

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CC. QUÍMICAS
Departamento de Química Analítica



**NUEVOS MÉTODOS DE TRATAMIENTO DE MUESTRA
PARA LA PRECONCENTRACIÓN, ESTABILIZACIÓN Y
DETERMINACIÓN DE PESTICIDAS POR
CROMATOGRAFÍA DE GASES**

**MEMORIA PRESENTADA PARA OPTAR AL GRADO DE
DOCTOR POR Abderrahim Bouaid**

Bajo la dirección de las Doctoras:
Carmen Cámara Rica
Pilar Fernández Hernando

Madrid, 2001

ISBN: 84-669-2700-X

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA



**NUEVOS MÉTODOS DE TRATAMIENTO DE MUESTRA
PARA LA PRECONCENTRACIÓN, ESTABILIZACIÓN Y
DETERMINACIÓN
DE PESTICIDAS POR CROMATOGRAFÍA DE GASES**

TESIS DOCTORAL

Abderrahim Bouaid

Madrid, 2001

Dra Carmen Cámara Rica, Catedrática del departamento de Química Analítica de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense de Madrid.

Dra Pilar Fernández Hernando, Profesora Asociada del departamento de Química Analítica de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense de Madrid.

En calidad de Directores de la Tesis Doctoral presentada por *Abderrahim Bouaid*, con el título “Nuevos métodos de tratamiento de muestra para la preconcentración, estabilización y determinación de pesticidas por cromatografía de gases”,

CERTIFICAN: Que la citada Tesis Doctoral se ha realizado en los laboratorios del Departamento de Química Analítica de la Facultad de Ciencias de la Universidad Complutense de Madrid y que a nuestro juicio, reúne los requisitos exigidos para su presentación.

Y para que conste, a los efectos de cumplir los tramites legales que procedan, firmamos el presente en Madrid, a 8 de Mayo del dos mil uno.

Madrid a 08 de mayo de 2001

Fdo: Dra. Carmen Cámara Rica

Fdo: Dra. Pilar Fernández Hernando

Agradecimientos

En el nombre de DIOS el Clemente y el Misericordioso.

La sabiduría es el zumo del pensamiento del ser humano y un resultado de sus experimentos diseñados con palabras coloradas con la sangre de su corazón y es el espejo de la civilización de los pueblos.

Cuanto es mejor dar sin recibir algo de cambio pero yo,

Quiero agradecer a tod@s los que han contribuido para producir este Zumo y formar parte de la llave que abre la puerta de esta magnífica experiencia.

En primer lugar mis mejores agradecimientos lo merecen sin duda mis directores de tesis: Carmen Cámara Rica por su eficaz labor de dirección de la presente tesis y por la confianza que depositó en mi, permitiéndome formar parte de su grupo y Pilar Fernández Hernando por su inestimable ayuda en todo momento. Gracias por sus acertadas correcciones, consejos, su apoyo y su continuo interés para llevar a cabo esta memoria y porque sin ellas este trabajo no salía a la luz.

A mis hermanos khalid por ser el puente de Larache a Madrid, Mohamed, Rachid y Mounir.

A mis compañeros del grupo internacional, Teresa por ser la 1º que conocí aquí aunque ella no lo sabe, Esther y Rosa por ser compañeras del mismo cuarto de experimental y por compartir patrones de pesticidas, Antonio por su ayuda para sacar “aquel” 1º trabajo adelantey Nour por MS, Belen y Eva por dominar el lenguaje “mecachilamachi” todos los extranjeros que han formado parte de este grupo especialmente Christian, Khadija y Ashok por formar ciencia sin fronteras, Paula por vigilarme, Mariella, Estrella, Pilar, Patricia, Marta, a todos los que se me han ido de la cabeza en este momento, todos y cada uno de los miembros de este departamento que de una u otra forma han contribuido por lo menos con una sonrisa para la realización de este trabajo.

A los Prof. A.Azmani por las tierras diatomeas(TD) Jose L. Tadeo por su ayuda y Carmen Cartagena por las muestras de suelo.

A mis compañeros marroquíes en esta universidad especialmente Hassan, M.Serroukh, Morad, Adil, Said y sin olvidar a Hanan(Jana) por asistir al ultimo experimento de esta tesis y por su inestimable apoyo durante los momentos críticos, a todos por la compañía, discusiones , comida y cafés juntos.

A mis compañeros del departamento de A.I y Química Ambiental (IQOG,CSIC) por echar una mano cuando se solicita, especialmente a Lourdes Ramos.

A todos mis amigos, amigos de mis amigos y enemigos de mis enemigos especialmente M.Haggi por ser mi mejor amigo en Madrid, a mi compañero el argelino Abdessalam por sus consejos y su filosofía en esta vida, todos los “Drari del Hawma” de Larache hasta UK pasando por Barcelona, empezando por Abdelkader, Ahmed, Jamal, Hicham, Abdelmougit, Redouan, Fouad, Outman, Tarik y Hamid(ana London!)...etc gracias por su motivación y apoyo, sin olvidarme de la memoria los niños palestinos (atfal alhijara) y iraquíes por darme un ejemplo de que las cosas no se logran por desear pero.....

A todos vosotros Gracias.

*A mi madre y a mi padre
Por formarme en la 1ª escuela y darme el 1º Vº de la vida
Invisibles a mis ojos presentes en mi corazón*

Índice

Objetivos	1
Introducción general	4
PARTE I. LOS PESTICIDAS EN EL MEDIO AMBIENTE	8
I.A.- Aspectos químicos de los pesticidas	8
I.A.1. Pesticidas: Definición, clasificación y mecanismos de acción.....	8
I.A.2. Propiedades físico-químicas.....	15
I.A.3. Efectos en el medio ambiente, en la agricultura y en los seres vivos.....	17
I.A.4. Distribución y movilidad en el medioambiente.....	23
I.A.4.1. Estabilidad de los pesticidas.....	30
I.B.-Remediación de espacios contaminados	36
I.B.1. Descontaminación con procesos físicos–químicos.....	37
I.B.2. Biorremediación.....	40
I.B.3. Fitorremediación.....	41
I.B.4. Estabilización: Las tierras diatomeas como estabilizantes.....	43
I.B.4.1.- Isotermas de adsorción.....	52
 PARTE II.- REVISION DE LOS MÉTODOS ANALÍTICOS MÁS RELEVANTES PARA LA DETERMINACION DE PESTICIDAS	 55
II.- Tratamiento de la muestra	55
II.1.- Extracción líquido-líquido	59
II.2.- Extracción en fase sólida	61
II.2.1-Extracción en fase sólida en discontinuo.....	63
II.2.2-Extracción en fase sólida acoplada en continuo a las técnicas cromatográficas.....	64
II.3.- Microextracción en fase sólida	66
II.4.- Extracción asistida por microondas	83

II.4.1.-Consideraciones teóricas de la interacción de microondas con la materia.....	84
II.4.2.-Aplicaciones analíticas de la extracción con microondas.....	87
II.5.- Otros	91
II.6.- Optimización del proceso analítico: Diseños factoriales	92
II.6.1.- Introducción.....	92
II.6.2.- Diseños factoriales fraccionales.....	93
II.6.3.- Diseños de superficie de respuesta.....	94
III.- Determinación de pesticidas	95
III.1.- Métodos cromatográficos	95
III.1.1.- Cromatografía de gases.....	95
III.1.2.- Cromatografía líquida de alta eficacia.....	98
III.2.- Otros métodos	99
III.2.1.- Electroforesis capilar.....	99
III.2.2.- Cromatografía de fluidos supercríticos.....	100
III.2.3.-Técnicas inmunoanalíticas.....	100
Bibliografía.....	102
Parte Experimental	112
Análisis Alimentario y Ambiental	113
Capítulo I Estudio de la degradación de atracina y otros pesticidas organofosforados en naranjas.....	114
Capítulo II Determinación de atracina y otros pesticidas organofosforados en naranjas mediante extracción asistida por microondas.....	127
Capítulo III Determinación de atracina y pesticidas organofosforados en suelos mediante microextracción en fase sólida.....	133
Métodos de Remediación	163

Capítulo IV	Adsorción de los pesticidas atracina y clorpirifos en sistema binario por las tierras de diatomeas-adsorción competitiva.....	164
Capítulo V	Remediación de atracina y cuatro pesticidas organofosforados en aguas medioambientales.....	190
Capítulo VI	Perspectivas de las tierras diatomeas (TD) en la química analítica y en el medio ambiente.....	196
Discusión Integradora		210
Conclusiones		217
Anexos		221
Anexo 1.- Glosario de términos.....		222
Anexo 2.- Comunicaciones a Congresos.....		225

Objetivos

OBJETIVOS

Es un hecho perfectamente establecido que los pesticidas constituyen un grupo de contaminantes que afectan a todo el ecosistema. Se han encontrado pesticidas en las más insólitas partes de nuestro planeta, en la leche de los mamíferos, en las focas del Báltico y, evidentemente, en las aguas, en el suelo y en los productos vegetales. El vector de introducción de los pesticidas en el ecosistema es su aplicación en la agricultura.

En la actualidad existe una verdadera preocupación por los efectos nocivos derivados de la utilización de pesticidas en la agricultura, por lo que el control de los mismos en el medio ambiente es fundamental. Todo ello ha hecho que sea necesario desarrollar metodologías analíticas que permitan la determinación de pesticidas en muestras medioambientales, alimentos, etc.. a niveles de concentración muy bajo.

El análisis de muestras medioambientales para los contaminantes orgánicos siempre es un procedimiento complicado en el que están involucradas muchas etapas. La exactitud y la precisión de los datos generados no depende solamente de los aparatos cromatográficos usados si no que está basada en la acumulación de una serie de etapas previas que incluyen la estrategia de muestreo, almacenamiento y pretratamiento de la muestra, técnicas de extracción utilizadas, y a veces es necesario limpieza (clean-up) y preconcentración de la muestra.

La investigación que se recoge en esta memoria ha tenido como objetivo el desarrollo de nuevos métodos analíticos para la determinación de pesticidas por cromatografía de gases con detectores NPD (nitrógeno-fósforo), ECD (captura electrónica), MS (espectrómetro de masas) en muestras medioambientales, así como la evaluación de un material para la remediación de espacios contaminados con pesticidas.

Los objetivos más relevantes a desarrollar del presente trabajo son los siguientes:

- Conocer si existe penetración y la posible degradación natural de atracina y cuatro pesticidas organofosforados aplicados en naranjas, con el fin de poder evaluar el posible índice de riesgo en el consumo.
- Desarrollo de nuevos procedimientos de tratamiento de muestras contaminadas con atracina y cuatro pesticidas organofosforados que sean rápidos, simplifiquen y

reduzcan el tiempo de los ya establecidos a la vez y que proporcionen una extracción cuantitativa para ser determinados mediante cromatografía de gases. Con este fin se desarrollará dos métodos analíticos utilizando la técnica de extracción asistida por microondas (MAE) y la microextracción en fase sólida (SPME), métodos conocidos por su posibilidad de automatización y disminución de los reactivos necesarios para el proceso.

➤ Un objetivo adicional es la corroboración de la utilidad y eficacia que supone la utilización de diseños estadísticos, y más concretamente de diseños factoriales, como modelo de ajuste de superficies de respuesta en los procesos de optimización de técnicas analíticas.

➤ El desarrollo y evaluación de procesos eficientes, nuevos, sencillos y baratos basados en el empleo de tierras diatomeas para la eliminación de contaminantes orgánicos (Pesticidas) en aguas medioambientales y lugares seriamente dañados por el impacto industrial y por las actividades urbanas. Un conocimiento profundo sobre el tema implicará conocer las isotermas de adsorción de ciertos pesticidas, así como evaluar la estabilidad/degradación de pesticidas inmovilizados y su potencial de desorción en función de las condiciones del medio.

Introducción

Con el afán de obtener cada vez mayores rendimientos, las prácticas puestas en juego por la “agricultura moderna” fueron el origen de efectos graves al agroecosistema (plagas resistentes, desequilibrio edáfico, polución medioambiental), a la calidad intrínseca del producto (presencia de residuos tóxicos, pérdida de sabor), y al ser humano (exposición a residuos químicos, enfermedades crónicas), convirtiéndose en un sistema insostenible a largo plazo.

Es un hecho evidente, que la lucha química contra las plagas de los cultivos agrícolas ha prestado y sigue haciéndolo, magníficos servicios al agricultor. Los resultados obtenidos en el mantenimiento y aumento de sus cosechas, fundamentalmente a partir de la década de los cuarenta gracias al descubrimiento y aplicación de los pesticidas, ha hecho que su empleo en la actualidad sea de tal magnitud, que para la mayoría de sus usuarios, la utilización de otros métodos de lucha haya quedado relegada a simples posibilidades por considerarse de menor efectividad. Es de destacar el aumento en la producción de estos compuestos entre 1945 y 1975, en el que se pasó de las 100,000 Tm. a 1.800.000. Hoy día, la producción supera ampliamente los 2.000.000 de Tm.

La continua necesidad de producir más alimentos es el origen del aumento de la demanda de estos productos. Los datos disponibles ponen de relieve que en los últimos años se ha producido un incremento de pesticidas del 4-5 % anual e incluso superior en los países desarrollados.

Esta información, pone de manifiesto que la utilización de los pesticidas agrícolas, entendidos como agentes químicos para proteger los cultivos, es en el momento actual importante y necesaria. Sin esta defensa es indudable que se produciría un colapso en los rendimientos de la producción agrícola. La Organización para la Alimentación y la Agricultura de Naciones Unidas (FAO) ha calculado que el cese del empleo de los pesticidas en los E.E.U.U., reduciría el rendimiento de las cosechas y del ganado en un 30-40 % y aumentaría el precio de los productos agrícolas en un 50-70 %.

Sin embargo también es cierto, que el uso de los pesticidas no está exento de problemas. Estos productos químicos se preparan deliberadamente para ser tóxicos frente a determinados organismos, siendo esta la razón de su utilidad comercial. No obstante, en

numerosas ocasiones su empleo produce efectos muy negativos en los seres vivos, tanto en humanos como en animales.

Los residuos de pesticidas pueden constituir, en ciertos casos, una importante fuente de contaminación en las zonas donde se emplean durante tiempos más o menos largos. Su movilidad a través del aire, su acumulación o transformación en el medio donde se aplican y el hecho de que puedan introducirse en la cadena alimentaria, constituyen un tipo de riesgos que deben ser comparados con los posibles beneficios que producen. Necesariamente y para evitar estas acciones tóxicas de los pesticidas, hay que tomar las debidas precauciones y regular su uso mediante normativas que deben ser conocidas por sus usuarios.

El hecho de que la toxicidad por vía oral sea la más nociva respecto a la peligrosidad de un determinado pesticida, ha motivado que las distintas administraciones de los países hayan regulado el contenido máximo de los pesticidas en los productos vegetales listos para el consumo. Estas regulaciones se han establecido basándose fundamentalmente en estudios toxicológicos con animales y en otros criterios técnicos, entre otros la dieta media de cada país. Así, hoy día los límites máximos de residuos (LMR) para los distintos productos alimentarios están regulados.

Lógicamente, los pesticidas ideales serían aquellos que fueran altamente específicos y activos de forma que permitan controlar y destruir con rapidez gran número de plagas sin perjudicar la flora y fauna beneficiosas; es, además, deseable que su persistencia en el suelo o sobre el cultivo tratado sea corta, permitiendo recoger una cosecha sin problemas de residuos ni posibles efectos nocivos para el consumidor a los pocos días de su utilización. Por último, es además importante que su fabricación sea económicamente rentable.

Desgraciadamente en la actualidad no se dispone de ese pesticida ideal. Todos los actualmente en uso presentan ventajas e inconvenientes y ello justifica en parte, no sólo su gran número, sino también los numerosos estudios realizados para dilucidar y comprender su comportamiento en los distintos medios en los que pueden encontrarse.

En este último aspecto hay que señalar, que durante muchos años se ha prestado una atención preferente, a conocer su dinámica en plantas y animales y a establecer los principios generales de los métodos y técnicas utilizables para el control de sus residuos

en los alimentos. Paralelamente, y sobre todo en las últimas décadas, la investigación se ha orientado en gran parte a conocer también su comportamiento en el suelo, debido a la gran capacidad de interacción con este medio. Hay que tener en cuenta, que los pesticidas en el suelo tienden a permanecer en él mucho más tiempo que en las plantas o en animales, ya que comparativamente los seres vivos provocan su metabolización o dilución de forma más rápida. Hoy en día también se ha orientado la investigación a conocer nuevos métodos de eliminación, limpieza y/o descontaminación (remediación) de aguas y suelos contaminados con pesticidas.

Resulta difícil recopilar y exponer todos los aspectos que plantea el comportamiento de estos residuos en el medio ambiente, ya que la bibliografía existente sobre el tema es muy extensa.

Conscientes de estas limitaciones en las páginas siguientes se tratarán solo los aspectos más importantes, relacionados con el comportamiento de los pesticidas en el medio ambiente.

A. LOS PESTICIDAS EN EL MEDIO AMBIENTE

A.I.- ASPECTOS QUIMICOS DE LOS PESTICIDAS

I.A.1.-Pesticidas: Definición, clasificación y mecanismos de acción.

La definición de pesticidas incluye cualquier compuesto o mezcla de compuestos que se aplique sobre un terreno agrícola para destruir, mantener alejados, prevenir o limitar la acción de hongos, insectos, hierbas y en general, de plantas, animales o microorganismos que puedan afectar al desarrollo, rendimiento y conservación de los productos cultivados.

Estos productos químicos pueden clasificarse en función de su finalidad. Así se denominan insecticidas los que se usan contra los insectos, herbicidas contra las malezas, fungicidas contra los hongos y rodenticidas contra los roedores.

Herbicidas:

Las plantas no deseadas que crecen en los cultivos constituyen uno de los problemas clásicos en agricultura, contra las que el hombre lucha mediante el empleo de herbicidas.

Desde el punto de vista de su naturaleza química hay más de 12 familias de compuestos químicos que se usan como herbicidas. Hay herbicidas selectivos que solo matan algún tipo de plantas y otros no selectivos que matan toda la vegetación. Entre los selectivos los hay que eliminan las plantas con hoja ancha mientras que otros eliminan las gramíneas.

En la actualidad se emplean herbicidas muy variados que se aplican por lo general directamente sobre el terreno cultivado, o sobre las hojas del vegetal, originando en ambos casos, una acumulación más o menos grande del producto en los correspondientes suelos.

Los herbicidas presentan mecanismos de acción muy variados pudiendo actuar por diferentes vías simultáneamente o de distinta forma según la concentración. En la tabla

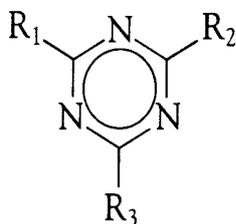
1 se indican los principales mecanismos de acción de los tipos de herbicidas más representativos.

Tabla 1.- Mecanismos de acción de los herbicidas.

Tipo de herbicida	Mecanismo de acción
Triacinas	Bloqueo o inhibición de la fotosíntesis.
Carbamatos	Alteración de la mitosis. Inhibición de la división celular.
Ureas	Inhibición de la reacción de Hill.
Cloroacetamidas	Interfiere en la germinación.
Aminotriazoles	Destrucción de la clorofila.

-Compuestos triacínicos: Son herbicidas de espectro muy amplio que en algunos casos exhiben una acción selectiva. Debido a su baja toxicidad en la actualidad se aplican en cultivos muy extensos, tales como el maíz, y en el tratamiento contra plagas que atacan a las plantas de raíces profundas, como el olivo, los cítricos, el café, el té, el cacao, etc....

Los herbicidas derivados de las triacinas inhiben la fotosíntesis, las triacinas presentan la siguiente estructura química general:



En triacinas, R₁=Cl y R₂, R₃= grupos aminos

La atracina, introducida en 1958, es hoy día uno de los herbicidas más usados y cuya estructura se muestra en la Figura 1, es el herbicida más utilizado en los cultivos de maíz. Otros compuestos de este tipo de elevado uso son la simacina y el prometrin.

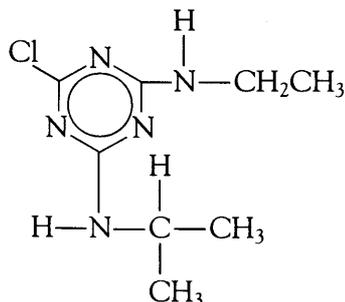


Figura 1.- Estructura química del herbicida atracina.

Otros tipos de herbicidas, como derivados fenólicos, bupiridínicos, fenoxiácidos, nitroanilinas, ácidos policlorofenoxiacéticos, organofosforados, derivados de la urea etc..., son también de suma importancia en la protección de los cultivos y en general poseen un amplio espectro de acción sobre la mayor parte de las malas hierbas.

Insecticidas:

Los insectos escarabajos, orugas, moscas y mosquitos entre otros, son los que ocasionan más plagas, causan grandes daños en las cosechas y transmiten enfermedades. Más de la mitad de los pesticidas que se emplean pertenecen al grupo de los insecticidas.

Desde hace muchos años los hombres han utilizado distintos tipos de sustancias llamadas insecticidas de la primera generación tales como cenizas, azufre, compuestos arsenicales, tabaco molido, cianuro de hidrógeno, compuestos de mercurio, zinc y plomo, etc. para luchar contra los insectos. Éstos son productos en general muy tóxicos, poco efectivos en la lucha contra la plaga y muy persistentes en el ambiente (hasta 50 años), hoy día se usan muy poco e incluso bastantes de ellos están prohibidos por su excesiva toxicidad.

Los avances de la ciencia y de la industria química hicieron posible la aparición de insecticidas mejores denominados de segunda generación. Son un conjunto variado de moléculas que se clasifican en grupos según su estructura química. Las tres familias más importantes son los organofosforados, los organoclorados y los carbamatos, los

cuales suelen aplicarse para atacar los insectos, larvas y huevos que viven y se desarrollan en el terreno.

Muchos insecticidas deben su actividad a que alteran el sistema nervioso de los insectos, otros actúan alterando su metabolismo y otros son tóxicos protoplasmáticos o estomacales.

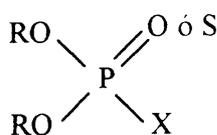
Con el fin de ofrecer una perspectiva general y resumida de los principales mecanismos de acción de los insecticidas, en la tabla I.2 se indican esquemáticamente dichos mecanismos.

Tabla 2.- Modo de acción de los insecticidas.

Grupo	Subgrupo	Ejemplos
Neurotóxicos	Anticolinesterásicos	Organofosforados y Carbamatos.
	Alteradores de la permeabilidad iónica	DDT, ciclodienicos, piretroides.
	Bloqueadores de los receptores de acetilcolina	Nicotinoides.
Inhibidores metabólicos	Inhibidores de la respiración	Rotenoides, dinitrofenoles, CO, -SH ₂

Los insecticidas más conocidos son los siguientes:

-Organofosforados : Los organofosforados pueden considerarse como derivados del ácido fosfórico (H₃PO₄), siendo en gran parte ésteres. Son compuestos solubles en agua y fácilmente hidrolizables, por lo que presentan una baja resistencia en el medio ambiente. La mayoría de los insecticidas organofosforados presentan la siguiente estructura química general:



Donde los grupos R son metilos o etilos, mientras que el grupo X puede ser alifático, homocíclico o heterocíclico, estando unido al átomo de fósforo directamente o a través de un átomo de oxígeno o de azufre. La Figura 2 muestra la estructura química de algunos de los insecticidas organofosforados más importantes.

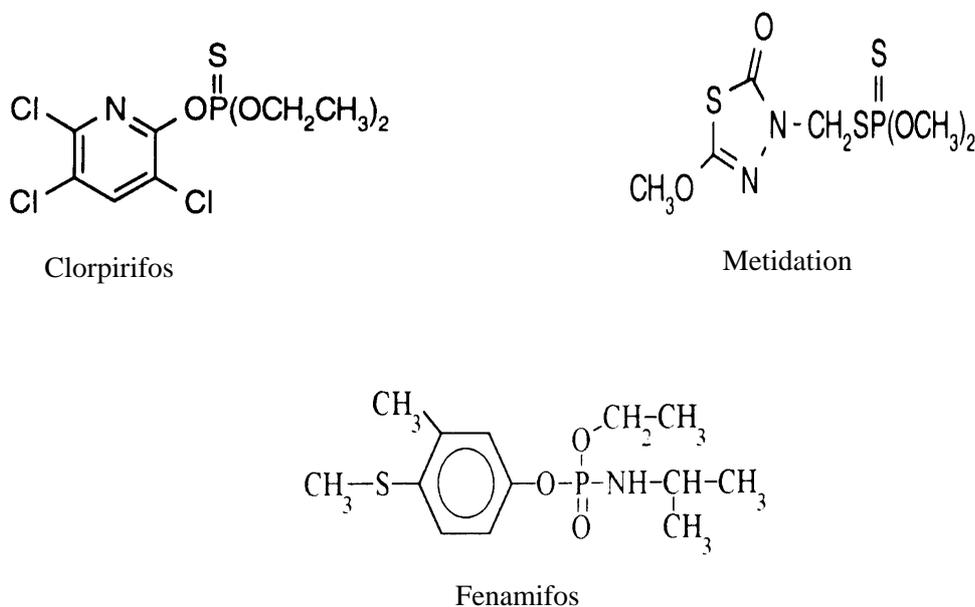


Figura 2.- Estructura química de algunos insecticidas organofosforados.

Los insecticidas tiofosforados constituyen un grupo importante en esta familia, presentando una estructura química similar a la de los derivados fosforados. La presencia de un átomo de azufre ligado al fósforo (en lugar de oxígeno) confiere a estas moléculas una mayor estabilidad química. Así, por ejemplo, los compuestos tiofosforados se hidrolizan mucho menos y por ende pueden ser utilizados en medio acuoso. El paration es uno de los compuestos más conocidos de este grupo y su utilización a escala mundial se halla muy difundida. La Figura 3 muestra las estructuras químicas generales de los tres subclases de los insecticidas organofosforados y algunos ejemplos específicos.

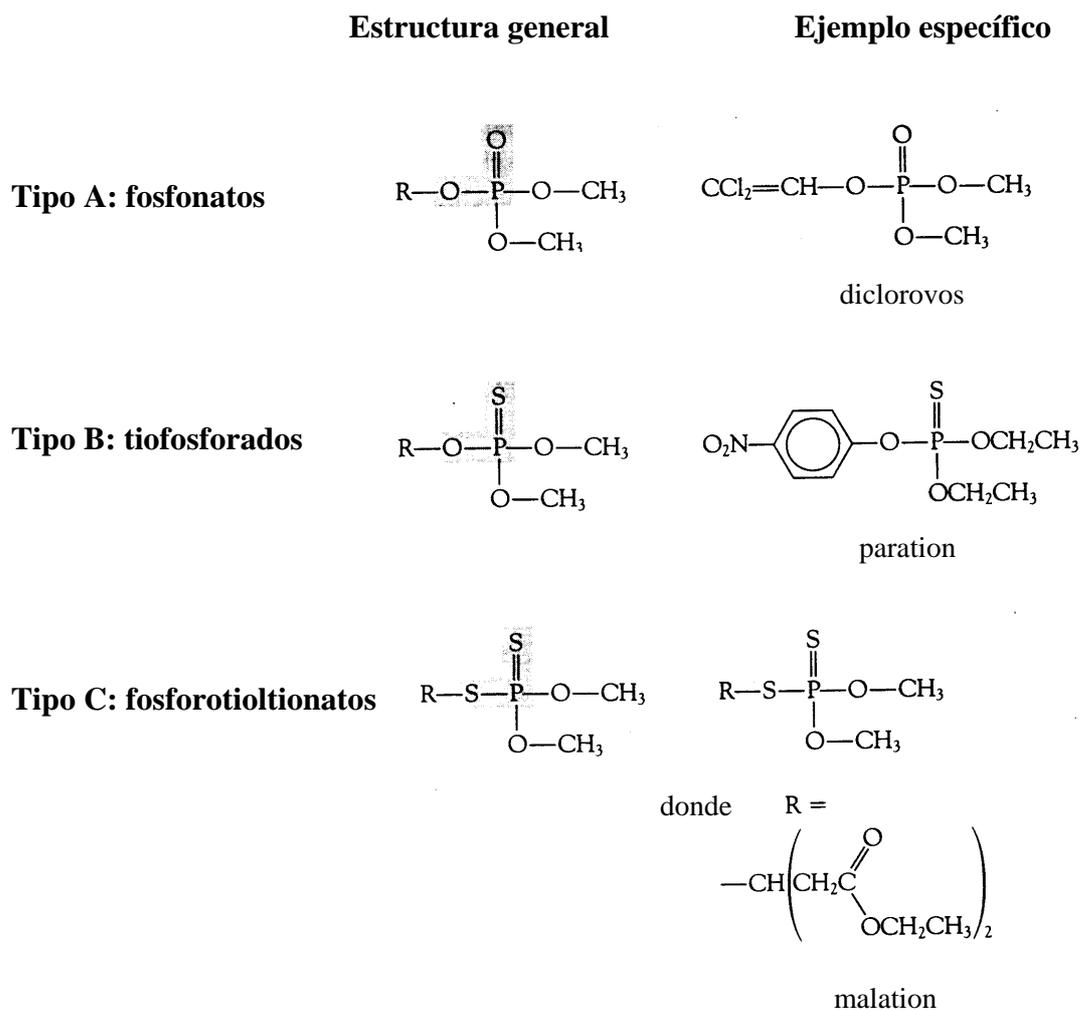


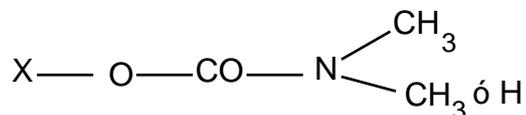
Figura 3.- Tipos de estructuras químicas de insecticidas organofosforados.

Los organofosforados (malation, paration, etc.) son muy tóxicos para el hombre, poco persistentes (días) y se eliminan en la orina. Su toxicidad es equiparable a la del arsénico, la estricnina o el cianuro. Se usan mucho en agricultura y actúan sobre el sistema nervioso de los insectos, inhibiendo la acción hidrolítica de la enzima acetilcolinesterasa. Esto produce la acumulación de acetilcolina en las terminales nerviosas, provocando un exceso de estimulación, lo cual conduce a un ritmo cardiaco irregular y a la muerte.

Carbamatos: Los carbamatos son insecticidas menos utilizados, aunque su actividad biológica resulta ser muy similar a la de los derivados fosforados. La diferencia fundamental es que en estos compuestos tal actividad depende mucho de la posición de los grupos sustituyentes presentes en la molécula y de la esteroisometría. En general

actúan por contacto. Los de uso mas frecuente son los N-metilcarbamatos, entre los cuales cabe mencionar por su mayor difusión al carbaril.

La estructura química general de los carbamatos es la siguiente:



Los carbamatos (por ejemplo el carbaril, de nombre comercial Servin; o el propoxur, llamado Baygon, etc.) son poco persistentes (días) y se eliminan en la orina. Son poco tóxicos para el hombre pero menos eficaces en su acción como pesticidas que los organofosforados. Se usan menos en agricultura y más en interiores, como insecticidas caseros, etc.

Insecticidas cloroorgánicos: Estos productos cubren algunas familias de compuestos de importancia histórica, desarrollados poco antes y durante la Segunda Guerra Mundial. Los más conocidos son el DDT(y sus derivados).

El **DDT** ha sido sin duda el pesticida más popular durante varias décadas y su acción puede considerarse de tipo general, dado que ataca a casi todos los insectos. Los principales inconvenientes ligados al uso de este producto son su elevada estabilidad química, que favorece la acumulación del DDT en el medio, y el hecho de su empleo masivo durante muchos años, que ha dado origen al desarrollo de un gran número de especies resistentes. Actualmente su empleo está prohibido.

Derivados ciclodiénicos: Su utilización ha sido cuestionada por parte de la OMS (Organización Mundial de la Salud), ya que está establecido que estos productos se acumulan en los órganos de los mamíferos y son tóxicos para los seres humanos.

El poder insecticida de esta familia, con compuestos tan conocidos como el clordan, aldrin, heptaclor, es muy elevado, pero su utilización masiva crea muchos problemas debido a su gran persistencia en el medio ambiente.

Derivados del piretro: Las características más favorables de estos compuestos son las de ser fácilmente degradables en el suelo y no presentar efectos tóxicos notables sobre la salud humana. En general son moléculas bastante estables al aire y a la exposición

de la luz solar. Entre los compuestos más difundidos de este grupo cabe mencionar al permetrin.

Fungicidas:

Los fungicidas se aplican selectivamente a aquellos cultivos que han perdido la resistencia natural al ataque por parte de hongos, tratándose normalmente las enfermedades producidas por este tipo de parásitos a nivel de las hojas. Algunos se utilizan para proteger la superficie exterior de distintas partes de la planta (no penetrante), mientras que otros pueden entrar en el vegetal a través de las raíces y llegar al follaje por vía interna. Existen asimismo algunas clases de agentes micostáticos de tipo inorgánico, principalmente sales de níquel, cinc, cobre, cromo, mercurio.

I.A.2.-Propiedades físico-químicas

Las propiedades físico-químicas de los pesticidas son las que determinan en qué modo influyen, su movilidad en el medio ambiente, y con qué grado de eficacia es posible eliminarlos según los diversos métodos existentes. La evaluación de estas propiedades depende en gran medida de su solubilidad, de su presión de vapor y del coeficiente de reparto, así como de su estabilidad y/o capacidad de degradación.

Los coeficientes de reparto son valores empíricos que describen de qué forma se distribuye una sustancia química en dos medios distintos. Los coeficientes de reparto de agua-octanol, agua-suelo y líquido-vapor son los más importantes, en la gestión de los residuos.

El coeficiente de reparto agua-octanol es una constante adimensional definida por la fórmula:

$$K_{ow} = C_o/C$$

en donde C_o = concentración en octanol y C = concentración en agua.

Este coeficiente sirve, por ejemplo, para conocer la cantidad de sustancia que será absorbida por los organismos acuáticos. Los valores de K_{ow} pueden encontrarse en un intervalo de hasta diez órdenes de magnitud, abarcando desde 10^{-3} hasta 10^7 . Este coeficiente es de especial utilidad a la hora de calcular el destino y traslado de

sustancias químicas, y está en relación con los coeficientes de adsorción del suelo, el factor de bioconcentración (FBC) y la solubilidad en agua. Las sustancias químicas con menor valor K_{ow} (< 10) se consideran hidrofílicas, así como por poseer una baja capacidad de adsorción en el suelo y un reducido FBC.

El coeficiente de reparto de agua-suelo, K_p , sirve para medir la capacidad de una sustancia química para ser adsorbida por el suelo o por los sedimentos, y se puede establecer como:

$$K_p = X/C$$

en donde X = concentración en el suelo

C = concentración en agua

Debido a que la adsorción de sustancias químicas orgánicas por el suelo es debida a su contenido en materia orgánica, el coeficiente de reparto de carbono orgánico, K_{oc} , puede establecerse del siguiente modo:

$$K_{oc} = Cc/C$$

en donde Cc = concentración adsorbida

K_{oc} puede ser deducido a partir de K_p :

$$K_{oc} = K_p / f_{oc}$$

En donde f_{oc} = fracción de carbono orgánico del suelo (no dimensional)

K_p es esencialmente el mismo que el coeficiente de adsorción Freundlich (mg/g). K_p y K_{oc} están en función del contenido de carbono orgánico, y son relativamente independientes del suelo o sedimentos específicos. Los cálculos estimados de K_p y K_{oc} pueden ser muy variables, y debe prestarse especial atención al aplicar estos parámetros. Como muestra la tabla 3, el valor de K_{oc} puede ser calculado partiendo de diversas propiedades físico-químicas.

El coeficiente de reparto líquido-vapor es función de la temperatura, de la presión del vapor, de la presión atmosférica, de la composición del líquido y del vapor, y del

compuesto en concreto. La ley de Raoult para disoluciones ideales y la ley de Henry para concentraciones bajas son casos específicos del coeficiente de reparto.

Tabla 3.- Correlación entre el k_{oc} y las propiedades químicas [1].

Tipo de sustancia química	Número de componentes químicos	Ecuación
Pesticidas	45	$\text{Log } k_{oc} = 0.544 \text{ log } K_{ow} + 1.377$
Aromáticos	10	$\text{Log } k_{oc} = 1,00 \text{ log } K_{ow} - 0.21$

El factor de bioconcentración. El factor de bioconcentración, FBC, muestra cuanto pesticida es susceptible de acumularse en los organismos acuáticos. Se puede calcular a través de la expresión:

$$FBC = C_{org}/C$$

En donde C_{org} = concentración equilibrada en un organismo

El factor de bioconcentración es fundamental en la evaluación de riesgos de los pesticidas. Su valor por lo general está asociado al contenido en lípidos del tejido animal y varía entre distintas especies. Así, por ejemplo, el *Pimephales promelas* tiene un valor del FBC mayor que el de la trucha [2].

Sorción es el proceso por medio del cual el pesticida se traslada de una fase a otra atravesando una barrera. El proceso de sorción depende del tipo de sorbente, tipo de sustancias químicas y medios.

I.A.3.- Efectos de los pesticidas en el medio ambiente, en la agricultura y en los seres vivos.

Los efectos de los pesticidas están directamente relacionados con la resistencia genética, las alteraciones que producen en el ecosistema, su acumulación en la cadena trófica y finalmente sobre el ser humano.

Resistencia genética

Un problema relacionado con el empleo de pesticidas es la llamada resistencia genética, la cual se produce porque entre los muchos individuos que componen la población de una plaga algunos poseen genes que hacen que el pesticida no sea tóxico para ellos por lo que soportan la acción del pesticida sin morir. Por otra parte, las nuevas poblaciones de la plaga heredan el gen de resistencia y la acción del pesticida contra ellas será mucho menor. La aparición de resistencia trae consigo la necesidad de aumentar la dosis necesaria para conseguir el mismo efecto y con ello un incremento de los efectos indeseables derivados de su aplicación. En Australia, este fenómeno ha causado que el tratamiento con fenamifos resulte ineficaz [3].

Como con los insectos las generaciones de plagas se suceden unas a otras con rapidez y la resistencia genética aumenta. Es por ello que los insectos han evolucionado a un mayor grado de resistencia frente a diversos pesticidas: de más de 2000 especies de plagas, cerca de 400 han desarrollado la resistencia.

Alteraciones en el ecosistema

Otro de los principales problemas asociados al uso de pesticidas es el que éstos no sólo matan a la plaga, sino también a otros insectos beneficiosos como abejas y otros organismos. De esta forma pueden hacer desaparecer a los enemigos naturales de la plaga o provocar que estos se trasladen a otros lugares porque ya no encuentran alimento en ese campo y, después de un breve periodo, la población de la plaga rebrota y además en mayor cantidad que antes al no tener enemigos naturales.

Un hecho que está adquiriendo cada vez más atención dada su importancia económica, ecológica y agrícola es la desaparición de especies útiles para la agricultura, impidiendo, por ejemplo, la polinización de plantas que necesitan la acción de insectos especializados. Las abejas productoras de miel o las abejas silvestres se encuentran entre las víctimas de envenenamiento por pesticidas y de ahí que su población está en descenso.

Un ejemplo típico lo constituye las consecuencias causadas por el empleo del dieldrin para matar a los escarabajos japoneses, el cual causó además la muerte de un gran

número de pájaros, conejos, ardillas, gatos e insectos beneficiosos. Desde entonces el uso de dieldrin ha sido suprimido en algunos países.

La disminución de poblaciones de aves y la alta mortalidad indican que la salud ambiental y, por consiguiente, la de los organismos que dependen de ella, sufre a causa del uso y abuso de los pesticidas. En este sentido, se ha detectado desde disminución de las aves cantoras a comienzos de los años cuarenta, de los halcones peregrinos, de las águilas pescadoras y de otras aves rapaces, a partir de los años sesenta, hasta las muertes más recientes de más de un 5% de la población mundial de gavilanes de Swainson durante el invierno de 1995.

Se estima que de la cifra aproximada de 672 millones de aves expuestas anualmente a pesticidas en las tierras agrícolas de los Estados Unidos, un 10% muere (considerando solo las aves que habitan en las tierras agrícolas y por tanto que mueren exclusivamente por ingestión de pesticidas). La extensión total de fatalidades entre las aves causadas por pesticidas es sumamente difícil de determinar pues la mayoría de muertes pasa inadvertida [4].

Paralelamente se ha demostrado que la exposición al acefato, un organofosforado, puede interferir en la capacidad de un ave adulta para orientarse en la dirección adecuada para emigrar.

Hasta ahora, han encontrado casi 40 especies de pesticidas letales para las aves, de los que solo un 25% ha sido prohibido su uso en los Estados Unidos y la mayoría siguen utilizándose en otros países. Entre los pesticidas para las aves se incluyen: diazinón, forato, clorpirifos, carbofurán, paration, monocrotofós, isofenfós, aldicarb, y azinfosmetílico.

El empleo de otros pesticidas ha ocasionado, también, la desaparición de otras especies animales. Así por ejemplo, un estudio publicado en Canadá mostró el caso de que su empleo sobre los bosques en ese País, a mediados de los años 1970, llevó a una disminución drástica en la población de salmón atlántico (un 45% de reducción en el salmón pequeño, un 77% de reducción en el salmón grande)[5].

Las alteraciones en el ecosistema citadas han provocado, en algunas ocasiones, que organismos que hasta ese momento no eran plagas, al desaparecer otras especies que

mantenían controlado su número, se hayan convertido en nuevas plagas muy difíciles de eliminar. Así, por ejemplo, cuando se usó el DDT para controlar unos insectos que destruían los limoneros, como consecuencia indirecta se originó una plaga nueva con un insecto chupador que ataca a las plantas y que no era problemático antes del tratamiento con DDT.

Acumulación en la cadena trófica (Bioacumulación)

Algunos pesticidas tienen estructuras químicas muy estables y tardan años en degradarse en formas menos tóxicas. En las zonas en las que su empleo es continuo su concentración aumenta con el tiempo. En muchos casos estos productos son, además, difíciles de eliminar por los organismos vivos por ser poco solubles en agua y tender a acumularse en los tejidos grasos. Cuando los organismos vivos que se han contaminado con los pesticidas son ingeridos por otros, el producto contaminante se va acumulando en mayores proporciones en los tramos finales de la cadena trófica. De esta forma un pesticida que se encuentra en concentraciones muy bajas, no peligrosas, en un bosque o un lago, termina estando en concentraciones de decenas o cientos de veces más altas en los tejidos grasos de los animales, como aves rapaces o peces o mamíferos depredadores que están situados en lo más alto de la cadena trófica. Un ejemplo gráfico se muestra en la figura 4.

Cuando se utilizan las reservas de grasa con gran rapidez, como ocurre durante la migración de las aves, si existen suficientes pesticidas organoclorados acumulados, éstos pueden liberarse en el cuerpo hasta causar la muerte.

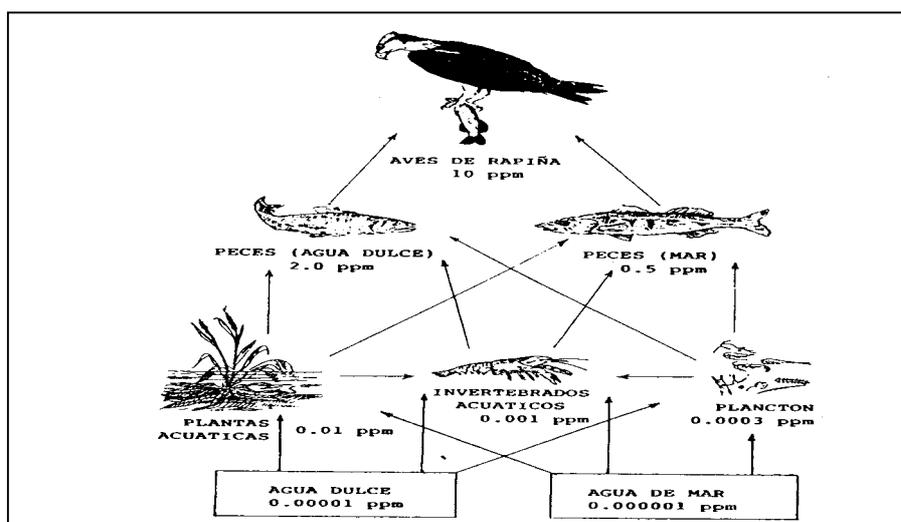


Figura 4.-Concentración del DDT a través de una cadena alimenticia preferentemente acuática.

Acción de los pesticidas sobre el hombre

La salud humana puede verse afectada por los pesticidas en dos aspectos diferentes. Por un lado la toxicidad crónica derivada de una prolongada exposición a dosis muy bajas de uno o varios de estos productos, provocada generalmente por la ingestión de alimentos que los contienen, y por otro, la toxicidad aguda causada accidentalmente en su manipulación o aplicación o por intentos suicidas.

Los conocimientos que se tienen sobre ambos tipos de toxicidad son muy diferentes. La intoxicación crónica es mucho más difícil de estudiar pues suele afectar a grupos heterogéneos de población, no existe certeza sobre la dosis ingerida y existen muchos factores difíciles de controlar (ingestión de una o varias sustancias, tiempo de ingesta, en qué orden, etc.). Además, los efectos aparecen a largo plazo y muchas veces su inespecificidad hace que se confundan con otros problemas o enfermedades de los afectados.

Los problemas derivados de toxicidad aguda son más concretos, se conocen con mejor precisión el o los productos implicados, los efectos son inmediatos o casi inmediatos y la sintomatología es también mucho más específica y definida.

Por ello la toxicidad crónica y los efectos desconocidos que de ella puedan derivarse (infertilidad, carcinogénesis, mutagénesis, etc.) es la que más preocupa. Los casos de intoxicación derivados de accidentes, podían evitarse en gran medida respetando las normas de seguridad para la fabricación, transporte, almacenamiento, aplicación de pesticidas, y la eliminación de sus envases.

El número de personas que mueren por pesticidas es bajo pero decenas de miles de personas se envenenan con ellos todos los años padeciendo síntomas más o menos graves incluyendo la aparición de cánceres. La mayoría son agricultores u otras personas, en especial las poco experimentadas en su manejo, pertenecientes a países en vías de desarrollo, son las que más sufren estos percances.

Dado que en el mundo actual todos estamos expuestos diariamente al contacto y a la ingestión de pequeñísimas cantidades de pesticidas y otros productos artificiales, algunos autores sugieren que las consecuencias para la humanidad, a largo plazo, pueden ser serias.

En un estudio sobre residuos de pesticidas en la orina se detectaron metabolitos de dos pesticidas organofosforados: las personas examinadas se encontró clorpirifos en un 82%, y paration en un 41% [6]. Investigadores en USA y Canadá publicaron la detección de pesticidas en el liquido amniótico en un 30% de una muestra de 9 mujeres embarazadas [7].

Entre las enfermedades y problemas de salud que pueden originar los pesticidas se encuentran la disminución de la fertilidad, aumento en el número de cánceres, malformaciones congénitas, etc. Aunque no hay evidencia de que esto sea así, tampoco hay completa seguridad del efecto que este conjunto de sustancias pueden producir en el ser humano a largo plazo.

El metil paration es el pesticida mas ampliamente detectado en peras, manzanas, melocotones y habichuelas enlatadas y congeladas. A finales del año 1998 la EPA estableció que la presencia de metil paration en alimentos representa un riesgo inaceptable pero no tomó acción alguna para prohibir o reducir su uso [8]. Los mecanismos de actuación de los pesticidas en la salud humana son variados. Generalmente actúan disolviéndose en la membrana lipídica que rodea a las fibras nerviosas, interfiriendo en el transporte de iones a su través, modificando la acción de algún enzima del metabolismo.

La fijación de las sustancias tóxicas a las enzimas, o a otro tipo de receptores, inicia una cadena de acontecimientos no explicados aún en su totalidad. Sin embargo, se sabe que éstas interfieren con los efectos no beneficiosos de las reacciones bioquímicas habituales del cuerpo humano o dan lugar a reacciones metabólicas anormales que tienen como consecuencia una respuesta tóxica. Esta respuesta puede consistir simplemente en efectos a corto plazo, como dolores de cabeza o náuseas, pero también puede acarrear consecuencias fatales, como en el caso del cianuro, que disminuye el intercambio de oxígeno a nivel celular hasta el punto de colapsar las funciones del sistema nervioso provocando fallos respiratorios.

Los efectos tóxicos de los pesticidas organofosforados pueden inhibir la acetilcolinesterasa. En las terminaciones nerviosas la liberación de acetilcolina provoca la contracción de las fibras musculares, pero activa también ciertas zonas del sistema nervioso autónomo[9]. Con el fin de evitar una acción prolongada y excesiva, la

enzima acetilcolinesterasa presente en las terminaciones nerviosas divide la acetilcolina en ácido acético inactivo y colina. La exposición a un compuesto organofosforado como el paraoxón (un metabolito del paratión) puede inhibir la acción de la acetilcolinesterasa (ACE), permitiendo por tanto la acumulación de acetilcolina en las terminaciones nerviosas. Como consecuencia, pueden surgir contracciones bronquiales, un aumento en la salivación, la contracción de los músculos blandos (ejecutores de las funciones involuntarias), y retorcimientos y calambres en los músculos esqueléticos [10]. En la Figura 5 se refleja la hidrólisis normal de la acetilcolina y el efecto inhibitorio causado por el pesticida paraoxón.

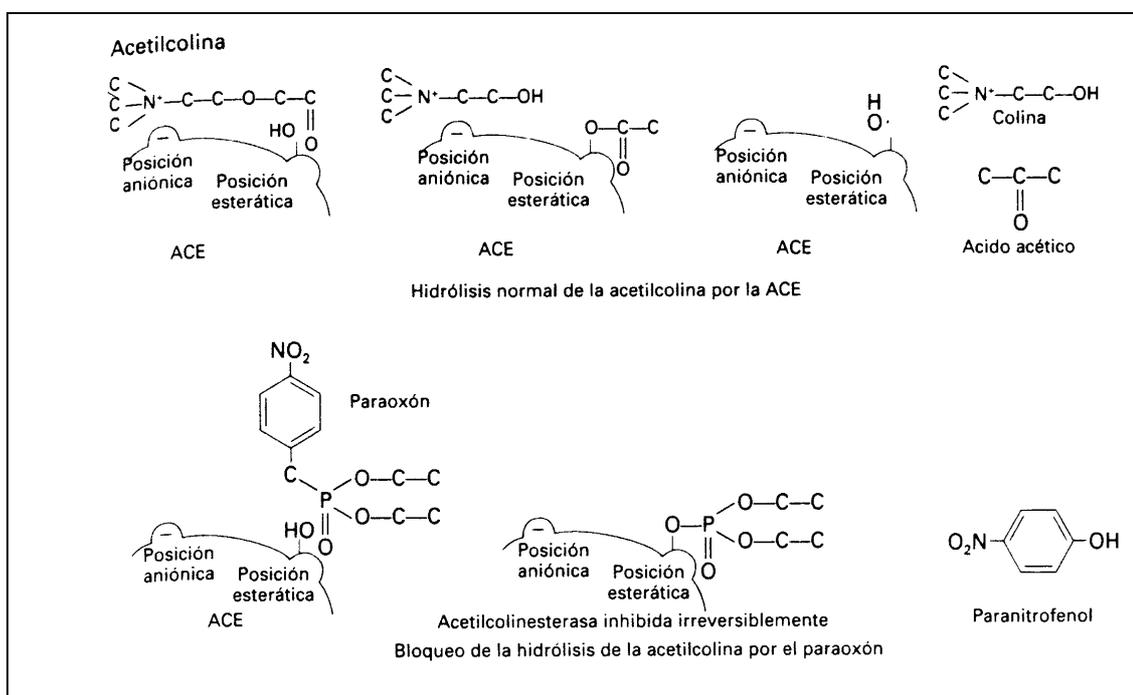


Figura.5- Inhibición de la enzima acetilcolinesterasa (ACE) por el organofósforo [11].

I.A.4.-Distribución y movilidad de los pesticidas en el ambiente

Otra fuente de problemas en el uso de pesticidas es que, en muchos casos, no permanecen en el lugar en el que se han depositado originalmente sino que, a veces, se trasladan a grandes distancias a través del agua, del suelo y del aire.

La distribución y localización de los pesticidas en el medio ambiente conlleva el estudio de los procesos físicos que controlan el transporte y la difusión de los

compuestos artificiales producidos por la actividad humana en el suelo, en el aire y en el agua.

Contaminación del suelo con los pesticidas

El suelo es el lugar al que con más probabilidad van a parar los residuos originados por la actividad antropogénica. La presencia de sustancias ajenas al medio edáfico puede conllevar serios problemas para el medio vivo que sustenta, los cuales, además, pueden proyectarse a otros seres vivos indirectamente relacionados a través de la cadena trófica.

El papel que tienen ciertos componentes del suelo es el de depurar, reteniendo algunos contaminantes por adsorción física, interacción química, o transformación mediante determinadas reacciones químicas.

Un pesticida se puede aplicar directamente al suelo, en sólido o en disolución rociándolo por encima de las hojas de las plantas. En este último caso, una parte del pesticida persiste absorbido sobre la superficie de la planta, mientras que el resto se disuelve o se arrastra por el agua de lluvia, hasta incorporarse al suelo. Una vez en el suelo, el pesticida puede migrar a través de éste y pasar a las aguas subterráneas.

La facilidad con que se lleve a cabo este desplazamiento depende de la naturaleza y de las propiedades químicas de los pesticidas, de la formulación, del método de aplicación del pesticida y del entorno en que se aplica (existencia de pendientes, grado de drenaje del terreno, etc...), así como del tipo de las especies de cultivos.

La relación entre el uso intensivo de los agroquímicos y la contaminación de los recursos hidráulicos a nivel mundial no consiguió motivar el interés científico hasta el inicio de los años setenta. La contaminación del agua subterránea con los diversos pesticidas aplicados en la agricultura era virtualmente desconocida, pues se suponía que los pesticidas y los fertilizantes se degradaban en condiciones naturales a través del suelo, evitándose de esta forma que alcanzaran las aguas subterráneas. Hoy día, sin embargo, está claro que la utilización de estos pesticidas, pueden afectar en forma significativa la calidad del agua subterránea.

En principio se puede asegurar que aquellos que sean poco solubles en agua, poco volátiles y químicamente estables, permanecen largos periodos de tiempo en el suelo.

