



Universidad de Chile
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas
Departamento de Química Inorgánica y Analítica

MONITOREO DE CONTAMINANTES ORGÁNICOS EN MIELES Y SUELOS DEL SUR DE CHILE

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE QUÍMICO

PATRICIO ANDRÉS LAGOS ESCALONA

Académico Patrocinador y Director de Memoria:
Dra. Tatiana Inés Garrido Reyes

Santiago, Chile
2021

A mis dos Inés favoritas...

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero expresar mis mas sinceros agradecimientos a mi profesora y directora de tesis, la Dra. Tatiana Inés Garrido Reyes, por quien tengo un cariño enorme y hermosos recuerdos de todos estos años juntos. No sólo fue una guía académica, sino que también fue una luz en los momentos mas difíciles y oscuros. Hoy en día en cada decisión o acontecimiento importante siempre recuerdo sus sabias palabras y consejos.

Quiero dar gracias a mi madre, Inés Escalona Salazar, por darme la vida y todo su amor y apoyo incondicional desde mi primer recuerdo. Eres sin lugar a duda la persona mas importante en mi vida y todos mis logros son gracias a ti y por ti. Eres mi héroe, te amo mamá. También a mi hermanita, mi Lore, por dejarme ser tío de dos sobrinos hermosos, mi Mati y mi Maxi, gracias por dejarme ser tu hermano, porque estos últimos años la vida nos ha enseñado cuan juntos debemos estar, te quiero mucho.

Agradecer a la Universidad de Chile, a la facultad y a todos sus profesores, ya que cuesta mucho darse cuenta cuando uno esta estudiando lo que en realidad esta recibiendo, que va mucho más allá de los conocimientos académicos adquiridos.

Finalmente quiero agradecer a mis grandes amigos: A Michelle Fuentes, quien muy pronto me permitirá ser tío por tercera vez, espero ansioso el día en que pueda conocer a Beltrán, los dos tienen mi apoyo siempre. A Fernanda Barra, a quien conocí antes de entrar a la universidad y no nos separaremos nunca mas, agradezco tu cariño, los sabios consejos y apoyo incondicional, y sobre todo gracias por tu amistad verdadera. A Tania Román, nos separamos mucho tiempo y el mismo tiempo nos demostró lo genuina que es nuestra amistad. Francisco Amaro, quien fue mi cable a tierra y apoyo por muchos años de universidad y por siempre estar para brindarme un sabio consejo o solo escuchar mis quejas de la vida.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. HIPÓTESIS	11
3. OBJETIVOS	11
3.1 General	11
3.2 Específicos	11
4. MATERIALES Y REACTIVOS	12
4.1 Materiales	12
4.2 Reactivos	12
4.3 Equipos	13
5. METODOLOGÍA.....	14
5.1 Obtención de las muestras	14
5.2 Caracterización de los suelos	16
5.2.1 Factor de humedad de los suelos	16
5.2.2 Determinación del contenido de carbono orgánico	16
5.2.3 Determinación del pH	17
5.2.4 Textura de los suelos	18
5.2.5 Determinación de metales totales	19
5.3 Obtención de los extractos de suelo y miel	20
5.4 Análisis de muestras por DSA-TOF-MS	21
5.5 Análisis por GC- μ ECD	22
5.5.1 Condiciones cromatográficas	22
5.5.2 Curva de calibración en solvente	23
5.5.3 Parámetros analíticos determinados	23
5.5.4 Extractos analizados	24
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	25
6.1 Caracterización de los suelos	25
6.2 Análisis de las muestras	28
6.2.1 Análisis de contaminantes orgánicos por DSA-TOF-MS	28
6.2.2 Análisis de las muestras de miel y suelos por DSA-TOF-MS	29

6.2.3 Análisis de contaminantes orgánicos mediante GC- μ ECD	40
7. CONCLUSIONES	44
8. BIBLIOGRAFÍA	46
Anexo A	51
Anexo B	54
Anexo C	60

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Proceso de extracción de miel en colmena	2
Figura 2: Estructura del suelo	3
Figura 3: Condiciones ambientales consideradas para la ubicación de una colmena	4
Figura 4: Estructura de clorpirifos	5
Figura 5: Estructura de fenhexamida	6
Figura 6: Ubicación del sector de la toma de muestras	14
Figura 7: Descripción del proceso de muestreo de suelo de los puntos 1 y 2	16
Figura 8: Determinación de carbono orgánico	17
Figura 9: Diagrama para la determinación de clases texturales de suelos	19
Figura 10: Muestras de suelo digeridas y siendo filtradas	20
Figura 11: Esquema de trabajo de las muestras de miel y suelo	21
Figura 12: Concentración de metal en suelos muestreados de Temuco y Valdivia	28
Figura 13: Espectro de masas para extracto acuoso de muestra de miel A-D, sector Temuco	32
Figura 14: Espectro de masas para extracto acuoso de muestra de miel E-G, sector Temuco y H-I sector Valdivia	33
Figura 15: Espectro de masas para extracto acuoso de muestra de suelo 1, sector A	35
Figura 16: Espectro de masas para extracto cetónico de muestra de suelo 1 y 2, sector A	35
Figura 17: Espectro de masas para extracto cetónico de muestra de suelo 3 y 4, sector B	36
Figura 18: Espectro de masas para extracto cetónico de muestra de suelo 5 y 6, sector C	36
Figura 19: Espectro de masas para extracto cetónico de muestra de suelo 7 y 8, sector D	37

Figura 20: Espectro de masas para extracto cetónico de muestra de suelo 9 y 10, sector E	37
Figura 21: Espectro de masas para extracto cetónico de muestra de suelo 11, sector F ...	38
Figura 22: Espectro de masas para extracto cetónico de muestra de suelo 13 y 14, sector G	38
Figura 23: Espectro de masas para extracto cetónico de muestra de suelo 15 y 16, sector H	39
Figura 24: Espectro de masas para extracto cetónico de muestra de suelo 17 y 18, sector I	39
Figura 25: Cromatograma de estándar de CP (200 µg/L) analizado por GC-µECD	40
Figura 26: Curva de calibración CP, análisis por GC-µECD	41
Figura 27: Cromatograma obtenido del análisis del extracto cetónico de suelos	43

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Propiedades fisicoquímicas de clorpirifos	6
Tabla 2: Propiedades fisicoquímicas de fenhexamida	7
Tabla 3: Localidades de las regiones seleccionadas para el muestreo	15
Tabla 4: Condiciones cromatográficas optimizadas para la cuantificación de CP	22
Tabla 5: Programa de temperatura de GC-µECD	23
Tabla 6: Concentraciones de curva de calibración en n-hexano, (EI: PCB 103)	24
Tabla 7: Superficie regional frutal por especie de la Región de la Araucanía	25
Tabla 8: Superficie regional frutal por especie de la Región de Los Ríos	26
Tabla 9: Características fisicoquímicas de los suelos muestreados	27
Tabla 10: Resultados del análisis de 19 contaminantes orgánicos por medio de DSA-TOF-MS	29
Tabla 11: Replicabilidad y repetibilidad del análisis CP por GC-µECD	42
Tabla 12: Resultados de las inyecciones de n-hexano para determinar el LD y LC de la técnica por GC-µECD	42

RESUMEN

La miel es un alimento con un alto valor agregado, cuya composición depende de su origen botánico y características fisicoquímicas del suelo cercano a las colmenas. Los suelos pueden contener contaminantes orgánicos e inorgánicos dependiendo de las actividades antropogénicas en ellos. Se ha descrito que los contaminantes se pueden transportar a las colmenas a través de la interacción de las abejas con el agua y las plantas en contacto con el suelo, o mediante el transporte de partículas del suelo a las colmenas. La identificación del origen geográfico de la miel es información que puede ayudar a consumidores y productores a evitar que las abejas estén expuestas a los contaminantes que pueden estar presentes en áreas de alimentación o a seleccionar la miel de áreas con menos riesgo de contaminación.

El objetivo de este estudio fue determinar contaminantes orgánicos presentes en miel y suelos cercanos a colmenas ubicadas en el sur de Chile.

Para este estudio, se realizó un muestreo de suelos y mieles de Temuco y Valdivia, un área caracterizada por una productividad de miel alta y variada. Las muestras se caracterizaron por métodos estandarizados (pH, contenido de carbono orgánico, contenido de metal, etc.). Para la extracción de contaminantes orgánicos del suelo se evaluó una metodología de ultrasonido. Para el análisis de las muestras se utilizaron dos técnicas: Cromatografía de gases con detector de microcaptura electrónica (GC- μ ECD) y análisis de muestra directa - tiempo de vuelo - espectrometría de masas (DSA-TOF-MS). Para el análisis DSA-TOF-MS, se obtuvieron extractos acuosos de suelo y miel. Los resultados de la caracterización del suelo mostraron un pH que fluctuó entre 4,56 y 6,57, con alto contenido de carbono orgánico. Los espectros m/z obtenidos mediante la técnica DSA-TOF-MS de extractos acuosos informaron la presencia de contaminantes orgánicos del tipo organofosforado en al menos tres sectores de muestreo. Se determinaron los límites de detección y cuantificación para clorpirifos, que fueron 25,4 μ g/L y 26,3 μ g/L, respectivamente. A partir de los resultados obtenidos, es posible concluir que la

técnica DSA-TOF-MS permite mostrar la presencia de contaminantes en la miel de los sectores muestreados, y que el método de extracción con ultrasonido es una técnica simple y de bajo costo, la cual permite la cuantificación de contaminantes orgánicos por GC- μ ECD.

