

"Año del Bicentenario del Perú: 200 años de Independencia"

FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍA

Análisis de plaguicidas en café verde por cromatografía de gases



Integrantes:

- ❖ Aldana Palomino, Ana Cristina
- ❖ Arismendiz Millones, Jennyfer Arantxa
- ❖ Jean Pierre Matias Rodriguez
- ❖ Hans Tommy Navarro Chancan
- ❖ Melgarejo Castillo Joseph Jesus
- ❖ Coaguila Sofía

Docentes:

- ❖ Castañeda Santa Cruz, Elisa
- ❖ Chalco Tomaylla, Natali Rosi
- ❖ Garambel Vilca, Edson Emilio
- ❖ Valenzuela Barrientos, Wilner

Índice

1. Introducción
2. Fundamento teórico
 - 2.1 Descripción sobre la técnica fundamental
 - 2.2 Componentes del equipo
 - 2.3 Limitaciones del método
 - 2.4 Posibles interferentes
 - 2.5 Límite de detección y límite de cuantificación
 - 2.6 Variables analíticas mencionadas en el artículo
 - 2.6.1 Robustez
3. Descripción de método analítico
 - 3.1 Materiales y métodos
 - 3.2 Preparación de la muestra blanco
 - 3.3 Plaguicidas
 - 3.4 Procedimiento
 - 3.4.1 Extracción
 - 3.4.2 Partición
 - 3.4.3 Limpieza
4. Cálculos
5. Aplicaciones
6. Referencias bibliográficas

1. Introducción:

La primera aplicación de una técnica cromatográfica se debe a Tswett en 1906 que utilizó una columna de aluminio para separar los pigmentos coloreados de las hojas. Desde entonces, permaneció ignorada, hasta que, en 1931 fue redescubierta por Kuhn. Los primeros en utilizar un gas como fase móvil en una separación cromatográfica fueron James y Martin en 1952 para separar ácidos grasos de cadena corta.

En la cromatografía de gases los componentes de una muestra vaporizada se separan como consecuencia del reparto entre una fase móvil gaseosa y una fase estacionaria contenida en una columna. La elución se lleva a cabo mediante el flujo de una fase móvil de gas inerte, cuya única función es transportar las moléculas de analito, ya que no interactúa con ellas. Distinguimos dos tipos de cromatografía de gases (CG), según sea la fase estacionaria:

Cromatografía gas-líquido (CGL): La fase estacionaria es un líquido inmovilizado sobre la superficie de un relleno sólido inerte o sobre las paredes de un tubo capilar. Es una herramienta rutinaria y de gran aplicación en todos los campos de la ciencia. Es a la que hacemos referencia habitualmente cuando hablamos de cromatografía de gases.

Cromatografía gas-sólido (CGS): La fase estacionaria es sólida y la retención de los analitos se produce por adsorción. Como el proceso de adsorción no es lineal, los picos cromatográficos presentan colas pronunciadas y no tienen mucha aplicación.

Métodos de la separación de la cafeína:

La cromatografía no solo permite la separación de los componentes de una mezcla, sino también su identificación y cuantificación. El análisis cualitativo está basado en la medida de parámetros cromatográficos (tiempos y volúmenes de retención) mientras que el análisis cuantitativo está basado en la medida de alturas o áreas de

picos cromatográficos que se relacionan con la concentración. La columna cromatográfica y la forma con la que se diseña, constituye el corazón de la separación. El detector, situado al final de la columna es el que garantiza la respuesta de los componentes que se separan. La determinación de la cafeína se suele llevar a cabo mediante técnicas de separación como HPLC (Cromatografía líquida de alta eficiencia), CE (Electroforesis capilar), TLC (Cromatografía de capa fina) o GC (Cromatografía de gases). Estos métodos realizan la detección mediante técnicas electroquímicas (potenciométricas, conductimétricas, amperométricas, etc.), ópticas (espectrofotométricas, fluorimétricas, etc.) y otras (termoquímicas). La elección de una u otra técnica depende del problema a resolver, del volumen de muestra y de su concentración.

2. Fundamento teórico que describa la técnica instrumental:

2.1. Descripción sobre la técnica instrumental.

La cromatografía de gases (GC) es una técnica analítica de uso muy extendido. Empleado para determinar la composición de una mezcla de productos químicos, un cromatógrafo de gases utiliza diversos gases en su operación en función del analizador y del tipo de detector concretos. El uso del gas especial y el equipo correctos cuando realice una cromatografía de gases mejorará considerablemente la precisión de sus resultados analíticos.