La cantidad de pesticida que se elimina por lixiviación, depende de la retención del pesticida, en el suelo, de su transformación química o biológica y de su volatilización.

De acuerdo con los estudios realizados por la Agencia de Protección Ambiental del los Estados Unidos (EPA) [12], han sido detectados aproximadamente 77 pesticidas diferentes en el agua subterránea de ese país, destacando entre ellos atracina, alaclor, aldicarb, diurón, metaclor y simacina. El transporte de los pesticidas tiene lugar principalmente en la fase acuosa, gracias a que muchos de los productos empleados presentan solubilidades mayores a los 10 mgL^{-1} y son comercializados como formulaciones solubles en agua [13]. La atracina presenta una solubilidad moderada en agua (33 mgL^{-1}) y muestra una movilidad media en el suelo, sin embargo, la de otros productos como 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) es muy superior (900 mgL^{-1}), lo que junto a sus propiedades químicas, han facilitado su aparición en aguas [14].

La retención del pesticida en el suelo viene gobernada por el complejo proceso de adsorción, el cual aumenta con su contenido en materia orgánica. Los ácidos húmicos son los que presentan en concreto, una mayor capacidad de retención de pesticidas.

Movimiento de los pesticidas en el suelo.

El movimiento de los pesticidas en el suelo puede tener lugar a través de los procesos siguientes: Difusión, lixiviación, erosión, volatilización, asimilación por animales y microorganismos del suelo.

Difusión. La difusión es el proceso mediante el cual, un pesticida se desplaza a través del suelo, debido a su energía térmica, de puntos de mayor a menor concentración. Este movimiento se puede dar tanto en la fase gaseosa del suelo como en la líquida o en el aire de la fase ínter sólida [15].

En realidad, se han efectuado pocos estudios en campo sobre este tipo de movimiento y los resultados disponibles derivan de experimentos realizados a nivel de laboratorio. Los factores que mayormente afectan a la difusión son los siguientes: El coeficiente de difusión, la solubilidad y la densidad de vapor del pesticida, así como la temperatura, el contenido en agua y la porosidad del suelo; y finalmente, la capacidad de adsorción en el suelo [16]. De todos los factores apuntados, los admitidos como más importantes son la adsorción, la temperatura y el contenido de humedad del suelo.

Un incremento de la adsorción reduce la difusión. Por consiguiente, todos los factores que a su vez influyen sobre la adsorción ejercerán también una clara influencia en la difusión. Altos contenidos en materia orgánica, arcillas u óxidos de hierro y aluminio en la tierra incidirán en la disminución de la difusión del pesticida. Mientras que el aumento de la temperatura tiende en general a aumentar el coeficiente de difusión y la presión de vapor del pesticida por lo que, un aumento de ésta se traduce en un incremento de la difusión [17].

Por otra parte, la difusión aumenta con el porcentaje de humedad en el suelo. Este hecho fue demostrado por SHEARER y cols. [15], quienes pusieron de manifiesto que la difusión de lindano en un suelo limoarcilloso, era muy superior al del suelo seco, presentando un máximo con un contenido en humedad del 4%. Conclusiones similares se obtuvieron en estudios con dimetoato [16] y con herbicidas como atracina y triasulfuron[17].

Lixiviación. La lixiviación de los pesticidas a través del suelo por efecto de la lluvia o del riego es un proceso frecuente. En estos casos, el movimiento del pesticida puede realizarse asociado a su disolución en agua, su suspensión o emulsión. La magnitud del proceso, que puede ser cuantificado en cierta medida mediante experimentos de laboratorio utilizando columnas de suelo a las que se aplica el pesticida objeto de estudio [18] o por cromatografía en capa fina del suelo [19] depende de la naturaleza del pesticida y sobre todo, de la composición coloidal del suelo y de sus posibilidades de adsorción.

Es evidente, que los resultados obtenidos en el laboratorio mediante las técnicas anteriormente citadas no pueden ser totalmente extrapolados al campo y solo pueden aceptarse como aproximados, ya que otros factores como son flujo de corriente de agua, características del perfil del suelo y contenido de agua, cationes adsorbidos a los coloides, concentración de sales, pH del suelo, mayor o menor facilidad de degradación del pesticida, solubilidad, etc....., pueden influir notablemente en su movimiento [20].

Los experimentos en campo dirigidos a evaluar las pérdidas de pesticidas por lixiviación y los efectos contaminantes que pueden producir han sido escasos, debido probablemente a las dificultades que presenta su realización. La importancia del tema y

la necesidad de incidir en estos estudios se ha puesto de manifiesto en publicaciones recientes [21]. Todo ello ha dado lugar, a que en los últimos años vayan apareciendo trabajos realmente interesantes en este sentido [22].

Erosión. Como ya se ha indicado, los pesticidas están íntimamente asociados a las partículas del suelo, fundamentalmente, por adsorción. Estas partículas pueden actuar por tanto como portadoras del pesticida cuando se desplazan, mediante el proceso de erosión, por el viento y el agua [23].

En general, los pesticidas más fácilmente desplazables son aquellos que presentan una baja movilidad, como es el caso de los organoclorados. Su traslado, depende de la cantidad de pesticida adsorbida por el suelo. Los más fácilmente adsorbibles suelen ser menos erosionables. En este sentido, un alto contenido coloidal contribuye en gran manera a disminuir la erosión.

Volatilización. La volatilización de pesticidas del suelo y subsiguiente dispersión en la atmósfera constituye un proceso bastante frecuente. La importancia que bajo el punto de vista ecológico y económico tiene este proceso, se ve reflejada por el elevado número de trabajos publicados en las dos últimas décadas con el fin de concretar los factores que lo regulan [24]. Se demuestra que la volatilidad potencial de los pesticidas está íntimamente relacionada con su presión de vapor, pero su volatilidad efectiva está controlada en gran manera por la temperatura, composición coloidal, contenido en agua y pH del suelo; otros factores importantes son la naturaleza del pesticida, su concentración en el suelo y el grado de adsorción que presente. Las temperaturas elevadas favorecen su volatilización excepto en el caso de suelos secos.

Contrariamente la adsorción, reduce la volatilización, hecho comprobado en suelos con alto contenido en materia orgánica.

El proceso de vaporización incrementa con el contenido en agua en los suelos, lo cual es debido a un incremento de la presión del vapor resultante al ser desplazado el pesticida de la superficie del suelo por el agua [25]. Algunos productos de degradación se volatilizan bastante fácilmente, lo que constituye una vía para su eliminación de los suelos. Diversos estudios en este aspecto han mostrado que los productos de degradación del DDT y Lindano son notoriamente más volátiles que ellos mismos.

Asimilación por macroanimales y microorganismos del suelo. Muchos animales que desarrollan su ciclo vital en los suelos agrícolas son capaces de asimilar un notable número de pesticidas, concentrándolos en sus organismos por encima de los niveles ambientales.

Wauchope (1978)[13] demostró que una cantidad importante de los pesticidas se pierde, en la agricultura, por desplazamiento superficial y/o lixiviación cuando se adiciona grandes cantidades de agua (bien sea por riego o lluvia) [22]. Es por ello que la cantidad de pesticidas empleada en cultivos intensivos, y la aplicación de riegos frecuentes, da lugar a la aparición de escenarios como el antes descrito, y justifican el estudio del transporte y lixiviación de agroquímicos bajo estos escenarios de alto riesgo.

Contaminación del agua con los pesticidas

El agua es un compuesto esencial para el desarrollo de la vida de nuestro planeta. A pesar de ello, el agua de consumo es un bien que empieza a ser escaso, debido al aumento creciente de la población mundial.

El agua dulce está, fundamentalmente concentrada en lagos, ríos y lagunas, en una proporción que no llega al 0.5% del agua total presente en la biosfera.

La situación es más complicada si se tiene en cuenta que una buena proporción de estas aguas superficiales está contaminada por el vertido indiscriminado de residuos generados por la actividad del hombre en centros urbanos e industriales. Esto hace que la disponibilidad de agua potable se reduzca y que se tenga que recurrir a métodos costosos de tratamiento para extraer los residuos y evitar daños indirectos en el ecosistema.

Los pesticidas se pueden presentar en este medio ya sea disueltos, en suspensión o en emulsiones que suelen formar en presencia de tensioactivos.

La movilización de los pesticidas en las aguas superficiales de los ríos, arroyos y torrentes permite el desplazamiento de estos compuestos hasta distancias considerables. En este aspecto, se ha estimado que el río Mississippi contribuye anualmente al golfo de Méjico con una masa de 16 toneladas de atracina, 71Tm. simacina, 56Tm. metolaclor y 18Tm. alaclor [26].

Los procesos de acumulación pueden tener lugar cuando el contaminante transportado entra en los lagos, donde la corriente es menor, o presenta sedimentación de sólidos en suspensión. La figura 6 muestra las distintas vías de ingreso de los contaminantes en un medio acuático.

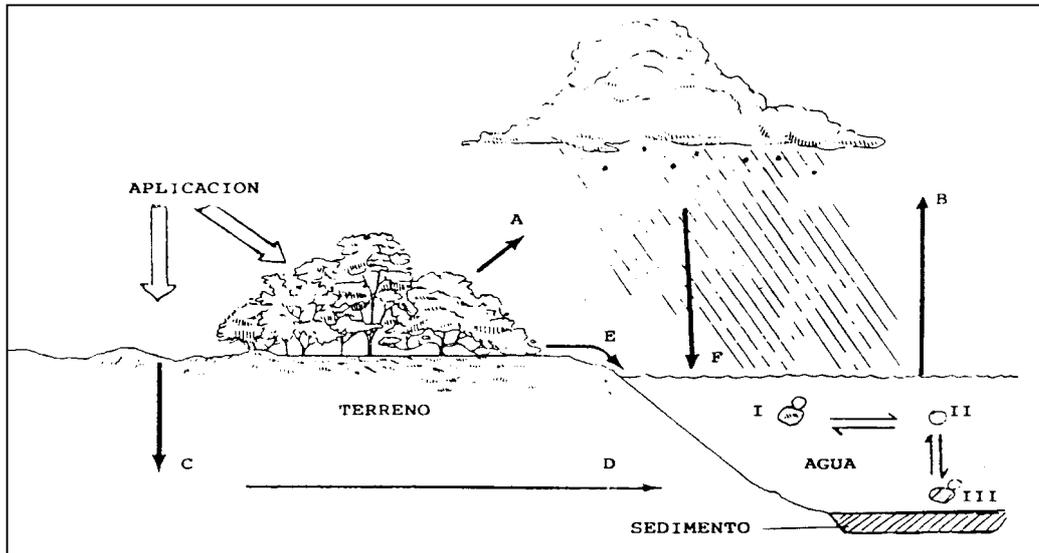


Figura 6.– Entrada y distribución de los pesticidas en un medio acuático.

A y B : evaporación, C: filtración, D: transporte en las aguas subterráneas; E: lavado; F: precipitación atmosférica; I: compuestos adsorbidos sobre terreno; II: compuestos disueltos; III: compuestos adsorbidos sobre partículas de sedimento.

Los pesticidas en la atmósfera

El destino inicial de éstos residuos es la atmósfera, medio en el que éstos pueden desplazarse junto con las masas de aire, transformarse por medio de reacciones químicas, disolverse en el medio acuoso de las nubes, precipitar y retornar otra vez a la superficie terrestre, etc.

En abril del año 1999, investigadores suizos [27] pusieron en evidencia que gran parte de la lluvia que cae en Europa contiene niveles tan altos de pesticidas que el agua de lluvia sería ilegal para el consumo como agua potable. La lluvia que cae sobre Europa contiene niveles relativamente altos de atracina, alaclor y otros pesticidas agrícolas comúnmente usados en las tierras de cultivo.

La atmósfera es un medio muy complejo, en el que concurren fenómenos meteorológicos y químicos que hacen incierto el comportamiento de los residuos vertidos. Debido a la gran movilidad de los compuestos en la atmósfera, los efectos de los residuos pueden alcanzar extensas zonas del planeta, a través de la volatilización y del transporte por el viento, pueden llegar a depositarse a centenares o miles de Km de distancia en las zonas más frías.

Los pesticidas considerados como compuestos orgánicos semivolátiles (SOC's) con presiones de vapor a temperatura ambiente entre 10^{-4} y 10^{-10} atm y que muy a menudo se adsorben bastante sobre las partículas sólidas, aparecen en el aire como vapores o como componentes del polvo atmosférico pudiendo posteriormente depositar sobre el suelo.

I.A.4.1- Estabilidad de los pesticidas

Cuando un pesticida es liberado en el medio ambiente interacciona con los componentes bióticos y abióticos de éste, sufriendo transformaciones en su estructura, capaces de modificar profundamente sus características físico-químicas y su acción biológica.

La degradación del pesticida dará lugar a nuevos compuestos que pueden ser menos tóxicos que la sustancia original (inactivación o destoxificación), o por el contrario, más tóxico que el original (activación).

Las reacciones de degradación son muy variadas (oxidación, reducción, hidrólisis, sustitución, eliminación de grupos funcionales, etc.) y pueden originarse mediante agentes orgánicos (principalmente bacterias del suelo), e inorgánicos.

Algunos pesticidas pueden ser retenidos o asimilados por los vertebrados, invertebrados y microorganismos que habitan en el suelo. Una vez finalizado el ciclo vital de estos organismos, los pesticidas y sus metabolitos volverán al suelo donde serán finalmente degradados. El pesticida que queda así incorporado al suelo, entra en un ecosistema dinámico e inmediatamente empieza a degradarse «in situ», a moverse del sistema inicial a otros sistemas, o a mantenerse en él con su estructura original o más o menos transformado, durante un periodo de tiempo variable.

Su desaparición del suelo transcurre de acuerdo a la ley cinética de primer orden, tal y como puede apreciarse en la figura 7.

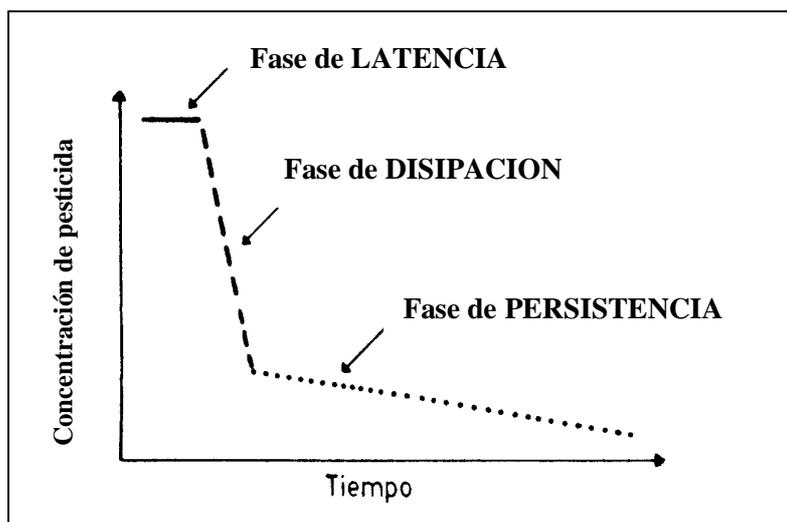


Figura .7- Cinética de la degradación de los pesticidas en el suelo.

Se pueden diferenciar tres fases: Una primera que puede denominarse de «latencia», de duración corta y en la que el pesticida mantiene constante una determinada concentración; una segunda, relativamente rápida en lo que respecta a su desaparición del suelo llamada de «disipación»; y finalmente, la tercera más lenta, conocida como de «persistencia». Esta última es la responsable de lo que se conoce como «persistencia del pesticida», y se expresa en unidades de tiempo. Dependiendo de su extensión se hablará de horas, días, meses e incluso años [13].

El término más corrientemente utilizado para expresar la persistencia es el denominado «tiempo de vida media $T_{1/2}$ », que se define como, el tiempo necesario para la disipación de la mitad de la cantidad inicialmente presente en el suelo. En determinados casos, algunos autores consideran más correcta la utilización del término «tiempo de desaparición» expresado como TD_{50} , TD_{75} y/o TD_{90} , que indican respectivamente el tiempo necesario para la desaparición del 50, 75 o 90% de la concentración inicial del pesticida aportado o presente en el suelo [28].

Los procesos responsables de la degradación pueden ser: procesos físicos, químicos y microbiológicos, los procesos de adsorción y el de desorción coloidal son los que condicionan la magnitud de los demás [15]. La figura 8 presenta un esquema general de estas relaciones.

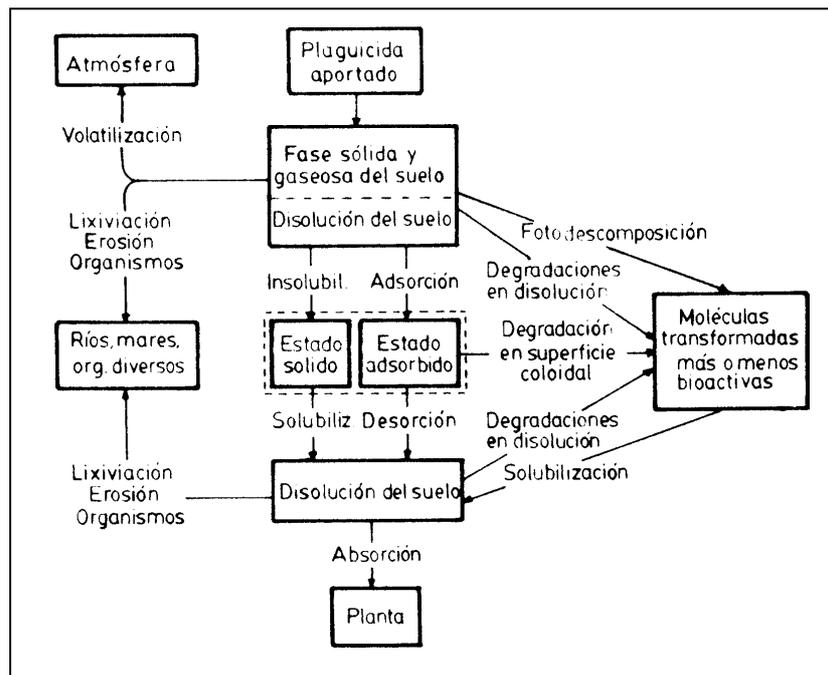


Figura 8.- Representación esquemática de la dinámica de los pesticidas en el suelo.

Es importante por consiguiente, conocer estos procesos así como los factores que condicionan su permanencia en el suelo, ya que mientras los pesticidas que se eliminan fácilmente o son completamente degradados se convierten en inofensivos, aquellos otros que permanecen o son parcialmente transformados y persisten, pudiendo pasar en algunos casos a otros sistemas, son los que verdaderamente deben controlarse.

Transformaciones y degradaciones de los pesticidas en el suelo.

El proceso de adsorción de los pesticidas en el suelo, es el responsable en gran parte de su permanencia y acumulación, mientras que, su degradación o descomposición conlleva la desaparición del pesticida en el suelo.

Son tres los procesos que merecen destacarse en este apartado:

- * Descomposición fotoquímica.
- * Degradación química.
- * Degradación microbiológica.

Hay que señalar, que las degradaciones química y microbiológica están íntimamente relacionadas entre sí, y en la mayoría de los casos es difícil establecer una concreta independencia entre ellas, ya que los factores que pueden influir son mayoritariamente comunes. Por ello ambos tipos de degradación pueden agruparse y tratarse en su conjunto como reacciones bioquímicas.

Para un estudio exclusivo de la primera, se requeriría previamente la destrucción de los microorganismos del suelo mediante técnicas de radiación o esterilización. Pero ello supondría también, la eliminación de otros sistemas catalíticos que influyen notablemente en la degradación, así como una notable alteración del estado natural del suelo como medio de reacción.

A pesar de que la fotodescomposición, posee algunos puntos de conexión con la degradación bioquímica las notables diferencias existentes entre ambas, aconseja su estudio independiente.

La degradación del pesticida en el suelo puede tener lugar de diferentes modos. En el caso de suelos arcillosos, la adsorción del pesticida sobre las partículas que constituyen el suelo, puede favorecer su degradación, debido a que las partículas de arcilla catalizan la reacción de oxidación de los pesticidas, gracias a la formación de enlaces químicos entre éstos y las partículas.

En otras ocasiones, la degradación del pesticida se inhibe cuando éste se adsorbe sobre las partículas de otro tipo de suelos, sobre todo si éstas bloquean la entrada de oxígeno y humedad, necesarios para que transcurran los procesos químicos de degradación. También, se ha de tener en cuenta que la actividad del pesticida puede disminuir a consecuencia de la intervención de determinados microorganismos presentes en el suelo como por ejemplo, hongos, bacterias, etc. Estos organismos, son capaces de degradar los pesticidas según su naturaleza química.

La actividad biológica de estos organismos es máxima en las capas superficiales del suelo. Normalmente, en la transformación de los pesticidas intervienen enzimas, que utilizan reacciones de oxidación-reducción, hidrólisis, hidroxilación, desalquilación, deshalogenación, etc...

Las transformaciones químicas que puede sufrir un pesticida son muy variadas. Una de las principales es la oxidación, la cual tiene lugar en las capas más superficiales del suelo, por ser las que están más aireadas. Así, entre otras transformaciones posibles, el enlace P=S de los pesticidas organofosforados, se transforma en P=O. Por ejemplo, el metil paration sufre esta oxidación demostrando poseer un tiempo de vida corto (3-4 días) en aguas naturales [29] (ver figura 9).

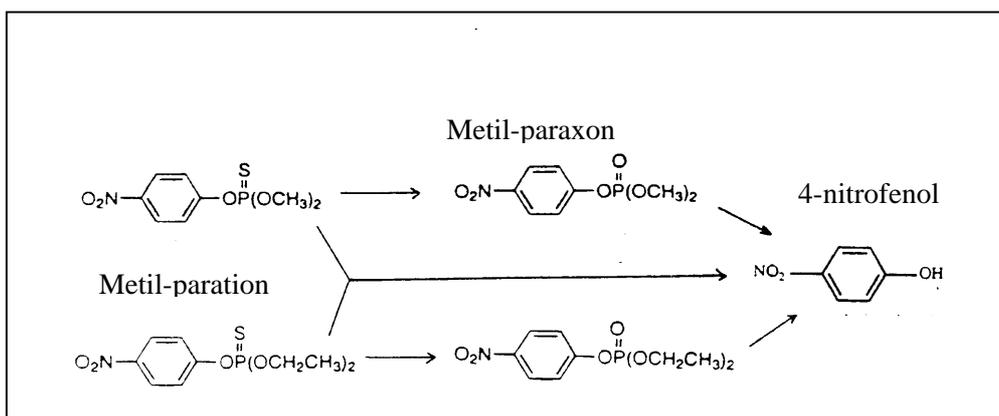


Figura 9.- Degradación de metil-patation y etil- paration.

El efecto de los procesos fotoquímicos, particularmente para los pesticidas fotoactivos, como son los ácidos fenoxiacéticos, también debe tenerse en cuenta. No obstante, este último proceso es más significativo cuando el pesticida permanece disuelto en las aguas superficiales y no en el suelo, puesto que allí la incidencia de la radiación solar es mayor.

La facilidad de degradación de un pesticida también depende de su estructura molecular, porque esta última desempeña un papel muy importante determinando su comportamiento en cuanto al poder de absorción de la radiación solar [30].

En general, los más resistentes son los organoclorados y entre éstos los fenol-bencenos altamente sustituidos. Entre los menos resistentes están los organofosforados.

Si bien aún se necesitan muchos estudios para conocer con más detalle la naturaleza y el mecanismo a través del cual tiene lugar las interacciones entre un contaminante y el sustrato húmico del suelo.

Degradación de organofosforados: Estos compuestos, en general, se hidrolizan tanto por vía enzimática como no enzimática, fácilmente. Su estabilidad frente a la acción hidrolítica aumenta, según la naturaleza de los enlaces, en el orden: anhídrido o halogenuro, alcohoxi y amido, oxifosfatos, tiofosfatos y fosfonatos, también la radiación ultra violeta es capaz de producir isomerización de los ésteres fosfóricos para dar derivados más tóxicos [31].

Los cortos tiempo de vida medio observados para algunos pesticidas organofosforados se atribuyeron al efecto de la radiación solar [32]. Los procesos fotoquímicos pueden tener lugar en la superficie del suelo o en las zonas cercanas a la superficie del agua.

La degradación microbiológica tiene lugar principalmente a través de reacciones metabólicas; el microorganismo utiliza el pesticida como fuente de energía y para producir el carbón necesario para el crecimiento. En la figura 10 se muestra un ejemplo de una biotransformación de pesticidas organofosforados.

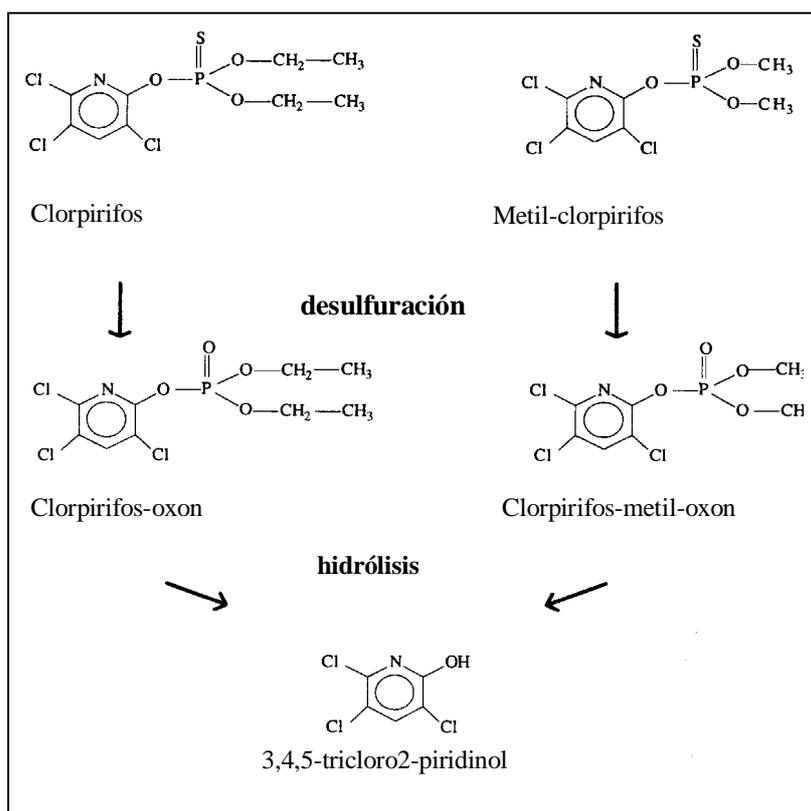


Figura 10.- Biotransformación de pesticidas organofosforados (clorpirifos y metil-clorpirifos) en organismos acuáticos.

I.B.-Remediación de espacios contaminados

La prevención de la contaminación del suelo y agua debería ser un objetivo primordial para la conservación del medio ambiente, ya que una vez que los recursos se contaminan la restauración de su calidad es siempre muy difícil y costosa. Muchos países han dirigido sus esfuerzos a minimizar la contaminación con pesticidas y, en algunos casos se ha tratado de remediar zonas altamente contaminadas.

La biosfera atenúa de forma natural la contaminación, esto es, posee la capacidad de disminuir, transformar o eliminar del medio ambiente sustancias peligrosas de origen natural o antropogénico [33]. La remediación es una disciplina de reciente desarrollo que intenta descubrir qué especies tienen propiedades descontaminantes, dónde residen y cómo operan esas propiedades a nivel fisiológico o bioquímico, y cómo se puede manejar dicho conocimiento con fines prácticos de protección ambiental [34, 35]. La mayoría de las técnicas disponibles para la remediación de suelos y aguas contaminadas están siempre agrupadas en dos grandes grupos: *in situ* y *ex situ*, estas técnicas incluyen la descontaminación físico-química y la biorremediación.

En la tabla siguiente (tabla 4) se recoge un breve resumen de las diferentes posibilidades de remediación divididos en los dos grandes grupos definidos anteriormente.

<i>Tipo de Remediación</i>	In Situ	Ex Situ
Destrucción/Detoxificación	Vitrificación Bio/Fitorremediación	Incineración Biorremediación
Separación/Recuperación	Extracción por vapor Arrastre por aire	Desorción térmica Lavado de suelo
Inmovilización	Solidificación/Estabilización Adsorción/Absorción	Solidificación/Estabilización Adsorción/Absorción

Tabla 4.- Tecnologías de recuperación de espacios contaminados.

A continuación, se detallan las características más significativas de cada una de las tecnologías mencionadas arriba.

I.B.1. Descontaminación con procesos físico-químicos

Los procesos físico-químicos descritos en este capítulo incluyen tecnologías que pueden ser utilizadas en el reciclado y tratamiento de residuos peligrosos, tanto en depuración de aguas subterráneas como en recuperación de suelos. A continuación se describirán los caminos o vías más usadas y conocidas de descontaminación.

Vitrificación. Es un proceso donde el suelo y los contaminantes presentes en él, se funden en una matriz silícea vítrea mediante la aplicación de un campo eléctrico, es una tecnología universal para cualquier contaminante (incluso radiactivos). Su mayor inconveniente es el alto gasto energético y que no es válida para suelos con grandes concentraciones de contaminantes orgánicos.

Arrastre por aire (Arrastre). El arrastre por aire es un proceso de transferencia de masa que aumenta la volatilización de los componentes del agua mediante el paso del aire a través del agua, mejorándose así la transferencia entre estas fases. El arrastre por aire es uno de los procesos que más comúnmente se utilizan en la depuración de aguas subterráneas contaminadas por Compuestos Orgánicos Volátiles (VOC), tales como disolventes. El proceso es especialmente adecuado para bajas concentraciones (< 200 mg/l).

Teoría del arrastre El movimiento de los compuestos orgánicos volátiles desde el agua hasta el aire se rige por la teoría de las dos películas (Figura 11) abarcando la transferencia desde la:

- ❖ Masa líquida a la película líquida.
- ❖ Película líquida a la película de aire.
- ❖ Película de aire a la masa de aire.

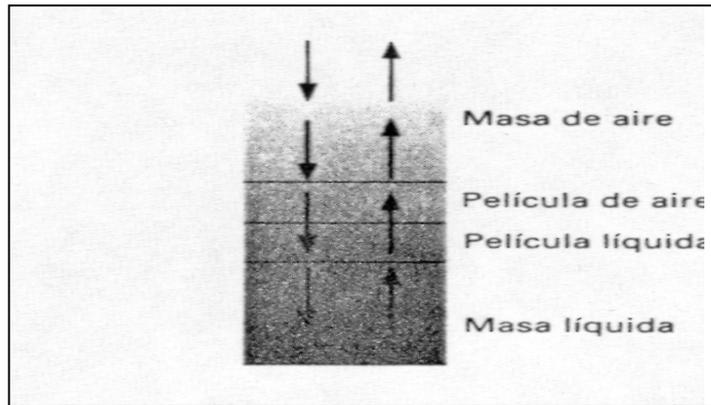


Figura.11.-Teoría de las dos películas.

La aplicabilidad viene limitada por una serie de factores:

(i) Es eficaz sólo para compuestos orgánicos volátiles o semivolátiles. (ii) El proceso necesita mucha energía. (iii) Los compuestos de baja volatilidad a temperatura ambiente necesitan un precalentamiento del agua subterránea.

Extracción por vapor del suelo (EVS). La extracción por vapor del suelo (arrastre por vapor) (EVS) es un método de depuración relativamente nuevo. Este método se emplea en la eliminación de compuestos orgánicos volátiles (VOCs) de la zona vadosa del suelo (zona insaturada), o de reserva, suelo excavado. El proceso EVS consiste en el paso de una corriente de aire a través del suelo, produciéndose así la transferencia de los contaminantes desde la matriz del suelo (o suelo/agua) a la corriente de aire.

Teoría de la aireación del suelo El movimiento de los contaminantes a través de varias fases de la zona vadosa se prolonga con el movimiento del sistema de aguas subterráneas hacia las condiciones de equilibrio. La eliminación de los VOCs de la zona vadosa puede ser modelizada mediante un proceso de cinco pasos, los cuales se ilustran en la Figura 12. Los compuestos volátiles abandonan la superficie de las partículas del suelo, transfiriéndose al agua del suelo (humedad de la zona vadosa), volatilizándose e incorporándose al gas del suelo. Posteriormente, el gas del suelo migra a través de los espacios vacíos hasta alcanzar la superficie del suelo y se libera finalmente a la atmósfera.

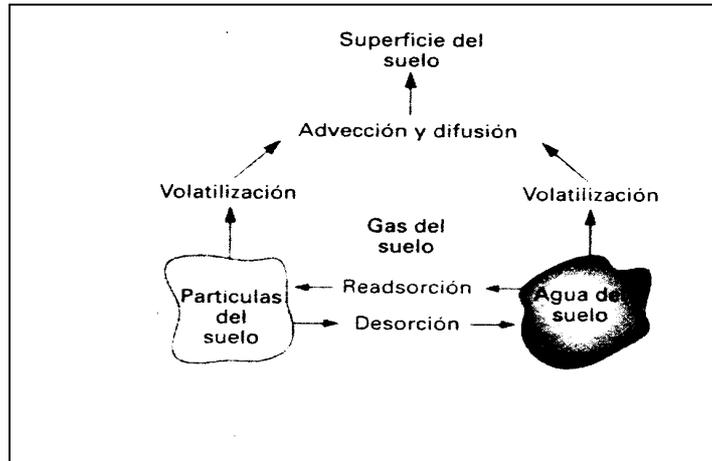


Figura 12.- Modelo esquemático del suelo/ vapor del suelo.

El movimiento de los contaminantes en el gas del suelo a través del mismo puede ser descrito mediante dos procesos: advección y difusión. La advección es el movimiento del contaminante en fase vapor con la masa del flujo de aire a través del medio del suelo. En suelos permeables, la advección es el camino dominante en la zona insaturada del flujo de aire. La difusión es el movimiento de los contaminantes a través del medio del suelo mediante el gradiente de concentraciones[36]. La difusión tiende a dominar en suelos con baja permeabilidad.

Los suelos secos o con alto contenido de compuestos orgánicos tienen alta capacidad para la adsorción de los VOCs, lo que reduce la eficacia del proceso, el proceso EVS no es efectivo en zonas saturadas. Gases del escape del sistema in situ EVS necesitan un tratamiento previo para eliminar posibles peligros para el público y el medio ambiente.

Incineración. Los sistemas de incineración están diseñados para destruir los componentes orgánicos de los residuos peligrosos. El principio de esta tecnología es someter al suelo a altas temperaturas (870-1200 °C) en cámaras de combustión para que los contaminantes se evaporen y/o volatilicen.

Se ha aplicado a la mayoría de los contaminantes orgánicos (aceites, petróleos, disolventes, cianuros, PAH, ...) y algunos inorgánicos.

Su aplicación está limitada dado que:

- los metales pesados pueden producir al final cenizas volantes que necesitan una posterior estabilización.

- produce pérdidas de las cualidades naturales del suelo.

Desorción térmica. Similar a la incineración, con la peculiaridad de que las temperaturas de trabajo no son tan elevadas (150-600 °C), evitando la combustión del contaminante. Su aplicación se limita a contaminantes orgánicos volátiles y semi-volátiles (disolventes clorados o no).

Lavado del suelo. El principio de esta tecnología se basa en el empleo de medios ácidos o quelatantes para separar los contaminantes de su matriz. Se puede considerar como un método de reducción de la contaminación o pretratamiento de suelo. Se ha aplicado a un amplio espectro de contaminantes, tanto orgánicos como inorgánicos.

Extracción por disolvente. El concepto de esta tecnología es similar a la anterior en su funcionamiento, aunque el medio de extracción es un disolvente orgánico. Se ha aplicado a la mayoría de los contaminantes orgánicos (aceites, petróleos, disolventes, pesticidas, PAH,...), aunque estén en grandes concentraciones. Estas dos últimas tecnologías son baratas pero tienen el inconveniente de una baja efectividad para eliminar compuestos muy hidrofílicos en suelos con altas concentraciones en arcillas, de poder contaminar aguas superficiales y/o subterráneas por el uso de disolventes volátiles generalmente clorados.

I.B.2. Biorremediación.

La biorremediación se basa en la utilización de sistemas biológicos, tales como enzimas y bacterias, para producir rupturas o cambios moleculares de contaminantes tóxicos y sustancias de importancia ambiental en suelos, aguas y aire, generando compuestos de menor o ningún impacto ambiental. Estas degradaciones o cambios ocurren usualmente en la naturaleza, pero la velocidad de tales cambios es baja. El empleo de estos sistemas biológicos se puede mejorar utilizando manipulaciones adecuadas que den lugar a un aumento de la velocidad de cambio o degradación y así usarlos en sitios altamente contaminados. En general, las manipulaciones involucran producción e inmovilización de enzimas en determinados soportes y cambios genéticos de algunas cepas bacterianas.

Bioremediación Bacteriana. La utilización de microorganismos que degradan o transforman diferentes compuestos nocivos en otros de menor impacto ambiental ha experimentado un gran desarrollo en la actualidad. Así, los estudios recientes están

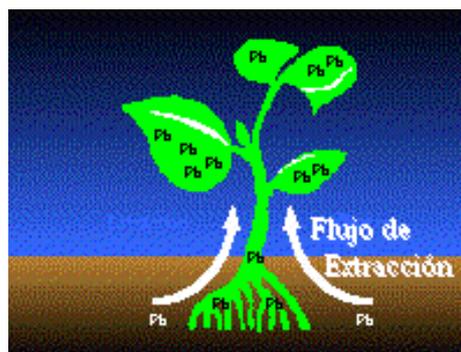
orientados a ampliar la versatilidad metabólica de la degradación de contaminantes por algunas especies bacterianas. Como por ejemplo podemos citar la degradación de pesticidas [37].

La limpieza de los suelos no es eficaz cuando la matriz del suelo inhibe o no permite el contacto del contaminante - microorganismo, o las concentraciones de metales pesados y compuestos orgánicos clorados son tóxicos para los microorganismos y por la lentitud del proceso de biorremediación a bajas temperaturas.

Actualmente, tanto la microbiología ambiental como la genética bacteriana contribuyen al diseño de sistemas microbianos con capacidades metabólicas mejoradas y aumentadas.

Recientemente, la fitorremediación se ha impuesto como una tecnología de interés que puede ser utilizada para "biorremediar" sitios con un alto nivel de contaminación. Básicamente, la fitorremediación es el uso de plantas vegetales para "limpiar" o "remediar" ambientes contaminados debido en gran parte a la capacidad fisiológica y características bioquímicas que poseen algunos ejemplares vegetales de absorber, retener y degradar contaminantes, tales como metales, compuestos orgánicos, compuestos radioactivos, petroquímicos, y otros.

I.B.3. Fitorremediación.



“Nuevo Nombre, Idea Vieja”

La idea por la cual las plantas, ya sea flora arbórea, arbustiva o herbácea, pueden atrapar y retener distintas sustancias químicas del medio ambiente incluidas algunas de reconocida peligrosidad no es nueva. Es más, el concepto de destrucción de

xenobióticos por organismos vivos es un asunto que ha apasionado a científicos de disciplinas variadas.

Raskin un bioquímico y fisiólogo vegetal y otros científicos [38] han encontrado que muchas plantas absorben naturalmente metales del suelo y los almacenan en sus tejidos. Tanto las plantas como los animales necesitan metales como zinc, cobre y otros para su crecimiento. Muchas veces, ocurre que las plantas no distinguen entre metales pesados como cadmio y aquellos necesarios como nutrientes (Zn, Ca, Mg, Fe...). Por ejemplo la "Streptanthus polygaloides" que crece en suelos contaminados con níquel y acumula cantidades grandes del metal [38].

Investigadores bioquímicos y fisiólogos han realizado avances importantes en procesos de detoxificación con plantas demostrando que los mecanismos de acción más importantes emplean sistemas con enzimas, como lo constituye el caso del citocromo P-450 y la glutatión S-transferasa. Se conoce que el citocromo P-450 ejecuta su acción al cambiar la naturaleza y estructura de un compuesto químico nocivo mediante la adición de oxígeno a la molécula, este proceso llamado oxigenación ocurre en sistemas denominados microsomales. No es de extrañar que esta importante enzima con funciones de detoxificación de xenobióticos esté siendo investigada a nivel molecular y en otras especies distintas al ser humano como plantas y microorganismos. Existen formas muy similares a esta enzima (isoformas) que se encuentran en varias especies de plantas.

Recientemente, se está comenzando a investigar y aplicar la fitorremediación con plantas que aparentemente poseen metabolismos más capaces para eliminar xenobióticos en distintos lugares del mundo. Específicamente, se ha comenzado investigar con plantas y especies arbóreas con capacidades aumentadas en retener herbicidas y metales pesados.

En general, las ideas centrales en fitoremediación son las siguientes: fitoextracción y rizofiltración.

Fitoextracción. La fitoextracción utiliza la biomasa vegetal-extractiva para remediar suelos contaminados. Una gran cantidad de contaminantes pueden ser captados desde el suelo, entre ellos metales pesados, algunos compuestos radiactivos y determinados compuestos orgánicos. Existe la idea de que los transportadores específicos estarían

dispuestos en las raíces de las plantas. La simbiosis microbiana en la rizosfera también jugaría un papel importante en algunos casos de fitoextracción.

Las plantas contaminadas con estos tóxicos pueden ser luego cortadas y tratadas convenientemente.

Rizofiltración. Las raíces, ya sea acuáticas o terrestres, pueden precipitar y concentrar contaminantes tóxicos de efluentes, es en este punto donde se manejan las hipótesis sobre la importancia simbiótica entre un tipo de microorganismo y la raíz de la planta. En investigaciones recientes la modificación genética de cepas bacterianas, por ejemplo para la reducción de metales pesados o bien para la eliminación de aceites u otros compuestos, ha evidenciado que la planta no solamente sea capaz de retener o degradar un tipo de contaminante sino que además esta acción puede ser mejorada insertando microorganismos simbióticos específicos en la rizosfera de la planta.

Estas dos ideas básicas se ramifican en una inmensa variedad de trabajos tanto a nivel teórico como aplicado.

La fitorremediación está limitada a la superficie de los suelos, además las concentraciones altas de los contaminantes pueden ser tóxicos a la planta, pudiendo transferir los contaminantes del suelo al aire, en su proceso de detoxificación. Otros factores como los contaminantes con adsorción alta y baja (ejemplo PCBs y algunos pesticidas), falta de información sobre la toxicidad y biodisponibilidad de los productos biodegradados pueden limitar el éxito de la fitorremediación.

I.B.4. Estabilización: Las tierras diatomeas como estabilizantes.

Es conocido que a pesar de las condiciones perfectas de la actividad microbiana en suelos, algunas veces los compuestos orgánicos no se biodegradan, debido a su pobre biodisponibilidad que está generalmente gobernada por los procesos físico-químicos de adsorción, desorción, o solubilización [39]. Recientemente se han empezado a usar las arcillas modificadas orgánicamente junto con otros reactivos como estabilizantes [40].

En términos generales, la estabilización es un proceso donde se mezclan los aditivos con los residuos para minimizar la velocidad de migración de los contaminantes del residuo y reducir la toxicidad de éste. Por tanto, la estabilización puede definirse como el

proceso mediante el cual los contaminantes quedan total o parcialmente confinados por la adición de un medio soporte aglomerante u otros modificadores [41].

Los objetivos de la estabilización abarcan la reducción de la toxicidad y de la movilidad del residuo así como la mejora de las propiedades técnicas del material estabilizado[42].

La estabilización se ha utilizado ampliamente en la gestión de los residuos peligrosos. Esta tecnología se aplica a:

- 1) la recuperación de vertederos de residuos peligrosos.
- 2) al tratamiento de residuos procedentes de otros procesos de eliminación (por ejemplo, las cenizas de tratamientos térmicos).
- 3) al tratamiento de terrenos contaminados donde intervienen grandes cantidades de suelos contaminados.

Durante la estabilización, algunos contaminantes pueden destruirse. Otros productos orgánicos pueden «desaparecer» como resultado de la volatilización. La estabilización debe considerarse como un proceso de tratamiento de residuos que reduce, hasta una velocidad aceptable o geológicamente lenta, el movimiento de los contaminantes en el medio ambiente.

Los campos principales de aplicación de la estabilización son:

- ❖ Eliminación de contaminantes del terreno: la estabilización de los residuos previa a su eliminación en vertederos de seguridad.
- ❖ Recuperación de terrenos contaminados.

Eliminación en el terreno. La eliminación de residuos líquidos en el terreno aumenta la probabilidad de migración de los contaminantes (actualmente se encuentra prohibida por la legislación de los Estados Unidos). Los residuos líquidos, así como los lodos con alto grado de humedad, deben estabilizarse antes de ser eliminados en vertederos. Para lograr que dicha estabilización sea eficaz se añaden agentes estabilizantes, los cuales no pueden ser absorbentes. Los líquidos absorbidos por estos agentes pueden liberarse (desorción) en el vertedero en presencia de sobrecargas. Es decir, al verter más material, el peso de las capas superiores haría fluir los líquidos de los materiales en capas

inferiores. Por lo tanto, los líquidos deben unirse química y físicamente con los estabilizantes, de manera que no se liberen por fuerzas de consolidación o lixiviados por percolación.

Recuperación de terrenos. La recuperación de terrenos contaminados emplea la estabilización para: 1) Mejorar las características físicas y el manejo de los residuos. 2) Disminuir la velocidad de migración de los contaminantes mediante la disminución de la superficie en la que puede producirse la transferencia de contaminantes, mediante la limitación de la solubilidad de éstos. 3) Reducir la toxicidad de ciertos contaminantes.

La estabilización como opción de recuperaciones más duradera que otras alternativas, tales como el mantenimiento en contenedores, está especialmente indicada para aquellos terrenos donde el peligro atañe a grandes cantidades de suelo con bajo nivel de contaminación. Hoy día se muestra como una alternativa importante a la limpieza de terrenos altamente contaminados. Así por ejemplo se aconseja su empleo antes o simultáneamente al empleo de técnicas de fitorremediación. En muchos casos, el excavar, transportar y verter o incinerar los suelos con bajo nivel de contaminación no será ni medioambientalmente correcto ni económicamente viable, debido a dos factores principales:

- 1) La posible contribución negativa a la atmósfera por volatilización de compuestos orgánicos causada por el equipo de excavación, camiones y por la propia exposición de suelos contaminados a la atmósfera.
- 2) Los riesgos por accidentes de tráfico.

Para evaluar el éxito o fracaso potencial de estos progresos se deben considerar los mecanismos básicos implicados en los procesos de estabilización.

- ❖ Macroencapsulación.
- ❖ Microencapsulación.
- ❖ Precipitación.
- ❖ Detoxificación.
- ❖ Absorción.

❖ Adsorción

Macroencapsulación: Es el mecanismo por el cual los constituyentes del residuo peligroso quedan atrapados físicamente en una matriz estructural de mayor tamaño [43]. La masa estabilizada puede descomponerse con el tiempo (considerado a escala geológica) debido a las tensiones medioambientales. Por tanto, los contaminantes estabilizados únicamente por macroencapsulación pueden reaparecer en el medio ambiente si no se conserva la integridad de la masa.

Microencapsulación: Los constituyentes del residuo peligroso quedan atrapados en el interior de la estructura cristalina de la matriz solidificada a nivel microscópico. Como resultado, incluso si los materiales estabilizados se degradan a partículas de tamaño relativamente pequeño, la mayor parte del residuo peligroso permanece atrapado. Sin embargo, como sucede con la macroencapsulación, al no estar el residuo alterado o ligado químicamente, la velocidad de liberación del contaminante de la masa estabilizado puede aumentar al disminuir el tamaño de partícula y quedar expuesta una superficie mayor del mismo.

Precipitación: Consiste en la precipitación de los contaminantes dando lugar a formas más estables [44]. Este fenómeno se puede aplicar para la estabilización de residuos inorgánicos en lodos precipitando los metales como hidróxidos.

Detoxificación: Por detoxificación se entiende cualquier mecanismo que transforma un constituyente químico en otro (u otra forma del mismo constituyente) no tóxico o de toxicidad inferior.

Absorción: Proceso por el cual los contaminantes son tomados por el sorbente de manera similar a como una esponja toma el agua. Como en la estabilización, la absorción precisa de un material sólido (absorbente) que empape o absorba los líquidos libres del residuo. Este proceso se emplea principalmente para eliminar los líquidos libres de manera que se mejoren las características de manejo del residuo, es decir, para solidificar el residuo. Los líquidos pueden escurrir del material si se somete la masa a tensiones de consolidación. Por ello, el empleo de la absorción se considera una medida temporal para mejorar las características de manejo.

Los absorbentes más comunes son: Suelo, cenizas volantes, residuos de hornos de cemento, heno y paja.

Adsorción: Se consideran fenómenos físico-químicos de superficie característicos y la naturaleza de la unión puede ser por fuerzas de Van der Waals o puentes de hidrógeno. Los contaminantes adsorbidos químicamente a la matriz estabilizadora tienen menor probabilidad de quedar libres en el medio ambiente que aquellos adsorbidos por otros mecanismos. Al contrario que en la microencapsulación y la macroencapsulación, donde la simple rotura de la partícula puede aumentar la velocidad de migración del contaminante, se necesita una fuerza físico-química adicional para desorber el material de la superficie de adsorción. Como resultado, este tratamiento se considera más permanente.

La adsorción es un fenómeno superficial que ocurre entre una fase fluida (gaseosa o líquida) y otra sólida (una o más). La sustancia sólida sobre cuya superficie ocurre la adsorción se denomina adsorbente. Por ser un fenómeno superficial, un buen adsorbente es aquel que ofrece gran área superficial por unidad de peso o volumen [45].

El adsorbente más ampliamente utilizado en aplicaciones medioambientales es el carbón, el cual es procesado para incrementar significativamente el área superficial interna (carbón activo). El carbón activo está disponible en forma granular o en polvo. El carbón activo granular (CAG), es frecuentemente el más utilizado para eliminar un amplio número de compuestos orgánicos tóxicos de las aguas subterráneas y vertidos industriales, el carbón activo en polvo es, a menudo empleado en sistemas de tratamiento biológico.

La adsorción por carbón activo es una metodología bien desarrollada capaz de eliminar eficazmente un elevado número de compuestos orgánicos solubles, es capaz de producir efluentes de muy alta calidad, y es utilizado en plantas de agua potable. Una de las razones de la alta eficacia de este material es su tremenda área superficial. Un cubo, de 30 cm de arista, lleno de partículas de carbono activo puede llegar a tener un área de hasta 16.000 m², aproximadamente.

Teoría de la adsorción

La adsorción es el proceso de superficie por el cual un componente pasa de una fase a otra a través de sus límites. El exámen de una sección transversal microscópica de un carbón activo muestra una estructura porosa con una gran área superficial interna. Como se ilustra en la figura 13, los procesos implicados en la adsorción son: transporte de la masa del fluido a la superficie adsorbente, transporte a través de la película, difusión intraparticular (o poros) y el enlace físico efectivo.

Los transportes a través de la película e intraparticular son normalmente los más lentos, y por tanto, los limitantes de la eficacia del proceso. Cuando el proceso lo limita la difusión intraparticular, la velocidad disminuye con el incremento del peso molecular del soluto, y/o con la disminución del tamaño del poro del carbón.

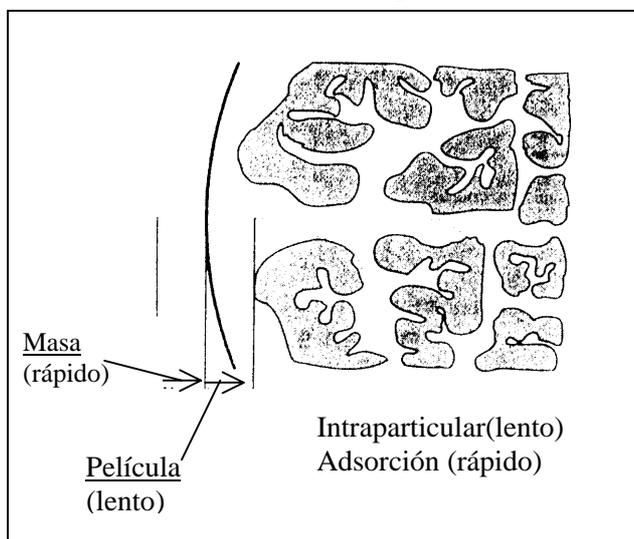


Figura 13.- Procesos de transporte [46].

Las fuerzas conductoras que controlan la adsorción incluyen la atracción electrostática, la afinidad química adsorbente/adsorbato, fuerzas de Van der Waals (fuerzas débiles de atracción que actúan entre las moléculas) y la naturaleza hidrofóbica de los compuestos orgánicos. Un resumen de algunos de los factores que afectan a la capacidad de adsorción de compuestos orgánicos se ilustran en la Tabla 5.

Tabla 5.- Factores que afectan a la adsorción y efectos que producen.

Factor	Efecto
Solubilidad	Compuestos menos solubles son adsorbidos más fácilmente que compuestos más solubles
Estructura molecular	Cadenas orgánicas ramificadas son más fácilmente adsorbidas que cadenas orgánicas lineales.
Polaridad	Orgánicos menos polares (o débilmente ionizados) son más fácilmente adsorbidos que orgánicos polares (o fuertemente ionizados)

La acumulación de los solutos en la superficie del carbono activo obliga a regenerarlo periódicamente, de este modo la descontaminación de las aguas residuales mediante este método puede mantener su efectividad económica. Dicha regeneración se consigue mediante un calentamiento del adsorbente a una temperatura de 950 °C en presencia de un chorro de aire.

La adsorción con carbono activo tiene como limitación importante su gran coste, ya que se consume gran cantidad de energía en la activación y regeneración del mismo. Otra desventaja adicional es la disminución de la capacidad de adsorción, estimada en torno al 10%, después de cada regeneración[47].

Las Tierras de diatomeas han demostrado, a lo largo de muchos años, tener una gran utilidad como purificadores de aguas.

Las tierras diatomeas tienen unas propiedades físicas y químicas tales que le permiten aplicaciones que no son posibles con ningún otro tipo de material de base sílice. Exhiben muchas ventajas con respecto a los métodos convencionales de tratamientos de lugares contaminados; en primer lugar poseen una estructura particular, gran estabilidad química, baja densidad, gran área superficial, baja capacidad de abrasión y alta capacidad de adsorción, además de ser un material económico, y de bajo coste.

La estabilización de pesticidas utilizando tierras de diatomeas como veremos más adelante puede emplearse en la estabilización de residuos orgánicos.