Se pudo constatar que existe una transferencia de los contaminantes orgánicos entre suelo, abeja, colmena y miel, como es el caso del pesticida organofosforado clorpirifos, de vida media mayor a 60 días, el cual se encontró tanto en los extractos de suelo como miel y además fue detectado en los extractos de suelo por GC- μ ECD. Otro de los contaminantes identificados por DSA-TOF- MS es el fungicida fenhexamida, de vida media de 1 día en condiciones aerobias el cual sólo fue encontrado en los extractos de miel.

SUMMARY

Honey is a food with a high added value, whose composition depends on its botanical origin and physicochemical characteristics of the soil near the hives. Soils can contain organic and inorganic pollutants depending on the anthropogenic activities in them. It has been described that pollutants can be transported to hives through the interaction of bees with water and plants in contact with the soil, or by transporting soil particles to hives. Identifying the geographic origin of honey is information that can help consumers and producers avoid exposing bees to contaminants that may be present in feeding areas or selecting honey from areas with less risk of contamination.

The objective of this study was to determine organic pollutants present in honey and soils near beehives located in southern Chile.

For this study, a soil and honey sampling from Temuco and Valdivia was carried out, an area characterized by high and varied honey productivity. The samples were characterized by standardized methods (pH, organic carbon content, metal content, etc.). For the extraction of organic pollutants from the soil, an ultrasound methodology was evaluated. For the analysis of the samples, two techniques were used: gas chromatography with electron microcapture detector (GC- μ ECD) and direct sample analysis - time of flight - mass spectrometry (DSA-TOF-MS). For the DSA-TOF-MS analysis, aqueous extracts of soil and honey were obtained. The results of the characterization of the soil showed a pH that fluctuated between 4.56 and 6.57, with a high content of organic carbon. The m/z spectra obtained by means of the DSA-TOF-MS technique of aqueous extracts reported the presence of organic pollutants of the organophosphate type in at least three sampling sectors. The detection and quantification limits for chlorpyrifos were determined, which were 25.4 μ g/L and 26.3 μ g/L, respectively. From the results obtained, it is possible to conclude that the DSA-TOF-MS technique allows to show the presence of contaminants in the honey of the sampled sectors, and that the ultrasound extraction method is a simple

and low-cost technique, the which allows the quantification of organic contaminants by GC- μ ECD.

It was found that there is a transfer of organic pollutants between soil, bee, hive and honey, as is the case of the organophosphate pesticide chlorpyrifos, with a half-life greater than 60 days, which was found in both soil extracts such as honey and it was also detected in the soil extracts by GC- μ ECD. Another of the contaminants identified by DSA-TOF-MS is the fungicide fenhexamide, with a half-life of 1 day under aerobic conditions, which was only found in honey extracts.

1. INTRODUCCIÓN

Existen registros, desde hace miles de años, que demuestran que el hombre consumía miel, para lo cual debió aprender a controlar las colmenas de abejas y así obtener este recurso que hoy en día es considerado un alimento de alto valor nutricional. La miel es considerada uno de los alimentos más nobles y de mayor valor agregado del planeta, esto es por las diversas propiedades que se le atribuyen. No sólo la miel es importante, sino el rol que cumplen las abejas al producir la miel es de suma importancia para el medio ambiente, ya que, las abejas además polinizan y ayudan a preservar la biodiversidad y la reproducción de la flor endémica.

Con los años, junto con el incremento de la población se ha incrementado la demanda de productos agrícolas, lo cual ha llevado a la utilización de una mayor cantidad de plaguicidas para asegurar la producción de alimentos, lo cual afecta de manera importante a las colmenas, ya que estos contaminantes generan un ambiente desfavorable para el normal desarrollo de las abejas, lo que se puede traducir en una disminución de la población de abejas, y a su vez disminuir la producción de miel.

A partir de lo expuesto se puede determinar que la agricultura va de la mano con la apicultura, por lo que el medio circundante a las colmenas es un factor que se debe considerar al evaluar la presencia de contaminantes en miel, ya que permitiría a través de un estudio del impacto ambiental, evaluar la influencia de los contaminantes presentes en el suelo sobre las abejas y si éstos persisten hasta llegar a la miel.

Para poder desarrollar el estudio primero debemos conocer las características de la miel, la cual es un alimento de sabor dulce, viscoso y de color ámbar. Es un producto

natural elaborado por las abejas *Apis mellifera* con el néctar que obtienen de flores y secreciones de plantas. El néctar recolectado es distribuido entre varias abejas de la colmena, que luego de regurgitarlo repetidas veces y someterlo en su boca al aire caliente de la colmena, con el fin de evaporar la mayor cantidad de agua, es depositado en celdas abiertas donde termina de concentrarse hasta convertirse en miel. Este proceso es conocido como trofalaxia y en él las abejas agregan enzimas salivales que degradan la sacarosa contenida en el néctar a glucosa y fructosa (figura 1).

La miel también contiene vitaminas, aminoácidos, proteínas, ácidos orgánicos y trazas minerales como hierro, cobre, manganeso, calcio, sodio, sulfatos, fosfatos, entre otros. (Von Frish, K. 1999)



Figura 1: Proceso de extracción de miel en colmena.

El segundo tema de importancia a considerar para el estudio es la matriz suelo, el cual se caracteriza por ser un sistema abierto que intercambia materia y energía con el entorno. El suelo corresponde a una mezcla heterogénea en la que podemos distinguir tres componentes principalmente, una fracción sólida, una gaseosa y una líquida (figura 2), en la cual se pueden encontrar microorganismos, así como también contaminantes orgánicos e inorgánicos (Luzio, W. y col. 2006). Existen distintos tipos de suelos, con distintas propiedades fisicoquímicas, los cuales pueden ser agrupados en series, familias, grupos, órdenes y subórdenes (Crespo, C. 2004). Las características fisicoquímicas del suelo son de suma importancia dado que, definen el destino final de los contaminantes.

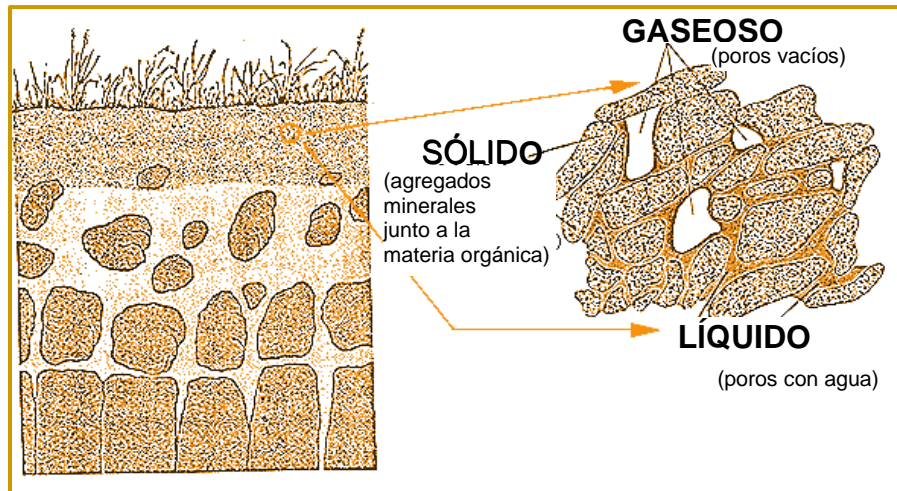


Figura 2: Estructura del suelo.

La ubicación de las colmenas es un parámetro primordial que considerar, dado que las abejas salen de la colmena a recolectar el néctar y cubren un área de 7 km² alrededor de ésta, pudiendo realizar en promedio 10 viajes al día (Von Frish, K. 1999). Previo a la instalación de las colmenas se debe realizar un estudio de los recursos disponibles para las abejas dentro de esa área y considerar si existe una fuente de contaminación que pudiese ser perjudicial.

A continuación se describen las principales recomendaciones relacionadas a la ubicación de las colmenas (Von Frish, K. 1999):

- Las colmenas no se deben ubicar en lugares bajos o que tengan poca humedad (figura 3).
- Se debe conocer la distancia con otros apiarios, ya que, podría ocurrir una transmisión de enfermedades (figura 3).
- Se deben ubicar sobre un caballete y se recomienda una leve inclinación (figura 3).
- La piqueta (entrada de las abejas a la colmena) debe estar en contra del sentido del viento y debe existir una separación de a lo menos 1 metro entre cada colmena que compone el apiario (figura 3).

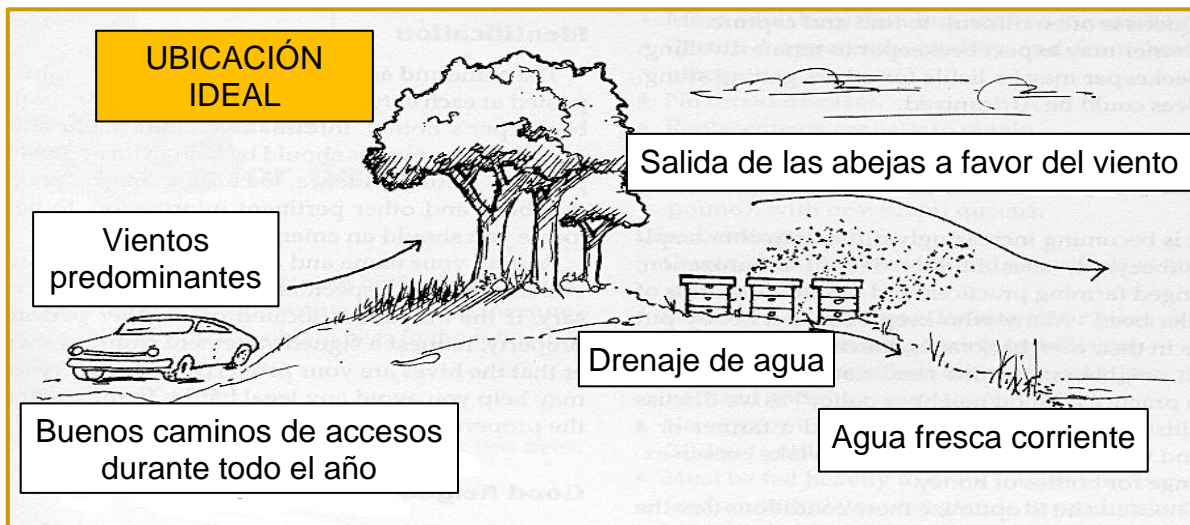


Figura 3: Condiciones ambientales consideradas para la ubicación de una colmena.

