

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA
ESCUELA DE POSTGRADO
MAESTRÍA EN QUÍMICA DEL MEDIO AMBIENTE



“DETERMINACIÓN DE CLORPIRIFOS EN LECHE DE VACUNO POR
VOLTAMPEROMETRÍA, HPLC Y GC-MS Y SU ALTERNATIVA DE
REMOCIÓN CON MICORRIZAS ARBUSCULARES,
AREQUIPA-2012”

Tesis presentado por la bachiller:

JEANETH MARISOL MEDINA PÉREZ

Para optar al título de:
Magister en Química del Medio Ambiente

Arequipa-Perú
2014

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN.....	5
HIPÓTESIS	8
OBJETIVOS	9
CAPÍTULO I	
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
1. Preparación del estándar secundario de Clorpirifos.....	10
2. Tratamiento de muestras.....	18
3. Validación método de determinación de Clorpirifos por GC-MS.....	19
Linealidad.....	20
Precisión.....	21
Exactitud.....	22
Límites de cuantificación y detección LDQ, LDD.....	23
4. Validación método de determinación de Clorpirifos por HLPC.....	24
Linealidad.....	26
Precisión.....	27
Exactitud.....	28
Límites de cuantificación y detección LDQ, LDD.....	28
5. Validación método de determinación de Clorpirifos por Voltamperometría.....	30
Linealidad.....	33
Precisión.....	34
Exactitud.....	35
Límites de cuantificación y detección LDQ, LDD.....	35
6. Determinación de los niveles de Clorpirifos en leche de vacuno.....	36
Preparación de la muestra.....	37
7. Remoción de Clorpirifos con micorrizas.....	39
Aislamiento de esporas de hongos micorrizídicos arbusculares.....	39
Pruebas de remoción.....	41

CONCLUSIONES.....	45
RECOMENDACIONES	46
REFERENCIAS	47
ANEXO 1 (Plan de tesis)	55
ANEXO 2.....	130





RESUMEN

Los sistemas de producción agrícolas tradicionales en el Perú han estado acompañados del uso indiscriminado de plaguicidas altamente tóxicos como organofosforados y organoclorados, lo que ha llevado a la contaminación de los recursos naturales y al deterioro de los ecosistemas y de la calidad de la vida de las personas.

El presente trabajo busca proporcionar más de una alternativa para la cuantificación de pesticidas organofosforados (Clorpirifos) en un producto pecuario (leche de vacuno) que se expende en la ciudad de Arequipa, dada la carencia de un control de este producto, para así asegurar la inocuidad de dicho alimento y justificar la necesidad de alternativas para la remoción de este tipo de compuestos.

Los tres métodos para la determinación de Clorpirifos (CP): HPLC, GC-MS y Voltamperometría, fueron validados mostrando ser lineales, exactos, precisos, con límites de detección de 0.0532, 0.0036 y 0.5856 mg.L⁻¹ y de cuantificación de 0.0722, 0.0095 y 1.2251 mg.L⁻¹ para GC, Voltamperometría y HPLC respectivamente, para estas validaciones se preparó un estándar secundario a partir de un primario el cual contenía una concentración de 315.61 mg.L⁻¹ de Clorpirifos.

Se recolectaron muestras de leche fresca expendida en distintos mercados de la ciudad de Arequipa (11 en total) una vez por mes durante los meses de Marzo, Abril y Mayo del año 2012; por cada punto de muestreo se tomaron 3 muestras las que fueron inmediatamente transportadas al laboratorio donde fueron homogenizadas para tomar 1 mL de ellas y hacer la determinación de Clorpirifos previo tratamiento de la muestra con extracción líquida y una fase de *clean-up* con cartuchos de SPE florisil.

Las muestras de los 11 mercados de Arequipa tomados como puntos de muestreo mostraron concentraciones de Clorpirifos de 0.0184 ± 0.016 , 0.0317 ± 0.0127 y 0.0339 ± 0.0072 mg.L⁻¹ para los meses de Marzo, Abril y Mayo, respectivamente habiendo variaciones de concentraciones, que en el caso de Abril y Mayo exceden el límite de 0.020 mg.L⁻¹ de Clorpirifos en leche de vacuno establecido por el *Codex alimentarius*, habiendo 7 muestras en las que la concentración fue no detectable.

Se probó la remoción *in vitro* de Clorpirifos con el uso de micorrizas arbusculares, mostrando hasta un 67.5 % de remoción del pesticida tras 60 horas en agitación constante en el grupo mantenido a 25±/- 1 °C, y un 55.28 % de remoción para el grupo mantenido a temperatura ambiente.

Palabras Clave: Clorpirifos, HPLC, GC-MS, Voltamperometría, Leche, Micorrizas Arbusculares.

ABSTRACT

The traditional agricultural production systems in Peru have been accompanied by the indiscriminate use of highly toxic pesticides such as organophosphates and organochlorines, which has led to the pollution of natural resources and the degradation of ecosystems and the quality of life of people.

This study aims to provide more of an alternative for the quantification of organophosphorus pesticides (Chlorpyrifos) in livestock products (milk cows) that is sold in the city of Arequipa, given the lack of a control product, thus ensuring the that food safety and justify the need for alternatives to the removal of these compounds.

The three methods for the determination of Chlorpyrifos (CP): HPLC, GC-MS and Voltammetry were validated showing be linear, accurate, precise, with detection limits of 0.0532, 0.0036 and 0.5856 mg.L⁻¹ and quantification of 0.0722, 0.0095 and 1.2251 mg.L⁻¹ for GC, HPLC and Voltammetry respectively, for these validations was prepared a secondary standard from a parent which contained a concentration of 315.61 mg L⁻¹ of Chlorpyrifos.

Samples of fresh milk expended were collected in different markets of the city (11 in total) once per month during the months of March, April and May of 2012, for each sampling point 3 samples were taken which were immediately transported to laboratory where they were homogenized to take 1 mL of them and make the determination of Chlorpyrifos pretreatment of the sample with liquid extraction and clean-up phase with florisil SPE cartridges.

Samples of the 11 markets Arequipa taken as sampling points showed Chlorpyrifos concentrations of 0.0184 ± 0.016 , 0.0317 ± 0.0127 and 0.0339 ± 0.0072 mg.L⁻¹ for the months of March, April and May, respectively having variations of concentrations, in the case of April and May exceed the limit of 0.020 mg L⁻¹ of Chlorpyrifos in cattle milk established by the *Codex alimentarius*, having 7 samples in which the

concentration was not detectable.

The in vitro removal of Chlorpyrifos was tested with the use of arbuscular mycorrhizal, showing up to 67.5% removal of the pesticide after 60 hours in constant agitation in the group kept at 25 ± 1 °C and a 55.28 % removal for group maintained at room temperature.

Keywords: Chlorpyrifos, HPLC, GC-MS, Voltammetry, Milk, arbuscular mycorrhizal.



INTRODUCCIÓN

A medida que crece la población mundial aumenta también la necesidad de mantener la capacidad de producción del suelo. La obtención de la cantidad adecuada de alimentos requiere el uso de plaguicidas para alcanzar y mantener un equilibrio entre las especies vegetales deseadas y sus competidores. (48)

A pesar de haber sido retirados del mercado varios de los plaguicidas más tóxicos y del auge relativo que en los últimos años ha tenido la llamada “agricultura orgánica” o “agricultura limpia”, la producción agropecuaria mundial depende aún en alta proporción del uso de plaguicidas con el fin de controlar insectos, hongos o plantas que afectan negativamente o compiten con los animales y los cultivos. La utilización de estas sustancias químicas ha permitido un notable incremento en el rendimiento y la producción agrícola y pecuaria, pero el precio que la salud humana y ambiental han pagado, debe ser considerado antes de continuar con su uso indiscriminado. (49)

El uso inadecuado de los insecticidas de amplio espectro, ha sido el responsable de la presencia de residuos en los productos pecuarios, del desarrollo de resistencia de las plagas a los productos químicos, de acumulación de estas sustancias en los pastos, de intoxicación y muerte de animales, y por lo tanto, del incremento en los costos de la producción pecuaria. Los residuos de algunos plaguicidas están apareciendo en la leche y causando problemas biológicos a los bovinos, incluso los humanos pueden estar consumiendo productos cárnicos y lácteos contaminados con plaguicidas. La aplicación de estos compuestos es frecuentemente indiscriminada, observándose aumento en las dosis, aplicaciones frecuentes e innecesarias, así como la utilización incorrecta de las formulaciones. (50)

Es bien sabido que los plaguicidas organofosforados son menos estables y persistentes que los pesticidas organoclorados, sin embargo, hay informes que afirman su presencia en la leche de vaca, esto puede ser por el uso de insecticidas directamente en el ganado lechero para el control de ectoparásitos; entre otras causas. (51, 52)

Clorpirifos, fue introducido y patentado por primera vez por Dow Chemical Company en 1965 y comercializado como Dursban para uso en interiores y Lorsban para la protección de cultivos. El Clorpirifos es un insecticida ampliamente activo no sistémico utilizado para controlar una gran variedad de insectos del suelo y artrópodos en una amplia gama de cultivos como los cítricos, melocotones, nectarinas, verduras, cereales, maíz y tabaco. Además, se indica la aplicación posterior a la cosecha antes del almacenamiento para la protección de plagas. (53)

El análisis de los plaguicidas consiste en la cuantificación a nivel de trazas, de estos compuestos en diferentes matrices y generalmente consta de las etapas de extracción, purificación y determinación. En la extracción de los plaguicidas de las matrices en las que se encuentran, se utilizan diferentes técnicas dependiendo de las condiciones. Los sistemas tradicionales de extracción, que se siguen empleando hoy en día en algunas ocasiones, son la extracción líquido-líquido (LLE), la extracción Soxhlet (SOX) y la extracción sólido líquido (SLE). Estas técnicas requieren el uso de grandes volúmenes de disolventes tóxicos, son laboriosas, y en algunos casos lentas, como la extracción Soxhlet, que requiere al menos 24 h. (54)

En las modernas metodologías de extracción se pretende minimizar el uso de disolventes, se trata de conseguir una mayor automatización del proceso además de una mayor rapidez. Algunos de estos métodos implican la utilización de fases sólidas, como la extracción en fase sólida (*solid-phase extraction*, SPE), técnica que consiste en la adsorción de los analitos en un adsorbente sólido y en la posterior desorción de los compuestos mediante la utilización de un pequeño volumen de disolvente orgánico (55) Al igual que los otros pesticidas organofosforados, los efectos tóxicos agudos de la exposición a Clorpirifos (CP) se deben principalmente a la inhibición de la acetilcolinesterasa. El potencial efecto de daño de Clorpirifos (CP) a los ecosistemas es considerable, y numerosos métodos han sido desarrollados para su determinación (56); por lo que el presente estudio pretende brindar tres alternativas para la determinación de Clorpirifos en leche de vacuno, para determinar su presencia y niveles y además proponer una especie vegetal para lograr su remoción.

HIPÓTESIS

Dado el uso excesivo de pesticidas organofosforados como el Clorpirifos y sus características lipófilas, es probable que estos puedan llegar a productos de tipo pecuario como la leche de vacuno, constituyéndose en un riesgo para la salud pública, justificando la necesidad de alternativas tanto para su determinación como para su remoción.

OBJETIVOS

- 1) Validar un método para la determinación cuantitativa del pesticida Clorpirifos por cromatografía de gases acoplado a espectrómetro de masas.
- 2) Validar un método para la determinación cuantitativa del pesticida Clorpirifos por cromatografía líquida de alta performance.
- 3) Validar un método para la determinación cuantitativa del pesticida Clorpirifos por Voltamperometría.
- 4) Determinar los niveles de Clorpirifos, por cromatografía de gases acoplada a masas, en leche de vacuno expendida en la ciudad de Arequipa, y evaluar si se encuentran dentro del límite máximo permitido establecido por el *Codex Alimentarius*.
- 5) Realizar pruebas *in vitro* de remoción de Clorpirifos con el uso de micorrizas arbusculares.

CAPÍTULO I

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Preparación del estándar secundario de Clorpirifos

Para la preparación del estándar secundario se realizó la compra de un estándar primario (Figura N° I.1), que consta de lo siguiente:

Descripción: EPA 508.1 Instrument Check Mix ver Anexo N° 2

Solvente: Metil ter-butil éter

Analitos:

Clorotalonil	50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
Dactal	50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
Delta-BHC	40 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
Dursban (Clorpirifos)	2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$



Figura N° I.1- Estándar primario EPA 508.1

Con tal fin se hizo uso de un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas GC-MS-QP2010 Ultra (Shimadzu). Se realizaron las medidas usando una columna Rtx-5MS de 30 m x 0.25 mm ID, 0.25 μm film y Helio como gas carrier. Las condiciones óptimas de determinación se muestran en la Figura N° I.2, junto con 2 condiciones también estudiadas para la determinación de Clorpirifos en n-hexano.

Condiciones ensayadas	Condiciones ensayadas	Condiciones óptimas
GC	GC	GC
Pressure: 50 KPa Total flow: 30 mL/min Column flow: 0.87 mL/min Column oven temp.: 70 °C Injection temp.: 250 °C Injection mode: Splitless Sampling Time: 3 min. Purge flow: 3 mL/min Temperature Program: Rate Final T°C Hold time - 40 1 20 160 3 3 275 0 20 310 0 Total program time: 50 min.	Pressure: 50 KPa Total flow: 30 mL/min Column flow: 1.8 mL/min Column oven temp.: 70 °C Inyección temp.: 250 °C Inyección mode: Splitless Sampling Time: 3 min. Purge flow: 3 mL/min Temperature Program: Rate Final T°C Hold time - 60 1 50 180 1 15 225 3 2 257 1.6 Total program time: 50 min.	Pressure: 50 KPa Total flow: 30 mL/min Column flow: 0.87 mL/min Column oven temp.: 70 °C Inyección temp.: 250 °C Inyección mode: Splitless Sampling Time: 3 min. Purge flow: 3 mL/min Temperature Program: Rate Final T°C Hold time - 70 1 50 150 0 6 200 0 16 280 6 Total program time: 21.93 min.
MS	MS	MS
Ion source Temp.:230 °C Interface Temp.:280 °C Solvent cut time: 3 min	Ion source Temp.:230 °C Interface Temp.:280 °C Solvent cut time: 3 min	Ion source Temp.:230 °C Interface Temp.:280 °C Solvent cut time: 3 min.

Figura N° I.2: Condiciones probadas en GC-MS para la determinación de Clorpirifos

Estos ensayos se realizaron usando el modo de adquisición SCAN, el cual es el modo a emplear en análisis cualitativo para la identificación de compuestos por búsqueda en biblioteca de espectros, y por lo tanto el reconocimiento del analito se hizo basándose en el tiempo de retención obtenido con una solución de estándar de Clorpirifos (12.25 min) y en la librería del software (NIST), como se muestra en la Figura N° I.3.



Figura N° I.3 Cromatograma obtenido en modo SCAN del estándar primario

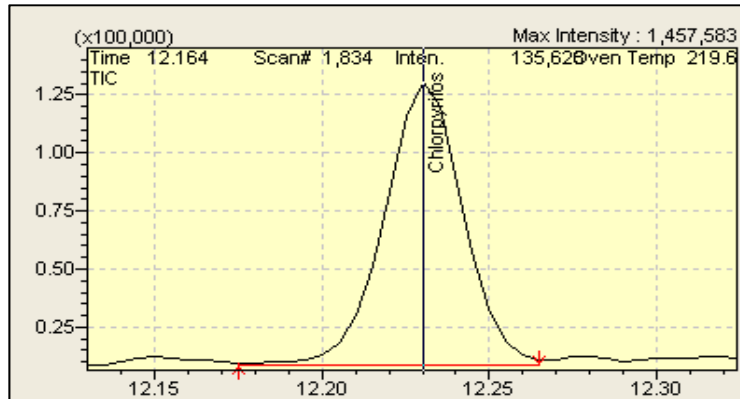


Figura N° I.4 Acercamiento al pico de Clorpirifos en el cromatograma obtenido con el estándar primario

Qualitative Table										
Print Edit View Similarity Search										
	Spectrum			Background						
	Ret. Time	Start Tm	End Tm	Ret. Time	StartRT	EndRT	Search	Report	Name	
1	---	9.950	9.960	9.955	9.845	10.035	Done	<input checked="" type="checkbox"/>	Chlorothalonil	
2	---	10.230	10.240	10.235	10.185	10.310	Done	<input checked="" type="checkbox"/>	delta-BHC	
3	---	12.265	12.275	12.270	12.230	12.325	Done	<input checked="" type="checkbox"/>	Chlorpyrifos	
4	---	12.375	12.385	12.380	12.325	12.650	Done	<input checked="" type="checkbox"/>	Chlorthal-dimethyl	

Figura N° I.5 Tabla análisis cualitativo del estándar primario

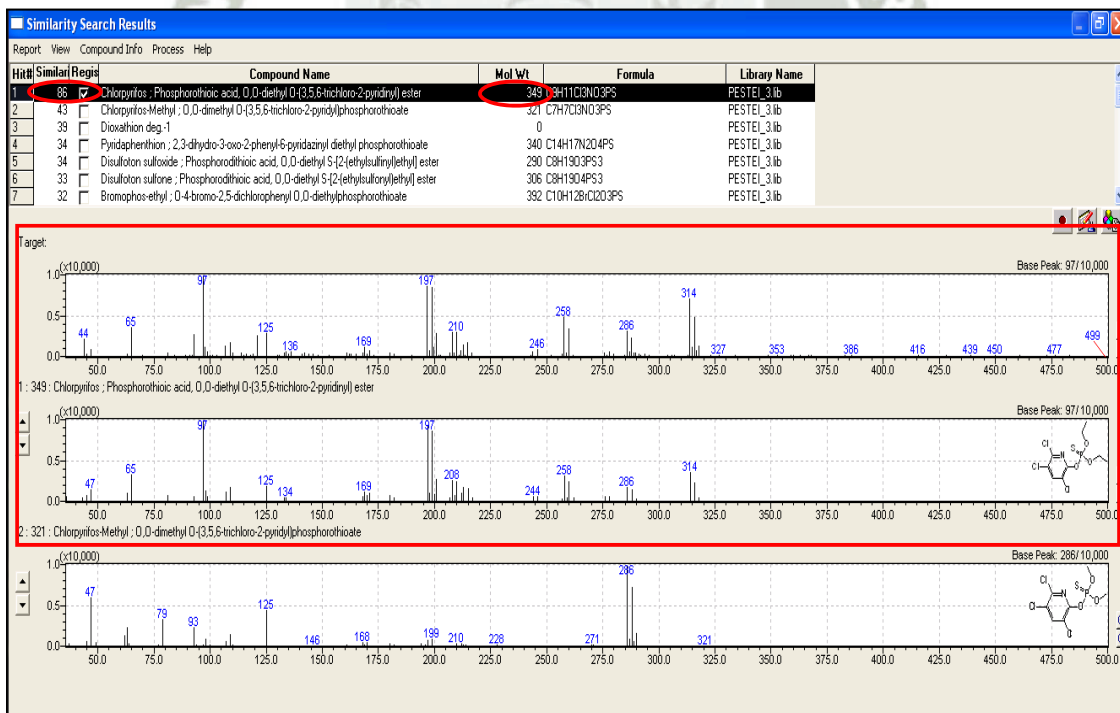


Figura N° I.6 Resultados de búsquedas similares que confirman la presencia del Clorpirifos

En las Figuras N° I.3.y.I.5 se muestran los distintos tiempos de retención obtenidos por los cuatro analitos presentes en el estándar primario, también se observa el nombre obtenido de la biblioteca NIST que confirma la identificación de estos, lo que además se puede afirmar con el cuadro de resultado de búsquedas similares que se muestra en la Figura N° I.6, el que muestra los resultados tras la búsqueda por masas similares obtenidas después de la separación producida en la columna y la ionización en el espectrómetro de masas, dándonos datos importantes (encerrados en rojo) que nos permiten afirmar que se trata de Clorpirifos; tales como el peso molecular de 349, el porcentaje de similaridad con el dato de biblioteca de 86 % y la similaridad de espectros de masa obtenido de la muestra y de la biblioteca, el cual para el detector cuadrupolo que posee este equipo, a pesar de ser robusto y muy reproducible, podría aumentar si se contara con un analizador de masas de triple cuadrupolo.

Una vez que se contaba con las condiciones óptimas, se ensayaron las mismas pero con el modo de adquisición SIM el cual permite monitorizar selectivamente los iones de interés con una alta sensibilidad. Para lo que se necesitaron datos como la masa del ión molecular y de iones fragmento, obtenidos tanto de literatura como de los resultados en modo de adquisición SCAN, los cuales fueron: masa del ión molecular: 349, masa de iones fragmento: 314, 199, 197 y 97. Estos valores se obtienen de las vías para la producción de fragmentos de Clorpirifos la cual se muestra en la Figura N° I.7.

El ión molecular aparece a los 349 de m/z , el pico base se aparece en el ión a m/z 314 por la pérdida de radical Cl del ion molecular. Los iones significativamente abundantes m/z 199 y 197 se producen de la fragmentación inicial del grupo dietil fosforotioato del ión molecular y por la distribución isotópica del Cl. Los iones en m/z 286 y 258 se forman por la eliminación sucesiva de las moléculas de eteno a partir de $(M-Cl)^+$ iones. El producto de iones a m/z 208 puede estar formado por las pérdidas de radical OC_2H_5 y átomo de S de la de iones a m/z 286. Particularmente, la pérdida de radical OC_2H_5 del ion molecular produce el ión a m/z 304, el fragmento de iones a m/z 276 se produce por la pérdida de la molécula de eteno a partir el ion m/z 304. (22)

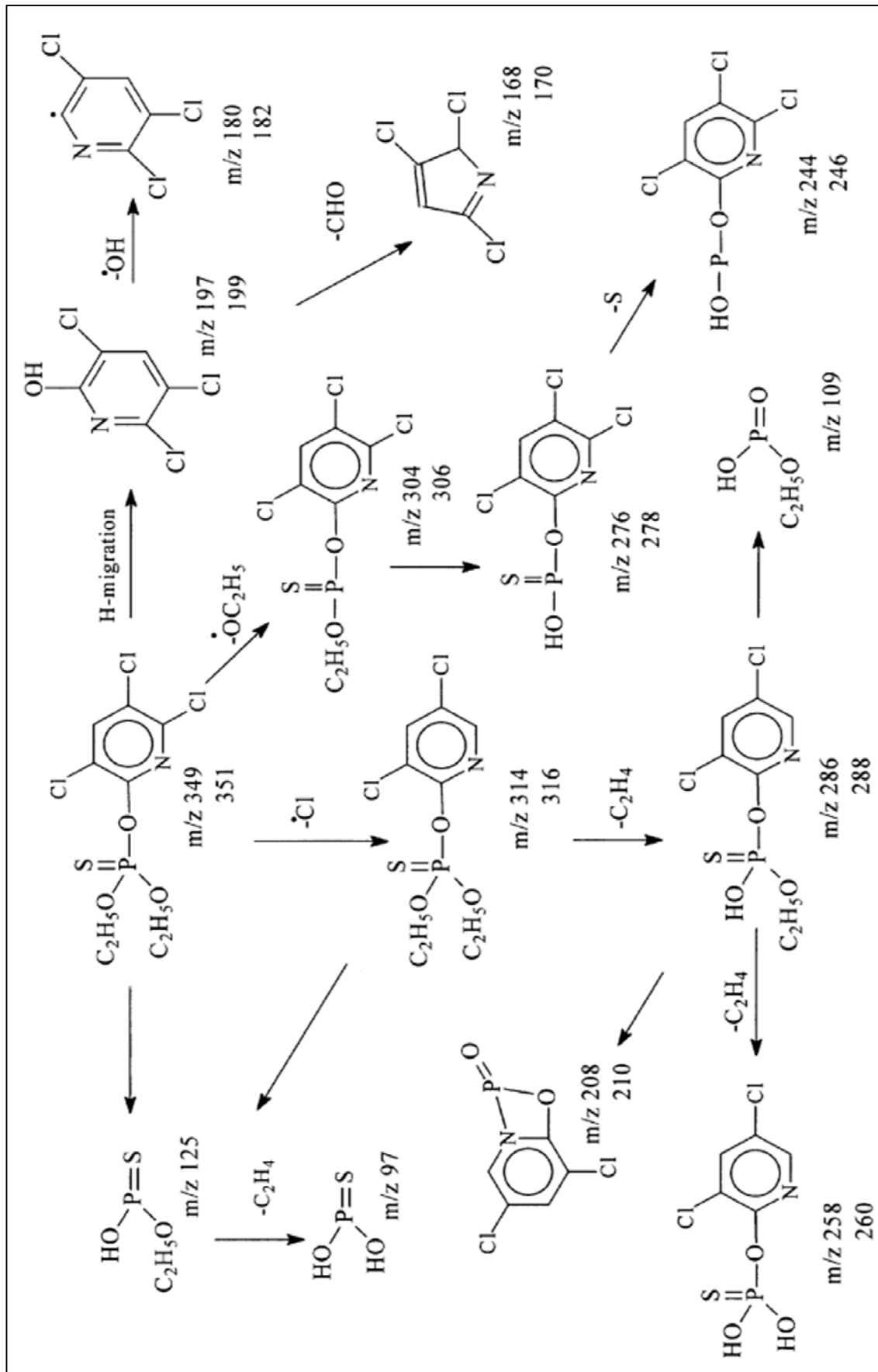


Figura N° I.7 Patrón de fragmentación de Clorpirifos

En la figura N°I.8 se muestra el cromatograma obtenido en modo de adquisición SIM en el cual se puede observar solo el pico de Clorpirifos al mismo tiempo de retención pero con notable mejor sensibilidad.

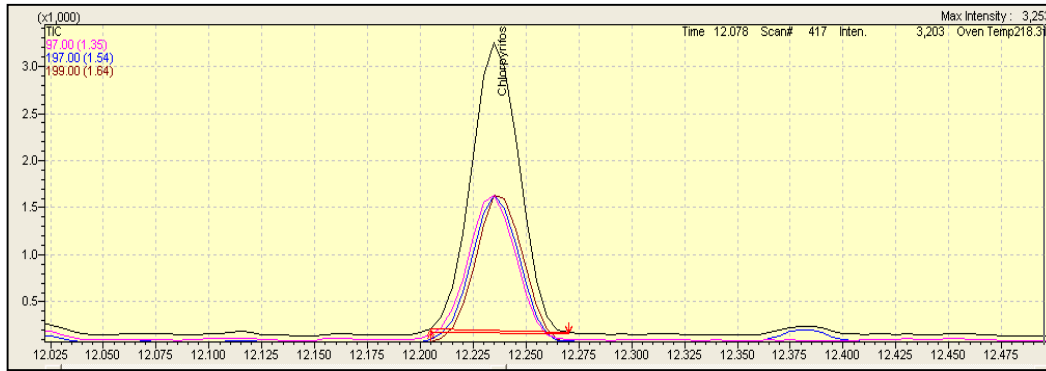


Figura N° I.8 Cromatograma obtenido en modo SIM del estándar primario

Habiéndose ya confirmado los parámetros para la determinación cuantitativa de Clorpirifos, se procedió a realizar una cuasi validación, esto por el limitante de cantidad de estándar, para lo que se estudiaron 3 niveles de concentración de Clorpirifos (0.1, 0.3 y 0.5 mg.L⁻¹), y se analizaron por triplicado, obteniéndose los resultados representados en el Cuadro N° I.1

Cuadro N° I.1 Datos para la linealidad y repetibilidad del método

mg.L ⁻¹	Área I	Área II	Área III	Promedio	DS	CV %
0.1	21224	21640	21760	21541	281.3	1.3058
0.3	36984	37824	37070	37293	462.2	1.2393
0.5	56445	56640	55021	56035	883.8	1.5773

Fuente: Elaboración propia

La repetibilidad refiere al grado de concordancia de los resultados cuando las condiciones son mantenidas lo más constantes posibles, es decir mismo analista, reactivo, equipo, etc. (37). Para esto se realizó el análisis en las mismas condiciones operativas en un mismo laboratorio en un mismo día. Según el Cuadro N° I.2 para un nivel de concentraciones próximo a 1 ppm el valor de coeficiente de variación aceptable es 8 %, por lo tanto los resultados mostrados cumplen con las especificaciones.

Cuadro N° I.2 Valores aceptables de CV según la AOAC

Concentración	Coefficiente de variación (CV) %
100 %	1 %
10 %	1.5 %
1 %	2 %
0.1 %	3 %
0.01%	4 %
10 µg/g (ppm)	6 %
1 µg/g	8 %
10 µg/kg (ppb)	15 %

Fuente: AOAC Guidelines for Single Laboratory (37)

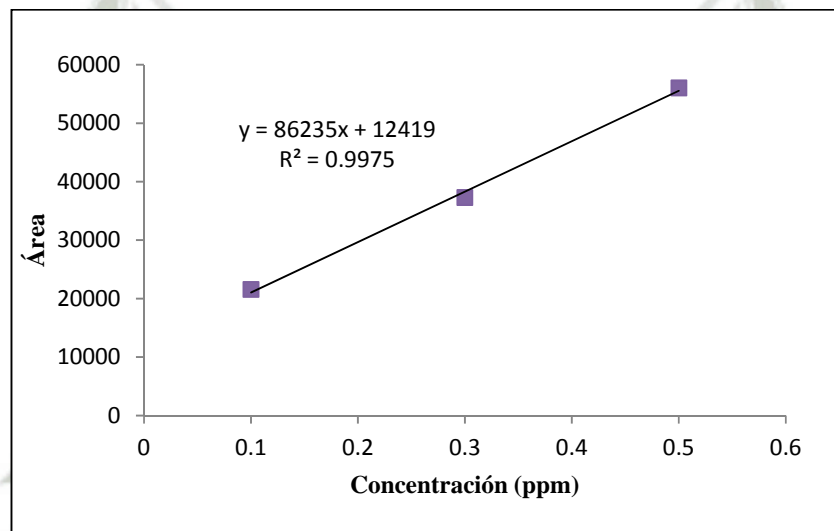


Figura N° I.9 Gráfica de linealidad del método obtenido con solución primaria de Clorpirifos.

