

UNIVERSIDAD DE SANTIAGO

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE BROMATOLOGÍA-TOXICOLOGÍA

Y

ANÁLISIS QUÍMICO APLICADO

RESÍDUOS DE PESTICIDAS Y POLICLOROBIFENILOS (PCB)
EN AGUAS Y MOLUSCOS DE LA RÍA DE AROSA

Memoria presentada en la Facultad
de Farmacia de la Universidad de
Santiago de Compostela, para op-
tar al Grado de Doctor en Farma-
cia, por

MARÍA ASUNCIÓN BOADO SEXTO,

D.L.: C-447-1.974

Servicio de Mecanización de la Universidad de Santiago de Compostela

Leida la presente el 18 de Octubre de 1.974 ante el Tribunal formado por los Sres. Profesores:

Presidente: *Ilmo. Sr. Pablo Sanz Pedrero*
Vocal: *Dr. D. Aniceto Charro Arias*
Vocal: *Dr. D. Román Casares López*
Vocal: *Dr. D. Rafael Garcia Vilanova*
Secretario: *Dr. D. Jesús Simal Lozano*

obtuvo la calificación de **SOBRESALIENTE CUM LAUDE**

1. The first part of the document discusses the importance of maintaining accurate records of all transactions and activities related to the business.

2. It is essential to ensure that all financial statements are prepared and reviewed regularly to identify any discrepancies or errors.

3. The document also outlines the various methods used to collect and analyze data, including surveys, interviews, and focus groups.

D. JESUS SIMAL LOZANO, Profesor Agregado de Bromatología y Toxicología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Santiago,

CERTIFICA: Que la Tesis Doctoral RESIDUOS DE PESTICIDAS Y POLICLOROBIFENILOS (PCB) EN AGUAS Y MOLUSCOS DE LA RIA DE AROSA, ha sido realizada bajo mi dirección y la de los prfs. D. A. Charro Arias y J. Ma Creus Vidal, en el Departamento de Bromatología-Toxicología y Análisis Químico Aplicado de la Facultad de Farmacia de Santiago de Compostela.

Santiago, Setiembre de 1.974.

El Director,

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'J. Simal Lozano', written in a cursive style with a horizontal line underneath.



Deseo expresar mi agradecimiento a los Profs. D. Jesús Simal Lozano, D. Aniceto Charro Arias y D. José Ma Creus Vidal, por la dirección de esta Tesis así como su continua orientación en mi formación científica.

A los demás compañeros de Departamento por la ayuda proporcionada.

A D. Luis Losada Lago y a D. Miguel Torre Cervigón por su colaboración en el suministro de muestras.

Así mismo hago constar mi gratitud a la Fundación Barrié de la Maza "Conde de Fenosa" por la beca de iniciación a la investigación concedida durante el año 1.973.



A mis padres



I N D I C E

0.- ABREVIATURAS

I.- INTRODUCCION

- 1.- Presencia en el agua
- 2.- Toxicidad
- 3.- Persistencia
- 4.- Concentración biológica
- 5.- Interés comercial y sanitario

II.- REVISION BIBLIOGRAFICA

1.- EXTRACCION

2.- PURIFICACION

2.1.- Columnas de alúmina

2.2.- Columnas de sílice

2.3.- Columnas de carbón

2.4.- Columnas de magnesia

2.5.- Columnas de florisil



- 3.- ANALISIS CUALITATIVO
- 3.1.- Pruebas químicas.
- 3.2.- Separación de pesticidas clorados
- 3.3.- Identificación por el p-Valor
- 3.4.- Otras técnicas
- 4.- METODOS USADOS EN LA VALORACION CUANTITATIVA

III.- PARTE EXPERIMENTAL

- 1.- REACTIVOS
- 2.- MATERIAL Y APARATOS
- 3.- MUESTRAS
 - 3.1.- LOCALIZACION
 - 3.2.- CARACTERISTICAS DE LAS MUESTRAS
 - 3.3.- PREPARACION DE LAS MUESTRAS
- 4.- TÉCNICAS Y MÉTODOS
 - 4.1.- EXTRACCION DE LOS PESTICIDAS
 - 4.1.1.- En aguas
 - 4.1.2.- En moluscos
 - 4.2.- PURIFICACION DEL EXTRACTO
 - 4.2.1.- Preparación del florisil y procedimiento de alúmina según el método de Mills.



- 4.2.2.- Modificaciones ensayadas.
- 4.2.3.- Método seguido
- 4.2.4.- Estudio de la recuperación de una solución patrón
- 4.3. ANALISIS POR CROMATOGRAFIA DE GASES
 - 4.3.1.- Características del aparato y condiciones de trabajo.
 - 4.3.2.- Técnica de inyección y limpieza de la jeringa
 - 4.3.3.- Análisis cualitativo
 - 4.3.3.1.- Tiempo de retención
 - 4.3.3.2.- Empleo de la columna de florisil
 - 4.3.3.3.- Determinación del p-Valor
 - 4.3.3.4.- Pruebas químicas;
 - a).- Tratamiento alcalino
 - b).- Tratamiento con ácido crómico
 - 4.3.3.5.- Uso de otros detectores
 - 4.3.3.6.- Estudio de los policlorobifenilos
 - 4.3.3.7.- Otras técnicas
 - 4.3.3.8.- Estudio de los cromatogramas de las muestras:
 - a).- Aguas de río
 - b).- Aguas de mar
 - c).- Moluscos



- 4.3.4.- Análisis cuantitativo.
- 4.3.4.1.- Margen del detector donde la respuesta es lineal y curvas de calibrado
- 4.3.4.2.- Límites de detección
- 5.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

- IV.- CONCLUSIONES

- V.- BIBLIOGRAFIA



0.- ABREVIATURAS

- DDE: diclorodifenil dicloroetileno.
DDT: diclorodifenil tricloroetano.
HCH: hexacloro-ciclohexano.
PCB: policlorobifenilos.
- ECD: detector de captura de electrones.
FID: detector de ionización de llama de hidrógeno.
KClTID: detector termoiónico de cloruro potásico.
- DC-200: polidimetilsiloxano, silicona no polar.
QF-1: Polifluoruro/propilmetilsiloxano, silicona fluora-
da semipolar.
HMDS: hexametildisilozano.
- S.E.O.: Sociedad Española del Oxígeno.
F.D.A.: Food and Drug Administration.
- ND: no detectable.
NM: no medible.
- ppm: partes por millón.
ppb: partes por mil millones.



I.- INTRODUCCION

En los últimos años el Departamento de Bromatología-Toxicología y Análisis Químico Aplicado de la Facultad de Farmacia de Santiago, se viene preocupando de diferentes aspectos que plantea la utilización de pesticidas (1, 2, 3, 4).

La existencia de residuos se ha comprobado en los lugares más distantes de la civilización y ya es conocido de todos la presencia de DDT en la grasa de los pingüinos de la Antártida donde este producto no ha sido empleado, lo que hace pensar en una contaminación ambiental, hecho alarmante por las consecuencias que puedan derivarse.

La importancia y trascendencia de estos problemas es tal, que existen numerosos libros y revistas especializadas solamente dedicados al tema (*Pesticides Monitoring Journal, Residue Reviews, Pesticides Plant Growth Regulators and food Additives, etc.*) y además es motivo de preocupación constante de organizaciones mundiales como la FAO y la OMS.

Estos organismos se encargan de elaborar informes anuales sobre el peligro de dichos residuos, dando límites máximos de ingestión diaria para algunos de ellos, y recomendando particularmente estudios para disponer de más datos (5).

Otra prueba de su importancia es que en algunos países, como los Estados Unidos, se lleva a cabo un programa de determinación de residuos de pesticidas a nivel nacional (*National Pesticide Monitoring Program*) en el que participan conjuntamente varios Laboratorios bajo la dirección de comités especiales y cuyos métodos analíticos aparecen recogidos en los vols. I y II de *Pesticides Analytical Manual* de la FDA (6).

Podríamos enfocar el problema de todos estos contaminantes atendiendo a las siguientes facetas:

1).- Presencia en el agua;

Los pesticidas se encuentran en el mundo acuático a veces debido a aplicaciones directas, lo que explicaría la concentración masiva en algunos lagos y pantanos; accidentales como el caso del Erkowit (4); otras, al movimiento de especies dentro de áreas contaminadas; en ocasiones, al transporte por el aire; y, las más de las veces, debido a los arrastres de los terrenos de cultivo que los vienten a los rios y arroyos, y de aquí al mar.

El mayor potencial de contaminación, como es lógico, resulta de su uso en agricultura, por lo que en algunos países, la aplicación de pesticidas está bajo el escrutinio de Comités Oficiales, cuyo principal objetivo es asegurarse de la necesidad de la aplicación y de la adecuada elección del producto, teniendo en cuenta su toxicidad,

persistencia y el habitat en que van a ser utilizados.

Los policlorobifenilos, proceden de vertidos industriales diversos y ello hace que igualmente se encuentren en el mar.

El amplio uso de los policlorobifenilos está relacionado con sus propiedades eléctricas. Se emplean como fluídos aislantes en transformadores y condensadores y también para impregnar algodón y asbesto de cables eléctricos.

Por otra parte, se utilizan en la industria de tintas, ceras, adhesivos sintéticos, en formulaciones de pesticidas para disminuir su vaporización y aumentar por tanto su vida, etc. Se ha visto que incrementan las propiedades insecticidas del DDT (7) y se ha señalado la posible transformación del DDT en policlorobifenilos (8).

2).- Toxicidad:

En el efecto nocivo de estos productos sobre un determinado ser vivo, podemos distinguir: una *acción directa* en sus dos vertientes de toxicidad aguda y crónica, sea esta por acumulación del producto tóxico o simplemente de su efecto; y *otra indirecta*, como consecuencia de que estos residuos pueden destruir especies que le sirven de alimento.

En este último sentido, es de gran importancia el fuerte choque creado al eliminar competidores (las especies más sensibles al tóxico), lo que da lugar a la apari-

ción de nuevas poblaciones dominantes, cambiando así la ecología del medio, de un modo que podemos suponer irreversible.

La toxicidad de estos residuos a los diferentes organismos marinos viene condicionada, como para otros seres, por infinidad de factores: tamaño, superficie, etc. y puede darse el caso de que una sustancia no resulte tóxica para una determinada especie y sin embargo, dada su liposolubilidad se almacene, sin peligro para su vida, con lo que estos organismos se convierten en materiales potencialmente peligrosos para animales que los utilizan en su alimentación, o para el hombre que, de esta manera, ingiere una fuerte dosis.

Se han efectuado numerosos estudios sobre la toxicidad aguda de pesticidas en animales de laboratorio y los resultados encontrados pueden verse en la obra de ZWEIG (9). En estos últimos años se han estudiado también los policlorobifenilos (10, 11, 12). Sin embargo, como contaminantes es más interesante su toxicidad crónica.

Con relación a los policlorobifenilos BITMAN y col. (13) señalan que cuando el porcentaje de cloro es superior al 48%, presentan actividad estrógena.

RISEBROUGH y col. (14) consideran a los policlorobifenilos responsables de ciertas aberraciones del metabolismo del calcio observados en algunos pájaros y son generalmente considerados como una amenaza más seria que el DDT para la extinción de algunas aves.

3).- Persistencia:

En general, estas sustancias presentan grandes diferencias con los productos naturales que las bacterias y otros organismos pueden descomponer con facilidad, permaneciendo en el medio ambiente durante largo tiempo. Se ha podido comprobar que algas, hongos y bacterias metabolizan rápidamente a los pesticidas fosforados, siendo más resistentes los organoclorados (15) y mucho más los llamados PCB, que, como hemos tenido ocasión de comprobar, incluso resisten a tratamientos con ácidos o bases (vease más adelante). La posibilidad y facilidad de su hidrólisis en el agua, varía notablemente de unos a otros, influyendo, además de su constitución química, el pH, la temperatura del medio, flora, fauna, etc.

Otro aspecto interesante a considerar, es el hecho de que los microorganismos, como otros seres vivos, pueden metabolizarlos dando lugar a productos inócuos o, por el contrario, elaborar sustancias tanto o más peligrosas que las originales. En el caso del DDT, uno de los clorados más estudiados, parecen posibles dos rutas de metabolización: una *aerobia*, con formación de DDE, y otra *anaerobia*, con transformación en TDE; ambos metabolitos también tóxicos.

4).- Concentración biológica:

Admitiendo al hombre como último eslabón de las distintas *cadena*s alimentarias, tiene interés considerar la

gran capacidad de acumulación de estos contaminantes por los seres vivos que, aunque se encuentren en concentraciones muy bajas en el agua, no existe garantía de seguridad; cada *eslabón* puede concentrar dichos residuos y de otra parte cooperar al total de la ingestión diaria.

Este aspecto de la concentración biológica ha sido estudiado por numerosos autores. Así en 1.966 HICKEY y col. (16) encuentran que, en la especie *Pantoporeia* (crustáceo acuático que sirve de alimento de pescados y aves del lago Michigán), el nivel de residuos de DDT era 50 veces superior al encontrado en el fango que le rodea, y los patos y pescados de este lago contenían del orden de 15 y 10 veces la concentración encontrada en *Pantoporeia*, respectivamente.

BUTLER (1.966) en experiencias de laboratorio bajo condiciones controladas, mantiene ostras a concentraciones de 1 a 2 ppb (ppb = $\mu\text{gr./Kg.}$) de pp'-DDT a 30°C y observa que tanto su comportamiento como su desarrollo eran similares a los del grupo de control, aún cuando en sus tejidos se alcanzaron cifras del orden de 25 ppm (25.000 ppb), al cabo de una semana. Realizada la disección de ostras, se pudo comprobar que el 67% del tóxico aparecía en el tracto intestinal, glándulas digestivas y gónadas, siendo la de los gametos la concentración máxima (17).

En un estudio posterior BUTLER (1.967) señala que aplicando DDT directamente al agua en cantidad de 1 ppb es absorbido por los seres que en ella viven. El plancton

concentra hasta 70,0 ppb, en los pescados se llega a 15000 ppb (15 ppm), y hasta 800.000 ppb (800 ppm) en esperma de ballena (18).

Empleando cultivos de algas y soluciones de DDT y Paration, Gregory y col. (1.966) han puesto de manifiesto la gran capacidad de concentración de todas ellas, aunque en diferente grado para cada especie (19).

La ostra *Crassostrea virginica*, ha sido usada por BUTLER (1.969) como indicador de la contaminación, porque es capaz de concentrar hasta 70.000 veces los pesticidas encontrados en el agua que la rodea, en poco más de un mes (20).

Por nuestra parte, con ocasión del naufragio del Er kowit en aguas de la bahía de La Coruña, hemos tenido ocasión de comprobar que el mejillón *Mytilus edulis* es capaz de concentrar, en pocos días, mil veces del Dieldrín que existe en el agua (4).

5).- Interés comercial y sanitario:

Desde el punto de vista económico es de gran importancia, la protección de las especies de moluscos que se cultivan con fines comerciales y de aquellas especies marinas que constituyen la riqueza natural de una determinada región.

LOOSANOFF (21) mediante estudios realizados en 1947 llega a la conclusión de que ciertos parásitos y competido

res de las ostras se podrían eliminar con soluciones de DDT en Keroseno, siendo utilizado este método en Inglaterra para proteger dicho molusco del *Elminius modestus* introducido accidentalmente en Europa durante la Segunda Guerra Mundial.

Dies años más tarde el mismo autor (22) sugiere el empleo de pesticidas para eliminar el copépodo *Mytilicola* peligroso parásito interno del mejillón (*Mytilus edulis*) y de la ostra europea (*Ostrea edulis*).

Sin embargo, aún cuando los pesticidas pueden eliminar algunas especies indeseables, también afectan al normal desarrollo de las especies comerciales. En Japón los plaguicidas causaron la muerte en gran escala de camarones en 1.953 y de almejas en 1.962 (23).

DAVIS (1.961) estudia los efectos de 31 compuestos a distintas concentraciones, entre los que figuran algunos insecticidas, herbicidas, solventes orgánicos y bacteriostáticos, sobre la supervivencia y crecimiento de larvas de ostra (*Crassostrea virginica*) y almeja (*Mercenaria mercenaria*), observando que DDT y Lindano afectan a las larvas de estos bivalvos aunque en distinto grado; en el caso concreto de las larvas de ostras, señala que mueren, en un 90% en 14 días, mantenidas a concentraciones de 50 ppb (0,05 ppm) de DDT, en agua de mar (24).

Algunos años más tarde BUTLER y SPRINGER (1.964) en ensayos con ostras, almejas y mejillones adultos, observan que los pesticidas más tóxicos son los hidrocarburos clorados ya que, a concentraciones de 0,007-0,05 ppm

interfieren en el normal desarrollo de la concha. Por otra parte, comprobaron que camarones adultos de especies comerciales morían o se paralizaban al ser sometidos a nivel de 0,3-0,4 ppb de heptaclor, endrín y lindano, y efectos similares se obtenían para toxafeno, clordano y DDT a concentraciones de 1,5 ppb (25).

BURDICK y col. (1.964) relacionan el fracaso de la reproducción de la trucha, en los lagos de New York y la mortandad de las crías del salmón, con la presencia de pp'-DDT en los huevos (26).

En 1.965 BUTLER establece que los camarones y cangrejos son tan sensibles que expuestos a 0,2 ppb de DDT durante 20 días, mueren en un 100% (27).

Prosiguen los estudios en este campo y en 1.966 BUTLER indica que las ostras mantenidas a 1-2 ppb de pp'-DDT se desarrollaban normalmente, pero el 50% del zooplancton moría en unos días (17). Aumentando el nivel de pp'-DDT observa que a concentraciones de 7-10 ppb hay una inhibición en la formación normal de la concha de las ostras de un 50% (28) mientras que a concentraciones de 0,1 a 1,0 ppm producen en la ostra movimientos espasmódicos, obligándole a permanecer cerradas (17).

WURSTER (1.968) comprueba que 10 ppb de DDT en aguas, impiden la fotosíntesis de las algas unicelulares, dato a considerar teniendo en cuenta que el fitoplancton es el primer eslabón de las cadenas tróficas de los seres marinos y que, aunque no sea soluble en el agua a esas concentraciones, puede alcanzarla depositándose en capas

de petróleo (29).

La ausencia de residuos de pesticidas clorados en camarones y otras especies de crustáceos cultivados en zonas contaminadas, se debe según BUTLER (1.968) a que dada su alta sensibilidad, estos animales mueren a concentraciones muy bajas, sin haber tenido tiempo prácticamente de metabolizar los pesticidas y almacenarlos en sus tejidos (30).

El mismo investigador (BUTLER 1.973) somete la ostra (*Crassostrea virginica*) a distintos niveles de pesticidas, añadidos por un sistema de *agua fortificada*. Los resultados indican que las ostras son capaces de detectar niveles de DDT tan bajos como 0,001 ppb (equivalente a 1 ngr/Kg.) acumulándolos sin trastornos aparentes hasta 150 ppm en sus tejidos, aún cuando cantidades de 0,1 ppm en el agua pueden causar su muerte (31).

Respecto a los PCB han sido puestos de manifiesto por primera vez en 1.966 por JENSEN (32) en los tejidos de lucios y otros pescados de diferentes partes de Suecia.

RISEBROUGHT y col. (1.968) consideran que DDE y políclorobifenilos son los polulantes aromáticos clorados más abundantes en el medio ambiente (14). También han sido encontrados en el tejido adiposo humano (33) y leche humana (34) y en alimentos como margarina, aceites vegetales y sobre todo en pescados (35).

Por todo lo expuesto, consideramos de gran interés establecer el nivel alcanzado por estos contaminantes en

aguas y moluscos de la Ría de Arosa y su evolución a lo largo del año 1.973.

Es el primer trabajo de este tipo llevado a cabo en Galicia y su interés lo respalda la elevada producción marisquera y pesquera de la Ría.

Por último quisiéramos recordar que los residuos de los contaminantes aquí estudiados, no se eliminan en la depuración bacteriana obligada para los moluscos.

Además, hemos tenido ocasión de comprobar con motivo del desastre causado por el Erkowit en aguas de la Ría de La Coruña que se necesitan dos meses para que un valor de 7 ppm de dieldrín baje a 0,7 ppm.

Estos residuos, tampoco son destruídos, ni en las preparaciones culinarias, ni en la esterilización industrial, por lo que sus conservas podrian ser rechazadas por los países en los que se hace este control. No sería desacertado el que la Administración lo exigiera, al igual que se hace en la actualidad con residuos de Mercurio (B.O.E. 14 de Abril de 1.973 - 5712 , Resolución de la Dirección General de Sanidad).

II.- REVISION BIBLIOGRAFICA

En la determinación de pesticidas y PCB se han aplicado muy diversos métodos. En general el procedimiento más seguido, suele ser el análisis mediante cromatografía de gases que a su vez lleva implícito las siguientes etapas:

- Extracción
- Purificación
- Análisis propiamente dicho.

De ellas haremos una breve revisión histórica aludiendo preferentemente a trabajos aplicados en alimentos marinos con bajo contenido en grasa, ya que este es el caso de algunas muestras que hemos utilizado.

1.- EXTRACCION.-

Algunos disolventes y métodos empleados en la extracción de residuos se relacionan a continuación:

GOODWIN y col. (36) proponen un método de extracción de pesticidas con acetona, seguido de una partición con hexano.

CASSIL (37) utiliza una mezcla de benceno/isopropanol (2:1, v/v) en la proporción de 3 ml. de esta mezcla

por cada gramo de muestra, y trata el líquido extractivo con agua a fin de separar el isopropanol. La recuperación para tedi6n, tiodan, DDT y DDD obtenida fué de $90 \pm 10\%$.

GUTENMANN y LISK (38) emplean acetona y al líquido filtrado, añaden Skellesolve B y soluci6n de SO_4Na_2 al 2% para separar la capa orgánica que utilizan en el análisis.

SCHWARTZ y col. (39) determinan 1,2,3,4, tetraclo-ro-benceno en almejas y ostras, empleando SO_4Na_2 anhidro como agente deshidratante y extraen en Soxhlet con varias porciones de n-hexano/isopropanol 1:1.

MILLS y col. (40) hacen la extracci6n para análisis rutinarios de organoclorados en alimentos no grasos por agitaci6n con acetonitrilo, seguido de purificaci6n en columna.

ONLEY, J.H. (41) modifica el método de MILLS realizando la extracci6n de pesticidas con acetonitrilo seguida de una partici6n con eter de petróleo.

Dicho procedimiento es aplicado por numerosos autores, como FREDEEN y DUFFY(42) que en 1.970 lo emplean para el análisis de pesticidas organoclorados en moluscos y fango marino y en general por la FDA, en los métodos oficiales franceses, etc. y ha sido utilizado en nuestro trabajo como más adelante veremos por lo que se comentará con detalle.

NELSON (43) indica que algunos pesticidas fosforados pueden ser extraídos por el método de MILLS y col. (40).

LICHTENSTEIN y col. (44) proponen un método de extracción con mezcla de hexano-acetona que es utilizado por MOUBRY y col. (45) para la determinación de residuos clorados en sedimentos marinos.

PENNELL y col. (46), una vez homogenizadas las muestras con sulfato sódico, extraen con acetona, evaporan a sequedad y disuelven el extracto en éter de petróleo.

