P=S presentan una banda intensa en la región de 600–700 cm⁻¹ (Colthup *et al.* 1990). Esta banda es claramente distinguible para compuestos sin anillos bencénicos, por ejemplo, el espectro



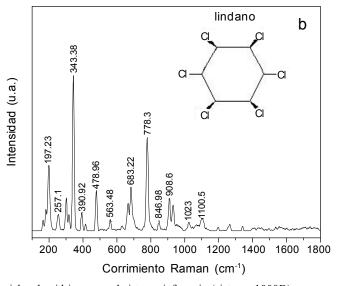
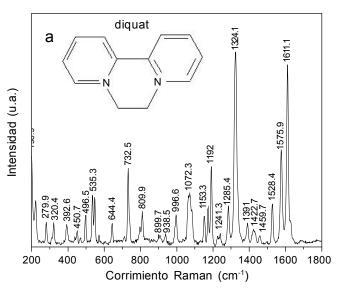


Fig. 5. Espectros Raman de DDD (a) y lindano (b) obtenidos a través de viales de vidrio y con el sistema infrarrojo (sistema 1000B)



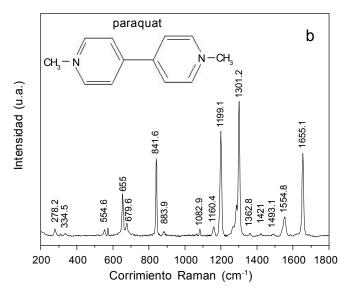
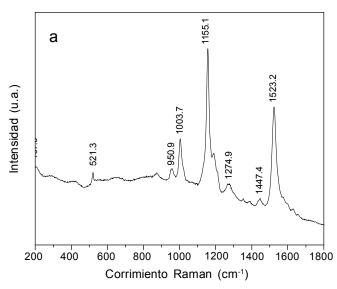


Fig. 6. Espectros Raman de diquat (a) y paraquat (b) obtenidos a través de viales de vidrio y con el sistema infrarrojo (sistema 1000B)

del malatión en la banda 653 cm⁻¹ (**Fig. 3b**). En cambio para moléculas que poseen estos anillos, la vibración de estrechamiento P=S es traslapada por las vibraciones del anillo; por ejemplo, los espectros del paratión metílico y del fentión en las bandas 644 y 648 cm⁻¹ (**Figs. 3a y 4a**), respectivamente. El grupo NO₂ que tiene el paratión metílico muestra una banda intensa en 1345 cm⁻¹ (**Fig. 3a**). Los espectros Raman de los pesticidas paratión metílico, diquat y paraquat han sido previamente reportados (Alak y Vo-Dinh 1987, Walker *et al.* 1998) y coinciden con los obtenidos en este trabajo.

En una serie de experimentos adicionales (no incluidos aquí), el paratión metílico fue diluido a diferentes concentraciones con metanol y analizado sobre el sustrato de aluminio. Nuevamente en el sistema NIR-Raman se realizó el análisis de cada concentración y se logró detectar el pico más intenso (1345 cm⁻¹) del espectro Raman del pesticida hasta una concentración de 5 mg/L (Sato *et al.* 2002).

La identificación de los picos característicos de los pesticidas, utilizados en este trabajo, en el espectro Raman del β -caroteno, es un primer paso en la investigación de detección de pesticidas en muestras vegetales. Posteriormente se estudiará la contaminación controlada en extractos de frutas, las recuperaciones de los pesticidas por técnicas de extracción y su análisis cuan-



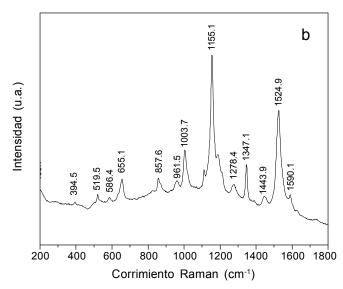


Fig. 7. a) Espectro Raman del β-caroteno. b) Espectro Raman del extracto de cáscara de tomate contaminado con malatión (banda en 655 cm⁻¹) y paratión metílico (bandas en 857, 1347 y 1590 cm⁻¹). Ambas muestras fueron analizadas sobre el sustrato de aluminio