Una familia de contaminantes con un importante efecto tóxico sobre las colmenas son los contaminantes orgánicos, entre los cuales están los plaguicidas (pesticidas, insecticidas organoclorados, insecticidas organofosforados, herbicidas, etc), los bifenilos policlorados (PCB), entre otros. Se trata de compuestos sintetizados y se

caracterizan en general por ser resistentes a la degradación fotolítica, biológica y química (Diez, M.C. 2010).

La problemática que se genera entre los pesticidas y las abejas radica en que estos compuestos al ser aplicados a los cultivos pueden llegar a los suelos, y estar en contacto directo con las abejas, contaminantes que pueden transferirse a la miel, la cual además es un alimento de consumo humano.

Dentro de las características fisicoquímicas de la miel de abejas se encuentra un pH entre 3,0 a 4,5 por lo que para un correcto análisis de plaguicidas, se debería realizar en un periodo corto de tiempo, para evitar su degradación (Aloisi, P. 2010).

A nivel nacional los pesticidas organoclorados y los organofosforados son ampliamente utilizados (SAG, 2019). Dentro de los pesticidas organofosforados se encuentra el clorpirifos, el cual destaca por un extenso uso en la agricultura de nuestro país, encontrándose en más de 23 productos registrados, cuyo nombre según IUPAC es [O,O-dietil O-(3,5,6-tricloropiridin-2-il) fosforotioato] (Geisy, J. y col.1999) (figura 4).

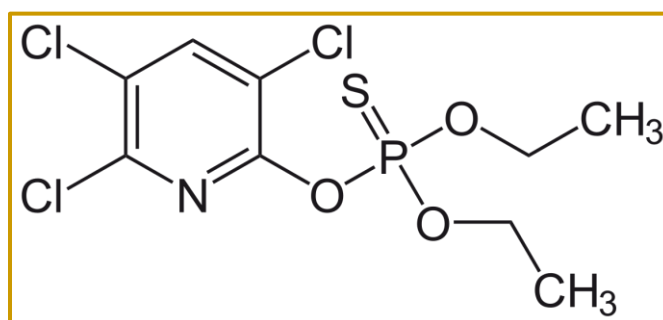


Figura 4: Estructura de clorpirifos.

El clorpirifos es utilizado en el hogar para el control de cucarachas y pulgas, también en la ganadería para controlar garrapatas y en la agricultura, que es donde tiene su mayor uso, para el control de plagas de moscas blancas, cochinillas, escarabajos, trips de la platanera, entre otros (ASTDR, 1997). Es un sólido cristalino de color

blanco que se clasifica químicamente dentro de los tiones. Sus principales características se describen en la tabla 1 (Márquez, S. y col. 2010).

Tabla 1: Propiedades fisicoquímicas de clorpirifos.

Fórmula Molecular	C₉H₁₁Cl₃NO₃PS
Peso Molecular	350,62 g/mol
Punto de Fusión	41,5 – 44°C
Solubilidad en agua	1,4 mg/L a 25°C
Solubilidad en otros solventes	Benceno 7900 g/Kg, acetona 6500 g/kg, cloroformo 6300 g/Kg a 25°C
Log K _{ow}	4,699

Con respecto a la persistencia del clorpirifos en el medio ambiente, se ha encontrado en bibliografía valores que varían desde los días hasta los 4 años (Watts, 2012), siendo el rango más reportado de 60 a 120 días (Manahan, 1999), por lo tanto, los valores de vida media dependerán de la aplicación, del ecosistema y de factores ambientales (Watts, 2012).

Los pesticidas clorados también destacan por su gran uso en la actualidad y un representante de esta familia de plaguicidas es la fenhexamida, cuyo nombre según IUPAC es [N-(2,3-Dicloro-4-hidroxifenil)-1-metilciclohexanocarboxamida] (figura 5).

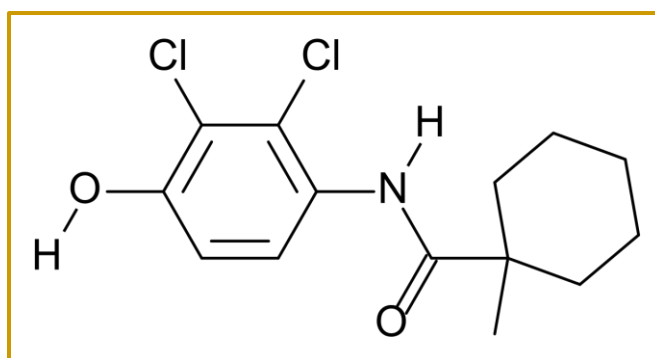


Figura 5: Estructura de Fenhexamida.

La fenhexamida es considerado específicamente un fungicida de contacto y de acción preventiva. Se usa para tratar enfermedades que pueden afectar a cultivos

activos o a frutas ya cosechadas. Su mayor utilización es para el control de Botritis y pudrición ácida en vides (Esteriol, M. y col. 2017). Es un sólido granulado y se debe aplicar disuelto en agua con dispersores. Las principales características fisicoquímicas de la fenhexamida se encuentran en la tabla 2 (Latorre, B.A y col. 2002).

La persistencia de la fenhexamida en el ambiente es baja, en suelo su vida media es menor a 1 día en condiciones aerobias y a 20°C (Esteriol, M. y col. 2017). Se trata de un contaminante poco sensible a la hidrólisis. La luz solar contribuye significativamente a su degradación y a la de sus metabolitos en el agua, que no se acumulan: su vida media en la superficie de los sistemas acuáticos es de 2,1 días (Latorre, B.A y col. 2002).

Tabla 2: Propiedades fisicoquímicas de fenhexamida.

Fórmula Molecular	C₁₄H₁₇Cl₂NO₂
Peso Molecular	302,20 g/mol
Punto de Fusión	153 °C
Solubilidad en agua	20 mg/L a 20°C
Solubilidad en otros solventes	Diclorometano 31g/L isopropanol 91g/L, acetonitrilo 15g/L, tolueno 5,7g/L y hexano < 0,1g/L a 20°C
Log K _{ow}	3,51

En Chile el Servicio Agrícola Ganadero (SAG) es responsable de establecer las regulaciones que norman la fabricación, comercialización y aplicación de los pesticidas en relación con los límites máximos permitidos (LMP), el SAG se rige en base al CODEX ALIMENTARIUS, siendo para el clorpirifos el límite entre 0,01-20 mg/Kg para distintos alimentos y para la fenhexamida 0,01-30 mg/kg.

Una de las etapas de mayor complejidad e importancia en el análisis de una muestra es la selección de una metodología de extracción, que permita aislar el analito desde la matriz que lo contiene, disminuyendo los interferentes presentes.

Para el análisis de contaminantes orgánicos en miel se recomienda una extracción líquida, donde se solubilice la matriz en agua o mezclas de agua, acetona, metanol o etanol, para así extraer los analitos de interés y minimizar la interacción entre los azúcares que componen la miel. (Tor, A. y col. 2006; Babic, S. y col. 1998).

Otra de las metodologías utilizadas para analizar contaminantes orgánicos en matrices complejas es la extracción en fase sólida (SPE), la cual requiere cartuchos o columnas empacadas con algún material sólido adsorbente, el cual es capaz de retener los analitos de interés cuando la muestra pasa a través de este material, permitiendo así su elución con una pequeña cantidad de solvente orgánico adecuado. Para aislar contaminantes orgánicos, se recomienda cartuchos de fase reversa C₁₈, florisil, entre otros. Una vez retenidos los plaguicidas por la fase adsorbente se recomienda eluir con acetona, diclorometano, acetato de etilo, n-hexano, metanol o mezcla de estos. La técnica SPE emplea tiempos cortos de ejecución y se aíslan analitos sin necesidad de aplicar temperatura a la muestra, lo que resulta ventajoso para no degradar dichos analitos (Tor, A. y col. 2006; Babic, S. y col. 1998).

Otras de las metodologías utilizadas para aislar un analito desde su matriz es la extracción líquido-líquido (LLE), la cual consiste en la utilización de una fase líquida (inmiscible con la matriz) que promueve la distribución de analitos de manera selectiva hacia el interior de dicha fase líquida. Como solvente extractante se recomienda el uso de acetato de etilo, diclorometano, hexano, mezcla de hexano-acetona, entre otros. A través de la metodología LLE se pueden alcanzar bajos límites de detección y cuantificación, pero tiene la desventaja de que requiere grandes volúmenes de solvente para su realización (Tor, A. y col. 2006; Babic, S. y col. 1998).

Otro punto importante que se debe considerar en la metodología de extracción seleccionada para matrices complejas es que deben ser limitadas las etapas a realizar para evitar la pérdida de la muestra, pero que sea eficiente para disminuir el efecto matriz.

