



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE
HIDALGO**

INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA

CENTRO DE INVESTIGACIONES QUÍMICAS

**“EVALUACIÓN DE DIFERENTES ESTRATEGIAS PARA LA
SEPARACIÓN DE PESTICIDAS EN MIELES MEDIANTE
ELECTROFORESIS CAPILAR”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO EN ALIMENTOS

PRESENTA:

JUAN MANUEL MONTIEL LEÓN

ASESOR:

Dr. JOSEANTONIO GODOY REYES



PACHUCA DE SOTO, HIDALGO

ENERO 2007

A GR A DE CI MI EN TOS

A mis padres, Má y Pá son el motor de mi vida, su esfuerzo ha sido mi inspiración y sus sacrificios mi valor. Nada de esto sería posible sin ustedes. Los amo.

A mis hermanas, Osito y Nancy, por su apoyo y por soportar mi mal humor en aquellos días de tensión.

A mi amor, Paty te readoro, por tu amor, apoyo incondicional, por tu tiempo y tu esfuerzo para ayudarme a ver realizado uno de mis sueños. Uno está realmente enamorado cuando se da cuenta que la otra persona es única....Ich liebe dich.

A mis amigos, Moma, Giorgio, Juan Antonis, Josi; en la universidad descubrí que tengo cuatro hermanos más, gracias por todos esos jocosos, buenos, malos y regulares momentos, por soportar mi mal humor y mi amplio y florido vocabulario.

A mis amigos-profesores, Dra. Alicia, por confiar en mi y dejar a un lado las primeras impresiones y por no dejarme usar bata negra en el laboratorio; Dr. Carlos Gómez, por tu apoyo y palabras de aliento, por los conocimientos y amistad, ya leí mis copias!!!.

A mi asesor, amigo, maestro y mago, gracias por un mundo de conocimientos, por la magia, por llevarme a conocer otro país, otra cultura; por las cartas y trucos, el show termina pero la magia sigue.

A mis maestros, Dra. Judith por confiar en mi, por su apoyo y alludarme con esa hortografía; Dr. Javier nunca pensé que tenía esa percepción de mi, gracias!!; Dra. Elizabeth reúne todos los aspectos de un excelente maestro, conocimiento y paciencia; Dra. Armida es ud. un ejemplo a seguir; Sr. Don Doctor Giaan, Dra. Angélica, Dra. Eva, Dra. Carmen, Dra, Alma; sin ustedes su apoyo y conocimientos transmitidos no sería esto posible.

A mis sinodales analíticos Dra. Elena y Dr. Carlos Galan por su paciencia y apoyo; y a todo el laboratorio de analítica.

A mis nuevos amigos y compañeros de trabajo de la Cervecería Cuauhtémoc Moctezuma; C.P. Raúl Lozano por la amistad y la oportunidad de pertenecer a ese gran equipo de trabajo; L.A.E. Gustavo Matamoros por el apoyo, conocimientos y amistad, tienes toda la razón, es bueno saber de todo; C.P. Norberto Sandoval, gracias por la confianza y apoyo; y a todo el equipo gracias!!!

ÍNDICE

	pg
Abreviaturas	7
Índice de tablas	9
Índice de figuras	12
INTRODUCCIÓN	19
1.2 Antecedentes.	21
1.2.1 Miel.	21
1.2.1.1 Composición de la miel.	22
1.2.1.2 Producción en México.	22
1.2.2 Pesticidas para el control de la <i>varroasis</i> en las abejas.	24
1.2.2.1 Estudio de los pesticidas con técnicas cromatográficas.	27
1.2.3 Electroforesis capilar no acuosa.	29
1.2.3.1 Propiedades fisicoquímicas de los solventes orgánicos.	31
1.2.3.2 Selectividad.	33
1.2.3.3 Detección en electroforesis capilar no acuosa.	34
1.2.3.3.1 Detección UV – VIS.	34
1.2.3.3.2 Detección por fluorescencia.	34
1.2.3.4 Detección electroquímica.	34
1.2.3.5 Espectrometría de masas con ionización electroquímica.	35
1.2.3.6 Separación de analitos sin carga.	35
OBJETIVOS	37
2.1 Objetivo general.	37
2.2 Objetivos específicos.	37
MATERIALES Y MÉTODOS	38
3.1 Materiales, reactivos y soluciones.	38
3.2 Métodos.	40

3.2.1 Preparación de la muestra.	47
3.2.1.1 Coumafós.	47
3.2.1.2 Bromopropilato.	47
3.2.1.3 Amitraz.	48
3.2.1.4 Fluvalinato.	48
3.2.1.5 Timol.	49
3.2.1.6 Mezclas.	49
RESULTADOS Y DISCUSIONES	51
4.1 Resultados generales empleando la electroforesis capilar.	51
4.2 Análisis individual de los pesticidas.	53
4.2.1 Coumafós.	53
4.2.1.1 Resultados obtenidos mediante fases acuosas.	53
4.2.1.2 Resultados obtenidos mediante fases no acuosas.	60
4.2.1.3 Extracción del pesticida en miel.	62
4.2.2 Bromopropilato.	66
4.2.2.1 Resultados obtenidos mediante fases acuosas.	66
4.2.2.2 Resultados obtenidos mediante fases no acuosas.	69
4.2.3 Amitraz.	75
4.2.3.1 Resultados obtenidos mediante fases acuosas.	75
4.2.3.2 Resultados obtenidos mediante fases no acuosas.	76
4.2.3.3 Degradación del analito en el transcurso del tiempo.	79
4.2.3.4 Degradación del amitraz.	80
4.2.3.5 Influencia de la temperatura en el análisis.	85
4.2.3.6 Extracción del pesticida en miel.	86
4.2.4 Fluvalinato	89
4.2.4.1 Resultados obtenidos mediante fases acuosas.	89
4.2.4.2 Resultados obtenidos mediante fases no acuosas.	91
4.2.4.3 Extracción del pesticida en miel.	92

4.2.5 Timol.	95
4.3 Estudio de diferentes mezclas de los pesticidas.	95
4.3.1 Resultados obtenidos de la mezcla de bromopropilato, coumafos y timol mediante fases acuosas.	96
4.3.2 Mezcla de a mitraz, bromopropilato y fluvalinato mediante fases no acuosas .	97
CONCLUSIONES	103
ANEXO I	105
1. Electroforesis capilar.	105
1.1. Parámetros analíticos.	107
1.1.1. Tiempo de migración.	107
1.1.2. Eficiencia.	110
1.1.3. Resolución.	112
1.1.4. Inyección de las muestras.	113
1.1.4.1 Inyección electrocinética.	114
1.1.4.2 Inyección hidrodinámica.	115
GLOSARIO	118
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	120

Abreviaturas.

ABF: Mezcla de pesticidas : amitraz, bromopropilato y fluvalinato.

Acn: Acetonitrilo

BCT: Mezcla de pesticidas : bromopropilato, coumafos y timol.

C18: Cartuchos de extracción en fase sólida C18 (octadecilsílica).

CICOPLAFEST: Catálogo Oficial de Plaguicidas Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural, Secretaría del Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca, Secretaría de Salud y Secretaría de Comercio y Fomento Industrial.

CG: Cromatografía de gases.

CG-MS: Cromatografía de gases con detector de masas.

CH₃COOH: Ácido acético.

CH₃COONH₄: Acetato de amonio.

CH₃COONa·3H₂O. Acetato de sodio.

CZE: Electroforesis capilar de zona.

DL₅₀: Nivel de estímulo que causa una respuesta en el 50% de los individuos de una población bajo estudio. En pesticidas se utiliza para determinar los límites de resistencia de insectos a ciertos biocidas.

DMF: 2,4- dimetilfenilformamida.

DMA: 2,4- dimetilanilina.

DPMF: *N*-(2,2- dimetilfenil) – *N*- metilformamidina.

EC: Electroforesis capilar.

EC-ESI-MS: Electroforesis capilar con espectrómetro de masas mediante ionización electroquímica.

EF: Movilidad electroforética.

Ej: Ejemplo

EOF: Flujo electroosmótico.

FAO/OMS: Food and Agricultural Organization.

Fig: Figura

HLB: divinilbenceno-Co-N-vinilpirrolidina.

HPLC: High Performance Liquid Chromatography.

IC: Intensidad de corriente.

MeOH: Metanol.

NACE: Non aqueous capillary electrophoresis.

NaOH: Hidróxido de sodio.

NH₄Cl: Cloruro de amonio.

PBS: Buffer de fosfatos.

pH: Índice que expresa el grado de acidez o alcalinidad de una disolución. Entre 0 y 7 la disolución es ácida, y de 7 a 14, básica.

RP: Reverse phase.

SAGARPA: Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación.

SDS: Dodecil sulfato de sodio.

SPE: Solid-phase extraction.

SSA: Secretaria de Salubridad y Asistencia.

t: Tiempo.

t_m: Tiempo de migración.

UV: Ultravioleta

μA: Micro amperes.

Vis: Visible.

Índice de tablas	pg
Tabla 1: Componentes de la miel.	23
Tabla 2: Valores permitidos de los pesticidas utilizados para el control de la <i>varroasis</i> en las abejas.	27
Tabla 3: Propiedades fisicoquímicas de los solventes orgánicos a 25 °C.	32
Tabla 4: Aplicaciones del metanol y acetonitrilo en la NACE.	36
Tabla 5: Condiciones y resultados obtenidos de los ensayos con variación de presión en la inyección utilizando fases acuosas.	54
Tabla 6: Tiempos de migración e intensidades de corriente obtenidas en los ensayos con aumento en la concentración del PBS.	56
Tabla 7: Condiciones de análisis del coumafos, mediante fases acuosas con variación en el pH y con adición de surfactantes.	59
Tabla 8: Condiciones y resultados obtenidos de los ensayos mediante fases no acuosas.	61
Tabla 9: Lista de condiciones y resultados para los ensayos I y II de la extracción del coumafos	64
Tabla 10: Condiciones y resultados de los ensayos mediante fases acuosas.	68
Tabla 11: Condiciones y resultados del bromopropilato, ensayos con variación en el pH y fase móvil.	69
Tabla 12: Condiciones y resultados obtenidos mediante fases no acuosas	70

e inyecciones por presión.

Tabla 13: Condiciones y resultados obtenidos mediante fases no acuosas 70 e inyecciones electrocinéticas.

Tabla 14: Condiciones y resultados obtenidos mediante fases no acuosas 71 e inyecciones electrocinéticas con variación en el electrolito.

Tabla 15: Condiciones y resultados de los ensayos mediante fases no 76 acuosas, con 25 kV en el análisis y 1 día de antigüedad.

Tabla 16: Condiciones y resultados de los ensayos mediante fases no 77 acuosas, con 25 kV en el análisis y 5 días de antigüedad.

Tabla 17: Condiciones y resultados de los ensayos del amitraz con una 78 concentración de 100 mg/L.

Tabla 18: Condiciones y resultados de los ensayos del amitraz, analizado 81 con fase no acuosa y acetato de amonio como electrolito.

Tabla 19: Resultados y condiciones de los ensayos realizados a una 82 solución estándar con 5 días desde su preparación.

Tabla 20: Ejemplos de los resultados obtenidos de los análisis del amitraz 83 con 9 días de antigüedad desde su preparación.

Tabla 21: Resultados y condiciones de los ensayos realizadas a las dos 86 pruebas de extracción del amitraz en una muestra de miel.

Tabla 22: Condiciones y resultados de los ensayos mediante fases 89 acuosas y no acuosas del fluvalinato.

Tabla 23: Condiciones y resultados de los ensayos realizados a una 90

concentración de 0.013 mg/ L.

Tabla 24: Condiciones y resultados de los ensayos de extracción del 93 pesticida.

Índice de figuras.

Fig. 1: Almacenamiento del néctar en los panales, para su transformación en miel.	pg 21
Fig. 2: Reacción de hidrólisis de la sacarosa en glucosa y fructosa realizada por la invertasa de la saliva de las abejas.	22
Fig. 3: Ácaro <i>Varroa jacobsoni</i> Oudemans.	24
Fig. 4: Estructura química del amitraz.	25
Fig. 5: Estructura química del coumafos.	25
Fig. 6: Estructura química del fluvalinato.	26
Fig. 7: Estructura química del bromopropilato.	26
Fig. 8: Diagrama de flujo de la metodología de lavado y acondicionamiento del capilar.	43
Fig. 9: Electroferograma de una muestra de miel libre de pesticidas.	46
Fig. 10: Electroferograma de coumafos analizado en medio acuoso con 0.05 M de sales de amonio.	52
Fig. 11: Electroferograma de coumafos analizado en medio acuoso con 0.1 M de sales de amonio.	53
Fig. 12: Electroferograma de coumafos analizado con fases acuosas y adicionado con un sistema buffer de fosfatos a una concentración 0.005 M; tiempo de migración de 2.54 min., inyección por presión 5 psi y utilizando un capilar con 50 µm de diámetro interno.	55

Fig. 13: Electroferograma de coumafos analizado con fases acuosas y 56
adicionado con un sistema buffer de fosfatos a una concentración 0.05 M;
tiempo de migración de 4.8 min., inyección por presión 5 psi y utilizando un
capilar con 50 μm de diámetro interno.

Fig. 14: Electroferograma de coumafos analizado con fases acuosas y una 57
variación en el pH sin adición de surfactantes; inyección por presión 5 psi y
75 μm de diámetro interno en el capilar.

Fig. 15: Electroferograma de coumafos analizado con una inyección por 58
presión y adición de tritón X 114 con una concentración 0.04 mM.

Fig. 16: Electroferograma de coumafos utilizando una fase acuosa con la 59
adición de triton X 114 con su concentración micelar crítica aumentada a 2
mM.

Fig. 17: Electroferograma de coumafos analizado mediante fases no 61
acuosas, inyección electrocinética (3 kV, 4 s).

Fig. 18A: Electroferograma de la extracción de coumafos en el ensayo I y 63
utilizando medios acuosos, inyección por presión 5 psi, y 15 kV en la
separación durante el análisis.

Fig. 18B: Electroferograma de la extracción de coumafos en el ensayo II y 63
utilizando fases acuosas, inyección por presión 5 psi, y 15 kV en la
separación durante el análisis.

Fig. 19: Electroferogramas A y B correspondientes a los ensayos I y II de 64
la extracción del coumafos.

Fig. 20: Electroferograma de bromopropilato analizado con fases acuosas , 66 5 kV durante el análisis, inyección por presión de 5 psi y utilizando un capilar con diámetro interno de 75 μm .

Fig. 21: Electroferograma de bromopropilato analizado con fases acuosas , 67 10 kV durante el análisis, inyección por presión de 5 psi y utilizando un capilar con diámetro interno de 75 μm .

Fig. 22: Electroferograma de bromopropilato analizado con fases acuosas, 67 15 kV durante el análisis, inyección por presión de 5 psi y utilizando un capilar con diámetro interno de 75 μm .

Fig. 23: Electroferograma de bromopropilato el cual fue analizado 72 mediante fases no acuosas con inyección por presión (5 psi, 5 s), utilizando acetato de sodio como electrolito y un capilar con diámetro interno de 75 μm .

Fig. 24: Electroferograma de bromopropilato analizado con fases no 73 acuosas e inyección electrocinética (3 kV, 4 s), acetato de sodio como electrolito y un capilar con diámetro interno de 75 μm .

Fig. 25: Electroferograma de bromopropilato analizado mediante fases no 73 acuosas con inyección electrocinética (3 kV, 4 s), utilizando acetato de amonio como electrolito y un capilar con diámetro interno de 50 μm .

Fig. 26: Electroferograma de bromopropilato analizado mediante fases no 74 acuosas con inyección electrocinética (3 kV, 4 s), utilizando acetato de amonio y un capilar con diámetro interno de 50 μm .

Fig. 27: Electroferograma de bromopropilato adicionado con SDS a una 75 concentración de 0.08 M, utilizando una inyección por presión (5 psi, 5 s) y un capilar con diámetro interno de 50 μm .

Fig. 28: Electroferograma de amitraz analizado mediante NACE, con una 78
inyección electrocinética (3 kV, 4 s) y un capilar con diámetro interno de 50
µm.

Fig. 29: Estructura química del amitraz y sus subproductos de 80
degradación.

Fig. 30: Electroferograma de amitraz con 3 días de antigüedad, analizado 81
mediante la metodología NACE, con una inyección electrocinética (3 kV, 4
s) y empleando un capilar con diámetro interno de 50 µm.

Fig. 31: Electroferograma de amitraz con 5 días de antigüedad, analizado 82
con metodología NACE, empleando una inyección del tipo electrocinética
(3 kV, 4 s) y un capilar con un diámetro interno de 50 µm.

Fig. 32: Ensayo de amitraz con 9 días de antigüedad, analizado con 83
metodología NACE, para el cuál el analito fue introducido en el capilar (50
µm de diámetro interno) por medio de voltaje (3 kV, 4 s).

Fig. 33: Electroferograma de amitraz analizado con metodología NACE a 84
los 15 días desde su preparación, inyección electrocinética (3 kV, 4 s) y
capilar con diámetro interno de 50 µm.

Fig. 34: Electroferograma de amitraz analizado con metodología NACE a 85
los 17 días desde su preparación, inyección electrocinética (3 kV, 4 s) y
capilar con diámetro interno de 50 µm.

Fig. 35: Electroferograma de la extracción de amitraz utilizando la 87
metodología del ensayo I, inyección electrocinética (3 kV, 4 s) y capilar con
diámetro interno de 50 µm.

Fig. 36: Electroferograma de amitraz analizado con metodología del 88 ensayo II, inyección electrocinética (3 kV, 4 s) y un capilar con diámetro interno de 50 μm .

Fig. 37: Electroferograma de fluvalinato analizado con medios acuosos 90 adicionados con SDS 0.05 M, empleando una inyección por presión (5 psi, 5 s) y un capilar con diámetro interno de 75 μm .

Fig. 38: Electroferograma de fluvalinato analizado mediante metodología 91 NACE, empleando una inyección por presión (5 psi, 5 s) y un capilar con diámetro interno de 75 μm .

Fig. 39: Electroferograma de fluvalinato analizado con metodología NACE, 92 con una inyección electrocinética (3 kV, 4 s) y utilizando un capilar con diámetro interno de 75 μm .

Fig. 40: Electroferogramas de fluvalinato analizado con metodología no 94 acuosa, inyección electrocinética (3 kV, 4 s) y utilizando un capilar con diámetro interno de 50 μm : A) Empleando la metodología de extracción ensayo I; B) Empleando la metodología de extracción ensayo II.

Fig. 41: Electroferograma de la mezcla de bromopropilato, coumafos y 96 timol, empleando una inyección por presión (5 psi, 5 s), y un capilar con diámetro interno de 75 μm .

Fig. 42: Electroferograma de la mezcla ABF analizada mediante la 98 metodología NACE e inyectada con presión de 2 psi.

Fig. 43: Electroferograma de la mezcla ABF analizada mediante la 98 metodología NACE e inyectada con presión de 5 psi.

Fig. 44: Electroferograma de la mezcla ABF analizada mediante la 99 metodología NACE y empleando una inyección por voltaje 3 kV durante

4 s.

Fig. 45: Electroferograma de la mezcla ABF, empleando una inyección por 100 voltaje de 3 kV durante 4 s, metodología NACE.

Fig. 46: Electroferograma de la mezcla ABF analizada con la metodología 101 NACE, utilizado una inyección por voltaje (3 kV, 4 s) y un capilar con diámetro interno de 50 μm .

Fig. 47: Electroferograma de la mezcla amitraz, bromopropilato y 101 fluvalinato analizada con la metodología NACE y empleando una inyección electrocinética (3 kV, 4 s) y un capilar con diámetro interno de 75 μm .

Fig. 48: Electroferograma de la mezcla de amitraz, bromopropilato y 102 fluvalinato analizado con la metodología NACE, empleando una inyección electrocinética (3 kV, 4 s) y un capilar con diámetro interno de 75 μm .

Fig. 49: Esquema de la instrumentación requerida en electroforesis capilar. 106

Fig. 50: Esquema del proceso de separación mediante electroforesis 108 capilar. La longitud de las flechas indica la magnitud de la movilidad electroforética (EF) y electroosmótica (EOF). La dirección de las flechas indica la dirección de migración electroforética y electroosmótica.

Fig. 51: Métodos de inyección de muestra: A) Inyección hidrodinámica por 116 presión, B) Inyección hidrodinámica por succión, C) Inyección hidrodinámica por efecto sifón, D) Inyección electrocinética.

INTRODUCCION

De acuerdo a las estadísticas (SAGARPA 2001), México es uno de los países más importantes en la producción de miel ocupando el tercer lugar a nivel mundial; debido a ello, el control de calidad se ha vuelto un factor de vital importancia para su exportación.

De acuerdo a las distintas organizaciones y normativas de cada país en específico, existen ciertos factores de calidad que la miel debe cumplir para exportación, siendo uno de los más importantes el que posea una mínima o nula cantidad de residuos de pesticidas. Estos residuos de pesticidas pueden quedar en la miel o en productos derivados de los panales debido a que algunas veces éstos son tratados directamente con acaricidas, los cuales se aplican con el fin de exterminar el ácaro que causa la enfermedad de la *varroasis* en las abejas.

La contaminación con pesticidas representa un grave problema en la calidad sanitaria, y de igual manera la determinación de las concentraciones permitidas por las autoridades sanitarias en base al reglamento en la fabricación de algunos productos derivados de la miel.

La contaminación por pesticidas se ha estudiado con diversos fines, ya sea por regulación sanitaria, para determinar sus límites en el control de calidad, como factor de calidad de exportación, así como para el desarrollo de nuevos métodos análisis mediante técnicas analíticas. En el marco de este contexto se han analizados diversos ácidos orgánicos y pesticidas, por medio de técnicas de separación analíticas como son la Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia (HPLC) y Cromatografía de gases (CG) principalmente, debido a ciertas dificultades derivadas de las características fisicoquímicas (B. Gomis y col., 1996) tanto de la miel como de los pesticidas.

Ahora con el avance tecnológico que se presenta, es posible aplicar nuevas tecnologías al estudio de algunos pesticidas, tal es el caso de la

Electroforesis Capilar, una técnica relativamente nueva que ofrece diversas ventajas sobre las técnicas antes mencionadas (Harris D.C, 2001), ya que el desarrollo de un método de análisis con ésta técnica sería de ayuda para la mejora en los análisis de los productos de exportación, dando resultados más rápidos, confiables y baratos; además de garantizar la calidad de productos de exportación/importación.

Una metodología de reciente desarrollo para la Electroforesis Capilar es la llamada NACE, electroforesis capilar no acuosa (Non Aqueous Capillary Electrophoresis, por sus siglas en inglés), la cuál reemplaza las soluciones tampón acuosas por solventes orgánicos como son el metanol, acetonitrilo, benceno, acetona, entre otros; ayudando así a la disolución del analito y a disminuir el ruido en los electroferogramas, además con la adición de un electrolito a la solución tampón como son los acetatos de sodio y amonio con el ácido acético se obtiene una mayor estabilidad e incremento en la intensidad de corriente al momento de la separación (M.L. Riekkola, M. Jussila, P. Porras, I.E. Valkó, 2000).

Debido a lo anterior, el propósito del presente trabajo es desarrollar una metodología que permita la detección de residuos de pesticidas en mieles utilizando la técnica de electroforesis capilar en sus modalidades acuosa y no acuosas, y que sirva como base para el diseño de una norma oficial mexicana que regule la calidad de sanitaria de la miel, ya que hasta nuestro conocimiento México carece de una norma oficial de ésta índole.

1.2. Antecedentes

1.2.1. Miel.

La Norma Oficial Mexicana (NOM-001-ZOO-1994), define a la miel como un producto elaborado por las abejas a base de néctar de las flores y que, transformado química y físicamente, la almacenan en los panales (Fig. 1).



Fig.1 Almacenamiento del néctar en los panales, para su transformación en miel.

La fuente principal de la que se origina la miel es el néctar de las flores, que consiste en una solución de agua y azúcares, con pequeñas cantidades de otras sustancias, como aminoácidos, minerales, vitaminas, ácidos orgánicos, enzimas, aceites esenciales, etc. El néctar recolectado por las abejas, es mezclado con su saliva, al pasar por la boca y antes de ser trasladado al buche. La saliva de las abejas contiene diversos ácidos, sales minerales, proteínas, y además una diastasa (la invertasa), que convierte a la sacarosa del néctar, en glucosa y fructosa (Fig. 2). Las abejas al regresar con el buche lleno de néctar a su colmena, lo depositan en el panal o lo pasan a alguna abeja obrera, la que se encarga de la posterior transformación del néctar en miel. Durante su transformación dicha sustancia se deshidrata, sufre un proceso de fermentación y sazónamiento. El secado se prolonga unos cinco días en las celdas, por ventilación a través de corrientes de aire generadas por las abejas que ingresan aire exterior (seco) y extrae el interior (húmedo), hasta un contenido de agua del 17 al 20 % en el momento del opérculo, que marca el fin de la transformación del néctar en miel.

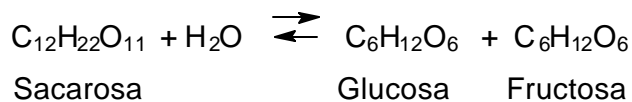


Figura 2. Reacción de hidrólisis de la sacarosa en glucosa y fructosa realizada por la invertasa de la saliva de las abejas.

Con este nivel de concentración de agua, ni los hongos, ni las levaduras encuentran un medio favorable para su desarrollo. Y además la conservación de la miel está asegurada por una gran cantidad de inhibina, que impide la reproducción de bacterias. Una vez concluido todo este proceso, las abejas obreras cierran las celdas que contienen miel madura hasta su cosecha (Piana G., 1989).

1.2.1.1. Composición de la miel.

La miel es una solución concentrada de azúcares con predominancia de glucosa y fructuosa. Contiene además una mezcla compleja de otros carbohidratos, enzimas, aminoácidos, ácidos orgánicos, minerales, pigmentos, cera, y granos de polen (Tabla 1).

1.2.1.2 Producción en México.

México exporta en promedio a otras naciones el 44 por ciento de su producción de miel, lo que representa al país ingresos por el orden de los 60 millones de dólares al año, es una potencia en la producción de miel a nivel mundial al ubicarse en el tercer sitio después de Argentina y China (SAGARPA, 2005); por tanto al ser un país exportador del producto y debido a la legislación que se encuentra por región y país donde se emiten día a día diferentes normas en las cuales se publican las características que debe de cumplir un producto, es necesario la reformación de normas mexicanas en las cuales se establezcan parámetros de calidad que sean equivalentes a los solicitados en otros países; ya que esto se verá reflejado en la rentabilidad de la producción y exportación de miel.

Tabla 1. Componentes de la miel (Piana G., 1989)

COMPONENTES DE LA MIEL	%
AGUA	17.20%
AZUCARES	
Levulosa (D-fructosa)	38.19%
Dextrosa (D-glucosa)	31.28%
Sucrosa (sacarosa)	1.31%
Maltosa y otros sacáridos reductores	7.31%
Total de azúcares	79.59%
ÁCIDOS	0.57%
Glucónico	
Cítrico	
Málico	
Succínico	
Fórmico	
PROTEÍNAS	0.26%
Aminoácidos:	
Ácido glutámico	
Alanina	
Arginina	
CENIZAS	0.17%
Minerales	
Potasio	
Sodio	
Magnesio	
Calcio	
Hierro	
COMPONENTES MENORES	2.21%
Pigmentos	
Sustancias aromáticas	
Enzimas	

El parámetro mas importante a estudiar es el límite permitido en cada país de residuos de pesticidas en la miel, estos residuos de pesticidas son una consecuencia lógica del tratamiento de los panales con acaricidas para evitar la *varroasis*, enfermedad parasitaria externa de las abejas ocasionada por el ácaro *Varroa jacobsoni Oudemans*(Fig. 3).

El tratamiento contra la *varroasis* se realiza por medio de diversas sustancias químicas, algunas de las cuales pertenecen al grupo de plaguicidas organofosforados como es el coumafos (García F., F. García, 1992).



Fig 3. Ácaro *Varroa jacobsoni* Oudemans.

