

REVISIÓN

Revisión de los métodos de extracción y purificación de pesticidas de muestras con alto contenido en materia grasa

Por M. López-Mesas y M. Crespi

Laboratorio de Control de la Contaminación Ambiental
INTEXTER. C/. Colón 15. E-08222 Terrassa, Barcelona, España.

RESUMEN

Revisión de los métodos de extracción y purificación de pesticidas de muestras con alto contenido en materia grasa.

En este artículo, se pretende dar una revisión a las técnicas utilizadas para la extracción de pesticidas de muestras que contienen algún tipo de grasa (animal o vegetal). Debido a que en la actualidad las técnicas no permiten una extracción exclusiva de los pesticidas, arrastrando siempre una cantidad de grasa que será mayor o menor según la técnica utilizada, también se revisan las técnicas empleadas para la purificación del extracto pesticida-grasa.

PALABRAS-CLAVE: Extracción - Grasa - Pesticida - Purificación - Revisión (artículo).

SUMMARY

Extraction and clean-up of pesticides from fatty samples.

The extraction of pesticides from fatty samples is a problem extensively studied. In this paper, the main techniques for the extraction of pesticides from fatty samples are reviewed. In this extraction, the extraction of fat material is a fact that is difficult to avoid, so it's necessary to apply clean-up systems prior to subsequent steps in the analytical process. The clean-up techniques are reviewed too.

KEY-WORDS: Clean-up - Extraction - Fat - Pesticide - Review (paper).

1. INTRODUCCIÓN

Desde los tiempos más remotos de la historia, el hombre ha desarrollado sistemas de destrucción de insectos, ya que éstos han atacado al hombre, a los animales domésticos y han provocado enfermedades en las plantas. Son además transmisores de enfermedades víricas muchas de las cuales pueden conducir a la muerte. Antiguamente, las plagas se destruían con fuego, pero al no tratarse de un sistema de destrucción selectivo, se llegó al uso de insecticidas

derivados de productos naturales. A partir de 1892 se introdujeron los pesticidas orgánicos sintéticos, aunque éstos no tuvieron éxito hasta la aparición del DDT, en 1939, el cual alcanzó tal nivel de uso, que estimuló el desarrollo de otros pesticidas organoclorados. Éstos han sido utilizados sin ningún control hasta que se descubrió que los compuestos organoclorados tienen una larga persistencia en el medio ambiente (años), son solubles en los tejidos grasos y no son biológicamente degradados, lo que implica una bioacumulación (Ashraf-Khorassani, 1996) en el hombre. Esto ha llevado al desarrollo de los pesticidas organofosforados, compuestos inhibidores irreversibles de la enzima acetilcolinesterasa (encargada de las transmisiones neurológicas) en insectos, garrapatas y mamíferos. Son altamente tóxicos, pero presentan una vida media relativamente corta (días). Además en los mamíferos son metabolizados para producir productos inocuos en uno o dos días, no provocando una bioacumulación en los tejidos animales. Pero la progresiva resistencia generada por los insectos a estos compuestos, hace que se tengan que aumentar las dosis usadas para eliminarlos y por tanto que el hombre se vea expuesto a intoxicaciones agudas. La introducción de otro tipo de insecticidas, carbamatos y piretroideos sintéticos (piretrinas) disminuyen el uso de los anteriores y dejan a unos productos que son rápidamente biodegradables y no bioacumulables. Estos últimos presentan la ventaja de ser extraordinariamente efectivos contra las plagas de insectos requiriendo menores dosis.

Procedimiento General

El procedimiento general seguido para el análisis de multiresiduos organoclorados (pesticidas, PCBs...) en muestras con un alto contenido en materia grasa puede resumirse en una primera etapa de extracción que permite la separación de los analitos de los componentes mayoritarios, otra etapa de purifica-

ción que elimina los componentes interferentes, y una tercera de análisis instrumental para la separación, identificación, cuantificación de los residuos, y finalmente la confirmación de éstos (Lázaro y col. 1995).

La mayoría de los autores consideran las dos primeras etapas como las más críticas del análisis, ya que de ellas depende el conseguir las fracciones adecuadas para el análisis posterior.

