

**IMPLEMENTACIÓN DE UNA TÉCNICA DE ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO PARA
DETERMINAR N-METILCARBAMATOS Y SUS PRODUCTOS DE DEGRADACIÓN EN
MUESTRAS DE AGUA**

MARTHA ISABEL BARRERA PÉREZ

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
BUCARAMANGA
2005**

**IMPLEMENTACIÓN DE UNA TÉCNICA DE ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO PARA
DETERMINACIÓN N-METILCARBAMATOS Y SUS PRODUCTOS DE DEGRADACIÓN EN
MUESTRAS DE AGUA**

MARTHA ISABEL BARRERA PÉREZ

Trabajo de grado presentado como
requisito para optar el título de química.

Directora: Dra. Elena E. Stashenko,
Química, Ph. D.

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
BUCARAMANGA
2005**

Dedicatoria

A Isabel Pérez y José Barrera, mis padres, quienes con su cariño, apoyo y enseñanzas, me dieron el valor para afrontar las dificultades y construir mi camino.

A los niños y las niñas que sueñan con forjar un mañana diferente para ellos y sus familias.

A los hombres y mujeres, que paso a paso, con dedicación, a través de su vida diaria, van transformando la realidad para construir un mundo más justo y solidario.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Elena Stashenko, por sus consejos, compartir sus experiencias y dedicación en la construcción de la Escuela Nacional de Cromatografía.

Al Dr. Jairo René Martínez, por sus valiosos aportes al laboratorio de Cromatografía.

Al laboratorio de síntesis orgánica, por su colaboración en la toma de los espectros de RMN

A Leonor Yamile Vargas, por su colaboración y recomendaciones en los ensayos de derivación.

A mis amigos y compañeros del laboratorio de cromatografía: Geovanna, Libia, Cristina, José Luis Molina, Hans, Raúl, Alberto, Mónica, Amner, José Luis Ortíz, Ciro, Deyanira..... por sus enseñanzas y momentos compartidos

A cada una de las personas con quienes a lo largo de mi carrera he compartido.

ABREVIATURAS

AA: anhídrido acético

Ache: acetilcolinesterasa

Ar: arilo

BLLE: extracción líquido-líquido por lotes (o en *batch*)

Br. s: singlete ancho

CLLE: extracción líquido-líquido continua o extractor líquido-líquido continuo, según contexto.

d: doblete

dd: doble doblete

ddd: doble doblete desdoblado

DDT: 1, 1, 1-tricloro-2,2-bis (*p*-clorofenil)etano

DL₅₀: dosis letal 50, en mg/kg de peso corporal en ratones.

DTC: ditiocarbamatos

DVB: divinilbenceno

ECD: *Electron Capture Detector* (Detector de captura de electrones)

EPA: *Environmental Protection Agency* (Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos).

EPTC: s-etil dipropiltiocarbamato

ETU: etilentiourea

GC: *Gas Chromatography* (cromatografía de gases o cromatógrafo de gases, según contexto).

GC-ECD: *Gas Chromatography - Electron Capture Detector* (cromatografía de gases con detector de captura de electrones)

GC-MSD: *Gas chromatography – Mass Spectrometry* (cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas).

HFBA: anhídrido heptafluorobutírico

HPLC: *High Performance Liquid Chromatography* (cromatografía líquida de alta eficiencia)

HRGC: *High Resolution Gas Chromatography* (cromatografía de gases de alta resolución)

Hz: Hertz

ICA: Instituto Colombiano Agropecuario

J: constante de acoplamiento

KD: *Kuderna-Danish* (concentrador)

LLE: extracción líquido-líquido

MDL: nivel mínimo de detección

MLQ: nivel mínimo de cuantificación

MSD: *Mass Selective Detector* (Detector selectivo de masas)

ng/L: nanogramos por litro

NPD: detector selectivo de nitrógeno-fósforo

OPC's: pesticidas organoclorados

OPP's: pesticidas organofosforados

PDMS: poli(dimetilsiloxano)

ppb: partes por billón

ppm: partes por millón. Medida de concentración o escala de desplazamiento en RMN

R_f: factor de respuesta

RR_f: factor de respuesta relativo

RMN: resonancia magnética nuclear

s: desviación estándar

s: singulete

sept: septete

SPE: *Solid Phase Extraction* (extracción en fase sólida)

SPME: *Solid Phase Microextraction* (microextracción en fase sólida)

TFAA: anhídrido trifluoroacético

t: triplete

td: triplete desdoblado

t_R: tiempo de retención

t_{RR}: tiempo de retención relativo

UV: ultravioleta

UV-DAD: detector ultravioleta y de arreglo de diodos

LISTADO DE FIGURAS

	Pág
Figura 1. Estructura general de los compuestos organoclorados: A. ciclodienos y B. Diclorofeniletenos.	18
Figura 2. A. Estructura genérica de los compuestos organofosforados. B. Estructura del malatión.	19
Figura 3. A. Estructura general de los piretroides. B. Estructura de la aletrina.	20
Figura 4. Estructura general de: A. fisostigmina y B. ácido carbámico.	22
Figura 5. A. Estructura general de un carbamato. B. Estructura del insecticida aldicarb.	23
Figura 6. A. Estructura general de: A. Tiocarbamatos. y B. Diocarbamatos.	23
Figura 7. Esquema de la hidrólisis de acetilcolina por la acetilcolinesterasa y acción de los carbamatos.	27
Figura 8. Carbofurano y sus productos presentes en el ambiente.	32
Figura 9. Esquema general de una reacción de acilación.	48
Figura 10. Procedimiento de extracción BLLE y análisis de N-metilcarbamatos.	58
Figura 11. Procedimiento de análisis de Nmetilcarbamatos en muestras de agua empleando la técnica SPE.	60
Figura 12. A. Perfil cromatográfico típico obtenido por HRGC/MS para propoxur comercial, extraído del producto Baygón de Bayer, B. Espectro de masas de propoxur y C. Espectro de masas de o-isopropoxifenol.	67
Figura 13. Formación de los principales fragmentos en el espectro de masas de: A. Propoxur y B. o-isopropoxifenol.	68
Figura 14. Espectro de resonancia magnética nuclear protónica del propoxur.	69
Figura 15. Esquema de la reacción de derivación de propoxur con anhídrido acético.	72
Figura 16. Espectro de masas del acetato de isopropoxifenilo y su ruta de fragmentación.	73
Figura 17. Espectro de resonancia magnética nuclear protónica del acetato de isopropoxifenilo.	74
Figura 18. Estudio de la relación molar adecuada pesticida/catalizador para la derivación de propoxur. Temperatura 120 °C, tiempo 3 horas y	75

	relación molar carbamato/AA 1:100	
Figura 19.	Estudio de la relación molar adecuada pesticida/ anhídrido acético para la derivación de propoxur. Temperatura 120 °C, tiempo 3 horas y relación molar carbamato/AA 1:10	75
Figura 20.	Cromatograma de los N-metilcarbamatos derivados con anhídrido acético. HRGC/MS. Inyección <i>split</i> (1:30). Modo <i>full scan</i> , (EI, 70 eV).	76
Figura 21.	Cromatograma de los N-metilcarbamatos derivados con anhídrido trifluoroacético. HRGC/MS. Inyección <i>split</i> (1:30). Modo <i>full scan</i> , (EI, 70 eV).	77
Figura 22.	Estudio de la relación molar adecuada carbamato/catalizador para la derivación de propoxur. Temperatura 50 °C, tiempo 2 horas y relación molar carbamato/TFAA 1:1000	78
Figura 23.	Estudio de la relación molar adecuada carbamato/anhídrido trifluoroacético para la derivación de propoxur. Relación molar carbamato/catalizador 1:1000	78
Figura 24.	Estudio del efecto de la temperatura para la derivación de propoxur. Temperatura 50 °C, tiempo 2 horas y relación molar carbamato/TFAA/catalizador 1:5000:1000	79
Figura 25.	Esquema de la reacción de derivación de propoxur con anhídrido trifluoroacético.	80
Figura 26.	Efecto de la polaridad del solvente en la BLLE sobre la eficiencia de la extracción de propoxur.	81
Figura 27.	Efecto de diferentes mezclas de diclorometano-acetato de etilo en la extracción de propoxur por BLLE.	81
Figura 28.	Efecto de la adición de sal sobre la eficiencia de extracción de propoxur por BLLE.	82
Figura 29.	Estudio del efecto de la polaridad de una mezcla de solventes sobre la eficiencia de la extracción de propoxur por SPE.	83
Figura 30.	Estudio del efecto del volumen de solvente de elución sobre la eficiencia de la extracción de propoxur por SPE	84
Figura 31.	Estudio del efecto de la adición de sal sobre la eficiencia de la extracción de propoxur por SPE.	84
Figura 32.	Comparación de la eficiencia de extracción por BLLE, SPE y CLLE de los N-metilcarbamatos.	87
Figura 33.	Perfiles cromatográficos de patrones de N-metilcarbamatos: A. Sin	88

derivar (20 µg/mL) obtenido por HRGC/FID y B. Con derivación (7 µg/mL) obtenidos por HRGC/µ-ECD.

- Figura 34.** Estabilidad de los derivados de N-metilcarbamatos durante su almacenamiento, (temperatura 4 °C, protegidos de la luz, solvente hexano/éter 95:5). 93
- Figura 35.** Perfiles cromatográficos comparados con los patrones de N-metilcarbamatos derivados, obtenidos por HRGC/µ-ECD de las muestras procedentes de las quebradas: A. Menzuly y B. La Grande. 94
- Figura 36.** Estudio de la estabilidad de los N-metilcarbamatos en muestras de agua superficiales, almacenados a 4 °C, protegidos de la luz durante 10 días. 95

LISTADO DE TABLAS

	Pág
Tabla 1. Principales N-metilcarbamatos, tiocarbamatos y ditiocarbamatos.	24
Tabla 2. Clasificación toxicológica de las sustancias químicas.	25
Tabla 3. Propiedades físicas y químicas de algunos plaguicidas carbamatos.	31
Tabla 4. Estructura, registro, toxicidad e impacto ambiental de algunos carbamatos.	33
Tabla 5. Producción y ventas nacionales (2001) de plaguicidas por clase de producto.	37
Tabla 6. Importación (2001) de plaguicidas por clase.	37
Tabla 7. Producción y ventas nacionales (2001) de pesticidas carbamatos	38
Tabla 8. Importación (2001) de pesticidas carbamatos en Colombia.	39
Tabla 9. Niveles permitidos en las aguas de algunos carbamatos.	40
Tabla 10. Concentración máxima admisible para plaguicidas individuales y totales en agua potable y agua segura, según Decreto 475 de 1998.	40
Tabla 11. Técnicas de análisis de carbamatos mediante derivación química.	50
Tabla 12. Solventes empleados en BLLE.	58
Tabla 13. Volúmenes de solución <i>stock</i> 2 requeridos para la preparación de patrones de calibración de N-metilcarbamatos derivados en el nivel de concentración bajo.	62
Tabla 14. Volúmenes de solución <i>stock</i> 2 requeridos para la preparación de patrones de calibración de N-metilcarbamatos derivados en el nivel de concentración alto.	63
Tabla 15. Estructura de los N-metilcarbamatos estudiados en el proceso de derivación	71
Tabla 16. Condiciones establecidas para la extracción de los N-metilcarbamatos de muestras de agua por BLLE, SPE y CLLE	85
Tabla 17. Porcentaje de recuperación obtenidos por BLLE para los N-metilcarbamatos en muestras de agua.	86
Tabla 18. Porcentaje de recuperación obtenidos por SPE para los N-metilcarbamatos en muestras de agua.	86
Tabla 19. Porcentaje de recuperación obtenidos por CLLE para los N-metilcarbamatos en muestras de agua.	86

Tabla 20.	Estudio de la reproducibilidad del proceso de derivación de los N-metilcarbamatos	89
Tabla 21.	MDL y MQL determinados por HRGC/ μ -ECD de los derivados trifluoroacetilos de los N-metilcarbamatos.	90

TABLA DE CONTENIDO

	pág
1	INTRODUCCIÓN
	13
2	MARCO TEÓRICO REFERENCIAL
	17
2.1	PLAGUICIDAS
	17
2.2	HISTORIA DE LOS PLAGUICIDAS
	17
2.3	PESTICIDAS CARBAMATOS
	22
2.3.1	Generalidades de los pesticidas carbamatos
	22
2.3.2	Toxicidad de los plaguicidas carbamatos
	24
2.3.2.1	Mecanismo de acción y efectos sobre la salud
	25
2.3.2.2	Toxicidad crónica
	28
2.3.3	Impacto ambiental
	29
2.3.4	Producción y venta de carbamatos en Colombia
	36
2.3.5	Legislación sobre la presencia de plaguicidas en Colombia
	39
2.4	DETERMINACIÓN DE N-METILCARBAMATOS EN MUESTRAS DE AGUA
	41
2.4.1	Técnicas de preparación de muestras
	41
2.4.1.1	Extracción líquido-líquido (LLE)
	41
2.4.1.2	Extracción en fase sólida (SPE)
	42
2.4.1.3	Microextracción en fase sólida (SPME)
	44
2.4.2	Técnicas analíticas usadas para la determinación de N-metilcarbamatos
	45
2.4.2.1	Técnicas de inmunoensayo
	45
2.4.2.2	Técnica de Limperos y Ranta
	45
2.4.2.3	Cromatografía líquida de alta eficiencia
	46
2.4.2.4	Cromatografía de gases
	47
2.4.3	Detectores para cromatografía de gases
	51
3	PARTE EXPERIMENTAL
	53
3.1	REACTIVOS Y MATERIALES
	53
3.2	INSTRUMENTACIÓN
	53
3.2.1	Sistema de detección HRGC/FID
	54
3.2.2	Sistema de detección HRGC/MS
	54

3.2.3	Sistema de detección HRGC/ μ -ECD	55
3.2.4	Resonancia magnética nuclear	55
3.3	OBTENCIÓN DEL PATRÓN COMERCIAL DE PROPOXUR	56
3.4	CONDICIONES PARA LA REACCIÓN DE ACILACION DE LOS N-METILCARBAMATOS	56
3.5	EVALUACIÓN DE LA EXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO POR LOTES (BLLE) DE LOS N-METILCARBAMATOS	57
3.6	EVALUACIÓN DE LA EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA (SPE) DE LOS N-METILCARBAMATOS	59
3.7	DETERMINACIÓN DE LA EFICIENCIA Y REPRODUCIBILIDAD DE LAS TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO CONTINUO (CLLE), LÍQUIDO-LÍQUIDO POR LOTES (BLLE) Y EN FASE SÓLIDA (SPE), PARA LOS N-METILCARBAMATOS.	61
3.8	ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA HRGC/ μ -ECD.	61
3.8.1	Curvas de calibración de los N-metilcarbamatos derivados	62
3.8.2	Determinación de los t_R , t_{RR} , áreas, áreas relativas, R_f , RR_f y el rango dinámico lineal del μ -ECD para los N-metilcarbamatos	63
3.8.3	Determinación de la reproducibilidad de los t_R , t_{RR} , área y áreas relativas	64
3.9	EXTRACCIÓN DE N-METILCARBAMATOS DE MUESTRAS DE AGUA SUPERFICIAL MEDIANTE CLLE	64
4	ANÁLISIS DE RESULTADOS	66
4.1	SELECCIÓN DEL SISTEMA DE DETECCIÓN PARA EL ANÁLISIS DE N-METILCARBAMATOS	66
4.2	OBTENCIÓN DEL PATRÓN COMERCIAL DE PROPOXUR	66
4.3	REACCIÓN DE ACILACIÓN DE LOS N-METILCARBAMATOS	70
4.3.1	Derivación con anhídrido acético	72
4.3.2	Derivación con anhídrido trifluoroacético	76
4.4	EVALUACIÓN DE LA EXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO POR LOTES PARA LOS N-METILCARBAMATOS	80
4.4.1	Estudio del efecto de la polaridad del solvente sobre la eficiencia de extracción	80
4.4.2	Estudio del efecto de la adición de sal sobre la eficiencia de la extracción	82

4.5	EVALUACIÓN DE LA EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA DE LOS N-METILCARBAMATOS	82
4.5.1	Estudio del efecto de la polaridad del solvente sobre la eficiencia de la extracción SPE	83
4.5.2	Estudio del efecto de la adición de sal sobre la eficiencia de la extracción SPE	84
4.6	COMPARACIÓN DE LAS TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN CLLE, BLLE Y SPE EN EL AISLAMIENTO DE LOS N-METILCARBAMATOS EN MUESTRAS DE AGUA	85
4.7	MONTAJE Y ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA HRGC/ μ -ECD	87
4.7.1	Determinación del nivel mínimo de detección (MDL) y de cuantificación (MQL) de los N-metilcarbamatos derivados	90
4.7.2	Determinación por μ ECD de los t_R , t_{RR} , áreas, áreas relativas, R_f , RR_f y rango dinámico lineal para los N-metilcarbamatos derivados.	91
4.7.3	Estudio de la degradación de los derivados trifluoroacetilos de N-metilcarbamatos durante el almacenamiento	92
4.8	EXTRACCIÓN DE N-METILCARBAMATOS DE MUESTRAS DE AGUA SUPERFICIAL, MEDIANTE LA TÉCNICA DE EXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO CONTINUO (CLLE)	93
5	CONCLUSIONES	96
6	RECOMENDACIONES	98
7	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	99
8	ANEXOS	104

TITULO

IMPLEMENTACIÓN DE UNA TÉCNICA DE ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO PARA DETERMINAR N-METILCARBAMATOS Y SUS PRODUCTOS DE DEGRADACIÓN EN MUESTRAS DE AGUA*

AUTOR

MARTHA ISABEL BARRERA PÉREZ**

PALABRAS CLAVES

N-metilcarbamatos, derivación, cromatografía de gases, extracción, plaguicidas, aguas, determinación.

RESUMEN

El monitoreo de los N-metilcarbamatos es importante, son insectidas utilizados en el control de plagas en los cultivos de café, maíz, hortalizas, cítricos y flores, entre otros; por su solubilidad, pueden contaminar los suelos y las fuentes de agua superficiales y subterráneas. Estos plaguicidas son tóxicos, afectan la salud de los seres humanos y muchas especies de peces y invertebrados. Para la determinación de estos plaguicidas en las aguas existen técnicas como Limperos y ranta, cromatografía líquida (LC) y Cromatografía de gases (GC). Sin embargo, la cromatografía de gases sobresale por su sensibilidad, resolución y costo moderado.

En el presente trabajo se implementó una técnica para la determinación, por cromatografía de gases de los N-metilcarbamatos y sus productos de degradación, a través de la derivación con anhídrido trifluoroacético. La técnica se caracterizó por su buena reproducibilidad y resolución y por sus bajos niveles mínimos de detección (0.5 – 3.3 µg/L). Adicionalmente, se estudió la recuperación de los N-metilcarbamatos de muestras de agua por las técnicas de extracción: líquido-líquido continuo (CLLE), líquido-líquido por lotes (BLLE) y extracción en fase sólida (SPE). Para CLLE se obtuvo los mejores porcentajes de recuperación para la mayoría de los N-metilcarbamatos estudiados.

La técnica desarrollada se aplicó para evaluar la presencia de N-metilcarbamatos en muestras de agua superficial de las quebradas Menzuly y La Grande. Según los resultados, no hay presencia de los plaguicidas estudiados, por encima del nivel mínimo de detección del sistema empleado HRGC/µ-ECD.

Los resultados de este trabajo pretenden ser una base para futuras investigaciones y programas de control de los N-metilcarbamatos en muestras de aguas, frutos y suelos.

* Tesis

** Facultad de Ciencias, Escuela de Química, Elena E. Stashenko

TITLE

ESTABLISHMENT OF A TECHNIQUE OF ANALYSIS CHROMATOGRAPHYC FOR DETERMINE N-METHYLCARBAMATES AND THEIR METABOLITES IN WATER SAMPLES*.

AUTHOR

MARTHA ISABEL BARRERA PÉREZ**

KEY WORDS

N-methylcarbamates, derivatization, gas chromatography, extraction, pesticides, water, determination

ABSTRACT

The monitoring of N-methylcarbamates is important, since, they are insecticides utilized in control of plagues in coffee, corn, vegetables, citries flowers and other cultivations. These pesticides contaminate soils and sources of superficial and underground water due to their solubility. N-methylcarbamates are toxic, they can affect people's health and lot of kind fish and invertebrates. For the determination of N-methylcarbamates in water samples there are techniques such as Limperos and Ranta, liquid chromatography (LC) and gas chromatography (GC). Nevertheless, GC has more resolution, more sensitivity and moderate expense.

In this work, a technique for determination of N-methylcarbamates and their metabolites was done by GC/ μ -ECD, through the derivatization with trifluoroacetic anhydride. The technique is characterized for its good reproducibility and low detection limits (0.5 – 3.3 μ g/L). In addition to former, the recoveries of N-methylcarbamates for water samples was assessed by the techniques: continue liquid-liquid extraction (CLLE), batches liquid-liquid extraction (BLLE), and solid phase extraction (SPE). The best recovery percents of N-methylcarbamate pesticides were got by CLLE.

The N-methylcarbamates in water samples from Menzuly and La Grande stream were not detected over minimun detection level of the system HRGC/ μ -ECD stablishmented.

The results of this work pretend to be a base for future investigations and programs to monitoring N-methylcarbamates in water, fruits, and soils samples.

* Thesis

** Science Faculty, School of Chemistry, Elena E. Stashenko

INTRODUCCIÓN

El agua, recurso vital para el sostenimiento de la vida en el planeta afronta en el presente siglo graves problemas: a nivel social, se ha modificado su condición de derecho para ser catalogado como una necesidad, convirtiéndose así en una mercancía, a la cual solo tendrán acceso quienes puedan comprarla. A nivel ambiental, la reducción dramática del recurso, debido al aumento de la población, el incremento de las áreas de cultivo y cría de animales y la contaminación por desechos industriales y caseros; olvidando que sólo el 1% del total de agua del planeta esta disponible para el consumo humano [1].

Uno de los contaminantes encontrados con mayor frecuencia son los plaguicidas, los cuales llegan a las aguas superficiales o subterráneas durante los procesos de fabricación, almacenamiento o aplicación. En las zonas agrícolas esta contaminación ocurre directa o indirectamente, cuando se aplican al agua para matar las larvas de los mosquitos, por derivas, por escorrentía, por drenaje de áreas de cultivo tratadas, durante el lavado de equipos de aspersión o por derrames accidentales [2].

La contaminación por plaguicidas no es reciente, ellos han estado presentes desde hace milenios: cenizas, azufre, cianuro de hidrógeno, compuestos de mercurio, zinc, plomo y arsénico son algunos de los primeros plaguicidas que se usaron para controlar las plagas de los cultivos, se caracterizaron por ser muy tóxicos, poco efectivos y persistentes en el ambiente. Buscando solucionar estos inconvenientes, hacia los años 30 del siglo pasado se inició la síntesis de una nueva generación de moléculas con un reducido espectro de acción y muy letales; es así como surgen los organoclorados, organofosforados, carbamatos, piretroides y triazinas, entre otros. Su uso se ha generalizado, bajo la falsa creencia que es la única opción para controlar de manera eficaz las plagas y, por ende, aumentar la producción de los cultivos y ganancias, pero estos beneficios han sido opacados debido a numerosas investigaciones que demuestran los múltiples problemas que conlleva el uso indiscriminado de plaguicidas; dentro de los que se encuentran:

- a). Residualidad en el suelo, carne, leche, frutos, forrajes, etc;
- b). Aparición de especies resistentes que se convierten en nuevas plagas;
- c). Intoxicación paulatina del hombre y los animales;
- d). Contaminación de las fuentes de agua y el suelo por la movilidad de los plaguicidas y sus productos de degradación;

- e). Desempleo, especialmente en los países pobres, por el uso del control químico o mecánico, en lugar del desyerbe manual que brinda trabajo a mucha gente;
- f) Pobreza y endeudamiento, debido a la destinación de gran parte de las ganancias a la compra de mayor cantidad y número de plaguicidas para controlar las plagas nuevas y resistentes [2,4].

Las razones mencionadas son suficientes para controlar, limitar y disminuir el uso de plaguicidas, pero es necesario sumar esfuerzos tanto del gobierno nacional, los centros de investigación y los agricultores para formular una estrategia de sustitución, que involucre: la investigación de nuevas alternativas en el control de plagas, adecuación y desarrollo de metodologías que permitan realizar estudios sobre la presencia de plaguicidas y sus efectos en el ambiente y la población, fortalecimiento y actualización de la legislación que controla el uso de los plaguicidas y apoyo a proyectos alternativos como la agricultura orgánica, que promueve una producción agrícola limpia, sustentable, de intercambio y reencuentro con nuestros saberes ancestrales.

Motivado por esta problemática y el crecimiento en las ventas de plaguicidas en Colombia, que en el año 2001 fueron de 27'761.390 kg y 31'769.432 L, principalmente plaguicidas organofosforados y carbamatos [5], el Laboratorio de Cromatografía ha desarrollado numerosas investigaciones en el campo de la implementación de metodologías en el análisis de plaguicidas y su impacto en el ambiente, las cuales han servido de soporte en los estudios de entidades de control ambiental y las empresas que desean llevar un seguimiento sobre la presencia de contaminantes en sus productos. Con el objeto de ampliar las investigaciones realizadas en este campo por el Laboratorio de Cromatografía, en este trabajo se realizó la implementación de una técnica para la determinación de plaguicidas carbamatos en agua, ya que su uso se ha incrementado en los últimos años debido a que han ido remplazando a los compuestos organoclorados y organofosforados por su selectividad y reducida persistencia en el ambiente, sin embargo, son tóxicos para algunas especies benéficas como pájaros, lombrices de tierra, hormigas, arañas, abejas y peces; además su solubilidad en agua favorece la contaminación de las fuentes subterráneas y superficiales [4].

Los carbamatos son derivados del ácido carbámico, fueron sintetizados alrededor de 1950 y se usan principalmente como fungicidas e insecticidas para el control de plagas en cultivos de flores, maíz, sorgo, café, palma, cacao, hortalizas y cítricos. Entre los carbamatos aplicados algunos son extremadamente tóxicos como carbofurano y aldicarb, los cuales se

encuentran entre los plaguicidas que más envenenamientos y muertes causan en el mundo [2], debido a que actúan sobre el sistema nervioso central inhibiendo la acción de la acetilcolinesterasa; además, según estudios realizados en animales, las exposiciones a largo plazo producen efectos reproductivos, teratogénicos, hormonales y carcinogénicos [2, 4 ,6].

La concentración de plaguicidas en aguas es regulada por el Ministerio de Salud de Colombia a través del decreto 475 de 1998, el cual recomienda para el análisis de carbamatos y organofosforados el método de inhibición enzimática *in vitro* de la acetilcolinesterasa; este método colorimétrico, es rápido, económico y da información sobre la presencia o ausencia de plaguicidas que inhiben la acetilcolinesterasa, pero no permite determinar el tipo y la concentración de plaguicidas en el ambiente. Otras técnicas utilizadas para el análisis de carbamatos son las cromatográficas: la cromatografía líquida, recomendada por el método EPA 531.1, que requiere derivación de post-columna para aumentar la sensibilidad en la detección y es menos específica que la cromatografía de gases, la cual también requiere derivación, pero es preferida por su alta sensibilidad, mayor resolución y niveles de detección más bajos [7,8].

En el presente trabajo se desarrolló una metodología para la determinación por HRGC/ μ -ECD de N-metilcarbamatos en muestras de agua a través de la formación de derivados trifluoroacetilo, los cuales son termoestables y ayudan a mejorar la sensibilidad y selectividad de la técnica cromatográfica.

El proyecto comprendió 4 fases. La primera fue el estudio de las técnicas de extracción líquido-líquido continuo (método EPA 3520), líquido-líquido por lotes y extracción en fase sólida, para la recuperación de N-metilcarbamatos de muestras de agua, teniendo en cuenta la eficiencia, reproducibilidad, costos y tiempo de extracción. La segunda fase comprendió la determinación de las condiciones adecuadas para la derivación de los N-metilcarbamatos con los agentes derivantes anhídrido acético y anhídrido trifluoroacético. La tercera etapa fue la implementación de la técnica HRGC/ μ -ECD para el análisis de N-metilcarbamatos derivados después de la extracción de las muestras de agua, para esta técnica se evaluó la sensibilidad, selectividad, reproducibilidad, eficiencia y costo. Por último, se aplicó la técnica HRGC/ μ -ECD para el análisis de carbamatos en muestra de agua reales, las cuales fueron tomadas de las quebradas La Grande y Menzuly que recorren el área metropolitana de Bucaramanga.

Algunos resultados preliminares de esta investigación fueron presentados como póster, bajo el título "Determinación de pesticidas N-metilcarbamatos en muestras de agua como derivados acetilo y trifluoroacetilo mediante GC-MS y GC- μ ECD" en el XIII Congreso Colombiano de Química realizado en octubre de 2004 en Cartagena.

2. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL

2.1 PLAGUICIDAS

Desde hace milenios el hombre ha liderado una lucha contra las plagas que atacan sus cultivos, invaden su hogar y le transmiten enfermedades. En esta batalla ha utilizado extractos de plantas, compuestos inorgánicos y ha sintetizado gran variedad de moléculas; todas estas sustancias se agrupan bajo el nombre de plaguicidas. "Un plaguicida es una sustancia química de origen natural o sintético que se utiliza con el fin de controlar, repeler y combatir plagas que atacan a los cultivos o a los vectores de enfermedades transmisibles al hombre o a los animales" [9]. Los plaguicidas según el organismo que combaten se clasifican en insecticidas, herbicidas, fungicidas, nematicidas, rodenticidas y reguladores fisiológicos [4].

Los plaguicidas son vendidos como productos formulados, los cuales contienen: ingredientes activos, aditivos (emulsificantes, antioxidantes, coadyuvantes) y diluyentes. El fin de la formulación es mejorar la eficiencia del plaguicida, facilitar su aplicación y darle estabilidad durante el almacenamiento [10].

2.2 HISTORIA DE LOS PLAGUICIDAS

El uso de sustancias químicas para combatir las plagas de los cultivos data de la antigüedad; su utilización a gran escala sólo se llevó a cabo hasta el siglo XX. Durante este tiempo se han dado 4 generaciones de plaguicidas. La primera generación comprende aquellos materiales primitivos usados desde la época de los griegos, quienes combatían los insectos con cenizas, hollín, polvo de los caminos y azufre. Más tarde se utilizaron para el control de cucarachas, termitas, pulgas y otras plagas: talco, gel de sílice, ácido bórico, jabón, brea, queroseno, orina, pimienta, hojas de nogal y compuestos tóxicos como cianuro de hidrógeno, azufre, compuestos de mercurio, arsénico, flúor, zinc y plomo [10, 11].

Dentro de los insecticidas extraídos de las plantas se destacan la nicotina y la rotenona, el primero presente en el extracto de las hojas de tabaco, fue utilizado por primera vez en 1763 para el control de áfidos. El segundo se ha encontrado en las raíces de cerca de 60 plantas y aunque los nativos de Suramérica lo han usado para cazar peces, sólo a mediados de 1800 se descubrió sus propiedades insecticidas.

La mayoría de los insecticidas de esta primera generación se caracterizaron por ser muy tóxicos, poco efectivos contra las plagas y muy resistentes en el ambiente; hoy en día se usan poco debido a que están prohibidos por su elevada toxicidad [11].

En 1930, se inició una segunda generación de insecticidas conformada por un conjunto muy variado de moléculas que se clasificaron en grupos según la estructura química. Las tres familias más importantes que surgieron en este periodo fueron: los organoclorados, los organofosforados y los carbamatos.

Los compuestos organoclorados se caracterizan por poseer uno o más átomos de cloro alrededor de uno o más anillos hidrocarbonados (**Figura 1**). Se utilizaron ampliamente desde 1940 a 1960 para erradicar las plagas de bs cultivos y en programas de control de la malaria. Sin embargo, su uso ha sido restringido debido a su persistencia en el ambiente y acumulación en los tejidos de los seres vivos [4, 11].

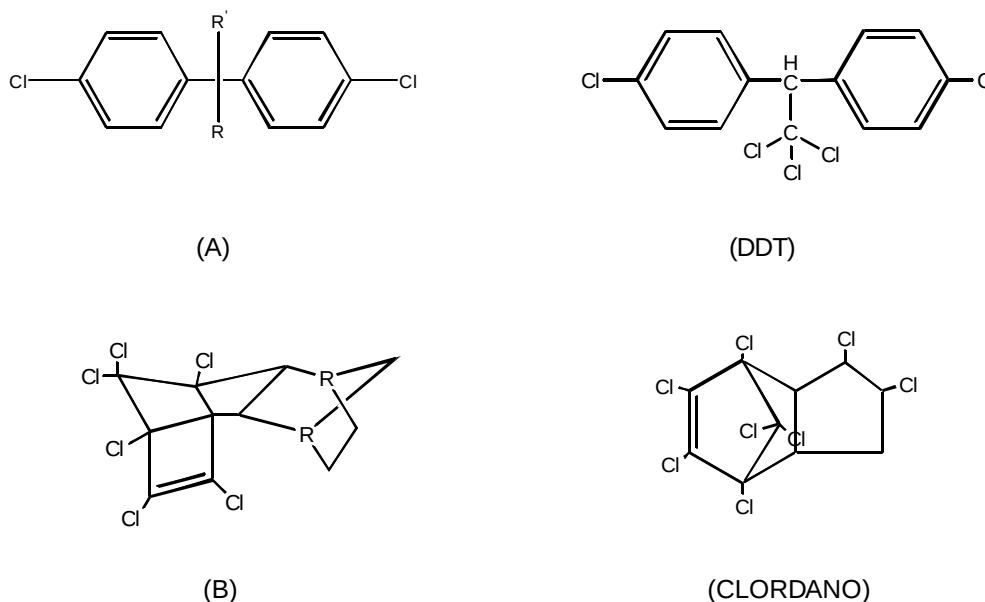


Figura 1. Estructura general de los compuestos organoclorados: A. Ciclodienos y B. Diclorofeniletanos.

Los compuestos organoclorados pueden permanecer en el ambiente, sin ser destruidos, por años, su vida media en el suelo varía de 2 a 10 años, aunque se han encontrado residuos después de un período de 30 años [12], ya que se enlazan fuertemente a las partículas del

suelo, son insolubles en agua y resisten la degradación biológica. Además, su alta lipofilidad favorece su biocumulación en cada uno de los eslabones de la cadena alimenticia [13].

Los organoclorados son estimulantes del sistema nervioso central, donde específicamente rompen el balance de sodio-potasio que rodea la fibra nerviosa, lo que ocasiona la transmisión continua del impulso nervioso [14]. Son compuestos tóxicos para los vertebrados, algunos tienen efectos mutagénicos [11] y cancerígenos [14].

Los compuestos organofosforados se caracterizan por poseer un átomo central de fósforo y numerosas cadenas con grupos alquilo o arilo a los lados (**Figura 2**). Las primeras moléculas fueron sintetizadas hacia 1941. Estos compuestos se han utilizado principalmente en el control de plagas de cultivos de algodón, maíz y trigo, contra insectos domésticos y en el control interno y externo de parásitos del ganado [4].

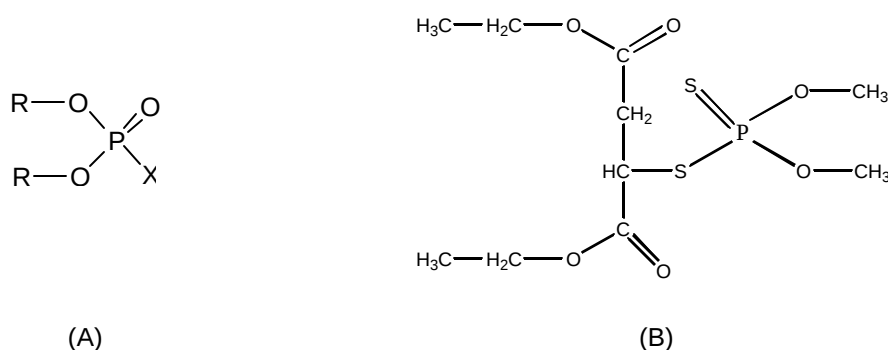


Figura 2. A. Estructura genérica de los compuestos organofosforados. B. Estructura del malatión.

Los compuestos organofosforados actúan sobre el sistema nervioso central, produciendo inhibición irreversible de la enzima acetilcolinesterasa (AChE), manifestándose con síntomas como debilidad, incoordinación y parálisis de los músculos [15]. Afectan órganos como el corazón y el hígado. Algunos son catalogados como mutagénicos y cancerígenos, razones por las cuales son considerados más tóxicos para los vertebrados que los compuestos organoclorados, especialmente, para especies de pájaros, patos y peces [16, 17].

Estos pesticidas son menos persistentes en el ambiente, un pH alcalino y buena radiación permite su degradación en unos días o algunos meses. En el organismo son metabolizados

y excretados rápidamente a través de la orina y las heces, aproximadamente en 12 horas, por lo tanto, no existe bioacumulación en los tejidos del cuerpo [4].

Los compuestos carbamatos fueron desarrollados alrededor de 1950, el primer producto comercial fue 1-naftil carbamato de metilo, conocido como carbaril. Los carbamatos se usan ampliamente en agricultura, en veterinaria y en el hogar. Son sustancias que afectan el sistema nervioso central inhibiendo la enzima acetilcolinesterasa, de manera reversible. Son tóxicos para los pájaros, los peces, las abejas y las lombrices de tierra. Se degradan por hidrólisis química o por la acción de microorganismos. Su solubilidad favorece la excreción y no permite la bioacumulación [4]. Debido a estas propiedades han logrado sustituir en muchas aplicaciones a los compuestos organoclorados y los organofosforados [4, 11].

Hacia la década de 1970, se inició la síntesis de una tercera generación de insecticidas, los piretroides, los cuales son análogos sintéticos de piretrum, un éster extraído de las flores de los crisantemos que crecen principalmente en Kenia. Estos insecticidas son especialmente para uso domestico, efectivos contra moscas, mosquitos e insectos de granos almacenados (**Figura 3**). Los piretroides se caracterizan por ser solubles, efectivos a bajas concentraciones y poco tóxicos para animales y humanos [4, 11].

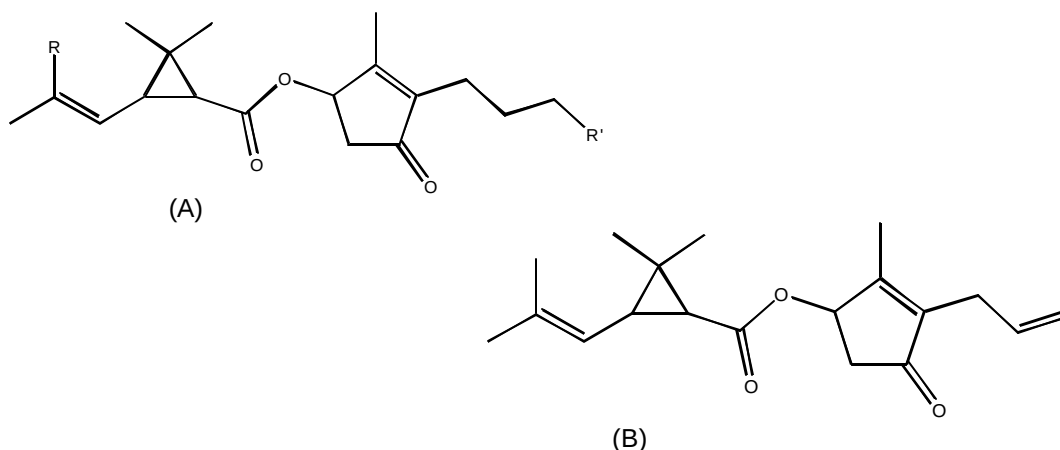


Figura 3. A. Estructura general de los piretroides. B. Estructura de la aletrina.

A través del tiempo la búsqueda de pesticidas más efectivos ha modificado el enfoque que siguen los químicos para descubrir y desarrollar nuevos compuestos. Los insecticidas de primera generación se basaron en remedios caseros descubiertos a través de un largo proceso al azar, de ensayo y error. La segunda generación de insecticidas fue el resultado

de síntesis intensivas y programas de *screening*, una vez encontrado un compuesto se realizaba optimización de su estructura a través de ensayo y error. La tercera generación fue producto de un programa de síntesis basado en una apreciación de la fisiología, bioquímica y ecología del insecto y las diferencias existentes entre plagas y organismos no perjudiciales [4, 11]. En la actualidad, la cuarta generación de pesticidas se desarrolla a partir de la combinación de los conocimientos en biotecnología, neurofisiología y neuroquímica de los insectos permitiendo prever secuencias de genes para moléculas bioactivas que pueden ser transferidos al insecto a través de un vector viral o bacterial o incorporados directamente en la planta afectada [10, 11].

Finalmente, la historia de los plaguicidas muestra no sólo los aciertos y errores en este campo, sino también la ruta a seguir: desde las cenizas, los extractos vegetales y los compuestos de arsénico, mercurio y plomo, pasando por la síntesis de homólogos y derivados de productos naturales, hasta la utilización del conocimiento de la fisiología, la bioquímica y la ecología de las plagas, la investigación apunta hacia el desarrollo de pesticidas más eficaces en el futuro: de alta efectividad contra un amplio rango de plagas de los cultivos, de importancia médica y veterinaria, bajo costo de manufactura, mínima persistencia en el ambiente y no susceptibilidad al desarrollo de resistencia por parte de las plagas.

2.3 PESTICIDAS CARBAMATOS

2.3.1 Generalidades de los pesticidas carbamatos

Los carbamatos fueron identificados por primera vez en los extractos de semillas de la planta *Physostigma venenosum*, que se cultiva en el Oeste de África. Estos extractos contenían un alcaloide muy tóxico llamado fisostigmina, el cual posee en su estructura el grupo carbamato (**Figura 4A**) [6, 11].

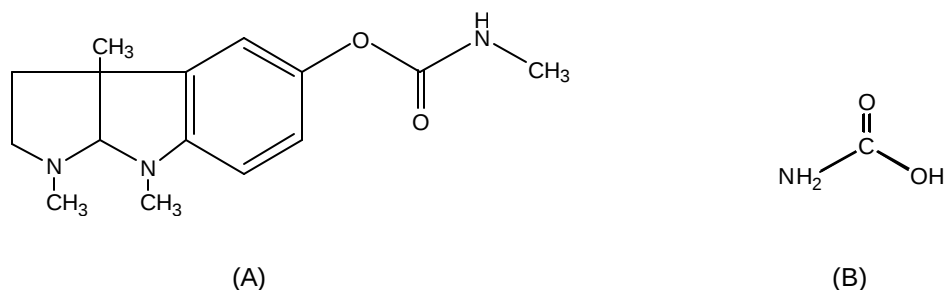
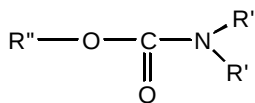


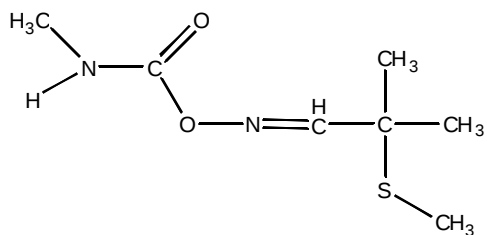
Figura 4. A. Estructura de la fisostigmina. B. Estructura del ácido carbámico.

Los primeros carbamatos fueron sintetizados en 1947 por la compañía suiza *Ciba-Geigy* (ahora *Norvatis*), a partir de la esterificación del ácido carbámico (**Figura 4B**). Entre los carbamatos sintetizados existen compuestos ionizables y no ionizables, los primeros son usados en medicina para el tratamiento del glaucoma y otras enfermedades, los segundos tienen actividad insecticida [10]. Estas sustancias generalmente no tienen olor, ni color, son cristales a temperatura ambiente, estables cuando se exponen al aire, la luz, el calor y durante su almacenamiento. La mayoría de los carbamatos son poco volátiles, polares, se descomponen a altas temperaturas y solubilizan en disolventes orgánicos y agua. Son usados como insecticidas, fungicidas y herbicidas. Su acción es selectiva: pueden ser activos contra algunos insectos e inactivos contra otros [4, 18].

La molécula general del grupo carbamato posee un átomo de nitrógeno al cual están unidos dos grupos R, que pueden ser un alquilo, un arilo o un hidrógeno. Si poseen un grupo metilo unido al nitrógeno, se conocen como N-metilcarbamatos (**Figura 5**).



(A)



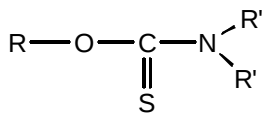
(B)

$\text{R}' = \text{H}, \text{CH}_3, \text{anillo fenólico}$

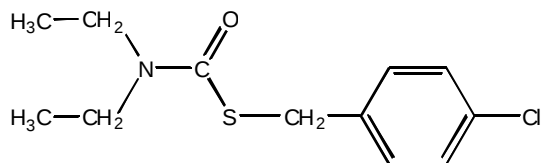
$\text{R}'' = \text{N}=\text{CR}_2 \text{ (oxima), anillo fenólico}$

Figura 5. A. Estructura general de un carbamato. B. Estructura del insecticida aldicarb.