1.2.2 Pesticidas para el control de la varroasis en las abejas.

La Norma Oficial Mexicana (NOM-001-ZOO-1994) define a un pesticida como cualquier sustancia o mezcla de sustancias que se destinan a controlar cualquier plaga, incluidos los vectores de enfermedades humanas y de animales, así como las especies no deseadas que causen perjuicio o que interfieran con la producción agropecuaria y forestal, por ejemplo, las que causan daño durante el almacenamiento o transporte de los alimentos u otros bienes materiales, así como las que interfieran con el bienestar del hombre y de los animales. Se incluyen en esta definición las sustancias defoliantes, las desecantes y los coadyuvantes.

La FAO/OMS define el término pesticida, como cualquier sustancia o mezcla de ellas para prevenir o controlar cualquier especie de plantas o animales indeseables, incluyendo también cualquier otra sustancia o mezcla de ellas destinada a utilizarse como regulador de crecimiento de las plantas, defoliantes o desecantes.

Otros organismos gubernamentales como la SAGARPA han desarrollado catálogos de plaguicidas con límites permitidos para los productos de consumo humano, por lo que se ha publicado un catálogo de la CICOPLAFEST en el cual se pueden encontrar los acaricidas más utilizados para el tratamiento de la varroasis que además son utilizados en otros países, dichos plaguicidas con su respectiva estructura química se enlistan a continuación:

Amitraz. Es un acaricida derivado del triazopentadieno, nombre químico: N-metilbis (2,4- xililiminometil) amina (Fig. 4); con un peso molecular de 293 g/mol. Moderadamente peligroso con una DL₅₀ oral de 523 mg/kg (rata) y DL₅₀ dérmica > 1600 mg/kg (conejo), en el ser humano puede provocar irritación en la piel y potencialmente carcinogénico en animales; ingesta diaria permisible 0.003 mg/kg (CICOPLAFEST, 1999).

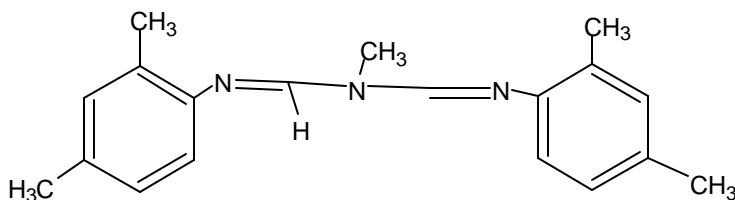


Fig.4. Estructura química del amitraz.

➤ Coumafos. Es un insecticida, larvicida organofosforado, nombre químico: o,o- dietil -o- (3- cloro - 4 - metil - 7 - coumarinil) - fosforotioato (Fig. 5) ; peso molecular 362 g/mol. Presenta una DL₅₀ oral (rata) 96 mg/kg y DL₅₀ dérmica (conejo) 2000 mg/kg, en el ser humano es muy tóxico por inhalación, ligeramente tóxico por contacto con la piel, irritante dérmico y de mucosas, fatal si es ingerido o absorbido a través de la piel; ingesta diaria permisible 0.0005 mg/kg (CICOPLAFEST, 1999).

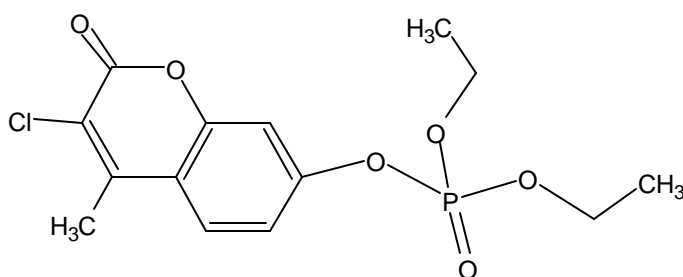


Fig.5. Estructura química del coumafos.

➤ Fluvalinato. Insecticida-acaricida piretroide de contacto, nombre químico Tau-fluvalinato (Fig. 6); peso molecular 502 g/mol. Presenta una DL₅₀ oral de 261 mg/kg (rata); DL₅₀ dérmica > 20,000 mg/kg (conejo), en el ser

humano es embriotóxico, teratogénico a altas dosis; ingesta diaria permisible 0.01 mg/kg y límite permitido en la miel 0.05 ppm (CICOPLAFEST, 1999).

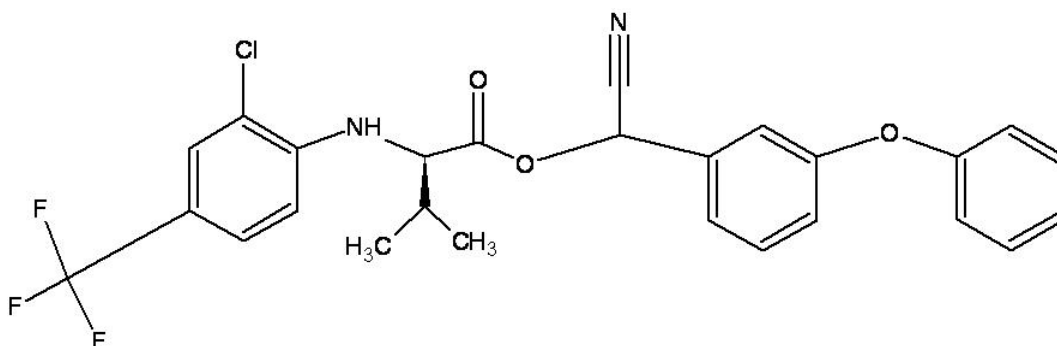


Fig.6. Estructura química del fluralinero.

➤ Bromopropilato. Es un acaricida derivado del benzilato, nombre químico isopropil 4,4' – dibromobenzilato (Fig. 7), peso molecular 428 g/mol. El bromopropilato ha sido estudiado por su amplio uso aunque no se encuentra registrado en el catalogo de la CICOPLAFEST (1999).

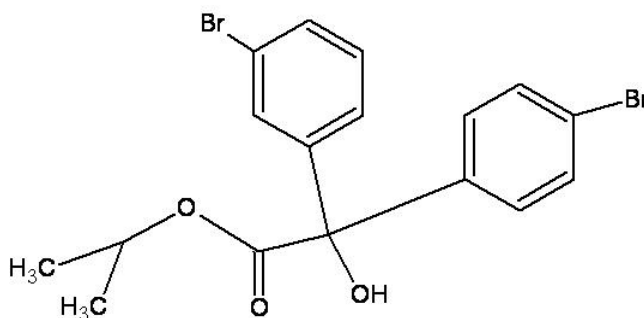


Fig.7. Estructura química del bromopropilato.

Estos pesticidas pueden permanecer en forma de residuos en productos como son la miel y ceras de panal; por lo que el análisis de estos es fundamental para mejorar la calidad del producto. En la tabla 2 se muestran los valores permitidos de residuos de algunos pesticidas dictado por la CICOPLAFEST (1999):

Tabla 2. Valores permitidos de los pesticidas utilizados para el control de la *varroasis* en las abejas (CICOPLAFEST, 1999).

Pesticida	Límite permitido	I.D.P
Amitraz		0.003 mg/L ¹
Coumafos		0.0005 mg/L ²
Fluvalinato	0.050 mg/L	

I.D.P = Ingesta Diaria Permisible

1 Ingesta diaria permitida de acuerdo al CICOPLAFEST. Límites permitidos en follaje 1 mg/L; carne 0.1 mg/L.

2 Ingesta diaria permisible de acuerdo al CICOPLAFEST. Límites permitidos en carne 1 mg/L, leche 0.5 mg/L, huevo 0.1 mg/L.

El bromopropilato no se encuentra registrado en el catálogo CICOPLAFEST.

La contaminación con estos plaguicidas puede deberse principalmente a dos causas:

1. El tratamiento aplicado a los vegetales con plaguicidas organofosforados, como medio de control de plagas, que puede producir una translocación de residuos de los mismos del vegetal a la miel a través del néctar, originando así la contaminación de la miel.
1. El tratamiento directo de las colmenas con plaguicidas, con el fin de erradicar el ácaro *Varroa jacobsoni Oudemans* (García F., Fernández G., 1992).

1.2.2.1 Estudio de los pesticidas con técnicas cromatográficas.

De forma tradicional, el análisis de los pesticidas se ha realizado con técnicas ya conocidas como son la cromatografía de líquidos de alta resolución y la cromatografía de gases. Para el caso de HPLC se puede citar a Gomis y col. (1996) quienes utilizaron la cromatografía líquida en fase reversa con columnas de microporo [fase móvil de metanol : agua (90:10)] para determinar diversos acaricidas en miel, observando diversos problemas como falta de estabilidad en la columna al principio de la investigación ya que fue hasta

después de 350 inyecciones que lograron estabilizar la columna, para finalmente obtener un coeficiente de correlación $r > 0.999$ para una determinación de los acaricidas a 10 ppm; como se sabe con una cantidad tan grande de inyecciones la columna se envejece, además de no ser viable un análisis real en el cual se lleve mucho tiempo para estabilizar la columna esto aunado al tiempo que tarda un análisis por ésta técnica; los investigadores concluyeron que la HPLC en fase-reversa con columnas de microporo en conjunto con un detector UV ofrece una alternativa de separación y determinación para el coumafós, bromopropilato, amitraz y fluvalinato, los cuales son los acaricidas comúnmente empleados en las colmenas.

Siguiendo la línea de análisis mediante HPLC, Anne-Claire Martel y col. (2002), utilizaron HPLC con un detector de arreglo de diodos y los acaricidas que estudiaron fueron los más comunes de uso agrícola como el coumafós, bromopropilato, amitraz y fluvalinato. En su trabajo proporcionan datos muy importantes como es la estabilidad de los acaricidas en medios no acuosos, principalmente el amitraz, ya que este presentó un periodo de degradación de 15 días, para lo cual adicionaron la fase móvil con 0.28 % de amonio; como proceso *a priori* de extracción y limpieza para cada acaricida se utilizó una metodología de extracción líquido-líquido con hexano- 2 propanol –amonio (60 mL : 30 mL : 0.28%) a través de cartuchos C18, concluye presentando un buen coeficiente de correlación $r > 0.999$ en una curva de calibración con un rango de 0.5 a 30 mg L⁻¹.

Otro grupo de plaguicidas orgánicos lo componen el timol, eucaliptol, mentol y alcanfor, de los cuales el timol es fotosensible de acuerdo a lo que reportan Nozal y col.(2002), se aplicaron por cromatografía de gases utilizando N₂ como fase móvil en un rango de flujo de 5 mL/min a 50° C y como gases auxiliares al nitrógeno, hidrógeno y aire sintético para el detector de ionización por flama, en su estudio obtuvieron un coeficiente de correlación $r > 0.9990$, en una curva de calibración con un rango de concentraciones de 0.1 a 100 µg/mL, siempre aplicando una extracción de la muestra diluida en agua por un cartucho

de extracción fase sólida (SPE) LiChrolut RP-18 preactivado con metanol y agua desionizada.

Una investigación muy importante sobre acaricidas en la miel fue realizado por Gallo y col. (2001), que hacen mención de la estabilidad de los pesticidas en la miel, principalmente del amitraz, concluyen que en un rango de 10 días éste puede degradarse y se producen hasta tres compuestos; DPMF [N-(2,2-dimetilfenil)-N – metilformamidina], DMF [2,4-dimetilfenilformamida] y DMA [2,4- dimetilfenilformamida]; por lo que demuestran que en menos de dos semanas el amitraz está completamente degradado, dichos subproductos del amitraz fueron determinados por HPLC y CG, de los cuales el DMA no pudo ser detectado por HPLC y todos los subproductos incluyendo DMA fueron detectados mediante cromatografía de gases con un detector de masas (CG-MS).

1.2.3 Electroforesis capilar no acuosa.

A continuación se presenta un resumen de las características principales que esta metodología ofrece.

La electroforesis convencional con campos eléctricos débiles es un método de separación bien establecido y que se ha utilizado ampliamente. En los años 50s, la electroforesis se aplicó a compuestos más hidrofóbicos con la ayuda de mezclas de solventes y soluciones no acuosas. La necesidad de obtener mejores separaciones llevó al desarrollo de la electroforesis capilar a principios de los años 80, utilizando campos eléctricos de elevada intensidad. Actualmente, las técnicas de electromigración forman una familia de técnicas versátiles para la separación de una gran cantidad de compuestos, desde iones pequeños hasta macromoléculas y células (ver anexo I).

Se han publicado diversos trabajos sobre la electroforesis capilar no acuosa (NACE) (Riekkola y col., 2000) donde se establecen los beneficios que esta técnica puede ofrecer al químico. La gran variedad de disolventes orgánicos, con diversas propiedades fisicoquímicas, amplían el campo de variables para manipular la selectividad de la separación. Las bajas intensidades de corriente que se presentan en la NACE permiten el uso de campos eléctricos con voltajes elevados, así como capilares de mayor diámetro, esto último permite la carga de mayor cantidad de muestra. En muchos casos la sensibilidad de la detección se puede mejorar.

Aunque los disolventes orgánicos han provisto una alternativa a los métodos acuosos en electroforesis convencional, y aunque han sido utilizados comúnmente como modificadores, el potencial de utilizarlos como electrolitos ha comenzado a atraer la atención de muchos investigadores en los últimos años (Riekkola y col. 2000).

La técnica de EC bajo medios no acuosos es muy prometedora, especialmente por su fácil manipulación y selectividad en la separación con tan solo cambiar los disolventes, y su campo de aplicación se amplía con fines semipreparativos. Adicionalmente, por las características de los disolventes no acuosos, presentan otras ventajas si acoplamos un sistema de separación como la electroforesis capilar a un sistema de detección como la espectrometría de masas; las ventajas que podemos mencionar están en términos de la volatilidad, tensión superficial, flujo e ionización, haciendo que se vislumbre un futuro prometedor para esta metodología.

Sin embargo, la NACE es una técnica que a pesar de estar ganando terreno en el área analítica, todavía se encuentra en etapas tempranas de desarrollo.

1.2.3.1 Propiedades fisicoquímicas de los solventes orgánicos.

La electroforesis capilar no acuosa explota la diversidad de propiedades fisicoquímicas de los solventes orgánicos (tabla 3) para controlar el flujo electroosmótico (EOF) y la migración de los analitos (Riekkola y col. 2000). La habilidad de los solventes orgánicos para aceptar protones de los grupos silanol de la pared del capilar, parece jugar un rol crucial en el desarrollo del EOF. Aunque el EOF puede ser no deseado en algunas técnicas de electromigración capilar, desempeña un papel importante en la separación por electroforesis capilar libre.

Debe hacerse notar, sin embargo, que la pureza de los solventes puede afectar tanto el EOF como el potencial zeta, incluso solventes de alta pureza pueden contener iones extraños y algunos de los disolventes como la N-metilformamida se hidrolizan fácilmente. La velocidad del flujo electroosmótico es mayor en solventes puros que en disoluciones de electrolitos, lo cual puede ser benéfico cuando se requiere un rápido transporte de los analitos, los solventes libres de sales pueden también ofrecer ventajas cuando se utiliza detección por espectrometría de masas.

Tabla 3. Propiedades fisicoquímicas de los solventes orgánicos a 25 °C (Riekkola y col. 2000)

Solvente	t °C (P.E.)	η (mPa s)	e	Pka	γ (10 ⁻² N m ⁻¹)
Metanol (MeOH)	64.7	0.545	32.7	17.20	2.212
Etanol	78.3	1.078	24.55	18.88	2.190
1- Propanol	97.2	1.956	20.33	19.43	2.33
2- Propanol	82.3	2.073	19.92	20.80	2.124
1- Butanol	117.7	2.593	17.51	21.56	2.416
Acetonitrilo	81.6	0.341	37.5	≥ 33.3	2.760
Formamida	210.5	3.3	111	16.8 ^b	5.791
N-metilformamida	180	1.65	182.4	10.74	3.87
N,N- dimetilformamida	153	0.802	36.71	29.4	3.52
Dimetil sulfoxido	189	1.996	46.68	33.3	4.286
Tetrahidrofuran	66	0.460	7.58	–	2.64
Agua	100	0.890	78.39	14	7.181

1. t °C Punto de ebullición; η, coeficiente de viscosidad; e, constante dieléctrica; Pka_{auto}, constante autoprotolítica; γ, coeficiente de tensión superficial.

2. ^b A 20 °C.

Debido a que la viscosidad tiene un efecto inverso en el flujo electroosmótico y en la movilidad electroforética, los solventes a utilizar deben tener una viscosidad baja para permitir separaciones en intervalos de tiempo razonables. Solventes estables con baja presión de vapor y líquidos a temperatura ambiente son los más convenientes para considerar su uso rutinario. Por supuesto, aquellos que son tóxicos deben evitarse. A diferencia del agua, los solventes orgánicos pueden presentar absorbancia al ultravioleta, de tal forma que en algunos casos se requiere de otro método de detección lo cual puede de hecho, proporcionar una mayor sensibilidad como es el caso de la detección fluorescente (J. Tj?melund, S.H. Hansen, 1997).

1.2.3.2 Selectividad.

Una de las características más atractivas de los solventes orgánicos es que sus propiedades físicas y químicas varían mucho entre ellos, de acuerdo a lo anterior, la manipulación de la selectividad en la NACE se puede lograr simplemente cambiando el solvente o la proporción de una mezcla de ellos (Riekkola y col., 1999).

Adicionalmente a la autodisociación, los solventes anfipróticos pueden actuar como aceptores o donadores de electrones en el caso de que haya otros donadores o aceptores en el sistema. Sin embargo, presentan características distintas en sus caracteres como donadores o aceptores. El metanol, como el agua, tiene una tendencia similar a donar o aceptar protones; solventes apróticos como el acetonitrilo, que tienen una constante de autoprotólisis muy baja, solamente pueden aceptar protones.

La mayoría de los solventes orgánicos tienen la capacidad de disolver electrolitos, los ácidos y sus sales de amonio son los electrolitos más utilizados y tienen en claro efecto sobre la selectividad en NACE (S.P. Porras y col., 1999).

Desafortunadamente, en la NACE las micelas no pueden ser utilizadas para mejorar la selectividad, la formación de micelas es escasa en solventes no acuosos debido a las débiles interacciones hidrofóbicas que limitan su agregación, otras de las limitantes son las elevadas temperaturas y las altas concentraciones que se requieren para la formación de las micelas (Riekkola y col., 2000).

1.2.3.3 Detección en electroforesis capilar no acuosa.

1.2.3.3.1 Detección UV-VIS.

Este es el método comúnmente utilizado en electroforesis capilar acuosa y es por lo general, aplicable a la NACE, los solventes que presenten una fuerte absorción a las longitudes de onda de trabajo no pueden ser considerados para este método de detección, sin embargo, muchos solventes comunes como el metanol y el acetonitrilo se pueden utilizar incluso a 200 nm. En algunos casos el efecto del solvente sobre el espectro del analito debe tomarse en cuenta (J. Tj?melund, S.H. Hansen, 1997).

1.2.3.3.2 Detección por fluorescencia.

Se han hecho algunos estudios (J. Tj?melund, S.H. Hansen, 1997) de complejos metálicos con algunas muestras lácteas y plasmáticas, se encontró que mediante la NACE se obtienen mejores intensidades de fluorescencia que utilizando medios acuosos. Otros solventes que presentaron mejores intensidades de fluorescencia son: formamida, metanol y acetonitrilo.

También se ha estudiado la detección indirecta y la cantidad de aditivo necesaria fue menor en solventes no acuosos, permitiendo mejorar los límites de detección (T. Chang y col. 1999).

1.2.3.4 Detección electroquímica.

Los sistemas de detección electroquímica usualmente involucran instrumentos de alta sensibilidad, los cuales están propensos a interferencias debido a campos eléctricos externos. El problema es especialmente importante en electroforesis capilar donde se encuentran presentes altos voltajes durante la operación del equipo. La interferencia se espera que sea menor utilizando solventes no acuosos debido a la elevada resistencia del medio. La NACE

extiende la aplicabilidad potencial para este tipo de detectores permitiendo la detección de compuestos que son difíciles de oxidar o reducir en medios acuosos, el acetonitrilo se ha mostrado especialmente útil para la detección electroquímica (A.J. Fry, 1996).

1.2.3.5 Espectrometría de masas con ionización electroquímica.

El hecho de sustituir el agua por solventes orgánicos en el acoplamiento de la electroforesis capilar con el espectrómetro de masas mediante ionización electroquímica (EC-ESI-MS) reúne todas las condiciones necesarias para obtener un spray estable y una sensibilidad elevada. La formación del spray se ve favorecida por la baja tensión superficial y el calor de vaporización de los solventes orgánicos. La facilidad de evaporación de los solventes orgánicos permite el uso de menores cantidades de gas desecante y por lo tanto, se obtiene un incremento en el rendimiento de los iones hacia el espectrómetro de masas. Entre los diversos solventes estudiados con buenos resultados se encuentran el metanol, acetonitrilo, hexano y 2-propanol.

1.2.3.6 Separación de analitos sin carga.

Hasta el momento, la técnica electroforética más utilizada para la separación de analitos sin carga es la llamada Electroforesis Micelar Electrocinética (MEC), sin embargo, como se ha mencionado, el uso de solventes no acuosos limita el uso de surfactantes. Los solventes orgánicos ofrecen el potencial de mecanismos de separación basados en interacciones que no pueden llevarse a cabo o son muy débiles en medios acuosos, además, las solubilidades de muchos aditivos prometedores para llevar a cabo interacciones analito-aditivo son mayores en algunos solventes orgánicos que en soluciones acuosas.

En la tabla 4 se muestran las aplicaciones mas recientes del metanol y del acetonitrilo en análisis de diversos compuestos utilizando la NACE, así como los electrolitos más utilizados y los analitos para los cuales ayudan a mejorar las separaciones, sensibilidad y selectividad.

Tabla 4. Aplicaciones del metanol y acetonitrilo en la NACE (Riekkola y col., 2000).

Solvente	Electrolito	Analito
Metanol (MeOH)	Imidazoles, ácido acético	Iones metálicos, aminas no cromóforos, surfactantes catiónicos
MeOH	Acetato de amonio, metanolato de amonio	Ácidos benzoicos
Mezcla de MeOH y acetonitrilo (Acn)	Acetato de amonio,	Ácidos carboxílicos, fármacos
MeOH	CAPS y Brij 35	Porfirinas
Acetonitrilo, MeOH y sus mezclas	Acido perclórico, SDS	Triazinas
Mezcla de Acetonitrilo y MeOH	Acetato de amonio, ácido acético	Cimetidina y materiales derivados.
MeOH, mezcla de MeOH y Acetonitrilo	Acetato de amonio	Fármacos antiinflamatorio no esteroideos
MeOH	Sulfonato naftaleno, sulfonato octilbenceno	Surfactates aniónicos
Acetonitrilo mezclado con MeOH	Acetato de amonio, ácido acético, KOH	Fenoles
MeOH mezclado con Acetonitrilo	Acetatos de metales alcalinos, acetato de amonio, cloruro de amonio y bromuro de amonio.	Narcóticos y diuréticos
MeOH mezclado con Acetonitrilo	Acetato de amonio, ácido acético, acetato de sodio y HDB	Ácidos benzoicos, ácidos orgánicos.

MeOH = Metanol

Acn = Acetonitrilo.

OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Evaluar diferentes estrategias para el análisis y separación de pesticidas en mieles utilizando la técnica de Electroforesis Capilar.

2.2. Objetivos específicos.

- Aplicar y evaluar las diferentes metodologías utilizadas en electroforesis capilar para el análisis de pesticidas en la miel.
- Estudiar individualmente y en diferentes mezclas a los distintos pesticidas utilizados comúnmente para el control de la *varroasis* en las abejas.

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Materiales, reactivos y soluciones.

Reactivos

- ✚ Amitraz marca: Riedel-de Häen, Amitraz Pestanal, P.M. 293 g/mol, pureza 96.4%. Fórmula $C_{19}H_{23}N_3$.
- ✚ Coumafos marca: Riedel-de Häen, Coumaphos Pestanal, P.M. 362 g/mol, pureza 99.8%. Fórmula $C_{14}H_{16}ClO_5PS$.
- ✚ Fluvalinato marca: Riedel-de Häen, Tau -Fluvalinate Pestanal, P.M. 502 g/mol, pureza 93.4 %. Fórmula $C_{26}H_{22}ClF_3N_2O_3$
- ✚ Bromopropilato marca: Riedel-de Häen, Bromopropylat Pestanal, P.M. 428 g/mol, pureza 98.9%. Fórmula $C_{17}H_{16}Br_2O_3$.
- ✚ Acetato de sodio marca J.T.Baker 3460-01, P.M. 136 g/mol, pureza 100%. Fórmula: $CH_3COONa \cdot 3H_2O$
- ✚ Acetato de amonio marca Mallinckrodt 3272-03, P.M. 77 g/mol. Fórmula: $NH_4C_2H_3O_2$
- ✚ Ácido acético marca Química Meyer, P.M. 60 g/mol , pureza 99.93%. Fórmula: CH_3COOH , densidad = 1.08 g/mL.
- ✚ Metanol grado HPLC, marca Mallinckrodt ChromAR*HPLC, P.M. 32 g/mol, pureza 99.9%. Fórmula CH_3OH .
- ✚ Acetonitrilo HPLC, J.T. Baker 9017-02, P.M. 41; pureza 99.99 %
- ✚ Dodecíl sulfato de sodio (SDS) marca Riedel-de Häen.
- ✚ Tritón X114 marca Riedel-de Häen.

Material

- ❖ Filtros de nylon marca Fisher Scientific, 0.45 μm .
- ❖ Jeringa marca NIPRO de 10 mL de capacidad, estéril.
- ❖ Cartuchos C18, 5 cm.
- ❖ Capilar marca Beckman Coulter de 50 y 75 μm .

- ❖ Sistema de electroforesis capilar, marca Beckman Coulter P/ACE system MDQ

Soluciones

- Fases móviles acuosas de boratos, fosfatos y acetatos a distintas concentraciones y pH.
- Fase móvil de metanol-acetonitrilo 8:2 (v/v) con 20 mM de acetato de sodio y 1 M de ácido acético, la cual se elaboró preparando una solución previa de metanol y acetonitrilo 8:2 (v/v), posteriormente se adicionó el acetato de sodio y se midió el volumen necesario de ácido acético, se mezcló en un matraz aforado y se enrasó dicha solución con la mezcla de metanol y acetonitrilo previamente preparado.
- Fase móvil de metanol-acetonitrilo 8:2 (v/v) con 20 mM de acetato de amonio y 1 M de ácido acético, la cuál se elaboró haciendo una solución previa de metanol y acetonitrilo 8:2 (v/v), posteriormente se adicionó el acetato de amonio y se midió el volumen necesario de ácido acético, los cuales se mezclaron en un matraz aforado y se enrasó dicha solución con la mezcla de metanol y acetonitrilo previamente preparado.
- Para la preparación de los pesticidas que fueron analizados se pesaron los gramos necesarios del pesticida y se afora con la fase móvil previamente preparada y filtrada.
- Todas las disoluciones se filtraron utilizando un filtro de 0.45 µm de tamaño de poro.

3.2. Métodos.

El lavado del capilar es un parámetro muy importante ya que de ello también puede depender la estabilidad en la separación del analito, por lo tanto, para los distintos ensayos se utilizaron diversos tipos de lavado; en algunos ensayos durante el proceso de lavado se aumentó y/o disminuyó la presión, en ensayos posteriores se modificó la concentración del NaOH, la cual fue desde 0.1 M hasta 1 M, o en lugar de NaOH y agua, también se lavó sólo con fase móvil, de los anteriores, tanto para el NaOH como con la fase móvil se aumentó la temperatura y/o presión, hasta 50 °C y/o 60 psi, respectivamente.

El método desarrollado de acondicionamiento y lavado de capilar fue optimizado durante el desarrollo de la investigación, se muestra un resumen de los cambios que se hicieron.

- Acondicionamiento del capilar previo a su utilización el día del análisis de los pesticidas, constó de un lavado con NaOH 0.1M durante 15 minutos, posteriormente un lavado con agua (grado milli-Q) durante 20 minutos, esto para lavar el exceso de NaOH, una vez realizados los lavados con NaOH y agua a una presión de 35 psi, se hizo un lavado con fase móvil (metanol y acetonitrilo 8:2) durante 25 minutos a 40 psi.
- Un lavado semejante se realizó al capilar entre cada inyección de pesticida diferente, pero con un aumento en la temperatura a 45°C y tiempos más cortos: lavado con NaOH durante 10 minutos, agua durante 12 minutos y con fase móvil adicionada con acetato de amonio durante 15 minutos manteniendo la misma presión de lavado que al principio del día.
- Al final del día se hizo un lavado fuerte con metanol y agua durante 30 minutos a 40°C y 45 psi.