En las matrices ricas en grasa, la extracción completa de los residuos lipofílicos, como es el caso de los pesticidas organoclorados y PCBs, sólo se asegura cuando se extrae toda la grasa de la muestra, por lo que la elección del método más adecuado está condicionada por el tipo de muestra y los análisis a investigar. En general las técnicas comunes se basan en una extracción de la muestra, deshidratada previamente con sulfato de sodio anhidro, mediante maceración o elución en columna con un solvente orgánico o mezclas de solventes, o bien mediante la técnica de extracción Soxhlet clásica o automatizada (SOXTEC® System HT). La separación de los pesticidas de las grasas comestibles puede hacerse (Walters, 1990) por distribución líquido-líquido, cromatografía de adsorción y destrucción química de lípidos con ácidos y bases fuertes. Estas técnicas están siendo desplazadas por otras más modernas como Cromatografía de Permeación en Gel (GPC), Sweep-codistillation, Cromatografía Líquida de fase reversa (Sílica) o Extracción por Fluidos Supercríticos (SFE).

2. EXTRACCIÓN

Un método ideal de extracción debe ser rápido, simple y económico. No debe generar residuos y no tener pérdidas del analito de interés. Se debe además obtener una muestra que pueda rápidamente ser analizada sin pasos intermedios. Sin embargo, la metodología analítica clásica es larga, tediosa, consume gran cantidad de disolventes caros y tóxicos (Hwthorne, 1990) y son inevitables los tratamientos posteriores.

Soxhlet

Esta técnica se basa en la extracción de la materia soluble de matrices complejas mediante el uso de disolventes orgánicos en caliente. La muestra se coloca en un cartucho, normalmente de celulosa y se introduce en un recipiente contenedor de vidrio con un sistema de sifón. Se coloca sobre un balón, también de vidrio, que contiene el disolvente y se calienta con una manta calefactora. De esta manera el disolvente se evapora, condensa en un refrigerante y cae sobre el cartucho. Al entrar en contacto con la

muestra, solubiliza la porción lipofílica que es arrastrada al contenedor de vidrio y mediante el sistema de sifón, disolvente y fracción solubilizada cae al balón, de donde el disolvente sigue evaporándose para seguir con el proceso de extracción. Este sistema presenta las ventajas de realizar una extracción en continuo durante varias horas sin requerir la atención que merecen otras técnicas, y de estar muy extendida a nivel mundial debido a su gran reproducibilidad. Pero presenta varios inconvenientes, posible contaminación de la muestra a partir de los cartuchos utilizados, largo tiempo de análisis y riesgos de explosión. Además ha sido criticada por su eficacia en la extracción de pesticidas ya que no extrae toda la fracción fosfolipídica (Atkinson, 1972). No obstante, dicha técnica es muy utilizada como fase de extracción en el análisis de residuos organoclorados.

Los factores que afectan a la extracción de la materia grasa y de residuos lipofílicos de pesticidas son la polaridad del disolvente, su punto de ebullición y las propiedades de hinchamiento.

Para la extracción de aceites y grasas el disolvente más utilizado (Greene, 1995) es el diclorometano (DCM), pero en función de la matriz sobre la que se encuentran los pesticidas a extraer, tendrá que modificarse este disolvente. Así, cuando se utiliza sobre fibras no extrae totalmente los analitos porque no penetra en el interior de las fibras al no tener la capacidad de hincharlas (capacidad más propia de los disolventes polares). Los lípidos de la superficie se extraen con disolventes no polares o non-fibre-swelling como n-heptano y t-butano. Los internos y los pesticidas asociados con las fibras requieren un disolvente más polar, como metanol. Con acetona tras 5 horas de Soxhlet se extrae más del 70% de pesticidas y otros residuos de la lana, algodón y lino.

Una comparación entre extracciones con sólo DCM o secuencial con DCM y después metanol, llega a la conclusión de que con este último sistema, la extracción de residuos de pesticidas organofosforados es mucho mayor y no tanto la de organoclorados.

Para los residuos de pesticidas de la familia de las piretrinas, no se recomienda la extracción secuencial porque éstos son inestables en metanol.