Una vez separado el analito desde la matriz es necesario concentrar el volumen de muestra, mediante un proceso de evaporación del solvente, una vez realizado este proceso se procede a reconstituir la muestra, en un solvente adecuado para la técnica de análisis que se utilizará.

El último paso es la cuantificación del analito, en el caso de matrices ambientales complejas, como son agua, suelo y miel, es necesario seleccionar técnicas de cuantificación que permitan obtener bajos límites de detección y cuantificación de contaminantes orgánicos.

Dentro de las posibles técnicas de cuantificación está la cromatografía gaseosa (GC) acoplada a diversos tipos de detectores, tales como detector de masas (GC-MS), a un detector de captura (GC-ECD) o micro captura de electrones (GC- μ ECD). Con un detector de masa se obtiene una mediana sensibilidad y una buena separación e identificación de analitos. La cuantificación realizada con un equipo GC- μ ECD posee una alta sensibilidad a halógenos y a grupos funcionales de gran capacidad electroceptora, y también permite una cuantificación a bajas concentraciones (Skoog, D. y col. 2008).

Por otro lado, la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) resulta una opción dado que algunos detectores utilizados son muy versátiles y se pueden determinar una mayor cantidad de analitos presentes. Entre los detectores más empleados se destaca el de arreglo de diodos (DAD), UV-VIS, fluorescencia (FLD), entre otros (Branko, N. y col. 2004). Actualmente, se destaca el uso del detector de espectrometría de masa en tándem para analizar residuos de contaminantes orgánicos dado el diseño de métodos multiresiduo más sensibles y selectivos con

la capacidad de separar muchos plaguicidas en un sólo análisis (Stachniuk, A. y col. 2016). Para los análisis por HPLC se debe tener extremo cuidado con el pH de la fase móvil, ya que en condiciones extremas se facilita la degradación de los analitos.

La técnica “Tiempo de vuelo – Espectrómetro de masa” acoplado a un sistema “análisis directo” (DSA-TOF- MS) permite la medición de muestras tanto sólidas como líquidas, en un corto tiempo, con un barrido en un amplio rango de masas. Para este análisis las muestras se sitúan en una malla metálica, donde a través de una corriente de nitrógeno a 300°C son ionizadas, ingresando a la zona de “Tiempo de vuelo”, los analitos ionizados se distancian entre ellos por la diferencia entre sus masas, finalmente ingresan al detector de masa generando una señal masa carga (m/z). La técnica DSA-TOF-MS tiene la característica de poseer una alta resolución y exactitud en la determinación de la relación m/z, además de tener límites de cuantificación en condiciones optimizadas menores a las partes por millón (Jones, R. y col. 2006).

A través de los antecedentes mencionados resulta de gran interés realizar estudios que permitan relacionar los contaminantes presentes en los suelos y la miel obtenida de colmenas ubicadas en estos, información que permitiría utilizar a la miel como un bioindicador de la contaminación ambiental circundante a la colmena y por otro lado información que podría ser un aporte para la selección del lugar en el cual se ubiquen las colmenas.

2. HIPÓTESIS

Los contaminantes orgánicos presentes en suelos cercanos a las colmenas se transfieren a las abejas y por medio de estas llegan a las colmenas y por consiguiente a la miel.

3. OBJETIVOS

3.1 GENERAL

- Determinación de contaminantes orgánicos presentes en miel y suelos cercanos a colmenas ubicadas en el sur de Chile.

3.2 ESPECÍFICOS

- Implementación de metodologías analíticas para la determinación de contaminantes orgánicos en miel y suelo apícola, mediante las técnicas de DSA-TOF-MS y GC- μ ECD.
- Caracterización de suelos.
- Análisis de miel y suelo apícola, mediante las técnicas DSA-TOF-MS y GC- μ ECD.
- Análisis y discusión de resultados.

4. MATERIALES, REACTIVOS E INSTRUMENTOS

4.1 MATERIALES

- Agitador, Gel Rocker 50, Bhanu.
- Balanza granataria, precisa 160M, Swiss Quality.
- Balanza analítica, precisa 125A, Swiss Quality.
- Baño Termo-regulado, GLF.
- Cámara de vacío para extracción en fase sólida, Manifold.
- Handy Step, Brand.
- Placa calefactora, Sahara 310, Rocker.
- Material de vidrio.
- Cartridges C18, Sep-Pak, Waters.
- Filtro Advantec MFS, inc. 9 cm de diámetro.

4.2 REACTIVOS

- Dicromato de sodio, G.T, Heyn.
- Sacarosa, P.A., Merck.
- N-hexano, Suprasolv para GC con detector ECD y FID, Merck.
- Metanol, Emsure, P.A., Merck.
- Ácido sulfúrico, P.A., Merck.
- Acetona, Emsure, P.A., Merck.
- Estándares de clorpirifos, P.A., Dr. Ehrenstorfer.
- Estándares de Cu, Zn, Ni, Cr y Cd, Titrisol, Merck.
- Estándar de PCB 103 (99,0%), Dr. Ehrenstorfer.
- Permanganato de potasio, P.A., Merck.
- Agua milliQ.
- Agua destilada.

4.3 EQUIPOS

- pH-metro, PMX 3000, WTW.
- Conductímetro, LF 539, WTW.
- Estufa 300°C, WTC, Binder.
- Estufa al vacío, VTR 5036, Heraeus.
- Espectrofotómetro UV/Vis, Unicam.
- Centrífuga, Z 383 K, Hermle.
- Espectrofotómetro de Absorción Atómica, 3110 con llama, Perkin Elmer.
- Cromatógrafo de Gases, 7890A, Agilent Technologies con detector μ -ECD y FID.
- Análisis de muestra directa - tiempo de vuelo - espectrometría de masas (DSA-TOF-MS)
- Rotavapor, WB 2000, Heidolph.

5. METODOLOGÍA

5.1 OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS

Las muestras de suelo y miel se obtuvieron de zonas aledañas a la ciudad de Temuco, Región de La Araucanía (IX) – Chile, y de zonas cercanas a la ciudad de Valdivia, Región de Los Ríos (XIV) – Chile, el año 2018.

Para la toma de muestras, se consideraron un total de 9 apiarios, de los cuales 7 pertenecen a localidades cercanas a Temuco y 2 apiarios de localidades cercanas a Valdivia (figura 4).

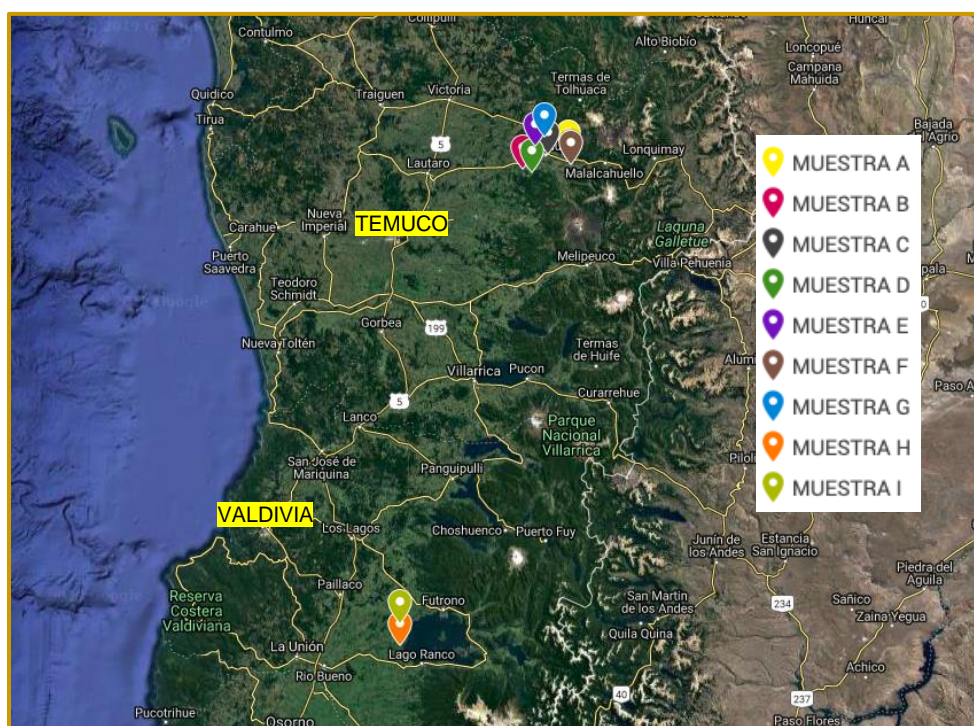


Figura 6: Ubicación del sector de la toma de muestras.

Por cada apiario corresponde una muestra de miel y dos puntos de muestreo de suelo, tal como se muestra en la tabla 3.

Tabla 3: Localidades de las regiones seleccionadas para el muestreo.

Miel	Suelo	Ciudad	Sector
A	1	Temuco	Córdoba
	2	Temuco	Córdoba
B	3	Temuco	Las Quilas
	4	Temuco	Las Quilas
C	5	Temuco	Curacautín
	6	Temuco	Curacautín
D	7	Temuco	Ventrecó
	8	Temuco	Ventrecó
E	9	Temuco	Camino a Victoria
	10	Temuco	Camino a Victoria
F	11	Temuco	San Pablo
	12	Temuco	San Pablo
G	13	Temuco	La Jaula
	14	Temuco	La Jaula
H	15	Valdivia	Peumal
	16	Valdivia	Peumal
I	17	Valdivia	Las Quemadas
	18	Valdivia	Las Quemadas

Para el muestreo de los suelos se consideró el suelo superficial (0-20 cm) de las cercanías de la colmena, considerando dos muestras de cada sector, donde el primer punto de muestreo corresponde a 20 pasos en línea recta alejados desde la colmena y el segundo punto corresponde a 40 pasos alejados desde el primer punto de toma de muestra (figura 7). Las muestras fueron recolectadas con pala, donde previamente fueron removidas hojas y ramas antes de su incorporación a la bolsa y su etiquetado. Finalmente, las muestras de suelo se secaron al aire para luego ser molidas en mortero de porcelana y posteriormente tamizadas, para su posterior análisis.

