

## Metodologías para el estudio del impacto de contaminantes plaguicidas

---

Rosío T. Amparán-Salido, Jorge Téllez López y María del Carmen Navarro

Rodríguez

Universidad de Guadalajara, Centro Universitario de la Costa, Campus Puerto Vallarta,  
Departamento de Ciencias Biológicas, UDG-CA345 Ecología y Manejo de Zonas Costeras.

*Dirección Postal:*

Dra. Rosío T. Amparán Salido,

Centro Universitario de la Costa, Campus Puerto Vallarta, Universidad de Guadalajara.

Av. Universidad de Guadalajara No. 203,

C.P. 48280, Delegación Ixtapa, Puerto Vallarta, Jalisco, México.

Tels. (322) 22 622 59 Fax (322) 28 11 680

*Dirección electrónica:* [rocioamparan@yahoo.com.mx](mailto:rocioamparan@yahoo.com.mx) y [rocioa@pv.udg.mx](mailto:rocioa@pv.udg.mx)

---

**Resumen**

Actualmente la población humana se encuentra expuesta al contacto y a la ingestión de plaguicidas, localizados en los alimentos y directamente en el ambiente. Las consecuencias para la humanidad a largo plazo, pueden ser alarmantes. En México, el mercado de estos productos ha ido expandiéndose continuamente. Como consecuencias por el uso, se mencionan problemas como la disminución de la fertilidad, aumento de tipos de cáncer, malformaciones congénitas, diversos tipos de alergias, mutaciones genotípicas, problemas graves en el sistema nervioso central, desórdenes del sistema inmunológico humano, entre otros. Por la gran variedad de sustancias químicas no naturales existentes en el ambiente, así como el gran número de plaguicidas utilizados, durante un análisis puede presentarse una variedad de ellos, interfiriendo de manera cualitativa y cuantitativa en la determinación. Por lo tanto, es necesario estandarizar métodos analíticos para la determinación de plaguicidas, principalmente considerar aquellos que determinen en breve tiempo la presencia y el nivel del contaminante. La presencia y nivel del contaminante plaguicida es requerido para la evaluación de los riesgos inmediatos hacia la salud y el ambiente (agua, suelo, sedimento, aire, vegetación y fauna, principalmente). Es prioritario realizar investigaciones para estandarizar los métodos para determinar residuos de plaguicidas, considerando principalmente aquellos que presenten un menor precio, rapidez en la determinación, condiciones constantes de adsorción, los que mantienen una buena purificación de los extractos de las muestras, entre otros. Siendo necesario un acuerdo entre instancias de gobierno y laboratorios particulares, para trabajar con un mismo propósito.

**Palabras clave:** Metodologías, impacto, contaminantes, plaguicidas.

---

**Abstract**

***Methodologies for study of the impact of pollutant pesticides.***

Nowadays the human population is exposed to the contact and to the ingestion of pesticides located in the food and directly in the environment. The consequences for the long-term humanity, can be alarming. In Mexico, the market of these products has gone expanding constant. As consequences for the use, there are mentioned problems like the decrease of the fertility, increase of types of cancer, congenital malformations, diverse types of allergies, mutations genotípicas, serious problems in the nervous central system, disorders of the immunological human system, between others. For the great variety of chemical substances no existing natives set in, as well as great the number of used pesticides, during an analysis one can present a variety of them, interference in a qualitative and quantitative way in the determination. Therefore, it is necessary to standardize analytical methods paragraph the determination of pesticides, principally consider those that should determine shortly time the presence and level that of the pollutant. The presence and level of the pollutant pesticide is needed for the evaluation of the immediate risks towards the health and the environment (water, soil, sediment, air, vegetation and fauna, principally). It is priority to realize investigations to standardize the methods to determine residues of pesticides, considering principally those who should present a minor price, rapidity in the determination, constant conditions of adsorption, which support a good purification of the extracts of the samples, between others. Being necessary an agreement among instances of government and particular laboratories, to work with the same intention.

**Keywords:** Methodologies, impact, pollutants, pesticides.

## Introducción

En las últimas dos décadas, numerosos investigadores han venido denunciando la problemática que existe por el uso masivo y mal manejo de plaguicidas en el campo mexicano; así como, la contaminación del agua, suelo y en especial de los alimentos (Villa, 2004). Sin embargo, poco se sabe de lo que pasa con aquellos plaguicidas para el control de plagas domésticas y de jardín.

Dependiendo de las circunstancias, el contacto con plaguicidas puede dañar a la población humana. Por ejemplo, si el contacto es con dosis altas, puede producir hasta la muerte; pero dosis bajas con largos períodos de contacto u exposición pueden provocar enfermedades como algunos tipos de cáncer u otras poco conocidas y por lo tanto, difíciles de diagnosticar.

El número de personas que mueren por exposición directa a los plaguicidas es bajo; sin embargo, la mayoría de los plaguicidas no muestran un efecto inmediato, ya que su toxicidad queda latente y actúa paulatinamente. Decenas de miles de personas se envenenan con ellos todos los años padeciendo síntomas más o menos graves. La mayoría son agricultores u otras personas que trabajan con éstas sustancias. (Jimeno-Diestro, 2008; López y Gallardo, 2001). Villa (2004), menciona que la mitad de los envenenamientos y el 90% de las muertes en el mundo relacionado con plaguicidas, ocurren en los países en desarrollo. Los principales factores son: etiquetas inadecuadas, analfabetismo, nula asistencia técnica y vigilancia; así como el uso indiscriminado y la mala asistencia médica.

Actualmente la población humana se encuentra expuesta diariamente al contacto y a la ingestión de pequeñísimas cantidades de plaguicidas, localizados en los alimentos y directamente en el ambiente. Algunos autores sugieren que las consecuencias para la humanidad a largo plazo, pueden ser serias. Se mencionan problemas como la disminución de la fertilidad, aumento de tipos de cáncer, malformaciones congénitas,

diversos tipos de alergias, mutaciones genotípicas, problemas graves en el sistema nervioso central, desórdenes del sistema inmunológico humano, entre otros (Baldi *et al.* 2003; Douwes, *et al.* 2003; Mills y Yang, 2003; Shaw, *et al.* 2003; Loffredo, *et al.* 2001).

En México, el mercado de estos productos ha ido expandiéndose continuamente. En 1990 la Asociación Mexicana de Estudios para la Defensa del Consumidor ha identificado alrededor de 50 productos diferentes para uso en interiores, huertos familiares y jardines, en una gama de diferentes presentaciones (aerosoles, polvos, humos, collares, pelets, etc.).

La Asociación de Químicos Analíticos Oficiales de EUA (AOAC), publica periódicamente las referencias consideradas como oficiales y de calidad para poder realizar estudios analíticos de residuos de plaguicidas. Por la gran variedad de sustancias químicas no naturales existentes en el ambiente, así como el gran número de plaguicidas utilizados, durante un análisis puede presentarse una variedad de ellos, interfiriendo de manera cualitativa y cuantitativa en la determinación. Por lo tanto, es necesario estandarizar métodos analíticos para la determinación de plaguicidas, principalmente considerar aquellos que determinen en breve tiempo la presencia y el nivel del contaminante.

