



Los plaguicidas representan una ayuda eficaz para el mantenimiento de los ecosistemas.

# Aplicación de técnicas avanzadas en análisis espectrofluorimétricos

## Determinación de fitohormonas, plaguicidas y sus metabolitos en el medio ambiente

D.<sup>ª</sup> CARMEN CRUCES BLANCO

Dpto. de Química Analítica.  
Facultad de Ciencias.  
Universidad de Málaga.

**P**LAGUICIDA es el término general empleado para denominar ciertos productos químicos cuyas propiedades toxicológicas resultan especialmente útiles para el control de numerosos insectos, nematodos, moluscos, hongos y cualquier otro organismo que viva a expensas de alimentos que ingiere el hombre o los animales domésticos. Se clasifican, según su función, en insecticidas, herbicidas, fungicidas, etc... A estas categorías hay que añadir los productos empleados en fumigaciones, los larvicidas, acaricidas, repelentes de insectos, rodenticidas, agentes desfoliantes y aquellos que poseen una función reguladora del crecimiento de las plantas, la floración y los frutos.

Estos últimos productos químicos fueron introducidos en 1932 con el nombre de fitohormonas o fitoreguladores y son considerados legalmente como plaguicidas. Todos ellos aparecieron como armas para controlar las enfermedades del hombre, los animales y los vegetales transmitidas por los insectos y la destrucción de cosechas producidas por éstos. Sin embargo, los límites de toxicidad para las especies

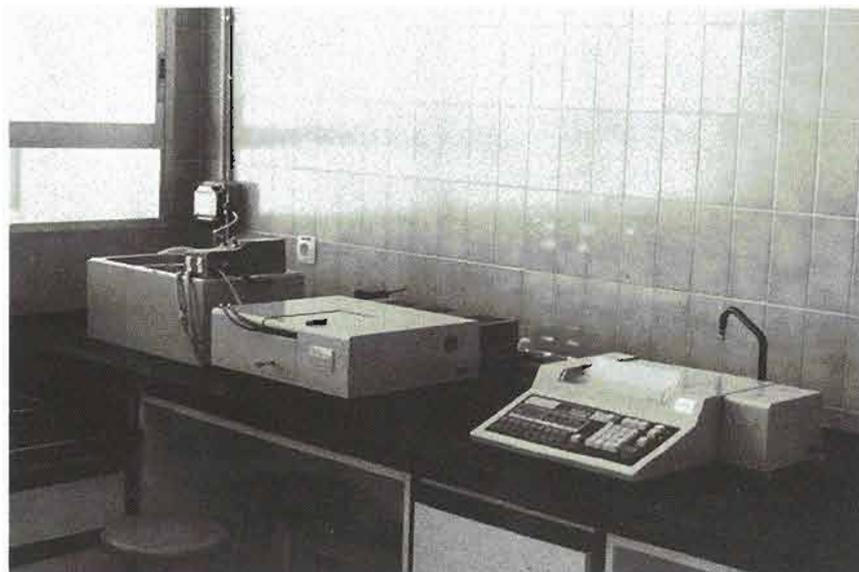
vivientes no tienen una separación tan tajante y el problema con que nos enfrentamos en la década actual consiste en descifrar las complejas interacciones de los factores ambientales que resultan de la aplicación de los plaguicidas.

Esta aplicación tiene dos vertientes: una beneficiosa y otra perjudicial. En primer lugar, el ser humano se alimenta con productos de mejor calidad, frutas y verduras fuera de su estación, se ha conseguido abaratar el costo de los alimentos y se mejora la calidad medio ambiental para el hombre, los animales y las plantas. En cambio, los plaguicidas pueden sufrir alteraciones químicas en condiciones naturales y los metabolitos generados ser peligrosos, incluso más que los componentes originales. Por otra parte, es fácil encontrar estos metabolitos asociados con el sustrato en que descansan (aire, agua, organismos de la cadena alimentaria, suelo, etc...), mostrando un comportamiento tóxico distinto, en ocasiones más virulento.

Probablemente la consecuencia de mayor alcance derivada del espectacular crecimiento de la industria de los



*Como resultado de la aplicación de los productos químicos denominados plaguicidas, el ser humano se alimenta con productos de mejor calidad, obtiene frutas y verduras fuera de su estación, ha conseguido abaratar el costo de los alimentos y mejorar la calidad medio ambiental para el hombre, los animales y las plantas.*



*El uso de la espectrofluorimetría y espectrofotometría como técnicas de análisis de trazas está ampliamente extendido como consecuencia de sus características inherentes de sensibilidad y selectividad, términos que adquieren una dimensión particularmente crítica en el análisis de residuos de productos tóxicos en el medio ambiente.*

plaguicidas en las dos últimas décadas y su consumo desmedido, es su contribución a la contaminación y degradación del medio ambiente por acumulación en los ecosistemas acuático y terrestre, pasando a través de la cadena alimentaria a las especies animales y, por último, al hombre.

No resulta aventurado predecir que seguiremos confiando fuertemente en los plaguicidas, que son todavía esenciales y seguirán siendo la primera línea de defensa contra las plagas, cuando los niveles de daños lleguen a consideraciones económicas.

Además de los factores ya indicados, su intensa actividad biocida y su amplia dispersión en el medio ambiente hace de los plaguicidas el grupo más importante de productos químicos identificados como factores de riesgo ambiental. Los efectos secundarios — no intencionados — en el medio ambiente, han generado la necesidad de una sistemática evaluación de su impacto y análisis de su perfil toxicológico. La correcta evaluación de dicho impacto y el diseño de medidas que conduzcan a eliminar o paliar sus efectos nocivos sólo se puede conseguir si se dispone de datos fiables procedentes de análisis fidedignos.

Por estas razones y debido al carácter tóxico de estos productos sobre el medio ambiente, existen cuerpos legislativos en algunos países y organismos de carácter supranacional que establecen normas conducentes a cumplir unos requisitos relativos a las tolerancias en los intervalos de seguridad en productos alimenticios, ambientes de trabajo, aguas, medio ambiente, etc.

Entre los organismos de carácter internacional que tienen funciones específicamente relacionadas con el desarrollo de metodologías analíticas, regulaciones y control de plaguicidas en el medio ambiente se pueden destacar:

1. **FAO** (Food and Agriculture Organization): establece, entre otras funciones, especificaciones a cumplir para alimentos y productos agrícolas útiles para el consumo humano y animal, suministrando criterios rigurosos y válidos para compradores y vendedores de estas mercancías.
2. **WHO** (World Health Organization): ofrece recomendaciones sobre condiciones del medio ambiente y tolerancias e intervalos de seguridad de contaminantes.
3. **CIPAC** (Collaborative International Pesticides Analytical Council): es una organización internacional constituida por químicos analíticos de unos 30 países. Su función es normalizar métodos de análisis y ensayos físico-químicos para plaguicidas basados en trabajos de colaboraciones inter-laboratorio.

En España, salvo el caso de enfermedades catalogadas como ocupacionales no se realiza un seguimiento epidemiológico sistemático de las patologías originadas por los plaguicidas, ni tampoco se ha potenciado suficientemente el sistema de detección y evaluación de los niveles de estos productos en el medio ambiente y en la población.