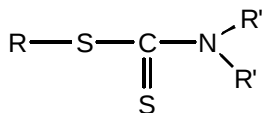
Existen dos subclases adicionales de carbamatos: los tiocarbamatos, los cuales tienen un átomo de azufre sustituyendo un átomo de oxígeno y los ditiocarbamatos, que tienen dos átomos de azufre remplazando los oxígenos (**Figura 6**). Los grupos R pueden ser sustituyentes alquilo, arilo, alcoxi, amida o metales como manganeso y zinc. Se usan principalmente como fungicidas y herbicidas, aplicados a los cultivos o a los productos para protegerlos de la descomposición durante la cosecha, el transporte y el almacenamiento [3,4]. Los principales carbamatos y su clasificación, según la estructura química, en N-metilcarbamatos, tiocarbamatos y ditiocarbamatos, se registran en la **Tabla 1**.



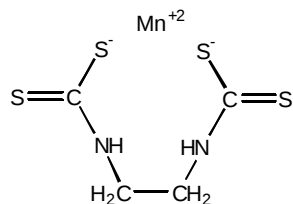
(A)



(TIOBENCAR)



(B)



(MANEB)

Figura 6. Estructura general de: A. Tiocarbamatos y B. Ditiocarbamatos.

Tabla 1. Principales N-metilcarbamatos, tiocarbamatos y ditiocarbamatos [4].

N-METILCARBAMATOS			
Aldicarb	Clorprofam	Oxamyl	
Bendiocarb	Fenoxicarb	Promecarb	
Carbaril	Isoprocarb	Propoxur	
Carbofurano	Methiocarb	Tiodicarb	
Carbosulfano	Metomil		
TIOCARBAMATOS			
Butilate	Esprocarb	Prosulfocarb	
Cartap	Fenotiocarb	Pyributicarb	
Cicloate	Methasulfocarb	Tiobencarb	
Diallate	Molinate	Tiocarbazil	
Dimepiperate	Orbencarb	Triallate	
EPTC	Perbulate	Vernolate	
DITIOCARBAMATOS			
Metil-ditiocarbamatos	Dimetil-ditiocarbamatos	Etilene(bis)-ditiocarbamatos	
Metham-sodio	Dimetilditiocarb	Anabam	Cufraneb
	Ferbam	Mancozeb	Maneb
Dietil-ditiocarbamatos	Thiram	Metiram	Zineb
Sulfallate	Ziram		

2.3.2. Toxicidad de los plaguicidas carbamatos

Toxicidad es un término usado para indicar los efectos adversos producidos por los venenos. Una de las medidas más comunes para medir la toxicidad es la LD₅₀ (Dosis letal para el 50% de los animales involucrados en el ensayo). La LD₅₀ de un veneno es expresada en miligramos de producto por kilogramo de peso del animal [4]. Teniendo en cuenta los efectos

producidos por la exposición oral, dérmica y por inhalación, la EPA ha establecido cuatro categorías toxicológicas, las cuales se presentan en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Clasificación toxicológica de las sustancias químicas [4].

CATEGORÍA TOXICOLÓGICA	GRADO DE TOXICIDAD	CARACTERÍSTICAS DE LA TOXICIDAD AGUDA EN EXPERIMENTOS CON ANIMALES
I	Extremadamente tóxico	Oral LD ₅₀ : 0-50 mg/kg Dérmico LD ₅₀ : 0-200 mg/kg Inhalación LD ₅₀ : 0.02-0.2 mg/L Irritación piel y ojos: severa
II	Altamente tóxico	Oral LD ₅₀ : 50-500 mg/kg Dérmico LD ₅₀ : 200-2000 mg/kg Inhalación LD ₅₀ : 0.2-2.0 mg/L Irritación piel y ojos: moderada
III	Medianamente tóxico	Oral LD ₅₀ : 500-5000 mg/kg Dérmico LD ₅₀ : 2000-20000 mg/kg Inhalación LD ₅₀ : 2.0-20 mg/L Irritación piel y ojos: ligera
IV	Ligeramente tóxico	Oral LD ₅₀ : > 5000 mg/kg Dérmico LD ₅₀ : > 20000mg/kg Inhalación LD ₅₀ : > 20 mg/L Irritación piel y ojos: ninguna

La mayoría de pesticidas carbamatos son catalogados como medianamente tóxicos (Tox. III, LD₅₀ oral 500-5000 mg/kg) y ligeramente tóxicos (Tox. IV, LD₅₀ oral > 5000mg/kg), aunque algunos están clasificados en la Categoría I (extremadamente tóxicos, LD₅₀ oral 0-50 mg/kg), como metomil, carbofurano y aldicarb y en la Categoría II (altamente tóxicos, LD₅₀ oral 50-500 mg/kg), como carbaril y metiocarb [4, 20].

2.3.2.1 Mecanismo de acción y efectos sobre la salud

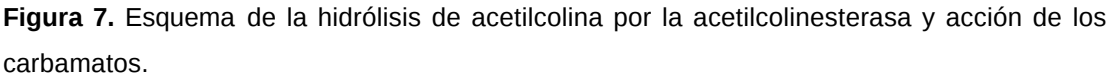
Los carbamatos pueden ingresar al organismo a través de la inhalación, ingestión o contacto con la piel, donde son metabolizados por la presencia de enzimas oxidasas, hidrolasas y glutatión-s-transferasas, para posteriormente ser eliminados a través de la orina, sin originar acumulación en los tejidos [19]. Sin embargo, su breve paso por el organismo puede originar algunos trastornos dependiendo del grado de toxicidad del compuesto.

Los carbamatos son pesticidas que actúan sobre el sistema nervioso central, bloqueando la acción de la acetilcolinesterasa en el cuerpo. La acetilcolinesterasa es una de las enzimas más importantes en el funcionamiento del sistema nervioso de humanos, otros vertebrados e insectos, ya que interviene especialmente en la transmisión de los impulsos nerviosos [19].

La transmisión eléctrica del impulso nervioso se realiza con la ayuda de medidores químicos como la acetilcolina (presente en las vías colinérgicas localizadas en el cerebro, médula espinal y nervios periféricos), la cual es liberada en la fibra terminal de la neurona cuando llega el impulso eléctrico. La acetilcolina se difunde a través de la sinapsis e interacciona con un receptor en la célula efectora modificando la permeabilidad de la membrana celular, de esta manera, se da inicio al impulso en la célula. Para terminar la transmisión del impulso la acetilcolinesterasa hidroliza rápidamente la acetilcolina en ácido acético y colina. Estos productos de hidrólisis permanecen unidos a la enzima: la colina queda unida por fuerzas de van der Waals y se disocia fácilmente, por el contrario, el grupo acetilo forma un enlace covalente con el grupo nucleófilo de la enzima el cual se rompe para regenerar la enzima (**Figura 7**) [19, 21].

Si los carbamatos están presentes evitan que la acetilcolinesterasa rompa la acetilcolina debido a que se unen al centro activo de la enzima desplazando la acetilcolina. La enzima los hidroliza formando una enzima carbamilada y el respectivo fenol, posteriormente, la enzima se regenera lentamente (**Figura 7**). Por su parte, la acetilcolina se acumula, el impulso nervioso continúa y se producen numerosos trastornos [19]. La severidad de los síntomas de inhibición de la acetilcolinesterasa depende de múltiples factores, tales como la toxicidad del pesticida, la cantidad involucrada, la frecuencia y la duración de la exposición [19, 21, 22]. Los signos y síntomas de inhibición de la acetilcolinesterasa por exposición a carbamatos se relacionan a continuación [15, 21, 22, 23]:

- Casos leves (contacto entre 4 y 24 horas): fatiga, debilidad, desvanecimientos, náuseas y visión borrosa;
- Casos moderados (contacto entre 24 y 36 horas): dolor de cabeza, sudoración, lagrimeo, visión túnel, vómito, ansiedad, confusión y convulsiones;
- Casos severos (absorción diaria continua): calambres abdominales, diarrea, temblor muscular, tambaleos, pupilas punto de alfiler, hipotensión (anormal descenso en la presión sanguínea), lentitud en los latidos del corazón, dificultad para respirar, y posible muerte, si el paciente no es tratado oportunamente por el médico.



Los ditiocarbamatos pueden afectar el sistema nervioso, pero no a través del mismo mecanismo de inhibición de la acetilcolinesterasa, ya que no interactúan muy bien con ella, sino a través de su principal metabolito el disulfuro de carbono. Este compuesto afecta la habilidad de las células nerviosas para conducir efectivamente el impulso nervioso, porque altera la permeabilidad de la membrana de la célula nerviosa y la envoltura de mielina. Otro metabolito peligroso es la etilentiourea (ETU), la cual tiene efectos cancerígenos y afecta la tiroides, según pruebas hechas en animales [4, 22].

2.3.2.2 Toxicidad crónica

La toxicidad crónica de una sustancia se mide por sus efectos a largo plazo sobre los seres vivos, debido a la exposición prolongada a dicha sustancia. Estos efectos pueden ser en la reproducción, teratogénicos, mutagénicos, cancerígenos, hormonales y en los órganos del cuerpo. Para los carbamatos se han realizado numerosos estudios en este campo, encontrando que los animales del ensayo alimentados con altas dosis y por un periodo prolongado, presentan efectos en la reproducción y la salud de sus descendientes [4].

- ☒ **Efectos reproductivos:** estudios realizados con tres generaciones de ratas, las cuales fueron alimentadas con 7.5 y 15 mg/kg/día de oxamyl, presentaron reducción en el consumo de alimentos, el crecimiento, la lactancia, el tamaño y el crecimiento de las crías [24]. Igualmente, altas dosis de mancozeb (50 mg/kg/día), propoxur (18 mg/kg/día) y EPTC (100 mg/kg/día) disminuyeron la fertilidad de las ratas y el peso de crías [24].
- ☒ **Efectos teratogénicos:** en los experimentos realizados con conejos y cerdos de guinea, donde las madres fueron alimentadas con altas dosis de carbaril, se observaron defectos en los nacimientos [25]. En ratas, se presentaron defectos en la división celular y los cromosomas, en animales e insectos se produjeron efectos en el sistema inmunológico. En los ensayos, realizados con ratas en gestación, las cuales fueron alimentadas con 5 mg/kg/día de propoxur, se observó el nacimiento de hijos con un peso bajo, retardo en el desarrollo de algunos reflejos y deterioro del sistema nervioso central [4].
- ☒ **Efectos mutagénicos:** numerosos estudios sobre la mutación de genes en *Salmonella typhimurium* y *Escherichia coli* se han llevado a cabo, pero no se ha observado ningún efecto, sin embargo, ensayos con ziram mostraron un incremento de las aberraciones cromosómicas en tejidos de trabajadores y animales expuestos a este pesticida [26].

- ⊗ **Efectos carcinogénicos:** existen actualmente estudios epidemiológicos realizados en varios países desarrollados que muestran una relación entre la exposición ocupacional y ambiental a plaguicidas y el cáncer en seres humanos. Los plaguicidas pueden incrementar los riesgos de cáncer, ya que pueden alterar el material genético, reducir la resistencia del organismo a ciertos virus iniciadores de cáncer o debilitar las defensas que eliminan las células cancerosas. Entre los carbamatos, que causan cáncer en animales de laboratorio, están propoxur, benomil, maneb y mancozeb [2].
- ⊗ **Efectos sobre los órganos:** estudios realizados en ratas alimentadas con 0.75 mg/kg/día de oxamyl, durante 2 años, mostraron una disminución en el peso del corazón, los testículos y las glándulas suprarrenales. Exposiciones prolongadas a chlorprofam incrementan el peso del hígado, el bazo y el riñón y producen además lesiones en el bazo [4].
- ⊗ **Efectos hormonales o endocrinos:** estudios científicos recientes han demostrado que ciertos plaguicidas pueden inhibir o imitar la acción de las hormonas sin que el cuerpo pueda reconocer la diferencia entre las hormonas naturales y las falsas, provocando efectos en el sistema inmunológico, desarrollo de la inteligencia, reproducción y fertilidad, especialmente si la exposición ocurre en el período de desarrollo del feto. Estos plaguicidas actúan en niveles inferiores al nivel de efecto no observable, NOEL, para estos compuestos no existe una dosis segura ni un riesgo aceptable. Entre los carbamatos con efecto hormonal se encuentran metomil, carbaril, aldicarb y benomil [2].

2.3.3 Impacto ambiental

Los carbamatos son comúnmente usados como insecticidas y fungicidas, actúan por contacto o por vía sistémica dentro de las plantas. Controlan plagas como gusanos blancos, perforadores, polillas, chinches, nemátodos y hongos, entre otras. Estas plagas atacan los cultivos de cítricos, algodón, papa, arroz, forrajes, hortalizas (tomate, zanahoria, apio, cebolla), maíz, sorgo, plátano, café, cacao, corcubitáceas, yuca, tabaco y flores (begonias, claveles, crisantemos y rosas). Igualmente, combaten gran variedad de plagas caseras como zancudos, moscas, arañas, hormigas y cucarachas [27].

Los carbamatos se aplican en el suelo o en las hojas, las plantas los absorben y los llevan a su interior, donde rápidamente son metabolizados a productos de degradación menos tóxicos en un período de 1 a 2 semanas. En el suelo, los carbamatos permanecen muy poco,

desde unas horas a unos meses, debido a que se degradan por completo mediante hidrólisis química o procesos microbiológicos. El porcentaje de degradación en el suelo depende de la humedad, contenido de materia orgánica y pH; se degradan más rápidamente en los suelos y aguas alcalinas en presencia de luz solar [4]. En los organismos son eliminados rápidamente a través de la orina, por tanto, no ocurre su bioacumulación [15].

El impacto nocivo de los carbamatos en el ambiente radica en su movilidad en el suelo y volatilización, fenómenos que son favorecidos por las propiedades físicas de las moléculas: presión de vapor, coeficiente de partición octanol-agua, coeficiente de absorción, solubilidad en agua, entre otras (**Tabla 3**).

La solubilidad en agua de estos plaguicidas, los hace susceptibles a ser arrastrados por la lluvia, contaminando las fuentes de aguas superficiales y subterráneas, donde se han encontrado meses después de su aplicación en el suelo; acompañados en muchas ocasiones de sus productos de degradación, algunos de los cuales son más tóxicos que sus predecesores [4, 7], por ejemplo: metiocarb se descompone produciendo metiocarb sulfona; propoxur da o-isopropoxifenol; carbaril origina 1- naftol, aldicarb se descompone en aldicarb sulfona y aldicarb sulfóxido y carbofurano en 3-hidroxicarbofurano, 3-cetocarbofurano y tres metabolitos fenólicos: 7-fenol (2,3-dihidro-2,2-dimetil-7-benzofuranol), 3,7-diol (2,3-dihidro-2,2-dimetil-3,7-benzofurandiol) y 3-ceto-7-fenol (2,3-dihidro-2,2-dimetil-3-oxo-7-benzofuranol) (**Figura 8**) [7, 31]. Algunos tiocarbamatos de baja solubilidad se descomponen absorbidos por los sedimentos, persistiendo por varias semanas a meses, se degradan por hidrólisis, principalmente a ETU (etilentiourea) [4].

Tabla 3. Propiedades físicas y químicas de algunos plaguicidas carbamatos [4, 28, 29].

NOMBRE	FÓRMULA MOLECULAR	PESO MOLECULAR	SOLUBILIDAD EN AGUA, mg/L 25°C	SOLUBILIDAD EN OTROS DISOLVENTES	PUNTO DE FUSIÓN, °C	PRESIÓN DE VAPOR, mPa	COEFICIENTE DE PARTICIÓN OCTANOL-AGUA
Aldicarb	C ₇ H ₁₄ N ₂ O ₂ S	190.27	6000 mg/L	Acetona, xileno, éter etílico, tolueno y otros disolventes orgánicos	99-100	13 (20°C)	1.13
Carbaril	C ₁₂ H ₁₁ NO ₂	201.23	40 mg/L	Dimetilformamida, acetona, dimetilsulfoxida, ciclohexanona	142	<5.3 (25 °C)	No disponible
Carbofuran o	C ₁₂ H ₁₅ NO ₃	221.25	320 mg/L	Acetona, acetonitrilo, benceno, ciclohexanona	153-154	2.7 (33°C)	17-26
Mancozeb	(C ₇ H ₆ N ₂ S ₄ Mn) _x (Zn) _y x:y = 10:1	266.31	6 mg/L	Insoluble en la mayoría de los disolventes orgánicos	Se descompone a 192	despreciable A 20°C	No disponible
Metiram	C ₁₆ H ₃₃ N ₁₁ S ₁₆ Zn ₃	1088.7	< 1 mg/L	Insoluble en la mayoría de los disolventes orgánicos	Se descompone a 140	0.01 (20°C)	2
Methiocarb	C ₁₁ H ₁₅ NO ₂ S	225.31	Insoluble en agua	Soluble en disolventes orgánicos	121.5	-	-
Metomil	C ₅ H ₁₀ N ₂ O ₂ S	162.21	57.9 g/L	Metanol, acetona, etanol, isopropanol	78-79	6.65 (25°C)	No disponible
Molinate	C ₉ H ₁₇ NOS	187.30	880 mg/L	Muy soluble en acetona, xileno, etanol, keroseno y 4-metil pentan-2-ona	No disponible	746 (26°C)	760
Oxamyl	C ₇ H ₁₃ N ₃ O ₃ S	219.36	280 g/L	Acetona, etanol, 2-propanol, metanol, tolueno	100-102	31 (25°C)	No disponible
Pirimicarb	C ₁₁ H ₁₈ N ₄ O ₂	238.29	2.7 g/L	Soluble en la mayoría de los disolventes orgánicos	90.5	-	-
Promecarb	C ₁₂ H ₇ NO ₂	207.27	Insoluble en agua	Soluble en disolventes orgánicos	87-87.5	-	3.10
Propoxur	C ₁₁ H ₁₅ NO ₃	209.25	2000 mg/L	Acetona, metanol, ciclohexanona, cloroformo, tolueno	87	300 (120°C)	0.14
Thiram	C ₆ H ₁₂ N ₂ S ₄	240.44	30 mg/L	Etanol, acetona, cloroformo	155-156	Despreciable a T. ambiente	No disponible
Zineb	C ₄ H ₆ N ₂ S ₄ Zn	275.74	10 mg/L	Disulfuro de carbono, pirimidina	Se descompone a 157	<0.01(20°C)	<20

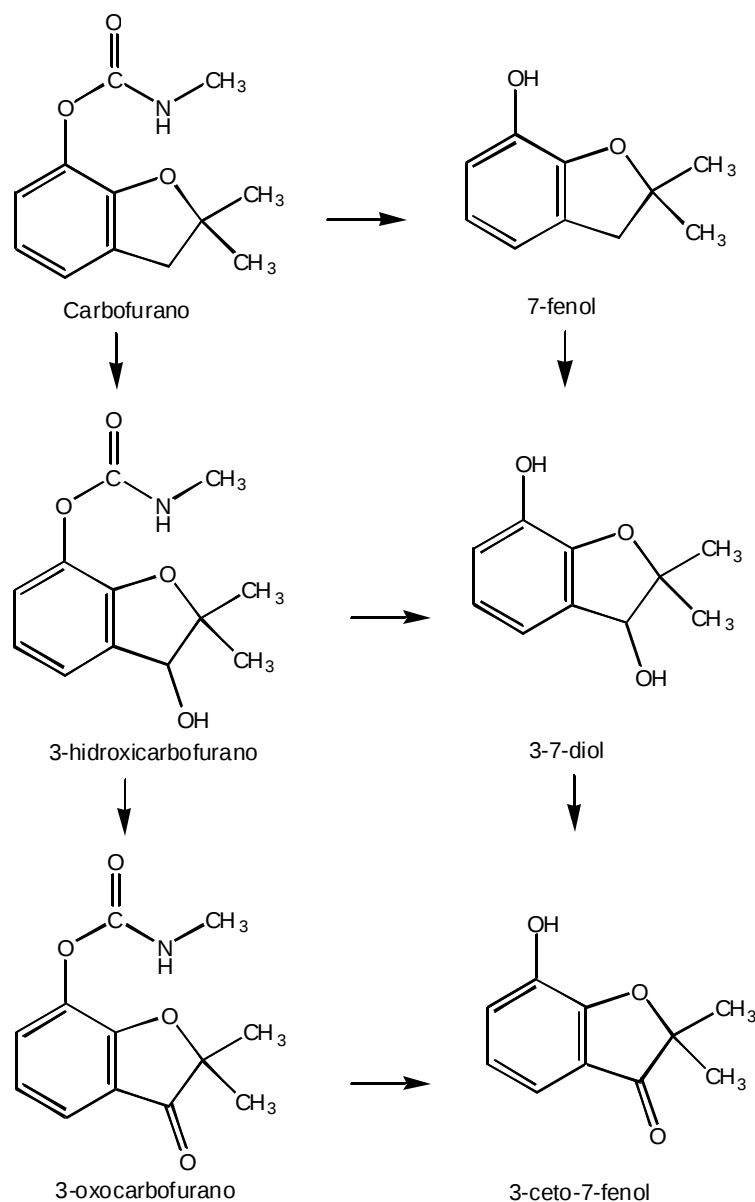
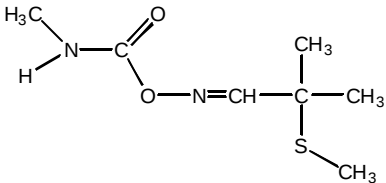
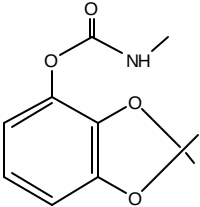
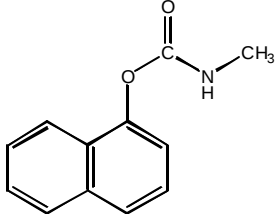
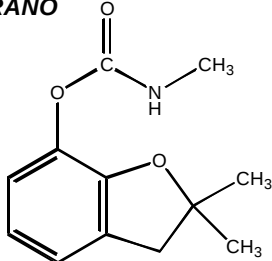


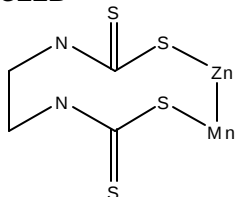
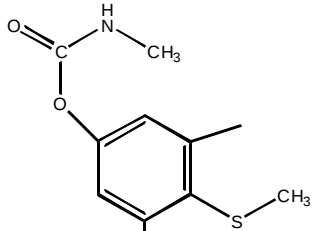
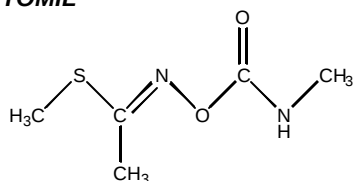
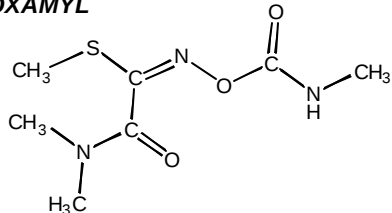
Figura 8. Carbofurano y sus productos de degradación presentes en el ambiente [31].

Los carbamatos, dependiendo de su polaridad, se pueden acumular en menor o mayor grado en los frutos. En 1985, el consumo de patilla contaminada con aldicarb produjo 281 enfermos en California; como este carbamato es soluble en agua puede acumularse en niveles peligrosos en los alimentos, que contengan bastante agua [6]. Otra problemática se centra en su alta toxicidad para algunas especies de pájaros, peces, abejas y lombrices de tierra, importantes eslabones de la cadena alimenticia [4, 27]. A continuación, la **Tabla 4** muestra diferentes aspectos, tales como nomenclatura, usos, categoría toxicológica y persistencia en el ambiente de algunos carbamatos utilizados en Colombia.

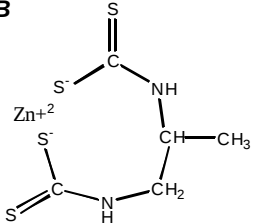
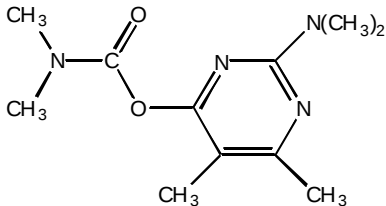
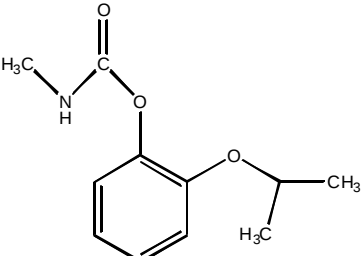
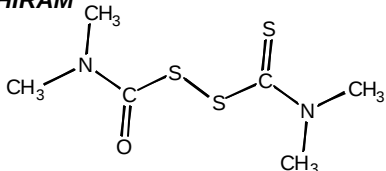
Tabla 4. Estructura, registro, toxicidad e impacto ambiental de algunos carbamatos [2, 19, 20, 27].

CARBAMATO	NOMBRES QUÍMICO Y COMERCIAL	CULTIVOS	IMPACTO EN EL AMBIENTE
ALDICARB 	2-metil-2-(metil-tio) propionaldehído o-metil carbamato oxima. Temik, ENT 27093, OMS 771, UC 21149.	Insecticida. Papa, café, algodón, flores (clavel, crisantemo, rosas), cítricos.	Su uso esta restringido debido a que contamina alimentos y aguas subterráneas. Tóxico para pájaros, peces y lombrices de tierra. Su degradación en el agua es de días a meses. Productos de descomposición: aldicarb sulfona, aldicarb sulfóxido, aldicarb nitrilo y aldicarb oxima. Tox: I. LD₅₀ (cerdos) 0,5 – 1,5 mg/kg
BENDIOCAR 	2,3-isopropilideno dioxifenil carbamato de metilo. Ficam, Garvox, Multimet, Rotate.	Insecticida. Control de mosquitos, moscas, avispas, hormigas, caracoles en jardines y cultivos.	Puede irritar los ojos y la piel, tóxico para peces, pájaros, lombrices y abejas. Baja persistencia en el suelo, de 1 a 4 semanas. Tox: III.
CARBARIL 	1-Naftil- carbamato de metilo. Sevin, Adios, Carbamida, Denapom.	Insecticida. Arroz, maíz, sorgo, hortalizas, cítricos, banano, palma africana, yuca.	Produce quemaduras por contacto con la piel y los ojos. Letal para abejas. Su tiempo de vida media es de 7-14 días en suelos arenosos y de 14-28 en suelos arcillosos. Su producto de descomposición es 1 - naftol. Tox: II. LD₅₀ 250-850 mg/kg.
CARBOFURANO 	2,3-dihidro2,2-dimetil-7-benzofuranol carbamato de metilo. Carboter, Curater, Furadan.	Insecticida. Papa, café, banano, plátano, arroz.	Su uso fue restringido por la EPA, afecta pájaros, peces y abejas. Tiene una vida media de 30-120 días. Productos de degradación: 3-hidrocarbofurano y 3-cetocarbofurano. Tox: I y II. LD₅₀ 5-13mg/kg.

Continuación **Tabla**

MANCOZEB 	Complejo de manganeso y zinc etileno-<i>bis</i> (ditiocarbamato) Cobrethane, Dithane, Manzate, Mancozeb, vondozeb.	Fungicida. Papa, tomate, uva, pepino, sandía, cebolla, frijol.	Ligeramente tóxico para pájaros y peces. Su vida media en el suelo es de 1-7 días. Se degrada espontáneamente a etilentiourea, en presencia de agua y oxígeno. Etilentiourea persiste de 5-10 semanas en agua. Tox: IV. LD₅₀ > 5000 mg/kg.
METHIOCARB 	3,5-dimetil-4-(metiltio) fenol carbamato de metilo. Mesurol, Sc 500	Insecticida y moluscocida. Se aplica a flores ornamentales (rosa, clavel).	Producto de descomposición metiocarb sulfona. Tox: II. LD₅₀ 60 mg/kg.
METOMIL 	5-metil-N-(metil-carbamoiiloxy) tioacetimidato. Lannate, Methavin, Dupont 1179.	Insecticida. Frutales, algodón, arroz, soya, frijol, repollo, coliflor, banano y flores (clavel y rosas).	Es un insecticida de uso restringido por la EPA. Tóxico para peces, abejas, pájaros e invertebrados acuáticos. Su vida media en el suelo es de 14 días, en aguas superficiales 6 días y subterráneas 25 semanas. Tox: I. LD₅₀ 17-24 mg/kg
OXAMYL 	N,N-dimetil-2-metilcarbamoiiloxyimino-2-(metiltio)-acetamida Blade, DPX 1410, Oxamil, Vidate.	Insecticida. Controla además garrapatas, gusanos, lombrices, es usado en vegetales, frutas y plantas ornamentales.	Sus productos son de uso restringido. Tiempo de vida media en el suelo 4-20 días, en los ríos de 1-2 días. Se hidroliza en suelos neutros y alcalinos, se absorbe fuertemente en aquellos con bastante materia orgánica y arenosos. Tox: I. LD₅₀ 5.4 mg/kg.

Continuación **Tabla 4**

PROPINEB 	Zinc (N,N'-propilene-1,2-bis(ditiocarbamato)). Antracol, Fitoraz.	Fungicida. Arroz, cacao, café, cítricos, clavel, corcubitáceas (Melón, sandía, pepino), rosas, tomate, frijol, tabaco.	Se descompone en medios ácidos o fuertemente alcalinos. Tox: IV. LD₅₀ 8500 mg/kg
PIRIMICARB 	Éster 2-(dimetil amino)-5,6-dimetil-4-pirimidinil del ácido dimetil carbámico. Pirimor wc, Karatek.	Insecticida para el control de áfidos en claveles, rosas y crisantemos.	Puede causar hormigueo, entorpecimiento del área expuesta (parestesia). Irrita la piel. Muy tóxico para organismos acuáticos. Tox: III. LD₅₀ 470mg/kg
PROPOXUR 	<i>o</i>-isopropoxifenil carbamato de metilo. Baygon, Rhoden, Propotox, Arprocarb.	Insecticida. Para el control de moscas, mosquitos, hormigas, cucarachas, grillos, en la agricultura y en el hogar. Se aplica a cultivos de caña, cacao, frutales, uvas, maíz y arroz.	Tóxico para pájaros, peces y abejas. Su tiempo de Vida media es de 15 a 50 días en suelos. Puede ser móvil. En las plantas tiene una actividad residual de 1 día después de aplicado. Producto de degradación <i>o</i>-isopropoxifenol. Tox: IV. (Varía con el producto).
THIRAM 	Bis(dimetiltiocarbamil) disulfuro. Vitavax, Aatack, Mercuram, Thiotex, TMTC	Fungicida. Arroz, protege del deterioro en el almacenamiento y transporte. Repelente de animales para proteger árboles frutales.	Ha sido usado en el tratamiento de la sarna humana, como protector solar y bactericida aplicado directamente en la piel o en el jabón. Tóxico para peces. En el suelo su tiempo de vida media es de 15 días. Tox: III.

2.3.4. Producción y venta de carbamatos en Colombia

Los plaguicidas son sustancias químicas de gran demanda en la agricultura, hogares e industria, por su principal función, que es el control de plagas, que afectan la productividad de los cultivos y transmiten enfermedades a animales y seres humanos. Se estima, que en el mundo en 1993, el volumen de producción de plaguicidas era de 2000 millones de toneladas, de las cuales 57% correspondieron a herbicidas, 23% a insecticidas y 12% a fungicidas. En los Estados Unidos durante 1992 se vendieron un billón de libras de plaguicidas, cerca del 58.7% (647 millones de libras) eran herbicidas, 23.2% (255 millones de libras) insecticidas, 10.9% (120 millones de libras) fungicidas y 7.2% (80 millones de libras) pertenecían a otros plaguicidas. En un estudio realizado en este país, la producción entre 1983 y 1993 creció de 975 millones de libras a 1152 millones de libras, que corresponde a un crecimiento del 18.2% en los 10 años; valores de crecimiento superiores se esperan para los próximos años [7].

En Colombia, según reportes dados por el Instituto Colombiano de Agricultura (ICA), la industria de plaguicidas en el país empezó en 1962. En esta primera etapa los ingredientes activos eran importados, sólo hasta 1964 se amplió la tecnología hacia la síntesis de algunos ingredientes activos utilizando materia prima nacional e importada, los primeros plaguicidas elaborados fueron maneb y mancozeb, por parte de las empresas Dupont de Colombia y Rohm and Haas en Barranquilla. Esta producción se ha venido incrementando, ya que hoy en día existen 98 empresas dedicadas a la comercialización y producción de plaguicidas: 25 empresas subsidiarias extranjeras y 73 nacionales, de tal manera, que ya no sólo se destina para el mercado interno sino a la exportación [32].

Reportes recientes realizados por el ICA indican que la producción de plaguicidas sólidos y líquidos en el año 2001 fue 27761390 kg y 31769432 L, respectivamente, donde los principales productos elaborados fueron fungicidas y herbicidas (**Tabla 5**). Adicional a la producción se realizan numerosas importaciones de ingrediente activo, materia prima y producto terminado para cubrir el mercado, cuyas ventas en el año 2001 fueron de 23518398 kg y 31668350 L (**Tabla 6**) [5].

Tabla 5. Producción y ventas nacionales (2001) de plaguicidas por clase de producto [5].

CLASE DE PRODUCTO	PRODUCCIÓN				VENTAS			
	kg	%PART*	L	%PART*	kg	%PART*	L	%PART*
ACARICIDA			51329	0.16	305	0.00	40171	0.13
COADYUVANTE			933140	2.94		0.00	860446	2.72
FUMIGANTE	234972	0.85			218805	0.93	80000	0.25
FUNGICIDA	18813592	67.77	2251154	7.08	9785783	41.61	5251788	16.58
HERBICIDA	7464853	26.89	21889690	68.90	10102936	42.96	19199248	60.62
INSECTICIDA	1164938	4.20	6594586	20.76	3320002	14.12	6176061	19.50
OTROS	15985	0.06	29225	0.09	11935	0.05	41902	0.13
REGULADOR FISIOLÓGICO	67050	0.24	20307	0.06	78632	0.33	18735	0.06
TOTAL	27761390	100.00	31769432	100.00	23518398	100.00	31668350	100.00

* % part: porcentaje del producto respecto a la masa o volumen total del grupo de plaguicidas

Tabla 6. Importación (2001) de plaguicidas por clase [5].

CLASE DE PRODUCTO	INGREDIENTE ACTIVO	MATERIA PRIMA		PRODUCTO TERMINADO	
	kg	kg	L	kg	L
ACARICIDA	22117			10548	7285
ADITIVO	937750	5105529			
COADYUVANTE		4950			
FUMIGANTE	89500				
FUNGICIDA	1774480	25029		1061225	575239
HERBICIDA	13486335	3322191	159000	538880	2932220
INSECTICIDA	1797900	108202	42000	1219374	594374
OTROS		334298		10517	100
REGULADOR FISIOLÓGICO	49620			94580	1488
TOTAL	18157702	8900199	201000	2935124	4110706

La industria de plaguicidas en Colombia produce y vende en grandes cantidades algunos carbamatos, se destacan los fungicidas y los insecticidas, los primeros cubren el 79.02% y el 8.84% y los segundos el 18.79% y 26.31% de la producción en kilogramos y litros de este tipo de productos, respectivamente. La manufactura es liderada por mancozeb con una producción de 14544488 kg; en menor porcentaje se producen propineb, carbofurano, metomil, carbaril, aldicarb, entre otros (Tabla 7). Los carbamatos metiram, methiocarb y

pirimicarb no registran valores de producción y venta en el año 2001, pero su producción fue significativa en los años 1999 y 2000 [5].

En el renglón de las importaciones del año 2001 se destaca la compra de ingrediente activo 2.57% y producto terminado 29.93% y 8.58% de producto sólido y líquido, respectivamente. Ingresan principalmente al país los carbamatos mancozeb, carbofurano, carbosulfan, carbaril, benomil, entre otros. En el año 2000, se presenta la compra de materia prima para la elaboración de los carbamatos carbendazim y metomil, y de ingrediente activo como propineb y thiram (**Tabla 8**) [5].

Tabla 7. Producción y ventas nacionales (2001) de plaguicidas carbamatos [5].

CLASE DE PRODUCTO	PRODUCCIÓN				VENTAS			
	kg	%PART*	L	%PART*	kg	%PART*	L	%PART*
FUNGICIDAS								
CARBENDAZIM			153179	7.88			154059	8.04
FAMOXADONE	9252	0.06			8933	0.11		
MANCOZEB	14544488	96.34			7295640	92.57	8006	0.42
METIRAM								
PROPINEB	313536	2.08			309156	3.92		
PROPAMOCARB			45816	2.36			51560	2.69
TOTAL								
HERBICIDAS								
MOLINATE + PROPANIL			9419	0.48				
INSECTICIDAS								
ALDICARB	86010	0.57			110980	1.41		
CARBARIL	91848	0.61			100564	1.27		
CARBOFURANO			1560262	80.29	1449	0.02	1540428	80.44
CARTAP			9920	0.51			10055	0.53
METOMIL	41043	0.27	126022	6.48	54709	0.69	121907	6.36
PIRIMICARB								
THIODICARB			38700	1.99			28998	1.51
TOTAL	15096177	100.00	1943318	100.00	7881431	100.00	1915003	100.00

* % part: porcentaje del producto respecto a la masa o volumen total del grupo de plaguicidas

Tabla 8. Importación (2001) de plaguicidas carbamatos en Colombia [5]

CLASE DE PRODUCTO	INGREDIENTE ACTIVO	PRODUCTO TERMINADO	
	kg	kg	L
FUNGICIDAS			
BENOMIL		125500	2000
CARBENDAZIM			20000
MANCOZEB		596000	128060
TOTAL			
HERBICIDAS			
TIOBENCARB			10148
INSECTICIDAS			
ALDICARB		67120	
CARBARIL	135000		
CARBOFURAN	153000	90000	4200
CARBOSULFAN			178200
CARTAP	24000		
METOMIL	99500		
THIODICARB	55398		
TOTAL	466898	878620	352608

2.3.5 Legislación sobre la presencia de plaguicidas en el ambiente

En vista de los efectos nocivos y el aumento en la utilización de plaguicidas, que supera las miles de toneladas al año en muchos países, los gobiernos han promulgado normas para regular su uso y destino. En Europa se elaboró una lista de pesticidas y productos relacionados que deben ser monitoreados en las fuentes de agua, debido a que su uso supera las 50 toneladas al año y son fácilmente lixiviados. Entre los carbamatos y productos de degradación enlistados en Europa se encuentran: aldicarb, dinozeb, maneb, methiocarb, ziran, metham-sodio, 1-naftol y etilentiourea. Los países del Mediterráneo (Francia, Italia, Grecia y España), teniendo en cuenta la información sobre su uso, propiedades fisicoquímicas y persistencia, anexaron a la lista los siguientes herbicidas: butilate, EPTC, molinate y triallate [7].

La Comisión de la Comunidad Europea para la calidad del agua ha fijado como máxima concentración admisible para pesticidas individuales y productos relacionados un valor de 0.1 µg/L y para pesticidas totales la concentración de 0.5 µg/L. En los Estados Unidos la Agencia de Protección Ambiental (EPA) reglamentó como nivel máximo para pesticidas

totales 0.5 µg/L y para pesticidas individuales 0.2 µg/L, y además elaboró una lista de plaguicidas con sus niveles permitidos en las aguas potables. En este listado se encuentran algunos carbamatos, los cuales se recopilan en la **Tabla 9** [7].

Tabla 9. Niveles permitidos en las aguas de algunos carbamatos [7].

PESTICIDAS CARBAMATOS	NIVEL PERMITIDO EN LAS AGUAS (mg/L)
Aldicarb	10
Aldicarb sulfóxido	10
Aldicarb sulfano	10
Carbofurano	40
Dinoseb	7
Metomil	200
Oxamyl	200

En Colombia, el Ministerio de Salud a través del Decreto 475 de 1998 sobre las normas técnicas de la calidad del agua potable, establece en el Capítulo III, Artículo 11 y siguientes, la concentración máxima admisible para plaguicidas en agua potable y agua segura (**Tabla 8**). El presente Decreto prescribe además que las personas prestadoras del servicio de acueducto deben realizar análisis periódicos de pesticidas dependiendo del número de habitantes servidos [33].

Tabla 10. Concentración máxima admisible para plaguicidas individuales y totales en agua potable y agua segura, según Decreto 475 de 1998 [33].

TIPO DE PLAGUICIDA	CONCENTRACIÓN MÁXIMA ADMISIBLE DE PLAGUICIDAS INDIVIDUALES (mg /L)	CONCENTRACIÓN MÁXIMA ADMISIBLE DE PLAGUICIDAS TOTALES (mg /L)
CATEGORÍA TOXICOLÓGICA I		
LD ₅₀ ≤ 50 mg/kg	0.1	1.0
CATEGORÍA TOXICOLÓGICA II y III		
LD ₅₀ 51-5000 mg/kg	1.0	10
CATEGORÍA TOXICOLÓGICA IV		
LD ₅₀ 5001-15000 mg/kg	10.0	100.0
La suma total de las concentraciones de plaguicidas y demás sustancias concernientes no debe ser mayor de 100 mg/L.		

2.4 DETERMINACIÓN DE N-METILCARBAMATOS EN MUESTRAS DE AGUA

La determinación de carbamatos en muestras de agua se desarrolla a través de dos etapas: una, de extracción y concentración de los analitos y, otra, de análisis. Para cada una de estas etapas se han implementado numerosas técnicas teniendo en cuenta factores como costo, tiempo, propiedades de los analitos y sensibilidad requerida. A continuación, se reseñan las principales técnicas usadas para la extracción de carbamatos de muestras de agua y las técnicas de análisis, ya sea exploratorio, como las pruebas calorimétricas y de inmunoensayo, o para identificar y cuantificar, como los métodos cromatográficos acoplados a detectores selectivos.

2.4.1 Técnicas de preparación de muestras

La preparación de la muestra es un paso determinante en el análisis ambiental. En éste, los analitos en concentraciones de trazas deben ser extraídos cuantitativamente de la muestra, hacia una matriz que sea compatible con el resto del procedimiento analítico. La extracción de carbamatos de agua se realiza utilizando un solvente inmiscible con agua, como diclorometano, acetato de etilo, éter o una mezcla de solventes. Para muestras sólidas, como suelos y tejidos, se realiza primero una maceración para asegurar un contacto efectivo con el solvente [34].

Las técnicas más utilizadas para la extracción de pesticidas en agua son: extracción líquido-líquido (LLE) en modo continuo (CLLE) y por lotes (BLLE), y extracción en fase sólida (SPE). Sin embargo, en los últimos años se ha empleado una nueva técnica, la microextracción en fase sólida (SPME), la cual permite la extracción y concentración a la vez de contaminantes de matrices acuosas y no acuosas, de una forma sencilla, rápida y libre de solvente [34, 35].

2.4.1.1 Extracción líquido-líquido (LLE)

La extracción líquido-líquido es una técnica útil en el análisis de matrices acuosas de carácter ambiental. Su principio consiste en la distribución o reparto de un analito entre el agua y el solvente de extracción, este último generalmente de baja polaridad como hexano, cloroformo o diclorometano. Esta operación de distribución del analito entre dos solventes se indica en el siguiente esquema:

$$[A]_o \text{ ————— } [A]_{ac} \quad K = [A]_o / [A]_{ac} \quad \text{(Ecuación 1)}$$

Donde $[A]_o$ es la concentración del analito en la fase orgánica y $[A]_{ac}$ la concentración en la fase acuosa. El cociente entre estos dos términos se llama coeficiente de partición (K) **(Ecuación 1)**. Este coeficiente depende del tipo de solvente orgánico, de la temperatura, el pH del medio acuoso y la cantidad de materia orgánica, entre otros factores; por lo cual se hace necesario establecer los valores adecuados de estos parámetros en la aplicación de dicha técnica, para así obtener buenos porcentajes de recuperación y reproducibilidad [36].

La extracción líquido-líquido puede llevarse a cabo en modo continuo o por lotes. En la técnica por lotes se utiliza un embudo de separación en el cual se coloca la muestra a un pH adecuado, según la naturaleza del analito, seguido de la adición de volúmenes determinados de solvente. La mezcla es agitada y se retira la fase orgánica que contiene el analito, operación que puede ser repetida varias veces; los extractos son unidos, concentrados y analizados por HPLC o GC [37]. Si hay presencia en la muestra de materia orgánica y aceites, éstos se deben eliminar previamente con columnas absorbentes de florisil o gel de sílice.