Las tierras diatomeas como estabilizantes: origen y composición

Las tierras de diatomeas (TD) constituyen casi la forma más pura del dióxido de silicio amorfo y son el resultado de las algas unicelulares fosilizadas. Abundan fundamentalmente en el ecosistema acuático, aunque pueden existir en el ambiente terrestre [48]. Representan, probablemente, el mayor grupo de plantas dispersadas en la tierra. Existen más de 25.000 especies de diatomeas, no encontrándose dos que presenten idéntica morfología.

Diferentes especies de diatomeas, extrajeron hace de 20 a 80 millones de años la sílice del agua produciendo un esqueleto silíceo amorfo. Cuando estas diatomeas murieron, las diminutas conchas se hundieron en las aguas y a través del paso de los siglos formaron capas de distintos espesores, desde unos pocos centímetros hasta miles de metros de espesor [49].



Figura 14.- Microfotografía realizada por Microscopía electrónica de barrido a las tierras de diatomeas

El componente mayoritario de estas tierras es la sílice (dióxido de silicio amorfo y sílice cristalino en un 2-7%), además, posee contenidos elevados de calcio y de otros elementos en menor escala como el aluminio, magnesio, sodio, hierro, fósforo, azufre, níquel, zinc y manganeso [50]. Este material se convierte mediante un proceso de tamizado en un talco fino, considerándose un material estable que no aporta residuos químicos u otras sustancias tóxicas al medioambiente [51].

Las tierras de diatomeas varían de color dependiendo de su composición, pasando de un color blanco grisáceo a amarillo o rojo, son insolubles en agua, y no son inflamables [52].

No existen evidencias de que tengan un efecto tóxico ni agudo ni crónico, hecho demostrado por experimentos realizados con animales (ratas) [53]. Estas tierras se adicionaron a alimentos consumidos por ciertos ganados de 1 a un 2 % como medicamento desparasitario [54]. En países desarrollados los campesinos añadían las tierras de diatomeas, a las cuales llamaban 'flor fósil', a la harina para protegerla durante largos períodos de almacenamiento [55]. Un hecho más que demuestra su inocuidad es la mezcla de las tierras de diatomeas con granos, así como el uso de este material en el almacenamiento de alimentos producidos en industrias [56], lo cual ha estado permitido por la Agencia de Protección del Medioambiente (EPA) [57]. En este sentido se ha registrado la utilización de este material como protector de granos en diferentes países como Australia, USA, Canadá, Alemania, Croacia, China, Indonesia y Arabia Saudita.

Los únicos efectos peligrosos de las tierras de diatomeas pueden darse en trabajadores que están expuestos a la inhalación prolongada del polvo suspendido de las tierras de diatomeas [58]. Aunque el silicio no se considera cancerígeno, se ha demostrado que las tierras de diatomeas calcinadas afectan considerablemente a los pulmones [59]. Trabajadores japoneses expuestos constantemente a estas tierras presentaron un considerable incremento en la enzima proteasa la cual está relacionada con el enfisema pulmonar [58]. Todo ello indica que las personas expuestas a una excesiva concentración del polvo deben protegerse con máscaras respiratorias [60].

Las aplicaciones de las tierras de diatomeas son diversas, destacando su uso como materia prima para: clarificador de licores y jugos, filtración de fluidos comerciales, pesticidas en la agricultura [61], mezclas para la producción de cementos [62], adsorción de mezclas de cloruro cúprico y cloruro de potasio [63], adsorción y transporte de líquidos radioactivos [64], relleno blanco en la industria del caucho [65], relleno en la pulpa de papel de imprenta [66], tratamientos electrotérmicos [67] y purificación de aguas naturales [68]. Han sido, además, utilizadas en numerosos productos industriales como detergentes, desodorantes, sistemas de filtros para piscinas y agente antiaglomerante en alimentos animales [69].

Sus aplicaciones analíticas han estado encaminadas fundamentalmente a su uso como soporte en columnas para separaciones cromatográficas [70,71].

Teniendo en cuenta todo lo anteriormente expuesto acerca de la remediación de suelos y aguas, en la presente memoria se evaluará la capacidad de las tierras diatomeas como agentes estabilizantes. Con el fin de obtener una mayor información se determinarán las isotermas de adsorción y su posible capacidad de liberación de los pesticidas.

1.B.4.1.- Isotermas de adsorción

El cálculo de los diferentes parámetros del proceso de adsorción es una buena herramienta para la predicción cuantitativa de éste. En algunos casos, por ejemplo, cuando se trata del equilibrio entre un solo adsorbato en contacto con un sólido, los cálculos son relativamente fáciles y directos. En otros, cuando por ejemplo, están presentes en disolución más de un adsorbato o debido a otros factores, como el crecimiento bacteriano, los cálculos, sólo pueden llevarse a cabo mediante supuestos y utilizando modelos matemáticos.

En el caso de la adsorción de un solo adsorbato a partir de una fase líquida sobre un adsorbente, se considera constante la actividad del disolvente, por lo que, puede ignorarse su influencia. En realidad, la adsorción de una fase líquida sobre un sólido es un fenómeno muy complejo. Consideraciones como las diferencias en la orientación de las moléculas adsorbidas, la formación entre ellas de micelas o la presencia de las moléculas del disolvente, pueden afectar a los cálculos, aunque muchas veces, con el objeto de simplificarlos, no se tienen en cuenta [45].

Durante las dos últimas décadas, diversos investigadores han venido proponiendo una serie de modelos para cuantificar los procesos de adsorción, estableciendo diferentes expresiones que relacionan la capacidad de adsorción del adsorbente (q), dada por la expresión (1), con la concentración de equilibrio (C_e), y como se recordará se expresa:

$$q = \frac{V_i (C_0 - C)}{B} \quad (1)$$

Debido a que el proceso de adsorción es exotérmico, una variación de la temperatura puede llevar consigo una variación en el rendimiento del proceso, por lo que, operar a una temperatura constante es un requisito básico para la elaboración de las isotermas de

adsorción. Por su sencillez y la mejor interpretación del fenómeno de adsorción, las isothermas de Freundlich y Langmuir son las que se han aplicado con más frecuencia.

La isoterma de **Freundlich** [72] es un modelo empírico que supone que no hay saturación del adsorbente y por consiguiente no hay valor límite para C_e , viene dada por la siguiente expresión:

$$q = K_e \cdot C_e^{1/n} \quad (2)$$

Esta ecuación puede ser linearizada tomando logaritmos:

$$\ln q = \ln K_e + \frac{\ln C_e}{n} \quad (3)$$

De este modo, la expresión (3) representa una línea recta cuya intersección con el eje de ordenadas ($\ln K_e$) expresa la capacidad de adsorción del adsorbente y cuya pendiente ($1/n$) mide su intensidad de adsorción.

La isoterma de **Langmuir** [72] se ajusta a la expresión:

$$q = \frac{q_{max} \cdot C_e}{K + C_e} \quad (4)$$

En dicha ecuación se define:

-q como la capacidad de adsorción (mg de pesticidas/g de adsorbente).

- q_{max} como la capacidad máxima de adsorción (mg de pesticida/g de adsorbente).

- C_e como la concentración final de equilibrio (mg de pesticida /L).

-K como la inversa de la constante de equilibrio o concentración a la cual se alcanza la mitad del valor de q_{max} (mg de pesticida/L).

Esta ecuación describe una hipérbola rectangular, que pasa por el origen y tiende hacia un máximo de concentración concreto (q_{max}). Su linearización puede realizarse tomando la siguiente expresión:

$$\frac{C_e}{q} = \frac{C_e}{q_{max}} + \frac{K}{q_{max}} \quad (5)$$

Por tanto, representando $\frac{C_e}{q}$ frente a C_e , la línea recta que se obtiene daría el valor de q_{\max} con el correspondiente valor de la pendiente, la ordenada en el origen daría el valor de la constante K.

El modelo de Langmuir supone que [72]:

- La superficie del adsorbente consiste en una serie de centros activos de adsorción libres.
- La actividad de los centros de adsorción es idéntica e independiente de la presencia de otros adsorbatos en los centros vecinos.
- Un adsorbato reacciona solamente con un centro de adsorción.
- La adsorción se limita a una sola capa.

En la figura 15 se comparan estos dos modelos estudiados (Freundlich y Langmuir) [73]. Puede observarse como el modelo propuesto por Langmuir tiende a un máximo mientras que el de Freundlich supone un crecimiento continuo de q en función de C_e .

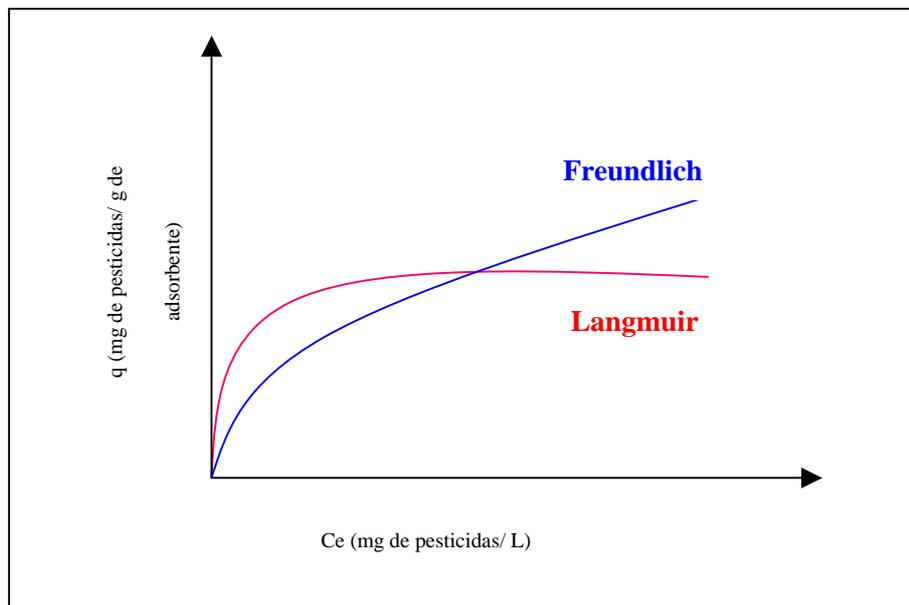


Figura 15.- Comparación entre las isotermas de Freundlich y Langmuir.

Parte II.- REVISIÓN DE LOS MÉTODOS ANALÍTICOS MÁS RELEVANTES PARA LA DETERMINACION DE PESTICIDAS.

II.- Tratamiento de muestra

En muchas ocasiones si las muestras son complejas como sucede con los alimentos y materiales biológicos etc., los analitos no se pueden separar con eficacia de la matriz sin un pretratamiento de la muestra exhaustivo.

La química analítica de pesticidas plantea una cierta dificultad al tratarse en general de la determinación de compuestos orgánicos a nivel traza, los cuales, a veces, están unidos a otras sustancias orgánicas o con productos de su degradación o biotransformación. Además las muestras de mayor interés son muy variadas (suelos, aguas, vegetales, etc.) y de muy diversa procedencia.

La determinación de un pesticida en suelo o agua, requiere de una metodología general de análisis con una serie de etapas que se recogen en la figura 16, las cuales procedemos a considerar de forma individual.

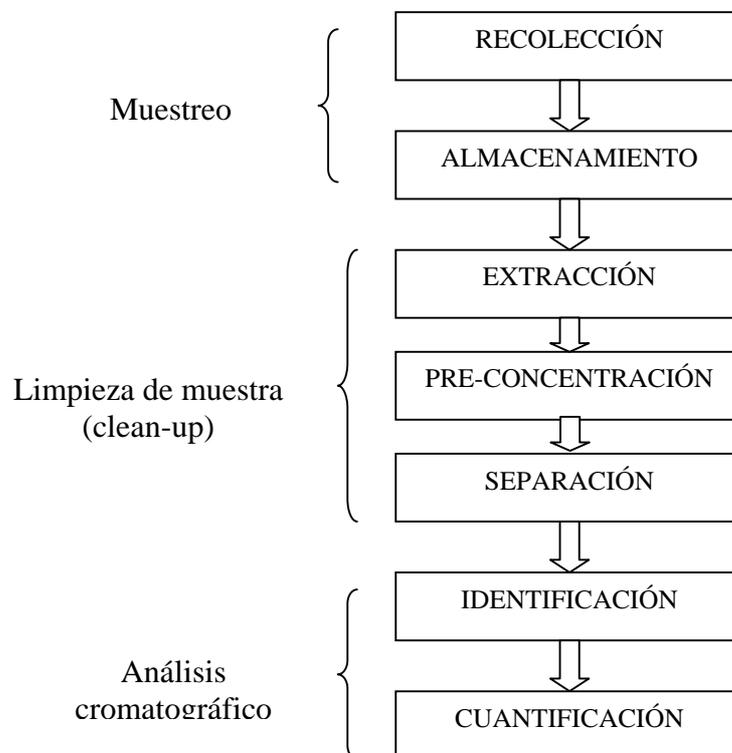


Figura 16.- Diagrama de flujo del proceso usado para la preparación de muestra para análisis cromatográfico [74].

Toma de muestra. Como se han dicho muchas veces:

“el resultado de un análisis será tan exacto como representativa sea la toma de muestra”

El objetivo principal en cualquier estrategia de muestreo es obtener una muestra homogénea y representativa, lo que requiere diseñar un plan detallado de cómo llevar a cabo el muestreo.

La recolección de una muestra no sólo involucra el proceso de adquirir físicamente una cierta cantidad de muestra para el análisis, sino también el caracterizar el ambiente en el cuál fue tomada dicha muestra, así como cuidar su manipulación para evitar pérdidas o contaminación de la misma. El objetivo de recoger la muestra y hacer las medidas en campo es conseguir una mayor exactitud en la determinación de los compuestos de interés en la muestra en ese tiempo, lo que significa obtener una serie de medidas (parámetros o medidas en el sitio) de una manera preestablecida, preservando y manteniendo la calidad y concentración de los analitos en la muestra.

Almacenamiento. Otro factor importante a considerar desde la llegada de la muestra al laboratorio y su análisis es que transcurra el menor tiempo posible, para evitar alteraciones químicas o fisicoquímicas de la muestra.

Desafortunadamente, la mayoría de los laboratorios no pueden analizar inmediatamente las muestras recibidas, por lo que se requiere conservarla adecuadamente, para evitar la pérdida, degradación o contaminación de analitos de interés. En algunos casos cuando el analito objeto es inestable o volátil, puede ser necesario analizar inmediatamente la muestra.

La refrigeración a 4 °C es por lo general la técnica de conservación más usada ya que en sí no altera la composición de la muestra, disminuye su actividad biológica, las pérdidas por volatilización, problemas ocasionados por la disolución de gases y no interfiere con los métodos analíticos. Muestras medioambientales como agua, suelo o lodos, se suelen conservar a 4°C en un frigorífico. Solo si el analito en la matriz es inestable o hay posibilidad de degradación se recomienda guardarlo en un congelador a -18°C. El almacenaje bajo esas condiciones reduce por completo muchas reacciones de oxidación y enzimáticas.

El tipo de recipiente para almacenar la muestra tiene una elevada importancia, por ejemplo para compuestos volátiles se recomienda guardar la muestra en un recipiente bien cerrado. En la mayoría de los casos, se recomienda el uso de recipientes de vidrio (borosilicato) (ámbar para evitar la degradación de pesticidas fotosensibles) [75]. Además de los recipientes de vidrio, los de polietileno o poli(tetrafluoroetileno) (PTFE) se pueden utilizar para muestras sólidas. El empleo de material de plástico debe evitarse ya que algunos de ellos pueden adsorber y/o contaminar la muestra con plastificantes.

Los pesticidas son compuestos fácilmente degradables lo cual implica la necesidad de estabilizarlos desde la toma de muestra hasta el momento de la determinación final.

Los principales factores que afectan a la estabilidad de los pesticidas en muestras acuosas dependen del tipo de muestra, tipo de recipiente y de las condiciones de almacenamiento (temperatura, oscuridad, presencia de estabilizadores y tiempo transcurrido entre la toma de muestra y la determinación)

Algunos estudios [76,77] llevados a cabo sobre el almacenamiento y la conservación de pesticidas en aguas han confirmado que la principal causa de la inestabilidad de pesticidas en aguas naturales son la degradación, la biodegradación, hidrólisis y fotólisis.

Existen diferentes procedimientos de estabilización de los pesticidas. Así, en ocasiones, para evitar la descomposición de los pesticidas se añaden a las muestras acuosas estabilizantes y conservantes como metanol [78], diclorometano [79] o HgCl_2 [80] o se congela la muestra [81] para hacer más lenta la descomposición de los constituyentes químicos. Una alternativa de uso frecuente para conservar los pesticidas en muestras acuosas, se basa en el empleo de discos o cartuchos de extracción en fase sólida (SPE) [82]. En estos adsorbentes [83] los analitos de interés se preservan de la degradación microbiana durante más de 54 días, además se puede evitar la fotólisis cuando los discos y cartuchos se guardan en la oscuridad. Otra posibilidad sería el uso de las tierras de diatomeas como soporte para favorecer la estabilidad de algunos pesticidas (usando un sistema de retención directa de los analitos). Dada la necesidad existente de disponer de formas sencillas de estabilización de pesticidas en el capítulo VI se evaluará la capacidad de las tierras diatomeas como sustrato estabilizante de pesticidas.

Un resumen de las formas más recomendadas para la conservación de pesticidas en muestras de agua se presenta en la tabla 6. Dado que por lo general la concentración de pesticidas presente en las muestras de partida es muy baja, se requiere una preconcentración previa a fin de situarse dentro de los márgenes de trabajo de la técnica analítica empleada.

Tabla 6.- Técnicas de conservación de pesticidas en agua.

Pesticidas	Recipiente	Conservación	Tiempo máximo de permanencia
Organoclorados	Vidrio	+1 ml de 10mg/ml HgCl ₂ o 1g/l de ácido ascórbico	7 días, 40 días después de la extracción
Organofosforados	Vidrio	+1 ml de 10mg/ml HgCl ₂	14días,28 días después de la extracción
Pesticidas polares	Vidrio	+1 ml de 10mg/ml HgCl ₂	28 días

Extracción. Un resumen de las técnicas extractivas mas ampliamente utilizadas para distintos tipos de analitos se muestra en la figura 17.

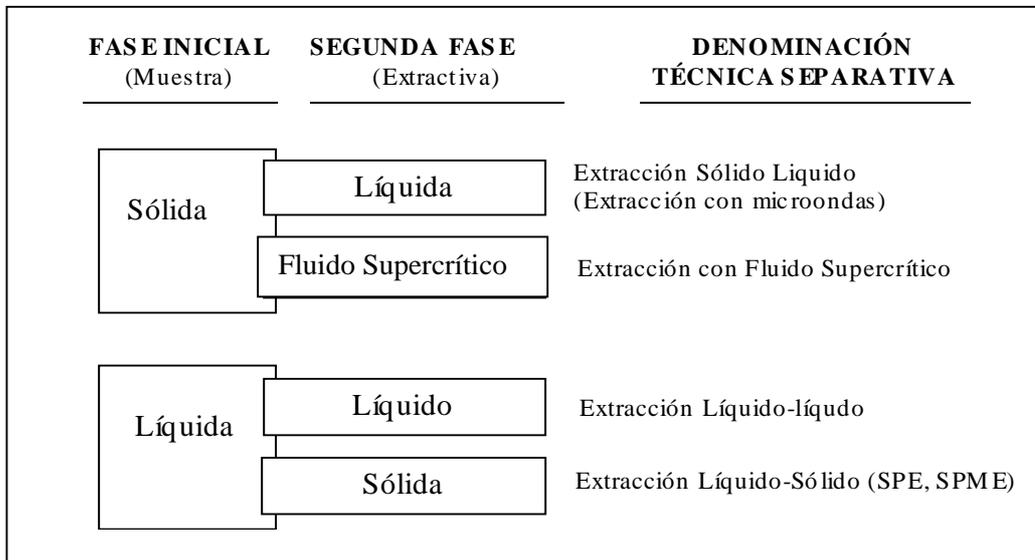


Figura 17.- Sistemas extractivos más usuales en Química Analítica.

Si la muestra es inicialmente líquida las especies que participan en la transferencia de materia pueden ser los analitos o las interferencias. A continuación se discuten las características de los sistemas extractivos más ampliamente utilizados.

II.1.- Extracción líquido-líquido

La extracción líquido-líquido es la técnica más ampliamente utilizada para la extracción de analitos de muestras acuosas. Se basa en una distribución o reparto de los analitos de la muestra entre dos disolventes inmiscibles donde el analito y la matriz tienen solubilidades diferentes.

La principal característica que debe poseer un disolvente orgánico para su empleo en un proceso de extracción líquido-líquido es su baja solubilidad y reactividad con el agua. Otras propiedades tales como: que su punto de ebullición no sea excesivamente bajo; que posean una presión de vapor y viscosidad moderada; que su densidad sea adecuada para originar una separación de fases; que tengan una baja tendencia a formar emulsiones, que posea una estabilidad química aceptable, y que no posea carácter tóxico son adicionalmente aconsejables.

Es un hecho bien conocido que el agua es un disolvente por excelencia debido fundamentalmente a su alta polaridad y constante dieléctrica, a su capacidad de producir la solvatación y la formación de enlaces de hidrógeno.

Los disolventes polares como los nitrogenados (nitrobenzenu y nitrometano), son muy adecuados para la extracción de pares iónicos, dada su baja solubilidad en agua y su alta constante dieléctrica.

Los hidrocarburos son el ejemplo más característico de disolventes apolares, se utilizan generalmente como diluyentes de agentes extractantes, y su interacción con los solutos extraídos es mínima. Dentro de los hidrocarburos alifáticos los más empleados son el n-hexano y el ciclohexano, o bien mezclas de ellos denominadas éter de petróleo y queroseno. Los hidrocarburos aromáticos más utilizados son el benceno, el tolueno y los xilenos. Los disolventes clorados, como el tetracloruro de carbono y el cloroformo en general, también poseen un carácter marcadamente polar, dada su capacidad de formación de puentes de hidrógeno.

Las cetonas presentan una gran capacidad de solvatación generada por el carácter básico de su átomo de oxígeno y además poseen una gran estabilidad química y baja solubilidad en agua. La más utilizada en procesos de extracción líquido-líquido es la metilisobutilcetona (MIBK). Estos disolventes se emplean para la extracción de haluros,

nitratos y otras sales metálicas y como diluyentes para extractantes de especies metálicas por formación de quelatos. Los éteres se emplean generalmente para la extracción de haluros y nitratos metálicos en los cuales están implicados procesos de solvatación.

El n-hexano [84], diclorometano [85] y cloroformo [86] se encuentran entre los disolventes de uso frecuente en la extracción líquida-líquida de pesticidas organofosforados de muestras de agua. Otros disolventes usados para el análisis de pesticidas en matrices medioambientales [87] son el acetato de etilo y acetonitrilo. El diclorometano es el disolvente más utilizado para la extracción de pesticidas moderadamente polares como triacinas y organofosforados[88] proporcionando en todos los casos recuperaciones superiores al 70%.

La selectividad y la eficiencia del proceso de extracción está gobernada críticamente por la elección de los dos disolventes inmiscibles. El equilibrio de extracción está influido por varios factores como: el pH para evitar ionización de bases o ácidos, formación de pares de iones con analitos ionizables, formación de complejos hidrofóbicos con iones metálicos, o por adición de sales a la fase acuosa para reducir la solubilidad del analito (salting out).

Las principales limitaciones de la extracción líquido-líquido son las siguientes:

1. La formación de emulsiones, especialmente en muestras que contienen surfactantes o grasas.
2. La recuperación de un mismo analito varia en función de la naturaleza de la matriz.
3. El riesgo de contaminación es elevado, por lo que es necesario el uso de disolventes de alta pureza.
4. La pérdida del analito debido a su adsorción en los recipientes usados.
5. La interfase de separación aumenta con la agitación del sistema que contiene las dos fases.
6. La duración de la misma puede variar entre amplios límites con el inconveniente de que alguna sustancia se altere si se prolonga excesivamente la agitación.

Todo eso hace de la extracción líquido-líquido una técnica tediosa que alarga enormemente el tiempo de análisis.

II.2.- Extracción en fase sólida (SPE)

La extracción en fase sólida es una alternativa más cómoda, barata y rápida que la extracción líquido-líquido. Se basa en pasar la muestra líquida por una minicolumna que contiene material adsorbente muy variado (sílice, carbón, alúmina, cambiador iónico, etc..) donde quedan retenidos las especies interferentes o los analitos [89]. Cuando son retenidos los últimos, se precisa una segunda etapa de elución con otro disolvente (por ejemplo de diferente polaridad) para proceder a su determinación. Este procedimiento separativo se ha popularizado en los últimos años, y hoy día existe una amplia variedad de cartuchos desechables de material adsorbente para realizar la limpieza (clean-up) de la muestra. En este proceso también puede realizarse la preconcentración de los analitos. Se usan generalmente como operación previa para adecuar muestras complejas a la determinación cromatográfica (CG, HPLC).

La elección del sistema adsorbente y disolvente para una preconcentración y/o clean-up eficaz del analito en la muestra es de gran importancia. Además a la hora de seleccionarlo conviene tener en cuenta ciertas pautas como son: el tamaño de partícula, la compatibilidad con el disolvente y la selectividad. Este proceso de SPE puede regular la eficacia del sistema de detección.

Generalmente, los adsorbentes de SPE se pueden dividir en tres clases; fase normal, fase inversa y de intercambio de iones. Los mecanismos de interacción de la matriz y/o de los analitos, con el adsorbente son similares a los usados en cromatografía líquida. La forma de adsorción no requiere fase enlazada, pero se basa en el efecto de los grupos funcionales presentes en el material adsorbente.

La superficie del adsorbente se puede modificar por adición de grupos funcionales los cuales son la base de las principales interacciones. En la figura 18 se ilustra las principales etapas de la extracción en fase sólida [89]. Cada etapa está caracterizada por la naturaleza y el tipo de disolvente usado el cual en definitiva depende de las características del adsorbente y de la muestra.

Extracción en fase sólida

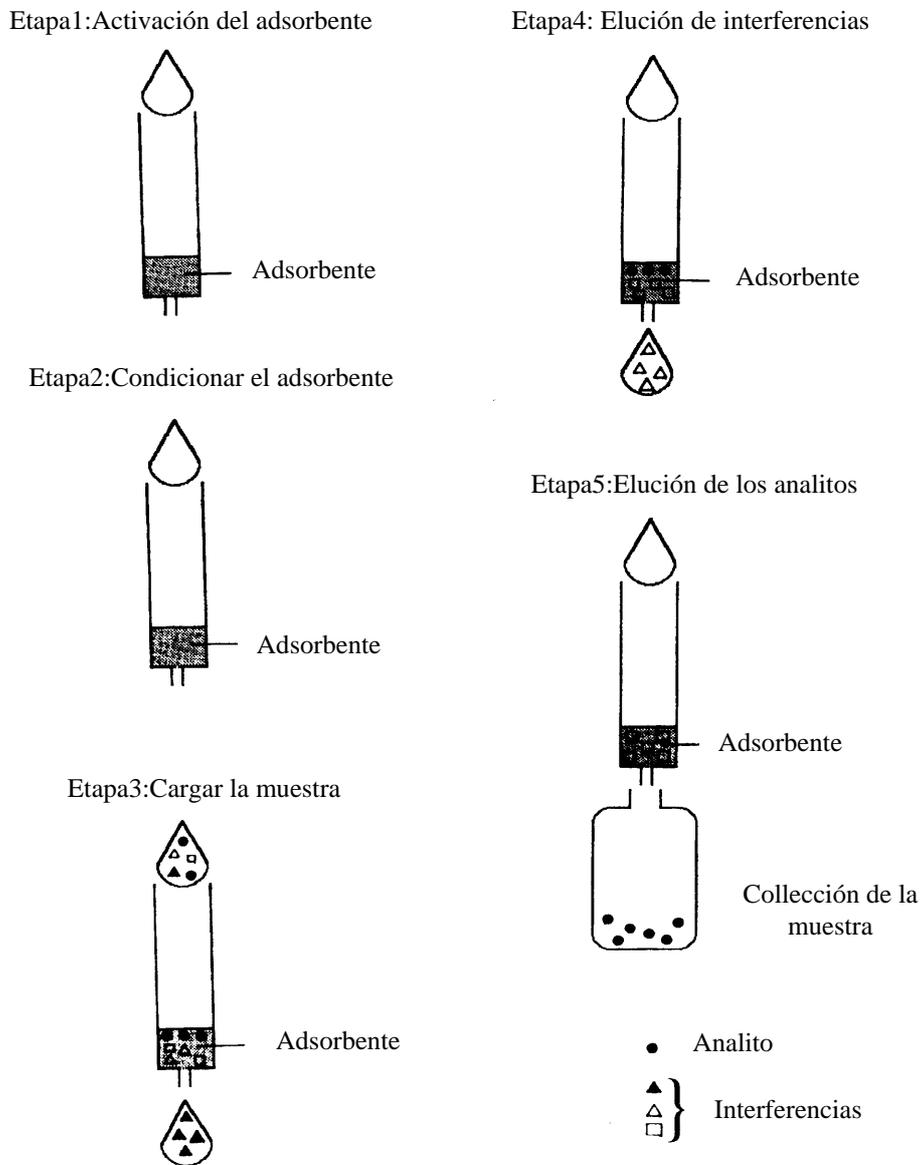


Figura 18.- Extracción en fase sólida: método de operación.

Las cinco etapas implicadas en el proceso son las siguientes:

1. Humedecer el adsorbente de forma que asegure un buen contacto entre el analito y su superficie en la etapa de adsorción del analito. Para mejorar la recuperación es importante que el adsorbente permanezca mojado en las dos etapas siguientes.
2. Acondicionar el adsorbente mediante el paso de un disolvente similar a la muestra.

3. Cargar la muestra, el volumen de la muestra puede variar desde microlitros hasta litros. La velocidad de flujo a través del adsorbente puede afectar la retención de ciertos compuestos, en general la velocidad del flujo no debe exceder 5mL/min, los flujos bajos son más aconsejables, siempre y cuando el tiempo no sea un factor importante.
4. Lavar el adsorbente con la misma disolución en la que se encuentra la muestra (u otra disolución que no elimine los compuestos deseados) para eluir las interferencias.
5. Finalmente eluir los analitos de interés usando la mínima cantidad de disolvente, generalmente con dos alícuotas pequeñas se puede eluir los compuestos de interés más eficientemente que con una alícuota grande.

Se debe poner especial atención en la selección de la naturaleza del adsorbente y el disolvente usado de forma que aseguren una máxima eficiencia del proceso.

II.2.1.-Extracción en fase sólida en discontinuo

La forma de llevar a cabo la SPE depende de los objetivos planteados, del número de muestras a analizar, de la naturaleza de la muestra y de su volumen disponible. El más usado es el cartucho con una gran variedad de adsorbentes con base de sílice y otros materiales. Uno de los adsorbentes, empaquetados en cartuchos, que se usan con más frecuencia para el análisis de varios pesticidas organofosforados en muestras de agua y otras matrices medioambientales son Octil- y octadecil-sílica [90].

Las resinas Amberlita XAD [91] y carbono grafitizado [92] han sido empleados para el análisis de muchos pesticidas. En el año 1990, los discos de extracción Empore fueron introducidos como un nuevo método de preparación de muestra aislando contaminantes orgánicos de agua y de otras muestras acuosas [93]. Los discos de extracción Empore fueron usados para el aislamiento rápido (inferior a 15min) de contaminantes orgánicos de 1L de muestra de agua, con una recuperación eficaz de muchos pesticidas [94]. Es importante resaltar que cuando se emplean cartuchos el tiempo requerido es de aproximadamente 100 minutos.

El empleo de cartuchos o discos tiene sus ventajas y limitaciones, así, el disco permite usar caudales rápidos de disolvente y una transferencia de masa rápida conseguida por el menor tamaño de partícula [95].

Desde la introducción de los discos de Empore de cambiadores de aniones fuertes (SAX) en 1994, ha habido muchas aplicaciones para aislar metabolitos de pesticidas cargados negativamente con estos discos [96]. Aparentemente los discos (SAX) tienen una baja selectividad para iones inorgánicos en muestras de agua subterránea; de este modo, el disco Empore (SAX) fue un adsorbente eficaz en fase sólida para las especies cargadas negativamente que contienen grupos carboxilos. Los cartuchos permiten el empleo de volúmenes de elución inferiores (4 ml) a los requeridos en discos (15 ml), lo que hace que el tiempo requerido para eliminar el exceso de disolvente sea menor. Además los cartuchos son significativamente más baratos que los discos, y ofrecen la posibilidad de extraer simultáneamente hasta 10 muestras usando el sistema de elución a vacío [97].

En general, la metodología seguida para la extracción de pesticidas en fase sólida en discontinuo se describe en la tabla 7, en diversas muestras.

Tabla 7 - Metodología general seguida en la extracción en fase sólida en discontinuo.

Analito	Adsorbente	Muestra	Referencia
Pesticidas organoclorados	C ₁₈ o C ₈ Disco Empore	0.5L de muestra de agua enriquecida	Viana y col. [98]
26 organofosforados, organoclorados y otros pesticidas	Cartucho de C ₁₈	1L de muestra de agua enriquecida, pasa de 10-15ml/min bajo vacío	De la colina y col. [99]
Fenamifos y sus metabolitos	Cartucho de C ₁₈	100ml de agua mineral enriquecida pasada a vacío	Terreni y col. [100]
10 pesticidas carbamatos	Disco Empore C ₁₈	2 litros de agua de río Erbo	Honing y col. [101]

II.2.2.-Extracción en fase sólida acoplada en continuo a las técnicas cromatográficas

El uso de la SPE automatizada permite extraer un número elevado de muestras sin tener que atender el sistema lo que la hace muy útil en análisis de rutina. Su acoplamiento en

continuo con la cromatografía de gases y de líquidos ha crecido enormemente en los últimos años.

SPE acoplada a la cromatografía de gases Aunque el acoplamiento de la extracción en fase sólida con la cromatografía de gases [102] es una alternativa más eficaz debido a la versatilidad de sus detectores (nitrógeno-fósforo, captura electrónica, espectrometro de masas, etc.) todavía no constituye un método de rutina en los laboratorios de análisis. El problema metodológico existente es combinar una parte del sistema SPE “mojada” con otra “seca” del sistema CG, lo que requiere el desarrollo de una interfase adecuada para SPE-CG, como la descrita por Brinkman y col. [103]. Se dispone de otras interfases para la introducción de muestras acuosas en CG basadas en procedimientos indirectos, como son las técnicas de purga y trampa o espacio de cabeza dinámico para el análisis de compuestos orgánicos volátiles en muestras acuosas. Una de las interfases más corrientes es la llamada “on-column”, la cual utiliza una columna (3-5m de longitud) desactivada sin relleno (“retención gap”) situada entre el inyector del cromatógrafo y la columna analítica, junto con la evaporación simultánea del disolvente a través de una salida situada entre la “retención gap” y la columna analítica.

Otra interfase alternativa es el uso de un inyector con temperatura programable para grandes volúmenes (PTV) (large volume programmed temperature vaporization (PTV) injector) [104]. En esta situación, el eluido (100 µl) de la SPE (ASPEC) se introduce directamente y de forma automatizada en el sistema PVT-GC-MS.

SPE acoplada a la cromatografía líquida (SPE-LC) La extracción en fase sólida acoplada a la cromatografía líquida es una herramienta excelente para la detección y cuantificación de contaminantes a concentraciones en el intervalo de 0.1-1µg/l en muestras medioambientales de agua [105] y ha permitido el análisis de pesticidas polares y sus metabolitos [106] alcanzando de este modo el límite de detección requerido para el control de agua potable (0.1µg/l para cada pesticida, en Europa)[107]. La posibilidad de determinar los compuestos más polares favorece el uso de los métodos de SPE-LC más que SPE-GC porque se elimina el tiempo consumido durante la derivatización.

Recientemente los copolímeros de estireno-divinilbenceno son los adsorbentes más usados para precolumnas o cartuchos (10x2 mm i.d) en línea con cromatografía líquida

por su alta eficacia de retención. Sin embargo, los constituyentes de la matriz, mayoritariamente ácidos húmicos y fulvicos son también retenidos y frecuentemente interfieren con el análisis de los compuestos de interés más polares. Este problema ha sido parcialmente resuelto añadiendo poca cantidad de un modificador orgánico [108] o surfactantes [109] o combinando SPE-LC con detectores menos sensibles a los interferentes de la muestra [110].

Extracción en fase sólida acoplada a la electroforesis capilar (SPE-CE) La combinación en continuo y discontinuo de los procedimientos de concentración con sistemas de precolumnas selectivas de derivatización ha resuelto el problema de detección y permite a la CE convertirse en una de las técnicas más adecuadas para la separación y determinación de pesticidas en muestras de agua y suelo.

Los objetivos del desarrollo de la metodología SPE-CE es alcanzar factores de preconcentración altos y mantener la elevada eficacia de separación de la electroforesis capilar.

El uso de la extracción en fase sólida en continuo ofrece muchas ventajas en especial cuando se debe analizar un elevado número de muestras: decrece la manipulación de la muestra lo que mejora la precisión de los datos, disminuye el riesgo de contaminación dado que el sistema se cierra desde el punto de inyección de la muestra hasta el punto de desecho del sistema cromatográfico. No obstante, algunas de las limitaciones que presenta son: el tiempo inicial requerido para el desarrollo del método, el coste adicional involucrado, así como la falta de selectividad del adsorbente típicamente usado (C_{18} , copolímeros apolares) lo que impide alcanzar límites de detección muy bajos debido al ancho pico que aparece al principio del cromatograma y al ruido de la línea base lo que hace necesario realizar varias etapas de limpieza (clean-up), lo que en algunos casos la hace una técnica tediosa y de elevado consumo de tiempo.

II.3.-Microextracción en fase sólida. (Solid Phase Micro Extraction) (SPME)

Normalmente los procesos analíticos están constituidos por una serie de etapas que implican extracción, preconcentración, limpieza, separación, cuantificación y tratamiento de datos, siendo cada una de ellas de gran importancia en la repercusión de resultados. El empleo de los métodos tradicionales para la preparación de la muestra

requiere en muchos casos el uso de disolventes tóxicos y el empleo de procedimientos que en alguna etapa puede originar la pérdida del analito durante el proceso. Frecuentemente, la preparación de la muestra es el origen de mayor error en el análisis. Una técnica ideal para la preparación de la muestra debería requerir el empleo de pequeños volúmenes de disolvente, ser eficaz, selectiva, barata y compatible con muchos métodos de separación y de detección.

La microextracción en fase sólida (SPME) es una nueva metodología analítica que puede integrar el muestreo, la extracción, y la introducción de la muestra en una sola etapa. Esta técnica fue desarrollada en la universidad de Waterloo (Ontario, Canada) por Pawliszyn y sus colaboradores en el año 1989 y el dispositivo instrumental lo comercializa la casa Supelco.

La microextracción en fase sólida consiste en dos procesos: el reparto de los analitos entre la fibra y la muestra y la desorción de los analitos concentrados por distintos procesos (mediante el empleo de disolventes o por el efecto de la temperatura).

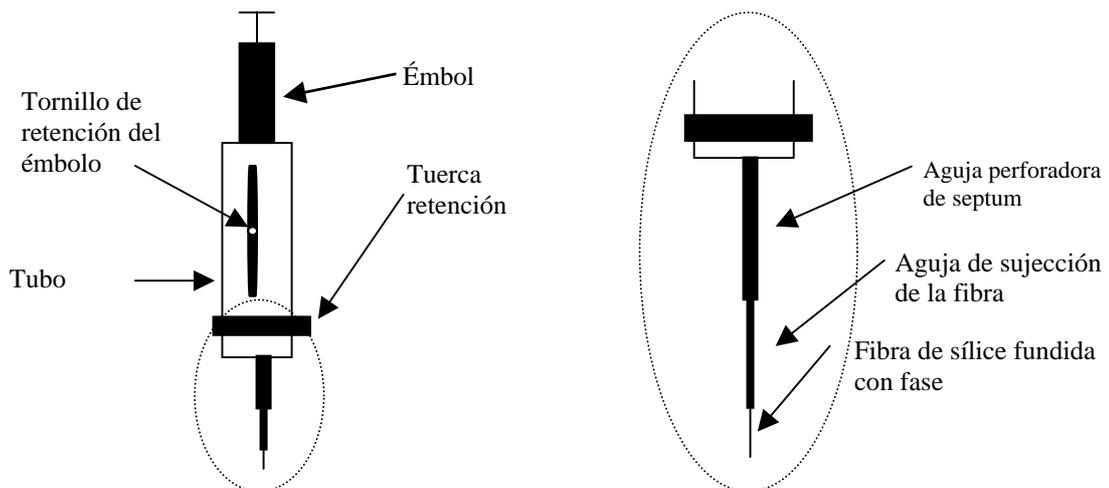


Figura 19.- Aparato de la SPME.

El fundamento, por tanto, de la SPME es el siguiente: es un método de muestreo en equilibrio en el que se produce la transferencia de los analitos desde la matriz de la muestra hasta una fase adsorbente.

Una unidad SPME es muy simple (ver figura 19), consiste básicamente en una fibra larga de sílica fundida, recubierta con un polímero y un sólido adsorbente,

unida a un pistón de acero inoxidable cubierto por una aguja protectora que es el que en realidad atraviesa el septum del cromatógrafo.

A continuación, se comentarán los aspectos más relevantes de cada una de las etapas principales que tienen lugar en el proceso de SPME (figura 20).

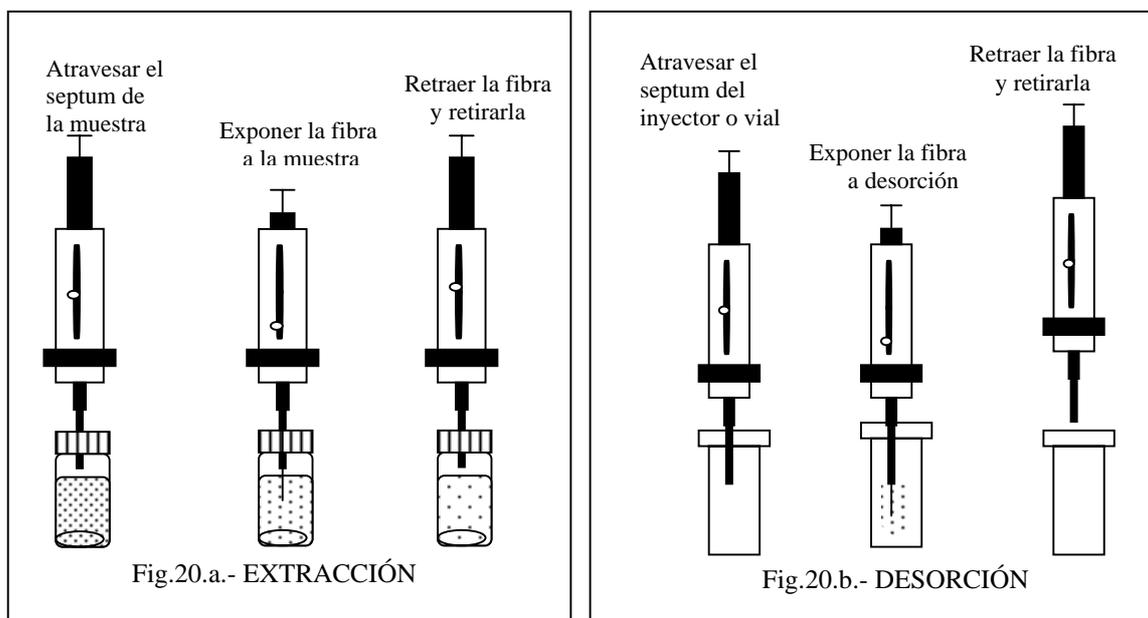


Figura 20.- Procedimiento de extracción y desorción en SPME.

Extracción La extracción se puede llevar a cabo por dos vías, por inmersión directa (ID-SPME) de la fibra en la muestra o permaneciendo en un espacio de cabeza inmediatamente superior a ella (HS-SPME) (sólo para volátiles).

En la extracción por inmersión directa, la fibra cubierta por el adsorbente, es sumergida directamente en la muestra líquida donde tiene lugar el desplazamiento de analitos a la fibra y su posterior adsorción (figura 20.a). La agitación del conjunto favorece el desplazamiento de los analitos hacia la fibra, y por tanto favorece la eficiencia del proceso. Una vez concluida la etapa de extracción, se retrae la fibra y se retira para su desorción posterior.

En teoría todas las moléculas de los analitos presentes en la muestra deben tener acceso fácil al recubrimiento de la fibra lo cual se favorece con la

agitación de la muestra, a la vez que se disminuye el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio.

El contacto de la fibra con la muestra es siempre estacionario, independientemente del nivel de agitación y del método empleado (agitación magnética, vibración de la fibra, etc.) y a medida que la distancia del analito a la fibra aumenta, el tiempo de transferencia de masa también aumentará. Este modelo, descrito como un flujo de masa, es aplicado para el recubrimiento de la fibra y usa el concepto de la capa límite [111] asumiendo que existe una zona estática que rodea la fibra en donde el flujo de masa no se produce correctamente aún cuando exista una perfecta agitación. Esta zona estática es llamada capa límite de Prandtl (Prandtl boundary layer) [112], y su espesor depende de la velocidad de agitación y de la viscosidad del fluido. La figura 21 representa gráficamente la situación de la capa límite de Prandtl.

Los métodos de agitación pueden reducir la capa límite de Prandtl con éxito, dicha capa determina la transferencia de la masa dentro de la fibra con lo cual el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio disminuye notablemente.

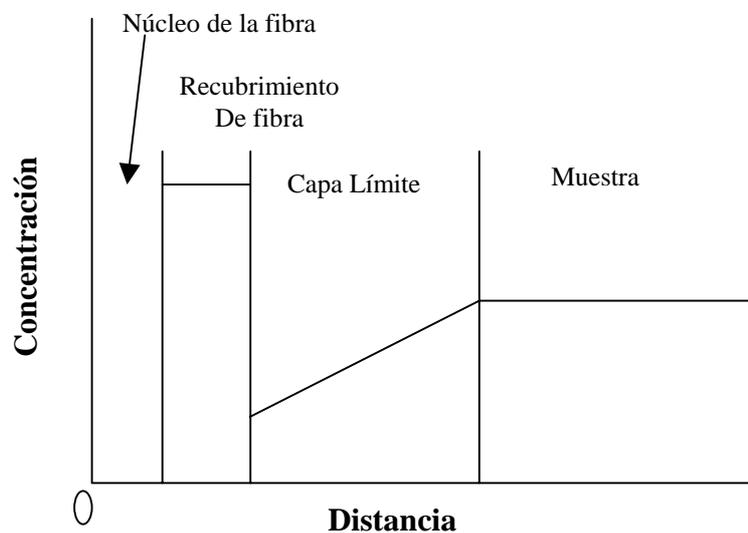


Figura 21.- Capa límite de Prandtl [113].

En la extracción por espacio de cabeza, tal como se muestra esquemáticamente en la figura 20 a, la fibra entra en contacto con el vapor del espacio de cabeza (bien sea obtenida a partir de una muestra sólida o líquida), donde tiene lugar el transporte del analito hacia la fibra en la que se retiene. Finalmente se retrae la fibra y se opera como el caso anterior.

Este sistema (HS-SPME) es muy conveniente para el análisis de compuestos volátiles en muestras con matrices complejas, aumenta el tiempo de vida de la fibra, ya que se evitan los efectos de saturación de la fibra con sales u otros compuestos de la matriz.

Cuando se alcanza el equilibrio en SPME, se consigue la máxima retención del analito [111], pero en la práctica el tiempo de extracción se puede acortar en función del factor de preconcentración deseado. La temperatura, es otro factor que también influye en el tiempo de extracción [114], ya que las temperaturas altas favorecen el transporte de masa de los analitos de la matriz al adsorbente de la fibra. El calentamiento con microondas, suele mejorar la transferencia de los analitos a la fase extractiva, pero en general, la temperatura es un parámetro que se suele mantener constante, a 30°C. Se podría, por tanto, resumir que los parámetros fundamentales a tener en cuenta en el proceso de extracción directa son la agitación, el tiempo de exposición y la temperatura [117,123].

Es importante resaltar que la manipulación de la fibra debe hacerse con sumo cuidado evitando los golpes o dobleces en la misma. Igualmente, se puede proceder a la adición de compuestos que favorezcan la adsorción de los analitos por la fibra pero han de considerarse las condiciones que deben cumplir de forma que en ningún caso agredan la fibra (ácidos y bases fuertes).

Desorción La desorción tal como se muestra en la figura 20.b puede ser térmica (CG) o con disolventes:

- Térmica (CG)
- Con disolventes (LC, HPLC, EC ...).

Después de la extracción de los analitos de la muestra la fibra se transfiere al inyector del cromatógrafo de gases o a la interfase del cromatógrafo de líquidos, donde se expone por un tiempo tal que permita que los analitos se desorban térmicamente o por la acción de la fase móvil respectivamente.

Desorción térmica La microextracción en fase sólida se puede acoplar fácilmente con la cromatografía de gases. El puerto de inyección del

cromatógrafo puede ser utilizado para la desorción térmica de analitos de la fibra.

La fibra se expone a la zona caliente del inyector para desorber térmicamente los analitos que son concentrados en cabeza de columna, y se analizan a continuación mediante GC.

La desorción térmica de los analitos, se basa en el descenso del coeficiente de partición fibra/gas, a causa del aumento de la temperatura, y por tanto en el descenso de la capacidad adsorbente de la fibra. En la mayoría de los casos, este proceso de desorción térmica es muy eficaz [118,123]. En el cromatógrafo de gases el flujo constante del gas portador dentro del inyector, facilita, aún más, la salida o eliminación de los analitos de la fibra.

En la práctica, el proceso de desorción térmica en el cromatógrafo es el siguiente: se inserta la aguja dentro del inyector de GC, bien de forma manual o mediante un sistema automático, donde los analitos, adsorbidos en el polímero, son térmicamente desorbidos y posteriormente analizados en el cromatógrafo de gases.

Desorción con disolventes La desorción térmica usando altas temperaturas puede crear problemas tales como degradación del polímero, y la no desorción completa de los analitos poco volátiles. Así la desorción con disolventes es una alternativa para desorber los analitos de la fibra y especialmente útil cuando se emplea el HPLC.

Se basa en el empleo de disolventes que tengan una elevada afinidad por los analitos retenidos en la fibra. Puede tener lugar en un vial que contenga al eluyente de interés o mediante el empleo de la interfase HPLC/SPME. En el primer caso, la fibra con la aguja se sumerge en un pequeño volumen de eluyente y se calienta suavemente para su desorción y posteriormente se inyecta en el instrumento deseado, un cromatógrafo de gases o líquidos o electroforesis capilar para su separación y análisis.

En el caso del análisis por HPLC directo, se emplea una interfase HPLC/SPME que conecta el dispositivo-jeringa de SPME con la válvula de inyección del cromatógrafo de líquidos.

Consideraciones teóricas

La teoría de la SPME se basa en los principios básicos de la termodinámica y de la transferencia de masa.

El reparto de los analitos entre la muestra acuosa y la fase estacionaria (película polimérica de la fibra) es el principio más importante de operación en SPME. La teoría de la adsorción en las fibras fue descrita por Louch y sus colaboradores [111] quienes pusieron de manifiesto que el analito no se extrae cuantitativamente sobre la fibra, ya que equivale a la existencia de únicamente un plato teórico, es decir, una sola etapa de adsorción. Así, el equilibrio tiene lugar entre la concentración de analito que queda en la fase acuosa y la concentración de analito adsorbido en el recubrimiento de la fibra (fase estacionaria).

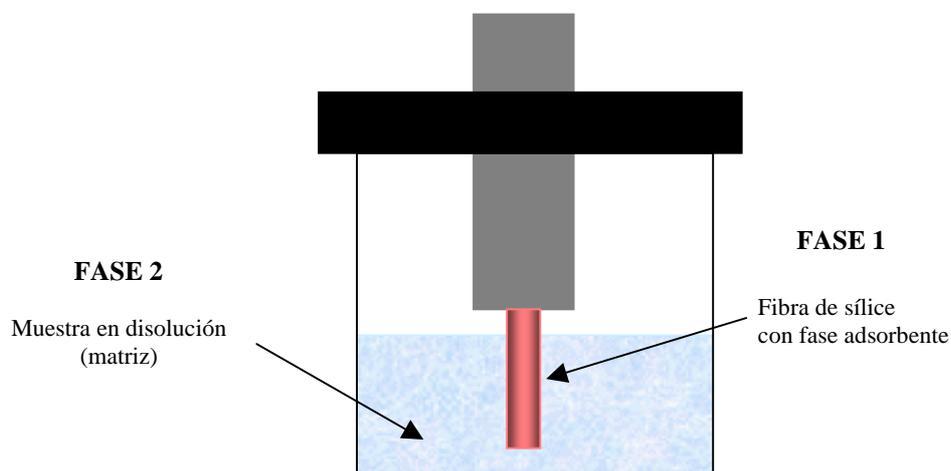


Figura 22.- Sistema de dos fases

Como puede verse en la figura 22, es, por tanto, un sistema de dos fases:

- La fibra de SPME (fase estacionaria).
- La matriz de la muestra (fase acuosa).

Estos autores, desarrollaron una relación matemática para la evaluación del proceso dinámico de adsorción, en la que ponen de manifiesto que la cantidad de analito absorbida en la fibra, n , está relacionada con la concentración en la fase acuosa a través de la siguiente expresión (en caso de muestra acuosa sin espacio de cabeza):

$$n = K_{fs} V_f V_s C_o / K_{fs} V_f + V_s \quad (1)$$

donde:

- K_{fs} es la constante de distribución del analito entre la fibra y la matriz de la muestra.
- V_f es el volumen de fase en la fibra.
- V_s es el volumen de muestra.
- C_o es la concentración inicial del analito en la muestra.

La ecuación (1) describe la masa absorbida por el polímero de la fibra después de alcanzar el equilibrio. Como indica dicha ecuación, si el volumen de la muestra es muy grande ($V_s \gg K_{fs} V_f$), la cantidad del analito extraída por la fibra es:

$$n = K_{fs} V_f C_o \quad (2)$$

De esta ecuación se deduce principalmente que:

- La cantidad de analito extraído no depende del volumen de muestra.
- No es necesario tomar un volumen conocido de muestra para realizar el muestreo.