El estudio de los pesticidas mediante la metodología NACE puede ofrecer ventajas para el análisis de ciertos compuestos, sin embargo, debido al uso de fases no acuosas se presentan ciertos problemas principalmente en la

intensidad de corriente y reproducibilidad de los resultados, en el presente trabajo se realizaron más de 300 inyecciones para desarrollar la metodología más adecuada para el estudio de los compuestos de interés, se realizaron ensayos modificando distintas condiciones como temperatura, voltaje de separación, método de inyección y adición de distintos electrolitos como acetatos de amonio y sodio. Cabe mencionar que en la literatura se puede encontrar que el acetato de amonio ofrece una mejor estabilidad en comparación con el acetato de sodio (A.C. Martel y col., 2002); pero en los resultados del presente trabajo no se observa una diferencia entre el uso de uno y otro acetato, siendo esta una importante contribución en la aplicación de la NACE.

La mayoría de los solventes orgánicos son capaces de disolver electrolitos al mínimo; entre la gran variedad de electrolitos disponibles, ácidos y sales de amonio son los más comúnmente utilizados. Los electrolitos catiónicos o aniónicos tienen además un claro efecto sobre la selectividad electroforética en NACE (S.P. Porras y col., 1999), por lo anterior, las fases no acuosas seleccionadas fueron mezclas de metanol y acetonitrilo, con la adición de electrolitos como ácido acético y sus sales. Se empleó metanol o acetonitrilo para solubilizar, de estos ensayos de solubilidad se observó que los pesticidas disueltos sólo en metanol o acetonitrilo no presentaban problemas como las mezclas de solventes orgánicos con agua.

Entre los distintos parámetros estudiados para obtener las mejores condiciones de análisis se encuentra la temperatura. Existen estudios previos (R. Cela y col., 1998) donde se menciona que mediante las condiciones de análisis empleadas al inicio de este estudio (25 kV de separación y 25 °C en el cartucho), es posible que el acetonitrilo ebulle, lo anterior es debido a que la ebullición se alcanza al utilizar voltaje de 30 kV (R. Cela y col., 1998), y dado que en este trabajo se utiliza un voltaje muy próximo, es decir, 25 kV y una temperatura relativamente alta, 25 °C; es posible que se llegara a dicho punto y al comenzar a ebullición el acetonitrilo produzca burbujas dentro del capilar

ocasionando inestabilidad en la intensidad de corriente, por lo anterior se realizaron diversos ensayos disminuyendo la temperatura hasta 18 °C, sin embargo, no se observaron diferencias entre el empleo de una u otra de estas temperaturas, por lo que se mantuvo la temperatura de 25 °C y se modificó el voltaje hasta 15 kV, previniendo así el comienzo de la ebullición.

Otro de los parámetros estudiados en el presente trabajo se enfocó a la disolución de los estándares. Se probaron diversas disoluciones utilizando la fase metanol:acetonitrilo con y sin la adición de electrolitos (acetatos de sodio y amonio y ácido acético). Los resultados obtenidos presentaron una mejoría mediante el uso de los electrolitos, observándose una mayor estabilidad en la intensidad de corriente, ya que las sales y el ácido acético contribuyen al aumento de la conductividad, ya de por sí baja o nula de las fases no acuosas (A.C. Martel y col., 2002). En el presente estudio se observó un aumento en la intensidad de corriente que va de 7 μ A hasta 20 μ A cuando se utilizaron los electrolitos en el vial de la inyección.

Como ya se ha mencionado debido a la baja intensidad de corriente que usualmente se presenta con las fases no acuosas, se suelen adicionar electrolitos, en el presente estudio se ensayaron los diferentes electrolitos (sales de acetato) a distintas concentraciones, entre 20 y 50 mM, los resultados no muestran diferencias a las concentraciones mencionadas, optándose por utilizar la correspondiente a 20 mM (J. Rodríguez, J.J. Berzas, A.M. Contenido, M.P. Cabello y col., 2003)

Todo lo anterior se ensayó con el fin de mejorar la intensidad de corriente y solubilidad, pero en cuanto a los resultados, se pueden citar problemas de taponamiento de capilar y picos muy anchos, se pueden numerar diversas soluciones para estos problemas, como variar el diámetro del capilar, mejorar los lavados del capilar, métodos de inyección y polaridad durante el análisis, por mencionar algunos.

El taponamiento del capilar se puede evitar aumentando el diámetro del mismo o cambiando el tipo de inyección, ya que una inyección a presión envía todo el analito al tubo capilar a un mismo tiempo, en un bolo de muestra; y con una electrocinética el analito es inyectado en partes, por cargas, es decir, primero las moléculas negativas, seguidas por las neutras y las positivas al final, por lo tanto al introducir el analito en fracciones con esta última opción de inyección se observó que también se puede evitar el taponamiento en el capilar (D.C. Harris, 2001).

La polaridad utilizada durante los diversos ensayos fue siempre normal y en algunos casos se probó también la polaridad inversa, la cuál no arrojó resultados concluyentes.

En la figura 8 se presenta un diagrama de la metodología final de lavado y acondicionamiento del capilar.

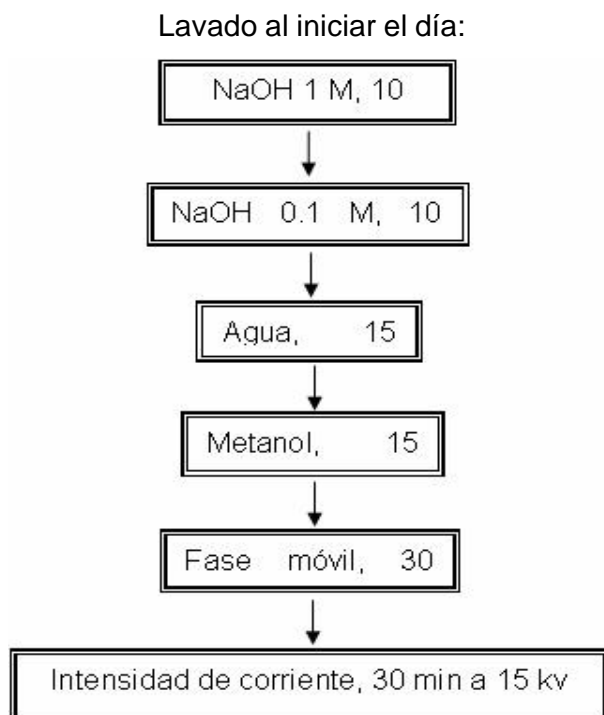


Fig. 8. Diagrama de flujo de la metodología de lavado y acondicionamiento del capilar, presión para todos los lavados 35 psi.

Se llegó a una metodología denominada “lavado intermedio” la cuál se realizó entre cada inyección consta de:

- Metanol 10 min
- Fase móvil 10 min
- Todo lo anterior a 20 psi

Condiciones de la inyección

- Las inyecciones se realizaron con voltaje de 3 kV durante 4 segundos.
- El voltaje durante la separación fue de 15 kV.
- Se utilizó un detector de UV a las siguientes longitudes de onda: 280 nm para amitraz y coumafos, 254 nm para bromopropilato y fluvalinato (Gomis y col., 1996).

Metodología final desarrollada

- Se utilizaron capilares de 50 y 75 μm de diámetro interno con una longitud de 40 cm.
- Los voltajes utilizados mediante la NACE fueron 25, 20 y 15 kV.
- El tipo de inyección utilizada fue la electrocinética, utilizando 4 kV durante 3 segundos.
- Las fases móviles utilizadas fueron:
 1. Metanol – acetonitrilo 8:2 (v/v), 20 mM de acetato de sodio y ácido acético 1M.
 2. Metanol – acetonitrilo 8:2 (v/v), 20 mM de acetato de amonio y ácido acético 1M.

Metodología para la extracción de los pesticidas en miel

La metodología a la cuál se llegó para su uso en este trabajo es la siguiente:

Preparación de la muestra:

- A 20 mL de miel se le agregaron 80 mL de agua milli-Q hasta un aforo de 100 mL, posteriormente se adicionó 0.1 mL del pesticida (10 mg/L) para obtener una concentración final de 0.01 mg/L.
- De la solución anterior (miel, agua y pesticida) se tomó una alícuota de 50 mL y se agregó metanol en proporción 1:1 (v/v), es decir, 50 mL de metanol (M.T. Galceran y col., 2002).

Acondicionamiento del cartucho C18 (fase de activación del cartucho) (M.T. Galceran y col., 2002)

- Lavado con 2 mL de metanol:agua 1:1(v/v).
- Lavado con 2 mL de agua.
- Lavado con 5 mL de metanol:agua 1:1(v/v).

Fase: carga de la muestra y enjuague del cartucho.

- **Ensayo I**

1. La solución de miel, pesticida y agua es pasada por los cartuchos C18 en porciones de 10 mL. Los primeros 5 mL son pasados a través del cartucho y con ellos se enjuaga el matraz donde se recolectó la solución recuperada; esto para evitar una posible contaminación por el matraz.

- **Ensayo II**

1. La solución de miel, pesticida y agua es pasada por los cartuchos C18 en porciones de 10 mL. Los primeros 5 o 10 mL son pasados a través del cartucho C18 y con ellos se enjuaga el matraz recolector de la solución para evitar una posible contaminación por el matraz.
2. La solución ya pasada a través del cartucho C18, es filtrada con un filtro de nylon de 0.45 μm de tamaño de poro.

En la figura 9 se puede observar un electroferograma de ejemplo de un ensayo de extracción realizado a una muestra de miel libre de pesticidas con una longitud de onda de 280 nm inyección electrocinética (3 kV, 4 seg), esto se realizó para verificar la ausencia de señales que pudieran interferir posteriormente.

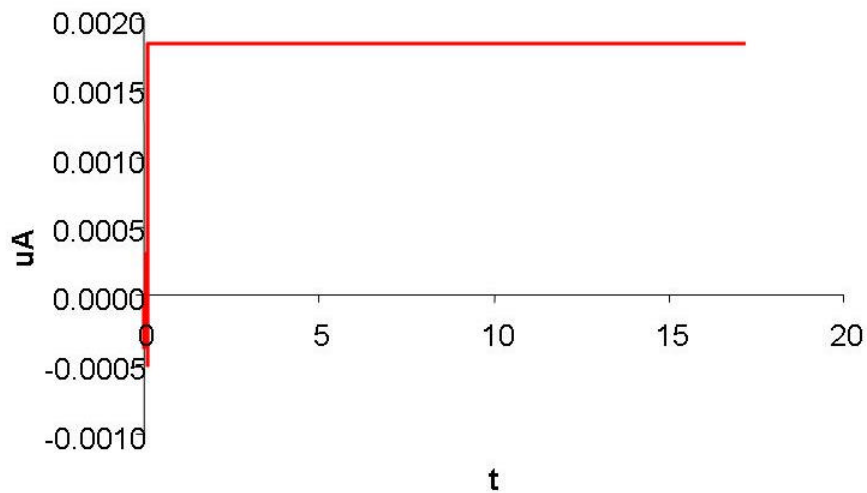


Fig. 9. Electroferograma de extracción a una muestra de miel libre de pesticidas, la línea base es constante a lo largo de 20 minutos.

3.2.1 Preparación de la muestra

Todas las muestras de pesticidas fueron preparadas a la concentración citada en el catalogo de plaguicidas editado por la SAGARPA (CICOPLAFEST, 1999); diluidas en una fase móvil de metanol y acetonitrilo 8:2 (v/v) con acetato de amonio 20 mM y ácido acético 1 M (Riekkola y col., 2000), dicha solución fue filtrada en cartuchos de nylon de 0.45 μm y almacenada en refrigeración. A continuación se presentan de forma individual las preparaciones de estándares y concentraciones de cada pesticida así como sus diferentes mezclas.

3.2.1.1 Coumafos

Para la preparación del estándar utilizado en el análisis bajo la metodología acuosa se utilizó una concentración de 2.72×10^{-3} mg/L, disueltos en acetonitrilo grado HPLC y posteriormente acetonitrilo: agua 7:3 (v/v); con y sin adición de SDS y NH_4Cl .

En el caso de la metodología no acuosa el pesticida fue preparado a 0.1, 1 y 100 mg/L en una fase móvil filtrada de metanol y acetonitrilo 8:2 (v/v) con acetato de sodio o amonio 20 mM y ácido acético 1M; se optó por utilizar estas concentraciones ya que son las establecidas como concentraciones límite permitidas en el catalogo de CICOPLAFEST (1999).

3.2.1.2 Bromopropilato

Para el análisis del bromopropilato se buscó una concentración que permitiera hacer una comparación con las concentraciones de los otros pesticidas y para lo cual se utilizó finalmente una concentración de 1.2×10^{-3} mg/L de acetonitrilo grado HPLC como solución estándar (JAL. Tadeo y col., 2004).

Para su estudio bajo la metodología NACE se prepararon a 0.1, 1 y 100 mg/L en una fase móvil de metanol y acetonitrilo 8:2 (v/v) con acetato de sodio o amonio 20 mM y ácido acético 1M.

3.2.1.3 Amitraz

El amitraz se preparó a una concentración de 2 mg/L aforándolo con acetonitrilo grado HPLC, como solución estándar para la metodología acuosa.

Para su estudio mediante la metodología NACE se prepararon a 0.1, 1 y 100 mg/L en una fase móvil filtrada de metanol y acetonitrilo 8:2 (v/v) con acetato de sodio o amonio 20 mM y ácido acético 1 M. Al igual que los pesticidas anteriormente citados, dichas concentraciones son las establecidas como límites regulados de acuerdo a la CICOPLAFEST (1999).

Se sabe que el amitraz es un pesticida inestable, ya que sufre una degradación completa en un par de días y en menos de dos semanas se obtienen tres subproductos; por lo tanto los resultados variarán de acuerdo al número de días transcurridos y por ende la reproducibilidad estará en función de los días transcurridos desde la preparación del amitraz hasta su análisis (B. Gallo y col., 2001). Se comenzó el estudio con el amitraz y no con sus productos de degradación debido a que al inicio de ésta investigación estaban fuera de los objetivos de este trabajo y no se contó con los estándares necesarios.

3.2.1.4 Fluvalinato

La solución estándar de fluvalinato para realizar ensayos mediante fases acuosas se obtuvo pesando 0.01 g del pesticida y posteriormente disolviéndolo en una mezcla de agua y acetonitrilo grado HPLC 3:7 (v/v) hasta un aforo de 5 mL, además, fue adicionado 0.01g de NH₄Cl, por cuestiones de estabilización de la corriente para su análisis.

Para el estudio mediante fases no acuosas se pesaron 0.01g del pesticida, los gramos pesados se disolvieron en metanol y acetonitrilo 8:2 (v/v) con 20 mM de acetato de sodio y 1 M de ác. acético.

3.2.1.5 Timol

El Timol se preparó a una concentración de 0.30 mg/L como solución estándar. Se realizaron diversos ensayos para encontrar una fase adecuada para la disolución del timol, entre los cuales se modificó la matriz de disolución, en el primer caso se disolvió en metanol y posteriormente se cambió a ácido acético, sin embargo, no se obtuvieron los resultados esperados ya que se presentaron muchos problemas de estabilidad de corriente y reproducibilidad.

No se presentan resultados de este pesticida debido a que los resultados obtenidos presentan poca reproducibilidad, picos con poca definición y diferentes tiempos de migración en todos los casos, ya que para el estudio de este pesticida se ensayaron diferentes fases, metodologías, condiciones de separación e inyección las cuales se numeran a mas de 100 ensayos.

3.2.1.6 Mezclas

Preparación de mezclas en soluciones acuosas

La mezcla estudiada de bromopropilato, coumafos y timol incorpora a este último debido a que en el momento del análisis se estaba estudiando simultáneamente a dicho compuesto y los resultados parecían prometedores, posteriormente se observó que no era posible estudiar al timol tanto en forma individual como en mezcla. Se prepararon disoluciones madre con las concentraciones que se muestran a continuación:

Pesticida	Concentración final
Bromopropilato	0.12 mg/L
Coumafos	0.272 mg/L
Timol	0.304 mg/L

Las concentraciones anteriores obedecen al hecho de querer estudiar los pesticidas mencionados a una concentración suficiente para obtener señales intensas. También se ensayaron diluciones de las mismas para descartar un posible saturamiento del capilar.

Preparación de mezclas en soluciones no acuosas

La mezcla denominada ABF compuesta por amitraz, bromopropilato y fluvalinato fue preparada a partir de las soluciones acuosas estándar de cada pesticida para obtener la concentración final siguiente:

Pesticida	Concentración final
Amitraz	0.120 mg/L
Bromopropilato	0.272 mg/L
Fluvalinato	0.304 mg/L

RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1. Resultados generales empleando la electroforesis capilar acuosa.

En la primera etapa del estudio se realizaron pruebas utilizando soluciones acuosas, con los cuales los resultados obtenidos no fueron satisfactorios; con la finalidad de mejorar el método se ensayaron distintos electrolitos acuosos. Entre los principales problemas encontrados (utilizando electrolitos acuosos) se observó baja solubilidad de los pesticidas y una intensidad de corriente muy baja, nula o inestable. En un intento por mejorar ambos factores se utilizaron estrategias como la adición de surfactantes de diversa naturaleza y la adición de sales, algunas de las estrategias llevadas a cabo se muestran a continuación:

Adición de surfactantes:

Se utilizaron con el fin de mejorar la solubilidad de los pesticidas en el medio acuoso:

- Para ello se adicionaron algunos surfactantes como son SDS y Tritón X114, con la finalidad de formar micelas en la fase y así aumentar la solubilidad de los pesticidas, primero a su concentración micelar crítica (cmc) y posteriormente aumentada 10 veces, sin embargo, no se observó una mejoría en los resultados.

Intensidad de corriente (IC):

- Se adicionó a la fase móvil NH_4Cl , tratando de estabilizar la intensidad de corriente, lo cual fue de poca ayuda (figuras 10 y 11).
- También se probaron diferentes mezclas acetonitrilo y buffer de boratos, 30% de acetonitrilo y 70% boratos; acetonitrilo y buffer de boratos 1:1 (v/v); los cuales no funcionaron observándose

cristalización en los viales que contenían las soluciones con pesticidas.

Problemas como baja intensidad o caída de corriente, corriente nula o muy inestable fueron los principales contratiempos observados con esta metodología.

Las figuras 10 y 11 son ejemplos de electroferogramas bajo la modalidad acuosa, en la primer figura se puede observar una fluctuación en la línea base, una señal obtenida a los 1.7 minutos y posteriormente una inestabilidad de la línea provocada posiblemente por la poca solubilidad en el medio y en la segunda figura una línea base creciente y posteriormente estable pero sin presentar señales del analito, dichos problemas son observados en todos los pesticidas, por lo que sólo se muestran las figuras del coumafos a manera de ejemplo.

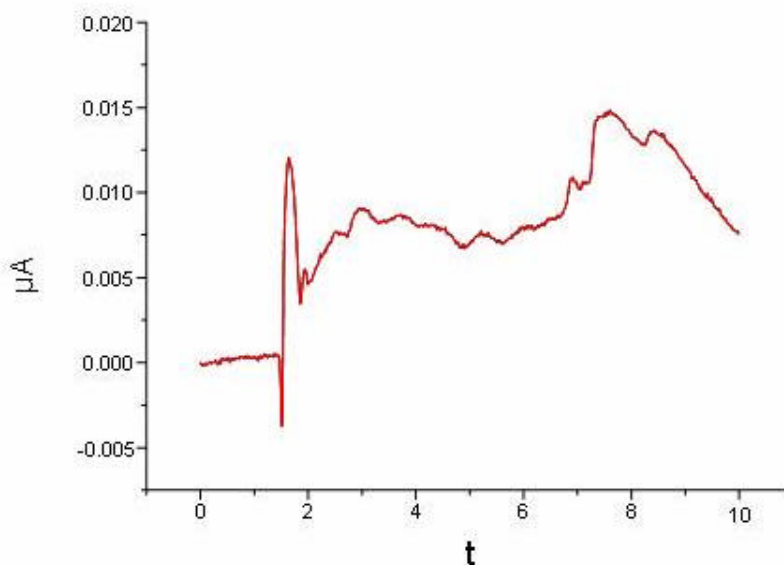


Figura 10. Electroferograma de coumafos analizado en medio acuoso con 0.05M de sales de amonio

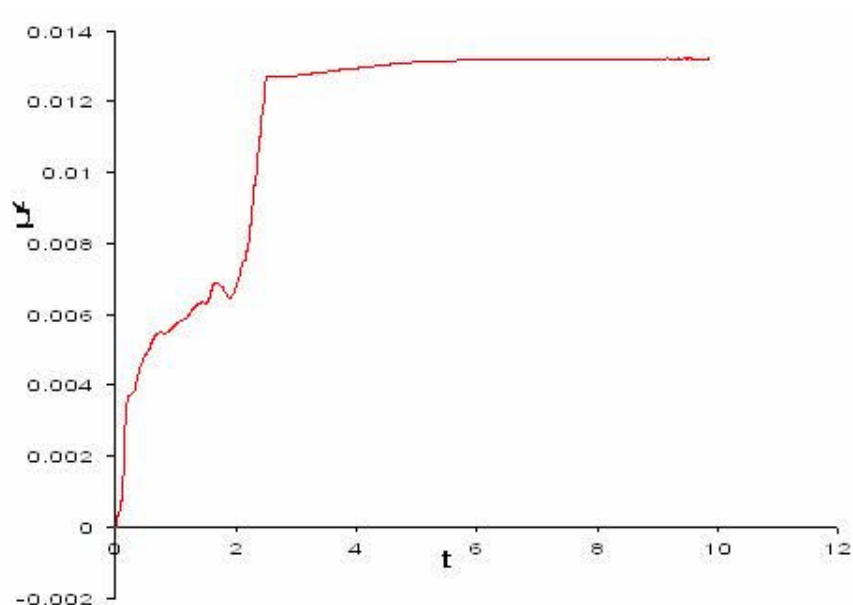


Figura 11. Electroferograma de coumafós analizado en medio acuoso con 0.1M de sales de amonio. En el apartado correspondiente a cada pesticida se detallan los resultados obtenidos en cada uno de ellos.

4.2. Análisis individual de los pesticidas.

4.2.1. Coumafós.

4.2.1.1. Resultados obtenidos mediante fases acuosas.

Se intentó desarrollar una metodología para el análisis de coumafós empleando la EC acuosa, se ensayaron diversos parámetros como la composición y concentración del electrolito, adición de surfactantes, condiciones de inyección y separación, etc.

Cabe hacer mención que la longitud de onda en el máximo de absorción para el coumafós es de 313 nm (A. C. Martel y col., 2002), sin embargo debido a dificultades técnicas con el equipo, la longitud de onda más cercana disponible fue de 280 nm y que, a comparación de otras longitudes de onda ésta puede ayudar a la sensibilidad (B. Gomis y col., 1996), en el presente

trabajo se logró observar una buena señal del analito utilizando una longitud de onda de 280 nm.

La variación de distintos parámetros como la presión de las inyecciones, el voltaje de la separación, pH y adición de surfactantes para mejorar las señales de los ensayos realizados al coumafos bajo una metodología acuosa se describen a continuación:

Variación de la presión en la inyección.

Al variar la presión de las inyecciones se pudo observar un cambio en los tiempos de migración de las señales obtenidas; un mayor tiempo para las presiones mas bajas, es decir, de 0.5 y 3 psi y por el contrario un tiempo de migración menor para presiones mas altas, en la tabla 5 se presenta una tabla de las condiciones empleadas para los ensayos en los cuales se modificó la presión de las inyecciones:

Tabla 5. Condiciones y resultados obtenidos de los ensayos con variación de presión en la inyección utilizando fases acuosas.

Ej.	?	kV	t	psi	Buffer	t_m	I.C.
		sep	Iny (s)	iny		(min)	(μA)
1	280	25	5	0.5	PBS 0.005M pH: 11.5	3.1	10
2	280	25	5	3	PBS 0.005M pH: 11.5	3.06	10
3	280	25	5	5	PBS 0.005M pH: 11.5	2.54	10

?: Longitud de onda; kV : kilovolts durante la separación; t : tiempo de la inyección; psi iny; presión de la inyección, t_m : tiempo de migración; I.C. Intensidad de corriente; PBS: Buffer sistema de fosfatos.

Variación de la concentración del buffer en los ensayos aplicados al coumafos.

Se tiene la aparición de la señal del analito a un tiempo de migración de 2.54 minutos aproximadamente con un sistema buffer de fosfatos (PBS) a una concentración 0.005 M (Fig. 12), esto se presenta como una discrepancia en comparación con los tiempos obtenidos en los ensayos realizados con un buffer

PBS a una concentración mayor, es decir, 0.05 M (Fig. 13); por un lado se tiene un lógico aumento en la IC al aumentar la concentración del PBS, se esperaba por lo tanto una migración más rápida lo cual no sucedió. Lo anterior pudiera deberse a que la concentración iónica de las especies presentes es alta provocando una serie de interacciones ion-analito provocando la ralentización de la migración (D.C. Harris, 2001).

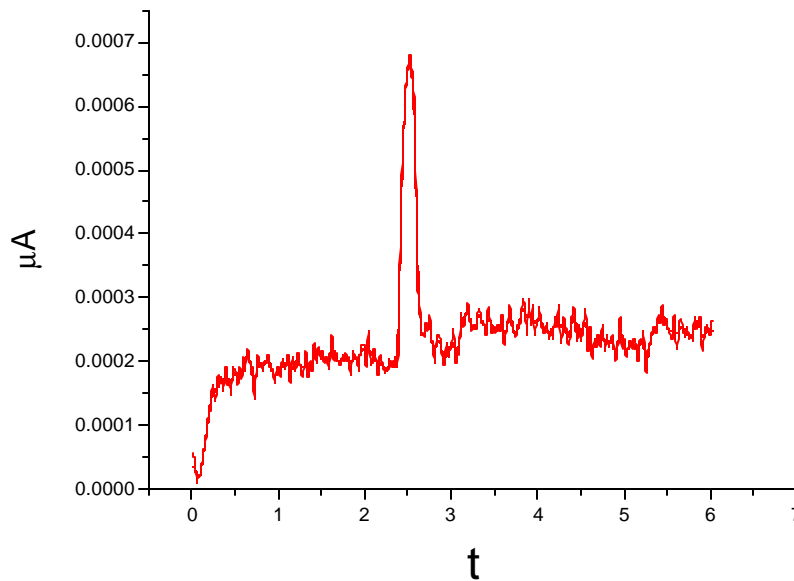


Figura 12. Electroferograma de coumafos analizado con fases acuosas y adicionada con un sistema buffer de fosfatos a una concentración 0.005 M; tiempo de migración de 2.54 minutos, inyección por presión 5 psi y utilizando un capilar con 50 µm de diámetro interno.

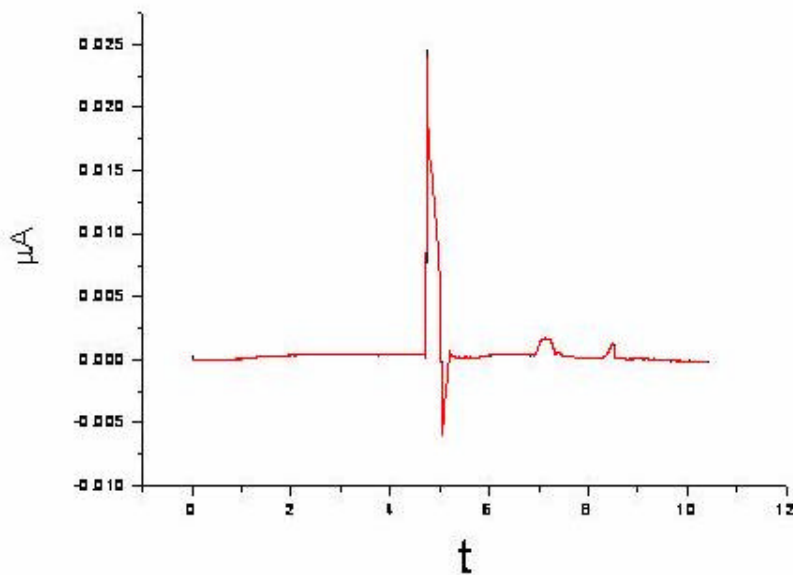


Figura 13. Electroferograma de coumafos analizado con fases acuosas y adicionada con un sistema buffer de fosfatos a una concentración 0.05 M; tiempo de migración de 4.8 minutos, inyección por presión 5 psi y utilizando un capilar con 50 μm de diámetro interno.