Con los datos del Cuadro N° I.1 se construyó la gráfica de linealidad, la que obtuvo un coeficiente de regresión lineal (r^2) que es igual a 0.9975, valor con el que podemos afirmar que existe una buena correlación entre las variaciones de la concentración del analito y su respuesta. Con estos datos también se determinó el límite de detección (LDD) y de cuantificación (LDQ) los cuales fueron 0.085 y 0.089 mg.L⁻¹, respectivamente.

Una vez obtenidas las condiciones óptimas para la determinación de Clorpirifos por GC-MS y dado que se contaba con un 1 mL de solución estándar primario de

Clorpirifos 2 mg/L se decidió preparar un estándar secundario a partir de una solución comercial concentrada de Clorpirifos (Tifon 480 g.L⁻¹).

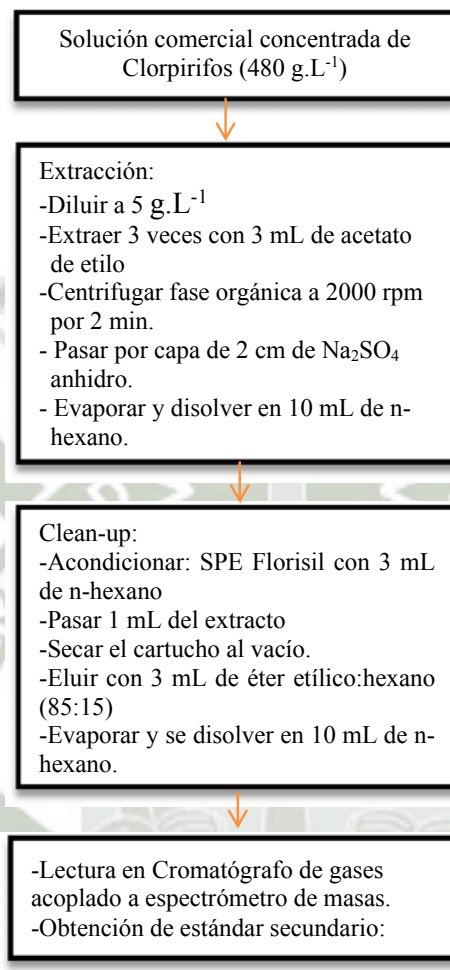


Figura N° I.10 Esquema preparación estándar secundario de Clorpirifos

Para la preparación del estándar secundario se realizó primero una extracción y luego una fase de *clean-up*, que se muestran en la Figura N° I.10, es así que la solución comercial de concentración 480 g.L⁻¹ se diluyó hasta obtener una de 5000 mg.L⁻¹, posteriormente 10 mL de esta solución se extrajo 3 veces con 3 mL de acetato de etilo, tomándose la fase orgánica la cual fue centrifugada a 2000 rpm por 2 minutos, luego la fase orgánica fue pasada por una capa de 2 cm de Na₂SO₄ anhidro, esto dado que la humedad limita mucho la extracción del pesticida, el filtrado fue evaporado y disuelto en 10 mL de n-hexano.

Posterior a este paso se acondicionó un cartucho de SPE Florisil con 3 mL de n-hexano, se pasó 1 mL del extracto y se secó el cartucho al vacío, una vez seco se realizó la elución con 3 mL de una solución de éter etílico:hexano (85:15), lo obtenido se evaporó y se disolvió en 10 mL de n-hexano.

Como la solución obtenida contaba con una concentración alta de Clorpirifos se realizó una dilución para poder cuantificar el mismo por cromatografía gaseosa acoplada a masas y poder saber su real concentración.

Cuadro N° I.3 Datos para cuantificación de estándar secundario

Área	Concentración (mg.L ⁻¹)
554693	6.29
516604	5.85
598084	6.79
Promedio	6.31
Concentración real	315.61

Fuente: Elaboración propia

En el Cuadro N° I.3 se observa las áreas obtenidas en el análisis hecho por triplicado además las concentraciones obtenidas por estas, dando una concentración final del 315.61 mg.L⁻¹ de Clorpirifos, con esta solución se procedió a evaluar el tratamiento de la muestra y a validar los métodos propuestos.

2. Tratamiento de muestras

Para decidir el tipo de tratamiento que recibirían las muestras se hicieron una serie de pruebas de extracciones con: hexano-centrifugación, tolueno-centrifugación, éter etílico-decantación, acetona-centrifugación, obtenciones de grasa con centrifugación o extracción, resultando mejor la realizada con tolueno-centrifugación, ya que el sobrenadante obtenido resultó ser el más cristalino y presentó mejor comportamiento en el cromatógrafo de gases, después de esta fase de extracción se realizó también una fase de *clean up* con cartuchos de SPE de florisil, para lo que fue necesario previamente pasar el extracto por una capa de Na₂SO₄ anhidro, el grosor de la cual tuvo también que ser probada decidiéndose trabajar con un grosor de capa de 1 cm, para el *clean up* también se ensayaron fases de elución: hexano, éter etílico:hexano (85:15), éter

etílico:éter de petróleo, trabajándose a partir de ahí con éter etílico:hexano (85:15) como fase de elución, el procedimiento final se muestra en la Figura N° I.11

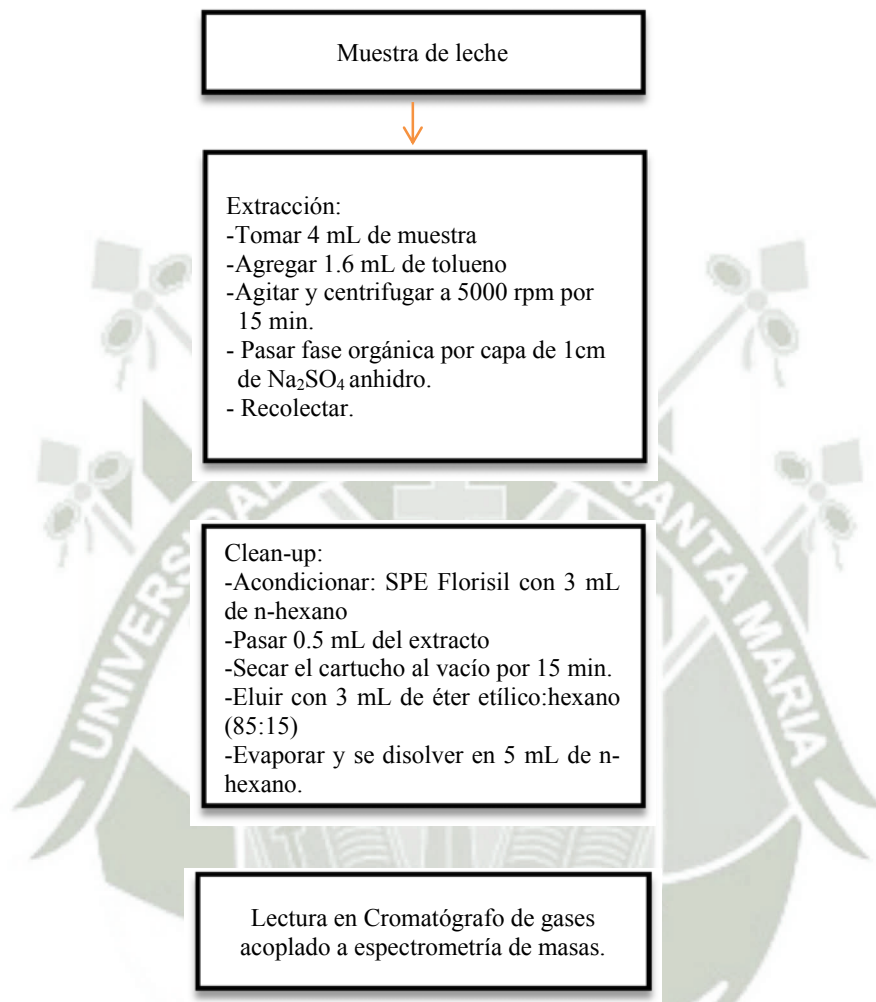


Figura N° I.11 Esquema tratamiento de muestras para la determinación de Clorpirifos.

3. Validación método de determinación de Clorpirifos por GC-MS

Una vez obtenido el estándar secundario de Clorpirifos, elegidos los parámetros para determinar Clorpirifos por GC-MS y el tipo de tratamiento de muestras, se procedió a validar el método, para esto se evaluaron los parámetros propuestos: linealidad, precisión, exactitud, límites de detección y cuantificación.

Linealidad:

Establecida como la capacidad del método para proporcionar resultados que son directamente proporcionales a la concentración del analito en la muestra dentro de un rango establecido, se estudiaron 5 niveles de concentración (0.25, 0.5, 0.75, 1.0 y 1.25 mg.L⁻¹) y se analizaron por triplicado, obteniéndose los siguientes resultados representados en el Cuadro N° I.4

Cuadro N° I.4 Datos para la linealidad del método.

Concentración mg.L ⁻¹	Área I	Área II	Área III	Promedio áreas	Desviación estándar
0.25	2387	2145	2255	2262.33	121.17
0.5	4904	5004	5055	4987.67	76.81
0.75	8150	8549	8251	8316.67	207.45
1	10908	11768	10701	11125.67	565.82
1.25	14632	15719	15048	15133.00	548.46

Fuente: Elaboración propia

Con estos datos se construyó la curva para la linealidad representada en la Figura N° I.12

Figura N° I.12 Gráfica para linealidad del método por GC-MS

Independientemente de la apariencia de la recta, es necesario evaluar los estimadores de regresión como el coeficiente de regresión lineal (r^2) que es igual a 0.9956, valor cercano a la unidad, por lo que podemos afirmar que existe una buena correlación entre las variaciones de la concentración del analito y su respuesta.

Precisión:

Una vez verificada la linealidad se procedió con la precisión del método, la que estudia la variabilidad que existe entre los diferentes resultados, pero sin tener en cuenta su proximidad al valor real.

Para esto en un primer ensayo de repetibilidad se realizó el análisis sobre la misma muestra en las mismas condiciones operativas, un mismo laboratorio, un mismo día, los datos son mostrados en el Cuadro N° I.5.

Según la Cuadro N° I.2 para un nivel de concentraciones próximo a 1 ppm el valor de coeficiente de variación aceptable es 8 %, por lo tanto los resultados mostrados cumplen con las especificaciones.

Cuadro N°I.5 Datos para la repetibilidad del método

CP mg.L ⁻¹	Área I	Área II	Área III	Promedio	D.S.	CV %	Int. Confianza	
0.25	2387	2145	2255	2262.33	121.17	5.36	1925.92	2598.75
0.5	4904	5004	5055	4987.67	76.81	1.54	4774.40	5200.94
0.75	8150	8549	8251	8316.67	207.45	2.49	7740.70	8892.63
1	10908	11768	10701	11125.67	565.82	5.09	9554.69	12696.64
1.25	14632	15719	15048	15133.00	548.46	3.62	13610.22	16655.78

Fuente: Elaboración propia

La repetibilidad del método depende generalmente del proceso de preparación de la muestra, es decir, cuanto mayor sea la manipulación de la muestra más probable es que la variabilidad de método aumente.

Para la precisión intermedia se evaluaron factores como día de ensayo (I), reactivo (II) y analista (III) cuyos resultados se muestran en el Cuadro N° I.6.

Cuadro N° I.6 Datos para la precisión intermedia

CP mg.L ⁻¹	Área I	Área II	Área III	Promedio	D.S.	CV %	Int. Confianza	
0.25	2000	2145	2255	2133.33	127.90	6.00	1778.23	2488.44
0.5	4461	5004	5055	4840.00	329.21	6.80	3925.96	5754.04
0.75	7391	8549	8251	8063.67	601.30	7.46	6394.19	9733.14
1	10504	11768	10701	10991.00	680.07	6.19	9102.82	12879.18
1.25	14390	15719	15048	15052.33	664.51	4.41	13207.36	16897.31

Fuente: Elaboración propia

Para la precisión intermedia generalmente se acepta valores inferiores al doble del coeficiente de variación de la repetibilidad del método, de tal modo que los datos mostrados en el Cuadro N° I.6 cumplen con las especificaciones dadas.

Lo límites de confianza representan el intervalo en torno al valor estimado que contiene el valor real con un probabilidad del 95%.

Exactitud:

La exactitud se probó a un nivel de concentración de 1 mg.L^{-1} , por triplicado, tomando como muestra leche fresca obtenida de un mercado de la ciudad de Arequipa, los datos son resumidos a continuación en el Cuadro N° I.7

Cuadro N° I.7 Recuperación del método

	Conc.	Conc +1 mg.L^{-1}	% Recuperación
	0.4508	1.5696	111.88
	0.3521	1.4420	108.99
	0.3793	1.5253	114.60
Promedio	0.39	1.51	111.82
DS	0.05	0.06	2.81

Fuente: Elaboración propia.

El promedio de la recuperación del método fue de 111.82 %, estando dentro de los límites (75-120%) dados por la AOAC (37)

Límites de cuantificación y detección LDQ, LDD:

Se entiende por límite de cuantificación a la mínima cantidad de analito presente en la muestra que se puede cuantificar con una adecuada precisión y exactitud, y por límite de detección a la mínima cantidad de analito en la muestra que se puede detectar aunque no necesariamente cumple con precisión y exactitud.

Se determinó la pendiente de la curva de calibración para los datos, de donde se pudo extrapolar a concentración cero la ecuación de la recta (Figura N° I.13), obteniéndose como señal ruido la correspondiente al termino independiente, es decir Y_{bl} .

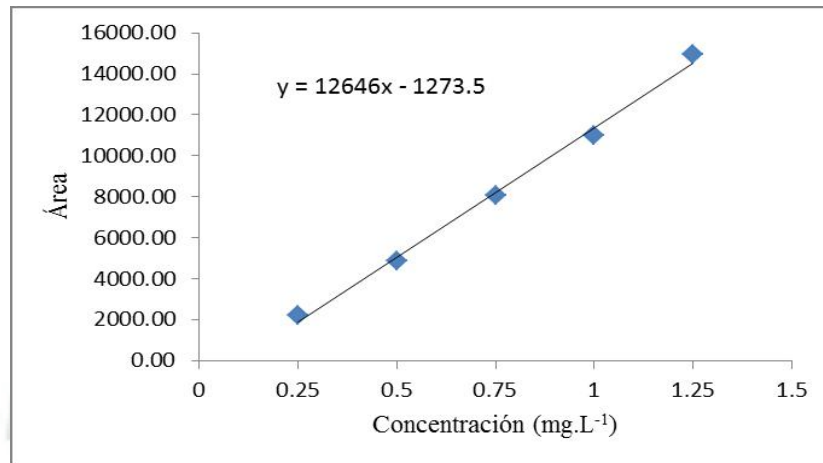


Figura N° I.13. Concentración versus Área

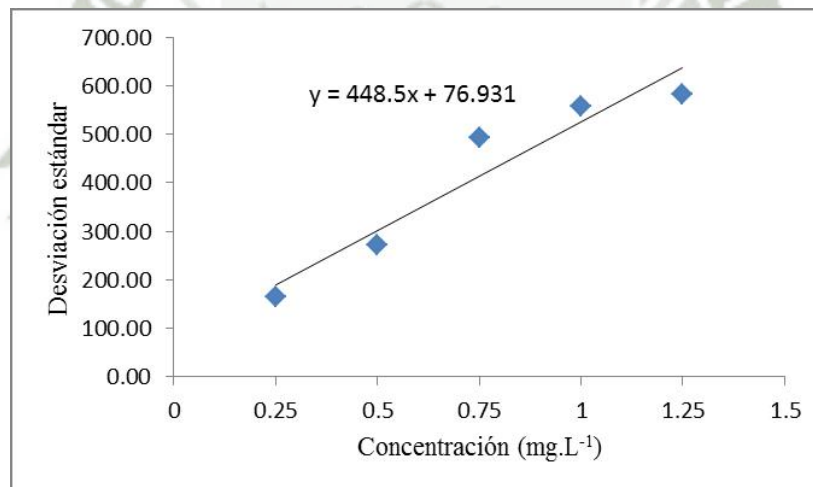


Figura N° I.14 Concentración versus Desviación estándar

Se construyó otra recta (Figura N° I.14) tomando como eje de ordenadas las desviaciones estándar de las respuestas y como eje de abscisas las concentraciones estudiadas, considerándose que la desviación estándar de las respuestas S_{bl} corresponderá al valor de la ordenada de origen de esta recta.

Con los datos necesarios se calculó el límite de detección y límite de cuantificación aplicando las siguientes formulas:

Límite de detección (LD):

$$LD = \frac{Y_{bl} + 3 S_{bl}}{b} * \frac{1}{\sqrt{n}}$$

Límite de cuantificación (LC):

$$LC = \frac{Y_{bl} + 10 S_{bl}}{b} * \frac{1}{\sqrt{n}}$$

Obteniéndose:

Límite de Detección	0.0532 mg.L ⁻¹ de Clorpirifos
Límite de Cuantificación	0.0722 mg.L ⁻¹ de Clorpirifos

De modo que el método es capaz de cuantificar 0.0722 mg.L⁻¹ de Clorpirifos en leche con una buena exactitud y precisión.

4. Validación método de determinación de Clorpirifos por HPLC

Una vez concluida la validación del método para determinación de Clorpirifos por GC-MS, se inició con la validación por HPLC como se planteó, con el fin de brindar alternativas para la determinación de este pesticida, para lo que se tuvieron que establecer los parámetros necesarios.

Se hizo uso del equipo HPLC LaChrom con detector UV/Visible (Figura N° I.15), el cual estaba equipado con una columna Chromolith. RP-18e 100 x 4.6 mm.



Figura N° I.15 Equipo HPLC LaChrom

Las condiciones óptimas de trabajo de HPLC se consiguieron tras efectuar pruebas con: fase móvil de acetonitrilo:agua en proporción de 80:20 a flujo de 2 y 1 mL/min., acetonitrilo:agua 60:40 a flujo de 2 y 1 mL/min., usando una longitud de onda 290 nm, decidiéndose trabajar a partir del momento con una fase móvil compuesta por acetonitrilo:agua (60:40), un flujo de 2 mL/min., longitud de onda del detector de UV/visible de 290 nm y volumen de inyección de 20 μ L, con el que se obtuvo un tiempo de retención para el Clorpirifos de 4.9 min. como se muestra en la Figura N° I.16.

Una vez conseguidos los parámetros ideales para la determinación de Clorpirifos por HPLC, se procedió a validar el método examinando los parámetros de linealidad, precisión, exactitud y límites de detección y de cuantificación, con el estándar secundario que se contaba, el cual fue diluido y disuelto en fase móvil.

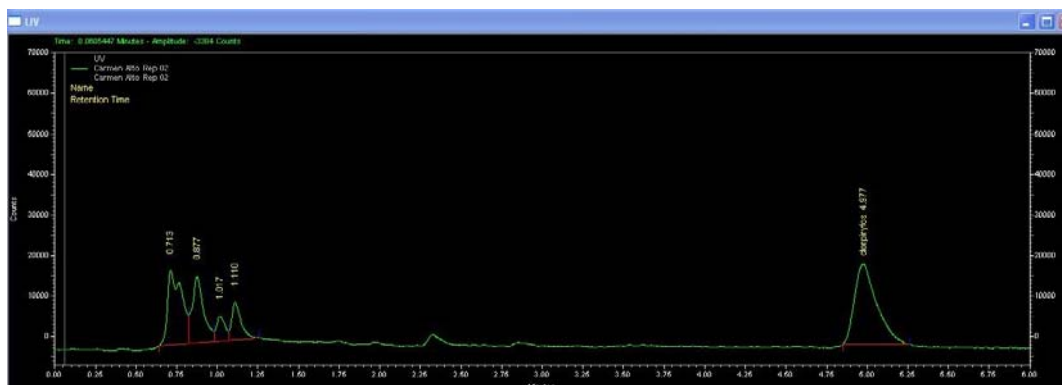


Figura N° I.16 Cromatograma obtenido con los parámetros HPLC para la determinación de Clorpirifos

Linealidad:

Para evaluar la linealidad del método se estudiaron 5 niveles de concentración (2, 4, 6, 8 y 10 mg.L⁻¹) y se analizaron por triplicado, obteniéndose los siguientes resultados representados en el Cuadro N°I.10

Cuadro N° I.10 Datos para la linealidad del método.

CP mg.L ⁻¹	Área I	Área II	Área III	Promedio	DS
2	61733	66716	60489	62979.3	3295.28
4	115429	122590	121931	119983.3	3957.91
6	170309	177991	179925	176075.0	5086.27
8	214139	214089	218704	215644.0	2650.16
10	266553	266773	265660	266328.7	589.44

Fuente: Elaboración propia

Con estos datos se construyó la curva para la linealidad mostrada en la Figura N° I.17, en el que el valor de coeficiente de regresión lineal (r^2) es igual a 0.996, valor cercano a la unidad, por lo que podemos afirmar que existe una buena correlación entre las variaciones de la concentración del analito y su respuesta.

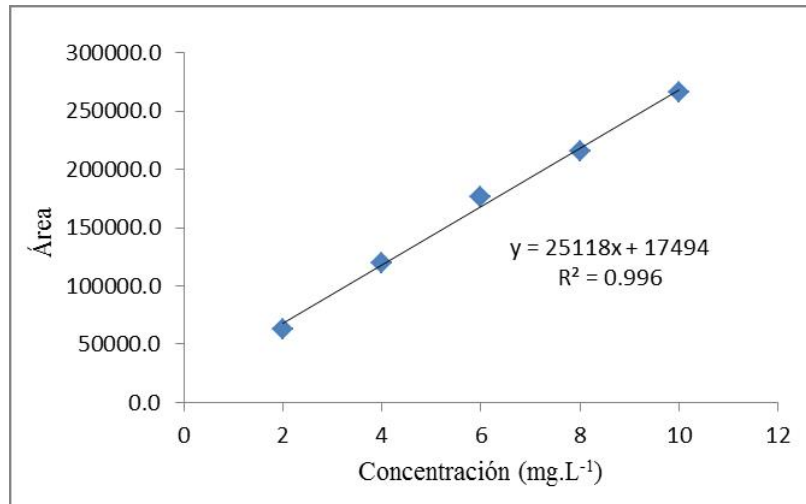


Figura N° I.17 Gráfica para linealidad del método por HPLC

Precisión:

Verificada la linealidad del método se procedió con la precisión del método, para esto en un primer ensayo de repetibilidad se realizó el análisis sobre la misma muestra en las mismas condiciones operativas en un mismo laboratorio en un mismo día, los datos son mostrados en el Cuadro N° I.11

Cuadro N° I.11 Datos para la repetibilidad del método

CP mg.L ⁻¹	Área I	Área II	Área III	Promedio	D.S.	CV%	Int. Confianza
2	61733	66716	60489	62979.3	3295.28	5.23	54508.5 71450.1
4	115429	122590	121931	119983.3	3957.91	3.30	109809.2 130157.4
6	170309	177991	179925	176075.0	5086.27	2.89	163000.3 189149.6
8	214139	214089	218704	215644.0	2650.16	1.23	208831.5 222456.4
10	266553	266773	265660	266328.7	589.44	0.22	264813.4 267843.8

Fuente: Elaboración propia

Según el Cuadro N° I.2 para un nivel de concentraciones próximo a 10 mg.L⁻¹ el valor de coeficiente de variación aceptable es 6 %, por lo tanto los resultados mostrados cumplen con las especificaciones.

Para la precisión intermedia se modificaron factores como día de ensayo (I), reactivo (II) y analista (III) mostrados en el cuadro I.12.

Cuadro N° I.12 Datos para la precisión intermedia

CP mg.L ⁻¹	Área I	Área II	Área III	Promedio	DS	CV %	Int. Confianza
2	61733	58644	66716	62364.3	4072.87	6.53	51894.7 72833.9
4	115429	126337	122590	121452.0	5542.33	4.56	107204.9 135699.0
6	170309	158679	177991	168993.0	9723.03	5.75	143999.1 193986.8
8	214139	202568	214089	210265.3	6666.13	3.17	193129.4 227401.1
10	266553	282457	266773	271927.7	9119.33	3.35	248485.6 295369.6

Fuente: Elaboración propia

Los valores de coeficiente de variación mostrados en el Cuadro N° I.12 son menores al doble del valor aceptado en repetibilidad por lo que los datos cumplen las especificaciones.

Exactitud:

La exactitud se probó a tres niveles de concentración de 3, 6 y 9 mg.L⁻¹, por triplicado, tomando como muestra leche fresca obtenida de un mercado de la ciudad de Arequipa, los datos son resumidos a continuación en el Cuadro N° I.13

Cuadro N° I.13 Recuperación del método

	M (mg.L ⁻¹)	M + 3 mg.L ⁻¹	M + 6 mg.L ⁻¹	M + 9 mg.L ⁻¹
	1.282	4.128	7.420	9.893
	1.316	4.136	7.222	10.423
	1.297	4.487	7.322	10.896
Promedio	1.298	4.250	7.321	10.404
DS	0.017	0.205	0.099	0.502
Recuperación %		98.398	100.381	101.173

*M: Misma muestra

Fuente: Elaboración propia.

El promedio de la recuperación del método fue de 99.984 %, estando dentro de los límites (80-115%) dados por la AOAC (37)

Límites de cuantificación y detección LDQ, LDD:

Para la determinación de estos límites se construyó las gráficas ya mencionadas concentración versus área y concentración versus desviación estándar, obteniéndose Y_{bl} y S_{bl}. (Figura N° I.18. y I.19).

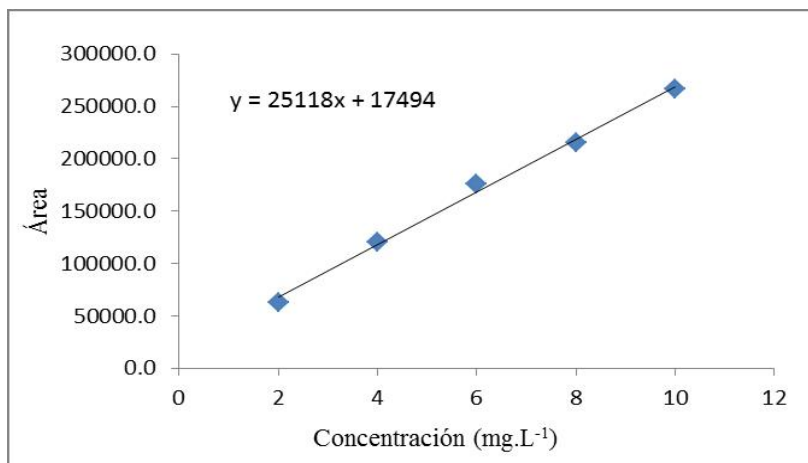


Figura N° I.18 Gráfica concentración versus área

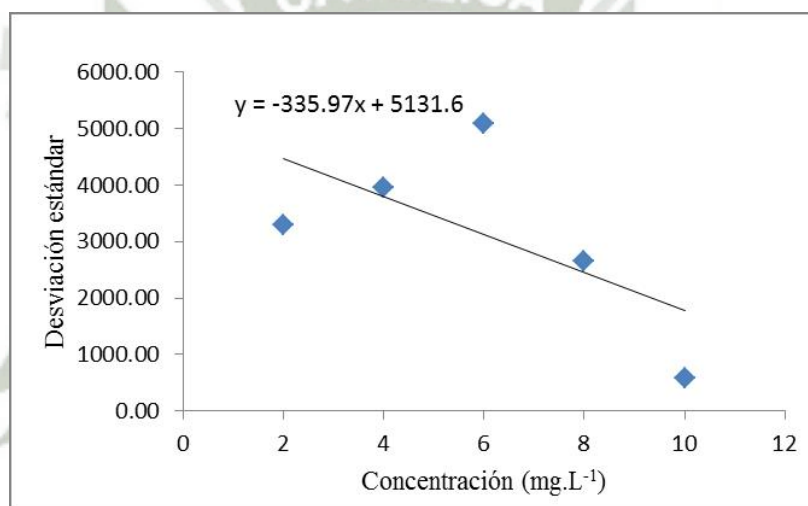


Figura N° I.19 Gráfica concentración versus desviación estándar

Con los datos necesarios se calculó el límite de detección y límite de cuantificación aplicando las fórmulas ya usadas para la validación el método por GC-MS, obteniéndose:

Límite de Detección 0.5856 mg.L⁻¹ de Clorpirifos

Límite de Cuantificación 1.2251 mg.L⁻¹ de Clorpirifos

De modo que el método es capaz de cuantificar 1.2251 mg.L⁻¹ de Clorpirifos en leche con una buena exactitud y precisión.