COAKLEY y col. (47) hacen la extracción del herbicida 2,4-D por agitación con hidróxido sódico 6 N en muestras de ostras, mejillones, almejas, camarones y pescado previamente congelados, pasando los líquidos extractivos a una ampolla que contiene agua, ajustan a pH 2 y tratan con benceno.

LAMAR y col. (48) extraen pesticidas organoclorados de agua, por tratamiento con 3 porciones de hexano con lo que obtienen una recuperación de 80 á 115%.

BERTUZZI y col. (49) señalan que la extracción con acetonitrilo (Mills y col. 1.963) no es adecuada si las muestras están deshidratadas; sin embargo, se puede usar en estos casos una mezcla agua/acetonitrilo al 35% en volumen.

En este mismo año, BURKE y PORTER (50) encuentran una relación directa entre la humedad de la muestra y la eficacia de la extracción con acetonitrilo.

WELLS (51) estudia la recuperación conseguida con los métodos de la FDA para alimentos grasos y no grasos.

WILDERMAN y col. (52) realizan la extracción de DDT con mezcla de isopropanol-hexano (1 + 2) obteniendo una recuperación de 92-97% y mediante el procedimiento de agua/acetoneitrilo al 35% análogos resultados, si bien recomiendan este segundo.

En 1.969 WESSEL (53) destaca el mayor rendimiento obtenido en la extracción con acetoneitrilo propuesta por MILLS y col. (40) frente a los procedimientos que utilizan cloroformo-metanol en Soxhlet (MUMMA y col. (54)).

El Federal Water Pollution Control Administration (U.S. Department of the Interior), para determinar pesticidas en aguas, realiza la extracción con una mezcla eter sulfúrico-hexano (15:85 v/v) utilizando SO_4Na_2 como deshidratante (55).

MARSTON y col. (56) logran detectar 0,04 ppb de endrín en agua haciendo la extracción con la mezcla de eter etílico-eter de petróleo (1:1) evaporando a sequedad y disolviendo el extracto en benceno.

PORTER y col. (57) proponen un método para la determinación de pesticidas en pescados consistente en la extracción de la grasa con eter de petróleo a partir de la muestra deshidratada, seguida de partición con acetoneitrilo y purificación en columna de florisil. Hacen un estudio comparativo entre este método y el que realiza la extracción exhaustiva en Soxhlet, mediante cloroformo-metanol encontrando resultados equivalentes. Este procedimiento es utilizado muy frecuentemente por los investigadores del *Natio*

nal Monitoring Pesticide Program para la determinación de residuos en pescados y moluscos.

STORHERR y col. (58) proponen un método general para la determinación de residuos de pesticidas fosforados en alimentos no grasos, muy similar al de la FDA para clorados y que consiste en la extracción con acetonitrilo, seguido de purificación en columna de carbón y análisis gas-cromatográfico con detector alcalino (CIK) de llama.

Los PCB por sus parecidas propiedades a los pesticidas organoclorados son extraídos conjuntamente.

2.- PURIFICACION DEL EXTRACTO.-

Después de extraídos pesticidas y policlorobifenilos, antes de su análisis gas cromatográfico es necesario, generalmente, someter el extracto a una purificación.

JONES y RIDDICK (59) y BURCHFIELD y STORRRS(60) proponen como técnica de purificación, la partición entre dos disolventes no miscibles.

Con el fin de separar impurezas del extracto se puede utilizar la cromatografía en capa fina. Sin embargo, en los últimos años se ha generalizado el uso de la cromatografía en columna, precedida en algunos casos de una partición entre dos disolventes de distinta polaridad.

Atendiendo a la naturaleza de la fase estacionaria en la técnica de purificación en columna podemos establecer los siguientes apartados:

2.1.- Columnas de alúmina:

LAWS y WEBLEY (61) después de la extracción de organofosforados con diclorometano someten el extracto a una cromatografía en columna, empleando alúmina de grado V (*) y eluyen primero con eter de petróleo y después con mezcla eter etílico/eter de petróleo al 15%, logrando una simple separación según su polaridad.

DE FAUBERT - MAUNDER y col. (63) purifican extractos de residuos procedentes de tejidos animales mediante partición hexano/dimetilformamida, seguido de cromatografía en columna de alúmina calentada previamente a 80°C durante cuatro horas y a la que habian añadido 15% de agua.

EGAN y col. (64) utilizan alúmina de grados II y III para purificar residuos de organofosforados.

HAMENCE y col. (65) encuentran resultados satisfactorios para residuos de organoclorados y organofosforados empleando alúmina de grado V.

BOYLE y col. (66) someten los extracto de peces en venenados a la partición hexano/acetonitrilo y cromatografía en columna de alúmina para su posterior análisis por cromatografía de gases y espectrofotometría de IR.

(*) NOTA: *Los grados de alúmina se equivalen a los siguientes % de agua: (62).*

% de agua agregada	Grado de actividad (Brockmann y Scholder)	Indice de azobenceno 10^{-5} mol/gr.
0	I	26
3	II	21
6	III	18
10	IV	13
15	V	0

2.2.- Columnas de sílice:

Las columnas de sílica-gel son también usadas con alguna frecuencia en la separación de pesticidas.

BREWERTON y McGRATH (67) usan columnas de sílica-gel no activado en análisis de rutina de residuos organoclorados cuyos extractos han sido sometidos a una partición acetoneitrilo/hexano. La elución la efectúan con eter de petróleo y mezcla de eter-etílico/eter de petróleo al 3%.

KADOUM, A.M. (68) utiliza sílica-gel para extractos que contienen DDT, HCHm metoxiclor, clordano, tioldan, etc.

2.3.- Columnas de carbón:

LAWS y WEBLEY (69) emplean columnas de carbón para organofosforados solubles en agua usando como eluyente

cloroformo.

GETZ (70) pone Norit A entre dos placas de sílica-gel para purificar extractos. El carbón es lavado con ácido y con agua y activado durante 48 horas a 130°C. La elución la realiza con 25% de cloroformo en acetato de etilo encontrando una recuperación satisfactoria para varios pesticidas fosforados.

WATSS y col. (71) extraen residuos organofosforados con acetato de etilo y purifican mediante columna de carbón activo.

2.4.- Columnas de Magnesia:

Su actividad es menor que la de la alúmina y también se puede modificar por adición de diferentes cantidades de agua como señala BROCKMANN (72) para conseguir tres grados de actividad diferente.

FAHEY y col. (73) usan columna de magnesia-celita en el análisis de extracto de suelos.

EGAN y col. (64) señalan que la dificultad de elución de malatión sobre alúmina se salva usando magnesia.

2.5.- Columnas de Florisil:

Son muchos los autores que se han ocupado de poner a punto la técnica de purificación con este material intencionalmente.

tando encontrar las condiciones más favorables.

ORDAS y col. (74) usan la columna florisil para privar de grasas y ceras a diversos extractos conteniendo residuos de heptaclor y clordano.

LICHTENSTEIN y SCHULZ(75) utilizan el florisil en el análisis de aldrín y dieldrín, eluyendo primero con hexano y después con una mezcla al 25% de benceno en n-hexano.

MILLS (76) aplica la cromatografía en columna de florisil en análisis de DDT, lindano, metoxiclor, toxafeno, pertano, clordano, heptaclor y heptaclor epóxido utilizando como eluyente eter etílico/eter de petróleo (6:94).

McKINLEY y MAHON (77) usan el mismo método, pero realizando antes una partición con los líquidos extractivos.

En 1.961, MODDES estudia la normalización de este adsorbente y distintas formas de actividad así como la posibilidad de su recuperación para usarlo de nuevo (78).

JOHNSON (79) utiliza la misma técnica que MILLS y señala que compuestos como el dieldrín podrian eluirse con una mezcla de eter etílico/eter de petróleo al 15%. Así mismo, comprueba que la presencia de impurezas en el eter etílico afecta seriamente a los pesticidas eluidos.

MILLS y col. (40) teniendo en cuenta los trabajos realizados por otros autores, modifican ligeramente su procedimiento; lo aplican al estudio de extractos de diversos

materiales con un máximo de 2% de grasa, y concluyen que pueden ser recuperados hasta 21 pesticidas organoclorados recogidos en dos eluatos de 6 y 15% de eter etílico en eter de petróleo, respectivamente.

MOATS (80) utiliza florisil parcialmente desactivado por adición de 5% de agua y eluye con mezcla de cloruro de metilo/eter de petróleo al 15-20% (v/v).

LANGLOIS y col. (81) emplean también este procedimiento para alimentos de origen animal y comprueban que reduciendo la cantidad de florisil en la columna, se podría también reducir el volumen del eluyente.

ONLEY (41) ensaya para la elución de pesticidas en columna de florisil mezclas de eter etílico/eter de petróleo al 12%, al 5% y dioxano/eter de petróleo al 0,4% (v/v).

BURKE y MALONE (82) estudian los efectos de la temperatura y el tiempo de calcinación sobre la capacidad de retención del florisil.

PORTER y col. (83) señalan que la presencia de acetoneitrilo podría ser la causa de una baja recuperación de organoclorados. Por ello, proponen la distribución entre acetoneitrilo/eter de petróleo, antes de la purificación con florisil.

WESSEL (84) demuestra que algunos pesticidas fosforados pueden ser eluidos del florisil con mezcla eter etílico/eter de petróleo al 50%, como ya anteriormente han señalado investigadores de la FDA.

MILLS (85) indica que la causa principal de las diferencias de poder adsorbente entre los distintos lotes de florisil es el contenido en sulfato sódico y propone un procedimiento para medir la capacidad de adsorción del florisil utilizando ácido láurico.

WIENCKE y BURKE (86) y GAUL (87) llegan a la conclusión de que los peróxidos que pueda contener el eter etílico, oxidan a los pesticidas fosforados sobre todo el carbofenotión durante la concentración de los eluatos.

HALL (88) estudia las variaciones de la capacidad de adsorción de 10 lotes de florisil comercial activados por distintos métodos y obtiene recuperación para 10 pesticidas clorados y 6 fosforados, utilizando el método del ácido láurico propuesto por MILLS para calcular la cantidad de florisil a colocar en la columna.

En general los estudios realizados con este adsorbente ha puesto de manifiesto que es excelente para organoclorados mientras que las columnas de carbón son más indicadas para organofosforados.

3.- ANALISIS CUALITATIVO.-

En el análisis mediante cromatografía gas-líquido muchas sustancias naturales y otro tipo de contaminantes pueden presentar respuesta similar a los pesticidas y a los PCB, lo que obliga a emplear técnicas de identificación y/o confirmación muy diversas.

GODDWIN y col. (36) manifiestan que existe una impureza natural que puede interferir con el aldrín.

JENSEN (32) señala que los contaminantes industriales englobados como policlorobifenilos incluyen sustancias con tiempo de retención igual o muy próximo a la mayoría de los pesticidas clorados.

HOLMES y col. (89) y HOLDEN y MARSDEN (90) en Gran Bretaña y KOEMAN y col. (91) en los Países Bajos comprueban la presencia de policlorobifenilos en muestras de origen marino.

RISEBROUGHT y col. (14) señalan la amplia distribución en el medio ambiente de estos últimos contaminantes.

Por todo ello en la detección de pesticidas por cromatografía de gases, aparte de la utilización de columnas de distintas naturaleza, se han puesto a punto otras pruebas que permiten la confirmación de residuos a nivel de nanogramo entre las que merece la pena destacar:

3.1.- Pruebas químicas:

Desde los primeros tiempos de utilización de la cromatografía gaseosa, se han venido usando diferentes reacciones químicas, antes y después de un análisis para comprobar la naturaleza de algún componente.

En este aspecto HAMENCE y col. (65) muestran el gran valor que tiene la modificación del tiempo de reten-

ción, por reacción con cloro, para identificar un plaguicida, así como para separarlo de interferencias coincidentes. Por este método obtienen un derivado del aldrín, eliminando así la interferencia con la impureza natural mencionada por Goodwin y col. (36).

KLEIN y WATS (92) y DUFFY y WONG (93) confirman la presencia de pesticidas del grupo del DDT tras su reacción con NaOH.

JENSEN y WIDMARK (94) señalan la inercia de los policlorobifenilos frente a la fácil nitración de la mayoría de los pesticidas halogenados, que como consecuencia no dan respuesta después de la nitración. Entre nosotros BALUJA (95) emplea este procedimiento para la identificación de PCB. La Food and Drug Administration utiliza para la confirmación de residuos de DDT en presencia de policlorobifenilos, el tratamiento del extracto con KOH alcohólica que produce la transformación de pp'-DDT en pp'-DDE y no altera los PCB (96).

NOREN (97) convierte el aldrín en dieldrín y determina este por cromatografía de gases.

HALLER y col. (98) comprueban la oxidación de DDE a diclorobenzofenona y más tarde MILES (99) realizando la oxidación con ácido crómico confirma la existencia de DDE en presencia de policlorobifenilos.

3.2.- Separación de pesticidas clorados y PCB:

REYNOLDS (100) afirma que algunos pesticidas no son nitrables (lindano, toxafeno, etc.) y por otra parte los derivados nitrados obtenidos pueden interferir con los pesticidas, especialmente con el grupo del DDT, por lo que, propone para el análisis de extractos con PCB y plaguicidas el uso de la columna de florisil eluyendo los primeros con n-hexano y los segundos con mezcla de eter/hexano.

Sin embargo heptaclor, aldrín y pp'-DDE eluyen con los policlorobifenilos.

ARMOUR y BURKE (101) proponen un método para separar pesticidas y PCB, mediante columna de ácido silícico aplicada al primer eluato obtenido de la purificación de la columna de florisil.

LEONI (102), sin embargo, emplea la cromatografía fraccionada en columna de silica-gel y comprueba que los PCB son eluidos en las fracciones 3^a a la 9^a, en tanto que el pp'-DDE eluye en su mayor cantidad en la 3^a y 4^a y el op'-DDT y pp'-DDT aparecen de la 4^a a la 9^a fracción, lo que confirma la gran dificultad que existe para separar los isómeros del DDT y los policlorobifenilos.

SNYDER y REINERT (103) siguen un rápido método para la separación de estas sustancias, utilizando columna de silicagel, que es también empleada por GIAM y col. (104) en el estudio de residuos de ambos contaminantes presentes en muestras de pescados y moluscos del Golfo de Méjico y Mar del Caribe, estimando que es posible la separa-

ción de DDT y policlorobifenilos.

3.3.- Identificación por el p-Valor (razón de distribución entre dos solventes inmiscibles equilibrados):

BEROZA y BOWMAN (105) proponen la determinación del p-Valor para la identificación de sustancias a nivel de nanogramo y señalan su aplicación a los residuos de pesticidas.

En un estudio de BEROZA y col. (106) se comprueba que el p-Valor de los pesticidas clorados varía con la temperatura pero no más de 0,02, por cada 30°C de diferencia.

3.4.- Otras técnicas:

La espectrofotometría de IR es también una técnica auxiliar en la confirmación de resultados que ha sido utilizada junto a la cromatografía en capa fina en nuestro Departamento por CREUS y SAAVEDRA a nivel de formulaciones (107), (108), pero a nivel de residuos aún se encuentran muchas dificultades. La polarografía, algo más limitada en este campo de aplicación también es empleada en ocasiones (109).

4.- METODOS USADOS EN LA VALORACION CUANTITATIVA MEDIANTE CROMATOGRAFIA DE GASES.-

Los parámetros de los diferentes picos obtenidos por cromatografía de gases, permiten conocer la cantidad de cada pesticida, una vez lograda su identificación.

En caso de picos muy agudos, se puede considerar que la altura es proporcional, dentro de un determinado margen a la cantidad de sustancia.

DIMBAT y col. (110) y FREDERICKS (111) entre otros autores señalan que, si bien la medida de la altura es el método más rápido en una determinación cuantitativa, no es el más digno de confianza.

La determinación del área puede hacerse por varios procedimientos, unos manuales y otros mecánicos. Entre aquellos, la triangulación en la que se obtiene el área multiplicando la altura por el ancho a media altura, es el más utilizado en pequeños laboratorios.

Entre los mecánicos la planimetría, el integrador de disco y el integrador electrónico son los más socorridos en grandes departamentos.

Estos diferentes métodos estarán más o menos indicados según la forma de los picos. En general, con buena resolución, separación y picos simétricos suele haber coincidencias. En ocasiones se han utilizado otros procedimientos que conviene recordar:

BARTLET y SMITH (112) proponen como parámetro de

comparación entre el patrón y la muestra el producto del tiempo de retención por la altura del pico. IVERSON (113) compara este método con el de triangulación y lo prefiere en el caso de picos solapados en los que se puede medir la altura del pico que interesa.

DAL NOGARE y JUVET (114) utilizan el procedimiento de recortar el pico y pesarlo. Para aplicar este método es necesario que el papel de registro sea uniforme y cierta destreza en el operador en la etapa de recortado.

BURKE (115) compara áreas obtenidas mediante triangulación e integrador de disco y hallan resultados similares.

BARRY y col. (116) llevan a cabo un estudio comparativo de algunos de estos métodos, no encontrando grandes diferencias, si bien observan que eran ligeramente superiores las obtenidas usando el integrador de disco.

GAUL (117) realiza la determinación cuantitativa de aldrín, heptaclor epóxido y dieldrín por varios de estos métodos y no observan diferencias significativas.

JENNINGS y col. (118) montan un sistema automático para análisis de rutina, con el consiguiente ahorro de tiempo, en el que un integrador va conectado a una computadora.

III.- PARTE EXPERIMENTAL

La cromatografía gaseosa, tan imprescindible en análisis de residuos, frente a la ventaja de permitir una detección múltiple y de alcanzar una gran sensibilidad, como veremos más adelante, tiene el inconveniente de que los reactivos y el material a utilizar deben estar exentos de impurezas a nivel de nanogramo, lo cual obliga a estudiar con detalle este apartado.

1.- REACTIVOS:

Agua: bidestilada en presencia de permanganato potásico en material *todo vidrio*. Este reactivo se extrae con tres porciones de 50 ml. de eter de petróleo purificado, y el extracto, concentrado a unos milímetros, no debe presentar respuesta en el cromatógrafo después de la del disolvente.

Acetonitrilo: *Fluka*, de p.e.=79-82°C.

Eter de petróleo: *CAMPSA*, p.e.=50-70°C, purificado por redestilación usando una columna Snyder de 20 cm. Un volumen de 200 ml. de este eter concentrado hasta 5 mls.,

Columnas para cromatografía gaseosa: de vidrio, de 3 mm. de diámetro interior y 2 m. de longitud, rellenas una con DC-200 al 10% y otra con una mezcla de DC-200 al 10% y QF-1 al 15%, en ambos casos sobre Gas-Chrom Q, de 80-100 mallas.

Microjeringas *Hamilton* de 10 μ l, mod. 701N.

Gases: Nitrógeno N-47, hidrógeno N-48 y aire de la S.E.O.

Registrador de doble canal, *Hitachi Perkin-Elmer*, mod. 196.

Espectrofotómetro de infrarrojos *Perkin-Elmer*, mod. 237, y accesorios para microdiscos de 0,5 y 1,5 mm.

Otro material de uso corriente en un Laboratorio de Investigación.

3.- MUESTRAS:

3.1.- LOCALIZACION:

La Ría de Arosa, de unos 300 Km² de superficie, produce anualmente más de 100.000 toneladas de mejillones en unos 3.800 viveros flotantes, distribuídos recientemente en

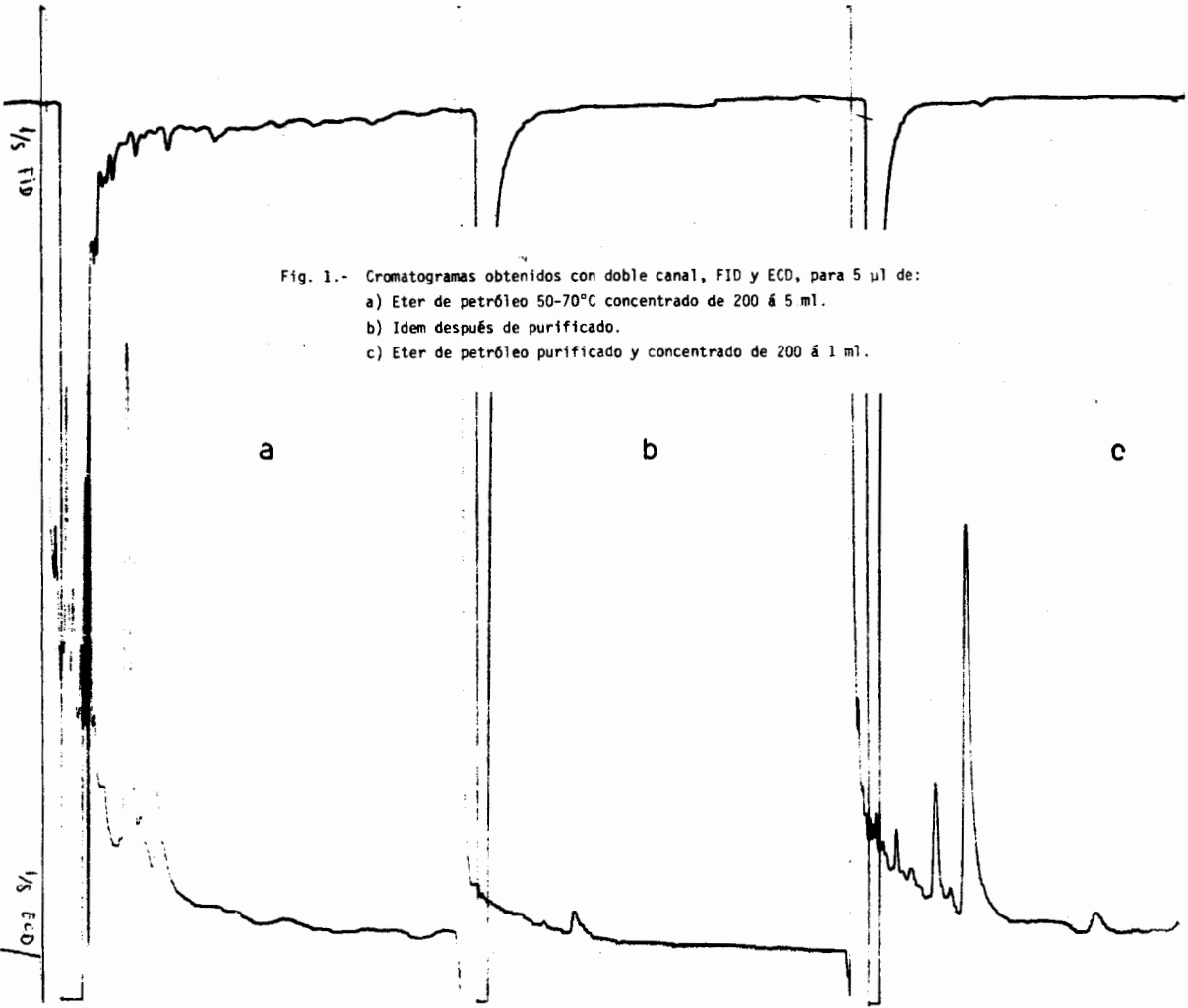


Fig. 1.- Cromatogramas obtenidos con doble canal, FID y ECD, para 5 μ l de:
a) Eter de petr3leo 50-70°C concentrado de 200 3 5 ml.
b) Idem despu3s de purificado.
c) Eter de petr3leo purificado y concentrado de 200 3 1 ml.