La extracción líquido-líquido continua es la técnica avalada oficialmente para la extracción de N-metilcarbamatos de matrices acuosas; toma como referencia el método EPA 3520 [8]. En este método la muestra de agua se coloca en un condensador de 1L con 300 mL de solvente, el cual se evapora, luego, se condensa en un refrigerante. El contenido cae al agua arrastrando los analitos al fondo del equipo, debido a su densidad más alta y el proceso de recirculación se mantiene por espacio de 24 horas. Una vez obtenidos los extractos, se procede a su concentración, para su posterior análisis. Esta técnica ofrece buenos porcentajes de recuperación, pero implica alta inversión de tiempo y la utilización de solventes en grandes cantidades, los cuales son costosos, muchas veces tóxicos e inflamables [37].

2.4.1.2 Extracción en fase sólida (SPE)

Las sustancias orgánicas también pueden ser extraídas de las matrices acuosas por la técnica de extracción sólido-líquido, conocida como extracción en fase sólida. El procedimiento es sencillo, rápido y menos costoso en comparación con LLE, además, el

analito puede ser separado utilizando un volumen más pequeño de muestra [38]. La extracción en fase sólida (SPE) utiliza cartuchos de poli(propileno) rellenos con un sorbente que puede ser un sustrato de sílice enlazado a un compuesto organosilano, los grupos funcionales enlazados a este último determinan las propiedades de selectividad de un sorbente en particular. Los sorbentes más usados son carbón activado, RP-C₁₈ y XAD-2, [38]. Para activar la columna, se procede a pasar volúmenes (cada uno igual al volumen de la columna) de solvente de diferente polaridad en orden creciente, hasta terminar en la matriz en la cual están los analitos. Estos pasos se realizan para acondicionar la columna y eliminar las impurezas que puedan existir en ella. Una vez acondicionada la columna, se aplica la muestra, los analitos presentes son retenidos por el sorbente debido a las fuerzas atractivas que se generan. Seguidamente, se lava el sorbente con un solvente adecuado, que no eluya el analito, para eliminar algunas interferencias que hayan quedado retenidas en la columna; por último, se eluyen los analitos con un solvente de polaridad similar [38, 39].

Una variación del cartucho de extracción utilizado en SPE es el disco, donde el sorbente (sustrato de sílice o un polímero) es embebido en una rejilla soportada en TeflonTM, posee partículas más pequeñas que las presentes en los cartuchos (8 µm de diámetro vs 40 µm, respectivamente). La corta trayectoria de las muestras y el pequeño tamaño de las partículas permiten enlazar de manera eficiente los analitos con el sorbente, usando un alto flujo de muestra y/o solvente a través del disco. Estos discos son ideales para reducir el tiempo de análisis cuando se manejan volúmenes grandes de muestras acuosas [38].

Se han realizado numerosas investigaciones para evaluar el porcentaje de recuperación de N-metilcarbamatos de muestras de agua por SPE, obteniéndose buenos resultados con sorbentes como carbón grafitado, XAD-2 y C₁₈, cuyos porcentajes de recuperación fueron superiores al 85% [38, 39, 40].

La extracción en fase sólida ofrece múltiples ventajas, a saber: factores de enriquecimiento de 10000 para muestras de 100 - 250 mL, reducción del tiempo de análisis, manipulación mínima de la muestra, evitando así su contaminación y, en la mayoría de los casos, porcentajes de recuperación superiores a los obtenidos mediante extracción líquido-líquido [38]. Además, permite almacenar por largo tiempo analitos como triazinas, fenilureas, carbamatos y fenoles clorados antes del análisis. Los analitos, una vez se les ha eliminado el agua, se pueden almacenar en el sorbente a temperatura ambiente o en el refrigerador, hasta por un período de 7 semanas [41].

2.4.1.3 Microextracción en fase sólida (SPME)

Es una técnica de muestreo libre de solvente, que emplea una pequeña fase extractora polimérica (un líquido de alto peso molecular o un adsorbente sólido de alta porosidad). Los analitos se adsorben sobre la fase polimérica (dependiendo de la naturaleza del recubrimiento) hasta que el sistema alcanza el equilibrio a medida que transcurre el tiempo, pero muchas veces este tiempo puede ser muy largo (horas o días). Cuando esto sucede, se puede emplear tiempos más cortos de extracción bajo condiciones de no equilibrio [38, 42].

El muestreo por SPME se puede desempeñar en tres modos básicos: extracción directa o por inmersión, extracción indirecta o *headspace* y extracción con protección de membrana [42, 43]. Una vez realizada la extracción la fibra es retirada e insertada en el inyector del cromatógrafo de gases, donde los analitos son desorbidos térmicamente y separados por la columna del GC. La desorción dura entre 1 y 2 minutos, después la fibra se retira del puerto de inyección [38].

SPME ofrece múltiples ventajas, comparada con LLE y SPE, a saber: a). No requiere solvente; b). Permite concentrar compuestos volátiles y no volátiles en gases y líquidos; c). Reduce el tiempo de análisis en un 70%; d). Es un método económico; e). La fibra se puede volver a usar (en promedio se pueden realizar 50 extracciones por fibra); y e) Es una técnica muy fácil de adaptar a cualquier sistema GC y HPLC [38, 42, 44].

La aplicación de esta técnica en el muestreo de carbamatos es limitada debido a la poca volatilidad de los compuestos, sin embargo, Gou y colaboradores del Centro de Trabajadores Graduados en Química en la Universidad de Waterloo en Ontario (Canadá), realizaron un trabajo destacado al aplicar la microextracción en fase sólida “en tubo” en el muestreo de carbamatos, esta técnica es una versión automatizada de SPME, que puede ser fácilmente acoplada a un automuestreador de HPLC para la detección de analitos polares y termolábiles. Esta técnica ha sido llamada “en tubo”, porque de manera similar a SPME emplea una columna capilar tubular abierta, en cuyo interior se encuentra el recubrimiento donde los analitos son retenidos. Los resultados mostrados por estos investigadores indican que el método es simple, efectivo, reproducible y sensible. Además, las desviaciones estándar relativas para todos los carbamatos estudiados estuvieron en el rango de 1.7 y 5.3 %; se mostró una buena linealidad, entre 5 y 10000 µg/L, y los límites de detección observados fueron más bajos o similares a los registrados por los métodos de la EPA [45].

2.4.2 Técnicas analíticas usadas para la determinación de N-metilcarbamatos

2.4.2.1 Técnicas de inmunoensayo

Actualmente se han desarrollado numerosos estudios sobre la determinación de pesticidas en aguas y frutos mediante la técnica de inmunoensayo ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), la cual se fundamenta en la interacción del analito con un anticuerpo, que lo reconoce debido a su alta afinidad y especificidad. El inmunoensayo comprende un conjunto de enzimas disponibles para realizar análisis semicuantitativos y de *screening* de plaguicidas, bifenilos policlorados (PCBs), hidrocarburos mononucleares y polinucleares, pentaclorofenoles y muchos otros compuestos en muestras acuosas y de suelo [32]. Esta técnica se lleva a cabo en 3 etapas: 1). Extracción de la muestra; 2). Combinación de la enzima con el analito; y 3). Formación de la coloración para la determinación visual o espectrofotométrica del analito en la muestra [46, 47].

Esta técnica se caracteriza por ser sencilla, de bajo costo, se puede llevar al sitio de trabajo, no requiere instrumentación sofisticada, en algunos casos no se requiere limpieza de la muestra, se pueden analizar muchas muestras a la vez y es un método complementario en los análisis agroquímicos. Es considerada una técnica de *screening*, no confirmatoria. Actualmente están disponibles *kits* de ELISA para aldicarb, carbaril, carbofurano y sus productos de degradación [46, 47]. Además, para propoxur se han realizado estudios en la producción de anticuerpos monoclonales para su análisis en frutos y suelos [48].

2.4.2.2 Técnica de Limperos y Ranta [49]

Esta técnica es recomendada por el Decreto 475 de 1998 del Ministerio de Salud para el análisis de carbamatos y organofosforados, la cual ha sido validada por el Instituto Nacional de Salud. El método de análisis comprende una extracción y concentración de los analitos mediante extracción en fase sólida. El extracto es mezclado con sangre, después de un determinado tiempo se compara la actividad de la acetilcolinesterasa en un blanco y en la muestra problema, si la actividad de la acetilcolinesterasa disminuye se debe a la presencia de plaguicidas organofosforados o carbamatos. La determinación se fundamenta en la variación del pH de la solución debido a la hidrólisis del perclorato de acetilcolina, hacia ácido acético, esta variación de pH se mide por el cambio de color del indicador bromotimol, el cual se compara con patrones de referencia [49].

Esta técnica es rápida, económica, su precisión es del 95% y permite realizar el ensayo hasta 15 días después de la toma de la muestra, su desventaja radica en que indica sólo la presencia o ausencia de pesticidas organofosforados o carbamatos en conjunto [49].

2.4.2.3 Cromatografía líquida de alta eficiencia

La cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) es una técnica usada en la determinación de un amplio rango de compuestos orgánicos y que hoy día es aplicada con frecuencia en análisis ambiental. En esta técnica los analitos se separan por partición entre una fase estacionaria líquida, enlazada a un soporte, y una fase móvil, solvente. La sílice utilizada generalmente como soporte, posee grupos funcionales enlazados a la superficie. Los analitos son transportados a través de la columna por una fase móvil líquida, donde son retenidos selectivamente por la fase estacionaria permitiendo así su separación [46].

Existen 2 formas en el desarrollo de la cromatografía líquida: cromatografía líquida en fase normal y cromatografía líquida en fase reversa. En la primera, la superficie enlazante es polar, debido a que contiene grupos amino, diol y ciano unidos al soporte de sílice y la fase móvil es no polar. Esta técnica es usada para separar esteroides, aflatoxinas y sacáridos. En la segunda, se trabaja con una superficie no polar, que contiene generalmente grupos octadecilo, octilo, metilo y difenilo enlazados al soporte de sílice, la fase móvil es polar y es un método ideal para análisis ambiental [46].

Para la determinación de N-metilcarbamoiloximas y N-metilcarbamatos se ha empleado como base el método EPA 531.1, en el cual se hace una inyección directa con derivatización de postcolumna y análisis por HPLC, para la determinación de aldicarb, aldicarb sulfona, aldicarb sulfóxido, baygon, carbaril, carbofurano, 3-hidrocarbofurano, methiocarb, metomil y oxamyl en muestras de agua subterránea y para consumo humano [8]. El análisis se lleva a cabo bajo condiciones de fase reversa usando columnas de sílice-octilo o octadecilo y mezclas de agua y solventes orgánicos polares como fase móvil [47].

En esta metodología la muestra se filtra y 400 µL se inyectan en una columna HPLC de fase reversa. La separación de los analitos se lleva a cabo por gradiente de elución seguida de hidrólisis con NaOH 0.05 N a 95°C. Esta hidrólisis convierte los carbamatos en sus respectivas metilaminas, las cuales reaccionan con o-ftalaldehído y 2-mercaptoetanol formando derivados altamente fluorescentes, que pueden ser analizados con el detector de fluorescencia. El nivel de detección estimado (EDL) se encuentra entre 0.5 y 4 µg/L. El

análisis de carbamatos por cromatografía líquida se recomienda debido a la disminución de su degradación térmica, sin embargo, no todos los compuestos pueden ser detectados por UV, ya que es necesario que contengan un grupo cromóforo detectable por UV. Carbamatos tales como carbofurano, carbaril, benomil y carbendazim, son detectados directamente por UV o UV-DAD [8, 18].

2.4.2.4 Cromatografía de gases

Cromatografía de gases (GC) es la técnica analítica más común para la determinación de contaminantes orgánicos en muestras acuosas y no acuosas. En análisis ambiental, se requieren límites de detección muy bajos para la determinación de contaminantes a nivel de trazas. La detección tan sensible puede ser obtenida por concentración de la muestra, seguida de una limpieza para remover las sustancias interferentes. Es importante conocer el tipo de compuestos a ser analizados, así como ciertas propiedades físicas y químicas de estos compuestos, para seleccionar la clase de detector y columna que se deben usar en el análisis [46].

La determinación de carbamatos y sus productos de degradación por GC presenta dificultades, debido a la presencia de grupos polares en su estructura, tales como hidroxilo, carbonilo y amida, los cuales disminuyen la volatilidad de las moléculas por su tendencia a formar enlaces tipo puente de hidrógeno; aumentan su absorción en el soporte de la fase estacionaria y les confieren inestabilidad térmica y química. Todo lo anterior favorece su degradación a fenoles e isocianatos en el puerto de inyección, la pérdida de muestra y sus componentes en el sistema cromatográfico y la obtención de picos asimétricos o con cooleo [50, 51]. Para evitar estos inconvenientes se puede utilizar columnas cortas (1 m), inyección *on-column* en frío, velocidades de flujo altas, programación de temperatura gradual, disminución de la temperatura del puerto de inyección [30,40, 52, 53] y modificación de los grupos polares a través de reacciones de derivación como la acilación, sililación y alquilación, siendo las dos primeras las más aplicadas [50, 51].

☒ Derivación química

La derivación permite obtener compuestos más estables, volátiles, de menor polaridad e introducir en la molécula grupos para emplear detectores específicos logrando mejorar la sensibilidad, selectividad y la separación de algunos compuestos en el análisis cromatográfico [50, 51].

La reacción de acilación se utiliza para derivar aminas, fenoles, alcoholes, tioles, enoles, glicoles y compuestos insaturados. Para formar los derivados acilo, los analitos se hacen reaccionar con un exceso de reactivo de acilación (anhídridos o haluros de ácido) en presencia de piridina, tetrahidrofurano u otro solvente capaz de enlazar el ácido formado en la reacción. Posteriormente, se remueve el exceso de agente derivante, antes de la inyección en el cromatógrafo, debido a que su presencia puede causar corrosión u otros daños en el sistema cromatográfico y derivación de residuos no volátiles que se pegan en la pared interna de la columna, promoviendo la aparición de los llamados picos fantasmas [51].

Los derivados obtenidos son compuestos de menor polaridad (ésteres, amidas, tioésteres), debido a que se sustituye un hidrógeno activo por un grupo acilo **(Figura 9)**, este hecho disminuye la capacidad de la molécula para formar puentes de hidrógeno, incrementando así su volatilidad [44, 45].

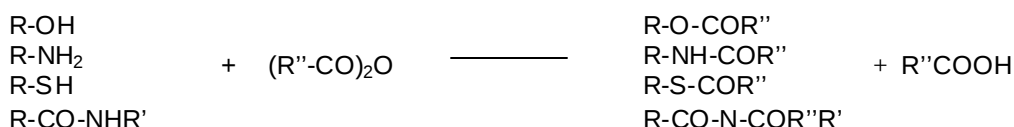


Figura 9. Esquema general de una reacción de acilación.

El agente de acilación puede perder el grupo acilo por mecanismos electrofílicos, nucleofílicos o de radicales libres, siendo más común la acilación electrofílica. Los reactivos de acilación más usados son los anhídridos ácidos, a saber: anhídrido acético, anhídrido heptafluorobutírico (HFBA), N-metil-*bis*(trifluoroacetamida) (MBTFA), anhídrido trifluoroacético (TFAA), los haluros de ácido y derivados acilo [51, 44].

La reacción de sililación es un método versátil, puesto que permite el bloqueo de los sitios con H activos, reduciendo las interacciones dipolo-dipolo e incrementando la volatilidad de la molécula. Por otro lado, al realizar el análisis por HRGC-MS, éste se ve favorecido ya que se obtienen patrones de fragmentación, con iones característicos que se pueden emplear en el monitoreo de iones seleccionados (SIM). Los reactivos más usados en la sililación de pesticidas son N,O-*bis* (trimetilsilil)acetamida (BSA), *bis*(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA) y ácido trifluoroacético (TFA) [51, 44].

☒ **Determinación de N-metilcarbamatos por cromatografía de gases**

Los N-metilcarbamatos se determinan principalmente por cromatografía líquida, cromatografía de gases, método de Limperos y Ranta e inmunoensayo, de las cuales la cromatografía de gases ofrece las mejores ventajas para el análisis de este tipo de compuestos: debido a su alta sensibilidad y versatilidad, ya que permite el análisis directo de algunos carbamatos o a través de sus derivados; bajo costo; bajos niveles de detección y cuantificación y posibilidad de acoplamiento a un detector selectivo de masas volviéndose así una técnica confirmatoria.

Algunos carbamatos se analizan directamente por cromatografía de gases, según lo indicado en el método EPA 507, el cual es empleado generalmente para la determinación de pesticidas nitrogenados y fosforados en muestras de agua subterránea y para consumo humano. Los carbamatos analizados por este método son los herbicidas butilate, clorprofam, EPTC, molinate, perbutate y vernolate. Se requiere para este análisis, un litro de muestra del cual se extraen con diclorometano los analitos por agitación en un embudo de separación. El extracto es aislado, secado y concentrado hasta un volumen de 5 mL, se hace intercambio de solvente con metil-terbutil éter (MTBE) y los analitos son separados y analizados por GC-NPD [8].

Para el análisis de N-metilcarbamatos y carbamatos oxima se requiere derivación. Existen numerosos artículos, publicados en revistas de química analítica [47, 54, 55], sobre la utilización de la derivación en el análisis de N-metilcarbamatos en muestras de agua por cromatografía de gases; estas metodologías muestran buenos límites de detección y cuantificación. La **Tabla 11** presenta resumidos los resultados de algunos de estos estudios.

Tabla 11. Técnicas de análisis de carbamatos mediante derivación química

AGENTE DERIVANTE	DERIVADO	CONDICIONES DE DERIVACIÓN	TÉCNICA DE ANÁLISIS	ANÁLITOS
Anhídrido acético	Acetilo	Temperatura: 150°C, tiempo: 3 horas, solvente: tolueno 1-3 mL, ag. derivante: 100 µL. Inyección directa [54].	HRGC-MS	Bentiocarb, carbaril, carbofurano, fenobucarb, fenoxicarb, propoxur, 3,4,5-landrin, methiocarb, etiofencarb, phenmedipham.
Anhídrido trifluoroacético	Trifluoroacetilo	Temperatura: 50°C, tiempo: 2 horas, solvente: acetato de etilo 200 µL, ag. derivante: 200 µL. Requiere lavado antes del análisis [55].	HRGC-MS	Fenobucarb, metolcarb, propoxur, isoprocab, carbaril, carbendazim
Diazometano en éter	Metilado	Temperatura ambiente, tiempo: 1 hora, solvente: metanol 0.5 mL, ag. derivante: 0.5 mL. Después de la derivación se adiciona ácido acético para descomponer el diazometano [55].	HRGC-MS	Carbendazim
Anhídrido heptafluobutírico	Perfluoroacilo	Temperatura: 30°C, tiempo: 180 minutos, solvente: acetato de etilo, ag. derivante: 200 µL, catalizador: piridina, requiere lavado antes del análisis [56].	HRGC-ECD	Carbaril, 1-naftol
Anhídrido heptafluobutírico	Perfluoroacilo	Temperatura: 70°C, tiempo: 60 minutos, Ag. derivante: 80 µL, catalizador: trimetilamina, requiere lavado antes del análisis [57].	HRGC-ECD	Carbofurano, 3-cetocarbofurano, 3-hidroxicarbofurano
Anhídrido trifluoroacético	Trifluoroacetilo	Temperatura: 45°C, tiempo: 16 horas, solvente: acetato de etilo, ag. derivante: 100 µL, requiere lavado antes del análisis [56].	HRGC-ECD	Carbofurano, 3-cetocarbofurano, 3-hidroxicarbofurano
Anhídrido pentafluoropropiónico	Perfluoroacilo	Se realiza primero la hidrólisis con NaOH a sus respectivos fenoles y luego la derivación [47].	HRGC-ECD	Bentiocarb, propoxur, carbofurano, aminocarb, carbaril, metiocarb.
Hidróxido trimetil sulfonio	Metilado	Se lleva a cabo en un vaporizador de temperatura programada (PVT) a 60°C donde reacciona una solución del agente derivante con los analitos [58].	HRGC-MS-SIM	Herbicidas e insecticidas carbamatos.

2.4.3 Detectores para cromatografía de gases

Los detectores para cromatografía de gases usualmente son clasificados con base en su respuesta o selectividad, los detectores universales responden a cada componente en la fase móvil, los detectores selectivos a un grupo relacionado de sustancias y los detectores específicos a un solo o limitado grupo de componentes con las mismas características químicas. Las características más importantes para el trabajo práctico son la sensibilidad, el rango dinámico lineal, los factores de respuesta del detector y su selectividad [60]. De los detectores para cromatografía de gases los más usados en el análisis de N-metilcarbamatos de modo directo o a través de derivación son el detector de ionización en llama (FID), el detector de captura de electrones (ECD) y el detector selectivo de masas.

☒ **Detector de ionización en llama (FID)**

El detector de ionización en llama es un detector universal, se emplea en el análisis de la mayoría de los compuestos orgánicos. Posee un quemador donde el afluente de la columna se mezcla con hidrógeno y con aire para luego encenderse eléctricamente. Los compuestos orgánicos se pirolizan y producen iones y electrones que pueden conducir la electricidad a través de la llama. El número de iones que se produce es aproximadamente igual al de átomos de carbono que llegan a la llama. Entre el extremo del quemador y un electrodo colector situado encima de la llama se aplica una diferencia de potencial de unos cuantos voltios y para medir la corriente que resulta se utiliza un amplificador operacional. El FID se caracteriza por poseer una elevada sensibilidad ($\approx 10^{-13}$ g/s), un intervalo lineal amplio de respuesta ($\approx 10^7$) y bajo ruido [60, 61]. Este detector se ha empleado principalmente en los estudios de estabilidad y pruebas de derivación de los N-metilcarbamatos [47, 53, 57]

☒ **Detector de captura de electrones (ECD)**

El detector de captura de electrones es frecuentemente utilizado para la determinación de compuestos que contienen halógenos. El principio de funcionamiento de este detector se basa en la disminución de la conductividad debido a que los electrones, son capturados por analitos específicos que tienen grupos electronegativos. El detector utiliza una fuente radiactiva de baja intensidad, usualmente una lámina de ^{63}Ni , para generar electrones de alta energía. En presencia de un gas como nitrógeno o argón/metano, éstos se convierten en electrones térmicos, principalmente responsables de la conductividad en la cavidad del ECD. Cuando un compuesto orgánico halogenado u otro con grupos electronegativos entra al

detector, los electrones son capturados y su corriente disminuye, generando una señal proporcional a la cantidad de moléculas con alta afinidad electrónica [60, 61]. ECD se ha empleado en la determinación de N-metilcarbamatos derivados con TFAA o HFBA, debido a la sensibilidad alta para este tipo de compuestos [47, 56, 59]

☒ **Detector selectivo de masas (MSD)**

Los compuestos orgánicos, que entran al espectrómetro de masas, son ionizados en la cámara de ionización por medio de diversos métodos, principalmente, se emplea el impacto de electrones (EI), o la ionización química (CI). En la ionización por impacto de electrones, las moléculas son bombardeadas con electrones de 70 eV de energía, emitidos desde un filamento de rutenio o tungsteno. Los iones moleculares (M^{+*}) formados adquieren una gran cantidad de energía, que se acumula en sus enlaces, para luego ser disociados a iones-fragmento, radicales y especies neutras. Se trabaja a presiones bajas (10^{-5} - 10^{-6} Torr) para favorecer las reacciones unimoleculares y la no asociación entre moléculas e iones-fragmento [60]. Una desventaja de este mecanismo de ionización radica en la elevada fragmentación del ión molecular.

La ionización química es una técnica “suave,” que causa una menor fragmentación del ion molecular. Ésta utiliza un gas reactante como metano, el cual es introducido dentro de la fuente iónica a una presión relativamente alta, donde es ionizado por los electrones para formar iones primarios, los cuales interactúan con las moléculas de la muestra para producir iones secundarios a través de la reacciones ión-molécula. Los principales iones obtenidos son los cuasimoleculares $(M+1)^+$, los cuales permiten obtener información sobre los pesos moleculares de moléculas lábiles [61]. El detector selectivo de masas se ha utilizado en la identificación y cuantificación de los derivados de N-metilcarbamatos y sus productos de degradación [53, 54, 55, 58].

3. PARTE EXPERIMENTAL

El proyecto desarrollado para implementar una técnica de análisis cromatográfico de N-metilcarbamatos y sus productos de degradación comprendió 4 etapas. La primera etapa fue la evaluación de las técnicas de extracción: líquido – líquido por lotes y en fase sólida para la extracción de los N-metilcarbamatos de muestras de agua. La segunda etapa abarcó el estudio de la derivación de los N-metilcarbamatos con los agentes derivantes anhídrido acético (AA) y anhídrido trifluoroacético (TFAA); la tercera etapa comprendió el montaje y estandarización de la técnica HRGC/ μ -ECD para la determinación de los N-metilcarbamatos y, por último, se aplicó la técnica desarrollada a muestras reales de aguas superficiales.

3.1 REACTIVOS Y MATERIALES

Los solventes utilizados en el trabajo fueron de grado analítico, suministrados por Mallinckrodt; se emplearon hexano, acetato de etilo, tolueno, diclorometano, éter y metanol. Para el desarrollo de la técnica de derivación se utilizó una mezcla patrón de once carbamatos (*Chem Service* CP8318-2JM), que contenía los pesticidas: aldicarb, aldicarb sulfóxido, aldicarb sulfona, oxamyl, metomil, carbofurano, 3hidroxicarbofurano, propoxur, promecarb, methiocarb y carbaril. También se usaron patrones individuales de los anteriores plaguicidas y de 1-naftol (M-531-04, *Accustandar*). Como estándares internos se emplearon metalaxyl y propiconazol para el análisis por GC/FID y GC/ μ ECD respectivamente. Como agentes derivantes se usaron anhídrido acético (97%, Merck) y anhídrido trifluoroacético (99%, Merck) y como catalizadores piridina (99.5%, Merck) y trietilamina (99.5%, Aldrich). Para la extracción en fase sólida se utilizaron microcolumnas de Octadecilo, C₁₈, (1000mg, 6mL) suministradas por J.T.Baker.

Las muestras de agua fueron tomadas de las quebradas Menzuly y La Grande, las cuales están ubicadas en los municipios de Floridablanca y Piedecuesta, respectivamente.

3.2 INSTRUMENTACIÓN

En el presente trabajo se emplearon 3 sistemas de detección: El detector de ionización en llama (FID), para evaluar las variables involucradas en la extracción de los N-metilcarbamatos por las técnicas BLLE y SPE, al igual que las condiciones adecuadas de derivación para cada agente derivante. El detector de microcaptura de electrones (μ -ECD), para la determinación de los N-metilcarbamatos derivados y el detector selectivo de masas

(MSD), para la identificación y confirmación de los N-metilcarbamatos derivados. Para corroborar la estructura del propoxur y su derivado acetilado se tomaron los respectivos espectros de resonancia magnética de protones (RMN ^1H)

3.2.1 Sistema de detección HRGC/FID

Los ensayos preliminares de derivación y la evaluación de las técnicas de extracción BLLE y SPE se realizaron en un cromatógrafo de gases *Hewlett-Packard* (Palo Alto, California, USA) HP 5890 A Series II dotado de un detector de ionización en llama, un inyector *split/splitless* y un sistema de datos *HP Chem Station* Rev. A.06.03 [509]. Se empleó una columna capilar de sílice fundida HP-5, con fase estacionaria 5% fenil-poli(dimetilsiloxano), [30m x 0.25 mm (d.i.) 0.25 μm (f.e)].

Los siguientes fueron los parámetros utilizados para el análisis cromatográfico:

El inyector se operó a 250°C, con la válvula *split* cerrada por un minuto durante la inyección en modo *splitless*, la presión de helio (99.995% AGA Fano S.A.) en la entrada de la cabeza de la columna fue de 100 kPa y la velocidad de flujo de 0.8 mL/min. Las velocidades volumétricas de los gases de combustión fueron de 300 y 30 mL/min para aire e hidrógeno, respectivamente. Como gas auxiliar se usó N_2 a 10 mL/min. La temperatura del detector se mantuvo en 250°C. La programación de temperatura del horno se inició en 60°C por 2 minutos, con una rampa de calentamiento de 6°C/min, hasta 250°C por 15 minutos.

3.2.2 Sistema de detección HRGC/MS

Para la identificación y confirmación de la estructura de los derivados se utilizó un cromatógrafo de gases *Hewlett-Packard* (Palo Alto, California, USA) HP 5890 A Series II, acoplado a un detector selectivo de masas (MSD) HP5972 con sistema de datos *HP Enhanced Chem Station* 61701BA (Versión B.01.00), equipado con base de datos de espectros de masas NB575K y Wiley 138K. Se empleó una columna capilar HP-5MS de fase estacionaria 5% fenil-poli(dimetilsiloxano), [60m x 0.25mm (d.i.) x 0.25 μm (f.e)].

Se emplearon los siguientes parámetros operacionales: el inyector se operó a 250°C con una relación *split* 1:30, la presión de helio (99.995%, AGA fano S.A.) en la cabeza de la columna fue de 78 kPa y su velocidad de flujo de 0.8 mL/min. La programación de la

temperatura del horno se inició a 50°C por 5 minutos, con una rampa de calentamiento de 5°C/min hasta 270°C, mantenidos por 30 min.

Las temperaturas de la cámara de ionización y de la línea de transferencia fueron 185 y 285°C, respectivamente. La energía de los electrones bombardeantes fue de 70 eV. La corriente iónica total reconstruida y los espectros de masas se obtuvieron por medio de barrido automático de radiofrecuencias a 2.4 scan/s en el rango de masas de m/z 30-400.

3.2.3 Sistema de detección HRGC/ μ -ECD

Los carbamatos derivados con anhídrido trifluoroacético (TFAA) se analizaron en un cromatógrafo de gases *Hewlett-Packard* (Palo Alto, California, USA) HP 6890-Plus GC System con control electrónico de presión, programación electrónica de temperatura, equipado con un inyector *split/splitless* y un microdetector de captura de electrones (μ -ECD). Los datos obtenidos se procesaron a través del software HP *Chemstation* Rev. A 06.03 (*Hewlett-Packard*). Se utilizó una columna capilar HP-5, [30m x 0.25mm (d.i.) 0.25 μ m (f.e)], con fase estacionaria 5% fenil-poli(dimetilsiloxano).

Los parámetros empleados en este equipo fueron los siguientes: el inyector se operó con la válvula *split* cerrada por un minuto durante la inyección en modo *splitless*. La presión de helio (99.995% AGA Fano S.A) en la entrada de la columna fue de 36 psi con una velocidad volumétrica de flujo de gas de arrastre de 1 mL/min. La temperatura del detector se mantuvo a 300 °C, como gas auxiliar se utilizó la mezcla de argón/ metano (9:1) con una velocidad de flujo de 20 mL/min. La programación de temperatura del horno se inició en 60°C por 2 minutos, con una rampa de calentamiento de 6°C/min, se elevó hasta 250°C, mantenidos por 15 minutos.

3.2.4 Resonancia magnética nuclear

Los espectros de resonancia magnética nuclear se registraron en un espectrómetro Bruker avance 400. El disolvente empleado fue cloroformo deuterado ($CDCl_3$). Los valores de los desplazamientos químicos (δ) se expresaron en partes por millón (ppm) respecto a una referencia interna de tetrametilsilano y las constantes de acoplamiento se expresaron en hertz. Los análisis se reportaron de la siguiente manera: desplazamiento químico (intensidad de la integral, multiplicidad, constantes de acoplamiento y grupo).

3.3 OBTENCIÓN DEL PATRÓN COMERCIAL DE PROPOXUR

En primera instancia, se llevó a cabo la determinación de las condiciones adecuadas de extracción y derivación, utilizando un patrón comercial de propoxur; posteriormente, las condiciones establecidas se aplicaron al patrón certificado de carbamatos. Para obtener el patrón de propoxur se trabajó con un litro del producto comercial Baygón de Bayer, el cual contenía el plaguicida en una concentración de 0.5% disuelto en una mezcla de hidrocarburos. Para extraer el plaguicida se evaporó la fracción más volátil del solvente en un rotoevaporador, el líquido restante se dejó en reposo por 2 días para favorecer la cristalización del propoxur. Posteriormente, la mezcla se filtró y los cristales se lavaron con hexano. Para determinar el grado de pureza se tomó el punto de fusión y se obtuvieron los espectros de masas y de RMN del plaguicida.

3.4 CONDICIONES PARA LA REACCIÓN DE ACILACIÓN DE LOS N-METILCARBAMATOS

En este trabajo se evaluó la derivación de un grupo de N-metilcarbamatos (aldicarb, oxamyl, metomil, propoxur, carbofurano, promecarb, methiocarb y carbaril) y los productos de degradación (3-hidroxicarbofurano, aldicarb sulfóxido, aldicarb sulfona y naftol) utilizando los agentes derivantes: anhídridos acético y trifluoroacético, y como catalizadores piridina y trietilamina. La derivación de los N-metilcarbamatos se llevó a cabo en 2 etapas. En la primera etapa se determinaron las condiciones adecuadas para derivar una solución del pesticida propoxur con cada uno de los 2 agentes derivantes antes mencionados. En la segunda etapa se aplicó la metodología establecida a la mezcla de N-metilcarbamatos.

Para preparar los derivados se tomó una cantidad determinada del pesticida y se colocó en un tubo de ensayo, se agregó el solvente, el catalizador y el agente derivante. La mezcla se agitó y calentó por el intervalo de tiempo establecido. Posteriormente, se realizó la extracción del derivado. El extracto, que se obtuvo, se deshidrató con sulfato de sodio, se concentró a un volumen de 1 mL y se inyectó 1 μ L para su respectivo análisis por HRGC/FID.

Los parámetros evaluados en el proceso de derivación de propoxur se describen a continuación:

➤ Derivación de propoxur con anhídrido acético (AA):

Relación molar carbamato/AA: 1:20, 1:50, 1:100.

Relación molar carbamato/catalizador (triethylamina): 1:0, 1:5, 1:10

Tiempo de reacción: 2 y 3 horas

Parámetros constantes: temperatura 120°C, solvente tolueno (1 mL)

Procedimiento de extracción del derivado: se adicionó a la mezcla de reacción, una solución de bicarbonato de sodio hasta pH 8, se lavó con 3 mL de agua y se extrajo la capa de tolueno que contenía el derivado.

➤ Derivación de propoxur con anhídrido trifluoroacético (TFAA):

Relación molar carbamato/ TFAA: 1:1000, 1:2000, 1:3000, 1:5000

Relación molar carbamato/ catalizador (piridina): 1:0, 1:300, 1:650, 1:1000

Temperatura de reacción: 50, 60 y 70°C

Parámetros constantes: tiempo 2 horas, solvente acetato de etilo (200 µL).

Procedimiento de extracción del derivado: se adicionó a la mezcla de reacción, una solución de bicarbonato de sodio hasta pH 8 y se extrajo el derivado con 5.5 mL de una mezcla de hexano-éter (95:5).

Una vez evaluados los anteriores parámetros, se determinó para cada reacción llevada a cabo a las condiciones establecidas el porcentaje de derivación de propoxur; para esto, se preparó una curva de calibración con patrones de propoxur comercial, con la cual se cuantificó la cantidad que no había sido derivada.

3.5 EVALUACIÓN DE LA EXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO POR LOTES (BLLE) DE LOS N-METILCARBAMATOS

Para la evaluación de esta técnica se trabajó con muestras de agua destilada, las cuales fueron enriquecidas con un patrón comercial de propoxur (30 µg/mL). El pH de la solución se ajustó a 4.0 con una solución de ácido sulfúrico (0.5 M), debido a que los carbamatos sufren degradación progresiva a los fenoles en soluciones acuosas con pH superior a 4.5 [40]. El volumen de muestra utilizada fue de 10 mL, la extracción se realizó 3 veces, empleando 2 mL de solvente. Bajo estas condiciones, se estudió el efecto de la polaridad del solvente y la adición de sal sobre la extracción. El procedimiento se muestra en la **Figura 10**.

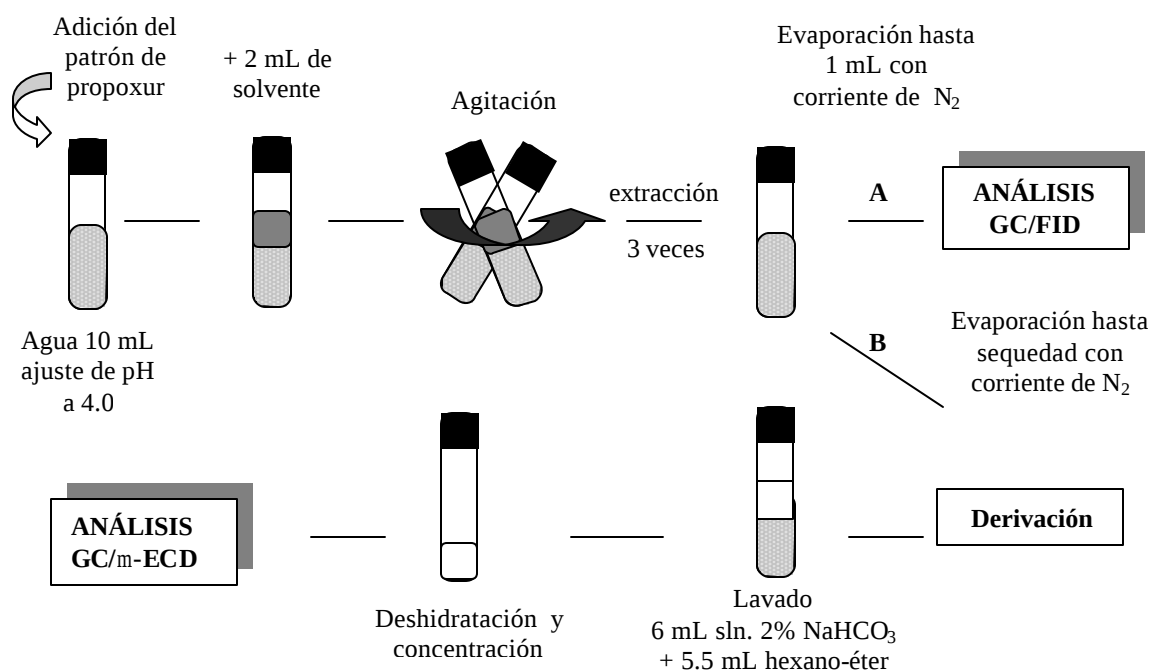


Figura 10. Procedimiento de extracción BLLE y análisis de N-metilcarbamatos.

El estudio del efecto de la polaridad del solvente para BLLE, se llevó a cabo empleando diversos solventes como diclorometano, éter, acetato de etilo y mezclas de ellos (**Tabla 12**). Las muestras se procesaron siguiendo el procedimiento descrito en la **Figura 10 A** como estándar interno se adicionó metalaxyl en una concentración de 20 µg/mL.

Tabla 12. Solventes empleados en BLLE [36].

SOLVENTE	DENSIDAD, g/cm ³	POLARIDAD, P'	PUNTO DE EBULLICIÓN, °C
Éter	0.713	2.8	35
Diclorometano	1.327	3.1	40
Acetato de etilo	0.902	4.4	77
Diclorometano/acetato de etilo (1:1)			
Diclorometano/acetato de etilo (1:3)			
Diclorometano/acetato de etilo (3:1)			

Con el objeto de establecer la influencia de la adición de sal en BLLE, las muestras se enriquecieron con una cantidad determinada de propoxur; se ajustó el pH y se adicionó cloruro de sodio en diferentes porcentajes, a saber: 0, 1, 5 y 10%; la extracción se realizó con la mezcla de solventes escogida.

Una vez establecidas las condiciones adecuadas (solvente y cantidad de sal) para la extracción de N-metilcarbamatos para BLLE se aplicó esta metodología a muestras enriquecidas con el patrón certificado de N-metilcarbamatos, las cuales fueron procesadas según el procedimiento descrito anteriormente; en el último paso se evaporó el extracto a sequedad y se procedió a realizar la derivación de los carbamatos con TFAA (**Figura 10 B**). Las muestras fueron analizadas por HRGC/ μ -ECD para determinar la eficiencia y reproducibilidad de la técnica BLLE.

3.6 EVALUACIÓN DE LA EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA (SPE) DE LOS N-METILCARBAMATOS.

Para realizar la extracción en fase sólida se trabajó con columnas de octadecilo C₁₈ de 1000 mg de sorbente y 6.0 mL de volumen, las cuales fueron conectadas a un extractor en fase sólida (J.T. Baker SPE-24G), operó a una velocidad de flujo de 2 mL/min.

Cada columna fue acondicionada adicionando en forma sucesiva 2 mL de los siguientes solventes: diclorometano, diclorometano-metanol (1:1), metanol y finalmente, agua a pH 4. Posteriormente, se agregaron 10 mL de la muestra de agua destilada enriquecida con el patrón de propoxur (20 mg/mL), cuyo pH se ajustó previamente a 4.0 con una solución de ácido sulfúrico (0.5 M). Luego se realizó el lavado y elución con 6 mL de solvente. El extracto obtenido se deshidrató con sulfato de sodio y fue concentrado a 1 mL con una corriente de nitrógeno. Finalmente 1 μ L de este extracto fue inyectado en un HRGC/FID para el respectivo análisis (**Figura 11**).

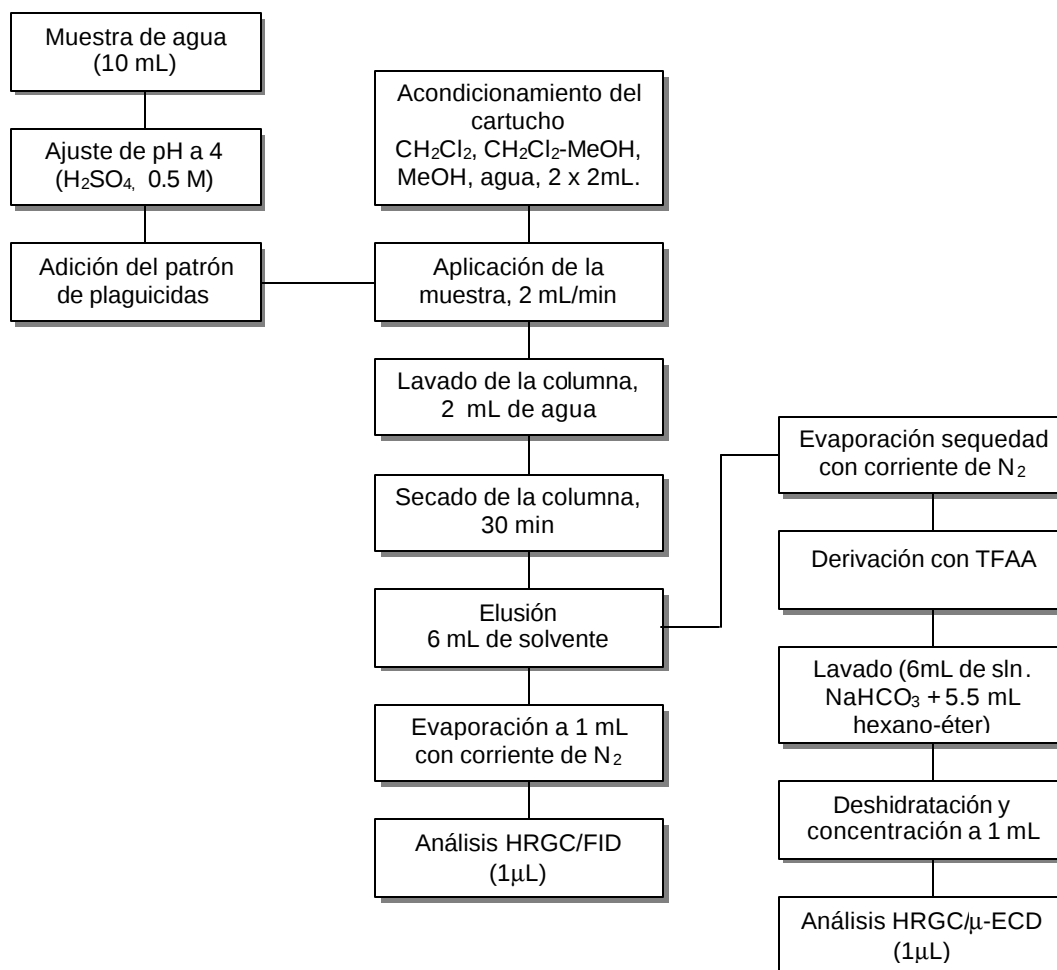


Figura 11. Procedimiento de análisis de N-metilcarbamatatos en muestras de agua empleando la técnica SPE.

Para esta técnica se estudió el efecto de la polaridad y el volumen de solvente utilizado para la extracción de los analitos del cartucho, y la adición de sal a la muestra de agua antes de la extracción, siguiendo el procedimiento descrito anteriormente. Con el fin de estudiar el efecto de la polaridad del solvente se utilizaron dos mezclas de solvente: diclorometano-acetato de etilo (1:3) y diclorometano-metanol (4:1), la primera fue escogida como la más adecuada para extraer los N-metilcarbamatatos por BLLE y la segunda es la recomendada por Supelco y Di Corcia [62, 63]. Los porcentajes de sal evaluados fueron 0, 1, 5 y 10% y la elución de los analitos del cartucho se efectuó con 2, 4 y 6 mL de solvente.