Por todo ello, se ha considerado de gran interés el estudio de las posibilidades que ofrece una de las técnicas luminiscentes más ampliamente usadas, la fluorimetría molecular, y las opciones más recientemente descritas (derivadas, espectros sincrónicos, representaciones tridimensionales), para el establecimiento de métodos analíticos de determinación de distintos insecticidas, herbicidas, fungicidas y sus metabolitos, junto con numerosas fitohormonas, en diversas matrices medio ambientales que abarcan el análisis de suelos de cultivo, aguas de riego, fluidos biológicos, frutas y hortalizas de consumo humano y formulaciones comerciales de uso corriente en España.

#### **CARACTERÍSTICAS GENERALES Y TOXICOLÓGICAS DE LOS PLAGUICIDAS**

Los plaguicidas — necesariamente — son sustancias tóxicas, pero sus efectos en la salud de la población y sus mecanismos de acción no son homogéneos. La peligrosidad no depende sólo de la toxicidad del plaguicida sino de otros factores tales como el tiempo de exposición, cantidad de material y vía de entrada y absorción en el organismo.

Para el desarrollo y comercialización de un determinado plaguicida es necesario verificar una serie de experimentos en animales de laboratorio de fisiología semejante a la del ser humano (ratones, ratas, conejos, perros, cerdos). Las pruebas intravenosas se suelen realizar con ratones y ratas, las dérmicas con conejos.

**TABLA I**  
**CLASIFICACION DE LOS PLAGUICIDAS POR SU VALOR DE DL<sub>50</sub> (1)**

TOXICIDAD	VIAS DE ABSORCION		DOSIS LETAL (ser humano)
	DL <sub>50</sub> oral (ratas)	DL <sub>50</sub> dérmico (conejos)	
Supertóxicos	< 5	< 20	Un grano
Extremadamente tóxicos	5 - 50	20 - 200	1 cucharita
Muy tóxicos	50 - 500	200 - 1000	1 ó 2 cuchar.
Moderadamente tóxicos	500 - 5000	1000 - 2000	1 onza - 1 pinta
Ligeramente tóxicos	5000 - 15000	2000 - 20000	1 pinta - 1 cuarto
Prácticamente no tóxicos	> 15000	> 20000	> 1 cuarto

micas con conejos y cerdos y las de toxicidad oral con ratas y perros. Todos estos experimentos son necesarios para determinar las propiedades toxicológicas de los plaguicidas y de esta información se puede extrapolar la toxicidad para el ser humano, pudiendo estar presentes, en algunos casos, en los alimentos ingeridos por el hombre a niveles que se expresan en µg/ml.

La toxicidad de estas sustancias se define con el término DL<sub>50</sub> que representa la dosis necesaria de dicho compuesto para matar el 50% de los animales a los cuales se les ha administrado, bajo condiciones experimentales, expresado en miligramos de producto por kilogramo de peso de cuerpo del animal.

Como ya se ha indicado anteriormente, la dosis, tiempo de exposición y vía de absorción son, además del DL<sub>50</sub>, las variables más importantes a la hora de hablar de toxicidad de un plaguicida. La cantidad de dicho plaguicida necesaria para ocasionar la muerte de un ser humano puede correlacionarse con el DL<sub>50</sub> del material administrado a las ratas de laboratorio. Con estas pruebas se pueden clasificar los plaguicidas de mayor a menor toxicidad y extrapolar las cantidades necesarias para ocasionar la muerte de un ser humano de 77 kg. de peso (Tabla I).

Todos los plaguicidas deben ir acompañados de un etiquetado adecuado que indique la toxicidad del producto. Así, se puede hablar de las siguientes categorías:

1. **Categoría I:** «Peligro-Veneno» para los compuestos supertóxicos

y extremadamente tóxicos (DL<sub>50</sub> entre 0-50 mg./kg.).

2. **Categoría II:** «Advertencia» para los muy tóxicos (DL<sub>50</sub> entre 50-500 mg./kg.).

3. **Categoría III:** «Precaución» para los moderadamente tóxicos (DL<sub>50</sub> entre 500-5.000 mg./kg.).

La categoría a la que pertenece un determinado plaguicida va a depender de distintos factores tales como el tipo de plaguicida o formulación comercial a la que pertenece. Así, con respecto al primer caso, la toxicidad decrece según el orden siguiente: insecticidas > desfoliantes > desecantes > herbicidas > fungicidas. Dentro de la clase más tóxica, que son los insecticidas

ticidas, las categorías siguen este orden en cuanto a toxicidad dérmica para el hombre: organoclorados > organofosforados > carbamatos > ciclodienos > derivados del DDT > botánicos > activantes o sinérgicos > inorgánicos.

En cuanto a las formulaciones comerciales cuyos componentes activos son los plaguicidas, debido a las distintas formas en las que se pueden presentar su toxicidad se ha clasificado de la siguiente forma: plaguicidas líquidos > concentrados emulsionables > soluciones de aceite > emulsiones en agua > soluciones en agua > polvos mojables > polvos > gránulos.

Las consecuencias del continuo incremento del uso en la agricultura de estos productos, han contribuido a establecer una clasificación de la toxicidad de las formulaciones comerciales existentes en España, atendiendo a los posibles riesgos para el hombre y los animales (2), en alguna de las cuatro categorías siguientes:

1. **Categoría A:** productos de baja peligrosidad utilizados de acuerdo con las instrucciones de empleo, pueden considerarse prácticamente inocuos.
2. **Categoría B:** productos de mediana peligrosidad que pueden ser utilizados sin riesgo con un mínimo de precaución.
3. **Categoría C:** productos peligrosos, cuya utilización y manipulación debe ajustarse a normas estrictas con el fin de evitar daños o accidentes.



*Los plaguicidas constituyen un compuesto eficaz en la lucha contra las plagas de pulgones.*



Olmos afectados por Grafiosis.



*La química analítica del medio ambiente es parte esencial en la determinación del valor límite umbral, definición de niveles de inmisión de varios contaminantes y en la caracterización de otros parámetros de importante significado industrial, comercial y legal, en relación con la protección del medio ambiente.*

4. **Categoría D:** productos de extrema peligrosidad cuya manipulación y empleo debe estar controlada y efectuada únicamente por personal especializado bajo normas muy estrictas.

Esta clasificación está basada, fundamentalmente, en el factor persistencia, como principal criterio de peligrosidad, orientándose la investigación de plaguicidas hacia productos que, junto a una eficacia funcional, presentan características de fácil degradación en el medio ambiente y rápida metabolización por los organismos vivos.

Todas las formulaciones comerciales existentes en España van acompañadas de distintas letras, cuyo orden tiene un significado concreto y son del tipo A(BC)/DE/:

- **Clasificación toxicológica:** la primera letra corresponde a la peligrosidad para el hombre, las dos que se encuentran entre paréntesis a la peligrosidad para la fauna terrestre y acuícola, respectivamente (3). Todas definen la toxicología del producto desde un punto de vista legal.
- **Peligrosidad apícola:** viene indicada por las dos letras que aparecen entre barras, la primera define la peligrosidad apícola de la materia activa y la segunda la del producto aplicado en condiciones normales y sin tener en cuenta a las abejas. No se trata de un dato oficial, se basa en los criterios dados por Cano (4).

En todos los casos, además de las siglas anteriormente indicadas, el producto debe ir acompañado de un plazo de seguridad o tiempo que debe transcurrir entre la aplicación del formulado, a la dosis y en las condiciones autorizadas, y la recolección o entrada del ganado. Algunos productos no poseen plazo de seguridad; en estos casos es prudente respetar un plazo mínimo de 15 días.