CUADRO 1

VILLAGARCIA		CAMBADOS	
A	216	A	128
B	75	B	41
C	17	C	13
D	10	D	32
E	11	E	47
F	100	F	271
G	145	G	234
H	100	H	30
I	65	I	40
CARAMIÑAL		RIVEIRA	
A	46	A	54
B	26	B	146
C	172	C	31
D	89		
E	85	EL GROVE	
F	52	A	135
G	72	B	24
H	54	C	81
I	56	D	84
J	180	E	232
K	129	F	70
L	165	G	130
M	20	H	110
N	12	-----	
Total = viveros 3.830.			



Fig. 2.— MAPA DE LA RIA DE AROSA, CON LA LOCALIZACION DE LOS POLIGONOS DE CULTIVO Y LOS RIOS EN LOS QUE SE HAN TOMADO MUESTRAS.

Por otra parte, nos hemos ocupado personalmente de la recogida de las aguas de los siguientes rios: Pedras, Barbanza, Coroño, Beluso, Ulla, Con, Umia y Dena o Chanca.

3.2.- CARACTERISTICAS DE LAS MUESTRAS:

El agua fué tomada en superficie y se han determinado sus valores de pH y conductividad á 20°C, para conocer su calidad. Estos datos se recogen en los correspondientes Cuadros de resultados.

Los mejillones de más de 7 cms. de tamaño proceden de los viveros flotantes de cada polígono de cultivo.

La localización de los berberechos y almejas utilizados, figura en el cuadro de resultados correspondiente, y su tamaño es superior a 3 cms.

3.3.- PREPARACION DE LAS MUESTRAS:

Aguas: Generalmente no necesitan preparación. Si acaso se han filtrado para privarles de restos vegetales en suspensión.

Moluscos: Se abren con un cuchillo y se les separa de las conchas, dejándolos escurrir en una superficie inclinada durante unos minutos, para pasarlos después a un recipiente en el que se dislaceran con una batidora hasta obtener una muestra lo más homogénea posible. En 10 muestras

de mejillón se ha determinado la humedad y el contenido graso a fin de poder expresar el resultado en materia seca o en materia grasa, según convenga (cuadro 2). Dada la constancia de valores obtenidos no se ha considerado necesario realizarla en todas las restantes. Además, los resultados en residuos se han expresado en materia húmeda, siguiendo las tendencias actuales.

CUADRO 2

<u>Determinaciones</u>	<u>% Agua</u>	<u>% Grasa</u>
1	80,5	1,92
2	80,5	1,95
3	81,1	2,02
4	81,0	1,83
5	81,5	1,94
6	80,5	1,88
7	81,0	2,07
8	80,1	2,02
9	80,0	1,99
10	80,5	1,92
\bar{X}	80,67	1,95
σ	0,46	0,07

4.- TÉCNICAS Y MÉTODOS:

Como se indicó al empezar este capítulo, el uso de la cromatografía de gases es imprescindible en el análisis de residuos. Las ventajas de esta técnica son: la detección múltiple, que permite mediante un solo análisis localizar hasta unos 70 componentes diferentes, y además, mediante el empleo de detectores extremadamente sensibles y casi específicos, es posible confirmar y valorar los residuos en un nivel de nanogramo.

Por nuestra parte, en la cromatografía de gases, hemos utilizado tres detectores diferentes:

- a).- *el de captura de electrones* (ECD, en la literatura inglesa), capaz de poner de manifiesto sustancias con electroafinidad (pesticidas y PCB) en cantidad del orden de picogramos.
- b).- *el de ionización de llama de hidrógeno* (FID), que permite comprobar la identidad de algunas sustancias, ya que este detector necesita microgramos para obtener respuesta, y de encontrarse un componente en un orden de nanogramos tan solo se obtendrá señal en aquel otro detector si es un pesticida o un PCB, lo cual ayuda a su identificación.
- c).- *el termoiónico*, modificación del anterior, casi específico de los pesticidas fosforados, con una sensibilidad para estas sustancias 10.000 veces superior al

de ionización de llama de hidrógeno, y para alguna de ellas 100 veces más sensible que el de captura de electrones (119).

Es de recordar que la cromatografía gaseosa no permite identificar plenamente los componentes separados y además requiere la utilización de algunas operaciones previas por lo que es importante señalar los métodos auxiliares empleados en análisis de residuos.

4.1.- EXTRACCION DE LOS PESTICIDAS Y POLICLOROBIFENILOS:

Para obtener un alto rendimiento en la extracción, se precisa una adecuada elección del disolvente y considerando que en el análisis de residuos se pretende una detección múltiple, debe utilizarse un disolvente capaz de extraer simultáneamente. si fuera posible, la totalidad de residuos, o al menos de aquellos que, por su uso y/o persistencia se encuentren con mayor probabilidad en una determinada muestra.

Otro factor en la elección del disolvente es la naturaleza de la muestra, pues interesa que la extracción sea tal que reduzca al mínimo la presencia de sustancias que puedan interferir en el posterior análisis.

Teniendo en cuenta estas consideraciones hemos seguido los procedimientos siguientes:

4.1.1.- En aguas:

1.000 mls. de agua se extraen con 100 mls. de eter de petróleo purificado; se agita durante dos minutos procurando que no se formen emulsiones (a las aguas de rios que tienen más tendencia a formarlas se les puede añadir 2 mls. de ClH concentrado) y se separa la capa eterea. Se extrae dos veces más con 50 mls. de este disolvente y se reunen los líquidos extractivos en un erlenmeyer. Seguidamente, se trata con unos 10 grs. de sulfato sódico anhidro purificado, para eliminar los restos de agua y por último se concentra a 1-2 mls. en un evaporador-concentrador tipo *Kuderna-Danish* (107).

4.1.2.- En moluscos (en su mayor parte mejillones):

Habida cuenta de su alta proporción en agua y el bajo contenido en grasa de estos moluscos (cuadro 2) la extracción con acetonitrilo resulta muy adecuada, por lo que hemos seguido el método propuesto por la FDA (120) para este tipo de muestras: 100 grs. de la muestra homogeneizada, se tratan con 100 mls. de acetonitrilo, agitándolos mecánicamente durante media hora. Se filtra a través de algodón, pasando el líquido a una ampolla de separación de 1 litro con llave de teflón, que contiene 600 mls. de una disolución de cloruro sódico purificado al 2% (p/v) y 100 mls. de eter de petróleo purificado. La muestra se extrae dos veces más con 50 mls. de acetonitrilo, pasando el filtrado a la misma ampolla; se agita procurando no se formen emulsiones y se separa la capa

eterea de la acuosa. Esta última se trata dos veces más con 50 mls. de eter de petróleo que se unen al anterior y se lava dos veces con 50 mls. de agua bidestilada. Finalmente la disolución etérea deshidratada con unos 20 grs. de sulfato sódico anhidro purificado se concentra a 3-5 mls. en un evaporador tipo Kuderna-Danish.

4.2.- PURIFICACION DEL EXTRACTO:

Esta etapa tiene por objeto, eliminar restos de grasas, ceras, pigmentos, etc. que pueden interferir en el análisis, permitiendo además, fraccionar los residuos de contaminantes en dos grupos atendiendo a su naturaleza.

La purificación no es imprescindible en muestras de agua por carecer en general de muchas de aquellas interferencias, sin embargo, para la identificación de algunos componentes, en ocasiones es conveniente realizarla.

En muestras de moluscos esta operación es obligada ya que, con los pesticidas y PCB se extraen otras sustancias que ocultarian aquellos residuos.

Hemos empleado en nuestro trabajo el método de MILLS (40) seguido también por la FDA (120) y basado en el empleo de florisil.

4.2.1. Preparación del florisil y procedimiento de elución según el método de Mills:

El florisil, de 60-100 mallas, es activado á 180°C durante 48 horas y mantenido después hasta su uso á 130°C. Se prepara una columna de cromatografía, de 20x400 mms. provista de placa filtrante, con 10 cms. de altura de florisil (unos 16 grs.) y 2 cms. de sulfato sódico anhidro purificado (unos 10 grs.). Se impregna con 30 mls. de eter de petróleo y se transfiere a su parte superior el concentrado del líquido extractivo (3-5 mls.). Así mismo, se pasan a la columna las pequeñas porciones de éter de petróleo empleadas en lavar varias veces el tubo que contenía el concentrado de la muestra. Después se eluye con 200 mls. de la mezcla eter etílico/eter de petróleo (6:94), a una velocidad no superior a 5 ml./mn., recogiendo este primer eluato en una vasija de concentración tipo Kuderna-Danish; se cambia la vasija receptor y se eluye con 200 mls. de la mezcla (15-85).

Los eluatos recogidos y concentrados a pocos mls. quedan preparados para ser analizados mediante cromatografía gaseosa.

A veces la purificación del segundo eluato no es suficiente, en cuyo caso se repite esta operación en una nueva columna de florisil.

En este método de purificación es necesario comprobar la actividad de cada lote de florisil. Para ello, es conveniente observar la elución y recuperación de los componentes de una solución patrón constituida por diferentes

pesticidas de ambos eluatos. Por nuestra parte hemos utilizado la disolución:

Lindano	0,02 ppm
Heptaclor	0,02 "
Aldrín	0,04 "
Dieldrín	0,06 "
Endrín	0,06 "

Esta concentración se ha considerado la más conveniente dada la sensibilidad de trabajo seleccionada por el nivel de residuos en las muestras y la conveniencia de inyectar volúmenes comprendidos entre 2 y 8 μ l. Se considera satisfactorio el florisil que permite eluir cuantitativamente lindano, heptaclor y aldrín en el primer eluato y dieldrín y endrín en el segundo (vease más adelante el estudio de la recuperación obtenida para un lote de florisil).

Comprobado el método y a la vista de los buenos resultados obtenidos, lo hemos aplicado a la purificación de las primeras muestras analizadas. Sin embargo, al agotar el florisil de que disponíamos en el Laboratorio, encontramos que el "nuevo florisil" activado y utilizado, como acabamos de describir, no daba buenos resultados ya que en el primer eluato eran arrastrados parte del dieldrín y endrín. Esto nos obligó a ensayar algunas modificaciones del método de Mills utilizados antes por otros autores.

4.2.2.- Modificaciones ensayadas:

- A).- Florisil sometido á 640°C durante dos horas, mantenido otras dos horas á 140°C y enfriado en un desecador al resguardo de la luz.
- B).- Florisil activado como en el método de Mills y desactivado parcialmente por adición de un 3% de agua destilada.
- C).- Florisil activado como en A y parcialmente desactivado por adición de 7% de agua destilada

Estas tres formas de activación del florisil fueron ensayadas en dos columnas de diferente diámetro (20 y 14 mms. respectivamente) y con distinto eluyente:

- a).- Columna de 20 mms. de diámetro, colocando florisil hasta una altura de 10 cms. y 2 cms. de sulfato sódico anhidro. Eluyendo:
- 1.- Con 200 mls. de mezcla eter sulfúrico/eter de petróleo (6:94) y con 200 mls. de mezcla eluyente (15:85), según el método de Mills.
 - 2.- Con 100 mls. de eter de petróleo y con 50 mls. de mezcla eter etílico/eter de petróleo (20:80), según el procedimiento seguido en Francia
- b).- Columna de 14 mms. de diámetro interior, utili-

zando 10 grs. de florisil (12 cm.) y sulfato sódico anhidro en una altura de 2 cms. y eluyendo como en 1 y 2.

4.2.3.- Método seguido:

De todas estas variantes hemos escogido, como método de purificación, el que utiliza florisil activado en la forma descrita en el apartado C, dispuesto en columna de 14 mms. de diámetro y eluyendo la primera fracción con 100 mls. de eter de petróleo y, la segunda con 50 mls. de mezcla eter etílico/eter de petróleo (20:80). De esta manera lo que en un principio obligó a detener los análisis y buscar el procedimiento de purificación más adecuado, resultó ventajoso si consideramos la economía que supone el método seguido en el ahorro de reactivos.

4.2.4.- Estudio de la recuperación de una solución patrón:

Antes de efectuar el estudio de la recuperación se hace necesario el contrastar la técnica de inyección para descartar diferencias por esta causa. Así se ha procedido a determinar las áreas de 10 inyecciones consecutivas de la solución patrón de organoclorados antes mencionada; los valores hallados se han agrupado en el cuadro 3, e igualmente se ha incluido el correspondiente estudio estadístico para cada componente. Como se

PESTICIDAS

Nº Inyección	Lindano 0,1 ngr.	Heptaclor 0,1 ngr.	Aldrín 0,2 ngr.	Dieldrín 0,3 ngr.	Endrín 0,3 ngr.
1ª	1,290	1,358	2,250	3,240	3,264
2ª	1,280	1,358	2,250	3,300	3,232
3ª	1,240	1,351	2,205	3,240	3,264
4ª	1,270	1,358	2,210	3,228	3,264
5ª	1,260	1,333	2,205	3,225	3,264
6ª	1,260	1,358	2,205	3,225	3,248
7ª	1,260	1,341	2,205	3,195	3,216
8ª	1,250	1,344	2,196	3,210	3,232
9ª	1,250	1,330	2,192	3,195	3,216
10ª	1,250	1,338	2,192	3,210	3,264
\bar{x}	1,261	1,346	2,211	3,226	3,246
σ	0,015	0,011	0,021	0,030	0,020
Coefficiente de variación %	1,19	0,81	0,95	0,93	0,61
Amplitud	1,24-1,29	1,33-1,35	2,19-2,25	3,19-3,30	3,21-3,26

CUADRO 3.- "Areas" medidas para Lindano, Heptaclor, Aldrín, Dieldrín y Endrín y su estudio estadístico.

de observarse la precisión alcanzada en la técnica de inyección es muy grande y de un orden parecido para todos los componentes, siendo muy próximo a 1 su coeficiente de variación por 100.

Sometida dicha solución patrón al método de purificación escogido se han obtenido los eluatos que, inyectados otras 10 veces cada uno, y determinando las áreas resultantes (cuadro 4) permite poner de manifiesto de nuevo, tras su estudio estadístico, la elevada precisión en la inyección y posibilitan calcular el % de recuperación, por la relación encontrada después y antes de la elución referida a 100 (cuadro 4).

4.3.- ANALISIS POR CROMATOGRAFIA DE GASES:

Finalmente, el análisis propiamente dicho se ha efectuado mediante cromatografía gaseosa y en este sentido interesa conocer:

4.3.1.- Características del aparato y condiciones de trabajo:

En el presente estudio se ha empleado un Cromatógrafo Perkin-Elmer, modelo F-11, provisto de dos detectores uno de captura de electrones (ECD) de electrodo concéntrico con fuente radiactiva de Ni-63 y otro detector de ionización de llama de hidrógeno (FID), convertible fácil-

PESTICIDAS

N° Inyección	1 ^{er} eluato			2° eluato	
	Lindano 0,1 ngr.	Heptaclor 0,1 ngr.	Aldrín 0,2 ngr.	Dieldrín 0,3 ngr.	Endrín 0,3 ngr.
1 ^a	1,260	1,320	2,106	3,161	3,264
2 ^a	1,230	1,320	2,088	3,161	3,200
3 ^a	1,260	1,335	2,106	3,161	3,264
4 ^a	1,230	1,305	2,070	3,161	3,232
5 ^a	1,232	1,290	2,052	3,132	3,248
6 ^a	1,210	1,290	2,043	3,146	3,248
7 ^a	1,240	1,327	2,079	3,132	3,200
8 ^a	1,226	1,320	2,070	3,070	3,232
9 ^a	1,240	1,320	2,088	3,103	3,200
10 ^a	1,240	1,327	2,063	3,103	3,184
\bar{x}	1,236	1,315	2,076	3,133	3,235
σ	0,015	0,015	0,021	0,031	0,031
Coefficiente de variación %	1,21	1,14	1,01	0,99	0,96
\bar{x} antes de eluir	1,261	1,346	2,211	3,226	3,246
Recuperación %	98,02	97,7	94,12	97,12	99,66

CUADRO 4.- Estudio de la "Recuperación" de una solución patrón de pesticidas conteniendo Lindano, Heptaclor, Aldrín, Dieldrín y Endrín.

mente en termoiónico como hemos podido comprobar (119).

- Dos amplificadores de ionización *Perkin-Elmer* para el mod. F-11, uno de ellos con el correspondiente accesorio para control de voltaje, necesario al ECD.
- Estufa *Perkin-Elmer* F-11 de *Alta Performance*, con lector de temperatura incorporado.
- Registrador *Hitachi Perkin-Elmer* de doble canal, modelo 196; velocidad del papel de registro 5 mm./mn y 10 mv de entrada.
- Dos columnas de vidrio, de 2 metros de longitud y 3 mm. de diámetro interior; una rellena con silicona DC-200 al 10% sobre Gas-Chrom Q de 80-100 mallas, HMDS y otra rellena a partes iguales de DC-200 al 10% y QF-1 al 15%, sobre aquel mismo soporte.
- Gas portador Nitrógeno N-47, que necesariamente debe ser purificado mediante la utilización de un tamiz molecular. caudal de 120 ml./mn en el detector de captura de electrones y la quinta parte para el detector de llama de hidrógeno (24 mls.); ambos caudales a temperatura ambiente.
- Gases necesarios para el FID, Hidrógeno puro, (20-25 ml/mn) y aire (unos 300 ml./mn).

- **Temperaturas:** de la columna, 200°C.
del bloque de inyección, 320°C
del ECD, 210°C.
- **Voltaje del detector de captura de electrones** óptimo para obtener la mayor respuesta.
- **Sensibilidad de registro**, la señalada en los cromatogramas, en general, 1/5 para ambos detectores.
- **Cantidad de muestra** de 2-8 μ ls .

4.3.2.- Técnica de inyección y limpieza de la jeringa:

La muestra es introducida en el Cromatógrafo mediante una jeringa Hamilton de 10 μ ls.

La forma de proceder es la siguiente: se carga la jeringa y llevando el émbolo hacia atrás se lee el volumen total tomado; se inyecta y volviendo a leer el volumen remanente se puede conocer la cantidad inyectada por diferencia entre las dos medidas.

El lavado de la jeringa, generalmente de gran dificultad, se logra haciendo pasar éter de petróleo mediante el vacío creado por una trompa de agua.

Es de destacar sin embargo, que el operador debe mantener un ritmo de inyección uniforme, pues dada la gran

sensibilidad del ECD, es fácil observar que la respuesta a una misma solución puede ser distinta de un analista a otro.

Por otra parte la repetición de la respuesta es mucho mejor para cantidades comprendidas entre 2 y 8 μ ls.

4.3.3.- Análisis cualitativo:

Relación de pruebas utilizadas en la identificación y confirmación y modo de efectuarlas:

4.3.3.1.- Tiempo de retención.- La determinación del tiempo de retención relativo al Aldrín, de cada uno de los picos de un cromatograma, para las dos columnas de distinta naturaleza (DC-200 y DC-200 + QF-1) permite la identificación de cada componente, por comparación con los valores obtenidos con soluciones patrón (cuadro 5) u observables en la bibliografía (121).

Igualmente operando con soluciones patrón de Aroclor 1248 y Aroclor 1260, se han calculado los tiempos de retención relativos al Aldrín, para cada uno de sus picos (cuadro 6) y (figs. 9 y 10).

4.3.3.2.- Empleo de la columna de florisil.- La purificación con florisil, como se ha indicado, permite separar los pesticidas según su polaridad en dos eluatos, con lo que se logra tener en distinta fracción pesticidas de tiem

PESTICIDAS	ELUATOS	Tr RELATIVO ALDRIN	p-VALOR
α -HCH	1	0,38	0,224
Lindano	1	0,47	0,184
Heptaclor	1	0,79	0,602
Aldrín	1	1,0	0,818
Endosulfán I	2	1,58	0,523
pp'-DDE	1	1,83	0,676
Dieldrín	2	1,83	0,421
Endrín	2	2,04	0,443
Endosulfán II	2	2,12	0,141
op'-DDT	1	2,45	0,444
pp'-TDE	1	2,70	0,191
pp'-DDT	1	3,03	0,409

CUADRO 5.- Tiempos de retención relativos al Aldrín para columna de DC-200 y p-Valor para el par "hexano/acetónitrilo" determinados con soluciones patrón de pesticidas.

AROCLOR 1248	Tr RELATIVO ALDRIN	p-VALOR
Pico n° 1	0,49	-
2	0,55	-
3	0,67	0,702
4	0,72	-
5	0,85	0,671
6	0,95	0,613
7	1,02	0,605
8	1,22	0,866
9	1,38	0,723
10	1,48	0,817
11	1,73	0,705
12	1,83	0,721
13	2,22	0,826
14	2,57	0,732
15	3,08	-

CUADRO 6.- Tiempos de retención relativos al Aldrín para columna de DC-200 y p-Valor para el par "hexano/acetoneitrilo" determinados con soluciones patrón de Aroclor 1248.

AROCLOR 1260	Tr RELATIVO ALDRIN	p-VALOR
Pico n° 1	1,28	-
2	1,51	0,661
3	1,85	-
4	2,08	0,696
5	2,22	0,745
6	2,66	0,781
7	2,85	0,764
8	3,11	0,723
9	3,58	0,818
10	4,11	0,730
11	5,00	0,822
12	5,89	0,745
13	6,54	-
14	6,74	-

CUADRO 6 (continuación).- Tiempos de retención relativos al Aldrín para columna de DC-200 y p-Valor para el par "hexano/acetónitrilo" determinados con soluciones patrón de Aroclor 1260.

po de retención coincidentes o muy próximos como sería el caso de pp'-DDE y Dieldrín.

Por otro lado, se ha comprobado también por estudios hechos con soluciones patrón, que los PCB son arratrados en el primer eluato. De este modo el que un compuesto aparezca en el primer o segundo eluato, puede ser útil para su identificación.

4.3.3.3.- Determinación del p-Valor.- el llamado p-Valor, que permite la identificación de un compuesto a nivel de nanogramo, se basa en la propiedad de que, para cada sustancia, la razón de distribución entre volúmenes iguales de dos fases immiscibles, es una constante prácticamente independiente de su concentración, de la presencia de otros solutos y poco influenciada por la temperatura (106). Presenta además la ventaja de que su determinación es rápida, sencilla y de fácil repetición, por lo que consideramos de interés el transcribir las formas de llevarla a cabo:

1er Procedimiento (utilizando pares de disolventes previamente saturados uno con otro) (122): se evapora a sequedad una porción del eluato en el que se quiere determinar la identidad de un pesticida, sospechado por su tiempo de retención. El residuo se toma en un volumen de n-hexano (saturado del solvente polar que se emplee, acetonitrilo, p.e.) y se analiza por cromatografía de gases. Se añade un volumen igual de acetonitrilo (saturado de n-hexano) y se agita vigorosamente. Se repite

el análisis gas-cromatográfico de la capa apolar, inyectando igual cantidad que en el análisis anterior. La relación de las áreas de esta determinación y aquella, siempre que se trabaje en el margen en que la respuesta del detector es lineal para este componente, (vease más adelante), permite conocer el p-Valor.