En relación con las mieles, éstas fueron colectadas en tubos plásticos, previamente descontaminados y almacenadas a 4°C hasta su análisis.

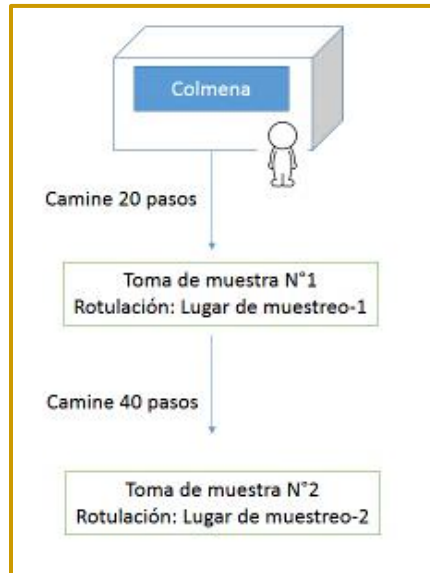


Figura 7: Descripción del proceso de muestreo de suelo de los puntos 1 y 2.

5.2 CARACTERIZACIÓN DE LOS SUELOS

La caracterización del suelo se realizó mediante métodos estandarizados, determinándose humedad, contenido de carbono orgánico (CO), pH, textura y metales totales (Sadzawka, A. y col. 2006).

5.2.1 Factor de Humedad de los suelos

Se determinó por pesada, para lo cual la muestra de suelo húmeda fue secada a 105°C por 24 horas, luego se pesó el suelo seco. La diferencia de las pesadas determinó el factor de humedad de los suelos

5.2.2 Determinación del contenido de Carbono Orgánico

Se determinó a través del método de Walkley-Black, que consiste en una combustión húmeda de la materia orgánica (MO) del suelo con un exceso de solución de $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ en medio ácido (H_2SO_4). Después de la reacción se cuantificó colorimétricamente Cr (III) en un espectrofotómetro Unicam UV-2 (UV-Visible), a una longitud de onda de 600 nm (Figura 8).



Figura 8: Determinación de carbono orgánico.

A partir de los resultados obtenidos de carbono orgánico, se determinó el porcentaje de materia orgánica mediante un factor de conversión, aplicable sólo a suelos (ecuaciones 1 y 2):

$$\text{Ecuación 1:} \quad \% \text{Carbono Orgánico} = \frac{\text{mg CO} \times 1,2 \times 100 \times Fh}{\text{Masa suelo} \times 1000}$$

$$\text{Ecuación 2:} \quad \% \text{Materia Orgánica} = 1,72 \times \% \text{Carbono Orgánico}$$

5.2.3 Determinación del pH

Se determinó potenciométricamente, utilizando un electrodo combinado de vidrio-calomelano en una solución cuya proporción suelo-líquido es 1:2,5; el pH fue determinado en el sobrenadante, obteniendo el registro de 3 soluciones por separado: pH en H₂O, en KCl (1 M) y en CaCl₂ (0,01 M). Se utilizó un pH-metro WTW pMX 3000.

5.2.4 Textura de los suelos

Para la determinación del contenido de arcilla, limo y arena se utilizó el método de Bouyoucos, para lo cual se pesaron 50 g de suelo (exactitud $\pm 0,1$ g) en un vaso precipitado de 1 L, al cual se le adicionaron 700 mL de agua milliQ, y 20 mL de hexametáfosfato de sodio al 10%. La suspensión fue agitada por 15 minutos, para luego trasvasiar el contenido a una probeta de 1 L, aforándose a ese volumen. Luego se procedió a tapar la boca de la probeta para agitar por un minuto, esta suspensión se dejó reposar por 4 minutos exactos, determinándose la temperatura (T_1) y luego la lectura con el hidrómetro (L_1). Nuevamente se dejó reposar la suspensión, pero esta vez por dos horas, transcurrido el tiempo se registró una segunda lectura de temperatura (T_2) y del hidrómetro (L_2).

A las lecturas del hidrómetro se les realizó una corrección de temperatura de 0,2 de graduación por cada $^{\circ}\text{F}$ por sobre o debajo de 67°F , de acuerdo con las siguientes ecuaciones:

$$\text{Ecuación 3:} \quad L_{1 \text{ corregida}} = L_1 \mp [(T_1^{\circ}\text{F} - 67^{\circ}\text{F}) \times 0,2]$$

$$\text{Ecuación 4:} \quad L_{2 \text{ corregida}} = L_2 \mp [(T_2^{\circ}\text{F} - 67^{\circ}\text{F}) \times 0,2]$$

Se suma cuando la T ($^{\circ}\text{F}$) es mayor de 67°F y se resta cuando la T ($^{\circ}\text{F}$) es menor de 67°F .

El porcentaje de arena, limo y arcilla fue determinado mediante las ecuaciones 5, 6 y 7, para finalmente ubicar los resultados del porcentaje de arena, limo y arcilla en la figura 9 y así determinar la textura de los suelos:

$$\text{Ecuación 5:} \quad \% \text{ Arena} = 100 - (L_{1 \text{ corregida}} \times 2)$$

$$\text{Ecuación 6:} \quad \% \text{ Arcilla} = L_{2 \text{ corregida}} \times 2$$

$$\text{Ecuación 7:} \quad \% \text{ Limo} = 100 - (\% \text{ Arena} + \% \text{ Arcilla})$$

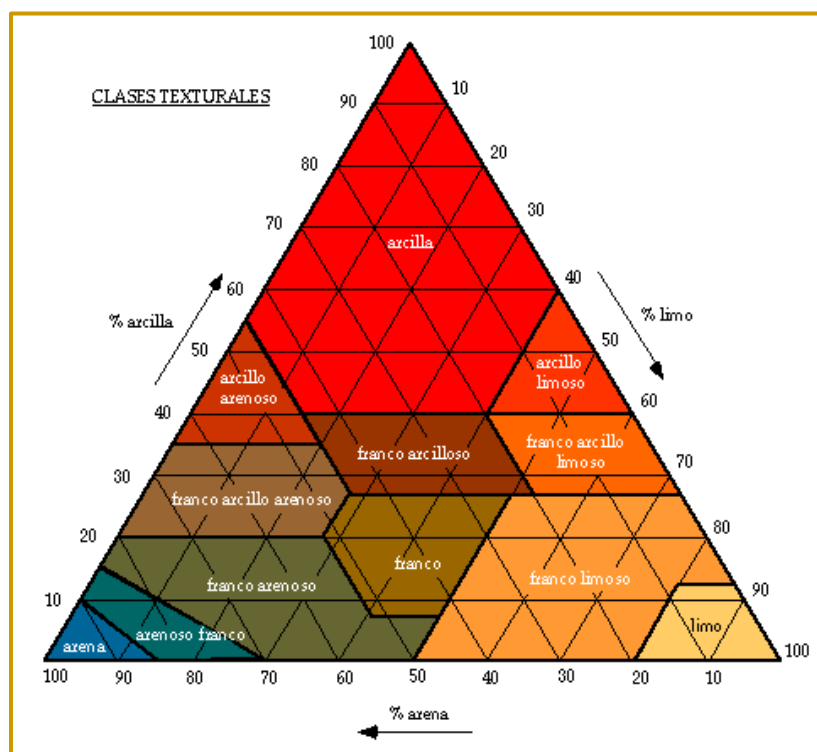


Figura 9: Diagrama para la determinación de clases texturales de suelos.

5.2.5 Determinación de metales totales

Para la determinación del contenido de metales totales se llevó a cabo una digestión ácida en microondas, para lo cual se pesaron 0,200 g de cada suelo en un vaso de teflón, previamente descontaminado con HNO₃, y se adicionaron 4 mL de HNO₃ concentrado y 2 mL de H₂O₂ (Horno microondas Milestone mls 1200 mega), para el proceso de digestión se utilizó el siguiente programa: 5 min a una potencia de 250W; 5 min a una potencia de 400 W; 10 min a una potencia de 500 W y finalmente 5 min de ventilación.

Realizada la digestión se traspasó la solución resultante a un matraz de aforo de 20 mL arrastrando todo el sólido residual con H₂O milli-Q. Finalmente, las muestras fueron filtradas y trasvasiadas a envases de plástico para su posterior cuantificación (figura 10) por Espectroscopia de Absorción Atómica (EAA) con llama.



Figura 10: Muestras de suelo digeridas y siendo filtradas para su almacenamiento.

5.3 OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS DE SUELO Y MIEL

Para el análisis de los contaminantes orgánicos en las muestras de suelo se realizó una extracción con solvente asistido por ultrasonido, donde se utilizaron dos extractantes, agua y acetona (Tor, A. y col. 2006; Babic, S. y col. 1998). usando una relación suelo: solvente de 1:2.