5. Validación método de determinación de Clorpirifos por Voltamperometría

Culminadas las validaciones por GC-MS y HPLC, se inició la validación del método para determinación de Clorpirifos por Voltamperometría, todas las medidas se realizaron por voltamperometría de redisolución catódica usando una estación voltamperométrica (757 VA Computrace de Metrohm) que constaba de un electrodo de gota colgante de mercurio (HMDE), un electrodo auxiliar de grafito y un electrodo de referencia de Ag/AgCl/KCl 3 M.

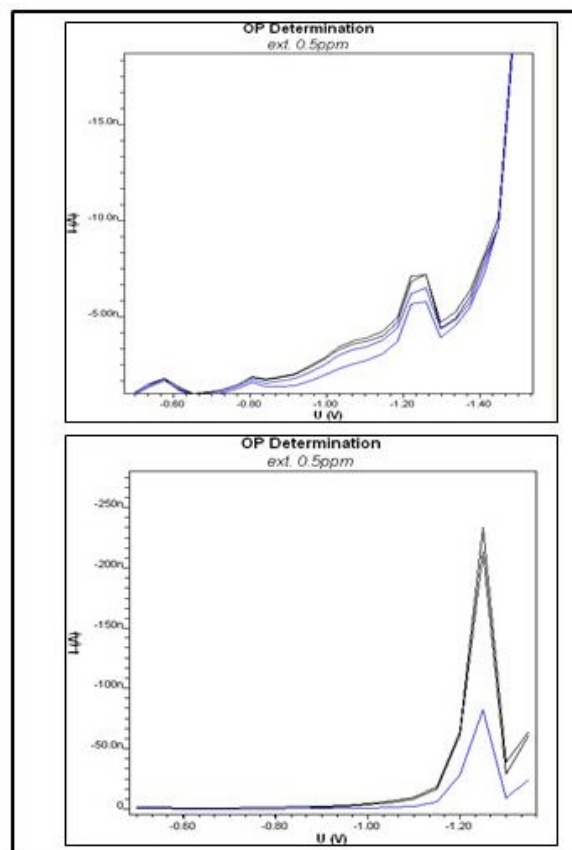


Figura N° I.20 Respuestas obtenidas con etanol arriba y CTAB abajo

Para la determinación de Clorpirifos y apoyada de bibliografía (58, 59, 60) se usó el buffer a pH 2 conteniendo 5 % de etanol, obteniéndose mala respuesta, posteriormente se probó el surfactante CTAB (Bromuro de Cetil trimetil amonio), el que mostró una mejor respuesta, los voltamperogramas obtenidos se muestran en la Figura N° I.20, tanto el etanol como el CTAB se usaron con el fin de disminuir la tensión superficial y lograr que el CP se adsorba en el electrodo HMDE, además se observó que la corriente de pico del CP es fuertemente dependiente del tamaño de la gota de HMDE, por lo que mientras más grande sea la superficie de gota mayor es la adsorción del CP.

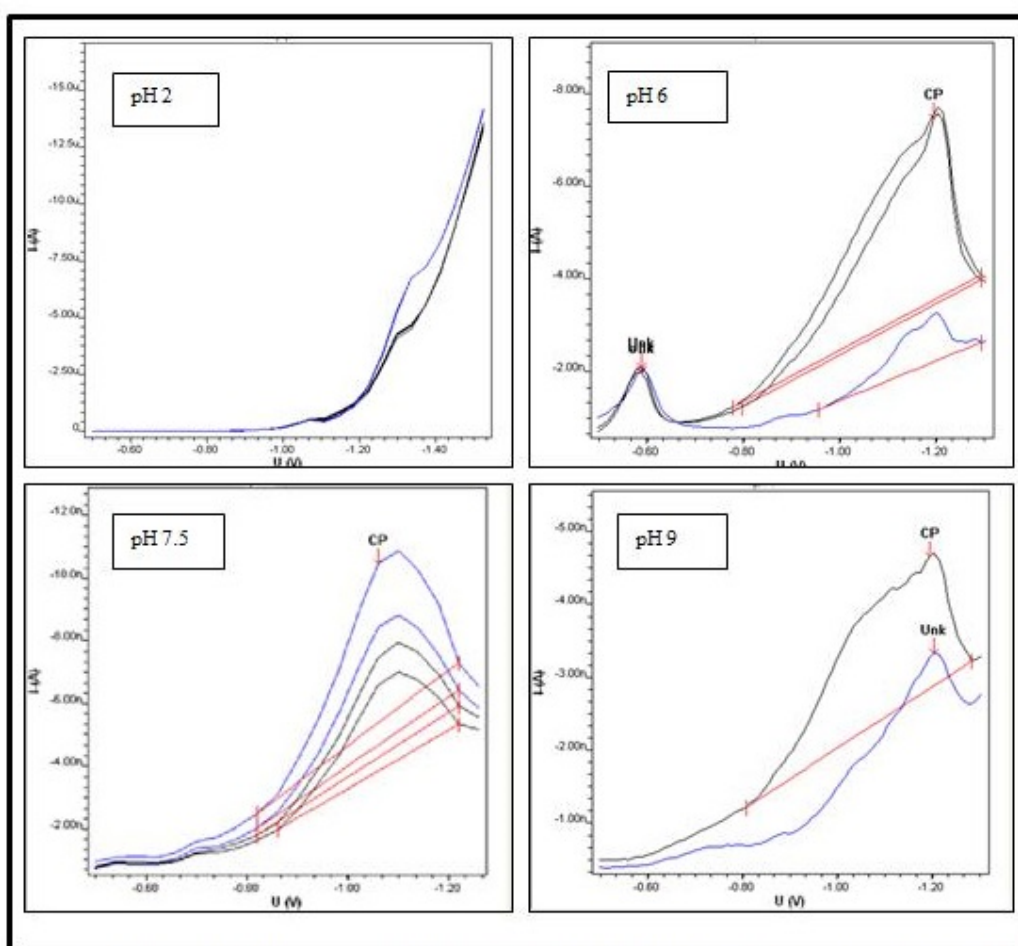
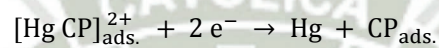


Figura N° I.21 Respuestas obtenidas con buffer Britton Robinson a diferentes pH

También se examinó la respuesta a diferentes pH usando el buffer Britton Robinson, el cual es un buffer universal usado en un rango de pH de 2 a 12, mostrando a pH 7.5 la mejor respuesta como se observa en la Figura N° I.21.

Es probable que el compuesto $[\text{CP Hg}]_{\text{ads}}^{2+}$ se forme inicialmente en la superficie del electrodo a través de la interacción del átomo de azufre en el compuesto de CP con la superficie del electrodo de mercurio cargado. La interacción del grupo P=S fosforotioato con la superficie del electrodo de mercurio no es fuerte, por lo tanto, en ausencia y en presencia de iones de Hg (II), es difícil de detectar estas especies por polarografía DC en el DME. Es así que el proceso de reducción electroquímica del pico podría ser presentado por la reacción siguiente:



Los fenómenos de adsorción se pueden utilizar aquí como un esquema para facilitar la concentración en la superficie para mejorar la sensibilidad y el límite de detección de voltamperometría.(61)

Una vez elegido el buffer a pH 7.5 y el CTAB como surfactante, se adicionó KCl para mejorar la conductividad y obtener un mejor voltamperograma, usando el estándar secundario de Clorpirifos (CP), definiendo así los parámetros como se muestra en la Figura N° I.22.

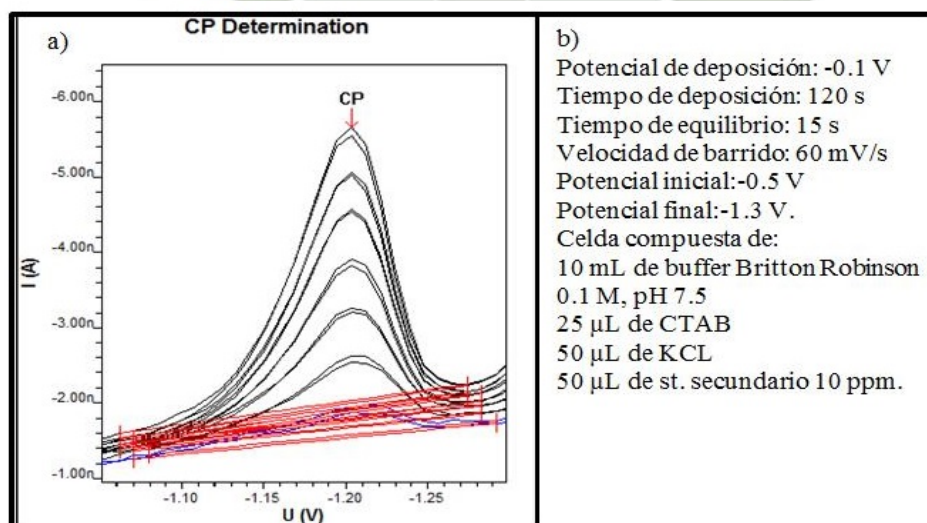


Figura N° I.22 Voltamperograma (a) obtenido con condiciones elegidas (b)

Establecidos los parámetros para la determinación de Clorpirifos por Voltamperometría, se procedió a validar el método examinando los parámetros de linealidad, precisión, exactitud y límites de detección y de cuantificación, con el estándar secundario que se contaba, el cual fue diluido y disuelto en hexano.

Linealidad:

Para evaluar la linealidad del método se estudiaron 6 niveles de concentración (0.0491, 0.0978, 0.1460, 0.1937 y 0.2410 y 0.2878 mg.L⁻¹) y se analizaron por triplicado, obteniéndose los siguientes resultados representados en el Cuadro N° I.14

Cuadro N° I.14 Datos para la linealidad del método.

CP en celda (mg.L ⁻¹)	Intensidad I (nA)	Intensidad II (nA)	Intensidad III (nA)	X Intensidad (nA)	D.S.
0.0491	-0.88	-0.90	-0.90	0.89	0.01
0.0978	-1.48	-1.47	-1.51	1.49	0.02
0.1460	-1.96	-2.01	-2.19	2.05	0.12
0.1937	-2.55	-2.68	-2.86	2.70	0.16
0.2410	-3.08	-3.12	-3.42	3.21	0.19
0.2878	-3.74	-3.67	-4.16	3.86	0.27

Fuente: Elaboración propia

Con estos datos se construyó la curva para la linealidad mostrada en la Figura N° I.23.

Figura N° I.23 Gráfica para la linealidad del método por Voltamperometría

El valor de coeficiente de regresión lineal (r^2) es igual a 0.9993, valor cercano a la unidad, por lo que podemos afirmar que existe una buena correlación entre las variaciones de la concentración del analito y su respuesta.

Precisión:

Verificada la linealidad del método se procedió con la precisión del método, para esto en un primer ensayo de repetibilidad se realizó el análisis sobre la misma muestra en las mismas condiciones operativas en un mismo laboratorio, en un mismo día, los datos son mostrados en el Cuadro N° I.15

Cuadro N° I.15 Datos para la repetibilidad del método

CP en celda (mg.L ⁻¹)	Intensidad I (nA)	Intensidad II (nA)	Intensidad III (nA)	X Int. (nA)	D.S.	CV %	Int. Confianza
0.0491	-0.882	-0.8975	-0.901	0.894	0.010	1.132	0.92 0.87
0.0978	-1.48	-1.47	-1.51	1.487	0.021	1.400	1.54 1.43
0.1460	-1.96	-2.01	-2.19	2.053	0.121	5.891	2.36 1.74
0.1937	-2.55	-2.675	-2.86	2.695	0.156	5.787	3.10 2.29
0.2410	-3.08	-3.115	-3.42	3.205	0.187	5.835	3.69 2.72
0.2878	-3.74	-3.67	-4.16	3.857	0.265	6.872	4.54 3.18

Fuente: Elaboración propia.

Según la Cuadro N° I.2 para un nivel de concentraciones próximo a 1 mg.L⁻¹ el valor de coeficiente de variación aceptable es 8 %, por lo tanto los resultados mostrados cumplen con las especificaciones.

Cuadro N° I.16 Datos para la precisión intermedia

CP en celda (mg.L ⁻¹)	Intensidad I (nA)	Intensidad II (nA)	Intensidad III (nA)	Intensidad IV (nA)	X Int.(nA)	D.S.	CV %	Int. Confianza
0.0491	-1.01	-0.88	-0.90	-0.90	0.92	0.06	6.377	1.07 0.77
0.0978	-1.9	-1.48	-1.47	-1.51	1.59	0.21	13.042	2.12 1.06
0.1460	-2.51	-1.96	-2.01	-2.19	2.17	0.25	11.478	2.81 1.53
0.1937	-2.78	-2.55	-2.68	-2.86	2.72	0.13	4.942	3.06 2.37
0.2410	-3.24	-3.08	-3.12	-3.42	3.21	0.15	4.782	3.61 2.82
0.2878	-3.86	-3.74	-3.67	-4.16	3.86	0.22	5.610	4.41 3.30

Fuente: Elaboración propia

Para la precisión intermedia se modificaron factores como día de ensayo (I), reactivo (II) y analista (III) resumidos en el Cuadro N° I.16, en el que los valores de coeficiente de variación son menores al doble del valor aceptado en repetibilidad por lo que los datos cumplen las especificaciones.

Exactitud:

La exactitud se probó a dos niveles de concentración de 1 y 2 mg.L⁻¹, por triplicado, tomando como muestra leche fresca obtenida de un mercado de la ciudad de Arequipa, los datos son resumidos a continuación en el Cuadro N° I.17.

Cuadro N° I.17 Recuperación del método

	M	M + 1 mg.L ⁻¹	M + 2 mg.L ⁻¹
	0.330	1.350	2.407
	0.351	1.367	2.396
	0.347	1.365	2.199
Promedio	0.343	1.361	2.334
DS	0.011	0.009	0.117
Recuperación %		101.800	99.567

*M: Misma muestra

Fuente: Elaboración propia.

El promedio de la recuperación del método fue de 100.69 %, estando dentro de los límites (75-120%) dados por la AOAC (37)

Límites de cuantificación y detección LDQ, LDD:

Para la determinación de estos límites se construyó las gráficas ya mencionadas concentración versus área y concentración versus desviación estándar, obteniéndose Y_{bl} y S_{bl} . (Figuras N° I.24 y I.25).

Con los datos necesarios se calculó el límite de detección y límite de cuantificación aplicando las formulas ya usadas para la validación el método por GC-MS, Obteniéndose:

Límite de Detección 0.0036 mg.L⁻¹ de Clorpirifos

Límite de Cuantificación 0.0095 mg.L⁻¹ de Clorpirifos

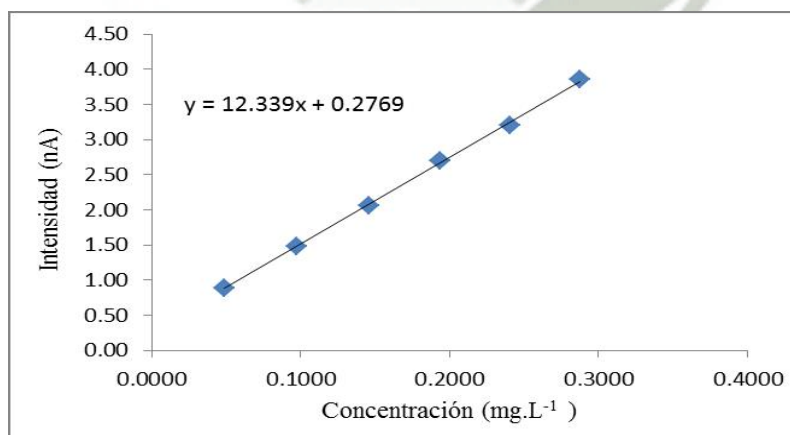


Figura N° I.24 Gráfica concentración versus Intensidad (nA)

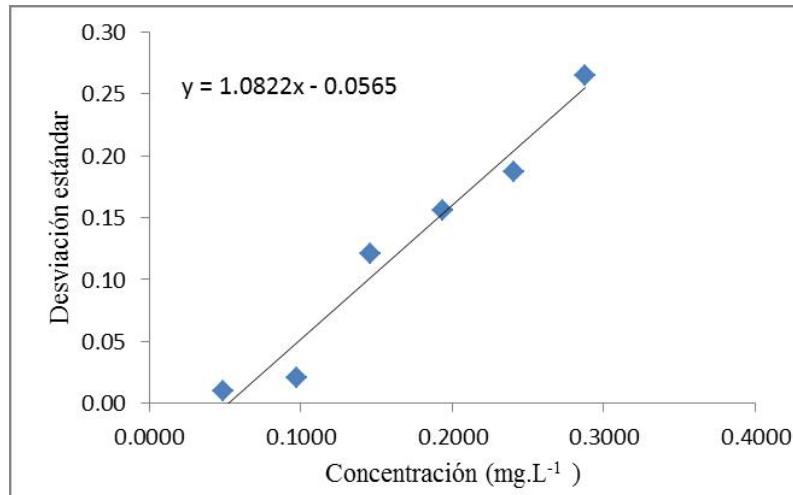


Figura N° I.25 Gráfica concentración versus desviación estándar

De modo que el método es capaz de cuantificar 0.0095 mg.L⁻¹ de Clorpirifos en leche con una buena exactitud y precisión.

6. Determinación de los niveles de Clorpirifos en leche de vacuno

Una vez culminada la etapa de validación de los tres métodos para la determinación de Clorpirifos (CP), se procedió a realizar la toma de muestras de leche de vacuno expendidas en la ciudad de Arequipa, esto para verificar la aplicabilidad de los métodos validados, pero dada la necesidad de realizar las medidas por el método de GC-MS, se hizo una comparación de los tres métodos con la misma muestra para observar si es que habría diferencia estadística entre los métodos, los datos obtenidos se resumen en el Cuadro N° I.18.

Cuadro N° I.18 Concentración de CP en mg.L⁻¹

	Nro medidas	Conc. CP (mg.L ⁻¹)	D.S.
HPLC	3	0.4267	0.012
GC-MS	3	0.4467	0.012
VA	3	0.4333	0.006

Fuente: Elaboración propia

Para establecer si existe diferencia significativa entre las medias de los grupos se realizó un análisis de varianza que se muestra en el Cuadro N° I.19.

Cuadro N° I.19 Análisis de varianza de un factor

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0.0006	2	0.0003	3.1111	0.1183	5.1433
Dentro de los grupos	0.0006	6	0.0001			
Total	0.0012	8				

Fuente: Elaboración propia

Al ser el F experimental menor al F teórico se establece que no existe diferencia significativa entre los grupos, es decir no existe diferencia significativa entre los tres métodos de determinación de Clorpirifos.

6.1. Preparación de la muestra:

Dado que se demostró que no existía diferencia significativa entre los tres métodos para la determinación de Clorpirifos, se procedió a realizar el muestreo de los 11 mercados de la ciudad de Arequipa, el cual se realizó 1 vez por mes durante los meses de Marzo, Abril y Mayo, tomándose tres muestras por cada punto de muestreo, tras la recolección fueron llevadas inmediatamente al laboratorio donde fueron procesadas (Figura N° I.26), los distritos muestreados fueron: Paucarpata, José Luis Bustamante y Rivero, Mariano Melgar, Miraflores, Selva Alegre, Cercado, Cayma, Tiabaya, Cerro Colorado, Hunter y Socabaya

Figura N° Proceso de extracción de CP en leche de vacuno



Figura N° I.26 Tratamiento de muestras

Una vez que se homogenizaron las muestras se trataron como ya se había determinado mostrándose el proceso en la Figura N° I.11.

Cuadro N° I.20 Concentración de CP en muestras de distintos mercados de Arequipa

Distrito	Concentración CP mg.L ⁻¹					
	Marzo	D.S.	Abril	D.S.	Mayo	D.S.
Paucarpata	ND	-	0.0336	31	0.0254	20
Tiabaya	0.0331	10	0.0365	10	0.0361	71
Cercado	ND	-	0.0280	11	0.0275	34
Miraflores	0.0374	39	0.0437	11	0.0399	85
J.L.B y R	0.0274	3	0.0369	11	0.0375	60
Mariano Melgar	ND	-	0.0123	6	ND	-
Selva Alegre	ND	-	0.0256	17	0.0321	20
Socabaya	ND	-	0.0135	9	ND	-
Hunter	0.0011	4	0.0490	10	0.0462	68
Cerro Colorado	0.0041	20	0.0220	13	0.0245	36
Cayma	0.0070	7	0.0479	14	0.0362	7
Promedio	0.0184		0.0317		0.0339	
D. S.	0.016		0.0127		0.0072	

Fuente: Elaboración propia

Las muestras de los 11 mercados de Arequipa tomados como puntos de muestreo mostraron concentraciones promedio (Cuadro N° I.20) de Clorpirifos de 0.0184, 0.0317 y 0.0339 mg.L⁻¹ para los meses de Marzo, Abril y Mayo, respectivamente, que en el caso de Abril y Mayo exceden el límite de 0.020 mg.L⁻¹ de Clorpirifos en leche establecido por el *Codex alimentarius*, cabe resaltar que a las muestras procesadas se les agregó estándar de CP antes de la medición, esto para superar el límite de cuantificación del método: las posibles causas de los niveles de pesticida obtenidos podrían ser el uso de insecticidas directamente en el ganado lechero para el control de ectoparásitos; los pastos, forrajes o piensos fabricados a partir de material vegetal que ha sido tratados con insecticidas o el uso de insecticidas en establos a diario, además de la temporada de lluvias en la ciudad.

7. Remoción de Clorpirifos con Micorrizas Arbusculares

Una vez culminada la etapa de determinación de Clorpirifos en las muestras recolectadas se realizó algunas pruebas para la remoción de Clorpirifos por hongos micorrizídicos, para lo que en un primer paso se procedió a su aislamiento.

7.1 Aislamiento de esporas de hongos micorrizídicos arbusculares

Para asegurar la presencia de las esporas de estos hongos, se obtuvo un producto agropecuario que se usa como biofertilizante y que contiene micorrizas vesículo arbusculares, Figura N° I.27.



Figura N° I.27 Biofertilizante

Para el aislamiento de esporas se homogenizó el producto adquirido y se tomó una muestra de 10 gramos, los cuales fueron colocados en un beaker adicionándosele 100 mL de agua, con la ayuda de una espátula se agitó manualmente por 15 minutos y se procedió a pasar por una serie de tamices correspondientes a 1.18 mm, 425 μ m, 150 μ m y 75 μ m de malla, se recolectaron las muestras pertenecientes a los tamices de 150 μ m y 75 μ m en un tubo de ensayo.



Figura N° I.28 Aislamiento de esporas en sistema de tamices

Seguidamente a lo recolectado en el tubo se le adicionó 5 mL de solución de sacarosa al 72 % con tween 80 al 2 % quedando ésta por debajo del material suspendido en agua, se centrifugó a 3000 rpm por 10 min. y la capa inferior se recolectó con una jeringa evitando romper la interfase de agua-sacarosa (Figura N.I.29).

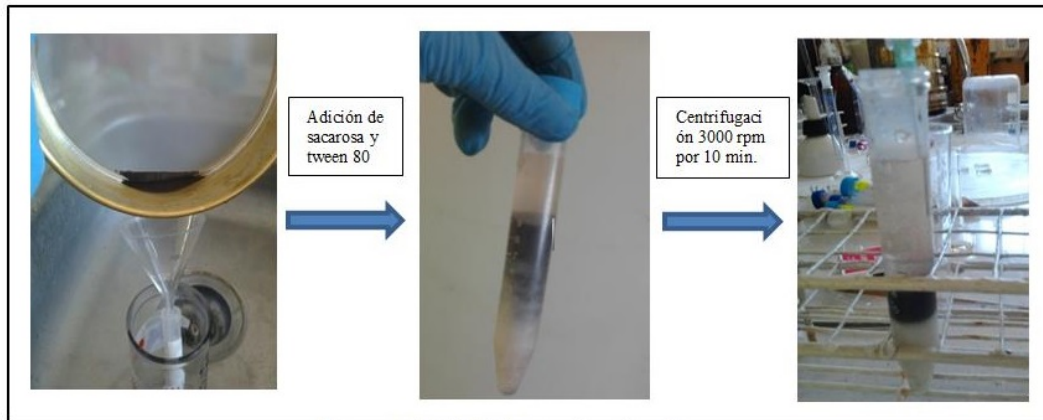


Figura N° I.29 Precipitación de esporas

El contenido de la jeringa se pasó al tamiz más pequeño y se lavó para eliminar la sacarosa, posteriormente este se filtró y lo obtenido se colocó en una placa petri. Las esporas aisladas de la caja de petri se pusieron en una lámina a la que se le adiciona una gota de PVL colocándole un cubreobjetos para ser observada al microscopio en donde se tuvieron en cuenta características referentes a morfología y color.

7.2. Pruebas de remoción

Una vez que se obtuvieron las esporas de micorrizas se inició con una prueba remoción en la que se tomó dos grupos, ambos compuestos por 10 mL de solución 50 mg.L⁻¹ de Clorpirifos en agua, 5 % de tween 80 para asegurar la dispersión del organofosforado y 1 g de esporas extraídas.

Cuadro N° I.21 Remoción de CP en un día

	Concentración CP (mg.L ⁻¹)	
	Remoción	Control
Basal	50.44	50.36
1 Día	26.14	49.97

Fuente: Elaboración propia

Se tomaron los valores basales y ambos sistemas se dejaron 24 horas en agitación constante, transcurrido ese tiempo se tomaron muestras y se determinaron las concentraciones de Clorpirifos. Las concentraciones obtenidas se muestran en el Cuadro N° I.21, siendo la concentración basal de 50.44 mg.L^{-1} y de 26.14 mg.L^{-1} al cabo de un día, dándonos estos valores un porcentaje de remoción de 48.18 %, no mostrando cambios en concentración para el grupo control.

Cuadro N° I.22 Grupos para la remoción

Grupos	Concentración CP (mg.L^{-1})	Tween (%)	Esporas (g)
Remoción T.A.	100	5	1
Remoción 25 °C	100	5	1
Control T.A.	100	5	-
Control 25°C	100	5	-

Fuente: Elaboración propia

Dados los resultados se realizó una segunda prueba en la que se tomaron cuatro grupos, como se en el Cuadro N° I.22

A dos de los grupos se les controló la temperatura a $25 \pm 1 \text{ } ^\circ\text{C}$, mientras que los dos restantes se dejaron a temperatura ambiente (TA), todos contenían 100 mg.L^{-1} teóricos iniciales, se tomaron los valores basales reales de todos los grupos y posterior a eso cada 12 h. obteniéndose los resultados en el Cuadro N° I.23.



Figura N° I.30 Grupo de remoción a 25°C.

Cuadro N° I.23 Grupos de trabajo

Hrs.	Concentración CP (mg.L ⁻¹)			
	Remoción T.A.	Control T.A.	Remoción 25°C	Control 25°C
0	100.25	100.47	100.25	99.88
12	88.76	100.08	82.37	98.29
24	69.51	99.88	67.73	98.51
36	68.73	99.72	49.85	98.70
48	45.03	99.70	36.81	99.00
60	44.83	99.04	32.58	98.08

Fuente: Elaboración propia

Como se muestra gráficamente en la Figura N° I.31 construida con los datos obtenidos del Cuadro N° I.23, los grupos de remoción (contenían micorrizas) mostraron a las 60 hrs. una disminución de los niveles de Clorpirifos de más de un 50 %, además los grupos controles mostraron cambios pequeños lo que nos refiere la actividad de las micorrizas, en la Figura N° I.32 se muestran los porcentajes de remoción de solo los grupos que contenían micorrizas en función del tiempo.