Para evaluar la eficiencia y reproducibilidad de la técnica, se trabajó con muestras enriquecidas con el patrón de N-metilcarbamatatos (1 µg/mL). Las muestras se procesaron

según las condiciones establecidas y siguiendo el procedimiento descrito anteriormente. El extracto obtenido se concentró a sequedad con una corriente de nitrógeno seco, posteriormente, se realizó la derivación de los carbamatos con TFAA y se inyectó 1µL para el análisis.

3.7 DETERMINACIÓN DE LA EFICIENCIA Y REPRODUCIBILIDAD DE LAS TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO CONTINUO (CLLE), LÍQUIDO-LÍQUIDO POR LOTES (BLLE) Y EN FASE SÓLIDA (SPE) PARA LOS N-METILCARBAMATOS.

La evaluación de la eficiencia y la reproducibilidad de las técnicas de extracción líquido-líquido por lotes y extracción en fase sólida se realizó procesando 4 muestras: un blanco y 3 muestras enriquecidas con un patrón de N-metilcarbamatos (1 µg/mL), siguiendo los procedimientos descritos en los **Numerales 3.5 y 3.6**.

Para la extracción líquido-líquido continuo, se aplicó la metodología indicada en el método EPA 3520, se trabajó con un litro de muestra y la extracción se realizó con 300 mL de diclorometano durante 24 horas. Posteriormente, los extractos se concentraron en un concentrador *Kuderna-Danish* y se llevaron a sequedad con una corriente de nitrógeno para realizar la derivación y el respectivo análisis.

3.8 ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA HRGC/_m-ECD

Para el análisis de los N-metilcarbamatos (propoxur, promecarb, carbofurano, 3-hidroxicarbofurano, carbaril y methiocarb), empleando el detector selectivo de µ-ECD, se prepararon tres soluciones *stock*. La solución *stock* 1 fue de 50 µg/mL en acetonitrilo, a partir de ésta se preparó una segunda solución *stock* de 25 µg/mL de carbamatos derivados en una mezcla de hexano-éter (95:5). La solución *stock* 2 se preparó derivando 500 µL de la *stock* 1 con 600 µL de TFAA y 58 µL de piridina en 300 µL de acetato de etilo, la reacción se llevó a cabo por 2 horas a una temperatura de 50 °C. La *stock* 3 fue de 1 µg/mL de carbamatos derivados y se preparó haciendo reaccionar 20 µL de la *stock* 1 con 34 µL de TFAA y 4 µL de piridina bajo las mismas condiciones utilizadas para la solución *stock* 2.

3.8.1 Curvas de calibración de los carbamatos derivados

Para la determinación del nivel mínimo de detección, NMD, de los N-metilcarbamatos derivados se prepararon patrones en concentraciones decrecientes a partir de la solución *stock* 3 y se inyectaron en el equipo. Los valores establecidos como NMD fueron los que generaron una señal S, 3 veces mayor que el nivel de ruido N, ($S/N=3$). Los patrones para las curvas de calibración se prepararon a partir de la *stock* 2 en dos niveles de concentración: uno bajo (0.01 µg/mL - 0.3 µg/mL) y uno alto (0.5 µg/mL - 7.0 µg/mL). Cada uno de los patrones se preparó en una mezcla de hexano-éter (95:5) y se adicionó propiconazol como estándar interno en una concentración de 2 µg/mL. Las **Tablas 13** y **14** especifican las concentraciones y los volúmenes de los patrones preparados para cada nivel.

Tabla 13. Volúmenes de solución *stock* 2 requeridos para la preparación de patrones de calibración de N-metilcarbamatos derivados en el nivel de concentración bajo.

Concentración del patrón de N-metilcarbamatos derivados (mg/mL)	Volumen tomado (mL) de la solución <i>stock</i> 2 de 25 mg/mL
0.01	0.4
0.02	0.8
0.03	1.2
0.05	2.0
0.1	4.0
0.2	8.0
0.3	12.0

Tabla 14. Volúmenes de solución *stock* 2 requerido para la preparación de patrones de calibración de N-metilcarbamatos derivados en el nivel de concentración alto.

Concentración del patrón de N-metilcarbamatos derivados (mg/mL)	Volumen tomado (mL) de la solución <i>stock</i> 2 de 25 mg/mL
0.5	20
1.0	40
2.0	80
3.0	120
5.0	200
7.0	280

3.8.2 Determinación de los t_R , t_{RR} , áreas, áreas relativas, R_f , RR_f y el rango dinámico lineal del μ -ECD para los N-metilcarbamatos derivados

Los tiempos de retención (t_R), los tiempos de retención relativos (t_{RR}), las áreas, las áreas relativas, los factores de respuesta (R_f), los factores de respuesta relativos (RR_f) y el rango dinámico lineal del μ -ECD se determinó teniendo en cuenta los patrones de calibración mencionados en las **Tablas 13 y 14**.

Los tiempos de retención relativos y las áreas relativas se calcularon mediante las siguientes expresiones:

$$t_{RR} = \frac{t_{R(i)}}{t_{R(ISTD)}}$$

$$\text{Área relativa} = \frac{A_{(i)}}{A_{(ISTD)}}$$

Donde:

$t_{R(i)}$ = tiempo de retención del pico de interés, min;

$t_{R(ISTD)}$ = tiempo de retención del estándar interno (propiconazol), min;

$A_{(i)}$ = área del pico de interés, cuentas;

$A_{(ISTD)}$ = área del pico del estándar interno (propiconazol), cuentas.

Los cálculos de los factores de respuesta (R_f) y factores de respuesta relativos (RR_f) se realizaron teniendo en cuenta las concentraciones de los patrones de calibración y las áreas reportadas en el análisis por HRGC/ μ -ECD, utilizando las siguientes ecuaciones:

$$R_f = \frac{A_{(i)}}{C_{(i)}}$$

$$RR_f = \frac{C_{(ISTD)} \times A_{(i)}}{A_{(ISTD)} \times C_{(i)}}$$

Donde:

$A_{(i)}$ = área del pico del N-metilcarbamato derivado, cuentas;

$C_{(i)}$ = concentración del N-metilcarbamato derivado, $\mu\text{g/mL}$;

$A_{(ISTD)}$ = área del pico del estándar interno (propiconazol), cuentas;

$C_{(ISTD)}$ = concentración del estándar interno (propiconazol), $\mu\text{g/mL}$;

El rango dinámico lineal del equipo definido como el rango de concentraciones en las cuales el equipo genera una respuesta lineal para un determinado analito, se observó al graficar para cada N-metilcarbamato derivado, el factor de respuesta relativo vs la concentración relativa.

3.8.3 Determinación de la reproducibilidad de los t_R , t_{RR} , las áreas y las áreas relativas

El estudio de la reproducibilidad de los t_R , t_{RR} , áreas y áreas relativas de los N-metilcarbamatos derivados se llevó a cabo utilizando los datos obtenidos al analizar los patrones de calibración, los cuales se inyectaron por triplicado en el equipo HRGC/ μ -ECD, bajo las condiciones descritas en el **Numeral 3.2.3**.

El tratamiento de los datos se realizó utilizando los valores promedio ($\bar{x}$), la desviación estándar (σ) y los coeficientes de variación (CV, %).

3.9 EXTRACCIÓN DE N-METILCARBAMATOS DE MUESTRAS DE AGUA SUPERFICIAL MEDIANTE CLLE

Las muestras para esta fase del proyecto fueron tomadas de las quebradas Menzuly y La Grande en los municipios de Floridablanca y Piedecuesta, respectivamente. Las muestras fueron almacenadas a 4°C y su pH se ajustó a 4 con una solución de ácido sulfúrico 0.5 M. La técnica de extracción utilizada fue líquido-líquido continuo, según el procedimiento

descrito en el método EPA 3505 [8]; posteriormente, se realizó la derivación con TFAA y se analizó el extracto por HRGC/ μ -ECD.

4. ANÁLISIS DE RESULTADOS

4.1 SELECCIÓN DEL SISTEMA DE DETECCIÓN PARA EL ANÁLISIS DE N-METILCARBAMATOS.

La determinación de los N-metil carbamatos se realizó por cromatografía de gases acoplada a los siguientes sistemas de detección: FID, μ -ECD y MSD. El detector de ionización en llama se utilizó en la primera etapa del trabajo, que abarcó el estudio de las condiciones adecuadas de extracción de los N-metilcarbamatos por BLLE y SPE, y en la etapa de evaluación del proceso de derivación. En la implementación de la técnica de análisis de N-metilcarbamatos a partir de la formación de los derivados trifluoroacetilo se escogió el μ -ECD debido a su sensibilidad y la respuesta específica para compuestos que poseen grupos electronegativos. Para la identificación de los N-metilcarbamatos y sus derivados acilo y trifluoroacetilo se usó el sistema HRGC/MS.

4.2 OBTENCIÓN DEL PATRÓN COMERCIAL DE PROPOXUR.

Para establecer las condiciones adecuadas de extracción y derivación de los N-metilcarbamatos se trabajó con un patrón comercial de propoxur; posteriormente, estas condiciones se aplicaron al patrón certificado de N-metilcarbamatos. El patrón comercial se aisló y purificó a partir del plaguicida Baygón de Bayer (propoxur, 0.5%), se obtuvo 2.8 g de propoxur con apariencia de cristales transparentes y punto de fusión 85 - 87°C. La caracterización de este compuesto se realizó a través de sus espectros de masas y de resonancia magnética nuclear protónica.

El cromatograma obtenido para propoxur mostró 2 picos, los cuales fueron identificados al analizar sus espectros de masas como propoxur y su producto de degradación o-isopropoxyfenol (**Figura 12**).

El espectro de masas presentó el ion molecular correspondiente a la fórmula mínima condensada del propoxur M^+ , m/z 209. La señal del ión molecular fue de muy baja intensidad menor del 1%. El pico de base del espectro en m/z 110, se generó por una pérdida sucesiva de metil isocianato e isopropilo a través de la migración de hidrogeno 1, 4 (**Figuras 12 y 13**). Para o-isopropoxyfenol, el espectro de masas mostró el ión molecular M^+ en m/z 152; el compuesto siguió la misma ruta de fragmentación que el propoxur (**Figuras 12 y 13**).

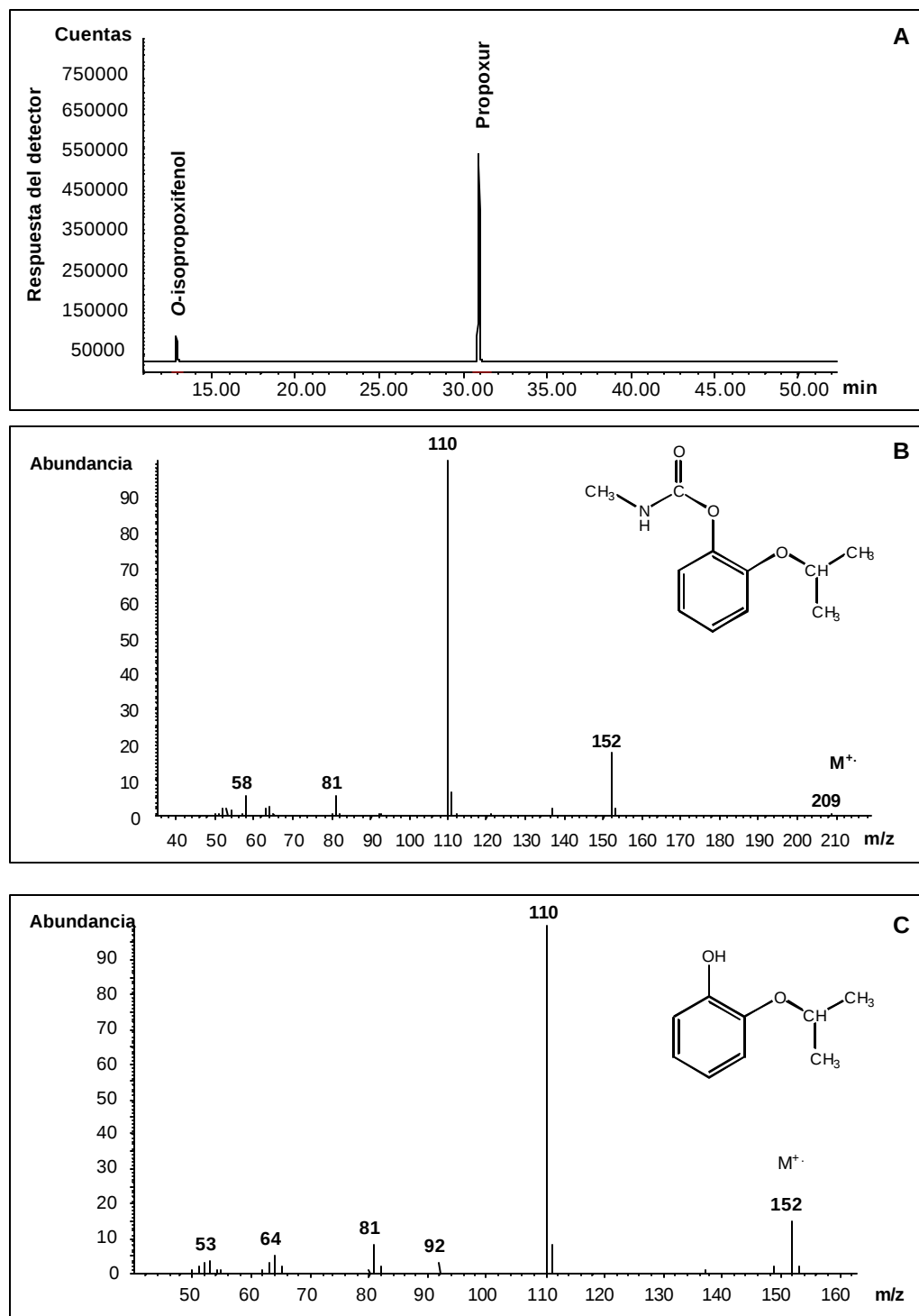


Figura 12. A. Perfil cromatográfico típico obtenido por HRGC/MS para propoxur comercial, extraído del producto Baygón de Bayer. B. Espectro de masas de propoxur y C. Espectro de masas de o-isopropoxyfenol.

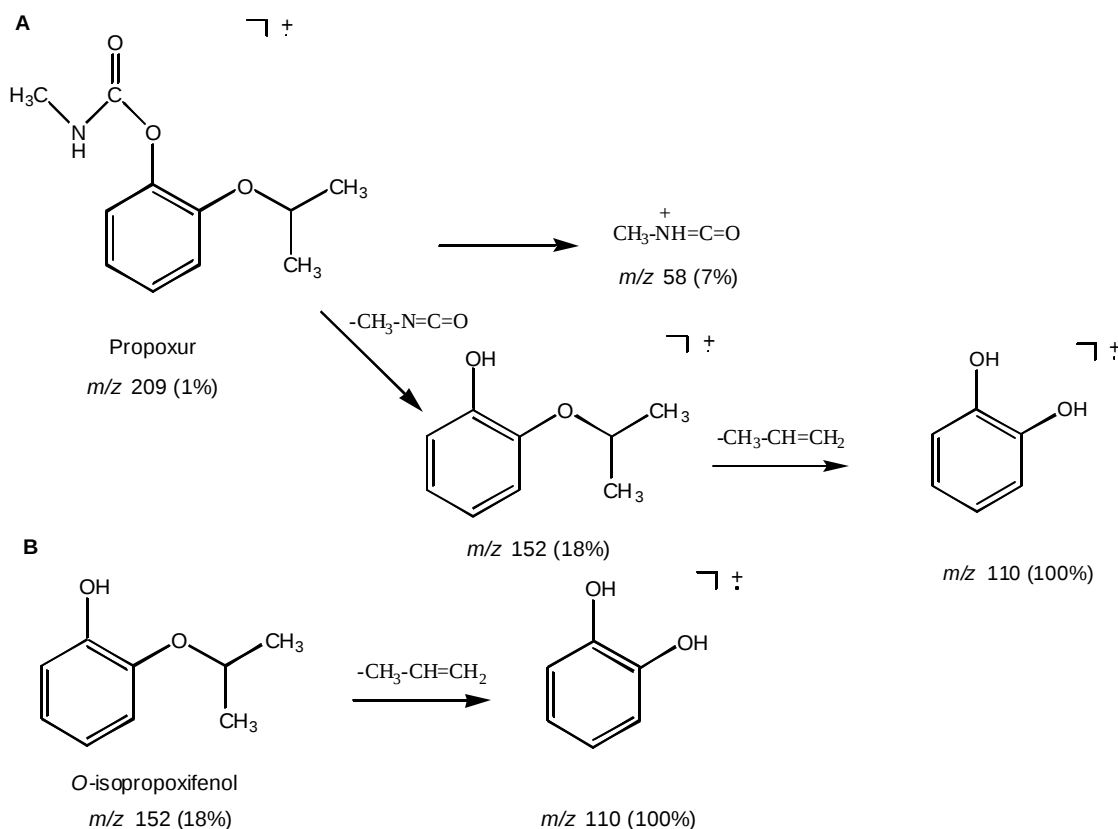
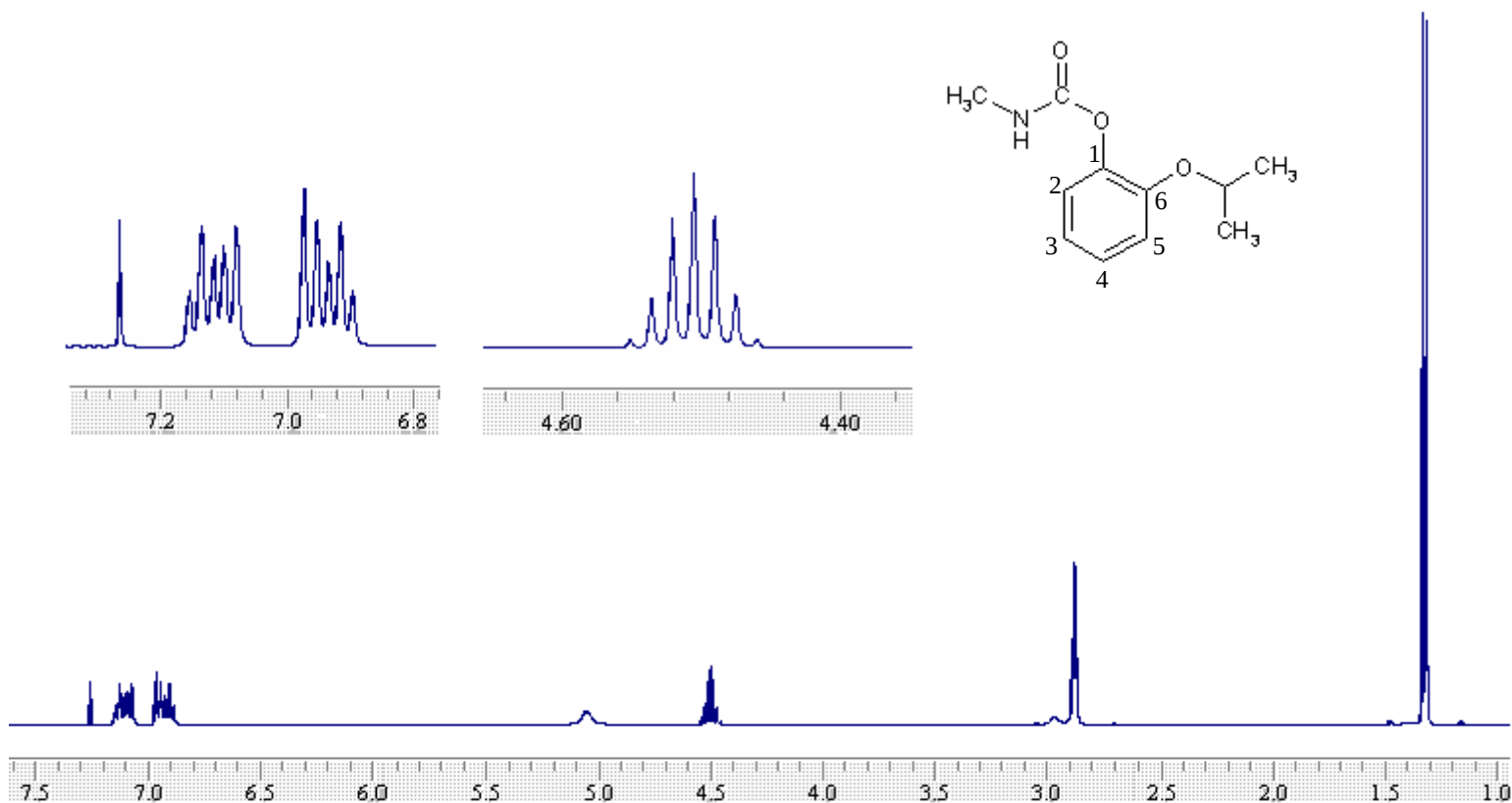


Figura 13. Formación de los principales fragmentos en el espectro de masas de: A. propoxur y B. o-isopropoxifenol.

Para corroborar que el producto de partida de esta investigación estaba libre de cualquier producto de degradación y que correspondía a la estructura del propoxur se realizó también un análisis por resonancia magnética nuclear.

En el espectro de resonancia magnética nuclear protónica se observó un doblete a 1.33 ppm correspondiente a los dos grupos metilo unidos al CH, en 2.88 ppm se observó el doblete del metilo del grupo carbamato, en 4.51 se encontró el septete del CH y en 5.06 un singulete ancho correspondiente al grupo NH. Entre 6.91 y 7.13 ppm se encontraron las señales aromáticas. Los anteriores resultados confirmaron la estructura del propoxur; además no se observaron otras señales que indicaran la presencia de productos de degradación, ni contaminantes (**Figura 14**).



^1H RMN (400 MHz) δ **1.33** (6H, d, $J = 6.4$ Hz; $(-\text{CH}_3)_2$), **2.88** (3H, d, $J = 4.8$ Hz; $\text{H}_3\text{C-N}$), **4.51** (1H, sept, $J = 6.1$ Hz; $-\text{CH}$), **5.06** (1H, br. s; N-H), **6.91** (1H, t, $J = 7.8$ Hz; 3- H_{ar}), **6.96** (1H, d, $J = 8.1$ Hz; 5- H_{ar}), **7.09** (1H, dd, $J = 7.9, 1.3$ Hz; 2- H_{ar}), **7.13** (1H, ddd, $J = 8.2, 8.2, 1.3$ Hz; 4- H_{ar}).

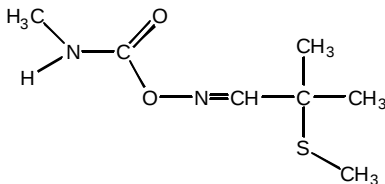
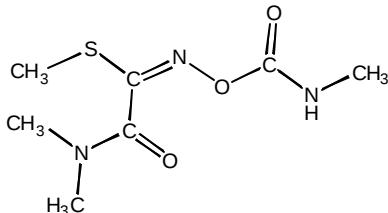
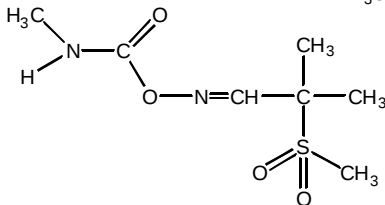
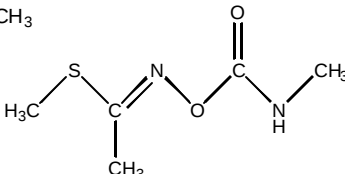
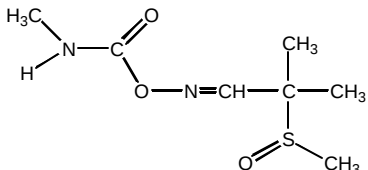
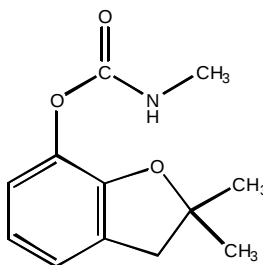
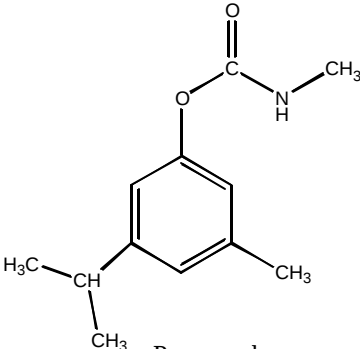
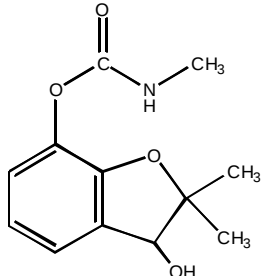
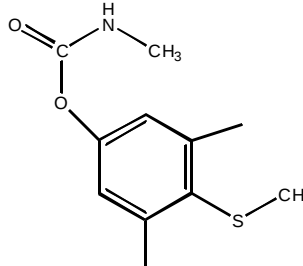
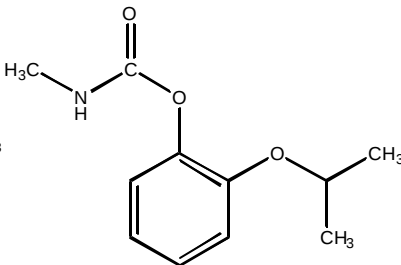
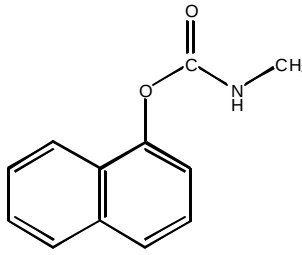
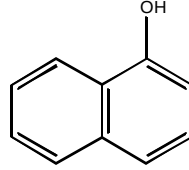
Figura 14. Espectro de resonancia magnética nuclear protónica del propoxur.

4.3 REACCIÓN DE ACILACIÓN DE LOS N-METILCARBAMATOS.

Para evitar la degradación de los N-metilcarbamatos en el puerto de inyección del cromatógrafo se han estudiado diferentes estrategias tales como el uso de columnas cortas (1m), inyección *on-column* en frío, programación de temperatura gradual y derivación química. En el presente trabajo se escogió la derivación química como una herramienta útil para obtener compuestos estables, volátiles y mejorar la respuesta y forma de los picos cromatográficos, evitando la descomposición de los carbamatos en el puerto de inyección.

Los ensayos de derivación se realizaron con los anhídridos acético (AA) y trifluoroacético (TFAA). Los N-metilcarbamatos analizados en este estudio fueron propoxur, carbofurano, carbaril, methiocarb, aldicarb, oxamyl, metomil, promecarb y los productos de degradación, 1-naftol, 3-hidroxicarbofurano, aldicarb sulfona y aldicarb sulfóxido (**Tabla 15**).

Tabla 15. Estructura de los N-metilcarbamatos estudiados en el proceso de derivación.

Carbamatos oxima		
		
Aldicarb		Oxamyl
		
Aldicarb sulfona (Prod. deg. aldicarb)	Metomil	
		
	Aldicarb sulfóxido (Prod. deg. aldicarb)	
Fenil N-metilcarbamatos		
		
Carbofurano	Promecarb	3-Hidroxicarbofurano (Prod. deg. Carbofurano)
		
Methiocarb	Propoxur	Carbaril
	1-Naftol (Prod. deg. carbaryl)	

4.3.1 Derivación con anhídrido acético

El anhídrido acético es usado como agente de acilación de fenoles y aminas, además, existen reportes de su utilización para derivar pesticidas ureados y algunos N-metilcarbamatos [50, 51, 54], uno de los trabajos más destacados es el de H. J. Stan y colaboradores [54], el cual se tomó como referencia en el presente estudio. Los parámetros evaluados en este trabajo fueron: tiempo de reacción, cantidad de agente derivante y catalizador (triethylamina). Los parámetros que se dejaron constantes a lo largo de los experimentos fueron: la temperatura (120°C) y el solvente (tolueno). En el **Apartado 3.4** de la sección experimental se recopiló la metodología utilizada en los ensayos de derivación con AA, cada una de las pruebas se realizó por duplicado.

La derivación se desarrolló inicialmente con el patrón de propoxur y al establecer las condiciones más adecuadas de la reacción, éstas se aplicaron a la mezcla patrón de N-metilcarbamatos. La reacción de N-acilación de los N-metilcarbamatos se llevó a cabo a través de la formación de un enlace tipo éster entre el fenol del pesticida y el anhídrido acético, donde se sustituyó el protón del fenol por el grupo acetilo del anhídrido [64, 65]. La razón de la derivación de los fenoles y no de los carbamatos de partida, radica en que éstos podrían haberse degradado por las altas temperaturas del proceso de derivación (120°C), generando los respectivos fenoles, que sí fueron derivados (**Figura 15**).

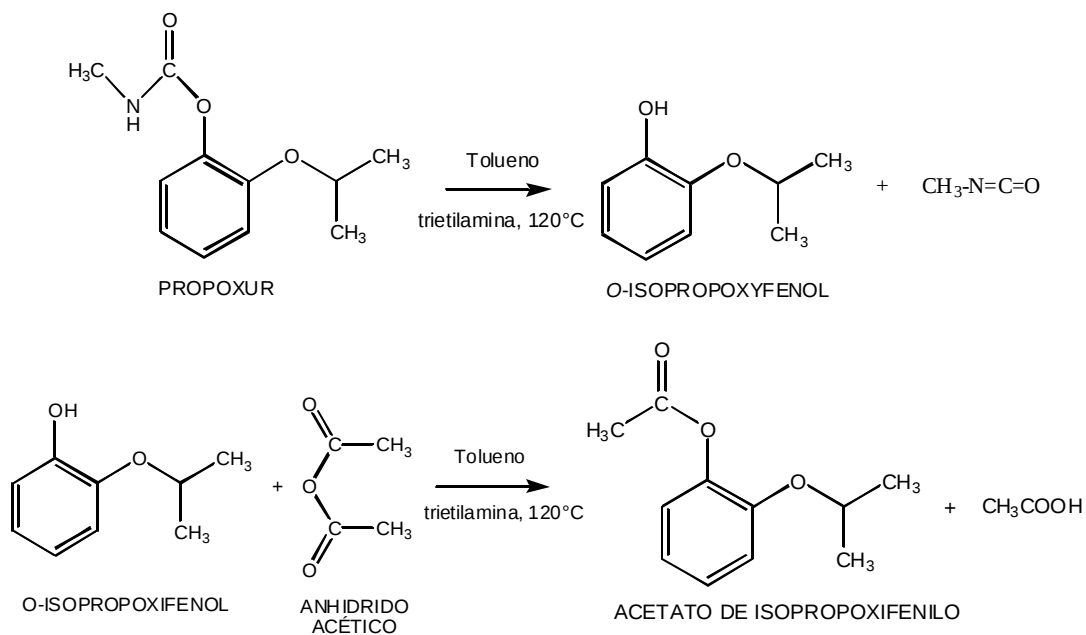


Figura 15. Esquema de la reacción de derivación de propoxur con anhídrido acético.

La identificación de la estructura del propoxur acetilado se llevó a cabo con base en sus espectros de masas y RMN ^1H . El espectro de masas mostró el ión molecular correspondiente al acetato de isopropoxifenol M^+ , en m/z 194, esta señal fue de muy baja intensidad (4%). Los iones, m/z 152 y m/z 110 se originaron por migración 1,4 de hidrógeno y el ión m/z 43 debido a una ruptura alfa con respecto al grupo ceto (**Figura 16**).

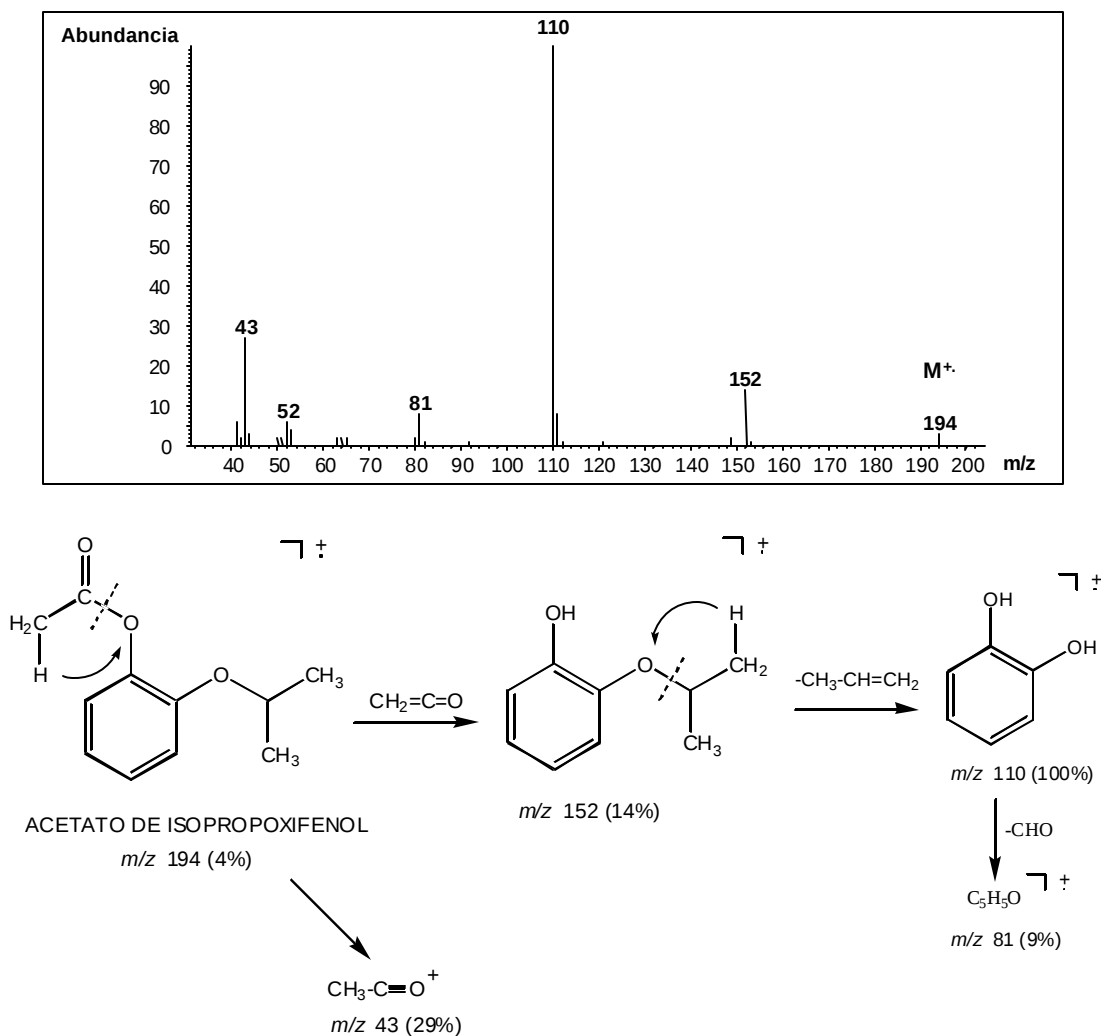
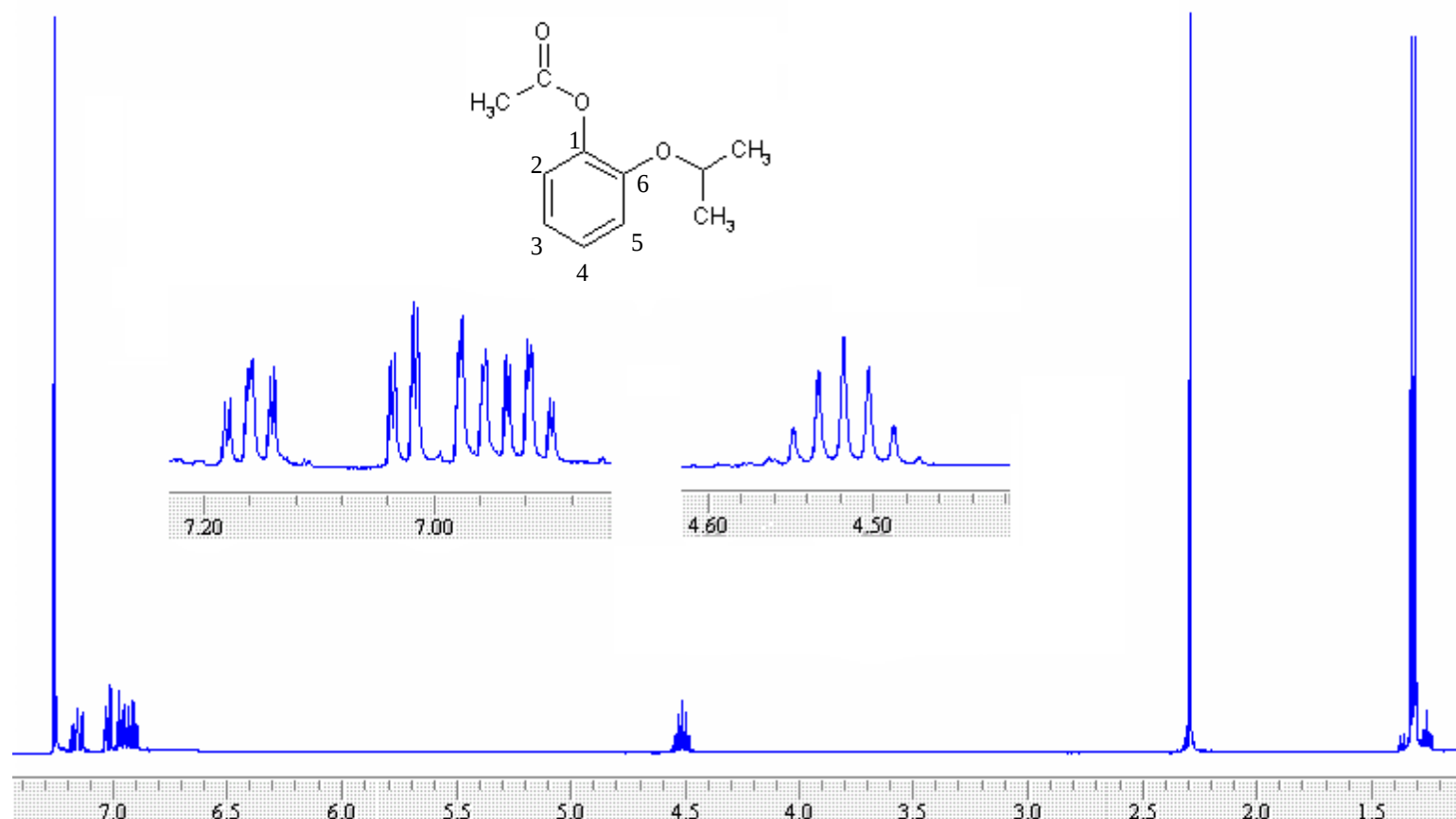


Figura 16. Espectro de masas del acetato de isopropoxifenilo y su ruta de fragmentación.

En el espectro de RMN se observó un doblete en 1.32 ppm generado por los dos grupos metilo unidos al CH, en 2.30 ppm se observó un singulete correspondiente al metilo unido al grupo éster y en 4.52 ppm se encuentra el septete de CH. Entre 6.92 y 7.16 ppm se encuentran las señales aromáticas (**Figura 17**).



^1H RMN (400MHz) δ **1.32** (6H, d, $J = 6.1$ Hz; $(-\text{CH}_3)_2$), **2.30** (3H, s; $\text{H}_3\text{C}-\text{CO}-$), **4.52** (1H, sept, $J = 6.1$ Hz; $-\text{CH}$), **6.92** (1H, td, $J = 7.7$, 1.4 Hz, 3- H_{ar}), **6.97** (1H, dd, $J = 8.2$, 1.4 Hz; 5- H_{ar}), **7.03** (1H, dd, $J = 7.9$, 1.7 Hz; 2- H_{ar}), **7.16** (1H, ddd, $J = 7.8$, 7.4, 1.7 Hz; 4- H_{ar}).

Figura 17. Espectro de resonancia magnética nuclear protónica del acetato de isopropoxifenilo.

El porcentaje de derivación de propoxur con anhídrido acético fue del 100 % y se obtuvo a una temperatura de 120°C, 3 horas de reacción y una relación molar pesticida/anhídrido acético/trietilamina (1:100:10) (Véase **Figuras 18 y 19**). Cuando se aplicaron estas condiciones a la derivación de la mezcla de N-metilcarbamatos sólo se logró la derivación de los fenoles de los fenil N-metilcarbamatos, mientras que los carbamatos oxima no fueron derivados (**Figura 20**). La identificación de los derivados se realizó con base en sus espectros de masas (**Anexo 1**).

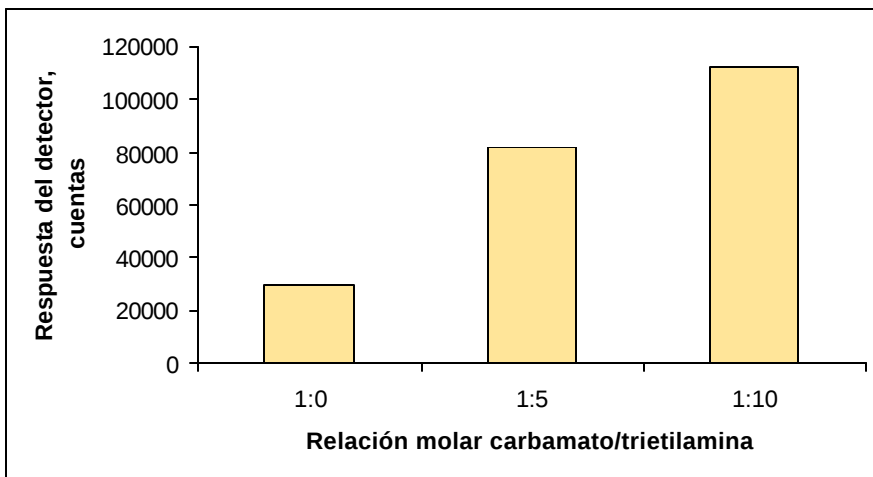


Figura 18. Estudio de la relación molar adecuada pesticida/catalizador para la derivación de propoxur. Temperatura 120°C, tiempo 3 horas y relación molar carbamato/AA 1:100.

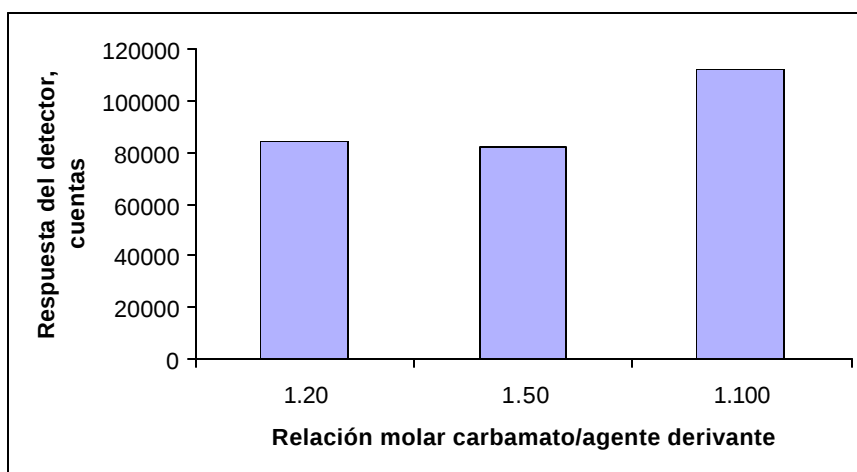


Figura 19. Estudio de la relación molar adecuada pesticida/anhídrido acético para la derivación de propoxur. Temperatura 120°C, tiempo 3 horas y relación molar carbamato/catalizador 1:10.

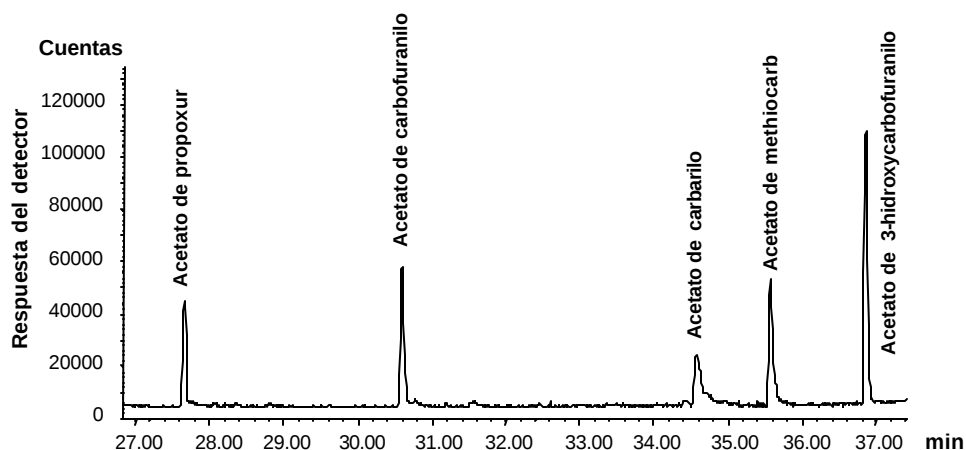


Figura 20. Cromatograma de los N-metil carbamatos derivados con anhídrido acético. HRGC-MS. Inyección *split* (1:30). Modo *full scan*, (EI, 70 eV).