Estas características, unidas a la sencillez del dispositivo, hacen de la SPME una forma ideal para el muestreo en campo, puesto que, la fibra se podrá

exponer al aire o sumergir directamente en un pozo, un lago o un río, sin tener en cuenta el volumen de muestra. La SPME reduce el tiempo de análisis en campo puesto que combina en un único proceso muestreo, extracción, preconcentración e inyección.

La SPME resulta, aparentemente, una técnica poco sensible si se compara con otras técnicas de extracción como la SPE la cual aísla a la mayoría de los analitos (> 90%), pero sólo inyectan un 1-2% de la muestra en el cromatógrafo de gases, mientras que con la SPME se extrae mucha menor cantidad de analitos (2-20%), pero todos son inyectados en el cromatógrafo de gases, con lo que se compensa la cantidad de analito que en uno u otro caso se inyecta en el cromatógrafo.

Inicialmente se empleó una fibra de sílice fundida cubierta con una fase de polidimetilsiloxano (PDMS) o poliacrilato (PA) y hoy día se han extendido a otros recubrimientos como Carbowax-divinilbenceno, PDMS-divinilbenceno o Carboxen-PDMS. En la tabla 8 se muestran los tipos de fibras existentes:

Tipo de fibra	Grosor	T máxima(°C)	T(°C) recomendada	Uso recomendado
PDMS	100µm	280	200-270	GC/HPLC
PDMS	30µm	280	200-270	GC/HPLC
PDMS	7µm	340	200-270	GC
PDMS/DVB	65µm	270	200-270	GC
PDMS/DVB	60µm	280	200-270	HPLC
PA	85µm	320	220-310	GC/HPLC
CAR/PDMS	75µm	320	240-300	GC
CW/DVB	65µm	265	200-260	GC
DVB/CAR/PDMS	50/30µm	270	230-270	GC

Tabla 8.- Fibras existentes en la actualidad y sus condiciones de trabajo.

PDMS: Polidimetilsiloxano, PA: Poliacrilato, DVB: Divinilbenceno, CW: Carbowax, CAR: Carboxen.

La fibra PDMS muestra una gran afinidad para compuestos no polares tales como PAHs. Sin embargo, también se puede usar con eficacia para la extracción

de compuestos más polares, particularmente después de optimizar las condiciones de extracción. La fibra de PDMS es una fibra robusta y puede soportar temperaturas, de hasta 300°C. La reducción del espesor de la película de 100 a 7 μm produce una fase limitada que es más estable a altas temperaturas con lo cual pueden ser utilizadas para el análisis de compuestos menos volátiles. Además, el proceso de desorción es más rápido desde la capa de 7 μm que desde la capa de 100 μm .

La fibra de PDMS de 30 μm extrae y libera compuestos semivolátiles de pesos moleculares más altos que las fibras de 100 μm y ofrecen mayor retención de compuestos semivolátiles no polares que las fibras con 7 μm .

Las fibras con fase estacionaria de polidimetilsiloxano/divinilbenceno (PDMS/DVB), Carbowax (CW: polietileno glicol)-DVB permiten extraer compuestos polares más volátiles tales como alcoholes o aminas, que se adsorben y se desprenden más rápidamente.

La fibra con fase estacionaria de poliacrilato (PA) es más polar y es utilizada para la extracción de compuestos polares. El PA es un polímero sólido a diferencia del PDMS, por lo tanto el tiempo de equilibrio es mayor que el de las fibras líquidas de PDMS. Esta fibra tiene gran afinidad por compuestos polares como fenoles y pesticidas polares [114].

La fibra carbowax y carboxen (CAR: soporte de carbono activo poroso) de fases mezcladas se utiliza para la extracción de compuestos más polares como cetonas y alcoholes.

Las fibras son compatibles con la mayoría de los disolventes orgánicos, si bien hay que evitar usar las fases PDMS cuando se utilicen disolventes apolares. Los disolventes organoclorados disuelven las uniones epoxi que poseen las fibras y que mantienen sus partes ensambladas unas con otras por lo que debe evitarse su uso.

Desde su desarrollo, SPME fue usada para la determinación de varios compuestos orgánicos en diferentes tipos de muestras (gaseosas, líquidas y sólidas), prestando

mucha atención a la determinación de compuestos volátiles tales como benceno, tolueno y xilenos (BTEXs) [115] y compuestos orgánicos volátiles(VOCs) [116].

El desarrollo de un procedimiento para la determinación de pesticidas usando la técnica SPME requiere siempre la optimización de variables relacionadas con las etapas de extracción y de desorción (tabla 9).

Variable	Observaciones	Referencias
Extracción		
Tipo de fibra		[117]
Tiempo de extracción	30s hasta 120min hasta 16horas	[117,118,119] [120,121]
Fuerza iónica	0%NaCl hasta saturación	[120,122]
pH	pH 2-11	[122,123]
temperatura	4°C hasta 80°C	[120,121]
Volumen de muestra	1-2ml	[124]
Agitación	0-1600rpm	[122]
Desorción		
Temperatura	240-290°C, 210-310°C	[118,125]
Tiempo	Hasta 7 min	[118,119,125]
Disolvente y volumen	ACN	[126]

Tabla 9.- Optimización de variables consideradas en el procedimiento de SPME.

Como podemos ver, entre las variables mas ampliamente estudiadas están casi siempre, el tipo de fibra, tiempo de extracción y fuerza iónica de la muestra, en la etapa de extracción, y la temperatura y el tiempo en la etapa de desorción. La mayoría de los trabajos describen el uso de fibras con recubrimiento de PDMS y PA porque como hemos señalado fueron las primeras fibras utilizadas. Para

los compuestos orgánicos el principio de “semejante disuelve a semejante” se aplica de tal forma, que para la extracción de compuestos polares se utilizarán fibras con recubrimientos polares. Hoy día hay muchos recubrimientos que cubren un amplio intervalo de polaridad y están comercialmente disponibles (por ejemplo Carbowax-divinilbenceno recientemente comercializada). La introducción de estas nuevas fases se debe al interés de extraer compuestos más polares y aumentar el grado de su aplicación cuando se utiliza el HPLC.

Se ha evaluado el efecto de largos tiempos de extracción (de hasta 16 horas), pero muchas veces se emplean tiempos cortos a pesar de no haberse conseguido las condiciones de equilibrio [118,127]. La eficacia de extracción de pesticidas puede estar influida por el pH de la muestra, aunque muchos autores consideran que el pH no es una variable a controlar para los pesticidas neutros [123,127], pero si en la extracción de compuestos ionizables como herbicidas ácidos[119] o clorofenoles[125] en los que el pH de la muestra debe ser ajustado a 1 antes de la SPME. Otro parámetro que afecta la eficiencia de la extracción es la fuerza iónica (salting out) que se puede controlar mediante la adición de sales a la muestra. Este efecto fue estudiado con frecuencia en las aplicaciones de SPME por la adición de NaCl o Na₂SO₄[128]. Muchos autores están de acuerdo del efecto positivo causado por la adición de NaCl a la muestra sobre la eficacia de la extracción de la mayoría de los compuestos, sin embargo otros no han encontrado ninguna relación entre la eficacia de extracción y la adición de sales [118,129]. Hernandez y col. sugieron que una concentración alta de sales puede conducir a efectos negativos sobre la estabilidad de la fibra, como por ejemplo cuando se usa una fibra de Carbowax-divinilbenceno (ver figura 23) [130].

La primera aplicación para determinar pesticidas aparece hasta el año 1994 [131,132]. Eisert y col. usaron una fibra de PDMS(100µm) para la extracción de seis pesticidas organofosforados de agua Mili-Q y de río alcanzando límites de detección de partes por billón. Hoy en día hay alrededor de 400 referencias sobre la técnica SPME, de las cuales 60 son sobre el análisis de pesticidas.

La mayoría de las aplicaciones de SPME para la determinación de pesticidas implican la extracción de muestras de agua, no solamente por su relevancia medioambiental si no porque la técnica es adecuada y se puede usar

perfectamente para la extracción de matrices acuosas. Cuando se evalúan otras matrices la mayoría de los autores incluyen una sección relacionada con muestras de agua como etapa preliminar de la optimización [123,128,130].

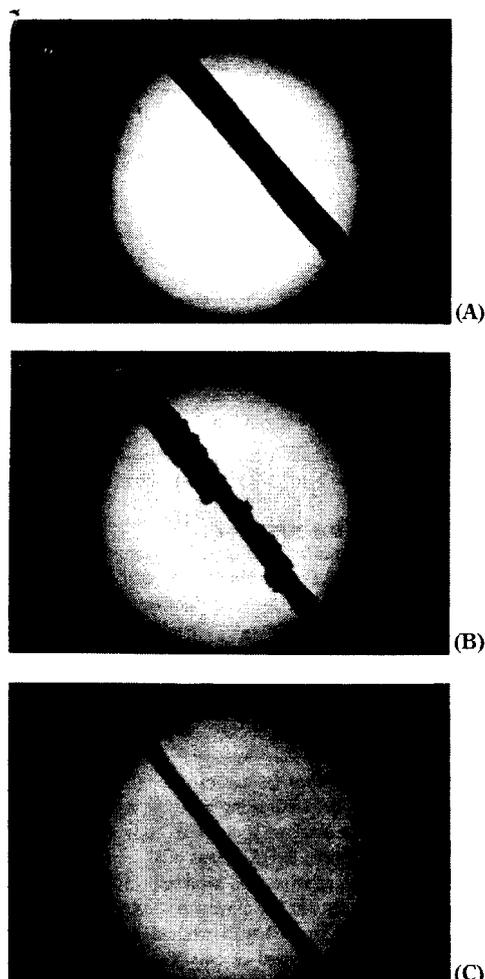


Figura 23.-Fotografía de una fibra obtenida usando un microscopio óptico: (A) fibra nueva, (B) después de 6 extracciones usando 30% de NaCl, y (C) después de 15 extracciones usando 30% de NaCl.

La tabla 10 recoge un resumen sobre las determinaciones de pesticidas con distintos tipos de fibras y matrices acuosas (agua ultrapura, agua (superficial y subterránea) y agua de consumo).

La reproducibilidad obtenida (inferior al 17%) y la buena precisión de los resultados permite considerar a la SPME como una técnica prometedora para el

Pesticidas	Matriz	Tipo de fibra	procedimiento	Determinación	LOD($\mu\text{g l}^{-1}$)	Ref.
Organofosforados	Agua subterránea Agua superficial	PDMS 100 μm	4ml de muestra saturada con NaCl a pH 7, extracción durante 20min; desorción a 220°C durante 5 min	GC-NPD GC-MS	0.03-37.5 0.01-8.13	130
Organofosforados	Agua de mar Agua residual	PA	2ml de muestra extraídos a 60°C durante 45min con agitación; desorción a 260°C durante 2 min	GC-NPD	0.006-0.136	118
Organofosforados	Agua subterránea	PDMS 100 μm PA	3ml de muestra extraída durante 25 min con agitación; desorción a 220°C durante 5min	GC-NPD	0.003-0.13 0.001-0.09	131
Triacinas	Agua subterránea Agua superficial	PDMS 100 μm PA	4ml de muestra extraída durante 50min con agitación; desorción a 250°C durante 5min	GC-MS	0.004-0.023 0.006-0.019	132
Organoclorados	Agua de río	PDMS 100 μm	1.7ml de muestra extraída durante 2 min con agitación; desorción a 250°C durante 2min	GC-ECD	0.005-0.02	121

Tabla 10.- Aplicación de SPME para la determinación de pesticidas en muestras de agua.

Pesticidas	Matriz	Tipo de fibra	procedimiento	Determinación	LOD($\mu\text{g l}^{-1}$)	Ref.
Herbicidas, Organoclorados y Organofosforados	Suelo	PDMS 100 μm (ID-SPME)	0.5g de suelo + 4ml de agua agitación 50min, desorción a 230°C durante 5 min.	GC-MS	-	132
Organofosforados	Suelo	PA (HS-SPME)	3.5g de muestra + 3.5ml de agua destilada extracción 60min a 80°C, desorción a 250°C durante 3 min	GC-FID GC-MS	29-143 14-29	136
Triacinas	Suelo	CW-TPR	Extracción de la suspensión de 200mg de suelo y 4ml de agua durante 60min; desorción con 50 μl de metanol	HPLC-MS	2-10	135

Tabla 11.- Aplicación de SPME para la determinación de pesticidas en muestras de suelo.

análisis cuantitativo de estos compuestos en agua a concentraciones que están alrededor del límite Europeo de 100 ng l^{-1} para pesticidas individuales en agua de consumo.

Como puede observarse en la tabla 10 la cromatografía de gases usando espectrometría de masas (MS), captura electrónica (ECD) o nitrógeno fósforo (NPD) como sistema de detección son los sistemas de detección más ampliamente utilizados.

La automatización en la preparación de muestra usando la microextracción en fase sólida es menos complicada que mediante el empleo de métodos convencionales, ya que sólo requiere unas pequeñas modificaciones en un muestreador automático de un cromatógrafo de gases.

Eisert y Pawliszyn [136] han desarrollado un sistema automatizado de SPME-HPLC llamado “in-tube”, donde se emplea una sección de un capilar (trozo de una columna de GC) de sílice fundida entre la jeringuilla y la válvula de inyección de un automuestreador de HPLC. Este sistema puede llevar a cabo la extracción, desorción e inyección en continuo usando un muestreador automático.

Aunque la teoría de los métodos SPME con fibra y SPME “in-tube” son similares, la diferencia significativa entre estos métodos es que la extracción de los analitos se lleva a cabo en la superficie exterior de la fibra para la SPME con fibra y en la superficie interior del capilar en caso de la SPME “in tube”. Esta técnica mejora la selectividad de la SPME para compuestos polares usando una fase estacionaria más polar tal como carbowax.

Muchos pesticidas polares, térmicamente inestables y/o de baja volatilidad no pueden ser analizados directamente con GC y requieren la aplicación de un procedimiento de derivatización como una etapa preliminar para su determinación por cromatografía de gases. En este sentido, la combinación de la derivatización y SPME fue realizada para el análisis de herbicidas fenoxiácidos [119].

La determinación de pesticidas en muestras de suelo usando SPME no ha sido todavía bien establecida, la tabla 11 resume las aplicaciones mas relevantes llevadas a cabo con la técnica, donde puede verse que la mayoría se basan en la preparación de una mezcla

de suelo y agua destilada y la inmersión de la fibra de SPME en esta suspensión [125,137].

Típicamente la cantidad de suelo usada oscila de 20 a 500 mg [125,135]. En la mayoría de los estudios se refleja la complejidad de esta matriz que proporciona una baja eficiencia de extracción.

Algunos autores [138] han usado la fibra de PA para la determinación de varios pesticidas en extracto de suelo empleando acetonitrilo como disolvente. Otros [130] han usado, en un sistema de extracción con microondas, una fibra de CW-DVB para determinar 5 triacinas, molinate y bromacil en suelo usando metanol seguido de una dilución posterior con agua destilada para disminuir el efecto negativo de la concentración del disolvente orgánico en la adsorción de los pesticidas en la fibra.

En resumen todos los trabajos hechos hasta ahora consideran que la técnica de SPME ofrece un gran potencial como técnica de tratamiento y preconcentración de muestra siendo además rápida, simple y barata para la determinación de pesticidas en muestras de suelo. Todos estos aspectos nos han llevado a evaluar la SPME para la determinación de pesticidas (atracina, me-paration, clorpirifos, metidation y carbofenotion) en suelos.

II.4.-Extracción asistida con microondas

EL tratamiento de muestras es en química analítica una de las partes más importantes y complejas del proceso analítico y el que por lo general contribuye a la mayor fuente de error. Como se desprende del esquema ilustrado en la figura 24 es la etapa que más tiempo consume en la ejecución del análisis [140].

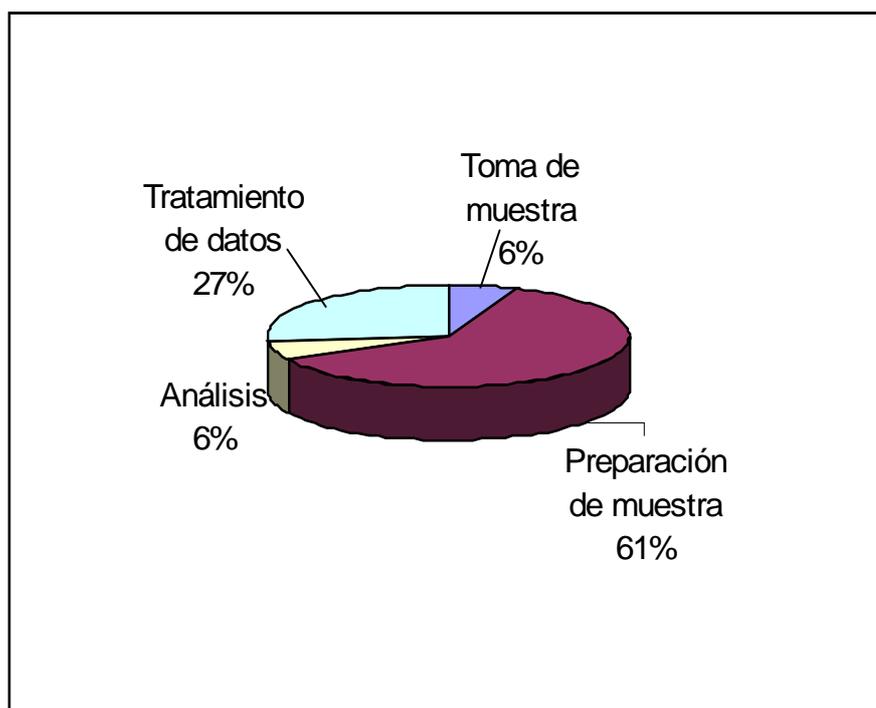


Figura 24.- Distribución del tiempo total de realización de un análisis.

Los métodos tradicionales de preparación de muestras suelen basarse en el empleo de temperaturas altas con el uso de placas calefactoras y suelen ser procesos excesivamente lentos y tediosos, presentando un alto riesgo de contaminación de la muestra. Estos inconvenientes han hecho que se busquen nuevas formas de energía tales como la radiación de microondas, como método de tratamiento de muestras ya que ofrece la ventaja de reducir significativamente el tiempo requerido en esta etapa preparativa de la muestra. La radiación de microondas se está empleando actualmente con éxito para extraer analitos contaminantes de muy diversa naturaleza de muestras de diferente naturaleza.

II.4.1.-Consideraciones teóricas de la interacción de microondas con la materia

La energía de microondas (ondas electromagnéticas) [141] es una radiación no ionizante que causa el movimiento de las moléculas debido a la migración de iones y la rotación dipolar, pero no causa cambios en la estructura molecular. La región de microondas comprende el intervalo de frecuencias comprendido entre 300 y 300000 MHz (ver figura 25). No obstante, los equipos de microondas domésticos, así como los utilizados en digestión y extracción analítica operan únicamente a 2450 MHz.

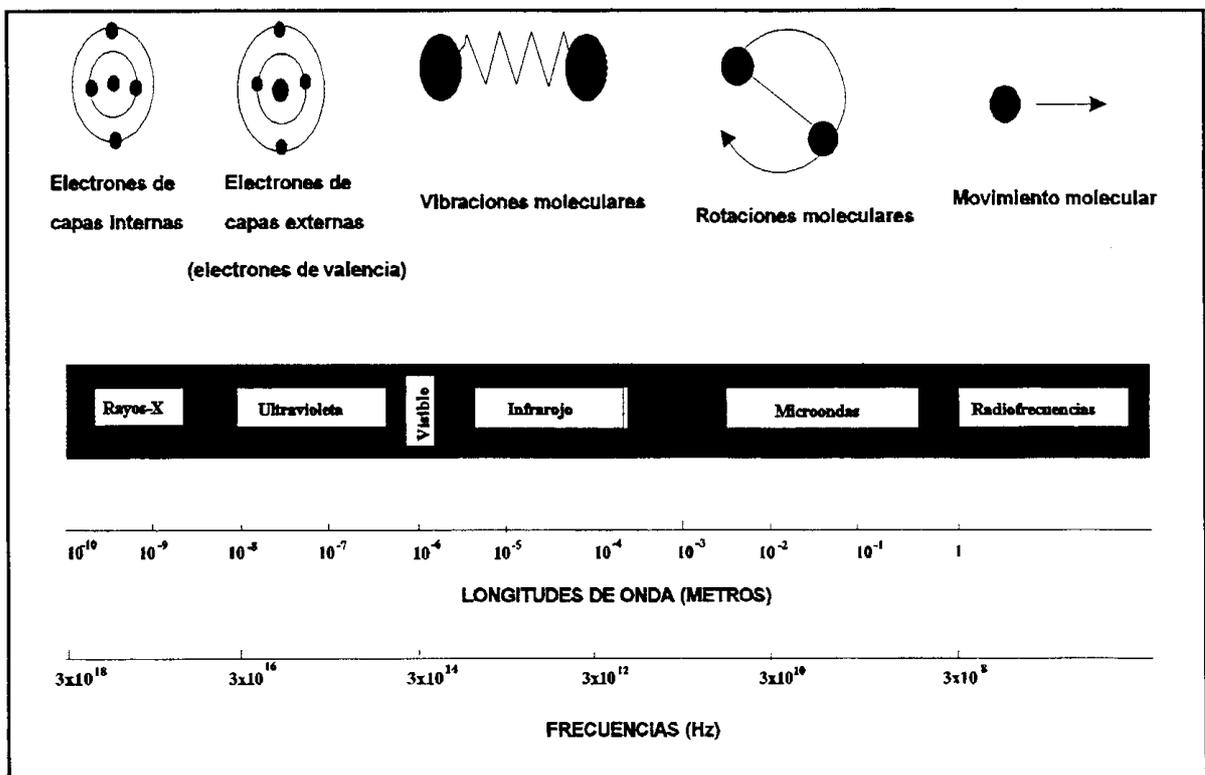


Figura 25.- Espectro electromagnético.

La capacidad de una especie para absorber energía de microondas varía con su naturaleza química. Así, el valor de la constante dieléctrica es una medida de la capacidad de la muestra para absorber la radiación de forma que cuanto mayor sea su valor, mayor será la capacidad de absorción de la muestra. El calentamiento de una

muestra dependerá además de su capacidad para transformar la energía de microondas en calor. Se define el factor de disipación ($\tan \delta$) como la relación entre la pérdida dieléctrica de la muestra o factor de pérdida (ϵ'') y su constante dieléctrica (ϵ');

$$\tan \delta = \epsilon''/\epsilon'$$

El factor de pérdida mide la capacidad de la muestra para disipar la energía de microondas como calor. Existen tablas donde se recogen los valores de los factores de disipación y las constantes dieléctricas para distintos materiales [142]. En caso de la extracción usando disolventes orgánicos, hay que tener en cuenta también los valores de sus constantes dieléctricas.

Tabla 12.- Características para disolventes usados en MAE.

Disolvente	Constante dieléctrica	Punto de ebullición (°C)	Temperatura en vasos cerrados (°C) ^a
Hexano	1.89	68.7	----
Hexano-acetona	----	52 ^b	156
Diclorometano	8.93	39.8	140
Acetona	20.7	56.2	164
Metanol	32.63	64.7	151
Acetonitrilo	37.5	81.6	194

^a a 175 psig

^b determinado experimentalmente

La energía de microondas es absorbida por la muestra en una proporción dependiente del factor de disipación. La capacidad de penetración de la radiación de las microondas se considera infinita en materiales transparentes a la radiación y nula en materiales reflectivos como son los metales.

En la tabla 12 se muestran algunas características de los disolventes usados en la extracción asistida con microondas MAE [143].

** Transformación de la energía de microondas en calor*

La energía de microondas se disipa mediante dos mecanismos: conducción iónica y rotación dipolar, y en muchos casos, ambos mecanismos tienen lugar simultáneamente. Los parámetros que afectan a la conducción iónica son la concentración de iones, su movilidad y la temperatura de la disolución.

La rotación dipolar se refiere al alineamiento de las moléculas que tienen momento dipolar permanente o inducido, debido a la acción de un campo eléctrico. Cuando deja de aplicarse el campo causante de este efecto, la agitación térmica devuelve el desorden a las moléculas en un breve espacio de tiempo. El tiempo de relajación dieléctrico se define como el tiempo necesario para que el 63% de las moléculas de una muestra vuelvan al desorden. A 2450 MHz, el alineamiento de las moléculas seguido por la vuelta al desorden ocurre 4.9×10^9 veces por segundo, lo que da lugar a un calentamiento muy rápido. De todas formas, la eficacia del calentamiento mediante rotación dipolar depende del tiempo de relajación dieléctrica, que a su vez depende de la temperatura y de la viscosidad de la muestra. La máxima conversión de energía por ciclo para muchos materiales (pérdida dieléctrica debida a la rotación dipolar) ocurrirá cuando $\omega = 1/t$, donde ω es la frecuencia angular de la energía de microondas en radianes por segundo y t es el tiempo de relajación dieléctrica de la muestra.

** Efecto de la temperatura en el factor de disipación*

La temperatura afecta a los dos mecanismos de conversión de energía; rotación dipolar y conducción iónica. Para moléculas pequeñas, como agua y otros disolventes, la pérdida dieléctrica de una muestra debido a la contribución de la rotación dipolar disminuye cuando la temperatura de la muestra aumenta. En contraste, la pérdida dieléctrica debida a la conducción iónica aumenta cuando la temperatura de la muestra aumenta. De todas formas, cuando una muestra de naturaleza iónica se calienta con energía de microondas, la pérdida dieléctrica de la muestra está inicialmente dominada por la contribución de la rotación dipolar. Cuando la temperatura aumenta, la pérdida dieléctrica es dominada por la conducción iónica.

La contribución de cada uno de estos dos mecanismos de calentamiento dependerá de la movilidad y concentración de los iones en la muestra así como de su tiempo de

relajación. Si la movilidad iónica y la concentración de iones son bajas, entonces el calentamiento de la muestra estará enteramente dominado por la rotación dipolar.

El agua exhibe una reducción del factor de disipación cuando aumenta la temperatura [144], mientras que la mayoría de los disolventes orgánicos se comportan de un modo diferente, el factor de disipación aumenta con la temperatura. El factor de disipación de los sólidos también aumenta con la temperatura, de forma que algunos tienen pérdidas dieléctricas muy bajas a temperatura ambiente, pero la absorción de la energía electromagnética aumenta muy rápidamente con la temperatura. La estabilización de la temperatura en un sistema expuesto a radiación de microondas, sólo es posible si el calor se puede eliminar en una proporción suficientemente alta o si se limita la potencia de microondas.

** Influencia de la forma y el tamaño de la muestra*

La forma y el tamaño de los objetos calentados por microondas tienen un impacto mucho mayor y diferente en la distribución de la temperatura que en los métodos clásicos de calentamiento. La energía de microondas incide directamente en el interior del objeto o muestra de forma que ésta se calienta sin la mediación del proceso de conducción y/o convección, lo que origina que las temperaturas en su interior sean superiores a las de su superficie, especialmente en sólidos con baja conductividad térmica (en líquidos también puede originarse un gradiente de temperatura).

Todas estas consideraciones hacen que aquellos sistemas que poseen características estructurales no homogéneas, o que contienen distintas especies químicas con propiedades dieléctricas diferentes dispersas en un medio homogéneo, puedan experimentar un calentamiento selectivo de algunas áreas o componentes del sistema.

II.4.2.-Aplicaciones analíticas de la extracción con microondas

La primera aplicación de la radiación de microondas en la preparación de muestras data de 1975 [145], en la que se empleó un horno de microondas para la destrucción de materia orgánica, usando combinaciones de ácido nítrico con ácido perclórico o con peróxido de hidrógeno. La primera aplicación de la extracción asistida por microondas de analitos usando disolventes orgánicos no tuvo lugar hasta el año 1986 [146]. Se

empleó para extraer analitos de suelo, semillas y alimentos empleando metanol o metanol-agua para compuestos polares y hexano para los no polares.

Los autores utilizaron un microondas doméstico y expusieron las muestras, previamente mezcladas con disolventes adecuados, a varios períodos de irradiación separados entre sí por períodos de enfriamiento, para evitar que se produjera la ebullición de la muestra. Se demostró que la extracción de compuestos polares tenía lugar con mayor eficacia que la proporcionada por el método Soxhlet. Las recuperaciones obtenidas fueron comparables o mejores que las obtenidas con las técnicas tradicionales, pero la extracción con microondas demostró ser mucho más rápida (La duración de cada etapa de calentamiento fue de 30s). Esta forma pionera de tratamiento de muestra fue de gran importancia a pesar del riesgo de fuego que implicaba el uso de disolventes orgánicos. Hoy día se han comercializado nuevos sistemas de MAE que han minimizado el riesgo que supone el calentar disolventes orgánicos.

El uso de microondas para realizar la mineralización de muestras en el análisis elemental constituye en la actualidad una técnica bien desarrollada y se ha establecido como método de rutina en muchos casos [147]. No obstante la extracción con microondas se encuentra todavía en su fase de desarrollo y son numerosas las aplicaciones que se recogen normalmente en la bibliografía.

El proceso de extracción asistida por microondas (MAE) ha sido patentado por Environment Canadá [148].

La selección del disolvente es el punto clave para una extracción eficaz. En su selección hay que considerar su capacidad de absorber la energía de microondas, la interacción del disolvente con la matriz, y la solubilidad de los analitos en el disolvente (el principio de “semejante disuelve semejante” sigue siendo aplicable en MAE). El disolvente con un momento dipolar grande es el que se calienta más rápido usando energía de microondas. Por ejemplo, hexano (momento dipolar < 0.1 Debye) no se calienta, mientras que la acetona con un momento dipolar de 2.69 Debye lo hace en fracciones de segundos. Así, una mezcla de hexano-acetona es un disolvente ideal para compuestos de importancia medioambiental, y muchas aplicaciones describen el uso de hexano-acetona (1:1) [149].

Otros factores de gran importancia que deben tenerse en consideración a la hora de seleccionar el disolvente son:

- ❖ La compatibilidad entre el disolvente de extracción y el método analítico usado en el análisis del extracto (disolventes menos polares parecen ser mejores para el análisis con cromatografía de gases, mientras los más polares lo son para la cromatografía de líquidos).
- ❖ La selectividad del disolvente. Son pocos los trabajos encontrados en la bibliografía sobre la selectividad de MAE debido a la eficacia del proceso. Por lo general en la mayoría de los casos se requiere una etapa de limpieza (clean-up) previa con el fin de que los extractos sean más selectivos.

Cuando se procede a la MAE en reactores cerrados, la temperatura para la mayoría de los disolventes (acetona, acetona-hexano, diclorometano-acetona) en el interior del reactor es dos o tres veces superior al punto de ebullición del disolvente, y como resultado se mejora la eficacia de la extracción del analito desde la matriz.

Aplicaciones específicas de MAE

En los últimos años el número de aplicaciones medioambientales de esta tecnología ha aumentado rápidamente. Por ejemplo la extracción de pesticidas organoclorados en sedimentos [150] cuyos resultados han servido para patentar el proceso por Environment Canadá (usando la terminología, Proceso asistido por microondas (MAPTM)). Se ha llevado a cabo la extracción de aldrin, dieldrin y DDT de suelos y sedimentos empleando acetonitrilo, isooctano y una mezcla de los dos disolventes (1:1) obteniendo recuperaciones desde 74% hasta el 95.3% y con una desviación estándar que no supera el 4%.

Avila y col.[149] han utilizado MAE para la extracción de 20 pesticidas organoclorados de muestras de suelo enriquecidas con recuperaciones del 83% y RSD del 10% usando las condiciones siguientes: temperatura 115°C; tiempo 10min a 100% de potencia; y 30 ml de acetona-hexano.

La extracción por MAE de atracina y sus productos de degradación [151] de suelos agrícolas se llevó a cabo con agua y HCl 0.35M como disolvente de extracción. Los extractos fueron más limpios que los obtenidos con mezclas de metanol-agua y acetonitrilo-agua, pero la recuperación de la atracina fue solo de 55-65%, con una desviación estándar aproximadamente de 30-40%. Sin embargo otros autores han demostrado la eficacia de MAE al extraer triacinas de suelo usando como disolvente de extracción agua [152] metanol [152], acetona-hexano(1:1)[152], diclorometano [152], diclorometano-agua (50:50)[153], metanol-diclorometano(10:90)[153]. El agua parece ser el disolvente más adecuado por su polaridad y capacidad de interacción con la materia polar del suelo desorbiendo así las triacinas [152].

La técnica MAE aplicada a muestras acuosas requiere por lo general una etapa de preconcentración previa en discos membrana u otros materiales adsorbentes. Chee y col [154] usaron discos de C₁₈ y luego extrajeron los analitos de los discos con 20 ml de (acetona o diclorometano) a 80°C, 100°C y 120°C durante 1, 2, 5 y 10min respectivamente. La acetona proporcionó recuperaciones superiores que el diclorometano.

Hasty y Revesz [155] optimizaron de forma univariante la temperatura, volumen de disolvente y tiempo de extracción de hidrocarburos en suelo. Utilizando disolventes no polares como el hexano y otros polares.

López Ávila y col. [156,157] optimizaron la extracción de varios grupos de contaminantes como son pesticidas, PAHS, PCBS, fenoles y compuestos básico/neutros en suelos y sedimentos. Estos autores estudiaron con detenimiento la influencia de toda una serie de factores (tipo y volumen de disolvente, tipo de muestra y tamaño de la misma, número de vasos de extracción utilizados simultáneamente, así como cantidad de agua añadida) en la temperatura máxima alcanzada por el sistema y el tiempo necesario para alcanzar esta temperatura. Las extracciones fueron realizadas finalmente en hexano-acetona (1:1) a 115°C durante 10 minutos, utilizando un tamaño de muestra de 5 gramos y un volumen de disolvente de 30 mL. En la tabla 13 se muestran aplicaciones de MAE para extraer pesticidas de diferentes muestras.

Analitos	Matriz	Disolvente	Condiciones de MAE	Ref.
Pesticidas organoclorados	Sedimentos	Acetonitrilo Isioctano Isooctano-acetonitrilo(1:1)	Radiación en 30s, repetida 5 veces	149
Atracina Simacina Prometrin	Arena Arcilla Florisil	Metanol, Agua Acetona-hexano (1:1) Diclorometano		152
7Pesticidas organofosforados Fungicidas/herbicidas	Agua (C ₁₈)	Acetona, Diclorometano	1, 3, 5, 10min a 80, 100, 120 °C, en vasos cerrados.	154
Atracina	Suelo	Agua	3, 4 y 5min en vasos cerrados.	158

Tabla 13.- Aplicaciones de MAE para pesticidas, seleccionados de la bibliografía.

II.5.- Otros

La extracción con fluidos supercríticos (SFE) es también otra técnica utilizada en la extracción de pesticidas que emplea disolventes con propiedades intermedias entre un gas y un líquido. Las ventajas conseguidas mediante el empleo de esta técnica son debidas a las propiedades físicas inherentes a los fluidos supercríticos.

Se ha demostrado que la SFE presenta claras ventajas, como menos tiempo de preparación de muestra y bajo consumo de disolventes, sobre los métodos de extracción convencionales. Además de conseguir recuperaciones iguales o mejores que las técnicas clásicas [159]

Las áreas en las que SFE ha tenido una mayor aplicación analítica son las de medio ambiente, alimentos e industrial, su principal campo de aplicación es, actualmente, la química analítica medioambiental.

Referente al empleo de la SFE de pesticidas de matrices medioambientales, a pesar de que la bibliografía es bastante extensa, la mayoría de los ejemplos se han llevado a cabo con suelos enriquecidos a diferentes niveles de concentraciones. Algunos han estudiado el efecto de la interacción de suelo-pesticida (efecto matriz) en la eficiencia de SFE para la extracción de pesticidas en suelo [160], otros han estudiado el efecto del tipo y la

cantidad del modificador(metanol, acetonitrilo, tolueno) y del tiempo de extracción de pesticidas organoclorados de suelos usando la SFE [161].

En general la optimización de la SFE en un análisis requiere un mayor esfuerzo que en otras técnicas convencionales de extracción debido a que hay más parámetros experimentales que deben ser controlados como: Presión, temperatura, flujo, tiempo de extracción estática, tiempo de extracción dinámica, tamaño de la muestra, elección del fluido supercrítico, elección del modificador, cantidad de modificador, matriz de la muestra, etc.

El acoplamiento de la extracción con un fluido supercrítico y la cromatografía de gases es una opción ventajosa cuando los componentes de la muestra son lo suficientemente volátiles, ya que la mayor parte de los fluidos supercríticos son fácilmente compatibles con esta cromatografía.

II.6.- Optimización del proceso analítico: diseños factoriales

II.6.1.-Introducción

Los diseños factoriales son un tipo de diseños experimentales que se usan muy a menudo para investigar superficies de respuesta multifactoriales [162]. La palabra "factorial" indica que muchos factores se varían simultáneamente de un modo sistemático. Una de las mayores ventajas de los diseños factoriales es que pueden usarse para revelar la existencia de interacciones entre diferentes variables de un sistema.

Historicamente, los diseños factoriales fueron introducidos por R.A. Fisher contradiciendo la entonces prevaleciente teoría de que si se quería descubrir el efecto de una variable en un sistema, los demás se deberían mantener constantes, y sólo se debía variar el factor objeto de estudio. Fisher demostró que todos los parámetros o variables de interés podían variarse simultáneamente y estimar con un adecuado tratamiento matemático los efectos individuales de los factores, así como sus interacciones.

El número de factores (variables) involucrados en el diseño, y el número de niveles (valores discretos) asignados a cada factor son importantes descriptores de los diseños factoriales. El diseño factorial más directo y fácil de entender comprende medidas de la respuesta para todas las combinaciones posibles de factores a todos los niveles que les

han sido asignados. De este modo, la descripción de un diseño factorial da el número de combinaciones de factores (f) contenidas en el diseño. En general, si P es el número de factores que van a ser investigados y k es el número de niveles de cada factor, será k^P el número de combinaciones de factores generadas por un diseño factorial completo.

El modelo más comúnmente ajustado a los datos obtenidos a partir de un diseño factorial a dos niveles 2^2 es:

$$y_{li} = b_0 + b_1X_{li} + b_2X_{2i} + b_{12}X_{li}X_{2i} + r_{li}$$

En este caso el número de parámetros a determinar coincide con el número de combinaciones de factores (experimentos), siendo, por lo tanto, cero el número de grados de libertad [163] y no es posible evaluar la falta de ajuste del modelo. Este problema se soluciona mediante la eliminación de aquellos efectos que no parecen ser significativos en el modelo y permite que la variación adscrita a esos efectos aparezca en los residuales. Además, si no se realizan réplicas, no se dispone de grados de libertad para estimar la incertidumbre de las medidas experimentales. Esto se soluciona normalmente, realizando réplicas, a menudo en el centro del diseño.

Otro inconveniente es que aquellos modelos que incluyen términos cuadráticos, no pueden ser ajustados a los datos obtenidos a partir de un diseño factorial completo.

Uno de los mayores problemas de los diseños factoriales completos es que cuando el número de factores a estudiar es moderado o alto, el número de experimentos a realizar es muy grande. En estos casos es conveniente recurrir a diseños factoriales fraccionales.

II.6.2.-Diseños factoriales fraccionales (screening).

Estos diseños, como su propio nombre indica, sirven y se usan para separar la importancia o incidencia de distintos factores [164]. Supongamos que estamos iniciando una investigación y contamos con un número elevado de factores que potencialmente pueden afectar a nuestro sistema. Sería interesante disponer de una herramienta que nos permitiera separar los factores importantes de aquellos que no lo son.

El propósito de iniciar un estudio con un diseño de screening es elegir, a partir de un elevado número de factores potencialmente útiles aquellos que ejercen la mayor influencia en el sistema.

II.6.3.-Diseños de superficie de respuesta

La metodología de superficie de respuesta [165] fue desarrollada por Box, Wilson y Youle a principios de 1950. Es una herramienta para construir modelos empíricos que usan técnicas secuenciales de experimentación para reconocer un campo de interés y localizar en él las variables más importantes y sus efectos.

En los primeros momentos de la investigación, generalmente se usan diseños de screening con el fin de reducir el número de variables potenciales a partir de un número relativamente grande. A continuación, siguiendo el camino de pasos ascendentes, se puede localizar una región en la que una ecuación polinomial de primer grado no se puede aproximar de forma satisfactoria. Esta área incluye un máximo o un mínimo local o global en la superficie de respuesta.

En este caso se puede aplicar la metodología de superficie de respuesta para describir el área alrededor del máximo, usando un polinomio de segundo grado o superior.

Diseños centrales composicionales (Central composite) Los diseños centrales composicionales constituyen los diseños de superficie de respuesta más importantes [166]. Estos diseños constan de dos partes: por ejemplo, en un estudio de 3 factores, 8 de los puntos en un diseño central composicional forman un cubo que corresponde a un diseño factorial completo 2^3 . La parte correspondiente a la estrella consiste en un grupo adicional de puntos, situados a igual distancia del centro del cubo en radios que pasan a través del punto central de cada cara del cubo. La distancia desde el centro del cubo a uno de esos puntos se denomina "distancia axial" de la estrella. La yuxtaposición de un diseño factorial a dos niveles con un diseño de estrella permite estimar todos los parámetros en un modelo polinómico completo de segundo orden. (Los diseños factoriales completos a dos niveles sólo permitían la estimación de los parámetros de segundo orden).

Los diseños centrales composicionales son relativamente eficientes cuando el número de factores es pequeño, entendiendo por eficiencia la obtención de los parámetros del modelo con el menor número de experimentos posible. De todas formas, es conveniente realizar algún experimento adicional a los estrictamente necesarios para establecer los parámetros del modelo. De esta forma, contaríamos con algún grado de libertad para estimar la falta de ajuste del modelo propuesto.

En este tipo de modelos se incluyen, a menudo, replicados de alguno de los puntos. Si se piensa que la superficie de respuesta es razonablemente homoscedástica, solo una de las combinaciones de factores (generalmente el punto central) necesita ser replicado, normalmente tres o cuatro veces, para proveer de suficientes grados de libertad como para estimar el error experimental.

Los diseños factoriales fraccionales ofrecen una visión general aproximada y son adecuados para construir modelos generales cualitativos sobre la influencia de las distintas variables en el sistema, mientras que los diseños de superficie de respuesta son adecuados cuando se quieren obtener datos cuantitativos de la forma de actuar de las distintas variables que afectan al sistema.

III.- Determinación de pesticidas

III.1.- Métodos cromatográficos

Las técnicas cromatográficas de gases y líquidos acopladas a distintos detectores han sido la más ampliamente utilizadas para la determinación de los pesticidas. A continuación se resume el desarrollo de dichas técnicas en el tema que nos ocupa.

III.1.1- Cromatografía de Gases

Desde que en 1951 la revista *Journal of biochemistry* publicara el primer trabajo sobre cromatografía de reparto gas-líquido, las mejoras en el diseño de las columnas cromatográficas y los avances en el desarrollo instrumental han convertido a la cromatografía de gases en la técnica más utilizada para el análisis cualitativo y cuantitativo de mezclas de compuestos orgánicos de volatilidad media y alta.

La cromatografía de gases con sus detectores selectivos nitrógeno-fósforo (NPD), captura electrónica (ECD) y fotométrico de llama (FPD) o el simple acoplamiento con la espectrometría de masas (MS) ha sido y sigue siendo la técnica más empleada en el análisis de pesticidas debido a su alta eficacia de separación y la velocidad de análisis[167].

La cromatografía de gases con detector de captura de electrones (GC-ECD) es la técnica más utilizada y sensible en la determinación de pesticidas organoclorados tales como DDT, dieldrin y endrin.

Uno de los inconvenientes del detector de captura de electrones es su baja selectividad debido a que existen numerosos compuestos de carácter electrofílico que pueden estar presentes en la matriz y proporcionar señales no específicas, siendo a veces difícil la identificación del compuesto químico que ha producido dicha señal. El detector de captura electrónica solamente ha resuelto una parte del problema permitiendo la detección selectiva y sensible de pesticidas halogenados (DDT, hexaclorociclohexano), pero los pesticidas sin halógenos tales como los organofosforados carecían de detectores sensibles en GC.

La detección por ionización de llama (FID), y la detección nitrógeno-fósforo (NPD) fueron descubiertos al observar que la presencia de sales alcalinas en la llama de un sistema FID aumenta la ionización de compuestos con N y P, lo que originó su uso como detector para estos compuestos [168].

El análisis con GC-NPD puede llevarse a cabo con el modo fósforo y nitrógeno. El modo fósforo permite la determinación de pesticidas organofosforados a concentraciones en el intervalo de pocos ng g^{-1} en diferentes matrices [169] mientras el modo nitrógeno permite la determinación de triacinas a nivel de ng g^{-1} [170].

La espectrometría de masas cumple satisfactoriamente la mayor parte de los requisitos necesarios para poderse acoplar como detector a la cromatografía de gases, al ser una técnica de elevada sensibilidad, capaz de hacer barridos rápidos y de registrar los espectros de los compuestos en fase gaseosa. Sin embargo, presenta el problema de operar a alto vacío, lo que parece, en principio, incompatible con la elución de la muestra por el gas portador.

Su uso permite la obtención de los espectros de masas característicos de cada uno de los analitos, es ampliamente usada en laboratorios medioambientales para el análisis de un amplio espectro de pesticidas en extractos complejos.

GC-MS con el modo impacto electrónico (EI) es de uso corriente para la identificación de pesticidas organofosforados y triacinas [171]. El uso de GC-MS con ionización

química negativa (NCI) resulta ser altamente selectivo, en particular para pesticidas con grupos nitro y cloro [172], por poder estabilizar la carga negativa. Este acoplamiento resulta ser altamente selectivo y sensible para la determinación de pesticidas organofosforados y clorados en muestras medioambientales. El uso de GC-MS con el modo de ionización química positiva (PCI) ha sido también empleado para los pesticidas organofosforados [172] y triacinas [173].

El uso de la técnica de GC-MS para el análisis de pesticidas con fines de confirmación en muestras medioambientales, está incrementando enormemente debido a la gran variedad de pesticidas usados en la actualidad. La selectividad y la sensibilidad pueden ser también mejoradas usando distintos modos o sistemas de ionización.

El uso de detectores selectivos en cromatografía de gases reduce en gran medida la necesidad de utilizar métodos de limpieza (clean-up) ya que el número de interferentes disminuye drásticamente.

Tradicionalmente, las técnicas de inyección usan tubos calientes como cámara de evaporación o inyección on-column. Por lo general se emplea de 1 a 5 µl de extracto de muestra como volumen de inyección.

La posibilidad de inyectar grandes volúmenes de muestra mediante la utilización de una columna de sílica fundida sin relleno ("retention gap") acoplada entre el inyector (inyección on-column) y la columna cromatográfica merece una mención especial, ya que ha permitido la determinación de varios pesticidas en aguas de superficie en concentraciones de ng.l^{-1} mediante la inyección de 200 µl del extracto obtenido en la preconcentración previa de la muestra mediante SPE [174]. Además, utilizando esta modalidad de inyección ha sido posible el acoplamiento de la SPE a la GC.

El desarrollo de interfases adecuadas para el acoplamiento LC-GC se orientó inicialmente al empleo de válvulas especiales o a la modificación de los sistemas clásicos de inyección en cromatografía de gases, de modo que permiten la introducción de volúmenes elevados de muestra. Las interfases más utilizadas se basan en el uso de un inyector automático.

La principal ventaja del acoplamiento entre la cromatografía de líquidos de alta eficacia y la cromatografía de gases (LC-GC) es la posibilidad de reemplazar la etapa de

preparación de la muestra, necesaria en numerosos métodos, por una pre-separación en diferentes fracciones o el aislamiento de componentes minoritarios presentes en mezclas complejas. Esta técnica representa, por tanto, una opción de gran utilidad para el desarrollo de nuevos métodos rápidos a la vez que ofrecen una alternativa eficaz a los procedimientos convencionales.

El acoplamiento LC-GC-ECD ha sido utilizado en el análisis de pesticidas organoclorados en muestras de suelo, la determinación fue llevada a cabo sin la necesidad de la etapa de limpieza de la muestra (clean-up). Las propiedades de pesticidas “modernos” usados en pequeñas cantidades como imidazolinones y sulfonilureas, polares, de baja volatilidad y/o termolábiles no son adecuados para su determinación por CG. Sin embargo, se pueden separar eficazmente por cromatografía líquida en fase reversa (RPLC) sin derivatización previa. Así, desde la introducción de RPLC con sus detectores UV o fluorescente (en los años 80), la técnica HPLC se ha convertido y adaptado rápidamente como una técnica viable complementaria a la GC para la determinación de varias clases de pesticidas polares.

III.1.2.- Cromatografía líquida

La cromatografía de líquidos abarca todas las técnicas cromatográficas en las que la fase móvil es un líquido.

El detector UV es el más utilizado para la determinación de pesticidas debido a su versatilidad, gran estabilidad, fácil uso y bajo coste. Sin embargo, la confirmación de pesticidas del mismo grupo es difícil dado a la gran similitud de los espectros UV. En los últimos años el detector de fotodiodos integrados (diodo-array) lo ha desplazado debido a que permite obtener el espectro UV-VIS de cada compuesto y por tanto puede confirmar la presencia de un determinado analito e incluso mejorar su sensibilidad por permitir utilizar la longitud de onda óptima para cada uno de ellos. Este tipo de detección es empleado en programas de monitorización (Rhine Basin Programme) y ha permitido la determinación e identificación de varios pesticidas en aguas de diferentes ríos de Europa[175].

El detector de fluorescencia (FLD) es más selectivo y sensible para los analitos que exhiben fluorescencia, y se ha utilizado para la determinación de pesticidas N-

carbamatos en alimentos [167]. Presentan la desventaja de una menor versatilidad que los detectores UV.

La introducción en el mercado de LC-MS abre un nuevo camino para el análisis de pesticidas polares. En la actualidad existen numerosas interfases siendo las más conocidas la interfases thermospray (TSP), haz de partículas (PB) e ionización a presión atmosférica (API) [176] la cual engloba un grupo de interfases denominadas aerosol eléctrico (ESP), aerosol iónico (ISP) e ionización química a presión atmosférica (APCI).

En los últimos dos años las aplicaciones más frecuentes de LC-MS constituyen el análisis de pesticidas en muestras medioambientales. LC-MS permite la determinación selectiva y eficaz de los pesticidas llamados “difíciles” tal como diquat y paraquat [177].

III.2.-Otros métodos

III.2.1.-Electroforesis Capilar

La determinación de pesticidas en matrices medioambientales complejas (aguas, suelos, sedimentos, etc.) requieren siempre un método de separación de alta eficacia, selectividad y alta sensibilidad. La electroforesis Capilar reúne estos requisitos y ha demostrado ser una buena técnica de microseparación de una gran variedad de pesticidas quirales y aquirales. El éxito de esta técnica reside, además de su capacidad de separación, en el corto tiempo de análisis y el pequeño volumen de muestra que se requiere.

El problema más importante radica en que (con la excepción de la detección CE-fluorescencia inducida por laser) el límite de detección de la electroforesis capilar (EC) es relativamente alto. La combinación de procedimientos de concentración en continuo y discontinuo con precolumnas selectivas de derivatización ha resuelto el problema de la detección y ha permitido a la técnica convertirse en una de las alternativas más adecuadas para la separación y determinación de pesticidas en muestras de agua y suelo. Entre las aplicaciones más importantes destacan la separación de triacinas [178] y

clorofenoxiácidos [179] en función del pH y de la naturaleza de la disolución reguladora, y de la presencia de tensioactivos empleando la cromatografía electrocinética micelar.

III.2.2.-Cromatografía de fluidos supercríticos (SFC)

La cromatografía de fluidos supercríticos se puede definir como una técnica cromatográfica en la que la temperatura y presión de la fase móvil se mantienen por encima de los valores que definen su punto crítico.

El hecho evidente de que prácticamente en cualquier campo de aplicación pueda ser necesario realizar el análisis de compuestos poco volátiles y termolábiles sugiere inmediatamente la utilidad práctica de la SFC. Además, conviene recordar otros aspectos igualmente importantes que se refieren a la posición de privilegio que ocupa la técnica en aquellas aplicaciones en las que sea conveniente eliminar fácilmente la fase móvil, como puede ser el acoplamiento directo de una técnica cromatográfica con una espectroscópica, o posibilidad de emplear un mismo medio como agente extractivo y fase móvil mediante el acoplamiento directo de una técnica de preparación de muestra y de separación (SFE-SFC).

La cromatografía de fluidos supercríticos (SFC) ha sido utilizada para el análisis de varios pesticidas. Las ventajas de esta técnica son el corto tiempo de retención de pesticidas moderadamente polares y termolábiles, y la compatibilidad con la mayoría de los detectores de GC y LC (FID, NPD, UV; MS). En la actualidad se han propuesto muchas aplicaciones de SFC que incluyen el análisis de pesticidas carbamatos [180] organofosforados [181] y fenilureas [180] usando, el dióxido de carbono como fase móvil y propanol-2- como modificador de polaridad. El acoplamiento de SFC-MS con detectores de ionización (EI) o química [180] permite la caracterización de diferentes pesticidas, lo que le convierte en una técnica potencialmente útil para el análisis medioambiental.

III.2.3.-Técnicas inmunoanalíticas

La aplicación de las técnicas inmunoanalíticas (IT) (inmunoensayos e inmunosensores) para el análisis de pesticidas en alimentos y muestras medioambientales ha aumentado significativamente en los últimos años [182,

183]. Las técnicas inmunoanalíticas se caracterizan por un alto grado de especificación de la interacción anticuerpo-antígeno y ofrecen la ventaja de requerir una menor manipulación de la muestra, y de proporcionar límites de detección y cuantificación desde las pocas ppb hasta partes por trillón (ppt) en el análisis de muestras de agua, y desde las ppm hasta las ppb en otros tipos de muestras.

Los inmunoensayos están basados en la interacción específica que se produce entre un anticuerpo y su antígeno (analito). En un típico inmunoensayo competitivo, un antígeno marcado es incubado junto con los anticuerpos del analito de interés inmovilizados en un soporte adecuado. El marcador puede ser un isótopo radioactivo (radioinmunoensayo), una enzima (enzimoinmunoensayo), un fluoróforo (fluoroinmunoensayo) o cualquier marcador medible por técnicas analíticas. Posteriormente, la muestra se añade y los antígenos (analitos) compiten con los antígenos marcados por los anticuerpos. Después de un adecuado período de incubación y de una etapa de lavado se determina la cantidad de antígeno marcado que ha quedado unida a los anticuerpos la cual será inversamente proporcional a la cantidad de analito presente en la muestra.