Además de la toxicología del producto en términos de DL<sub>50</sub> o su categoría toxicológica cuando pertenece a una formulación comercial, el primer paso llevado a cabo para comenzar la investigación realizada fue conocer las características generales de los plaguicidas o fitohormonas y que se han resumido en:

1. **Fórmula empírica:** indicando el peso molecular.
2. **Nomenclatura e historia:** se indica el nombre químico impuesto por la IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry), el nombre común con que se conoce y su descubrimiento.
3. **Propiedades:** incluyen, fundamentalmente, propiedades físicas tales como el punto de fusión y solubilidad en distintos disolventes.
4. **Usos:** se indica el tipo de plaguicida o fitohormona y su utilización agrícola o industrial.
5. **Formulaciones comerciales:** se indican los nombres comer-

ciales y casas suministradoras, así como el porcentaje de producto activo objeto de nuestro estudio.

6. **Métodos analíticos:** se hace una recopilación de todos los métodos de determinación cuantitativa de dicha sustancia que se han obtenido tras una revisión bibliográfica y que nos sirven de guía para conocer las técnicas analíticas más frecuentemente empleadas en el análisis de estos plaguicidas.

Los plaguicidas y fitohormonas seleccionados para este estudio, junto con sus características generales más relevantes se indican en la Tabla II. La clasificación de estos compuestos atendiendo al tipo de función que desempeñan es la siguiente:

#### 1. Fitohormonas y herbicidas

En las explotaciones agrícolas son de uso corriente sustancias reguladoras del crecimiento de las plantas, también denominadas fitohormonas. Estas sustancias se utilizan para influenciar favorablemente el crecimiento de las propias plantas cultivadas a diferencia de los herbicidas que destruyen o impiden el crecimiento de las plantas que compiten con las mencionadas.

En los últimos 25 años se han publicado casi 10.000 trabajos de investigación relacionados con los cinco grupos de fitohormonas actualmente recono-



cidos por la Sociedad Americana para las Ciencias Hortícolas: auxinas, giberelinas, citoquininas, generadores de etileno e inhibidores y retardadores del crecimiento.

La baja toxicidad de estos compuestos, y de los herbicidas en general para el hombre; hace que los niveles tolerados en los países en los que están regulados sean relativamente altos. En cualquier caso, el hecho de que sean poco tóxicos no implica que no sean nocivos si se ingieren de forma incontrolada, como cualquier producto químico. Estos compuestos se suelen encontrar a niveles de trazas en tejidos vegetales, siendo el extracto típico muy complejo. De estos dos factores se deduce la dificultad que supone este tipo de análisis y la necesidad de métodos analíticos que permitan dicha determinación de una forma sensible y selectiva en muestras de plantas relativamente pequeñas.

En el presente trabajo se han propuesto métodos de análisis espectrofluorimétricos para seis fitohormonas del grupo de las auxinas, tres derivadas del naftaleno (**ácido naftalenacético**, **naftalenacetamida**, **ácido 2-naftoxiacético**) y tres derivadas del índol (**ácido 3-Indolacético**, **ácido 3-indolbutírico**, **ácido 3-indolpropionico**); un representante de las giberelinas (**ácido giberélico**) y otro de los retardadores o inhibidores (**ácido abscísico**).

Tanto el ácido giberélico ( $GA_3$ ) como el ácido abscísico (ABA) son dos constituyentes naturales de las plantas, ca-

*La dosis, tiempo de exposición y ruta de absorción son, además del  $DL_{50}$ , las variables más importantes a la hora de hablar de toxicidad de un plaguicida. La cantidad de dicho plaguicida necesaria para ocasionar la muerte de un ser humano puede correlacionarse con el  $DL_{50}$  del material en las ratas de laboratorio.*

paces de producir profundos cambios fisiológicos y morfológicos en las mismas a concentraciones extremadamente bajas, ampliamente usados en la industria de la conversión de la cebada (industria cervecera) y para evitar el florecimiento de las cosechas almacenadas, respectivamente.

Dentro del grupo denominado herbicidas se han analizado dos de naturaleza química muy diferente: el **profam** y el **flurenol**. El primero es un N-fenil carbamato; el segundo deriva del ácido fluorenacético. El profam es un herbicida de absorción radicular que, en principio, sólo se empleó en tratamientos de pre-emergencia en remolacha, guisante y menta y que actualmente ha extendido su uso a tratamientos de post-emergencia en gramíneas. En general, se pretende utilizar dosis mínimas de las formulaciones comerciales existentes en España y sólo dosis más elevadas en aquellos casos en que se prevea un largo período de almacenamiento, como es el caso de la patata de consumo. El flurenol es otro herbicida de absorción radicular y foliar causante de una inhibición general del crecimiento de la planta. La dosis oscila entre 1.5 - 2.5 gramos y su aplicación debe hacerse de acuerdo con las normas establecidas (B.O.E. 8.10.1973), teniendo en cuenta que este compuesto persiste en el suelo alrededor de 42 días.

## 2. Insecticidas

Como ya se ha indicado anteriormente, existen distintos tipos de insecticidas dependiendo de su estructura química. Los insecticidas organoclorados han sido los predominantes desde un punto de vista histórico y aunque son extraordinariamente eficaces, debido a su persistencia, se está restringiendo su uso por el peligro que entrañan para otros seres vivos, incluido el hombre. A diferencia de lo que ocurre en España, la legislación sobre estos insecticidas, es más estricta en otros países, habiéndose logrado restringir su uso y aumentando el de los organofosforados y los carbamatos, que están sujetos a una destrucción más rápida.

De estos últimos dos grupos se han estudiado tres insecticidas ampliamente usados en España: **carbaril**, **promecarb** y **metal paratión**, los dos primeros N-metil carbamatos y el último organofosforado.

TABLA II  
CARACTERISTICAS GENERALES DE LOS PLAGUICIDAS ANALIZADOS (24-26)

NOMBRE COMUN	TIPO	ESTRUCTURA QUIMICA	Pm (g/mol)	Pto. fusión (°C)	DL <sub>50</sub> (mg/kg)	USOS	FORMULACIONES	METODOS ANALITICOS (referencias)
ANA	Fitohormona		186.0	134 - 136	1.000	Para, Manzana, Piña,	Fruit hormone, Frufix, Rodofix	(27), (28), (29)
NAD	Fitohormona		185.2	184	6.400	Frutas	Amid-thin	(30)
ANOA	Fitohormona		202.2	156	600	Tomates, uvas, fresas	Tomador-NT	(31), (32)
GA <sub>3</sub>	Fitohormona		346.4	221 - 223	15.000	Cítricos	Giberol, Berelex	(39), (40)
ABA	Fitohormona		264.2	—	—	Tabaco, cabollas, patatas.	—	(41), (42)
IAA	Fitohormona		175.2	168 - 170	—	Peras, patatas, remolacha	—	(50), (51)
IBA	Fitohormona		189.2	123 - 125	100	Peras, patatas	—	(52), (53)
IPA	Fitohormona		203.2	—	—	Hortalizas	—	(43)
CARBARIL	Insecticida		201.2	142	500	Frutales, Hortalizas	Muy numerosas	(44 - 47)
PROMECARB	Insecticida		207.3	—	74	Cítricos	Carbamult F-50	(54)
METIL PARATION	Insecticida		263.2	36 - 36	14	Frutales y hortalizas	Folidol M-2	(53), (56), (57)
FLURENOL	Herbicida		226.2	166	5.000	Arroz, cereales	Aniten N	(33), (34)
IPC	Herbicida		179.2	87	5.000	Gramíneas, lechuga	Tuberite, Anibrotanol	(48), (49)
TBZ	Fungicida		201.2	304 - 305	3.300	Frutales	Fumigist	(35), (36)
MBC	Fungicida		191.2	310	15.000	Cereales	Bendazim, Berelex	(39), (40)

Como se puede observar en la Tabla II, los insecticidas son los compuestos que presentan mayor toxicidad (menor DL<sub>50</sub>) llegando a ser de 14 mg./kg. en el metil paratión, por lo que es necesario disponer de métodos de análisis altamente sensibles.