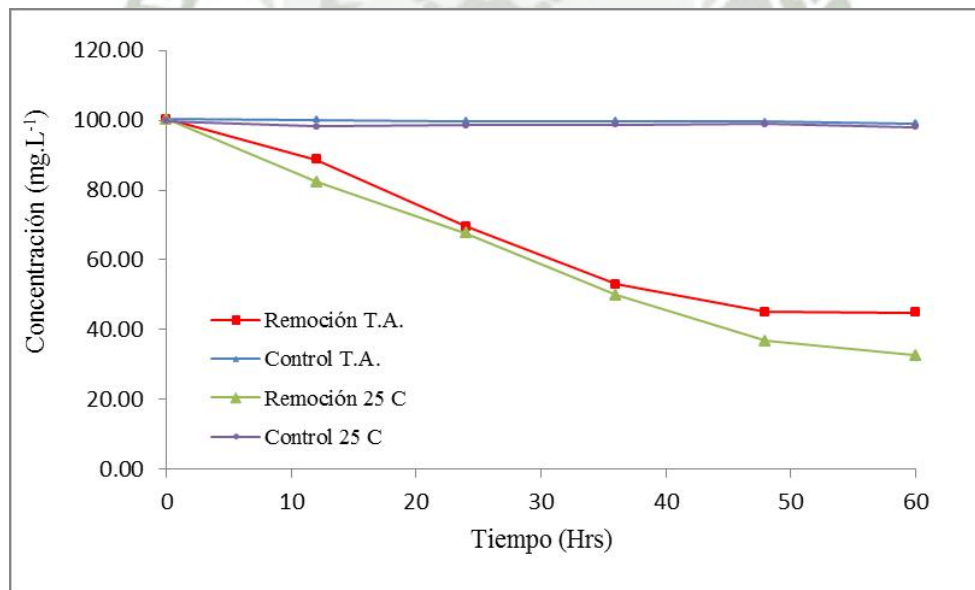


Figura N° I.31 Gráfico de remoción para los grupos de trabajo

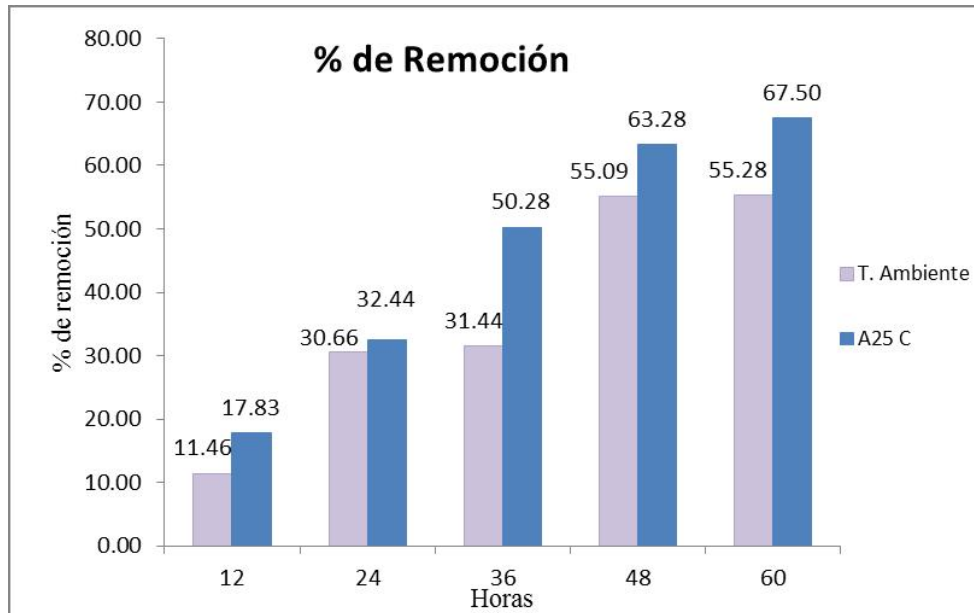


Figura N° I.32 Gráfica porcentaje de remoción en función del tiempo

Como se observa (Figura N° I.32) el grupo al que se mantuvo con temperatura controlada (25 °C) mostró un mayor porcentaje de remoción en el tiempo en comparación con el que se mantuvo a temperatura ambiente, mostrando claramente el aumento de la actividad de las micorrizas a temperatura de 25 °C, alcanzando a las 60 hrs. un 67.50 %, y un 55.28 % para el grupo que estuvo a temperatura ambiente.

Aunque no se han hallado reportes de la actividad de micorrizas vesículo arbusculares sobre pesticidas organofosforados, se ha reportado el uso de otro tipo de hongos como el expuesto por *Lopera Meza M. y su grupo* (57) quienes demostraron que el hongo *Phanerochaete chrysosporium*, causante de la enfermedad de podredumbre blanca en árboles, reducía hasta en un 96.3 % los niveles de Clorpirifos pero a concentraciones inferiores a 10 mg.L⁻¹, lo que nos indica la alta actividad de las micorrizas vesículo arbusculares usadas en este trabajo, dado que se trabajó a altas concentraciones.

CONCLUSIONES

- 1) El método por Cromatografía de gases acoplado a espectrómetro de masas para la determinación de Clorpirifos en leche mostró ser selectivo, lineal, preciso, exacto, con límites de detección de 0.0532 mg.L^{-1} y de cuantificación de 0.0722 mg.L^{-1} .
- 2) El método por HPLC para la determinación de Clorpirifos en leche mostró ser selectivo, lineal, preciso, exacto, con límites de detección de 0.5856 mg.L^{-1} y de cuantificación de 1.2251 mg.L^{-1} .
- 3) El método Voltamperométrico para la determinación de Clorpirifos en leche mostró ser selectivo, lineal, preciso, exacto, con límites de detección de 0.0036 mg.L^{-1} y de cuantificación de 0.0095 mg.L^{-1} .
- 4) Las concentraciones halladas de Clorpirifos, por el método de Cromatografía gaseosa acoplada a masas, previa adición de estándar, en las muestras de los mercados de Arequipa para los meses de Abril y Mayo se encuentran fuera del límite máximo permisible establecido por el *Codex Alimentarius* como 0.020 mg.L^{-1} de Clorpirifos en leche cruda, habiendo variaciones entre los mercados, siendo la concentración menor al límite máximo permisible para el mes de Marzo.
- 5) Las pruebas in vitro de remoción de Clorpirifos con el uso de Micorrizas Arbusculares, mostraron hasta un 67.5 % de remoción del pesticida tras 60 hrs. en agitación constante en el grupo mantenido a $25 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$, y un 55.28 % de remoción para el grupo mantenido a temperatura ambiente, demostrándose la capacidad de las micorrizas para la disminución de los niveles de Clorpirifos.

RECOMENDACIONES:

1. Monitorear otros alimentos para determinar la presencia de pesticidas organofosforados.
2. Continuar estudiando la remoción de Clorpirifos con micorrizas vesículo-arbusculares.
3. Identificar la especie exacta de micorrizas que se aislaron.



REFERENCIAS

1. M. Lopera M., G. Peñuela M., M. Dominguez G. y G. Mejia Z.; “Evaluacion de la degradacion del plaguicida Clorpirifos en muestras de suelo utilizando el hongo phanerochaete chrysosporium”, (Junio, 2005), Revista facultad de ingenieria Universidad de Antioquia N.º 33. pp. 58-69.
2. Joseph C. Street, B.S., Ph.D., Logan, Utah, U.S.A., “Methods of Removal of Pesticide Residues”, Canad. Med. Ass. Jan 25, vol.100
3. Márquez Girón Sara, Ing Agríc, MSc; Mosquera Ballesteros Roberto, Ing Agríc, MSc; Márgela Herrera Torres, Zoot, MSc; Cristian Monedero, Zoot; “Estudio de la absorción y distribución del Clorpirifos en plantas de pasto Kikuyo”; (2011), Grupo de Investigación GRICA. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Antioquia, AA 1226, Medellín, Colombia.
4. -Dang Quang Hung; “Monitoring of organochlorine pesticides in surface waters in Hanoi and detoxification of organochlorine and organophosphorous pesticides in water by applying novel methods using ultraviolet irradiation air ionisation and solar photocatalysis”; (2011) Faculty of Biology/ Chemistry University of Bremen, Germany; disponible en http://elib.suub.uni-bremen.de/publications/dissertations/E-Diss359_DQHung_Dissertation_April_2002.pdf, consultado el 26-05-11.
5. Mohammad H. Badii, S. Varela; “Insecticidas Organofosforados: Efectos sobre la salud y el ambiente”, (2008); toxicología de insecticidas CULCyT, Año 5 Nº28.
6. Klein Gary M., MD, MBA, MPH, CHS-V; Disaster Response: The New Paradigm Disaster A Supplement to Emergency Medicine, (preparedness july 2008), disponible en: <http://www.emedmag.com/images/organophosphorus.pdf>, consultado el 08-05-2011.

7. J.A. Vale; “Toxicokinetic and toxicodynamic aspects of organophosphorus (OP) insecticide poisoning”; (1998) Toxicology Letters 102-103 649-652.
8. Reigart JR, Roberts JR. “Recognition and Management of Pesticide Poisonings”, (1999). 5th ed. Washington, DC: Environmental Protection Agency; pag:38-40
9. Organophosphorus pesticides. In: International Programme on Chemical Safety Poisons Information Monograph G001. World Health Organization, Geneva, Disponible en: <http://www.inchem.org/documents/pims/chemical/pimg001.htm>, consultado el 10-06-11.
10. Milan Jokanovi, “Medical treatment of acute poisoning with organophosphorus and carbamate pesticides, (2009) Toxicology Letters 190 107–115.
11. U.S. department of health and human services, public health service agency for toxic substances and disease registry; “toxicological profile for chlorpyrifos”, (2011) pag: 20; 118-121; disponible en: <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp84.pdf>; consultado el 11-06-11
12. Harvey David; “Modern Analytical Chemistry 1st ed.”; (2000) The McGraw-Hill Companies, pag: 595
13. Kazakevich Yuri, Lobrutto Rosario; “HPLC for Pharmaceutical Scientists”; (2007) John Wiley & Sons, Inc., Publication-2007, New Jersey; PAG: 9,10
14. Standard base techniques: High Performance Liquid Chromatography; Drenthe College, (2011) The Netherlands; disponible en: <http://www.standardbase.hu/tech/HPLC.pdf>; consultado el 09-06-11.
- 15 W. M. A. Niessen; “Current Practice of Gas Chromatography-Mass Spectrometry”; (2010), Marcel Dekker, Inc. pág: 2-10

- 16 Stuart Brian; “Practical Laboratory Skills Training Guides Gas Chromatography”; (2003), Royal Society of Chemistry, Thomas Graham House, pág: 2-4
- 17 Grob Robert L., Barry Eugene F.; “Modern practice of gas chromatography IV edition”,(2004), a John Wiley & Sons, Inc. Publication, pág.: 72-73
- 18 Harold M. McNair y James M. Miller; “Basic gas chromatography,second edition”, (2009), A John Wiley & Sons, Inc., Publication Pág: 16
- 19 Fulton G., Kitson S. y Charles N.; “Gas Chromatography and mass spectrometry, A practical guide”, (1996); Academic Press, Pág: 5-13
- 20 Konrad Grab; “Split and Splitless Injection for Quantitative Gas Chromatography”, (2001); Fourth, edition WILEY-VCH, Pág.: 10-12
- 21 Scott E. Van Bramer; “An Introduction to Mass Spectrometry” Widener University Department of Chemistry One University Place Chester, PA 19013
- 22 Hong J., Kim D. y Paeng K.; “Electron Impact Fragmentations of Chlorinated Organophosphorus Pesticides”; (2000) Bull. Korean Chem. Soc. , Vol. 21, N° 8
- 23 Gunter Henze, “Introduction to polarography and Voltammetry”, Methron Ltd.CH-9101 Herisau.
- 24 An Introduction in Theory, Metrohm Ltd.CH-9100 ,Herisau Switzerland, Voltammetry
- 25 Harvey. D. DePauw University. “Modern Analytical Chemistry”, (2000), McGraw-Hill Higher Education., Pag 508-520.
- 26 Lizhong Zhu, Li Lu y Dong Zhang; “Mitigation and remediation technologies for organic contaminated soils”, (2010), Front. Environ. Sci. Engin. China, 4(4): 373–386

- 27 Torres, R.D., “El papel de los microorganismos en la biodegradación de compuestos tóxicos. Ecosistemas”; (2003), Revista científica y técnica de ecología y medio ambiente, Año XII, N°2 / Mayo – Agosto.
28. Anatomía de raíz, micorrizas; morfología de plantas vasculares; Facultad de Ciencias Agrarias, Corrientes, Argentina; disponible en: <http://www.biologia.edu.ar/botanica/tema20/20-9micorrizas.htm>
- 29 Sánchez Martín Jesús, Rodríguez Gallego José Luis; “Fundamentos y aspectos biológicos, Biorremediación”; (2011) Universidad de Oviedo; articulo disponible en: http://ingenierosdeminasdelevante.org/documentos/fundamentos_%20biorremediacion.pdf, consultado el 11-06-11
- 30 He XinHua, Duan YingHua, Chen YingLong y Xu MingGang; “A 60-year journey of mycorrhizal research in China: Past, present and future directions”; (2010) Sci China Life Sci December Vol.53 No.12
- 31 Villavicencio Meta, “La micorriza arbuscular, características, producción y aplicaciones”, 1era edición 2004; Publicación Corpoica C.I. La Libertad; pág.: 7-8: http://books.google.com.pe/books?id=PVU9UThI7TgC&pg=PT9&dq=micorrizas&hl=es&ei=Rx72TYmsD-H30gHHzcDtDA&sa=X&oi=book_result&ct=result&resnum=4&ved=0CDYQ6AEwAw#
- 32 Douds David D. Jr., Millner Patricia D.; “Biodiversity of arbuscular mycorrhizal fungi in agroecosystems”; Agriculture, Ecosystems and Environment 74 (1999) 77–93
- 33 L.A.Harrier; “The arbuscular mycorrhizal symbiosis: a molecular review of the fungal dimension”; (march 2001)Journal of experiment Botany, vol. 52, Roots Special Issue, pp 469-478,.

- 34 Aguilera Gomez Luis I., Portugal Victor O., Arriaga M.Rubi, Contreras Alons Rogelio; “Micorrizas Arbusculares” (Nov-Febr, 2007-2008), Universidad Autonoma del estado de México, Ciencia Ergo Sum, vol. 14, nro 003 pp 300-306
35. Asociación española de Farmacéuticos de la Industria, “Validación de métodos analíticos”, (Marzo 2001) Gráficas Gispert S.A, Barcelona, pág.: 45-94
- 36 J.N. Miller, J.C Miller; “Estadística y Quimiometría para química analítica”, (2002) 4^a Edición; Pearson Educación S.A. Madrid pag:21-72
- 37 AOAC Guidelines for Single Laboratory -2002, disponible en: http://www.aoac.org/vmeth/Validation_Guidelines.htm
- 38 Sheheli I., Nazneen A., Mohammad S. H., Nilufar N., Mohammad M. y Mohammad I. R. M.; “Analysis of Some Pesticide Residues in Cauliflower by High Performance Liquid Chromatography”; (2009); American Journal of Environmental Sciences 5 (3): 325-329.
- 39 Aqel W. y Mohamed B.; “Quantification of nicotine, chlorpyrifos and their metabolites in rat plasma and urine using high-performance liquid chromatography”; (2001); Journal of Chromatography B, 757, 295–300
- 40 Aqel W. y Mohamed B.; “Development of a high-performance liquid chromatographic method for the quantification of chlorpyrifos, pyridostigmine bromide, N,N-diethyl- m-toluamide and their metabolites in rat plasma and urine”; (2001); Journal of Chromatography B, 754, 533–538
- 41 R.S. Battu, Balwinder Singh, and B.K. Kang; “Contamination of liquid milk and butter with pesticide residues in the Ludhiana district of Punjab state, India”; (2004); Ecotoxicology and Environmental Safety 59, 324–331

- 42 Diaz Gilberto, Ortiz Rutilio, Schettino Beatriz, Vega Salvador y Gutierrez Rey; “Organochlorine Pesticides Residues in Bottled Drinking Water from Mexico City”; (2009); Bull Environ Contam Toxicol 82:701–704
- 43 M. Brevik; “Gas Chromatographic Method for the Determination of Organochlorine Pesticides in Human Milk”; Veterinary College of Norway Department of Pharmacology and Toxicology Oslo, Norway
- 44 J. C. Snyder, R. R. Thacker, M. Boeniger y G. F. Antonious; “Potential of Solid Phase Extraction Disks to Aid Determination of Dislodgeable Foliar Residues of Chlorpyrifos, Malathion, Diazinon, and Acephate”; (2003); Arch. Environ. Contam. Toxicol. 45, 429–435
- 45 Rend K. Juhler; “Optimized method for the determination of organophosphorus pesticides in meat and fatty matrices”; (1997); Journal of Chromatography A, 786, 145-153
- 46 Coral del Val, J.M. Barea y C. Azcoan-Aguilar; “Assessing the tolerance to heavy metals of arbuscular mycorrhizal fungi isolated from sewage sludge-contaminated soils”; Applied Soil Ecology 11
- 47 J.N. Miller, J.C Miller; “Estadística y Quimiometría para química analítica”, 4^{ta} Edición; Pearson Educación S.A. Madrid 2002 pag:21-72
- 48 M. J. Sánchez Martín, Sánchez Camazano “Los plaguicidas adsorción y evolución en el suelo”, (1984), Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología Temas de divulgación 1^a Edición en 1984
- 49 Morales Carlos A., Rodríguez Nérida; “El Clorpirifos: posible disruptor endocrino en bovinos de leche”; (2004), Rev Col Ciencias Pecuarias Vol. 17:3.

- 50 Márquez SM, Mosquera R, Herrera M, Monedero C. “Estudio de la absorción y distribución del Clorpirifos en plantas de pasto Kikuyo (*Pennisetum clandestinum* Hochst ex chiov.) cultivadas hidropónicamente”, (2010), *Rev Colomb Cienc Pecu*; 158-165.
- 51 Gabaldón J.A., Maquieira A. y Puchades R. “Development of a simple extraction procedure for chlorpyrifos determination in food samples by immunoassay”, (2007), *Talanta* 71, 1001–1010
- 52 Food, “Pesticide Residue Monitoring Program 2002”; Consultado en Octubre-2013; disponible en: <http://www.fda.gov/Food/FoodborneIllnessContaminants/Pesticides/ucm125174.htm>
- 53 Salas J.H., Gonzáles M.M., Noa M. Pérez N. A.,*, Díaz G., Gutierrez R., Zazueta H. y Osuna I.; “Organophosphorus pesticide residues in mexican commercial pasteurized milk”, (2003), *J. Agric. Food chem.*, 51, 4468-4471
- 54 Castro Jiménez J.; “Determinación, persistencia y distribución de insecticidas de uso agrícola en el medio ambiente” Universidad Autónoma de Madrid-Departamento de Química Agrícola, Geología y Geoquímica.
- 55 Font G., Mañes J., Moltó J.C., Picó Y.; “Solid-phase extraction in multi-residue pesticide analysis of water”, (16 July 1993), *Volume 642, Issues 1–2*, Pages 135–161
- 56 Mage D. T.; “Dermal Absorption of Chlorpyrifos”; (2006), *Ann. Occup. Hyg.*, Vol. 50, No. 6, pp. 638–640.
- 57 Lopera Meza M, Peñuela Mesa G., Domínguez Gual M. y Mejía Zapata G.; “Evaluación de la degradación del plaguicida Clorpirifos en muestras de suelo utilizando el hongo *phanerochaete chrysosporium*”; (Junio,2005), *Rev. Fac. Ing.* N°33, pp. 58-69. Univ. Antioquía

58 Fu"sun Okc,u Pelit • Hasan Ertas, • F. Nil Ertas; "Development of an adsorptive catalytic stripping voltammetric method for the determination of an endocrine disruptor pesticide chlorpyrifos and its application to the wine samples", (2011), J Appl Electrochem 41:1279–1285

59 El-Shahawi M. M. Kamal; "Determination of the pesticide Chlorpyrifos by cathodic adsorptive stripping voltammetry"; (1998), Fresenius J Anal Chem 362 : 344–347

60 Fu"sun O. P., Hasan E.y F. N. Ertas; "Development of an adsorptive catalytic stripping voltammetric method for the determination of an endocrine disruptor pesticide chlorpyrifos and its application to the wine samples"; (2011), J Appl Electrochem 41:1279–1285

61 Meng S. L., Bor I. J., Hoang-Jyh L., Jhy S. L. "Trace measurement of dithiocarbamate based pesticide by adsorptive stripping voltammetry"; (1999) Analytica Chemical Acta 388 (111-117)



UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

ESCUELA DE POSTGRADO

MAESTRÍA EN QUÍMICA DEL MEDIO AMBIENTE



“DETERMINACIÓN DE CLORPIRIFOS EN LECHE DE VACUNO POR VOLTAMPEROMETRÍA,
HPLC Y GC-MS Y SU ALTERNATIVA DE REMOCIÓN CON MICORRIZAS ARBUSCULARES,
AREQUIPA-2012”

Plan de Tesis presentado por la Bachiller:

JEANETH MARISOL MEDINA PÉREZ

Para optar al título de:

Magister en Química del Medio Ambiente

Arequipa-Perú
2012

CAPÍTULO I

PREÁMBULO

En la actualidad los pesticidas se usan en todo el mundo para proteger los cultivos contra las enfermedades causadas por insectos, hongos, mohos y otros agentes. Además el número de pesticidas usados es muy alto y su composición química muy variada, por lo que los efectos tóxicos y los problemas ambientales derivados de su amplia utilización en la agricultura son complejos y variados. En nuestro medio los compuestos organofosforados son ampliamente utilizados y son catalogados como compuestos tóxicos para la fauna terrestre y acuática y para las personas. Algunos de ellos se pueden almacenar en el suelo desde algunos días hasta más de 20 años, dependiendo de su concentración, el tipo de suelo y las condiciones ambientales existentes. Por otro lado la determinación de estos pesticidas resulta una herramienta muy costosa y en algunos casos imposible de realizar. Es por esto que el presente estudio pretende brindar tres alternativas para la determinación de Clorpirifos en muestras de leche de vacuno, para determinar su presencia y la necesidad de su remoción.



CAPÍTULO II

PLANTEAMIENTO TEÓRICO DE LA INVESTIGACIÓN

1.- PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1. ENUNCIADO DEL PROBLEMA

“DETERMINACIÓN DE CLORPIRIFOS EN LECHE DE VACUNO POR VOLTAMPEROMETRÍA, HPLC Y GC-MS Y SU ALTERNATIVA DE REMOCIÓN CON MICORRIZAS ARBUSCULARES, AREQUIPA-2012”

1.2. DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA:

La Región Arequipa tiene en su sector agrario a una de sus más importantes posibilidades de desarrollo económico y social. A pesar de la aridez de su clima y en general su difícil fisiografía, su agricultura tiene aún un enorme potencial por ser explotado, la utilización de los plaguicidas ha conseguido aumentar la producción de alimentos y mejorar la salud humana.(7) Sin embargo deben vigilarse los daños ambientales ocasionados por su gran uso a gran escala por lo que es importante conocer los riesgos y la toxicidad de estos compuestos, especialmente para las especies que no son su objetivo.

El uso generalizado de los pesticidas en la agricultura, así como en la industria y en uso doméstico, puede llegar a producir un empobrecimiento de la biodiversidad, contaminar las aguas subterráneas y superficiales y amenazar la salud humana, tanto por exposición directa como a través de sus residuos en alimentos o en aguas potables.

Por otro lado, en nuestro medio actualmente se dispone de escasos lugares en los que se realiza la determinación de algunos pesticidas organofosforados, entre los que se encuentra el Clorpirifos, en especial en productos pecuarios.

Es por esto que se realizará un estudio de tipo experimental prospectivo, para lo que se propone el desarrollo de tres metodologías analíticas para la determinación de pesticidas organofosforados: por voltamperometría, HPLC y GC-MS a fin de determinar su presencia en un producto pecuario y por otro lado probar su remoción mediante técnicas de bioremediación.

1.3. JUSTIFICACIÓN:

En nuestra región el sector agropecuario juega un rol importante dada la alta productividad de sus tierras dotadas de excelentes condiciones agroclimáticas, además el uso de pesticidas es una práctica común realizada en muchos casos

indiscriminadamente, por lo que su uso podrías llegar hasta productos pecuarios, siendo escasas las opciones para su determinación en estos. El presente trabajo busca brindar tres alternativas para la determinación de Clorpirifos en leche de vacuno que se expende en la ciudad de Arequipa, dada la carencia de un control de estos productos, para así asegurar la inocuidad de dicho alimento y así justificar la remoción de estos insecticidas organofosforados de suelos en los que estén presentes mediante técnicas de bioremediación.

2. OBJETIVOS

- 6) Validar un método para la determinación cuantitativa de pesticida Clorpirifos por Cromatografía de gases acoplado a espectrómetro de masas.
- 7) Validar un método para la determinación cuantitativa de pesticida Clorpirifos por HPLC.
- 8) Validar un método para la determinación cuantitativa de pesticida Clorpirifos por Voltamperometría.
- 9) Determinar los niveles de Clorpirifos, por cromatografía de gases acoplada a masas, en leche de vacuno expendida en la ciudad de Arequipa, y evaluar si se encuentran dentro del límite máximo permitido establecido por el *Codex Alimentarius*.
- 10) Realizar pruebas *in vitro* de remoción de Clorpirifos con el uso de Micorrizas Arbusculares.

3. HIPÓTESIS

Dado el uso excesivo de pesticidas organofosforados como el Clorpirifos y sus características lipófilas, es probable que estos puedan llegar a productos de tipo pecuario como la leche de vacuno, constituyéndose en un riesgo para la salud pública, justificando la necesidad de alternativas tanto para su determinación como para su remoción.

4.- MARCO CONCEPTUAL

4.1. INTRODUCCIÓN

Los sistemas de producción agrícolas tradicionales en el Perú han estado acompañados del uso indiscriminado de plaguicidas altamente tóxicos como organofosforados y organoclorados, lo que ha llevado a la contaminación de los recursos naturales y al deterioro de los ecosistemas y de la calidad de la vida de las personas.(1)

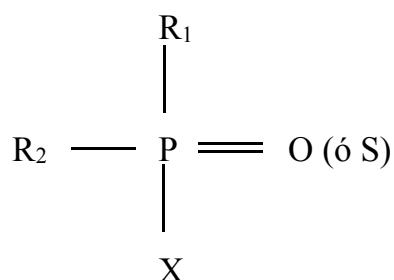
Estos plaguicidas persisten durante largos períodos antes de ser completamente degradadas por procesos naturales. Estos compuestos de larga duración migran muy lejos por ciclos entre las plantas y animales, y en el aire, sistemas de agua y suelo. La extensa producción y utilización de plaguicidas, por un lado y los problemas económicos, de peligros a la salud de los residuos persistentes en el otro, aumentan la pregunta pertinente: ¿la persistencia de los residuos son inevitables?, ¿cuáles son las perspectivas para su eliminación de los alimentos y otros sectores críticos?.(2) La persistencia de un residuo de plaguicida es un asunto complejo afectado no sólo por el producto químico y las características físicas de los compuestos relacionados y sus productos de degradación, sino también por la naturaleza de la formulación aplicada, los adsorbentes y disolventes empleados, y así sucesivamente. La persistencia también puede depender en gran grado de las características del huésped. La cera de las superficies de las plantas tiende a localizar y atrapar a muchos plaguicidas y por lo tanto se vuelven más resistentes a su eliminación. (2)

4.2. PESTICIDAS ORGANOFOSFORADOS

Nuevas generaciones de pesticidas como organofosforados y carbamatos han venido siendo desarrollados. Estos son altamente tóxicos, pero su tiempo de vida en el medio ambiente es corto. Muchos de estos productos, especialmente herbicidas, tienen un amplio espectro de acción, por lo que algunas veces pueden matar a especies no objetivo. Estas características tienen efectos en la cadena alimenticia, y en los hábitats y por lo tanto tienen un impacto en las especies que comen ciertos tipos de presas o que usan sus hábitats. (2)

4.2.1. Naturaleza y origen

La investigación de los compuestos orgánicos del fósforo se inició con Lassaigne en 1820 quien preparó ésteres fosfóricos, sin embargo las propiedades fueron descubiertas hasta 1937 por el Dr. Schrader quien desarrolló la siguiente fórmula básica.(3). En el cual R1 y R2 corresponden a diversos grupos funcionales, amidas, alcoholes, mercaptanos, fenoles, alquilos, etc. y X puede ser halógeno, paranitrofenol, derivados fenilamónicos fosfatos, etc.



P=O: fosfatos

P=O sustituido por P=S: tionofosfatos

-OR sustituido por -SR: tiolfosfatos

P=O sustituido por P=S y -OR sustituido por -SR: ditiofosfatos

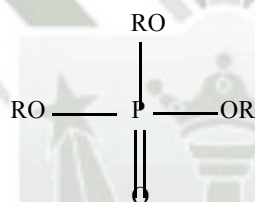
-OR sustituido por -R: fosfonatos

-OR sustituido por halógeno: halogenofosfoidatos

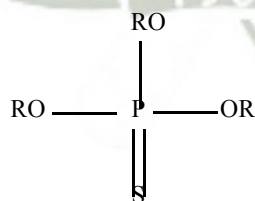
-OH sustituido por NH₂: amidofosfatos

Dependiendo de la sustitución de sus radicales en la fórmula básica de los organofosforados, puede dar origen a nuevos grupos de compuestos en los cuales los sustituyentes tienen gran influencia en las propiedades físico-químicas del compuesto y se relacionan además con su selectividad.

✓ Fosfato: Se forman al sustituir el grupo OH por el radical orgánico (OR), alta toxicidad y escasa estabilidad, entre ellos el mevinfos.

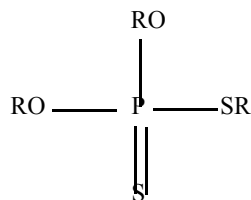


✓ Tiofosfatos: Se originan al sustituir el enlace P=O por un enlace P=S, menos tóxicos que fosfatos y constituyen un grupo importante, ya que en el mercado mundial, existen más de 30 compuestos de este tipo por ejemplo, Fenitrotión y el Foxim.

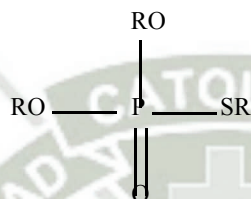


✓ Tionotiofosfato o fosforoditionato: Al sustituir simultáneamente el enlace P=O por P=S y de OR por SR, a nivel mundial más de 40 compuestos pertenecen a este

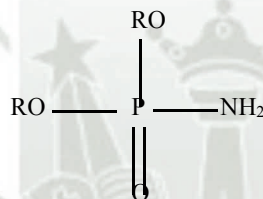
tipo: Dimetoato, Azinfosmetílico, Metidatió, Forato, Malatió y su fórmula básica es:



✓ Tiolfosfato: Se originan al sustituir el enlace OR por un SR, a él pertenecen Oxidemetón-metil, Edifenfos, etc.