Los enzimoinmunoensayos de tipo ELISA se utilizan, por la sensibilidad que proporcionen para la determinación de muchos pesticidas [184].

Los inmunosensores han sido utilizados en la monitorización del medioambiente hasta los años 80s. En la actualidad se han desarrollado diferentes biosensores para la determinación de pesticidas (triacinas, organofosforados, carbamatos) capaces de inhibir la actividad de enzimas colinesterasas sobre diferentes sustratos [185]. Aunque en todos los casos estos sensores permiten alcanzar límites de detección adecuados, el mayor inconveniente radica en el largo periodo de incubación necesario así como en la disminución de la sensibilidad con el repetido uso de los mismos.

Bibliografía

Bibliografía

- [1] Dragun James: "The fate of hazardous materials in soil", Hazardous Materials Control, Hazardous Materials Control Research Institute, **1** (5), septiembre-octubre (1998).
- [2] Barron M. G.: "Bioconcentration", *Environ. Sci. Technol.*, **24**, (1990) 1612.
- [3] Beehag G. A review of enhanced biodegradation of fenamifos in truff in Australia. In "proceedings of the 2nd ATRI Truf Research Conference". (Australian Truf Research Institute: Sydney) (1995) 61.
- [4] <http://www.si.edu/smbc/fxshts/fxsht8sp.htm>.
- [5] Wayne L. Fairchild y otros, *Environmental Health Perspectives*, **107**, (1999) 349.
- [6] Needham L., Hill R., Ashley D., Pirkle J. y Sampson E., *Env Hlth Persp*, **103** (1995) 89.
- [7] Angela y otros, editores, *Cancer Rates and Risks 4th Edition* (NIH Publication No. 96-691) (Bethesda, Maryland: National Cancer Institute) (1996) 17.
- [8] <http://www-earthsystems.org/list/eco-isla/0922.html>.
- [9] Schmidt R. F. y Thews G.,: *Human Physiology*, Springer Verlag, Berlín, (1983).
- [10] Ecobichon: "Toxic Effects of Pesticides".
- [11] Areins E. J. y col.,: *Introduction to General Toxicology*, Academic Press, Nueva York, (1976) 38.
- [12] Buttler Martinovic T., y Nesheim O., Factors influencing pesticides movement to ground water. Extension Bulletin RF-WQ-107. IFAS, University of Florida, Gainesville (1993).
- [13] Wauchope R., *J. Environ. Qual.*, **7** (1978) 459.
- [14] Agertved J., Ruge K. y Barker J., *Ground Water* **30**(4) (1993) 500.
- [15] Shearer R.C., Letey J., Farmer W.J. y Klute M., *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.*, **37** (1973) 189.
- [16] Graham-Bryce I.J., *J.Sci. Food Agri.*, **20** (1969) 489.
- [17] Lavy T.L., *Weed Sci.*, **18** (1970) 53.
- [18] Van Genuchten M. Th., Davinson J.M. y Wierenga P.J., *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.*, **38** (1974) 29.

- [19] Singhal J.P. y Bansall V., *Soil Sci.*, **126** (1978) 360.
- [20] Czapar G.F., Horton R. y Fawcett R. S., *J. Environ. Qual.*, **21** (1992) 110.
- [21] Jury W.A. y Fluhler H., *Adv. Agron.*, **47** (1992) 141.
- [22] Gaynor J., Mac Tavish D. y Findlay W., *J. Environ. Qual.*, **24** (1995) 246.
- [23] Buttlé J.M., *J. Environ. Anal*, **19** (1990) 531.
- [24] Nash R.G., *J. Agric. Food Chem.*, **31** (1983) 210.
- [25] Singh H.B., y Kanakidou M., *Geophys. Res. Lett.* **20** (1993) 133.
- [26] Pereira D., Gasparetti G., Siro P. y Bonvini J., *Contam. Hydrol.*, **19** (1995) 127. - 144.
- [27] Fred P. y Debora M., *New Scientist*, **3** (1999) 23.
- [28] Donald D. y Syrgiannis J., *J. Environ. Qual.*, **24** (1995) 266.
- [29] Castillo M., Domingues R., Alpendurada M.F. y Barceló D., *Anal. Chim. Acta.*, **353** (1997) 133.
- [30] Flury M., Leuenberger J., Studer B. y Fluhler H., *Water Resour. Res.*, **30** (1995) 823.
- [31] Helling C. S. Y Krivonak A., *J. Agri. Food Chem.*, **26** (1978) 1164.
- [32] Mikami N., Imanishi K. y Yamada H., *J. Pestic. Sci* **10** (1985) 263.
- [33] Raskin I., *Curr. Opin. Biotechnol*, **8** (2) (1997) 221.
- [34] Raloff Janet, *Science News*, **136** (1989) 212.
- [35] Wann D., *Biologic: Designing With Nature To protect the Environment*, Johnson Book, Boulder, USA, (1994).
- [36] Grasso dominic : "Soil Vapor Extraction (Module)" hazardous Waste Site Remediation, Enero (1993).
- [37] Bottoni P., keizer J. y Funari E., *Chemosphere* 32 (1996) 1401.
- [38] Kumar N.P.B.A., Dushenkov V., Motto H., Raskin I., Phytoremediation: the use of plants to remove heavy metals from soils. *Environ. Sci. Technol*, **29** (1995)1232.
- [39] Jeanne A. B., Ted Whitewell, y Melissa B. R., *Weed Technology*, **13** (1999) 157.
- [40] Boyd S.A., Mortland M.M. y Pinnavai T.J., " Use of modified clays for adsorption and catalytic destruction of contaminants", en proc. 13th Annual Research Symposium, Cincinnati, OH, (1987).

- [41] Conner J. R.: Chemical Fixation and Solidification of Hazardous wastes, Van Nostrand Reinhold, New York, NY, (1990) 692.
- [42] Cullinane M.J., Jones L.W. y Malone P.G: Handbook for stabilization/Solidification of Hazardous Waste, U.S: EPA Hazardous waste Engineering Research Laboratory (HWERL), EPA/540/2-86/001, (1986).
- [43] Somerville R.B.: “Encapsulation Solidification of Hazardous Wastes”, en 1986 AICHE Symposium, Hazardous Waste Management, Overland Park, KS, 14 noviembre, (1986).
- [44] Camp Dresser y Mckee Inc.: “Mobile treatment technologies for Superfund waste” EPA 540/2-86/033,(1986).
- [45] Chi Tien, Adsorption Calculation and Modeling, “Chapter 1: Introduction”. Butterworth-Heinemann, USA. IBSN: 0-7506-9121. Pág. 1-7.
- [46] Weber Jr.W.J.,: “Evaluation of A Technology”, *Journal of Environmental Engineering*, ASCE, **110** (5) (1984) 899.
- [47] Stanley E. Manahan. *Environmental Chemistry*, Sixth Edition, “Water Treatment”. CRC Press LLC, Florida 33431.ISBN:1-56670-088-4. (1994) 223.
- [48] Round F.E., Crawford R.M. y Mann D.G., *The Diatoms. Biology & Morfology of the genera*. Cambridge University Press, New York, USA (1992).
- [49] Quarles W., Winn P., *IPM Practitioner*, **18** (1996) 1.
- [50] Subramanyan Bh., *Report of Departement of Entomology*, University of Minnesota, St. Paul: Sept., (1993) 4.
- [52] Bertke E.M., *Toxicology of Applied Pharmacology*, **6** (1964) 284.
- [53] Allen F., *Organic gadening and Farming*, **19** (1972) 50.
- [54] Cummins A.B., *Terra Diatomacea*. Report of Johns-Manville Co., Greenwood Plaza, Denver CO (1975).
- [55] La Hue D.W., y Fifield C.C., Agricultural Research Report , USA, **780** (1967) 1
- [56] Annon. *Federal Register*, 26, 10228, USA, (NOV1) (1961).
- [57] Annon. Silica and some silicates. *IARC Monograph Series* **42** (1986) 289.
- [58] Swensson A., *Studiorum Laboris Salutis* **10** (1971) 86.
- [59] Omura T., *Averugi*, **30** (1981) 181.
- [60] McDonald J.W., *British Journal Of Industrial Medicine* **46** (1989) 289.
- [61] Korounic Z., *J. Of Environm. Sci. And Healt*, part A **33**(7) (1998) 169.
- [62] Aruntas H.Y., Tokoyay M., *Cemento Beton Duyasi* **1**(4) (1996) 33.

- [63] Czarny Z. y Zurowski K., *Polish Journal Of Chemistry* **55** (1981) 2509.
- [64] Otis M.D., Martin J.B., Courtney J.W., y Garnett J.E. *Oper Healt Phys., Proc. Midyear Top. Symp. Health Phys. Soc.*, (1876) 187.
- [65] Soos I., *Muanyag Gumi* **12**(7) (1975) 215.
- [66] Malinowska H., *Przegl. Papier.*, **48**(8) (1992) 272.
- [67] Nishido H., Sakamoto T., Doi A., y Agadi Y., *Kenkyu Hokoku, Hiruzen kenkyusho*, Okayama Rika Daigaku, 8 (1983) 21.
- [68] Milisiv V., Bersillon J.L., *Filtr., Sep.*, **23**(6) (1986) 347.
- [69] Snetsinger R., *Report on Shellshock insecticide*. Report of Department of Entimology, Pennsylvaiia State university (1988).
- [70] Viska J., Kiss F., Pollak M. y Pospichal O., *Journal of Chromatography*, 51 (1970) 103.
- [71] Evans M.B., *J. of Chromatogr. B.*, **552** (1991) 169.
- [72] Volesky B., Biosorption of heavy metals “ Chapter 1.2: Removal ans Recovery of Heavy Metals by Biosorption”. CRC press, Tnc, USA. ISBN: 0-8493-4917-6. Pp. 7-43.
- [73] [http:// www. Mcgill.ca/biosorption/publication/book/book.htm](http://www.Mcgill.ca/biosorption/publication/book/book.htm).
- [74] Salwa K.P., Thomas A.D., John W.O. y Colin F.P., *Analytica Chimica Acta*, **236** (1990) 3.
- [75] House W.A., *Intern. J. Environ. Anal. Chem.*, 57 (1994) 207.
- [76] Barceló D., Chiron S., Lacorte S., Martinez E., Salau J. S., y Hennion M. C., *TrAC, Trends Anal. Chem.*, (Pers. ED.), **13** (1994) 352.
- [77] Lartiges S.B., y Garrigues P.P., *Environ. Sci. Technol.*, **29** (1995) 1246.
- [78] Liska I., Brower E.R., Ostheimer A.G.L., Lingeman H., y Brinkman U.A.Th., *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, **47** (1992) 267.
- [79] Bourne S., *J. Environ. Sci. Health.*, **B13** (1978) 75.
- [80] Munch D.J., y Frebis C.P., *Environ. Sci Technol.*, **26** (1992) 921.
- [81] Barceló D., House W.A., Maier E.A., y Griepink B., *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, **57** (1994) 237.
- [82] Font G., Mañes J., Moltó J.C., y Picó Y., *J. Chromatogr.*, **642** (1993) 135.
- [83] Green D.R., y Le Pape D., *Anal Chem.*, **59** (1987).699.

- [84] Organophosphorus pesticides in river and drinking water 1980; tentative method, Her Majesty's Stationery Office: London, (1993) 1.
- [85] Barceló D., Porte C., Cid J. y Albaigés J., *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, **38** (1990) 199.
- [86] Neicheva A., Kovacheva E. y Marudov G., *J. Chromatogr.*, **437** (1988) 249.
- [87] Barceló D., *Analyst* **116** (1991) 681.
- [88] Tekel J., Schultzova K. y Bandsteterova J., *J. High Rolut. Chromatogr.*, **16** (1993) 126.
- [89] Moors M., Massart D.L. y McDowall R.D., *Pure Appl. Chem.*, **66** (1994) 277.
- [90] Balinova A., *J. Chromatogr.*, **643** (1993) 203. Lacorte S., Molina C., y Barceló D. *Anal. Chim. Acta*, **281** (1993) 71.
- [91] Namiesnik J., Gorecki T., Bizuik M. y Torres L., *Anal. Chim. Acta* **237** (1990) 1.
- [92] Di Corcia A. y Marchetti M., *Environ. Sci. Technol.* **26** (1992) 66.
- [93] Barceló D., Hennion M. C., Trace determination of pesticides and their degradation products in water, Elsevier: Amsterdam, **19** (1997).
- [94] Barceló D., Durand G. y Bouvot V. M., *Environ. Sci. Technol.* **27** (1993) 271.
- [95] Hagen D.F., Markell C.G., Schmitt G.A. y Blevins D.D., *Anal. Chim. Acta*, **236** (1990) 157.
- [96] Field J.A., Monohan J., *J. Chromatogr. A*, **741** (1996) 85.
- [97] Beltrán J., López F.J. y Hernández F., *Anal. Chim. Acta*, **283** (1993) 297.
- [98] Viana E., Redondo M.J., Font G. Molto J.C., *J. Chromatogr.*, **733** (1996) 267.
- [99] De la colina C., y col *J. Chromatogr.*, **733** (1996) 275.
- [100] Terreni M. y col *J. Chromatogr.*, **754** (1996) 207.
- [101] Honing M., Riu J., Barcelo D., van Baar y Brinkman U.A.Th., *J. Chromatogr.*, **733** (1996) 283.
- [102] Picó Y., Louter A.J.H., Vreuls J.J., y Brinkman U.A.Th., *Analyst*, **119** (1994) 2025.
- [103] Brinkman U.A.Th. y Vreuls R.J.J., *LC-GC Int.*, **8** (1995) 694.
- [104] Ollers S., Van Lieshout M., Janssen H.G. y Cramers C.A., *LC-GC Int.*, **10** (1997) 435.
- [105] Lacorte S. y Barceló D., *Anal. Chim. Acta*. **296** (1994) 223.

- [106] Hennion M.C., y Coquart V., *J. Chromatogr.*, 642 (1993) 211.
- [107] EC Directive relating quality of water intended for human consumption (80/778/EC). *Off.J. Eur. Commun.* L229/11.
- [108] Berrueta L.A., Fernandez L.A. y Vincente F., *Anal. Chim. Acta* **243** (1991) 115.
- [109] Brouer E.R., Struys E.A., Vreuls J.J. y Brinkman U.A.Th. *Fresenius J. Anal. Chem.*, **350** (1994) 487.
- [110] Pocurull E., Sánchez G., Borrull F. y Marcé R.M., *J. Chromatogr. A*, **696** (1995) 31.
- [111] Louch D., Motlagh S., Pawliszyn J., *J. Anal. Chem.*, **64** (1992) 1187.
- [112] Young A.D. *Boundary layers*. BSP Professional Books, Oxford (1989).
- [113] Pawliszyn J., *Solid-Phase Microextraction: Theory and Practice*, Wiley-VCH, Inc., New York, (1997).
- [114] Eisert R., Pawliszyn J., "new trends in solid-phase microextraction", *Critical Review in Analytical Chemistry*, **27**(2) (1997) 103.
- [115] Langenfeld J.J., Hawthorne S.B, Miller D.J, *Anal. Chem.*, **68** (1996) 144.
- [116] Bartelt R.J, *Anal. Chem.*, **69** (1997) 364.
- [117] Barnabas I.J, Dean J.R., Fowles I.A, Owen S.P, *J. Chromatogr. A*, **705** (1995) 305.
- [118] Beltran J., Lopez F, Hernandez F, Cepria O, *J. Chromatogr. A*, **808** (1998) 257.
- [119] Lee M.R., Lee R.J, Lin Y.W., Chen C.M. y Hwang B.H., *Anal. Chem.*, **70** (1998) 1963.
- [120] Jimenez J.J., Bernal J.L, del Nozal M.J., Martin M.T y Mayorga A.L, *J. Chromatogr. A*, **829** (1998).
- [121] Valor I, Molto J.C., Apraiz D y Font G., *J Chromatogr. A*, **767** (1997) 195.
- [122] Magdic S, Boyd-Boland A, Jinno K. y Pawliszyn J., *J. Chromatogr. A*, **736** (1996) 219.
- [123] Boyd-Boland A.A., Pawliszyn J, *J. Chromatogr. A*, **704** (1995) 163.
- [124] Jackson G.P, Andrews A.R.J, *Analyst*, **123** (1998) 1085.
- [125] Lee M.R, Yeh Y.C, Hsiang W.S y Hwang B.H., *J. Chromatogr. A*, **806** (1998) 317.
- [126] Jinno K., Muramatsu T., Saito Y., Kiso Y., Magdic S. y Pawliszyn J., *J. Chromatogr. A*, **754** (1996) 137.

- [127] Miege C., Dugay J., *Analisis*, **26** (1998) M137.
- [128] Guan F., Watanabe K., Ishii A., Seno H., Kumazawa T., Hattori H. y Suzuki O., *J. Chromatogr. B*, **71** (1998) 205.
- [129] Page B.D., Lacroix G., *J. Chromatogr. A*, **757** (1997) 173.
- [130] Hernandez F., Beltran J., Lopez J.F. y Gaspar J.V., *Anal. Chem.*, **72** (2000) 2313.
- [131] Popp P., Kalbitz K. y Oppermann G., *J. Chromatogr. A*, **687** (1994) 133.
- [132] Eisert R., Levsen K. y Wünsch G., *J. Chromatogr. A*, **683** (1994) 175.
- [133] Choudhury T.K., Gerhardt K.O. y Mawhinney T.P., *Environ. Sci.*, **30** (1996) 3259.
- [134] Eisert R. y Levesen K., *Fresenius J. Anal. Chem.*, **351** (1995) 555.
- [135] Boyd-Boland A.A., Magdic S. y Pawliszyn J., *Analyst*, **121** (1996) 929.
- [136] Eisert R. y Pawliszyn J., *Anal. Chem.*, **69** (1997) 3140.
- [137] Ng W.F., Teo M.J.K. y Lakso H.A., *Fresenius J. Ana. Chem.*, **363** (1999) 673.
- [138] Crook S.J., presented at the 8th Symposium on Handling of Environmental and Biological Samples in Chromatography, Almeria, (1997).
- [139] Moder M., Popp P., Eisert R. y Pawliszyn J., *Fresenius J. Anal. Chem.*, **363** (1999) 680.
- [140] Majores R.E., *LC-GC*, **9** (1991) 1.
- [141] Kingston H.M., y Jassie L.B. Eds., "Introduction to Microwave Sample Preparation", ACS Professional Reference Book, , Washington, D.C. (1988).
- [142] Von Hippel A. R. "Dielectric Materials and Applications" John Wiley: New York, 1945, p.301.
- [143] Hasty E. y Revesz R., *American Laboratory*, February **66** (1995).
- [144] Heitkamp N.D., Merker. S.L., y Stungis G.E. U.S.Patent 3,870,053, issued March 11, (1975).
- [145] Abu-Samra A., Morris J.S. y Koirtiyohann S.R., *Anal. Chem.*, **47** (1975) 1475.
- [146] Ganzler K., Salgo A., y Valko K., *J. Chromatogr.*, **371** (1986) 299.
- [147] Kuss H. H. *Fresenius J. Anal. Chem.*, **343** (1992) 788.
- [148] Paré J.R.J., Sigouin M., y Lapointe J. U.S. Patent 5, 002, 784. (1991).

- [149] Lopez- Avila V., Young Kim R., y Beckert W.F., *J. Chromatogr. Sci.*, **33** (1995) 481.
- [150] Paré J.R.J., Belangér J., y Stafford, S.S., *Trends Anal. Chem.*, **13**(4) (1994 A) 176.
- [151] Steinheimer T.R., *J. Agric. Food Chem.*, **41** (1993) 588.
- [152] Xiong G., Tang B., He X., Zhao M. y Zhang Z., *Talanta* **48** (1999) 333.
- [153] Molins C., Hogendoom E.A., Heusinkveld H.A.G., Van Harten D.C, van Zoonen P. y Baumann R.A. *Chromatografia* **43** (1996) 527.
- [154] Chee K.K., Wong M.K., y Lee H.K., *Anal. Chim. Acta* **330** (1996) 217.
- [155] Pastor A., Vazquez E., Ciscar R., y De la Guardia M., *Anal. Chim. Acta*, **344** (1997) 241.
- [156] Lopez- Avila V., Young R., Benidicto J., Kim R., y Beckert W. F., *Anal. Chem.*, **67** (1995, A) 2096.
- [157] Lopez- Avila V., Young, R., y Beckert, W. F., *Anal. Chem.*, **66** (1994, B) 1097.
- [158] Xiong G., Liang J., Zou S., Zhang Z., *Anal. Chim. Acta*, **371** (1998) 97.
- [159] Lopez-Ávila V., Bendicto J., Dodhiwata N.S., Young R. Y Beckert W.F., *J. Chromatogr.Sci.*, **30** (1992) 335.
- [160] Dean J.R., *J. Chromatogr.*, **754** (1996) 221.
- [161] Van der Velde E.G., Dietvorst M. y Kootstra P.R., *J.Chromatogr.*, **683** (1994) 167.
- [162] Demíng S.N. y Morgan S.L. "Eperimental Design: a chemiometric approach", Cap. 12, 234-239. Ed. Elseiver, Amsterdam (1993 A).
- [163] Bose R.C. y Carter R.L., *Biometric*, **18** (1954) 160.
- [164] Demíng S.N. y Morgan S.L. "Eperimental Design: a chemiometric approach", Cap. 14, 342-347. Ed. Elseiver, Amsterdam, (1993 B).
- [165] Statgraphícs Plus. Ref. Manual. Manugistics R47-R49.
- [166] Demíng S.N. y Morgan S.L. "Eperimental Design: a chemiometric approach", Cap. 12, 246-253. Ed. Elseiver, Amsterdam (1993 C).
- [167] Van Zoonen P. (Ed.), Analytical methods for Pesticides Residues in Foodstuffs, 6th edition, The inspectorate for health Protection, maasstricht, The Netherlands, (1996).
- [168] Kolb B., Bischoff J., *J. Chromatogr. Sci.*, **12** (1974) 625.

- [169] Kjolhot F.A., *Chemosphere*, **14** (1985) 1763.
- [170] Onuska F.I., HRC CC, *J. High Resolut. Chromatogr. Commun.*, **7** (1984) 660.
- [171] Bagnati, R., Benfenati E., *Chemosphere* **17** (1988) 59.
- [172] Stan H.J., Kellner G., *Biomed. Environ. Mass Spectrom.*, **18** (1989) 645.
- [173] Rostad C.E., Pereira W.E., y Leiker T.J., *Biomed. Environ. Mass Spectrom.*, **18** (1989) 820.
- [174] Van der Hoff G.R., Gort S.M., Baumann R.A. y Zoontjes P.W., *Trends Anal.Chem.*, **21** (1985) 63.
- [175] Brinkman U.A.Th., Lingeman H., y Slobodnik J., *LC-GC Int.*, **7** (1994b) 157.
- [176] Slobodnik J., Van Baar B.L.M. y Brinkman U.A.Th., *J. Chromatogr. A*, **703** (1995) 81.
- [177] Marr J.C. y King J.B., *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **11** (1997) 479.
- [178] Turiel E., Fernandez P., Perez-Conde C. Y Cámara C., *J. Chromatogr. A*, **872** (2000)229.
- [179] Wu Q., Claessens H.A. y Cramers C.A., *Chromatografia*, **34** (1992) 25.
- [180] Kalinoski H.T., Udseth H.R. y Wright B.W., *J. Chromatogr.*, **400** (1987) 307.
- [181] Kalinoski H.T.y Smith R.D., *Anal. Chem.*, **60** (1988) 529.
- [182] Kramer PM, *JAOAC Int* **79** (1996)1245.
- [183] Aga D.S., *Analisis* **25** (1997) M25.
- [184] Ulrich P., Neissner R., *Fresenius Envir. Bull* **1** (1992) 22.
- [185] Skladal P., Pavlik M. y Fiala M., *Anal. Lett.*, **27** (1994) 29.

Parte Experimental

Análisis Alimentario y Ambiental

Capítulo I

Capítulo I

DEGRADACIÓN DE ATRACINA Y OTROS PESTICIDAS ORGANOFOSFORADOS EN NARANJAS

El contenido de este Capítulo ha sido publicado en la revista *Annali di Chimica*, 91, 2001.

Las naranjas constituyen una fruta de amplio consumo en nuestro país. Su consumo no solo se limita a la fruta si no también a su cáscara ya que ésta se utiliza en la fabricación de mermeladas, zumos, postres etc.

Este hecho nos ha conducido a realizar un estudio sobre el poder de penetración de los pesticidas al fruto a través de la cascara y a evaluar la posible degradación natural de atracina y de cuatro pesticidas organofosforados en naranjas con objeto de comprobar la permanencia o no de dichos pesticidas en la fruta, ya puede constituir un riesgo para la salud humana. Los pesticidas seleccionados fueron: Atracina, Metil-Paration, Cloropirifos, Fenamifos y Metidation.

Para llevar a cabo el presente estudio se sumergieron varias naranjas en disolución acuosa de 10mgL^{-1} de cada uno de los pesticida ensayados durante un día, para permitir su adsorción y/o absorción en las naranjas. Pasado este tiempo se lavan las naranjas con agua Milli-Q y se mantienen expuestas a las condiciones atmosféricas normales durante un periodo de dos semanas, y con el fin de evaluar la posible degradación de los pesticidas en disolución se preparó un blanco, el cual consistió en una disolución acuosa conteniendo todos los pesticidas a una concentración de 1mgL^{-1} y se mantuvo en recipiente cerrado herméticamente bajo las mismas condiciones atmosféricas (luz y temperatura) en las que se encontraron las muestras durante el tiempo que duró el experimento.

Se llevó a cabo un análisis periódico de los pesticidas y sus productos de degradación en ambas muestras (cáscara de naranja y disolución acuosa) por cromatografía de gases con detector NPD y por espectroscopia de masas durante todo el tiempo objeto de estudio (0-2 semanas). La degradación de pesticidas en las muestras se describe a través de las curvas de degradación de primer orden, los tiempos de vida medios para los pesticidas organofosforados en disolución acuosa varían de 14.5 a 30 días y en naranjas de 2.3 a 14.2 días, mientras que los de atracina fueron de 2.3 y 14.2 días en disolución y en las muestras respectivamente.

Se confirmó por GC-MS la presencia de algunos productos de degradación de los pesticidas organofosforados en muestras de agua después de almacenamiento bajo las condiciones mencionadas.

Paralelamente, se evaluó la posibilidad de migración de estos pesticidas desde la cáscara a la pulpa. Los resultados obtenidos pusieron de manifiesto que la cantidad de pesticidas encontrada en la cáscara oscila del 10% al 40% (en función del tipo de pesticida) de la cantidad añadida inicialmente.

El hecho de que una fracción importante de los pesticidas añadidos permanezcan en el conjunto de la cáscara de la naranja pone de manifiesto la necesidad de su control antes de su consumo.

DEGRADATION OF ATRAZINE AND SEVERAL ORGANOPHOSPHORUS PESTICIDES IN ORANGES¹

Abderrahim BOUAID, Antonio MARTÍN-ESTEBAN[†], Pilar FERNÁNDEZ and Carmen CÁMARA(°)

Departamento de Química Analítica. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Complutense de Madrid. 28040 Madrid (Spain).

[†] Present adress: Departamento de Química. Facultad de Ciencias. Universidad Europea de Madrid. Villaviciosa de Odón. E-28670 Madrid (Spain).

Summary - The degradation of atrazine and four organophosphorus pesticides (chlorpyrifos, fenamiphos, methidathion and methyl-parathion) in oranges was studied. Oranges were immersed in a Milli-Q water solution spiked with 10 mg litre⁻¹ of each pesticide for one day, allowing their adsorption on the orange peel. Then, the oranges were rinsed with Milli-Q water and left outdoors to expose them to natural ambient conditions for two weeks. In parallel, an aqueous solution containing 1 mg litre⁻¹ of each pesticide was placed in a Pyrex flask, which was tightly closed, and exposed to the same ambient conditions. Both samples (orange peel and Milli-Q water) were analyzed periodically by gas chromatography coupled to a nitrogen-phosphorus detector. The pesticide degradation in both samples could be described using a first-order degradation curve. Half-lives varied from 14.5 to more than 30 days in aqueous solution and from 2.3 to 4.1 days in oranges for organophosphorus pesticides, while those for atrazine were 3.1 days and 14.2 days, respectively. The presence of some organophosphorus degradation products in water samples after storage under the above conditions was confirmed by gas chromatography-mass spectrometry.

Riassunto - È stata studiata la degradazione dell'atrazina e quattro pesticidi organofosforati (chlorpyrifos, fenamiphos, methidathion and methyl-parathion) nelle arance. Le arance sono state immerse, per un giorno, in una soluzione acquosa (Milli-Q) addizionata di 10 mg L di ciascun pesticida al fine di ottenerne l'assorbimento sulla buccia. Le arance sono state successivamente lavate con acqua Milli-Q e collacate all'esterno per esporle alle condizioni ambientali per due settimane. In parallelo si è collocata, una soluzione acquosa contenente 1 mg L, in un matraccio di pirex chiuso ed esposto alle stesse condizioni ambientali. Entrambi i campioni (buccia d'arancia ed acqua Milli-Q) sono stati analizzati periodicamente mediante gascromatografia

¹ Presented at the 2nd European Pesticide Residue Workshop, 24-27 May 1998, Almería (Spain)

(°), corresponding author.. Tel: 34-91-3944318. Fax: 34-91-3944329. E-mail: ccamara@eucmax.sim.ucm.es

accoppiata ad un rivelatore azoto-fosforo. La degradazione dei pesticidi, in entrambi i campioni, può essere descritta da una curva di degradazione di primo ordine. Il tempo di dimezzamento dei pesticidi varia da 14.5 a più di 30 giorni nella soluzione acquosa e da 2.3 a 4.1 giorni nelle arance.

Nei campioni acquosi, dopo conservazione nelle condizioni descritte, è stata confermata, mediante gascromatografia-spettrometria di massa, la presenza di alcuni prodotti di degradazione organofosforici.

INTRODUCTION

Nowadays, pesticides are widely used throughout the world to protect crops against pests and increase yields. Citrus fruits, one of the most important crops in the Mediterranean region, are treated with high amounts of different pesticides, such as atrazine and organophosphorus insecticides. After application, the pesticides presumably remain in the fruit and may constitute a risk for human health, which makes it advisable to monitor pesticide residues before consumption.¹

However, under environmental conditions, pesticides may suffer degradation by hydrolysis, photolysis and microbiological reactions, as well as losses by volatilization, falling to a concentration below the Maximum Residue Levels (MRLs) permitted by current regulations which range, depending on the pesticide, from 0.02 to 3.0 mg Kg⁻¹,² although the degradation products may be more toxic than the parent compounds.

Accordingly, the aims of this work were to study the degradation kinetics of certain pesticides in oranges, establish their degradation pathways and detect the presence of transformation products.

The pesticides selected were atrazine, chlorpyrifos, fenamiphos, methyl-parathion and methidathion. The techniques employed to carry out this study were gas chromatography coupled to a nitrogen-phosphorus detector (GC-NPD), which was used to monitor degradation kinetics, and GC coupled to mass spectrometry (MS), used to confirm the presence of transformation products after extraction of the pesticides from oranges and a clean-up step using silica gel adapted from that described by Garcia-Repetto et al.³

EXPERIMENTAL

Reagents

Atrazine, chlorpyrifos, fenamiphos, methyl-parathion and methidathion were obtained from Riedel-de Hën (Germany). Stock standard solutions (1000 mg litre⁻¹) were prepared in acetonitrile (Scharlau, Barcelona, Spain) and stored at -20 °C in the dark.

Ethyl acetate (Scharlau), n-hexane (Scharlau) and silica gel (Merck, Darmstadt, Germany) were of analytical reagent grade. High purity water was obtained from a Milli-Q water system (Millipore, Milford, MA)

Experimental setup

Four oranges were immersed in a Milli-Q water solution spiked with 10 mg litre⁻¹ of each pesticide for one day, allowing their adsorption on the orange peel. Then, the oranges were rinsed with Milli-Q water and left outdoors to expose them to natural ambient conditions for two weeks. In parallel,

Degradation of Atrazine and Several Organophosphorus Pesticides in Oranges

a Milli-Q water sample spiked at 1 mg litre^{-1} of each pesticide was placed in a Pyrex flask which was tightly closed and exposed to the same ambient conditions. Both samples (orange peel and Milli-Q water) were analyzed periodically by gas chromatography coupled to a nitrogen-phosphorus detector. At the end of the experiment (after two weeks), the orange pulp was also analyzed to determine whether the pesticides were able to cross the peel in this period. During the experiment, the weather was slightly cloudy and the daily temperature ranged from 7 to $18 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

Sample preparation and clean-up

Orange samples (peel and pulp)

The orange peel or pulp sample (25 g), chopped into small pieces, was blended with acetonitrile (25 ml) for 3 min. Then NaCl (5 g) was added to the mixture which was blended again with acetonitrile (3 x 25 ml) for 3 min each time. The acetonitrile extract was concentrated ten-fold on a rotary evaporator and 200 μl were taken for further clean-up on a manually packed silica gel (0.5 g) glass-column (J.T. Baker, Deventer, Holland) previously conditioned with n-hexane (2.5 ml) and ethyl acetate (2.5 ml). The pesticides were eluted from the column with 15 ml of n-hexane + ethyl acetate (1+1 by volume). The eluate was evaporated to 1 ml on a rotary evaporator and 0.5 μl were analyzed by GC.

To determine extraction efficiency, orange peel samples (1 g) were fortified with 1 ml of pesticide standard solution in ethyl acetate to obtain a final concentration of $1 \mu\text{g g}^{-1}$. Fortified samples were allowed to stand at room temperature for 12 h after pesticide addition.

Milli-Q water samples

Milli-Q water samples (100 ml), spiked with pesticides, were loaded on a Bond Elut C_{18} (200 mg) solid-phase extraction cartridge (Varian, Harbor City, CA) previously conditioned with methanol (2 x 5 ml) and water (2 x 5 ml). The retained analytes were eluted with ethyl acetate (5ml) and an aliquot (0.5 μl) was analyzed by GC.

Chromatographic analysis

GC-NPD

The pesticides were analyzed by GC-NPD (HP-5890-II, Hewlett Packard, Palo Alto, CA) using a 30 m x 0.32 mm i.d. fused silica capillary column SPB-50 (Supelco, Bellefonte, PA) with helium as carrier gas (1.8 ml min^{-1}) and nitrogen as make-up gas (30.7 ml min^{-1}).

A 0.5 μl aliquot of extract was injected on-column with a $3 \text{ }^{\circ}\text{C}$ oven track. The detector temperature was $280 \text{ }^{\circ}\text{C}$. The temperature program was as follows: the initial oven temperature of $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$ was increased at $50 \text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ to $180 \text{ }^{\circ}\text{C}$ for 1 min, and then at $15 \text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ to $225 \text{ }^{\circ}\text{C}$ for 3 min followed by a ramp of $2 \text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ to $257 \text{ }^{\circ}\text{C}$ and held for 1.6 min to complete the program.

Quantification was performed by linear calibration with external standards using peak area measurements.

GC-MS

A Hewlett Packard Model HP-5890-II gas chromatograph coupled to a mass spectrometer with quadrupole filter HP-5989A was used for GC-MS analysis in the electron impact (EI) mode using a 25 m x 0.25 mm i.d. fused silica capillary column with a 5% phenyl-methyl silicon stationary phase (MFE-73, Análisis vínicos, Ciudad Real, Spain) introduced directly into the ion source of the mass spectrometer. Helium was used as carrier gas at 1 ml min^{-1} . The temperature program was 2 min at 60

°C, increased by 10 °C min⁻¹ to 200 °C, after 4 min increased by 20 °C min⁻¹ to 300 °C and held for 30 min. Samples were injected in splitless mode with the valve closed for 30 s at 290 °C.

The ion source and the analyser were maintained at 200 and 130 °C, respectively. EI mass spectra were obtained at 70 eV within the mass range 35-500 at 1.14 scans s⁻¹.

RESULTS AND DISCUSSION

Quantification

The method employed for the preparation of orange samples was adapted from the one described previously.³ Different solvents for the extraction of pesticides from samples and for clean-up of the orange extracts were tested. Under the optimum conditions indicated in the Experimental Methods section, quantitative recoveries were obtained for all tested pesticides, as shown in Table 1 together with the recoveries obtained in Milli-Q water.

In these conditions, linear calibration graphs were obtained for all analytes within the range 0.2-10 µg g⁻¹ with regression coefficients better than 0.997. The detection limits were within the range 0.01-0.05 µg g⁻¹, depending on the analyte, which was somewhat below the MRLs allowed.²

TABLE 1 .Mean recoveries (%) ± standard deviation (n = 3) obtained for selected pesticides in orange and Milli-Q water samples by the proposed method.

	Orange ^a	Milli-Q water ^b
Atrazine	97 ± 20	95 ± 7
Methyl-parathion	82 ± 18	72 ± 8
Fenamiphos	79 ± 8	82 ± 10
Chlorpyrifos	97 ± 6	101 ± 8
Methidathion	99 ± 18	105 ± 7

^a Pesticide concentration level: 1 µg g⁻¹

^b Pesticide concentration level: 1 mg litre⁻¹

Degradation kinetics

The use of GC-NPD enabled the calculation of the amount of pesticide remaining in both samples after storage under environmental conditions. Figure 1 shows the GC-NPD chromatograms of an orange peel extract obtained at the beginning of the experiment (t=0) (Figure 1A) and after 14 days (Figure 1B), clearly demonstrating that losses of pesticides occur.

Degradation of Atrazine and Several Organophosphorus Pesticides in Oranges

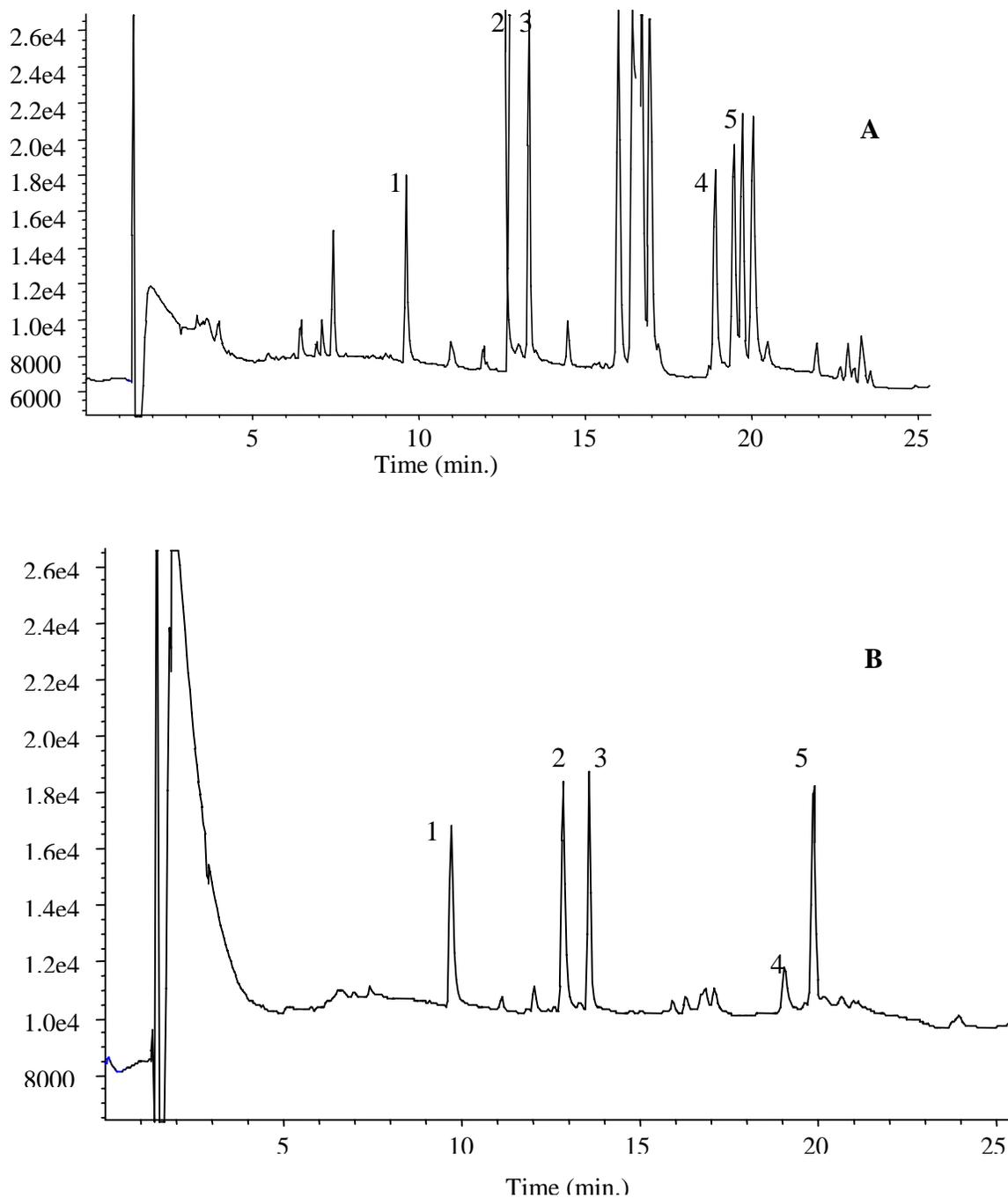


FIGURE 1.- GC-NPD chromatograms of orange peel samples at $t = 0$ (A) and after storage for 14 days (B) under environmental conditions. Peak numbers: (1) Atrazine; (2) Methyl-parathion; (3) Chlorpyrifos; (4) Fenamiphos; (5) Methidathion. Chromatographic conditions: See Experimental Methods section.

Losses ranged from 49% for atrazine to 90% for fenamiphos in orange peel samples, and from 0% for fenamiphos to 89% for atrazine in Milli-Q water samples (after 10 days). Figure 2 shows the time variation of the levels of pesticide in orange peel (Figure 2A) and in Milli-Q water (Figure 2B).

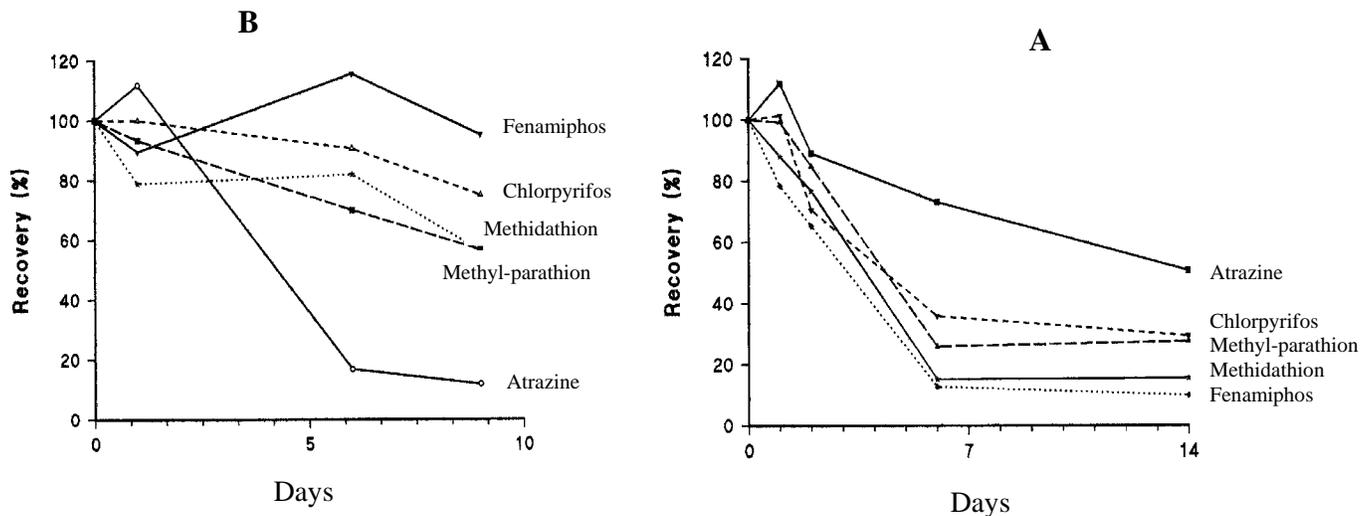


FIGURE 2. Remaining amount (%) of pesticide in oranges (A) and Milli-Q water (B) samples exposed to environmental conditions.

The degradation process can be described by a first-order degradation curve according to the equation

$$C_t = C_o \cdot e^{-kt}$$

as previously reported by several authors in different kinds of samples,⁴⁻⁶ where C_t represents the concentration at time t , C_o represents the initial concentration, and k is the rate constant. As the concentration fell to 50% of its initial value, half-life ($t_{1/2}$) could be determined from the above equation. Table 2 shows that the half-lives obtained for the pesticides tested in orange peel and Milli-Q water samples differ considerably. These dissimilar results indicate that the degradation of pesticides follows a different pathway depending on the sample, as discussed below.

Degradation of Atrazine and Several Organophosphorus Pesticides in Oranges

TABLE 2 Half-lives ($t_{1/2}$) in days and initial concentration (C_0) in $\mu\text{g g}^{-1}$ of selected pesticides in orange and Milli-Q water exposed to environmental conditions.

	Orange		Milli-Q water	
	C_0	$t_{1/2}$	C_0	$t_{1/2}$
Atrazine	1.3	14.2	1	3.1
Methyl-parathion	5.9	3.5	1	14.5
Fenamiphos	2.3	2.3	1	--- ^a
Chlorpyriphos	1.9	4.1	1	30.5
Methidathion	3.5	2.7	1	14.7

^a No losses observed

In order to evaluate the need to monitor pesticide residues in this kind of sample, the amount of pesticides remaining in orange peel and pulp after 14 days was determined. Table 3 shows the results obtained, which demonstrate that the selected pesticides are not able to cross the orange peel and reach the pulp to a great extent. However, the fact that the remaining residue levels in orange peel does not go to zero but levels off at a percentage between 10 and 40 % of the applied amount, depending on the pesticide, is of public concern making the systematic monitorization of these analytes in orange samples. Necessary

TABLE 3. Concentration ($\mu\text{g g}^{-1}$) of pesticide residues in orange peel and pulp samples after storage under environmental conditions for 14 days.

	Peel	Pulp
Atrazine	1.02	0.04
Methyl-parathion	2.52	0.15
Fenamiphos	0.28	n.d.
Chlorpyriphos	1.02	0.07
Methidathion	0.83	n.d.

n.d.: Not detected.

Degradation pathways

Pesticides in the environment can be degraded by hydrolysis, photolysis, microbial degradation and volatilization. Table 2 shows the different $t_{1/2}$ for several pesticides in water and in orange exposed to environmental conditions. For all pesticides tested, except atrazine, $t_{1/2}$ in water is much higher than in orange. As the chance of pesticide hydrolysis in water is expected to be higher than in orange and taking into account that the aqueous pesticides were kept in a tightly closed flask the main loss pathway in orange could be attributed to a volatilization process. The particular behavior of atrazine in water can be justified by hydrolysis degradation. An interlaboratory exercise for polar pesticides determination in freeze-dried water demonstrated that some pesticides are not stable in a water solution at +20 °C after one month.⁷

A parameter to be taken into consideration in experiments involving air-solid interfaces is Henry's Law constant (HLC), which is used to determine the evaporation rates of chemicals from water and solids.⁸ The vapor pressure/water solubility ratio gives an excellent estimate of HLC and it can be used to evaluate the evaporation rate more accurately than with vapor pressure alone. Table 4 shows the vapor pressure, water solubility and calculated HLC of the pesticides studied and it can be seen that, consistently, atrazine, the pesticide with the lowest HLC value, also experienced the lowest losses in oranges. However, the organophosphorus pesticide losses in oranges cannot be explained by volatilization alone but must also be caused by photolysis and/or microbiological degradation and further research should be done.

TABLE 4. Characteristics of the pesticides studied.

	Vapor pressure (mmHg) ^a	Water solubility (mg litre ⁻¹) ^a	Henry's Law constant calculated
Atrazine	$3.0 \cdot 10^{-2}$	30	0.00029
Methyl-parathion	$0.92 \cdot 10^{-5}$	50	68.4
Fenamiphos	10^{-6}	700	0.06
Chlorpyrifos	$1.82 \cdot 10^{-5}$	1	827.6
Methidathion	$1 \cdot 10^{-6}$	240	0.16

^a Data obtained from Ref. 8

Transformation products

It is clear that, although pesticide degradation is rapid, the resulting transformation products may be more toxic than the parent compounds. For example, it has been shown that the transformation of organophosphorus pesticides in the environment takes place by conversion of the phosphorothioate

Degradation of Atrazine and Several Organophosphorus Pesticides in Oranges

(P=S) group to their oxon (P=O) analogues, which are a stronger inhibitor of acetylcholinesterase enzyme, or the formation of different phenolic compounds which are toxic and persistent.⁵

GC-MS analysis of sample extracts was carried out to detect the presence of transformation products. Only in Milli-Q water samples was it possible to detect typical organophosphorus pesticide degradation products, such as phosphonic acid dimethylester, phosphorothioic acid trimethyl ester and some phenols. Figure 3 shows the total ion current chromatogram obtained by GC-MS of a Milli-Q water sample under natural environmental conditions for 10 days, which enabled us to confirm the presence of 3-methyl-4-(methylthio)-phenol, one of the transformation products of fenamiphos, by comparing its mass spectrum (see Figure) with the one obtained from the computer library.

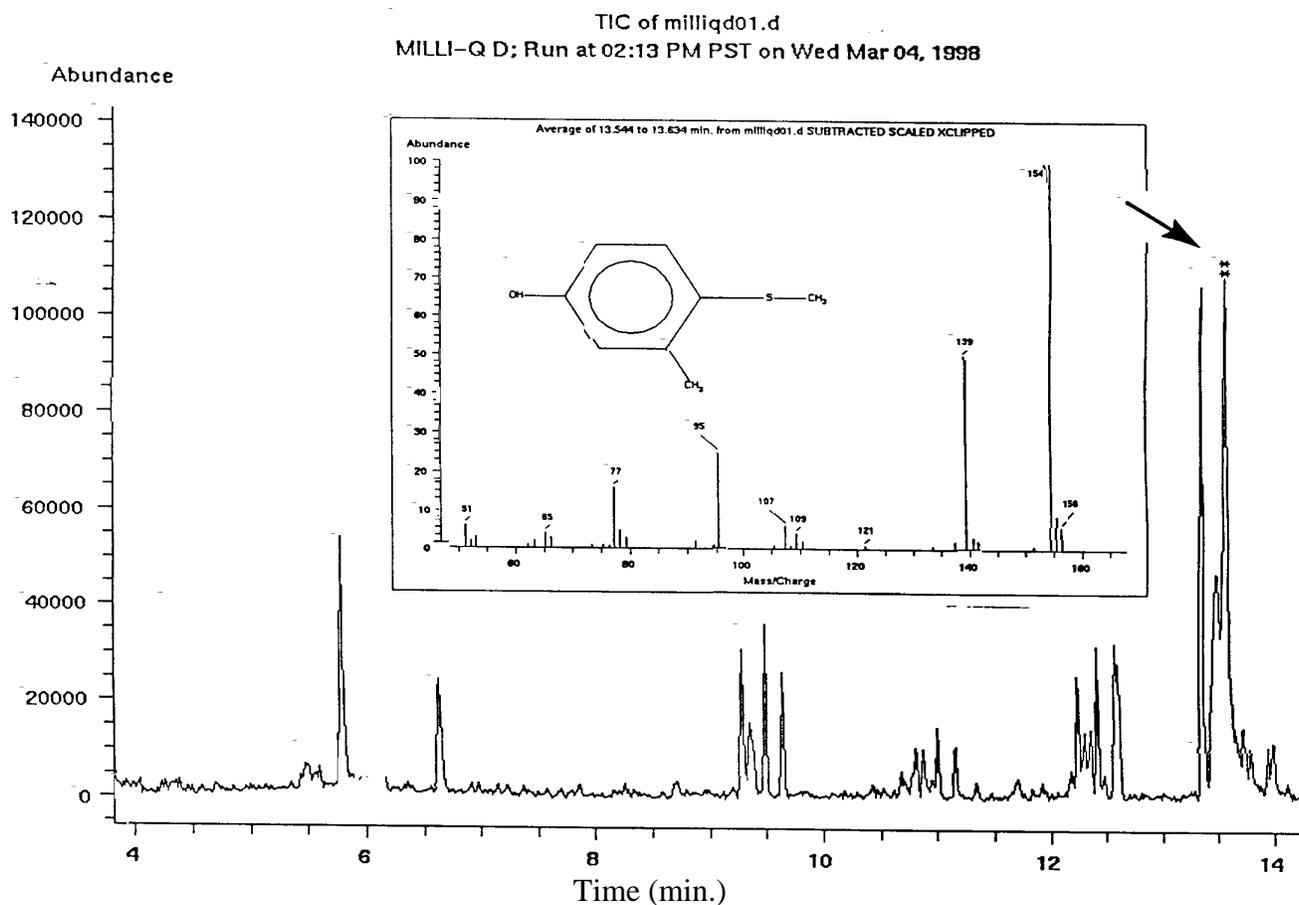


FIGURE 3. GC-MS chromatogram extract of a Milli-Q water sample exposed to environmental conditions for 10 days and mass spectrum of 3-methyl-4-(methylthio)-phenol. Chromatographic and mass spectrum analysis: See Experimental Methods section.

However, in orange samples, it was not possible to detect any degradation products, maybe because volatilization was the main loss pathway of the pesticides studied although as stated previously other degradation mechanisms may be also involved

CONCLUSIONS

The losses of the pesticides studied in orange samples under environmental conditions may be attributed to volatilization although other pathways such as hydrolysis and photolysis may be also involved. Although this result is not fully extrapolable, it gives an approximation of what takes place in the field. Moreover, the rapid degradation in a short time period (14 days) leaves a residue content close to the MRLs, which is a matter for consumer concern.

The fact that the residue of pesticide in peel oranges remain (depending of the pesticide) between 10-40 % of the original amount added, gives a clear evidence the need to control these pesticides when the whole orange is used for human consumption.

Received December 28th, 1999

Acknowledgments- This work received financial support from CICYT under contract PB 98- 0768. The authors wish to thank the Mass Spectrometer Service of the Universidad Complutense de Madrid for GC-MS analysis and Max Gormann for revision of the manuscript.