La presencia y nivel del contaminante plaguicida es requerido para la evaluación de los riesgos inmediatos hacia la salud y el ambiente (agua, suelo, sedimento, aire, vegetación y fauna, principalmente).

### **Consideraciones en la determinación de plaguicidas.**

#### **Tipo de muestra**

Es importante mencionar el procedimiento para tratar las muestras de diversos productos alimenticios, tejidos de animales y en el ambiente, para realizar el análisis de residuos de plaguicidas. Por ejemplo en las frutas y las verduras se analizan para determinar agua, proteínas, grasas, extracto libre de nitrógeno, fibra y cenizas; en la

leche se determinan principalmente las proteínas; en la carne sólo fibra y el extracto libre de nitrógeno que contiene carbohidratos y ácidos orgánicos. Los constituyentes fundamentales para tratar en los análisis de residuos de plaguicidas son agua, grasa y fibra en las muestras de poca humedad. Aunque la fibra y las macroproteínas del músculo no son removibles por los solventes orgánicos utilizados en la extracción, es necesario considerarlas por su potencial de retener los residuos de plaguicidas que se pueden adsorber o ser incorporados por estas estructuras. El extracto de una muestra puede contener cierta cantidad de agua, proteínas, grasas, carbohidratos o ácidos orgánicos. La cantidad relativa de cada uno de ellos varía según el tipo de muestra, el solvente utilizado en el proceso de extracción y el tipo de proceso de extracción. Los parámetros de un análisis se escogen de acuerdo con las siguientes clasificaciones de las muestras para procesar:

### **Preparación de la muestra**

De acuerdo a Waliszewski (2001), Cooper *et al.* (1988) y Vega (1985), cada grupo necesita su procesamiento específico para prepararlo; se trituran para obtener una muestra representativa y uniforme para el proceso analítico subsiguiente. Con excepción de las muestras líquidas, siempre es necesario mezclarlas y triturarlas para que la parte tomada para el análisis sea representativa de la muestra total. El tamaño final de las partículas de una muestra triturada debe ser adecuado para que el solvente extractor pueda interactuar con facilidad en ellas. Las partículas de muestras húmedas pueden llegar hasta unos milímetros, ya que reaccionan con los solventes que se mezclan con el agua y se rompen con facilidad durante el proceso de extracción. Las muestras de baja humedad presentan matrices rígidas, a la cual debe penetrar el solvente extractor para liberar los residuos de plaguicidas. Las muestras de poca humedad y ricas en grasa, requieren el tamaño final de las partículas menores de 0.5 mm obtenidas de la muestra durante el proceso de ultra homogenización. Los procesos de homogeneización de la muestra pueden iniciar la degradación del plaguicida expuesto a la variedad de

sustancias reactivas naturales. Al mismo tiempo, las muestras sometidas al proceso de secado pueden perder la mayor parte de los residuos por su volatilización.

Los estudios sobre procesos de extracción conducidos por Luke y Masumoto (1987), observaron degradación en las primeras seis horas después de una homogeneización, hasta de 50% de clorotalonilo en muestras de guisantes. Como resultado de este estudio se confirmó que, durante la trituración de la muestra, empieza el proceso de degradación de los plaguicidas, lo que depara resultados menores. Para el fenómeno de iniciación del proceso de degradación de los plaguicidas durante la homogeneización de la muestra, se deben considerar las propiedades fisicoquímicas de los plaguicidas al preparar la muestra para su análisis.

### **Extracción de la muestra**

Los métodos antiguos empleados en el análisis de residuos de plaguicidas para productos húmedos y poco grasosos, utilizan el proceso de extracción con una licuadora de gran velocidad y solventes no polares, como hexano o benceno. El uso de licuadoras tipo Waring en la extracción se aceptó por su gran eficacia y buena recuperación. El proceso de licuación reduce las partículas de la muestra e incrementa la interacción entre ésta y el solvente de extracción. Los problemas de emulsificación que se presentaban durante la extracción con solventes no polares, han sido resueltos por la aplicación de isopropanol como segundo solvente o al saturar el extracto con cloruro de sodio o sulfato de sodio.

Las determinaciones tratadas con insecticidas demostraron que con dos solventes de polaridad diferente se obtienen mejores resultados, comparado con la extracción realizada con un solo solvente no polar. Los resultados superiores obtenidos con dos solventes indican que el solvente penetró a la matriz de la muestra. Como consecuencia de varios estudios, los analistas de plaguicidas seleccionaron el acetonitrilo como el mejor solvente polar para la extracción, el cual proporciona un extracto bastante limpio y con recuperación cuantitativa de los plaguicidas; este solvente de extracción se extendió para casi todos los plaguicidas determinados en productos húmedos y poco grasosos. De

ésta manera, su uso eliminó la necesidad de extracciones múltiples para obtener la recuperación cuantitativa de los residuos; el factor de recuperación depende del volumen de acetonitrilo utilizado en la extracción (Mills *et al.* 1963). Técnicas similares de un solo paso de extracción se han desarrollado con acetona (Luke *et al.* 1988) y acetato de etilo (Waliszewski *et al.* 1988, 1997) como solventes de extracción. La razón del uso de estos solventes es la capacidad de disolver agua, grasa, proteínas y otros compuestos de la matriz de la muestra, además, pueden romper los enlaces entre el plaguicida y la matriz de la muestra, con lo que la extracción se define como el proceso de partición entre el contenido de la muestra y el solvente.

El análisis de las muestras ricas en agua y grasa (p. ej., carne y productos lácteos) requiere de solventes que se mezclan con el agua para desnaturalizar la muestra. Por lo general, en el análisis se emplean mezclas de solventes polares con no polares (p. ej., éter etílico y éter de petróleo) para extraer la grasa de la muestra. Los métodos analíticos diseñados para productos ricos en agua y grasa limitan el tamaño de la muestra, de la cual no se debe extraer más de 2 g de grasa. Las tolerancias establecidas para este tipo de productos están diseñadas con base en los lípidos extraídos y no en la muestra fresca o total. El análisis de productos ricos en grasa se limita principalmente a los plaguicidas liposolubles que se acumulan en ella; la menor parte y la de menos interés la constituyen los plaguicidas polares que se pueden encontrar básicamente en la fase acuosa de la muestra, después de la extracción de los plaguicidas no polares Waliszewski (2001).