✓ Fosforoamidico o amidofosfato: Se forman al sustituir OH por radical NH₂ a él pertenece el Metamidofos, su fórmula básica es:



Así debido al gran número y diversidad de estructuras existen más sustituciones en cuyo caso la nomenclatura de los compuestos se obtiene por combinación de la correspondiente sustitución Tabla N° 1 (3), Agentes organofosforados (OP) existen en una variedad de formas, incluyendo sprays, polvos y granulados.

Por lo general son inodoros e incoloros, aunque los fabricantes a veces añaden colores para facilitar su reconocimiento. Los agentes OP son lipofílicos, y muchos pueden ser fácilmente absorbidos a través de la piel y las membranas mucosas, también puede ser inhalados. La mayoría de los agentes de OP son líquidos en condiciones ideales y templadas, sin embargo, cuando se dispersan, los más volátiles se convierten en una forma vaporosa.(4)

Tabla N° 1 Agentes organofosforados

Lista de agentes organofosforados		
Acephate	EPN	Naled
Azinphos-methyl	Ethion	Parathion
Carbofuran	Ethoprop	Phorate

Carbophenothion	Famphur	Phosalone
Chlorfenvinphos	Fenamiphos	Phosmet
Chlorpyrifos	Fenitrothion	Phosphamidon
Coumaphos	Fensulfothion	Propyl
Crotoxypfos	Fenthion	thiopyrophosphate
Crufomate	Fonofos	Temephos
Demeton	Isofenfos	Terbufos
Diazinon	Malathion	Tetrachlorvinphos
Dichlorvos	Methamidophos	Tetraethyl pyrophosphate
Dicrotophos	Methidathion	(TEPP)
Dimethoate	Methyl parathion	Trichlorfon
Dioxathion	Mevinphos	
Disulfoton	Monocrotophos	

Fuente: Reigart JR, Roberts JR. *Recognition and Management of Pesticide Poisonings*. 5th ed. Washington, DC: Environmental Protection Agency; 1999.

4.2.2. Mecanismo de acción

Los plaguicidas OP funcionan mecánicamente como inhibidores de la colinesterasa. La colinesterasa es la enzima responsable del metabolismo de la acetilcolina (ACh) en la sinapsis después de que la acetilcolina es liberada de la neurona presináptica. Como resultado de la inhibición de la colinesterasa, la acetilcolina se acumula en las sinapsis, resultando en una estimulación persistente del receptor postsináptico, Figura N° 1 (6)

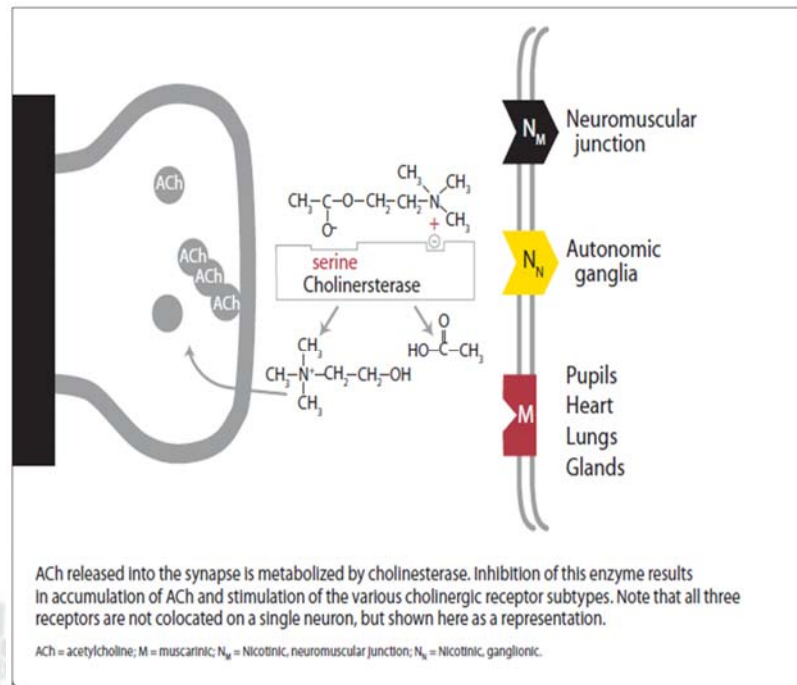
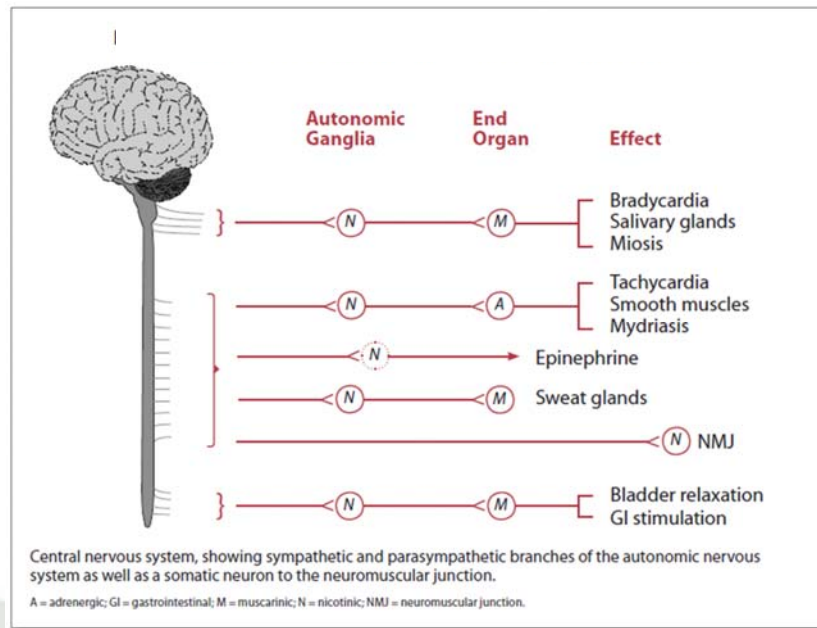


Fig. N° 1 Hidrólisis intrasináptica de acetilcolina

El neurotransmisor acetilcolina se produce en todo el sistema nervioso. Se puede encontrar en el cerebro, pero es particularmente importante en la función del sistema nervioso autónomo (SNA). La acetilcolina actúa como neurotransmisor en los ganglios de las ramas simpática y parasimpática del SNA, donde se une a los receptores colinérgicos nicotínicos (N_N). La inhibición de la colinesterasa en los ganglios simpáticos resulta en mayor eflujo simpático, produciendo, entre otros resultados, midriasis, hipertensión y taquicardia. (6)

Un efecto similar en los ganglios parasimpáticos resulta en salida parasimpática, provocando miosis, salivación, y bradicardia. El balance de la estimulación de estas dos ramas SNA determina en gran parte los hallazgos clínicos. Sin embargo, la acetilcolina es también un neurotransmisor postganglionar en las neuronas parasimpáticas que directamente inervan el corazón (a través del nervio vago nervioso), varias glándulas, y músculo liso bronquiolar. A diferencia de los ganglios, los receptores colinérgicos en estos lugares son del tipo muscarínico (M).



Fuente: Gary M. Klein, Disaster preparedness, A Supplement to Emergency Medicine July 2008

Figura N° 2 Efectos de la inhibición en el sistema nervioso

La acción directa de la colinesterasa en estos órganos explica el predominio de los resultados parasimpáticos en pacientes con intoxicación por plaguicidas OP, ya que esta clase de agentes parece inhibir preferentemente colinesterasas en estos lugares. La miosis es particularmente común en los pacientes que están expuestos a agentes OP volátiles, como consecuencia de la estimulación parasimpática directa, en comparación con la exposición sistémica.(6)

Los organofosforados OP compiten con la acetilcolina por la acetilcolinesterasa. El átomo central de fósforo muestra una deficiencia de electrones y esta configuración electrónica es favorable para la atracción hacia el sitio esteárico de la acetilcolinesterasa que posee un excedente de electrones. El fósforo forma una unión covalente con el grupo nucleofílico de la enzima. En el proceso normal la enzima fosforilada es relativamente estable lo cual impide la regeneración de la enzima libre y activa a menos que sea administrado un antídoto tipo **oxima** (antídoto bioquímico de las sustancias inhibitoras de la colinesterasa). La estructura química de cada organofosforado tiene importancia en su efecto sobre la enzima, al aumentar o disminuir la competencia con el sustrato, es decir, influye sobre su toxicidad. Cuando la acetilcolinesterasa es inhibida en forma irreversible por un organofosforado, la restauración de la actividad enzimática dependerá exclusivamente de la síntesis de nuevas moléculas de enzima. (4)

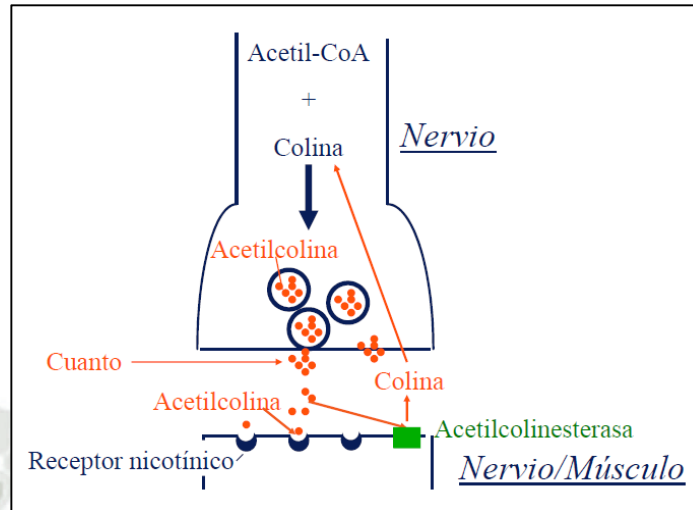


Fig. N° 3 Estimulación receptor postsináptico

4.2.3. Datos toxicocinéticos

Los datos toxicocinéticos humanos son limitados por lo que solo serán tomados aquellos aspectos que son clínicamente importantes (7)

❖ Absorción

Como la mayoría de los insecticidas OP son lipofílicos y no ionizados, se absorben rápidamente tras la inhalación o ingestión. Aunque la absorción cutánea de organofosforados tiende a ser lenta, la intoxicación grave todavía puede sobrevenir si la exposición es prolongada. El grado de absorción depende del tiempo de contacto con la piel, la lipofiliidad del agente involucrado y la presencia de disolventes, por ejemplo, xileno, y emulsionantes en la formulación, que pueden facilitar la absorción. Para los polvos, los más finos son de más rápida y completa absorción por la piel. Otros factores importantes son la volatilidad por ejemplo, plaguicidas diclorvos es mucho más volátil que el malatión., la permeabilidad de la ropa, la extensión de la superficie corporal y la higiene personal. La velocidad de absorción también varía con la región afectada de la piel. Por ejemplo, el paratión se absorbe más fácilmente a través de la piel del escroto, de las axilas, de la cabeza y del cuello que a través de manos y brazos. Es probable que la piel traumatizada o la presencia de la dermatitis permitan una mayor absorción de insecticidas OP.(7)

❖ Distribución y almacenamiento

Después de la absorción, los compuestos OP se acumulan rápidamente en grasa, hígado, riñones y glándulas salivales. Los fosforotioatos (P=S), (por ejemplo, diazinon, paration y bromofos), son más lipofílicos que los fosfatos (P=O) (por ejemplo diclorvos); y son almacenados ampliamente en grasa y pueden dar cuenta de la intoxicación prolongada y de la

recaída después de la aparente recuperación clínica que se ha observado en la intoxicación por estos insecticidas OP. Los compuestos OP son generalmente lipofílicos y, por tanto cruzan la barrera hematoencefálica en la mayoría de los casos.(5)

❖ **Biotransformación**

Los fosfatos P=O son biológicamente activos como inhibidores de acetilcolinesterasa AChE, mientras que fosforotioatos P=S necesitan de bioactivación a sus análogos oxon fosfato para convertirse biológicamente activos. Como consecuencia, las características de intoxicación después de la exposición a fosforotioatos P=S toman menos tiempo que cuando ocurre la oxidación aérea para generar trazas de oxon. Otros compuestos OP fosfatos P=O. son metabólicamente activados a sus correspondientes oxon por desulfuración oxidativa mediado por isoformas P450, por flavinas conteniendo enzimas mono-oxigenasas, por N-oxidación y por S-oxidación. Los oxones que inhiben la AChE pueden ser desactivados por hidrolasas, tales como las carboxilesterasas y por A-esterasas, por ejemplo la paraoxonasa.

❖ **Eliminación**

La eliminación de los metabolitos se produce principalmente en orina con menores cantidades en las heces y en el aire expirado. Algunos OPs, por ejemplo el diclorvos el cual no se almacena en la grasa de forma importante, pueden ser eliminados en horas mientras que el inhibidor oxon de clorpirifos o metil demeton-S-puede persistir durante días debido a su extenso almacenamiento en la grasa.(7)

❖ **Signos y síntomas de la intoxicación**

Los síntomas de la intoxicación aguda por organofosforados se desarrollan durante o después de la exposición, en minutos u horas, dependiendo del método de contacto. La exposición por inhalación resulta en una rápida aparición de síntomas tóxicos, seguida por la vía gastrointestinal y por último la vía cutánea. Todos los signos y los síntomas son de carácter colinérgico y afectan receptores nicotínicos, muscarínicos, y el centro sistema nervioso. Los síntomas críticos son los síntomas respiratorios. Se requieren de múltiples fasciculaciones musculares y debilidad para hacer necesaria la asistencia respiratoria, puesto que el paro respiratorio puede ocurrir repentinamente. Del mismo modo, broncorrea y broncoespasmos pueden a menudo obstaculizar los esfuerzos en la adecuada oxigenación del paciente.(8)

Pueden ocurrir broncoespasmo y broncorrea, produciendo opresión en el pecho, respiración sibilante, tos productiva y edema pulmonar. En una intoxicación grave la pérdida de la conciencia, incontinencia, convulsiones, y depresión respiratoria pueden amenazar la vida del paciente. La causa principal de muerte es la falla respiratoria, y por lo general hay un componente cardiovascular secundario. El síntoma clásico cardiovascular es la bradicardia

que puede progresar a paro sinusal. Sin embargo, esto puede ser sustituido por taquicardia e hipertensión por estimulación nicotínica (simpático ganglios). La miocardiopatía tóxica ha sido una importante característica de algunas intoxicaciones graves por organofosfatos. (8)

MUSCARINIC	NICOTINIC
Parasympathetic	Autonomic Ganglia (N_N)
Diaphoresis	<i>Sympathetic</i>
Diarrhea	Hypertension
Urination	Tachycardia
Miosis	Mydriasis
Bradycardia*	<i>Parasympathetic</i>
Bronchorrhea*	(Muscarinic effects)
Bronchoconstriction*	
Emesis	Neuromuscular Junction (N_M)
Lacrimation	Fasciculations
Salivation	Motor weakness
	Paralysis*

* Life-threatening symptoms

Fig. N° 4 Receptores colinérgicos y sus efectos

Algunos de los síntomas más comúnmente reportados incluyen dolor de cabeza, náuseas, mareos e hipersecreción, la última se manifiesta por la sudoración, salivación, lagrimeo y rinorrea. Las señales de empeoramiento del estado envenenado incluyen espasmos musculares, debilidad, temblores, incoordinación, vómito, calambres abdominales y diarrea. La miosis el cual a menudo es un signo útil para el diagnóstico en el que el paciente puede informar visión oscura y/o borrosa. La ansiedad y la inquietud son prominentes, al igual que algunos reportes de movimientos coreiformes. Han sido reportados síntomas psiquiátricos como la depresión, pérdida de memoria y confusión. La psicosis tóxica, que se manifiesta como confusión o comportamiento extraño, ha sido mal diagnosticada como intoxicación por alcohol. Los niños a menudo presentan un cuadro clínico un poco diferente que los adultos. Algunos de los signos típicos colinérgicos: bradicardia, fasciculaciones musculares, lagrimeo y sudoración, son menos comunes. Convulsiones (22% -25%) y alteraciones del estado mental incluyendo letargo y coma (54% -96%). En comparación, sólo el 3.2% de los adultos presentan convulsiones. Otros síntomas comunes que se presentan en los niños incluyen debilidad muscular flácida, miosis y salivación excesiva. (8)

❖ Confirmación de Envenenamiento

Si la intoxicación es probable, se debe tratar al paciente de inmediato sin esperar la confirmación de laboratorio. Se debe determinar la actividad colinesterásica y los niveles de AChE en glóbulos rojos. Se tienen como indicadores bioquímicos de excesiva absorción de organofosforados: depresiones de pseudocolinesterasa plasmática y/o actividad de las enzima acetilcolinesterasa RBC. Algunos organofosforados pueden inhibir de forma selectiva la pseudocolinesterasa plasmática o acetilcolinesterasa en glóbulos rojos. Una cantidad mínima

de organofosfato debe ser absorbida para deprimir las actividades de colinesterasa en sangre, pero las actividades de enzimas especialmente pseudocolinesterasas plasmáticas, pueden necesitar dosis considerablemente menores que los requeridos para causar envenenamiento sintomático. La depresión de la enzima suele ser evidente a los pocos minutos u horas de absorción significativa de los organofosforados.(8)

La depresión de la enzima plasmática persiste generalmente durante varios días a varias semanas. La actividad de la enzima de acetilcolinesterasa de glóbulos rojos puede no alcanzar su mínimo durante varios días, y por lo general se mantiene deprimida, a veces 1-3 meses, hasta que la enzima nueva reemplaza aquella inactivada por organofosforados. Los niveles más bajos por lo general indican la absorción excesiva de una sustancia química inhibidora de la colinesterasa. En ciertas condiciones, las actividades de la colinesterasa en plasma y glóbulos rojos son deprimidas en ausencia de inhibición química. Alrededor del 3% de los individuos tienen un nivel determinado genéticamente bajo de pseudocolinesterasa plasmática. Estas personas son particularmente vulnerables a la acción de la succinilcolina que paraliza los músculos (a menudo se administra a pacientes quirúrgicos), pero no por productos organofosforados. Los pacientes con hepatitis, cirrosis, desnutrición, alcoholismo crónico y dermatomiositis muestran actividades bajas de colinesterasa plasmática. Una serie de sustancias tóxicas, en particular de cocaína, disulfuro de carbono, sales de benzalconio, compuestos orgánicos de mercurio, ciguatoxinas y solaninas, pueden reducir la actividad de plasma pseudocolinesterasa. El embarazo precoz, las píldoras anticonceptivas, y la metoclopramida también pueden causar cierta depresión.(8)

Es menos probable que la acetilcolinesterasa eritrocitaria se vea más afectada por otros factores que no sean organofosforados, que la enzima plasmática. Sin embargo es reducida en ciertas condiciones poco comunes que dañan la membrana celular de color rojo, como la anemia hemolítica. Los fosfatos de alquilo y fenoles a la que los organofosforados son hidrolizados en el cuerpo, a menudo se pueden detectar en la orina durante la absorción de pesticidas y hasta cerca de 48 horas después de esta. Estos análisis a veces son útiles en la identificación y cuantificación de los plaguicidas existentes. El alquilfosfato urinario y análisis de fenoles puede demostrar la absorción de organofosforados en dosis más bajas que las requeridas para deprimir las actividades de la colinesterasa y en dosis mucho más bajas que las requeridas para producir los síntomas y signos. Su presencia puede ser simplemente un resultado de organofosfatos en la cadena alimentaria. La detección de organofosfatos intactos en la sangre no suele ser posible excepto durante o poco después de la absorción de una cantidad sustancial. En general, los organofosforados no permanecen sin hidrolizar en la sangre durante más de unos pocos minutos u horas, a menos que la cantidad absorbida sea grande o que las enzimas de hidrólisis hepáticas estén inhibidas.(8)

❖ Manejo de la intoxicación por organofosforados

El tratamiento de la intoxicación por plaguicidas organofosforados debe comenzar con la descontaminación y la reanimación si es necesaria. La descontaminación es vital en la reducción de la dosis del plaguicida absorbido, pero se debe tener cuidado de no contaminarse otros, como personal médico y paramédico. En el caso de la ingestión, el lavado se puede realizar, y debe ser administrado el carbón activado. El paciente debe ser observado cuidadosamente durante las primeras etapas del tratamiento, porque puede haber obstrucción de las vías respiratorias.

Fenotiazinas, parasimpaticomiméticos y los antihistamínicos están contraindicados, ya que tienen una actividad anticolinesterasa. Si no hay posibilidad de ventilación artificial, los depresores del sistema nervioso central (por ejemplo, opiáceos) deben ser evitados ya que puede aumentar el riesgo de paro respiratorio. Los solvente vehículos y otros componentes de la formula plaguicidas de organofosforados puede complicar el cuadro clínico y debe tomarse en consideración.(9)

❖ Antídotos para el tratamiento de la intoxicación humana por plaguicidas organofosforados

✓ Atropina

La atropina actúa bloqueando los efectos de las concentraciones en exceso de acetilcolina en las sinapsis colinérgicas muscarínicas seguido por la inhibición de la AChE. La atropina es el fármaco de elección inicial en la intoxicación aguda por OP. El sulfato de atropina en combinación con una oxima se ha utilizado en la terapia tradicional para intoxicaciones OP incluyendo insecticidas. La atropina puede aliviar los síntomas siguientes de intoxicación por OP: sudoración, salivación, rinorrea, lagrimeo, náuseas, vómitos y diarrea, y puede ayudar a controlar la bradicardia y las depresiones circulatorias, la dilatación de los bronquios y suprimir la broncorrea. La atropina no se une a receptores nicotínicos y no puede aliviar los efectos nicotínicos en la intoxicación por OP. Se ha demostrado que la atropina puede tener efectos anticonvulsivantes y evita el daño cerebral inducido por ciertos OP. Otros han afirmado que la atropina puede bloquear sólo parcialmente las convulsiones después de la exposición a estos agentes ya que otros sistemas de transmisión (GABA, glutamato) se ven afectados en la sobre estimulación colinérgica en el cerebro. Los efectos de la atropina en la intoxicación por OP son mucho más complejos que en el bloqueo muscarínico. (10)

✓ **Diazepam**

Las benzodiazepinas son depresoras del SNC, ansiolíticos y relajantes musculares. Su principal sitio de acción es en el receptor ácido gamma-aminobutírico (GABA). Las benzodiazepinas disminuyen la mortalidad después de la exposición a agentes OP, aumentan la actividad inhibitoria en el sistema nervioso central e inhiben la depresión respiratoria central inducida por OP por un mecanismo no claro. El mecanismo puede estar relacionado con la prevención de la sobre estimulación del centro respiratorio por el exceso de la ACh. La dosis de benzodiazepina debe aumentar parcialmente para controlar las convulsiones del paciente y/o agitación. En un adulto, una dosis inicial adecuada de diazepam es de 10 mg, en un niño de 0,5 mg/kg hasta 10 mg. Esta dosis puede repetirse hasta que la agitación y las convulsiones sean controladas. Como las benzodiazepinas IV pueden causar depresión del SNC y respiratoria, debe haber un control de vía aérea si el paciente no está intubado. (6,10)

✓ **Piridin oximas**

Oximas son una clase de agentes farmacológicos utilizados clínicamente para revertir los efectos neuromusculares de plaguicidas OP, así como para disminuir los requerimientos de la atropina. Esta terapia es necesaria porque los agentes antimuscarínicos tales como la atropina no influyen en los efectos nicotínicos producidos en una intoxicación por OP. Oximas debe darse a principios de curso clínico del paciente para proporcionar el máximo beneficio. Como se ha señalado, los pesticidas se unen a la colinesterasa (ChE) y evitan la degradación de ACh.(6)

La interacción inicial de los plaguicidas organofosforados con colinesterasa es reversible, sin embargo, con el tiempo, un enlace covalente se forma por fosforilación y la enzima es irreversiblemente inhibida. Esta inhibición irreversible de la la enzima colinesterasa se conoce como envejecimiento.(6)

Numerosos estudios en los últimos decenios han investigado el mecanismo de acción de las piridin oximas. Hay evidencia convincente de que la potencia antidoto de las piridin oximas es principalmente atribuida a su capacidad para reactivar las colinesterasas fosforiladas. Las oximas reactivan la colinesterasa fosforilada desplazando el resto fosforilo de la enzima en virtud de su gran afinidad por la enzima y su poderosa nucleofilicidad. La reactivación procede como una reacción en dos etapas a través de la formación de un complejo intermedio de Michaelis Menten que conduce a la formación de residuos fosforilos más estables unidos al grupo hidroxilo de la serina en el sitio activo de la AChE. La tasa de reactivación depende de la estructura del residuo fosforilo unido a la enzima, la fuente de la enzima, la estructura y concentración de la oxima que está presente en el sitio activo, y la tasa de desalquilación post inhibitoria conocido como envejecimiento. Las oximas

fosforiladas se forman durante la reacción de reactivación y algunos de ellos parecen ser inhibidores potentes de la AChE.(10)

La dosificación de acuerdo al régimen de la Organización Mundial de la Salud es un mínimo de 30 mg/kg en bolo IV seguido de > 8 mg/kg/h en infusión.(6)

Los efectos adversos de pralidoxima incluyen mareos, cambios visuales como visión borrosa o diplopía, dolor de cabeza, somnolencia, náuseas, taquicardia, aumento de la presión arterial, hiperventilación, disminución de la función renal y dolor en el lugar de inyección. Estos efectos son raros y no debería detener el médico de proporcionar la terapia con este agente.(6)

4.2.4. Clorpirifos

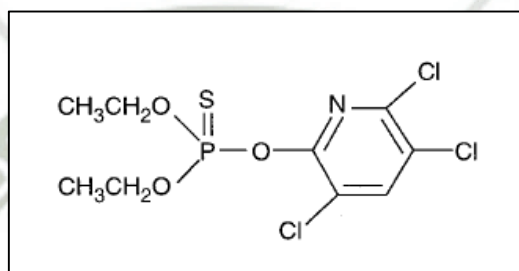


Figura N° 5 Estructura de Clorpirifos

El clorpirifos es un insecticida organofosforado que ha sido ampliamente utilizado en el hogar y en la granja, es un sólido blanco cristalino con un olor fuerte. No se mezcla bien con agua, por lo que generalmente se mezcla con líquidos aceitosos antes de ser aplicadas a los cultivos o animales. También se puede aplicar a los cultivos en una forma microencapsulados.

El clorpirifos entra al medio ambiente mediante la aplicación directa a los cultivos, pastos, animales domésticos, y en el lugar de origen, también puede entrar al ambiente a través de la volatilización, derrames y la eliminación de residuos. El clorpirifos aplicado al suelo por lo general se queda en la zona donde se ha aplicado porque se adhiere fuertemente a partículas del suelo. Debido a esto, existe una baja probabilidad de que el clorpirifos se lava el suelo y entrar en los sistemas locales de agua. La volatilización es la principal forma en la que el clorpirifos se dispersa después de que se ha aplicado.(1,11)

Propiedad	Valoración
Apariencia	Sólido cristalino de ámbar a blanco con un leve olor sulfúrico
Peso Molecular	350.62
Solubilidad en agua	2 mg/L a 25 °C
Solubilidad en otros solventes	Benceno 7900 g/Kg, acetona 6500 g/Kg, cloroformo 6300 g/Kg a 25 °C

Punto de fusión	41.5 a 44 °C
Presión de vapor	2.5 mPa a 25 °C
Coefficiente de partición	4.6990
Coefficiente de adsorción	6070

Fuente: Department of Health and Human Services

Fig. N° 6 Propiedades fisicoquímicas del clorpirifos

El clorpirifos es un insecticida clasificado como categoría II (Córdoba, 2001), en la figura N° 6 se presentan sus características físico-químicas.