A pesar de ser la derivación de N-metilcarbamatos con anhídrido acético un proceso económico y que genera residuos poco tóxicos, no se tuvo en cuenta para implementarlo como una técnica de análisis de estos plaguicidas, debido a que el porcentaje de derivación, que se logró en un montaje macro de reflujo, no fue posible de reproducir en un tubo de ensayo de 20 mL, en el cual sólo se alcanzó una derivación del 65%; además, los extractos provenientes de esta reacción contenían bastantes contaminantes, que posiblemente se desprendieron del interior de las tapas de los tubos de ensayo.

4.3.2 Derivación con anhídrido trifluoroacético

Los anhídridos trifluoroacético, TFAA, y heptafluorobutírico, HFBA, son usados para derivar fenoles, aminas, aminas fenólicas y alcoholes, los compuestos obtenidos son volátiles, de menor polaridad y permiten el uso de detectores específicos como μ -ECD [50, 51]. En el presente trabajo se utilizó TFAA para derivar los N-metilcarbamatos tomando como referencia la investigación de T. Okumura y colaboradores [55].

Las variables estudiadas en el proceso de derivación fueron: tipo de catalizador, cantidades de catalizador y agente derivante, y temperatura de reacción; se dejaron constantes el tiempo (2 horas) y el solvente (acetato de etilo). Cada una de las pruebas se realizó por duplicado, según el procedimiento descrito en el **Número 3.4** de la Parte Experimental. Los N-metilcarbamatos, derivados bajo las condiciones estudiadas fueron: propoxur,

carbofurano, promecarb, methiocarb, carbaril y los productos de su degradación: 1-naftol y 3-hidroxicarbofurano (**Figura 21**), los cuales fueron identificados con base en sus espectros de masas (**Anexo 2**).

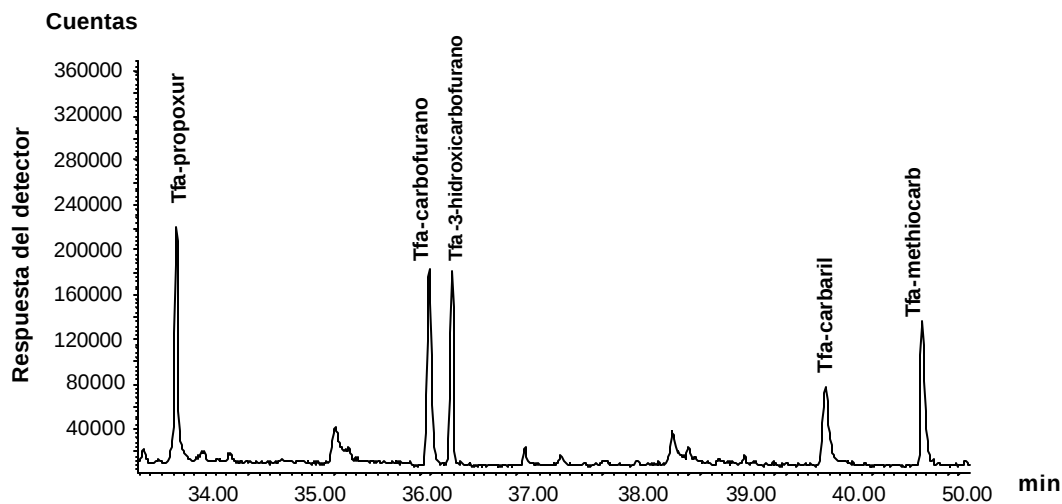


Figura 21. Cromatograma de los N-metilcarbamatos derivados con anhídrido trifluoroacético. HRGC-MS. Inyección *split* (1:30). Modo *full scan*, (EI, 70 eV).

Para escoger las mejores condiciones de derivación de los N-metilcarbamatos se evaluaron los parámetros sobre un patrón de propoxur; en primera instancia, la relación molar carbamato/agente derivante, luego, la relación molar carbamato/catalizador (piridina) y, por último, la temperatura de reacción. De acuerdo con los resultados obtenidos se escogió como mejor relación molar carbamato/catalizador/agente derivante la relación 1:1000:5000 y la temperatura de reacción 50°C, ya que a temperaturas más altas el agente derivante se volatiliza y escapa del sistema, disminuyendo el porcentaje de derivación (Ver **Figuras 22-24**). La reacción con TFAA se llevó a cabo en tubos cónicos de poli(propileno) de 2 mL, debido a que un menor volumen del recipiente favoreció la interacción del agente derivante con los analitos; además, las mezclas de reacción obtenidas presentaron menor contaminación en comparación con las realizadas en tubos de ensayo.

El porcentaje más alto de derivación logrado para propoxur fue de 95% y se determinó cuantificando la cantidad de propoxur sin derivar presente en la mezcla de reacción. Este porcentaje se tomó como referencia del proceso de derivación de los demás N-metilcarbamatos estudiados.

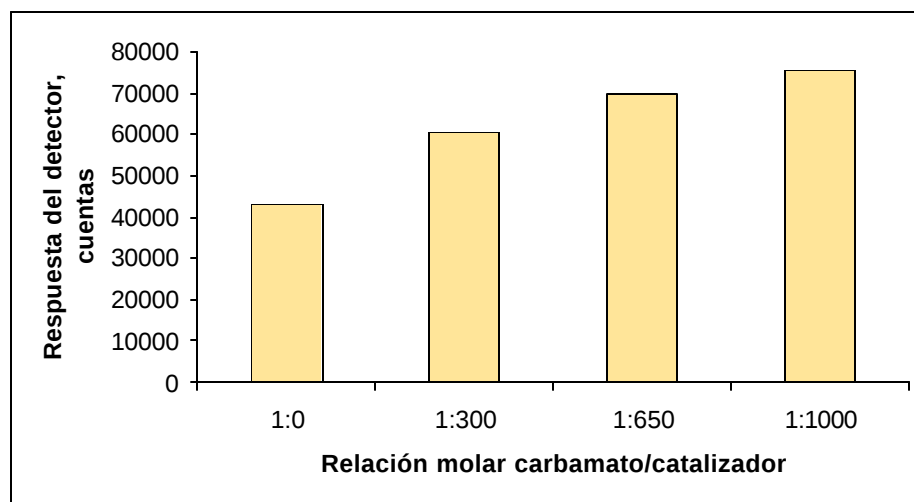


Figura 22. Estudio de la relación molar adecuada carbamato/catalizador para la derivación de propoxur. Temperatura 50°C, tiempo 2 horas y relación molar carbamato/TFAA 1:1000.

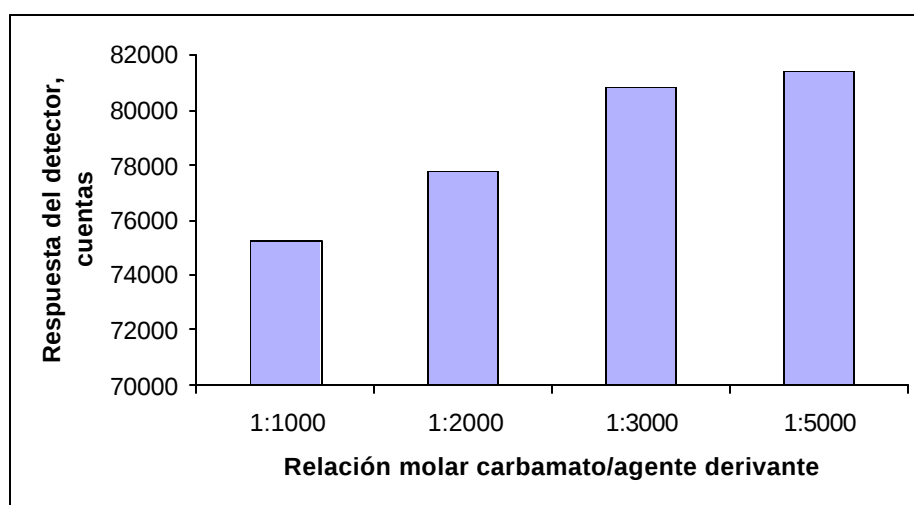


Figura 23. Estudio de la relación molar adecuada carbamato/anhídrido trifluoroacético para la derivación de propoxur. Temperatura 50°C, tiempo 2 horas y relación molar carbamato/catalizador 1:1000.

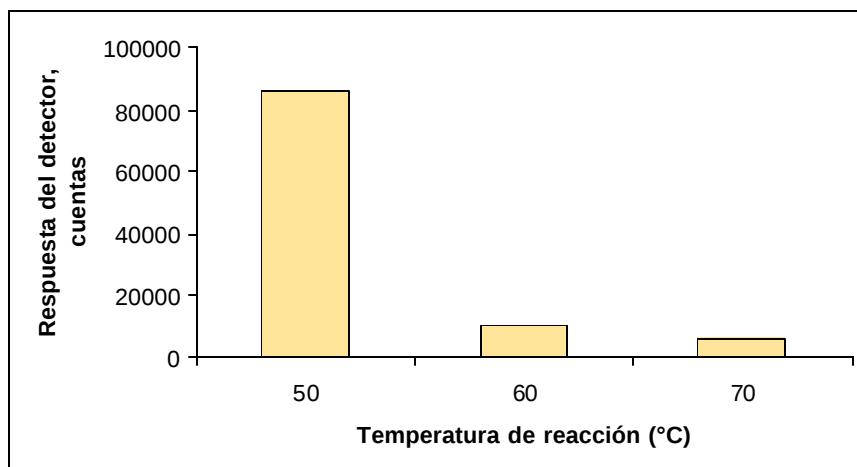


Figura 24. Estudio del efecto de la temperatura para la derivación de propoxur. Temperatura 50°C, tiempo 2 horas y relación molar carbamato/TFAA/catalizador 1:5000:1000.

Finalmente, las condiciones establecidas para la derivación de propoxur con TFAA, que luego se aplicaron para los N-metilcarbamatos, fueron:

Relación molar carbamato/catalizador/agente derivante: 1:1000:5000

Catalizador: piridina

Solvente de reacción: 200 µL de acetato de etilo

Tiempo de reacción: 2 horas

Temperatura: 50°C

Recipiente de reacción: tubo cónico de poli(propileno) de 2 mL

Lavado: adición de solución de bicarbonato de sodio (2%, p/v) hasta pH 8 y extracción de los derivados con 5.5 mL de una mezcla de hexano/éter (95:5).

La derivación con TFAA es una reacción de sustitución nucleofílica, donde el N-metilcarbamato actúa como el nucleófilo, por el par de electrones del nitrógeno del grupo carbamato. El nitrógeno se adiciona al grupo carbonilo del anhídrido, eliminando posteriormente el grupo carboxilato, como se muestra en la **Figura 25** para el propoxur [64, 65]. Los carbamatos no son buenos nucleófilos, ya que el par de electrones del nitrógeno se deslocaliza en el grupo carbonilo y su disponibilidad está dada también por la influencia de los grupos sustituyentes. Bajo estas condiciones los grupos fenilo presentes en los fenil N-metilcarbamatos debido a efectos inductivos y de resonancia permiten una mayor disponibilidad del par de electrones favoreciendo la reacción de derivación, por el contrario,

los enlaces dobles y los átomos electronegativos (S, N y O) en los carbamatos oxima reducen su capacidad nucleofílica, evitando que se lleve a cabo la acilación [64].

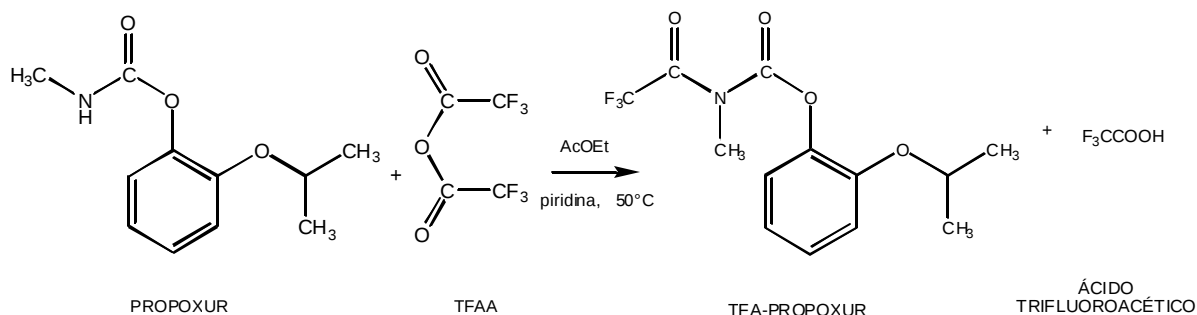


Figura 25. Esquema de la reacción de derivación de propoxur con anhídrido trifluoroacético.

4.4 EVALUACIÓN DE LA EXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO POR LOTES PARA LOS N-METILCARBAMATOS.

Las extracciones líquido-líquido por lotes se realizaron de acuerdo con el procedimiento descrito en el **Numeral 3.5** de la Parte Experimental. Para establecer las condiciones adecuadas de extracción de los N-metilcarbamatos, inicialmente se trabajó con el patrón de propoxur, para lo cual se enriquecieron muestras de agua destilada de 10 mL con 20 µg/mL del mismo y, luego, se ajustó el pH a 4, para evitar la degradación del plaguicida.

Las muestras obtenidas por esta metodología, sin previa derivación, se analizaron directamente por HRGC-FID, los cromatogramas de las muestras presentaron 2 picos: el de propoxur y de su producto de degradación. Por consiguiente, para la interpretación de los resultados se sumó el área de estos dos picos y se reportó como el área generada por la cantidad de propoxur extraída.

4.4.1 Estudio del efecto de la polaridad del solvente sobre la eficiencia de extracción.

Como se observa en la **Figura 26**, el diclorometano presentó una mayor eficiencia de extracción en BLLE en comparación con los otros solventes, debido a las interacciones dipolo-dipolo que se presentan entre éste y el N-metilcarbamato. Otro solvente con alta eficiencia en la recuperación de propoxur fue acetato de etilo, ya que su elevada polaridad y

habilidad para aceptar protones favorecen la extracción de los N-metilcarbamatos, que son polares [36].

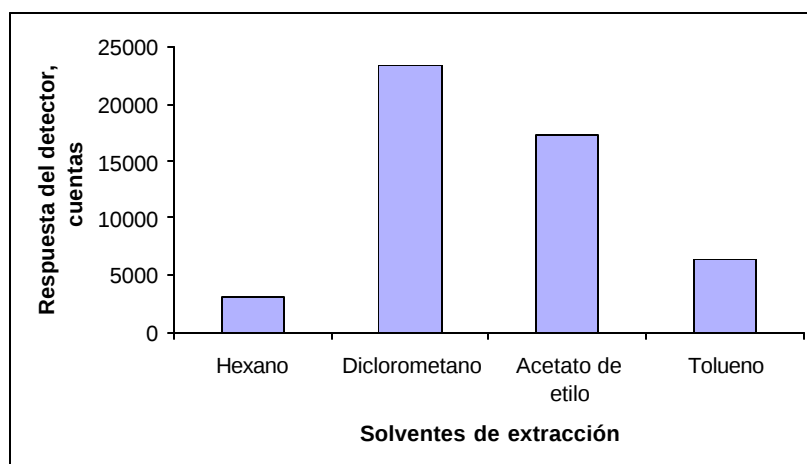


Figura 26. Efecto de la polaridad del solvente en la BLLE sobre la eficiencia de extracción de propoxur.

Para aumentar la eficiencia de extracción de propoxur se prepararon mezclas de diclorometano y acetato de etilo en diferentes relaciones (**Figura 27**), lográndose una mejor eficiencia en la extracción con la mezcla diclorometano-acetato de etilo (1:3), en comparación con las otras mezclas y solventes puros, debido a que se presentan efectos de sinergismo o suma de interacciones de cada solvente con los N-metilcarbamatos, facilitando la solvatación y extracción de estos compuestos.

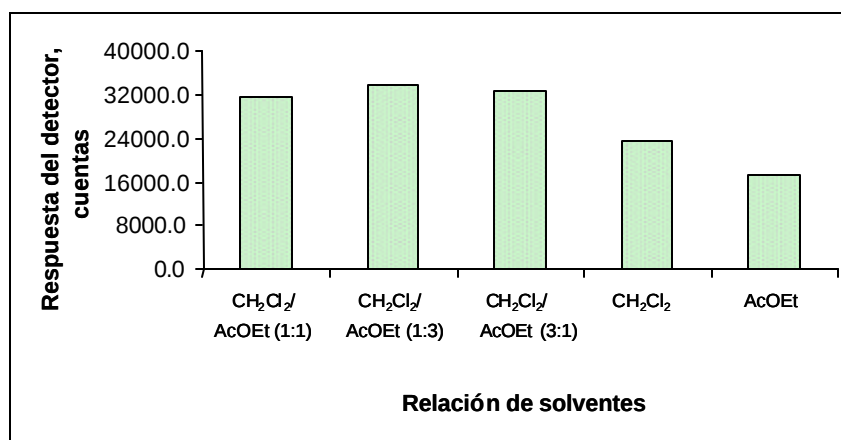


Figura 27. Efecto de diferentes mezclas de diclorometano-acetato de etilo en la extracción de propoxur por BLLE.

4.4.2 Estudio del efecto de la adición de sal sobre la eficiencia de la extracción.

La adición de sales inorgánicas como NaCl antes de la extracción (efecto *salting-out*) evita la formación de emulsiones y aumenta la fuerza iónica del agua, lo cual origina que los compuestos orgánicos presentes pierdan afinidad por ella y se disuelvan más fácilmente en la fase orgánica favoreciendo su extracción [36]. En este trabajo, se evaluaron 4 concentraciones de sal, a saber: 0, 1, 5 y 15% (p/v). En la **Figura 28** se observa la variación en el proceso de extracción de propoxur para cada una de las concentraciones de sal evaluadas.

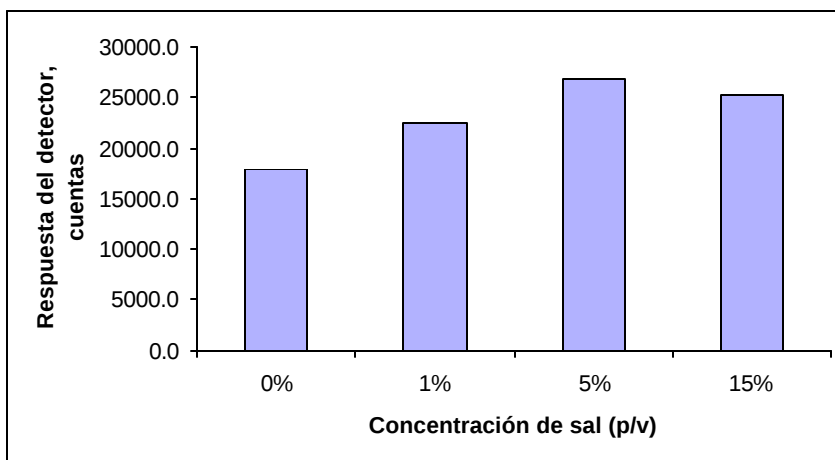


Figura 28. Efecto de la adición de sal sobre la eficiencia de extracción de propoxur por BLLE.

Como se aprecia en la **Figura 28**, la adición de 5% de sal y la extracción con una mezcla de diclorometano/acetato de etilo (1:3), fueron las condiciones más favorables para la recuperación de propoxur por BLLE. Estas condiciones posteriormente se aplicaron a un patrón de N-metilcarbamatos para la evaluación de la eficiencia y reproducibilidad de la técnica.

4.5 EVALUACIÓN DE LA EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA DE LOS N-METILCARBAMATOS.

El procedimiento seguido para SPE de las muestras de agua enriquecidas con propoxur se describió en el **Número 3.6** de la Parte Experimental. Se trabajó con muestras de agua

destilada de 10 mL, enriquecidas con propoxur (20 µg/mL). Las muestras fueron procesadas y analizadas por HRGC/FID, los resultados se reportaron de igual forma que para BLLE.

4.5.1 Estudio del efecto de la polaridad del solvente sobre la eficiencia de la extracción SPE.

En este estudio se evaluaron 2 mezclas de solventes: diclorometano/acetato de etilo (1:3), escogida como solvente de extracción para BLLE, y diclorometano/metanol (4:1), recomendada en algunos estudios [62, 63]. Como se observa en la **Figura 29** la mezcla de solventes diclorometano-acetato de etilo presentó una eficiencia más alta en la extracción de propoxur debido al mayor número de interacciones entre éste y los solventes, ya que se presentan interacciones tipo dipolo-dipolo con el diclorometano y puentes de hidrógeno con el acetato de etilo.

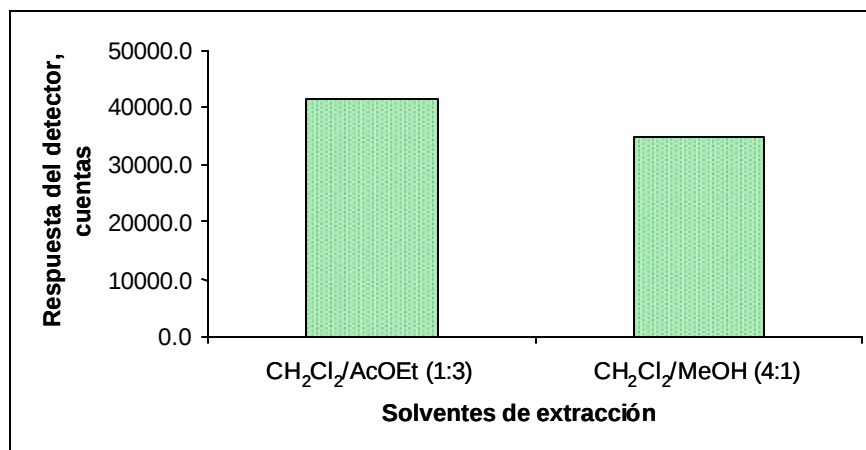


Figura 29. Estudio del efecto de la polaridad de una mezcla de solventes sobre la eficiencia de la extracción de propoxur por SPE.

En esta etapa también se evaluó el volumen de solvente usado para la elución de los analitos del cartucho de SPE. Se probaron volúmenes de 2, 4 y 6 mL, obteniéndose una alta recuperación con 4 y 6 mL (**Figura 30**). La diferencia en la respuesta del detector para estas 2 condiciones no fue significativa y se escogió como valor de elución 6 mL de solvente para favorecer la extracción exhaustiva de los analitos.

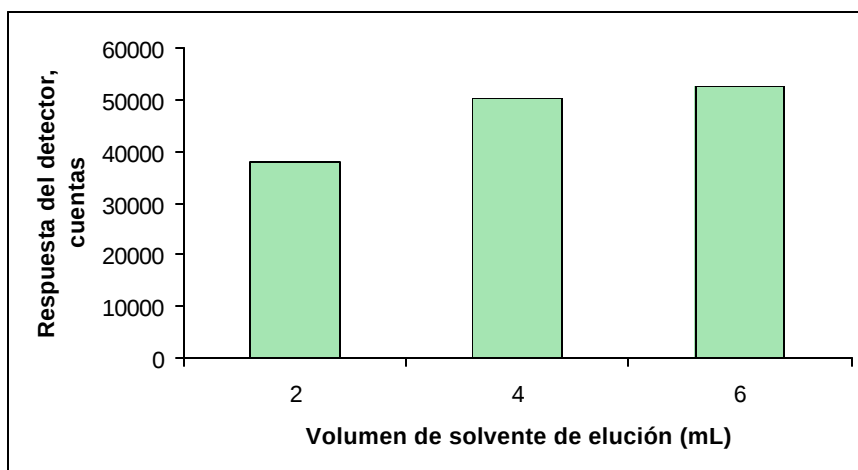


Figura 30. Estudio del efecto del volumen de solvente de elución sobre la eficiencia de la extracción de propoxur por SPE.

4.5.2 Estudio del efecto de la adición de sal sobre la eficiencia de la extracción SPE.

Las concentraciones de sal evaluadas en este estudio fueron 0, 1, 5 y 10% (p/v); la **Figura 31** muestra como a medida que aumenta la cantidad de sal se favorece la extracción, aunque concentraciones muy altas como 10% pueden obstruir los poros del sorbente y limitar la elución de los analitos.

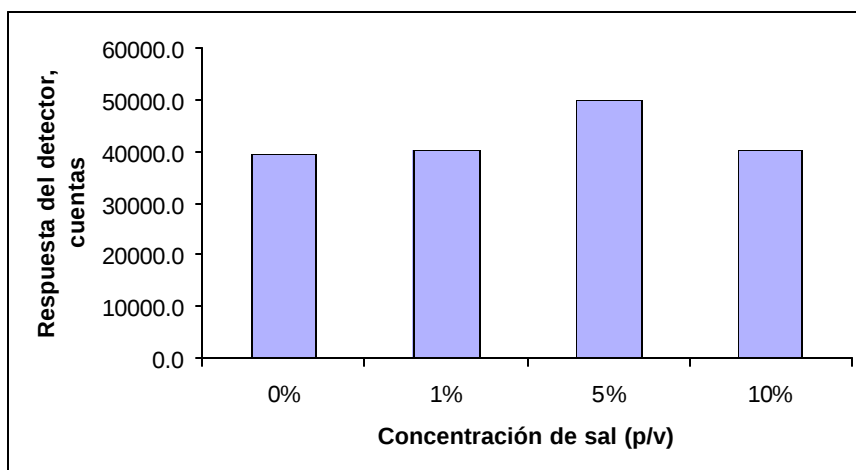


Figura 31. Estudio del efecto de la adición de sal sobre la eficiencia de la extracción de propoxur por SPE.

Con base en los resultados anteriores se estableció, que se obtiene una recuperación más alta de propoxur utilizando 6 mL de una mezcla diclorometano-acetato de etilo (1:3) y adición de 5% de sal; estas condiciones se aplicaron posteriormente al patrón de N-metilcarbamatos para evaluar la eficiencia y la reproducibilidad de la técnica de extracción.

4.6 COMPARACIÓN DE LAS TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN CLLE, BLLE Y SPE EN EL AISLAMIENTO DE LOS N-METILCARBAMATOS DE MUESTRAS DE AGUA.

Una vez establecidas las mejores condiciones de extracción de los N-metilcarbamatos por BLLE y SPE se comparó su eficiencia y reproducibilidad con la técnica de extracción líquido-líquido continuo (método EPA 3520). Para cada una de las técnicas se trabajaron con 3 muestras de agua enriquecidas con el patrón de N-metilcarbamatos en una concentración de 1 µg/mL de cada uno. Una vez realizada la extracción se derivó cada muestra con TFAA bajo las condiciones establecidas en el **Numeral 4.3.2** y se analizaron por HRGC/µ-ECD. Los parámetros utilizados para cada técnica de extracción se encuentran indicados en la **Tabla 16**.

Tabla 16. Condiciones establecidas para la extracción de los N-metilcarbamatos de muestras de agua por BLLE, SPE y CLLE.

PARÁMETROS	TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN		
	BLLE	SPE	CLLE (Método EPA 3520)
Cantidad de muestra	10 mL	10 mL	1000 mL
Solvente de extracción	CH ₂ Cl ₂ / AcOEt (1:3)	CH ₂ Cl ₂ / AcOEt (1:3)	CH ₂ Cl ₂
Adición de sal (NaCl)	5%	5%	0%
pH de la muestra	4	4	7

La eficiencia en la extracción para cada una de las técnicas se determinó calculando los porcentajes de recuperación para cada uno de los N-metilcarbamatos. Las **Tablas 17, 18 y 19** muestran los porcentajes de recuperación obtenidos, al igual que el estudio de la reproducibilidad para cada una de las técnicas de extracción.

Tabla 17. Porcentajes de recuperación obtenidos por BLLE para los N-metilcarbamatos en muestras de agua.

Derivado	Recuperación, %*	s	CV, %
TFA-propoxur	94	1.9	2.1
TFA-promecarb	94	3.2	3.4
TFA-carbofurano	97	1.1	1.2
TFA-3-hidroxicarbofurano	62	6.1	9.9
TFA-carbaril	76	8.2	10.9
TFA-methiocarb	85	7.6	9.0

* Promedio obtenido para n=3

Tabla 18. Porcentajes de recuperación obtenidos por SPE para los N-metilcarbamatos en muestras de agua.

Derivado	Recuperación, %*	s	CV, %
TFA-propoxur	65	6.0	9.3
TFA-promecarb	100	3.7	3.7
TFA-carbofurano	70	0.9	1.3
TFA-3-hidroxicarbofurano	40	2.2	5.5
TFA-carbaril	46	3.2	6.9
TFA-methiocarb	59	6.2	10.6

* Promedio obtenido para n=3

Tabla 19. Porcentajes de recuperación obtenidos por CLLE para los N-metilcarbamatos en muestras de agua.

Derivado	Recuperación, %*	s	CV, %
TFA-propoxur	80	3.5	4.4
TFA-promecarb	84	1.5	1.8
TFA-carbofurano	95	2.5	2.6
TFA-3-hidroxicarbofurano	85	6.5	7.6
TFA-carbaril	86	5.7	6.6
TFA-methiocarb	30	2.4	7.9

* Promedio obtenido para n=3

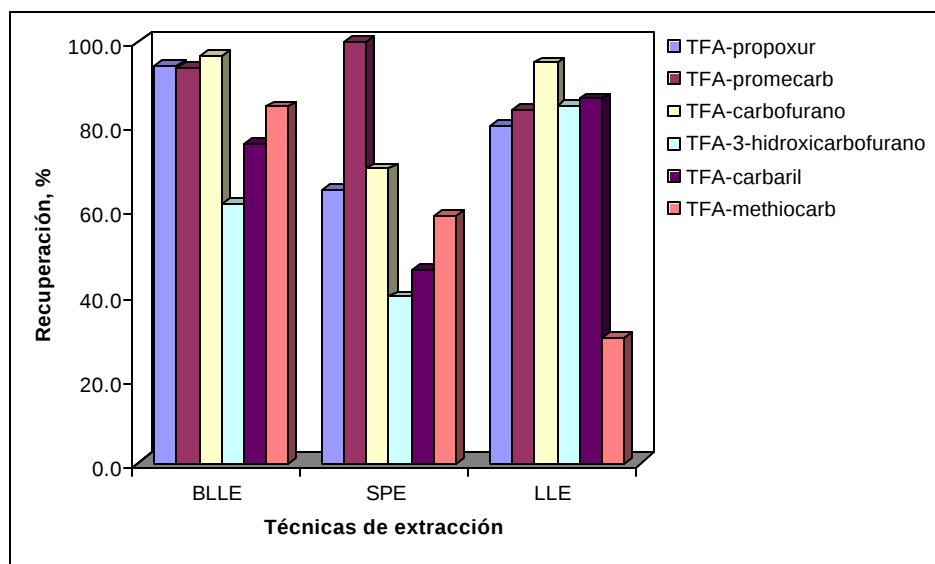


Figura 32. Comparación de la eficiencia de extracción por BLLE, SPE y CLLE de los N-metilcarbamatos.

Como se observa en la **Figura 32**, la técnica de extracción, que mostró una mayor eficiencia en la recuperación de los N-metilcarbamatos fue BLLE, debido a la afinidad de los analitos por la mezcla de solventes utilizada en la extracción y la menor manipulación de la muestra. Sin embargo, la recuperación de 3-hidroxicarbofurano fue baja, ya que este producto de degradación es bastante soluble en agua. Para la extracción líquido-líquido continua la recuperación de N-metilcarbamatos fue alta, excepto para methiocarb, el cual es insoluble en agua y posiblemente se dispersó en las paredes del balón aforado durante la preparación de la muestra enriquecida. Para SPE se observó una buena recuperación de propoxur, promecarb y carbofurano, como consecuencia de su mayor afinidad por el sorbente.

Los coeficientes de variación para cada una de las técnicas de extracción presentaron valores relativamente altos, esto se explica por la gran manipulación que se realiza de las muestras en las etapas de extracción, deshidratación y concentración, antes de ser sometidas estas al proceso de derivación.

4.7 MONTAJE Y ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA HRGC/m-ECD

El análisis directo por cromatografía de gases de los N-metilcarbamatos conlleva varios inconvenientes debido a su inestabilidad térmica y la presencia de grupos polares en su

estructura. Los cromatogramas obtenidos para estos compuestos muestran picos de baja intensidad, asimétricos, anchos y con coleo; como consecuencia de la excesiva interacción de los grupos amida y carbonilo con la fase estacionaria, además, aparecen picos adicionales que corresponden a los fenoles generados por la degradación de las moléculas a las altas temperaturas en el puerto de inyección. (**Figura 33 A**).

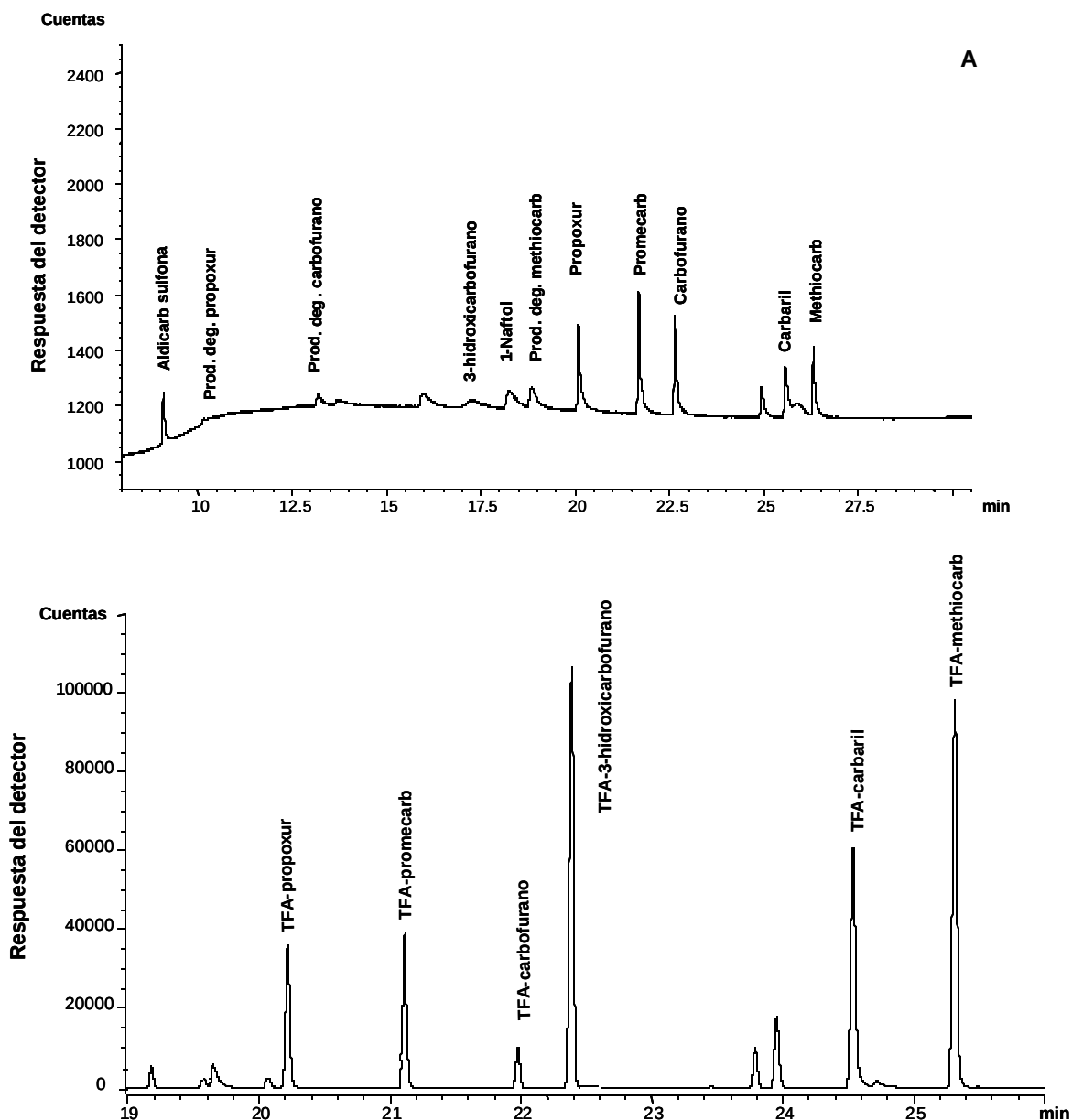


Figura 33. Perfiles cromatográficos de patrones de N-metilcarbamatos: **A.** Sin derivar (20 µg/mL) obtenido por HRGC/FID y **B.** Con derivación (7µg/mL) obtenidos por HRGC/µ-ECD.

Para solucionar los anteriores inconvenientes una de las estrategias más adecuadas es la derivación química con anhídridos, la cual se utilizó en el presente trabajo para el montaje y estandarización de la técnica de análisis de N-metilcarbamatos. El procedimiento, que se siguió fue la derivación con TFAA bajo las condiciones establecidas en el **Numeral 4.3.2.** de la Parte de Análisis de Resultados. Los derivados obtenidos se analizaron por el sistema HRGC/ μ -ECD, los cuales fueron estables en el puerto de inyección y presentaron picos simétricos, sin coleo y la respuesta del detector μ -ECD fue mayor en comparación con la generada por FID, disminuyendo por consiguiente el nivel mínimo de detección para los N-metilcarbamatos (**Figura 33 B**).

La reproducibilidad del proceso de derivación se evaluó al derivar un patrón de N-metilcarbamatos de 1 μ g/mL, por triplicado, bajo las condiciones descritas en el **Numeral 4.3.2**; los resultados obtenidos se presentan en la **Tabla 20**.

Tabla 20. Estudio de la reproducibilidad del proceso de derivación de los N-metilcarbamatos.

Derivado	Área, cuentas	Área promedio, cuentas	s	CV, %
TFA-propoxur	14822.0 13742.3 15270.3	14611	8 E+02	5.4
TFA-promecarb	16073.4 14936.4 13926.0	14978	1 E+03	7.2
TFA-carbofurano	4245.7 4154.8 3878.0	4092	2 E+02	4.7
TFA-3-hidroxicarbofurano	62681.0 50033.2 56357.1	56357	6 E+03	11.2
TFA-carbaril	33794.5 31532.3 32563.4	32630	1 E+03	3.5
TFA-methiocarb	52518.7 46221.2 43571.6	47437	5 E+03	9.7

4.7.1 Determinación del nivel mínimo de detección (MDL) y de cuantificación (MQL) de los N-metilcarbamatos derivados.

El nivel mínimo de detección, MDL, se estableció como la cantidad más pequeña de analito que generó una señal 3 veces mayor que la del ruido del detector, y el nivel mínimo de cuantificación, MQL, se calculó como dos veces el nivel mínimo de detección.

Para determinar el nivel mínimo de detección se inyectaron al cromatógrafo varios patrones en concentraciones descendentes, preparados a partir de la solución *stock* 3 de N-metilcarbamatos derivados; la relación señal ruido se estableció con ayuda del sistema de datos *HP Chem Station* Rev. A. 06.03 [509]. La **Tabla 21** muestra los MDL y MQL para cada uno de los N-metilcarbamatos derivados, comparados con los MDL y MQL del método EPA 531.1, en el cual los N-metilcarbamatos se analizan por HPLC con derivación postcolumna [8].

Tabla 21. MDL y MQL determinados por HRGC/ μ -ECD de los derivados trifluoroacetilos de los N-metilcarbamatos.

Compuesto	MDL, mg/L		MQL, mg/L	
	Derivado trifluoroacetilo	Método EPA 531.1	Derivado trifluoroacetilo	Método EPA 531.1
Propoxur	1.5	1.0	3.0	2.0
Promecarb	1.3	-	2.6	-
Carbofurano	3.3	1.5	6.6	3.0
3-hidroxicarbofurano	0.3	2.0	0.6	4.0
Carbaril	1.5	2.0	3.0	4.0
Methiocarb	0.5	4.0	1.0	8.0

Como se aprecia en la **Tabla 21**, los límites de detección de los derivados trifluoroacetilos están en el orden de $\mu\text{g/L}$, destacándose TFA-3-hidroxicarbofurano, TFA-carbaril y TFA-metiocarb, que muestran valores más bajos, que los reportados para el método EPA 531.1 [8].

4.7.2 Determinación por m -ECD de los t_R , t_{RR} , áreas, áreas relativas, R_f , RR_f y rango dinámico lineal para los N-metilcarbamatos derivados.

♦ Tiempos de retención y áreas.

La determinación de los tiempos de retención y las áreas de picos cromatográficos se realizó para cada uno de los patrones de la curva de calibración. Los patrones fueron inyectados por triplicado y como estándar interno se utilizó propiconazol. Los tiempos de retención relativos y las áreas relativas se determinaron como se describió en el **Numeral 3.8.2** de la Parte Experimental.

Los coeficientes de variación para los tiempos de retención estuvieron entre 0.000 y 0.023%, para los tiempos de retención relativos entre 0.001 y 0.020%, lo cual muestra la alta reproducibilidad de las inyecciones en el equipo HRGC/ μ -ECD (**Anexo 3**). Los coeficientes de variación se encuentran dentro de los establecidos por las Buenas Prácticas de Laboratorio, que recomiendan un valor máximo de 2% para las muestras analizadas por cromatografía de gases [66].

Los coeficientes de variación para las áreas y áreas relativas estuvieron entre 0.25 - 3.88 y 0.12 - 5.29, respectivamente (**Anexo 4**). La mayoría de los valores se encuentran dentro de lo establecido por las Buenas Prácticas de Laboratorio, que admiten como valor máximo 5% para las áreas obtenidas por cromatografía de gases [66]. Algunos valores superaron el 5% debido a dificultades presentadas en la determinación de las áreas de los picos cromatográficos, ya que las muestras de los patrones contenían artefactos, producto de la derivación que no fueron retirados por el lavado, lo cual aumentó el ruido del detector e hizo menos reproducible el proceso de integración de los picos cromatográficos.

♦ Factores de respuesta y rango dinámico lineal del m -ECD.

Los factores de respuesta y factores de respuesta relativos se calcularon para cada una de las concentraciones de los niveles alto y bajo, como se describió en el **Numeral 3.8.2** de la Parte Experimental. Los coeficientes de variación estuvieron entre 0.22 - 3.88% para los R_f y 0.12-5.29% para los RR_f (**Anexo 5**).

La linealidad de la respuesta del detector μ -ECD para cada uno de los derivados se determinó graficando los factores de respuesta relativos en función de la concentración relativa. Las gráficas se pueden observar en el **Anexo 6**.

Para los N-metilcarbamatos derivados se observó que el RR_f en el rango de concentraciones bajo de 0.01 – 0.3 $\mu\text{g/mL}$ se mantuvo constante entre las concentraciones 0.02 y 0.1 $\mu\text{g/mL}$. Para el rango de concentraciones alto 0.5 – 7.0 $\mu\text{g/mL}$, el factor de respuesta relativo fue constante en todo este intervalo, excepto para promecarb y methiocarb, para los cuales fue constante dentro del intervalo de 1 – 7 $\mu\text{g/mL}$. Por consiguiente, para las concentraciones analizadas de los derivados trifluoroacetilos de los N-metilcarbamatos, el rango dinámico lineal del μ -ECD, dentro del cual se puede cuantificar con toda seguridad, fue entre 0.02 – 0.1 $\mu\text{g/mL}$ y 0.5 – 7 $\mu\text{g/mL}$.

♦ **Curvas de calibración para los N-metilcarbamatos derivados.**

Las curvas de calibración elaboradas para los N-metilcarbamatos derivados, con adición de patrón interno, propiconazol, en los niveles de concentración alto y bajo, se observan en el **Anexo 7**.

Los coeficientes de correlación lineal, R^2 , obtenidos para cada una de las curvas de calibración de los N-metilcarbamatos derivados se encuentran entre 0.9955 y 0.9996, debido a la linealidad de la respuesta del μ -ECD para cada uno de los niveles analizados, lo cual garantiza una cuantificación confiable y reproducible de estos compuestos.

4.7.3 Estudio de la degradación de los derivados trifluoroacetilos de N-metilcarbamatos durante el almacenamiento.

Los N-metilcarbamatos se derivaron con TFAA y se obtuvieron compuestos estables a las altas temperaturas del puerto de inyección, evitando su degradación; pero estos derivados no mostraron ser muy estables en solución durante su almacenamiento.

El estudio de la degradación se llevó a cabo con un patrón de N-metilcarbamatos derivados (5 $\mu\text{g/mL}$), el cual fue preparado bajo las condiciones descritas en el **Numeral 4.3.2**. El patrón en una mezcla de hexano/éter (95:5) fue almacenado en un vial de 2 mL, se refrigeró

a 4°C y se aisló de la luz. Durante los 2 meses de almacenamiento se analizó en varias ocasiones por HRGC/ μ -ECD.