2.2. Componentes del equipo

-Fuente de Gas: Los gases más usados son helio, argón, nitrógeno e hidrógeno. El gas suele venir determinado por el tipo de detector que se va a emplear. Con ese suministro de gas portador van asociados reguladores de presión, manómetros y medidores de flujos.

-Sistema de inyección: Para que la separación sea eficaz es necesario un sistema que permita la introducción de una muestra de tamaño adecuado de forma rápida. La introducción de muestras grandes o demasiado lentamente provoca la aparición de bandas anchas lo que se traduce en una resolución pobre. El método más sencillo de introducción de la muestra es el empleo de una microjeringa.

-Horno y Columna cromatográfica: El horno de un cromatógrafo de gases, tiene como misión principal mantener la columna termostaticada a una temperatura fijada con gran

precisión, además, es necesario que el control de termostatación del horno permite incrementar la temperatura de este a una velocidad prefijada y constante. La columna cromatográfica se encuentra en el interior de un horno termostaticado, ya que la temperatura es una variable crucial en las separaciones por cromatografía de gases. La temperatura afecta al equilibrio de distribución de los analitos entre la fase móvil y estacionaria. Cuando la columna se acelera la elución. La temperatura óptima refleja un equilibrio entre la consecuencia de la resolución necesaria y la velocidad de la separación.

-Sistema de detección: El detector es el sistema encargado de poner de manifiesto la presencia de solutos que salen de la columna cromatográfica. Se han usado muchos detectores. Las características un detector ideal en cromatografía de gases son:

- Adecuada sensibilidad
- Buena estabilidad y reproducibilidad
- Respuesta Lineal en un intervalo amplio de concentración
- Amplio intervalo de temperatura de trabajo
- Tiempo de respuesta corto

2.3. Limitaciones del método

La cromatografía de gases es probablemente la técnica de más amplia utilización; ninguna técnica analítica puede ofrecer su capacidad de separación o su sensibilidad a la hora de analizar compuestos volátiles. Por otra parte, el hecho de que con esta técnica las mezclas sean separadas en fase gaseosa, establece los límites de su utilización, que estarán marcados fundamentalmente por la estabilidad térmica de los compuestos a separar. Por lo general, la utilización de la cromatografía de gases está restringida a la separación de compuestos con un peso molecular menor de 1000 a una temperatura máxima de trabajo de aproximadamente de 400 C; dentro de estos límites, como ya se ha mencionado, la única limitación existente será la estabilidad térmica de la muestra.

2.4. Posibles interferentes

- Temperatura de la columna: Una temperatura de columna excesivamente alta da como resultado un tiempo de retención muy corto, como resultado la separación es muy pobre, esto se debe a que los componentes permanecen principalmente en la fase gaseosa.

- Caudal del gas portador: Un caudal elevado reduce los tiempos de retención, de esta manera se puede obtener una mala separación.
- Longitud de la columna: Al aumentar la longitud de la columna se mejora la separación de componentes, al igual que si se disminuye la longitud se acorta el tiempo de retención y la separación tiende a ser errónea.
- Presión de vapor: Cuando el punto de ebullición de un compuesto es bajo, mayor es la presión de vapor y el tiempo de retención se acorta, así el compuesto pasará más tiempo en la fase gaseosa.

2.5. Límites de detección y límite de cuantificación

Los límites de detección(LOD) y los límites de cuantificación(LOQ) se calcularon teniendo en cuenta 3 y 10 veces el ruido de la matriz blanco respectivamente (9). El experimento se realizó con cinco réplicas. La Tabla 5 presenta los valores correspondientes para cada uno de los plaguicidas en mg/kg, los cuales se verificaron experimentalmente. Estos resultados muestran que el método propuesto en este trabajo es apropiado para determinar residuos de plaguicidas al nivel de los LMR.