El análisis de productos poco húmedos (como heno o paja), requiere que el solvente orgánico (p. ej., acetonitrilo) utilizado en la extracción se mezcle con agua, en cantidad aproximada 65 + 35 (Waliszewski *et al.* 1985). La acción del agua en este tipo de extracción consiste en la desactivación de los centros activos y de los grupos hidroxilos presentes en la fibra de celulosa que adsorben con gran fuerza a los plaguicidas (Waliszewski y Rezepczynski, 1980). Aparte de la desactivación, el agua utilizada rompe la estructura de celulosa, lo que permite una migración mucho más fácil de los residuos de plaguicidas hacia la fase orgánica del solvente.

---

## Valoración del proceso de extracción

Para precisar la exactitud de un método analítico, se realiza siempre un estudio de fortificación añadiendo una cantidad conocida del plaguicida a la muestra y más tarde se siguen todos los pasos que incluye el método. El porcentaje de recuperación, aunque no necesariamente proporciona las medidas de exactitud del método, puede indicar datos sobre la eficacia del paso de extracción de la muestra; esto señala que los plaguicidas, cuando se adicionan a la muestra, son adsorbidos de inmediato por la matriz de ésta. El error de los estudios de recuperación comienza en la extracción, cuando la muestra entera es licuada con el solvente. La recuperación alrededor de 100% se logra cuando la manera de fortificación consiste en rociar, por encima de la muestra, una solución de testigos y después se adicionan los solventes de extracción. Al contrario, se esperan resultados bajos al inyectar la solución de testigos dentro de la muestra y después de varias horas se procesa la extracción. Los resultados de los estudios sobre la extracción de algunos plaguicidas con solventes de diferente polaridad, ilustran la dificultad de diseñar un proceso de recuperación que refleje con exactitud la eficiencia de la extracción. Cuando las muestras de carne y leche fortificada con insecticidas han sido extraídas por la mezcla de hexano y éter etílico, la recuperación aumenta de 10 a 92%, a pesar de que sólo se extrajo 10% de las grasas de la carne y la leche. Las recuperaciones mayores de 10% indican que los insecticidas de la solución de testigos no penetraron a la matriz del glóbulo de grasa. Las recuperaciones bajas indican que los plaguicidas fueron adsorbidos por compuestos hidrofóbicos e hidrofílicos de la superficie del glóbulo de grasa. Al utilizar etanol en la extracción para destruir la membrana del glóbulo de grasa de 1,1, la recuperación de los plaguicidas aumenta de 77 hasta 92%. La recuperación menor de 100% se debe a las fuerzas de enlace en la fase acuosa de la muestra (Waliszewski *et al.* 1997; 1988; 1985 y Waliszewski y Rezepczynski, 1980).

Los estudios de fortificación, por tanto, deben revelar una evaluación de la exactitud del método analítico, de acuerdo con la cantidad del plaguicida agregado a la matriz de la muestra, antes de su extracción y el nivel de fondo que puede interferir en el porcentaje de recuperación.

Luke y Masumoto (1987), realizaron estudios con insecticidas marcados con  $C^{14}$  y les indicaron una buena recuperación al utilizar la homogeneización de la muestra con licuadora y una mezcla de solventes isopropanol y hexano. La radioactividad de  $C^{14}$  se recuperó cuantitativamente cuando a la extracción inicial con licuadora siguió la extracción completa en el aparato de Soxhlet utilizando la mezcla de metanol con cloroformo (Gorbach, 1977 citado por Waliszewski, 2001).

En una muestra de suelo se logró la extracción completa con una mezcla de solventes isopropanol y hexano. y se recuperó hasta 92% de los insecticidas, mientras que la extracción con acetato, de etilo o cloruro de metileno sin el paso de desactivación de los centros activos de la muestra de suelo, recuperó 77 y 65% de los plaguicidas, respectivamente (Burke *et al.* 1966). Al repetir los pasos de extracción, la recuperación de los plaguicidas de la muestra de suelo aumentó 85%. La desactivación de la muestra de suelo con agua, la cual disminuye las fuerzas de enlace, aumenta la recuperación de los plaguicidas, alcanzando hasta 98% (Waliszewski *et al.* 1985 y Waliszewski y Rezepczynski, 1980). El proceso de extracción con acetonitrilo desarrollado por Mills *et al.* (1963), presentó alrededor de 100% de recuperación de los plaguicidas, lo que dependió de la relación entre la cantidad de la muestra y el volumen de acetonitrilo utilizado, así como del número de extracciones.

Los resultados indican que la recuperación suficiente se logra cuando se utiliza la proporción del solvente y la muestra en cantidad de 2 a 1. Algunos autores señalan la obtención de valores bajos en los estudios de recuperación, originados por la imposibilidad del plaguicida para reaccionar con la matriz de la muestra al dejarlo en contacto por un corto tiempo. En los estudios de Szymczynski y Waliszewski (1982), las muestras fortificadas se dejaron por 24 horas para que el plaguicida penetrara a la matriz de la muestra o reaccionara químicamente con la muestra, estimulando las condiciones normales del ambiente, antes de pasar a la extracción. En estas condiciones, al alcanzar la recuperación mayor de 80%, justifican los resultados de concentraciones de plaguicidas determinados, ya que reflejan las concentraciones verdaderas de

contaminación. Cuando los resultados de extracción oscilan alrededor de 100% para una variedad de productos y plaguicidas, esto indica que la relación entre la matriz constituida por agua, proteínas, grasa y fibra de la muestra ha sido rota por la acción del solvente.

El método de Luke *et al.* (1988) sustituyó el acetonitrilo del método de Mills *et al.* (1963) por la acetona, y obtuvo valores parecidos. La extracción triple con acetona rompió en su totalidad los enlaces con la matriz de la muestra, dejando al final de la extracción un polvo blanco de celulosa. El método de Waliszewski y Waliszewski (1986a y 1997) reveló los resultados compatibles de recuperación con los métodos de Mills *et al.* (1963) y de Luke *et al.* (1988), y además, una elevada recuperación para los insecticidas polares, solubles en agua, como el Metamidofós.

Por lo tanto, y con base en los estudios mencionados, se pueden recomendar los tres solventes (acetonitrilo, acetona y acetato de etilo) como los más apropiados en la determinación de residuos de plaguicidas, tomando en cuenta la cantidad de agua contenida en la muestra para desactivar con agua los centros activos de una muestra seca.

Aunque es posible extrapolar el valor de la extracción entre las muestras pobres en grasa, el problema se complica con las muestras grasosas. Los estudios de fortificación antes mencionados, que proporcionaron la recuperación desde 77 hasta 92%, constituyen hasta la fecha el método reconocido y recomendado por la Asociación de Químicos Analíticos Oficiales de EUA (AOAC) para la extracción de grasas. Es importante mencionar que la (AOAC), publica periódicamente las referencias consideradas como oficiales y de calidad para poder realizar estudios analíticos de residuos de plaguicidas (Waliszewski, 2001).