En la tabla 6 se pueden observar algunos ejemplos de los tiempos de migración obtenidos de los ensayos con una variación en la concentración del PBS.

Tabla 6. Tiempos de migración e intensidades de corriente obtenidos en los ensayos con aumento en la concentración del PBS.

Ej.	?	kV	t	psi	Buffer	t_m	I.C.
		sep	Iny (s)	iny		(min)	(μA)
1	280	25	5	5	PBS 0.005 M pH: 11.5	2.5	10
2	280	25	5	5	PBS 0.05 M pH: 11.5	4.7	60

?: Longitud de onda; kV : kilovolts durante la separación; t : tiempo de inyección ; psi iny; presión de la inyección; t_m : tiempo de migración; I.C. Intensidad de corriente; PBS: Buffer sistema de fosfatos.

Variación del pH y buffer de los ensayos realizados al coumafos

En un intento por mejorar la I.C. y el tiempo de migración del analito, así como poder observar el comportamiento de la señal con el cambio de dichos parámetros se presentó, se utilizó ácido bórico a una concentración de 0.05 M y

un pH de 8.6 con lo cual se observó una I.C. muy inestable con aumentos hasta 136 μA y disminuciones hasta 0 μA . A pesar de que el coumafos es de difícil disolución en medios acuosos es posible observar la señal del analito, incluso cambiando condiciones como pH (11.5 y 10) y diámetro del capilar (50 y 75 μm de diámetro interno), corroborando que la señal obtenida corresponde al estándar (Fig. 14).

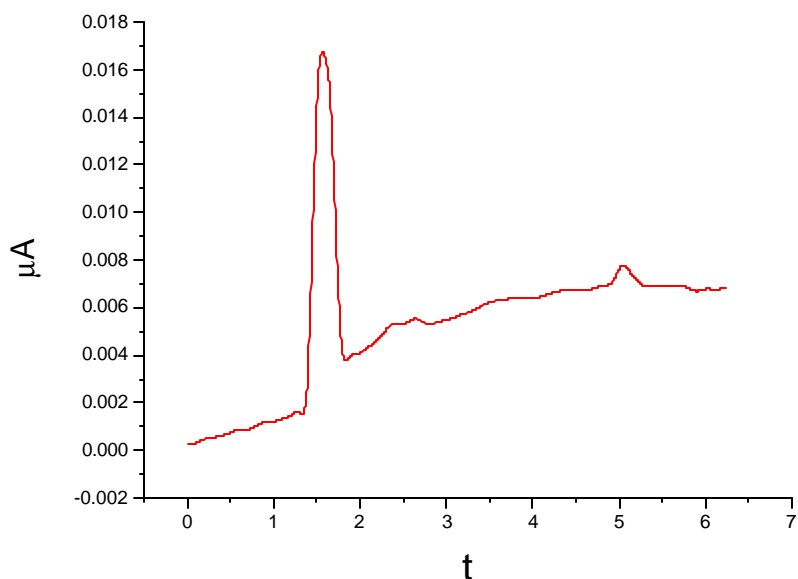


Figura14: Electroferograma de coumafos analizado mediante fases acuosas, pH 10, sin adición de surfactantes, inyección por presión 5 psi y capilar con 75 μm de diámetro interno.

Al tratar de mejorar la señal aumentando la solubilidad del analito en el medio con la formación de micelas se utilizó un surfactante como el tritón X114 0.04 mM (Fig. 15); de los ensayos con la adición de este surfactante se observaron distintos problemas en la línea base, al presentarse una inestabilidad en la misma, probablemente causada por las micelas libres del surfactante, aunque el tiempo de migración de la señal predominante fue muy similar a las señales observadas en la figura 14, con el mismo diámetro interno del capilar (75 μm).

Al intentar cambiar la metodología de ensayos con triton X 114 mM; se puede observar (Fig. 16) que se presenta una señal a los 6.3 minutos con un área relativamente menor que las señales anteriores, lo anterior puede atribuirse a las micelas libres y a una posible asociación del exceso de éstas (producto de sobrepasar el umbral de la cmc) con el analito, provocando una descompensación en la línea base; también se utilizó SDS como surfactante pero no se pudieron observar resultados favorables, ya que no se observaron picos y había muchos problemas con la intensidad de corriente.

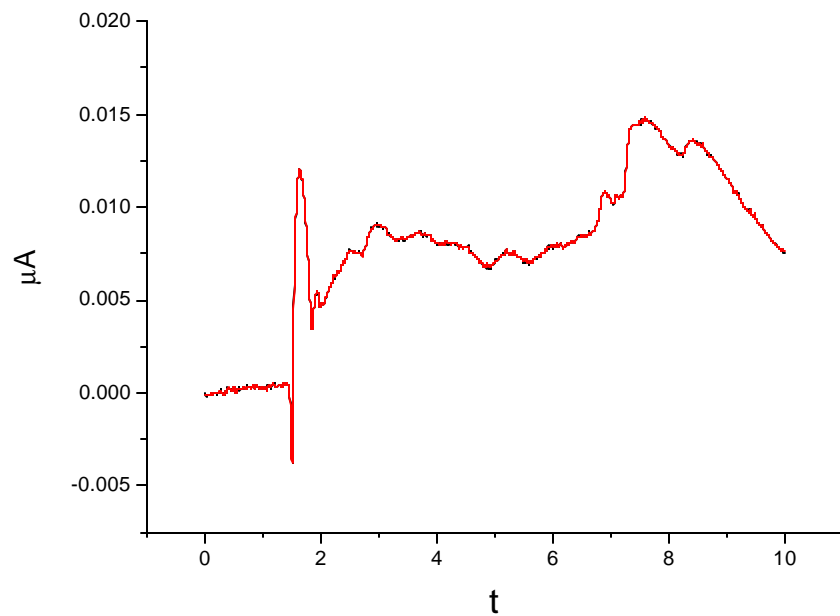


Figura 15: Electroferograma de coumafos analizado con una inyección por presión y adición de triton X 114 con una concentración 0.04 mM, se puede observar la inestabilidad en la línea base.

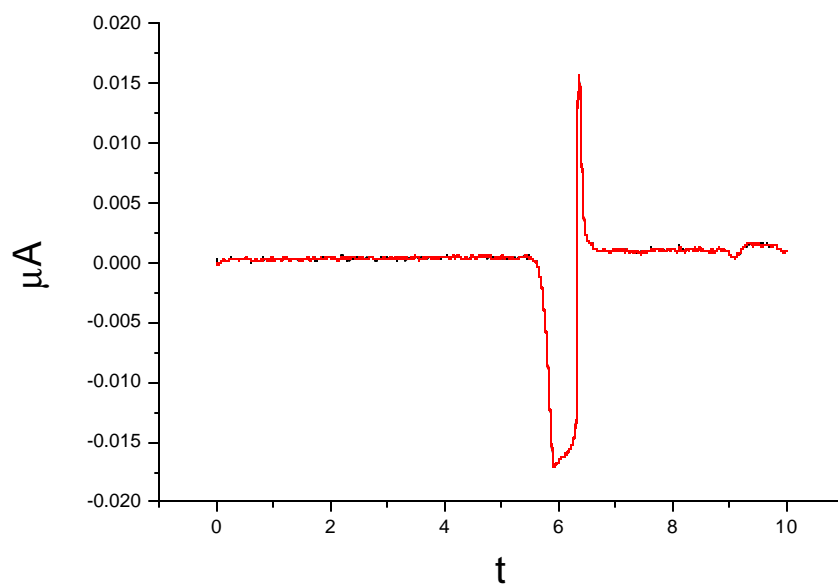


Figura 16: Electroferograma de Coumafos analizado con una fase acuosa y adición de triton X 114 con su concentración micelar crítica aumentada a 2 mM.

En la tabla 7 se muestran los tiempos de migración, I.C., y condiciones de estudio del analito mediante fases acuosas con adición de surfactantes.

Tabla 7. Condiciones de análisis del coumafos, mediante fases acuosas con variación en el pH y con adición de surfactantes.

Ej.	?	kV	t Iny (s)	psi iny	Buffer	t _m (min)	I.C. (µA)
1	280	25	5	5	PBS 0.05M pH: 10.0	1.5	100
2	280	25	5	5	PBS 0.05M pH: 10.0 Tritón X114 0.4mM	1.4	100
3	280	25	5	5	PBS 0.05M pH: 8.9 H ₂ O/acetonitrilo 7:3 (v/v) SDS 0.08M NH ₄ Cl 0.05M	14.6	180

?: Longitud de onda; kV : kilovolts durante la separación; t : tiempo de inyección; psi iny; presión de la inyección; t_m : tiempo de migración; I.C. Intensidad de corriente; PBS: Buffer sistema de fosfatos SDS: Dodecil sulfato de sodio.

4.2.1.2 Resultados obtenidos mediante fases no acuosas

La tabla 8 muestra los resultados obtenidos mediante fases no acuosas, en la que a manera de resumen se enlistan las condiciones empleadas para el estudio del analito bajo esta metodología; no presentaron una reproducibilidad favorable; la misma señal puede observarse en 4 ensayos diferentes pero además se aprecian 2 ó 4 picos más, lo mismo fue observado a diferentes voltajes, ya que parámetros como la presión y el tiempo de inyección no fueron modificados, hay que tomar en cuenta que también se modificaron estas condiciones pero no se apreciaron resultados contundentes que pudieran ser presentados.

Por otra parte, los ensayos mediante una fase no acuosa a base de metanol y acetonitrilo con la adición de electrolitos como el acetato de amonio 20 mM y ácido acético 1 M, presentan un buen resultado, una señal intensa y buena reproducibilidad, con un tiempo de migración de 18.8 minutos y una intensidad de corriente muy estable a 23 μ A. Dichos resultados se muestran en la figura 17 en la cual se observar una señal a los 18.8 minutos, con una línea base estable y una buena intensidad de corriente durante el análisis.

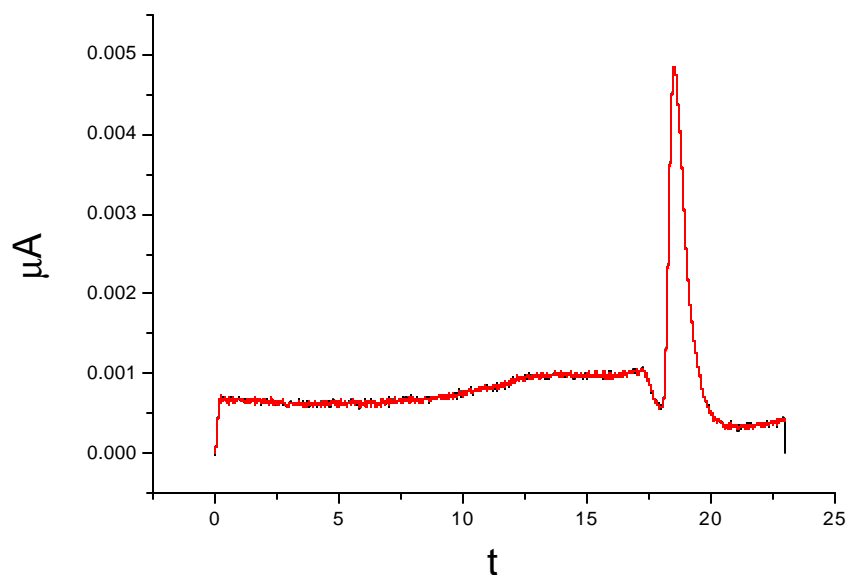


Figura 17: Electroferograma de coumaños analizado mediante fases no acuosas, inyección electrocinética (3 kV, 4 seg.).

Tabla 8. Condiciones y resultados obtenidos de los ensayos mediante fases no acuosas.

Ej.	?	kV sep	t _{iny} (s)	psi iny	Buffer	t _m (min)	I.C. (µA)
1	280	20	5	5	MeOH/Acn 8:2 (v/v) CH ₃ COONa-3H ₂ O 20mM CH ₃ COOH 1M	8	10
2	280	25	5	5	MeOH/Acn 8:2 (v/v) CH ₃ COONa-3H ₂ O 20mM CH ₃ COOH 1M	6.5 2 picos mas	10
3	280	15	5	5	MeOH/Acn 8:2 (v/v) CH ₃ COONa-3H ₂ O 20mM CH ₃ COOH 1M	10.06 4 picos mas	10
4	280	25	5	5	MeOH/Acn 8:2 (v/v) CH ₃ COONa-3H ₂ O 20mM CH ₃ COOH 1M	8.87	10
5	280	25	5	5	MeOH/Acn 8:2 (v/v) CH ₃ COONa-3H ₂ O 20mM CH ₃ COOH 1M	9.19	10

?: Longitud de onda; kV : kilovolts durante la separación; t : tiempo de inyección ; psi iny; presión de la inyección; t_m : tiempo de migración; I.C. Intensidad de corriente; PBS: Buffer sistema de fosfatos.

4.2.1.3 Extracción del pesticida en miel.

La extracción del pesticida fue realizada como se mencionó en la sección de materiales y métodos. En el primer ensayo la solución de miel, agua y el coumafos es llevada en proporción 1:1 con metanol, posteriormente se pasa a través de un cartucho C18; en el segundo ensayo además de pasar la solución de miel, agua y pesticida/metanol 1:1 a través de cartuchos C18, se filtró adicionalmente con un cartucho de nylon con poro de 0.45 μm . Los resultados pueden ser observados en la tabla 9, donde se obtuvo una buena reproducibilidad para ambas pruebas de extracción y la intensidad de corriente aunque fue baja, fue también muy estable con un valor de 7 μA durante todo el tiempo de análisis, la única discordancia entre resultados fue el área del pico y una ligera caída de la línea base, tomando en cuenta la señal del ensayo I (Fig. 18A) con un área de pico mayor en comparación de la señal del ensayo II (Fig. 18B) la cual presenta una área menor pero con un tiempo de migración similar, esto puede ser provocado por que la primer prueba es un procedimiento sin filtrar, lo cuál se puede asociar a una complejación o interacción con alguno de muchos de los compuesto de la miel. Esto puede ser observado en la figura 19, donde se sobreponen las figuras 18A y 18B, con un tiempo de migración similar pero diferentes áreas.

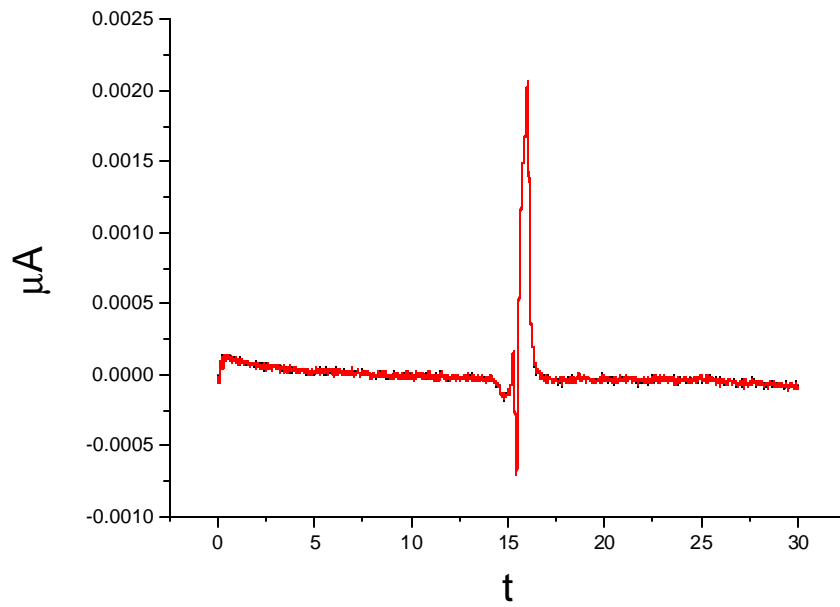


Fig. 18A: Electroferograma de la extracción de coumafos en el ensayo I y utilizando medios acuosos, inyección por presión 5 psi, y 15 kV en la separación durante el análisis.

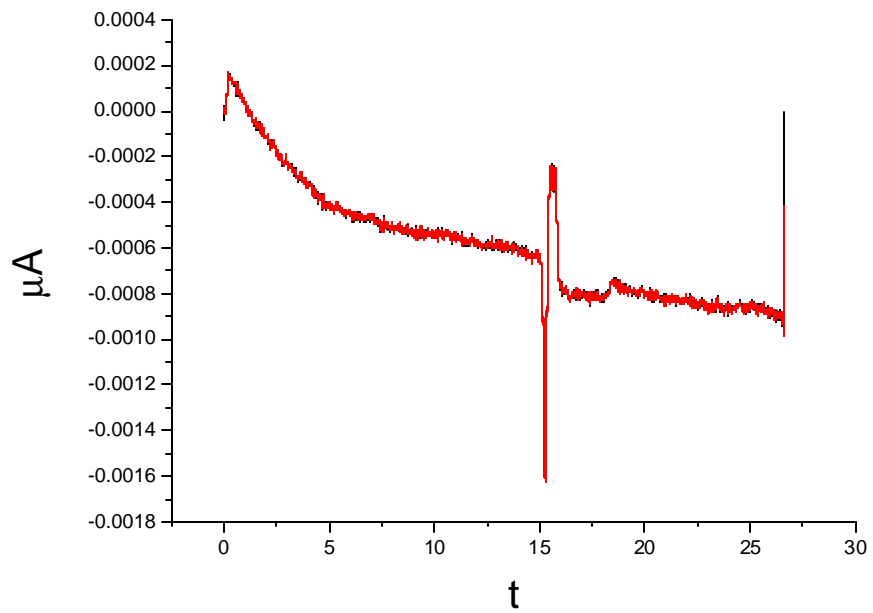


Fig. 18B: Electroferograma de la extracción de coumafos en el ensayo II y utilizando medios acuosos, inyección por presión 5 psi, y 15 kV en la separación durante el análisis.

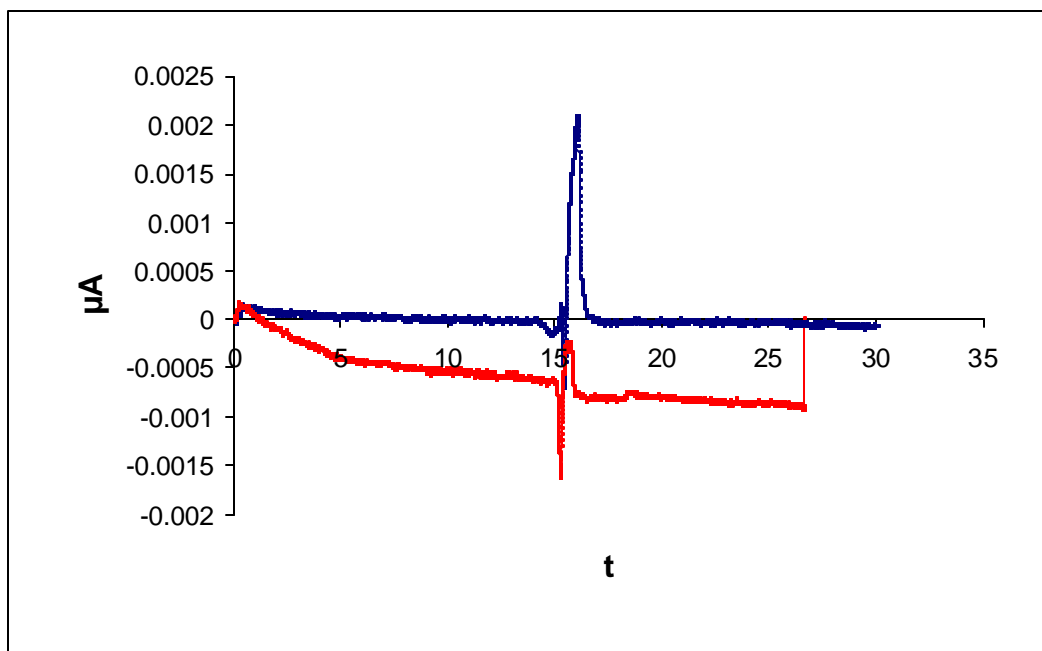


Figura 19: Electroferogramas A y B correspondientes a los ensayos I y II de la extracción de coumafos.

Tabla 9. Lista de condiciones y resultados para los ensayos I y II de la extracción del coumafos.

Ej.	?	kV	t iny sep	psi iny	Buffer	t _m (min)	I.C. µA
A	280	15	5	5	MeOH/Acn 8:2 (v/v) CH ₃ COONa-3H ₂ O 20mM CH ₃ COOH 1M	15.98	7
B	280	15	5	5	MeOH/Acn 8:2 (v/v) CH ₃ COONa-3H ₂ O 20mM CH ₃ COOH 1M	15.6	7

?: Longitud de onda; kV : kilovolts durante la separación; t : tiempo de inyección ;psi iny: presión en la inyección; t_m : tiempo de migración; I.C. Intensidad de corriente.

En el estudio del coumafos bajo la metodología NACE el empleo de acetato de amonio 20 mM y ácido acético 1 M ayudaron a mejorar la estabilidad de la intensidad de corriente y solubilidad del pesticida en el medio y se

obtuvieron los mejores resultados al analizar el pesticida con una inyección electrocinética (3 kV, 4 s) y un voltaje en el análisis de 15 kV; la metodología aquí presentada puede ser utilizada para la detección de coumafos de forma semicuantitativa en muestras de miel con sospechas de estar contaminadas, el método se muestra capaz de obtener resultados a las concentraciones estudiadas las cuales corresponden a los límites permitidos por las autoridades sanitarias.

4.2.2 Bromopropilato

4.2.2.1 Resultados obtenidos mediante fases acuosas

En la tabla 10, se enlistan todas las condiciones a las cuales se estudió éste pesticida, en un principio se utilizó PBS y el analito disuelto en acetonitrilo e inyección por presión (25 kV separación, 5 s, 5 psi), de lo anterior se obtuvieron resultados poco favorables. Intentado mejorar los resultados se disolvió el bromopropilato en una mezcla de acetonitrilo y agua; bajo las mismas condiciones de inyección y un capilar con diámetro interno de 75 μm se observó una línea base estable al igual que su intensidad de corriente y un pico con absorbancia negativa, de lo cual se pudo observar que la señal mostrada corresponde realmente al pesticida, ya que su tiempo de migración cambió conforme al voltaje utilizado; 5 kV, 10 kV y 15 kV con un tiempo de migración 7.8, 3.9 y 1.4 minutos, respectivamente (Fig. 20, 21 y 22).

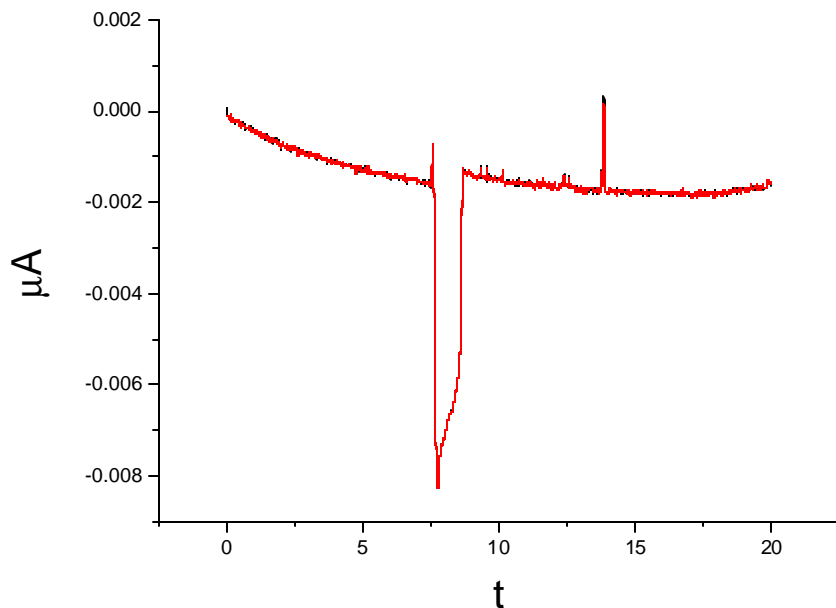


Fig.20 Electroferograma de bromopropilato analizado mediante fases acuosas con un voltaje durante el análisis de 5kV, inyección por presión de 5 psi y utilizando un capilar con 75 μm de diámetro interno.

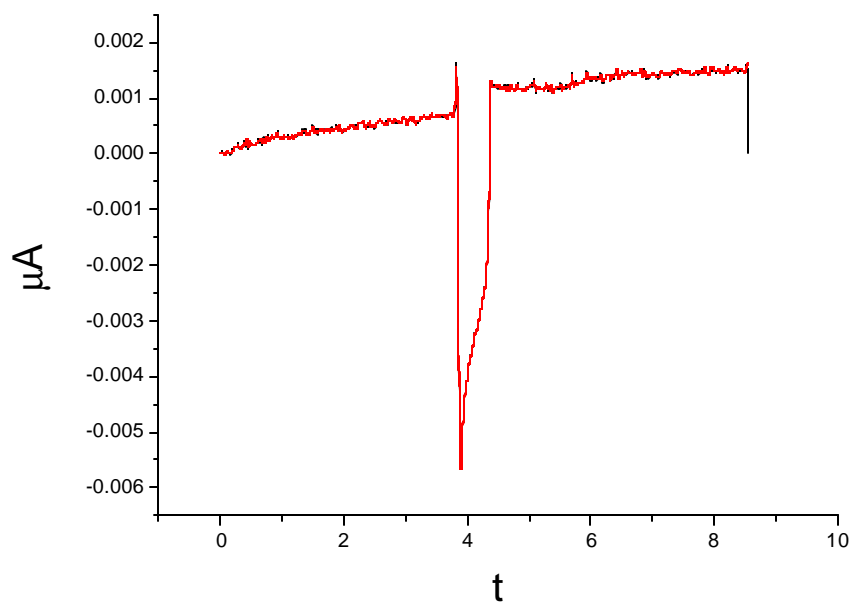


Fig.21 Electroferograma de bromopropilato analizado con fases acuosas y un voltaje durante el análisis de 10 kV, inyección por presión de 5 psi y utilizando un capilar con 75 μm de diámetro interno.

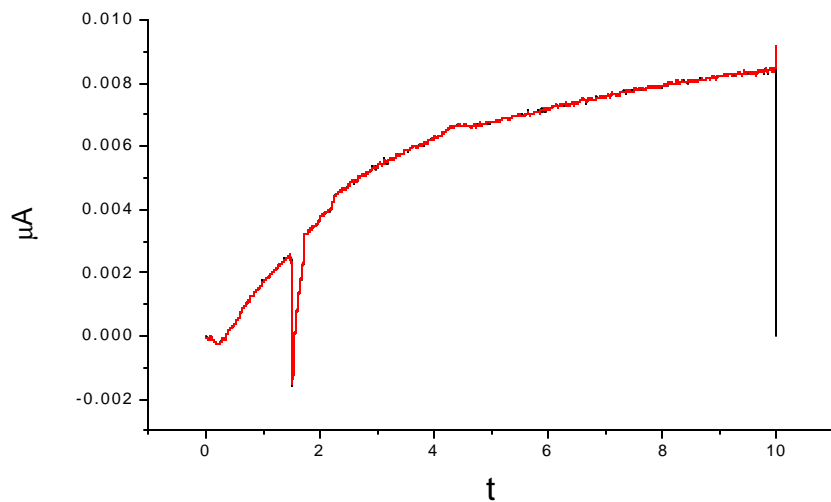


Fig.22 Electroferograma de bromopropilato analizado con fases acuosas, voltaje de 15 kV durante el análisis, inyección por presión de 5 psi y utilizando un capilar con 75 μm de diámetro interno.