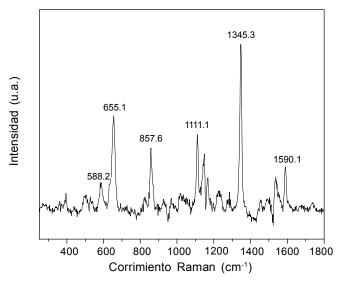


Fig. 8. Espectro Raman del extracto contaminado después de la sustracción del espectro Raman del β-caroteno y corrección de la línea base. Se observan con mayor definición las bandas características del malatión (655 cm⁻¹) y paratión metílico (857, 1111, 1345 y 1590 cm⁻¹)

titativo, y se aplicará un análisis estadístico en la interpretación de los resultados (Waliszewski *et al.* 2000).

CONCLUSIONES

Los espectros Raman obtenidos con el sistema convencional presentan una débil ganancia de la señal Raman en comparación con el sistema 1000B (NIR-Raman), en la cual se obtiene una mejor resolución para estos espectros. La espectroscopia Raman es una herramienta alterna para la detección de una gran variedad de pesticidas presentes en diversas matrices como en vegetales, frutas, agua y otros. Esta técnica tiene varias ventajas sobre algunas de las técnicas clásicas, no necesita grandes volúmenes de disolventes y la obtención de los resultados es relativamente rápida. En los espectros Raman registrados aquí, el tiempo de obtención de cada espectro fue de aproximadamente 60 s en el sistema 1000B y de 2 minutos en el sistema convencional. No se necesita demasiada manipulación de sustancias tóxicas, evitando todo contacto con ellas, y se pueden analizar a través del vidrio de un vial o sobre un sustrato. El sustrato utilizado en este trabajo es muy fácil de implementar, se encuentra disponible comercialmente y no requiere de ninguna preparación previa, esto en comparación con los sustratos utilizados en la técnica SERS que requieren de un método sofisticado de preparación. El análisis del paratión metílico en diversas concentraciones, da una idea del límite de detección que se puede alcanzar con el uso del sustrato de aluminio en el equipo Raman que se utilizó; este límite puede ser mejorado con la implementación de nuevos sustratos y de la técnica SERS.

Los resultados obtenidos para los pesticidas aquí considerados demuestran que las bandas Raman son fácilmente discernibles y que cada espectro Raman individual puede servir como una huella digital para cada compuesto. Es de notar que uno o unos pocos picos característicos son suficientes para proporcionar identificación espectral de un compuesto químico.

AGRADECIMIENTOS

R.Y. Sato agradece al Centro Latino-Americano de Física (CLAF) por el apoyo económico para los estudios de doctorado en el Centro de Investigaciones en Óptica.

REFERENCIAS

Adou K., Bontoyan W.R. y Sweeney P.J. (2001). Multiresidue method for the analysis of pesticide residues in fruits and vegetables by accelerated solvent extraction and capillary gas chromatography. J. Agric. Food Chem. 49, 4153-4160.

Alak A.M. y Vo-Dinh T. (1987). Surface-enhanced Raman spectrometry of organophosphorus chemical agents. Anal. Chem. 59, 2149-2153.

Carabias R., Rodriguez E., Amigo M.J. y Hernandez J. (1992). Sensitive method for the determination of organophosphorus pesticides in fruits and surface waters by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. J. Chromatogr. 607, 37-45.

Carrabba M.M., Edmonds R.B. y Rauh R.D. (1987). Feasibility studies for the detection of organic surface and subsurface water contaminants by surface-enhanced Raman spectroscopy on silver electrodes. Anal. Chem. 59, 2559-2563.

Clement R.E., Yang P.W. y Koester C.J. (1999). Environmental analysis. Anal. Chem. 71, 257R-292R.