El carbaril es un insecticida de contacto que posee unas propiedades excelentes en lo que se refiere a los residuos que origina. Controla la mayoría de los insectos y se ha comprobado su efectividad en más de 40 clases diferentes de frutas, verduras y cosechas (5). Por todo ello, además de su baja toxicidad para las plantas, es uno de

los plaguicidas más ampliamente usados hoy día en el mundo. En cambio, al igual que la mayoría de los insecticidas carbámicos, surten efectos nocivos en el hombre, habiéndose observado efectos embriotóxicos, teratogénicos, mutagénicos y carcinogénicos en estudios realizados con ratas de laboratorio (6, 7, 8).

El promecarb, al igual que el carbaril, es un insecticida carbámico que actúa por contacto, ingestión e inhalación, produciendo inhibición de la colinesterasa en los mamíferos. En España se distribuye como producto comercial en forma de polvo mojable al 50%

con una toxicidad de la categoría B(BB)/CC/, es decir, altamente tóxico para la fauna terrestre y acuícola, con un plazo de seguridad de 28 días.

El metil paratión es un insecticida organofosforado no sistemático con gran poder de penetración y actividad por contacto e ingestión. Debido a su relativamente rápida descomposición y baja acumulación en las cadenas de alimentación biológica, este insecticida se ha empleado para sustituir a otros agentes más persistentes y tóxicos como los organoclorados. La toxicología de la mayoría de las formulaciones comerciales usadas en España es muy

elevada, necesitando un plazo mínimo de seguridad de 21 días. Ciertos estudios han demostrado que, bajo condiciones ambientales, puede persistir en el suelo o en el agua a niveles de  $\mu\text{g/ml}$  durante un cierto número de días o semanas, dependiendo del pH y la temperatura (9).

### 3. Fungicidas

Dentro del gran número de productos químicos usados en el control de microorganismos, concretamente, fungicidas, bactericidas, algucidas y desinfectantes, hemos destacado, únicamente, el estudio de dos fungicidas ampliamente usados en el campo o en el almacén.

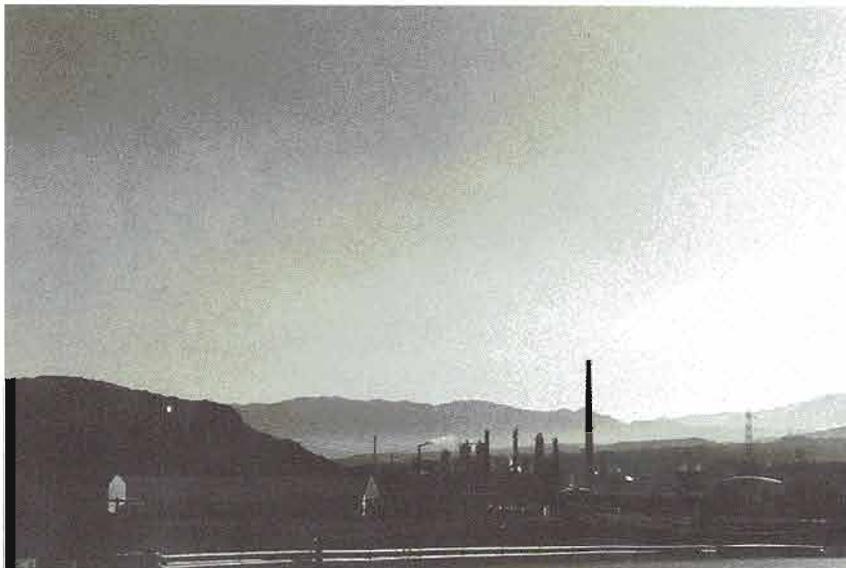
Se trata de dos compuestos de estructura química semejante, por ser ambos derivados del benzimidazol, denominados **tiabendazol** y **carbendazima**. Debido a que este último es un producto de degradación natural del también ampliamente usado fungicida benomil, su presencia junto con el tiabendazol es frecuente, de ahí que exista un gran interés por una determinación conjunta de ambos compuestos.

#### **METODOLOGÍA GENERAL USADA EN EL ESTABLECIMIENTO DE LOS METODOS DE ANALISIS**

Una vez conocidas las características físicas y químicas de la sustancia objeto de estudio, se deduce de su estructura la posibilidad de una determinación empleando la técnica fluorimétrica o fotométrica.

El uso de la espectrofluorimetría y espectrofotometría como técnicas de análisis de trazas, está ampliamente extendido a consecuencia de sus características inherentes de sensibilidad y selectividad. Estos son criterios a tener en cuenta en la selección de un determinado método o en el desarrollo de técnicas analíticas, ya que estas sustancias tóxicas se encuentran en distintas matrices tales como fluidos biológicos, tejidos animales y vegetales, alimentos y muestras ambientales a niveles inferiores a  $1 \mu\text{g/ml}$ , por lo que los términos sensibilidad y selectividad adquieren una dimensión particularmente crítica.

Para ambas técnicas, un método queda caracterizado al establecer el límite de detección, rango dinámico li-



*Los efectos secundarios, no intencionados, en el medio ambiente han generado la necesidad de una sistemática evaluación de su impacto y un análisis de su perfil toxicológico. La correcta evaluación de dicho impacto y el diseño de medidas que conduzcan a eliminar o paliar sus efectos nocivos sólo se puede conseguir disponiendo de datos fiables procedentes de análisis fidedignos.*

neal, sensibilidad, precisión y exactitud. Para determinar la precisión y exactitud del método propuesto se llevan a cabo ensayos de reproducibilidad, consistentes en la determinación de varias muestras (oscilan entre 7 y 11) conteniendo la misma concentración y preparadas según el procedimiento operatorio propuesto. El tratamiento estadístico de estos resultados nos conducirá al conocimiento del error relativo sobre el valor medio (error, %) y la desviación estandar relativa (D.E.R., %), que evalúan conjuntamente la precisión y exactitud de la determinación.

La sensibilidad de un método analítico se ha definido como sensibilidad analítica (10), que es inversamente proporcional a la desviación estandar derivada de los ensayos de reproducibilidad y viene expresada en unidades de concentración ( $S_A$ ), lo que permite un sistema coherente y comparativo de evaluación de métodos analíticos, independientemente de la técnica empleada.

Establecida la sensibilidad, precisión y exactitud de la determinación analítica, el límite de detección o mínima cantidad que se puede detectar se calcula en base a los criterios establecidos por la IUPAC (11, 12).