El uso de SDS en los ensayos realizados con este pesticida no fue muy alentador, ya que en algunos de los casos se pueden observar señales con

poca reproducibilidad, mucha inestabilidad en la intensidad de corriente al igual que en la línea base.

Tabla 10. Condiciones y resultados de los ensayos mediante fases acuosas.

Ej.	?	kV	t iny	psi	Buffer	t_m	I.C.
		sep	(s)	iny		(min)	(μA)
1	254	25	5	0.5	PBS pH: 11.5	Inv 4.11	5.5
2	254	15	5	5	PBS pH: 11.5 Acn/H ₂ O 1:1 (v/v)	Inv 1.4	100
3	254	5	5	5	PBS pH: 11.5 Acn/H ₂ O 1:1 (v/v)	Inv 7.8	50
4	254	10	5	5	PBS pH: 11.5 Acn/H ₂ O 1:1 (v/v)	Inv 3.9	50
5	254	25	5	5	PBS pH: 11.5 Acn/H ₂ O 1:1 (v/v)	Inv 1.87	50

?: Longitud de onda; kV : kilovolts durante la separación ; t : tiempo de inyección ;psi iny: presión en la inyección; t_m : tiempo de migración; I.C. Intensidad de corriente

Variación del pH y fase móvil

Se cambió el pH de la fase móvil de 11.5 a 8.9 para tratar de mejorar los resultados de los ensayos realizados al bromopropilato, el cual es diluido en una fase de acetonitrilo y agua en proporción 1:1; en los ensayos con fase móvil de PBS y pH de 11.5 se presentó una señal invertida a los 1.16 minutos con una intensidad de corriente de 100 μ A; por otro lado los ensayos con fase móvil de ácido bórico y pH de 8.9 la señal invertida se observó a los 8 minutos presentando una intensidad de corriente de 40 μ A (Tabla 11).

Tabla 11. Condiciones y resultados del bromopropilato, ensayos con variación en el pH y fase móvil.

Ej.	?	kV sep	t iny (s)	psi iny	Buffer	t _m (min)	I.C. (μ A)
1	254	25	5	5	PBS pH: 11.5 a.C./H ₂ O 1:1 (v/v)	Inv. 1.16	100
2	254	25	5	5	PBS pH: 11.5 a.C./H ₂ O 1:1 (v/v)	Inv. 1.3	100
3	254	25	5	5	AC. Bórico 0.05M pH: 8.9 a.C./H ₂ O 1:1 (v/v) SDS 0.08 M	Inv. 8	40

?: Longitud de onda; kV : kilovolts durante la separación ; t : tiempo de inyección ;psi iny: presión en la inyección; t_m : tiempo de migración; I.C. Intensidad de corriente.

4.2.2.2 Resultados obtenidos mediante fases no acuosas

Al cambiar de metodología para tratar de mejorar los resultados observamos que la inyección por presión no fue la mejor opción ya que se obtuvo muy poca reproducibilidad; al modificar el tipo de inyección por la electrocinética se obtuvo sólo un par de resultados con pobre reproducibilidad, aunque ya con una buena señal a los 8.5 minutos aproximadamente, esto se logró con un voltaje de separación de 25 kV, al disminuir el voltaje, como era de esperarse la señal aumenta su tiempo de migración hasta 15 minutos, estabilizando la señal y obteniendo mejores resultados, con mayor reproducibilidad. En la tabla 12 se pueden observar dos de los resultados obtenidos a las condiciones ensayadas para este pesticida, con inyección a presión.

Tabla 12. Condiciones y resultados obtenidos mediante fases no acuosas e inyecciones por presión.

Ej.	?	kV	t iny	psi	Buffer			t_m	I.C.
		sep	(s)	iny				(min)	(μA)
1	254	25	5	5	MeOH/Acn	8:2	(v/v)	Inv	40
					CH ₃ COONa-3H ₂ O	20 mM		8.04	
					CH ₃ COOH	1M			
2	254	25	5	5	MeOH/Acn	8:2	(v/v)	Inv	40
					CH ₃ COONa-3H ₂ O	20 mM		7.15	
					CH ₃ COOH	1M			

?: Longitud de onda; kV : kilovolts durante la separación ; t : tiempo de inyección ;psi iny: presión en la inyección; t_m : tiempo de migración; I.C. Intensidad de corriente.

Variación en el tipo de inyección: electrocinética

La tabla 13 presenta dos ejemplos de los resultados obtenidos de los ensayos del bromopropilato con fase móvil no acuosa a base de metanol y acetonitrilo 8:2, adicionada con acetato de sodio 20 mM y ácido acético 1M, es posible observar la disminución en los tiempo de migración a 4.3 y 4.8 minutos en comparación con los tiempos obtenidos con inyecciones a presión.

Tabla 13. Condiciones y resultados obtenidos mediante fases no acuosas e inyecciones electrocinéticas.

Ej.	?	kV	t iny	kV	Buffer			t_m	I.C.
		sep	(s)	iny				(min)	(μA)
1	254	25	4	3	MeOH/Acn	8:2	(v/v)	Inv	40
					CH ₃ COONa-3H ₂ O	20 mM		4.8	
					CH ₃ COOH	1M			
2	254	25	4	3	MeOH/Acn	8:2	(v/v)	Inv	40
					CH ₃ COONa-3H ₂ O	20 mM		4.3	
					CH ₃ COOH	1M			

?: Longitud de onda; kV : kilovolts durante la separación ; t : tiempo de inyección ;psi iny: presión en la inyección; t_m : tiempo de migración; I.C. Intensidad de corriente.

Variación en el electrolito utilizado en la fase móvil

Para aumentar la estabilidad en la intensidad de corriente y por lo tanto mejorar la reproducibilidad de las señales del analito se optó por cambiar el acetato de sodio por el acetato de amonio (M. P. Cabello y col., 2003); y de lo cual se presentó un aumento en el tiempo de migración hasta 15 minutos aproximadamente con señales intensas y como era de esperarse la intensidad de corriente subió hasta 20 μA . La tabla 14 enlista los ensayos realizados con variación en el electrolito.

Tabla 14. Condiciones y resultados obtenidos mediante fases no acuosas e inyecciones electrocinéticas con variación en el electrolito.

Ej.	?	kV	t iny	kV	Buffer	t_m	I.C.
		sep	(s)	iny		(min)	(μA)
1	254	25	4	3	MeOH/Acn 8:2 (v/v) CH ₃ COONa-3H ₂ O 20 mM CH ₃ COOH 1M	6.7	13
2	254	15	4	3	MeOH/Acn 8:2 (v/v) NH ₄ C ₂ H ₃ O ₂ 20 mM CH ₃ COOH 1M	15.2	20
3	254	15	4	3	MeOH/Acn 8:2 (v/v) NH ₄ C ₂ H ₃ O ₂ 20 mM CH ₃ COOH 1M	14.7	20

?: Longitud de onda; kV: kilovolts durante la separación; t: tiempo de inyección; psi iny: presión en la inyección; t_m: tiempo de migración; I.C. Intensidad de corriente.

Una inyección a presión puede provocar inestabilidad en la línea base, posiblemente debido a un taponamiento del capilar por sobrecarga del mismo, y pocos fueron los resultados aceptables como se puede observar en la figura 23, la cual presenta una señal a los 8.04 minutos pero con una previa descompensación en la línea base; en cambio, una inyección electrocinética envía el analito al tubo capilar en segmentos de cargas facilitando el análisis, pero no así la estabilidad de la línea base, la adición de acetato de amonio en

lugar del acetato de sodio permitió obtener resultados con una mayor reproducibilidad y estabilidad en la intensidad de corriente para este pesticida en particular. Como se puede observar en la figura 24, se obtuvo una señal a los 8.5 minutos utilizando un capilar de 75 μm de diámetro interno, cambiando este último parámetro, es decir, el diámetro interno de capilar a 50 μm se obtiene la señal observada en la figura 25 la cual tiene un tiempo migración mayor (15.2 min); aunque se presenta una buena señal la reproducibilidad fue pobre en comparación con la señal obtenida al sustituir el acetato de sodio por el de amonio, en la figura 26 se muestra una señal a los 14.7 minutos y aunque la línea base presenta un poco de ruido fue estable para todos los ensayos bajo esta metodología.

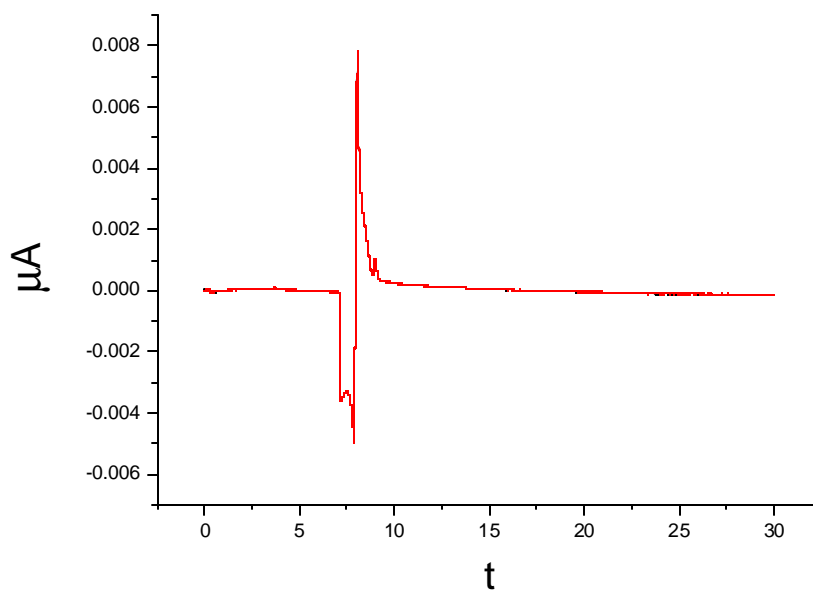


Fig. 23. Electroferograma de bromopropilato el cual fue analizado mediante fases no acuosas con inyección a presión (5psi, 5 s), utilizando acetato de sodio como electrolito y un capilar con 75 μm de diámetro interno.

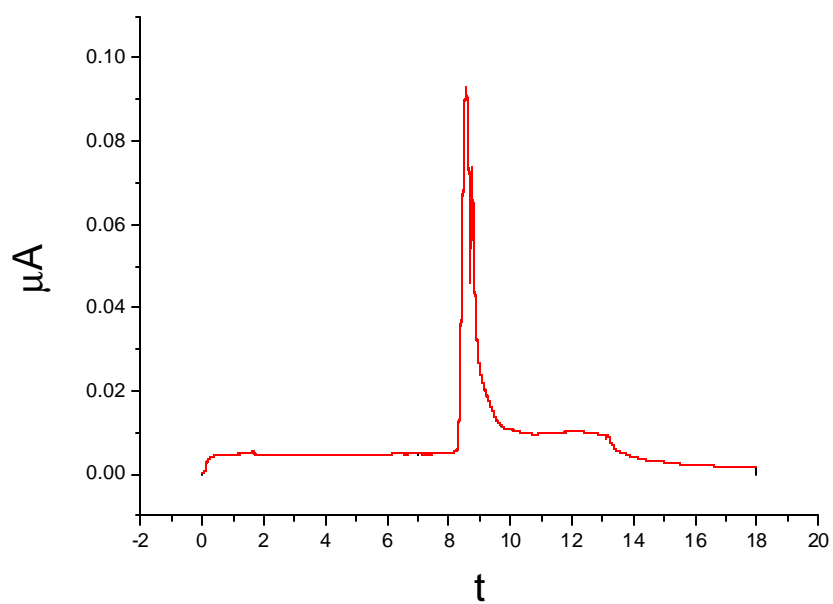


Fig. 24. Electroferograma de bromopropilato analizado con fases no acuosas e inyección electrocinética (3kV, 4 s), acetato de sodio como electrolito y un capilar con 75 μm de diámetro interno.

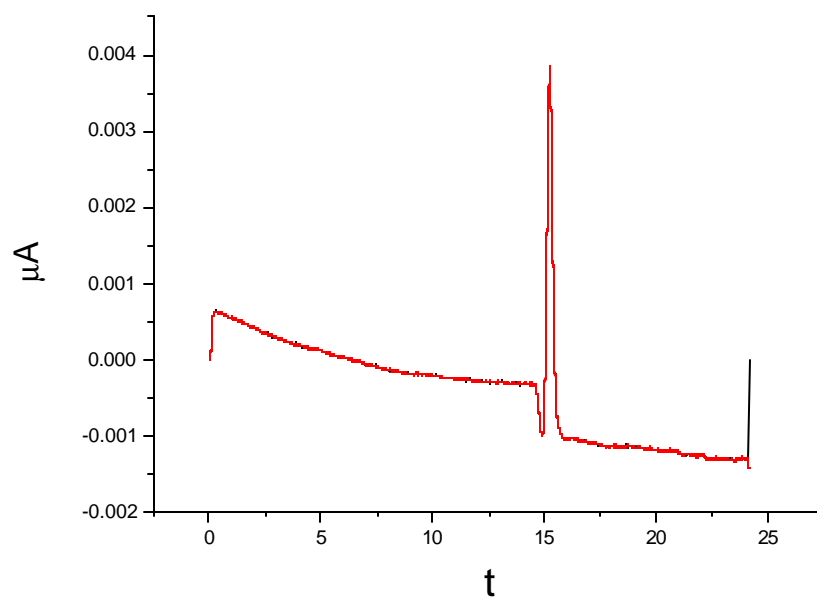


Fig. 25. Electroferograma de un ensayo del bromopropilato el cual fue analizado mediante fases no acuosas con inyección electrocinética (3kV, 4 s), utilizando acetato de amonio como electrolito y un capilar con 50 μm de diámetro interno.

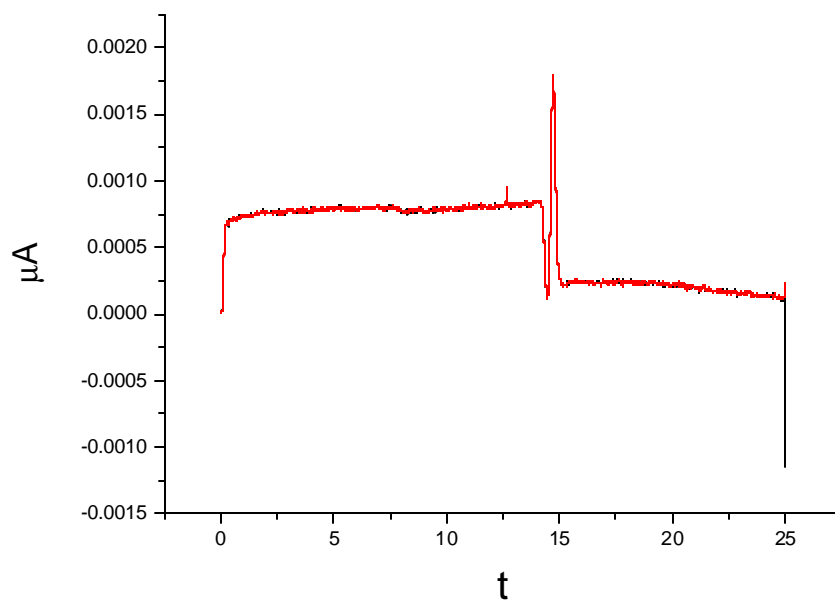


Fig. 26. Electroferograma de bromopropilato el cual fue analizado mediante fases no acuosas con inyección electrocinética (3kV_i, 4 s), utilizando acetato de amonio y un capilar con 50 µm de diámetro interno.

El uso de SDS 0.08 M para mejorar la estabilidad y solubilidad de este pesticida, mediante una inyección a presión (5 psi, 5 s) y utilizando un capilar con un diámetro interno de 50 µm, mostró resultados poco alentadores, ya que como se puede observar en la figura 27, la línea base presentó un aumento en la absorbancia y varios picos no identificados, lo cuál puede ser debido al tipo de inyección y una asociación entre las micelas del SDS con el pesticida.

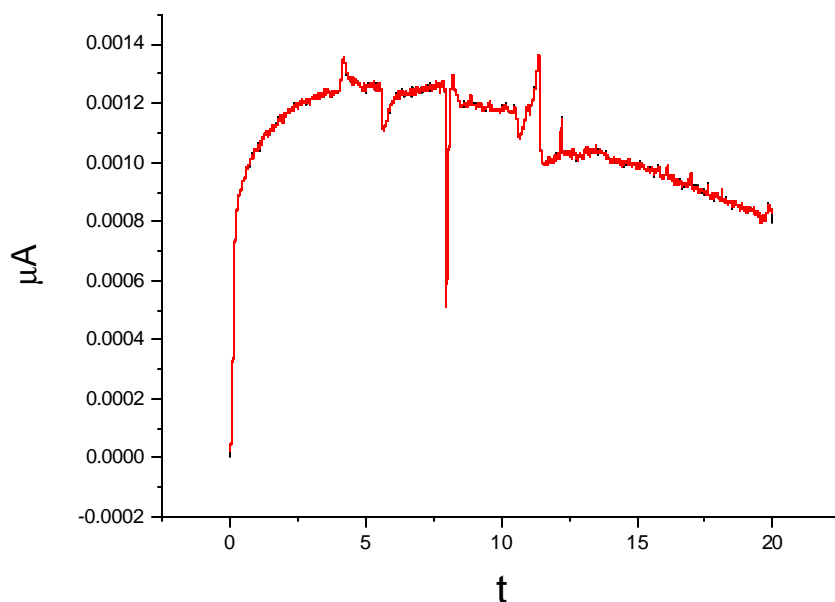


Fig. 27. Electroferograma del bromopropilato adicionado con SDS a una concentración de 0.08M, utilizando una inyección por presión (5 psi, 5 s) y un capilar con 50 μm de diámetro interno.

El uso de acetato de amonio en lugar del acetato de sodio para mejorar la conductividad en la fase móvil durante el análisis del bromopropilato, se presentó como la mejor opción para su estudio en conjunto con una inyección electrocinética (3 kV, 4 s) y 15 kV durante el análisis; bajo la metodología anterior se obtuvieron señales con una buena estabilidad tanto en el medio como en la intensidad de corriente.

4.2.3 Amitraz

4.2.3.1 Resultados obtenidos mediante fases acuosas.

Los ensayos mediante fases acuosas no mostraron resultados favorables, es decir, no se obtuvieron señales, la línea base fue muy inestable y se tuvo una intensidad de corriente inestable, baja o nula, lo anterior puede atribuirse a su poca solubilidad del analito en agua (A. C. Martel y col., 2002), por lo tanto dichos resultados no son mostrados.

4.2.3.2 Resultados obtenidos mediante fases no acuosas.

El presente trabajo de investigación se enfocó al estudio del amitraz utilizando fases no acuosas, como un método de monitoreo de la degradación del amitraz y generación de sus subproductos.

En la tablas 15 y 16, se puede observar un resumen de las condiciones empleadas en los ensayos del amitraz a distintos intervalos de análisis a lo largo de 3 días y con acetato de sodio; con una intensidad de corriente estable a 40 μ A, con tiempos de migración muy similares y una reproducibilidad mejor que las obtenidas mediante fases acuosas.

Variación del voltaje en el análisis y antigüedad de la solución estándar.

Se comenzó el estudio de este pesticida ensayándolo con 25 kV durante el análisis; 280 nm de longitud de onda, inyección electrocinética (3 kv, 4 s) y una fase móvil adicionada con acetato de sodio 20 mM, los tiempos de migración obtenidos en esta primera fase del estudio estuvieron en función del tiempo.

Resultados obtenidos del amitraz con 1 día de antigüedad

Tabla 15. Condiciones y resultados de los ensayos mediante fases no acuosas, con 25 kV en el análisis y 1 día de antigüedad.

Ej.	?	kV sep	t iny (s)	kV iny	Buffer y Electrolitos	tm (min)	I.C. (μA)
1	280	25	4	3	MeOH/Acn 8:2 (v/v) CH ₃ COONa-3H ₂ O 20 mM CH ₃ COOH 1M	2.37	40
2	280	25	4	3	MeOH/Acn 8:2 (v/v) CH ₃ COONa-3H ₂ O 20 mM CH ₃ COOH 1M	2.8	40

?: Longitud de onda; kV : kilovolts durante la separación ; t : tiempo de inyección ;psi iny: presión en la inyección; tm : tiempo de migración; I.C. Intensidad de corriente.

Resultados obtenidos del amitraz con 3 días de antigüedad

Tabla 16. Condiciones y resultados de los ensayos mediante fases no acuosas, con 25 k.o. en el análisis y 3 días de antigüedad.

Ej.	?	kV sep	t iny (s)	kV iny	Buffer y Electrolitos	t_m (min)	I.C. (μA)
1	280	25	4	3	MeOH/Acn 8:2 (v/v) CH ₃ COONa-3H ₂ O 20 mM CH ₃ COOH 1M	9.8	40
2	280	25	4	3	MeOH/Acn 8:2 (v/v) CH ₃ COONa-3H ₂ O 20 mM CH ₃ COOH 1M	10	40
3	280	25	4	3	MeOH/Acn 8:2 (v/v) CH ₃ COONa-3H ₂ O 20 mM CH ₃ COOH 1M	10	40

?: Longitud de onda; kV : kilovolts durante la separación ; t : tiempo de inyección ;psi iny: presión en la inyección; t_m : tiempo de migración; I.C. Intensidad de corriente.

Como se mencionó en apartados anteriores la temperatura, fue modificada en el cartucho en diferentes ensayos del análisis del pesticida, empezando con una temperatura de 25 °C y en ensayos posteriores se disminuyó hasta 18 °C para evitar la ebullición del acetonitrilo y mejorar la estabilidad en la intensidad de corriente. Aunado a estas modificaciones, se adicionó acetato de sodio como electrolito para mejorar la conductividad en la fase, posteriormente se sustituyó por el acetato de amonio ya que ha sido citado en la literatura que éste presenta ventajas sobre el acetato de sodio (A. C. Martel y col., 2002), los resultados del presente trabajo demuestran que no hubo una mejoría en los electroferogramas , los resultados difieren de las notas de la literatura citada, que mencionan que la inestabilidad del amitraz en medios ácidos es controlada con la adición de acetato de amonio en el medio.

Variación en la concentración de la solución estándar y antigüedad de la solución estándar.

Algunos ensayos con el amitraz fueron realizados a 100 mg/L para poder observar una señal más intensa y así trabajar con la reproducibilidad, posteriormente disminuir la concentración y trabajar sobre la sensibilidad del método. Los resultados de los ensayos realizados con variación en la concentración se observan en la tabla 17.

Tabla 17. Condiciones y resultados de los ensayos del amitraz con una concentración de 100 mg/L.

Ej.	?	kV	t	kV	Buffer y	t _m	I.C.
		sep	iny (s)	iny	Electrolitos	(min)	(μ A)
1	280	15	4	3	MeOH/Acn 8:2 (v/v) NH ₄ C ₃ H ₂ O ₃ 20 mM CH ₃ COOH 1M	6.36	6

?: Longitud de onda; kV : kilovolts durante la separación ; t : tiempo de inyección ;psi iny: presión en la inyección; tm : tiempo de migración; I.C. Intensidad de corriente.

En la figura 28 se puede observar una buena señal a los 6.36 minutos, dicha señal puede atribuirse al estándar del analito el cuál fue preparado el mismo día del análisis.

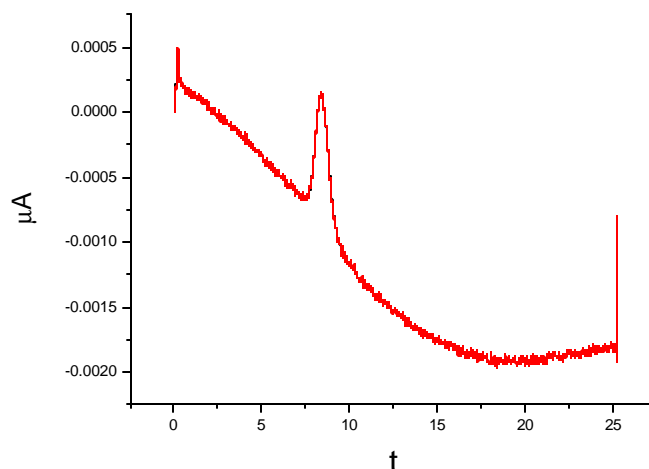
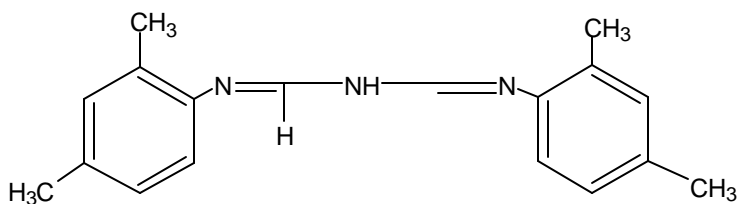


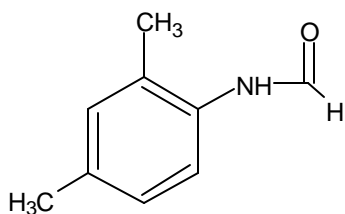
Fig.28. Electroferograma del amitraz analizado mediante la metodología NACE, con una inyección electrocinética (3 kV, 4 s) y un capilar con 50 µm de diámetro interno.

4.2.3.3 Comportamiento del analito desde la preparación hasta el análisis

El tiempo juega un papel muy importante en el estudio del amitraz, ya que, este pesticida es muy susceptible a la degradación. De acuerdo a la estructura del amitraz (N- metilbis (2,4- xililiminometil)- amina); sus subproductos son: 2,4- dimetilfenilformamida (DMF), N-(2,2- dimetilfenil) – N- metilformamidina (DPMF) y 2,4- dimetilnilina (DMA) (A. C. Martel y col., 2002) (Fig. 29). Dos subproductos pueden ser observados desde el segundo día a partir de la preparación del amitraz hasta el día 15, a partir del día 17 es posible observar la aparición del tercer compuesto. Por lo que los resultados esperados del análisis de una muestra real dependerán del tiempo de la cera o miel proveniente del panal.

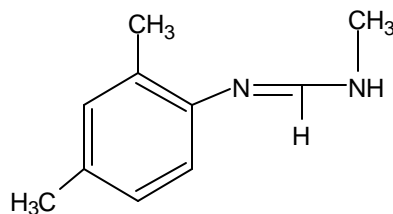


AMITRAZ

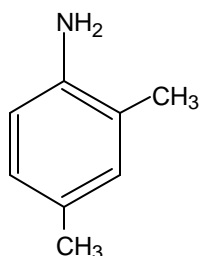


DMF

+



DPMF



DMA

Fig. 29. Estructura química del amitraz y sus subproductos de degradación.

4.2.3.4 Degradación del amitraz

Los dos primeros subproductos de la degradación DMF y DPMF han podido ser observados en estudios realizados por HPLC, los tres subproductos juntos pudieron ser observados en estudios llevados a cabo por cromatografía de gases, pero el tercero, es decir, el DMA se presenta como una señal muy débil (B. Gallo y col., 2001).

Es importante destacar que durante este estudio se pudieron observar los electroferogramas correspondientes a los ensayos realizados a 3, 5, 9, 15 y 17 días después de la preparación del estándar del amitraz, obsérvense las figuras , 30, 31, 32, 33 y 34, en las cuales se presentan tres picos a diferentes tiempos de migración que posiblemente correspondan a estos tres compuestos, de acuerdo a los días transcurridos.

Todos los ensayos mencionados anteriormente fueron realizados con una inyección electrocinética (3 kV, 4 s), capilar con diámetro interno de 50 μm y 15 kV durante el análisis.

Ensayos realizados a una solución de amitraz con tres días de antigüedad.

En la tabla 18 se presentan las condiciones y resultados del análisis del amitraz el cuál presentó a los tres días de haberse preparado la solución estándar dos de sus compuestos de degradación, los cuales se pueden apreciar a los 12.7 y 16.5 minutos (Fig. 30) que posiblemente corresponden al DMF y DPMF (B. Gallo y col., 2001).

Tabla 18. Resultados y condiciones de los ensayos del amitraz con 3 días de antigüedad, analizado con fase no acuosa y acetato de amonio como electrolito.