2° Procedimiento (utilizando disolventes no saturados) (123): el residuo seco de un determinado eluato se trata con un volumen de solvente no polar (V_s) y se analiza gas-cromatográficamente; se añade igual volumen de fase polar (V_p), se agita vigorosamente y una vez separadas las capas se determina el volumen de fase polar y apolar (V_p y V_n). Se analiza de nuevo la fase apolar; la relación de áreas entre estos dos análisis es R_a y el p-Valor se obtiene aplicando la siguiente fórmula:

$$P = \frac{R_a V_p}{V_s - R_a (V_n - V_p)}$$

Este valor coincide prácticamente con el determinado por el primer procedimiento.

Manteniendo las condiciones de trabajo ya señaladas se han obtenido los p-Valores, para los disolventes indicados en los cuadros 5, 6 y 7, de soluciones patrón y de las muestras, al objeto de poder comprobar la identidad de algunos componentes, pudiendo observar que para las muestras de aguas de río y mar coinciden con los hallados para los patrones.

Sin embargo, este procedimiento resulta dificilmen

MEJILLONES		AGUAS (mar y rio)	
Tr	p-Valor	Tr	p-Valor
<u>1^{er} eluato</u>			
0,29	0,732	0,38	0,224
0,38	0,224	0,47	0,184
0,47	0,184	0,63	0,554
0,63	0,554	0,86	0,562
0,86	0,562	1,83	-
1,22	0,548	2,45	-
1,38	-	3,03	0,409
1,83	0,676		
2,08	-		
2,22	0,633		
2,66	0,892		
3,08	0,736		
3,58	-		
4,11	-		
5,00	-		
5,89	-		
6,54	-		
6,76	-		
<u>2^o eluato</u>			
0,63	0,554		
0,86	0,562		
1,55	-		

CUADRO 7.- Tiempos de retención relativos al Aldrín de los diferentes picos encontrados en las muestras utilizando columna de DC-200 y su p-Valor para el par "hexano/acetónitrilo".

te aplicable a muestras de moluscos, donde se encuentran otros componentes además de los pesticidas, nos referimos a los numerosos picos de los policlorobifenilos.

4.3.3.4.- Pruebas químicas.-

a).- Tratamiento alcalino: La presencia de DDT se ha confirmado por tratamiento con disolución alcohólica de KOH, que da lugar a la transformación de pp'-DDT en pp'-DDE (vease fig. 3).

Este método con algunas variantes en su realización ha sido aplicado por numerosos autores, HAMENCE (65), SANS (124), CARRASCO (125), etc.. Por nuestra parte lo hemos ensayado con las dos soluciones patrón de lindano y pp'-DDT y PCB, así como con los extractos de las muestras de la siguiente manera:

Se evapora a sequedad una parte alícuota (V ml.) de la solución etérea que contiene DDT y se añade al residuo 1 ml. de KOH metanólica 1N, manteniéndola a 30°C durante 30 minutos. Se enfría y se añaden 3 ml de agua destilada y un volumen de eter de petróleo purificado igual al volumen utilizado en la prueba (V mls.). Se agita, decanta, deshidrata y se inyecta la capa etérea. En los cromatogramas resultantes desaparece totalmente el pp'-DDT por transformación en pp'-DDE, que se verá incrementado proporcionalmente

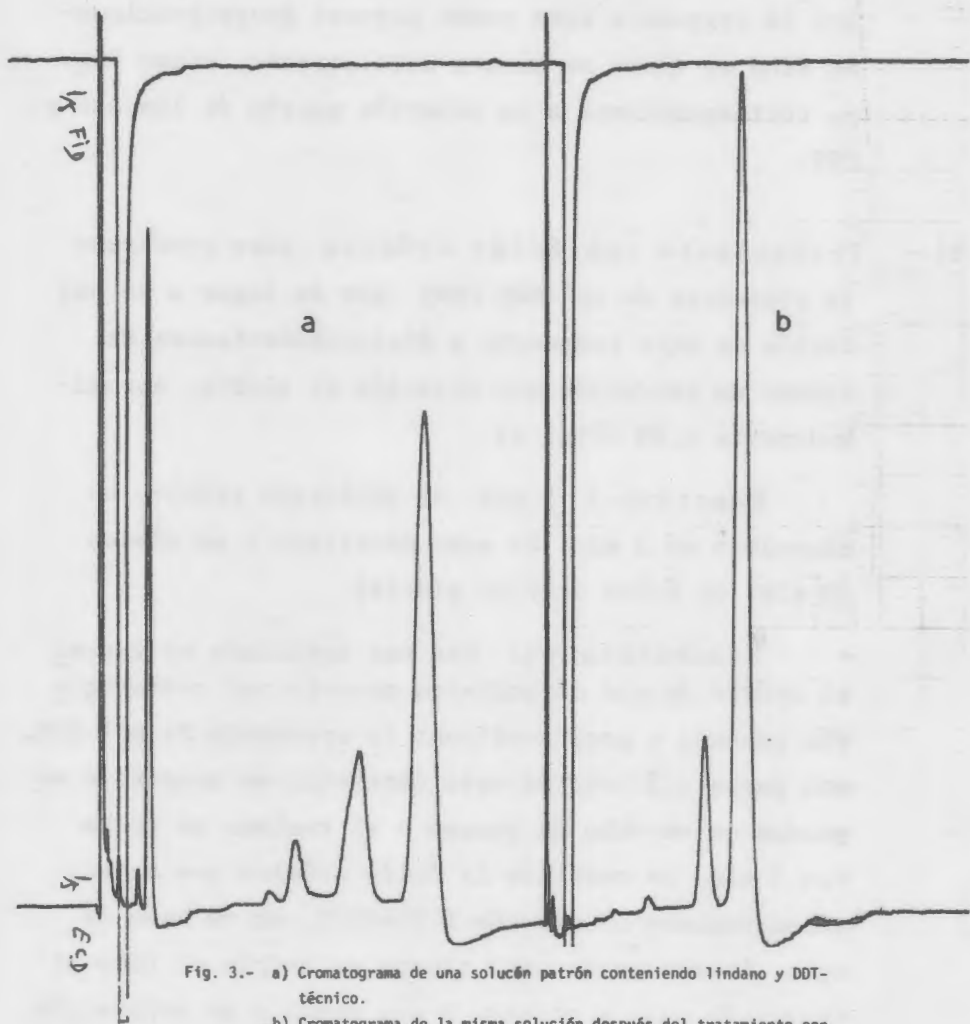


Fig. 3.- a) Cromatograma de una solución patrón conteniendo lindano y DDT-técnico.
 b) Cromatograma de la misma solución después del tratamiento con KOH metanólica.

a la cantidad de DDT original. La sensibilidad relativa del pp'-DDE para el detector de captura de electrones es unas cuatro veces mayor (121) por lo que la respuesta esta puede parecer desproporcionada sino se tiene en cuenta este aspecto, vease fig. 3, correspondiente a la solución patrón de lindano y DDT.

- b).- Tratamiento con ácido crómico para confirmar la presencia de pp'-DDE (99) que da lugar a la oxidación de este compuesto a diclorobenzofenona de tiempo de retención con relación al aldrín, aproximadamente 0,89 (fig. 4).

Reactivo : 5 grs. de anhídrido crómico se disuelven en 3 mls. de agua destilada y se añaden 60 mls. de ácido acético glacial.

Procedimiento: Una vez analizado el extracto etéreo de una determinada muestra por cromatografía gaseosa y para confirmar la presencia de pp'-DDE, una parte alícuota de este extracto, se evapora a sequedad en un tubo de ensayo y el residuo se trata con 5 mls. de reactivo de ácido crómico que se mantiene durante 10 minutos a 75-80°C. en un baño de agua. Transcurrido este tiempo se enfría el tubo al chorro de agua y se pasa a una ampolla de separación que contiene 20 ml. de agua destilada y 20 mls. de eter de petróleo purificado. Se lava el tubo varias veces con agua y los líquidos de lavado se pasan tam

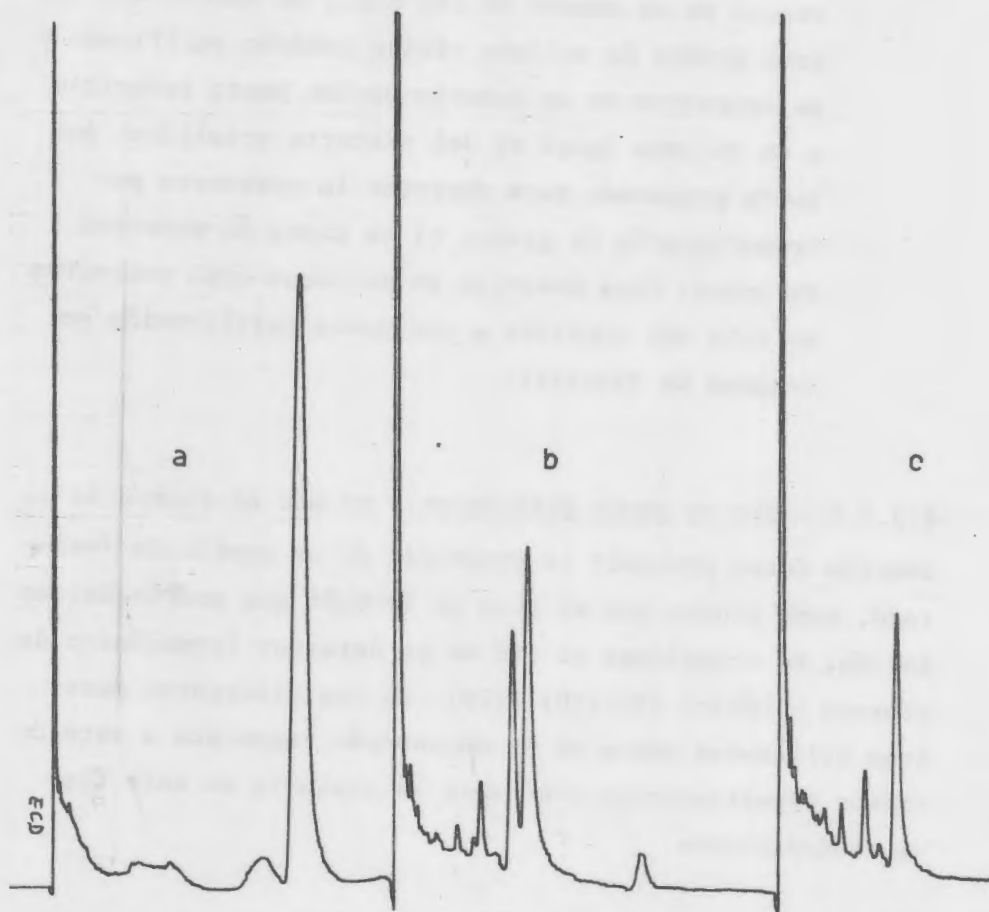


Fig. 4.- a) Cromatograma de una solución patrón de pp'-DDE.- b) Cromatograma de la misma solución después del tratamiento con ácido crómico.- c) Prueba en blanco, del ácido crómico (los picos corresponden al éter de petróleo, compárese con la fig. 1c).

bién a la ampolla. Se agita, se deja que las capas se separen y se retira la capa acuosa. Se añaden 20 mls. de agua destilada, se agita y se retira otra vez la capa acuosa. Después la capa eterea se recoge en un matraz de 100 mls., se deshidrata con unos gramos de sulfato sódico anhidro purificado y se concentra en un Kuderna-Danish hasta reducirlo a un volumen igual al del extracto primitivo. Así queda preparado para observar la respuesta por Cromatografía de gases, si se trata de muestras de aguas. Para muestras de moluscos este concentrado debe ser sometido a una nueva purificación en columna de florisil.

4.3.3.5.- Uso de otros detectores.- Si por el tiempo de retención fuese probable la presencia de un pesticida fosforado, como ocurre con el pico de $Tr=0,86$ que podría ser malación, se transforma el FID en un detector termoiónico de cloruro potásico (KClTID) (119). En las diferentes muestras utilizadas nunca se ha encontrado respuesta a este detector permitiendonos confirmar la ausencia de este tipo de contaminantes.

4.3.3.6.- Estudio de los policlorobifenilos (PCB).- La posible presencia de PCB, considerados no solo como interferencias en el análisis de pesticidas. sino también en su calidad de contaminantes industriales tóxicos y de larga persistencia, ha merecido por nuestra parte una atención

especial.

Los policlorobifenilos son mezclas de isómeros clorados del bifenilo, de muy distinta composición y de diferente nombre comercial (*Aroclor, Clophen, etc.*). La nomenclatura Aroclor va seguida de cuatro cifras, de las cuales las dos primeras hacen referencia al número de átomos de carbono y las otras dos al porcentaje de cloro.

En experiencias realizadas con Aroclor 1248 y Aroclor 1260 (fig. 9 y 10) aislados y en mezclas con Lindano y DDT se ha podido comprobar que los policlorobifenilos aparecen en su totalidad en el primer eluato, mezclados con aquellos pesticidas. Su tiempo de retención, su p-Valor y sobre todo su inalterabilidad al tratamiento alcalino y al ácido crómico, permiten poder llegar a identificarlos aún en mezclas.

4.3.3.7.- Otras técnicas.- La espectrofotometría de IR con accesorios para microdiscos que sería de gran utilidad para establecer la naturaleza de un determinado componente, necesita una cantidad de producto algo superior al microgramo (5-10 μ grs.) y además, la absorción producida por otras materias extractivas, a veces en concentraciones más importantes que el mismo residuo, acaban ocultando las absorciones características. El método es por ello de poca utilidad en el análisis de residuos, donde las cantidades encontradas en aguas están a nivel de nanogramo/litro y en muestras de moluscos en cantidades de microgramo/Kgr. (veanse cuadros de resultados).

4.3.3.8.- Estudio de los cromatogramas de las muestras.- Como consecuencia de lo comentado en todas las muestras ha sido necesario observar la respuesta a diferentes detectores: FID, ECD y en ocasiones al KC1TID; calcular el tiempo de retención de cada pico; razón de distribución o p-Valor y para la valoración cuantitativa ha sido indispensable someterlas al tratamiento alcalino y al del ácido crómico para poder apreciar el nivel de pesticidas y PCB.

Trás los primeros análisis se pudieron comprobar algunas circunstancias que es conveniente comentar:

a).- Aguas de río.- Los cromatogramas de estas muestras están formados, prácticamente, por los mismos componentes (fig. 5), que se han identificado como residuos de α y γ -HCH, pp'-DDE, op'-DDT y pp'-DDT. A estos resultados se ha llegado:

- 1.- Por no haber respuesta al detector de ionización de llama de hidrógeno (FID) y sí en el de electroafinidad (ECD) (fig. 5a).
- 2.- Por tener iguales tiempos de retención relativos al aldrín (cuadros 5 y 7).
- 3.- Por presentar un p-Valor muy parecido (cuadros 5 y 7).
- 4.- Porque al tratarlos con KOH metanólica se modifican desapareciendo del cromatograma el α y γ -HCH por haberse hidrolizado en parte a compuestos más volátiles y los isómeros del DDT, de forma análoga se han transformado en op'-DDE y pp'-DDE res-

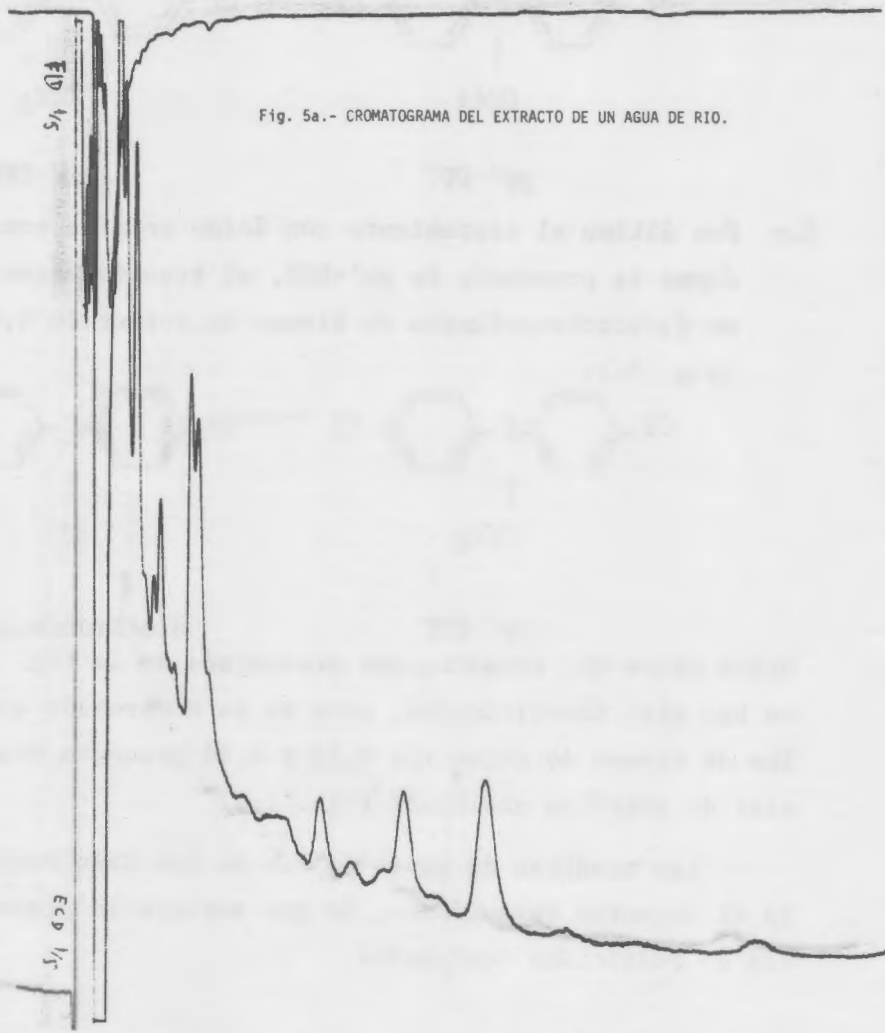
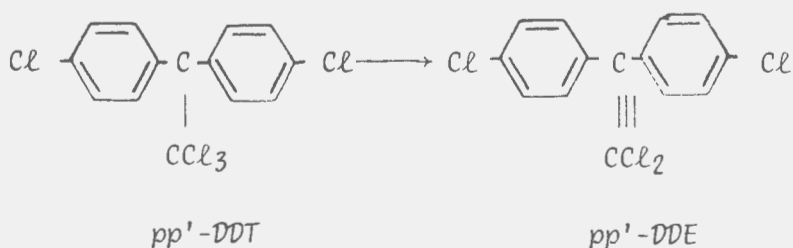
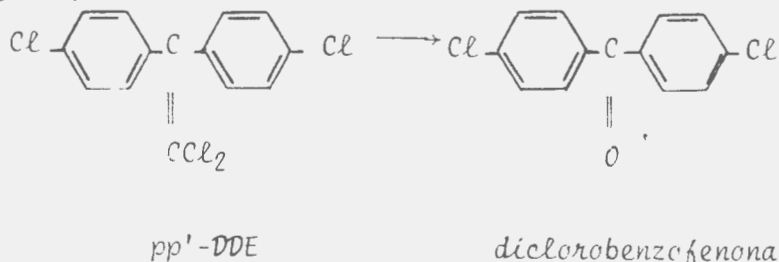


Fig. 5a.- CROMATOGRAMA DEL EXTRACTO DE UN AGUA DE RIO.

pectivamente por lo que estos isómeros se notaran incrementados (fig. 5b). Este proceso podría escribirse:



5.- Por último el tratamiento con ácido crómico confirma la presencia de pp'-DDE, al transformarse en diclorobenzofenona de tiempo de retención 0,39 (fig. 5c):



Otros picos del cromatograma presentado en la fig. 5a, no han sido identificados, pero se ha comprobado que los de tiempo de retención 0,63 y 0,86 proceden del eter de petróleo utilizado (fig. 1c).

Las muestras de aguas de río no han dado respuesta al detector termoiónico, lo que excluye la presencia de pesticidas fosforados.

b) - Aguas de mar.- En los cromatogramas correspondientes a las aguas de la Ría, de forma análoga a la anterior, se han podido identificar α y β -HCH, pp'-DDE, pp'-DDT y pp'-DDT (fig. 6).

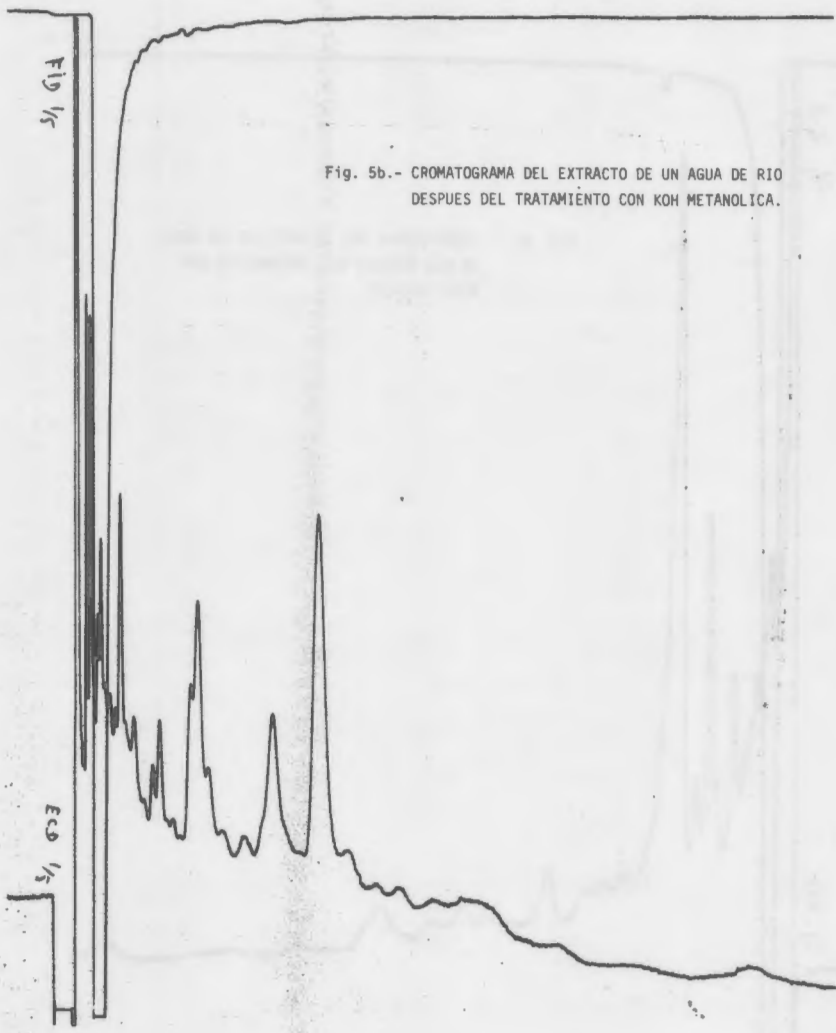


Fig. 5b.- CROMATOGRAMA DEL EXTRACTO DE UN AGUA DE RIO
DESPUES DEL TRATAMIENTO CON KOH METANOLICA.