Según la ficha técnica de la U. S. Department of Health and Human Services (2009) tiene el nombre sistemático clorpirifos es O,Odietyl O-3,5,6 triclora-2-piridil fosforotioato) y fue registrado por la Dow Chemical Company en 1965.(11)

Referencia	Persistencia en suelo	Persistencia en los vegetales
Extención toxicology Network, 1996	60 y 120 días, rango 2 semanas-años	10-14 días, sobre la superficie
National Pesticide telecommunications Network, 1999	30 días	4.4 días
Royal Society of chemistry, 1987	80-100 días	-
Márquez G Sara, 2001	63 días	63 días

Fuente: Department of Health and Human Services

Fig. N° 7 Persistencia del clorpirifos en suelos y en vegetales

4.3. DETERMINACIÓN DE PESTICIDAS ORGANOFOSFORADOS

La elevada toxicidad de los plaguicidas presentes en el medio ambiente obliga a disponer de métodos analíticos fiables, rápidos, económicos y suficientemente sensibles que permitan el control de los compuestos tóxicos en diversos tipos de muestras.(12)

Le elección de la técnica analítica para la determinación instrumental depende de una variedad de factores incluyendo coste, disponibilidad, selectividad, sensibilidad, propiedades de los analitos y capacidad de análisis. En el caso de los pesticidas esta determinación se lleva a cabo mediante técnicas cromatograficas, cromatografía de gases (CG) o cromatografía liquida de alta resolución (HPLC), figura N° 8

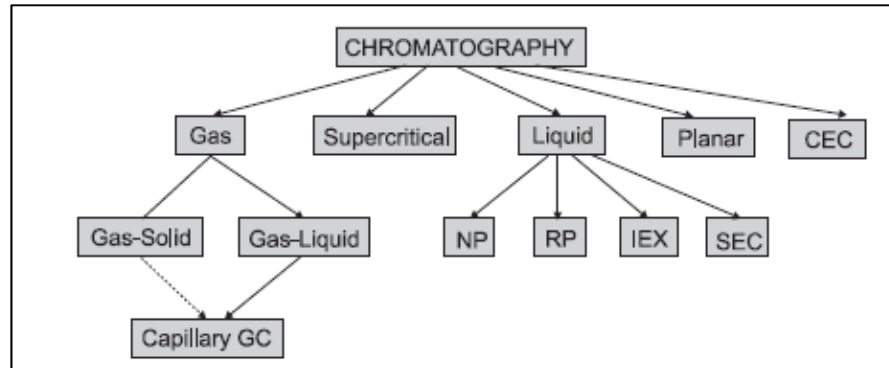


Fig. N° 8 Clasificación de los modos cromatográficos

A pesar de que la cromatografía de gases es ampliamente utilizada, esta se limita a las muestras que son térmicamente estables y volatilizan fácilmente. Las muestras no volátiles, como los péptidos e hidratos de carbono, pueden ser analizados por GC, pero sólo después de que se han hecho más volátiles por una derivatización química adecuada. Por esta razón, de las distintas técnicas incluidas en el ámbito general, la cromatografía de líquidos es de las técnicas de separación más utilizadas. (10)

4.3.1. Cromatografía Líquida De Alto Desempeño (HPLC)

Cromatografía líquida de alto desempeño (HPLC) es un modo de cromatografía y una de las técnicas analíticas más utilizadas. El proceso cromatográfico se puede definir como la técnica de separación de transferencia de masa entre la fase estacionaria y móvil. El HPLC utiliza una fase móvil líquida para separar los componentes de una mezcla. La fase estacionaria puede ser un líquido o una fase sólida. (13)

Los componentes son primero disueltos en un disolvente, y luego forzado a fluir a través de una columna cromatográfica bajo una presión alta. En la columna, la mezcla se separa en sus componentes. La calidad de la resolución es importante, y depende del grado de interacción entre los componentes de solutos y la fase estacionaria. La fase estacionaria se define como el material de empaque inmóvil en la columna. La interacción del soluto con fases móviles y estacionarias puede ser manipulada a través de diferentes opciones de disolventes y fases estacionarias. Como resultado, HPLC adquiere un alto grado de versatilidad que no se encuentran en otros sistemas de cromatográficos y tiene la capacidad de separar fácilmente una gran variedad de mezclas químicas. (13)

4.3.1.2. Sistema HPLC

El típico sistema de HPLC consiste en los siguientes componentes principales (13):

- ✓ Reservorios de Solvente. Almacenan la suficiente cantidad de solventes HPLC para la operación continua del sistema. Puede ser equipado con un

sistema de desgasificación en línea y filtros especiales para aislar los solventes de la influencia del medio ambiente.

✓ Bomba. Esta permite el flujo constante y continuo de la fase móvil a través del sistema, las bombas más modernas permiten controlar la mezcla de diferentes solventes de diferentes reservorios.

✓ Inyector. Esto permite la introducción (inyección) de la mezcla de analitos en la corriente de la fase móvil antes de entrar en la columna, los inyectores más modernos son inyectores automáticos, que permiten inyecciones programadas de diferentes volúmenes de muestras que se retiran de los viales en la bandeja del muestreador automático.

✓ Columna. Este es el corazón del sistema HPLC, lo que realmente produce una separación de los analitos de la mezcla. Es el lugar donde la fase móvil está en contacto con la fase estacionaria, formando una interfaz con una superficie enorme. La mayor parte de la cromatografía de desarrollo en los últimos años se dirige hacia el diseño de muchas maneras diferentes para mejorar este contacto de interface, actuales columnas de HPLC en la mayoría de los casos son un tubo de acero inoxidable lleno de muy pequeñas partículas de material poroso rígido (1-5.µm). El material de empaque se mantiene dentro de la columna con un especial accesorio final equipado con fritas permeables que permita las conexiones de la línea de líquido (para ofrecer fase móvil a la columna).

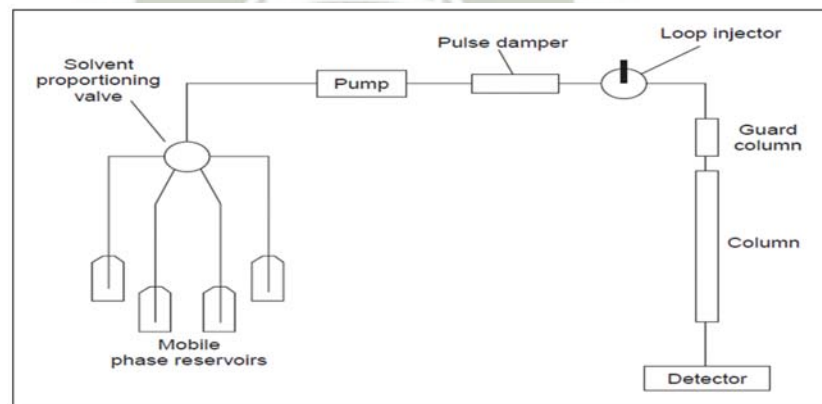


Fig. N° 9 Diagrama de sistema de HPLC

Las fritas de acero inoxidable o de titanio tiene un tamaño de poro de 0.2-0.5 μm , que permite pasar la fase móvil, mientras que las pequeñas partículas de material de empaque se mantienen dentro de la columna. La columna es el "corazón" del sistema cromatográfico, y es el único dispositivo en que se lleva a cabo la separación real de la mezcla de analitos.(13)

✓ Columnas monolíticas. Estas columnas consisten en una única pieza (de ahí su nombre) de material poroso con características únicas en cuanto a permeabilidad y eficiencia. Se han desarrollado dos tipos principales de columnas monolíticas, las basadas en polímeros orgánicos y las basadas en monolitos de sílice. Las de tipo orgánico son, en general, más utilizadas para separaciones de macromoléculas como proteínas o anticuerpos utilizando fases móviles mayoritariamente acuosas; estos polímeros suelen contraerse y expandirse al variar mucho la concentración del modificador orgánico. Las basadas en sílice tienen una estructura bimodal caracterizada por macro-poros de unos 2 μm y meso-poros de aproximadamente 13 nm. Sus propiedades son similares a las rellenas de partículas del orden de los 3.5 μm en cuanto a eficiencia, pero de permeabilidad comparable a las que contienen partículas de 11 μm . Las características físicas de estas columnas radican en que poseen mayor velocidad de transferencia de masa y pueden ser utilizadas a caudales entre 3 y 10 veces más elevados que las columnas particuladas, permitiendo reducir significativamente el tiempo de análisis. Otro enfoque que se emplea con estas columnas consiste en utilizar suficiente longitud de columna (hasta el límite de presión provisto por el sistema) con el fin de lograr un gran número de platos teóricos. Entre las limitaciones generales de estos monolitos se encuentra el límite de presión que soportan: no mayor a 200 bar, rangos reducidos de pH de fase móvil posibles (entre 2 y 8), incompatibilidad con algunos solventes ya que se encuentran construidas en PEEK (acrónimo de "polyether etherketone"), poca variedad de fases estacionarias y muy pocos fabricantes por fuertes restricciones en las patentes de su fabricación.

✓ Detector. Este es un dispositivo para el registro continuo de las propiedades físicas específicas (a veces química) de la columna de efluentes. El detector

más común utilizado en el análisis de productos farmacéuticos es UV (ultravioleta), que permite la monitorización y registro continuo de la absorbancia UV a una longitud de onda seleccionada o en un lapso de longitudes de onda (detección de diodos). Si el analito absorbe más que el fondo (fase móvil), se obtiene una señal positiva.(13)

✓ Sistema de control y adquisición de datos. El sistema informático controla todos los parámetros de un instrumento de HPLC (composición del eluyente (mezcla de diferentes solventes), la temperatura, la secuencias de inyección, etc) y adquiere los datos del detector y los monitorea el rendimiento del sistema (control continuo de la composición de fase móvil, la temperatura , contrapresión, etc.) (13)

4.3.1.3. Tipos de HPLC

Hay muchas maneras de clasificar a la cromatografía líquida. Si esta clasificación se basa en la naturaleza de la fase estacionaria y el proceso de separación, se pueden especificar tres modos: (14)

A. Cromatografía de adsorción: la fase estacionaria es un adsorbente (como sílica gel o cualquier otro empaque basado en sílica) y la separación se basa en repetir los pasos de absorción y adsorción.

B. Cromatografía de intercambio iónico: la fase inmóvil tiene una superficie de carga iónica de carga opuesta a los iones de la muestra. Esta técnica se utiliza casi exclusivamente con muestras iónicas o ionizables. Cuanto más fuerte sea la carga de la muestra, más fuerte será atraído a la superficie iónica y, por tanto, más tiempo tendrá para eluir. La fase móvil es un tampón acuoso, donde se utilizan tanto el pH y fuerza iónica para controlar el tiempo de elución

C. Cromatografía de exclusión de tamaño: la columna se llena con material que tiene controlada con precisión los tamaños de poros, y la muestra es filtrada de acuerdo a su tamaño molecular solvatado. Las moléculas más grandes son rápidamente pasadas a través de la columna; las moléculas más pequeñas penetran en el interior de la porosidad de las partículas de embalaje y

eluyen después. Esta técnica también se conoce como filtración en gel o cromatografía de permeación en gel.

En cuanto al primer tipo, dos modos se definen en función de la polaridad relativa de las dos fases: la cromatografía en fase reversa y normal. En cromatografía de fase normal, la fase inmóvil es de naturaleza fuertemente polar (por ejemplo, gel de sílice), y la fase móvil es no polar (como el n-hexano). Muestras polares son por lo tanto retenidas en la superficie polar del empaque de la columna. La cromatografía de fase inversa es la inversa de esta. La fase estacionaria fija es de naturaleza no polar, mientras que la fase móvil es un líquido polar, como mezclas de agua y el metanol o acetonitrilo. Aquí, los materiales más polares son los que más tiempo se conservarán. La cromatografía en fase reversa se utiliza casi el 90% de todas las aplicaciones cromatográficas.

La polaridad del eluyente desempeña el papel principal en todos los tipos de HPLC. Hay dos tipos de elución: isocrática y gradiente. En el primer tipo, la composición del eluyente constante es bombeada a través de la columna durante todo el análisis. En el segundo tipo, la composición de eluyente (y fuerza) está en constante cambio durante la corrida.(14)

4.3.1.4. Fases móviles

El orden de elución de los solutos en HPLC se rige por la polaridad. En una separación de fase normal los solutos menos polares pasan proporcionalmente menos tiempo en la fase estacionaria polar y son los primeros en eluir de la columna. Los tiempos de retención se controlan mediante la selección de la fase móvil, una fase móvil menos polar lleva a los tiempos de retención más largo. Si, por ejemplo, una separación es pobre porque los solutos están eluyendo con demasiada rapidez, el cambio a una fase móvil menos polar lleva a tiempos de retención más largos y más oportunidades para una separación aceptable. Cuando dos solutos tienen adecuada resolución el cambio a una fase móvil más polar puede proporcionar una separación aceptable con un tiempo de análisis más cortos. En una separación de fase inversa el orden de elución se invierte, siendo los solutos polares los primeros en eluir. El aumento de la polaridad de la fase móvil lleva a tiempos de retención más largos, mientras que tiempos de retención más cortos requieren de una fase móvil de baja polaridad. (12)

Mobile Phase	Polarity Index (P')	UV Cutoff (nm)
cyclohexane	0.04	210
<i>n</i> -hexane	0.1	210
carbon tetrachloride	1.6	265
<i>i</i> -propyl ether	2.4	220
toluene	2.4	286
diethyl ether	2.8	218
tetrahydrofuran	4.0	220
ethanol	4.3	210
ethyl acetate	4.4	255
dioxane	4.8	215
methanol	5.1	210
acetonitrile	5.8	190
water	10.2	—

Fig. N° 10 Polaridades de fase móvil de HPLC

Para la elección de la fase móvil varios índices se han desarrollado para ayudar a seleccionar una fase móvil, el más útil es el índice de polaridad figura N° 10 que proporciona valores para el índice de polaridad P', de varias fases móviles de uso general, en los que mayores valores de P' corresponden a solventes más polares. (12)

Fases móviles de polaridad intermedia se puede formar mediante la mezcla de dos o más de las fases móviles de la figura N° 10

4.3.1.5. Parámetros de HPLC

✓ **Volumen de retención**

La distancia máxima del pico desde el punto de inyección se expresa en unidades de tiempo y se denomina tiempo de retención (t_R), y sirve como un identificador para el analito dado en un sistema en particular. El tiempo de retención es, probablemente, el descriptor más utilizado del comportamiento analito, y es el parámetro más fácil de medir. Sin embargo, a pesar de que es fácilmente medible, es el parámetro menos universal.

Tiempo de retención del compuesto depende del flujo de la fase móvil, mientras más rápida sea la velocidad de flujo, menor será el tiempo de retención del analito. Es también dependiente de la estabilidad del tipo de flujo. El producto del tiempo de retención del analito y el flujo de la fase móvil es el volumen de retención (V_R) volumen de retención V_R del compuesto que es el descriptor más universal del comportamiento del analito en el sistema cromatográfico, ya que es menos dependiente de los parámetros instrumentales.

✓ Volumen vacío

Incluso si el analito no interacciona con la fase estacionaria, no aparecerá en el detector inmediatamente después de la inyección. Una columna HPLC está llena de pequeñas partículas de material poroso que tienen un volumen significativo de la fase líquida entre las partículas y el interior de su espacio poroso, por lo que el analito no interactúa todavía, y tiene que viajar a través de este volumen antes de entrar en el detector.

El volumen de la fase líquida de la columna se llama "volumen vacío" (V_0). Varios otros nombres se utilizan también en literatura "volumen muertos", "el volumen de retención", algunas veces volumen de retención de los componentes no retenidos.

En un sistema particular de HPLC en el que el sistema ofrece un flujo (F) constante y estable, se puede convertir el volumen de retención (V_R) y el volumen vacío (V_0) en el tiempo de retención (T_R) y un tiempo vacío (t_0)

El tiempo vacío puede interpretarse como parte del tiempo de retención total de analito, tiempo que el analito en realidad pasa en la fase móvil moviéndose a través de la columna, y para el resto del tiempo de retención del analito se encuentra en la superficie de la fase estacionaria.

✓ Factor de retención

La retención del analito se compone de dos partes: (1) el tiempo que el componente se encuentra en la fase móvil y en realidad se mueve a través de la columna y (2) el momento en que el analito es retenido en la fase estacionaria.

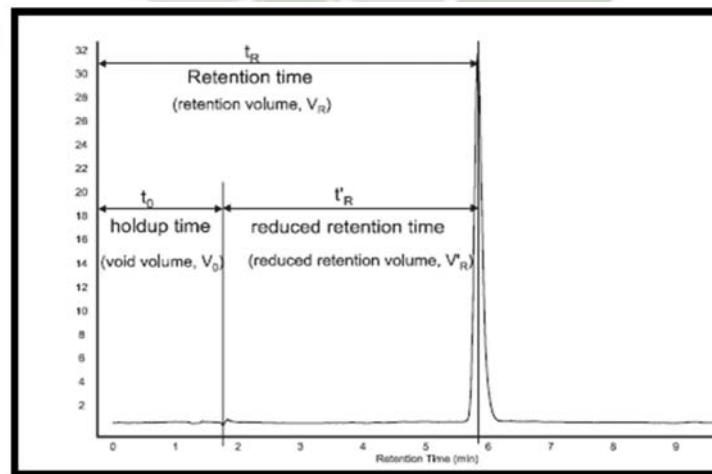


Fig. N° 11 Parámetros de retención del analito

La diferencia entre el tiempo de retención total (T_R) y el tiempo muerto se llama tiempo de retención reducido ($t'_{R'}$), el volumen de retención reducida V'_R corresponde a la diferencia entre el volumen de retención del analito y el volumen vacío.

La relación entre el volumen de retención reducido y el volumen vacío es un parámetro dimensional ampliamente usado llamado factor de retención, k . (13)

✓ **Selectividad**

La capacidad del sistema cromatográfico para discriminar diferentes analitos se llama selectividad (α). La selectividad se determina como la relación entre los factores de retención de dos analitos, o la relación entre los tiempos de retención reducidos.

El aumento de la selectividad en el desarrollo de la separación de una mezcla compleja es la meta principal de cualquier cromatógrafo, porque si la selectividad para el par de analitos es igual a 1, entonces no importa cómo delimitar picos o la velocidad de su separación, no se podrá separar estos componentes hasta que aumentar la selectividad.(11)

✓ **Eficiencia**

Un analito se inyecta en la columna en forma de zona muy pequeña con una distribución uniforme de la sustancia analizada dentro de esta zona. Si bien esta zona se está moviendo a través de la columna, se amplía. El grado de esta banda se llama la ampliación de la eficiencia. Hay varias teorías diferentes (aproximaciones matemáticas) utilizado para la descripción de la ampliación de la banda. Martin y Syngge, introdujo la teoría de platos para la evaluación de la eficiencia de la columna. La teoría de los platos supone que el analito se encuentra en el equilibrio con la fase estacionaria y la columna se divide en una serie de platos hipotéticos. Cada plato tiene una altura finita (altura de plato teórico eficaz, HETP), y un analito pasa un tiempo finito en este plato. Este se considera que es suficiente para alcanzar el equilibrio. Cuanto menor sea la de altura de la placa o mayor es el número de placas, más eficiente será el intercambio del analito se encuentra entre dos fases, y la mejor será la separación. Esa es la razón por eficiencia de la columna se mide en número de platos teóricos. (13)

✓ **Resolución**

La distancia máxima entre los picos refleja la selectividad del sistema. Cuanto mayor sea la distancia, mayor es la selectividad. La anchura del pico cromatográfico refleja la ampliación de la banda del sistema y por lo tanto la eficiencia. La resolución, R , se define como la razón de la distancia entre dos picos a la anchura media de estos picos (al inicio), este descriptor abarca tanto la eficiencia y la selectividad.(13)

4.3.2. CROMATOGRAFÍA DE GASES (GC)

La cromatografía de gases (GC) fue descrita por primera vez en 1952 por James y Martin con la separación de una mezcla de pequeños ácidos carboxílicos, inicialmente se aplicaron columnas empacadas. El poder de GC se amplió sustancialmente por la introducción de columnas capilares en 1958 por Golay. En la mayoría de los casos, se aplicaron frágiles columnas capilares de vidrio. Como tal, la introducción de la columna capilar de sílice fundida en 1976 por Dandeneau Zerenner y puede ser considerado como un gran avance en el desarrollo de la GC. (15)

La muestra se introduce normalmente en forma de vapor a la columna cromatográfica. En la columna, la solubilidad de cada componente en la fase gaseosa depende de su presión de vapor, la cual es a su vez una función de la temperatura de la columna y la afinidad entre el compuesto y la fase estacionaria. Las diferencias en la presión de vapor hacen que las moléculas de cada componente a partición entre la fase de gas móvil y la fase estacionaria. De hecho, como las moléculas se están continuamente moviendo rápidamente entre las dos fases, es la diferencia en el tiempo de residencia en cada fase que afecta a la partición. Cada vez que una molécula entra en la fase de gas se hace circular hacia el detector por el flujo de gas portador. Por consiguiente, los compuestos que tienen diferentes propiedades físicas y químicas llegarán al detector a diferentes tiempos. La fase estacionaria puede ser un sólido o un recubrimiento líquido un soporte sólido inerte, esto da lugar a dos formas de cromatografía de gases; gas-sólido (SGC) y cromatografía gas-líquido (GLC), respectivamente. (16,17)

GC tiene varias ventajas importantes que se resumen en la siguiente lista.

- Análisis rápido, normalmente minutos, eficiente proporcionando alta resolución, sensible, fácil de detectar ppm y, a menudo ppb.
- No destructivos, posibilitando on - line acoplamiento, por ejemplo, a la masa espectrómetro
- Análisis cuantitativo de alta precisión, RSDs típicos de 1-5%
- Requiere muestras pequeñas, por lo general μL
- Fiable y relativamente simple
- Económico

4.3.2.1 SISTEMA GC

✓ Gas portador

A la fase móvil que transporta los analitos desde la columna al detector se le denomina gas portador. El gas portador es inerte por lo que no tiene ningún tipo de interacción ni con la fase estacionaria ni con los analitos. Los gases más utilizados son los siguientes: el

helio, nitrógeno e hidrógeno especialmente y en algunos casos también el argón y el dióxido de carbono.

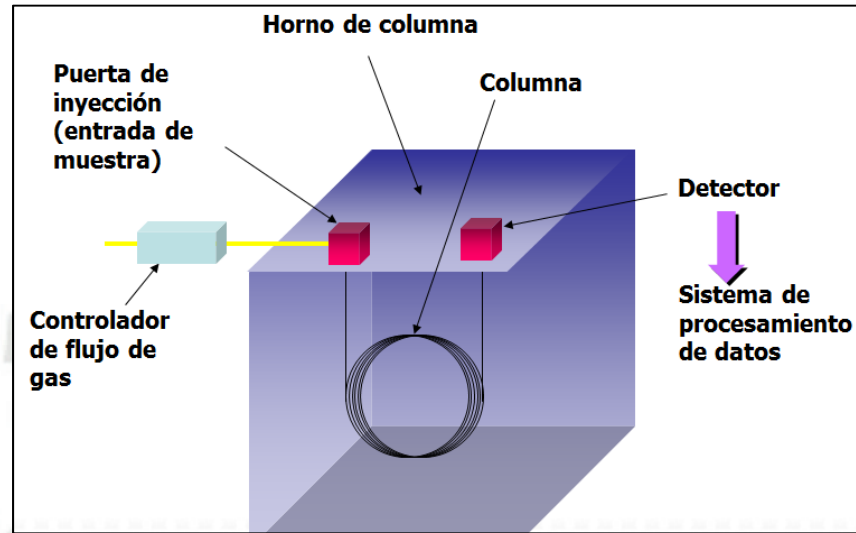


Figura N° 12 Esquema general de un cromatógrafo de gases (GC)

Para el detector de conductividad térmica, el helio es el más popular. Mientras que el hidrógeno es de uso común en algunas partes del mundo (donde el helio es muy caro), no se recomienda debido a la posibilidad de incendios y explosiones. Con el detector de ionización de llama, ya sea nitrógeno o helio se pueden utilizar. El nitrógeno proporciona un poco más de sensibilidad, pero un análisis más lento que el helio. Para el detector de captura de electrones, el oxígeno muy seco-libre de nitrógeno es recomendable. (18)

✓ Portal de inyección

El objetivo del inyector es introducir una cantidad significativa de muestra en la columna cromatográfica.

En la cromatografía de gases los líquidos son inyectados por medio de jeringas. Después de pinchar en un disco de goma denominado septum, la jeringa llega a un tubo de vidrio silanizado (denominado liner) que posee el portal de inyección, donde deja la muestra. Puesto que el portal de inyección se encuentra a temperatura alta, la muestra se va a evaporar rápidamente y el gas portador transportará la muestra hasta la columna. En la cromatografía analítica se usan volúmenes de inyección del orden de 0.1-2 μL . Los productos de descomposición de la muestra así como los no evaporados se quedarán en el tubo de vidrio y por lo tanto este tubo tiene que ser limpiado o cambiado de vez en cuando. Si la muestra estuviese en fase gaseosa se introduciría por medio de una jeringa

hermética con sistemas parecidos a los portales de inyección utilizados en la cromatografía de líquidos. (19)

Además existen dos tipos principales de inyección:

Split: En el que sólo una pequeña parte del vapor entra en la columna, y el resto se ventila. Es la técnica de elección para las muestras más bien concentradas, así como para el análisis de Headspace.

Splitless: En el que casi todo el vapor de la muestra se transfiere desde el inyector a la columna; es usada para el análisis de trazas. (20)

✓ **Columna cromatográfica**

En un principio, las columnas más utilizadas eran las empaquetadas pero hoy en día se utilizan más las de tubo abierto o capilares.

Las empaquetadas presentan una longitud que oscila entre los 1-6 metros y diámetros que oscilan entre los 2 y 6 mm. mientras que las capilares presentan longitudes entre 10 y 100 m. y diámetros entre 0.1 y 0.6 mm. En cuanto al material de producción, las empaquetadas suelen ser de acero inoxidable o vidrio mientras que las capilares suelen ser de sílice.

La fase estacionaria utilizada en la cromatografía gas-líquido debe de tener las siguientes características: baja volatilidad, estabilidad térmica e inercia química. A la hora de elegir la fase estacionaria además de cumplirse las características anteriores, hay que tener en cuenta que la fase escogida tiene que tener el poder suficiente como para disolver la muestra para que así los compuestos puedan quedar retenidos. En ese sentido, se puede seguir la regla de que “los semejantes son disueltos por los semejantes” donde la palabra “semejante” se refiere a que tengan polaridad parecida. Antes de nada, para saber cuáles van a ser las interacciones entre el analito y la fase estacionaria se han recogido en la Figura N° 13 las fases más utilizadas así como sus grupos funcionales característicos.

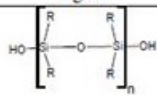
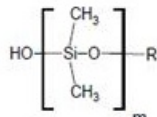
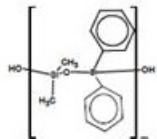
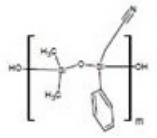
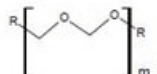
Grupo funcional	Figura	Fuerzas de dispersión	T _{mst} (°C)	Analitos
Polisiloxano		Fuertes	325-350	Hidrocarburos (n-alcenos)
Metil-		Fuertes	325-350	Hidrocarburos (alcenos, alquenos, aromáticos)
Fenil-	14 	Muy fuertes	325-350	Hidrocarburos aromáticos
Cianopropilfenil-		Fuertes	280-300	Compuestos ligeramente polares (hidrocar. halogenados, bifenilos, éteres...)
Polietilenglicol (PEG)		Fuertes	250-260	Compuestos polares (cetonas, alcoholes, ácidos carboxílicos, aminas...)

Figura N° 13 Fuerza interacciones fase estacionaria

Uno de los problemas más extendidos de la cromatografía de gases es la degradación de la fase estacionaria o de la columna, sobre todo a altas temperaturas. El responsable de ello suele ser la rotura del material de la fase estacionaria.

✓ Programación de la presión y la temperatura

La temperatura es una variable muy importante en la cromatografía de gases y para obtener valores repetitivos es obligatorio controlar esta variable. Asimismo, la columna está colocada en el interior de un horno. La temperatura del horno se puede variar entre 10-450°C con una incertidumbre del 0.1 °C.

Para programar la temperatura del horno existen dos opciones:

Mantener la temperatura constante a lo largo del cromatograma (modo isoterma).

Aumentar la temperatura a medida que transcurre el cromatograma (modo no isoterma).

Cuando la elución es isotérmica, los compuestos de temperatura de ebullición parecidos serán difícilmente separados y en función de la temperatura de elución se obtendrán picos pequeños y anchos, sobre todo con compuestos difícilmente evaporables o se apreciara

una resolución muy baja. Cuando se programa la temperatura de elución se pueden obtener mejores resoluciones y separaciones de los compuestos. La programación de la temperatura es fundamental para el desarrollo de métodos de cromatografía de gases, sobre todo cuando la mezcla a separar es muy compleja. En la mayoría de los casos, las partes más importantes de la programación son la temperatura inicial y final y la velocidad de aumento de temperatura ($^{\circ}\text{C}/\text{min}$). Según los cromatógrafos, el programa puede incluir tres pasos, esto es, el aumento de temperatura puede ser el siguiente: $T^{\circ} = 110^{\circ}\text{C}$ (1 min); $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ hasta 200°C (0.5 min); $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ hasta 250°C (0.5 min); $15^{\circ}\text{C}/\text{min}$ hasta 325°C (1 min).

Algunos de los cromatógrafos utilizados hoy en día tienen controladores electrónicos que controlan la presión del gas portador que circula a lo largo de la columna. Al aumentar el flujo de la fase móvil el tiempo de retención de los analitos disminuirá. De esta forma, la programación de la presión puede ser utilizada en el caso de compuestos que eluyen muy tarde.

✓ **Detectores**

Una vez que los compuestos han sido separados en la columna cromatográfica, al salir de ella es necesario detectarlos para poder medirlos y para de alguna forma poder identificarlos. En general, la mayoría de los detectores no identifican al compuesto que sale de la columna, es decir, no es posible averiguar de qué compuesto se trata, sino que solo indican que un compuesto ha salido de la columna.