Colthup N.B., Daly L.H. y Wiberly S.E. (1990). *Introduction to infrared and Raman spectroscopy*. Academic Press, San Diego, California, 368 p.

Ferraro J. y Nakamoto K. (1994). *Introductory Raman spectroscopy*, Academic Press, San Diego, California, 11 p. Garrell R.L (1989). Surface-enhanced Raman spectroscopy. Anal. Chem. 61, 401A-411A.

Herzberg G. (1991). *Molecular spectra and molecular structure. Infrared and Raman spectra of polyatomic molecules*, Krieger, Malabar, Florida, Vol. 2, 239 p.

Johnson P.D., Rimmer D.A. y Brown R.H. (1997). Adaptation and application of a multi-residue method for the determination of a range of pesticides, including phenoxy acid herbicides in vegetation, ased on high-resolution gel permeation chromatographic clean-up and gas chromatographic analysis with mass-selective detection. J.

- Chromatogr. A. 765, 3-11.
- León-González M.E. y Townshend A. (1991). Determination of organophosphorus and carbamate pesticide standards by liquid chromatography with detection by inhibition of inmobilized acetylcholinesterase. J. Chromatogr. 539, 47-54.
- McGarvey B.D. (1993). High-performance liquid chromatographic methods for the determination N-methylcarbamate pesticides in water, soil, plants and air. J. Chromatogr. 642, 89-105.
- Mulvaney S.P. y Keating C.D. (2000). Raman spectroscopy. Anal. Chem. 72, 145R-157R.
- Nakamoto K. (1997). Infrared and Raman spectra of inorganic and coordination compounds. part A: Theory and applications in inorganic chemistry, Wiley, Nueva York, 13 p.
- Olsen E.D. (1990). *Métodos ópticos de análisis*, Reverté, Barcelona, 333 p.
- Pérez M., Alario J., Vazquez A. y Villén J. (2000). Pesticide residue analysis by off-line SPE and on-line reversed-phase LC-GC using the through-oven-transfer adsorption/desorption interface. Anal. Chem. 72, 846-852.
- Rea W.J. (1996). Pesticides. J. Nutritional & Environmental Medicine, 6, 55-125.
- Sato R.Y., Medina C., Frausto F. y Medina J. (2002). Detección de pesticidas por espectroscopia NIR-Raman, XLV Con-

- greso Nacional de Física, León, Gto., México. 28 de Oct. 01 Nov. 2002.
- Sherma J. (1993). Pesticides. Anal. Chem. 65, 40R-54R.
- Tarabara V.V., Nabiev I.R. y Feofanov A.V. (1998). Surface-enhanced Raman scattering (SERS) study of mercaptoethanol monolayer assemblies on silver citrate hydrosol. Preparation and characterization of modified hydrosol as a SERS-active substrate. Langmuir 14, 1092-1098.
- Tuormaa T.E. (1995). Adverse effects of agrochemicals on reproduction and health: a brief review from the literature, J. Nutritional & Environmental Medicine, 5, 353-367.
- Turrel G. y Corset J. (1996). *Raman microscopy. Developments and applications*, Academic Press, San Diego, California, 243 p.
- Vo-Dinh T., Hiromoyo M.Y.K., Begun GM. y Moody R.L. (1984). Surface-enhanced Raman spectrometry for trace organic analysis. Anal. Chem. 56, 1667-1670.
- Waliszewski S.M., Aguirre-Gutiérrez A.A. e Infanzón-Ruiz R.M. (2000). Tendencia de 1988 a 1998 de los niveles de plaguicidas organoclorados persistentes en tejido adiposo humano en Veracruz, México. Rev. Int. Contam. Ambient. 16, 13-18.
- Walker P.A., Morris M.D., Burns M.A. y Johnson B.N. (1998). Isotachophoretic separations on a microchip. Normal Raman spectroscopy detection. Anal. Chem. 70, 3766-3769.