### **Residuos enlazados y conjugados**

Los términos residuos enlazados y residuos conjugados provienen de estudios con plaguicidas marcados con elementos radioactivos que se aplicaron a plantas, animales y suelo; los cuales fueron no extraídos por métodos convencionales. Los plaguicidas y sus

metabolitos obtenidos de la matriz como resultado de la interacción con los productos naturales de las plantas, animales o suelo, se denominan residuos conjugados. El material radioactivo atrapado y que no se extrajo durante las extracciones con solventes, se denomina residuos enlazados. Hasta ahora, no se ha definido con exactitud qué parte de un plaguicida es atrapada por la estructura de la matriz, por un tipo desconocido de enlaces, o dónde los metabolitos de los plaguicidas son químicamente enlazados por un fragmento insoluble (Waliszewski, 2001; y Szymczynski y Waliszewski 1982).

Las investigaciones realizadas en el campo con plaguicidas marcados con el carbono  $C^{14}$  para comparar la eficacia de varios solventes orgánicos, indican al metanol como el solvente con mayor capacidad de recuperar el plaguicida marcado (Gorbach, 1977 citado por Waliszewski, 2001; y Wheeler *et al.* 1983). La mayor potencia del metanol en recuperar el plaguicida marcado con  $C^{14}$  se explica por su participación en reacciones solvolíticas, que liberan los plaguicidas enlazados de las matrices insolubles, así como por la mayor polaridad que permite competir con los enlaces electrostáticos entre el plaguicida y la matriz de una muestra.

Las tolerancias establecidas por las autoridades sanitarias no incluyen en sus normas a los residuos enlazados y conjugados (esto en Estados Unidos; para México se desconocen). Su grado de toxicidad en forma de un complejo se considera como baja, pero al liberarse en el tracto digestivo con los alimentos, en sus condiciones hidrolíticas, pueden presentar un valor tóxico que no se ha considerado; por ello, se recomienda el uso de condiciones hidrolíticas durante la extracción o un solvente de gran polaridad, que permita liberar a los plaguicidas atrapados por los enlaces de las sustancias naturales, para lograr la extracción completa de los residuos contenidos en una muestra estudiada (Gorbach 1977 citado por Waliszewski, 2001; y Szymczynski y Waliszewski, 1982).

### **Selección del solvente y la concentración del extracto**

La propiedad más importante es su temperatura de ebullición (t. eb.), que determina el tiempo necesario para concentrar el extracto a un grado requerido para alcanzar la sensibilidad de la técnica analítica. El uso de un solvente con temperatura de

ebullición baja, reduce significativamente el tiempo requerido para su concentración. Como ejemplo se puede citar uno de los métodos antiguos que utilizó una columna cromatográfica con carbono en la purificación del extracto de acetonitrilo. El método contempló la recuperación de los residuos de plaguicidas utilizando acetonitrilo (t.eb. 81.6°C), benceno (t. eb. 80.1 °C) y después acetato de etilo (t.eb. 77 °C). Al evaporar la mezcla de los solventes hasta 1 ml, se agregó isopropanol (t.eb. 82.5 °C) y se concentró dos veces, para remover los restos de acetonitrilo. Luke *et al.* (1988), en su método consideró el paso de purificación del extracto acetónico recuperando los residuos de plaguicidas de la columna con cloruro de metileno (t.eb. 39.8° C) y acetona (t. eb. 56.3 °C). Los residuos de cloruro de metileno que disuelven las fases de las columnas y afectan a los detectores de cromatógrafos de gases fueron removidos por éter de petróleo. El tiempo necesario para la concentración de los solventes en el método de Luke *et al.* (1988) fue de 15 min, en comparación con 1 a 3 horas necesarias para la concentración de los solventes pesados (Waliszewski, 2001; y Szymczynski y Waliszewski, 1982).

Las técnicas analíticas que utilizan hexano (t.eb. 69 °C) como solvente se pueden modificar si se sustituye por la fracción de éter de petróleo 40-60 °C o mejor por la fracción de 40-50 °C (Waliszewski y Rezepczynski, 1980). En comparación con el tiempo requerido para concentrar 100 ml de un solvente en el concentrador de Kuderna-Danish, el éter de petróleo necesita sólo 5 min, mientras el hexano demora hasta 20 min. Por ello, el éter de petróleo se puede utilizar en lugar de benceno (que además es muy tóxico), y el cloruro de metileno en vez de cloroformo o tetracloruro de carbono.

El uso de acetona en la determinación de residuos de plaguicidas presenta ventajas sobre el acetonitrilo, el cual afecta y se considera como un veneno para los detectores selectivos de cromatógrafos de gases; por ello es necesario un cambio de solvente eliminando los residuos de acetonitrilo antes de realizar una corrida cromatográfica. El metanol, cuya molécula es parecida a la de la acetona, no está permitido en el análisis residual por su propiedad solvolítica. Los estudios comparativos de la respuesta de un cromatógrafo de gases en soluciones de carbarilo en metanol y en

acetona, revelaron picos grandes y reproducibles en la solución acetónica, mientras que en la solución metanólica los picos apenas fueron detectados. Estos resultados indican una gran reactividad solvolítica del metanol. En otros estudios se han comparado las respuestas cromatográficas de las soluciones de clorotalonilo, preparadas en metanol, acetona e isooctano, y hay una respuesta de 70% en la solución metanólica en comparación con 100% de los otros solventes. Además, los estudios de concentración de los extractos en el aparato de Kuderna-Danish revelaron que el metanol prácticamente estaba destruyendo a los plaguicidas, razón por la que sólo se usa como participante de las mezclas de extracción para romper los enlaces entre el plaguicida y la matriz de una muestra (Waliszewski *et al.* 1997; y Waliszewski y Rezepczynski, 1980).

Para la concentración de extractos voluminosos hasta unos mililitros, algunos analíticos inclinan su preferencia al aparato de Kuderna-Danish, el cual con algunas modificaciones permite evaporar, en paralelo, varias muestras. El rotavapor con una baja presión requiere mucho cuidado para no perder los residuos de plaguicidas cuando el extracto se está evaporando casi hasta sequedad. Los estudios sobre la recuperación de plaguicidas durante la concentración de extractos con el rotavapor, indicaron que las mayores pérdidas de plaguicidas son causadas por el chorro de aire que entra y pasa por la muestra para equilibrar la presión. La modificación del aparato consistió en la eliminación de la manguera que conduce el aire hacia el matraz que contiene la muestra, y se eliminó así el paso directo de aire por la muestra; lo que proporcionó resultados sorprendentes durante el proceso de concentración, logrando hasta 100% de recuperación para los plaguicidas muy volátiles, como el Diclorfós y Aldicarb (Waliszewski y Waliszewski, 1992).