Para determinar la selectividad del método propuesto se realizan ensayos sobre muestras sintéticas conteniendo otras sustancias además de aquella objeto de análisis. La interferencia producida por la sustancia extraña puede venir expresada en forma de error cometido en la determinación o porcentaje de recuperación. El criterio de tolerancia para estas interferencias se basa en el establecido por Sommer (13).

Como se observa hasta el momento, se ha puesto especial énfasis en la descripción de las características analíticas de los métodos puestos a punto, aunque finalmente sean los criterios técnicos junto con las consideraciones económicas las que van a decidir la elección de una metodología concreta para resolver un problema determinado.

La optimización de los métodos analíticos se ha llevado a cabo teniendo muy en cuenta la naturaleza del analito, la cual define el rango analítico que



*Probablemente la consecuencia de mayor alcance derivada del espectacular crecimiento de la industria de los plaguicidas en las dos últimas décadas y el consumo desmedido de estos productos, es su contribución a la contaminación y degradación del medio ambiente por acumulación en los ecosistemas acuático y terrestre pasando, a través de la cadena alimentaria, a las especies animales y, por último, al hombre.*

debe predominar o que debe ser favorecido preferentemente y, también, que existe una estrecha relación entre las características analíticas de un método. Así, en general, una mejora en la selectividad de un método se hace a expensas de la sensibilidad, y un aumento de la precisión por un factor «n» puede llegar a aumentar el costo en «n<sup>2</sup>».

Todos estos factores se han tenido en cuenta a la hora de la estrategia a seguir en la optimización de las variables experimentales, las cuales son función del tipo de método y la técnica utilizada. Sin embargo, ha habido unos tópicos generales en los que se ha puesto especial cuidado por su incidencia en el fenómeno luminiscente. Estos factores son:

- Efecto del pH.
- Comportamiento en distintos disolventes.

- Influencia de la temperatura.
- Oxígeno.
- Fotodescomposición.
- Contaminación de los disolventes, muestras y recipientes.

Optimizadas todas las variables experimentales, se procede a la caracterización de la longitud de onda de trabajo mediante el registro de los espectros de fluorescencia o absorción a las condiciones óptimas seleccionadas.

Como se ha indicado anteriormente, los criterios de sensibilidad y selectividad son extraordinariamente importantes al hablar de análisis de residuos de productos tóxicos en el medio ambiente. Debido a la falta de selectividad que a veces presentan las técnicas luminiscentes, se ha hecho uso de metodologías avanzadas cuya selectividad ha sido probada en distintos campos de la química analítica recientemente (14-18) y que comprenden el

registro de espectros sincrónicos, tridimensionales y derivadas, estas últimas aplicadas tanto a la técnica fluorimétrica como fotométrica.

La optimización de los parámetros instrumentales que afectan a este tipo de metodologías consiste en la selección de los valores de estos parámetros, de tal forma que se obtenga la mejor respuesta, que no tiene por qué ser la más alta o el máximo, sino que dependerá de la técnica y del parámetro en concreto.

Además de estos parámetros instrumentales, el soporte informático (software) que ofrece la instrumentación actual permite obtener más y mejor información del sistema analítico en estudio con el mismo instrumento. Mediante la modificación efectuada en el programa de software suministrado por la casa comercial Perkin-Elmer para el espectrofluorímetro LS-5, se han

podido utilizar técnicas tridimensionales para la optimización de los parámetros instrumentales que afectan a los espectros sincrónicos y, especialmente, en la resolución de mezclas binarias y ternarias de plaguicidas de estructura química semejante.

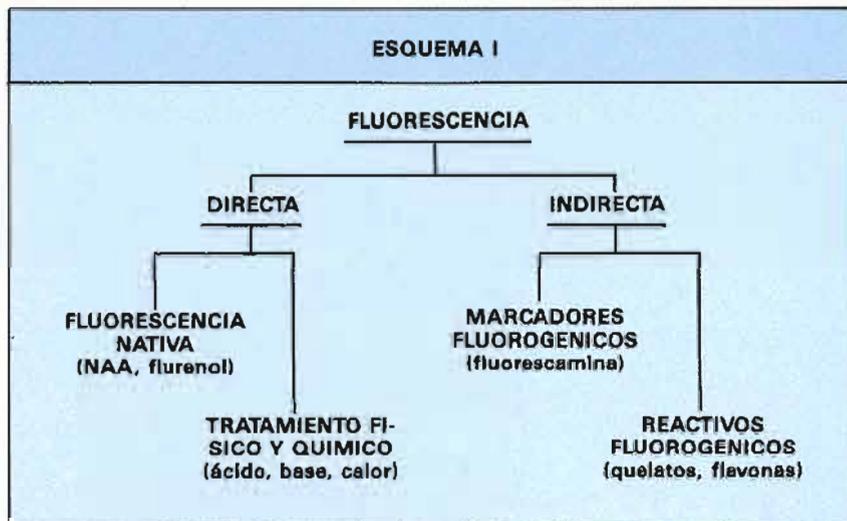
## APLICACION DE LAS TECNICAS LUMINISCENTES EN EL ANALISIS DE PLAGUICIDAS EN EL MEDIO AMBIENTE

La química del medio ambiente, en todos sus aspectos, representa un papel en la provisión de información en los procesos ambientales. Así, los contaminantes que penetran en el medio ambiente procedentes de la acción del hombre, precisan un análisis químico detallado si se pretende identificar el mecanismo y vías para las que se actúan. Pero, además, la química medio ambiental no sólo constituye el nivel de conocimientos generales de estos procesos, sino que representa un papel importante en el diseño de programas de requisito, control y análisis para detectar tendencias ambientales, un ritmo y su gradiente, y para suministrar datos que procuren asistencia en la atenuación de los efectos potencialmente peligrosos.

La química analítica del medio ambiente encaja así como una parte importante, esencial en la determinación del TLV (valor límite umbral), definición de niveles de inmisión de varios contaminantes y en la caracterización de otros parámetros de importante significado industrial, comercial y legal, en relación con la protección del medio ambiente.

El problema del análisis de trazas en el medio ambiente no es, pues, trivial. No es una moda regida por un código arbitrario sino la consecuencia de un reto de nuestros días surgido de la tremenda importancia que muy pequeñas concentraciones de determinadas especies tienen en determinados sistemas y su proyección en ciencia y tecnología.

Aunque existen métodos analíticos para la determinación de prácticamente cualquier plaguicida, la mayoría de ellos requieren técnicas cromatográficas que, en muchos casos, no son satisfactorias por diversas causas, unas veces económicas y otras técnicas. El criterio económico más obvio es el costo. La instrumentación y el equipo



de los laboratorios es caro, pero si el método a aplicar es sencillo y rápido y se efectúan un número suficiente de muestras por unidad de tiempo, el coste unitario resulta mucho menor.

En los casos de intoxicación por insecticidas que inhiben la colinesterasa en el hombre, las muestras de sangre han de ser analizadas en el plazo de 4 horas, por lo que la Organización Mundial de la Salud (19) sugiere la investigación con métodos sencillos que precisen material portátil para vigilar dicha exposición.

Por estos motivos y el creciente interés en el establecimiento de métodos analíticos para la determinación de plaguicidas en distintas matrices medio ambientales, se han desarrollado y puesto a punto métodos de análisis para la determinación de los plaguicidas y fitohormonas indicados en la Tabla II, tanto por la mejora que pueden aportar como para su disposición en análisis confirmatorios.