En la actualidad, esta técnica está siendo desplazada por el sistema automatizado SOXTEC®. Éste, basado en el principio de la técnica Soxhlet, hace posible llevar a cabo extracciones con una amplia variedad de disolventes, en un modo más rápido, más económico y de manera más segura para el analista. Además, reduce el tiempo de extracción a menos del 20% del tiempo necesario para el Soxhlet clásico y recupera el 60-70% del disolvente utilizado. Las muestras se pesan dentro de cartuchos de extracción que son insertados en la Unidad de Extracción. Después de la adición del disolvente a los vasos de extracción, el material soluble se extrae dentro del di-

solvente en un proceso de dos etapas, seguido de otra etapa para la recuperación del mismo. Algunas de las aplicaciones han sido como fase previa preparatoria para el análisis de contaminantes medioambientales (Sturaro, 1993) y en la extracción de grasas de fibras de algodón (Martínez, 1997).

Microondas

Aunque el uso de las microondas no es nuevo, sí lo es el uso de esta técnica para la extracción.

El principio de esta técnica se basa en la absorción de la energía de las microondas por parte de la muestra, lo cual incrementa la temperatura y la presión, permitiendo la difusión de los componentes desde la matriz hasta el disolvente que la rodea.

Se han realizado pocos estudios con esta técnica ya que todavía se desconoce el mecanismo por el que se produce la extracción. Esta técnica fue utilizada por primera vez como método de preparación de muestras para la determinación de pesticidas de matrices de alimentos en 1986 (Ganzler, 1986 y 1987). Se han realizado posteriores estudios para la extracción de pesticidas de matrices de sedimentos (Onuska, 1993 y Pastor, 1997) y suelos (López-Ávila, 1994 y Hoogerbrugge, 1997), pero poco se conoce sobre la extracción sobre matrices ricas en contenido graso (Ganzler, 1986), o de la extracción de grasas (de Pedro 1997).

Los mayores porcentajes de recuperación se obtienen con tiempos de irradiación altos o potencias elevadas. Pero no puede utilizarse una combinación de potencia elevada durante un largo tiempo ya que puede causar roturas en las piezas de teflón de los reactores.

Extracción por Fluidos Supercríticos

Un fluido supercrítico es una sustancia con la que se trabaja en un estado cercano al de su temperatura y presión críticas. Combinan características del comportamiento de los gases respecto a la transferencia de masa y de los líquidos respecto a la solubilidad, aunque en su estado líquido siempre será mayor.

Existe una amplia variedad de gases que han sido probados como fluidos supercríticos (CO_2 , N_2O , CHF_3 (Alzaga, 1995 y Hillmann, 1995)) pero de entre ellos, el más utilizado es el CO_2 por sus características de inerte y no tóxico. Se trata de un disolvente no polar, del cual, se modifica su polaridad añadiendo disolventes polares como metanol (Engelhardt, 1991) o acetona. La fuerza solvente del CO_2 puede aumentarse aumentando la presión o disminuyendo la temperatura, lo que implica un aumento de la densidad. A temperatura constante y bajas presiones se

favorece la extracción de los analitos menos polares mientras que a altas, se favorece la de los más polares y de mayor peso molecular. Su baja temperatura crítica facilita el trabajo a bajas temperaturas y por tanto la extracción de compuestos inestables térmicamente.

Los fluidos supercríticos más comúnmente utilizados son gases a temperatura ambiente, lo que reduce posteriores tratamientos de concentración del analito. Además son inertes, puros, no tóxicos y relativamente baratos. Uniendo estas características a la de rapidez, resulta una técnica de extracción ideal.

En los equipos de extracción por fluidos supercríticos, una bomba proporciona una presión conocida al fluido extractante y lo dirige hacia la cubeta de extracción, donde se encuentra contenida la muestra, la cual está colocada en un calentador que la mantiene a una temperatura cercana a la crítica para el fluido. Durante la extracción, el analito soluble se reparte desde la matriz hasta el fluido y se dirige hacia un colector que normalmente se encuentra a presión atmosférica. En estas condiciones los fluidos vuelven a su estado gaseoso y son fácilmente eliminados del colector donde se retienen los analitos extraídos.

El tamaño de la muestra a extraer puede ir de 1 mg a cientos de gramos, pero cuanto mayor sea, más fluido se necesita y más difícil es la extracción.

Cuando hay cera de lana en la matriz (Jones, F.W. 1997), el colesterol es más difícil de extraer siendo su solubilidad a 250 atm y 60°C de sólo 0.02% (peso). Además, la cera de la lana, debido a la complejidad de su composición, presenta una solubilidad parcial en un amplio rango de temperatura y presión, pero puede extraerse completamente a mayor temperatura y presión. La extracción de grasa de lana pura es máxima en las condiciones 0.013 g/l, 80°C y 450 bar (Gere, 1994).