El chorro de nitrógeno se utiliza con frecuencia para reducir el volumen final de la muestra antes de analizarla por cromatografía de gases o líquidos. Se han detectado grandes pérdidas de la mayor parte de los residuos de plaguicidas, ya que son volátiles, y especialmente cuando el volumen del solvente se aproxima a sequedad. Las pérdidas bajo estas condiciones pueden ser menores cuando la solución se concentra antes del paso de purificación, ya que los residuos están protegidos por las sustancias coextraídas

procedentes de la muestra. El uso de la microcolumna de Snyder permite concentrar rápidamente la cantidad del extracto hasta 0.1 a 0.3 ml en baño maría y bajo un chorro de nitrógeno, sin tener pérdidas significativas de los plaguicidas. Esta técnica se recomienda sólo para las soluciones relativamente limpias, ya que los extractos crudos por la presencia de sustancias de origen natural, pueden causar pérdidas por proyección rápida del solvente (Waliszewski y Waliszewski, 1992).

### **Principios de purificación**

Durante el análisis de residuos de plaguicidas, de ser posible, se debe evitar el paso de purificación del extracto que siempre origina pérdidas de los plaguicidas o sus metabolitos. Hasta el proceso cromatográfico de permeación por geles que separa los compuestos químicos de acuerdo con su peso molecular, causa algunas pérdidas inexplicables, ya que teóricamente el plaguicida debería recuperarse en forma cuantitativa. El desarrollo de los detectores específicos de cromatógrafos de gases, redujo la necesidad del paso de purificación de los extractos, disminuyendo el fondo de la muestra, que no fue posible de lograr con el detector de captura de electrones (ECD) (Drescher *et al.* 1983 citados por Waliszewski, 2001; Waliszewski y Waliszewski 1986a; 1986b). Las muestras grasosas siempre requieren el paso de separación de las grasas, las cuales, por ser poco volátiles, se acumulan en el inyector del cromatógrafo y afectan el proceso de cuantificación y separación de los compuestos determinados, e interfieren también en la inyección subsiguiente. La purificación del extracto durante el análisis de plaguicidas a veces es indispensable, cuando en la determinación de una muestra no purificada se obtienen resultados irregulares con un gran fondo o el pico del plaguicida es deformado o sobrepuesto por otra sustancia procedente de la muestra. El proceso de purificación también resulta benéfico por el hecho de que el plaguicida se recupera de una columna con absorbentes que tienen un volumen característico y previamente establecido para un plaguicida, confirmando así su identidad (Drescher *et al.* 1983 citados por Waliszewski, 2001; y Waliszewski y Waliszewski 1986a; 1986b).

---

## **Partición**

Se utiliza para remover el agua y otras sustancias polares, solubles en agua como azúcares o almidones, de los extractos de la muestra. Esta técnica suele identificarse como la parte íntegra que sigue después de la extracción de una muestra. Mills *et al.* (1963), en su método utilizan la partición con agua para remover los solventes hidrosolubles utilizados en la extracción cuando su presencia no es deseada y pueden interferir en el proceso de purificación. Durante este paso, los plaguicidas con mayor grado de hidrosolubilidad (por ejemplo el Metamidofós) pueden presentar grandes pérdidas en su recuperación (Waliszewski y Waliszewski, 1986a). El método de Luke y Masumoto (1987) no contempla la adición de agua, por lo que revela una buena recuperación de los plaguicidas polares y no polares.

El contenido de grasa en el extracto se puede reducir por la partición entre el acetonitrilo y el éter de petróleo (Waliszewski, 1981; Waliszewski y Waliszewski, 1986b). El principio de esta técnica consiste en la poca solubilidad de las grasas en el acetonitrilo y una muy buena solubilidad en el éter de petróleo. Una muestra que contiene hasta 3 g de grasa en su extracto, por medio de la partición reduce su contenido a 0.2 g o menos, cantidad aceptable para la cromatografía de columna. Si se repite tres veces la partición entre el acetonitrilo y el éter de petróleo, muchas veces se habilita una muestra grasosa para su inyección inmediata al cromatógrafo de gases. Esta partición remueve sólo las grasas, y a veces es necesario realizar la purificación en la columna cromatográfica para separar los plaguicidas de los compuestos procedentes de la muestra que interfieren en la determinación final.

## **Cromatografía de adsorción**

### **Florisil**

Antes de su uso, el Florisil se activa en el laboratorio por un tiempo mínimo de 5 horas a 130°C. Su fuerza de adsorción se verifica por la elución de 1 ml de una mezcla de testigos de plaguicidas para identificar el porcentaje de recuperación, así como para establecer las mezclas de solventes idóneas para la recuperación cuantitativa de los

plaguicidas y la recuperación menor posible de sustancias que interfieren en la determinación cromatográfica.

Szymczynski y Waliszewski (1982), desactivaron el Florisil previamente activado a una temperatura de 130°C, pasando por la columna una mezcla de éter de petróleo y éter etílico con 2% de etanol (70 + 30) y los residuos de plaguicidas se recuperaron con una mezcla de éter de petróleo y éter etílico con 2% de etanol (94 + 6), lo que disminuyó de manera significativa el volumen de los solventes con una recuperación cuantitativa de los plaguicidas estudiados.

Para mejorar la separación de los plaguicidas de los carotenos y los sulfatos orgánicos procedentes de las muestras, cubrieron la superficie del Florisil con nitrato de plata (Beyer, 1981 y Thier, 1981 citados por Waliszewski, 2001 y Suzuki *et al.* 1979).

La purificación de los extractos en las columnas empacadas con Florisil se recomienda para los plaguicidas no polares o moderadamente polares (Viersino *et al.* 1971). Por ello, la estandarización del Florisil se realiza con compuestos relativamente no polares. Los plaguicidas polares, como el Metamidofós, debido a su fuerte enlace con el adsorbente, son casi imposibles de recuperar. Cierta variación en la fuerza adsorbente del Florisil entre los lotes diferentes puede afectar la elución de los plaguicidas estudiados, lo que indica cambios importantes en el volumen de elución, especialmente para los plaguicidas más polares. Al cambiar a un lote nuevo, se recomienda realizar un estudio de elución para determinar el volumen de retención para los plaguicidas estudiados y evaluar el porcentaje de recuperación durante el proceso de purificación de la muestra.

### **Óxido de aluminio**

El óxido de aluminio se introdujo en el análisis de residuos de plaguicidas sustituyendo al Florisil, con la ventaja de su menor precio y condiciones constantes de adsorción. Para recuperar los residuos de plaguicidas de una columna de óxido de aluminio se utilizan los mismos solventes orgánicos recomendados para el Florisil; para mejorar la recuperación de los plaguicidas de una columna de óxido de aluminio, se

procede a la desactivación previa con una determinada cantidad de agua. Así, para el análisis Greve *et al.* (1974) citados por Waliszewski (2001), utilizaron óxido de aluminio Woelm básico desactivado con 9% de agua.

Steinwandter *et al.* (1975 y 1979) citados por Waliszewski (2001), seleccionaron el óxido de aluminio básico Merck Art. 1061 desactivado con 3 o 4% de agua como el idóneo, y que permitió obtener picos angostos de volumen de elución durante el análisis de residuos de plaguicidas. Para obtener mejores resultados de purificación de los extractos de plaguicidas en comparación con el Florisil, Wells *et al.* (1977) y Kveseth y Brevik (1979) desactivaron el óxido de aluminio con 5% de agua antes de su uso; mientras que Telling *et al.* (1977) lo desactivaron hasta con 10% de agua para mejorar la recuperación de los plaguicidas de una columna cromatográfica, manteniendo una buena purificación de los extractos de las muestras.