Ej.	?	kV sep	t iny (s)	kV iny	Buffer y Electrolitos	t _m (min)	I.C. (μ A)
1	280	15	4	3	MeOH/Acn 8:2 (v/v) NH ₄ C ₃ H ₂ O ₃ 20 mM CH ₃ COOH 1M	12.7, 16.5	20

?: Longitud de onda; kV : kilovolts durante la separación ; t : tiempo de inyección ;psi iny: presión en la inyección; tm : tiempo de migración; I.C. Intensidad de corriente.

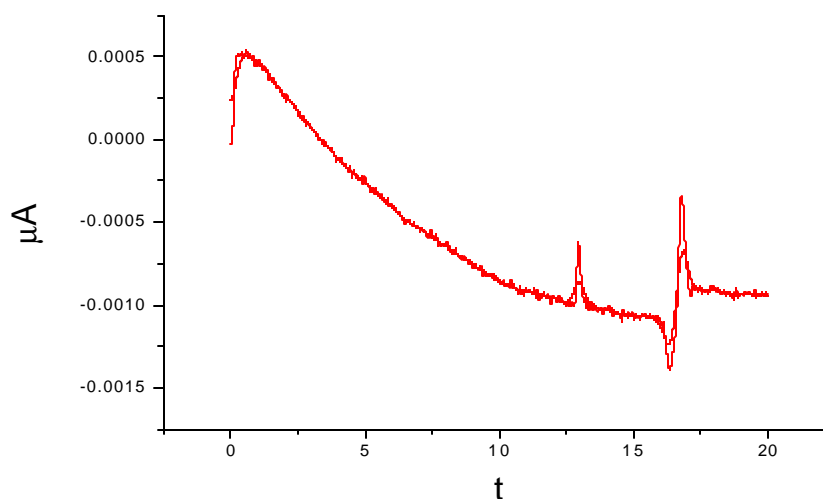


Fig.30. Electroferograma de amitraz con 3 días de antigüedad, analizado mediante la metodología NACE, con una inyección electrocinética (3 kV , 4 s.) y empleando un capilar con 50 μ m. de diámetro interno.

Ensayos realizados a una solución de amitraz con 5 días de antigüedad.

Los resultados y condiciones del análisis realizado el día cinco son enlistados en la tabla 19 y la figura 31 es un electroferograma en el cual se presenta como se acercan los dos picos observados desde el día tres; uno de ellos presenta una mayor altura a los 17.5 min, el segundo más pequeño a los 18.5 minutos.

Tabla 19. Resultados y condiciones de los ensayos realizados a una solución estándar con 5 días desde su preparación.

Ej.	?	kV	t	kV	Buffer y	t _m	I.C.
		sep	iny	iny	Electrolitos	(min)	(μ A)
			(s)				
1	280	15	4	3	MeOH/Acn 8:2 (v/v)	17.5,	20
					NH ₄ C ₃ H ₂ O ₃ 20 mM	18.5	
					CH ₃ COOH 1M		

?: Longitud de onda; kV : kilovolts durante la separación ; t : tiempo de inyección ;psi iny: presión en la inyección; tm : tiempo de migración; I.C. Intensidad de corriente.

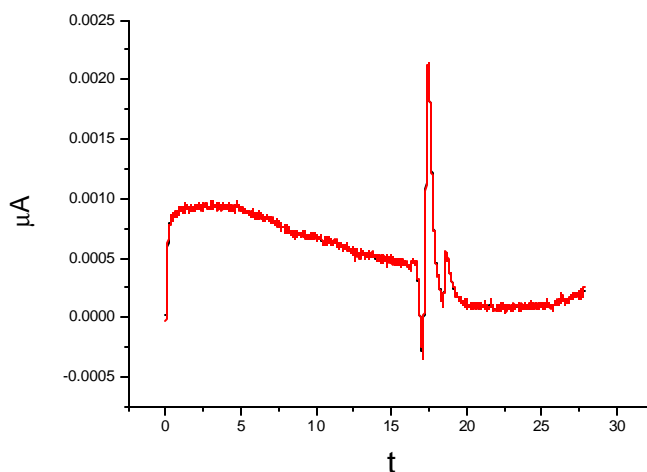


Fig.31. Electroferograma de amitraz con 5 días de antigüedad, analizado con metodología NACE, empleando una inyección del tipo electrocinética (3 kV, 4 s) y un capilar con 50 μ m de diámetro interno.

Ensayos realizados a una solución de amitraz con 9 días de antigüedad.

Al realizar los ensayos del amitraz con una solución estándar que tenía nueve días (tabla 20) desde su preparación se pudieron observar dos picos que se vuelven a separar, uno de ellos a un tiempo de 14 minutos y el segundo a los 19.5 minutos (Fig. 32), posiblemente se modifiquen los tiempos de retención debido a la transformación química de las especies presentes.

Tabla 20. Resultados y condiciones obtenidos de los análisis del amitraz con 9 días de antigüedad desde su preparación.

Ej.	?	kV	t	kV	Buffer y	t _m	I.C.
		sep	iny	iny	Electrolitos	(min)	(μ A)
			(s)				
1	280	15	4	3	MeOH/Acn 8:2 (v/v) NH ₄ C ₃ H ₂ O ₃ 20 mM CH ₃ COOH 1M	14, 19.5	20

?: Longitud de onda; kV : kilovolts durante la separación ; t : tiempo de inyección ;psi iny: presión en la inyección; tm : tiempo de migración; I.C. Intensidad de corriente.

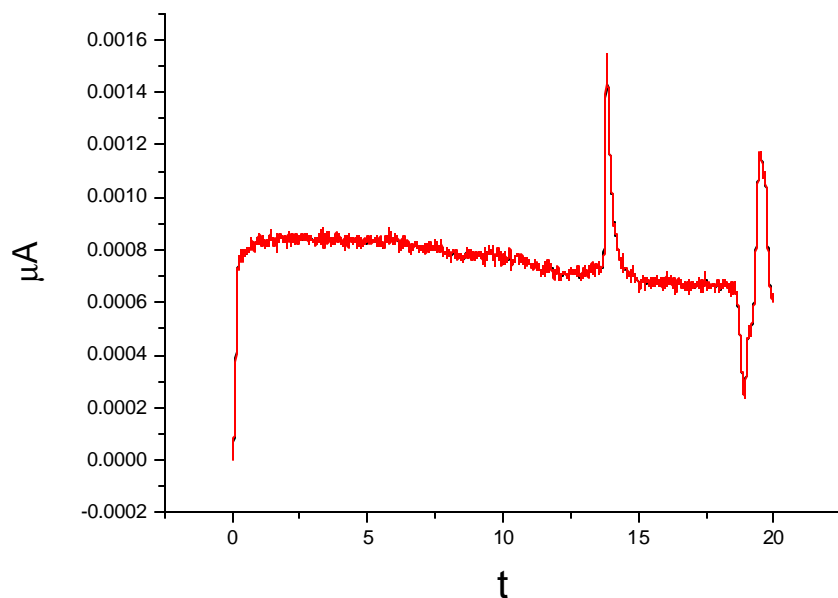


Fig.32 Electroferograma de amitraz con 9 días de antigüedad, analizado con la metodología NACE, para el cual el analito introducido en el capilar (50 μ m de diámetro interno) por medio de voltaje (3 kV, 4 s).

Ensayos realizados a una solución de amitraz con 15 y 17 días de antigüedad.

Los mismos tiempos de migración de los ensayos realizados a los 9 días pueden ser observados en las señales obtenidas en los análisis realizados el día 15 pero con la presencia de una tercera señal a los 22 minutos (Fig. 33), dicha señal creció en los dos días siguientes, es decir, a los 17 días; y llegó a la misma intensidad de la señal observada a los 19.5 minutos (Fig. 34); estos resultados representan una gran ventaja sobre lo reportado en la literatura (B. Gallo y col., 2001) donde se observa una señal muy débil y por el contrario, en los resultados del presente estudio la señal del tercer subproducto se observa como una señal intensa.

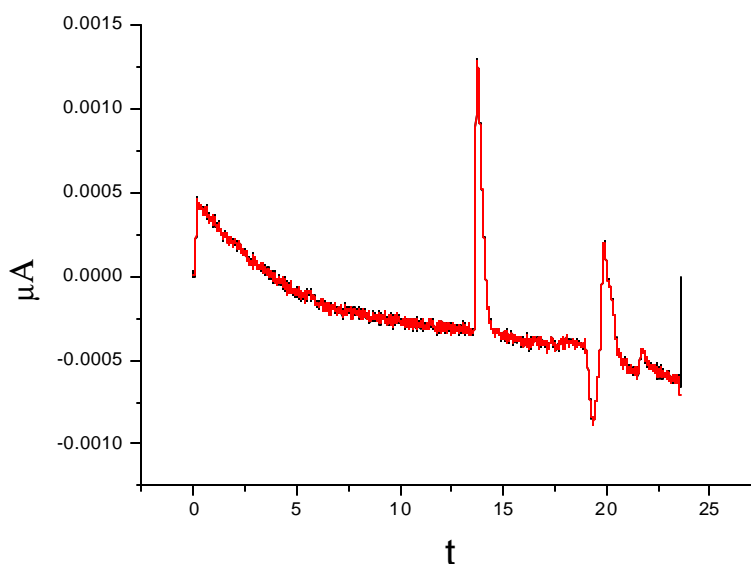


Fig.33 Electroferograma de amitraz analizado con metodología NACE a los 15 días desde su preparación, inyección electrocinética (3 kV, 4 s) y un capilar con 50 μm de diámetro interno.

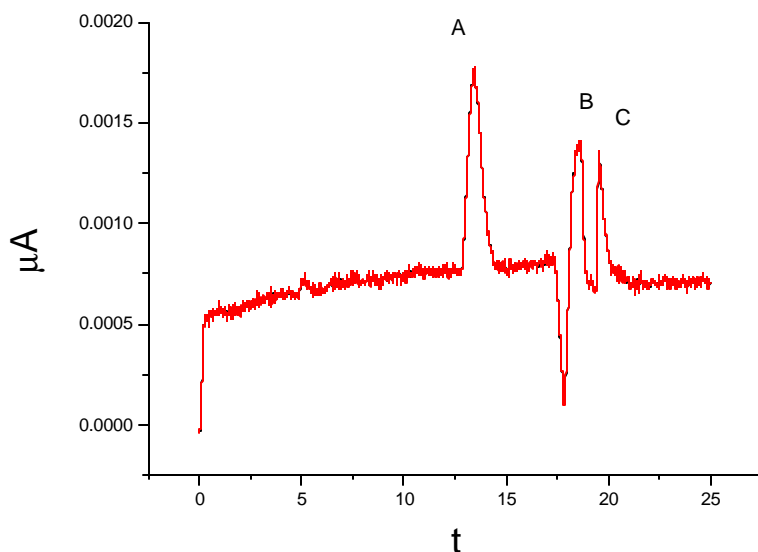


Fig.34 Electroferograma del amitraz analizado con la metodología NACE a los 17 días desde su preparación, inyección electrocinética (3 kV, 4 s) y un capilar con 50 μm de diámetro interno, A) Señal a los 14 min.; B) Señal a los 19.5 min.; C) Señal a los 22 min.

La estabilidad observada en la intensidad de corriente y la buena reproducibilidad de los subproductos se pueden atribuir a que éstos son muy polares al igual que el metanol y acetonitrilo (B. Gallo y col., 2001) por lo que el presente trabajo aporta una ventaja más sobre los estudios realizados por las técnicas anteriormente mencionadas.

4.2.3.5 Influencia de la temperatura en el análisis.

Durante este estudio se manejaron diferentes temperaturas, desde 25 $^{\circ}\text{C}$ hasta 18 $^{\circ}\text{C}$, tanto en el capilar como en todo el equipo en diferentes ensayos realizados, el pesticida fue almacenado a una temperatura de refrigeración 14 $^{\circ}\text{C}$; todas las condiciones anteriores no modificaron los resultados obtenidos por lo que la separación del pesticida se presume que no se ve influenciada por la temperatura.

4.2.3.6 Extracción del pesticida en miel.

La metodología utilizada para la extracción del pesticida ya se ha mencionado en materiales y métodos del presente trabajo, en el primer ensayo la solución de miel, agua y pesticida es llevada a una proporción 1:1 con metanol y posteriormente pasada a través de cartuchos C18; el ensayo dos al igual que en el primero la solución de miel, agua y pesticida es llevada a una proporción 1:1 con metanol y posteriormente pasada a través de cartuchos C18 y filtrado adicionalmente con cartuchos de nylon con poro de 0.45 μm de diámetro interno. Una muestra de miel utilizada fue analizada previamente para descartar posible contaminación con amitraz o cualquier otro pesticida.

En la tabla 21 se enlistan las condiciones y resultados de los ensayos de extracción del pesticida.

Tabla 21. Resultados y condiciones de los ensayos realizados a las extracciones del amitraz en una muestra de miel.

Ej.	λ	kV sep	t iny (s)	kV iny	Buffer y Electrolitos	t_m (min)	I.C. (μA)
I	280	15	4	3	MeOH/Acn 8:2 (v/v) NH ₄ C ₃ H ₂ O ₃ 20 mM CH ₃ COOH 1M	14.1	10
II	280	15	4	3	MeOH/Acn 8:2 (v/v) NH ₄ C ₃ H ₂ O ₃ 20 mM CH ₃ COOH 1M	13.96	10

?: Longitud de onda; kV : kilovolts durante la separación ; t : tiempo de inyección ;psi iny: presión en la inyección; tm : tiempo de migración; I.C. Intensidad de corriente.

En la figura 35, se observa la señal obtenida en el primer ensayo de extracción, un pico con un tiempo de migración de 14.9 minutos en comparación con la señal mostrada en la figura 36, que presentó el mismo tiempo de migración a los 14.9 minutos pero la señal presentó una cola, el tiempo de

migración del estándar comparado con las señales obtenidas en la extracción difiere en 10 minutos entre uno y otro, lo anterior posiblemente se deba a que el analito se hace más lento en el flujo electroosmótico por la asociación con alguno de los muchos componentes de la miel (Piana G., 1989). Además, se observó un mejor resultado analizando la muestra de miel sin filtrar, lo que coincide con los resultados obtenidos para el coumafos. Todo el proceso de extracción desde el pesaje de la muestra, con sus disoluciones y extracciones en cartuchos C18 y con su filtrado adicional en filtros de 0.45 μm de diámetro de poro y hasta completar el tiempo requerido para su separación en electroforesis capilar es de aproximadamente 2 horas, por lo tanto, este método presenta una buena viabilidad en comparación con técnicas tradicionales, ya que una extracción bajo dichas técnicas llevaría un par de días en realizarse por la preparación de la muestra y acondicionamiento de las columnas a utilizar, esto aunado a que el equipo de HPLC y CG es delicado y requiere de personal entrenado.

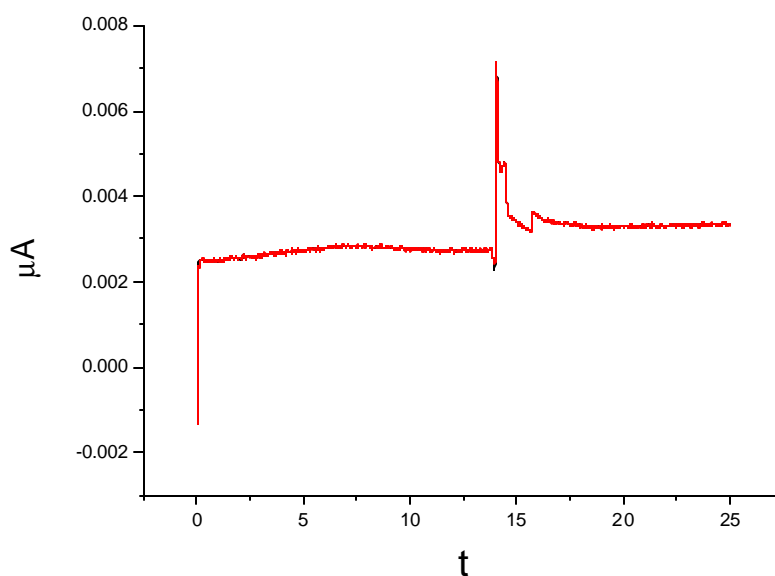


Fig.35 Electroferograma de extracción del amitraz utilizando la metodología del ensayo I, inyección electrocinética (3 kV, 4 s) y un capilar con 50 μm de diámetro interno.

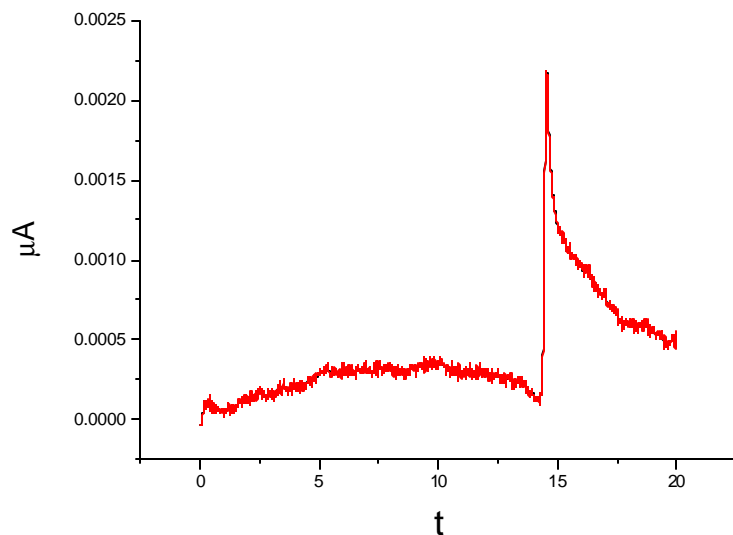


Fig.36 Electroferograma de la extracción del amitraz empleando la metodología del ensayo II, inyección electrocinética (3 kV, 4 s) y un capilar con 50 μm de diámetro interno.

El estudio del amitraz y sus subproductos se fue llevando desde el mismo día de la preparación del estándar y dependiendo de los días transcurridos se pudieron obtener las señales correspondientes a los tres subproductos del amitraz; DMF, DPMF y DMA, respectivamente, hasta un lapso de 17 días. Las señales de dichos subproductos presentaron una buena estabilidad en la intensidad de corriente y una reproducibilidad relativamente buena entre los mismos, ya que debido a su cinética no fue posible obtener reproducibilidad exacta; todo lo anterior con una fase de metanol y acetonitrilo 8:2 (v/v) que ayudó a la estabilidad de los subproductos y el estándar por su alta polaridad, además no se observó una diferencia en la mejoría de los resultados al usar los acetatos de amonio y sodio como electrolitos para mejorar la conductividad y estabilidad en la intensidad de corriente, la mejor inyección empleada fue electrocinética (3 kV y 4 s) con 15 kV durante el análisis.

La metodología desarrollada representa una importante contribución para el estudio del amitraz, ya que al comparar los resultados obtenidos en el presente trabajo con los estudios realizados mediante HPLC y CG, es posible observar una clara ventaja sobre estos últimos ya que la metodología aquí

presentada es capaz de obtener resultados de los tres metabolitos con buenas señales para todos los casos, además, la sensibilidad del método permite observar dichos resultados a las concentraciones establecidas como límites permitidos en el CICOPLAFEST (1999).

4.2.4 Fluvalinato.

4.2.4.1 Resultados obtenidos mediante fases acuosas.

En las tablas 22 y 23 se enlistan los ensayos del fluvalinato a diferentes condiciones y concentraciones, los resultados obtenidos con medios acuosos presentan una baja reproducibilidad e inestabilidad en la intensidad de corriente durante la separación del analito, al adicionar SDS 0.05 M (cmc) para intentar mejorar la estabilidad de la corriente la reproducibilidad siguió siendo un problema puesto que se observan diferentes tiempos de migración para la mayoría de los ensayos aunque éstos fueron llevados a cabo con las mismas condiciones de inyección y separación.

Tabla 22. Condiciones y resultados de los ensayos mediante fases acuosas y no acuosas del fluvalinato.

Ej.	?	kV	t	Psi	Buffer y Electrolitos	t _m (min)	I.C. (µA)
		sep	iny	iny			
			(s)				
1	280	25	5	5	Ac. Bórico pH: 8.9, SDS 0.05M NH ₄ Cl 0.05 M H ₂ O/ Acn 7:3 (v/v)	5	15
2	280	25	5	5	MeOH/Acn 8:2 (v/v) CH ₃ COONa-3H ₂ O 20 mM CH ₃ COOH 1 M	7.03	15
3	280	25	5	5	MeOH/Acn 8:2 (v/v) CH ₃ COONa-3H ₂ O 20 mM CH ₃ COOH 1 M	5.7	15

?: Longitud de onda; kV : kilovolts durante la separación ; t : tiempo de inyección ;psi iny: presión en la inyección; tm : tiempo de migración; I.C. Intensidad de corriente.

Tabla 23. Condiciones y resultados de los ensayos realizados a una concentración de 0.013 mg/ L.

Ej.	?	kV sep	t iny (s)	kV iny	Buffer y Electrolitos	t _m (min)	I.C. (μ A)
1	280	15	4	3	MeOH/Acn 8:2 (v/v) CH ₃ COONa \cdot 3H ₂ O 20 mM CH ₃ COOH 1M	9.9	15
2	280	15	4	3	MeOH/Acn 8:2 (v/v) CH ₃ COONa \cdot 3H ₂ O 20 mM CH ₃ COOH 1M	8.6	15

?: Longitud de onda; kV : kilovolts durante la separación ; t : tiempo de inyección ;psi iny: presión en la inyección; tm : tiempo de migración; I.C. Intensidad de corriente.

En la figura. 37 se observa la señal obtenida del estudio del fluvalinato con adición SDS como surfactante, dicha señal presenta un pico a los 5 minutos pero lamentablemente la señal no fue la misma para todos los ensayos realizados con estas condiciones, esto aunado a la inestabilidad de la intensidad de corriente nos condujo a cambiar las condiciones de análisis.

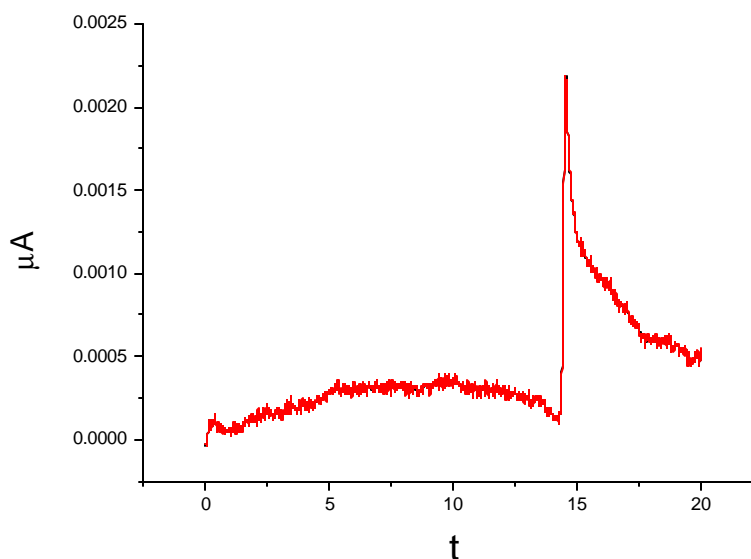


Fig.37. Electroferograma del fluvalinato con medios acuosos adicionados con SDS 0.05m, empleando una inyección por presión (5 psi, 5 s) y un capilar con 75 μ m de diámetro interno.

4.2.4.2 Resultados obtenidos mediante fases no acuosas.

Variación en el tipo de inyección.

En la figura 38 se observa una señal ancha, dicho efecto pudo ser ocasionado por el tipo de inyección empleado, ya que como se ha venido mencionando el analito inyectado por presión es introducido en el capilar en forma de un bolo de muestra, por lo que su análisis se dificulta; la intensidad de corriente observada durante el análisis es estable y aunque la forma de la señal no fue la esperada presentó cierta reproducibilidad.

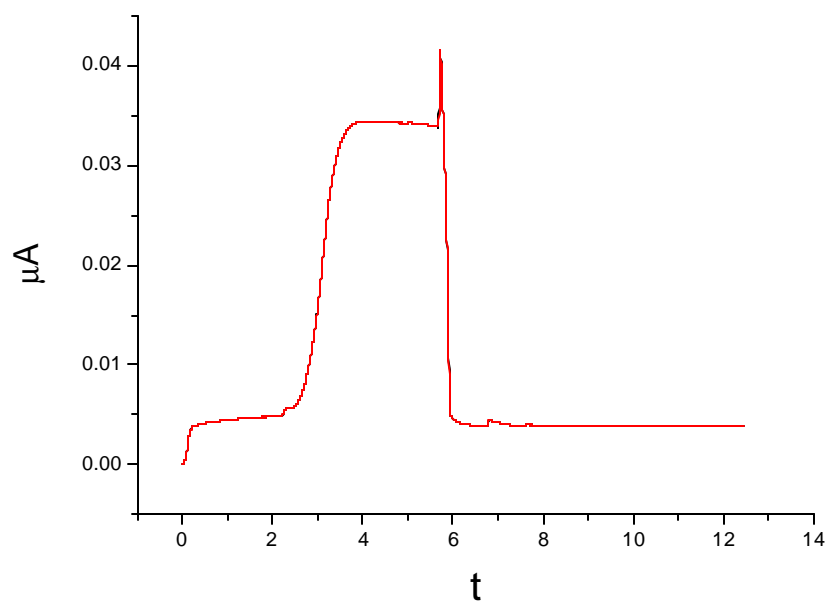


Fig.38. Electroferograma del fluvialinato analizado mediante la metodología NACE, empleando una inyección por presión (5 psi, 5 s) y un capilar con 75 µm de diámetro interno.

Empleando una inyección electrocinética.

El tipo de inyección es un factor importante en la estabilidad del análisis, como se puede observar en los resultados obtenidos, mediante la inyección electrocinética se obtuvo un pico con mayor reproducibilidad que la obtenida

con inyecciones por presión, ya que la primera introduce una menor cantidad de muestra dentro del capilar propiciando una mejor separación al evitar saturarlo capilar, la mejoría de la señal obtenida por el cambio de inyección se observa en la figura 39.

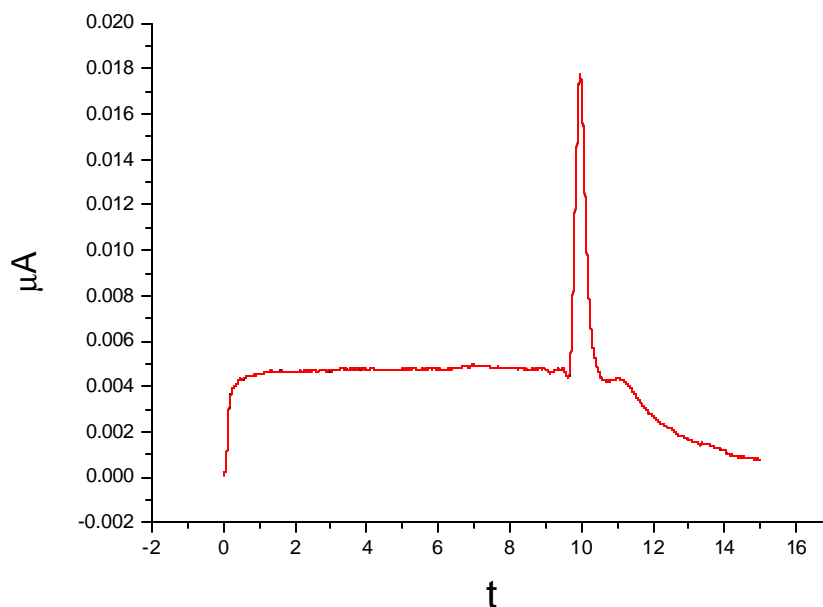


Fig.39. Electroferograma del fluvalinato analizado con la metodología NACE, con una inyección electrocinética (3 kV, 4 s) y utilizando un capilar con 75 μm de diámetro interno.