REFERENCES

- 1) C.M. TORRES, Y. PICÓ, R. MARIN and J. MAÑÉS: *J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int.*, **80**, 1122 (1997).
- 2) E.C. Council Directive listing the maximum content on pesticide residues of some fruits and vegetables, 93/58/EEC, 1993.
- 3) R. GARCÍA-REPETTO, I. GARRIDO and M. REPETTO: *J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int.*, **79**, 1423 (1996).
- 4) T.C. WANG and M.E. HOFFMAN: *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **74**, 883 (1991).
- 5) M. CASTILLO, R. DOMINGUES, M.F. ALPENDURADA and D. BARCELÓ: *Anal. Chim. Acta*, **353**, 133 (1997).
- 6) P. CABRAS, A. ANGIONI, V.L. GARAU, M. MELIS, F.M. PIRISI, M. KARIM, and E.V. MINELLI: *J. Agric. Food Chem.*, **45**, 2244 (1997).
- 7) A. MARTIN-ESTEBAN, P. FERNÁNDEZ, C. CÁMARA, G.N. KRAMER and E.A. MAIER: *Inter. J. Environ. Anal. Chem.*, **67**, 125 (1996).
- 8) I. FERRER and D. BARCELÓ: *J. Chromatogr. A*, **737**, 93 (1996).

Capítulo II

Capítulo II

ÓPTIMIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN DE ATRACINA Y OTROS PESTICIDAS ORGANOFOSFORADOS USANDO UN HORNO DE MICROONDAS

El contenido de este Capítulo ha sido publicado en la revista *Fresenius J Anal Chem.* (2000) 367: 291-294, y presentado como cartel en la XI REUNIÓN CIENTÍFICA DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE QUÍMICA ANALÍTICA, Valencia, 1999.

Por lo general los métodos convencionales de extracción de pesticidas de muestras complejas, requieren para obtener una buena eficiencia del proceso un tiempo largo y el volumen de disolventes orgánicos es por lo general bastante elevado.

El uso de hornos de microondas para la extracción de pesticidas o contaminantes orgánicos en general de matrices medioambientales y de alimentos reduce el tiempo, el volumen del disolvente de extracción, y la contaminación de las muestras

En el presente estudio se ha desarrollado un método analítico simple y rápido para la extracción y análisis de cinco pesticidas (atracina, metil-paration, cloropirifos, fenamifos y metidation) en naranjas usando un horno de microondas. El análisis se llevó a cabo mediante cromatografía de gases con detector selectivo nitrógeno-fósforo (NPD).

Se han optimizado los diferentes parámetros que afectan a la eficiencia del proceso de extracción de estos pesticidas: tiempo de extracción (8-14 min), temperatura de extracción (80-100°C), volumen (5-30ml) y naturaleza (de distinta polaridad) de los disolventes extractantes y la cantidad de la muestra (1-3g). La optimización de estos parámetros se ha llevado a cabo mediante la utilización de programas de diseños experimentales.

Los resultados obtenidos nos han permitido desarrollar un método de tratamiento de muestra de naranja que requiere sólo unos minutos de extracción proporcionando recuperaciones entre 93 y 101 % para todos los pesticidas ensayados.

La técnica de MAE mostró ser muy adecuada para la extracción de pesticidas en muestras complejas como las naranjas y ofrece la ventaja de minimizar el tiempo requerido (9 minutos) y de disolvente (10 ml de acetona-hexano(1:1)) durante el proceso de extracción respecto a los métodos convencionales.

La aplicación de diseños experimentales estadísticos y, concretamente, de diseños factoriales, constituye una herramienta de trabajo valiosísima a la hora de conseguir una optimización adecuada del proceso con un consumo de tiempo mínimo.

Capítulo III

Capítulo III

DETERMINACIÓN DE ATRACINA Y PESTICIDAS ORGANOFOSFORADOS EN SUELOS MEDIANTE MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA

El contenido de este Capítulo está en fase de revisión para su publicación en la revista

Journal of Chromatography A.

En este trabajo se ha desarrollado un procedimiento de microextracción en fase sólida (SPME) para la determinación de atracina y cuatro pesticidas organofosforados en muestras de suelo por cromatografía de gases. Para ello, se han optimizado las variables que más significativamente afectan al proceso: tiempo de extracción, concentración de NaCl, temperatura y tiempo de desorción. Esta optimización se ha llevado a cabo utilizando una disolución de los pesticidas objeto de estudio a una concentración de 3 ngml⁻¹ en agua Milli-Q.

Las muestras de agua así enriquecidas se homogeneizaron por agitación magnética durante 15 min antes de cualquier tratamiento. La optimización de los parámetros fue llevada a cabo usando un diseño factorial.

Se ha puesto a punto un procedimiento de extracción, que consiste en la inmersión directa de la fibra (polidimetilsiloxano 100 µm) previamente condicionada. La extracción se llevó a cabo agitando (con la ayuda de un agitador magnético) 3 ml de muestra (en presencia de un 10% de NaCl) contenida en un vial ámbar de 4ml, durante 30 min y a temperatura ambiente. La fibra se colocó en el centro del vial de manera que la muestra fluyera perpendicularmente al eje de la fibra, la desorción de los pesticidas se llevó a cabo a 260°C durante 5min en un inyector splitless, y la determinación final se llevó a cabo mediante CG-ECD.

Una vez optimizados todos aquellos parámetros que afectan a la eficiencia del proceso, las recuperaciones obtenidas en agua enriquecida a un nivel de 0.1ng/ml oscilaron desde un 54% hasta 100% (excepto para el metil-paration que fue del 22%) con una desviación estándar superior al 6%.

El procedimiento desarrollado para la determinación de pesticidas en muestras de suelo es simple (la SPME se hace directamente en el extracto obtenido por ultrasonidos sin previa limpieza). Las recuperaciones obtenidas de los pesticidas estudiados fueron del 72-92%, excepto para atracina, y las RSD fueron inferiores de 14%.

Los resultados obtenidos considerados satisfactorios para este tipo de análisis, nos muestran que la técnica de SPME constituye un proceso simple, rápido y adecuado para la extracción de los diferentes tipos de pesticidas ensayados en muestras de agua y suelo.

Solid phase microextraction method for the determination of atrazine and four organophosphorus pesticides in soil samples by gas chromatography

A. Bouaid¹, L. Ramos² M. J. Gonzalez², P. Fernández¹ and C. Cámara¹ ())

¹Departamento de Química Analítica. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Complutense de Madrid. 28040 Madrid (Spain).

²Departamento de A.I. y Química Ambiental, IQOG, CSIC. Juan de la Cierva 3. 28006 Madrid (Spain)

Corresponding author:

Prof. Dr. C. Carmen

Departamento de Química Analítica.
Facultad de Ciencias Químicas.
Universidad Complutense de Madrid.
28040 Madrid (Spain).

Phone: (34) 91 394 4318

Fax: (34) 91 394 4322

Email: ccamara@eucmax.sim.ucm.es

Solid phase microextraction method for the determination of atrazine and four organophosphorus pesticides in soil samples by gas chromatography

A. Bouaid¹, L. Ramos² M. J. Gonzalez², P. Fernández¹ and C. Cámara¹ ())

¹Departamento de Química Analítica. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Complutense de Madrid. 28040 Madrid (Spain).

²Departamento de A.I. y Química Ambiental, IQOG, CSIC. Juan de la Cierva 3. 28006 Madrid (Spain)

Abstract

A simple and rapid solid phase microextraction (SPME) based method is presented for the simultaneous determination of two different types of pesticides, triazines (i.e. atrazine) and organophosphorus (i.e. parathion-methyl, chlorpyrifos, methidathion and carbophenothion), in soil. After optimisation of the different experimental variables affecting the SPME of the target compounds from aqueous solutions by using an experimental design, a consensus strategy was adopted which allowed the use of the SPME method developed for the simultaneous screening of all the analytes selected. The complete analytical procedure finally proposed consisted on a 15 min ultrasonic extraction of the target compounds from a 0.5 g soil sample with 5 ml of methanol and the dilution of this extract to up 10% methanol followed by the addition of NaCl to a final concentration of 10% (w/v). The analytes in this aqueous extract were preconcentrated for 30 min in the SPME fiber and subsequently desorbed by heating of the fiber at 260°C for 5 min in the gas chromatograph injection port. Final determination was carried out with an electron-capture detector. The recoveries of the pesticides

studied in soils ranged from 72% to 92%, except for atrazine, and the RSDs were below 14%. The feasibility of the procedure finally proposed for the screening of the endogenous pesticides irrespective of the properties of the soil selected has been shown.

Keywords: SPME; atrazine; organophosphorus pesticides; soil analysis

1. Introduction

Pesticides are widely used in agriculture for controlling weeds, insects, and fungi, but once these xenobiotic substances have accomplished their intended effects, their residues are left in the ecosystem where they accumulated particularly in the soil, from where they can be leached to the superficial and subterranean waters [1].

Current methods for pesticides analysis in solid samples involve typically solid-liquid extraction [2,3], solid-phase extraction of the aqueous or organic extracts [2] or sophisticated techniques such as supercritical fluid extraction (SFE) [4]. In general, the two former methods require a long extraction time and frequently involve large volume of toxic solvents while SFE methods are rather matrix dependent and involve an expensive instrumentation. Besides, an extensive clean-up of the extracts is usually mandatory before final determination of the target compounds by chromatographic methods. On the other hand, the social concern about the levels of these pollutants in the environment and the reduction of the maximum residue levels allowed in current legislations have made increase the number of samples to be analysed and require the detection of contaminants at lower levels than those attained by the methodologies available nowadays. Thereby, nowadays much effort has been directed toward reducing laboratory-generated waste and time for sample preparation and to improve the limits of detection of the analytical procedures. According to these requirements solid-phase

microextraction (SPME) has been regarded as a valuable (solvent-free) alternative analytical technique which overcomes most of the shortcomings of the conventional methods while maintaining their advantages [5].

Due to its characteristics, the SPME technique was initially used for the determination of volatile compounds [6,7] and for preconcentration of a variety of organic compounds from aqueous samples, including pollutants of great concern such polycyclic aromatic hydrocarbons [8], organophosphorus pesticides [9,10], triazines [3] or organochlorine compounds [11]. However, it was only recently that the feasibility of SPME of pollutants from soil samples started to be investigated. In general, most of these studies evaluated the possibility of SPME of a particular family of pollutants from a specific soil sample. Thereby, screening methods based on SPME that allow the simultaneous determination of pesticides covering a wide range of physico-chemical characteristics irrespective of the soil properties are still scarce in the literature.

Previous studies have shown the direct dipping of the fiber in an aqueous suspension of soil [12] and, especially, in a diluted organic extract previously obtained by a conventional solid-liquid extraction method [3] as the best strategies for SPME of pesticides from soils. Surfactant mediated SPME is a novel approach which attempts to overcome the usually reported lack of sensitivity of the quoted above extraction procedures while preventing the use of an organic extraction solvent. In spite of the promising results reported when this method was applied for the analysis of pesticides in fruit slurries [13], to our knowledge, its feasibility for soil analysis has not been tested yet.

The objective of this work was to develop an SPME-based procedure for fast simultaneous screening of a variety of pesticides (i.e. atrazine and four organophosphorus pesticides) in soil samples. A factorial experimental design was used

for the optimisation of the different experimental variables affecting the SPME step as this approach provides a maximum of information with a low number of experiments and allows to study the (possible) cross effect among the parameters investigated. The optimised method was applied to the determination of the pesticides levels in soils with different physico-chemical characteristics.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Atrazine, methyl parathion, chlorpyrifos, fenamiphos and methidathion were obtained from Riedel-de-Haen (Hannover, Germany). Standard stock solutions (1000 mg/l) were prepared in acetonitrile (Scharlau, Barcelona, Spain) and stored at -20 °C in the dark. Working standard solutions were prepared daily. Dodecylsulphate sodium salt (SDS, 99% purity) and sodium chloride (99.5-100%) were purchased from Merck (Barcelona, Spain), acetone, *n*-hexane, methanol from SDS (Peypin, France). All reagents used were analytical grade.

Four soil samples from the Madrid region, Spain, with different physico-chemical characteristics were used in this study (Table 1). Soils were air dried and sieved to 35 mesh before using.

2.2. Apparatus and experimental conditions

The SPME fiber holder for manual extraction and the fibers of polydimethylsiloxane (PDMS, 100 µm film thickness) used in the study were from Supelco (Madrid, Spain). SPME fibers were conditioned by heating at 250 °C for 2h in the GC injection port according to the manufacturer recommendations and reconditioned between two consecutive extractions by heating at 260 °C for 4 min.

A magnetic stirrer was used for stirring the samples during extraction. An ultrasonic bath (Ultrasons Selecta, J.P. Selecta, Barcelona, Spain) and a Hermle Z-320 centrifuge (Hermle, Germany) were used for the extraction of pesticides from soil samples and to separate the soil particles from the supernatant, respectively.

GC separation was performed using an HP 5890 series II GC (Hewlett-Packard, Alto Palo, CA, USA) equipped with an ECD, on a DB-5 60 m fused silica capillary column (0.25 mm i.d., 0.25 μm film thickness) supplied by J & W Scientific (Folsom, CA, USA). The detector temperature was set at 300°C. The temperature program was as follows: the initial oven temperature was 60°C, maintained for 6 min and increased at 15°C/min to 280°C (11 min) to complete the program. Nitrogen was used as carrier gas at a column head pressure of 22.4 psi and as make-up gas (60 ml/min).

Final confirmation of the pesticides in the soil extracts was performed by GC (HP 5890 Series) with mass spectrometer (HP 5890 Series) detection (GC-MS) in the selected ion monitoring (SIM) mode. In this part of the study, 4 ml of the soil extract were concentrated to 100 μl and an 1- μl sub-sample was injected in the splitless mode (splitless time, 1.0 min) in a capillary OV-1 column (25 m x 0.25 mm i.d., 0.25 μm film thickness) from J & W Scientific. The column temperature was programmed from 70°C (1.3 min) to 280°C at a rate of 15°C/min. The final temperature was held for 5 min. Helium was used as the carrier gas at a column head pressure of 8 psi. For each compound, the two most abundant ions produced by electron ionisation (EI) at 70 eV were monitored (Table 2).

2.3. Procedures

SPME procedure for water. Preliminary experiments were carried out to optimise the main parameters affecting the SPME of the pesticides investigated from aqueous

solutions (i.e. extraction time, ionic strength and magnetic stirring rate of the solution) and their subsequent quantitative thermal desorption in the GC injection port (i.e. temperature and time of desorption). In these studies Milli-Q water samples spiked with the appropriate amount of the standard solution to give a final concentration of 3 ng/l and equilibrated during 15 min were used. Optimisation was carried out by factorial experimental design [15].

After optimisation, a typical experiment consisted on the direct immersion of the conditioned fiber into the spiked water sample (3ml with 10% NaCl, w/v) contained in a 4-ml amber glass vial. As recommended by Eisert and Pawliszyn [16], the fiber was placed off-center in the vial so the sample flowed perpendicularly to the fiber axis. SPME was carried out under magnetic stirring for 30 min at ambient temperature. Desorption of pesticides was carried out at 260°C for 5 min in a splitless injector. Efficiency of the SPME of pesticides from water samples under the experimental conditions finally proposed was evaluated by direct comparison of the SPME peak areas with those of the calibration lines obtained by 1 µl splitless injection of the pesticides selected in *n*-hexane (calibration range 0.1-7.5 ng/ml with coefficient of correlation better than 0.994). Then, new calibration lines were constructed by SPME of the target compounds from water samples spiked at concentration levels ranging from 0.1 to 10 ng/ml (0.03-3.3 ng/ml for chlorpyrifos) under these experimental conditions. These calibration lines were used for quantification in subsequent experiments.

SPME procedure for soil. The feasibility of the method developed for SPME of pesticides from aqueous solutions was investigated for the analysis of these compounds in soil aqueous extracts. In this part of the study, sub-samples of soil 1 (Table 1) were spiked at the 100 (or 75) ng/g level with the pesticides studied, extracted by a selected

extraction method and subsequently subjected to SPME according to the procedure previously optimised. The soil was spiked by pre-soaking the sample in methanol containing the pesticides at the appropriate level for 5 min. Then, methanol was allowed to evaporate in a fume hood overnight. Feasibility of two soil extraction methods for obtaining the aqueous solutions subjected to SPME was evaluated: ultrasonic extraction with methanol and surfactant mediated extraction with SDS. In the former method, a 0.5 mg soil sample spiked at the 100 ng/g level was extracted for 15 min by ultrasonic agitation with 5 ml of methanol. Methanol was chosen because of its high efficiency for the extraction of the target compounds from soil allowed to minimise the volume of the extraction solvent used in this step. Solid particles were subsequently separated from the supernatant by centrifugation of the mixture for 15 min at 2000 g. A 2 ml of this methanolic extract was then separately diluted to 20 ml with Milli-Q water as it has been proved that percentages of methanol up to 10 % did not affect the SPME of polar pesticides from aqueous solutions [3]. A 3 ml aliquot of this aqueous solution was then used for SPME and subsequent analysis. In the second approach, surfactant mediated extraction, a 0.5 g soil sample spiked at the 75 ng/g level with the target compounds was extracted by shaking for 10 min with 5 ml of a 10% NaCl (w/v) extraction solution containing 3 mg/ml of SDS [13]. Then, the supernatant was removed and the extraction repeated. Both extracts were mixed and diluted to 12 ml to ensure that the micelles were broken [17] and pesticides available for SPME. A 3 ml aliquot of this aqueous solution was used for SPME and subsequent analysis. In both methods, ultrasonic and surfactant mediated extraction, the *theoretical* final concentration of pesticides in the aqueous solution subjected to SPME was 3 ng/ml. Efficiency of the soil extraction methods tested was evaluated by comparison of the SPME peak areas obtained in each case with those of the calibration lines constructed by SPME of spiked water samples. Otherwise

specify, all experiments were carried out in duplicate at ambient temperature. Finally, the optimised extraction method plus SPME procedure was applied to the analysis of pesticides in non-spiked soils with different physico-chemical characteristics.

Blank samples, i.e. non-spiked water and soil samples, were analysed to check any contamination throughout the analytical procedure. No background interference was found to be introduced by the proposed methodology.

3. Results and discussion

3.1. Optimisation of SPME of pesticides from water by factorial experimental design

Selection of the SPME fiber is of outstanding importance when the goal is to achieve simultaneous high extraction efficiencies for compounds with a variety of chemical characteristics (Table 2). A PDMS fiber was selected as this material has been reported to have a satisfactory extraction efficiency for a variety of compounds, including atrazine [3] and some of the organophosphorus pesticides included in this study [9].

Some preliminary experiments were carried out to determine the boundary levels for the parameters affecting the desorption of the analytes from the SPME fiber. In these experiments, 3 ml of Milli-Q water containing 10% NaCl (w/v) and spiked at the 3 ng/ml level were extracted under magnetic stirring for 10 min at ambient temperature. According to these preliminary assays (results not shown), desorption temperatures in the range 200–260°C and desorption times ranging from 2 to 5 min were selected for the central composite design used to further proceed with method optimisation (Table 3). As regard the variables affecting the SPME sorption, the extraction time and the ionic strength were considered to be the most relevant according to previously reported data [9] and, therefore, included in the experimental design used in this study. Extraction times ranging from 5 to 40 min were investigated. Due to the contradictory results

published for the salting-out effect, i.e. ionic strength –as percentage of NaCl, w/v–, in SPME methods [3,18,19], percentages of NaCl ranging from 0% to 30% were considered in the experimental design (Table 3). The rest of the parameters were kept identical to those used in previous experiments. Table 3 summarises the 27 randomised experiments corresponding to the complete design used for the simultaneous optimisation of the SPME sorption and desorption parameters. As an example of the results found in this study, Figures 1, 2 and 3 summarise, respectively, those obtained for pesticides with relatively high, intermediate and low polarity (i.e. atrazine, chlorpyrifos and carbophenothion, respectively).

The pareto chart is a graph that shows the amount of influence that each factor investigated has on the response obtained for every particular compound studied as well as the possible cross effect among these factors. Expectedly, and in agreement with previous observations [3], the pareto chart obtained for atrazine (Figure 1.a) shows that the ionic strength has a mayor effect on the SPME efficiency of the most polar pesticides investigated. The extraction time, the desorption temperature as well as the interaction between these factors and the ionic strength were also found to be statistically significant. However, the desorption time had not significant effect since this bar did not cross the vertical line in Figure 1.a that represents a 95% test for significance. Figure 1.b shows that the higher the percentage of NaCl and the longer the extraction time, the higher the response obtained for atrazine when using a desorption temperature of 230°C and a desorption time of 3.5 min. Rather similar results were obtained for pesticides with intermediate polarity as chlorpyrifos (Figure 2.a). Again the time of desorption did not show any significant effect on the SPME efficiency for this compound while all three other factors studied, ionic strength, extraction time and desorption temperature, were statistically significant. However, as it can be read out

form both the pareto chart (Figure 2.a) and the response surface obtained when using a desorption temperature of 230°C and a desorption time of 3.5 min (Figure 2.b), the ionic strength did not have an as dramatic effect as in the case of more polar pesticides. Finally, in the case of the most apolar pesticide investigated (carbophenothion) newly the time of desorption did not show any significant effect (Figure 3.a). The SPME efficiency was found to increase with the desorption temperature. However, a negative effect was observed for the ionic strength: the SPME efficiency increased as the percentage of NaCl added to the aqueous solution decreased. Competition between this apolar compound and the more polar ones, for which sorption on SPME fibers clearly improved with the ionic strength, could be proposed as a possible explanation for this result. This finding could also explain the contradictory results published for authors as regard the salting-out effect on SPME methods [3,18,19].

As somewhat divergent optimum conditions were obtained for the SPME of the different types of compounds studied, a consensus solution was adopted for subsequent experiments. The finally proposed method for simultaneous screening of the pesticides selected consisted on a direct immersion of the SPME fiber placed off-centre in a vial containing a 3-ml water sample at room temperature for 30 min followed by desorption at 260°C (5 min). Because of the opposite trends observed for pesticides with different polarity when adding NaCl to the water, an intermediate percentage of NaCl (15%, w/v) was provisionally proposed as the most convenient solution. However, due to the fast degradation of the PDMS SPME fiber previously reported when using percentages of NaCl higher than 15% [3], a 10% NaCl was selected for subsequent experiments.

Finally, the effect of the agitation speed on the SPME efficiency was investigated. For all the analytes the SPME efficiency increased with the agitation speed during the sorption step as the rate-limiting step in SPME is the diffusion of the compounds

throughout the solution. Due to this diffusion rate can be efficiently speeded by increasing the agitation, the agitation speed was set at the maximum for subsequent analysis.

Once all the experimental parameters were optimised, the feasibility of the SPME method developed was evaluated by analysing waters spiked at different concentration levels (in the range 0.1-10 ng/ml, except for chlorpyrifos, 0.03-3.3 ng/ml). Recoveries of the pesticides investigated at the 0.1 ng/ml level were 74% for atrazine, 22% for methyl parathion, 100% for chlorpyrifos, 98% for methidathion and 54% for carbophenothion. These values were in the range [9, 20] or even better [3] than those previously published for similar applications involving a PDMS SPME fiber, except for carbophenothion for which no previous data were found in the literature. The repeatability of the whole SPME procedure, evaluated as the relative standard deviation (RSD, n=3) at the 0.1 ng/ml level, was better than 6%, except for atrazine (20%) because this peak showed some tailing. It is important to note that, for obvious reasons, the absolute recoveries trended to decrease with the spiking level for concentrations higher than 5 ng/ml. However, the amount versus area response was linear over the whole range tested for all the compounds studied with coefficient of correlation in the range 0.91-0.97. The experimentally calculated limits of detection in water were in the range 0.01-0.04 ng/ml which proves the feasibility of the proposed SPME method for environmental applications.

3.2. SPME of pesticides from soil

The SPME method developed was tested for pesticides analysis in aqueous soil extracts. As quoted above, two different approaches, ultrasonic extraction with methanol and

surfactant mediated extraction with SDS, were evaluated for previous extraction of the analytes from the spiked soil. Figure 4 summarises the results of these experiments.

In all instances, ultrasonic extraction was found to be more efficient than surfactant mediated extraction for the extraction of the target compounds from the spiked soil studied. The recoveries obtained with the ultrasonic method ranged from 72% to 90%, except for atrazine (47%). These results can be also read out from Figure 5 which besides shows that the chromatogram corresponding to the ultrasonic extract was cleaner than that obtained with the procedure involving surfactants. Therefore, the former extraction method was used in subsequent experiments.

Additional relevant analytical data concerning the whole ultrasonic extraction plus SPME method finally proposed for pesticides screening in soil are summarised in Table 5. The procedure developed showed a satisfactory repeatability for all the analytes with RSDs better than 14%. The experimentally calculated limits of detection in real soil samples were in the range 0.6-24 ng/g soil (except for atrazine, 30 ng/g soil), which proves the practicability of the proposed ultrasonic plus SPME method for the analysis of the target compounds in real-life soils.

As a further illustration of the potential of the procedure developed for fast pesticides determination in soils with different physico-chemical characteristics, this analytical method was used for the determination of the pollutants investigated in a variety of soil samples. Both spiked and non-spiked soils were analysed in this part of the study.

Table 5 summarises the recoveries obtained when analysing three different types of soil (see Table 1 for physico-chemical characteristics identification) spiked at the 100 ng/g level (chlorpyrifos, 33 ng/g). The recoveries ranged from 97% to 123% with SD lower than 16% for the organophosphorus pesticides studied and were somewhat lower, but still in the range of those previously published for SPME methods [3], for atrazine (43-

62% with SD below 11%). These results proved the feasibility of the analytical method developed for the screening of the target compounds irrespective of the characteristics of the soil investigated.

The method proposed was also applied to the determination of the endogenous levels of the pesticides studied in non-spiked soils. Pesticides were quantified by GC-ECD and GC-MS was used for confirmation purposes. As a typical example of the results obtained, Figure 6 shows the MS chromatogram obtained after ultrasonic extraction of a soil sample and subsequent SPME of the endogenous pesticides from the aqueous solution as well as the fragmentograms of chlorpyrifos and carbophenothion. These two pesticides were found at quantifiable levels in all the four samples investigated (levels in the range 3.7-4.8 ng/g soil for chlorpyrifos and 13-16 ng/g soil for carbophenothion). Atrazine and methyl parathion were never detected. Analysis of the soil extracts by GC-MS solved the interference affecting the GC-ECD determination of methidation (see Figure 5) and proved that the levels of this pesticide were below the limit of detection in all the soils analysed.

4. Conclusions

A fast screening method based on a 15 min ultrasonic extraction of a 0.5 g soil sample with methanol, dilution of the methanolic extract and subsequent SPME of the analytes from the aqueous solution has been developed for the determination of atrazine plus four organophosphorous pesticides, methyl parathion, chlorpyrifos, methidathion and carbophenothion. The main experimental parameters affecting the SPME step were optimised by applying an experimental design which allowed to obtain maximum information with a minimum number of assays. Compared to methods typically used for pesticides determination in soil, the procedure developed is simpler, as the ultrasonic

extracts can be subjected to SPME without any additional clean-up, faster (around 50 min for total sample preparation against the 1.5-2 h for conventional extraction methods) and involves a minimum of organic solvent (5 ml of methanol against 150-300 ml of organic solvents for conventional procedures). The similar recovery and RSD values obtained for the target compounds when the method developed was used for the analysis of soils with different of physico-chemical characteristics support its feasibility for the fast screening of the pesticides selected irrespective of the properties of the soil sample investigated.

Acknowledgement

To the CICYT for the financial support of the contract PB 98-0768

References

- [1] I. Scheunert *in* Fate and prediction of environmental chemicals in soil, plant, and aquatic systems. Chapter 1 (M.Mansour ed. Lewis, Boca Raton-Ann Arbor-London-Tokyo) (1993) 1.
- [2] D. Barceló, J. Chromatogr. A 643 (1993) 117.
- [3] F. Hernández, J. Beltrán, J.F. López, J.V. Gaspar, Anal. Chem. 72 (2000) 2313.
- [4] T.S. Steinhelmer, R.L. Pfeiffer, K.D. Scoggin, Anal. Chem. 66 (1994) 645.
- [5] C. Arthur, J. Pawliszyn, Anal. Chem. 62 (1990) 2145.
- [6] R.J. Bartelt, Anal. Chem. 69 (1997) 364.
- [7] F.J. Santos, M.T. Galcerán, D. Fraisse, J. Chromatogr. A 742 (1996) 181.
- [8] J. Poerschman, Z. Zhang, F. D. Koponke, J. Pawliszyn, Anal. Chem. 69 (1997) 597.
- [9] J. Beltrán, F. López, O. Cepria, F. Hernández, J. Chromatogr. A 808 (1998) 257.
- [10] I. Valor., J.C. Moltó, D. Apraiz, G. Font, J. Chromatogr. A 767 (1997) 195.
- [11] G.P. Jackson, A.R.J. Andrews, Analyst 123 (1998) 1085.
- [12] A.A. Boyd-Boland, J. Pawliszyn, J. Chromatogr. A 704 (1995) 163.
- [13] L.E. Sojo, I. Ding, Matrix Effect on solid phase micro-extraction: micelle-analytes interaction, Anal. Chem. (Submitted).
- [14] A. Noble, J. Chromatogr. A 642 (1993) 3.
- [15] J.A. Palasota, S.N. Deming, J. Chem. Ed. 69 (1992) 560.
- [16] R. Eisert., J. Pawliszyn, J. Chromatogr. A 776 (1997) 293.
- [17] A.L. Simplício, L.V. Boas, J. Chromatogr. A 833 (1999) 35.
- [18] S. Magdic, A. Boyd-Boland, K. Jinno, J. Pawliszyn, J. Chromatogr. A 736 (1996) 219.
- [19] R. Eisert, K. Levsen, J. Am. Soc. Mass Spectrom. 6 (1995) 1119.
- [20] W. Chen, K.F. Poon, M.H.W. Lam., Environ. Sci. Technol. 32 (1998) 3816.

Table 1
Physicochemical characteristics of the soil samples tested.

Sample	Soil 1	Soil 2	Soil 3	Soil 4
Sand %	92	78	55	57
Silt %	8	12	23	17
Clay %	0.3	11	22	26
CaCO₃ %	–	42	–	–
pH	6	8	8	8

Table 2
 Characteristics of the pesticides investigated.

Pesticides	MW^a	m/z^b	log_{ow}^c
Atrazine	215.0	215/200	2.21-2.75
Methyl parathion	263.2	109/125	1.80-3.04
Chlorpyrifos	350.6	197/ 97	4.96-5.27
Methidathion	302.3	145/125	2.42
Carbophenothion	342.9	342/157	5.12-5.66

^a Molecular weight

^b Values of the two ions monitored

^c Log octanol/water partition coefficient [14]

Table 3
Factor levels in the central composite design and design matrix.

Factor	Key	Low level	High level
Extraction time (min)	A	5	40
NaCl (% w/v)	B	0	30
Desorption temperature(°C)	C	200	260
Desorption time (min)	D	2	5

Run No.	A	B	C	D
1	22,5	15	230	5
2	40	0	200	2
3	5	15	230	3,5
4	5	0	200	2
5	40	30	260	2
6	5	30	200	2
7	40	30	260	5
8	5	0	200	5
9	40	30	200	5
10	40	0	200	5
11	22,5	15	200	3,5
12	40	30	200	2
13	22,5	30	230	3,5
14	22,5	15	230	3,5
15	22,5	0	230	3,5
16	22,5	15	230	3,5
17	40	0	260	2
18	5	30	260	2
19	5	30	260	5
20	5	30	200	5
21	40	0	260	5
22	22,5	15	230	2
23	5	0	260	2
24	40	15	230	3,5
25	5	0	260	5
26	22,5	15	260	3,5
27	22,5	15	230	3,5

Table 4

Recoveries and RSDs (% , n=4) obtained after ultrasonic extraction and SPME of the aqueous extracts of a soil spiked at the 100 ng/g level (chlorpyrifos, 33 ng/g). Limits of detection as experimentally determined in the real-life soil (ng/g soil).

Pesticides	Recovery	RSD	LOD
Atrazine	47	14	30
Methyl parathion	79	8	24
Chlorpyrifos	86	1	0.6
Methidathion	90	13	7
Carbophenothion	72	10	3

Table 5

Recoveries (% , n=3) and SD obtained after ultrasonic extraction and SPME of the aqueous extracts of three different soils spiked at the 100 ng/g level (chlorpyrifos, 33 ng/g).

Pesticides	Soil 2	Soil 3	Soil 4
Atrazine	62 ± 9	43 ± 11	60 ± 7
Methyl parathion	107 ± 6	97 ± 15	105 ± 10
Chlorpyrifos	105 ± 16	105 ± 14	107 ± 5
Methidathion	ND ^a	ND ^a	ND ^a
Carbophenothion	112 ± 5	123 ± 7	106 ± 12

^a Not determined because of coelution with an impurity

Figure legend

Figure 1. Atrazine (A) pareto chart for the standardised main effects in the central composite design, and (B) response surface estimated from the factorial design by plotting extraction time versus NaCl % with a desorption T of 230°C and a desorption time of 3,5 min.

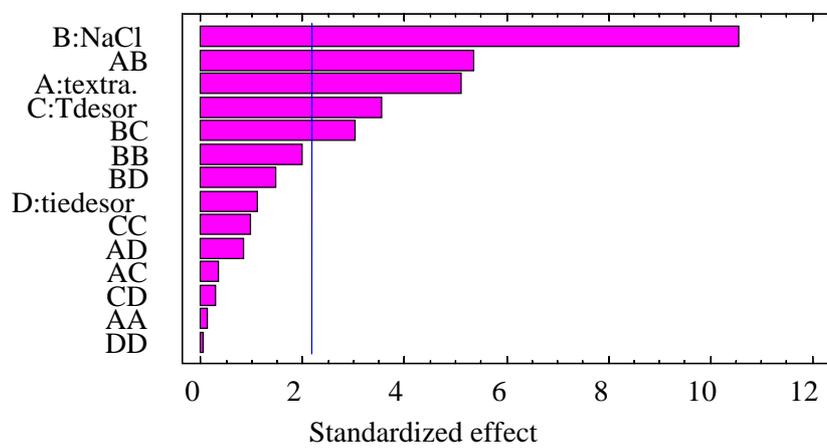
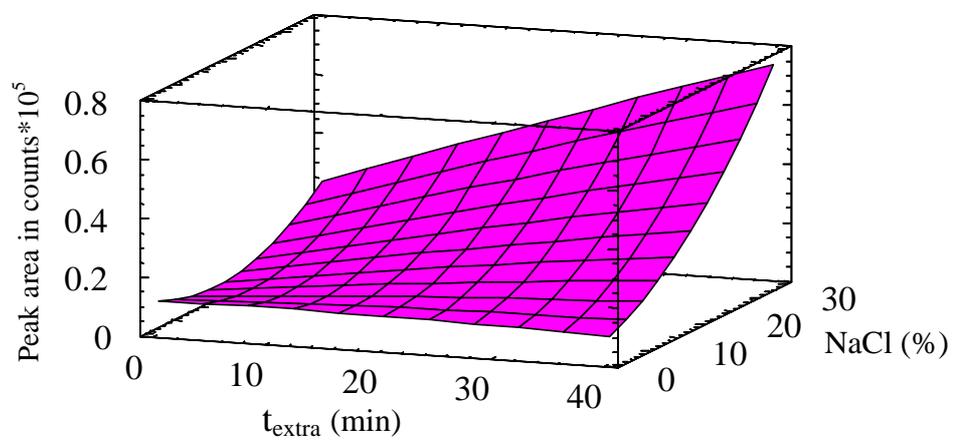
Figure 2. Chlorpyriphos (A) pareto chart for the standardised main effects in the central composite design, and (B) response surface estimated from the factorial design by plotting extraction time versus NaCl % with a desorption T of 230°C and a desorption time of 3 min.

Figure 3. Carbophenothion (A) pareto chart for the standardised main effects in the central composite design, and (B) response surface estimated from the factorial design by plotting temperature of desorption versus NaCl % with a extraction time of 22,5 min and a desorption time of 3,5 min.

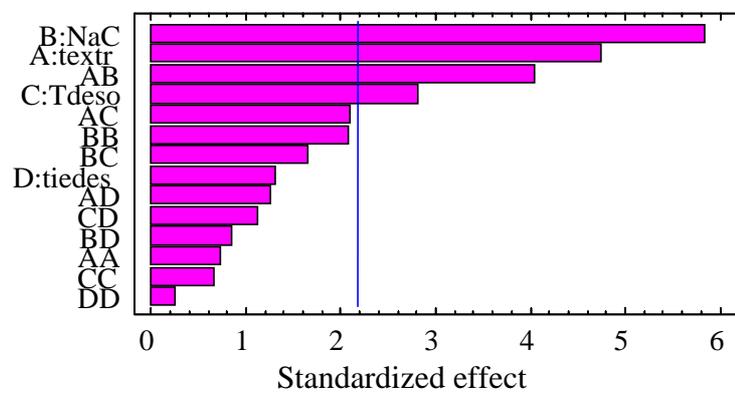
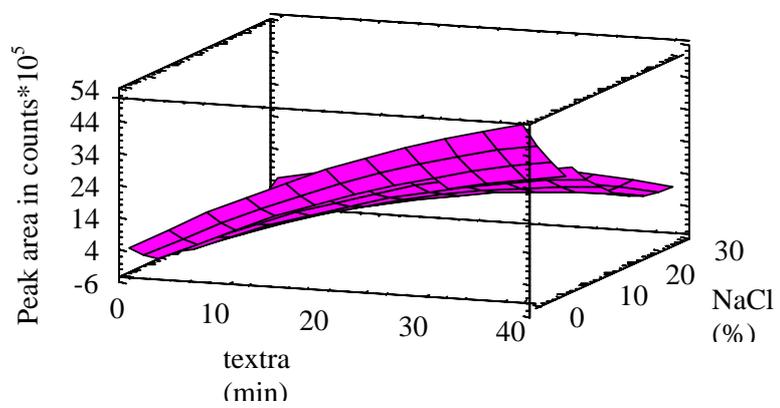
Figure 4. Comparison of results obtained after ultrasonic and surfactant mediated extraction of the pesticides studied from a soil spiked at the 100 ng/g soil (chlorpyriphos, 33 ng/g soil) and subsequent SPME of the analytes from the aqueous extracts. Results as average of two separate analyses.

Figure 5. GC-ECD chromatograms obtained after ultrasonic extraction of a soil with (A) and without spiking (B); and (C) surfactant mediated extraction of the same spiked soil and subsequently SPME of the analytes from the aqueous extracts. Spiking level 100 ng/g, except chlorpyriphos, 33 ng/g. The same scale has been used in all cases. Pesticides: 1. atrazine, 2. parathion-methyl, 3. chlorpyriphos, 4. methidathion and 5. carbophenothion.

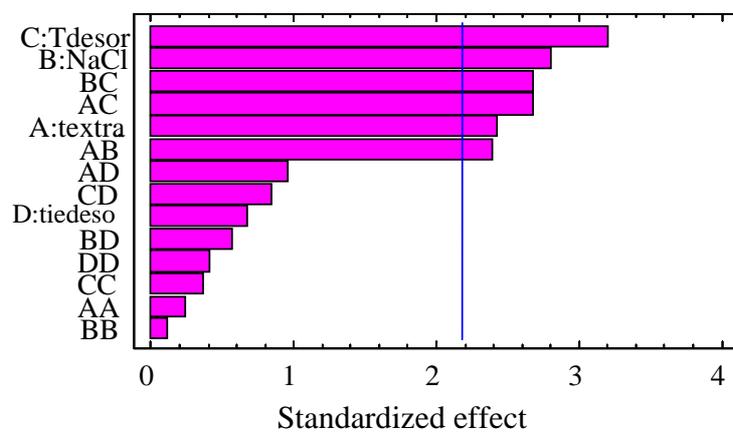
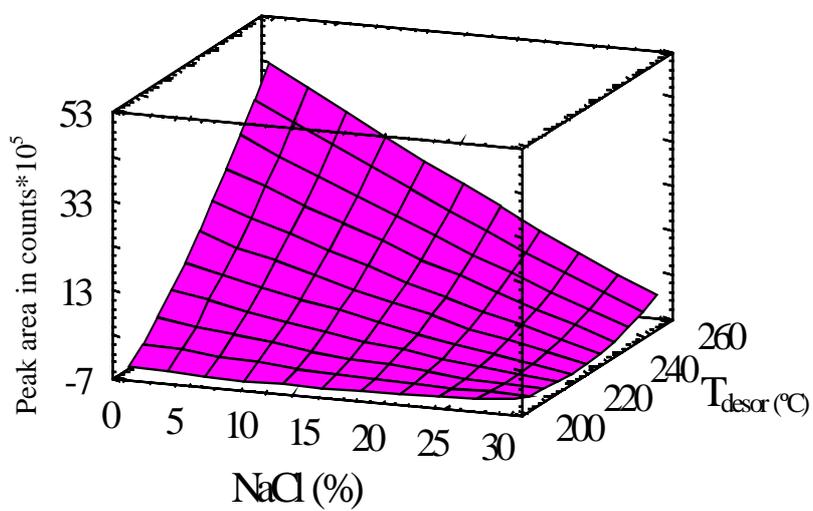
Figure 6. GC-MS chromatogram obtained (A) after ultrasonic extraction plus SPME of the aqueous extract for a non-spiked soil and (B) direct injection of a standard solution containing the pesticides investigated at the 10 ng/ml level. Inserts correspond to the fragmentograms of chlorpyriphos (ion 197) and carbophenothion (ion 342). See Figure 5 legend for peak numbering.

A**B**

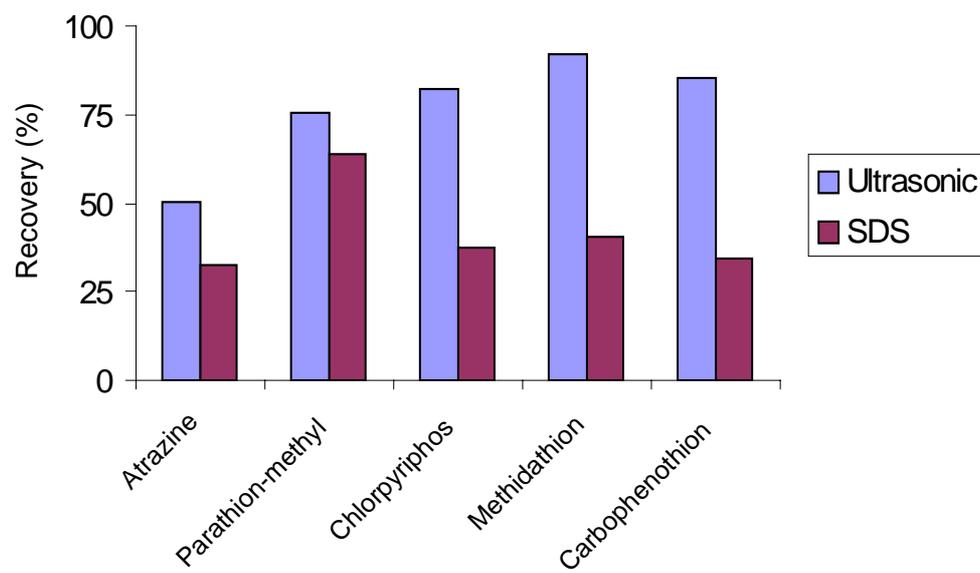
Atrazine

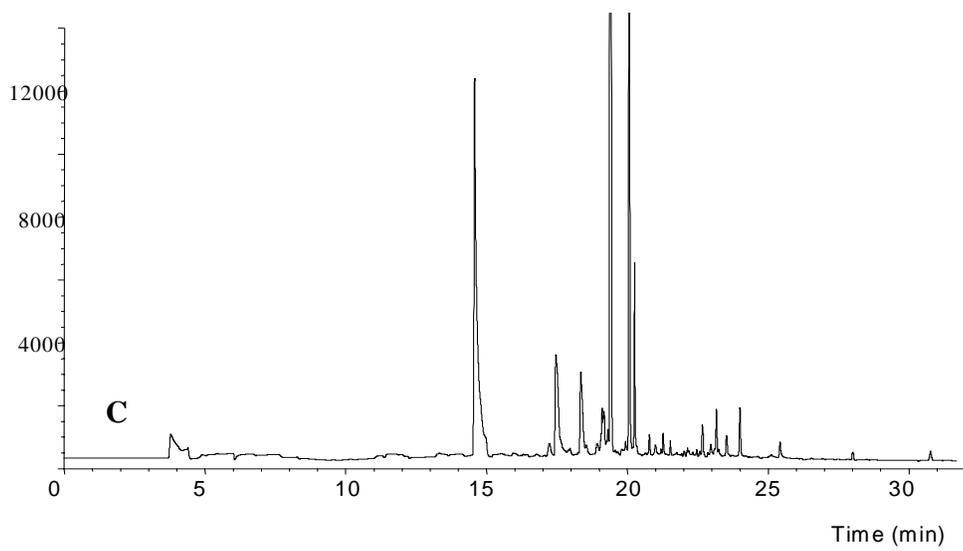
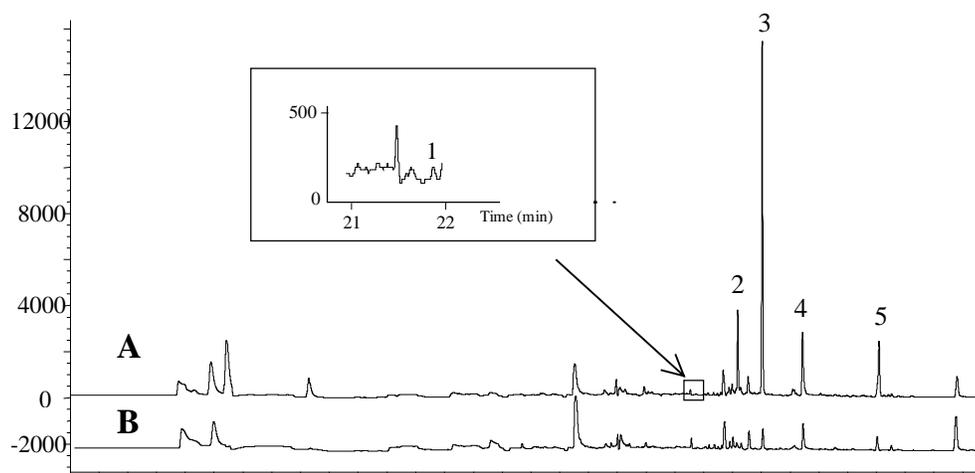
A**B**

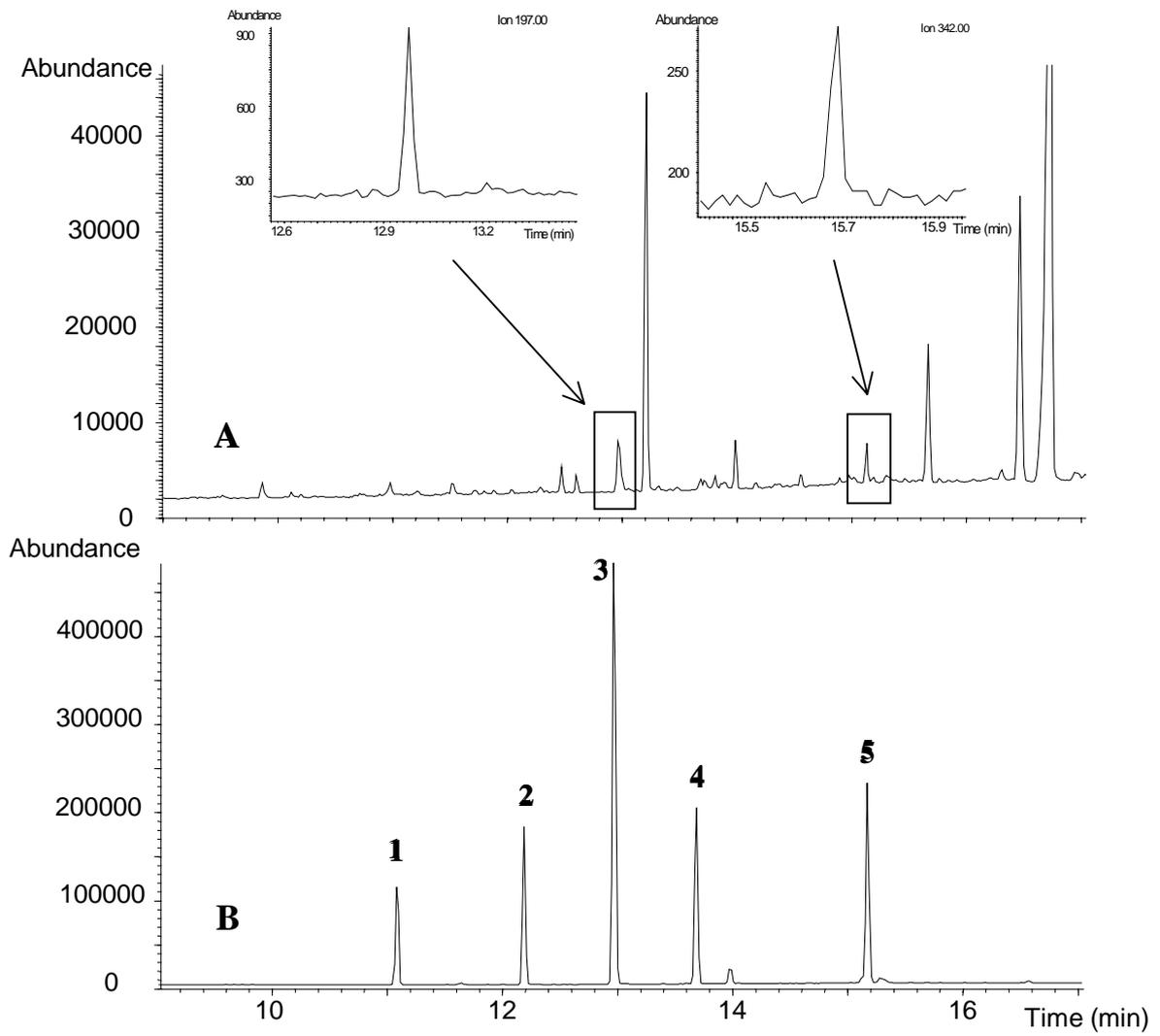
Chlorpyrifos

A**B**

Carbophenotion







Métodos de Remediación

Capítulo IV

Capítulo IV

ADSORCIÓN DE LOS PESTICIDAS ATRACINA Y CLORPIRIFOS EN SISTEMA BINARIO POR LAS TIERRAS DE DIATOMEAS

El contenido de este Capítulo ha sido publicado en la revista *International Journal of Environmental Studies*, (2000) Volume3.

El objetivo de este trabajo es evaluar la capacidad de adsorción de dos pesticidas con características diferentes atracina y clorpirifos por las tierras de diatomeas en un sistema en discontinuo. Para ello se ponen en contacto las tierras de diatomeas con disoluciones que contienen, bien solo cada uno de los pesticidas o la mezcla de ambos.

Se evaluó la influencia de varios parámetros que afectan su adsorción en ambos sistemas y se estudió la cinética del proceso.

Los ensayos relativos al sistema de combinación de los dos pesticidas (binario) se han dividido en dos grupos principales: el estudio cinético y el trazado de las isothermas de adsorción. Los estudios de adsorción en “batch” han permitido obtener una información detallada sobre el comportamiento de adsorción de los dos pesticidas estudiados.

La atracina y clorpirifos han demostrado tener efectos competitivos de adsorción. La adsorción de atracina se reduce en presencia de clorpirifos, el cual mostró una fuerte adsorción en un intervalo de concentración de 0.1-10 mg/l.

Se elaboraron las isothermas de adsorción en sistemas de combinación de los dos pesticidas (binarios) ajustando los datos experimentales a un modelo matemático que permitió evaluar, de forma cuantitativa, la influencia de la presencia de un pesticida sobre la capacidad de adsorción del otro.

En base a los resultados obtenidos se ha puesto de manifiesto la buena afinidad del clorpirifos por las tierras de diatomeas con un valor alto de K_f (227.09) frente al de atracina (3.06).

Removal of Atrazine and Chlorpyrifos from aqueous solutions by adsorption on Diatomaceous earth – Competitive adsorption.

K. AGDI, A. BOUAID, A MARTIN ESTEBAN, P. FERNANDEZ HERNANDO,
A. AZMANI* and C. CAMARA.

ABSTRACT

Diatomaceous earth, an inexpensive material, as an adsorbent for the removal of atrazine and chlorpyrifos from aqueous solution has been used. The effects of contact time, pH, temperature, pesticide concentration and dose of adsorbent have been studied. The equilibrium nature of each pesticide alone has been described by the Freundlich isotherm and a tentative mechanism has been proposed, the Freundlich coefficient (K_f) and Freundlich constant ($1/n$) appeared to be closely related to physiochemical properties of the compounds. With increasing pesticide hydrophobicity their adsorption was stronger and faster (higher K_{ow} , lower solubility).

The kinetics and the factor controlling the adsorption process have also been studied.

Atrazine and chlorpyrifos showed different competitive effects : the adsorption of the relatively weak sorbing atrazine was reduced in the presence of the stronger adsorbing chlorpyrifos, whereas the adsorption of chlorpyrifos was less affected by competition of atrazine at a concentration of 0.1 – 10 mg/l.

Keywords : Atrazine, Chlorpyrifos, Removal pesticide, adsorption isotherm, diatomaceous earth, adsorbents.

INTRODUCTION

Among the different pollutants of aquatic ecosystems, pesticides, especially the triazines and organophosphorus ones, are considered as priority pollutants since they harmful to organisms even at $\mu\text{g/l}$ levels (1). These pesticides constitute a diverse group of chemical structures exhibiting a wide range of physiochemical properties.

Advanced removal pesticide methods are usually needed to achieve environment quality requirement. These include some combination of biological chemical and physical processes. Therefore, adsorption has evolved into one of the most effective physical processes for removal pesticides.

To date, the most common commercially used adsorbent has been activated carbon (2, 3, 4), but this relatively expensive. The suitability of peat, wood, ash, Fuller's earth, fired clay and some other low cost materials was investigated and has recently received more attention owing to its economic advantages (5, 6, 7). The study of the feasibility of atrazine and chlorpyrifos eliminated by diatomaceous earth is presented in this paper. Much attention has been paid to optimise the effective abatement conditions in a cost effective fashion to remove these pesticides. Diatomaceous earth, one of the cheapest and abundantly (North of Morocco) available adsorbent has been tried for the uptake of atrazine and chlorpyrifos .