La principal restricción que se plantea al utilizar la espectrofluorimetría como técnica de análisis procede de la condición necesaria para una determinación directa de que el plaguicida o fitohormona objeto de análisis sea fluorescente. Por desgracia, el número de estas sustancias que presentan fluorescencia nativa o intrínseca es muy limitado. Este problema es subsanado mediante el trazado de un perfil de trabajo que comprenda todas las opciones posibles, en las que el problema luminiscente pueda participar en metodologías asociadas a los plaguicidas o fitohormonas.

Los métodos generales en que se basa la fluorescencia como técnica analítica se pueden clasificar en dos

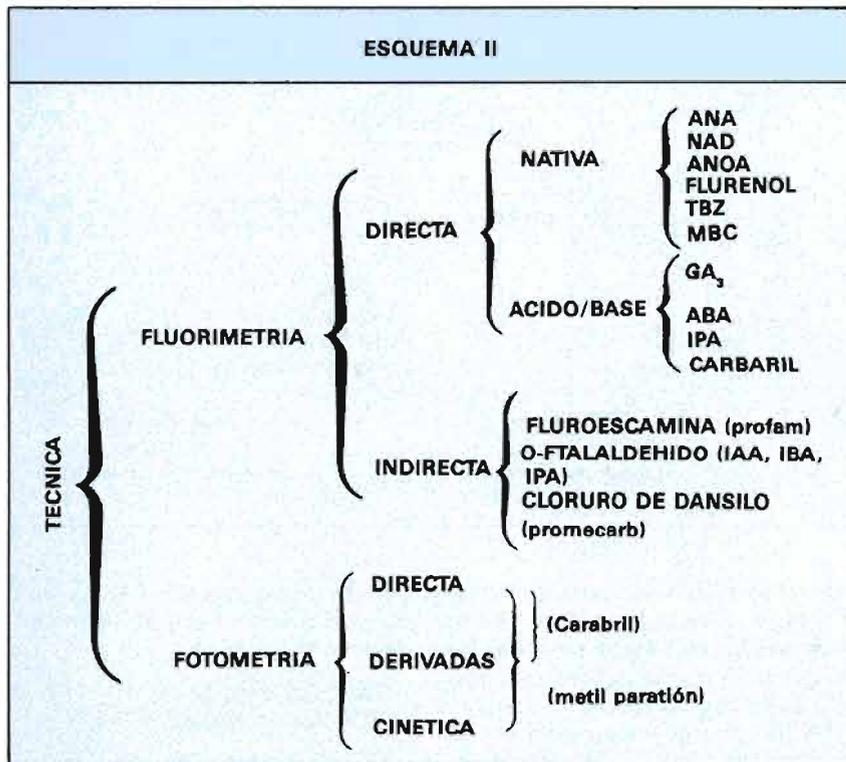
grandes grupos, atendiendo a la naturaleza que sirve de objeto a la medida (Esquema I):

- Métodos directos.
- Métodos indirectos.

En los primeros se estudian sistemas en los que la fluorescencia del analito es nativa o producida por tratamiento con ácidos o bases fuertes, mientras que en los segundos se requiere una reacción de la sustancia con un reactivo adecuadamente denominado marcador fluorogénico, para dar lugar a un compuesto de naturaleza química diferente.

En el Esquema II se puede observar la clasificación que se ha realizado de los plaguicidas y fitohormonas estudiadas, según el tipo de metodología empleada. Así, dentro de los métodos directos por fluorescencia nativa se han analizado las fitohormonas ácido naftalenacético (ANA), naftalenacetamida (NAD) y ácido 2-naftoxiacético (ANO) y mezclas binarias de los mismos; el herbicida flurenol en suelos de cultivo de la provincia de Granada y los fungicidas tiabendazol (TBZ) y carbendazima (MBC) en extractos vegetales de pimiento, tomate y patata obtenidos de los mercados locales.

Por tratamiento con ácido sulfúrico concentrado al 85% se han analizado las fitohormonas ácido giberélico (GA<sub>3</sub>), ácido abscísico (ABA), ácido 3-indolpropanoico (IPA) y mezclas binarias y ternarias de los mismos. Por tratamiento con hidróxido sódico el insecticida carbaril en forma de N-metil carbamato o como su metabolito el 1-naftol. Se ha aplicado en muestras biológicas, concretamente sangre de rata y a formulaciones comerciales



determinación del herbicida profam en aguas de riego de la provincia de Málaga, la familia de las fitohormonas del indol (ácido 3-indolacético, ácido 3-indolbutírico y ácido 3-indolpropaico) en mezclas binarias de las mismas y el insecticida promecarb, respectivamente.

Por último, en el curso de la investigación realizada, las experiencias suministraron información sobre sistemas en los que la aplicación de las técnicas espectrofotométricas dieron lugar a procedimientos analíticos de gran calidad. Así nos hemos ocupado del estudio de los insecticidas carbaril y su metabolito el 1-naftol por técnicas fotométrica, directa y de derivadas, aplicado a sangre de rata y formulaciones comerciales y del insecticida metil paratión por las tres técnicas, directa, de derivadas y cinética, aplicado a formulaciones comerciales con resultados muy satisfactorios.

En todos los métodos establecidos, tras la optimización de variables experimentales e instrumentales se procede a la caracterización de los métodos estableciendo los límites de detección y demás características analíticas que se indican en la Tabla III para los distintos métodos propuestos.

La utilidad de estos métodos se ha puesto de manifiesto mediante la apli-

(Patatol AC, Agrex S-7 y Sevim 85 PM) conteniendo distintos porcentajes de carbaril que suponen dos metodologías distintas dentro del análisis de plaguicidas.

Dentro de los métodos fluorimétri-

cos indirectos se ha utilizado sistemáticas de marcado que comprendan los medios homogéneos y heterogéneos con los tres marcadores más ampliamente usados: fluoescamina, O-ftalaldehído y el cloruro de dansilo, para la

**TABLA III**  
**CARACTERISTICAS DE LOS METODOS ANALITICOS ESTABLECIDOS**

PLAGUICIDA	$\lambda_{ex}$ (nm)	$\lambda_{abs}$	$\lambda_{em}$ (nm)	$S_A$ (ng/ml)	$C_L$ (ng/ml)	RANGO DINAMICO LINEAL (ng/ml)	$x^a$ (ng/ml)	ERROR (%)	D.E.R. (%)	APLICACIONES
ANA	275		330	0.53	1.15	3.85 - 90.00	16.82	3.23	4.96	Muestras evaluaciones
NAD	283		333	0.30	0.70	2.40 - 25.00	8.20	3.90	5.80	Muestras evaluaciones
ANOA	270		345	0.38	1.14	3.80 - 25.00	9.32	3.15	4.74	Muestras evaluaciones
FLURENOL	310		495	0.48	40.90	136.40 - 1000.00	700.50	2.28	2.89	Suelos de cultivo
TBZ	297		341	8.09	24.27	80.91 - 450.00	272.50	2.67	2.99	Hortalizas
MBC	239		309	5.73	17.18	57.27 - 900.00	534.70	0.97	1.08	Hortalizas
GA <sub>3</sub>	410		455	1.74	3.50	7.60 - 40.00	29.60	3.92	5.88	Frutas
ABA	455		490	0.33	0.55	1.83 - 400.00	10.30	2.72	3.20	Muestras evaluaciones
IPA	463		540	6.70	2.50	8.30 - 400.00	186.00	3.30	3.70	Muestras evaluaciones
	285		333	0.91	0.57	1.90 - 2000.00	9.82	6.21	9.27	Formulaciones y
CARBARIL		279		2200.00	70.00	200.00 - 40000.00	900.00	3.20	2.80	sangre
	330		460	0.26	0.76	2.50 - 100.00	9.79	1.74	2.65	Formulaciones y
1-NAFTOL		306		2700.00	20.00	200.00 - 40000.00	70.00	4.50	4.00	sangre
IPC	400		510	2.50	7.20	24.00 - 175.00	84.80	2.62	2.93	Aguas de riego
IAA		285	407	0.63	0.50	1.70 - 1000.00	8.90	5.03	7.13	Muestras evaluaciones
IBA		395	435	0.61	0.19	0.60 - 500.00	4.76	8.96	12.58	Muestras evaluaciones
IPA <sup>b</sup>	390		430	0.32	0.18	0.61 - 500.00	4.81	4.57	6.48	Muestras evaluaciones
PROMECARB	340		485	70.00	90.00	150.00 - 10000.00	650.00	9.73	10.88	Muestras evaluaciones
METIL PARATION		400		20.00	60.00	200.00 - 2000.00	293.9	8.62	9.64	Formulaciones