De los diferentes estudios que se han realizado para la extracción de grasas, se puede concluir que la grasa es muy soluble en el disolvente supercrítico en condiciones de alta temperatura y presión por lo que para la extracción de analitos contenidos en una matriz rica en grasa tendría que trabajarse a bajas temperaturas y presión donde la grasa es sólo parcialmente soluble, pero aún así, es difícil pensar en esta técnica sin un posterior sistema de purificación para este tipo de muestras.

Así pues, el CO_2 supercrítico solubiliza las grasas. Si el objetivo es la extracción de analitos contenidos en grasa, sin una extracción de ésta, se han de modificar los sistemas de extracción por fluidos supercríticos y usar una técnica combinada de SFE-Clean up (extracción-purificación) donde en la primera se extraen los pesticidas y las grasas y en la segunda se separan (France, 1991). En éstos, y antes de la elución del extracto, se hace pasar por una columna donde quedan retenidos los compuestos, de donde

se eluyen posteriormente de forma fraccionada, eluyéndose a tiempos superiores las grasas y por tanto pudiendo recoger un extracto libre de éstas.

Este sistema de separación puede ser una columna de alúmina (usar y tirar) o una de sílica (reusar). La alúmina retiene lípidos pero también retiene compuestos de interés por lo que se ha de reducir la cantidad de grasa introduciendo un paso de fraccionamiento.

El CO₂ es un disolvente no polar, por lo que para la extracción de analitos con sustituyentes polares tales como pesticidas organofosforados, herbicidas... se requiere la adición de modificadores polares como metanol o agua al CO₂ para su recuperación cuantitativa o bien la aplicación simultánea de derivatización y extracción (Alzaga, 1995). Por otra parte, la extracción de pesticidas organoclorados, no requiere la adición de modificadores (Ashraf-Khorassani, 1996). Si la matriz contiene grasa, es probable que la adición de modificadores polares al CO₂ pueda disminuir el contenido graso en el extracto, al tratarse éste de material lipídico, y por tanto de muy baja polaridad, pero si la extracción ha de ser de compuestos de baja polaridad, la extracción de éstos también se verá disminuida.

Pueden darse reacciones entre grupos de la matriz tales como -OH fenólicos o -COOH y los pesticidas, de manera que éstos quedan estabilizados químicamente en la matriz y por tanto se hace más difícil la extracción.

El porcentaje de recuperación de los pesticidas aumenta al aumentar la presión y la densidad, mientras que un cambio en la temperatura no afecta. Además para los organoclorados y organofosforados es mayor con un 3% MeOH-CO₂ que con CO₂ puro, siendo además cuantitativas en todos los casos (Snyder, 1993). La precisión del método usando MeOH-CO₂ es mejor que con CO₂ puro.

Los porcentajes de recuperación son controlados por la habilidad del fluido supercrítico para interaccionar con lugares de absorción de la matriz de la muestra.

Los modificadores han de ser seleccionados de acuerdo con la matriz y los analitos a extraer y teniendo en cuenta que un modificador polar incrementa la solubilidad de un soluto polar pero no afecta a la de uno no polar.

Otros autores han minimizado el contenido de materia grasa en el extracto mediante la adición de CHF₃ como modificador del fluido supercrítico, lo que parece ser una fácil y rápida solución (Ashraf-Khorassani, 1996).

3. PURIFICACIÓN (CLEAN-UP)

Es necesario introducir esta posterior etapa de limpieza de las muestras extraídas antes de conti-

nuar con el proceso analítico, desde el momento en el que se exigen cada vez más el análisis a nivel de trazas de productos contaminantes, para el cual es imprescindible tener una muestra libre de interferencias, así como para minimizar el riesgo de deterioro de los actuales instrumentos de análisis (principalmente las columnas de GC y HPLC y los detectores de masas).

Extracción líquido-líquido

La distribución líquido-líquido entre hexano y acetonitrilo es uno de los métodos más antiguos para la separación de pesticidas de grasas biológicas y ceras (Jones, L.R. 1952). Usando una adecuada proporción de acetonitrilo-hexano, los pesticidas se distribuyen en la fase de acetonitrilo, mientras que los lípidos quedan solubilizados en la fase no polar (hexano) debido a su contenido en hidrocarburos.