### **Gel de sílice**

Desactivado previamente con una determinada cantidad de agua introdujo en el análisis de plaguicidas por la fuerte y selectiva adsorción de algunos plaguicidas por el Florisil y el óxido de aluminio, que causó una disminución significativa de recuperación, así como por un mayor precio de ambos adsorbentes. Lo anterior recomendó al gel de sílice desactivado con 0.5 hasta 30% de agua para la purificación de los extractos durante el análisis con una recuperación cuantitativa de los plaguicidas estudiados. Kveseth y Brevik (1979), han recomendado para el análisis de plaguicidas el gel de sílice Woelm 0.063-0.2 mm activado durante 24 horas en el horno a 130°C y después desactivado con 0.5% de agua. Sin embargo, Steinwandter (1982) y Steinwandter (1980) citado por Waliszewski (2001), han recomendado como idóneo el Kieselgel 60, 70-230 mesh de Merck Art. 7734, activado durante 16 horas en el horno a 130°C y desactivado después con 10% de agua. El proceso de miniaturización del análisis de los plaguicidas llevó consigo a una drástica disminución de la cantidad del adsorbente utilizado hasta 1 g, lo que en consecuencia redujo el volumen de los solventes orgánicos necesarios para la recuperación de los residuos de plaguicidas (Specht y Tillkes, 1980;

Lores *et al.* 1987 y Cetinkaya 1988). Este procedimiento permitió reducir significativamente hasta en 80% el costo durante el análisis de residuos de plaguicidas.

### **Carbón**

El objetivo de los métodos analíticos que utilizan el carbón es remover de los extractos las sustancias orgánicas de peso molecular mayor, como los pigmentos de plantas y grasas. Normalmente, el carbón se mezcla con óxido de magnesio o con Celite 545, y después de pasar el extracto por la columna, los residuos de plaguicidas se recuperan con acetona o con cloruro de metileno. El carbón tiende a adsorber con mayor fuerza los compuestos clorados y los que contienen el anillo de benceno en su estructura química. Si el uso del carbón es indispensable para purificar un extracto que contiene un plaguicida con el anillo bencénico, para recuperarlo se necesita una mezcla de solventes muy polares, como benceno y acetonitrilo. Los plaguicidas polares (como Metamidofós) han reaccionado con el carbón disminuyendo drásticamente la recuperación. El uso del carbón y sus derivados en el análisis de residuos de plaguicidas se recomienda para las muestras que contienen compuestos de azufre y que interfieren en la determinación cromatográfica. Los estudios de Luke y Masumoto (1987) sobre el poder de purificación del carbón de origen distinto, no indicaron diferencias en la capacidad de detener los plaguicidas entre los diversos lotes de carbón ni en la capacidad de purificar los extractos estudiados. La mezcla de carbón con ácido no reveló su influencia para detener los plaguicidas ni tampoco en la calidad del eluato. En el desarrollo de métodos analíticos de plaguicidas, el carbón no es de gran importancia, y encuentra su uso sólo en algunos casos específicos.

### **Diatómitos**

Para purificar los extractos acetónicos de vegetales fortificados con 24 insecticidas organofosforados, Hopper (1988) ha introducido los diatómitos desactivados con fosfatos. Los resultados de recuperación indicaron valores excelentes de 100% de los

plaguicidas, y hasta 80% de recuperación del Metamidofós, conocido por ser muy difícil de recuperar de los demás adsorbentes.

### **Permeación por geles**

Otro método en la purificación de los extractos vegetales y animales durante el análisis de los residuos de plaguicidas es la cromatografía sobre geles. Este proceso consiste en una filtración fraccionada a través de resinas colocadas en una columna cromatográfica que separa los compuestos químicos de acuerdo con su peso molecular. Como fases estacionarias se utilizan geles granulados, y como medio de elución, mezclas de solventes orgánicos. En el análisis de los residuos de plaguicidas, la permeación por geles fue utilizada por primera vez por Stalling *et al.* (1972) citados por Waliszewski (2001), para purificar un extracto de aceite de pescado que pasaron por una columna de 27 cm de longitud empacada con resina Bio-Beads SX-2. La elución de los plaguicidas se realizó con ciclohexano. Los estudios subsiguientes realizados por Stalling (1974) citado por Waliszewski (2001), Griffitt y Craun. (1974), Johnson *et al.* (1976) selecciona-en la resina Bio-Bead SX-3 y una mezcla eluyente de tolueno y acetato de etilo (1 + 3), como los más apropiados para el análisis de residuos de plaguicidas. Meemken *et al.* (1977) citados por Waliszewski (2001), ocuparon una columna más larga de 35 cm de longitud empacada con resina Bio-Bead SX-3 en el análisis, y eluyeron los plaguicidas con una mezcla tolueno y acetato de etilo (1 + 3). Posteriormente, varios estudios (Fuchsichler, 1979; Specht *et al.* 1979; Ault *et al.* 1979; Beyer, 1981; citados por Waliszewski, 2001), utilizaron la permeación por geles sobre la resina Bio-Bead SX-3 y una mezcla de ciclohexano y cloruro de metileno en proporción (85 + 15) como eluyente en la recuperación de los plaguicidas para purificar las muestras ambientales contaminadas con éstos. Al investigar el comportamiento de 90 plaguicidas durante el proceso de purificación de los extractos, Specht y Tillkes (1980), Sandmeyer (1981) y Hopper *et al.* (1988), obtuvieron mejores resultados de purificación y recuperación al realizar la permeación sobre 1a resina Bio-Bead SX-3 y recuperar los plaguicidas con una mezcla de acetato de etilo y ciclohexano (1 + 1). En la purificación de los extractos de alimentos en

la determinación de 85 plaguicidas, Hopper (1981) obtuvo muy buenos resultados de purificación y recuperación con la resina ORPVA-2000, al utilizar la mezcla de cloruro de metileno y acetona (30 + 70) como eluyentes.

Waliszewski (2001), hace referencia a la compañía ABC Laboratory que ha desarrollado un sistema automático para procesar sobre una columna empacada con resina Bio-Bead SX-3 23 muestras de extractos vegetales o animales en la determinación de los residuos de plaguicidas. Durante la noche, en el tiempo de descanso del personal del laboratorio, el sistema realizó la etapa de purificación de los extractos, y recolectó para el día siguiente los eluatos limpios y listos para la determinación cualitativa y cuantitativa por cromatografía.