a) Valor medio obtenido en los ensayos de reproducibilidad.

b) Método de determinación por reacción de marcado con o-ftalaldehído.

cación de los mismos a muestras reales en que las características analíticas del método adquieren una dimensión propia. La selección de tipos de matrices se ha hecho atendiendo fundamentalmente a dos criterios. En primer lugar el interés que presenta el problema analítico, utilizando criterios lógicos. Así, por ejemplo, el carbaril y su metabolito el 1-naftol, debido a su toxicidad elevada y su uso tan extendido ha sido analizado en sangre y formulaciones comerciales; los fungicidas tiabendazol y carbendazima en productos comestibles hortofrutícolas donde normalmente se encuentran; los herbicidas flurenol y profam en suelos de cultivo y aguas de riego, como consecuencia de su aplicación en el suelo para el tratamiento de las hierbas.

El segundo criterio ha sido dictado por las propias especificaciones que ofrecen los métodos establecidos. Una insuficiente sensibilidad puede aconsejar el análisis de residuos mediante una determinada metodología. En los casos en los que se ha hecho necesaria la preparación de extractos semicrudos para eliminar la mayor parte de las sustancias que acompañan el

analito de una determinada muestra, se ha utilizado la extracción con disolventes. Los métodos de extracción empleados en cada caso se han basado en sistemáticas ya probadas y descritas en la bibliografía (20-23), con algunas modificaciones específicas cuando ello ha sido necesario, como en el caso de flurenol, para el cual no existía sistemática alguna.

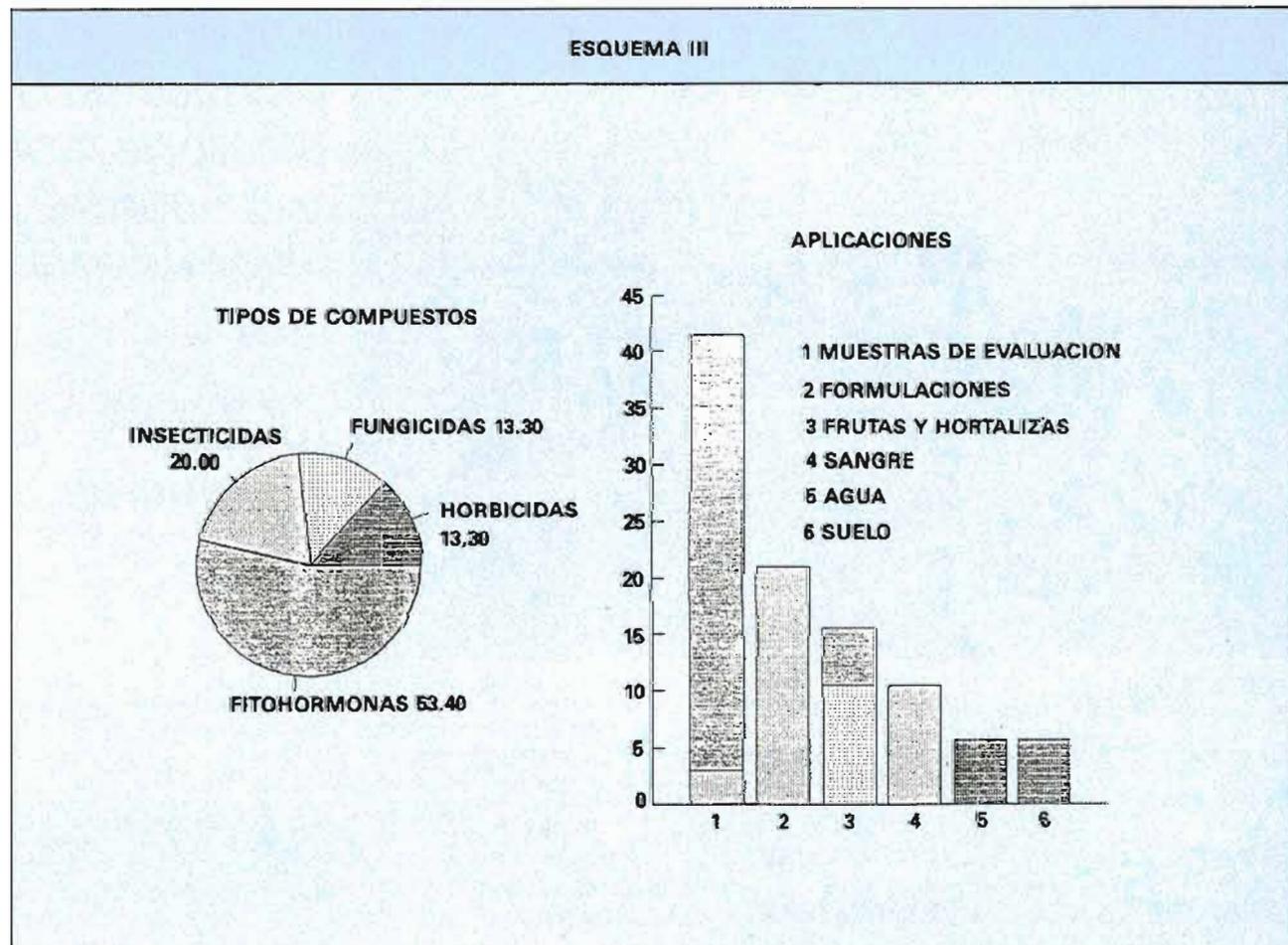
En todos los casos se ha intentado conseguir un equilibrio entre los productos químicos analizados, dentro de sus distintas variedades y las metodologías empleadas dentro de las técnicas fluorimétricas y fotométricas.

En cuanto a las aplicaciones, se ha concedido especial importancia a la aplicación de los métodos propuestos en una amplia variedad de matrices. Así, estas matrices analizadas abarcan el análisis de suelos de cultivo, aguas de riego, fluidos biológicos, frutas y hortalizas de consumo humano y formulaciones comerciales empleados ampliamente en España (Esquema III), demostrando la utilidad de las técnicas luminiscentes como herramientas para el control y análisis de rutina en los laboratorios.