La extracción de la grasa de la lana más efectiva es mediante una repartición hexano-dimetil formamida (DMF). Al aumentar la concentración de cera en el hexano aumenta la extracción con DMF porque la cera es más polar que el hexano lo que hace aumentar la solubilidad de la DMF en hexano y aumenta la extracción. Se extraen ácidos y alcoholes de pequeño peso molecular y polares lo que refina la cera dejándole propiedades emolientes pero requiere una neutralización para convertirla en grado farmacéutico.

El problema que presenta esta técnica es que no se obtienen los niveles de purificación requeridos para los actuales métodos de análisis.

Sweep Co-Distillation

Esta técnica se basa en la capacidad de volatilización de los analitos (Ott, 1964) y funciona como una «cromatografía gaseosa preparativa» (Luke, 1984). La muestra de grasa se calienta hasta licuar y se inyecta con una jeringa a través del septum dentro de un tubo de fraccionamiento calentado, empaquetado con bolas de vidrio silanizadas. La muestra es arrastrada a través del tubo mediante un flujo de nitrógeno. Los lípidos no volátiles son atrapados por la superficie de las bolas formando una delgada película, mientras que los pesticidas son volatilizados y recogidos en una trampa de Florisil, de donde son eluidos con un disolvente apropiado. Este sistema se encuentra automatizado y se comercializa bajo el nombre UNITREX® (Universal Trace Residue Extractor). La efectividad del método queda limitada a la estabilidad térmica de los analitos y a volatilidad relativa a los constituyentes naturales de la muestra.

Ya han sido publicadas (Luke, 1984) las condiciones operacionales para un equipo comercial de este tipo de destilación por arrastre para la purificación de pesticidas organofosforados y organoclorados de matrices de grasas animales. Aún así, otros autores (Brown, 1987), recomiendan optimizar las condiciones operacionales del sistema UNITREX® en función de si se analizan trazas de pesticidas específicos o se hace un barrido general.

Un estudio comparativo con otras técnicas de purificación (Armishaw, 1993), revela que esta técnica presenta unos resultados equivalentes a los obtenidos para columnas de Florisil y GPC. Combina además rapidez de análisis, bajo coste y reducción del consumo de disolventes. Esta técnica es bastante utilizada por laboratorios de análisis australianos y se encuentra en expansión a laboratorios de otros países.

Extracción en Fase Sólida (EFS)

La Extracción en Fase Sólida (EFS) utiliza el mismo principio de retención selectiva que caracteriza la técnica de separación de HPLC. Los cartuchos EFS de extracción son como la parte inferior de una jeringa de plástico rellena con gel de sílice químicamente ligada. De esta manera se obtienen diferentes tipos de relleno en función de los analitos a separar. Estos rellenos son los mismos que los usados en HPLC con la diferencia de que el tamaño de partícula es mayor.

Los cartuchos son buenos para una rápida preparación de muestras acuosas. Los más comúnmente utilizados son de sílica y de C₁₈. En los primeros, los compuestos no polares son eluidos antes que los polares. Para la elución de los componentes retenidos se han de usar disolventes poco polares. En los segundos, los componentes polares se eluyen antes que los no polares. Los disolventes para la elución han de ser agua o una mezcla agua/orgánico lo más polar posible.

Este tipo de extracción se utiliza sobre todo para la limpieza de muestras, concentración de los analitos y la eliminación de interferencias. Puede ser por tanto considerada como técnica de extracción o bien como técnica de purificación, en función del tipo de muestra a analizar. Son muy utilizadas para la extracción de los analitos de muestras de aguas residuales.

El problema que presenta es que es una técnica difícil de usar para contaminantes desconocidos ya que para obtener una buena separación de los analitos, se ha de comparar el tiempo de retención al que se eluyen con el tiempo de elución para un patrón de dichos analitos.

Es muy usada cuando se necesitan alcanzar niveles de detección muy bajos, ya que entonces se

necesita un proceso de enriquecimiento del componente. Presenta las ventajas de ser un método fácilmente adaptable y la reducción del uso de solventes tóxicos.