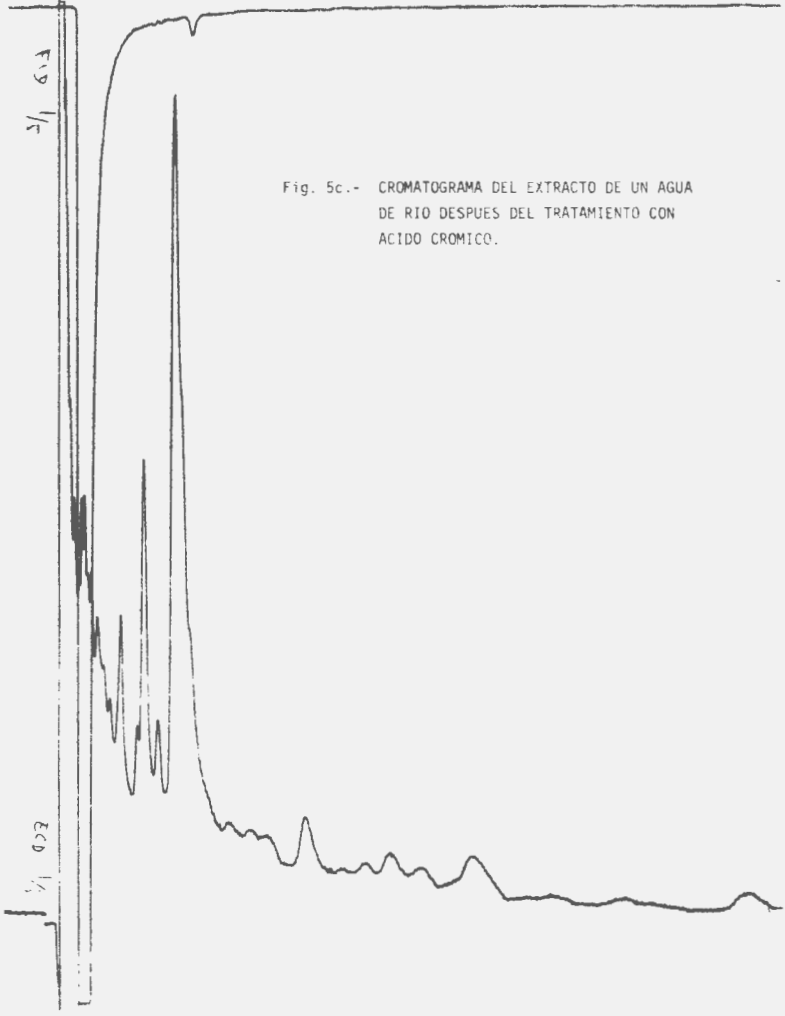


Fig. 5c.- CROMATOGRAMA DEL EXTRACTO DE UN AGUA DE RIO DESPUES DEL TRATAMIENTO CON ACIDO CROMICO.

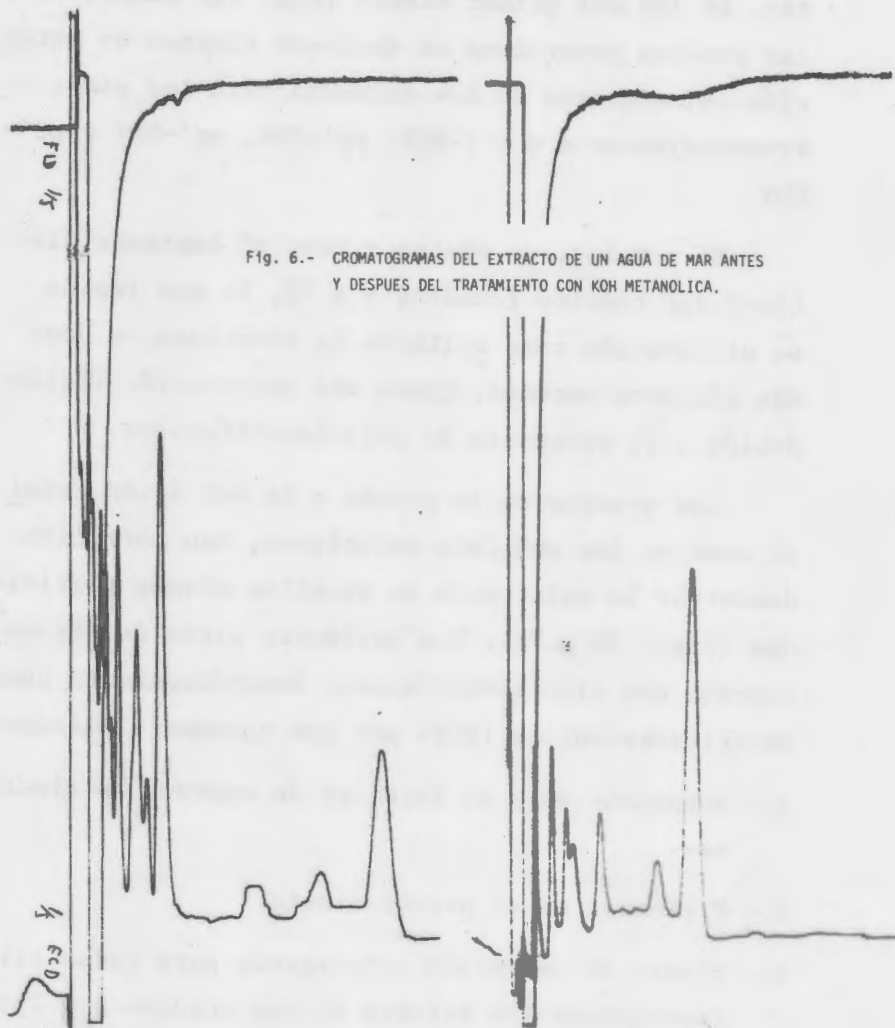


Fig. 6.- CROMATOGRAMAS DEL EXTRACTO DE UN AGUA DE MAR ANTES Y DESPUES DEL TRATAMIENTO CON KOH METANOLICA.

c).- Moluscos.- Los cromatogramas del primer y segundo eluato de mejillones (figs. 7a y 11 respectivamente presentan siempre el mismo número de componentes. En los del primer eluato (fig. 7a) sometidos a las pruebas anteriores se obtienen tiempos de retención coincidentes en dos columnas para los picos correspondientes a α y γ -HCH, pp'-DDE, op'-DDT y pp'-DDT.

El p-Valor, no obstante resultó bastante distinto del teórico (cuadros 5 y 7), lo que impide su utilización como criterio de identidad, y como más adelante veremos, tiene una explicación lógica debido a la presencia de policlorobifenilos.

Las pruebas de la potasa y la del ácido crómico como en los análisis anteriores, han permitido demostrar la existencia de aquellos mismos pesticidas (figs. 7b y 7c). Los restantes picos del cromatograma han sido identificados inequívocamente como policlorobifenilos (PCB) por las razones siguientes:

- 1.- Respuesta solo al detector de captura de electrones.
- 2.- Presencia en el primer eluato.
- 3.- Tiempo de retención coincidente para todos ellos (comparense los valores de los cuadros 6 y 7).
- 4.- No se modifican en el tratamiento alcalino (fig. 7b).

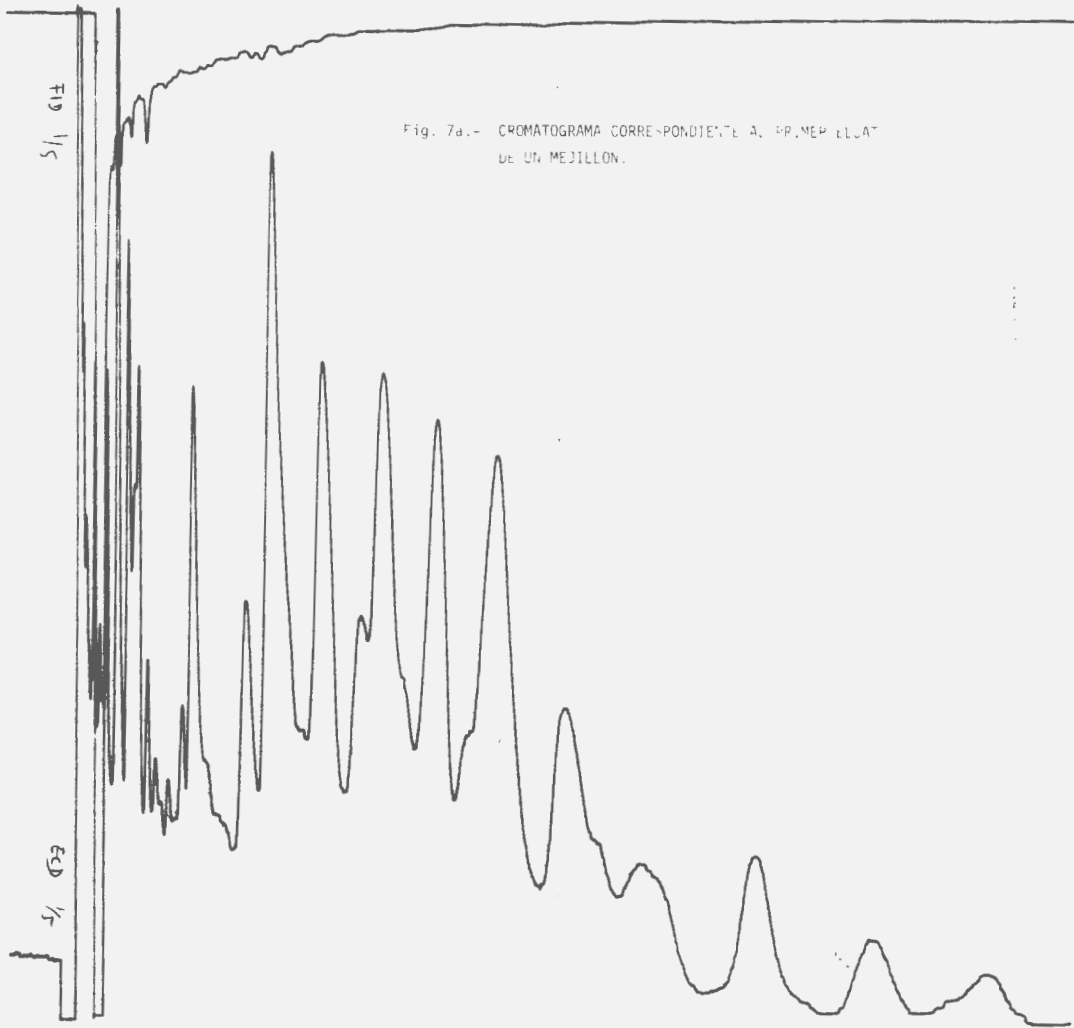


Fig. 7a.- CROMATOGRAMA CORRESPONDIENTE AL PR. MEP LLAT DE UN MEJILLON.

Fig. 7b.- Cromatogramas correspondientes al primer eluato de mejillón antes y después del tratamiento con KOH metanólica.

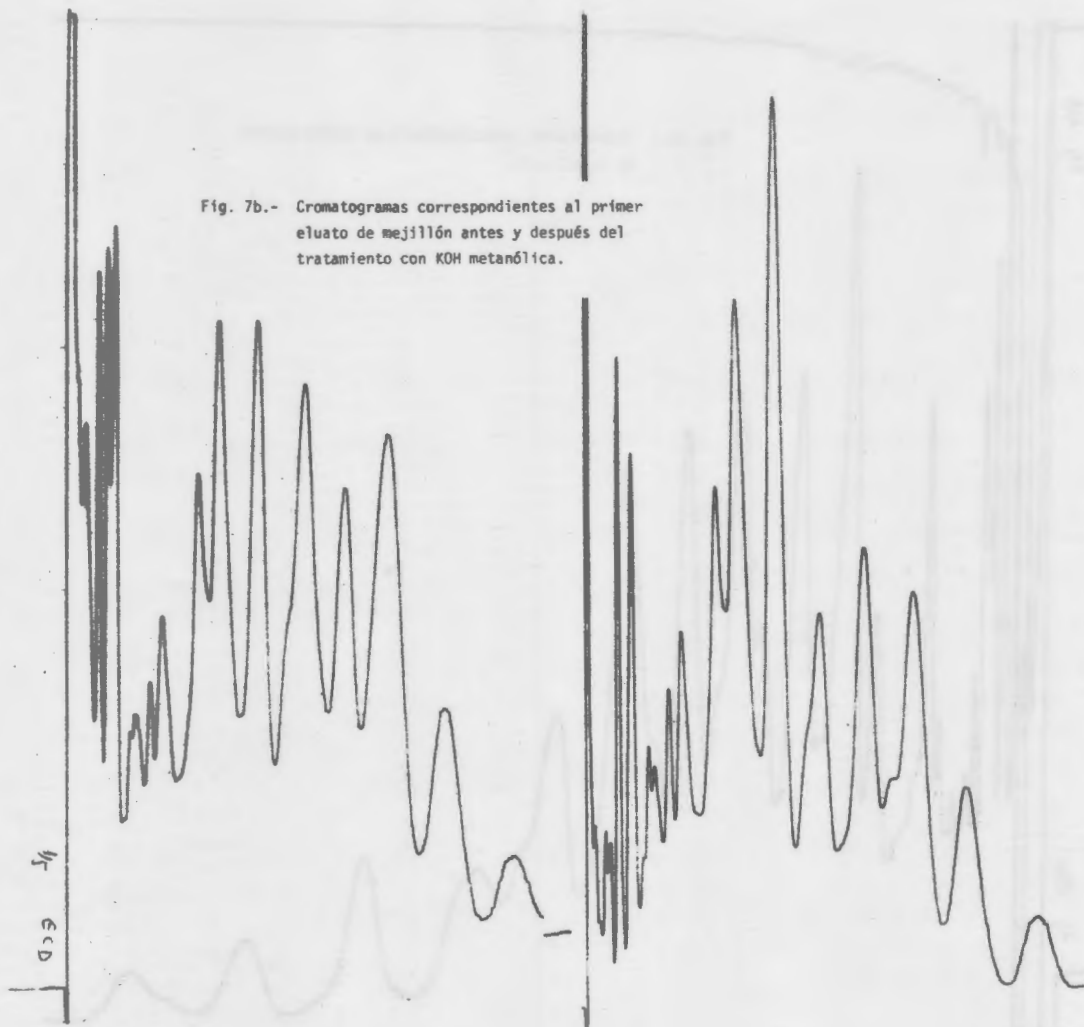
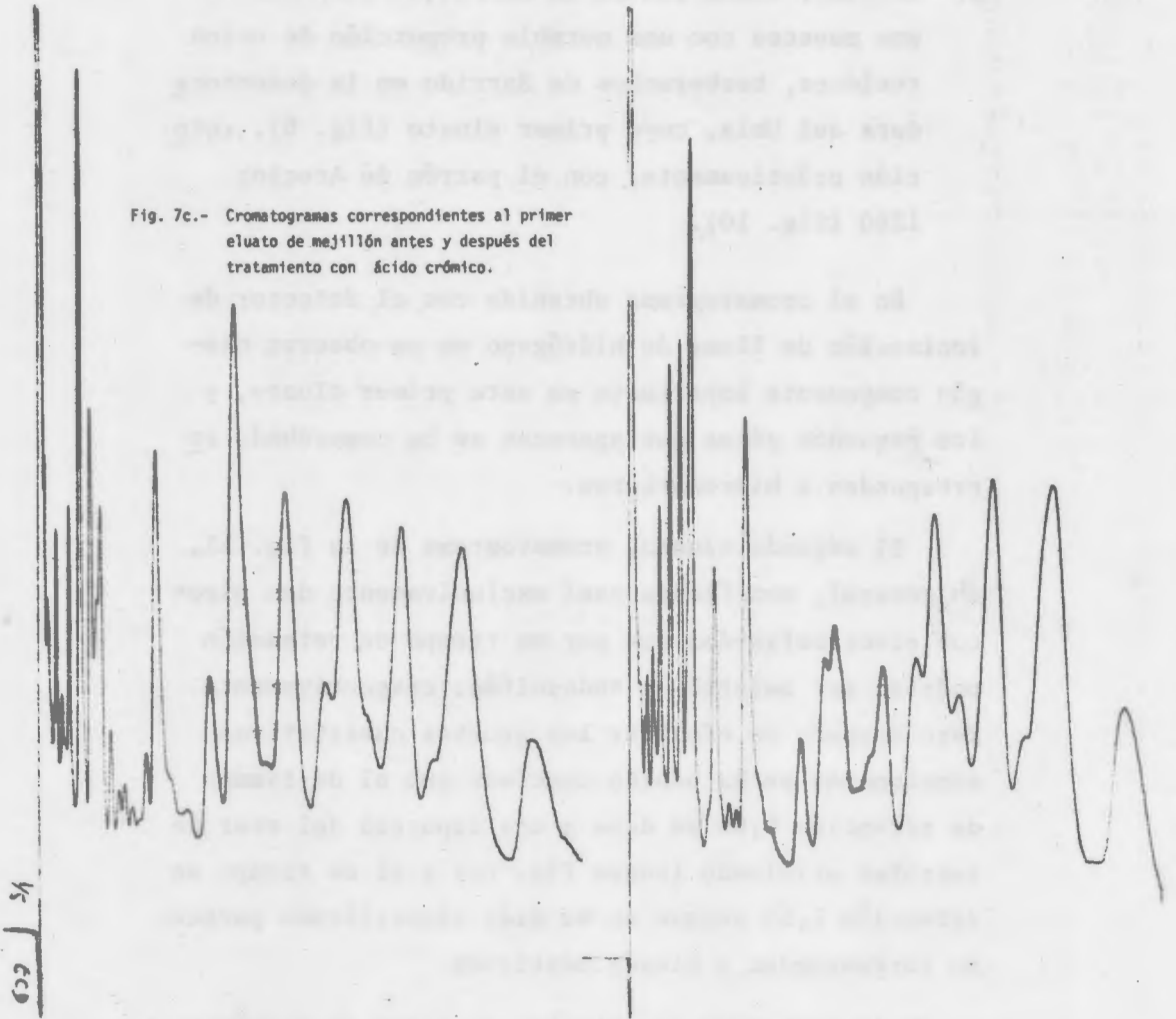


Fig. 7c.- Cromatogramas correspondientes al primer eluato de mejillón antes y después del tratamiento con ácido crómico.



5.- Tampoco en el tratamiento con ácido crómico (fig. 7c).

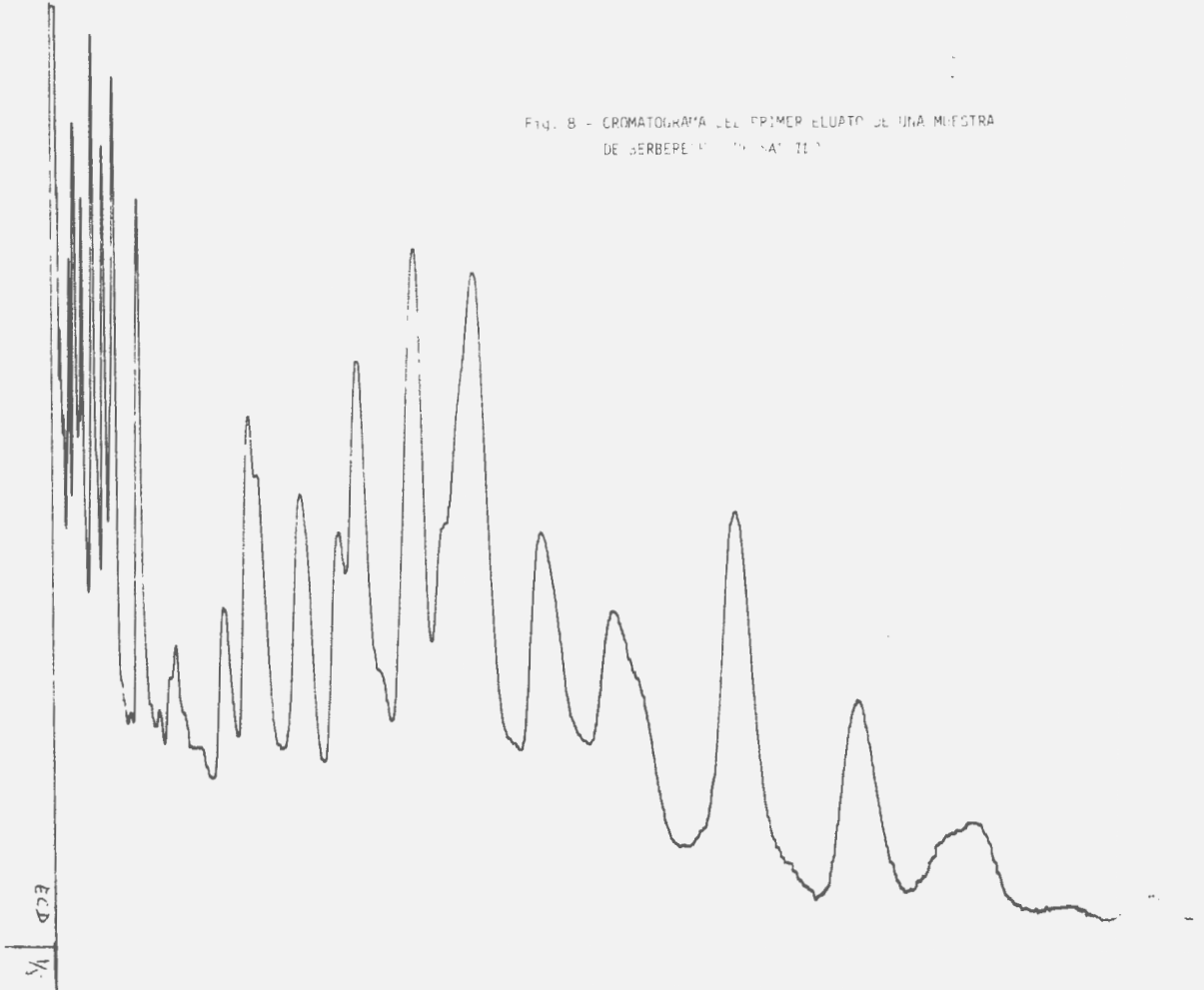
6.- Incluso, hemos tenido la suerte de disponer de una muestra con una notable proporción de estos residuos, berberechos de Sarrido en la desembocadura del Umia, cuyo primer eluato (fig. 8), coincide prácticamente, con el patrón de Aroclor 1260 (fig. 10).

En el cromatograma obtenido con el detector de ionización de llama de hidrógeno no se observa ningún componente importante en este primer eluato, y los pequeños picos que aparecen se ha comprobado corresponden a hidrocarburos.

El segundo eluato, cromatograma de la fig. 11, en general, manifiesta casi exclusivamente dos picos con electroafinidad que por su tiempo de retención podrían ser malatión y endosulfán, respectivamente. Pero después de efectuar las pruebas cualitativas mencionadas se ha podido concluir que el de tiempo de retención 0,86 se debe a una impureza del eter de petróleo utilizado (vease fig. 1c) y el de tiempo de retención 1,55 aunque no ha sido identificado parece no corresponder a ningún pesticida.