Cole *et al.* (2002), mencionan los métodos analíticos para determinar el nivel de contaminantes organoclorados en peces depredadores de los Grandes Lagos, a continuación se describen:

Para la determinación en lípidos, se obtuvieron muestras de suero de 9.5-ml, se le agrego el rojo-cima, se utilizó como separador el gel de sílice. Se centrifugaron los tubos con la muestra a varios volúmenes y se pusieron en refrigeradores. Un nivel o perfil del lípido (el colesterol total, colesterol de lipoproteína de alta densidad, colesterol de lipoproteína de baja densidad y triglicéridos) se determinan con varios métodos, señalados por Cole *et al.* (2002). Los fosfolípidos se aislaron mediante cromatografía de capa delgada y cromatografía de gases (Ferrier *et al.* 1995 y Holub y Skeaf, 1987).

Para la determinación de contaminantes organoclorados, las muestras se pone en biphenyls del polychlorinated (PCBs) y en 10-ml de lavanda-cima Vacutainer® que contiene el ácido ethylenediaminetetracético, para realizar el análisis de los pesticidas organoclorados. La muestra se centrifuga y se colecta el plasma el cual se transfiere a una pipeta de vaso de Teflon®-rayado, se refrigera posteriormente. Son determinados los plaguicidas organoclorados como diclorodifenildicloroetileno (por ejemplo el DDE) y el diclorodifeniltricloroetano (por ejemplo el DDT) al 0.03 µg/l; y hexaclorobenzeno (HCB), hexaclorociclohexano (HCH), mirex, oxiclordano, y trans-nonacloro, al 0.02 µg/l.

Es prioritario realizar investigaciones para estandarizar los métodos para determinar residuos de plaguicidas, considerando principalmente aquellos que presenten un menor precio, rapidez en la determinación, condiciones constantes de adsorción, los que mantienen una buena purificación de los extractos de las muestras, entre otros. Siendo necesario un acuerdo entre instancias de gobierno y laboratorios particulares, para trabajar con un mismo propósito.

---

## Bibliografía

1. Baldi, I.; P. Lebailly; B. Mohammed-Brahim, ;L. Letenneur; J.F. Dartigues, y P. Brochard. 2003. **Neurodegenerative Diseases and Exposure to Pesticides in the Elderly**. American Journal of Epidemiology. 157(5): 409-414 p.
2. Burke J. A., P. A. Mills y D. C. Bostwick. 1966. **Experiments with Evaporation of Solutions of Chlorinated Pesticides**. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 49: 999-1006.
3. Cetinkaya, M. 1988. **Organophosphorus-und Organochlorpestizidrückstände in Rohkaffee**. Deutsche Lebensmittel-Rundschau. 84: 189-190.
4. Cole, D. C.; J. Sheeshka; E. J. Murkin; J. Kearney; F. Scott; L. A. Ferron y Jean-Phillippe Weber. 2002. **Dietary Intakes and Plasma Organochlorine Contaminant Levels among Great Lakes Fish Eaters**. Archives of Environmental Health. 57(5):496-509
5. Cooper, G. R.; G. L. Myers y S. J. Smith. 1988. **Standardization of Lipid, Lipoprotein and Apolipoprotein Measurements**. Clin Chem. 34(8B):B95-B105.
6. Deinlein, Mary. 2004. **Cuando se Trata de Pesticidas, las Aves son Presa Fácil**. Smithsonian Migratory Bird Center, National Zoo, Washington, DC. [http://nationalzoo.si.edu/ConservationAndScience/Aves\\_Migratorias/Educacion/Folletos/default.cfm?fxsh=8](http://nationalzoo.si.edu/ConservationAndScience/Aves_Migratorias/Educacion/Folletos/default.cfm?fxsh=8).
7. Douwes, J.; P. Thorne, N. Pearce y D. Heederik. 2003. **Bioaerosol Health Effects and Exposure Assessment: Progress and Prospects**. Annals of Occupational Hygiene. 47(3):187-200.
8. Ferrier, L.K.; L. J. Caston y S. Leeson. 1995. **Alpha-Linolenic Acid- and Docosahexaenoic Acid-Enriched Eggs From Hens Fed Flaxseed: Influence on Blood Lipids and Platelet Phospholipid Fatty Acids in Humans**. Am. J. Clin. Nutr. 62:81-86.
9. Griffitt, K. R. y J. C. Craun. 1974. **Gel Permatation Chromatographic System: An Evaluation**. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 57: 168-172.

10. Holub, B.J. y C. M. Skeaff. 1987. **Nutritional Regulation of Cellular Phosphatidylinositol**. *Methods Enzymol.* 141:234-44.
11. Hopper, M. L. 1988. **Improved Method for Partition of Organophosphate Pesticide Residues on a Solid Phase Partition Column**. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 71: 731-734.
12. Hopper, M. L. 1981. **Gel Permeation System for Removal of Fats During Analysis of Food Residues of Pesticides and Herbicides**. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 64: 720-723.
13. Jimeno-Diestro, G. 2008. **Ciencias de la Tierra y del Medio Ambiente**. Ed. Anaya Educación. España.
14. Johnson L. D., R. H. Waltz, J. P. Ussay y F. E. Kaiser. 1976. **Automated Gel Permeation Chromatographic Clean up of Animal and Plant Extracts for Pesticide Residue Determination**. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 59: 174-187.
15. Kveseth, N. J. y E. M. Brevik. 1979. **Column Chromatographic Method for Cleaning up Extracts from Biological Material and Simultaneous Separation of PCB's and DDE**. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 21: 213-218.
16. Loffredo, C. A; E. K. Silbergeld; C. Ferencz y J. Zhang. 2001. **Association of Transposition of the Great Arteries in Infants with Maternal Exposures to Herbicides and Rodenticides**. *American Journal of Epidemiology.* 153(6): 529-536.
17. Luke M. A., H. T. Masumoto, T. Cairns y H. K. Hundley. 1988. **Levels and Incidentes of Pesticide Residues in Various Foods and Animal Feeds Analyzed by the Luke Multiresidue Methodology for Fiscal Years 1982-1986**. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 71: 415-433.
18. Luke, M. A. y H. T. Masumoto. 1987. **Pesticide Residue Analysis of Foods**. En: *Analytical Methods for Pesticides and Plant Growth Regulators*. Eds. Zweig G. y Sherma J. Vol. XV. Washington, D.C. 161-200 p.
19. López, C. L. y M.A. Gallardo L. 2001. **Efectos en la Salud de las Exposiciones Agudas y Crónicas a los Plaguicidas**. En: *Daños a la Salud por Plaguicidas*.

Editores Octavio Rivero Pedro Rizo, Guadalupe Ponciano y Gustavo Oláiz. Editorial El Manual Moderno. México, D. F. 61 – 74 p.