Puede ser utilizada como técnica de purificación tras una primera extracción por otra técnica. Así, tras la extracción con disolventes orgánicos de la mezcla grasa-pesticidas, éstos pueden ser separados mediante esta técnica.

Los lípidos son completamente retenidos en sorbentes altamente polares como sílica o aminopropil (NH₂), con t_R de 10 a 30 min (Murugaverl, 1991). Son también retenidos con t_R de entre 5-20 minutos en C₁₈ (Octadecyl, ODS) y cyanopropil (CN) (Barceló, 1988).

Con una columna Extrelut®, se coeluye de un 5-10% del material lipídico. Purificando con cartucho C-18 EFS sólo se coextrae unos 10-20 mg. El extracto es además suficientemente limpio para el análisis de los compuestos organofosforados. Para los organoclorados es necesaria una purificación con florisil.

Con el uso de los cartuchos se han de filtrar las muestras y no perder nada de ellas (Reupert). Se ha de asegurar que en la materia sólida no quedan adsorbidos los compuestos de interés. Presentan el inconveniente de que pueden retener otros compuestos presentes en la muestra dando interferencias en la separación de los pesticidas por lo que se ha de realizar una confirmación por MS o espectros de UV/Vis.

Su uso es suficiente para aguas potables, pero para muestras con alto contenido en contaminantes, como es el caso de las muestras con alto contenido en materia grasa, es necesaria la técnica GPC (Schuster).

Florisil

El principio de esta técnica es el mismo que para la cromatografía clásica. Florisil es el nombre del polímero utilizado para rellenar una columna cromatográfica. La muestra se hace pasar a través de la columna donde los pesticidas y la materia grasa son retenidos. Debido a la naturaleza del polímero, la fuerza con la que se retienen es diferente, lo que hace que sean eluidos a diferentes tiempos, obteniéndose fracciones de pesticidas separados de las grasas (las grasas son retenidas al eluir con solventes de baja polaridad).

La cromatografía realizada con Florisil, es una técnica de purificación reconocida para muestras grasas de alimentos. El procedimiento está descrito en detalle en AOAC Official Methods of Analysis (1990) así como en el Pesticide Analytical Manual (1968). Esta técnica también ha sido provada con éxito en la separación de residuos de pesticidas de

suelos (Durand, 1994 y de Bertrand, 1991), grasas de animales (Armishaw, 1993), lanolina (Miyahara, 1992) y una matriz orgánica compleja (Pedersen, 1998).

Todos los resultados muestran que esta es una buena técnica para la obtención de un residuo de pesticidas libres de grasas, siendo además un método rápido, económico y de fácil uso.

Cromatografía de Permeación en Gel (GPC)

En 1972 la cromatografía por permeación en gel fue introducida como una técnica de purificación para la separación de lípidos y pesticidas (Stalling y Tindle, 1972). En 1974, se probó un modelo para la misma separación de una matriz de muestras de alimentos que contenían grasas (Griffitt, 1974). Más tarde, en 1982, se publicó un método modificado de GPC para el aislamiento de productos clorados y organofosforados de matrices de alimentos (Hopper, 1982).

Es una de las principales técnicas utilizadas para la separación de fracciones lipídicas cuando se preparan grasas (Specht, 1980), aceites, vegetales (Ault, 1979), extractos de tejidos (Stalling, Tindle y Johnson, 1972) y más recientemente lanolina y cera de lana (Jones, F.W. 1996) para el análisis de residuos de pesticidas. La separación se basa en el tamaño molecular de los compuestos a separar, lo cual hace que sea una técnica ampliamente aplicable. Fue desarrollada para la separación de polímeros de alto peso molecular y adaptada a la separación de pesticidas de diferentes extractos. El sistema de GPC, consiste básicamente en una columna rellena de un polímero poroso en forma de bolas. De esta manera al introducir una muestra, las moléculas lo suficientemente pequeñas para introducirse en los poros, han de recorrer mayor camino que las grandes, que se eluirán en primer lugar de la columna. Las moléculas lipídicas son lo suficientemente grandes para no poder acceder a los poros y por tanto eluidas las primeras. La mayoría de los pesticidas sintéticos, tienen pesos moleculares entre 200 y 400, mientras que los de los lípidos van entre 600 a 1500. Con una elección adecuada del material polimérico y del disolvente orgánico utilizado para la elución, los pesticidas son recogidos en una fracción prácticamente libre de lípidos.