En la respuesta al detector de llama de hidrógeno, de este segundo eluato, se observan grandes picos que por sus características hizo pensar en una serie homóloga de hidrocarburos. Sin embargo, puede concluir

Fig. 8 - CROMATOGRAMA DEL PRIMER ELUATO DE UNA MUESTRA DE SERBEPÉ (CINCO SALSAS)



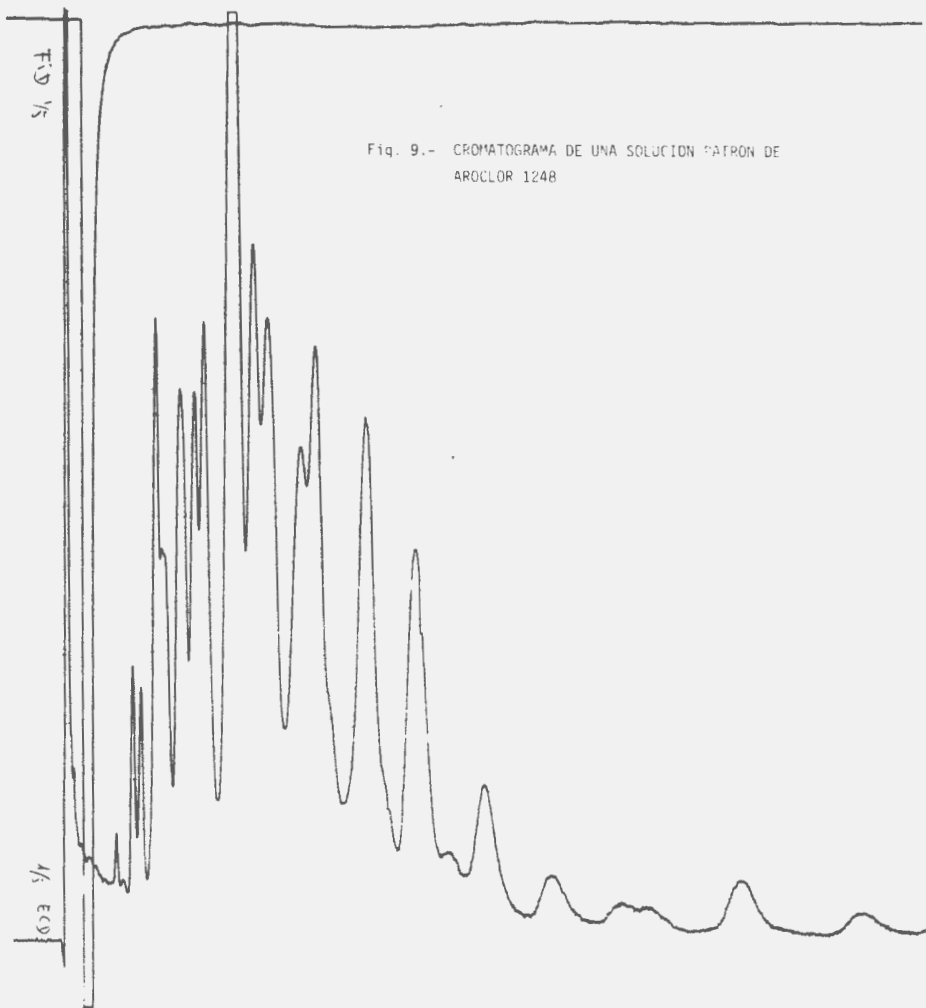


Fig. 9.- CROMATOGRAMA DE UNA SOLUCION PATRON DE AROCLOR 1248

FID 1/5

1/5 ECD

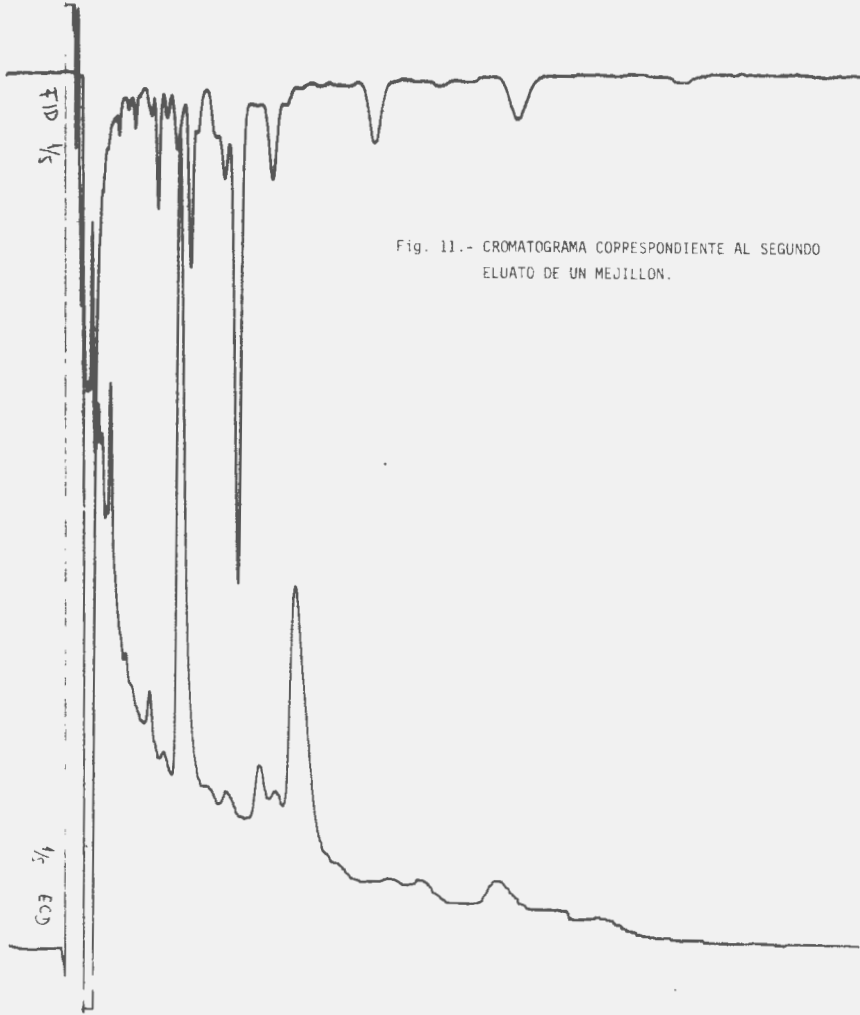


Fig. 11.- CROMATOGRAMA CORRESPONDIENTE AL SEGUNDO ELUATO DE UN MEJILLON.

que no lo son por lo siguiente:

- 1.- La elevada polaridad del acetonitrilo utilizado en la extracción impediría que se encontrasen estos compuestos.
- 2.- De haberse extraído aparecerían en el primer eluato y
- 3.- Su espectro de infrarrojos pone de manifiesto, sin lugar a dudas, su naturaleza lipídica con una función ester, cuya naturaleza por no corresponder a los residuos estudiados, de momento, no ha sido establecida.

Finalmente, el uso del detector termoiónico como en los casos anteriores, ha permitido concluir que no existen residuos de pesticidas organofosforados.

4.3.4.- Análisis cuantitativo:

La evaluación de residuos se ha efectuado midiendo las áreas de cada componente y comparándolas con los valores obtenidos con disoluciones patrón.

En las determinaciones cuantitativas mediante cromatografía de gases existen varios factores que modifican la respuesta: temperatura, fluctuaciones en la presión del gas portador, cambio de envase del gas portador, variaciones en el suministro de energía eléctrica, suciedad del de

detector, contaminación de la columna o envejecimiento de la fase estacionaria, etc., todo lo cual obliga a efectuar comprobaciones periódicas con disoluciones patrón de concentración conocida.

Algunos de estos factores no son fáciles de controlar y a fin de evitarlos, es aconsejable inyectar la muestra y la disolución patrón una a continuación de la otra, para establecer por último la comparación entre sus áreas. Es conveniente además que la cantidad de muestra sea tal que el área resulte lo más próxima posible a la del patrón.

4.3.4.1.- Margen del detector donde la respuesta es lineal y curvas de calibrado.- Cuando el número de muestras a analizar es alto, es de gran utilidad construir una curva de calibrado utilizable, al menos, durante un día, evitando la inyección de la disolución patrón inmediatamente antes o después de cada una. En la práctica, es ta curva, siempre que el cromatografo permanezca encendido día y noche y para un mismo envase de gas portador, se man tiene incluso semanas, aunque haya que comprobarlo por inyección de algún punto de la curva.

Nosotros hemos utilizado la curva de calibrado del Lindano para valorar los dos isómeros α y γ -HCH; y la del pp'-DDT para los isómeros del DDT y sus derivados, considerando en cada caso su sensibilidad relativa al detector de captura de electrones (121).

Optimos resultados se obtienen calculando la ecua-

LINDANO		pp'-DDT	
Area	ngr.	Area	ngr.
7,1	0,04	0,080	0,12
9,4	0,06	1,485	0,24
11,5	0,08	3,340	0,48
13,2	0,10	4,600	0,72
14,6	0,12	5,684	0,96
16,0	0,14	6,750	1,20
17,3	0,16	7,650	1,44
18,5	0,18	-	-

$$r = 0,9928$$

$$r = 0,9933$$

$$y = 0,012 x - 0,056$$

$$y = 0,190 x - 0,087$$

CUADRO 8.- Valores encontrados para la curva de calibrado de γ -HCH (Lindano) y pp'-DDT.

ción de la recta de regresión entre áreas y concentraciones (cuadro 8), ya que se evitan los errores del método gráfico. Igualmente es interesante calcular el coeficiente de correlación para observar mejor la condición de respuesta lineal. Es de señalar que los resultados encontrados para esta técnica analítica son altamente satisfactorios, pues el coeficiente de correlación prácticamente es la unidad.

4.3.4.2.- Límites de detección.- El límite de detección para los residuos estudiados ha quedado establecido de la siguiente forma:

	α y γ -HCH	0,001	μ gr./litro
En aguas	pp'-DDE	0,002	"
	op'-DDT	0,008	"
	pp'-DDT	0,008	"
	α y γ -HCH	0,03	μ gr./Kg.
En moluscos	pp'-DDE	0,07	"
	op'-DDT	0,30	"
	pp'-DDT	0,30	"
	policlorobifenilos	2,00	

Los límites de detección expresados en materia seca para los mejillones serian 5 veces más altos y en materia grasa 50 veces superior a la dada.

	α y γ -HCH	0,15 μ gr./Kg.	
	pp'-DDE	0,35	"
En materia seca	op'-DDT	1,5	"
	pp'-DDT	1,5	"
	Policlorobifenilos	10,0	"
	α y γ -HCH	1,5 μ gr./Kg.	
	pp'-DDE	3,5	"
En materia grasa	op'-DDT	15,0	"
	pp'-DDT	15,0	"
	Policlorobifenilos	100,0	"

5.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

Los resultados de las distintas muestras de la Ría de Arosa, se han agrupado en los dos semestres del año 1973 (vease Cuadros I al XXIII). Han sido desglosados, a su vez, en agua de rios, aguas de mar, mejillones y otros moluscos.

En los cuadros de resultados de muestras de aguas se incluye el polígono a que corresponden, la fecha de toma de muestras y sus características de pH y conductividad a 20°C. En las columnas restantes aparecen los valores de los residuos encontrados de los isómeros α y γ -HCH, así como el total de estos isómeros, e igualmente los de pp'-DDE, op'-DDT y pp'-DDT y en otra columna el total de dichos isómeros.

El primero de estos cuadros corresponde a las muestras de aguas de río tomadas dentro del primer semestre de 1.973. Los cinco siguientes resumen los valores encontrados durante este período en aguas de la Ría y en los cuadros VII al XI se presentan los valores obtenidos para los mejillones en el primer semestre de 1.973.

No se ha incluido en ninguno de ellos la columna correspondiente a pesticidas fosforados por haber sido siempre la respuesta negativa. Esta circunstancia parece lógica, pues aunque se utilizan con cierta profusión, su degradación es también rápida.

En los cuadros correspondientes a los moluscos del segundo semestre de 1.973, también se hallan incluidos los residuos de policlorobifenilos, estimados en Aroclor 1260 por presentar este producto unas características gas-cromatográficas muy similares a los residuos encontrados en moluscos (veanse figs. 7a, 8 y 10).

Estos resultados, además, se han representado con relación a la frecuencia de aparición. En la fig. 12 correspondiente a los valores del HCH y DDT de las aguas de los ríos en ambos períodos, puede notarse que predominan los valores bajos y aunque se ha calculado el promedio incluido en el cuadro correspondiente, creemos que esta gráfica da una idea más clara de la contaminación.

Las figs. 13, 14 y 15 en forma análoga, agrupan los resultados de aguas de mar y mejillones, para aquellos pesticidas y para los policlorobifenilos respectivamente.

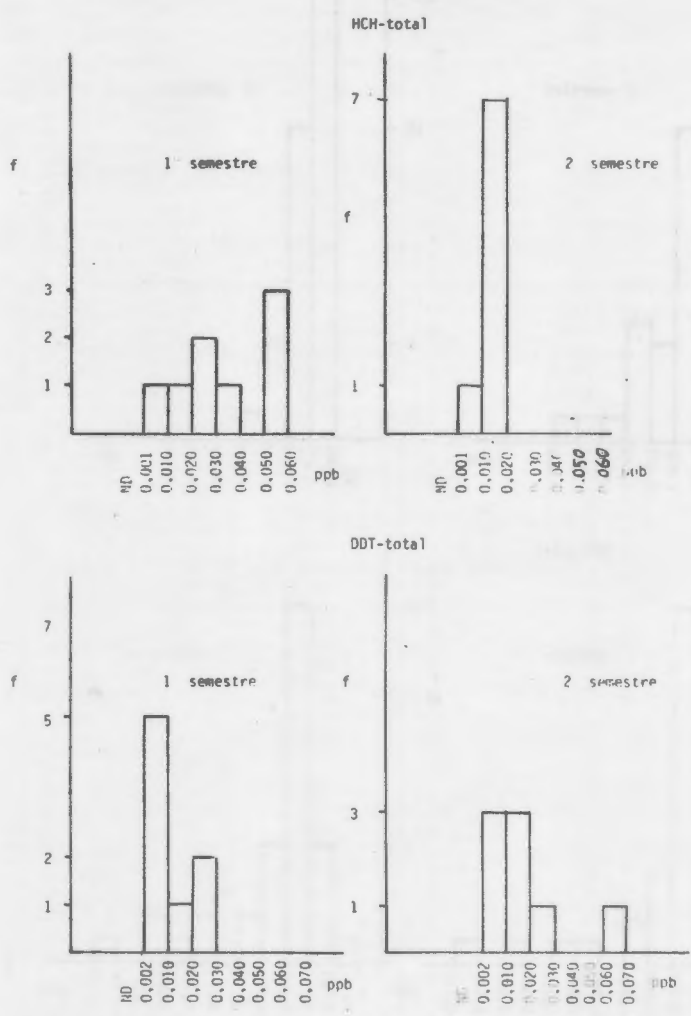


Fig. 12.- HISTOGRAMA DE DISTRIBUCION DE FRECUENCIAS DE RESIDUOS DE PESTICIDAS EN AGUAS DE RIO.

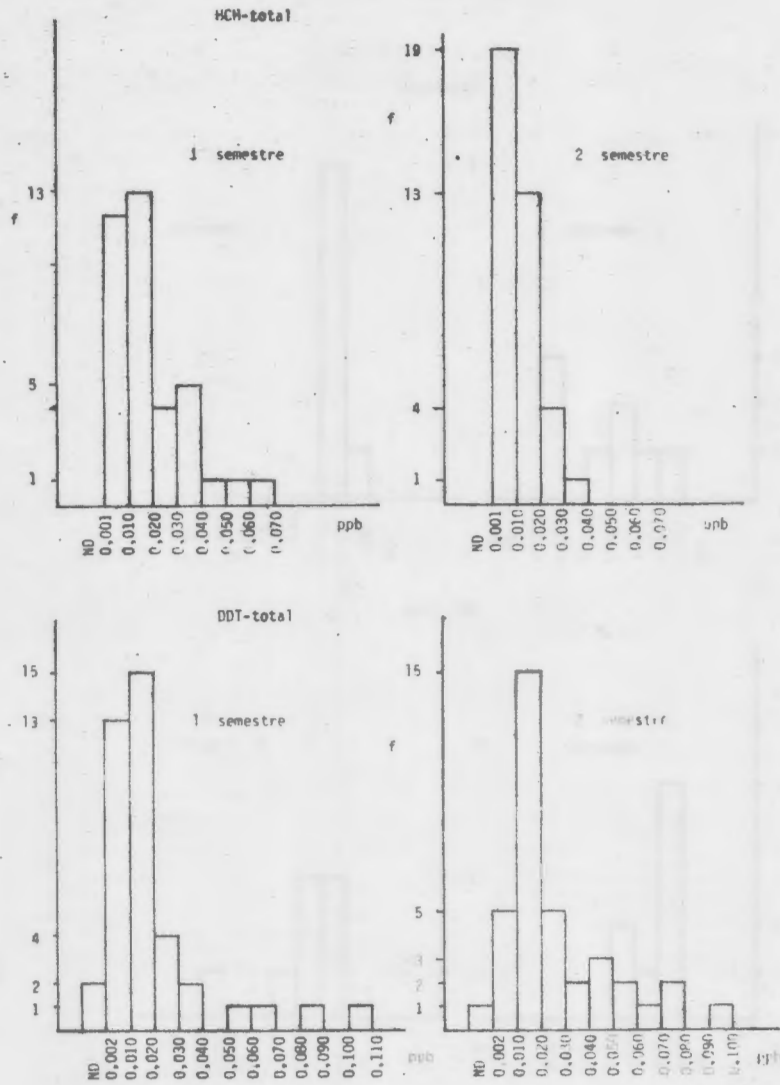


Fig. 13.— HISTOGRAMA DE DISTRIBUCION DE FRECUENCIAS DE PESTICIDAS EN AGUAS DE MAR.

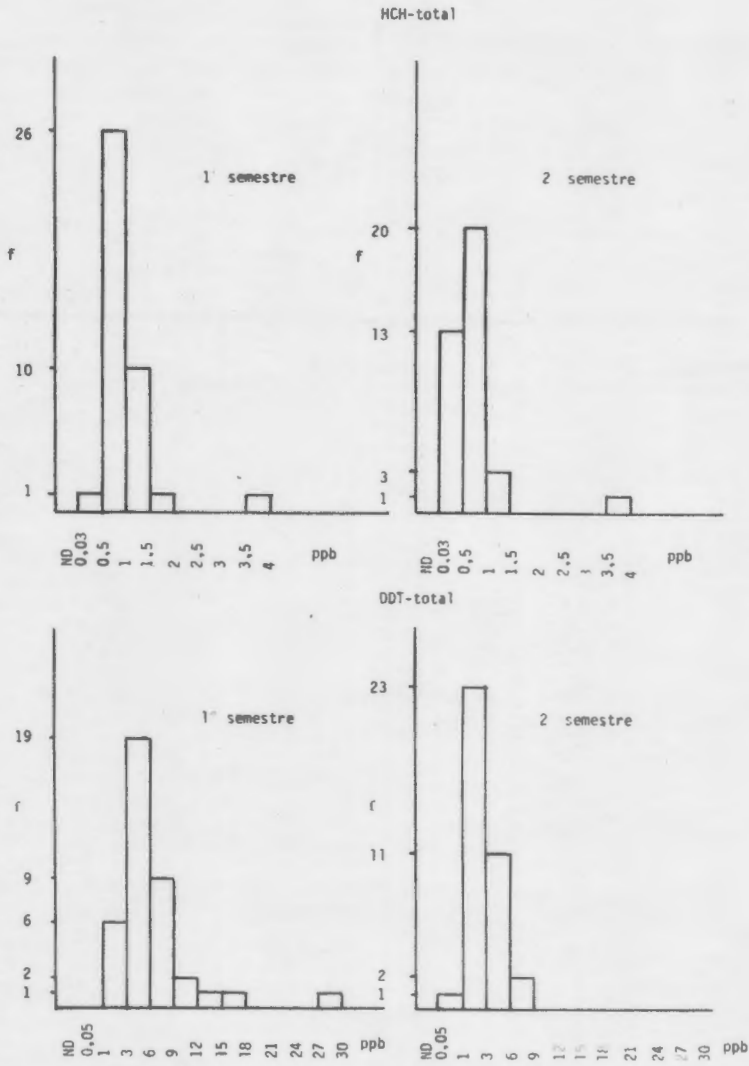


Fig. 14.- HISTOGRAMA DE DISTRIBUCION DE FRECUENCIAS DE RESIDUOS DE PESTICIDAS EN MEJILLONES

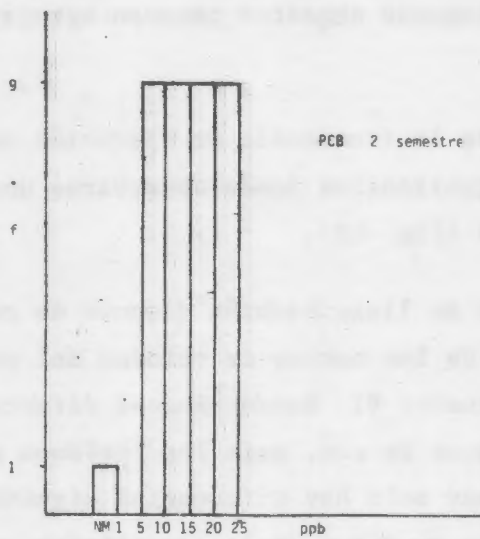


Fig. 15.— HISTOGRAMA DE DISTRIBUCION DE FRECUENCIA DE RESIDUOS DE POLI-CLOBIFENILOS EN MEJILLÓN, CORRESPONDIENTES AL SEGUNDO SEMESTRE DE 1973.

La comparación de estos gráficos permite deducir lo siguiente:

- En las aguas de río y mar (figs. 12 y 13) los residuos de HCH han descendido de un semestre a otro, mientras que los de DDT, por el contrario se observan agrupados hacia valores más altos.
- En mejillones (fig. 14) el HCH ha disminuido y los residuos de DDT, en el segundo semestre parecen agruparse a niveles más bajos.
- En la distribución de la frecuencia de aparición de los residuos de policlorobifenilos puede observarse una agrupación más homogénea (fig. 15).
- A estas conclusiones se llega también después de conocer la "t" experimental de las series de valores del primer y segundo semestres (cuadr. 9). Encontrándose diferencias significativas en aguas de río, para los residuos de HCH y DDT; en aguas de mar solo hay diferencias significativas para los residuos de HCH y en los mejillones, por el contrario, solo se observan diferencias significativas para los residuos de DDT.

Se ha buscado la existencia de alguna relación entre el contenido en Lindano y DDT, de los dos semestres, sin ningún resultado.

Sí parece existir una cierta relación entre los residuos de DDT y PCB ya que el coeficiente de correlación es superior a 0,8. Claro que solo se ha podido estudiar

	Grados de libertad	"t" teórica	HCH (ppb)	"t" experimental	DDT (ppb)	"t" experimental
1 ^{er} sem.	7		$\bar{x}=0,035$		$\bar{x}=0,014$	
Aguas rio		2,14		3,35		2,28
2 ^o sem.	7		$\bar{x}=0,013$		$\bar{x}=0,025$	
1 ^{er} sem.	38		$\bar{x}=0,018$		$\bar{x}=0,022$	
Agua mar		2,0		2,33		1,39
2 ^o sem.	36		$\bar{x}=0,012$		$\bar{x}=0,029$	
1 ^{er} sem.	38		$\bar{x}=0,92$		$\bar{x}=6,20$	
Mejillones		2,0		1,65		3,95
2 ^o sem.	36		$\bar{x}=0,71$		$\bar{x}=2,92$	

CUADRO 9.- Estudio de las diferencias significativas durante el año 1.973 de residuos de HCH y DDT para muestras de aguas de rio, aguas de mar y mejillones.

en los mejillones del segundo semestre de 1.973. Esta circunstancia parece indicar una contaminación local por ambos residuos.