La metodología de extracción depende de la técnica de cuantificación a utilizar, para el caso del análisis por GC- μ ECD, se realizó una extracción con acetona, usando ultrasonido por 15 minutos, esta suspensión se centrifugó por 7 min a 3500 rpm para separar el sobrenadante. El extracto obtenido se llevó a sequedad en un baño seco con corriente de nitrógeno (42°C), para finalmente reconstituir en n-hexano el cual contenía estándar interno (PCB 103) (figura 11).

Para los análisis realizados por DSA-TOF-MS de suelos, se realizó la extracción mediante ultrasonido por 15 minutos usando agua y acetona, por separado, esta suspensión se centrifugó por 7 min a 3500 rpm para separar el sobrenadante (figura 11).

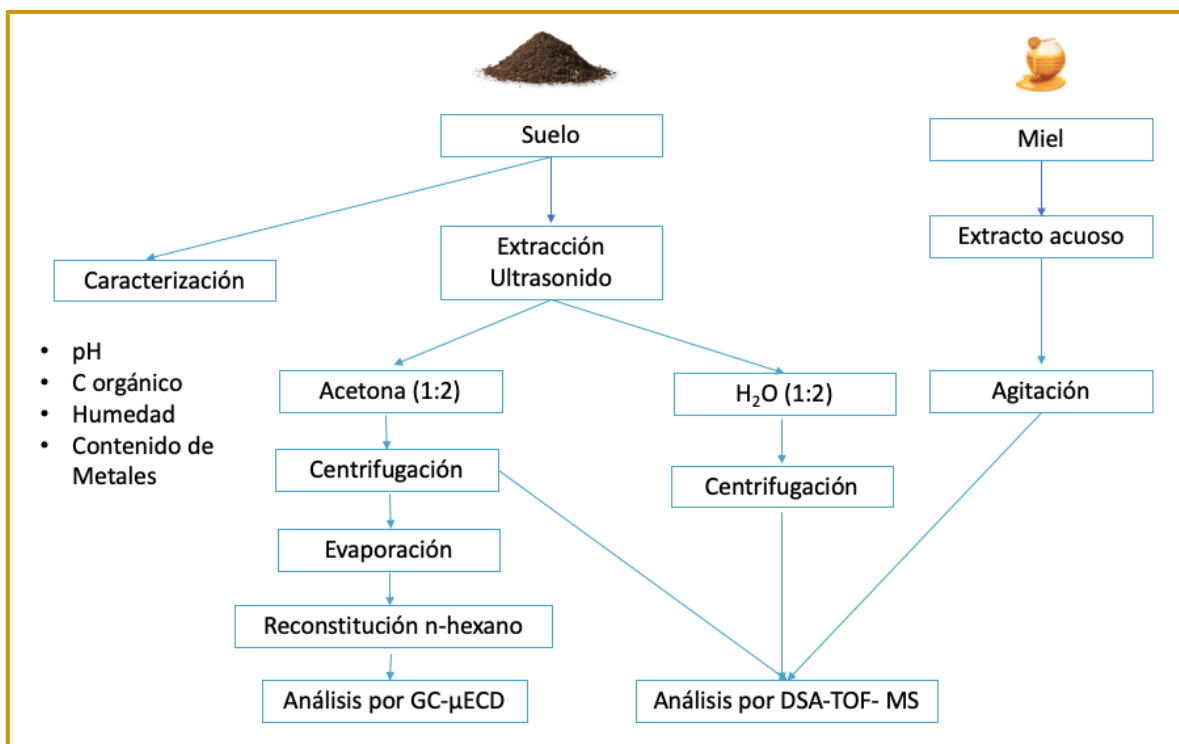


Figura 11: Esquema de trabajo de las muestras de suelo y miel.

Para el análisis de las mieles por medio de DSA-TOF-MS, se preparó un extracto acuoso, tomando entre 550-800 mg de cada muestra de miel, a la cual se le adicionaron 400 μL de agua grado HPLC, las suspensiones fueron agitadas por 10 minutos (figura 11).

5.4. ANÁLISIS DE MUESTRAS POR DSA-TOF- MS

Los análisis se realizaron utilizando DSA-TOF-MS, Perkin-Elmer, donde las condiciones de trabajo del equipo fueron:

- Polaridad: positiva
- Corona: 3,0 μA
- APCI: 300°C
- Volumen de calibrante: 40 μL
- Volumen de inyección: 10 μL
- Voltaje: 2900-3400 V.

Estás condiciones fueron optimizadas preliminarmente (Garrido y col. 2018), donde la muestra se coloca sobre una malla metálica, para su análisis.

En una primera etapa se prepararon soluciones de contaminantes orgánicos en solvente acetona de concentración 0,01 µg/L aproximadamente (Ivermectina, Clorpirifos, Flumequina, Vamidotion, Malation, Mebendazol, Vinclozolina, Aldicarb, Tiabendazol, Lindano, Fentión, Dimetoato, Cipermetrina, Fenamifos, Imidan, Etión, Diclorvos, Iprodiona, Clordano) las cuales fueron analizadas mediante DSA.TOF-MS para determinar las relaciones m/z correspondientes a cada compuesto.

Finalmente se analizaron los extractos de suelo y miel usando las mismas condiciones de trabajo descritas.

5.5 ANÁLISIS POR GC-µECD

5.5.1 Condiciones cromatográficas

Para el análisis de contaminantes orgánicos en suelo se realizó la implementación de un método de análisis utilizando un cromatógrafo de Gases, 7890A, Agilent Technologies con detector de microcaptura electrónica (GC-µECD), tomando como analito de estudio representativo de estos contaminantes al pesticida organofosforado clorpirifos (CP). A continuación, en las tablas 4 y 5 se describen las condiciones cromatográficas utilizadas para el análisis.

Tabla 4: Condiciones cromatográficas optimizadas para la cuantificación de CP

Condiciones Cromatográficas	Detalle
Temperatura de inyección	250 °C
Detector	300 °C
Gas	N ₂
Flujo Make Up N ₂	20 mL/20 min
Flujo Fase Móvil	1 mL/1 min
Volumen de inyección	3 µL
Columna	HP-5: 325°C: 30m x 320µm x 0,25µm

Tabla 5: Programa de temperatura de GC- μ ECD

	Razón [°C/min]	Temperatura [°C]	Tiempo [min]	Tiempo total [min]
Inicial	---	100	1	1
Rampa 1	85	150	0	1,5
Rampa 2	25	200	0	3,6
Rampa 3	7	280	0	15

5.5.2 Curva de calibración en solvente

Se realizó una curva de calibración de CP a partir de una solución de 50 mg CP/L, para lo cual se pesaron 2,5 mg de un estándar sólido de CP (99,5% de pureza), el cual fue solubilizado en n-hexano y luego se llevó cuantitativamente a un matraz aforado de 50 mL. A partir de esta solución de partida se prepararon 6 soluciones para construir la curva de calibración (por duplicado, en un rango entre 25 y 400 μ g/L), a estas soluciones se les adicionó PCB 103, como estándar interno a una concentración 150 μ g/L (Tabla 6).

5.5.3 Parámetros analíticos determinados

Para la técnica se determinaron los límites de detección (LD) y de cuantificación (LC), para lo cual se realizaron diez inyecciones de un estándar de 24,6 μ g/L. Para el LD se utilizó la formula $\text{Área LD} = 3 \sigma$ inyecciones, donde σ es la desviación estándar. Para el cálculo de LC se desarrolló el mismo procedimiento, multiplicando por diez la desviación estándar (es decir, $\text{Área LC} = 10 \sigma$ inyecciones). Posteriormente, estos valores de área fueron interpolados en la curva de calibración del analito, obteniéndose las concentraciones correspondientes al LD y LC.

Tabla 6: Concentraciones de curva de calibración en n- hexano, (EI: PCB 103).

Estándar	CP	PCB
	µg/L	
1	401,5	148,0
2	300,7	149,9
3	199,6	150,6
4	99,4	149,7
5	49,1	150,0
6	24,6	148,3

5.5.4 Extractos analizados

Para los análisis por GC-µECD, se utilizaron los extractos de suelo y miel obtenidos por extracción con acetona y ultrasonido según lo descrito en 5.3. Este extracto se llevó a sequedad, y luego fue reconstituido en n-hexano con adición de un estándar interno PCB 103 (EI).

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 CARACTERIZACIÓN DE LOS SUELOS

La mayoría de las muestras se obtuvieron de La Región de La Araucanía, cuya capital es la ciudad de Temuco, la cual posee una superficie de 31.842,3 km², equivalente al 4,2% del territorio nacional. El clima predominante en esta región es el templado oceánico, con periodos marcadamente lluviosos. Cerca de 916.993 ha. de esta Región se dedica al sector silvoagropecuario, lo cual corresponde al 20,6% de la superficie nacional. Siendo el principal uso plantaciones forestales con 64,3% de dicho total, seguido por cereales con 18,5% y plantas forrajeras con 9,8%. Además esta región cuenta con casi un 30% de huertos caseros frutales (ODEPA, Araucanía 2018).

Las actividades agropecuarias de las zonas cercanas a los sitios de muestreo son de gran interés, ya que, las abejas tienen una interacción directa con los recursos del entorno circundante, en la tabla 7 se encuentra la superficie regional frutal por especie de la Región, siendo la especie frutal predominante el avellano.

Tabla 7: Superficie regional frutal por especie de la Región de la Araucanía.