4. CONCLUSIONES

Las diferentes publicaciones científicas, muestran que realizar una total extracción de pesticidas de una matriz que contenga un alto contenido en materia grasa, es muy difícil sin una extracción de la misma ya que los pesticidas se encuentran íntima-

mente ligados a la grasa. Por ello es necesario una posterior técnica de purificación tras la primera extracción. La única técnica que parece dar buenos resultados en un solo paso es la Extracción por Fluidos Supercríticos con una columna a la salida para atrapar a los analitos.

BIBLIOGRAFÍA

- Alzaga, R., Bayona, J.M. y Barceló, D. (1995).—Use of supercritical fluid extraction for pirimicarb determination.— *J. Agric. Food Chem.* **43** (2), 395-400.
- Armishaw, P. y Millar, R.G. (1993).—Comparison of gel permeation chromatography, sweep codistillation, and florisil column adsorption chromatography as sample cleanup techniques for the determination of organochlorine pesticide residues in animal fats.—*J. of AOAC International* **76** (6) 1317-1322.
- Ashraf-Khorassani, M. y Taylor, L.T. (1996).—Development of a method for extraction of organochlorine pesticides from rendered chicken fat via supercritical fluorofom.— *J. Agric. Food Chem.* **44**, 3540-3547.
- Atkinson, S.S., Fowler, V.R., Garton, G.A. y Lough A.K. (1972).—A rapid method for the accurate determination of lipid in animal tissues.—*Analyst* **97**, 562-568.
- Ault, J.A., Schofield, C. Michael, Johnson, L.D. y Waltz, R.H. —(1979). Automated gel permeation chromatographic preparation of vegetables, fruits, and crops for organophosphate residue determination utilizing flame photometric detection.—*J. Agric. Food Chem.* **27** (4) 825-828.
- Barceló, D. (1988).—*Chromatographia* **25** (10) 929.
- Brown, R.L., Farmer, C.N. y Millar, R.G. (1978).—Optimization of sweep codistillation apparatus for determination of coumaphos and other organophosphorus pesticide residues in animal fat.— *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **70** (3) 442-445.
- De Bertrand, N., Durand, G. y Barceló, D. (1991).—*J. Environ. Sci. Health* **A26** (4) 575.
- De Pedro, E., Casillas, M. y Miranda, C.M. (1997).—*Meat Science* **45** (1) 45.
- Durand, G. y Barceló, D. (1994).—*Química Analítica* **13**, S89.
- Engelhardt, H., Zapp, J. y Kolla, P. (1991).—*Chromatographia* **32** (11) 527.
- France, J.E., King, J.W. y Snyder, J.M. (1991).—Supercritical fluid-based cleanup technique for the separation of organochlorine pesticides from fats.—*J. Agric. Food Chem.* **39**, 1871-1874.
- Ganzler, K. y Salgó, A. (1987).—Microwave-extraction a new method superseding traditional Soxhlet extraction.—*Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **184**, 274-276.
- Ganzler, K., Salgó, A. y Valkó, K. (1986).—*J. Chromatographia* **371**, 299.
- Gere, D.R. y Derrico, E.M. (1994).—*LC•GC* **7**, 370.
- Greene, R.V. y Wimbush, J.M. (1995).—The 9th International Wool textile Research Conference, 321.
- Griffitt, K y Craun, J. (1974).—Gel permeation chromatographic system: An evaluation.—*J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **57** (1) 168-172.
- Hillmann, R. y Bächmann, K. (1995).—Extraction of pesticides using supercritical trifluoromethane and