Observando los valores medios, cuadro 9, puede estimarse en los mejillones un nivel de residuos de DDT 100 á 300 veces superior al alcanzado en el agua de mar, y de 50 á 60 veces para los residuos de HCH.

Con los valores de PCB no ha sido posible efectuar comparaciones, pués al no disponer de los testigos correspondientes en el primer semestre y haberse modificado algunas condiciones de trabajo, fué imposible la valoración cuantitativa en aquella ocasión y tan solo a la vista de los cromatogramas puede darse una apreciación subjetiva e indicar que no parece existir una gran variación entre ambos períodos.

RIO	FECHA	pH	C, a 20°C	RESIDUOS EN p.p.b. ($\mu\text{gr.}/\text{litro}$)						
				α -HCH	γ -HCH	HCH-total	pp'-DDE	op'-DDT	pp'-DDT	DDT-total
ULLA (Catoira)	2-5-73	6,80	1,67 mM	0,021	0,034	0,055	0,002	0,008	0,020	0,030
CON	1-5-73	6,50	200 μM	0,026	0,033	0,059	<0,001	0,008	0,022	0,030
UMIA	29-3-73	6,30	57 μM	< 0,001	0,020	0,020	<0,001	<0,006	0,008	0,008
CHANCA	6-5-73	7,00	103 μM	0,002	0,008	0,010	<0,001	0,008	0,009	0,017
BELUSO	2-6-73	6,64	1,55 mM	0,013	0,039	0,052	<0,001	<0,006	0,008	0,008
COROÑO	2-6-73	6,22	62 μM	0,009	0,013	0,022	<0,001	<0,006	0,008	0,008
PEDRAS	2-6-73	6,30	82 μM	0,010	0,019	0,029	<0,001	<0,006	0,008	0,008
BARBANZA	2-6-73	6,20	58 μM	0,008	0,025	0,033	<0,001	<0,006	0,008	0,008
				$\bar{x}=0,035$						$\bar{x}=0,014$

AGUAS "VILLAGARCIA"

POLÍGONO	FECHA	pH	C. á 20°C (mMho)	RESIDUOS EN p.p.b. (µgr./litro)						
				α-HCH	γ-HCH	HCH-total	pp'-DDE	op'-DDT	pp'-DDT	DDT-total
A	13-4-73	7,86	45,2	0,002	0,014	0,016	< 0,001	0,008	0,008	0,016
B	4-5-73	7,80	36,0	0,007	0,022	0,029	< 0,001	0,008	0,008	0,016
C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D	4-5-73	7,82	44,0	0,005	0,028	0,033	0,002	0,008	0,008	0,018
E	4-5-73	7,80	45,5	0,002	0,021	0,023	< 0,001	0,008	0,008	0,016
F	9-5-73	7,80	47,0	0,002	0,013	0,015	0,002	0,008	0,008	0,016
G	9-5-73	7,83	46,5	0,002	0,014	0,016	0,002	0,018	0,008	0,028
H	9-5-73	7,83	46,7	0,006	0,032	0,038	< 0,001	0,008	0,008	0,016
I	11-5-73	7,86	47,8	0,002	0,001	0,003	0,002	0,008	0,008	0,018
						$\bar{x}=0,021$				$\bar{x}=0,018$

AGUAS "CAMBADOS"

POLIGONO	FECHA	pH	C. á 20°C (mMho)	RESIDUOS EN p.p.b. (µgr./litro)						
				α-HCH	γ-HCH	HCH-total	pp'-DDE	op'-DDT	pp'-DDT	DDT-total
A	11-5-73	7,9	47,8	0,003	0,010	0,013	0,002	0,020	0,040	0,062
B	16-5-73	8,0	41,2	0,010	0,021	0,031	0,060	0,008	0,020	0,088
C	16-5-73	8,0	43,0	0,006	0,011	0,017	0,002	0,027	0,029	0,058
D	16-5-73	8,0	44,0	0,001	0,001	0,002	0,002	0,008	0,008	0,018
E	18-5-73	8,08	38,5	0,010	0,029	0,039	<0,001	<0,006	0,008	0,008
F	25-5-73	8,00	40,0	0,015	0,047	0,062	0,002	<0,006	0,008	0,010
G	25-5-73	7,82	43,4	0,002	0,005	0,007	0,001	0,008	0,008	0,016
H	25-5-73	8,01	40,1	0,003	0,008	0,011	<0,001	<0,006	<0,006	ND
I	11-5-73	7,92	47,5	0,002	0,005	0,007	0,002	0,008	0,008	0,018
						$\bar{x}=0,021$				$\bar{x}=0,034$

AGUAS "CARAMIÑAL"

POLIGONO	FECHA	pH	C, á 20 °C (mmho)	RESIDUOS EN p.p.b. (µgr./litro)						
				α-HCH	γ-HCH	HCH-total	pp'-DDE	op'-DDT	pp'-DDT	DDT-total
A	30-3-73	7,94	44,8	0,006	0,140	0,020	<0,001	0,008	0,020	0,028
B	30-3-73	7,94	45,0	0,002	0,008	0,010	0,006	0,009	0,022	0,037
C	30-3-73	7,96	47,0	0,007	0,014	0,021	<0,001	<0,006	0,008	0,008
D	30-3-73	7,93	47,0	0,010	0,024	0,034	<0,001	<0,006	0,035	0,035
E	30-3-73	7,94	46,6	<0,001	0,002	0,002	0,005	0,010	0,009	0,024
F	3-4-73	7,83	47,0	0,006	0,010	0,016	0,002	0,009	0,095	0,106
G	3-4-73	7,81	46,0	0,004	0,007	0,011	0,002	0,008	0,019	0,029
H	3-4-73	7,81	45,0	0,003	0,007	0,010	<0,001	<0,006	0,008	0,008
I	13-4-73	7,90	46,5	0,002	0,017	0,019	0,002	0,008	0,008	0,018
J	13-4-73	7,90	46,5	<0,001	0,011	0,011	<0,001	<0,006	0,008	0,008
K	13-4-73	7,86	46,0	<0,001	0,005	0,005	<0,001	<0,006	0,008	0,008
L	18-5-73	7,96	45,0	<0,001	0,003	0,003	<0,001	0,008	<0,006	0,008

$\bar{x}=0,013$

$\bar{x}=0,026$

AGUAS "EL GROVE"

POLIGONO	FECHA	pH	C. á 20°C (mmHg)	RESIDUOS EN p.p.b. (µgr./litro)						
				α-HCH	γ-HCH	HCH-total	pp'-DDE	op'-DDT	pp'-DDT	DDT-total
A	24-5-73	7,73	47,0	0,025	0,027	0,052	<0,001	<0,006	0,008	0,008
B	24-5-73	7,83	46,9	0,006	0,008	0,014	<0,001	0,008	0,008	0,016
C	24-5-73	7,84	46,9	0,007	0,017	0,024	<0,001	<0,006	<0,006	ND
D	24-5-73	7,84	46,8	0,002	0,019	0,021	<0,001	<0,006	0,008	0,008
E	25-5-73	7,93	44,0	0,006	0,007	0,013	0,002	0,008	<0,006	0,010
F	29-5-73	7,94	41,6	0,002	0,005	0,007	<0,001	<0,006	0,008	0,011
G	29-5-73	7,88	41,5	0,013	0,033	0,046	<0,001	0,008	<0,006	0,008
H	29-5-73	7,92	44,2	0,003	0,003	0,006	<0,001	0,008	0,008	0,016
						$\bar{x}=0,022$				$\bar{x}=0,011$

AGUAS "RIVEIRA"

POLIGONO	FECHA	pH	C, a 20°C (mmho)	RESTIDUOS EN p.p.b. (µgr./litro)							
				α-HCH	γ-HCH	HCH-total	pp'-DDE	op'-DDT	pp'-DDT	DDT-total	
A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B	18-5-73	7,97	46,2	<0,001	0,005	0,005	<0,001	<0,006	0,008	0,008	0,008
C	18-5-73	8,00	45,6	<0,001	0,003	0,003	<0,001	0,008	0,008	0,008	0,016
CANAL	29-5-73	7,96	44,2	0,005	0,006	0,011	<0,001	<0,006	0,008	0,008	0,008

MEJILLONES "VILLAGARCIA"

POLIGONO	FECHA	RESIDUOS EN p.p.b. (mgr/Kgr.)							
		α -HCH	γ -HCH	Σ -total	pp'-DDE	op'-DDT	pp'-DDT	DDT-total	PCB
A	13-4-73	0,22	0,36	0,58	0,54	0,30	3,34	4,18	
B	4-5-73	0,63	0,74	1,37	0,81	< 0,020	4,92	5,73	
C	-	-	-	-	-	-	-	-	
D	4-5-73	0,61	0,65	1,26	1,13	0,93	9,37	11,53	
E	12-3-73	0,48	0,58	1,06	1,35	< 0,020	7,54	8,89	
F	29-1-73	1,54	2,21	3,75	1,28	0,30	7,32	8,90	
G	6-2-73	0,61	0,91	1,52	1,19	0,30	5,19	6,68	
H	9-5-73	0,43	0,63	1,06	0,57	0,30	4,07	4,94	
I	14-5-73	0,48	0,55	1,03	0,63	0,30	4,07	5,00	
				$\bar{x}=1,45$				$\bar{x}=6,98$	

MEJILLONES "CAMBAJUS"

POLIGONO	FECHA	RESIDUOS EN p.p.b. ($\mu\text{gr}/\text{Kgr.}$)							PCB
		α -HCH	γ -HCH	DDT-total	pp'-DDDE	op'-DDT	pp'-DDT	DDT-total	
A	11-5-73	0,29	0,54	0,83	0,72	0,30	2,34	3,36	
B	16-5-73	0,42	0,57	0,99	0,45	0,30	2,72	3,02	
C	16-5-73	0,42	0,62	1,04	0,77	0,30	5,81	6,88	
D	16-5-73	0,54	0,62	1,16	1,34	0,30	13,52	15,16	
E	18-5-73	0,27	0,27	0,54	0,07	0,30	1,51	1,88	
F	25-5-73	0,33	0,64	0,97	0,63	2,27	6,02	8,92	
G	29-5-73	0,25	0,33	0,58	0,25	1,22	12,04	13,51	
H	29-5-73	0,24	0,52	0,76	0,29	0,30	2,09	2,68	
I	11-5-73	0,34	0,54	0,88	0,36	0,30	3,83	5,28	
				$\bar{x}=0,86$				$\bar{x}=6,74$	

MEJILLONES "CARAMINAL"

POLIGONO	FECHA	RESIDUOS EN p.p.b. ($\mu\text{gr}/\text{Kgr.}$)							
		α -HCH	γ -HCH	HCH-total	pp'-DDE	op'-DDT	pp'-DDT	DDT-total	PCB
A	30-3-73	0,24	0,33	0,57	0,42	0,30	2,03	2,75	
B	30-3-73	0,27	0,45	0,72	0,55	2,02	4,17	6,24	
C	30-3-73	0,32	0,56	0,88	0,77	1,13	5,12	7,02	
D	30-3-73	0,34	0,32	0,66	0,54	0,84	2,74	4,12	
E	3-4-73	0,35	0,47	0,82	0,53	0,30	3,12	3,95	
F	3-4-73	0,29	0,29	0,58	0,33	0,30	3,15	3,78	
G	3-4-73	0,37	0,32	0,69	0,57	0,30	2,67	3,54	
H	3-4-73	0,38	0,44	0,82	0,48	0,51	2,12	3,11	
I	13-4-73	0,51	0,53	1,04	0,61	0,30	2,44	3,35	
J	13-4-73	0,22	0,48	0,70	0,41	0,92	1,89	3,22	
K	13-4-73	0,26	0,32	0,58	0,65	1,43	5,61	7,69	
L	18-5-73	0,27	0,34	0,61	0,54	0,46	2,75	3,75	
				$\bar{x}=0,72$				$\bar{x}=4,37$	

MEJILLONES "EL GROVE"

POLIGONO	FECHA	RESIDUOS EN p.p.b. (µgr/Kgr.)							PCB
		o-HCH	γ-HCH	β-HCH	pp'-DDE	op'-DDT	pp'-DDT	DDT-total	
A	24-5-73	0,15	0,16	0,31	0,35	0,30	1,84	2,49	
B	24-5-73	0,24	0,27	0,51	0,62	0,20	1,91	2,53	
C	24-5-73	0,37	0,32	0,69	1,15	1,06	4,45	6,66	
D	24-5-73	0,33	0,45	0,78	0,74	0,30	4,47	5,51	
E	29-5-73	0,64	0,74	1,38	0,72	0,30	4,72	5,74	
F	29-5-73	0,38	0,66	1,04	0,49	0,30	4,15	4,94	
G	29-5-73	0,37	0,45	0,82	0,65	0,30	2,19	3,14	
H	29-5-73	0,31	0,52	0,83	0,34	0,30	2,07	2,71	
				$\bar{x}=0,79$				$\bar{x}=4,21$	

MEJILLONES "RIVEIRA"

POLIGONO	FECHA	RESIDUOS EN p.p.b. ($\mu\text{gr}/\text{Kgr.}$)							
		α -HCH	γ -HCH	HCH-total	pp'-DDE	op'-DDT	pp'-DDT	DDT-total	PCB
A		-	-	-	-	-	-	-	
B	18-5-73	0,37	0,45	0,82	0,07	0,30	28,02	28,39	
C	18-5-73	0,42	0,46	0,88	0,71	0,30	9,64	10,65	
				$\bar{x}=0,85$				$\bar{x}=19,52$	

AGUAS "RIOS"

RIO	FECHA	pH	C, δ 20°C (mmho)	RESIDUOS EN p.p.b. (μgr./litro)						
				α-HCH	γ-HCH	HCH-total	pp'-DDE	op'-DDT	pp'-DDT	DDT-total
ULLA (Catorra)	4-11-73	6,60	830	0,004	0,007	0,011	<0,001	<0,006	0,027	0,027
CON	4-11-73	6,50	210	0,005	0,010	0,015	0,003	0,008	0,026	0,037
UMIA	10-11-73	6,50	60	0,005	0,010	0,015	0,003	0,008	0,010	0,021
CHANCA	4-11-73	5,60	142	0,007	0,011	0,018	0,004	0,014	0,044	0,062
BEFUSO	17-11-73	6,50	58	0,003	0,008	0,011	0,002	0,008	0,010	0,020
CORONO	17-11-73	6,80	51	0,002	0,006	0,008	0,002	0,008	0,010	0,020
PEDRAS	17-11-73	6,50	53	0,004	0,009	0,013	0,004	0,008	0,013	0,025
BARBANZA	17-11-73	6,20	62	0,003	0,008	0,011	0,002	0,008	0,009	0,019
				$\bar{x}=0,012$					$\bar{x}=0,029$	

AGUAS "VILLAGARCIA"

POLÍGONO	FECHA	pH	C, á 20°C (mmho)	RESIDUOS EN p.p.b. (µgr./litro)							
				α-HCH	γ-HCH	HCH-total	pp'-DDE	op'-DDT	pp'-DDT	DDT-total	
A	4-10-73	7,7	49,0	0,002	0,002	0,004	0,004	0,008	0,008	0,008	0,020
B	4-10-73	7,7	48,0	0,002	0,003	0,005	0,002	0,008	0,008	0,070	0,080
C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D	4-10-73	7,5	47,5	0,004	0,006	0,010	0,002	0,008	0,022	0,032	
E	7-11-73	7,9	45,6	0,015	0,005	0,020	0,002	0,008	0,017	0,027	
F	11-10-73	7,9	47,5	0,003	0,006	0,009	0,002	0,008	0,063	0,073	
G	4-10-73	7,7	48,0	0,007	0,018	0,025	0,002	0,010	0,084	0,096	
H	11-10-73	7,9	47,5	0,007	0,014	0,021	0,004	0,008	0,052	0,064	
I	11-10-73	7,9	47,8	0,010	0,022	0,032	0,004	0,008	0,008	0,020	
						$\bar{x}=0,016$					$\bar{x}=0,051$

AGUAS "CAMBADOS"

POLIGONO	FECHA	pH	C, á 20°C (mMho)	RESIDUOS EN p.p.b. (mgr./litro)						
				p-hCH	p-ho	HCH total	pp'-DDE	op'-DDT	pp'-DDT	DDT-total
A	31-10-73	6,7	43,0	0,006	0,002	0,008	<0,001	<0,006	0,008	0,008
B	31-10-73	6,3	42,8	0,008	0,002	0,010	0,002	0,008	0,033	0,043
C	7-11-73	7,9	44,0	0,007	0,008	0,015	0,003	0,008	0,010	0,021
D	5-11-73	7,8	48,5	0,004	0,007	0,011	0,002	0,008	0,006	0,010

AGUAS "CARAMIÑAL"

POLIGONO	FECHA	pH	C, á 20°C (mmho)	RESIDUOS EN p.p.b. (µgr./litro)						
				α-HCH	γ-HCH	HCH-total	pp'-DDE	op'-DDT	pp'-DDT	DDT-tot. (1)
A	29-10-73	7,9	46,5	0,003	0,006	0,009	0,002	0,008	0,009	0,019
B	22-10-73	8,0	46,5	0,012	0,006	0,018	<0,001	<0,006	0,008	0,008
C	24-10-73	7,8	47,0	0,004	0,004	0,008	0,002	0,008	0,035	0,045
D	24-10-73	7,9	47,5	0,002	0,003	0,005	0,002	0,008	0,017	0,027
E	24-10-73	7,8	47,5	0,001	0,002	0,003	0,002	0,008	0,014	0,024
F	22-10-73	7,9	45,8	0,003	0,004	0,007	0,002	0,009	0,030	0,041
G	22-10-73	7,8	46,5	0,003	0,019	0,022	0,001	0,050	0,008	0,058
H	22-10-73	7,7	46,5	0,005	0,006	0,011	0,002	0,009	0,027	0,038
I	17-10-73	7,6	34,5	0,004	0,014	0,018	0,002	0,008	0,008	0,018
J	17-10-73	6,7	33,8	0,008	0,008	0,016	0,003	0,008	0,012	0,023
K	17-10-73	7,6	35,8	0,002	0,003	0,005	0,003	0,013	0,039	0,055
L	29-10-73	7,9	47,0	0,003	0,006	0,009	0,002	0,008	0,009	0,019
						$\bar{x}=0,011$				$\bar{x}=0,031$

AGUAS "EL GROVE"

POLIGONO	FECHA	pH	Ca 20°C (mmho)	RESIDUOS EN p.p.b. (mgr./litro)						
				-HACH	-HCH	HCH-total	pp'-DDF	op'-DDT	pp'-DDT	DDT-total
A	12-11-73	7,9	43,5	0,005	0,006	0,011	0,002	0,008	0,008	0,018
B	12-11-73	7,9	44,0	0,005	0,008	0,013	0,002	0,008	0,008	0,018
C	14-11-73	7,9	46,5	0,002	0,005	0,007	0,002	0,008	0,008	0,018
D	14-11-73	7,8	47,0	0,002	0,002	0,004	0,002	0,008	0,008	0,018
E	14-11-73	7,8	47,0	0,005	0,005	0,010	0,002	0,008	0,008	0,018
F				-	-	-	-	-	-	-
G	27-11-73	7,9	47,1	0,005	0,005	0,010	0,002	0,008	0,008	0,018
H	27-11-73	8,0	47,0	0,003	0,008	0,011	0,002	0,008	0,008	0,018
						$\bar{x}=0,009$				$\bar{x}=0,018$

POLIGONO	FECHA	pH	C, a 20°C (mMho)	RESIDUOS EN p.p.b. (µgr./litro)							
				α-HCH	γ-HCH	HCH-total	pp'-DDE	pp'-DDT	pp'-DDT	DDT-total	
A				-	-	-	-	-	-	-	-
B	19-11-73	7,9	46,0	0,003	0,007	0,010	0,002	0,008	0,008	0,008	0,018
C	19-11-73	7,9	46,0	0,002	0,004	0,006	<0,001	0,006	0,006	0,006	NE
						$\bar{x}=0,08$					$\bar{x}=0,018$

MEJILLONES "VILLAGARCIA"

POLIGONO	FECHA	RESIDUOS EN P.P.B. (µgr/Kgr.)									
		α-HCH	γ-HCH	β-HCH	ΣDDE	ΣDDT	ΣDDE	ΣDDT	DDT-total	PCB	
A	4-10-73	0,30	0,36	0,66	0,40	0,30	2,20	2,90	14,6		
B	4-10-73	0,15	0,18	0,33	0,24	0,30	0,60	1,14	7,2		
C		-	-	-	-	-	-	-	-		
D	4-10-73	0,30	0,32	0,62	0,60	1,10	4,80	6,50	24,5		
E	7-11-73	0,30	0,28	0,58	0,48	0,35	3,63	4,46	24,5		
F	11-10-73	0,10	0,26	0,36	0,20	0,30	0,70	1,20	5,7		
G	4-10-73	0,30	0,27	0,57	0,38	0,35	2,23	2,96	18,7		
H	11-10-73	0,30	0,63	0,93	0,49	0,30	1,60	2,39	10,4		
I	11-10-73	0,40	0,75	1,15	0,35	0,40	3,90	4,65	24,5		
				$\bar{x}=0,65$				$\bar{x}=3,27$			

MEJILLONES "CAMBADOS"

POLIGONO	FECHA	RESIDUOS EN p.p.b. ($\mu\text{gr}/\text{Kgr.}$)							
		α -HCH	γ -HCH	HCH-total	pp'-DDE	op'-DDT	pp'-DDT	DDT-total	PCB
A	31-10-73	0,16	0,18	0,34	0,23	0,30	0,90	1,43	10,6
B	5-11-73	0,35	0,74	1,09	0,33	0,30	2,33	2,96	22,7
C	7-11-73	0,23	0,23	0,46	0,27	0,30	1,75	2,32	12,3
D	5-11-73	0,34	0,34	0,78	0,32	0,30	1,90	2,52	12,3
E	5-11-73	0,56	0,56	1,12	0,36	0,40	2,96	3,72	18,6
F	7-11-73	0,35	0,40	0,75	0,28	0,30	1,75	2,33	18,0
G	12-11-73	1,55	2,30	3,85	0,62	0,30	4,98	5,90	24,5
H	-	-	-	-	-	-	-	-	-
I	12-11-73	0,42	0,50	0,92	0,30	0,30	0,90	1,50	10,6
				$\bar{x}=1,16$				$\bar{x}=2,83$	

MEJILLONES "CARAMIÑAL"

POLIGONO	FECHA	RESIDUOS EN P.P.b. ($\mu\text{gr}/\text{Kg}$.)							PCB
		α -HCH	γ -HCH	DDT-total	pp'-DDE	op'-DDT	pp'-DDT	DDT-total	
A	29-10-73	0,20	0,20	0,40	0,30	0,30	0,80	1,40	7,2
B	29-10-73	0,22	0,25	0,47	0,24	0,30	0,90	1,44	7,2
C	24-10-73	0,40	0,40	0,80	0,55	0,40	3,27	4,22	18,6
D	24-10-73	0,33	0,47	0,80	0,50	0,50	4,83	5,83	18,6
E	24-10-73	0,27	0,39	0,66	0,36	0,40	3,40	4,16	20,2
F	22-10-73	0,40	0,43	0,83	0,66	0,40	3,40	4,54	24,5
G	22-10-73	0,30	0,33	0,63	0,23	0,30	0,80	1,43	18,6
H	22-10-73	0,24	0,24	0,48	0,28	0,30	1,70	2,28	12,7
I	17-10-73	0,30	0,30	0,60	0,32	0,30	1,60	2,22	10,4
J	17-10-73	0,31	0,31	0,62	0,27	0,30	1,50	2,07	7,2
K	17-10-73	0,15	0,17	0,32	0,28	0,30	1,30	1,88	5,3
L	29-10-73	0,33	0,51	0,84	0,50	0,50	5,36	6,36	24,5
				$\bar{x}=0,62$				$\bar{x}=3,15$	