20. Lores E. M., J. C. Moore y P. Moody. 1987. **Improved Gel Cleanup for Organophosphorus Pesticides**. Chemosphere. 16: 1065-1069.
21. Mills, P. K. y R. Yang. 2003. **Prostate Cancer Risk in California Farm Workers**. The Journal of Occupational and Environmental Medicine. 45(3):249-258.
22. Mills P. A., J. H. Onley y R. A. Gunther. 1963. **Rapid Method for Chlorinated Pesticides in Nonfatty Foods**. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 46: 186-191.
23. Sandmeyer, U. 1981. **Schnelle Untersuchung von Milch auf Chlorierte Kohlenwasserstoffe Mittels Automatischer Gel-Chromatographie**. Deutsche Lebensmittel-Rundschau. 77: 175-178.
24. Shaw, G. M.; V. Nelson; D. M. Iovannisci; R. H. Finnell y E. J. Lammer. 2003. **Maternal Occupational Chemical Exposures and Biotransformation Genotypes as Risk Factors for Selected Congenital Anomalies**. American Journal of Epidemiology. 157(6):475-484.
25. Specht, W. y M. Tillkes. 1980. **Gaschromatographische Bestimmung von Rückständen an Pflanzenbehandlungsmitteln Nach Cleanup über Gel-Chromatographie und Mini-Kieselgel-Säule-Chromatographie**. Fresenius Z. Anal. Chem. 301: 300-307.
26. Steinwandter, H. 1982. **Contribution to Silica Gel Application in Pesticide Residue Analysis. III. An on-line Method for Extracting and Isolating Chlorinated Hydrocarbon Pesticides and Polychlorinated Biphenyls (PCB's) from Milk and Dairy Products**. Fresenius Z. Anal. Chem. 312:342-345.
27. Stickel, L. F. 1986. **Pesticide Residues in Birds and Mammals**. Patuxent Wildlife Research Center, Laurel, Maryland. 254 – 311.
28. Stijve, T. y E. Brand. 1977. **A Rapid, Low Cost, Small Scale Clean-up, Method for the Determination of Organochlorine Pesticide Residues in Fats and Oils**. Deutsche Lebensmittel Rundschau. 2: 41-43.

29. Suzuki T., K. Ishikawa, N. Sato y K. Sakai. 1979. **Determination of Chlorinated Pesticide Residues in Foods. III. Simultaneous Analysis of Chlorinated Pesticide and Phthalate Esters Residues by Using AgNO<sub>3</sub> Coated Florisil Colum Chromatography for Cleanup of Various Samples.** J. Assoc. Off. Anal. Chem. 62: 689-694.
30. Szymczyński G. A. y S. M. Waliszewski. 1982. **A Method for the Determination of Chlorinated Pesticides in Human Semen.** J. Androl. 3: 149-150.
31. Telling G. M., D. J. Sissons y H. W. Brinkman. 1977. **Determination of Organochlorine Insecticide Residues in Fatty Foodstuffs Using a Cleanup Technique Based on a Single Column of Activated Alumina.** J. Chromat. 137: 405-423.
32. Vallejo R., M. C. 1992. **Toxicidad de los Plaguicidas y su Impacto en la Salud.** En: Los Plaguicidas en América Latina. Colección: Salud, Ambiente y Desarrollo. Tomo II. Ministerio de Salud. Bogotá, Colombia. 103 – 128 p.
33. Vega, S. 1985. **Toxicología I: Evaluación Epidemiológica de Riesgos Causados por Agentes Químicos Ambientales.** Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud. OPS. OMS. 69 pp.
34. Viersino B., M. T. Van der Venne, H. Vissers y C. C. R. Euraton-Ispra. 1971. **Comparison of Some Cleanup Columns for Residue Analysis of Chlorinated and Phosphorus-Containing Pesticides.** J. Assoc. Off. Anal. Chem. 54: 147-149.
35. Villa Cornejo, B. 2004. **Manejo Integrado de Plagas.**  
<http://www.union.org.mx/publicaciones/guia/actividadesyagravios/plagas.htm>
36. revisado el 7 de septiembre de 2004.
37. Waliszewski, S. M. 2001. **Determinación de Plaguicidas y sus Metabolitos en Muestras Ambientales y Biológicas.** En: Daños a la Salud por Plaguicidas. Editores Octavio Rivero Pedro Rizo, Guadalupe Ponciano y Gustavo Oláiz. Editorial El Manual Moderno. México, D. F. 75 – 85 p.

38. Waliszewski S. M., V. T. Pardío, K. N. Waliszewski y J. N. Chantiri. 1997. **Low Cost Monitoring Method for Organophosphorus and Carbamate Pesticide Residues Determination.** Rev. Int. Contam. Ambient. 13:41-45.
39. Waliszewski S. M. y K. N. Waliszewski. 1992. **Simple and rapid Determination of Organophosphorus and Carbamate Pesticide Residues.** Fourth Annual Meeting of the International Society for Environmental Epidemiology, Cuernavaca, Morelos, México, August 26-29, 163 p.
40. Waliszewski S. M. y K. N. Waliszewski. 1988. **GC Determination of Dichlofluanid (Euparen) Residues and its Metabolite Dimethylphenylsulfamide (DMSA) in Strawberries.** Fresenius Z. Anal. Chem. 331: 528-529.
41. Waliszewski S. M. y K. N. Waliszewski. 1986a. **Gas-Chromatographic Determination of Acephate, Methamidophos and Terbufos in Tobacco.** Fresenius Z. Anal. Chem. 325: 395.
42. Waliszewski S. M. y K. N. Waliszewski. 1986b. **Gas-Chromatographic Determination of Triazofos (Hostathion) in Garlics.** Fresenius Z. Anal. Chem. 325: 393.
43. Waliszewski S. M., G. A. Szymczynski y Z. Rogowska. 1985. **Rapid and Low Cost Method for Monitoring Determination of Selected Chlorinated Pesticides in Food Mixture.** Bull. Environ. Contam. Toxicol. 34: 518-526.
44. Waliszewski, S. M. 1981. **Bestimmung von Rückständen von Triazophos (Hostathion) in Rapssamen.** Fresenius Z. Anal. Chem. 401-402.
45. Waliszewski S. M. y M. Rezepczynski. 1980. **Bestimmung von Rückständen von Organochlorinsecticiden im Boden. I. Bestimmung von alfa-, beta-, gamma-, delta-, epsilon-HCH und HCB.** Fresenius Z. Anal. Chem. 301-320.
46. Wells, D. E. y S. J. Johnstone. 1977. **Method for the Separation of Organochlorine Residues Befor Gas-Liquid Chromatographic Analysis.** J. Chromat. 140: 17-28.

- 
47. Wheeler W. B., R. L. Edelstein y N. P. Thompson. 1983. **Extraction of Pesticide Residues from Plants.** En: Pesticide Chemistry, Human Welfare and the Environment. Eds. Greenhalgh R. y Drescher N. Pergamon Press. USA. Vol.4: 49-54.
48. Wilburn, S. 2002. **Protecting Patients and Staff from Pesticides.** American Journal of Nursing. 102(9):128.

**Recibido: 06/04/09**

**Aceptado: 17/04/09**