- carbon dioxide.—*J. of Chromatography A*, **695**, 149-154.
- Hoogerbrugge, R., Molins, C. y Baumann, R.A. (1997).—*Analytica Chimica Acta* **348**, 247.
- Hopper, M. (1982).—Automated gel permeation system for rapid separation of industrial chemicals and organophosphate and chlorinated pesticides from fats.—*J. Agric. Food Chem.* **30**, 1038-1041.
- Hwthorne, S.B. (1990).—Analytical-scale supercritical fluid extraction.—*Analytical Chemistry* **62** (11) 633A-642A.
- Jones, F.W. (1996).—Multiresidue analysis of pesticides in wool wax and lanolin using gel permeation and gas chromatography.—*J. Agric. Food Chem.* **44**, 3197-3201.
- Jones, F.W., Bateup, B.O., Dixon, D.R. y Gray, S.R. (1997).—*J. of Supercritical Fluids* **10**, 105.
- Jones, L.R. y Riddick, J.A. (1952).—Separation of organic insecticides from plant and animal tissues.—*Analytical Chemistry* **24**, 569-571.
- Lázaro, R., Bayarri, S., Conchello, P., Ariño, A. y Herrera, A.—Comparación de dos técnicas de extracción de materia grasa para la determinación de residuos organoclorados en alimentos.—*Grasas y Aceites* **46** (1) 35-38.
- López-Avila, V., Young, R. y Beckert, W.F. (1994).—Microwave-assisted extraction of organic compounds from standard reference soils and sediments.—*Analytical Chemistry* **66**, 1097-1106.
- Luke, B.G., Richards, J.C. y Dawes, E.F. (1984).—Recent advances in cleanup of fats by sweep co-distillation. Part 1. Organochlorine residues.—*J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **67** (2) 295-298.
- Luke, B.G., Richards, J.C. y Dawes, E.F. (1984).—Recent advances in cleanup of fats by sweep co-distillation. Part 2. Organophosphorus residues.—*J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **67** (5) 902-904.
- Martínez, M.J. y Crespi, M. (1997).—Extracción mediante un SOXTEC® de la materia grasa de algodones procedentes de diferentes áreas productoras. Comparación extracción con diclorometano o sucesivas diclorometano-metanol. *Grasas y Aceites* **48** (4) 226-230.
- Miyahara, M., Suzuki, T. y Saito, Y. (1992).—*J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **40**, 64.
- Murugaverl, B. y Voorhees, K.J. (1991).—*J. Microcol. Sep.* **3**, 11.
- Official Methods of Analysis (1990) 15th Ed., AOAC, Arlington, VA, sec. 970. 520.
- Onuska, F.I. y Terry, K.A. (1993).—*Chromatographia* **36**, 191.
- Ott, D.E. y Gunther, F.A. (1964).—*J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **12**, 239.
- Pastor, A., Vázquez, E., Ciscar, R. y de la Guardia, M. (1997).—*Analytical Chimica Acta* **344**, 241.
- Pedersen, B.A. y Higgins, G.M. (1998).—*LC•GC* **6**, 1016.
- Pesticide Analytical Manual (1968) 2nd Ed., Vol. 1, U.S. Food and Drug administration, Washington, DC.
- Reupert, R., Plöger, E.Y. y Brausen, G.—HPLC Determination of 29 Controlled Herbicides in Water Supplies, Hewlett Packard Application Note.
- Schuster, R. y Gratzfeld-Hüsgen, A.—Analysis of Phenoxy-acid Herbicides an Bentazone by HPLC with Diode-array Detection, Hewlett Packard Application Note.
- Snyder, J.L., Grob, R.L., McNally, M.E. y Oostdyk, T.S. (1993).—The effect of instrumental parameters and soil matrix on the recovery of organochlorine and organophosphate pesticides from soils using supercritical fluid extraction.—*J. of Chromatographic Science* **31**, 183-191.
- Specht, W. y Tillkes, M. (1980).—Gas-chromatographic determination of pesticides residues after clean-up by gel-permeation chromatography and mini-silica gel-column chromatography.—*Fresenius Z. Anal. Chem.* **301**, 300-307.
- Stalling, D. y Tindle, R. (1972).—Apparatus for automated gel permeation cleanup for pesticide residue analysis.—*Analytical Chemistry* **44** (11) 1768-1773.
- Stalling, D.L., Tindle, R.C. y Jonhson, J.L. (1972).—Cleanup of pesticide and polychlorinated biphenyl residues in fish extracts by gel permeation chromatography.—*J. of the AOAC* **55** (1) 32-38.
- Sturaro, A., Parvoli, G. y Doretto, L. (1993).—In focus—The Tecator *Journal of Technology for Chemical Analysis* **17** (2) 14.
- Walters, S.M. (1990).—Clean-up techniques for pesticides in fatty foods.—*Analytical Chimica Acta* **236**, 77-82.

Recibido: Enero 1999
Aceptado: Mayo 1999