POLIGONO	FECHA	RESIDUOS EN p.p.b. (ugr/fer.)							
		α -HCH	γ -HCH	HCH-total	pp'-DDE	op'-DDT	pp'-DDT	DDT-total	PCB
A	12-11-73	0,19	0,28	0,47	0,30	0,30	1,50	2,10	12,1
B	12-11-73	0,35	0,23	0,58	0,46	0,30	3,67	4,43	24,1
C	14-11-73	0,30	0,33	0,63	0,35	0,30	2,74	3,39	18,4
D	14-11-73	0,10	0,25	0,35	0,07	0,20	0,30	0,37	NM
E	14-11-73	0,10	0,10	0,20	0,15	0,30	1,20	1,6	6,6
F		-	-	-	-	-	-	-	-
G	27-11-73	0,15	0,25	0,40	0,28	0,30	0,85	1,43	8,3
H	27-11-73	0,20	0,24	0,44	0,30	0,30	1,20	1,80	8,3
				$\bar{x}=0,43$				$\bar{x}=2,16$	

MEJILLONES "RIVEIRA"

POLIGONO	FECHA	RESIDUOS EN p.p.b. ($\mu\text{gr}/\text{Kgr.}$)							PCB
		α -HCH	γ -HCH	pp'-total	pp'-DDE	op'-DDT	pp'-DDT	DDT-total	
A		-	-	-	-	-	-	-	-
B	19-11-73	0,30	0,33	0,63	0,40	0,30	2,86	3,56	18,6
C	19-11-73	0,30	0,32	0,62	0,32	0,30	2,15	2,77	18,6
				$\bar{x}=0,62$				$\bar{x}=3,16$	

OTROS MOLUSCOS "RIA DE AROSA"

ESPECIE y LOCALIZACION	FECHA	RESIDUOS EN p.p.b. (μ gr./Kg.)							
		α -HCH	γ -HCH	HCH-total	pp'-DDE	op'-DDT	pp'-DDT	DDT-total	PCB
BERBERECHO "El Sarrido" (Cambados)	31-10-73	0,29	0,29	0,58	0,25	0,30	0,90	1,45	25,0
ALMEJA "Bao" (Cambados)	30-10-73	0,12	0,19	0,31	0,20	0,30	0,30	0,80	8,6
BERBERECHO "Bao" (Cambados)	30-10-73	0,12	0,14	0,26	< 0,05	0,30	0,30	0,60	NM

IV.- CONCLUSIONES

- 1.- Se expone un procedimiento de extracción, purificación y análisis de multiresíduos (pesticidas clorados, fosforados y policlorobifenilos) a muestras de agua de río, agua de mar y moluscos que se considera óptimo en el análisis de estos contaminantes.
- 2.- Se considera indispensable para la identificación y confirmación de residuos de pesticidas y PCB, las pruebas siguientes:
 - a) Respuesta al detector de ionización de llama de hidrógeno, al detector de captura de electrones y al detector termoiónico de cloruro potásico.
 - b) El tiempo de retención relativo al Aldrín, en las columnas de DC-200 y DC-200+QF-1
 - c) Su presencia en el primer o segundo eluato de la purificación mediante florisisil.
 - d) La razón de distribución entre dos disolventes no miscibles o p-Valor. Esta confirmación solamente es aplicable en muestras de agua
 - e) La modificación o persistencia a la potasa metanólica, que permite identificar y valorar residuos de HCH y DDT, incluso en mezclas con policlorobifenilos.

f) La alteración o permanencia al ácido crómico que posibilita confirmar y determinar residuos de pp'-DDE.

3.- Con los mencionados criterios se pone de manifiesto en aguas de río y de mar, residuos de α y γ -HCH, pp'-DDE, op'-DDT y pp'-DDT. No logrando detectar en estas muestras residuos de PCB ni pesticidas fosforados.

4.- En moluscos además de α y γ -HCH y pp'-DDE y los isómeros del DDT, se ha podido evidenciar la presencia de policlorobifenilos.

5.- El nivel de residuos de pesticidas y policlorobifenilos está comprendido entre los extremos siguientes:

	HCH(ppb)		DDT(ppb)		PCB(ppb)	
	mín.	máx.	mín.	máx.	mín.	máx.
1er Semestre. Aguas río	0,010	0,059	0,008	0,030	No detectados.	
2° Semestre	0,008	0,018	0,019	0,062	" "	
1er Semestre Aguas mar	0,003	0,062	0,008	0,106	" "	
2° Semestre	0,003	0,032	0,008	0,096	" "	
1er Semestre Mejillones	0,31	3,75	1,88	28,39	No determinados.	
2° Semestre	0,20	3,85	0,37	6,50	2,0	24,5

- 6.- De la distribución de resultados por la frecuencia de aparición y del correspondiente estudio estadístico, se deduce:
- a) Los residuos de HCH han experimentado una ligera evolución a valores más bajos en las aguas de río y de mar, no encontrándose diferencias significativas en mejillones a lo largo de 1.973.
 - b) Los residuos de DDT, han sufrido una evolución ligeramente ascendente en aguas de río y de mar, con diferencias significativas solo en las aguas de río. En tanto que en los mejillones existen diferencias significativas con tendencia descendente.
 - c) Los residuos de policlorobifenilos determinados cuantitativamente solo en el segundo semestre permiten observar una distribución de frecuencias muy agrupada.
- 7.- Los resultados hallados para el DDT parecen tener una cierta relación con los residuos de policlorobifenilos, lo que probaría una fuente lejana de contaminación, aunque ello no parezca coincidir con los valores más altos encontrados en las aguas de río, que será explicable por su larga persistencia en el suelo.

8.- Finalmente de los promedios de los resultados se puede observar que la concentración de HCH en mejillones es de 50 á 60 veces el valor encontrado para las aguas y de 100 á 300 veces en el caso de residuos de DDT.

V.- BIBLIOGRAFIA

- 1.- CHARRO, A., SIMAL, J. y CREUS, J.M^a (1.966).- *Anales Real Academia de Farmacia* 32, 131.
- 2.- CHARRO, A., SIMAL, J. y CREUS, J.M^a (1.967).- *La seguridad en los trabajos agrícolas. Ministerio de Trabajo* 135.
- 3.- CHARRO, A., CREUS, J.M^a y SIMAL, J (1.970).- *Anales de Bromatología*, XXII, 273.
- 4.- SIMAL, J., CREUS, J.M^a, CHARRO, A., BOADO, M^a A., DIAZ, P. y VILAS, D. (1.971).- *Anales de Bromatología*, XXIII., 1.
- 5.- FAO.- *Informe de la reunión conjunta FAO/OMS. (1.970) Roma 1.972.*
- 6.- U.S. Department of Health, Education and Welfare. Food and Drug Administration. Puesto al día.-*Pesticide Analytical Manual*, Vols. I y II.
- 7.- LICHTENSTEIN, E.P., SCHULZ, K.R., FUHREMANN, T.W. y LIANG, T.T. (1.969).- *J. Econ. Entomol.*, 62, 761.

- 8.- MOILANEN, K.W. y CROSBY, D.G. (1.973).- *165th Meeting, Amer. Chem. Soc., Dallas, Texas, April 10.*
- 9.- MISKUS, R. (1.964).- *Analytical Methods for Pesticides Plant Growth Regulators and Food Additives.* Ed. Gunter Zweig, Vol. II. Academic Press-Londres-New York.
- 10.- NISHIZUMI, M. (1.970).- *Arch. Environ. Health, 21, 620.*
- 11.- McCUNE, E.L., SAVAGE, J.E. y O'DELL, B.L. (1.962).- *Poultry Sci. 41, 295.*
- 12.- FLICK, D.F., DOUGLASS, C.D. y GALLO, L. (1.963).- *Poultry Sci. 42, 855.*
- 13.- BITMAN, J. y CECIL, H.C. (1.970).- *J. Agr. Food Chem. 18, 1108.*
- 14.- RISEBROUGH, R.W., REICHE, P., PEAKALL, D.B., HERMAN, S.G. y KIRVEN, M.N. (1.968).- *Nature, 220, 1098.*
- 15.- WARE, Q.W. y ROAN, C.C. (1.970).- *Residue Reviews, Vol. 33, Ed. Gunther F.A. Springer-Verlag. Berlin, 15.*
- 16.- HICKEY, J.J., KEITH, J.A. y COON, F.B. (1.966).- *J. Applied Ecol. 3 (Suppl) 141.*
- 17.- BUTLER, P.A. (1.966).- *J. Appl. Ecol. 3 (Suppl) 253-254.*

- 18.- BUTLER, P.A. (1.967).- *Proc. Marsh Estuary Mit. Symp.*
120.
- 19.- GREGORY, W.W., Jr., REED, J.K. y PRIESTER, L.E., Jr.
(1.969).- *J. Protozool.*, 16, 69.
- 20.- BUTLER, P.A. (1.969).- *Monitoring Pesticide Pollution.*
Bioscience, 19 (10), 889-891.
- 21.- LOOSANOFF, V.L. (1.974).- *Fishing Gaz*, 64, (4) , 94.
- 22.- LOOSANOFF, V.L., HANKS, J.E. y GANAROS, A.E. (1.957).-
Science, 125, 1092.
- 23.- FAO.- *La contaminación.* Roma 1.971.
- 24.- DAVIS, H.C. (1.961).- *Commercial Fisheries Rev.* 23,
(12), 8.
- 25.- BUTLER, P.A. y SPRINGER, P.F. (1.964).- *Trans. 28th.*
N. Am. Wildlife Natural Resources Conf. 1964, pp. 387
390.
- 26.- BURDICK, G.E., HARRIS, E.J., DEAN, H.S., WALKER, T.M.,
SKEA, J. y COLBY, D. (1.964). *Trans. Am. Fish. Soc.*
93 (2), 127.
- 27.- BUTLER, P.A. (1.965).- *U.S. Fish. and Wildlife Servi-*
ce, p. 65 Washington, D.C. Circular n 226.

- 28.- BUTLER, P.A. (1.966).- *Trans. 31 st North Am. Wild. Nat. Resour. Conf.*
- 29.- WUTSTER, C.F. Jr. (1.968).- *Science*, 159 (3822), 1474.
- 30.- BUTLER, P.A. (1.968).- *Proc. Mats. Estuary Manage Symp.*, La State Univ., Baton Rouge, La, July 19-20, 1967.
- 31.- BUTLER, P.A. (1.973).- *Pesticides Monitoring Journal* 6 (4), 239
- 32.- JENSEN, S. (1.966).- *New Scientist*. 32. 612.
- 33.- BIROS, F.J., WALKER, A.C. y MEDBURY, A. (1.970).- *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 5, 317.
- 34.- RISEBROUGH, R. y BRODINE, V. (1.970) *Environnement* 12, 16.
- 35.- WESTOO, G., NOREN, K. y ANDERSON, M (1.970).- *Vat Fo da*, 2-3 , 10.
- 36.- GOODWIN, E.S., GOULDEN, R. y REYNOLDS, J.G. (1961).- *Analyst*, 86, 697
- 37.- CASSIL, C.C. (1.962).- *Residue Reviews* 1.- F.A. Gunther ed. Springer Berlin, p. 37.

- 38.- GUTENMANN, W.H. y LISK, D.J. (1.963).- *J. AOAC*, 11, 301.
- 39.- SCHWARTZ, N., GAFFNEY, H.E., SCHMUTZER, M.S. y STEFANO, F.D. (1.963).- *J. AOAC*, 46, 893.
- 40.- MILLS, P.A., ONLY, J.H. y GAITHER, R.A. (1.963).- *J. AOAC*, 46, 186.
- 41.- ONLY, J.H. (1.964).- *J. AOAC*, 47, 317.
- 42.- FREDEEN, F.J.H. y DUFFY, J.R. (1.970).- *Pesticides Monitoring Journal* 3(4), 219.
- 43.- NELSON, R.C. (1.964).- *J. AOAC*, 47, 289.
- 44.- LICHTENSTEIN, E.P., MYRDAL, G.R. y SCHULZ, K.R. (1.964).- *J. Econ. Entomol.* 57, 133.
- 45.- MOUBRY, R.S., HELM, J.M. y MYRDAL, G.R. (1.968) - *Pesticides Monitoring Journal*, 4 , 27
- 46.- PENNELL, J.T., MISKUS, R. y GRAIG, R. (1 964) - *Bull. World Health Organ.*, 30, 91.
- 47.- COAKLEY, J.E., CAMPBELL, J.E. y McFARREN, E.F. (1964) - *J. Agr. Food Chem.* 12 , 262.

- 48.- LAMAR, W.L., GOERLITZ, D.F. y LAW, L.M. (1.965).- U. S. Geol. Surv. Water-Supply Paper 1817-B.
- 49.- BERTUZZI, P.F., KAMPS, L. MILES, C.I. y BURKE, J.A. (1.967).- J. AOAC, 50, 623.
- 50.- BURKE, J.A. y PORTER, M.L. (1.967).- J. AOAC 50, 1260.
- 51.- WELLS, C.E. (1.967).- J. AOAC. 50, 1205.
- 52.- WILDERMAN, M. y SHUMAN, H. (1.968).- J. AOAC, 51, 892.
- 53.- WESSELS, J.R. (1.969) - J. AOAC. 52, 172
- 54.- MUMMA, R.O., WHEELER, W.B., FREAR, D.E. y HAMILTON, R.H. (1.966).- Science, 152, 530.
- 55.- *Federal Water Pollution Control Administration*. Department of the Interior U.S. (1.969).
- 56.- MARSTON, R.B., TYO, R.M. y MIDDENDORFF, S.C. (1.969).- *Pesticides Monitoring Journal*, 2, 167.
- 57.- PORTER, M.L., YOUNG, S.J.V. y BURKE, J.A. (1.970) - J. AOAC, 53, 1300.
- 58.- STORHERR, R.W., OTT, P. y WATTS, R.R. (1.971).- J. AOAC, 54(3), 513.

- 59.- JONES, L.R. y RIDDICK, J.A. (1.952).- *Anal. Chem.* 24, 569.
- 60.- BURCHFIELD, H.P. y STORRS, E.C. (1.953).- *Contribs Boyce Thompson Inst.* 17, 333.
- 61.- LAWS, E.Q. y WEBLEY, D.J. (1.961).- *Analyst* 86, 249.
- 62.- *Cromatografía*.- Edgar Lederer y Michael Lederer Ed. "El Ateneo". Buenos Aires (1.960).
- 63.- DE FAUBERT MAUNDER, M.J., EGAN, H., GODDY, E.W., HAMMOND, E.W., ROBURN, J. y THOMPSON, J. (1.964).- *Analyst*, 89, 168.
- 64.- EGAN, H., HAMMOND, E.W. y TOMPSON, J. (1.964).- *Analyst*, 89, 175.
- 65.- HAMENCE, J.H., HALL, P.S. y CAVERLY, D.J. (1.965).- *Analyst*, 90, 649.
- 66.- BOYLE, H.W., BURTTSCHELL, R.H. y ROSEN, A.A. (1.965).- *Presented 150th Meeting Amer. Chem. Soc., Sept. 12-17, Atlantic. City, New Jersey.*
- 67.- BREWERTON, H.V. y McGrath, H.J.W. (1.964).- *J. Science*, 7, 452.

- 68.- KADOUM, A.M. (1.968).- *Bull. Environ. Contamination Toxicol.*, 3, 65.
- 69.- LAWS, E.Q. y WEBLEY, D.J. (1.959).- *Analyst*, 84, 25.
- 70.- GETZ, M.E. (1.962).- *J.AOAC*, 45, 393.
- 71.- WATTS, R.R., STORHERR, R.W., PARDUE, J.R. y OSGOOD, T. (1.969).- *J.AOAC*, 52, 522.
- 72.- BROCKMANN, H. (1.949).- *Discussions Faraday Soc.* 7, 58.
- 73.- FAHEY, J.E., BUTCHER, J W. y MURPHY, P.T. (1.965).- *J. Econ Entomol.* 58 , 1026.
- 74.- ORDAS, N.P., SMITH, V.C. y MEYER, C.F (1.965).- *J. AOAC*, 4, 444.
- 75.- LICHTENSTEIN, E.P. y SCHULZ, K.R. (1.959).- *J. Econ Entomol.* 52, 118.
- 76.- MILLS, P.A. (1.959).- *J. AOAC*, 42, 734.
- 77.- MCKINLEY, W.P. y MAHON, J H. (1.959).- *J. AOAC*, 42, 725.
- 78.- MODDES, R. (1.961).- *J. AOAC*, 44, 158

- 79.- JOHNSON, L.Y. (1.962).- J. AOAC, 45, 363.
- 80.- MOATS, W.A., (1.963).- J. AOAC, 46, 172.
- 81.- LANGLOIS, B.E., STEMP, A.R. y LISKA, B.J. (1.964).-
J. Agri. and Food Chem. 12, 243.
- 82.- BURKE, J.A. y MALONE, B. (1.966).- J. AOAC, 49, 1003.
- 83.- PORTER, M.L., BURKE, J.A. y BERTUZZI, P.F. (1.967).-
J. AOAC, 50, 644.
- 84.- WESSEL, J.R. (1.967).- J. AOAC, 50, 450.
- 85.- MILLS, P.A. (1.968).- J. AOAC, 51, 29.
- 86.- WIENCKE, W.W. y BURKE, J.A. (1.969).- J. AOAC, 52 (6),
1277.
- 87.- GAUL, J.A. (1.966).- J. AOAC, 49, 389.
- 88.- HALL, E.T. (1.971).- J. AOAC, 54, (6) 1349.
- 89.- HOLMES, D.C., SIMMOS, J.H. y TATTON, J.O'G. (1.967).-
Nature, 216, 227.
- 90.- HOLDEN, V.V. y MARSDEN, K. (1.967).- *Nature*, 216,
1274.

- 91.- KOEMAN, J.H., TEN NOEVER DE BRAU, M.C. y DE VOS, R.H.
(1.969).- *Nature*, 221, 1126.
- 92.- KLEIN, A.K. y WATTS, J.O. (1.964).- *J. AOAC*, 47, 311.
- 93.- DUFFY, J.R. y WONG, N. (1.967):- *J. Agrí. Food Chem.*
15, 457.
- 94.- JENSEN, S. y WIDMARK, G. (1.967).- *Swedish Report of
the OECD pesticide conference on "Unintended residues
in the enviroment"*.
- 95.- BALUJA, G., CASTRO, S., FRANCO, J.M. y MURADO, M.A.
(1.971).- *Agroquímica y Tecnología de Alimentos*, 11,
(2), 260.
- 96.- U.S. Department of Health, Education and Welfare,
Food and Drug Administration, (1.968). *Pesticide Ana-
lytical Manual*, vol. 1 Sect. 211-16d.
- 97.- NOREN, K. (1.968).- *Analyst*, 93, 39.
- 98.- HALLER, H.L., BARTLETT, P.D., DRAKE, N.L., NEWMAN,
M.S., CRISTOL, S.J., EAKER, C.M., HAYES, R.A., KILMER,
G.W., MAGERLEIN, B., MUELLER, G.P., SCHNEIDER, A. y
WHEATLEY, W. (1.945).- *J. Amer. Chem. Soc.* 67, 1591.
- 99.- MILES, J.R.W. (1.972).- *J. AOAC*, 55 (5) 1039.

- 100.- REYNOLDS, L.M. (1.969).- *Bull. Environ Contamination Toxicol.* 4, 128.
- 101.- ARMOUR, J.A. y BURKE, J.A. (1.970).- *J. AOAC* 53, 761.
- 102.- LEONI, V. (1.971).- *Chromatogr.* 62, 63.
- 103.- SNYDER, D. y REINERT, R. (1.971).- *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 6 (5) 385.
- 104.- GIAM, C.S., HANKS, A.R. RICHARDSON, R.L., SACKETT, W.M. y WONG, M.K. (1.972).- *Pesticides Monitoring Journal*, 6 (3) 139.
- 105.- BEROZA, M. y BOWMAN, MC. (1.965).- *J. AOAC*, 48, 358.
- 106.- BEROZA, M., JOSCO, M.N. y BOWMAN, MC. (1.969).- *Residue Reviews*, 30, 1.
- 107.- CREUS, J.M. (1.970).- *Tesis doctoral*.- Facultad de Farmacia. Universidad de Santiago.
- 108.- SAAVEDRA, M.J. (1.969).- *Tesina*.- Facultad de Farmacia. Universidad de Santiago.
- 109.- GAJAN, R.J. (1.963).- *J. AOAC*, 46, 216.
- 110.- DIMBAT, M., PORTER, P.E. y STROSS, F.H. (1.956).- *Anal. Chem.* 28, 296.

- 111.- FREDERICKS, E.M. y BROOKS, F.R. (1.956).- *Anal. Chem.* 28, 301.
- 112.- BARTLET, J.C. y SMITH, D.M. (1.960).- *J. Chem.*, 38, 2057.
- 113.- IVERSON, J.L. (1.963).- *J. AOAC*, 46 (4), 718
- 114.- DAL NOGARE, M. y JUVET, R.S. Jr. (1.962).- *Gas-Liquid Chromatography*, Interscience Publishers, Inc. New York.
- 115.- BURKE, J.A. (1.965).- *J. AOAC*, 48, 1037.
- 116.- BARRY, H.C., HUNDLEY, J.C. y JOHNSON, L.Y. (1.965).- *Pesticide Analytical Manual* 2. 32 (A), Vol. I.- U.S. Department of Health Education and Welfare, Food and Drug Administration. Washington, DC. 202.04.
- 117.- GAUL, J.A. (1.966).- *J. AOAC*, 49, 389.
- 118.- JENNINGS, R.W., JUE, D.L. y SUGGS, J.E. (1.970).- *Chromatographie*, 3, 353.
- 119.- DIAZ, R.- *Tesis doctoral en preparación.*
- 120.- U.S. Department of Health Education and Welfare. Food and Drug Administration (1.968).- *Pesticide Analytical Manual*, Vol. I, Sec. 212, 13a.

- 121.- U.S. Department of Health Education and Welfare.
Food and Drug Administration (1.968).- *Pesticide
Analytical Manual*, Vol. I. Tabla 311, 5A.
- 122.- BOWMAN, M.C. y BEROZA, M. (1.965).- *J. AOAC*, 48,
943.
- 123.- BOWMAN, M.C. y BEROZA, M. (1.966).- *Anal. Chem.*
38, 1427.
- 124.- SANS, W.W. (1.967).- *J. Agri. Food Chem.* 15, 192.
- 125.- CARRASCO, J.M^a, CUÑAT, P., MARTINEZ, M. y PRIMO,
E. (1.972).- *Agroquímica y Tecnología de Alimen-
tos* 12 (3), 463.