Si se quiere llevar un análisis cualitativo de los componentes de la muestra, es decir, si se quiere llevar a cabo la identificación de los compuestos que salen de la columna se necesita un espectrómetro de masas o un detector de infrarrojos. En el caso de estos detectores, los espectros de los compuestos son comparados con espectros que están ya recogidos en bibliotecas y de esta forma pueden ser identificados. Otra solución no muy sofisticada, es comparar los tiempos de retención de los analitos de la muestra con los tiempos de retención de sustancias puras que han sido introducidos en columnas de distinta polaridad. Otra posibilidad puede ser la de añadir a la muestra una cantidad de una sustancia que se sospeche que pueda estar en la misma, y si se observa un aumento de la señal es una indicación de que se trata del compuesto del que se sospechaba. El más adecuado es el último pero para ello habría que usar columnas de diferente polaridad.

Para un análisis de tipo cuantitativo, se toman como referencia el área y la altura del pico cromatográfico y se comparan con las áreas que corresponden a los estándares de los analitos puros.

En la mayoría de los casos se utilizan calibraciones con estándares internos, bien para llevar a cabo correcciones en el sistema cromatográfico (la correspondiente al volumen de inyección, por ejemplo) así como para corregir el cambio de la señal con respecto al tiempo del detector

Los detectores más comunes son:

- Detector de conductividad térmica (TCD)
- Detector de ionización de llama (FID)
- Detector de captura electrónica (ECD)
- Espectrómetro de masas (MS)

4.3.2.2. Espectrómetro de masas (MS)

El espectrómetro de masas es el detector más poderoso utilizado tanto en la cromatografía de gases como en la cromatografía líquida para llevar a cabo un análisis tanto cualitativo como cuantitativo de los analitos. Aplicaciones de la espectrometría de masas incluyen la identificación y cuantificación de plaguicidas en muestras diversas (21). En la espectrometría de masas, las moléculas gaseosas son ionizadas, son aceleradas en un campo eléctrico y por último son separadas en función de la masa. El proceso natural tiene la suficiente energía como para romper las moléculas en varios trozos y al gráfico que representa la abundancia isotópica relativa de cada trozo se le denomina espectro de masas. En el eje X de este espectro de masas se representa la relación m/z donde m es la masa del ión (en unidades de masa atómica -uma) y z es la carga del ión. Como en muchos casos la carga del ión equivale a la unidad, la relación m/z se reduce a la masa del ión. Al trozo de igual masa al de la molécula original (M^+) se le denomina ión molecular.

El espectrómetro de masas se puede separar en cuatro partes: interfase, fuente de ionización, zona de separación y detector.

La interfase une la columna capilar y la fuente de ionización. Por una parte, la presión de la columna es muy alta y en la fuente de ionización lo que es alto es el vacío. En esas condiciones, las funciones de la interfase son las siguientes: quitar las moléculas de gas transportador e introducir las moléculas de analito en el espectrómetro de masas.

Las moléculas de analito que llegan a la fuente de ionización son bombardeadas con electrones de alta energía que provienen del filamento (ionización por medio del choque de electrones). Normalmente una energía controlada de los electrones de 70 eV suele ser suficiente para provocar la ionización ($M + e^- = M^+ + 2e^-$) y garantizar la rotura de la molécula iónica.

Las partes obtenidas son llevadas al espectrómetro de masas para medir su espectro

Los iones producidos en la fuente de ionización deben de llegar repartidos al detector. Con ese objetivo, los espectrómetros de masas se basan en distintos medios. Entre otros, los más extendidos son el cuadrupolo, la trampa de iones o el tiempo de vuelo. Los tres, de una forma u otra, consiguen hacer la distinción entre los trozos o iones y al detector solo llegan aquellos iones que tienen una relación m/z concreta.

Los iones repartidos en la zona de separación llegan a un detector con forma de embudo. Los iones al chocar con el detector liberan los electrones de la superficie y estos a su vez hacen lo mismo a lo largo de la longitud de la columna. Por medio de este salto de electrones se consigue una amplificación de la señal en la salida del detector. Representando la señal de todos los iones obtenidos por unidad de tiempo se obtiene el cromatograma. Este cromatograma y los obtenidos en cualquiera de los casos anteriormente explicados son parecidos. Ahora, la diferencia estriba en lo siguiente: en cualquier punto del cromatograma se puede obtener el espectro de masas del compuesto eluido en ese punto

En vez de hacer las medidas en todo el intervalo de la masa molecular (en el caso de CG-MS entre 40-650 UMAS) el instrumento puede ser programado para medir masas concretas o masas simples, a esta forma de trabajar se le denomina monitorización de iones simples (SIM). De esta forma se obtienen cromatogramas de menor número de picos y límites de detección mejores. Entre las características más importantes de los espectros de masas están las siguientes: es un detector universal, trabajando en la forma SIM presenta límites de detección inferiores a los del FID, intervalo lineal del orden de 3-4 y los compuestos pueden ser identificados a partir de sus espectros de masas.

4.3.3 VOLTAMPEROMETRÍA Y POLAROGRAFÍA

Voltamperometría y Polarografía son nombres de métodos analíticos basados en la respuesta corriente-potencial en celdas electrolíticas. La señal analítica es la corriente, normalmente corriente de Faraday, la cual fluye en la celda durante la reacción del analito en el electrodo de trabajo. El analito puede ser un catión, anión o molécula.

El fundador de estos métodos, Jaroslav Heyroský (1890-1967 premio Nobel en Química - 1959) introdujo el electrodo de gota de mercurio como electrodo de trabajo. El electrodo consiste en un capilar de vidrio de paredes gruesas del cual las gotas de mercurio caen en la solución de la muestra bajo la presión de una columna de mercurio, además introdujo el término de polarografía.

El término voltamperometría (Voltamperometry) resulta de volt-am (perios)-metry y no debe ser confundido con voltametría (Voltammetry) (con una sola m) el cual es descrito como una valoración potenciométrica con corriente controlada.

Los términos polarografía y voltamperometría son frecuentemente usados inadecuadamente. De acuerdo a la IUPAC, el término polarografía debe ser usado cuando la curva de la corriente en función del potencial es graficada empleando un electrodo de trabajo con un líquido, del cual la superficie puede ser renovada periódica o continuamente (ej. Gotas). Esto incluye el clásico electrodo de goteo de mercurio (DME) y el subsecuente electrodo de gota de mercurio estática (SMDE).

La voltamperometría incluye todos los métodos en el cual la medición de potencial de la corriente están hechos en un electrodo fijo y estacionario. Esto incluye el electrodo de gota colgante de mercurio (HMDE), el electrodo de capa fina de mercurio (TMFE), electrodo de glassy carbón (GCE) y electrodos de pasta de carbón (CPE). Los electrodos de trabajo hechos de metales nobles (oro, platino) son usados menos frecuentemente.

Varios métodos son atribuidos a los términos de polarografía y voltamperometría; estos difieren en la técnica de medición y el tipo de potencial eléctrico de excitación usado en el proceso de la determinación (23).

4.3.3.1 Instrumentación en voltamperometría

El sistema voltamperométrico consiste en una fuente de voltaje, un porta electrodos con los electrodos y la celda electroquímica; y una unidad de registro de la corriente (24). Aunque los primeros métodos voltamétricos hacían uso de sólo dos electrodos, la voltamperometría moderna hace uso de tres electrodos sumergidos en una solución que contiene analito y un exceso de un electrolito de soporte (25).

- El electrodo de trabajo (WE), el más importante del sistema electroquímico, su potencial varía de manera lineal con el tiempo, Existen dos tipos el MME (electrodo multimodo) que incluye todos los tipos de electrodos de mercurio (DME, SMDE, HMDE) y el RDE para aplicaciones especiales.
- El electrodo de referencia (RE): que ofrece un potencial estable. Los potenciales en el WE se aplican con respecto al potencial de referencia constante. Hoy en día se utiliza principalmente sistemas de Ag/AgCl.

- El tercer electrodo es el electrodo auxiliar (AE): La corriente fluye entre el trabajo y el electrodo auxiliar. Existen dos tipos disponibles: Platino (Pt) y Carbón vítreo (GC) (23,24).

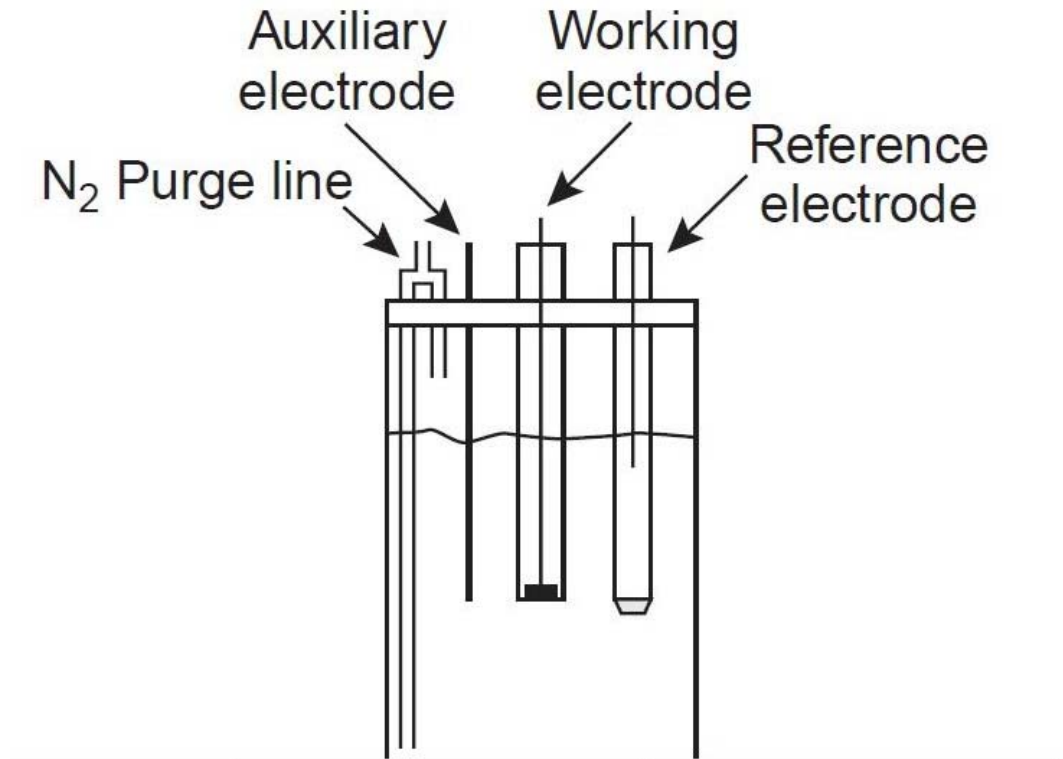


Figura N° 15 Celda electroquímica típica en voltamperometría.

En voltametría se han empleado mucho los electrodos de mercurio, por varias razones: una de ellas es por el potencial negativo relativamente grande que se puede lograr con el mercurio, debido al alto sobrevoltaje del hidrógeno sobre el mercurio. Este sobrevoltaje permite la determinación de metales que se reducen con potenciales negativos, hasta amalgamas en la superficie de un electrodo de mercurio. Además, se forma rápidamente una superficie metálica fresca con una nueva gota de mercurio (25)

4.3.3.2 Principio de la Voltamperometría

La voltamperometría se basa (Figura N° 16) en la aplicación de una rampa de voltaje (a), al alcanzarse el potencial de reducción del metal este se reduce y se disuelve en el mercurio del electrodo (b), esta reacción produce una corriente que es medida (c). La corriente fluye cuando la sustancia es oxidada o reducida en el electrodo. Sin reacción electroquímica no existe corriente (24).

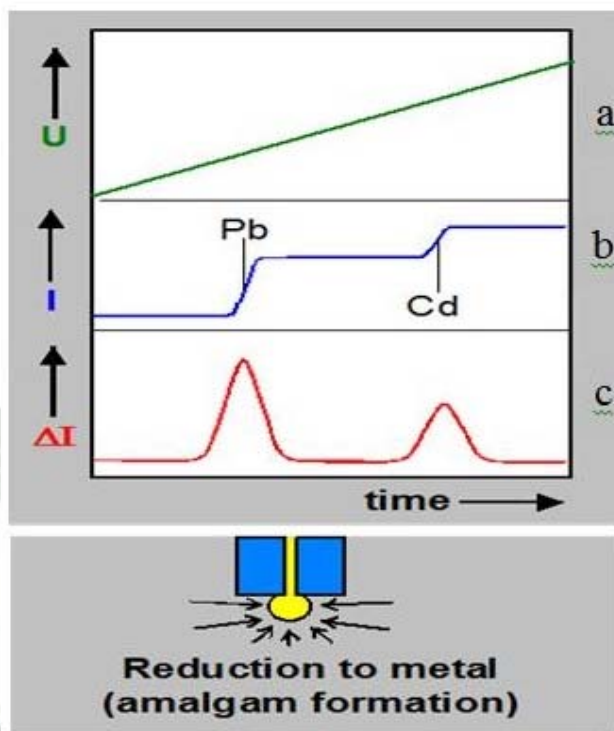


Figura N° 16. Principio de la voltamperometría

4.3.3.3 Métodos Voltamperométricos

A Voltamperometría de Barrido Lineal (VBL)

El potencial aplicado (un barrido lineal) varía rápidamente (20-200mV/seg) y toda la corriente es monitorizada directamente. La sensibilidad no es extremadamente alta y algunas distorsiones en el resultado de las ondas pueden ser dificultades para el análisis cuantitativo. (23)

B Voltamperometría Directa Simple (DC)

La voltamperometría DC es la clásica, es la medición voltamperométrica más simple con una limitada sensibilidad. Es principalmente utilizado para la investigación de sistemas reversibles redox. (23)

C Voltamperometría de Onda Cuadrada (SqW)

La voltamperometría de onda cuadrada es principalmente adecuada para procesos reversibles. Es usada particularmente para voltamperometría de stripping sensitiva en el modo HMDE o RDE. (23)

D Voltamperometría de Pulso Diferencial (PD)

La voltamperometría de pulso diferencial, es una de las técnicas electroanalíticas que alcanzó una gran popularidad a partir de 1970. Es el modo de medición universal y más frecuentemente usado, es apropiado para sistemas reversibles e irreversibles y ofrece una alta sensibilidad. Para la voltamperometría PD, la corriente i es medida en función del voltaje U inmediatamente antes del pulso $t(I1)$ y al final del pulso $t(I2)$, Figura N° 17. De las diferencias entre las dos mediciones de corriente, los picos de la curva obtenidos son evaluados usando base lineal, polinomial, o exponencial. (24)

Figura N° 17. Esquema de Voltamperometría Pulso Diferencial

E Voltamperometría Cíclica (CV)

La voltamperometría cíclica es principalmente usada para investigar la reversibilidad del proceso del electrodo y para estudios cinéticos. (23)

F Voltamperometría de Redisolución

Una de las más importantes técnicas de voltamperometría cuantitativa es la voltamperometría de redisolución ya que proporciona los límites de detección más bajos para los metales (10^{-9} - 10^{-12}). Es decir, detecta iones metálicos con una exactitud razonable, en pocos minutos y en un margen de concentración como el antes expresado. Los métodos de redisolución están basados en el siguiente concepto: la sustancia a determinar se pre-concentra en el electrodo y posteriormente es devuelta a la disolución por un proceso inverso. (23, 24, 25)

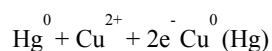
Gracias a la voltamperometría de redisolución se ha conseguido:

- Preconcentrar sustancias que antes no era posible al ser consideradas no electroactivas.
- Desarrollar métodos impulsionales, de onda cuadrada, voltamperometría de corriente alterna, las cuales permiten aumentar la sensibilidad de las determinaciones, pudiéndose llegar en algunos casos a determinar concentraciones de orden $\mu\text{g/L}$ e incluso pg/L .

Se compone de tres técnicas relacionadas: anódica, catódica y voltamperometría de adsorción. Ya que la voltamperometría de redisolución anódica ha encontrado la aplicación más amplia, la hemos consideramos con mayor detalle (23, 24,25)

A.-Etapa de pre-concentración:

Objetivo: Traspasar el analito de la disolución en que se encuentra al electrodo, es decir, a la gota de mercurio.



Pre-concentración mediante electrolisis.

Distintos aspectos influyen en esta primera etapa:

La sustancia, el analito, puede llegar al electrodo de tres maneras distintas: por migración (debido a atracciones electroestáticas), por difusión (debido al gradiente de concentración) y por convección (fuerzas mecánicas (agitación)). La temperatura, debe estar controlada, ya que, el coeficiente de difusión depende de ella. El tiempo, a medida que aumentamos el tiempo, la cantidad de analito depositado en el electrodo aumenta. Por otro lado la intensidad de corriente disminuye con el tiempo. Para que el proceso mantenga su intensidad prácticamente constante tendremos que utilizar volúmenes grandes de disolución, superficies pequeñas de electrodo y tiempos de electrodeposición cortos (23, 24,25)

B.-Etapa de reposo:

En el proceso de reposo se detiene la agitación y se mantiene el potencial aplicado. Necesitamos que el analito y el electrodo se homogenicen.

C.-Etapa de medida:

Objetivo: Obtener desde el punto de vista analítico información acerca del depósito que tenemos.

Existen distintas técnicas y la más común es:

Barrido lineal de potencial con respecto al tiempo: Consiste en aplicar al electrodo un potencial cuya variación es una función lineal en el tiempo. En redisolución anódica el barrido lineal consistiría en que el potencial de electrodo se hace variar linealmente hacia potenciales más positivos, registrando la intensidad de la corriente.

En redisolución anódica, a medida que aumenta el potencial se produce un aumento de la intensidad, ya que, aumenta la velocidad de reacción.

En redisolución catódica ocurre lo contrario el potencial varía hacia valores más negativos. A partir de un determinado valor de potencial, la intensidad disminuye al igual que la concentración de sustancia electroactiva. (23, 24,25)

4.4. BIORREMEDIACIÓN

La contaminación de los suelos por los contaminantes orgánicos se ha convertido en un problema ambiental generalizado. Contaminantes orgánicos del suelo, tales como los bifenilos policlorados (BPC), hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP), compuestos organoclorados (OC), compuestos organofosforados (OPs), fenoles, etc, son de gran preocupación ambiental debido a su amplia distribución, persistencia, complejidad, y los posibles efectos sobre la salud (26), es por eso la necesidad de alternativas para su remediación.

Las prácticas de biorremediación consisten principalmente en el uso de diferentes organismos del medio (plantas, levaduras, hongos, bacterias, etc.), para neutralizar sustancias tóxicas, bien transformándolas en sustancias de carácter menos tóxico o bien convirtiéndolas en inocuas para el medio ambiente y la salud humana. Una de las medidas biocorrectoras más empleada es la utilización de microorganismos para la descontaminación de suelos. Estos sistemas de descontaminación se basan en la absorción de las sustancias orgánicas por parte de dichos microorganismos, los cuales las utilizan como la fuente de carbono necesaria para su crecimiento y de energía para sus funciones metabólicas.(27)

La biorremediación utiliza la habilidad de los microorganismos para degradar compuestos orgánicos. Esta tecnología está basada en el uso de organismos naturales o mejorados genéticamente para recuperar sitios contaminados y proteger el ambiente, el proceso de biorremediación puede clasificarse de acuerdo al organismo que efectúe la degradación del compuesto xenobiótico en los siguientes tipos: (28)

a.- Fitorremediación. Consiste en el uso de plantas verdes para contener, remover o neutralizar compuestos orgánicos, metales pesados o radionucleidos. Un ejemplo de la fitorremediación la constituye el uso de la especie *Thlaspi caurulencens* en suelos contaminados con zinc y cadmio, encontraron que el uso de esta especie lograba eliminar más de 8 mg/Kg de cadmio y 200 mg/Kg de zinc, representado estos valores el 43 y 7 por ciento de estos metales en un suelo agrícola, respectivamente.

b.- Biorremediación animal. Existen animales que actúan como agentes descontaminantes, ya que pueden desarrollarse en medios con fuerte toxicidad y poseen en su interior microorganismos capaces de retener los metales pesados.

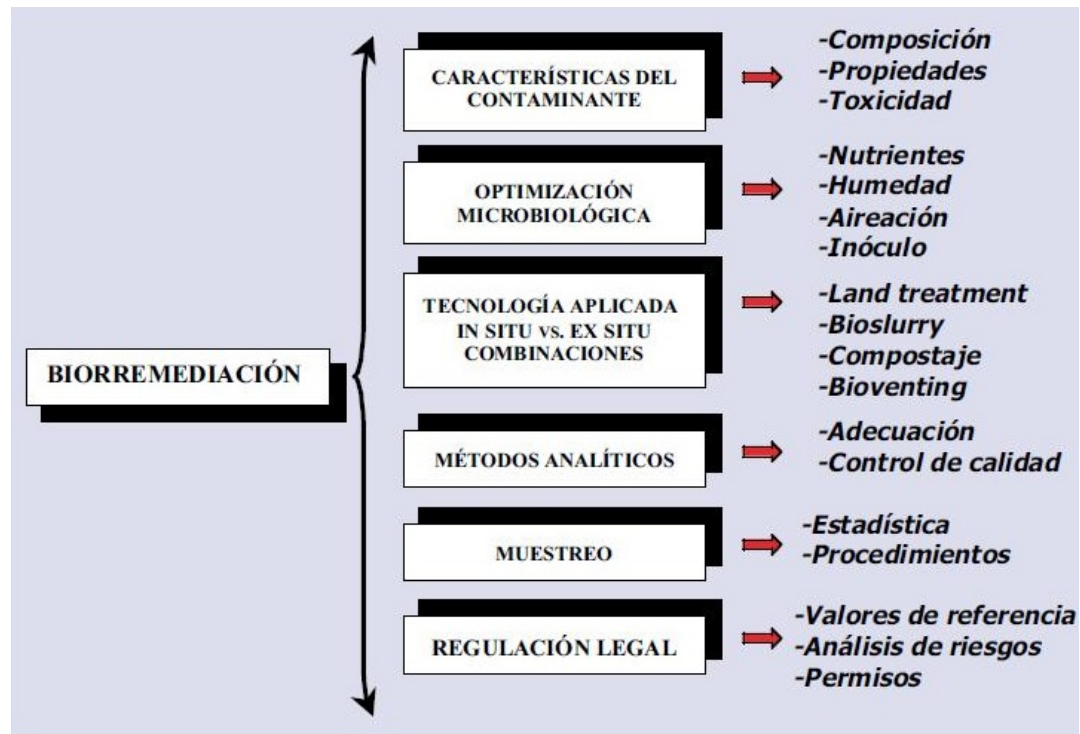


Fig. N° 18 Parámetros implicados en la biorremediación

c.- Biorremediación microbiana. Existe la posibilidad del uso de bacterias con la propiedad de acumular o metabolizar metales pesados. La utilización de microorganismos que transforman diferentes compuestos nocivos en otros de menor impacto ambiental ha experimentado un gran desarrollo reciente. Aunque las bacterias son las más empleadas en el proceso de biorremediación, también se han empleado otros microorganismos como hongos, algas, cianobacterias y actinomicetos para la degradación de compuestos tóxicos en el suelo.

Se puede realizar una clasificación en función de los contaminantes con los que se puede trabajar: (29)

- Hidrocarburos de todo tipo (alifáticos, aromáticos, BTEX, PAHs).
- Hidrocarburos clorados (PCBs, TCE, PCE, pesticidas, herbicidas).
- Compuestos nitroaromáticos (TNT y otros).
- Metales pesados: Estos no se metabolizan por los microorganismos de manera apreciable, pero pueden ser inmovilizados o precipitados.
- Otros contaminantes: Compuestos organofosforados, cianuros, fenoles, etc.

4.4.1. Bioremoción de plaguicidas

La contaminación de los suelos por la presencia de agentes tóxicos como hidrocarburos, plaguicidas y otras sustancias constituye un problema ambiental de primer orden. El panorama actual no es tan desalentador ya que se cuenta con novedosas técnicas para la recuperación de suelos degradados por contaminación química. El uso de los microorganismos constituye una estrategia potencialmente viable. Hasta hace algunos años las investigaciones se habían limitado a la identificación de aquellos microorganismos capaces de aislar compuestos tóxicos. Hoy día las investigaciones están dirigidas a incrementar la tasa de degradación de compuestos tóxicos, mejoramiento genético de microorganismos para que se adapten a ambientes extremos y desarrollo de diferentes técnicas biocorrectivas alternativas para la recuperación de suelos degradados.(27)

4.4.1.1. Hongos micorrizas

Se conoce con el nombre de micorriza a la asociación mutualista establecida entre las raíces de la mayoría de las plantas y ciertos hongos del suelo. Se trata de una simbiosis prácticamente universal, no sólo porque casi todas las especies vegetales son susceptibles de ser micorrizadas sino también porque puede estar presente en la mayoría de los hábitats naturales.(30)

4.4.1.1.1. Clasificación de las micorrizas

Se pueden distinguir tres grupos fundamentales: (31)

a. Las ectomicorrizas se caracterizan por formar una extensa red de hifas que se ubican en la corteza de la raíz. Se encuentran especialmente asociadas con pino, eucalipto y ciprés.

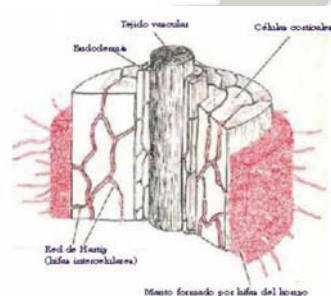


Fig. N° 19 Colonización de ectomicorriza

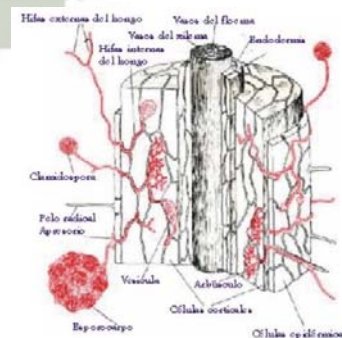


Fig. N° 20. Edomicorrizas (Micorrizas vesículoarbusculares)

b. Las endomicorrizas son las más comunes en la naturaleza, estas penetran profundamente en la raíz, la colonizan y cambian su forma, mientras sus estructuras externas exploran el suelo. Se asocian con más del 90% de las plantas terrestres, a este grupo pertenecen las micorrizas arbusculares.

c. Las ectendomicorrizas son una combinación de las ecto y endomicorrizas, se encuentran en la corteza y penetran profundamente la raíz. Están presentes en algunas especies forestales especialmente en bosques naturales.

4.4.1.1.1. Endomicorrizas

Son las más frecuentes, ocurren aproximadamente en el 80% de las plantas vasculares. Los hongos más frecuentes en las endomicorrizas son generalmente Zygomycetes, con hifas no septadas y las asociaciones hongo/hospedante no son muy específicas. Muchas gramíneas las presentan: *Andropogon*, *Bromus*, *Festuca*, *Panicum*, *Poa*, *Saccharum*, *Sorghum*, *Sporobolus*, *Stipa* y *Zea mays*.

Las hifas de las endomicorrizas penetran las células del córtex de la raíz, sin romper el plasmalema o el tonoplasto. Forman unas estructuras dendroides llamadas arbusculos o protuberancias llamadas vesículas, que quedan revestidas por la membrana plasmática.