Especie	Superficie Región 2006 (ha)	Superficie Región 2012 (ha)	Superficie Región 2016 (ha)	Superficie Nacional	Región/Nacional (año 2018)
Avellano	548,7	2.251,5	4.434	13.110	33,8%
Manzano rojo	1.597,4	2.312,6	2.573	29.052	8,9%
Arándano	721,4	1.561,0	1.853	15.707	11,8%
Cerezo	193,3	382,0	725	25.109	2,9%
Nogal	55,0	95,3	253	35.277	0,7%
Frambueso	320,5	330,8	225	3.187	7,0%
Manzano verde	108,8	163,4	194	6.884	2,8%
Cranberry	127,1	137,8	149	726	20,5%
Castaño	35,8	8,8	55	960	5,7%
Peral	20,8	18,2	17	8.538	0,2%
Kíwi	22,0	19,7	14	8.720	0,2%

Otros	30	21	45	168.465	0,0%
Total	3.780,7	7.302,5	10.536	315.735	3,3%

Fuente: Elaborado por Odepa a partir de información del catastro frutícola para la Región de la Araucanía; Odepa – Ciren.

El segundo grupo de muestras pertenecen a La Región de Los Ríos (XIV), cuya capital es Valdivia, con una superficie de 18.429,5 km², que representa el 2,4% del territorio nacional. Al igual que la Región de la Araucanía, la Región de los Ríos presenta un clima templado oceánico. La actividad forestal, forrajera, y cerealera, alcanzan un 96,0% de la superficie destinada al rubro silvoagropecuario. Además, se ha indicado una importante producción de huertos caseros frutícolas en la región (ODEPA, Los Ríos 2018). En la tabla 8 se encuentra la superficie regional frutal por especie de la Región, donde la especie frutal predominante es el cranberry.

Tabla 8: Superficie regional frutal por especie de la Región de Los Ríos.

Especie	Superficie Región 2006 (ha)	Superficie Región 2012 (ha)	Superficie Región 2016 (ha)	Superficie Nacional	Región/Nacional (año 2018)
Arándano	614,4	1.591,1	1.420,6	15.707,5	9,0%
Avellano	29,1	260,9	509,5	13.109,8	3,9%
Cranberry	250,2	464,9	476,1	725,7	65,6%
Frambueso	279,7	275,2	116,8	3.186,7	3,7%
Castaño	19,0	59,6	79,9	960,4	8,3%
Kiwi	26,1	30,3	28,1	8.719,7	0,3%
Cerezo	14,9	27,9	20,5	25.109,3	0,1%
Sauco			17,7	17,7	100%
Zarparrilla roja			13,7	117,2	11,7%
Nogal	1,1	11,1	9,0	35.277,4	0,0%
Manzano Verde	15,4	16,9	6,4	6.884,4	0,1%
Manzano rojo	142,1	8,9	1,9	29.052,2	0,0%
Otros	10,1	16,8	3,2	176.867,6	0,0%
Total	1.402,7	2.691,5	2.703,3	315.735,4	0,9%

Fuente: Elaborado por Odepa a partir de información del catastro frutícola para la Región de Los Ríos; Odepa – Ciren.

Los resultados de la caracterización de los suelos realizada mediante métodos estandarizados para la determinación de textura, humedad y pH, se encuentran en la tabla 9. Los suelos de ambas localidades se clasifican como Franco Arenoso en base a los porcentajes de arena, arcilla y limo, según el diagrama de la figura 9.

Este tipo de suelos se caracterizan por ser aptos para la actividad agrícola, dado que poseen una textura no agregada (proporcionada por la arena), son suelos fértiles (aportado por los limos) y por poseer una buena capacidad para la retención de la humedad (favorecido por la arcilla) (Luzio, W. y col. 2006).

Tabla 9: Características fisicoquímicas de los suelos muestreados

Miel	Suelo	Arena	Arcilla	Limo	Clasificación	MO		pH	
		%				%	DE	%	DE
A	1	73,3	8,72	18,0	Franco Arenoso	23,6	0,9	4,79	0,08
	2	75,3	6,72	18,0	Franco Arenoso	20,6	1,0	4,75	0,04
B	3	78,0	6,00	16,0	Franco Arenoso	21,1	0,8	5,41	0,06
	4	80,0	6,00	14,0	Franco Arenoso	21,0	0,0	5,04	0,05
C	5	78,9	11,1	10,0	Franco Arenoso	22,4	0,1	5,91	0,07
	6	80,9	7,12	12,0	Franco Arenoso	16,0	0,7	6,61	0,03
D	7	83,4	6,56	10,0	Franco Arenoso	23,4	1,2	5,07	0,14
	8	81,4	6,56	12,0	Franco Arenoso	22,3	0,2	4,95	0,10
E	9	76,2	6,56	17,3	Franco Arenoso	18,6	0,7	4,79	0,05
	10	77,4	7,28	15,3	Franco Arenoso	23,2	1,4	4,88	0,13
F	11	81,4	9,28	9,28	Franco Arenoso	13,7	0,5	4,97	0,09
	12	83,4	7,28	9,28	Franco Arenoso	16,8	0,1	4,89	0,09
G	13	75,4	9,28	15,3	Franco Arenoso	18,1	0,4	4,70	0,08
	14	76,7	9,28	14,0	Franco Arenoso	17,9	2,2	4,86	0,09
H	15	80,7	6,00	13,3	Franco Arenoso	16,6	0,9	4,59	0,05
	16	72,7	8,00	19,2	Franco Arenoso	15,2	0,2	4,80	0,04
I	17	77,4	6,56	16,0	Franco Arenoso	19,2	1,0	4,87	0,04
	18	79,4	6,56	14,0	Franco Arenoso	21,0	0,7	4,62	0,08

El pH para los suelos de localidades cercanas a Temuco (suelos 1 a 14) se encuentra entre los rangos de $4,70 \pm 0,08$ y $6,61 \pm 0,03$, y para localidades cercanas a Valdivia entre los rangos de $4,59 \pm 0,05$ y $4,87 \pm 0,04$, en ambos casos se encuentran en rangos ligeramente ácidos, siendo esto característico de suelos del sur de Chile (Luzio, W. y col. 2006).

En la figura 12 se presentan los resultados del contenido de metal total presente en los suelos muestreados de las ciudades de Temuco y Valdivia. No fue posible cuantificar el contenido de plomo (Pb), ya que, las absorbancias obtenidas fueron

menores al límite de cuantificación de la técnica. En general para todas las muestras la desviación estándar relativa fue menor a 45%.

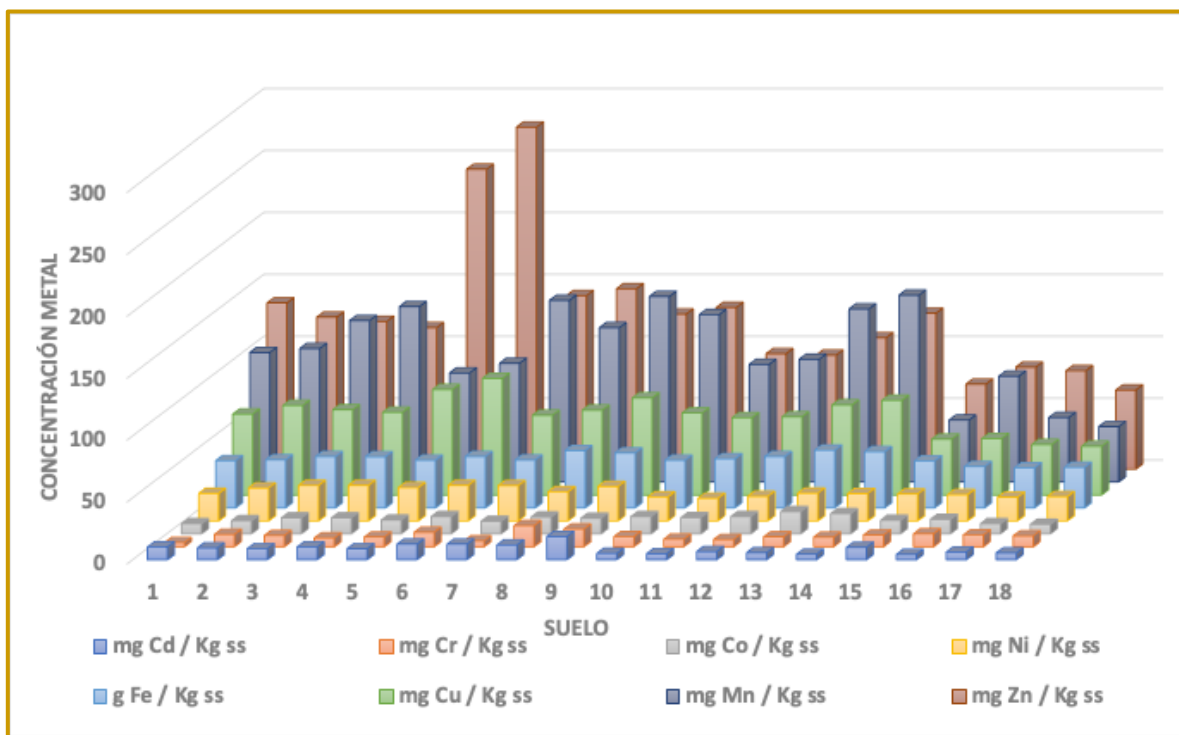


Figura 12: Concentración de metal en suelos muestreados de Temuco y Valdivia.

Los resultados obtenidos de la concentración de metal en los suelos muestreados fueron similares para los dos puntos de muestreo de cada sector, donde los valores de concentración de Cu, Ni, Cr, Zn y Cd concuerdan con los reportados para los sectores de Los Ángeles, Concepción y Talcahuano.