4.2.4.3 Extracción del pesticida en miel.

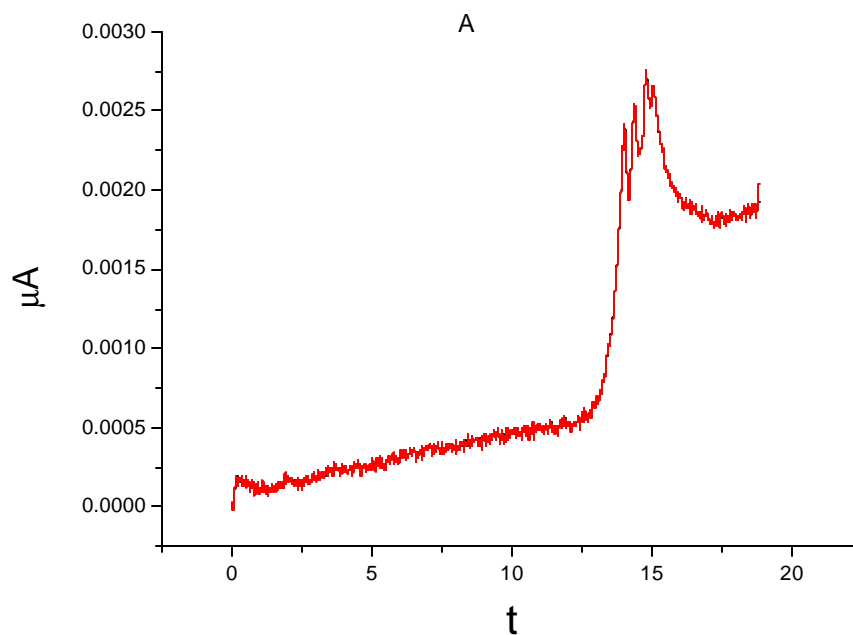
El proceso de extracción de este pesticida presentó resultados que no eran los esperados de acuerdo al patrón de reproducibilidad y definición de los picos observados en los pesticidas anteriores, en la señal de la muestra sin filtrar, en la figura 40A se observa una serie de picos solapados entre los 14 y 15 minutos, posiblemente complejos de los pesticidas con componentes de la miel; y en la figura 40B, un procedimiento con un filtrado adicional en poro de 0.45 μm muestra sólo dos picos, los cuales tienen tiempos de retención mas cercanos a los obtenidos por el estándar bajo las mismas condiciones, los

cuales pueden ser comparados con las condiciones y resultados enlistados en la tabla 24.

Tabla 24. Condiciones y resultados de los ensayos de extracción del pesticida.

Ej.	?	kV sep	t iny (s)	kV iny	Buffer y Electrolitos	tm (min)	I.C. (μ A)
I	280	15	4	3	MeOH/Acn 8:2 (v/v) CH ₃ COONa-3H ₂ O 20 mM CH ₃ COOH 1M	-----	8
II	280	15	4	3	MeOH/Acn 8:2 (v/v) CH ₃ COONa-3H ₂ O 20 mM CH ₃ COOH 1M	10.6, 11.6	8

?: Longitud de onda; kV : kilovolts durante la separación ; t : tiempo de inyección ;psi iny: presión en la inyección; tm : tiempo de migración; I.C. Intensidad de corriente.



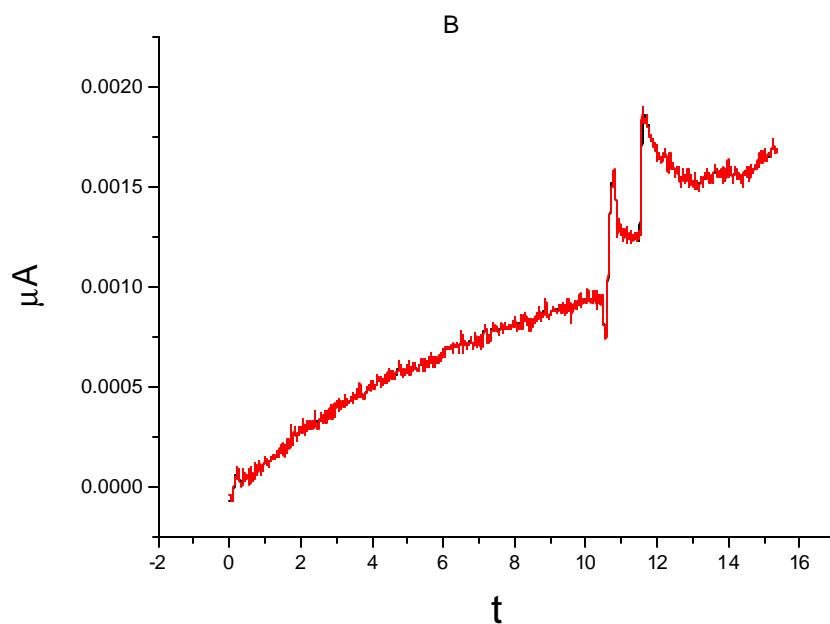


Fig.40. Electroferogramas de la extracción realizada al fluvalinato aplicando la metodología NACE, inyección electrocinética (3 kV, 4 s) y utilizando un capilar con 50 μm de diámetro interno: A) Extracción aplicando la metodología de extracción ensayo I; B) Extracción aplicando la metodología de extracción ensayo II.

Los resultados obtenidos pueden ser atribuidos a la poca interacción entre los solventes utilizados y los sitios activos del pesticida, puesto que el fluvalinato es un compuesto no polar, el metanol y acetonitrilo son los solventes orgánicos más polares (Bogdanov y col.,1999), no existe una solubilidad adecuada provocando dificultades para su análisis.

4.2.5 Timol.

De acuerdo a diversos investigadores y dada la naturaleza del acaricida la técnica ideal para su estudio es la cromatografía de gases con un detector de ionización de flama (T. Shibamoto y col., 1981; M. J. Nozal y col., 2002), por lo que el estudio de este pesticida mediante electroforesis capilar se presentó como una buena opción para el desarrollo de una nueva metodología. Sin embargo, los resultados obtenidos no fueron alentadores por lo que no se muestran.

4.3 Estudio de diferentes mezclas de pesticidas.

En el transcurso del estudio de los pesticidas , en los primeros ensayos se lograba apreciar señales para cada uno a diferentes tiempos de migración, por lo que se decidió estudiarlos en una mezcla a diferentes concentraciones y proporciones, para observar su comportamiento en conjunto y sus posibles interacciones al aplicar un campo eléctrico; cabe mencionar que los pesticidas utilizados para el control de la varroasis no son aplicados a las colmenas en conjunto, de acuerdo a los apicultores de la zona centro del país (referencia verbal), ya que por una parte dicha mezcla esta prohibida por la Secretaría de Salubridad y Asistencia (SSA), además de ser un tratamiento muy agresivo para las abejas, por lo tanto, el análisis de los principales pesticidas con fines de calidad es posible hacerlo de forma individual con los métodos hasta ahora desarrollados en el presente trabajo, sin embargo, es deseable contar con una metodología adecuada para resolver una posible mezcla de algunos de ellos, también con fines de control de calidad. En este apartado se muestran los esfuerzos realizados para tal fin.

4.3.1 Resultados obtenidos de la mezcla de bromopropilato, coumafos y timol estudiados mediante fases acuosas.

La mezcla de bromopropilato, coumafos y timol fue analizada utilizando fases acuosas con un buffer de ácido bórico a un pH: 8.6 y SDS 0.05 M. El mejor resultado de todos los ensayos realizados puede ser observado en la figura 41, la cuál muestra una señal a los 1.9 minutos no resuelta, durante la separación la intensidad de corriente presentaba fluctuaciones desde 15 hasta 30 μA , lo cual pudo ser provocado por varias razones, entre las cuales podemos mencionar la poca solubilidad de los pesticidas en medios acuosos, la inestabilidad de los pesticidas en presencia de surfactantes y el tipo de inyección utilizada (presión 5 psi, 5 s)

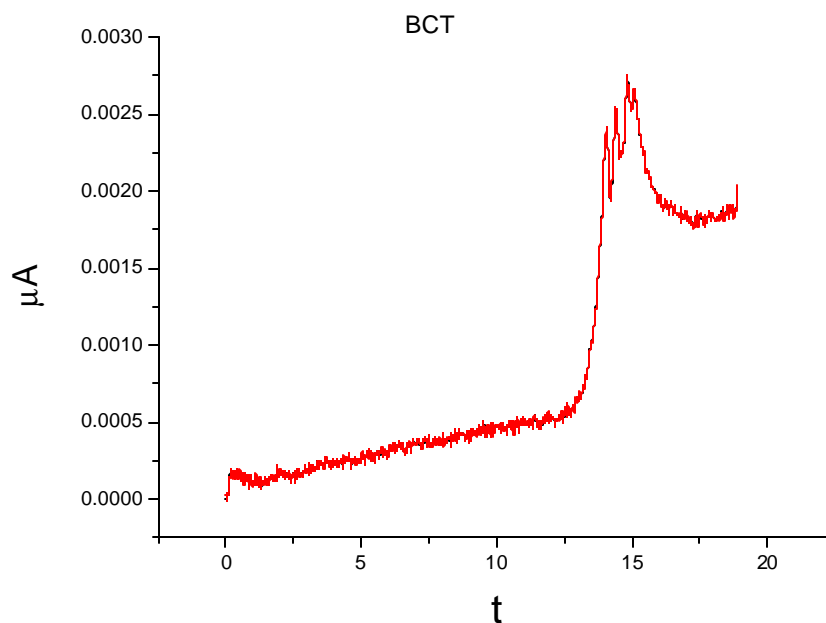


Fig. 41. Electroferograma de la mezcla de bromopropilato, coumafos y timol, empleando una inyección por presión (5 psi, 5s), y un capilar con 75 μm diámetro interno.

Para el estudio de esta mezcla utilizando fases acuosas se realizaron diversas modificaciones a las condiciones del ensayo como cambios en la presión de la inyección, tiempo de inyección, adición de distintos surfactantes, modificaciones en el grosor del capilar, cambios en el voltaje del análisis. De todos los esfuerzos no se obtuvieron electroferogramas que muestren una buena separación de las especies, se presentaron muchos problemas en la intensidad de la corriente, con caídas incluso hasta 0 μ A y líneas bases inestables para todos los electroferogramas. Todos estos problemas los atribuimos a la dificultad de poder solubilizar adecuadamente los pesticidas en medios acuosos, la adición de surfactantes no contribuyó a observar mejoría en los resultados.

4.3.2 Mezcla de amitraz, bromopropilato y fluvalinato mediante fases no acuosas.

Variación en el tipo de inyección mediante metodología NACE.

Los ensayos realizados a concentraciones altas de los estándares obedece al criterio de observar señales intensas de los pesticidas, posteriormente se disminuyó la concentración descartando el saturamiento del capilar. Se realizaron modificaciones a las condiciones de inyección como son por presión y por voltaje. Los mejores electroferogramas obtenidos se observan en las figuras 42 y 43 donde se tiene un solo pico ancho, sin resolverse.

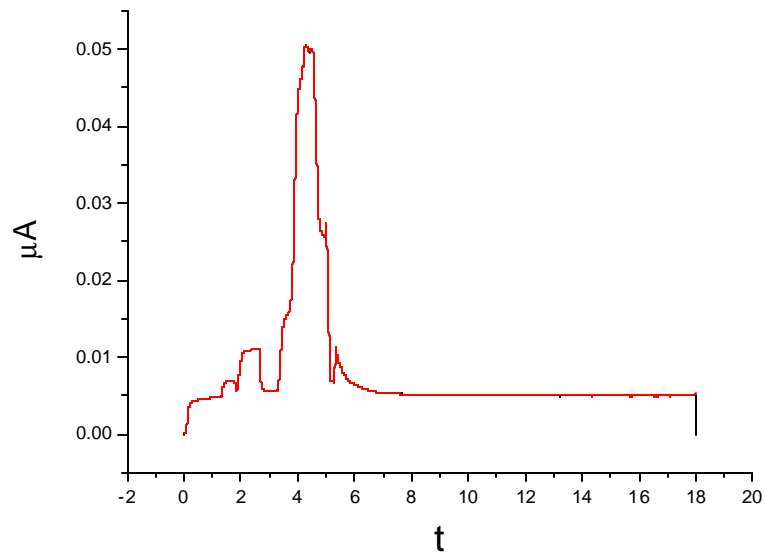


Fig. 42. Electroferograma de la mezcla ABF analizada mediante la metodología NACE e inyectada por presión 2 psi y un capilar con 75 μm de diámetro interno.

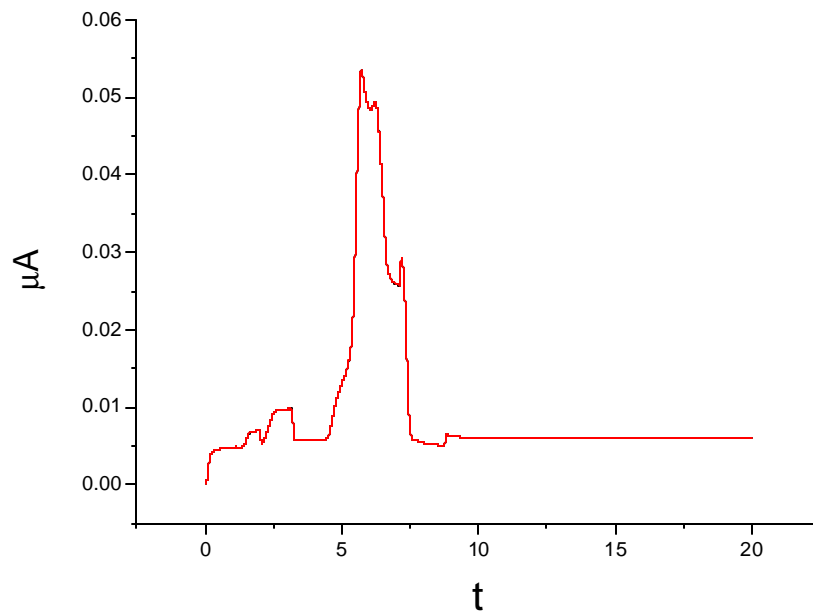


Fig.43. Electroferograma de la mezcla ABF analizada mediante metodología NACE e inyectada por presión 5 psi y un capilar con 75 μm de diámetro interno.

Resultados obtenidos modificando el tiempo que transcurre desde la preparación del amitraz hasta el momento del análisis. Variaciones en el tipo de inyección.

Diversos parámetros como son el tipo de inyección y los días transcurridos desde la preparación de los estándares hasta el día del análisis influyen en los resultados obtenidos; al cambiar la inyección por presión a una inyección electrocinética se puede observar una mejoría en los resultados (Fig. 44).

Resultados obtenidos a los 7 después de haber sido preparado los estándares para la mezcla.

Debido a que esta mezcla contenía amitraz y dada la degradación de mismo, los resultados obtenidos también se encontraban en función del tiempo, en la figura 45 se muestran 4 picos, y aunque no fue posible la asignación de los picos debido a la pobre reproducibilidad en los tiempos de migración ya que estos no coinciden con ninguno de los estándares, se elabora la siguiente hipótesis: “dos señales corresponden a los subproductos del amitraz (DMF y DPMF) y las dos señales restantes al bromopropilato y fluvalinato”.

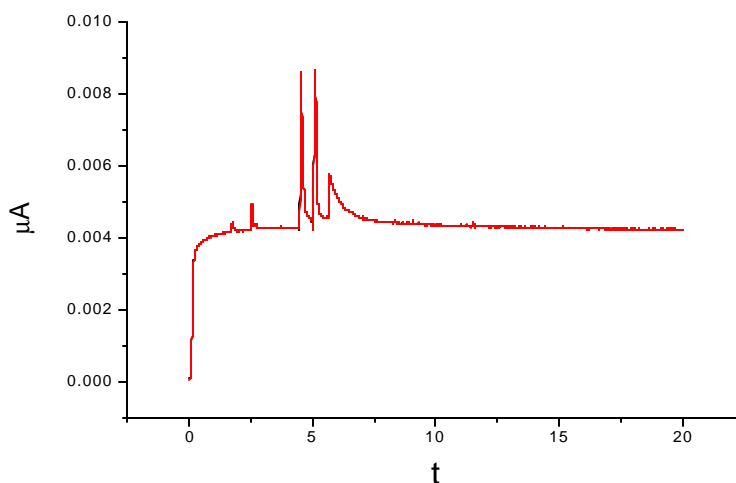


Fig. 44. Electroferograma de la mezcla ABF analizada mediante la metodología NACE y empleando una inyección por voltaje 3 kV durante 4 seg, capilar con 75 µm de diámetro interno.

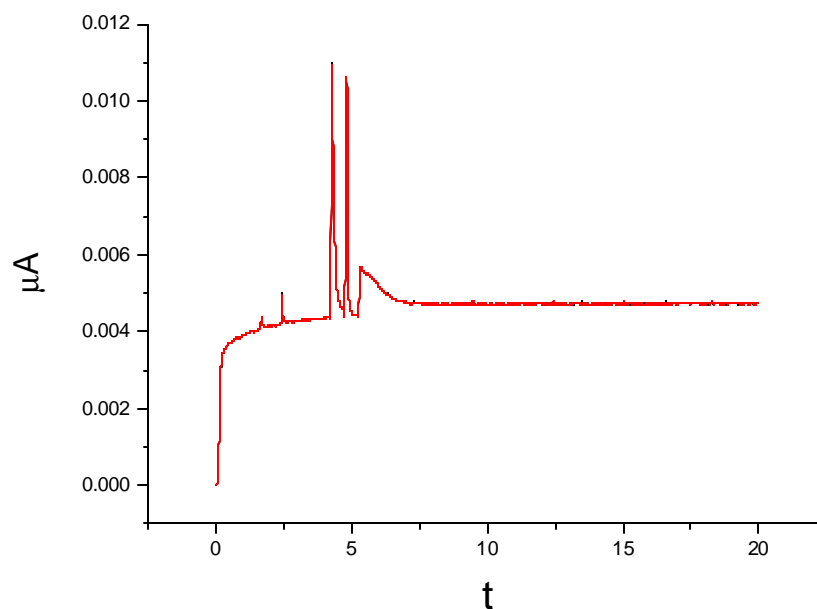


Fig. 45. Electroferograma de la mezcla ABF, para la cual la muestra fue inyectada por voltaje de 3 kV durante 4 segundos y un capilar con 75 μm de diámetro interno.

Muestras analizadas el mismo día de su preparación.

Al tratar de mejorar los resultados, se realizaron los ensayos de la mezcla con soluciones frescas, ya que así se evitarían los problemas de reproducibilidad causados por la antigüedad de la muestra; en la figura 46 se pueden observar dos señales a los mismos tiempos de migración que las muestras con una semana de antigüedad, con lo que se confirma la ausencia de los subproductos del amitraz, pero por un posible solapamiento, solo se observan dos picos; en un intento por mejorar la separación se modificó el diámetro interno del capilar de 50 μm a 75 μm , en los resultados obtenidos se observó una modificación en el tiempo de migración, aunque se acercan a los tiempos de retención de los estándares por separado, dicha señal, volvió a ser un mismo pico ancho sin resolver (Fig. 47 y 48). En cuanto a la reproducibilidad y estabilidad en la intensidad de corriente observada durante la separación, estos fueron similares a los resultados obtenidos mediante fases no acuosas.

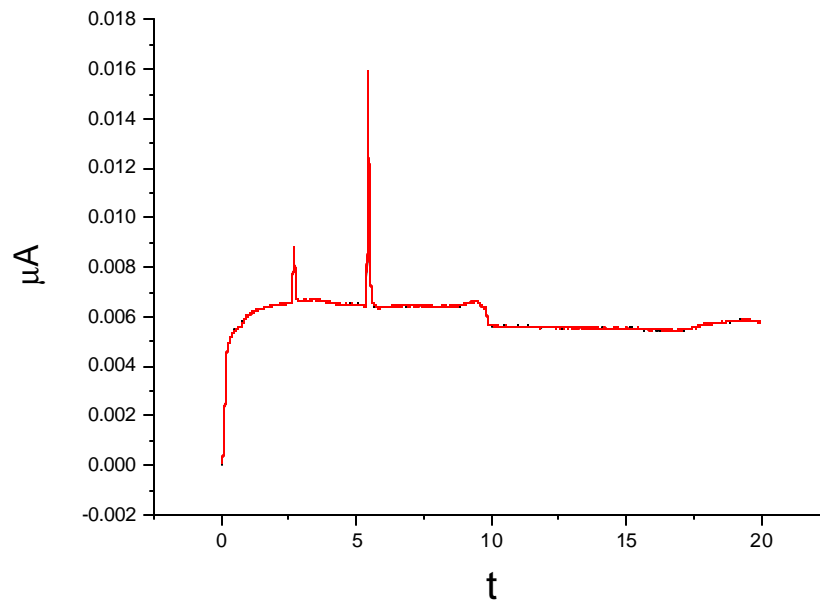


Fig. 46. Electroferograma de la mezcla ABF aplicando la metodología NACE, utilizado una inyección por voltaje (3 kV, 4 s) y un capilar con 50 μm de diámetro interno.

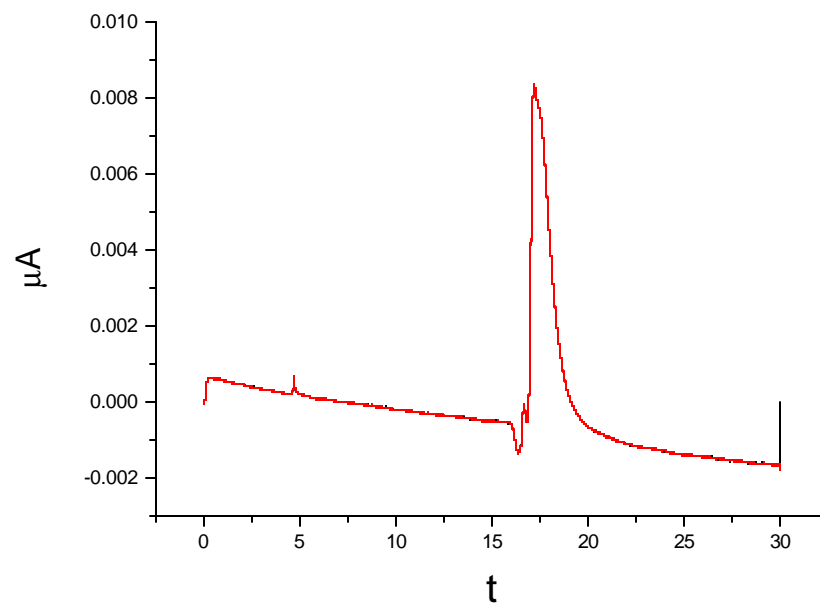


Fig. 47. Ejemplo de electroferograma de la mezcla amitraz, bromopropilato y fluvalinato analizada con la metodología NACE y empleando una inyección electrocinética (3 kV, 4 s) y 75 μm de diámetro interno de capilar.

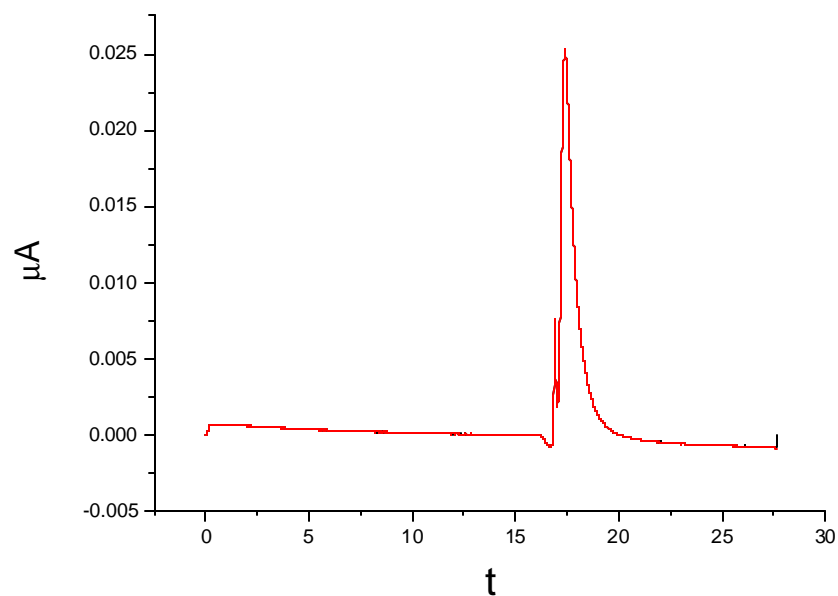


Fig. 48. Electroferograma de la mezcla de amitraz, bromopropilato y fluvalinato analizada con la metodología NACE, aplicando una inyección electrocinética (3 kV, 4 s) y un capilar con 75 μm de diámetro interno.

Con los resultados obtenidos mediante diversos cambios en fases móviles, parámetros de inyección y uso de electrolitos no fue posible obtener una separación, la degradación del amitraz juega un papel importante como factor de inestabilidad de los resultados y posiblemente la longitud de onda no fue la adecuada, como se mencionó anteriormente, por dificultades técnicas, no se pudieron usar las longitudes exactas, pero cabe mencionar que la longitud de onda utilizada fue útil para el estudio de los pesticidas por separado.

CONCLUSIONES

La electroforesis capilar no acuosa es una técnica que por las características de los solventes orgánicos que utiliza (metanol y acetonitrilo), presenta ventajas en el análisis de muestras que por sus características fisicoquímicas son difíciles de estudiar utilizando medios acuosos.

El método desarrollado es utilizable para la detección individual de coumafos, bromopropilato, amitraz y fluvalinato en muestras de miel. El método es rápido y sencillo de llevar a cabo.

La inyección electrocinética mostró mejores resultados que la inyección por presión, los electroferogramas fueron más reproducibles y sin problemas de intensidad de corriente.

No se observaron diferencias entre el acetato de sodio y acetato de amonio utilizados como sales para aumentar la intensidad de la corriente.

El amitraz es un compuesto que se degrada conforme transcurre el tiempo, desde el día de su preparación hasta el día de su análisis. El método de análisis propuesto es capaz de observar los tres subproductos del amitraz, la intensidad de las señales es mejor que las técnicas tradicionales como son HPLC y CG.

Las extracciones realizadas para cada pesticida empleando una fase sólida como los cartuchos C18, previamente acondicionados con metanol y acetonitrilo, presentan una mayor reproducibilidad que los ensayos realizados en extracciones con C18 y filtrados a través de poros de 0.45 μm ; la extracción sólo fue viable para el coumafos y amitraz, ya que en el bromopropilato y fluvalinato se observaron señales anchas y con poca reproducibilidad.

La metodología desarrollada no es adecuada para el análisis de mezclas de los pesticidas en estudio.

ANEXO 1

1 Electroforesis capilar

La electroforesis es la migración de iones presentes en una solución por influencia de un campo eléctrico, ésta técnica presenta diversas modalidades como lo es la electroforesis capilar, la cual fue introducida prácticamente al mismo tiempo por Mikkers y cols. (1979) y Jorgenson y Lukacs (1981). La electroforesis se lleva a cabo en tubos capilares de pequeño diámetro, lo que permite utilizar campos eléctricos elevados de 30 KV. Aunque los tubos capilares inicialmente se construyeron de teflón y vidrio, actualmente se utilizan capilares de sílice fundida recubiertos de poliamida, que permite su flexibilidad sin roturas. La longitud aproximada suele ser de 30-100 cm y el diámetro interno de 20-100 μm . La utilización de voltajes elevados mejora la separación en dos formas: velocidad y eficiencia.

Las características más importantes de la electroforesis capilar son:

- Elevada velocidad de separación al emplear altos voltajes y capilares relativamente cortos.
- Alta eficiencia (el número de platos teóricos varía entre 100000 y 500000). Al utilizar capilares de diámetros muy pequeños se disipa muy bien el calor generado por la aplicación de voltajes elevados, lo cual minimiza el ensanchamiento de las zonas de soluto.
- Requiere pequeñas cantidades de muestra (los volúmenes de inyección normalmente son del orden de 1 a 10 nL).
- Consumo mínimo de reactivos.
- Gran versatilidad en cuanto a modos de operación y aplicabilidad. Se puede analizar una gran variedad de analitos tanto iónicos como moleculares.
- Es fácilmente automatizable.

Los elementos básicos de un instrumento de electroforesis capilar se muestran en la figura 49. Los extremos del capilar se introducen en los viales de electrolitos, que generalmente están llenos con la misma disolución tampón que el interior del capilar. En esos viales se insertan los electrodos de platino, a través de los cuales se aplica un voltaje elevado (usualmente de 20 a 30 kV).