Plaguicida	Detector	LOD (mg/kg)	LOQ (mg/kg)	LMR* (mg/kg)
Diclorvos	NPD	0,017	0,056	
Dimetoato	ECD	0,022	0,074	
Dimetoato	NPD	0,031	0,062	
γ -HCH	ECD	0,004	0,013	
Clorotalonil	ECD	0,003	0,011	0,20
Fenitrothion	NPD	0,009	0,029	
Fenitrothion	ECD	0,004	0,013	
Malation	NPD	0,009	0,031	
Malation	ECD	0,011	0,018	
Clorpirifos	NPD	0,009	0,030	
Clorpirifos	ECD	0,003	0,011	
Fentoato	NPD	0,007	0,022	
Fentoato	ECD	0,010	0,035	
α -Endosulfan	ECD	0,005	0,017	
Fenamifos	NPD	0,05	0,100	0,10
β -Endosulfan	ECD	0,005	0,015	
p'p'- DDT	ECD	0,004	0,015	0,00
Permetrina	ECD	0,074	0,140	0,05
Cipermetrina	ECD	0,065	0,095	0,05
Deltametrina	ECD	0,021	0,024	2,00

Tabla 5. Límites de detección y cuantificación

2.6. Variables analíticas mencionadas en el artículo

2.6.1 Robustez:

Siguiendo el modelo propuesto por Youden y Steiner (14, 17), se seleccionaron 7 factores determinantes que podrían ser críticos en el desarrollo del método y se hicieron variaciones a los valores nominales de estos factores. Este estudio se realizó al segundo nivel de calibración; para decidir si un parámetro tenía influencia significativa sobre el resultado, se comparó la diferencia de medias obtenida para el cambio efectuado para ese parámetro y el producto de la desviación estándar del estudio de precisión como repetibilidad y raíz de 2. Los resultados mostraron que ninguno de los factores influyó significativamente sobre todos los plaguicidas, lo cual indica la robustez del método. La Tabla 8 muestra los factores evaluados en el estudio de robustez.

Factor	Valor nominal	Valor alternativo
Tiempo de matriz en agua	15 minutos	0 minutos
Temperatura del evaporador rotatorio	37 °C	42 °C
Evaporación de acetona	Se evapora	No evaporación
Volumen solvente de partición	80 mL	60 mL
Volumen elución en limpieza con GPC	50-90 mL	55-90 mL
Solvente de inyección	En AcOEt	En Isooctano
Volumen de elución en limpieza con silica	40 mL	30 mL

Tabla 8. Factores evaluados en el estudio de robustez

3. Descripción del método analítico

3.1 Materiales y métodos

Materiales y reactivos		
Acetato de etilo	Bicarbonato de sodio	Probeta
Ciclohexano	Silica gel grado analítico	Molino eléctrico
Acetona	Sulfato de sodio anhidro	Evaporador rotatorio

Posteriormente se prepararon soluciones madre de los materiales a una concentración cercana a 1.000 $\mu\text{g/mL}$ en acetato de etilo y se almacenaron en un congelador a -20°C . Asimismo, las mezclas de los plaguicidas se prepararon en concentraciones que van entre 2,56 $\mu\text{g/mL}$ y 102,40 $\mu\text{g/mL}$.

3.2 Preparación de la muestra blanco

Se usó un molino eléctrico para triturar el café, para evitar el calentamiento de la matriz se

añadió hielo seco triturado y así se pudo prevenir una posible degradación de los plaguicidas. Luego el café fue pasado por una malla de 1 mm para obtener partículas más pequeñas de café. Se busca que las partículas sean pequeñas, puesto que así el solvente de extracción tendría un acceso a mayor cantidad de material.

3.3 Plaguicidas

Organoclorados	Organofosforados	Piretroides
γ-HCH	Diclorvos	Permetrina
	Monocrotofos	
	Dimetoato	
Endosulfan	Clorotalonil	Cipermetrina
	Malation	
	Clorpirifos	
p, p -DDT	Fenitrothion	Deltametrina
	Fenotato	
	Fenamifos	

Tabla 1. Clasificación de los plaguicidas involucrados en la metodología

Volumen de inyección	2 µL
Modo de inyección	splitless
Presión de pulso	60 psi/min
Tiempo de purga	1 min
Flujo de purga	50 mL/min
Temperatura de inyector	250°C

Tabla 2. Condiciones cromatográficas para el análisis de plaguicidas

3.4 Procedimiento

3.4.1. Extracción: Luego de haberse molido el café y que este haya sido pasado por la malla, se toman 20 g de la muestra y se adicionan 48 mL de agua dejándose reposar por 15 minutos. Se agregan 100 mL de acetona y se usa ultrarrax para homogeneizar la muestra. Posteriormente se deja reposar por 30 minutos y se filtran 80 mL de la muestra homogénea en probeta con una tela de algodón. Por último, dicha solución se concentra en un evaporador rotatorio hasta que toda la acetona se haya evaporado.