En la **Figura 34** se muestra el proceso de degradación de los derivados trifluoroacetilos de los N-metilcarbamatos durante su almacenamiento. Durante los 4 primeros días se observó estabilidad de los compuestos, lo cual indica que estos derivados deben ser analizados inmediatamente después de ser preparados, para que los resultados sean confiables y reproducibles. En cuanto a los patrones que se preparan para obtener la curva de calibración, es necesario resaltar, que para cada análisis, estos deben ser sintetizados y purificados y debe realizarse el control de su estabilidad durante el almacenamiento.

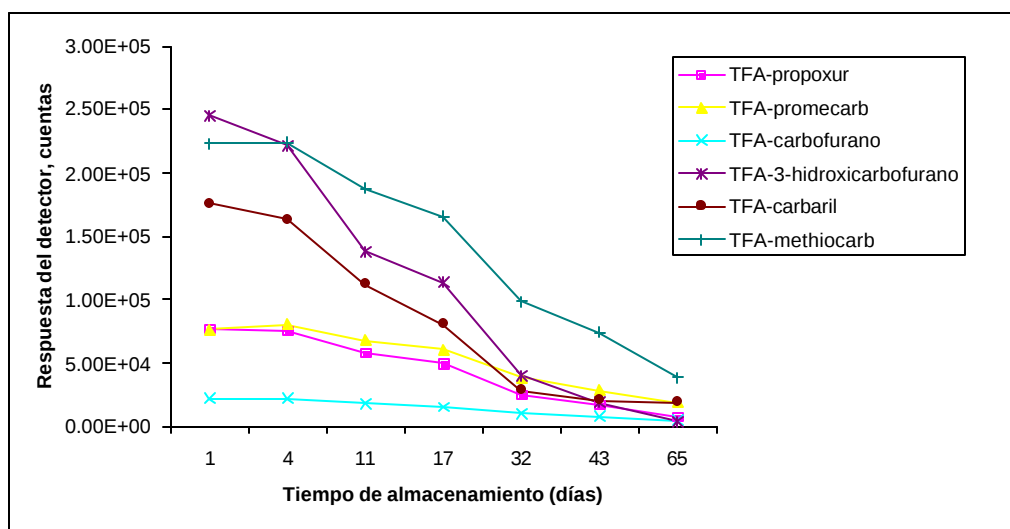


Figura 34. Estabilidad de los derivados de N-metilcarbamatos durante su almacenamiento, (temperatura 4°C, protegidos de la luz, solvente hexano/éter 95:5).

4.8 EXTRACCIÓN DE N-METILCARBAMATOS DE MUESTRAS DE AGUA SUPERFICIAL, MEDIANTE LA TÉCNICA DE EXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO CONTINUO (CLLE).

El análisis de muestras reales se realizó por HRGC/ μ -ECD; se empleó como método de extracción LLE y posterior derivación con TFAA bajo las condiciones establecidas. Las muestras de agua fueron tomadas de forma integral y por duplicado en las quebradas Menzuly y La Grande ubicadas en los municipios de Floridablanca y Piedecuesta; la primera

muestra se tomó en el tramo de la Universidad Pontificia Bolivariana y la segunda en la vereda Tres Esquinas.

En las dos muestras analizadas no se determinó ninguno de los N-metilcarbamatos o los productos de su degradación, por encima de los niveles mínimos de detección del sistema de detección empleado. En la **Figura 35** se muestran y se comparan los perfiles cromatográficos de las dos muestras analizadas con el de un patrón de N-metilcarbamatos derivados.

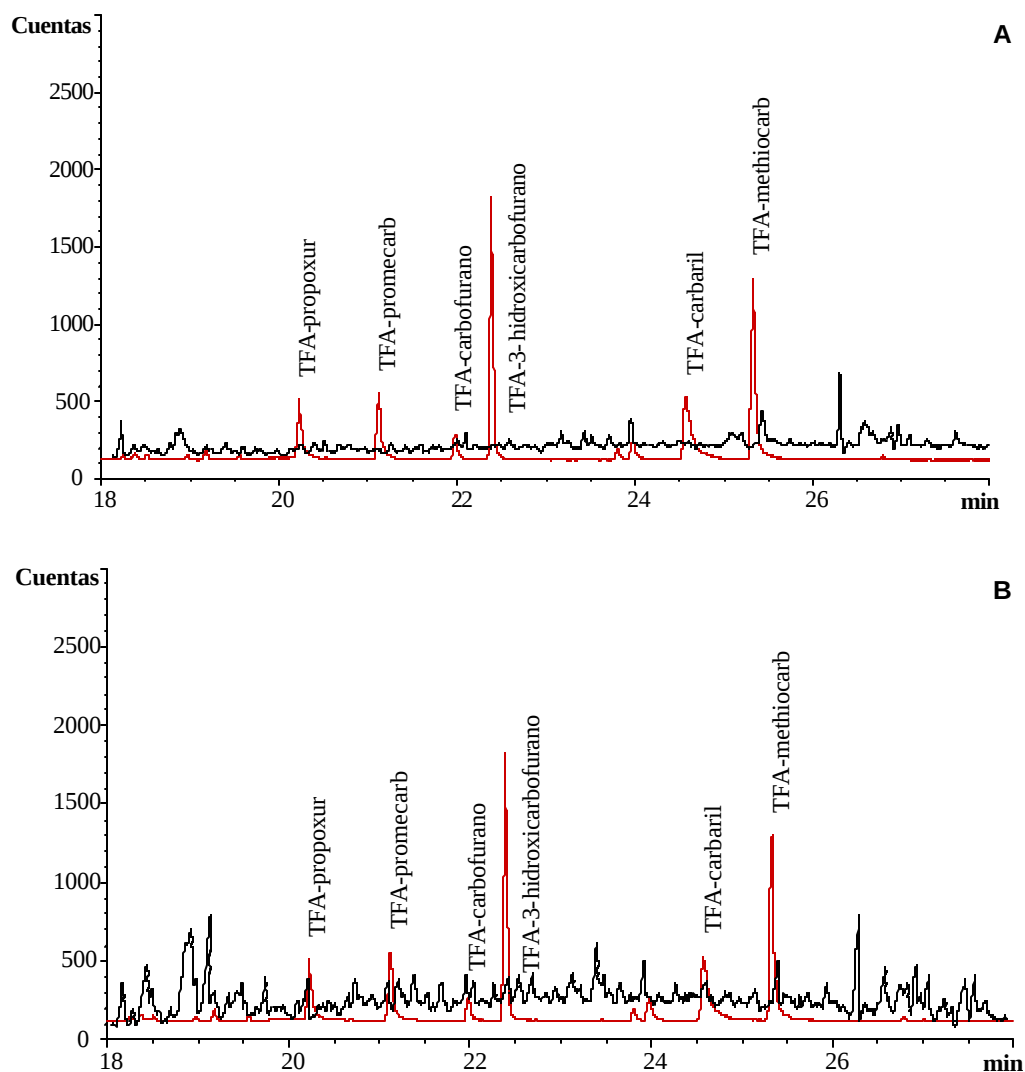


Figura 35. Perfiles cromatográficos comparados con los patrones de N-metilcarbamatos derivados, obtenidos por HRGC/ μ -ECD de las muestras procedentes de las quebradas: A. Menzuly y B. La Grande.

Para estudiar el efecto de matriz y la estabilidad de los plaguicidas en las muestras de agua reales durante su almacenamiento, se tomaron cuatro muestras de agua de 10 mL provenientes de la quebrada La Grande, se enriquecieron con el patrón de N-metilcarbamatos (0.8 µg/mL), y el pH se ajustó a 4. El análisis se realizó primero a dos muestras, utilizando como técnica de extracción BLLE, según las condiciones establecidas en el **Numeral 4.4** de la sección de Análisis de Resultados; posteriormente, se realizó la derivación y análisis por HRGC/µ-ECD. Las otras dos muestras fueron almacenadas a 4°C y protegidas de la luz durante 10 días, al cabo de este tiempo se llevó a cabo la extracción y análisis respectivo.

La **Figura 36** ilustra la extracción de los N-metilcarbamatos por BLLE de las muestras reales enriquecidas; como se puede observar, no hay cambios significativos en la recuperación con el tiempo, esto indica que las condiciones de almacenamiento de las muestras de agua son las adecuadas y los componentes adicionales de la matriz no afectan la extracción de los plaguicidas.

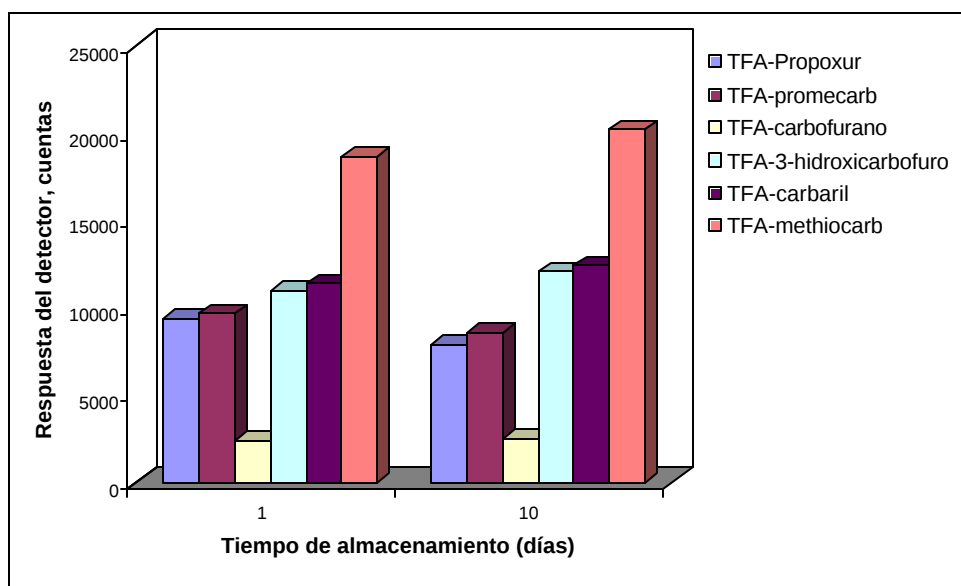


Figura 36. Estabilidad de los N-metilcarbamatos en muestras de agua superficiales, almacenadas a 4°C, protegidas de la luz durante 10 días.

5. CONCLUSIONES

- ♦ Se implementó un método por cromatografía de gases de alta resolución con detector de microcaptura de electrones (μ -ECD) para la determinación de los fenil N-metilcarbamatos y sus productos de degradación en muestras de agua superficial y agua potable, empleando derivación química.
- ♦ Se implementaron las técnicas de extracción líquido-líquido por lotes (BLLE) y extracción en fase sólida (SPE) para la recuperación de los fenil N-metilcarbamatos y sus productos de degradación de muestras de aguas superficiales o potables. Las condiciones establecidas para BLLE fueron extracción con una mezcla de diclorometano/acetato de etilo (1:3) y adición de sal (5%, p/v). Para SPE se utilizó como sorbente octaécilo C_{18} , y la extracción se llevó a cabo con 6 mL de la mezcla de solventes diclorometano/acetato de etilo (1:3) y se adicionó sal (5%, p/v).
- ♦ Se desarrolló la técnica de derivación de los fenil N-metilcarbamatos con anhídrido trifluoroacético, lográndose derivar propoxur, promecarb, carbofurano, carbaril, methiocarb y los productos de degradación 3-hidroxicarbofurano y 1-naftol. Las condiciones de derivación fueron: relación molar carbamato/agente derivante/catalizador 1:5000:1000, catalizador piridina, temperatura 50°C, tiempo de reacción 2 horas y como solvente se usó acetato de etilo.
- ♦ El análisis por HRGC/ μ -ECD de los N-metilcarbamatos derivados mostró una alta reproducibilidad de los t_R (CV, 0.00 - 0.023%), áreas (0.25 – 3.88%) y R_f (CV, 0.22 – 3.88%), valores que se encuentran dentro de los parámetros recomendados por las Buenas Prácticas de Laboratorio para las técnicas cromatográficas.
- ♦ Los porcentajes de recuperación de los N-metilcarbamatos para las técnicas de extracción BLLE y LLE fueron buenos. BLLE presentó porcentajes altos para carbofurano (97%), propoxur (94%) y promecarb (94%); igualmente, LLE recuperó satisfactoriamente carbofurano (95%) y carbaril (86%). En cuanto a SPE, sólo presentó una alta recuperación para promecarb (100%), los demás valores estuvieron por debajo del 70% debido a la falta de afinidad de los analitos con el sorbente utilizado.
- ♦ Los niveles mínimos de detección para los derivados trifluoroacetilos de los N-metilcarbamatos estuvieron en el orden de μ g/L. Para compuestos como 3-

hidroxicarbofurano (0.36 µg/L), carbaril (1.7 µg/L), y methiocarb (0.5 µg/L) se observaron valores inferiores en comparación a los MDL del método EPA 531.1, lo cual indica que la técnica implementada, es bastante sensible, selectiva y adecuada para el control de plaguicidas y sus productos de degradación de acuerdo con los requerimientos del Decreto 475 de 1998 del Ministerio de Salud.

- ♦ El método desarrollado se aplicó a la extracción, identificación y cuantificación de N-metilcarbamatos y sus productos de degradación en muestras de agua tomadas de la quebrada Menzuly y La Grande ubicadas en Floridablanca y Piedecuesta, respectivamente. En estas muestras no se detectó ninguno de los analitos estudiados por encima de los niveles mínimos de detección de la técnica implementada.

6. RECOMENDACIONES

- ♦ En el presente trabajo se observó como los N-metilcarbamatos derivados con TFAA son poco estables en solución durante el proceso de su almacenamiento; es conveniente para asegurar la reproducibilidad y confiabilidad de los resultados preparar patrones de los derivados por separado, purificarlos y estudiar su estabilidad durante el almacenamiento.
- ♦ Realizar estudios para analizar los N-metilcarbamatos empleando el método de inyección *on-column* en frío, el cual, según algunos estudios, [52] es adecuado para evitar la degradación de estas moléculas.
- ♦ Implementar metodologías de análisis adecuadas para el estudio los tiocarbamatos mancozeb, propineb y metiram, los cuales son usados ampliamente en Colombia por los agricultores para el control de plagas en cultivos de flores, hortalizas y árboles frutales.
- ♦ Unos de los inconvenientes de las técnicas de extracción BLLE, SPE y LLE es la manipulación de la muestra y el uso de solventes tóxicos y costosos, para solucionar estos inconvenientes se podría estudiar el uso de la microextracción en fase sólida, empleando la derivación sobre la fibra simultáneamente con la extracción, o derivación sobre la fibra después de la extracción.
- ♦ Con la implementación del presente método de análisis de N-metilcarbamatos de muestras de agua, se podría realizar un estudio sobre la presencia de estos plaguicidas en las fuentes de agua potable y superficial del departamento de Santander; además, para complementar el estudio se podría aplicar la metodología al análisis de sus residuos en frutas y suelos. Posteriormente sería necesario elaborar un programa para informar y capacitar a los agricultores sobre los peligros, manejo adecuado y sustitución de estos plaguicidas.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. MONTAIGNE, Fen y ESSICK, Peter. La presión del agua. En: National Geographic, sep. 2002; p. 8-33.
2. NIVIA, Elsa. Mujeres y Plaguicidas. 1^{era} ed. Colombia: Rapalmira, 2000.
3. ROJAS, M. and VASQUEZ, R. Manual de herbicidas y fitoreguladores: aplicación y uso de productos agrícolas. México: Limusa S.A., 1995.
4. KAMRIN, M. A. Pesticides profiles: Toxicity, environmental impact and fate. Florida: Lewis Publishers, 1997; p. 135-139, 239-243.
5. INSTITUTO COLOMBIANO AGROPECUARIO. Comercialización de plaguicidas: importación, producción, ventas, exportación 1999. Santa Fe de Bogotá: Produmedios, 2001; 108p
6. SHIBAMOTO, T. and BJELDANES, L. Introduction to food toxicology. Academic Press, Inc, 1993; p. 152-154.
7. BARCELÓ, D. Environmental analysis techniques applications and quality assurance. Amsterdam: Elsevier, 1993; p. 149-178.
8. KEITH, Lawrence k. Compilation of EPA's sampling and analysis methods. 2^{da} ed. New York: Lewis Publishers, 1996.
9. COLOMBIA. MINISTERIO DE SALUD PUBLICA. Decreto 1843 de 1991: Uso y manejo de pesticidas. Bogotá: Ministerio de Salud, 1991; 14p
10. Plimmer, Jack R. Handbook of pesticide toxicology: chemistry of pesticides. New York: Academic Press Inc, 2002; p. 95-107.
11. HODGSON, E. and RONALD, J. K. Safer insecticides development and use. New York: Marcel Dekker, Inc, 1990; p. 2-6.
12. WORLD HEALTH ORGANIZATION. DDT and its derivates: Environmental aspects. Environmental Health Criteria 83. WHO, Switzerland. 1989. Citado por Kamrin, M. En: Pesticides profiles: toxicity, environmental impact and fate. Florida: Lewis Publishers, 1997; 675p
13. U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Integrated risk information system, Washington, D.C, 1995. Citado por Kamrin, M. En: Pesticides profiles: toxicity, environmental impact and fate. Florida: Lewis Publishers, 1997; 675p
14. SMITH, A. Chlorinated hidrocarbon insecticides in handbook of pesticide toxicology. New York: Academic Press Inc, 1991. Citado por Kamrin, M. En: Pesticides profiles: toxicity, environmental impact and fate. Florida: Lewis Publishers, 1997; 675p
15. PRADILLA, G. Neurotoxicidad por plaguicidas. En: Salud UIS, 1989; 17: p. 67-72.

16. GALLO, M. A: and LAWRYK, N. J: Organic Phosphorus pesticides. In Handbook of pesticide toxicology. New York: Academic Press, 1991. Citado por Kamrin, M. En: Pesticides profiles: toxicity, environmental impact and fate. Florida: Lewis Publishers, 1997; 675p
17. NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE HAZARDOUS SUBSTANCE DATA BANK. Washington, D.C., 1995. Citado por Kamrin, M. Pesticides profiles: toxicity, environmental impact and fate. Florida: Lewis Publishers, 1997; 675p
18. BARCELO, D. Trace determination of pesticides and their degradation products in water. New York: Elsevier, 1997.
19. FOYE, William. Principios de química farmacéutica. Barcelona: Reverté. 1986. Tomo 1. p. 371-386.
20. CASARETT, Louis J. and DOULL John. The Basic Science of Poisons. New York: Macmillan Publishing Co. 1975.
21. BAYONA, Sandra. Estudio de la población expuesta a plaguicidas organofosforados y carbamatos inhibidores de colinesterasa en el municipio de Molagavita. Bucaramanga, 1999,150p. Trabajo de grado (especialización en ingeniería ambiental). Universidad Industrial de Santander. Facultad de ciencias fisicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química.
22. BENEDICT, K. Safety and toxicological considerations when working with organophosphates and carbamates in laboratory. En: Chemical Health & Safety, May/June 2002.
23. MATOS, E.; LORIA, D. and ALBIANO, N. Efectos de los plaguicidas en trabajadores de cultivos intensivos. En: Bol. of Sanit Panam, 1998, 104 (2); p. 160-169.
24. U.S. Environmental Protection Agency. Health Advisory Summary: oxamyl. Office of Drinking Water. Washington DC, 1987. Citado por Kamrin, M. En: Pesticides profiles: toxicity, environmental impact and fate. Florida: Lewis Publishers, 1997; 675p
25. CRANMER, M. F. Carbaryl: a toxicological review and risk assessment neurotoxicology. 7 (1), 247-332, 1986. Citado por Kamrin, M. En: Pesticides profiles: toxicity, environmental impact and fate. Florida: Lewis Publishers, 1997; 675p
26. U.S: National Library of Medicine. Hazardous substances data bank. Bethesda, MD, 1995. Citado por Kamrin, M. En: Pesticides profiles: toxicity, environmental impact and fate. Florida: Lewis Publishers, 1997; 675p
27. ROSENSTEIN, Emilio. Diccionario de especialidades agroquímicas.10^a ed. Bogotá: DLM S.A, 2000
28. MERCK. The Merck Index. 19^a ed. New York: Merck & Co., Inc, 1989; 1606p
29. CRC. Handbook of Chemistry and Physics. 78^a ed. Florida: CRC Press, 1997

30. TRCHY, M. L.; YOST, J. B. and MC CREARY J. J. Gas chromatographic determination of microamounts of aldicarb, aldicarb oxime and aldicarb nitrilo in sources of water. En: Anal. Chem., 1984, 56; p. 1281.
31. ARCHER, T.; CHU, Y. and ENGBRETSON, J. Investigation of carbofuran and its metabolites by gas-liquid chromatography in green and dry hops. En: Environmental Toxicology and Chemistry, 1988; Vol 7; p 897-905.
32. INSTITUTO COLOMBIANO AGROPECUARIO. Comercialización de plaguicidas: importación, producción, ventas, exportación 1995. Santa Fe de Bogotá: Produmedios, 1997; 60p
33. Colombia. Ministerio de Salud. Decreto 475 de 1998: Normas técnicas de calidad del agua potable. Bogotá: Asociación Colombiana de Ingeniería Sanitaria y Ambiental, 1998; 10p.
34. PATNAIK, P. Handbook of environmental analysis: chemical pollutants in air, water, soil and solid wastes. New York: Lewis Plublishers, 1997; p. 199-202.
35. PAWLISZYN, J. and EISERT, R. New trends in solid-phase microextraction. Critical reviews in analytical chemistry. 1997, 27 (2); p. 103-135.
36. LIU, R. and GADZALA, D. Handbook of drug analysis: applications in forensic and clinical laboratories. Washington, DC: American Chemical Society, 1997. 367p.
37. RODRIGUEZ, Dora. Análisis comparativo de diferentes técnicas de extracción de pesticidas organoclorados y bifenilos policlorados en aguas naturales, usando cromatografía de gases de alta resolución. Bucaramanga, 2001. Trabajo de grado(maestría en ciencias químicas). Universidad Industrial de Santander. Facultad de ciencias. Escuela de Química.
38. BROWN, P. and GRUSHKA E. Advances in Chromatography. Charter 6: Sample preparation for gas chromatography with solid-phase extraction and solid-phase microextraction. Vol 37. New York: Marcel Dekker, Inc, 1996; p. 205-235.
39. BUSCENA, I.; ETTIENE, G.; MEDINA, D. and PRIETO, A. Método de extracción liquido sólido para el análisis de residuos de plaguicidas N-metil carbamatos en aguas. En: Fac. Agron. (Luz), 1999, 16 supl. 1; p. 196-205.
40. BALLESTEROS, E.; GALLEGGO, M. and VALCARCEL, M. On-line preconcentration and gas chromatography determination of N-methylcarbamates and their degradation products in aqueous samples. En: Environ. Sci. Technol., 1996, vol 30, N. 6; p. 2071-2077.
41. LISKA, I. and BILIKOVA, K. Stability of polar pesticides on disposable solid-phase extraction precolumns. En: J. Chromatogr. A, 1998, vol 795, N:1; p 61-69.

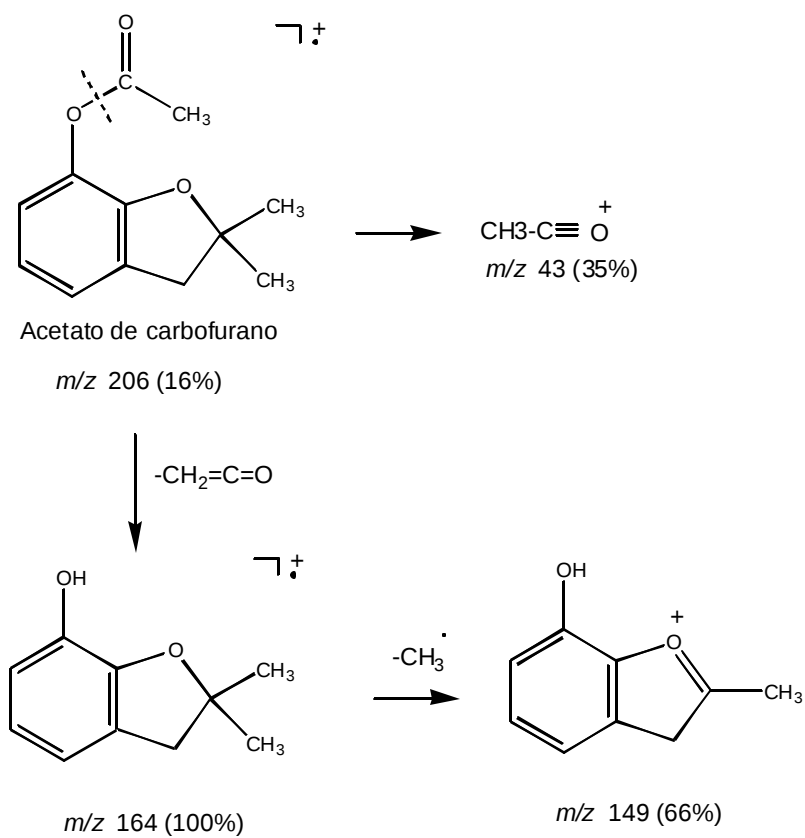
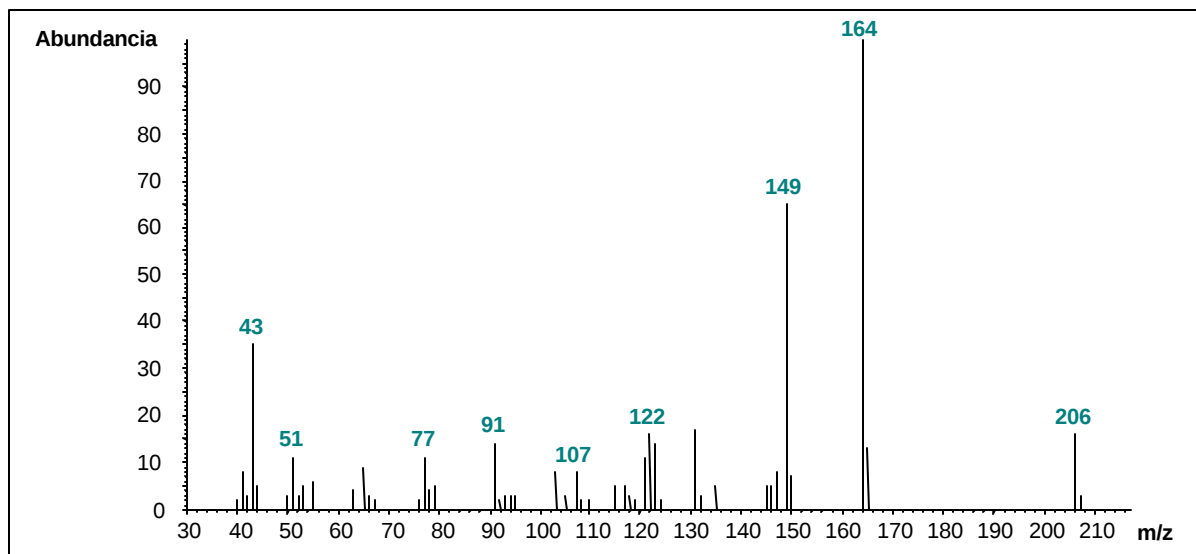
42. PAWLISZYN, J. Solid phase microextraction: theory and practice. New York: John Wiley, 1997; 241p
43. PAWLISZYN, J. Applications of solid-phase microextraction. RSC Chromatography. Monographs. Cambridge, 1999; 653p
44. SUPELCO. Productos para cromatografía. Bellefonte, PA USA: Supelco Inc., 1997.
45. GOU, Y.; EISERT, R. and PAWLISZYN, J. Automated in tube solid-phase microextraction-high-performance liquid chromatography for carbamate pesticide analysis. En: J. Chromatogr. A, 2000, vol 873, N.1; p 137-147.
46. POOLE, C. F. And POOLE S. K. Chromatography today. Amsterdam: Elsevier. 1991. 302p.
47. YANG, S. S.; GOLDSMITH, A. and SMETENA, I. Recent advances in the residue analysis of N-methylcarbamate. En: J. Chromatogr. A, 1996, 754; p. 3-16.
48. MORENO, M.; ABAD, A. and MONTOYA, A. Production of monoclonal antibodies to the N-methylcarbamates pesticide propoxur. En: J. Agric. Food Chem., 2001, 49; p. 72-78.
49. JAIMES, Cesar y VILLALVA, Giovanni. Determinación de plaguicidas organofosforados y/o carbamatos inhibidores *in vitro* de la acetilcolinesterasa en agua potable, en los municipios de Piedecuesta, Lebrija y Rionegro por la técnica de Limperos y Ranta. Bucaramanga, 2003. Trabajo de grado (pregrado en química). Universidad Industrial de Santander. Facultad de ciencias. Escuela de Química.
50. DROZD, J. Chemical derivatization in gas chromatography. Amsterdam: Elsevier Scientific Publishing Company. vol 19, 1981.
51. BLAU, K. and HALKET, J. Handbook of derivates for chromatography. 2^{da} ed. Chichester: John Wiley and Sons, 1996.
52. McNAIR, H. and SONG, X. Fast gas chromatography analysis of Ncarbamates with cold-on-column injection. En: J. Chromatogr. Sci., 2002, Aug 40; p. 321-325.
53. SANTOS, M.; RUBIO, S.; TOLEDANO, G. and POLO-DÍEZ, L. Stability studies of carbamates pesticides and analysis by gas chromatography with flame ionization and nitrogen-phosphorus detection. En: J. Chromatogr. A. 2001, 921; p. 287-296.
54. STAN, H. J. and KLAFFENBACH, P. Determination of carbamate pesticides and some urea pesticides after derivatization with acetic anhydride by means of GC-MSD. En: Fresenius' J. Anal. Chem, 1991, 339; p. 151-157.
55. OKUMURA, T.; IMAMURA, K. and NISHIKAWA, Y. Determination of carbamate pesticides in environmental samples as their trifluoroacetyl or methyl derivatives by using gas chromatography-mass spectrometry. En: Analyst., Nov 1995, vol 120; p. 2675-2681.

56. NAGASAWA, K.; UCHIYAMA, H.; OGAMO, A. and SHINOZUKA T. Gas chromatographic determination of microamounts of carbaryl and 1- naphthol in natural water as sources of water supplies. En: J. Cromatogr. 1977, 144; p. 77-84.
57. LAWRENCE, J. F. ; LEWIS, D. A. and McLEOD, H. A. Detection of carbofuran and metabolites directly or as their heptafluorobutyl derivatives using gas-liquid or high-pressure liquid chromatography with different detectors. En: J. Chromatogr., 1977, p. 143-150.
58. FÄRBER, H. and SCHÖLER, H. Gas chromatographic determination of carbamate pesticides after flash-heater methylation with trimethylsulfonium hidroxide. En: J. Agric. Food Chem., 1993, vol 41. N. 2; p. 217-220.
59. WONG, L. and FISHER, Frank. Determination of carbofuran and its toxic metabolites in animal tissue by gas chromatography of their N-trifluoroacetyl derivatives. En: J. Agric. Food Chem., 1975, 23; p. 315-318.
60. HILL, H. H. and McMINN, G.D. Detectors for capillary chromatography. New York: John Wiley & Sons, INC, 1992. 443p.
61. SCOTT. P.W. Chromatographic Detector: Disign, Function and Operation. New York: Marcel Dekker, INC, 1996. 512p.
62. DI CORCIA, A. and MARCHETTI, M. Multiresidue method for pesticides in drinking water using a graphitized carbon black cartridge extraction and liquid chrmatographic analysis. En: Anal. Chem., 1991, 63; p. 580-585.
63. SUPELCO. Extract nonvolatile pesticides from drinking water, using a graphitized carbon adsorbent. Note application 27. 1996, 2p.
64. CAREY, Francis and SUNDBERG, Richard. Advanced Organic Chemistry. 3^a ed. New York: Plenum Press. 1990; p. 473-479.
65. MARCH, Jerry. Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms and Structure. New York: Wiley & Sons. 1992.
66. STASHENKO, H. y BERNAL, J. Resonancia Magnética Nuclear y acoplamientos, Cromatografía de Gases/Espectrometría de Masas. Bucaramanga: Universidad Industrial de santander. 354p.
67. McLAFFERTT, F. W. Interpretation of Mass Spectra. California: University Science Books. 1980; 302p.
68. SAFE, S. and HUTZINGER, O. Mass Spectrometry of Pesticides and Pollutants. Ohio: CRC Press. 1973; p. 52-53

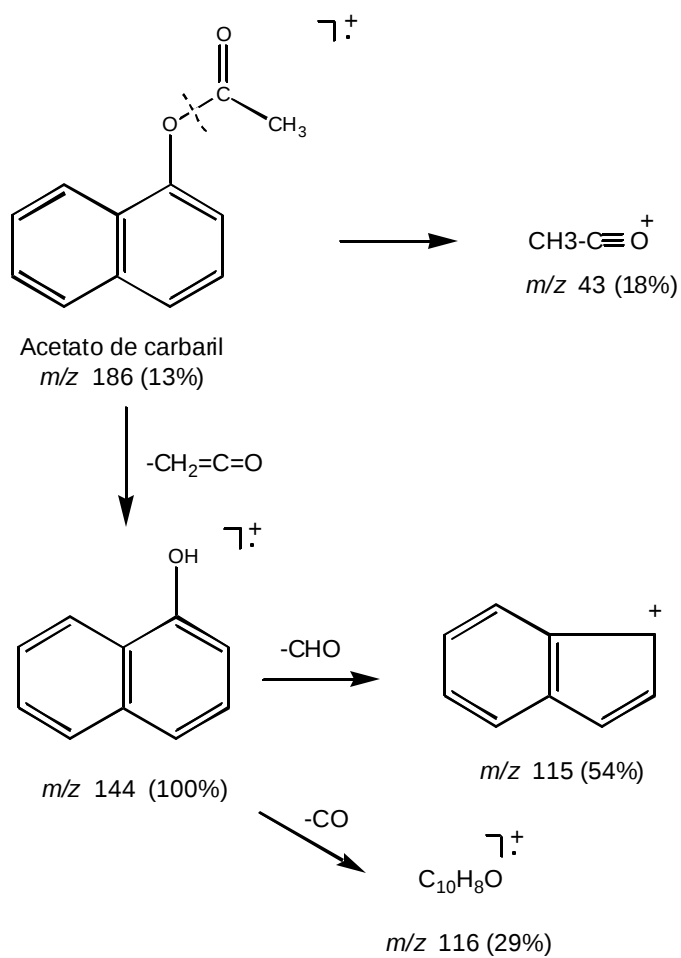
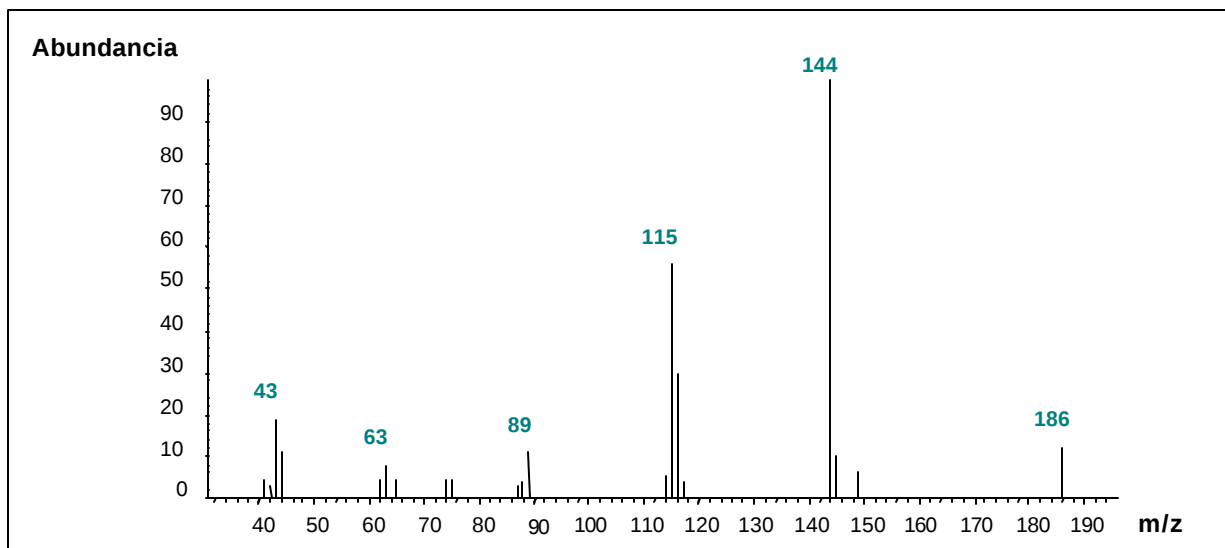
ANEXO 1

ESPECTROS DE MASAS DE LOS N-METILCARBAMATOS
DERIVADOS CON ANHÍDRIDO ACÉTICO

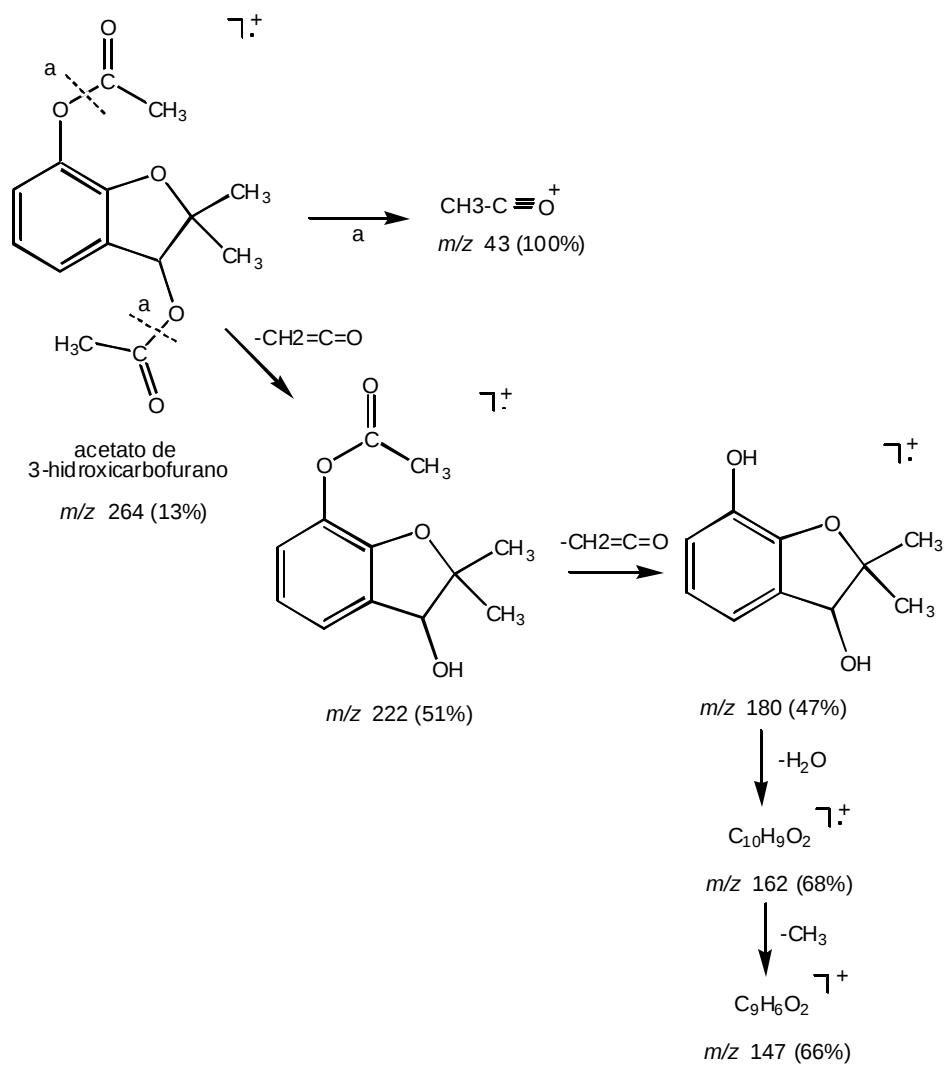
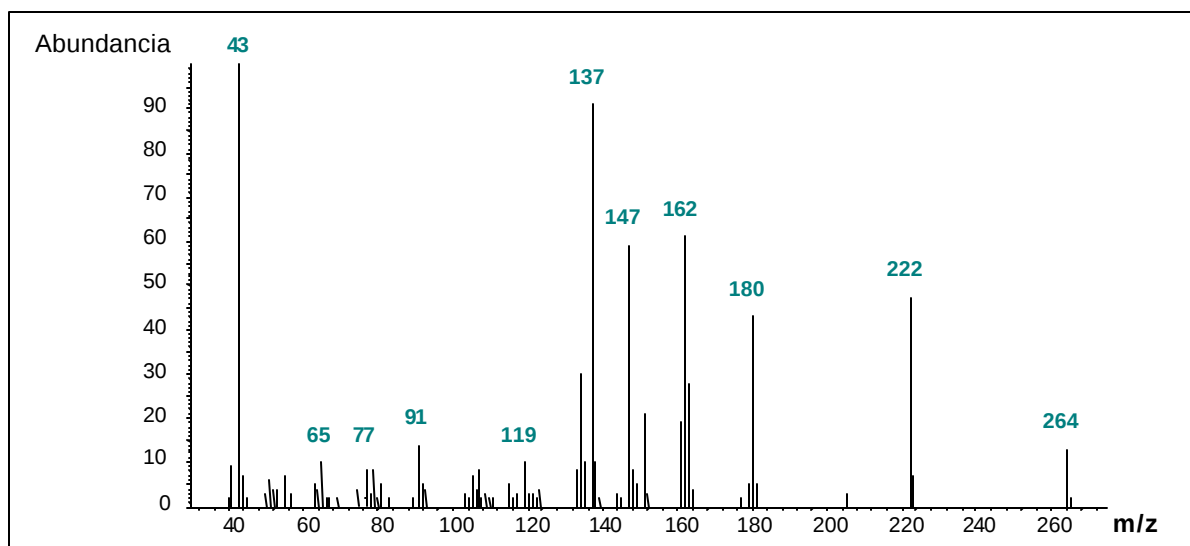
Anexo A. Espectro de masas y ruta de fragmentación del acetato de carbofurano.



Anexo B. Espectro de masas y ruta de fragmentación del acetato de carbarilo.