Las endomicorrizas se suelen llamar micorrizas V/A por la formación de estas estructuras. El hongo nunca penetra la endodermis, ni la estela, ni el meristema apical, ni la caliptra.(32)

4.4.1.1.2. Micorrizas arbusculares

Todos los hongos AM son miembros de la clase Zygomycota y la clasificación contiene un orden, el Glomales, que abarca seis géneros en los cuales aproximadamente 150 especies han sido clasificadas. La colonización de las raíces por los hongos AM confiere beneficios directamente al crecimiento y el desarrollo de las plantas, para la adquisición de nutrientes minerales de fosfato y otros de la tierra. Además, la colonización también puede mejorar la resistencia de las plantas a estrés biótico y abióticos.(33)

Hongos micorrizógenos arbusculares (AMF) son obligatoriamente hongos simbióticos del suelo. En esta asociación el hongo penetra en la raíz y forma dentro de ella estructuras características como hifas, miscelios, arbusculos, esporas y vesículas. Las esporas de estos hongos germinan, dando origen a las hifas que al ramificarse forman el micelio que explora el suelo y coloniza la raíz de la planta. El miscelio se origina a partir de esporas germinadas. Las micorrizas arbusculares forman un cuerpo central con muchas ramificaciones de hifas, esta estructura se llama arbusculo. Los arbusculos realizan el intercambio de agua y nutrientes entre el suelo y la raíz. En las raíces se originan estructuras internas de forma globosa, llamadas vesículas, que sirven para almacenar alimento para el hongo. (31)

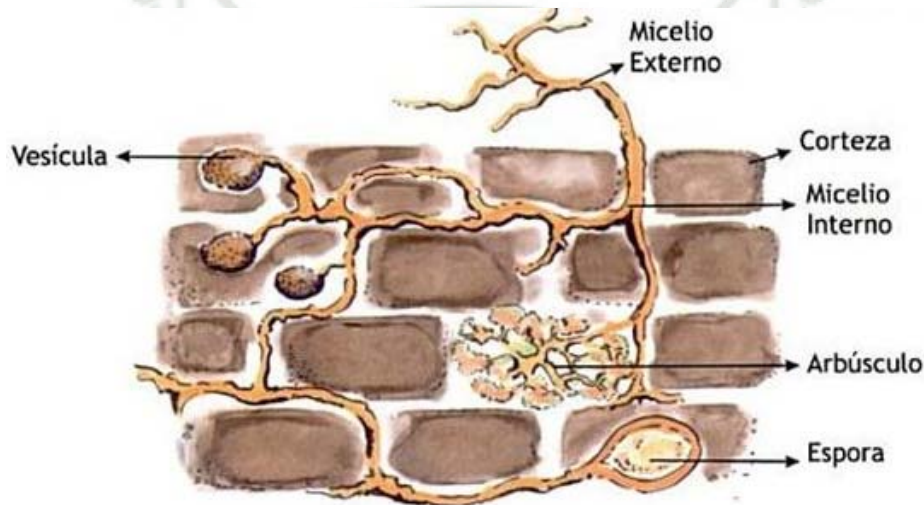


Fig. N° 21 Estructura típica de la micorriza arbuscular

Los géneros AMF *Gigaspora* y *Scutellospora* producen sólo arbusculos e hifas inter e intracelulares, mientras que *Glomus*, *Entrophospora*, *Acaulospora*, y *Sclerocystis* también producen vesículas (de ahí el término de uso frecuente hongos vesículo-arbusculares micorrizas (AVM)), que son terminales, globosas, estructuras ricas en lípidos en zonas intracelulares en la corteza de la raíz. (32)

La evidencia fósil sugiere que esta asociación se remonta a cuando las primeras plantas crecieron en la tierra, hace unos 400 millones de años y de hecho, es raro en la naturaleza la planta que no está micorrizada. La simbiosis AM suele ser mutualista. Como simbiosis obligada, los AMF se cree que dependen de la planta para fijar carbono. La planta recibe una variedad de beneficios que puede resultar en un mayor crecimiento, resistencia a las enfermedades y plagas, mayor absorción de nutrientes en comparación con los controles no micorrizadas y la modificación de

morfología de la raíz. El más importante de estos beneficios es el incremento de la absorción de nutrientes, especialmente de los nutrientes inmóviles como P y Zn. (32)

El ecosistema por debajo del suelo en su conjunto se ve afectada por la AMF. Estos hongos son importantes en el mantenimiento y la mejora de la estabilidad de la agregación del suelo. La agregación del suelo es un aspecto importante de la estructura del suelo, que determina las características tales como la tasa de aporte de agua, espacio poroso, y la resistencia a la erosión (32). Por lo tanto, estos hongos constituyen un componente integral e importante de los ecosistemas y puede tener importantes aplicaciones. (33)

4.4.1.1.1.3. Mecanismo de colonización

En las micorrizas arbusculares existen dos fases de sistema micelial: un micelio en la corteza de la raíz de la planta y un micelio externo en el suelo, que varía en extensión y volumen. El inicio de la colonización de la planta y con ellos la formación de la simbiosis comienza con la germinación de las esporas de resistencia en el suelo cuando las condiciones de temperaturas y humedad son favorables o bien mediante el crecimiento de hifas a partir de propágulos del suelo que se encuentran cerca del sistema radical susceptible. El crecimiento del micelio se incrementa algunas veces debido a que los exudados de la raíz pudieran proporcionar sustratos adecuados para el desarrollo de las hifas después de que las reservas de nutrimentos sobre todo en las esporas, se hubieran agotado.

La hifa finalmente tiene contacto con la célula epidérmica o un pelo radical y produce un apresorio ligeramente engrosado, a partir del cual se desarrollan ramificaciones infectivas cortas. Posteriormente se produce la penetración de la epidermis o del pelo radical mediante la presión ejercida por la hifa en crecimiento sobre la pared celular, lo cual hace que esta última se combe alrededor de la hifa y se vuelva mucho más delgada en las células corticales. No se sabe si está involucrada la producción de enzimas por el hongo, pero parece probable que ocurra una alta actividad hidrolítica y se ha sugerido también que la entrada de la hifa a la raíz se facilita por la presencia de pectinasas.

La colonización del hongo puede extenderse también mediante hifas y hongos por la superficie de la raíz y penetrar en esta a intervalos irregulares. (34)

4.4.1.1.1.4. Aislamiento de esporas del suelo

Existen varios métodos para aislar esporas de AMF del suelo. Estos incluyen; tamizado en húmedo y decantación, flotación-adhesión, el fraccionamiento corriente

de aire, diferentes métodos de centrifugación en sacarosa/agua y la fijación de lodos del suelo en papel de filtro.

Quizás el método más utilizado combina tamizado en húmedo y decantación con un método adaptado de nematología.

5. ANÁLISIS DE ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS:

En un informe presentado por del Programa de Competitividad, Innovación y Desarrollo de la Región Arequipa-2005 se expuso que, el uso en muchos casos indiscriminado de agroquímicos en Arequipa son causa del deterioro de la sustentabilidad de los sistemas agrícolas, además de los efectos nocivos sobre la salud de consumidores y trabajadores agrícolas, y de la ruptura de los equilibrios biológicos. Por otro lado en un estudio realizado en el año 2005 en la universidad de Antioquia-Colombia (1), se realizaron pruebas para la degradación de un pesticida orgafoforado por el hongo *Phanerochaete Chrysosporium*, mostrandose una remoción de hasta el 82,38% del mismo; dando cuenta así de la viabilidad de este tipo de material biológico en la remoción efectiva de pesticidas. Además esta la existencia de un grupo de procesos llamados “procesos avanzados de oxidación” (PAO), en el que los radicales reaccionan con el contaminante y lo transforman en compuestos inofensivos al medio ambiente, dados los antecedentes descritos es que se propone el desarrollo del presente trabajo de investigación. (3)

CAPÍTULO III

PLANTEAMIENTO OPERACIONAL DE LA INVESTIGACIÓN

III.1.- CAMPO DE VERIFICACIÓN

III.1.1. UBICACIÓN ESPACIAL:

- ✓ Laboratorio de Investigación de la Universidad Católica de Santa María Pabellón H-202.
- ✓ Mercados de la ciudad de Arequipa

III.1.2. UNIDADES DE ESTUDIO:

- ✓ Muestra de leche de 11 mercados de la ciudad de Arequipa.
- ✓ Cepas de hongos micorrizas arbusculares.

III.1.3. UBICACIÓN TEMPORAL:

- ✓ En una primera etapa, la parte experimental tendrá una duración de 5 meses a partir de la llegada de los reactivos necesarios, posterior a esta etapa se realizará el procesamiento de datos con la interpretación de los mismos en un periodo de un mes, concluido este se procederá a la presentación de los resultados.

III.2. TÉCNICAS, INSTRUMENTOS Y MATERIALES DE VERIFICACIÓN

III.2.1. PRIMERA FASE DEL ESTUDIO:

Se validarán dos métodos cromatográficos y un electroquímico para la determinación de Clorpirifos, para estas validaciones se utilizará un estándar secundario el cual se producirá a partir de un estándar primario de Clorpirifos 2 mg/L (Sigma Aldrich) y se valorará en un equipo de cromatografía gaseosa acoplado a un espectrómetro de masas, para las validaciones los parámetros a evaluar serán (35,36).

- Linealidad
- Exactitud
- Precisión
- LDD y LDQ

III.2.1.1. Validación

A Linealidad:

Establecida como la capacidad del método para proporcionar resultados que son directamente proporcionales a la concentración del analito en la muestra dentro de un rango establecido.

Para evaluar la linealidad se construirán gráficas concentración respuesta, siendo la concentración dependiente del método. La relación entre ambas variables se expresará matemáticamente como una recta de regresión del tipo:

$$Y = a + bx$$

Si la recta no pasa cerca del origen de las coordenadas significa que el método a evaluar está afectado por un error sistemático por defecto o por exceso en el intervalo estudiado.

El estudio de la linealidad no solo implica una representación gráfica sino que es necesario realizar una comprobación estadística. Para realizar esta evaluación las formulas aplicadas serán las siguientes:

$$Y = a + bx$$

$$b = \frac{\sum X_i Y_i - \frac{\sum X_i \sum Y_i}{n}}{\sum X_i^2 - \frac{(\sum X_i)^2}{n}}$$
$$a = \frac{\sum Y_i - b \sum X_i}{n}$$

Siendo a y b los estimadores de la ordenada al origen y pendiente respectivamente, n el número de mediciones, X_i la concentración y Y_i el valor medido en el ensayo.

$$r = \frac{\sum X_i Y_i - \frac{\sum X_i \sum Y_i}{n}}{\sqrt{\left(\sum X_i^2 - \frac{(\sum X_i)^2}{n}\right) \left(\sum Y_i^2 - \frac{(\sum Y_i)^2}{n}\right)}}$$

El coeficiente de correlación (r) nos indica el grado de relación entre la variable X y la variable Y. Su valor máximo es 1. Si r es cercano a la unidad significa que existe correlación con una probabilidad elevada. En la práctica, r es generalmente mayor de 0,99 y los valores menores de 0,90 son raros. Sin embargo, el mejor indicador del modelo lineal no es r sino un test estadístico, en el cual se calcula un valor de t con $n-2$ grados de libertad y se compara con el valor t tabulado para el nivel de confianza requerido.

$$t_r = \frac{[r]\sqrt{(n-2)}}{\sqrt{(1-r^2)}}$$

Si el valor observado de t es mayor que t tabla, la correlación es lineal significativa con la probabilidad calculada.

B Precisión:

La precisión expresa el grado de concordancia entre una serie de medidas de tomas múltiples a partir de una misma muestra homogénea en las condiciones prescritas.

El objetivo del estudio es conocer la variabilidad o el más-menos del método de ensayo. Esta variabilidad es debido a errores aleatorios inherentes a todo método de ensayo. Los factores a influir sobre los resultados de un ensayo no pueden ser siempre controlados (analista, equipo instrumental, reactivos, etc) de aquí a importancia del estudio de la precisión.

-Repetibilidad: Estudia la variabilidad del método efectuando una serie de análisis sobre la misma muestra en las mismas condiciones operativas (por un mismo analista, mismos aparatos y reactivos, etc) en un mismo laboratorio en un periodo de tiempo corto.

-Precisión intermedia: Estudia la variabilidad del método efectuando una serie de análisis sobre la misma muestra pero en condiciones operativas diferentes (diferentes analistas, aparatos, días, etc.) en un mismo laboratorio.

-Reproducibilidad: Estudia la variabilidad del método bajo condiciones operativas diferentes y en distintos laboratorios.

Para evaluar estos parámetros se realizarán:

- 3 mediciones con el método a validar en las mismas condiciones operativas en un día cumpliendo con los requisitos para determinar la repetibilidad.
- Para evaluar la precisión intermedia se efectuarán 4 mediciones en las que se modificaron condiciones operativas como analista, equipo, reactivos y día de análisis.

- El parámetro de reproducibilidad no será abarcado al no contar con algún otro laboratorio que contara con los equipos usados, por otro lado este parámetro no resulta obligatorio ya que solo es necesario en el caso de que se quiera transferir el método a otros laboratorios.

La precisión de un método se expresa generalmente como el coeficiente de variación (CV) de una serie de medidas y se calcula matemáticamente de la siguiente manera:

$$CV (\%) = \frac{s}{x} * 100$$

Donde:

S: Desviación Estándar

X: Media Aritmética

Además se recomienda introducir los intervalos de confianza en el estudio de la precisión. Estos intervalos deben determinarse para cada nivel de concentración estudiada. Los intervalos de confianza se calculan a partir de:

$$x \pm t * s$$

Donde:

x: media de una serie de resultados obtenidos en un mismo nivel de concentración.

t: Valor de la t de Student de tablas para n-1 grados de libertad y $\alpha=0.05$

s: Desviación estándar

Tabla N° 4 Valores aceptables de CV según la AOAC

Concentración	Coefficiente de variación (CV)
100 %	1 %
10 %	1.5%
1 %	2 %
0.1 %	3 %
0.01%	4 %
10 µg/g (ppm)	6 %
1 µg/g	8 %
10 µg/kg (ppb)	15 %

Fuente: AOAC Guidelines for Single Laboratory (47)

La precisión estudia la variabilidad que existe entre los diferentes resultados, pero sin tener en cuenta su proximidad al valor real. En la tabla N°4 se encuentran los valores aceptables de CV.

C Exactitud:

La exactitud de un procedimiento analítico expresa la proximidad entre el valor que es aceptado convencionalmente como valor verdadero o un valor de referencia y el valor experimental encontrado.

Existen diversos modos de demostrar la exactitud de un método entre los que son de utilidad:

- Principio activo puro
- Placebo cargado con el analito
- Muestra problema cargada con el analito

Se recomienda demostrar la exactitud de un método con un mínimo de 9 determinaciones sobre 3 niveles de concentración del analito. Para este parámetro dependiendo del método a validar se tomarán distintos niveles de concentraciones.

La exactitud se expresa en porcentaje de recuperación en la valoración de una cantidad conocida de analito añadida sobre la muestra.

La recuperación depende de la matriz de la muestra, del procedimiento de preparación de la muestra y de la concentración del analito en la misma. En la tabla N° 5 se presentan los valores de recuperación orientativos aceptables según la AOAC.

Tabla N° 5 Límites de porcentaje de recuperación según la AOAC

Concentración	Límites de Recuperación
100 %	98-101%
10 %	95-102%
1 %	92-105%
0.1 %	90-108%
0.01%	85-110%
10 ug/g (ppm)	80-115%
1 ug/g	75-120%
10 ug/kg (ppb)	70-125%

Fuente: AOAC Guidelines for Single Laboratory -2002 (37)

D Límites de cuantificación y detección LC, LD:

Se entiende por límite de cuantificación a la mínima cantidad de analito presente en la muestra que se puede cuantificar con una adecuada precisión y exactitud, y por límite de detección a la

mínima cantidad de analito en la muestra que se puede detectar aunque no necesariamente cumple con precisión y exactitud.

Para su evaluación se:

- Determinará la pendiente de la curva de calibración ya examinada para el parámetro de la linealidad que será la que se extrapola.
- Se extrapolará a concentración cero la ecuación de la recta, obteniéndose como señal ruido la correspondiente al término independiente, es decir Y_{bl} .
- Se construirá otra recta tomando como eje de ordenadas las desviaciones estándar de las respuestas y como eje de abscisas las concentraciones estudiadas, considerándose que la desviación estándar de las respuestas S_{bl} corresponderá al valor de la ordenada de origen de esta recta.
- Se calculará el límite de detección y límite de cuantificación aplicando las siguientes formulas:

Límite de detección (LD):

$$LD = \frac{Y_{bl} + 3 S_{bl}}{b} * \frac{1}{\sqrt{n}}$$

Límite de cuantificación (LC):

$$LC = \frac{Y_{bl} + 10 S_{bl}}{b} * \frac{1}{\sqrt{n}}$$

III.2.1.2 Método para la determinación de Clorpirifos por HPLC

Se hará uso de un equipo HPLC LaChrom con detector UV/Visible. La separación se realizará en una columna monolítica de fase reversa con relleno C-18. Las condiciones de trabajo de HPLC se efectuarán con una fase móvil de acetonitrilo: agua en proporción 70:30, la cual se modificará de acuerdo a los resultados obtenidos probándose también corridas en gradiente, el flujo será de

1 o 2 mL/min, el volumen de inyección de 20 μ L y la longitud de onda del detector de UV/visible en 290 nm. (38, 39, 40)

III.2.1.3 Método para la determinación de pesticidas organofosforados por Voltamperometría

Todas las medidas voltamperométricas se realizarán por voltametría de redisolución catódica usando una estación voltamperométrica (757 VA Computrace de Metrohm). Que consta de un electrodo de gota colgante de mercurio (HMDE), un electrodo auxiliar de grafito y un electrodo de referencia de Ag/AgCl/KCl 3 M.

Para la determinación de Clorpirifos se probarán inicialmente buffers a diferentes pH, además de cantidades variadas de CTAB (Bromuro de Cetil trimetil amonio) el cual es un [surfactante catiónico](#), etanol y KCl, también se analizará la respuesta de distintos tiempos y potenciales de deposición, una vez obtenidos los parámetros ideales se procederá a validar dicha técnica.

III.2.1.4 Método para la determinación de pesticidas organofosforados por Cromatografía de gases acoplado a espectrómetro de masas (GC-MS)

Se hará uso de un Cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas GCMS-QP2010 Ultra (Shimadzu). Se realizarán las medidas usando una columna Rtx-5MS de 30 m x 0.25 mm ID, 0.25 μ m film y Helio como gas carrier.

Se hará uso de un estándar secundario de Clorpirifos en hexano usando el tiempo de retención y datos de la librería (NIST) para el reconocimiento del analito, se probarán distintas rampas de calentamiento en el horno, así como inyecciones en modo split y splitless.

Una vez obtenidas las condiciones óptimas para la determinación del pesticida por GC-MS se procederá con la validación de este método.

III.2.2. SEGUNDA FASE DEL ESTUDIO

III.2.2.1 Tratamiento de muestras

Una vez validados los tres métodos para la determinación de Clorpirifos, se procederá a realizar el muestreo de un producto pecuario que se comercializa en los mercados de la ciudad de Arequipa.

Se realizará el muestreo de leche de vaca de 11 mercados de la ciudad de Arequipa, haciéndose una vez por mes de Marzo a Mayo.

Una vez recolectadas las muestras serán transportadas al laboratorio para su tratamiento y posterior determinación de los niveles de Clorpirifos. El tratamiento de las muestras se realizará haciendo pruebas con extracciones líquido-líquido, y con cartuchos de extracción en fase sólida (Florisil) (41, 42, 43 44, 45)

III.2.2.2 Remoción de pesticidas

En un primer paso se realizará el aislamiento (46) y observación de las esporas de hongos micorrícicos, para esto se obtendrán muestras cargadas con esporas de estos hongos y se transportarán al laboratorio.

Se mezclará y se homogenizará el suelo y se tomará una muestra de 10 gramos, a la cual se le adicionará 100 mL de agua en un beaker de 250 mL agitándose manualmente con la ayuda de una espátula por un tiempo aproximado de 15 minutos. A continuación se procederá a tamizar la mezcla de suelo y agua vertiéndola en el tamiz en el siguiente orden 1.18 mm, 425 μm , 150 μm y 75 μm de malla y se continuará lavando con agua corriente. Se tomarán las muestras de los tamices de 150 μm y 75 μm de malla.

Seguidamente la muestra tamizada se colocará en un tubo de ensayo y se le adicionará 5 mL de solución de sacarosa al 72 % con tween 80 al 2% de manera que la solución queda por debajo del material suspendido en agua. Posteriormente se colocarán los tubos en la centrifuga a 3000 rpm y se sacarán con cuidado, evitando romper la interfase de agua – sacarosa. Consecutivamente, con la ayuda de una jeringa, se recoge toda la superficie de la interfase, el contenido de la jeringa se pasará al tamiz más pequeño y se lavará para eliminar la sacarosa. A continuación el contenido del tamiz se colocará sobre papel filtro con la ayuda de un embudo y será ubicada en una caja de petri para observarlo al estereoscopio. Las esporas aisladas de la caja de petri se

pondrán en una lámina a la que se le adiciona una gota de PVL colocándole un cubreobjetos para ser observada al microscopio en donde se tendrán en cuenta características referentes a morfología y color. Una vez aisladas las esporas se realizarán pruebas in vitro de remoción de Clorpirifos.

III.2.3 MATERIALES Y REACTIVOS:

- Estándar de pesticida Clorpirifos 2mg/L (Sigma Aldrich)
- Acetonitrilo grado HPLC
- Metanol grado HPLC
- Cepas de hongos micorrizídicos
- Equipo de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) LaChrom con una Bomba Cuaternaria L-7100, una Interfase D-7000, un Detector UV L-7400.
- Balanza analítica
- Material de vidrio
- Micropipetas.
- Equipo EASYPURE II
- Cartuchos SPE Florisil
- Metanol
- Cromatógrafo de gases acoplado a espectrómetro de masas -QP2010 Ultra (Shimadzu).
- Hexano grado HPLC
- Tolueno
- Sulfato de sodio anhidro
- Eter etílico
- Estación voltamperométrica 757 VA Computrace de Metrohm.
- Etanol
- CTAB (Bromuro de Cetil trimetil amonio)
- Cloruro de potasio

III.3 ESTRATEGIA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

✓ La parte experimental del presente trabajo se realizará en dos etapas, en la primera se procederá con la validación de las tres metodologías para la determinación de insecticida organofosforados clorpirifos en un producto pecuario, concluida esta etapa se realizará el muestreo del producto pecuario y se harán pruebas in vitro para la remoción de Clorpirifos con micorrizas arbusculares.

✓ Los datos obtenidos serán almacenados en tablas de Excel con los que se realizarán las pruebas estadísticas para determinar el grado de remoción de los pesticidas, así como para determinar los niveles del pesticida en leche de vacuno.

III.3.1 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Una vez obtenidos los datos se determinaron los siguientes parámetros estadísticos: (47)

III.3.1.1. Estadística de medidas repetidas:

A. Promedio:

Valor que representa un conjunto de datos. Señala un centro de los valores, que es la suma de todas las medidas divididas por el número de medidas.

$$\bar{X} = \frac{\sum x}{n}$$

Dónde:

Σx : Sumatoria del conjunto de datos.

n: Número de datos.

B. Desviación Estándar (S):

La desviación estándar proporciona una medida de la dispersión de un conjunto de resultados alrededor del valor medio. Se considera como la raíz cuadrada de la varianza.

$$S = \sqrt{\frac{\sum (x - X)^2}{n - 1}}$$

Dónde:

x: Sumatoria del conjunto de datos.

X: Promedio de los datos.

n: Número de datos.

C. Coeficiente de variación (CV):

Es una medida de variabilidad extensamente utilizada, también conocido como la desviación estándar relativa (DER):

Dónde:

S: Desviación Estándar

X: Promedio

El CV cuyas unidades se expresan obviamente en tanto por ciento, es un ejemplo de error relativo, es decir una estimación del error dividida por una estimación de valor absoluto de la cantidad medida. Los errores relativos se utilizan con frecuencia al comparar las precisiones de los resultados que tienen diferentes unidades o magnitudes.

III.3.1.2 Pruebas de Significación.

A. Comparación de dos medias experimentales:

Los resultados de un método analítico nuevo se pueden contrastar mediante una comparación con los obtenidos utilizando un segundo método. En este caso tenemos dos medias muestrales X_1 y X_2 . Tomando como hipótesis nula que los dos métodos proporcionen el mismo resultado, es decir $H_0: \mu_1 = \mu_2$, se necesita probar si $(X_1 - X_2)$ difiere significativamente de cero. Para decidir si la diferencia entre dos medias muestrales es significativa, se calcula el estadístico t:

$$t = \frac{(X_1 - X_2)}{s \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}}$$

Donde s se calcula a partir de:

$$S^2 = \frac{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}{(n_1 + n_2 - 2)}$$

y tiene $n_1 + n_2 - 2$ grados de libertad.

B. Análisis de Varianza.

En el trabajo analítico se suelen presentar a menudo comparaciones en las que intervienen más de dos medias. El análisis de varianza (ANOVA) es una técnica estadística muy potente que se utiliza para separar y estimar las diferentes causas de variación. Un ANOVA de un factor contrasta la existencia de diferencias significativas entre medias cuando están presentes más de dos muestras.

Para probar la significación en la relación F se recurre a tablas. Se analiza si el valor calculado para F es menor o mayor que el que se indica en tablas de acuerdo a los grados de libertad. En el primer caso, se concluirá que todos los grupos son iguales, en caso contrario se concluirá que no todos los grupos son iguales, entre algunos o todos existe una diferencia estadística significativa.

Las fórmulas utilizadas son:

Cuadro N° 2 Formulas para ANOVA

Fuente de Variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Estadístico F
Entre de grupos	K-1	SCE	$\frac{SCE}{K-1} = CME$	$\frac{CME}{CMD} = F$
Dentro de grupos	N-K	SCD	$\frac{SCD}{N-K} = CMD$	
Total	N-1	SCT		

Dónde:

N: n° de datos

K: n° de grupos experimentales

C. Prueba de Especificidad: LDS (Least significant difference)

Si en el análisis de varianza los resultados obtenidos fueran significativos a los diferentes métodos, se procederá a averiguar estadísticamente cuál de ellos fue más eficiente o más específico, de no hallarse significancia a la prueba del ANOVA no será necesario realizar ninguna prueba de especificidad.

Esta prueba se recomienda generalmente para datos analíticos, y se calcula con la siguiente expresión:

$$LSD = S \sqrt{\frac{2}{n}} * t_{h(n-1)}$$

Donde:

S: Promedio de cuadrados dentro de los grupos

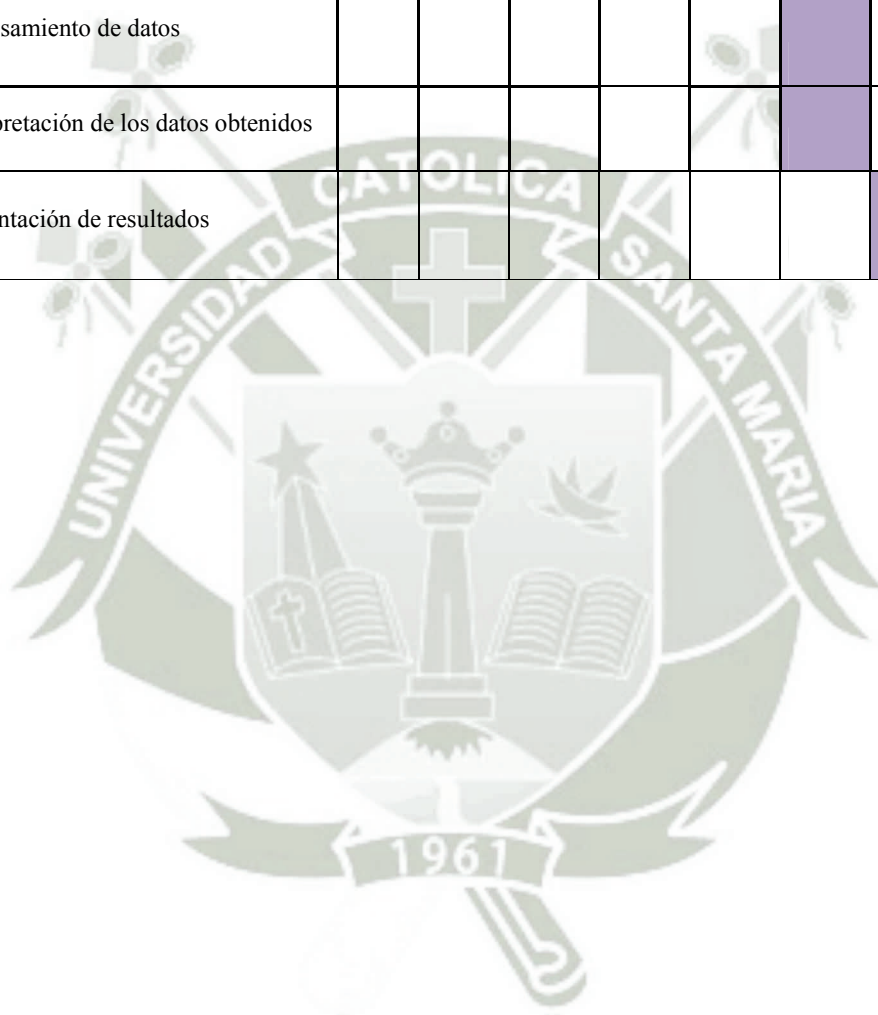
n: Numero de datos por grupo

h: Numero de grupos

t: t de tablas

CAPÍTULO IV
CRONOGRAMA DE TRABAJO:

Actividades a realizar	Mes						
	I	II	III	IV	V	VI	VII
1: Parte Experimental							
2: Procesamiento de datos							
3: Interpretación de los datos obtenidos							
4: Presentación de resultados							





Certificate of Analysis

DESCRIPTION: EPA 508.1 Instrument Check Mix

CATALOG NO.: 507989

MFG DATE: Jul-2010

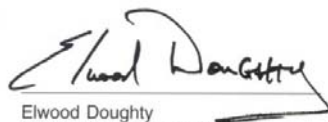
LOT NO.: LB77239

EXPIRATION DATE: Jan-2012

SOLVENT: METHYL TERT-BUTYL ETHER

ANALYTE (1)	CAS NUMBER	PERCENT PURITY (2)	WEIGHT (3) CONCENTRATION	ANALYTICAL (4)	STD DEV	SUPELCO LOT NO
CHLOROTHALONIL	1897-45-6	99.9	50.00	50.66 +/-	0.362	LB61314
DACTHAL (DIMETHYL)	1861-32-1	99.9	50.00	48.98 +/-	0.762	LB58396
DELTA-BHC	319-86-8	99.5	40.00	39.86 +/-	0.441	LB41862
DURSBAN	2921-88-2	99.9 (a)	2.003	2.060 +/-	0.079	LB72183

- (1) Listed in alphabetical order.
- (2) Determined by capillary GC-FID, unless otherwise noted.
a) GC; detector ECD
- (3) NIST traceable weights are used to verify balance calibration with the preparation of each lot. Concentration of analyte in solution is ug/ml +/- 0.5%, uncertainty based upon balance and Class A volumetric glassware. Weights are corrected for analytes less than 98% pure.
- (4) Determined by chromatographic analysis against an independently prepared reference lot. Mean of replicate injections.



Elwood Doughty
Quality Control Supervisor

Supelco warrants that its products conform to the information contained in this publication. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. Please see the latest catalog or order invoice and packing slip for additional terms and conditions of sale.



595 North Harrison Road
Bellefonte, PA 16823-0048 USA
Phone (814) 359-3441