Diatomaceous earth (DE) is geological deposit consisting of the fossilised skeletons of numerous species of siliceous marine and fresh water unicellular organisms, particularly diatoms and other algae. Many of these fossilised sedimentary layers originated at least 20 million years ago in the lakes and seas of the Eocene and Miocene epochs (8, 9).

The objective of the present work was to evaluate the effect of retention time, pH, temperature, pesticide initial concentration and amount of adsorbent on the removal of atrazine and chlorpyrifos by DE and to compare the adsorption performance of single pesticide system in batch mode and two pesticide system.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals and materials

The tested pesticides in this study, atrazine (6-Chloro-N-ethyl-N'-(1-methylethyl)-1,3,5-triazine-2,4-diamine) and chlorpyrifos (0,0-diethyl0-(3,5,6-trichloro-2-pyridinyl) phosphorothic acid) were purchased from Riedel-de Haen (Hannover, Germany). The physico-chemical properties of these pesticides are shown in table 1.

Stock standard solutions (1000 mg/l) were prepared in ethyl acetate (Scharlau, Spain) and stored at – 20°C in the dark. Working standard solutions were prepared daily. All reagents used were of analytical grade.

The diatomaceous earth of Ras-Traf (Region of the Nador, North of Morocco), used in our work, was screened to give a powder with granulometrie ($d < 63 \mu\text{m}$) and dried at 110°C for 24 h before use.

A univapo concentrator coupled to a Unijet II Refrigerated Aspirator (Supplied by Barcelona, Spain), a RC 2- B centrifuge (Sorvall Superspeed), a Bond Elut (C18) extraction cartridges (Varian, Zug, Switzerland) and a gas chromatography equipped with a nitrogen-phosphorus detector (HP-5890-II, Hewlett Packard, Palo Alto, CA) using a $30 \text{ m} \times 0.32 \text{ mm}$ I.D fused silica capillary column SPB-50 (Supelco, USA) with Helium as carrier gas (1.8 ml/min) and nitrogen as make-up gas (30.7 ml/min) were employed throughout the present study.

Physicochemical Properties of the diatomaceous earth

The pH of the samples was measured in 1:200 solid suspensions. For the pH measurements, suspensions were equilibrated for 3 h, centrifuged, and the pH of the supernatant measured using the pH-meter.

The surface area was measured using the methylene blue adsorption method (**10, 11**). a volume of 100 ml of various concentrations of methylene blue solution was shaken in glass flasks for 1 h at 25°C with 0,1 g of diatomaceous earth. Preliminary experiments of adsorption kinetics indicated that this period was sufficient to attain equilibrium. Subsequently, the final equilibrium concentration of the dye was determined spectrophotometrically at 656 nm. The surface area was calculated from the saturation adsorption assuming across sectional area of 108 \AA^2 for the methylene blue molecule.

The chemical composition of Ras – Traf diatomaceous earth were obtained with the Bruker SRS 3400 X – Ray spectrometer.

Batch adsorption studies

The batch adsorption experiments were carried out by shaking 10 mg of diatomaceous earth with 2 ml of distilled water MilliQ plus 5 system (Millipore, Molsheim, France) spiked with 10 mg/l of each pesticide used at various pH (2-11) and at temperatures ($4\text{-}40^\circ\text{C}$) in different flasks for different retention times using a temperature controlled shaker.

The effect of contacted time between pesticide and adsorbent and the effect of the amount adsorbate solution adsorbed per unit mass of DE on equilibrium were studied in series of experiments. In each experiment, 10 mg of DE was contacted with a adsorbate solution in a 10 ml flask and stirred with a magnetic stirrer at room temperature for a given recorded time. The contents of each flask was then centrifuged for 5 min and the supernatant was extracted by a Bond eluted extraction cartridges C18, the extract was eluted with 10 ml of ethyl acetate each, evaporated using a Univapo concentrador centrifuge to attain 2 ml of this solvent. The amounts of the adsorbed pesticides were calculated as the difference between the initial pesticide concentration and the supernatant concentration at equilibrium which was measured by gas chromatography GC-NPD. Blanks and control samples were prepared with the same manner without pesticides or adsorbent.

Competitive adsorption

The competitive adsorption was examined by the two experiments. In the first set of experiments, the primary solute (atrazine) was adjusted to a constant initial concentration of 10 mg/l, while the secondary solute (chlorpyrifos) concentration was varied by adding an initial concentration of 0,1; 0,5; 0,8; 2,5; 5; 10 mg/l respectively. In the second set of experiments, the solute were interchanged.

RESULTS AND DISCUSSION

Physicochemical Properties of the adsorbent

Some physicochemical properties of the diatomaceous earth (DE) are given as follow : pH = 9,84 and surface area ($S = 318 \text{ m}^2/\text{g}$).

The chemical composition of this adsorbent is shown in table 2. As it can be seen from this table, the DE is consisted of the high amounts of SiO_2 , CaO, Al_2O_3 and Fe_2O_3 and other minor components.

The scanning electron microscopic analysis of DE (Fig. 1 (a)) showed that this adsorbent is made of a structure in honeycomb of the silica which can be explained exclusively by the formation of diatoms belonging to the consinodiscus kind, to which join speculate sponges, argillaceous minerals and grains of quartz of glauconie and silicoflagellés.

Semiquantitative surface content by energy – dispersive analysis showed (Fig. 1 (b)) apart from the major components of Si, O, Ca, Al and Fe and some minor components as Cl, Mg and Na.

Time of equilibrium

The dependence of adsorption of the pesticides studied with time is presented in Fig. 2. The adsorption increases with increasing contact time for each pesticide and the equilibrium was attained of shaking for 15 min for each pesticide. Therefore in each experiment, the shaking time was set to 30 min.

Temperature effect

A known amounts for each pesticide and DE were placed with 2 ml of distilled water MilliQ in thermostatted shaker at varied temperature 4 – 40 °C for giving the behaviour of atrazine and chlorpyrifos adsorption with the temperature.

This parameter was unaffected the adsorption of atrazine and chlorpyrifos by diatomaceous earth. Thus subsequent experiments were carried out at ambient temperature.

Effect of pH

The test was carried out the same way as the standard adsorption experiments, but prior to the test the pH of the pesticide solution was adjusted to 2, 4, 7, 9 and 11 by adding either 1,0 N HCl or NaOH.

The effect of pH on the adsorption of atrazine and chlorpyrifos on diatomaceous earth (DE) is presented in Fig.3. The pH of aqueous solution is an important controlling parameter in the adsorption process (**12**). Decreasing adsorption with increasing pH (pH 2-11) was observed in the case of atrazine. The maximum adsorption of atrazine occurred normally when pH was near his pKa (1.7), which is present in the cationic form. Atrazine is weakly basic, so an increasing pH results in a decreasing cationic fraction in solution and hence a decreasing adsorption.

Chlorpyrifos, non-ionic compound, probably interact with the non-ionic parts of the diatomaceous earth surface (hydrophobic bonding), which are probably not much influenced by the pH of the DE. Therefore in each experiment the shaking pH was set to 4,5.

Effect of DE amount on the adsorption process

The effect of DE amount (0,5 – 100 mg) on the adsorption of atrazine and chlorpyriphos is presented in Fig. 4. The data indicates that the adsorption increases with the amount of DE for both pesticides. The maximum uptake is exhibited at 20 mg of adsorbent in 2 ml of solution (10 mg/ml).

Effect of initial concentration of these pesticides

The Fig. 5 shows variation of atrazine and chlorpyriphos concentration on adsorption. As can be seen from this figure that the adsorption increases with concentration for atrazine and chlorpyriphos to attained a maximum (saturation) at 25 mg/l and 10 mg/l for atrazine and chlorpyriphos respectively.

Kinetics of adsorption process

The adsorption kinetics of all pesticides exhibit an immediate rapid sorption by which about 60 – 85 % of the added pesticide amount are adsorbed within 15 min, followed by a slow sorption over a longer period (Fig. 6). Presumably initial quick adsorption is a surface phenomenon, followed by a slow migration and diffusion of the compound into the organic matter matrix and mineral structure.

The sorption kinetics correspond to the L type in the classification proposed by Giles and al (14), which means that as the adsorption sites are occupied, it becomes increasingly more difficult for adsorbate molecules to find vacant sites. As expected, the more hydrophobic solute chlorpyriphos was adsorbed to a greater extent than atrazine.

A kinetic study of the adsorption process was also made using the following expression :

$$r = K_c (C - C_e)^n \quad (1)$$

Where : r is the adsorption rate (mg/min).

K_c is the kinetic constant ($l/mg^{1-n} \cdot \text{min}^{-1}$)

n is the reaction order.

The equation (1) can also be expressed in a linear form by taking the logarithm :

$$\text{Log } r = \text{Log } K_c + n \text{Log } (C - C_e) \quad (2)$$

Statistical analysis was performed by linear regression to calculate the isotherm coefficients K_c and n .

As it can be shown from table 3, the kinetic constant values were very similar for both pesticides, indicating that the adsorption rate is similar and the reaction order ($n \approx 1$) is similar too, although the kinetic constant was greater for chlorpyrifos, confirming a greater affinity of the DE for this pesticide.

Adsorption isotherm studies

To quantify the adsorption capacity of DE for removal of atrazine and chlorpyrifos from aqueous solution, the Freundlich model was used :

$$Q_e = K_f C_e^{1/n} \quad (3)$$

Where Q_e (mg/g) is the amount of pesticide adsorbed per g of adsorbent.

C_e (mg/l) is the equilibrium concentration in solution.

K_f (l/g) and $1/n$ are the adsorption coefficient and the adsorption constant respectively.

For $1/n > 1$ the amount of adsorbate tends to increase without limit at a value nearly C_e , for $1/n < 1$ adsorption appears to approach a limit. For $1/n = 1$ the adsorption isotherm will be linear, then equation (3) can be written as follows :

$$K_d = Q_e / C_e \quad (4)$$

Where K_d is the partition coefficient of the adsorbed amount in DE and the concentration in solution at equilibrium.

The Freundlich equation can also be expressed in a linear form by taking the logarithm :

$$\text{Log } Q_e = \text{Log } K_f + 1/n \text{Log } C_e \quad (5)$$

Statistical analysis was performed by linear regression to calculate the isotherm coefficients K_f and $1/n$.

The related parameters for the fitting of Freundlich equation are summarised in table 4 and isotherm plots for atrazine and chlorpyrifos are shown in Fig. 7.

Over limited range of concentration (0,1 – 10 mg/l) non-linear adsorption were observed in particular for chlorpyrifos which is poorly soluble and shows a high K_{ow} value. This nonlinearity of surface adsorption phenomena maybe attributed to adsorption into organic or mineral matrices.

Comparison of the adsorption behaviour of each pesticides, it has be seen that chlorpyrifos shows a higher K_f (227,09) on DE than atrazine ($K_f = 3,06$) and that the extent to which the Freundlich isotherm exponent $1/n$ for these compounds differs from 1 is dependent on their intrinsic physiochemical properties **(15, 16)**.

Comparaison of the adsorption behaviour of different chemicals on the basis of their K_d values (table 4) suggests an inverse relationship of K_d and water solubility.

Competitive adsorption

In order to examine the exist competitive effect between atrazine and chlorpyrifos, two series of adsorption experiments with primary solute in the presence of a secondary solute in different concentrations (0.1-10 mg/l) were carried out in our laboratory.

The adsorption of the weakly sorbing atrazine proved to be insignificantly influenced by chlorpyrifos Fig. 8 (a), and the figure 8 (b) shows that the adsorption of chlorpyrifos was even less affected by the same initial concentration of atrazine.

The anticipated mixed adsorption behaviour most likely related to the both the adsorbent responsible for the nonlinearity of the adsorption isotherms and the pesticide properties **(13, 17)**. A compound will be adsorbed favourably by those sites of DE that have the strongest affinity towards it. As those high affinity sites becomes saturated, adsorption of this compound is limited to the less strongly adsorbing site.

CONCLUSION

The batch adsorption studies described in this paper have yielded much detailed information on the adsorption behaviour of the both pesticides studied. It is evident that the degree of nonlinearity of the isotherm increases with increasing hydrophobicity of the pesticides. The adsorption process is not completely reversible, that means that hysteresis occurs, the extent of which being also related to the physiochemical properties of these pesticides.

This study reveals that the diatomaceous earth is an excellent adsorbent for atrazine and chlorpyrifos removals from aqueous solution.

The pH affects atrazine adsorption. Increasing the pH (2-11) causes a decrease in atrazine adsorption's.

The adsorption of the strongly adsorbing chlorpyrifos was almost unaffected by the presence of atrazine at different concentrations while atrazine showed a decreased adsorption on diatomaceous earth in the presence of chlorpyrifos.

The investigations are quite useful in developing an appropriate technology for decreasing a wastewater treatment plant. The process is economically feasible and easy to carry out.

REFERENCES

- (1) Chapman P. M., Romberg G. P. and Vigers C. A. (1982)
Design of monitoring studies priority pollutants. *J. Wat. Poll. Control Fed.* 54, 292-297.
- (2) M. J. Prados, P. Roche and G. Dagois – J. M. Philipot. (1994)
Elimination de l'atrazine par adsorption sur charbon actif : modélisation du phénomène. *TSM* N° 7-8, Juillet- Août.
- (3) D. R. U. Knappe, M. J. Prados and G. Dagois. (1993)
Adsorption of atrazine by Powdered activated carbon. *AWWA annual conf., Water res.*, June 6-10, San Antonio, US.
- (4) F. Orshansky and N. Narkis. (1997)
Characteristics of organics removal by PATC simultaneous adsorption and biodegradation. *Water res.*, March, 31 (39 : 391-398).

- (5) G. Parads, E. , M. Villafranca-Sanchez and A.Gallego-Campo. (1995).
Adsorption of paraquat, linuron and atrazine on natural and acid-treated bentonite.p.77-78. In D. Suett (de.) Proc. COST 66 WOKESH. On pesticides in soil and the environment, Stratford-upon-Avon. 13-15 May – Hort. Res Int., Wellsbourne, Warwick, UK.
- (6) Laird, D. A., E. barriuso, R. H. Dowdy, and W. C. Koskinem. (1992).
Adsorption of atrazine on smectites. Soil Sci. Soc. Am. J. 56 : 62-67.
- (7) A. B. Turribull, Msc, PhD, R. M. Harrison, PhD, Dsc, R. J. Williams, Bsc, P. Matthiessen, PhD, D. N. Brocke, PhD, D.O A. sheahan and M. Mills, bsc, Msc. (1997).
Assesment of the fate of senlected adsorptive pesticides at ADAS rosemaund. J. CIWEM,11, February.
- (8) Z. Korunic and al. (1998).
Diatomaceous earth, a group of natural insecticides.
J. of stored Products research. Apr – Jul, 34 (2-3) : 87-97.
- (9) E.Hilali and M. Nataf. (1970).
Le kieselghur de Ras-Traf (province de Nador) et ses possibilités d'utilisation en génie civil, Mines et Géologie, N° 31, Rabat, Maroc.
- (10) H. J. Van den Hul and J. Lyklema. (1968).
Determination of specific surface areas of dispersed materials. Comparison of the negative adsorption method with some other methods. J. of the American Chemical Society. 90 : 12, June 5, pp. 3010 – 3015.
- (11) I. A. H. Schneider and J. Rubio. (1995).
New trends in biosorption of heavy metals by Fresh water macrophytes. Biohydrometallurgical Processing, volume II, pp. 247 – 256
- (12) J. P. Gao, J. Maguhn, P. spitzauer and A. Kettstup. (1998).
Sorption of pesticides in the sediment of the Teufelsweiher Pond (Southern Germany). I: Equilibrium assesments, Effect of organic carbon content and pH.
Water res. Vol, 32, N° 5, pp. 1662-1672.
- (13) J. P. Gao, J. Maguhn, P. spitzauer and A. Kettstup. (1998).
Sorption of pesticides in the sediment of the Teufelsweiher Pond (Southern Germany). II: Competitive adsorption, desorption of aged residues and effect of dissolved organic carbon.
Water res. Vol, 32, N° 7, pp. 2089-2094.

(14) C. H. Giles, T. H. MacEwan, S. N. Nakhwa and D. Smith. (1960).

Studies in adsorption . Part IV. A system of classification of solution adsorption isotherms and its use in diagnosis of adsorption mechanisms and in measurement of specific surface areas of solids. J. Chem. Soc. 3, 3973-3993.

(15) S. W. Karickhoff. (1979).

Sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments. Wat. Res, 13, 241-248.

(16) R. Singh and Y. Saxena. (1989).

Adsorption – desorption behaviour of selected pesticides in some western Australian soils. Aust. J. Soil. Res, 28, 227-243.

(17) Macginly, P. .M., L. E. Katz and W. J. Weber, Jr. (1996).

Competitive sorption and displacement of hydrophobic organic contaminant in saturated subsurface soil systems. Water. Res. 32 : 3571-3577.

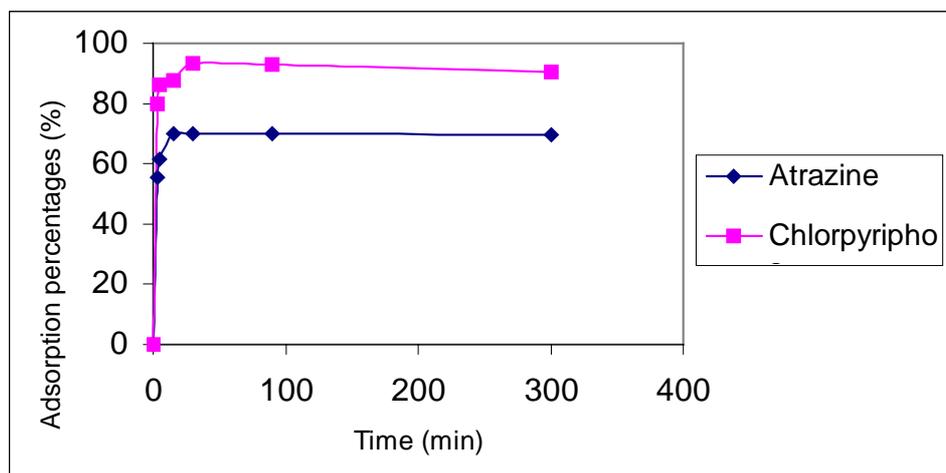


Fig. 2 : Effect of time on removal atrazine and chlorpyrifos by DE.

Experimental conditions :

m (DE) = 10 mg.

C_0 (pesticide) = 10 mg/l.

T° = ambient.

pH = 6,3

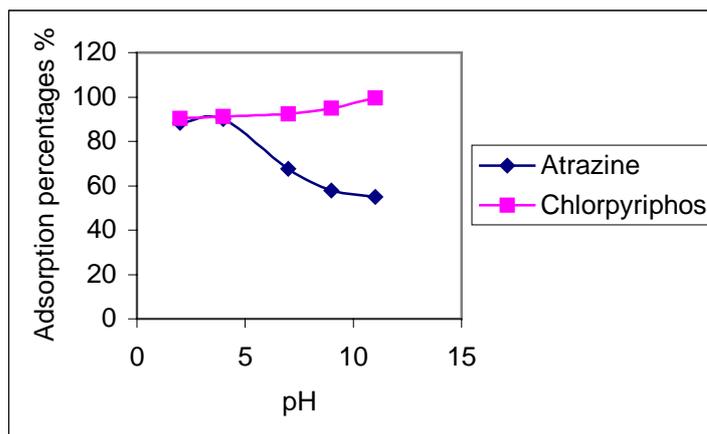


Fig. 3 : Effect of pH on the adsorption of atrazine and chlorpyrifos in the DE.

Experimental conditions :

m (DE) = 10 mg.

C_0 (pesticide) = 10 mg/l.

T° = ambient.

Equilibrium time = 30min.

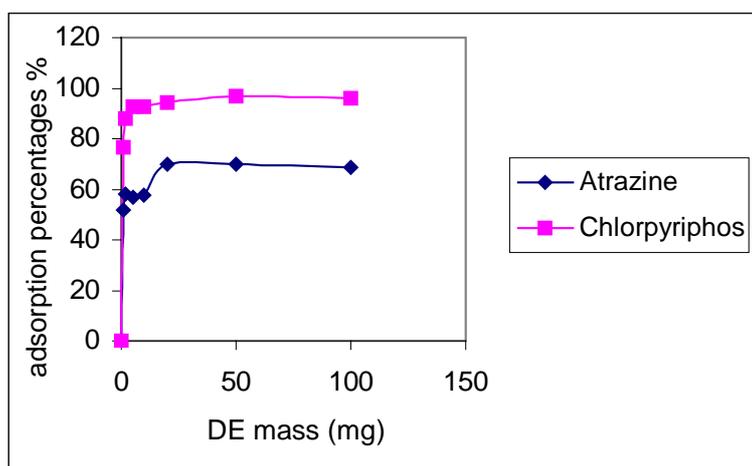


Fig. 4 : Effect of DE amount on the adsorption of pesticides studies.

Experimental conditions :

Equilibrium time = 30 min.

C_0 (pesticide) = 10 mg/l.

T° = ambient.

pH = 4,5

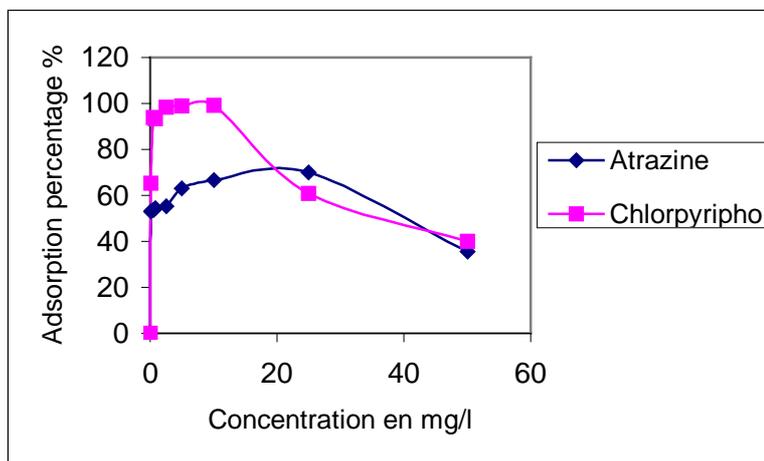


Fig. 5 : Variation of atrazine and chlorpyriphos concentrations with adsorption process.

Experimental conditions :

m (DE) = 20 mg.

pH = 4,5.

T° = ambient.

Equilibrium time = 30 min.

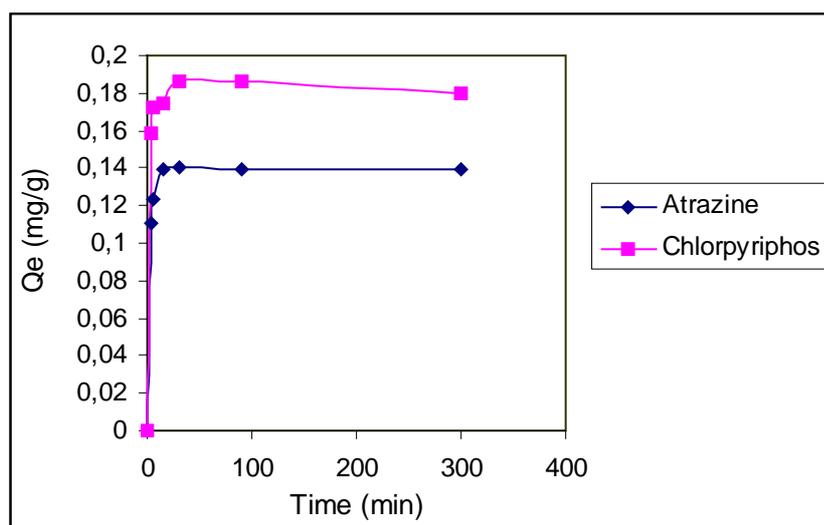


Figure 6 : Adsorption kinetics of atrazine and chlorpyrifos (10 mg/l) on DE.

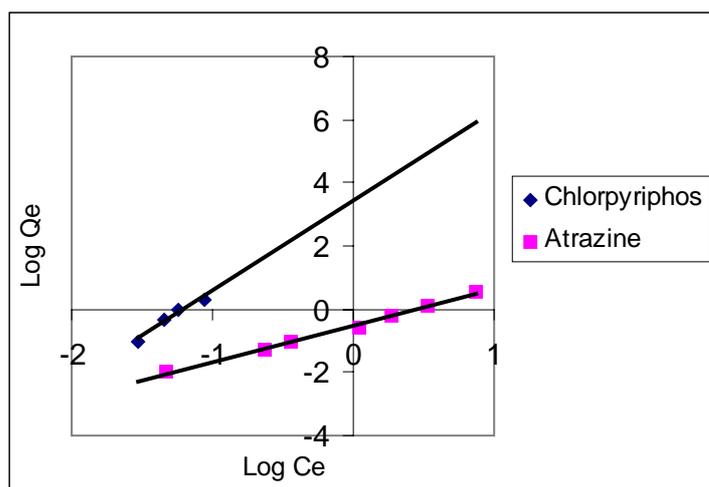


Fig. 7 : Atrazine and chlorpyrifos adsorption isotherms on DE.

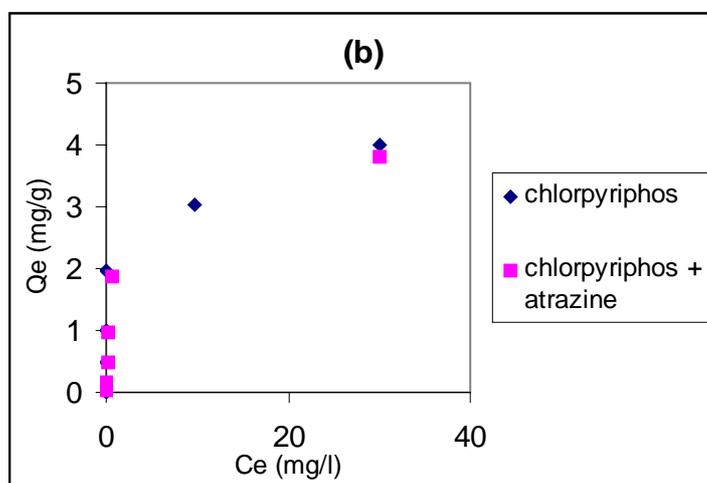
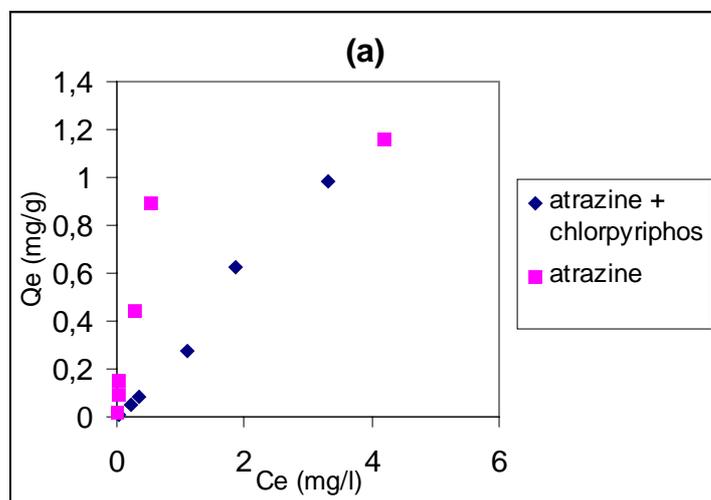


Fig. 8 : Competitive adsorption behaviour of (a) atrazine on DE in the presence of chlorpyrifos at different concentrations and (b) of chlorpyrifos in the presence of atrazine at different concentrations.

Pesticides	Atrazine	Chlorpyrifos
Form	Colourless powder	Colourless crystals with a mild mercaptan odour
Molecular weight	215.7	350.6
Solubility in water	33 mg/l (at pH = 7 and 22°C)	1.4 mg/l (25°C)
*Log K _{ow}	2.5 (25°C)	4.7
PK _a	1,7	-
p.v	3,85. 10 ⁻² mPa (25°C)	2,7 mPa (25°C)

Table 1 : Physiochemical properties of atrazine and chlorpyrifos.

*Log K_{ow} = logarithm of compounds partition coefficient between octanol and water.

Analyte	Chemical composition (%)
SiO ₂	72.1
Al ₂ O ₃	7.34
Fe ₂ O ₃	4.33
Na ₂ O	1.76
MgO	1.86
P ₂ O ₅	0.12
SO ₃	0.36
Cl	0.51
K ₂ O	1.19
CaO	9.90
TiO ₂	0.37

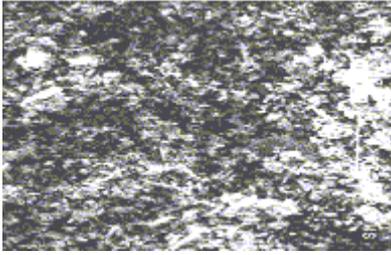
Table 2 : Chemical composition of Ras-traf diatomaceous earth.

Pesticide	K_c ($l/mg^{1-n} \cdot \text{min}^{-1}$). 10^3	n	R^2
Atrazine	1,53	0,84	0,9999
Chlorpyriphos	2,04	0,96	1

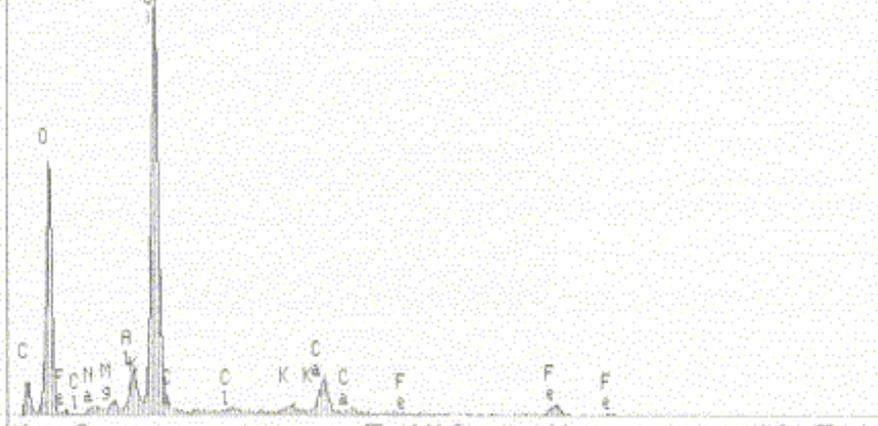
Table 3 : Kinetic constants for atrazine and chlorpyriphos adsorption on DE.

Pesticides used	Freundlich constants			
	K_f	K_d	1/n	R^2
Atrazine	3,06	2,89	0,75	0,9953
Chlorpyriphos	227,09	215,17	0,35	0,9997

Table 4 : Freundlich parameters of the tested pesticides in DE.



X-RAY: 0 - 20 keV Super ATW
Live: 100s Preset: 100s Remaining: 0s
Real: 113s 12% Dead



< .0 5.146 keV 10.3 >
FS= 4K ch 267= 33 cts
MEM1:BRUTE

Capítulo V

Capítulo V

REMEDIACIÓN DE ATRACINA Y CUATRO PESTICIDAS ORGANOFOSFORADOS EN AGUAS MEDIOAMBIENTALES

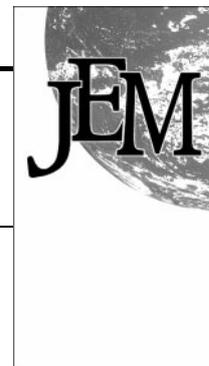
El contenido de este Capítulo ha sido publicado en la revista *J. Environ. Monit.*, (2000) 2, 420-423, y presentado como cartel en la 4th *Euroconference on environmental Analytical Chemistry*, Visegrád, Hungría (2000).

El objetivo de este trabajo es la evaluación de la eficacia de la tierra de diatomeas como un sustrato para la remediación de atracina y cuatro pesticidas organofosforados (metil-paration, clorpirifos, fenamifos y metidation) en aguas medioambientales.

Se ha optimizado las distintas variables tales como (temperatura, pH, tiempo de contacto, concentración de pesticidas y la cantidad del adsorbente) que afectan a la retención de dichos pesticidas en las tierras de diatomeas. La optimización de todas estas variables ha permitido la remediación con eficacia de tres muestras diferentes de aguas contaminadas con los pesticidas objetos de estudio.

Los experimentos en batch han demostrado que las tierras de diatomeas han sido capaces de retener 95% de clorpirifos, 75% de metidation y metil-paration y 55% de atracina y fenamifos. La determinación de las isothermas de adsorción ha permitido estudiar la interacción de los pesticidas con las tierras de diatomeas y cuantificar el proceso de adsorción.

Los resultados obtenidos nos permiten proponer a las tierras diatomeas como un sustrato adecuado para la eliminación de contaminantes orgánicos, como pesticidas en aguas de desecho, de forma sencilla, barata y eficaz.



Removal of atrazine and four organophosphorus pesticides from environmental waters by diatomaceous earth-remediation method

K. Agdi,^a A. Bouaid,^b A. Martin Esteban,^c P. Fernandez Hernando,^b A. Azmani^a and C. Camara^{*b}

^aApplied Physical Chemistry Laboratory, Department of Chemistry, Faculty of Science, Abdel Malek Essaadi University of Tetouan, B.P. 2121, Tetouan, Morocco

^bDepartment of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, Complutense University of Madrid, 28040 Madrid, Spain. E-mail: ccamara@eucmax.sim.ucm.es; Fax: +34-91-3944329; Tel: +34-91-3944318

^cDepartment of Chemistry, Faculty of Science, European University of Madrid, Villaviciosa de Odón, E-28670 Madrid, Spain

Received 13th June 2000, Accepted 21st July 2000

First published as an Advance Article on the web 31st August 2000

A new viable remediation technique based on the use of diatomaceous earth is proposed to improve the ecological system. Its ability to remove atrazine and the four organophosphorus pesticides parathion-methyl, chlorpyrifos, fenamiphos and methidathion from river and waste waters has been proven. A series of experiments including variable conditions, such as temperature, pH, contact time, pesticide concentration and adsorbent quantity, were performed to demonstrate the efficiency of pesticide removal from three different water samples. The batch experiments showed that diatomaceous earth was able to remove 95% of chlorpyrifos, 75% of methidathion and parathion-methyl and 55% of atrazine and fenamiphos from all types of waters tested. The individual adsorption of each pesticide on diatomaceous earth could be described by the Freundlich isotherm and a tentative adsorption mechanism was proposed. The Freundlich coefficient (K_f) and Freundlich constant ($1/n$) appeared to be closely related to the physicochemical properties (K_{ow} , solubility) of the compounds. The actual results support the conclusion that diatomaceous earth has the potential to serve as an extractant in remediation techniques.

Introduction

Among the different pollutants of aquatic ecosystems, pesticides, especially triazines and organophosphorus pesticides, are considered as priority pollutants since they are harmful to organisms even at $\mu\text{g l}^{-1}$ levels.¹ These pesticides constitute a diverse group of chemical structures exhibiting a wide range of physicochemical properties.

The increased use of agricultural pesticides has meant that the mechanisms and magnitude of pesticide movement after their application continue to be an active area of research. Furthermore, their removal from contaminated lands is of paramount interest. Many of the pesticides introduced to replace organochlorine pesticides, such as triazines and organophosphorus pesticides, were designed to break down fairly quickly. However, their relatively high solubility in water, makes them quite mobile in the environment.² When the potential level of exposure to contaminants at a given site is unacceptable from the human health or ecological standpoints, remediation strategies become necessary.

Advanced pesticide removal methods are usually needed to meet environment quality requirements. These include combinations of biological, chemical and physical processes. Therefore, adsorption has evolved into one of the most effective physical processes for pesticide removal.

To date, the most common commercially used adsorbent has been activated carbon,³⁻⁵ but it is relatively expensive. The suitability of peat, wood, ash, Fuller's earth, fired clay and some other low cost materials has been investigated and has recently received more attention owing to their economic advantages.⁶⁻⁸

Diatomaceous earth (DE), one of the cheapest and most abundantly available adsorbents (in Northern Morocco, the

east of Spain and California more than 270 000 tonnes of it are extracted annually), is a geological deposit consisting of the fossilized skeletons of numerous species of siliceous marine and fresh water unicellular organisms, particularly diatoms and other algae. Many of these fossilized sedimentary layers originated at least 20 million years ago in the lakes and seas of the Eocene and Miocene epochs.⁹ Actually, there are many industries distributing DE as it is used also as an insecticide or grain protectant (Australia, Canada, USA, Croatia, Germany, China and some other Asian countries).

Taking into account its specific properties (high silica content, high porosity, low density, weak conductivity coefficient, etc.), DE offers many possible industrial applications, *i.e.*, as an adsorbent, insulator and catalyst.^{10, 11} Special attention has been paid to optimizing the effective abatement conditions in a cost-effective fashion to remove these pesticides.

The objective of this work is to evaluate the effectiveness of the DE as a substrate for removing atrazine and four organophosphorus pesticides from environmental waters. Thus, the main parameters affecting their adsorption capacity (pH, temperature, contact time) have been evaluated.

Experimental

Reagents and instruments

Atrazine, parathion-methyl, chlorpyrifos, fenamiphos and methidathion were purchased from Riedel-de Haen (Hannover, Germany). Stock standard solutions (1000 mg l^{-1}) were prepared in ethyl acetate (Scharlau, Barcelona, Spain) and stored at -20°C in the dark. Working standard solutions were prepared daily. All reagents used were of analytical grade.

A Univapo concentrator coupled to a Unijet II (Barcelona,

Spain) refrigerated aspirator, an RC2-B centrifuge (Sorvall Superspeed), Bond Elut (C18) extraction cartridges (Varian, Zug, Switzerland) and a gas chromatograph equipped with a nitrogen-phosphorus detector (HP5890-II, Hewlett Packard, Palo Alto, CA, USA) using a 30 m × 0.32 mm id fused silica capillary column SPB-50 (Supelco, USA) with helium as carrier gas (1.8 ml min⁻¹) and nitrogen as make-up gas (30.7 ml min⁻¹) were employed throughout this study.

The DE of Ras-Traf (Nador Region, Northern Morocco) used in our work was screened to obtain powder with granulometry ($d < 63 \mu\text{m}$) and dried at 100 °C for 24 h before use. The chemical composition of Ras-Traf DE, analyzed with a Bruker SRS 3400 X-ray spectrometer connected to spectra^{plus} Windows NT software, was SiO₂ (72.1%), Al₂O₃ (7.34%), CaO (9.90%), Fe₂O₃ (4.33%) and other minor components. The SiO₂ content is similar to other DE from different sources.¹²

Experimental procedure

The batch experiments according to a procedure previously described^{13,14} were carried out by shaking 10 mg of DE with 2 ml of river water (Guadarrama, Madrid) spiked with (10 mg l⁻¹) of each pesticide under different experimental conditions (pH, temperature) in a controlled shaker at room temperature for 5 min. DE is resistant to heat and chemical reactions, in our study no degradation of the pesticides tested under the working conditions was detected, even when longer periods were applied.

The solution was then centrifuged for 5 min and the supernatant was extracted by solid-phase extraction on a (C18) Bond Elut extraction cartridge. The pesticides were eluted with 10 ml of ethyl acetate and evaporated using a Univapo concentrator centrifuge to obtain 2 ml of ethyl acetate. The amount of adsorbed pesticide was calculated as the difference between the initial pesticide concentration and the supernatant pesticide concentration at equilibrium by gas chromatography. A 1 μl aliquot of eluate was injected on to the column with a 3 °C oven track. The detector temperature was 280 °C and the temperature program was as follows: the initial oven temperature (60 °C) was increased at 50 °C min⁻¹ to 180 °C for 1 min, and then at 15 °C min⁻¹ to 225 °C for 3 min followed by a ramp of 2 °C min⁻¹ to 257 °C and held for 1.6 min to complete the program. In these conditions, linear calibration graphs were obtained for all the analytes within the 0.2–10 μg g⁻¹ range with regression coefficients of better than 0.997.

Blanks and control samples were prepared in the same manner without pesticides or adsorbent.

Results and discussion

Most of the papers dealing with DE, use this material for metals preconcentration, a few for pesticides extraction from other samples such as vegetables,^{15,16} or as a support for column chromatography.¹⁷

The effect of several physicochemical parameters (pH, contact time, temperature, DE quantity and saturation concentration) on the capability of the DE to remove pesticides from environmental water was evaluated. The results obtained are expressed in terms of percentage of pesticide (R) removed by DE and were calculated as follows:

$$R = [(C_0 - C) / C_0] 100$$

where C_0 and C are the initial and final concentrations, respectively, of each pesticide in the water sample.

Effect of pH on adsorption

The pH of the pesticide solutions was adjusted to 2, 4, 7, 9 and 11 with either HCl or NaOH and the solutions were then

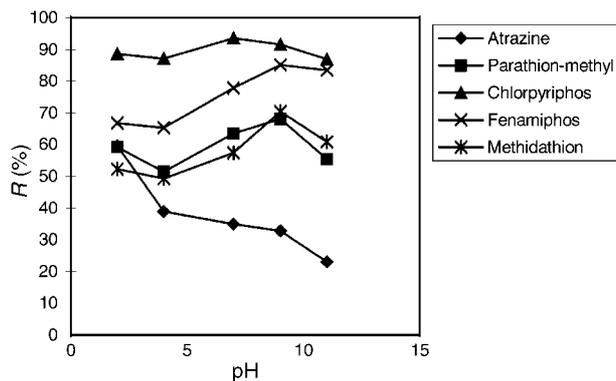


Fig. 1 Effect of pH on removal efficiency (R).

treated according to the procedure described in the Experimental section.

The results obtained are shown in Fig. 1. It is clearly demonstrated that the removal efficiency (R) is dependent on the hydrophobicity of the pesticide. In addition, adsorption, except in the case of atrazine, was unaffected by pH. Since atrazine is a weak base ($pK_a = 1.7$), at acidic pHs it is largely in its cationic form. This might be an indication that atrazine is retained by ionic groups present on the DE surface.

Effect of temperature

The effect of temperature on the adsorption of selected pesticides on DE was studied within the range 4–40 °C by exposing 2 ml of river water spiked with pesticides (10 mg l⁻¹) to 10 mg of DE. This study showed that temperature does not affect the removal efficiency of any of the pesticides evaluated. Subsequent experiments were therefore carried out at ambient temperature.

Effect of DE quantity

The effect of the DE quantity (0.5–100 mg) on removal of the selected pesticides (10 mg l⁻¹) in this process is shown in Fig. 2. The data indicate that the removal efficiency (R) increases slightly with increasing DE quantity. The maximum uptake is exhibited at 10 mg of DE in 2 ml of river water.

Contact time

Fig. 3 shows the effect of contact time on the sorption of selected pesticides by DE. The values of (R) increase with increasing contact time for all the pesticides studied. The retention efficiency for the four organophosphorus pesticides ranged from 80% to 93%, whereas for atrazine it was significantly lower (60% at 5 min up to a maximum of 80% at 50 min). A contact time of 5 min was chosen as optimum.

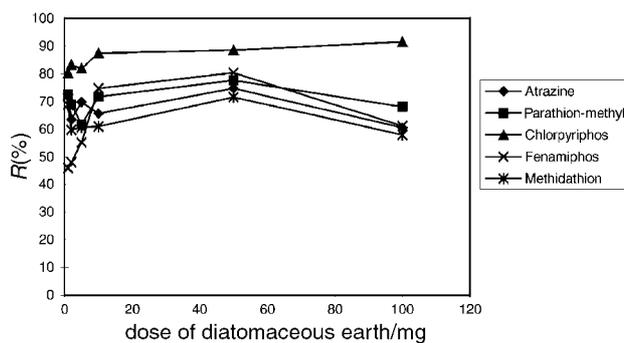


Fig. 2 Effect of DE quantity.

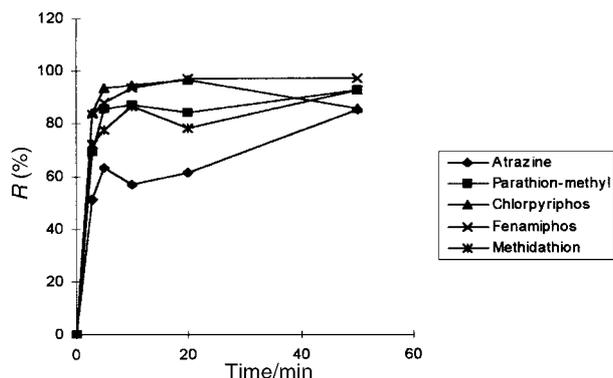


Fig. 3 Effect of contact time.

DE capacity

The saturation study shown in Fig. 4 was carried out by exposing the same amount of DE (10 mg) to 2 ml of river water spiked with different amounts of pesticides ranging from 0.1 mg l^{-1} to 150 mg l^{-1} . As shown in Fig. 4, the maximum amount of pesticides removed by 10 mg of DE was $220 \mu\text{g}$ ($2 \text{ ml} \times 110 \mu\text{g ml}^{-1}$).

Adsorption model

To quantify the DE adsorption capacity for the removal of atrazine and chlorpyrifos from aqueous solution, the Freundlich model was used:

$$Q_e = K_f C_e^{1/n}$$

where Q_e (mg g^{-1}) is the amount of pesticide adsorbed per g of adsorbent, C_e (mg l^{-1}) is the equilibrium concentration in solution and K_f (l g^{-1}) and $1/n$ are the adsorption coefficient and the adsorption constant, respectively.

This relation implies an energy distribution that can be explained by the heterogeneity of the surface. According to this equation, the adsorbed quantity increases to infinity with increasing concentration. In general, even though not very satisfactory for high concentrations, it describes well the adsorption of the composite species diluted in the solvent, which is the case of pesticides in water.¹⁸

For $1/n > 1$ the amount of adsorbate tends to increase without limit at a value of nearly C_e , whereas for $1/n < 1$ adsorption appears to approach a limit. For $1/n = 1$ the adsorption isotherm will be linear. The Freundlich isotherm can also be expressed in a linear form by taking the following logarithm:

$$\log Q_e = \log K_f + 1/n \log C_e$$

A statistical analysis was performed by linear regression to calculate the isotherm coefficients K_f and $1/n$.

The relevant parameters for the fitting of the Freundlich

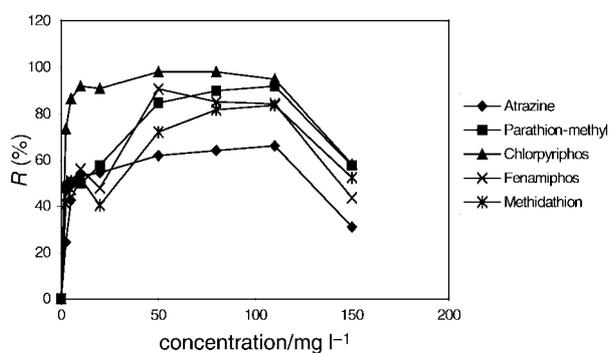


Fig. 4 DE capacity.

Table 1 Freundlich parameters for the adsorption of atrazine and chlorpyrifos on DE

Pesticide	Freundlich parameter		
	K_f	$1/n$	R^2
Atrazine	3.06	0.87	0.9507
Chlorpyrifos	227.09	0.35	0.9953

equation for the pesticides evaluated are summarized in Table 1.

Non-linear adsorption was observed over a limited range of concentrations ($0.1\text{--}10 \text{ mg l}^{-1}$), in particular for chlorpyrifos, which is poorly soluble and has a high K_{ow} value.

By comparing the adsorption behavior of each pesticide, it was observed that chlorpyrifos had a higher K_f (227.09) on DE than atrazine ($K_f = 3.06$) and that the extent to which the Freundlich isotherm exponent $1/n$ for these compounds differed from 1 was dependent on their intrinsic physicochemical properties.^{19–22}

Application of DE for the removal of pesticides from waste waters

After optimization of the parameters affecting the removal of atrazine, parathion-methyl, chlorpyrifos, fenamiphos and methidathion on DE, an experiment was performed to extend the applicability of the optimized method by applying it to the removal of atrazine, parathion-methyl, chlorpyrifos, fenamiphos and methidathion from two waste water samples ("La China" water treatment plant, Madrid, Spain): treated waste water (TWW) and non-treated waste water (NTWW). The water samples were spiked with pesticides (10 mg l^{-1}) and treated according to the optimized procedure described.

The results obtained are shown in Fig. 5. The data indicate that the removal efficiency was higher for TWW than for other water samples [RW (river water) and NTWW] due to the nature and amount of organic matter present. As the well known ability of DE to retain different kind of compounds. (The DE can work as both an adsorbent and physical entrapment of many compounds.) Organic matter and other compounds may compete in the pesticides adsorption process taking place.

Conclusions

Diatomaceous earth was effective for removing atrazine, parathion-methyl, chlorpyrifos, fenamiphos and methidathion from all water samples tested, which means that it could be used to mitigate problems with their waste disposal.

The batch adsorption studies described in this paper give detailed information on the adsorption behavior of the pesticides studied. It is evident that the degree of nonlinearity of the isotherm increases as the hydrophobicity of the pesticides increases. The adsorption process is not completely reversible, which means that hysteresis occurs, the extent of which is also related to the physicochemical properties of these pesticides.

The development of an effective remediation system based

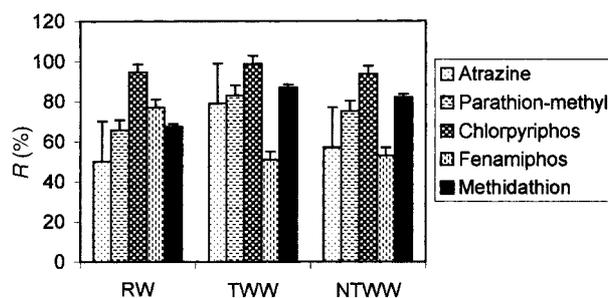


Fig. 5 Removal of pesticides from waters (RW, river water; TWW, treated waste water; and NTWW, non-treated waste water) by DE.

on DE for atrazine and the four organophosphorus pesticides seems to be technically feasible.

To evaluate the ability of DE to transform or degrade the pesticides is of significant interest for many environmental applications.

References

- 1 P. M. Chapman, G. P. Romberg and C. A. Vigers, *J. Water Pollut. Control Fed.*, 1982, **54**, 292.
- 2 A. H. Alegria and J. T. Shaw, *Environ. Sci. Technol.*, 1999, **33**, 850.
- 3 M. Prados, P. Roche, H. Paillard and C. Galley, *J. Fr. Hydrol.*, 1992, **23(2)**, 201.
- 4 D. R. U. Knappe, V. L. Snoeyink, M. J. Prados, M. M. Bourbigot and G. Dagois, *Proc. Annu. Conf. Am. Water Works Assoc., Water Res.*, 1993, June 6–10, San Antonio, CA, USA, p. 561.
- 5 F. Orshansky and N. Narkis, *Water Res.*, 1997, **31**, 391.
- 6 G. Parads, E. M. Villafranca-Sanchez and A. Gallego-Campo, in *Proc. COST 66 Workshop on Pesticides in Soil and the Environment*, ed. D. Suett, Eur. Study Serv., Rixensart, Belgium, 1995, p. 77.
- 7 D. A. Laird, E. Barriuso, R. H. Dowdy and W. C. Koskinem, *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 1992, **56**, 62.
- 8 A. B. Turnbull, R. M. Harrison, R. J. Williams, P. Matthiessen, D. N. Brooke, D. A. Sheahan and M. Mills, *J. Chart. Inst. Water Environ. Manage.*, 1997, **11(1)**, 24.
- 9 Z. Korunic, *J. Stored Prod. Res.*, 1998, **34**, 87.
- 10 E. Hilali and M. Nataf, *Mines Géol.*, 1970(31), 20.
- 11 J. M. West, *Minerals and fuels*, US Bureau of Mines, New York, 1968, vol. I–II, p. 495.
- 12 Paul Field's homepage: <http://www.hedleytech.com/index.htm>
- 13 M. V. Sánchez, A. G. Campo, D. U. Amate, M. F. Pérez and E. G. Pradas, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 1999, **74**, 49.
- 14 A. K. Seta and A. D. Karathanasis, *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 1997, **61**, 612.
- 15 G. Wehtje, R. H. Walker and J. N. Shaw, *Weed Sci.*, 2000, **48(2)**, 248.
- 16 F. Sicbaldi, A. Sarra and G. L. Copeta, *J. Chromatogr., A*, 1997, **765**, 23.
- 17 S. B. Davé, *Am. Environ. Lab.*, 1990(April), 22.
- 18 L. Gicquel, D. Wolbert and A. Laplanche, *Environ. Tech.*, 1997, **18**, 467.
- 19 A. H. Elliot and P. C. Huang, *Water Res.*, 1981, **15**, 849.
- 20 J. P. Gao, J. Maguhn, P. Spitzauer and A. Kettstup, *Water Res.*, 1998, **32(5)**, 1662.
- 21 J. P. Gao, J. Maguhn, P. Spitzauer and A. Kettstup, *Water Res.*, 1998, **32(7)**, 2089.
- 22 C. H. Giles, T. H. MacEwan, S. N. Nakhwa and D. Smith, *J. Chem. Soc.*, 1960, **3**, 3973.

Capítulo VI

Capítulo VI

PERSPECTIVAS DE LAS TIERRAS DIATOMEAS (TD) EN LA QUÍMICA ANALÍTICA Y EN EL MEDIO AMBIENTE.

Perspectivas de las tierras diatomeas (TD) en la química analítica y en el medio ambiente.

Muchos pesticidas y otros contaminantes orgánicos pueden desaparecerse del suelo por procesos físicos-químicos incluyendo volatilización, degradación fotolítica, degradación microbial y lixiviación. Esta última ha recibido una gran atención en los últimos años dado que es uno de los procesos que más contribuye a la contaminación de las aguas subterráneas tras los tratamientos en campos cultivados. En este proceso, las propiedades físico-químicas tanto de los pesticidas como del suelo, desempeñan un papel decisivo [1].

La limpieza y descontaminación total de suelos y sedimentos es siempre el objetivo final y tiene prioridad sobre aquellos métodos que guardan o inmovilizan el contaminante en el medioambiente reduciendo su efecto eco-toxicológico. Sin embargo, siempre existe una fracción muy importante del contaminante que no se ve afectada por los procesos de limpieza físico-químicos o biológicos, lo que constituye un obstáculo para las tecnologías de remediación medioambiental y su legislación.