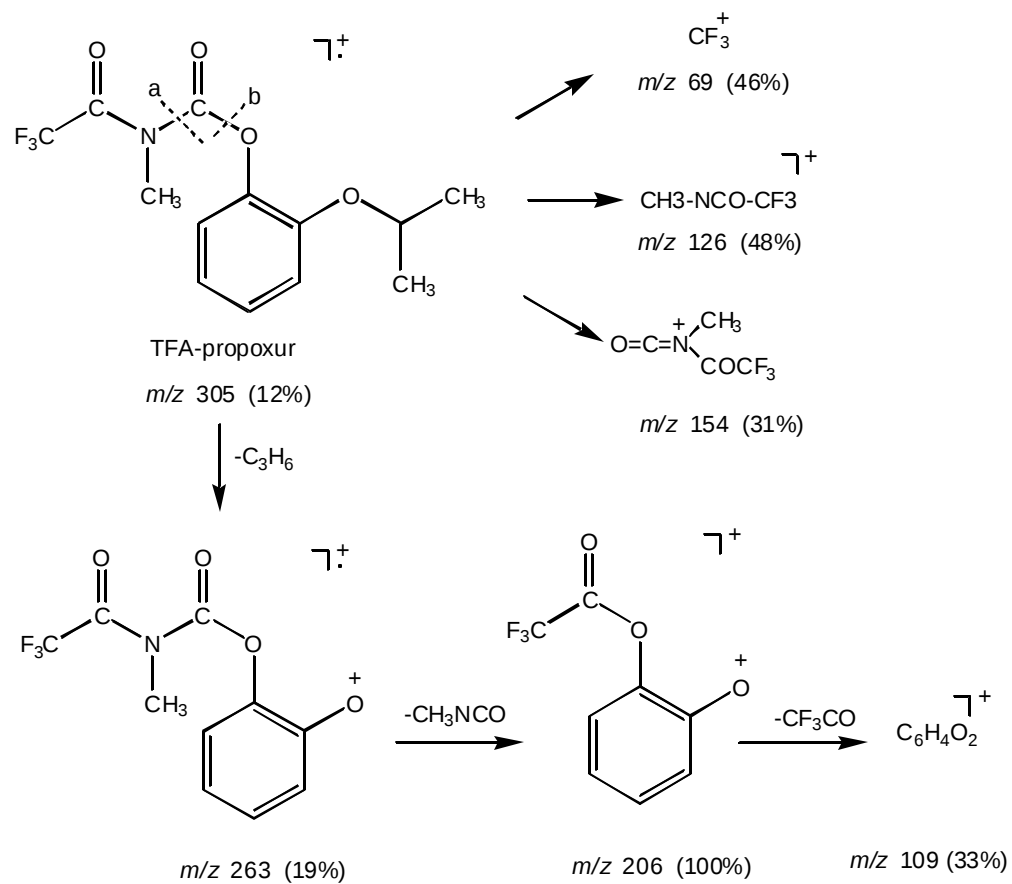
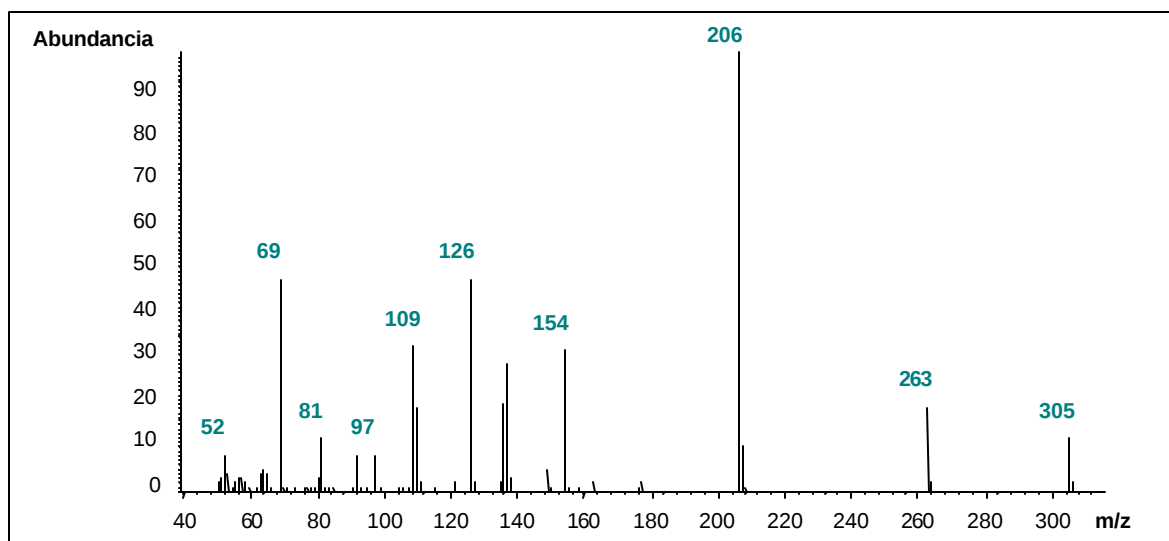
Anexo C. Espectro de masas y ruta de fragmentación del acetato de 3-hidroxicarbofurano.



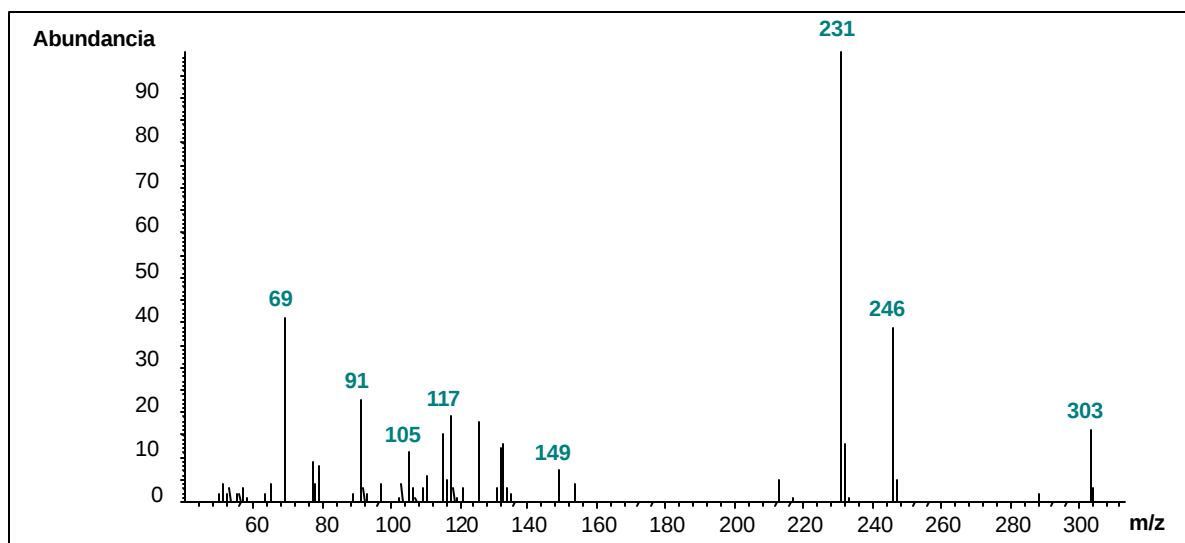
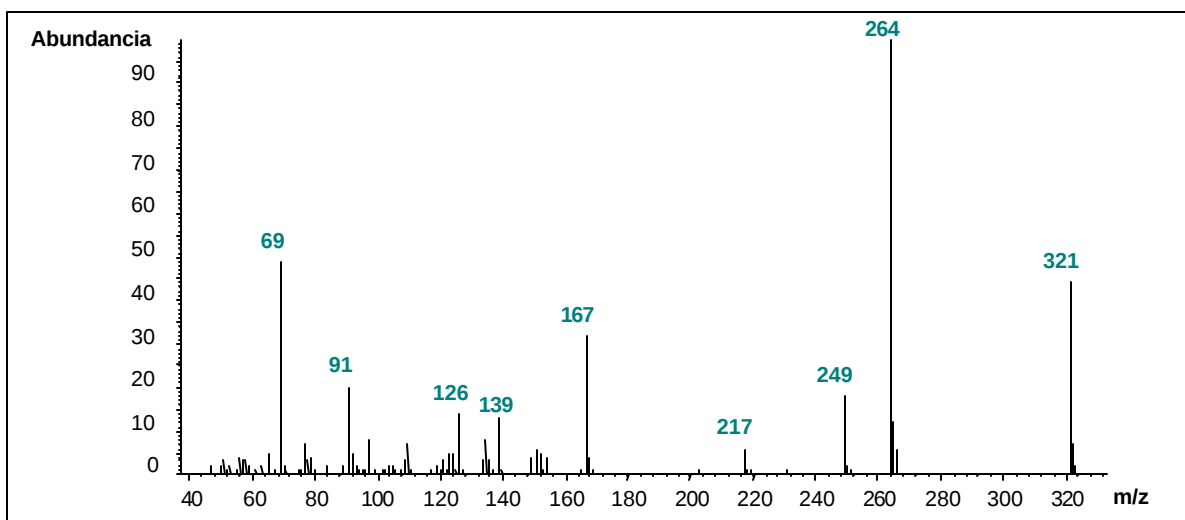
ANEXO 2

ESPECTROS DE MASAS DE LOS N-METILCARBAMATOS
DERIVADOS CON ANHÍDRIDO TRIFLUOROACÉTICO

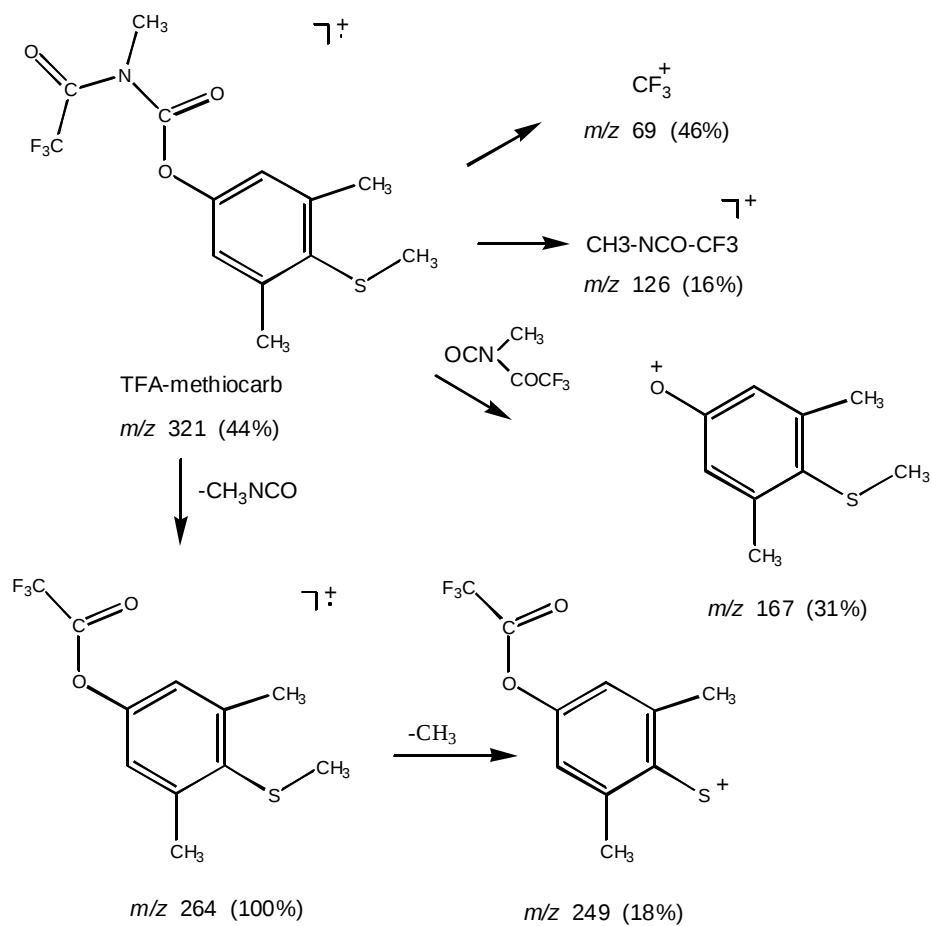
Anexo A Espectro de masas y ruta de formación de los principales iones fragmento del TFA-propoxur.



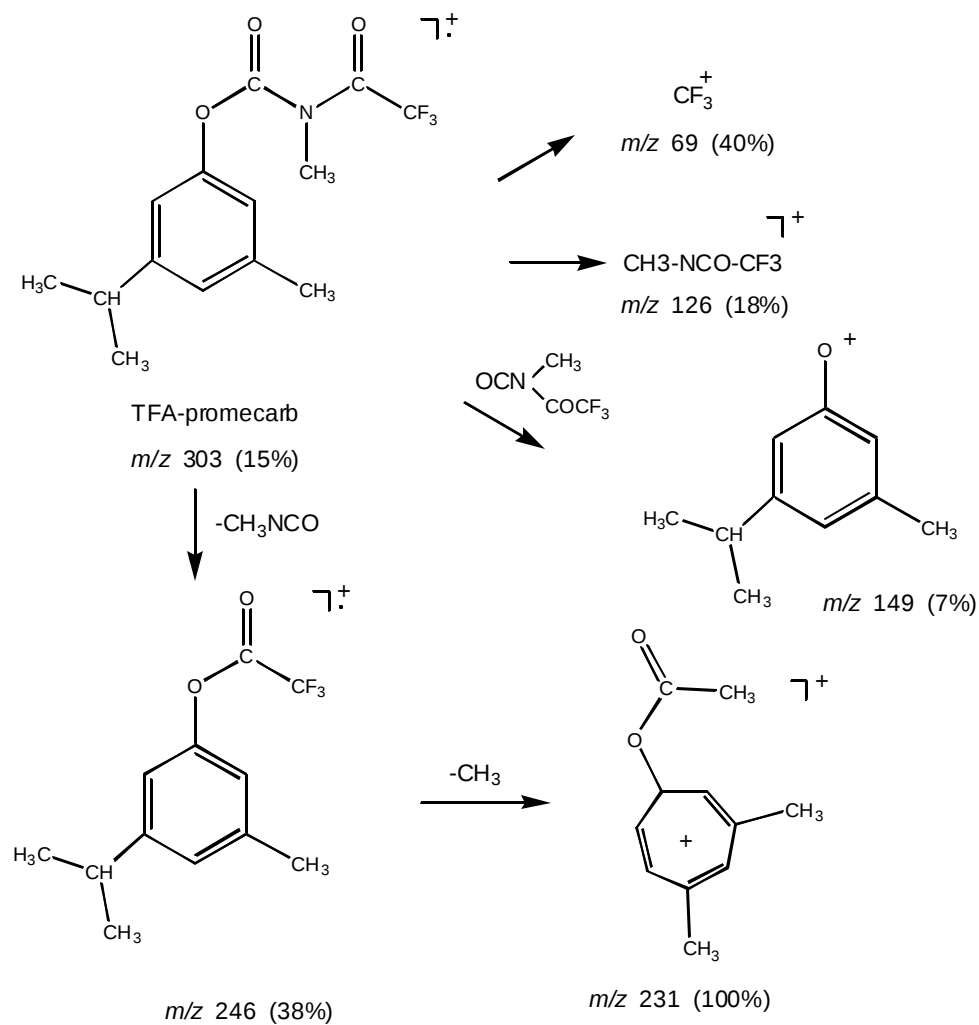
Anexo B. Espectros de masas de los derivados TFA-methiocarb y TFA-promecarb.



Anexo C. Ruta de formación de los principales iones fragmento del TFA-methiocarb.



Anexo D. Ruta de formación de los principales iones fragmento del TFA-promecarb.



ANEXO 3

ESTUDIO DE LA REPRODUCIBILIDAD DE LOS TIEMPOS DE
RETENCIÓN DE LOS PATRONES DE N-METILCARBAMATOS
DERIVADOS, DETERMINADOS POR HRGC/ μ -ECD

Compuesto	Conc., mg/mL	Tiempos de retención, min			Tiempos de retención promedio, min				CV, %	
		t _R	t _{STD}	t _{RR}	t _R	t _{RR}	t _R	t _{RR}	t _R	t _{RR}
Propoxur	0.01	20.230	32.864	0.616						
		20.229	32.865	0.643	20.23	0.62	5.77E-04	2.84E-05	0.003	0.005
		20.229	32.865	0.669						
	0.02	20.229	32.864	0.616						
		20.226	32.864	0.615	20.23	0.61	1.53E-03	4.57E-05	0.008	0.007
		20.227	32.864	0.615						
	0.03	20.229	32.867	0.615						
		20.230	32.867	0.616	20.23	0.62	1.53E-03	5.68E-05	0.008	0.009
		20.232	32.866	0.616						
	0.05	20.226	32.865	0.615						
		20.227	32.869	0.615	20.23	0.61	1.53E-03	2.50E-05	0.008	0.004
		20.229	32.870	0.615						
	0.10	20.227	32.869	0.615						
		20.227	32.871	0.615	20.23	0.61	0.00E+00	2.16E-05	0.000	0.004
		20.227	32.869	0.615						
	0.20	20.224	32.868	0.615						
		20.223	32.868	0.615	20.22	0.61	2.08E-03	2.38E-05	0.010	0.004
		20.220	32.864	0.615						
	0.30	20.220	32.866	0.615						
		20.220	32.865	0.615	20.22	0.61	1.73E-03	1.02E-05	0.009	0.002
		20.217	32.861	0.615						
	0.50	20.219	32.866	0.615						
		20.220	32.869	0.615	20.22	0.61	1.53E-03	3.05E-05	0.008	0.005
		20.222	32.869	0.615						
	1.00	20.220	32.867	0.615						
		20.221	32.865	0.615	20.22	0.61	5.77E-04	4.56E-05	0.003	0.007
		20.221	32.864	0.615						
	2.00	20.220	32.868	0.615						
		20.218	32.868	0.615	20.22	0.61	1.15E-03	3.39E-05	0.006	0.006
		20.218	32.865	0.615						

Continuación Anexo 3

Compuesto	Conc., mg/mL	Tiempos de retención, min			Tiempos de retención promedio, min		s		CV, %	
		t _R	t _{STD}	t _{RR}	t _R	t _{RR}	t _R	t _{RR}	t _R	t _{RR}
Promecarb	3.00	20.218	32.866	0.615	20.22	0.61	3.37E-07	1.08E-05	0.000	0.002
		20.218	32.865	0.615						
		20.218	32.866	0.615						
	5.00	20.214	32.862	0.615	20.21	0.61	1.00E-03	4.45E-05	0.005	0.007
		20.213	32.859	0.615						
		20.215	32.859	0.615						
	7.00	20.219	32.862	0.615	20.22	0.61	0.00E+00	2.86E-05	0.000	0.005
		20.219	32.865	0.615						
		20.219	32.864	0.615						
	0.01	21.123	32.864	0.643	21.12	0.64	5.77E-04	1.54E-05	0.003	0.002
		21.123	32.865	0.643						
		21.124	32.865	0.643						
	0.02	21.124	32.864	0.643	21.12	0.64	1.53E-03	4.57E-05	0.007	0.007
		21.121	32.864	0.643						
		21.122	32.864	0.643						
	0.03	21.124	32.867	0.643	21.12	0.64	2.08E-03	7.16E-05	0.010	0.011
		21.121	32.867	0.643						
		21.125	32.866	0.643						
	0.05	21.119	32.865	0.643	21.12	0.64	2.08E-03	1.20E-05	0.010	0.002
		21.122	32.869	0.643						
		21.123	32.870	0.643						
	0.10	21.122	32.869	0.643	21.12	0.64	1.15E-03	5.04E-05	0.005	0.008
		21.120	32.871	0.643						
		21.120	32.869	0.643						
	0.20	21.117	32.868	0.642	21.11	0.64	2.52E-03	3.95E-05	0.012	0.006
		21.115	32.868	0.642						
		21.112	32.864	0.642						
	0.30	21.112	32.866	0.642	21.11	0.64	1.15E-03	1.84E-05	0.005	0.003
		21.112	32.865	0.642						
		21.110	32.861	0.642						

Continuación Anexo 3

Compuesto	Conc., mg/mL	Tiempos de retención, min			Tiempos de retención promedio, min		s	CV, %		
		t _R	t _{STD}	t _{RR}	t _R	t _{RR}		t _R	t _{RR}	
Carbofurano	0.50	21.111	32.866	0.642	21.11	0.64	1.00E-03	1.70E-05	0.005	0.003
		21.112	32.869	0.642						
		21.113	32.869	0.642						
	1.00	21.112	32.867	0.642	21.11	0.64	5.77E-04	4.68E-05	0.003	0.007
		21.113	32.865	0.642						
		21.113	32.864	0.642						
	2.00	21.113	32.868	0.642	21.11	0.64	2.08E-03	4.67E-05	0.010	0.007
		21.110	32.868	0.642						
		21.109	32.865	0.642						
	3.00	21.110	32.866	0.642	21.11	0.64	5.77E-04	1.54E-05	0.003	0.002
		21.110	32.865	0.642						
		21.111	32.866	0.642						
	5.00	21.107	32.862	0.642	21.11	0.64	5.77E-04	2.93E-05	0.003	0.005
		21.106	32.859	0.642						
		21.107	32.859	0.642						
	7.00	21.112	32.862	0.642	21.11	0.64	5.77E-04	4.46E-05	0.003	0.007
		21.111	32.865	0.642						
		21.112	32.864	0.642						
	0.01	21.985	32.864	0.669	21.99	0.67	4.16E-03	1.24E-04	0.019	0.019
		21.983	32.865	0.669						
		21.991	32.865	0.669						
	0.02	21.986	32.864	0.669	21.99	0.67	2.00E-03	3.51E-05	0.009	0.005
		21.984	32.864	0.669						
		21.988	32.864	0.669						
	0.03	21.987	32.867	0.669	21.99	0.67	1.73E-03	6.45E-05	0.008	0.010
		21.987	32.867	0.669						
		21.990	32.866	0.669						
0.05	21.984	32.865	0.669	21.99	0.67	2.08E-03	9.97E-06	0.009	0.001	
	21.987	32.869	0.669							
	21.988	32.870	0.669							

Continuación Anexo 3

Compuesto	Conc., mg/mL	Tiempos de retención, min			Tiempos de retención promedio, min		s	CV, %		
		t _R	t _{ISTD}	t _{RR}	t _R	t _{RR}		t _R	t _{RR}	
3-Hidroxi carbofurano	0.10	21.985	32.869	0.669	21.99	0.67	2.08E-03	2.12E-05	0.009	0.003
		21.985	32.871	0.669						
		21.984	32.869	0.669						
	0.20	21.981	32.868	0.669	21.98	0.67	5.77E-04	1.19E-05	0.003	0.002
		21.981	32.868	0.669						
		21.979	32.864	0.669						
	0.30	21.977	32.866	0.669	21.98	0.67	1.00E-03	3.67E-05	0.005	0.005
		21.978	32.865	0.669						
		21.976	32.861	0.669						
	0.50	21.977	32.866	0.669	21.98	0.67	1.00E-03	1.76E-05	0.005	0.003
		21.978	32.869	0.669						
		21.979	32.869	0.669						
	1.00	21.978	32.867	0.669	21.98	0.67	5.77E-04	4.58E-05	0.003	0.007
		21.978	32.865	0.669						
		21.979	32.864	0.669						
	2.00	21.979	32.868	0.669	21.98	0.67	1.73E-03	4.65E-05	0.008	0.007
		21.976	32.868	0.669						
		21.976	32.865	0.669						
	3.00	21.977	32.866	0.669	21.98	0.67	5.77E-04	2.56E-05	0.003	0.004
		21.977	32.865	0.669						
		21.976	32.866	0.669						
5.00	21.973	32.862	0.669	21.97	0.67	5.77E-04	3.05E-05	0.003	0.005	
	21.972	32.859	0.669							
	21.973	32.859	0.669							
7.00	21.979	32.862	0.669	21.98	0.67	1.00E-03	6.12E-05	0.005	0.009	
	21.977	32.865	0.669							
	21.978	32.864	0.669							
0.01	22.389	32.864	0.681	22.39	0.68	5.77E-04	5.60E-06	0.003	0.001	
	22.390	32.865	0.681							
	22.390	32.865	0.681							

Continuación Anexo 3

Compuesto	Conc., mg/mL	Tiempos de retención, min			Tiempos de retención promedio, min		s	CV, %	
		t _R	t _{ISTD}	t _{RR}	t _R	t _{RR}		t _R	t _{RR}
	0.02	22.388	32.864	0.681					
		22.385	32.864	0.681	22.39	0.68	1.73E-03	4.65E-05	0.008
		22.388	32.864	0.681					
	0.03	22.390	32.867	0.681					
		22.388	32.867	0.681	22.39	0.68	1.53E-03	5.61E-05	0.007
		22.391	32.866	0.681					
	0.05	22.386	32.865	0.681					
		22.389	32.869	0.681	22.39	0.68	2.08E-03	9.05E-06	0.009
		22.390	32.870	0.681					
	0.10	22.389	32.869	0.681					
		22.389	32.871	0.681	22.39	0.68	5.77E-04	2.15E-05	0.003
		22.388	32.869	0.681					
	0.20	22.386	32.868	0.681					
		22.386	32.868	0.681	22.38	0.68	1.15E-03	1.27E-05	0.005
		22.384	32.864	0.681					
	0.30	22.383	32.866	0.681					
		22.384	32.865	0.681	22.38	0.68	1.00E-03	3.75E-05	0.004
		22.382	32.861	0.681					
	0.50	22.383	32.866	0.681					
		22.385	32.869	0.681	22.38	0.68	1.15E-03	7.57E-07	0.005
		22.385	32.869	0.681					
	1.00	22.385	32.867	0.681					
		22.385	32.865	0.681	22.38	0.68	5.77E-04	4.64E-05	0.003
		22.386	32.864	0.681					
	2.00	22.387	32.868	0.681					
		22.385	32.868	0.681	22.39	0.68	1.15E-03	3.55E-05	0.005
		22.385	32.865	0.681					
	3.00	22.386	32.866	0.681					
		22.385	32.865	0.681	22.38	0.68	5.77E-04	1.55E-05	0.003
		22.385	32.866	0.681					

Continuación Anexo 3

Compuesto	Conc., mg/mL	Tiempos de retención, min			Tiempos de retención promedio, min		s	CV, %		
		t _R	t _{STD}	t _{RR}	t _R	t _{RR}		t _R	t _{RR}	
Carbaril	5.00	22.383	32.862	0.681						
		22.381	32.859	0.681	22.38	0.68	1.00E-03	1.80E-05	0.004	0.003
		22.382	32.859	0.681						
	7.00	22.389	32.862	0.681						
		22.387	32.865	0.681	22.39	0.68	1.00E-03	6.18E-05	0.004	0.009
		22.388	32.864	0.681						
	0.01	24.598	32.864	0.748						
		24.589	32.865	0.748	24.59	0.75	4.73E-03	1.53E-04	0.019	0.020
		24.596	32.865	0.748						
	0.02	24.593	32.864	0.748						
		24.588	32.864	0.748	24.59	0.75	4.51E-03	8.51E-05	0.018	0.011
		24.584	32.864	0.748						
	0.03	24.589	32.867	0.748						
		24.584	32.867	0.748	24.59	0.75	4.04E-03	1.34E-04	0.016	0.018
		24.592	32.866	0.748						
	0.05	24.582	32.865	0.748						
		24.582	32.869	0.748	24.58	0.75	2.31E-03	5.50E-05	0.009	0.007
		24.586	32.870	0.748						
	0.10	24.581	32.869	0.748						
		24.577	32.871	0.748	24.58	0.75	2.31E-03	9.65E-05	0.009	0.013
24.581		32.869	0.748							
0.20	24.568	32.868	0.747							
	24.565	32.868	0.747	24.56	0.75	3.00E-03	5.28E-05	0.012	0.007	
	24.562	32.864	0.747							
0.30	24.559	32.866	0.747							
	24.562	32.865	0.747	24.56	0.75	5.69E-03	1.22E-04	0.023	0.016	
	24.551	32.861	0.747							
0.50	24.553	32.866	0.747							
	24.557	32.869	0.747	24.55	0.75	2.08E-03	2.68E-05	0.008	0.004	
	24.556	32.869	0.747							

Continuación Anexo 3

Compuesto	Conc., mg/mL	Tiempos de retención, min			Tiempos de retención promedio, min		s	CV, %		
		t _R	t _{ISTD}	t _{RR}	t _R	t _{RR}		t _R	t _{RR}	
Methiocarb	1.00	24.549	32.867	0.747						
		24.549	32.865	0.747	24.55	0.75	1.15E-03	6.55E-05	0.005	0.009
		24.551	32.864	0.747						
	2.00	24.549	32.868	0.747						
		24.549	32.868	0.747	24.55	0.75	4.77E-07	3.94E-05	0.000	0.005
		24.549	32.865	0.747						
	3.00	24.541	32.866	0.747						
		24.542	32.865	0.747	24.54	0.75	5.77E-04	3.07E-05	0.002	0.004
		24.541	32.866	0.747						
	5.00	24.536	32.862	0.747						
		24.534	32.859	0.747	24.53	0.75	1.00E-03	2.00E-05	0.004	0.003
		24.535	32.859	0.747						
	7.00	24.540	32.862	0.747						
		24.539	32.865	0.747	24.54	0.75	1.00E-03	5.93E-05	0.004	0.008
		24.538	32.864	0.747						
	0.01	25.331	32.864	0.771						
		25.331	32.865	0.771	25.33	0.77	1.15E-03	3.07E-05	0.005	0.004
		25.333	32.865	0.771						
	0.02	25.331	32.864	0.771						
		25.329	32.864	0.771	25.33	0.77	1.00E-03	3.04E-05	0.004	0.004
		25.330	32.864	0.771						
0.03	25.332	32.867	0.771							
	25.331	32.867	0.771	25.33	0.77	1.53E-03	5.94E-05	0.006	0.008	
	25.334	32.866	0.771							
0.05	25.328	32.865	0.771							
	25.333	32.869	0.771	25.33	0.77	2.52E-03	4.32E-05	0.010	0.006	
	25.331	32.870	0.771							
0.10	25.330	32.869	0.771							
	25.329	32.871	0.771	25.33	0.77	1.53E-03	4.92E-05	0.006	0.006	
	25.327	32.869	0.771							

Continuación Anexo 3

Compuesto	Conc., mg/mL	Tiempos de retención			Tiempos de retención promedio		s	CV, %	
		t _R	t _{STD}	t _{RR}	t _R	t _{RR}		t _R	t _{RR}
	0.20	25.324	32.868	0.770					
		25.323	32.868	0.770	25.32	0.77	1.53E-03	1.83E-05	0.006
		25.321	32.864	0.770					
	0.30	25.319	32.866	0.770					
		25.320	32.865	0.770	25.32	0.77	2.08E-03	2.69E-05	0.008
		25.316	32.861	0.770					
	0.50	25.318	32.866	0.770					
		25.320	32.869	0.770	25.32	0.77	1.15E-03	5.46E-06	0.005
		25.320	32.869	0.770					
	1.00	25.318	32.867	0.770					
		25.317	32.865	0.770	25.32	0.77	5.77E-04	3.68E-05	0.002
		25.318	32.864	0.770					
	2.00	24.549	32.868	0.747					
		24.549	32.868	0.747	24.55	0.75	4.77E-07	3.94E-05	0.000
		24.549	32.865	0.747					
	3.00	25.315	32.866	0.770					
		25.315	32.865	0.770	25.31	0.77	0.00E+00	1.35E-05	0.000
		25.315	32.866	0.770					
	5.00	25.312	32.862	0.770					
		25.309	32.859	0.770	25.31	0.77	1.73E-03	1.21E-05	0.007
		25.309	32.859	0.770					
	7.00	25.317	32.862	0.770					
		25.315	32.865	0.770	25.32	0.77	1.15E-03	7.00E-05	0.005
		25.315	32.864	0.770					

ANEXO 4

ESTUDIO DE LA REPRODUCIBILIDAD DE LAS ÁREAS DE LOS PATRONES DE N-
METILCARBAMATOS DERIVADOS, DETERMINADOS POR HRGC/ μ -ECD

Compuesto	Conc., mg/mL	Área, cuentas			Area promedio, cuentas		s	CV, %		
		A _{analito}	A _{ISTD}	A _{analito} /A _{ISTD}	A _{analito}	A _{ISTD}		A _{analito}	A _{ISTD}	A _{analito} /A _{ISTD}
Propoxur	0.01	199.6	35197.9	0.006						
		206.0	34118.5	0.006	199	0.01	7.24E+00	2.84E-04	3.64	4.96
		191.6	34962.5	0.005						
	0.02	310.0	33399.7	0.009						
		310.5	32113.2	0.010	307	0.01	5.45E+00	3.64E-04	2.67	3.92
		300.8	33648.7	0.009						
	0.03	441.9	33184.4	0.013						
		451.6	33133.2	0.014	441	0.01	1.03E+01	1.60E-04	2.32	1.18
		431.1	31907.2	0.014						
	0.05	644.9	32719.6	0.020						
		688.5	31502.5	0.022	675	0.02	2.62E+01	1.11E-03	3.88	5.29
		691.8	32531.4	0.021						
	0.10	1233.4	33562.0	0.037						
		1227.9	32397.6	0.038	1231	0.04	3.03E+00	5.77E-04	0.25	1.55
		1232.8	33347.6	0.037						
	0.20	2467.0	32549.9	0.076						
		2447.9	31673.7	0.077	2474	0.08	3.11E+01	1.71E-03	1.26	2.26
		2508.7	33955.6	0.074						
	0.30	3553.8	32161.1	0.110						
		3484.5	32466.7	0.107	3519	0.11	3.46E+01	1.59E-03	0.98	1.46
		3519.1	32313.9	0.109						
	0.50	5606.6	32483.8	0.173						
		5557.6	32039.6	0.173	5564	0.17	4.03E+01	6.02E-03	0.73	3.55
		5526.5	33981.8	0.163						
	1.00	10892.1	32009.8	0.340						
		10762.4	32978.5	0.326	10815	0.33	6.80E+01	1.15E-02	0.63	3.50
		10791.7	33988.7	0.318						
	2.00	21815.3	33167.8	0.658						
		21699.4	33404.4	0.650	21810	0.65	1.09E+02	1.22E-02	0.50	1.88
		21916.7	34579.8	0.634						

Continuación Anexo 4

Compuesto	Conc., mg/mL	Área, cuentas			Área promedio, cuentas		s	CV, %		
		A _{analito}	A _{istd}	A _{analito} /A _{istd}	A _{analito}	A _{istd}		A _{analito}	A _{istd}	A _{analito} /A _{istd}
Promecarb	3.00	35864.6	32551.2	1.102	36008	1.09	2.08E+02	1.79E-02	0.58	1.64
		36247.0	33493.0	1.071						
		35912.9	32594.5	1.102						
	5.00	56901.3	33330.1	1.707	36008	1.72	2.08E+02	1.97E-02	0.58	1.14
		58382.5	34019.9	1.716						
		56371.4	32307.4	1.745						
	7.00	84399.2	35540.2	2.375	82748	2.43	1.52E+03	4.93E-02	1.83	2.03
		82429.9	33628.1	2.451						
		81415.6	33002.2	2.467						
	0.01	229.5	35197.9	0.007	227	0.01	4.60E+00	1.97E-04	2.03	3.01
		229.7	34118.5	0.007						
		221.6	34962.5	0.006						
	0.02	364.3	33399.7	0.011	363	0.01	1.40E+00	2.78E-04	0.39	2.53
		362.4	32113.2	0.011						
		361.6	33648.7	0.011						
	0.03	508.6	33184.4	0.015	512	0.01	7.74E+00	2.86E-04	1.51	1.83
		520.9	33133.2	0.016						
		506.7	31907.2	0.016						
	0.05	765.5	32719.6	0.023	782	0.02	1.43E+01	8.88E-04	1.83	3.66
		792.8	31502.5	0.025						
		786.4	32531.4	0.024						
	0.10	1425.4	33562.0	0.042	1421	0.04	4.57E+00	6.29E-04	0.32	1.46
		1416.3	32397.6	0.044						
		1421.2	33347.6	0.043						
	0.20	2684.1	32549.9	0.082	2682	0.08	2.81E+01	2.03E-03	1.05	2.47
		2653.4	31673.7	0.084						
		2709.6	33955.6	0.080						
	0.30	3886.5	32161.1	0.121	3866	0.12	2.08E+01	1.21E-03	0.54	1.01
		3844.8	32466.7	0.118						
		3865.6	32313.9	0.120						

Continuación Anexo 4

Compuesto	Conc., mg/mL	Área, cuentas			Área promedio, cuentas		s	CV, %		
		A _{analito}	A _{ISTD}	A _{analito} /A _{ISTD}	A _{analito}	A _{ISTD}		A _{analito}	A _{ISTD}	A _{analito} /A _{ISTD}
Carbofurano	0.50	6090.0	32483.8	0.187						
		6069.5	32039.6	0.189	6105	0.19	4.42E+01	4.36E-03	0.72	2.34
		6154.2	33981.8	0.181						
	1.00	11672.7	32009.8	0.365						
		11675.1	32978.5	0.354	11664	0.35	1.64E+01	1.10E-02	0.14	3.11
		11645.6	33988.7	0.343						
	2.00	23653.7	33167.8	0.713						
		23878.2	33404.4	0.715	23841	0.71	1.72E+02	1.17E-02	0.72	1.65
		23991.9	34579.8	0.694						
	3.00	36412.4	32551.2	1.119						
		37072.4	33493.0	1.087	36796	1.11	3.43E+02	2.31E-02	0.93	2.07
		36901.9	32594.5	1.132						
	5.00	58158.8	33330.1	1.745						
		59633.0	34019.9	1.753	58456	1.76	1.06E+03	1.96E-02	1.81	1.11
		57577.4	32307.4	1.782						
	7.00	90195.9	35540.2	2.538						
		88623.7	33628.1	2.635	88922	2.61	1.15E+03	6.65E-02	1.30	2.54
		87945.6	33002.2	2.665						
	0.01	87.2	35197.9	0.002						
		88.4	34118.5	0.003	88	0.00	6.32E-01	5.98E-05	0.72	2.37
		87.4	34962.5	0.002						
	0.02	139.7	33399.7	0.004						
		140.1	32113.2	0.004	141	0.00	2.20E+00	8.97E-05	1.56	2.10
		143.7	33648.7	0.004						
	0.03	186.8	33184.4	0.006						
		203.7	33133.2	0.006	192	0.01	1.02E+01	2.64E-04	5.33	4.50
		185.3	31907.2	0.006						
	0.05	269.5	32719.6	0.008						
		285.8	31502.5	0.009	280	0.01	9.01E+00	4.21E-04	3.22	4.84
		284.3	32531.4	0.009						

Continuación Anexo 4

Compuesto	Conc., mg/mL	Área, cuentas			Área promedio, cuentas		s	CV, %		
		A _{analito}	A _{ISTD}	A _{analito} /A _{ISTD}	A _{analito}	A _{ISTD}		A _{analito}	A _{ISTD}	A _{analito} /A _{ISTD}
3-Hidroxi carbofurano	0.10	475.5	33562.0	0.014						
		485.3	32397.6	0.015	479	0.01	5.51E+00	4.21E-04	1.15	2.90
		476.1	33347.6	0.014						
	0.20	852.7	32549.9	0.026						
		864.8	31673.7	0.027	867	0.03	1.50E+01	7.06E-04	1.74	2.66
		882.6	33955.6	0.026						
	0.30	1182.3	32161.1	0.037						
		1155.4	32466.7	0.036	1169	0.04	1.34E+01	5.86E-04	1.15	1.62
		1168.8	32313.9	0.036						
	0.50	1705.2	32483.8	0.052						
		1679.2	32039.6	0.052	1697	0.05	1.55E+01	1.28E-03	0.91	2.48
		1706.9	33981.8	0.050						
	1.00	3077.9	32009.8	0.096						
		2978.9	32978.5	0.090	3033	0.09	5.03E+01	3.61E-03	1.66	3.92
		3043.8	33988.7	0.090						
	2.00	5892.5	33167.8	0.178						
		5948.5	33404.4	0.178	5931	0.16	3.30E+01	3.34E-03	0.56	1.90
		5950.9	34579.8	0.172						
	3.00	9366.6	32551.2	0.288						
		9491.3	33493.0	0.280	9433	0.29	6.28E+01	5.32E-03	0.67	1.86
		9442.3	32594.5	0.290						
	5.00	15090.7	33330.1	0.453						
		15544.4	34019.9	0.457	15167	0.46	3.45E+02	3.70E-03	2.28	0.81
		14866.4	32307.4	0.460						
	7.00	23705.9	35540.2	0.667						
		23218.6	33628.1	0.690	23307	0.68	3.62E+02	1.57E-02	1.55	2.29
		22997.9	33002.2	0.697						
	0.01	691.9	35197.9	0.020						
		688.6	34118.5	0.020	677	0.02	2.30E+01	8.04E-04	3.40	4.13
		650.4	34962.5	0.019						

Continuación Anexo 4

Compuesto	Conc., mg/mL	Área, cuentas			área promedio, cuentas		s	CV, %		
		A _{analito}	A _{ISTD}	A _{analito} /A _{ISTD}	A _{analito}	A _{ISTD}		A _{analito}	A _{ISTD}	A _{analito} /A _{ISTD}
	0.02	984.0	33399.7	0.029						
		963.1	32113.2	0.030	963	0.03	2.03E+01	1.01E-03	2.11	3.47
		943.3	33648.7	0.028						
	0.03	1457.9	33184.4	0.044						
		1498.9	33133.2	0.045	1460	0.04	3.78E+01	6.52E-04	2.59	1.46
		1423.4	31907.2	0.045						
	0.05	2223.9	32719.6	0.068						
		2371.9	31502.5	0.075	2306	0.07	1.75E+02	3.66E-03	0.88	5.12
		2322.5	32531.4	0.071						
	0.10	4161.5	33562.0	0.124						
		4083.8	32397.6	0.126	4108	0.12	4.60E+01	1.45E-03	1.12	1.17
		4080.0	33347.6	0.123						
	0.20	8917.8	32549.9	0.274						
		8850.9	31673.7	0.279	8910	0.27	5.59E+01	7.87E-03	0.63	2.89
		8962.0	33955.6	0.264						
	0.30	12986.8	32161.1	0.404						
		12887.6	32466.7	0.397	12937	0.40	4.96E+01	3.43E-03	0.38	0.86
		12937.2	32313.9	0.400						
	0.50	19883.3	32483.8	0.612						
		19575.7	32039.6	0.611	19777	0.60	1.75E+02	1.54E-02	0.88	2.56
		19873.0	33981.8	0.585						
	1.00	39169.5	32009.8	1.224						
		37952.1	32978.5	1.151	38626	1.17	6.19E+02	4.54E-02	1.60	3.87
		38757.9	33988.7	1.140						
	2.00	76015.0	33167.8	2.292						
		75779.2	33404.4	2.269	76108	2.26	3.84E+02	4.04E-02	0.50	1.79
		76530.0	34579.8	2.213						
	3.00	115122.0	32551.2	3.537						
		115324.0	33493.0	3.437	115396	3.51	3.17E+02	6.20E-02	0.27	1.77
		115743.0	32594.5	3.551						

Continuación Anexo 4

Compuesto	Conc., mg/mL	Área, cuentas			Área promedio, cuentas		s	CV, %		
		A _{analito}	A _{ISTD}	A _{analito} /A _{ISTD}	A _{analito}	A _{ISTD}		A _{analito}	A _{ISTD}	A _{analito} /A _{ISTD}
Carbaril	5.00	173752.0	33330.1	5.213	173474	5.22	1.95E+03	7.72E-02	1.12	1.48
		175269.8	34019.9	5.152						
		171401.0	32307.4	5.305						
	7.00	248456.0	35540.2	6.991	244145	7.17	3.86E+03	1.62E-01	1.58	2.26
		242980.0	33628.1	7.226						
		241000.0	33002.2	7.303						
	0.01	318.9	35197.9	0.009	318	0.01	8.09E-01	1.36E-04	0.25	1.48
		317.5	34118.5	0.009						
		317.5	34962.5	0.009						
	0.02	424.2	33399.7	0.013	414	0.01	1.13E+01	5.18E-04	2.73	4.13
		415.2	32113.2	0.013						
		401.8	33648.7	0.012						
	0.03	651.4	33184.4	0.020	662	0.02	2.14E+01	5.50E-04	3.23	2.72
		686.5	33133.2	0.021						
		647.7	31907.2	0.020						
	0.05	1029.7	32719.6	0.031	1066	0.03	3.21E+01	1.55E-03	3.01	4.68
		1088.7	31502.5	0.035						
		1081.2	32531.4	0.033						
	0.10	2092.5	33562.0	0.062	2064	0.06	2.49E+01	5.95E-04	1.21	0.95
		2046.5	32397.6	0.063						
		2052.8	33347.6	0.062						
	0.20	4639.8	32549.9	0.143	4616	0.14	2.76E+01	5.56E-03	0.60	3.94
		4621.4	31673.7	0.146						
		4585.5	33955.6	0.135						
	0.30	6840.7	32161.1	0.213	6838	0.21	2.94E+00	1.09E-03	0.04	0.52
		6834.8	32466.7	0.211						
		6837.8	32313.9	0.212						
	0.50	10890.9	32483.8	0.335	10880	0.33	2.43E+01	9.58E-03	0.22	2.89
		10852.4	32039.6	0.339						
		10897.2	33981.8	0.321						

Continuación Anexo 4

Compuesto	Conc., mg/mL	Área, cuentas			Área promedio, cuentas		s	CV, %		
		A _{analito}	A _{ISTD}	A _{analito} / A _{ISTD}	A _{analito}	A _{ISTD}		A _{analito}	A _{ISTD}	A _{analito} / A _{ISTD}
Methiocarb	1.00	22739.9	32009.8	0.710						
		22768.6	32978.5	0.690	22615	0.67	2.42E+02	2.69E-02	1.07	3.92
		22335.3	33988.7	0.657						
	2.00	44328.5	33167.8	1.336						
		44807.2	33404.4	1.341	44755	1.33	4.03E+02	1.97E-02	0.90	1.48
		45128.5	34579.8	1.305						
	3.00	73174.2	32551.2	2.248						
		73502.2	33493.0	2.185	73180	2.22	3.19E+02	3.35E-02	0.44	1.51
		72863.4	32594.5	2.235						
	5.00	115672.0	33330.1	3.470						
		117918.0	34019.9	3.466	115151	3.47	3.06E+03	4.02E-03	2.66	0.12
		111863.0	32307.4	3.462						
	7.00	166970.0	35540.2	4.698						
		163216.0	33628.1	4.854	163538	4.80	3.28E+03	9.20E-02	2.01	1.92
		160427.0	33002.2	4.861						
	0.01	524.7	35197.9	0.015						
		516.9	34118.5	0.015	512	0.01	1.52E+01	5.11E-04	2.96	3.47
		495.4	34962.5	0.014						
	0.02	828.5	33399.7	0.025						
		828.3	32113.2	0.026	827	0.02	3.01E+00	6.90E-04	0.36	2.76
		823.2	33648.7	0.024						
	0.03	1201.0	33184.4	0.036						
		1259.9	33133.2	0.038	1217	0.04	3.78E+01	9.22E-04	3.11	2.48
		1189.3	31907.2	0.037						
	0.05	1894.3	32719.6	0.058						
		1991.9	31502.5	0.063	1946	0.06	4.91E+01	2.68E-03	2.52	4.44
		1953.2	32531.4	0.060						
	0.10	3812.2	33562.0	0.114						
		3814.9	32397.6	0.118	3808	0.11	1.05E+01	2.16E-03	0.28	1.88
		3795.6	33347.6	0.115						