## BIBLIOGRAFIA

- WARE, G. W. y FREEMAN, W. H.: En: *Pesticides: theory and application*. San Francisco (1978).
- «Boletín Oficial del Estado» (España). Orden Ministerial del 29.09.76. Boletín del 11 de octubre (1976).
- Orden Ministerial del 31 de enero (1973).
- CANO MANUEL, J. R. M.: En: *Productos fitosanitarios 78. Servicio de Defensa contra plagas e Inspección Fitopatológica*. Ministerio de Agricultura, Madrid (1978).
- EPA (Environmental Protection Agency): *Carbaryl decision document*, Washington, D. C. Office of Pesticides and Toxic Substances, Diciembre (1980).
- ELESPURU, R. *Nature*, 247, 386 (1974).
- UCHIYAMA, M. *Bull. Environ. Cont. Toxicol.*, 14, 589 (1975).
- WEIL, C. S.: *Tox. and appl. pharmacol.*, 26, 621 (1973).
- PASCHAL, D. C., BICKNELL, R. y DREBACH, D.: *Anal. Chem.*, 49 (11), 1551, (1977).
- GARCIA SANCHEZ, F. y CRUCES BLANCO, C.: *Anal. Chem.*, 58, 73 (1986).
- «Nomenclature, symbols, units and their usage in Spectrochemical Analysis». II. *Spectrochim. Acta*, parte B, 33B, 242 (1978).
- «Guidelines for Data Acquisition and Data Quality Evaluation in Environmental Chemistry», *Anal. Chem.*, 52, 2242 (1980).
- SOMMER, L., LANGOVA, M. y KUBAN, V. «Scripts. Fac. Sci. Netur. Ujep. Brunensis». *Chemia*, 8, 13 (1978).
- GARCIA SANCHEZ, F. y HERNANDEZ LOPEZ, M.: *Talanta*, 33 (10), 785 (1986).

ESQUEMA III



- MEDINILLA, J., ALES, F. y GARCIA SANCHEZ, F.: *Talanta*, 33(4), 329 (1986).
- CRUCES BLANCO, C. y GARCIA SANCHEZ, F.: *Anal. Chem.*, 56, 2035 (1984).
- CRUCES BLANCO, C. y GARCIA SANCHEZ, F.: *Anal. Chim. Acta*, 166, 277 (1984).
- GARCIA SANCHEZ, F., CRUCES BLANCO, C. y RAMOS RUBIO, A. L.: *J. Mol. Structure*, 143, 473 (1986).
- OMS (Organización Mundial de la Salud), Serie de Informes Técnicos 677, pág. 40, Ginebra (1982).
- KITADA, Y., SASAKI, M. y TANIGAWA, K.: *J. Ass. Off. Anal. Chem.*, 65(6), 1302 (1982).
- NORMAN, S. M., FOUSE, D. C. y CRAFT, C. C.: *J. Agr. Food Chem.*, 20 (6), 896, (1970).
- MCDERMOTT, W. H. y DUVALL, A. H.: *J. Ass. Off. Anal. Chem.*, 65(1), 40.
- SANE, R. T. y KAMAT, S. S.: *J. Ass. Off. Anal. Chem.*, 65(1), 40 (1982).
- WORTHING, C. R.: En: *The Pesticide Manual. A world compendium*, 7.<sup>a</sup> edición, The British Crop Protection Council, Inglaterra (1983).
- De LIÑAN y VICENTE, C.: En: *Vademecum de productos fitosanitarios*. Ministerio de Agricultura, Madrid (1985).
- ZWEIG, G.: En: *Analytical Methods for Pesticide and plant growth regulators*, Wiley Interscience, Nueva York, 11 volúmenes (1964 - 1988).
- JOLLIFFE, V. A. y COGGINS, C. W. Jr.: *J. Agr. Food Chem.*, 187(3), 394 (1970).
- COCHRANE, W. P. y LANOUILLE, M.: *J. Ass. Off. Anal. Chem.*, 62(1), 100, (1979).
- ARCHER, T. E. y STOKES, J. D.: *J. Agr. Food Chem.*, 31, 286 (1983).
- COCHRANE, W. P., LANOUILLE, M. y GRANT, R.: *J. Ass. Off. Anal. Chem.*, 63, 145 (1980).
- ARCHER, T. E.: *J. Agr. Food Chem.*, 26(2), 452 (1978).
- TRAUTWEIN, N. L. y GUYON, J. C.: *Mikrochim. Acta*, 1, 413 (1983).
- SIEPER, H.: IUPAC Congress of Pesticide Chemistry, Tel Aviv, (1971).
- AMADORI, E. y HAMPT, W.: En: *Analytical Methods for pesticide and planta growth regulators*, Vol. 11, p. 319 (1980).
- COLLINGE, A. y NOIRFALISE, A.: *J. Chromatogr.*, 257, 416 (1983).
- BARDELAYE, P. C. y WHEELER, W. B.: *J. Ass. Off. anal. chem.*, 69(1), 114, (1986).
- OGIERMAN, L.: *J. chromatogr. Sci.*, 19(10), 518 (1981).
- CHIBA, M. y SIGH, R. P., *J. Agr. Food Chem.*, 34, 108 (1986).
- HOLT SACKETT, P.: *Anal. chem.*, 56, 1600 (1984).
- CRUCES BLANCO, C. y GARCIA SANCHEZ, F.: *J. Ass. Off. Anal. chem.*, 69(17), 105 (1986).
- DURLEY, R. C., KANNANGARA, T. y SIMPSON, G. M.: *J. Chromatogr.*, 236, 181, (1982).
- PASTORE, T. C. M., NICOLA, E. y LIMA, C. G.: *Analyst*, 109, 243 (1984).
- VANELLI, J. J. y SCHULMAN, E. M.: *Anal. Chem.*, 56(6), 1030 (1984).
- KRAUSE, R. T.: *J. Ass. Off. anal. Chem.*, 68(4), 734 (1985).
- SPITTLER, T. D., MARAFIOTI, R. A., HELFMAN, G. W. y MORSE, R. A., *J. Chromatogr.*, 352, 439 (1986).
- GARCIA SANCHEZ, F. y CRUCES BLANCO, C. *Environ. Anal. Chem.*, enviado.
- TENA, M., MAGALLANES, M. y GARRIDO, R.: *An. Quim.*, 78C, 73 (1986).
- GARCIA SANCHEZ, F. y CRUCES BLANCO, C.: *Anal. Chem.*, 58, 73 (1986).
- JENSEN, E., ERNSTEN, A. y SANDBERG, G.: *Plant Growth regulators*, 4(1), 55 (1986).
- GARCIA SANCHEZ, F., HEREDIA, A. y REQUENA, G.: *Anal. letter*, 19B, 1939 (1986).
- WURST, M., PRIKRYL, Z. y VANCURA, V.: *J. Chromatogr.*, 191, 129 (1980).
- KRAUS, L. y RICHTER, R.: *Chromatographie, GIT Suppl.*, 63 (1982).
- GUNEW, D. S.: *Analytical Methods for pesticide and planta growth regulators*, Vol. XI, p. 141 (1980).
- DING, X-D y KRULL, I. S.: *J. Agr. Food Chem.*, 32(3), 622 (1984).
- CLARK, G. J., GOURDIN, R. R. y SMILEY, J. W.: *Anal. Chem.*, 57, 2223 (1985).
- HERNANDEZ MENDEZ, J., CARABIAS MARTINEZ, R. y SANCHEZ MARTIN, J.: *Anal. Chem.*, 58, 1969 (1986).