Existen distintos medios de remediación de aguas y suelos, éstos se basan fundamentalmente en tres principios: inmovilización-estabilización, separación-concentración y destrucción.

La estabilización, como ya hemos comentado en la introducción, es un proceso que minimiza la velocidad de migración de los contaminantes y reduce la toxicidad de éstos. Puede definirse como: “el proceso mediante el cual los contaminantes quedan total o parcialmente inmovilizados por la adición de un medio que actúa como soporte aglomerante u otros modificadores” [2]. Durante el proceso de estabilización, algunos contaminantes pueden destruirse y otros pueden «desaparecer» como resultado de la volatilización.

En la bibliografía existente no se recoge ninguna aplicación analítica directa de las tierras de diatomeas (TD) para la estabilización y remediación de espacios contaminados con pesticidas. La utilización de este material como filtro para la

obtención de aguas potables [3] resultó una premisa importante para evaluar la posibilidad de establecer un procedimiento de remediación de pesticidas mediante su adsorción en este substrato geológico.

Teniendo en cuenta todo lo anteriormente expuesto acerca de la remediación de suelos y aguas junto con los resultados obtenidos durante el desarrollo de esta tesis (capítulo IV y V) respecto a la capacidad de las TD para adsorber atracina y varios pesticidas organofosforados, se ofrece la posibilidad de usar este material como soporte y aplicarlo en distintos fines:

- Analítico: estabilización de pesticidas
- Remediación ambiental: limpieza de aguas lixiviadas contaminadas tras el regadío.

Para llevar a cabo estos dos objetivos fue necesario determinar inicialmente si las TD eran capaces de inmovilizar de forma permanente los analitos sin liberarlos al ambiente en condiciones favorables a la desorción.

El plan de trabajo seguido cuya finalidad es la búsqueda de nuevas aplicaciones de las TD en química analítica y en remediación ambiental, ha estado constituido por las siguientes etapas:

- ❖ Desorción de pesticidas de las TD simulando un caso real práctico.
- ❖ Estabilidad de los pesticidas en TD.
- ❖ Evaluación de la posible remediación de agua del lixiviado y de espacios contaminados.

1. Desorción de los pesticidas

Para realizar estos estudios se utilizaron tierras de diatomeas procedentes de Marruecos cuya composición química está señalada en los capítulos IV y V.

Con el fin de evaluar la posible desorción de los pesticidas estudiados y determinar si las TD eran capaces de inmovilizar de forma permanente a los analitos sin liberarlos al

ambiente, se realizaron, una serie de experimentos en discontinuo, reteniendo los pesticidas (atrazina, metil-paration y clorpirifos) en el substrato.

Inicialmente se añadieron 4 μ g de cada pesticida en 20ml de agua milli-Q (0.2 ppm) a un vaso de reacción que contiene 100mg de TD. Posteriormente, la mezcla se sometió a una agitación mecánica durante media hora para asegurar el equilibrio de adsorción. El sistema se centrifugó durante 5 min y el líquido sobrenadante se recogió para proceder al análisis de los pesticidas mediante CG tras su extracción y preconcentración en fase sólida siguiendo el procedimiento descrito en el capítulo V.

El procedimiento operatorio llevado a cabo en este estudio se representa en la figura VI.1.

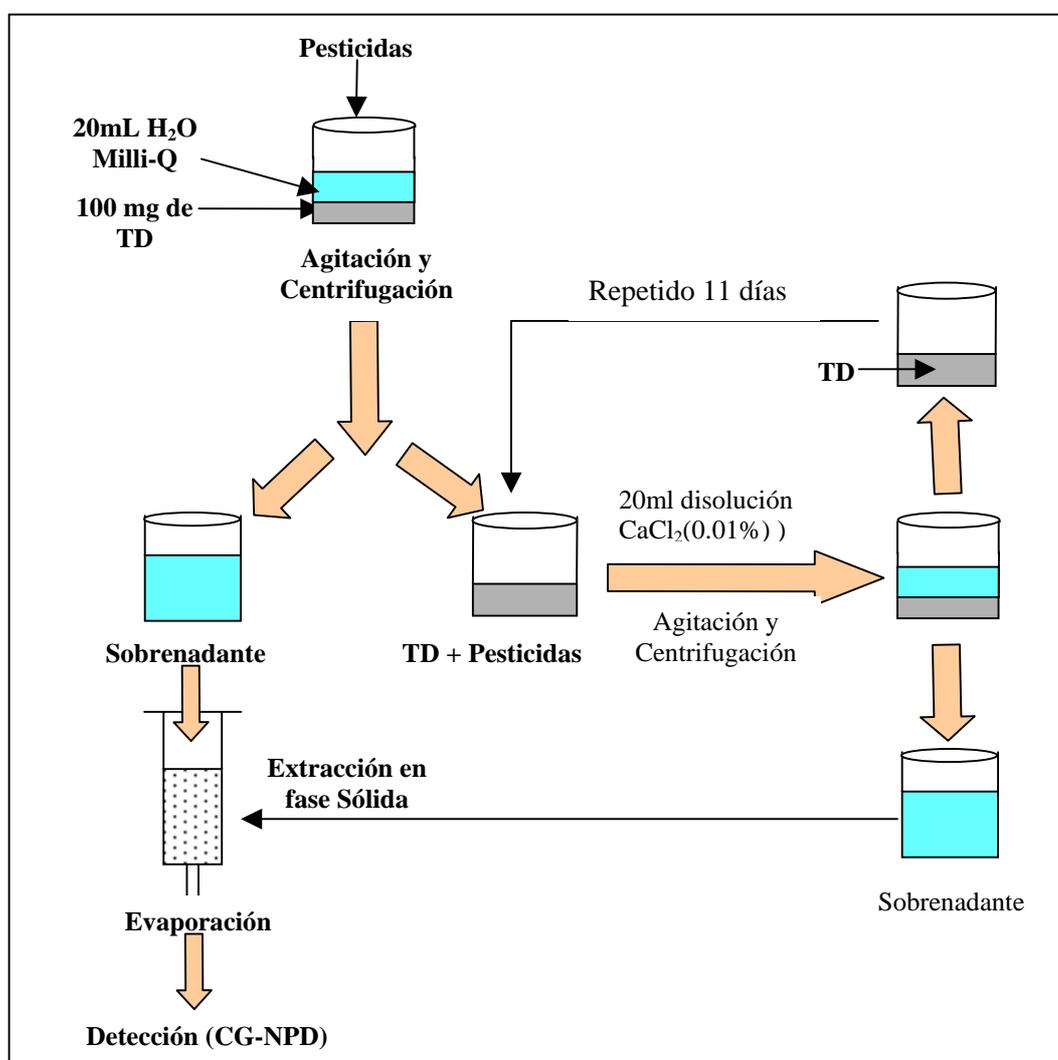


Figura VI.1.- Procedimiento utilizado en el estudio de adsorción y desorción: detección de los pesticidas por CG-NPD.

El porcentaje de retención de pesticidas en las TD se muestra en la tabla VI.1.

Pesticidas	Atrazine	Me-paration	Clorpirifos
% Retenido en DE	41.2	71.5	83.7

Tabla VI.1.- Estudio de adsorción de los pesticidas en DE.

Seguidamente se realizaron ensayos para comprobar la posible desorción de los analitos. Para ello se puso en contacto las tierras de diatomeas cargadas con los pesticidas con 20mL de una disolución de CaCl_2 (0.01%) para simular un caso real. Tras una agitación magnética de 24h. Se separó la tierra de diatomeas del sobrenadante analizando los posibles pesticidas que aparecieron en este último siguiendo el procedimiento mencionado en el capítulo V. Esta misma tierra con los pesticidas se someterá de nuevo al ensayo de desorción durante un tiempo máximo estudiado de 11 días, a fin de controlar la cantidad de pesticidas liberada en dichos ensayos.

Los resultados correspondientes a este estudio se muestran en la figura VI.2, en ella se puede comprobar que, al contrario que en el caso de adsorción la eficacia del proceso de liberación fue baja siendo un proceso de desorción muy lento, liberando sólo un total de 2.4% (de la cantidad adsorbida) del pesticida clorpirifos durante once días. De los otros pesticidas, solo se desorbió un 0.07% de atracina en los siete primeros días y el metil-paration no se desorbió.

Este fenómeno observado de liberación lenta puede explicarse como resultado de una fuerte interacción específica entre TD-pesticida en el proceso de adsorción y/o difusión de los pesticidas los cuales penetran en los poros del adsorbente quedando totalmente atrapados, lo que hace imposible su liberación.

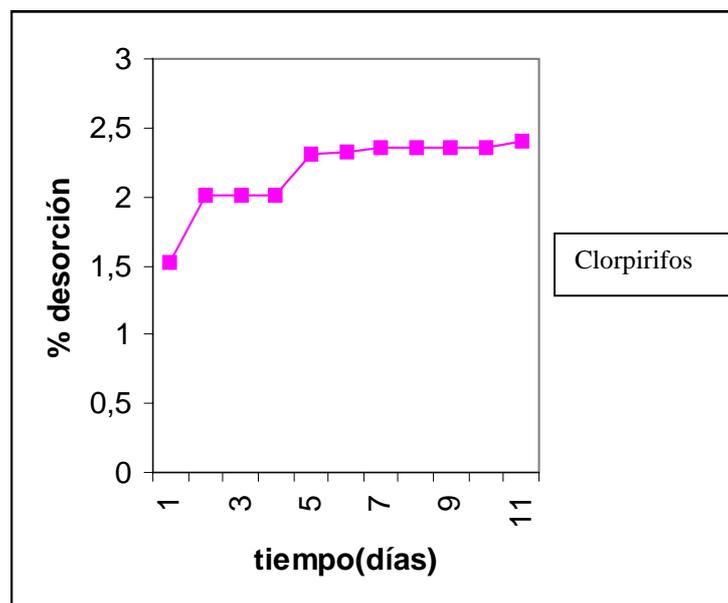


Figura VI.2.- Estudio de desorción.

2. Estabilidad de los pesticidas en TD

Cuando una muestra llega al laboratorio no siempre es posible analizarla de forma inmediata, es necesario conservarla para evitar la pérdida o contaminación de los analitos. Como ya se ha mencionado la mayoría de los pesticidas presentan una alta inestabilidad en disolución, por lo que es necesario recurrir a diversas técnicas de conservación durante su almacenamiento previo al análisis. En algunos casos esta conservación suele ser cara, difícil de conseguir y puede originar diversas interferencias en la determinación analítica (congelación, liofilización, adición de conservantes y estabilizantes).

Teniendo en cuenta todo esto, encontrar un substrato que sirva de estabilizante-immobilizante de los pesticidas presenta un gran interés desde el punto de vista analítico.

Por ello, y basándonos en los experimentos anteriores de la desorción se evaluó el empleo de las tierras diatomeas como soporte para favorecer la estabilidad de algunos pesticidas (usándolo como un sistema de retención directo de los analitos). Por está

razón, se realizó un estudio de la estabilidad de los pesticidas reteniéndolos en las tierras de diatomeas a tres temperaturas distintas durante un periodo de tiempo de más de dos meses.

Para llevar a cabo la experimentación de este apartado, se realizó, un ensayo con los siguientes pesticidas: atracina y clorpirifos, el cual consistía en poner en contacto en un vaso de reacción 3g de las tierras diatomeas con 12 μ g de los pesticidas en 20 mL de metanol para favorecer su adsorción (4 μ g de pesticidas/g de TD).

En la figura VI.3 se muestra el procedimiento seguido para el estudio de estabilización de pesticidas en TD.

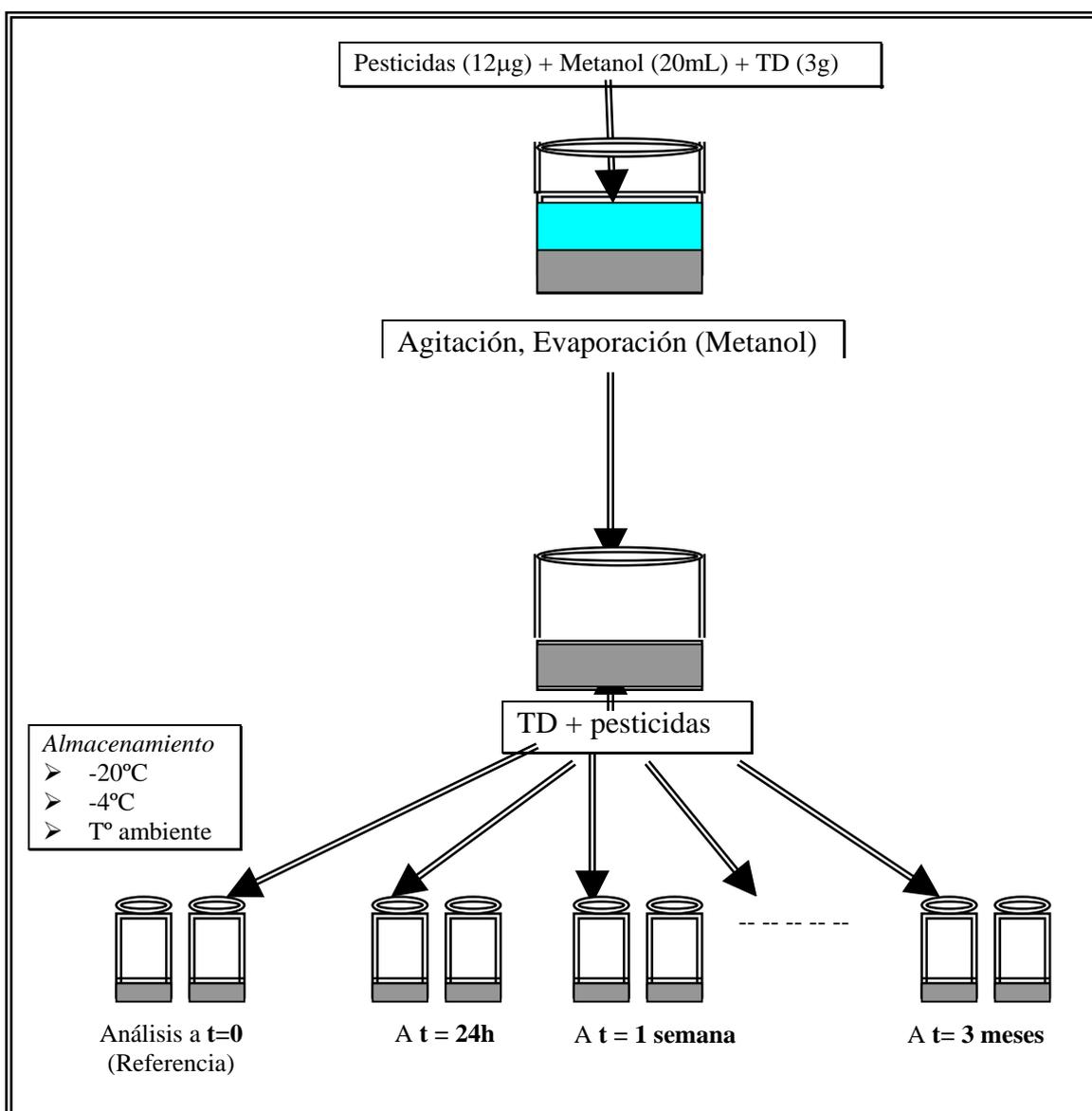


Figura VI.3.- Procedimiento utilizado en el estudio de estabilidad.

La mezcla se sometió a agitación mecánica durante 10 minutos y se dejó en reposo para evaporar el metanol. A continuación se procedió a la división de las tierras de diatomeas (con los pesticidas adsorbidos) que se almacenaron en viales a tres temperaturas diferentes -20°C , -4°C y a temperatura ambiente ($20-25^{\circ}\text{C}$). Los pesticidas así adsorbidos se mantuvieron en las condiciones específicas hasta el momento del análisis. La desorción de los pesticidas de las TD se llevó a cabo mediante la extracción de los analitos con una mezcla hexano-acetona (1:1) en un baño de ultrasonidos durante 25 minutos. Este proceso resultó ser eficaz para dicha desorción. El análisis de los extractos se llevó a cabo mediante la técnica CG-NPD.

La estabilidad de los pesticidas mencionados se evaluó comparando los resultados obtenidos a -20°C , -4°C ó temperatura ambiente con los obtenidos en el análisis de las muestras del primer día de almacenamiento ($t=0$) utilizando el factor R y la incertidumbre U de las medidas realizadas.

El factor R se calcula como el cociente entre la concentración (X) de un determinado analito a una temperatura y un tiempo determinados y la concentración obtenida a $t=0$ ($X_{(t=0)}$).

$$R = X/X_{(t=0)}$$

La incertidumbre en cada punto U viene dada por la expresión:

$$U = (CV^2 + CV_{(t=0)}^2)^{1/2} \cdot R/100$$

Donde CV es el coeficiente de variación de las medidas realizadas

Pesticida	T° -20 °C	-4 °C	T^a ambiente (20-25°C)
<i>Clorpirifos</i>	3 meses *	3 meses	2 meses
<i>Atracina</i>	+ de 2 meses	+ de 2 meses	+ de 2 meses

Tabla VI.2.- Estudio de estabilidad de los pesticidas.

* Máximo tiempo ensayado

Los resultados de este estudio se muestran en la tabla VI.2, donde se puede apreciar que el clorpirifos fue estable durante más de tres meses (máximo tiempo ensayado) a las temperaturas de -4°C y -20°C mientras que a la temperatura ambiente fue estable sólo

durante un periodo de dos meses. La atracina resultó ser estable en el soporte de las diatomeas durante dos meses a todas las temperaturas ensayadas.

Las tierras de diatomeas fueron capaces de estabilizar a la atracina y clorpirifos durante dos meses a temperatura ambiente. Las causas de inestabilidad, detectadas a temperatura ambiente y en tiempos superiores a los dos meses no fueron establecidas ya que no se analizaron los posibles productos de degradación.

Como consecuencia de este estudio realizado se abren nuevas perspectivas a la aplicación de las tierras de diatomeas en la química analítica:

- La retención de estos pesticidas en las tierras de diatomeas ofrece la posibilidad de efectuar el muestreo directamente en campo, pudiendo ser usado como técnica sencilla de almacenamiento y conservación durante elevados periodos de tiempo.
- Cabe también la posibilidad de usar las tierras de diatomeas como soporte para favorecer la estabilidad de algunos pesticidas (usando un sistema de retención directo de los analitos).
- Muy posiblemente, el sistema de retención-extracción de pesticidas en TD puede emplearse como un nuevo método de preconcentración y limpieza de muestras.

3. Evaluación de la posible remediación de agua del lixiviado y de espacios contaminados

La búsqueda de nuevos métodos de remediación de aguas y espacios contaminados y los resultados obtenidos de los estudios anteriores con las TD han contribuido a la aplicación de este material como substrato para remediar aguas lixiviadas tras un proceso de regadio.

Con objeto de remediar estas aguas lixiviadas se llevó a cabo un estudio preliminar a fin de determinar la movilidad de los pesticidas en distintos suelos durante el proceso de regadio.

Para este estudio se dispuso de dos suelos, proporcionados por el departamento de Química y Análisis Agrícola, de la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos

(Universidad Politécnica de Madrid). Las características más importantes de estos suelos se muestran en la tablaIV.3.

TablaIV.3- Características de suelos utilizados para el estudio de remediación.

	Pantoja	El Molar
Arena (%)	57	92
Limo (%)	17	8
Arcilla (%)	26	0.3
pH	8	6

Las diferencias que presentan estos suelos en cuanto a sus contenidos y sus pH's hacen que se les pueda considerar representativos y adecuados para nuestros estudios de remediación.

La contaminación de las aguas subterráneas se debe fundamentalmente, al porcentaje de filtración, adsorción y degradación a través del perfil del suelo y se puede evaluar por diferentes métodos. El coeficiente de partición suelo-agua y los coeficientes de adsorción se usan para predecir la movilidad de los pesticidas en los suelos, éstos se han determinado experimentalmente en laboratorios usando columnas rellenas de los suelos objeto de estudio. No obstante, el transporte y la movilidad de los pesticidas en suelos siguen siendo una incógnita lo que pone de manifiesto la necesidad de proseguir la investigación en procesos que simulen la movilidad real de pesticidas en distintos tipos de suelos de cuyos estudios se deduzca como evitar más daños respecto a la contaminación de aguas superficiales y subterráneas.

Por todo lo expuesto se ha diseñado un estudio experimental encaminado a mejorar los conocimientos en esta área y determinar el comportamiento de atrazina, metil-paration y clorpirifos en dos suelos con características diferentes (Molar y Pantoja).

Para llevar a cabo este estudio se prepararon una serie de macetas de (9 cm de altura) con un contenido de 500g de tierras Molar y Pantoja. Inicialmente tras saturar el suelo con agua, se adicionó una disolución que contenía 2 μ g de pesticidas (atracina, metil-paration y clorpirifos) por cada g de tierra. Posteriormente las tierras se regaron con volúmenes de 40mL de una disolución de CaCl₂ (0.01%) cada dos días durante los dos meses que duró la experimentación.

El liquido lixiviado al día siguiente después de cada experiencia se colectó durante las 24 horas posteriores a cada riego y los pesticidas en dicho lixiviado se determinaron mediante CG-NPD. Paralelamente se realizó un blanco con cada uno de los suelos estudiados en las mismas condiciones.

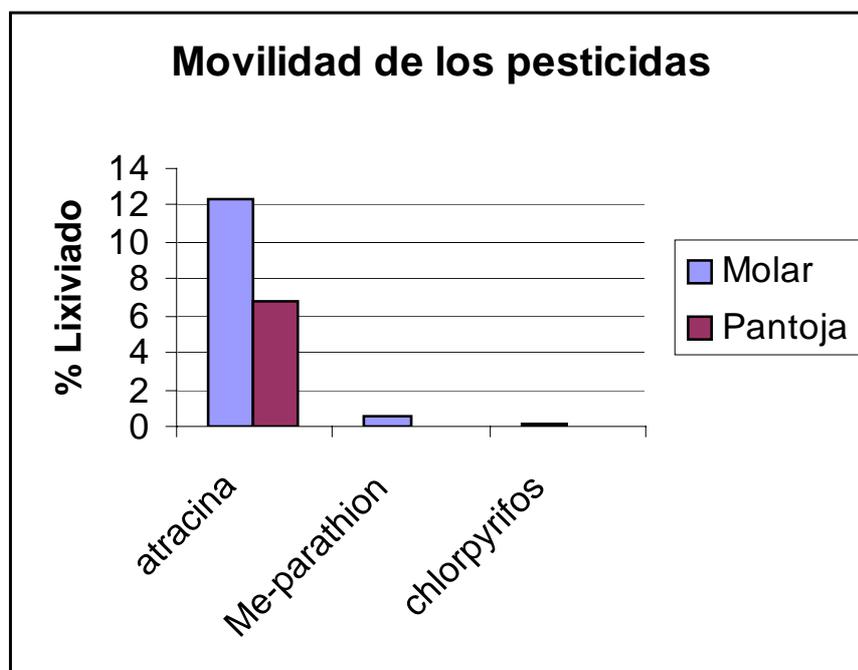


Figura VI.4 .- Estudio de la movilidad de pesticidas en suelos.

La figura VI.4 muestra la cantidad de pesticida lixiviado tras el experimento con los dos suelos tratados, Molar y Pantoja. Como puede apreciarse la atracina es el pesticida que presenta una mayor movilidad en ambas tierras, mientras que el metil-paration y el clorpirifos prácticamente no se lixivian. Por esta razón se eligió la atracina para realizar los estudios posteriores de tratamiento y limpieza de aguas lixiviadas tras el regadio.

La baja lixiviación experimentada por el clorpirifos y metil-paration en el suelo de Pantoja puede deberse fundamentalmente a las características del suelo, el cual contiene un 26% de arcilla, y a las características de los propios pesticidas como son la solubilidad, la volatilidad y también el elevado coeficiente de adsorción en suelo (K_{oc}) lo que produce su retención en la tierra impidiendo la lixiviación.

En general la movilidad en el suelo “Molar” es mas alta que en “Pantoja” para todos los pesticidas estudiados lo que justificó su elección como suelo de estudio para la remediación.

La posibilidad de emplear la TD con fines de remediación se llevó a cabo empleando 125g de suelo “Molar” colocados en pequeñas macetas de 5 cm de altura (profundidad). La elección de este tipo de macetas, cuyo diseño se puede ver en la figura VI.5 se debió a la posibilidad de obtener volúmenes grandes de lixiviado y a la posibilidad de monitorizar muchas macetas en un tiempo relativamente corto.

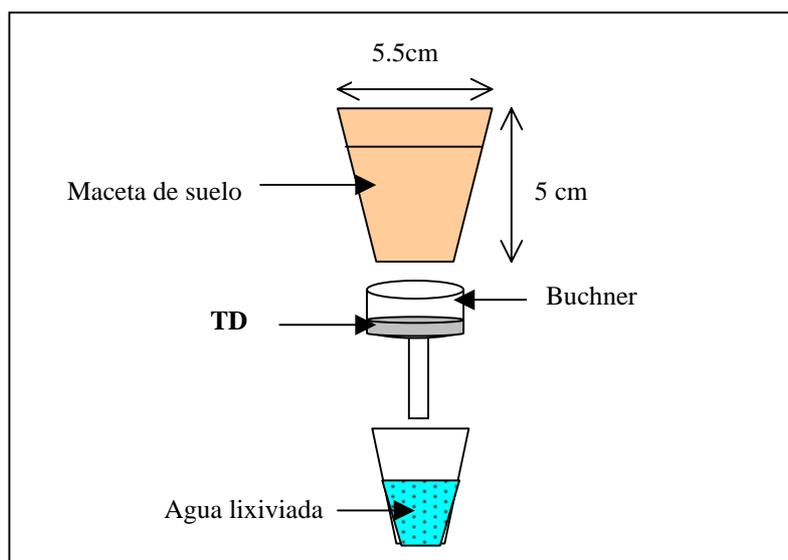


Figura VI.5.- Diseño del experimento de remediación.

El experimento llevado a cabo se realizó de la misma manera que en el estudio anterior. Se saturó la tierra con agua, luego se aplicó un volumen de 12.5ml de una disolución de 20ppm del pesticida atracina (250 μ g). Seguidamente se regó con volúmenes de 12.5ml de agua cada dos días durante los 10 días de experimentación.

Los líquidos lixiviados recogidos durante las 24horas posteriores a cada riego, se pasaron por un filtro que contenía las tierras diatomeas (0.5g) situadas éstas, en un

embudo de filtración (buchner) colocado justo debajo de cada maceta como indica la figura VI.5. Finalmente se analizaron los pesticidas en los lixiviados, se realizaron tres réplicas y tres blancos (sin filtración a través de TD).

Como se desprende de la figura VI.6 en las dos primeras etapas la masa lixiviada de pesticidas se reduce prácticamente a la mitad cuando se emplean las tierras diatomeas con respecto a la cantidad lixiviada en su ausencia mientras que en la tercera no existen diferencias significativas entre ambos lixiviados.

El hecho de que en el tercer lixiviado no se haya retenido pesticidas en las diatomeas podría atribuirse a un efecto competitivo entre los pesticidas y la materia orgánica. No debemos olvidar que las TD pueden actuar como adsorbente de un elevado número de compuestos.

hay que indicar que el espesor de la capa de TD es muy pequeño por lo que se podría aumentar el % de pesticida retenido si se aumenta el espesor.

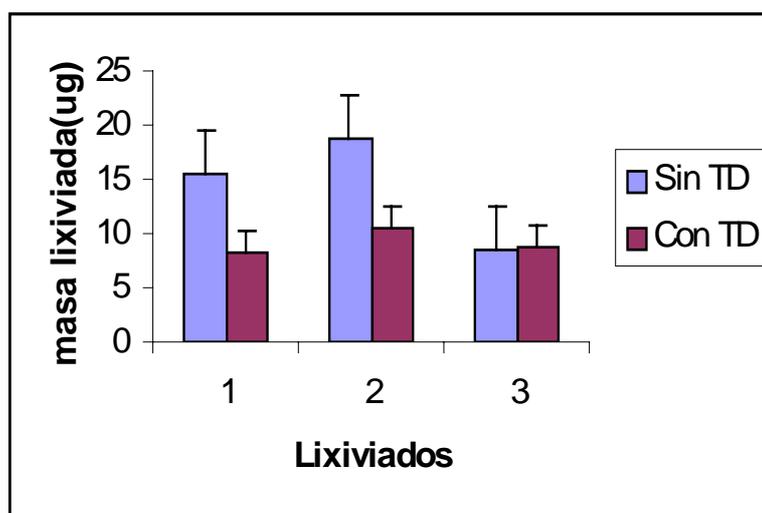


Figura VI.6.- Cantidad de pesticidas lixiviada en tres procesos llevados a cabo de forma secuencial.

Estos hechos ponen de relieve que la utilización de este material en macetas con cámara de lecho filtrante es útil para disminuir posibles contaminaciones en invernaderos en zonas de regadío o como solución inicial de remediación y limpieza de aguas que hayan sido contaminadas con pesticidas de forma accidental, puesto que con filtros de TD

debidamente situados se podría eliminar de manera sencilla y rápida más de un 50% de los contaminantes.

Estos resultados preliminares representan buenas perspectivas en el área de remediación de aguas y espacios contaminados e inducen a proponer nuevos ensayos y experimentos más detallados encaminados a resolver problemas analíticos de esta índole, dejando por tanto, el tema abierto para una investigación futura.

Bibliografía

- [1] Markus Flury *J. Environ. Qual.* 25 (1996) 25.
- [2] Conner J. R.: *Chemical Fixation and Solidification of Hazardous wastes*, Van Nostrand Reinhold, New York, NY, (1990) 692.
- [3] Milisiv V., Bersillon J.L., *Filtr., Sep.*, **23**(6) (1986) 347.

Discusión Integradora

DISCUSIÓN INTEGRADORA

El trabajo realizado en la presente memoria constituye una de las líneas de nuestro grupo de investigación encaminada a la determinación de pesticidas y otros contaminantes de interés medioambiental, así como a la posible remediación de espacios contaminados.

La finalidad de la presente memoria podría resumirse en dos grandes partes:

1.- El desarrollo de nuevos métodos de tratamiento de muestras de interés para la determinación de pesticidas de diferente naturaleza en muestras de alimentos y medioambientales.

2.- El empleo y evaluación de substratos naturales como adsorbentes de pesticidas para su estabilización y posterior aplicación a la remediación de aguas contaminadas.

La primera parte del trabajo está integrada por tres capítulos, en todos ellos se utilizó la cromatografía de gases como técnica de separación con distintos tipos de detectores en función de la naturaleza de los analitos a determinar.

1.A.- En este capítulo se ha estudiado la cinética de degradación natural de cinco pesticidas, con diferentes propiedades químicas y distinta naturaleza, en naranjas.

1.B.-En este capítulo se ha desarrollado un método rápido y sencillo de extracción de pesticidas en naranjas basado en el empleo de microondas.

1.C.- Este tercer capítulo conlleva el empleo de la técnica de microextracción en fase sólida para la determinación de pesticidas en muestras de suelos contaminados.

En la segunda parte de la memoria integrada también por tres capítulos, se ha utilizado las tierras diatomeas con distintas finalidades: como adsorbentes y como estabilizantes de pesticidas.

2.A.- Estudio de la capacidad de adsorción de las tierras diatomeas de dos pesticidas de distinta naturaleza y estructura.

2.B.- Evaluación de la eficiencia de las tierras diatomeas para remediar aguas medioambientales contaminada con pesticidas de distinta naturaleza.

2.C.- En el tercer capítulo se ha llevado a cabo un estudio de la estabilidad de estos contaminantes orgánicos en las tierras diatomeas, y se ha evaluado la capacidad de las tierras diatomeas como substrato natural en la remediación de aguas lixiviadas contaminadas tras el regadío.

A continuación se pasa a discutir y justificar brevemente la sistemática de cada uno de los capítulos.

PARTE 1

Capítulo I. El hecho de la elevada utilización de pesticidas en la agricultura y los posibles efectos tóxicos que pueden causar en el organismo ha originado que sean unos de los contaminantes ambientales más ampliamente estudiados.

Los pesticidas después de su aplicación a un cultivo dado pueden experimentar procesos de transformación y de penetración al interior de la fruta o vegetal, tanto de los posibles productos de degradación como del producto madre. En los países mediterráneos el consumo de frutas y verduras es muy elevado, destacando la naranja como fruta base en la alimentación, por ello existe un gran interés en evaluar la posible contaminación de esta fruta por parte de los pesticidas que se aplican en este tipo de agricultura.

Este estudio se ha centrado sobre dos familias de pesticidas triacinas y organofosforados que han sido seleccionados por su elevado uso en tratamientos agrícolas en nuestro País y por poseer distintas propiedades desde el punto de vista de solubilidad, polaridad y volatilidad, pudiendo de esta manera extrapolar los resultados obtenidos a otros contaminantes con características similares.

En este capítulo se ha llevado a cabo un estudio de la cinética de degradación natural de atracina y cuatro pesticidas organofosforados (metil-paration, cloropirifos, fenamifos y metidation) y su posterior determinación en naranjas con objeto de comprobar la permanencia o no de dichos pesticidas en la fruta tanto en la cáscara como en la pulpa.

El método empleado en la extracción de dichos pesticidas y sus productos de degradación fue un método convencional que consistió en el empleo de un sistema de

trituration y posterior empleo de acetonitrilo como disolvente de extracción. A pesar de que los resultados obtenidos con la extracción llevada a cabo fueron buenos y las recuperaciones de todos los analitos fueran cuantitativas, el método de tratamiento de muestra presentaba una serie de inconvenientes por requerir:

- ❖ Un volumen de disolvente orgánico elevado (100mL).
- ❖ Un tiempo de extracción alto.
- ❖ Una manipulación de la muestra y atención del operador importante.

Todo esto nos indujo a buscar un nuevo método de extracción que evitara los inconvenientes mencionados, por lo que la investigación se continuó orientada hacia la optimización de un nuevo método de preparación de muestra basado en el empleo de un horno de microondas.

Capítulo II. Por lo general la extracción de estos pesticidas de muestras complejas implica el uso del Soxhlet o de ultrasonidos. No obstante el tiempo requerido para obtener una buena eficiencia del proceso es largo y el volumen de disolventes orgánicos es por lo general bastante elevado.

En este capítulo de la memoria se ha evaluado un nuevo método de extracción que disminuye el tiempo requerido en la extracción, empleando pequeños volúmenes de disolvente orgánico y proporciona recuperaciones similares a los de los métodos establecidos de extracción de contaminantes orgánicos en muestras sólidas.

Con este fin se optimizaron los diferentes parámetros que afectan a la eficiencia del proceso de extracción de estos pesticidas en naranjas, usando un horno de microondas, como son: el tiempo y la temperatura de extracción, volumen y la naturaleza (de distinta polaridad) de los disolventes extractantes y la cantidad de la muestra.

Cabe destacar que cuando los enlaces analito-matriz son muy fuertes la extracción asistida por microondas es capaz de superar a otras técnicas de extracción, ya que por ejemplo la extracción Soxhlet no alcanza la energía necesaria para la ruptura de enlaces y la extracción con fluidos supercríticos (SFE) es extremadamente dependiente de la matriz de la muestra, con lo que las eficiencias de estas últimas extracciones son inferiores a las de MAE.

El uso de esta técnica de extracción permite reducir tanto el tiempo de extracción (20-30 minutos frente a 1.5-2 horas para extracciones convencionales) como el gasto de disolvente (10-15 mL frente a \approx 100 ml), proporcionando recuperaciones cuantitativas, sin la necesidad de realizar un “clean-up” de los extractos. Además, la manipulación de la muestra se disminuye drásticamente pudiéndose realizar extracciones simultáneas de hasta 12 muestras con una atención mínima por parte del operador.

El procedimiento de optimización de las variables que afectan al proceso de extracción llevado a cabo mediante la utilización de diseños factoriales permitió optimizar los diferentes parámetros antes mencionados y ver la influencia tanto de los factores principales como de las interacciones de primer y segundo orden sobre la respuesta del sistema.

Capítulo III. En la actualidad existe una verdadera preocupación por los efectos nocivos derivados de la utilización de pesticidas en sectores como la agricultura lo que hace que el control de los mismos tanto en las aguas como en los suelos y frutos donde se aplican sea fundamental. Todo ello hace necesario el desarrollo de nuevas metodologías analíticas que permitan la determinación de pesticidas en muestras de suelos con niveles de contaminación de pesticidas muy bajos.

En este capítulo se ha propuesto un método para la determinación de pesticidas de distintas características (atracina, metil-paration, cloropirifos, metidation y carbofenotion) en diferentes tipos de suelos usando la técnica de microextracción en fase sólida.

La influencia de la mayoría de los factores que afectan la determinación de estos pesticidas durante todo el procedimiento de extracción fue optimizada de forma rápida empleando el diseño factorial lo que permitió reducir el número de experimentos, con lo que se pudieron determinar estos pesticidas en un mínimo tiempo y gasto de extractante.

El procedimiento desarrollado es simple (la SPME se hace directamente en el extracto obtenido por ultrasonidos sin previa limpieza), rápido (alrededor de 50min para toda la preparación de muestra comparada con 1.5-2 horas para los métodos convencionales) utilizando una mínima cantidad de disolvente.

Los trabajos llevados a cabo en esta primera parte de la memoria ofrecen una serie de aportaciones como son:

Desarrollo de nuevas técnicas de extracción rápidas y eficaces, sencillas y que implican el empleo de pequeños volúmenes de disolventes orgánicos. Los métodos propuestos requieren, por lo general, un corto tiempo de atención del operador. De esta manera se resuelven los problemas inherentes a otras técnicas convencionales de extracción, por lo que con estos estudios se contribuye de forma clara a una química analítica limpia y más sencilla de tratamientos de muestra para la determinación de compuestos orgánicos.

PARTE 2

Capítulos IV, V y VI. La mayoría de los pesticidas aplicados en la agricultura bien sea por adición directa al suelo o sobre cultivos, pueden entrar como contaminantes en aguas naturales bien por aplicación directa o de forma indirecta por el drenaje de superficies cultivadas. Un ejemplo típico lo constituye el caso de los invernaderos cuyo uso se ha extendido a la mayoría de los países desarrollados y que generan aguas de lixiviado contaminadas con los diferentes pesticidas usados para proteger el cultivo. La contaminación de suelos y aguas con pesticidas ha tenido lugar en numerosos países, de ahí se haya planteado la necesidad de desarrollar distintas alternativas de remediación rápidas y baratas para minimizar cualquier impacto contrario a nuestro medioambiente en el futuro.

En este contexto, el desarrollo de un método de remediación basado en el uso de un material disponible y barato abre nuevas puertas a otras alternativas de reducir el riesgo de contaminación del medio ambiente.

En estos tres capítulos se evaluó la eficacia de las tierras diatomeas como un material para la remediación (adsorción y estabilización) de aguas contaminadas con pesticidas que han sido seleccionados por su elevado uso en tratamientos agrícolas y por su potencial presencia en aguas ambientales.

En primer lugar se evaluó de forma cuantitativa la capacidad de adsorción de los mismos pesticidas estudiados a lo largo de esta memoria por las tierras diatomeas. Con este fin se elaboraron las isotermas de adsorción en sistemas de combinación de dos pesticidas con características diferentes y se han optimizado las distintas variables que

afectan a la retención de dichos pesticidas en las tierras de diatomeas. En este sentido, se evaluó y se optimizó su posible uso como sistema de remediación de tres muestras diferentes de aguas contaminadas con los pesticidas objetos de estudio. Teniendo en cuenta todo lo anteriormente expuesto acerca de la remediación de aguas junto con los resultados obtenidos respecto a la capacidad de adsorción de atracina y varios organofosforados por las tierras de diatomeas (capítulos IV y V), se puede proponer este material para su utilización en estabilización de pesticidas y para la remediación de aguas lixiviadas tras el regadío.

La gran capacidad de adsorción de los pesticidas en las diatomeas nos indujo a pensar que si tuvieran una cinética lenta de liberación podrían aplicarse inmovilizados en TD a los suelos. Con este fin, se llevó a cabo un estudio de desorción pero se comprobó que su capacidad de liberación o desorción era mínima. A pesar de la parte negativa que implican estos resultados desde el punto de vista de que una liberación lenta de pesticidas hubiera permitido su aplicación en la agricultura y constituido un gran avance desde el punto de vista de disminuir el riesgo en su manipulación y proporcionar un gran ahorro económico, un aspecto positivo contemplando fue su posible utilización como agentes estabilizantes de suelos y/o aguas.

Otro de los aspectos importantes derivados del trabajo realizado se ha basado en evaluar la estabilidad de los pesticidas en las TD. Como es bien sabido numerosos pesticidas son sumamente inestables por lo que, por lo general, se requiere llevar a cabo su análisis rápido una vez obtenida la muestra. Numerosos autores proponen su conservación a -20°C y/o la liofilización de muestras. No obstante, estos aspectos también presentan elevados riesgos de recuperación de muestra o de pérdida de analitos en el proceso.

En esta línea, los resultados obtenidos sobre la estabilidad de pesticidas en diatomeas han demostrado que este soporte constituye un medio muy adecuado de estabilización de los mismos. Se ha comprobado su estabilidad durante el periodo de tiempo ensayado. Este aspecto constituye un avance inicial en la puesta a punto de métodos sencillos de estabilización de pesticidas y de su posible uso como sistema de muestreo en campo.

Conclusiones

CONCLUSIONES

Los resultados más relevantes del trabajo que se presenta en esta memoria se pueden resumir en las siguientes conclusiones, referidas a cada una de las partes principales del trabajo.

1.- NUEVOS MÉTODOS DE TRATAMIENTO DE MUESTRA PARA LA DETERMINACIÓN DE PESTICIDAS

➤ La degradación de pesticidas en las muestras de agua y naranjas se describió usando una curva de degradación de primer orden, los tiempos de vida medio de los pesticidas organofosforados en disolución acuosa variaron de 14 a 30 días, y en naranjas de 2 a 4 días, mientras que los de atracina fueron de 3 y 14 días respectivamente.

➤ Se establecieron los pasos de degradación y se detectó la presencia de productos de transformación en las muestras de agua mediante la técnica de cromatografía de gases con detector de espectrometría de masas.

➤ Se demostró que los pesticidas aplicados a la naranja no atraviesan la cáscara puesto que no se detectaron estos contaminantes en la pulpa. Este hecho demuestra que la cáscara actúa de filtro protector de los residuos de pesticidas que se aplican en la agricultura.

➤ Del estudio de extracción de pesticidas en naranjas utilizando la técnica de MAE se concluye que los cinco pesticidas ensayados pueden ser extraídos de forma eficiente en 1 o 2 g de cáscara de naranja con 10 ml de una mezcla hexano: acetona (1:1) a 90 °C durante 9 minutos a la mitad de potencia de microondas.

➤ Las recuperaciones obtenidas en todos los casos fueron superiores al 93% con una desviación estándar relativa de 1-3%. Todo ello demostró que la extracción asistida por microondas es eficaz y adecuada para la extracción de pesticidas en muestras complejas como es el caso de naranjas.

- La técnica de MAE, por tanto, se presenta como una alternativa a las técnicas clásicas, reemplazando así a los métodos tradicionales de extracción los cuales presenta mayor manipulación de muestra, más gasto de disolventes orgánicos y mayor tiempo consumido en el proceso.
- Se ha desarrollado un método rápido y simultáneo para la determinación de diferentes pesticidas (atracina, metil-paration, clorpirifos, metidation y carbofenotion) en suelos basado en una extracción previa con metanol en ultrasonidos y la subsecuente microextracción en fase sólida de los analitos de la muestra.
- Se demuestra que el diseño factorial permite la optimización del proceso con un mínimo número de ensayos realizados.
- La recuperación e la determinación final de pesticidas en suelos empleando la SPME fue del 72 al 92% excepto para atracina, y con una desviación estandar relativa inferior al 14% en todos los casos.
- El método de SPME desarrollado, ha conseguido reducir el tiempo de extracción a 30 minutos tiempo que contrasta con las 2 horas empleadas en el caso de las extracciones convencionales de pesticidas en suelos. Por otra parte se requiere una menor manipulación de la muestra sin necesidad de aplicar ningún tipo de "clean up" adicional, por último el bajo consumo de disolventes le capacita ser como un método alternativo de rutina en la preparación de muestras para la determinación de pesticidas.

2.- EMPLEO DE LAS TIERRAS DIATOMEAS PARA LA ESTABILIZACIÓN DE PESTICIDAS Y LIMPIEZA DE AGUAS CONTAMINADAS:

- Mediante la aplicación de isotermas de adsorción se demostró la existencia de efectos competitivos de adsorción de la atracina y el cloropirifos por las tierras diatomeas. La retención de atracina se reduce en presencia de cloropirifos, el cual mostró una fuerte capacidad de adsorción en un intervalo de concentración de 0,1-10 mg/L .
- El proceso de adsorción de los cinco pesticidas en aguas de río y de depuradora tratada y no tratada demostró ser rápido, con una eficacia de retención en las

TD de más del 80%. La adsorción tiene lugar en los cinco primeros minutos de contacto para los cuatro organofosforados, mientras que para la atracina fue de 60% en los cinco primeros minutos y de un 80% pasados 50 minutos.

➤ Los procesos de adsorción de los pesticidas mencionados en TD no son completamente reversibles, y la adsorción depende de las propiedades físico químicas de los contaminantes.

➤ El empleo de las tierras diatomeas se presenta como un sistema prometedor para remediar aguas medioambientales contaminadas con atracina y cuatro pesticidas organofosforados (metil-paration, clorpirifos, fenamifos y metidation).

➤ La desorción de pesticidas se realizó simulando un caso real empleando una disolución de CaCl_2 (0,01%) y agitando magnéticamente durante 24 horas, el proceso demostró tener lugar en muy baja extensión, ya que sólo un 2.4% de clorpirifos y un 0.07% de atracina son desorbidos de la TD. Todo ello demuestra el elevado poder estabilizante de las tierras diatomeas sobre estos compuestos.

➤ Como consecuencia de la no desorción/desorción lenta, se realizó un estudio de la posible estabilidad de los pesticidas en TD a tres temperaturas distintas (-20°C, -4°C y temperatura ambiente 20-25°C) durante un máximo de dos meses. La atracina fue estable en el substrato durante los dos meses estudiados a todas las temperaturas mientras que el clorpirifos fue estable en el máximo tiempo estudiado a -20 °C y -4 °C y sólo cuatro semanas a temperatura ambiente.

➤ Finalmente, se demuestra la capacidad de este material como soporte para remediar las aguas lixiviadas de regadío y así proteger las aguas subterráneas en caso de contaminación de suelos con dichos pesticidas.

Anexos

Anexo I

ANEXO I.-GLOSARIO DE TERMINOS

- ACE: Acetilcolimesterasa.
- APCI: Ionización química a presión atmosférica.
- API: Ionización a presión atmosférica.
- ASPEC: Sistema SPE automatizado.
- CAR: Carboxen.
- CW: Carbowax.
- DAD: Detector de fotodiodos integrados.
- DVB: Divinilbenceno.
- ECD: Detector de captura electrónica.
- EI: Impacto electrónico.
- EPA: Agencia de Protección Medioambiental.
- ESP: Aerosol eléctrico.
- F: Fluorescencia.
- FAO: Organización para la Alimentación y la Agricultura.
- FBC: Factor de bioconcentración.
- FTD: Detector termoiónico de llama.
- GC: Cromatografía de gases.
- HPLC: Cromatografía líquida de alta eficacia.
- ISP: Aerosol iónico.
- K_{oc} : Coeficiente de partición suelo-agua.
- K_{ow} : Coeficiente de partición octanol-agua
- K_f : Coeficiente de Freundlich
- LC: Cromatografía líquida.
- LLE: Extracción líquido-líquido.
- LMR: Límites máximos de residuos.
- MAE: Extracción asistida por microondas.
- MS: Espectrometría de masas.
- NCI: Ionización química negativa.
- NPD: Detector nitrógeno-fósforo.
- OMS: Organización Mundial de la Salud.
- PA: Fibra con fase estacionaria de poliacrilato.
- PDMS: Polidimetilsiloxano.
- PAH: Hidrocarburos poliaromáticos.
- PB - Haz de partículas.
- PCB: Befenilos policlorados.

PCIC: Ionización química positiva

P_v: Presión de vapor.

PTV: Inyector con temperatura programada para grandes volúmenes.

RPLC: Cromatografía líquida en fase inversa.

RSD: Desviación típica relativa.

S: Solubilidad en agua.

SFE: Extracción con fluido supercrítico.

SPE: Extracción en fase sólida.

SPME: Micro-extracción en fase sólida.

TD: Tierras de diatomeas.

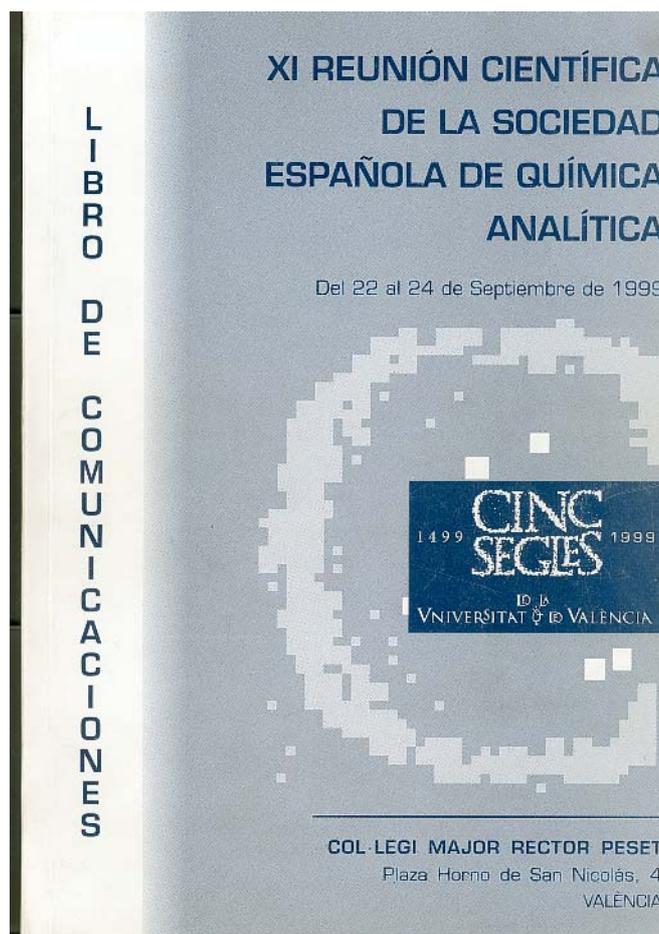
US EPA: Environmental Protection Agency de los Estados Unidos.

UV: Ultravioleta

VOC: Compuestos orgánicos volátiles.

Anexo II

Comunicaciones en congresos



ÓPTIMIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN DE ATRACINA Y OTROS PESTICIDAS ORGANOFOSFORADOS DE LAS NARANJAS USANDO UN HORNO DE MICROONDAS

A. BOUAID, A. MARTIN-ESTEBAN, P. FERNÁNDEZ Y C. CÁMARA

Departamento de Química Analítica. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Complutense de Madrid. 28040. Spain.

Estudios previos (1-5) han demostrado que el uso de hornos de microondas para la extracción de pesticidas o contaminantes orgánicos en general de matrices ambientales reduce el tiempo, el volumen de la extracción, y la contaminación de las muestras

En el presente estudio se desarrolla un método para la extracción y análisis de 5 pesticidas (Atrazina, Metil-Paration, Cloropirifos, Fenamifos y Metidation) en naranjas usando un horno de microondas. El análisis se lleva a cabo mediante cromatografía de gases con un detector selectivo nitrógeno-fósforo (NPD).

Se realiza una optimización de los parámetros físicos y químicos (Temperatura, tiempo, cantidad de muestra, naturaleza y volumen del disolvente) que influyen en la extracción de dichos pesticidas empleando un horno de microondas.

Han sido seleccionados los diferentes factores que afectan a la extracción de estos pesticidas como el tiempo, temperatura, volumen de disolventes extractantes y la cantidad de la muestra. Además se estudió la extracción con disolventes de diferentes polaridades. El método desarrollado requiere sólo unos minutos de extracción para obtener recuperaciones entre 92.4 y 100.7 para todos los pesticidas.

La optimización de estos factores se lleva a cabo mediante la utilización de programas de diseños experimentales.

Referencias:

- (1) H.M.Kingston and L.B. Jassie, Introduction to Microwave sample Preparation, Theory and Practice, American Chemical Society, Washington D.C., USA, 1988.
- (2) B.W. Renoe, American Lab., 8 (1994) 34-40.
- (3) V. Lopez Avila, R. Young and W.R. Beckert, Anal. Chem., 66(7) (1994) 1097-1106.
- (4) V. Lopez Avila, R. Young, J. Benedicto, P. Ho, R. Kim and F. W. Beckert, Anal.Chem., 67(13) (1995) 2096-2102.
- (5) S.J. Stout, A.R. daCunha and D. G. Allardice, Anal. Chem., 68 (1996) 653-658.

Removal of Atrazine and Chlorpyrifos from aqueous solutions by adsorption on Diatomaceous earth – Competitive adsorption.

K. AGDI, A. BOUAID, A MARTIN ESTEBAN, P. FERNANDEZ HERNANDO,
A. AZMANI* and C. CAMARA.

K. AGDI : Applied Physical Chemistry Laboratory, Department of Chemistry, Faculty of Science, Abdel Malek Essaadi University, Tetouan, Morocco. E-mail : khagdi@hotmail.com.

A. BOUAID : Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, Complutense University, Madrid, Spain. E-mail : bouaid@eucmax.sim.ucm.es.

A MARTIN ESTEBAN : Department of Chemistry, Environmental Faculty, European University of Madrid, Villaviciosa de Odon, E – 28670, Madrid, Spain. E-mail : antonio.martin@qui.cie.uem.es.

P. FERNANDEZ HERNANDO : Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, Complutense University, Madrid, Spain. E-mail : pilarher@eucmax.sim.ucm.es.

A. AZMANI * : Applied Physical Chemistry Laboratory, Department of Chemistry, Faculty of Science, Abdel Malek Essaadi University, Tetouan, Morocco. * Author to whom all correspondence should be addressed (Tel : 002129972423 poste : 47, Fax : 002129994500, E-mail : aazmani@latinmail.com).

C. CAMARA : Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, Complutense University, Madrid, Spain. E-mail : ccamara@eucmax.sim.ucm.es.