3.4.2. Partición: Luego de la extracción pasamos la acetona evaporada la pasamos a un embudo de decantación, pues necesitamos canalizar los líquidos y materiales sólidos granulares en recipiente, procedemos a adicionar 15 mL de NaCl a un 15%, partimos en 3 soluciones la mezcla en proporción de 1:1, recogemos estas fracciones pasamos a una columna, luego se lava la misma y se lleva al evaporador a 37°C, finalmente se lava con acetato de etil ciclohexano y aforamos a volumen.

3.4.3. Limpieza

En GPC : Se inyectan 2,5 mL y se eluye a un flujo de 5 mL/min, solo se toma la fracción de 50-90 mLs y se concentra en evaporador rotatorio hasta casi sequedad.

En sílica gel : La columna de sílica es de 1,0 gramos y tiene un 1,5 de agua, está desactivada. A continuación, acondicionamos con una mezcla de ciclohexano al 86, acetonas al 10, acetonitrilo al 4, los valores descritos son las proporciones usadas, se traslada a la columna y se eluye con el volumen de las mismas, contamos las muestras en el evaporador, hasta que estén casi en su totalidad secas, para finalizar la limpieza se lleva a un balón de 2,0 ml con acetato de etilo y aforamos.

4. Cálculos

Después del proceso de limpieza, se fortificaron tres réplicas del extracto blanco con mezcla de plaguicidas a cinco niveles de concentración. Se inyectaron en el cromatógrafo de gases y se construyeron gráficas de área en función de la concentración.

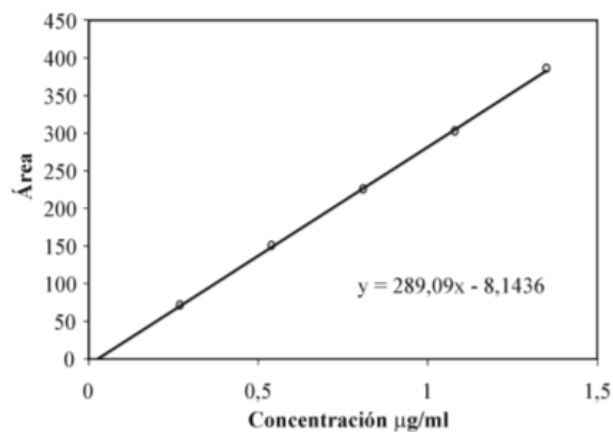


Figura 1. Linealización

El coeficiente de correlación tiene un valor mayor a 0,99, además de correlación significativa, pendientes estadísticamente diferentes a cero, regresión significativa y linealidad, con una confiabilidad del 95%. El gráfico mostrado es la relación entre diclorvos con la concentración.

5. Aplicaciones:

En el análisis ambiental : GC tiene un papel importante en la identificación y

cuantificación de contaminantes presentes en el medio ambiente. Por ejemplo, GC capilar se usa para analizar varias clases de contaminantes orgánicos y los compuestos orgánicos volátiles tales como hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP), pesticidas y compuestos halogenados.

En el análisis de productos petrolíferos: La gasolina para aviones, el diesel y el queroseno se analizan mediante GC que involucra un horno a 35°C, una columna SupelQ, detector TCD y un portador de gas.

6. Referencias bibliográficas

Specht, W., Pelz, S., & Gilsbach, W. (1995). Gas-chromatographic determination of pesticide residues after clean-up by gel-permeation chromatography and mini-silica gel-column chromatography. Communication(*): Replacement of dichloromethane by ethyl acetate/cyclohexane in liquid-liquid partition and simplified conditions for extraction and liquid-liquid partition. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 353(2), 183–190. <https://doi.org/10.1007/s0021653530183>

Qingren, G., & Shifang, K. (1987). Study of AUC thermal decomposition kinetics in nitrogen by a non-isothermal method. *Thermochimica Acta*, 116(C), 71–77. [https://doi.org/10.1016/0040-6031\(87\)88166-2](https://doi.org/10.1016/0040-6031(87)88166-2)

Stashenko, E., & Martínez, J. (2009). Algunos aspectos de la detección en cromatografía de gases y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Selectividad e identificación. *Scientia Chromatographica*, 1(3), 31–49. www.scientiachromatographica.com

Kaur, Gurleen & Sharma, Sahil. (2018). Gas Chromatography -A Brief Review. <https://www.researchgate.net/publication/344042922>

Eva María Carral Mahía-Silvia Calle Aznar. (2011). -12-junio-universidad de catalunya-vol.1-“Determinación analítica de la cafeína en diferentes productos comerciales”