Continuación Anexo 4

Compuesto	Conc., mg/mL	Área, cuentas			Área promedio, cuentas		s	CV, %		
		A _{analito}	A _{ISTD}	A _{analito} /A _{ISTD}	A _{analito}	A _{ISTD}		A _{analito}	A _{ISTD}	A _{analito} /A _{ISTD}
	0.20	7972.4	32549.9	0.245						
		7993.9	31673.7	0.252	7994	0.24	2.13E+01	8.18E-03	0.27	3.35
		8015.0	33955.6	0.236						
	0.30	11819.7	32161.1	0.368						
		11741.2	32466.7	0.362	11780	0.36	3.92E+01	2.94E-03	0.33	0.81
		11780.5	32313.9	0.365						
	0.50	19379.8	32483.8	0.597						
		19460.6	32039.6	0.607	19398	0.59	5.54E+01	1.95E-02	0.29	3.30
		19354.5	33981.8	0.570						
	1.00	36824.6	32009.8	1.150						
		36609.9	32978.5	1.110	36688	1.11	1.19E+02	3.64E-02	0.32	3.27
		36628.9	33988.7	1.078						
	2.00	72973.4	33167.8	2.200						
		73474.5	33404.4	2.200	73589	2.18	6.80E+02	2.92E-02	0.92	1.34
		74318.4	34579.8	2.149						
	3.00	111264.0	32551.2	3.418						
		113090.0	33493.0	3.322	112232	3.40	9.18E+02	6.53E-02	0.82	1.92
		112341.0	32594.5	3.447						
	5.00	169128.0	33330.1	5.074						
		173868.0	34019.9	5.111	169986	5.12	3.53E+03	4.72E-02	2.08	0.92
		166961.0	32307.4	5.168						
	7.00	248576.0	35540.2	6.994						
		243760.0	33628.1	7.249	244781	7.19	3.40E+03	1.76E-01	1.39	2.45
		242008.0	33002.2	7.333						

ANEXO 5

ESTUDIO DE LA REPRODUCIBILIDAD DE LOS FACTORES DE RESPUESTA DE LOS
PATRONES DE N-METILCARBAMATOS DERIVADOS, DETERMINADOS POR HRGC/ μ -ECD

Compuesto	Conc., mg/mL	Factores de respuesta		R _f promedio		s	CV, %		
		R _f	RR _f	R _f	RR _f		R _f	RR _f	
Propoxur	0.01	19961.8	1.134	19906	1.15	7.24E+02	5.68E-02	3.64	4.96
		20601.0	1.208						
		19156.4	1.096						
	0.02	15502.2	0.928	15356	0.94	2.72E+02	2.33E-02	1.77	2.48
		15523.6	0.965						
		15041.6	0.923						
	0.03	14728.4	0.888	14718	0.90	3.42E+02	1.06E-02	2.32	1.18
		15054.6	0.909						
		14371.3	0.901						
	0.05	12898.9	0.788	13502	0.84	5.23E+02	4.43E-02	3.88	5.29
		13770.4	0.874						
		13836.3	0.851						
	0.10	12333.9	0.735	12314	0.74	3.03E+01	1.22E-02	0.25	1.64
		12278.9	0.758						
		12328.3	0.739						
	0.20	12335.0	0.758	12373	0.76	1.55E+02	1.71E-02	1.26	2.26
		12239.6	0.773						
		12543.3	0.739						
	0.30	11845.9	0.737	11730	0.73	1.15E+02	1.06E-02	0.98	1.46
		11614.9	0.715						
		11730.4	0.726						
	0.50	11213.1	0.690	11127	0.68	8.07E+01	2.41E-02	0.73	3.55
		11115.2	0.694						
		11053.1	0.651						
1.00	10892.1	0.681	10815	0.66	6.80E+01	2.30E-02	0.63	3.50	
	10762.4	0.653							
	10791.7	0.635							
2.00	10907.7	0.658	10905	0.65	5.44E+01	1.22E-02	0.50	1.88	
	10849.7	0.650							
	10958.4	0.634							

Continuación Anexo 5

Compuesto	Conc., mg/mL	Factores de respuesta		R _f promedio		s		C.V. %	
		R _f	RR _f	R _f	RR _f	R _f	RR _f	R _f	RR _f
Promecarb	3.00	11954.9	0.735	12003	0.73	6.94E+01	7.53E-03	0.58	1.03
		12082.3	0.721						
		11971.0	0.735						
	5.00	11380.3	0.683	11444	0.69	2.08E+02	7.87E-03	1.82	1.14
		11676.5	0.686						
		11274.3	0.698						
	7.00	12057.0	0.679	11821	0.69	2.17E+02	1.41E-02	1.83	2.03
		11775.7	0.700						
		11630.8	0.705						
	0.01	22948.0	1.304	22691	1.31	4.60E+02	3.93E-02	2.03	3.01
		22966.2	1.346						
		22160.2	1.268						
	0.02	18214.8	1.091	18138	1.10	6.99E+01	2.99E-02	0.39	2.72
		18122.0	1.134						
		18077.8	1.077						
	0.03	16951.7	1.022	17068	1.04	2.58E+02	1.90E-02	1.51	1.83
		17363.8	1.048						
		16888.9	1.059						
	0.05	15310.3	0.936	15632	0.97	2.86E+02	3.55E-02	1.83	3.66
		15856.8	1.007						
		15728.6	0.967						
	0.10	14254.0	0.849	14210	0.86	4.57E+01	1.36E-02	0.32	1.58
		14162.8	0.874						
		14211.9	0.852						
	0.20	13420.4	0.825	13412	0.82	1.41E+02	2.03E-02	1.05	2.47
		13267.2	0.838						
		13548.0	0.798						
	0.30	12954.8	0.806	12885	0.80	6.94E+01	8.07E-03	0.54	1.01
		12816.1	0.789						
		12885.5	0.798						

Continuación Anexo 5

Compuesto	Conc., mg/mL	Factores de respuesta		R _f promedio		s	CV, %		
		R _f	RR _f	R _f	RR _f		R _f	RR _f	
Carbofurano	0.50	12180.1	0.750	12209	0.74	8.84E+01	1.74E-02	0.72	2.34
		12139.1	0.758						
		12308.4	0.724						
	1.00	11672.7	0.729	11664	0.71	1.64E+01	2.20E-02	0.14	3.11
		11675.1	0.708						
		11645.6	0.685						
	2.00	11826.9	0.713	11921	0.71	8.60E+01	1.17E-02	0.72	1.65
		11939.1	0.715						
		11996.0	0.694						
	3.00	12137.5	0.746	12265	0.75	1.14E+02	8.43E-03	0.93	1.13
		12357.5	0.738						
		12300.6	0.755						
	5.00	11631.8	0.698	11691	0.70	211.924247	7.84E-03	1.81	1.11
		11926.6	0.701						
		11515.5	0.713						
	7.00	12885.1	0.725	12703	0.75	164.910639	1.90E-02	1.30	2.54
		12660.5	0.753						
		12563.7	0.761						
	0.01	8716.7	0.495	8764	0.50	6.32E+01	1.20E-02	0.72	2.37
		8836.0	0.518						
		8740.2	0.500						
	0.02	6985.3	0.418	7058	0.42	1.10E+02	1.03E-02	1.56	2.43
		7004.3	0.435						
		7184.9	0.416						
	0.03	6227.2	0.375	6398	0.39	3.41E+02	1.76E-02	5.33	4.50
		6790.8	0.410						
		6177.4	0.387						
	0.05	5390.9	0.330	5598	0.35	1.80E+02	1.68E-02	3.22	4.84
		5716.8	0.363						
		5686.6	0.350						

Continuación Anexo 5

Compuesto	Conc., mg/mL	Factores de respuesta		R _f promedio		s		C.V. %	
		R _f	RR _f	R _f	RR _f	R _f	RR _f	R _f	RR _f
3-hidroxi carbofurano	0.10	4755.4	0.283	4790	0.29	5.51E+01	8.82E-03	1.15	3.05
		4853.4	0.300						
		4760.6	0.286						
	0.20	4263.4	0.262	4333	0.26	7.52E+01	7.06E-03	1.74	2.66
		4324.1	0.273						
		4412.9	0.260						
	0.30	3940.8	0.245	3896	0.24	4.47E+01	3.91E-03	1.15	1.62
		3851.4	0.237						
		3896.1	0.241						
	0.50	3410.5	0.210	3394	0.21	3.10E+01	5.14E-03	0.91	2.48
		3358.4	0.210						
		3413.8	0.201						
	1.00	3077.9	0.192	3033	0.18	5.03E+01	7.22E-03	1.66	3.92
		2978.9	0.181						
		3043.8	0.179						
	2.00	2946.3	0.178	2965	0.18	1.65E+01	3.34E-03	0.56	1.90
		2974.2	0.178						
		2975.4	0.172						
	3.00	3122.2	0.192	3144	0.19	2.09E+01	2.15E-03	0.67	1.13
		3163.8	0.189						
		3147.4	0.193						
	5.00	3018.1	0.181	3033	0.18	6.91E+01	1.48E-03	2.28	0.81
		3108.9	0.183						
		2973.3	0.184						
	7.00	3386.6	0.191	3330	0.20	5.18E+01	4.49E-03	1.55	2.29
		3316.9	0.197						
		3285.4	0.199						
	0.01	69186.0	3.931	67693	3.90	2.30E+03	1.61E-01	3.40	4.13
		68855.5	4.036						
		65039.1	3.721						

Continuación Anexo 5

Compuesto	Conc., mg/mL	Factores de respuesta		R _f promedio		s	C.V. %		
		R _f	RR _f	R _f	RR _f		R _f	RR _f	RR _f
	0.02	49197.6	2.946						
		48154.5	3.064	48172	2.96	1.02E+03	1.01E-01	2.11	3.43
		47164.9	2.862						
	0.03	48597.7	2.929						
		49962.0	3.016	48669	2.97	1.26E+03	4.35E-02	2.59	1.46
		47447.9	2.974						
	0.05	44478.9	2.719						
		47437.4	3.012	46122	2.86	1.51E+03	1.47E-01	3.27	5.12
		46449.5	2.856						
	0.10	41615.1	2.480						
		40838.3	2.521	41084	2.48	4.60E+02	3.71E-02	1.12	1.50
		40799.7	2.447						
	0.20	44589.0	2.740						
		44254.6	2.794	44551	2.72	2.80E+02	7.87E-02	0.63	2.89
		44810.1	2.639						
	0.30	43289.3	2.692						
		42958.7	2.646	43124	2.67	1.65E+02	2.29E-02	0.38	0.86
		43124.0	2.669						
	0.50	39766.6	2.448						
		39151.4	2.444	39555	2.41	3.49E+02	6.18E-02	0.88	2.56
		39746.0	2.339						
	1.00	39169.5	2.447						
		37952.1	2.302	38626	2.34	6.19E+02	9.08E-02	1.60	3.87
		38757.9	2.281						
	2.00	38007.5	2.292						
		37889.6	2.269	38054	2.26	1.92E+02	4.04E-02	0.50	1.79
		38265.0	2.213						
	3.00	38374.0	2.358						
		38441.3	2.295	38465	2.34	1.06E+02	3.90E-02	0.27	1.67
		38581.0	2.367						

Continuación Anexo 5

Compuesto	Conc., mg/mL	Factores de respuesta		R _f promedio		s		C.V. %	
		R _f	RR _f	R _f	RR _f	R _f	RR _f	R _f	RR _f
Carbaril	5.00	34750.4	2.085	34695	2.09	3.90E+02	3.09E-02	1.12	1.48
		35054.0	2.061						
		34280.2	2.122						
	7.00	35493.7	1.997	34878	2.05	5.52E+02	4.64E-02	1.58	2.26
		34711.4	2.064						
		34428.6	2.086						
	0.01	31891.0	1.812	31798	1.83	8.09E+01	2.71E-02	0.25	1.48
		31749.1	1.861						
		31752.8	1.816						
	0.02	21211.1	1.270	20687	1.27	5.64E+02	4.37E-02	2.73	3.43
		20761.0	1.321						
		20089.8	1.234						
	0.03	21713.6	1.309	22063	1.35	7.14E+02	3.67E-02	3.23	2.72
		22883.9	1.381						
		21591.2	1.353						
	0.05	20593.7	1.259	21330	1.32	6.42E+02	6.20E-02	3.01	4.68
		21773.8	1.382						
		21623.5	1.329						
	0.10	20924.7	1.247	20639	1.25	2.49E+02	1.61E-02	1.21	1.29
		20465.1	1.263						
		20527.6	1.231						
	0.20	23199.0	1.425	23078	1.41	1.38E+02	5.56E-02	0.60	3.94
		23107.2	1.459						
		22927.6	1.350						
	0.30	22802.3	1.418	22792	1.41	9.79E+00	7.28E-03	0.04	0.52
		22782.7	1.403						
		22792.5	1.411						
	0.50	21781.8	1.341	21760	1.33	4.85E+01	3.83E-02	0.22	2.89
		21704.8	1.355						
		21794.4	1.283						

Continuación Anexo 5

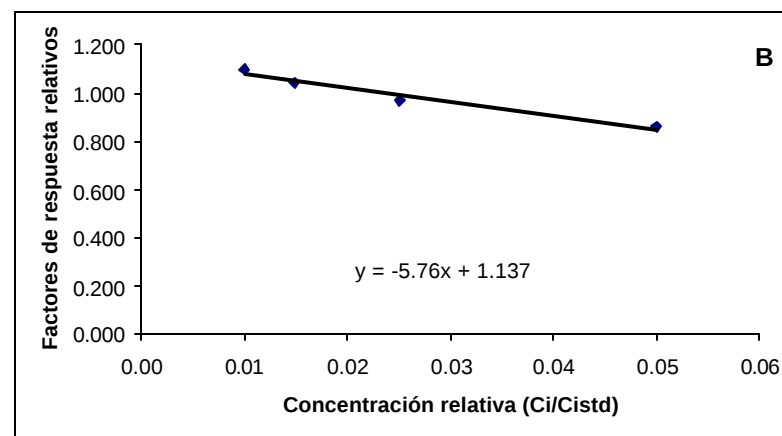
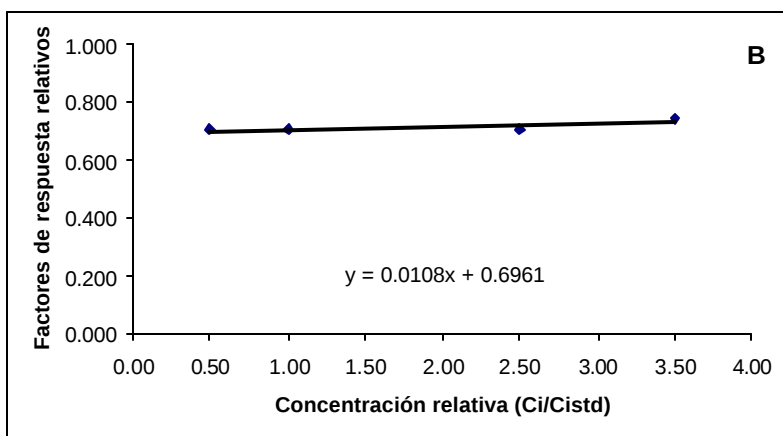
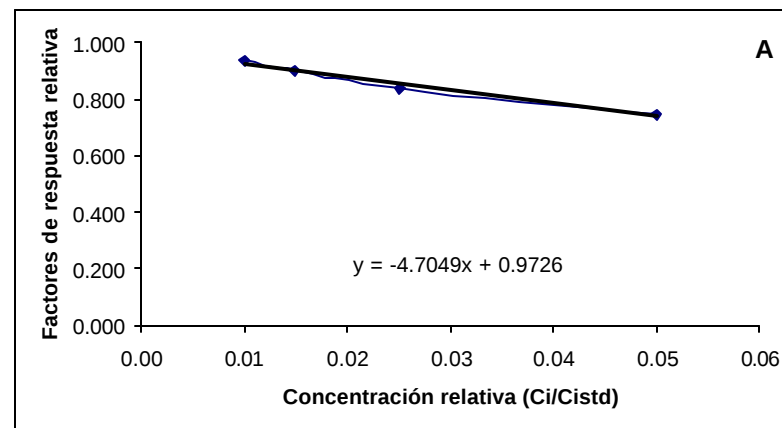
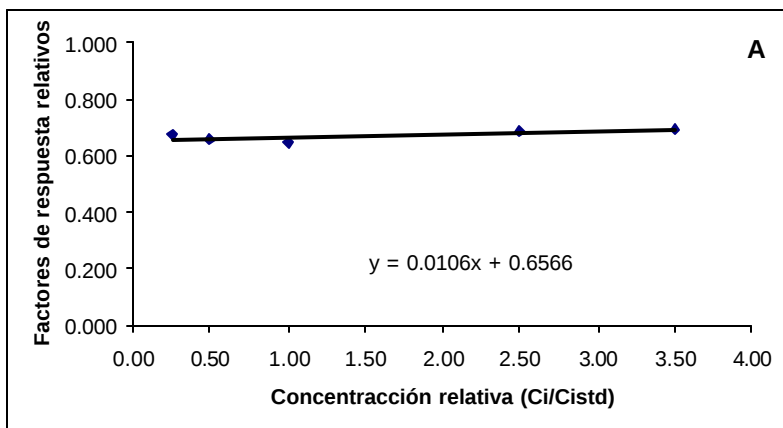
Compuesto	Conc., mg/mL	Factores de respuesta		R _f promedio		s		C.V. %	
		R _f	RR _f	R _f	RR _f	R _f	RR _f	R _f	RR _f
Methiocarb	1.00	22739.9	1.421	22615	1.37	2.42E+02	5.38E-02	1.07	3.92
		22768.6	1.381						
		22335.3	1.314						
	2.00	22164.3	1.336	22377	1.33	2.01E+02	1.97E-02	0.90	1.48
		22403.6	1.341						
		22564.3	1.305						
	3.00	24391.4	1.499	24393	1.48	1.06E+02	1.86E-02	0.44	1.26
		24500.7	1.463						
		24287.8	1.490						
	5.00	23134.4	1.388	23030	1.39	6.12E+02	1.61E-03	2.66	0.12
		23583.6	1.386						
		22372.6	1.385						
	7.00	23852.9	1.342	2336	1.37	4.69E+02	2.63E-02	2.01	1.92
		23316.6	1.387						
		22918.1	1.389						
	0.01	52466.4	2.981	51233	2.95	1.52E+03	1.02E-01	2.96	3.47
		51693.4	3.030						
		49539.4	2.834						
	0.02	41425.6	2.481	41334	2.501	1.51E+02	6.35E-02	0.36	2.53
		41416.2	2.580						
		41160.2	2.462						
	0.03	40032.0	2.413	40557	2.48	1.26E+03	6.15E-02	3.11	2.48
		41995.9	2.535						
		39642.5	2.485						
	0.05	37885.4	2.316	38928	2.41	9.83E+02	1.07E-01	2.52	4.44
		39837.1	2.529						
		39063.1	2.402						
	0.10	38121.8	2.272	38075	2.30	1.05E+02	4.68E-02	0.28	2.04
		38149.3	2.355						
		37955.6	2.276						

Continuación Anexo 5

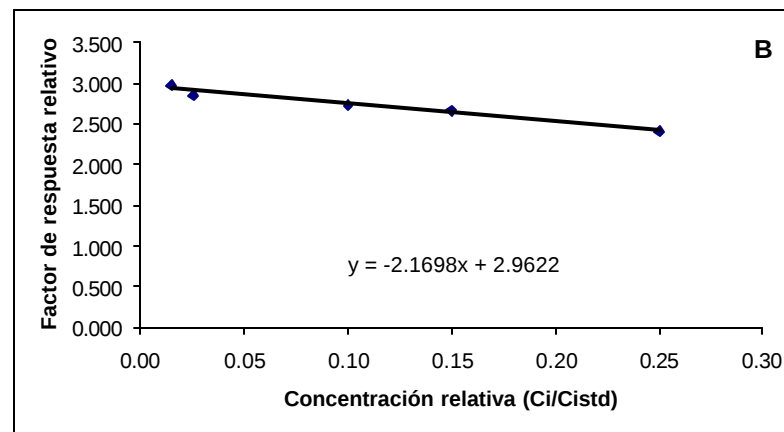
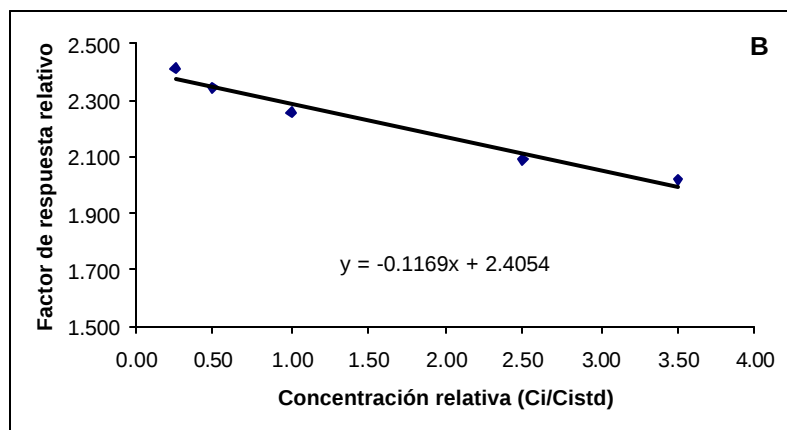
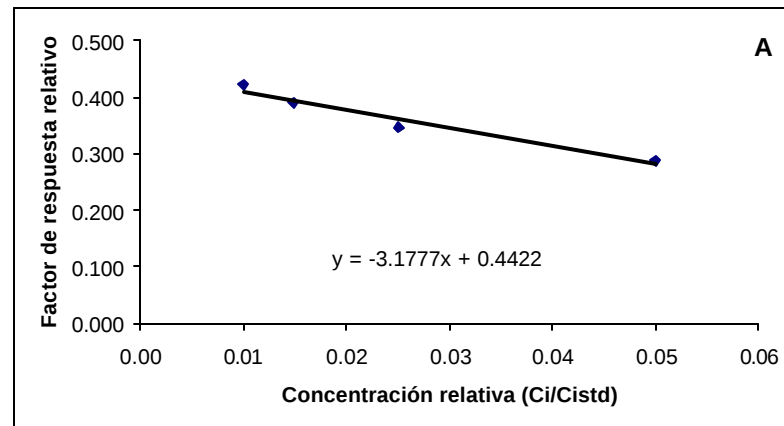
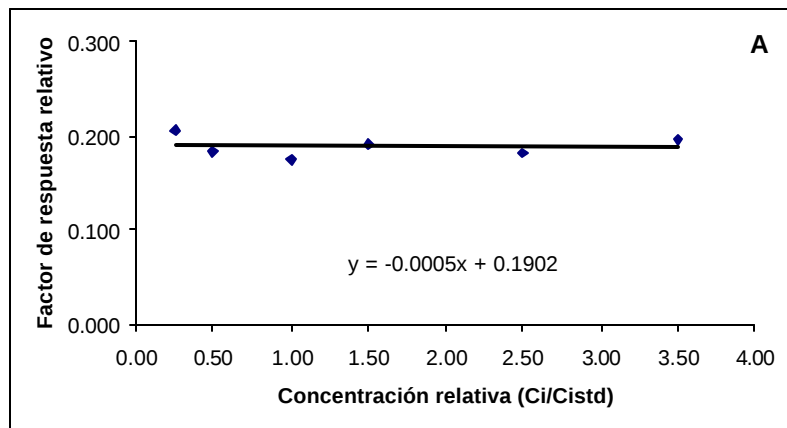
Compuesto	Conc., mg/mL	Factores de respuesta		R _f promedio		s		C.V. %	
		R _f	RR _f	R _f	RR _f	R _f	RR _f	R _f	RR _f
	0.20	39862.2	2.449						
		39969.5	2.524	39969	2.44	1.07E+02	8.18E-02	0.27	3.35
		40075.2	2.360						
	0.30	39399.0	2.450						
		39137.3	2.411	39268	2.43	1.31E+02	1.96E-02	0.33	0.81
		39268.2	2.430						
	0.50	38759.6	2.386						
		38921.2	2.430	38797	2.36	1.11E+02	7.80E-02	0.29	3.30
		38709.0	2.278						
	1.00	36824.6	2.301						
		36609.9	2.220	36688	2.22	1.19E+02	7.29E-02	0.32	3.27
		36628.9	2.155						
	2.00	36486.7	2.200						
		36737.3	2.200	36794	2.18	3.40E+02	2.92E-02	0.92	1.34
		37159.2	2.149						
	3.00	37088.0	2.279						
		37696.7	2.251	37411	2.28	3.06E+02	2.35E-02	0.82	1.03
		37447.0	2.298						
	5.00	33825.6	2.030						
		34773.6	2.044	33997	2.05	7.06E+02	1.89E-02	2.08	0.92
		33392.2	2.067						
	7.00	35510.9	1.998						
		34822.9	2.071	34969	2.05	4.86E+02	5.04E-02	1.39	2.45
		34572.6	2.095						

ANEXO 6

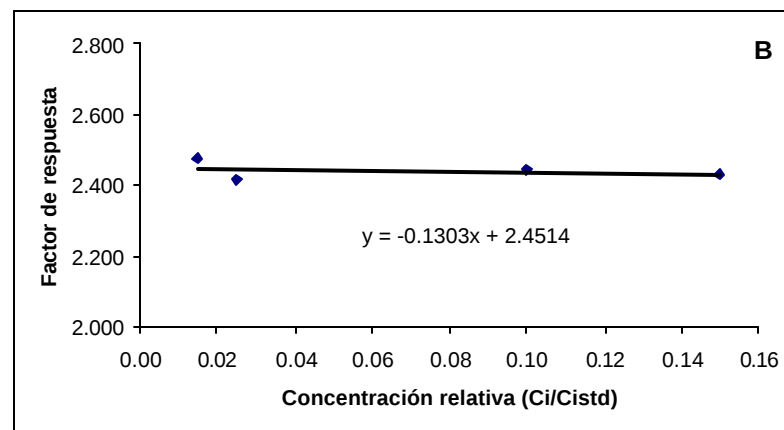
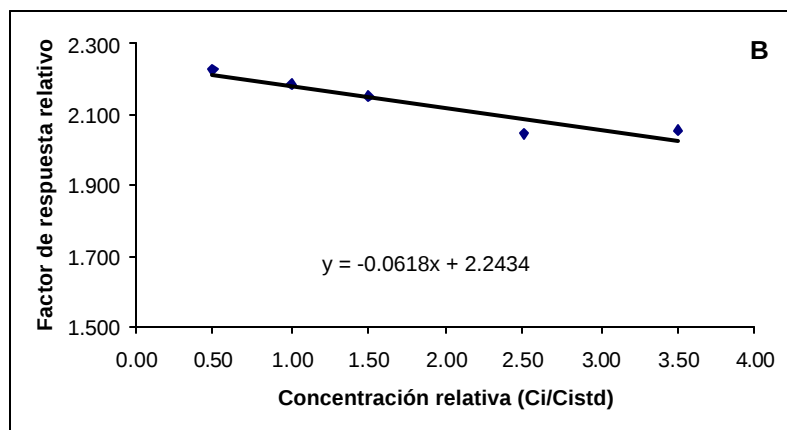
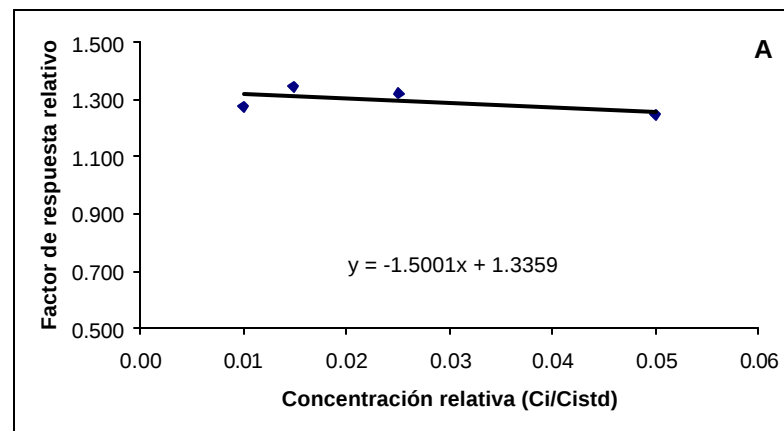
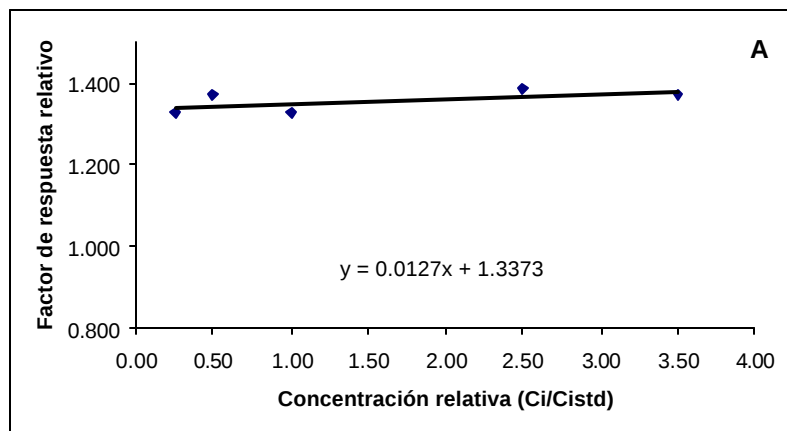
FACTORES DE RESPUESTA RELATIVOS DEL μ -ECD Vs CONCENTRACIÓN RELATIVA DE
LOS PATRONES DE N-METILCARBAMATOS DERIVADOS



Rango dinámico lineal del μ -ECD en el nivel de concentración alto (0.5 – 7.0 $\mu\text{g/mL}$) y bajo (0.01 – 0.3 $\mu\text{g/mL}$) para: A. propoxur y B. promecarb.



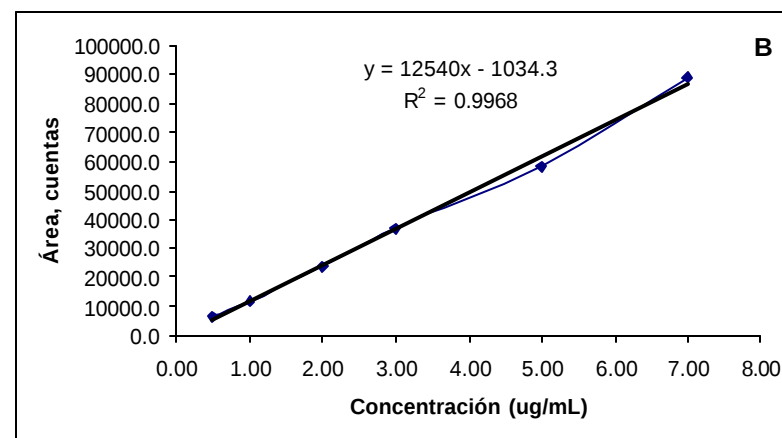
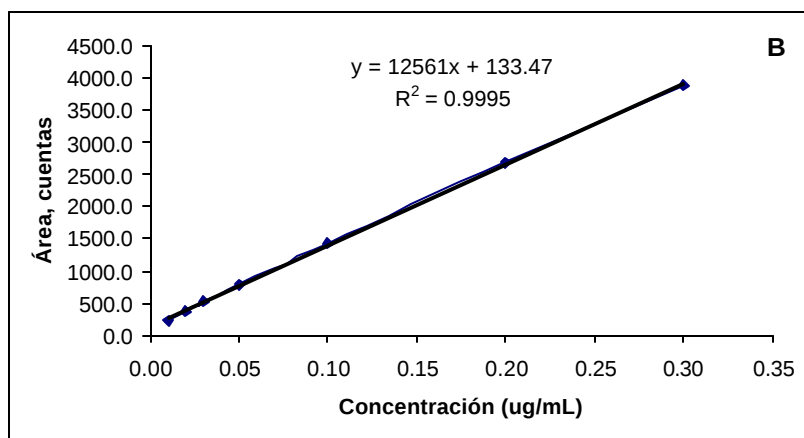
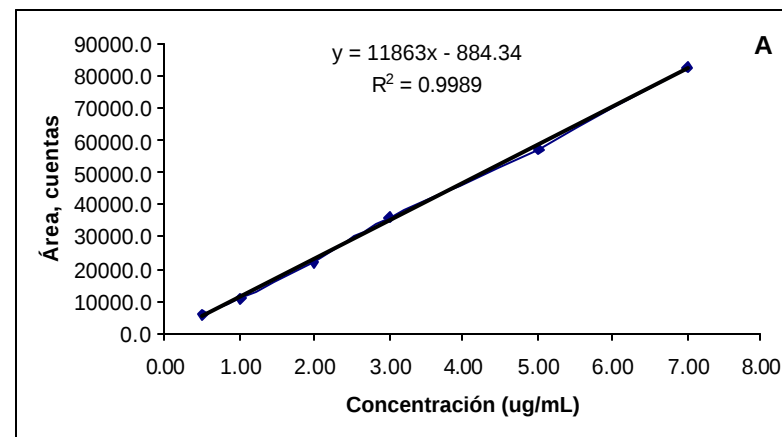
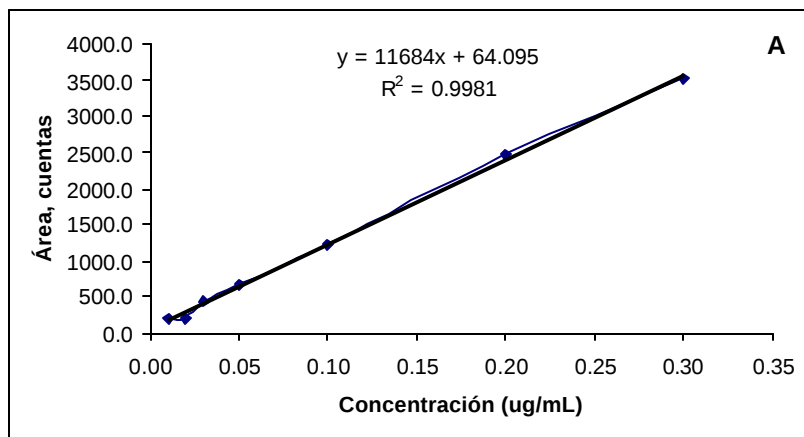
Rango dinámico lineal del μ -ECD en el nivel de concentración alto (0.5 – 7.0 $\mu\text{g/mL}$) y bajo (0.01 – 0.3 $\mu\text{g/mL}$) para: A. carbofurano y B. 3-hidroxicarbofurano.



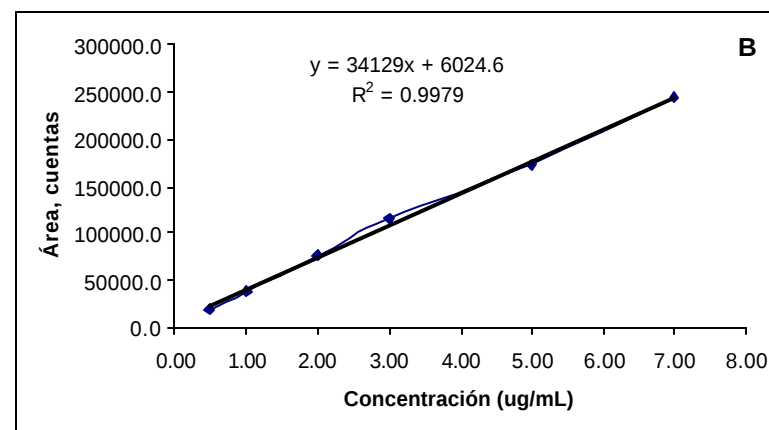
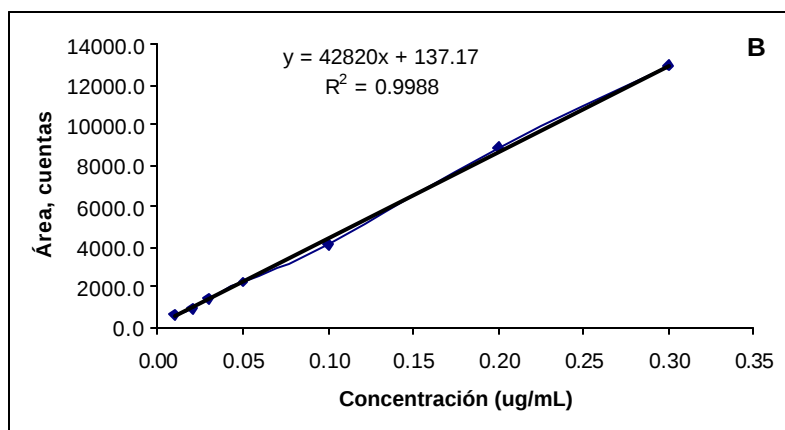
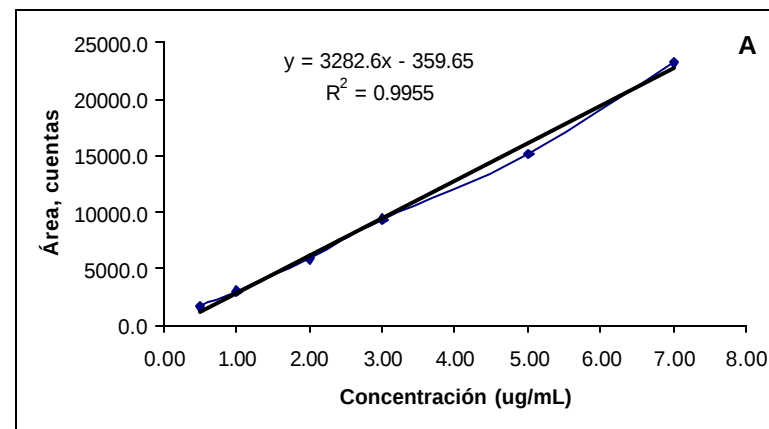
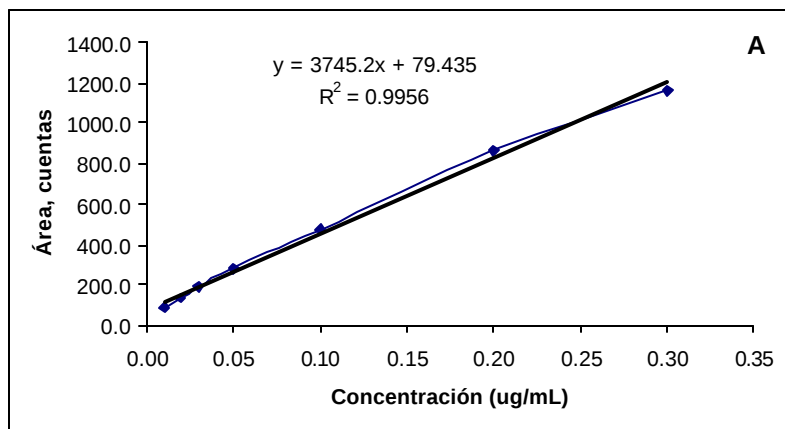
Rango dinámico lineal del μ -ECD en el nivel de concentración alto (0.5 – 7.0 $\mu\text{g/mL}$) y bajo (0.01 – 0.3 $\mu\text{g/mL}$) para: A. carbaril y B. methiocarb.

ANEXO 7

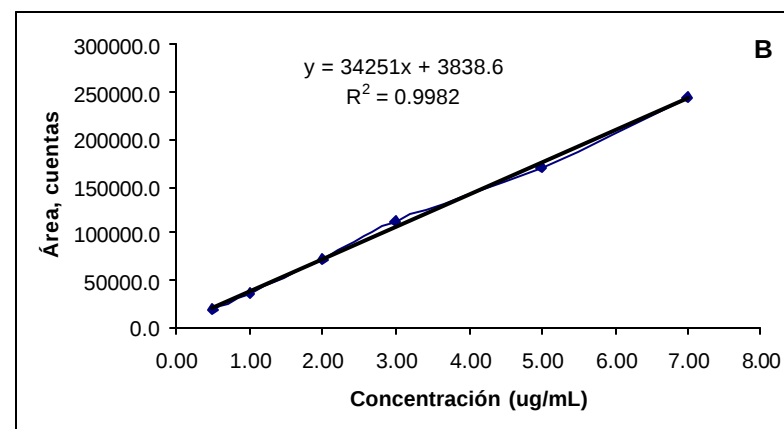
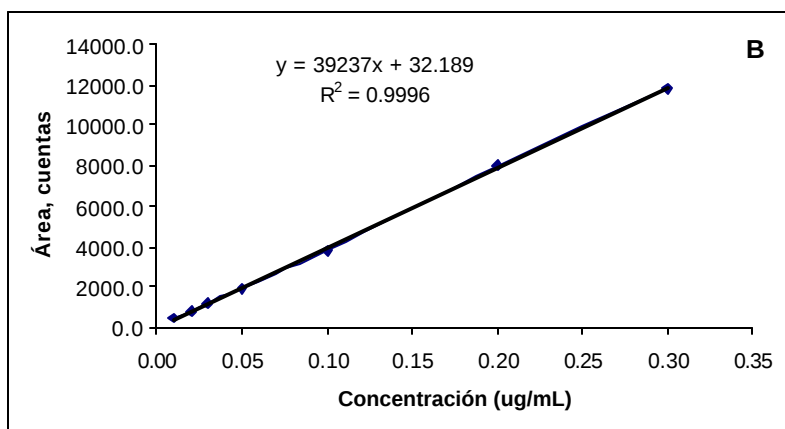
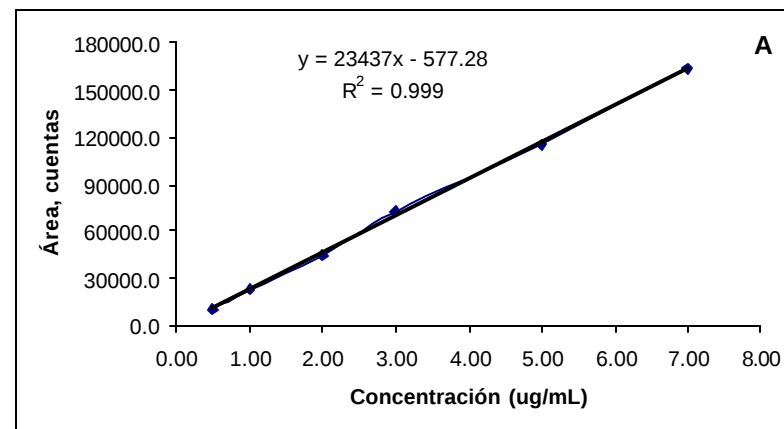
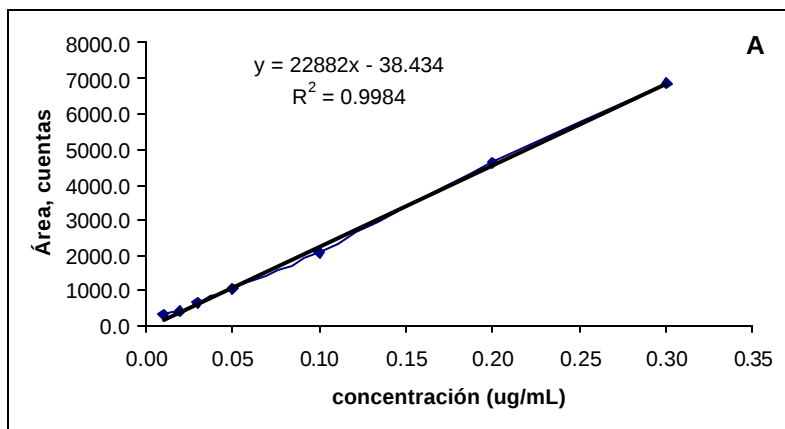
CURVAS DE CALIBRACIÓN OBTENIDAS POR HRGC/ μ -ECD DE LOS N-METILCARBAMATOS
DERIVADOS



Curvas de calibración para el nivel de concentración bajo (0.01 – 0.3 mg/mL) y alto (0.5 – 7.0 µg/mL) de los derivados: A. TFA-propoxur y B. TFA-promecarb.



Curvas de calibración para el nivel de concentración bajo (0.01 – 0.3 µg/mL) y alto (0.5 – 7.0 µg/mL) de los derivados: A. TFA-carbofurano y B. TFA-3-hidroxicarbofurano.



Curvas de calibración para el nivel de concentración bajo (0.01 – 0.3 µg/mL) y alto (0.5 – 7.0 µg/mL) de los derivados: A. TFA-carbaryl y B. TFA-3-methiocarb.