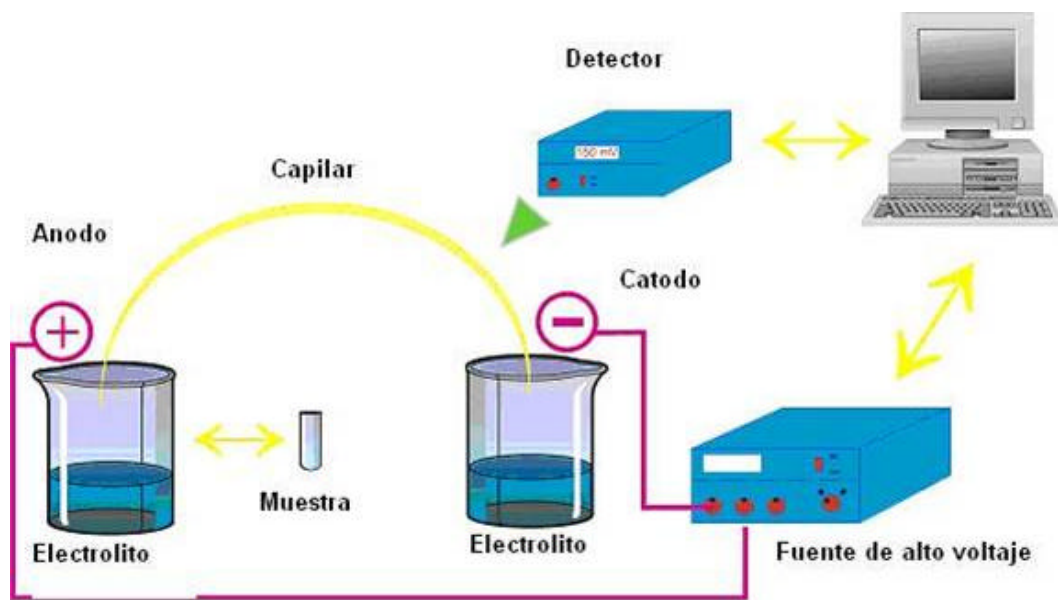


Fig. 49: Esquema de la instrumentación requerida en electroforesis capilar.

El capilar suele estar termostaticado. En algunos instrumentos, se hace circular alrededor del capilar una corriente de aire, mientras que en otros diseños la termostaticación se lleva a cabo haciendo circular un líquido refrigerante.

Para llevar a cabo la inyección de la muestra, uno de los viales de tampón se intercambia por el vial de muestra. En el otro extremo se encuentra el detector. Debe indicarse la polaridad de la fuente de alto voltaje. En el denominado modo normal de trabajo, el detector se encuentra en el extremo catódico. Cuando el detector se encuentra en el extremo anódico, el modo de trabajo se denomina de polaridad invertida. El sistema de detección más usual es en columna (on column), es decir, cuando los analitos se encuentran

todavía en el interior del capilar. La respuesta del detector genera el electroferograma, el cual es un gráfico que relaciona el tiempo de migración con la respuesta del analito, dicho electroferograma es de aspecto similar al de un cromatograma.

1.1 Parámetros analíticos: tiempos de migración, eficacia y resolución

Los parámetros analíticos que se obtienen de una separación electroforética son similares a los resultados de una cromatografía, factores como tiempo, eficacia, resolución, etc. llevan tratamientos similares en ambas técnicas. Aquí se presenta un resumen de los parámetros más importantes. Existen diversas publicaciones y trabajos previos donde pueden consultarse los principios básicos de las separaciones mediante EC (Harris D. C., 2001).

1.1.1 Tiempo de migración

Cuando se lleva a cabo la separación electroforética en el interior de un capilar de sílice, las moléculas de analito se mueven a una velocidad que va a depender de su movilidad electroforética efectiva y de la magnitud del flujo electroosmótico (EOF), que viene determinada por la movilidad electroosmótica. Para un ión, la velocidad aparente u observada viene dada por la ecuación:

$$v_{ap} = (m_e + m_{eq})E = m_{ap}E = m_a \frac{V}{L} \quad \text{Ec. 1}$$

Siendo V_{ap} la velocidad aparente, μ_e la movilidad electroforética, μ_{eq} la movilidad electroforética equivalente, E el campo eléctrico, L la longitud total del capilar y V , el voltaje aplicado entre los electrodos.

La figura 50 muestra el esquema de separación de los componentes de una muestra mediante electroforesis capilar. La muestra está compuesta de

especies catiónicas, aniónicas y neutras. La separación se lleva a cabo con polaridad normal: la muestra se inyecta en el extremo anódico y el detector está colocado del lado del cátodo. El capilar utilizado es de sílice y la separación se lleva a cabo en presencia de flujo electroosmótico puesto que la pared del capilar, debido a la disociación de los grupos silanol, está cargada negativamente.

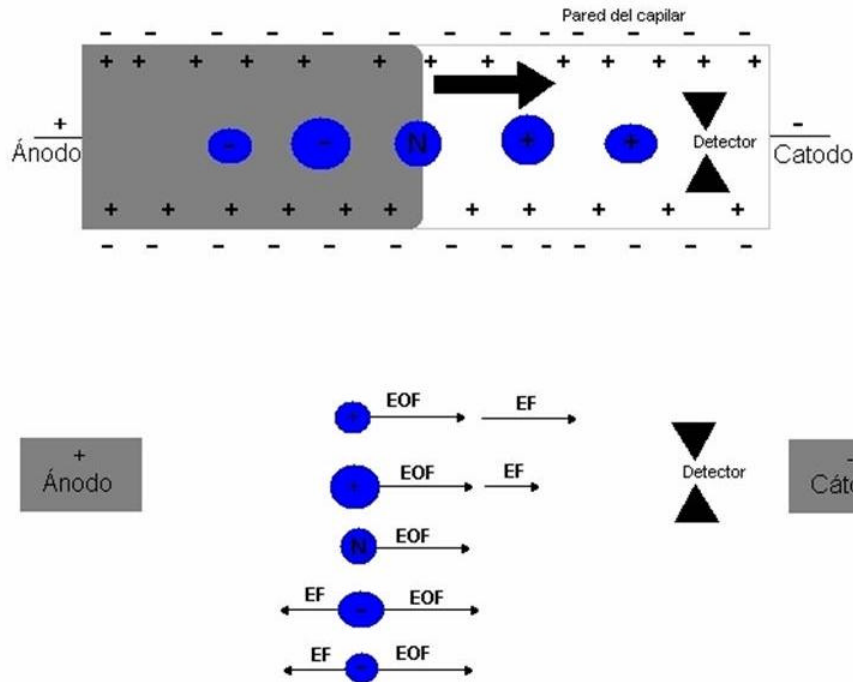


Fig. 50: Esquema del proceso de separación mediante electroforesis capilar. La longitud de las flechas indica la magnitud de las movilidades electroforéticas (EF) y electroosmótica (EOF). La dirección de las flechas indica la dirección de migración electroforética y electroosmótica.

La densidad de carga sobre la pared del capilar está influenciada por el pH del tampón y, por tanto, éste va a afectar al flujo electroosmótico, aumentando a valores altos de pH y disminuyendo a valores bajos (Harris D. C., 2001).

También hay que tener en cuenta que el pH del tampón va a afectar a la movilidad electroforética de los analitos, pues su grado de ionización, y, por tanto, su carga, dependen del pH. Las especies catiónicas de la muestra se

mueven en la misma dirección del flujo electroosmótico. De esta forma, su movilidad aparente es mayor que la movilidad electroforética y serán las especies que alcancen antes la zona del detector. Para los aniones la dirección de movilidad electroforética es contraria a la velocidad electroosmótica, por lo que la movilidad aparente será la resta de las dos cantidades. Si se trabaja en condiciones de pH a las cuales la velocidad del flujo electroosmótico es mayor que la velocidad electroforética de los aniones, éstos pueden alcanzar el detector. Las especies neutras no presentan movilidad electroforética, por lo que se moverán a la misma velocidad del flujo electroosmótico. Entonces, primero fluirán los cationes según su relación carga/radio (los que presentan una mayor relación tienen una mayor movilidad electroforética, tal como indican la longitud de las flechas en la figura); a continuación las especies neutras, todas juntas, y finalmente los aniones cuya movilidad electroforética sea inferior al flujo electroosmótico.

El tiempo que tarda un analito en alcanzar el detector, o tiempo de migración efectivo o real, será:

$$t_m = \frac{L_d}{V_{ap}} = \frac{L_d L}{\mu_{ap} V} \quad \text{Ec.2}$$

Donde, t_m es el tiempo de migración, μ_{ap} movilidad aparente, L_d es la longitud del capilar desde el extremo de inyección hasta la posición del detector, denominada longitud efectiva del capilar.

Como en la práctica las diferencias entre L y L_d son pequeñas:

$$t_m = \frac{L^2}{\mu_{ap} V} \quad \text{Ec. 3}$$

Como se deduce de esta ecuación, la aplicación de voltajes elevados reduce el tiempo de migración.

Las movilidades electroforéticas efectivas de los analitos pueden calcularse a partir de sus tiempos de migración utilizando la ecuación.

$$m_e = \frac{L_d L}{t_m V} - m_{eo} \quad \text{Ec. 4}$$

Donde μ_e será la movilidad electroforética, L_d la longitud del capilar desde el extremo de la inyección hasta el capilar, μ_{eo} la migración electroosmótica, t_m el tiempo de migración y V la velocidad.

1.1.2 Eficacia

Debido a la similitud que existe entre los cromatogramas y los electroferogramas, para medir la eficacia de la separación en electroforesis capilar se utilizan los mismos términos que en cromatografía, la altura de plato teórico, H , y el número de platos teóricos, N :

$$H = \frac{s_x^2}{L_d} \quad \text{Ec. 5}$$

Donde s_x^2 es la varianza espacial de la distribución de un componente y L_d la distancia recorrida por el componente.

El número de platos teóricos viene dado por:

$$N = \frac{L_d}{H} \quad \text{Ec. 6}$$

Experimentalmente, N se puede determinar:

$$N = \left(\frac{t_m}{s_t} \right)^2 \quad \text{Ec. 7}$$

Siendo, s_t la desviación estándar en tiempo para el pico observado.

En electroforesis capilar (realmente en electroforesis capilar de zona), existen varios factores que puede contribuir al ensanchamiento de la zona de soluto y, por tanto, a disminuir la eficacia. La difusión molecular del analito a lo largo de la dirección de migración y la dispersión por efecto térmico debido al perfil parabólico de temperatura en el interior del capilar. Además, debe considerarse la dispersión originada por fenómenos de adsorción de los solutos sobre las paredes del capilar (que actuaría como una fase estacionaria). Finalmente, habría que considerar el ensanchamiento debido a la longitud de la muestra inyectada, las diferencias de conductividad entre la zona de soluto y la zona de tampón (que conducen a un comportamiento electroforético no ideal), y también el ensanchamiento producido en el detector (Harris D. C., 2001).

Trabajando en condiciones ideales, el principal mecanismo de ensanchamiento de la zona de soluto es la difusión longitudinal. La varianza espacial según la ecuación de Einstein, viene dada por $s_x^2 = 2Dt_m$ donde D es el coeficiente de difusión molecular (cm^2/s). Teniendo en cuenta esta ecuación y las ecuaciones 2 y 3.

$$N = L_d m_{up} V / 2DL \quad \text{Ec. 8}$$

Si consideramos $L_d \approx L$

$$N = m_{up} V / 2D \quad \text{Ec. 9}$$

De las ecuaciones 3 y 8, puede concluirse que trabajar a potenciales elevados aumenta la eficacia de separación y los análisis se realizarán en un menor tiempo, dos de las ventajas principales de esta técnica. La ecuación 9 también nos indica que el número de platos teóricos es independiente de la longitud del capilar cuando se mantiene constante el voltaje y siempre que se disipe bien el calor generado, sin embargo un capilar mas largo nos permite utilizar voltajes mayores y, de esta forma, incrementar el número de platos teóricos. Por su puesto, hay un límite práctico, pues si se aplican voltajes muy elevados se generan corrientes muy elevadas y se producen incrementos de temperatura que no se disipan de forma efectiva provocando perfiles parabólicos de temperatura, con aparición de gradientes de temperatura, cambios locales de viscosidad y, por tanto, ensanchamiento de las zonas de soluto.

1.1.3 Resolución

La resolución de los compuestos es el objetivo final de cualquier técnica de separación; la resolución entre dos picos puede expresarse como:

$$R_s = \frac{2(t_2 - t_1)}{W_1 + W_2} = \frac{t_2 - t_1}{4s_t} = \frac{x_2 - x_1}{4s_t} \quad \text{Ec. 10}$$

Donde R_s es la resolución entre dos picos, t_1 y t_2 el tiempo de migración de cada uno y s_t la desviación estándar en tiempo para cada pico observado; según que las posiciones de los solutos se midan en términos de tiempo o espacio.

Como se mencionó al principio del presente trabajo, la electroforesis capilar no se ha utilizado para el análisis de acaricidas en miel, pero si hay evidencias en la literatura de su utilización en el estudio de pesticidas en agua potable y en el medio ambiente en general. Carabias - Martínez y col. (1999) realizaron un estudio a diversos herbicidas como triazinas en aguas naturales

utilizando electroforesis capilar de zona (CZE) con detección UV y aplicando un proceso de extracción por cartuchos C18 y polyOasis HLB (divinilbenceno-Co-N-vinilpirrolidina), el estudio se llevo a cabo mediante una metodología no acuosa, con un medio de separación a base de acetonitrilo - metanol, ácido perclórico y SDS, obtuvieron limites de detección desde 0.01 a 0.05 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Por su parte Galceran y col [16], utilizando CZE realizaron un estudio de diversos herbicidas cuaternarios de amonio, con un procedimiento a priori de extracción fase sólida a través de cartuchos C₁₈, dando pauta al uso de electrolitos en la fase móvil que ayuden a mejorar la intensidad de corriente como son ácido acético y acetato de amonio 50 mM y 5% de metanol (v/v) y obteniendo un limite de detección de 2.2 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Sin embargo, la NACE es una técnica que a pesar de estar ganando terreno en el área analítica, todavía se encuentra en etapas tempranas de desarrollo.

1.1.4 Inyección de la muestra

El sistema de inyección de la muestra debe ser capaz de introducir pequeños volúmenes de muestra, proporcionales a los pequeños volúmenes de los capilares, de forma eficiente y reproducible. La longitud o espacio que ocupa la muestra dentro del capilar es un parámetro crítico. Es necesario introducir la muestra en forma de banda lo más estrecha posible, para minimizar el ensanchamiento de zona y, por tanto evitar perder eficacia y resolución. La longitud de la zona de muestra o el volumen de muestra deben ser menores que el ancho de banda generado por difusión o por la ventana del detector. Si la zona de inyección es demasiado larga, el ensanchamiento de banda será mayor. Normalmente, inyecciones mayores (en longitud) del 1% de la longitud de separación afectaran negativamente a la eficacia (Harris D. C., 2001).

Los métodos de inyección más empleados en electroforesis capilar son los métodos de introducción directa de muestra en la columna (inyección *on column*). En estos métodos de inyección un extremo del capilar es utilizado directamente como inyector de muestra. De esta forma, se eliminan los ensanchamientos de banda que se producirían con la conexión de válvulas de inyección. La inyección *on column* se puede llevar a cabo mediante el método de electromigración (inyección electrocinética o electromigración), y preferiblemente mediante el establecimiento de una diferencia de presión a través de los extremos del capilar (inyección hidrodinámica) (Harris D. C., 2001).

1.1.4.1 Inyección electrocinética

Se lleva a cabo reemplazando el reservorio del tampón en el extremo de inyección por el vial de muestra y aplicando un voltaje durante un corto periodo de tiempo. Normalmente, las fuerzas del campo aplicado son de 3 a 5 veces menores que las aplicadas para las separaciones (Fig. 51). Una propiedad característica de la inyección electrocinética es que la cantidad de soluto inyectada es dependiente de su movilidad electroforética y viene dada por:

$$\frac{Q_i}{L} = V \rho C_i t r_c^2 (\mu_e + \mu_{eo}) \quad \text{Ec. 11}$$

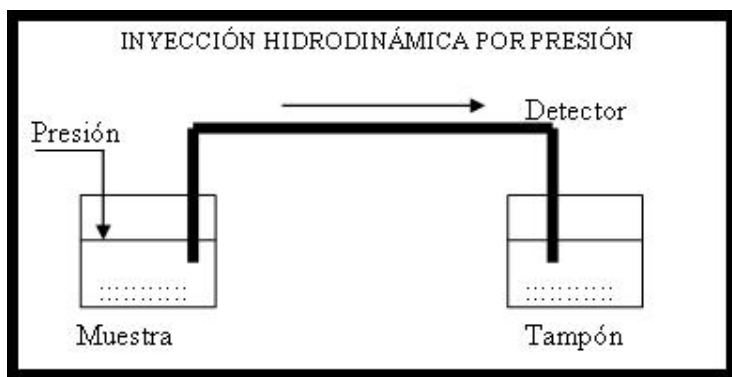
siendo Q_i la cantidad inyectada de la especie i (moles), V el voltaje aplicado (voltios), C_i la concentración de la especie i en la muestra (mol/m^3), r_c el radio del capilar (m), t el tiempo de aplicación del voltaje (s), μ_e la movilidad electroforética de la especie i ($\text{m}^2/\text{V}\cdot\text{s}$), μ_{eo} , la movilidad electroosmótica ($\text{m}^2/\text{V}\cdot\text{s}$) y L la longitud del capilar (m).

Entonces, la cantidad de muestra introducida en el capilar puede controlarse variando el voltaje y/o el tiempo de aplicación de dicho voltaje, y depende del flujo electroosmótico, movilidad electroforética y concentración de la muestra.

En este tipo de inyección se produce una discriminación de las especies iónicas, debido a que los iones más móviles son cargados en mayor proporción que los iones menos móviles (muestreo sesgado). De esta forma, la muestra inyectada no tiene la misma composición que la muestra original. Normalmente la presencia de flujo electroosmótico, los cationes son cargados preferentemente a los aniones, si el extremo de inyección es anódico. Los solutos con más movilidad se inyectarán antes que los que tienen menos movilidad. Así los cationes con mayor relación carga/radio entrarán primero en el capilar, luego los cationes con menor relación carga/radio, seguidamente las especies neutras, y finalmente los aniones, en orden inverso a su relaciones carga/radio.

1.1.4.2 Inyección hidrodinámica

La inyección hidrodinámica es el método usado más ampliamente. Puede ser llevado a cabo por aplicación de presión en el extremo de inyección, succión por vacío aplicado a la salida del capilar o bien debido al efecto de sifón obtenido por la elevación del reservorio de inyección con respecto al reservorio de salida.



A)

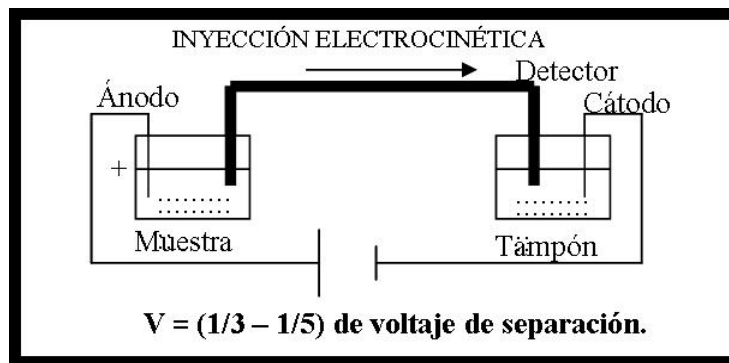
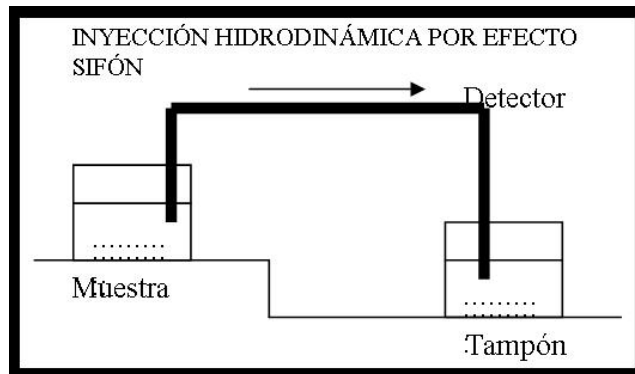
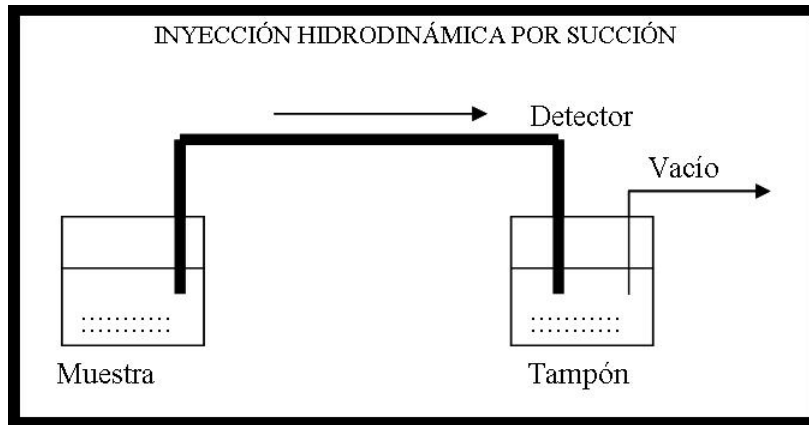


Fig. 51: Métodos de inyección de muestra: A) Inyección hidrodinámica por presión, B) Inyección hidrodinámica por succión, C) Inyección hidrodinámica por efecto sifón, D) Inyección electrocinética.

El volumen de muestra cargada será función de las dimensiones del capilar, de la viscosidad del tampón y del tiempo que se aplica la diferencia de presión (Rouessac F., 2003).

La electroforesis capilar presenta una serie de ventajas sobre la cromatografía de gases y HPLC, como

- ❖ Velocidad de análisis similar o mayor.
- ❖ Sencillo fundamento teórico.
- ❖ Menor costo de operación.
- ❖ Instrumentación sencilla.
- ❖ Gran versatilidad en el análisis.

Por lo anterior, la EC es una técnica en auge y cada día se ensayan nuevas posibilidades dadas las ventajas que presenta esta técnica.

GLOSARIO

Amitraz. Acaricida derivado del triazopentadieno, nombre químico: [N- metilbis (2,4- xililiminometil) amina]

Anfipróticos: Especies químicas que pueden actuar como aceptores o donadores de electrones.

Apróticos: Especies químicas que tienen una constante de autoprotolisis muy baja y solamente pueden aceptar protones

Bromopropilato: Acaricida derivado del benzilato, nombre químico [isopropil 4,4' - dibromobenzilato]

Cmc: Concentración micelar crítica.

Coumafos: Insecticida, larvicida organofosforado, nombre químico: [o,o- dietil - o- (3- cloro – 4 – metil – 7 – coumarinil) – fosforotioato]

DL50. Dosis letal 50, que es la dosis de tóxico que resulta letal para el 50% de los organismos tratados en el experimento.

Electrocínética: Tipo de inyección por medio de voltaje.

Electroferograma. Gráfico que relaciona el tiempo de migración con la intensidad de la señal del analito.

Electroforesis: Movilidad de las moléculas cargadas de una sustancia al aplicar un campo eléctrico externo.

Electroforesis capilar: La electroforesis capilar se lleva a cabo en tubos capilares de diámetro pequeño (50 – 75 μm).

Fluvalinato: Insecticida-acaricida piretroide de contacto, nombre químico Tau-fluvalinato

Hidrodinámica: Tipo de inyección por medio de presión.

Micelas: Grupos esféricos que pueden formar algunas especies químicas.

Plaguicida: Sustancia o mezcla de sustancias que se destinan a controlar cualquier plaga.

Traslocación: Proceso de contaminación que comienza en la vegetación y llega al producto final pecuario.

Termostatación. Control de la temperatura del capilar por medio de sustancias refrigerantes.

Timol: Acaricida orgánico.

Varroasis: Enfermedad parasitaria externa de las abejas ocasionada por el ácaro *Varroa jacobsoni* O.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

04-28-94 NORMA Oficial Mexicana NOM-001-ZOO-1994.

Alberto, C. Sanchez-Brunete, J. L. Tadeo, *Journal Agricultural of Food Chemistry* (2004), **52**, 5828 – 5835.

Anne- Claire Martel y Sarah Zeggane, *Journal of Chromatography* (2002) **A 954**, 173-180.

B. Gallo, E. Korta, A. Bakkali, L. A. Berrueta, F. Vicente, V. Kilchenmann y S. Bogdanov, *Journal of Agricultural Food Chemistry* (2001) **49**, 5835-5842.

CICOPLAFEST Catálogo Oficial de Plaguicidas Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural, Secretaría del Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca, Secretaría de Salud y Secretaría de Comercio y Fomento Industrial, México D.F., 1999.

Domingo B. Gomis, Juan J. Mangas, Alberto Castaño y María D. Gutiérrez, *Analitycal Chemistry* (1996), **68**, 3867-3870.

Folleto informativo editado por la SAGARPA, Número 206, 2005.

García F. Fernández G., Determinación de residuos plaguicidas organofosforados en mieles de Lugo. Servicio publicaciones diputación provincial de Lugo, 1992, pg. 2-10.

H. T. Chang; M. J. Chen y C-Y. Lin, *Journal of Chromatography* (1999) **A 853**, 171-180.

Harris D.C., *Análisis Químico Cuantitativo*, 2ª Edición/correspondiente a la 5ª ed. de la original norteamericana. Editorial Reverté S.A. España 2001. pg. 747 – 750.

J. Fry, in P.T. Kissinger, W. R. Heinema (Eds). *Laboratory techniques in electroanalytical chemistry*, Marcel Dekker, New York, pg. 1054, 1996.

J. Rodríguez, J. J. Berzas, A. M. Contento, M. P. Cabello, 2003. Development and validation method for determination of paroxetine and its metabolites by non aqueous capillary electrophoresis. VIII International symposium on analytical methodology in the environmental field, XIII Reunión de la sociedad española de química analítica del 21 al 24 de octubre de 2003. Universidade da Coruña, Campus de Elviña, España.

J. Tjømelund, S.H. Hansen, *Journal of Chromatography* (1997), **A 779**, 235.

Jorgenson, J.W. y Lukacs, K.D., *Journal of Chromatography* (1981) **218**, 209-216.

M. Calull, D. Martínez, M. J. Cugat y F. Borull, *Journal of Chromatography* (2000) **Review A 902**, 65-89.

M. T. Galceran, O. Nuñez y E. Moyano, *Journal of Chromatography* (2002) **A 946**, 275-282.

Mº. J. Nozal, J. L. Bernal, J. J. Jiménez, Mº. J. González, M. Higes, *Journal of Chromatography* (2002), **A 954**, 207-215.

Marja-Liisa Riekkola, Matti Jussila, Simo P. Porras y István E. Valkó, *Journal of Chromatography* (2000) **Review A 892**, 155-170.

Melgardt M. de Villiers, Charmaine M. van Eeden, Wilna Liebenberg, Migna Song, William M. Kolling y Mino R. Caira, *Journal of Agricultural Food Chemistry* (2004) **52**, 7362-7369.

Mikkers, F.; Everaerst, F. y Verheggen T., *Journal of Chromatography* (1979) **169**, 11-20.

Piana G., La miel. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid (España). 1989. pg. 86.

R. Cela y S. Morales, *Journal of Chromatography* (1999) **A 846**, 401-411.

Rouessac F., Rouessac A., Métodos y Técnicas instrumentales modernas, Teoría y ejercicios resueltos, ANÁLISIS QUÍMICO, Ed. McGraw Hill, España, 2003, pg. 121 -122.

S. Bogdanov, V. Kilchenmann y A. Imdorf; Acaricide residues in honey, beeswax and propolis, Swiss Bee Research Centre (1999).

S. P. Porras, M. Jussila, K. Sinervo, M.L. Riekkola, *Electrophoresis* (1999) **20**, 2510.

SIACON, Sistema de Información y Estadística Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), SAGARPA, 2001.

T. Shibamoto, in; W. Jennings (Ed), Applications of glass capillary, Gas chromatography, chromatographic Science Series, Vol.15, Marcel decker, New York, USA, 1981,p. 455.

Y. Marcus, Ion solvation, Wiley, Chichester, 1985.