6.2 ANÁLISIS DE MUESTRAS

6.2.1 Análisis de contaminantes orgánicos por DSA-TOF-MS

La técnica de análisis DSA-TOF-MS se caracteriza por una alta sensibilidad y selectividad, capaz de identificar a los compuestos por su relación m/z , hasta el cuarto decimal. Los resultados obtenidos del análisis de los contaminantes orgánicos seleccionados para este estudio se presentan en la tabla 10. Se pudo

determinar que todos los contaminantes fueron identificados por una relación m/z similar a la masa molar de cada compuesto. Sólo en algunos casos la relación m/z fue diferente a la masa molar, donde se puede determinar la protonación de algunos de los grupos funcionales presentes.

Tabla 10: Resultados del análisis de 19 contaminantes orgánicos por medio DSA-TOF- MS

Nº	Nombre	Tipo	Estructura	Masa molar (g/mol)	m/z encontrada
1	Ivermectina	Antiparasitario	C ₄₇ H ₇₂ O ₁₄ (H2B1b)	875,1	892,5431
2	Clorpirifos	Pesticida	C ₉ H ₁₁ Cl ₃ NO ₃ PS	350,59	362,3367
3	Flumequina	Antibiótico	C ₁₄ H ₁₂ FNO ₃	261,25	262,0891
4	Vamidotion	Pesticida	C ₈ H ₁₈ NO ₄ PS ₂	287,34	285,0035
5	Malation	Insecticida	C ₁₀ H ₁₉ O ₆ PS ₂	330,358	331,0435
6	Mebendazol	Insecticida	C ₁₆ H ₁₃ N ₃ O ₃	295,293	296,1049
7	Vinclozolina	Fungicida	C ₁₂ H ₉ Cl ₂ NO ₃	286,11	285,0034
8	Aldicarb	Plaguicida	C ₇ H ₁₄ N ₂ O ₂ S	190,27	189,1021-202,0450
9	Tiabendazol	Fungicida	C ₁₀ H ₇ N ₃ S	201,249	202,0440
10	Lindano	Insecticida	C ₆ H ₆ Cl ₆	290,83	290,0260
11	Fentión	Plaguicida	C ₁₀ H ₁₅ O ₃ PS ₂	278,33	279,0280
12	Dimetoato	Insecticida	C ₅ H ₁₂ NO ₃ PS ₂	229,26	230,0110
13	Cipermetrina	Insecticida	C ₂₂ H ₁₉ Cl ₂ NO ₃	416,3	416,0760
14	Fenamifos	Insecticida	C ₁₃ H ₂₂ NO ₃ PS	303,36	304,1138
15	Imidan	Insecticida	C ₁₁ H ₁₂ NO ₄ PS ₂	317,32	305,118; 317,1073
16	Etión	Insecticida	C ₉ H ₂₂ O ₄ P ₂ S ₄	384,48	384,4425
17	Diclorvos	Plaguicida	C ₄ H ₇ Cl ₂ O ₄ P	220,98	220,9552
18	Iprodiona	Fungicida	C ₁₃ H ₁₃ Cl ₂ N ₃ O ₃	330,17	331,0471
19	Clordano	Plaguicida	C ₁₀ H ₆ Cl ₈	409,779	409,3431

6.2.2 Análisis de las muestras de Miel y suelos por DSA-TOF-MS

Los resultados de los análisis realizados por DSA-TOF-MS de las muestras de miel de Temuco y Valdivia se presentan en la figura 13 y 14, en general se puede apreciar un patrón de distribución similar de las señales m/z obtenidas para las mieles provenientes de Temuco. La miel es una matriz compleja, la cual contiene alrededor de 200 compuestos, entre los cuales están las azúcares, aguas y otras sustancias como proteínas (enzimas), ácidos orgánicos, vitaminas, minerales (Cu,

Ca, Fe, Mg, P, K, Na y Zn) pigmentos, compuestos fenólicos y una gran cantidad de compuestos volátiles y partículas sólidas, todos estos factores son determinantes para la estabilidad de este producto (Missio da Silva, P. y col. 2016).

Los componentes de las mieles se pueden utilizar para discriminar el origen geográfico o botánico, por ejemplo, algunos investigadores utilizan las huellas digitales de productos químicos volátiles y semi volátiles presentes en la miel para determinar su variación con orígenes florales, otros investigadores utilizan los sacáridos, componentes principales de la miel, a partir de esta información se puede evidenciar la adulteración de estos productos (Wang, J. y col. 2011), en esta investigación se considerarán los espectros de masas obtenidos como una huella dactilar de las mieles, el cual está relacionado con el origen geográfico de ellas.

Al comparar los resultados de las señales m/z de los contaminantes orgánicos analizados por DSA-TOF-MS con los espectros obtenidos de las mieles, sólo se encuentran dos señales m/z concordantes para la miel del sector D, la señal m/z de 230,1145, la cual podría corresponder al insecticida organofosforado dimetoato, y para la miel E, la señal m/z de 290,1414, la cual podría corresponder a la señal del insecticida clorado Lindano.

Por otro lado, se ha descrito en literatura la señal m/z de 180,0982 característica del compuesto fenhexamida, ($C_4H_{17}Cl_2NO_2$, masa molar 302,2 g/ mol), la cual corresponde al fragmento del anillo más 3 protones, esta señal se encontró en las mieles de los sectores A, D, E, H e I (Zhao y Hwang, 2009). También es posible corroborar la relación m/z de 149,022 correspondiente a Clorpirifos ($m/z= 149,0359$; Ftalatos o fragmentos de clorpirifos + $H_2O + 3 H^+$) en mieles de los sectores E y G.

Esta información se relaciona con los cultivos predominantes de la Región de La Araucanía (tabla 7) y la Región de Los Ríos (tabla 8), ya que clorpirifos es ampliamente usado para controlar plagas en arándanos, que corresponde al 8% y 11,8% de la producción frutícola de cada región respectivamente.

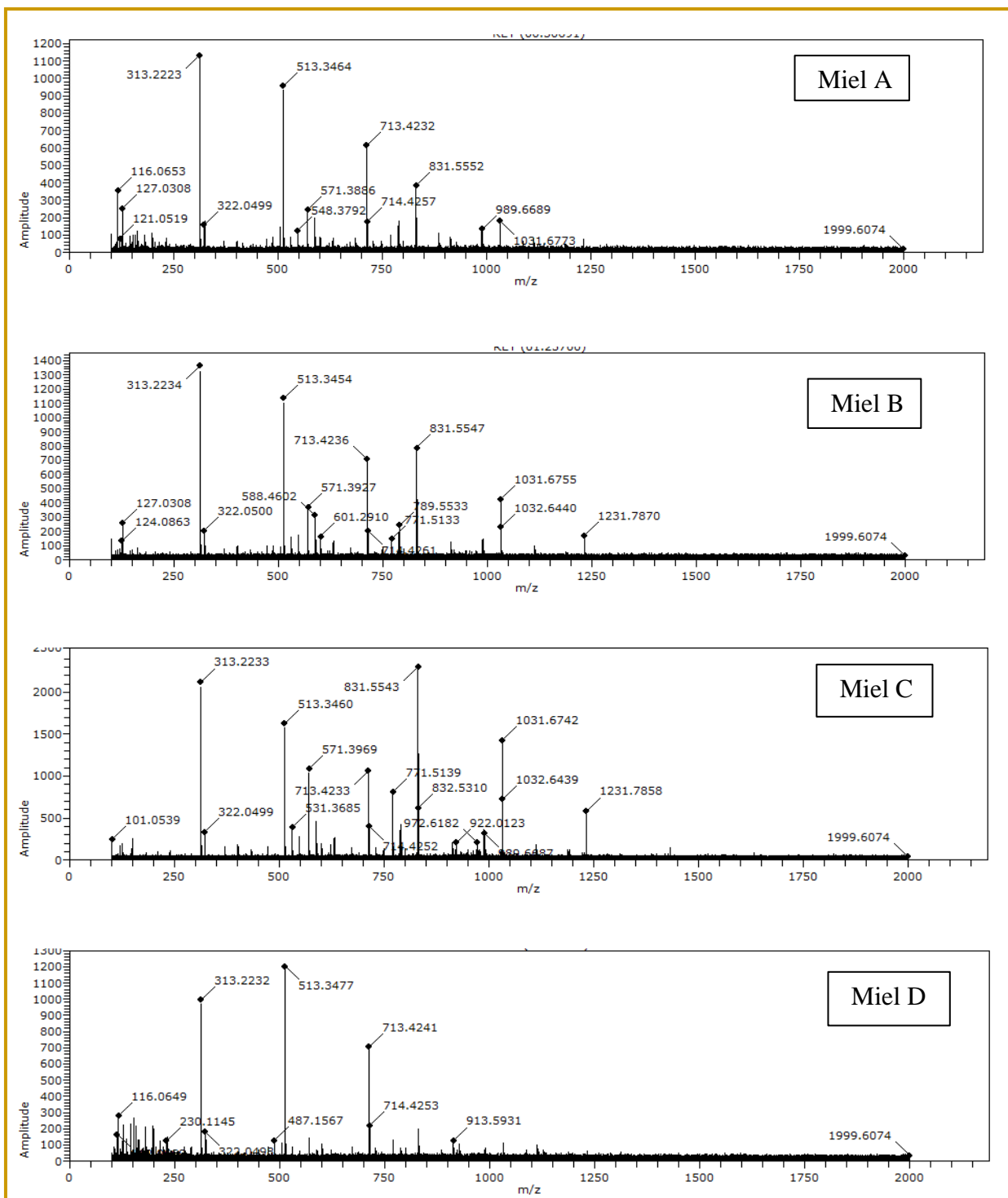


Figura 13: Espectro de masas para extracto acuoso de muestra de miel A- D, sector de Temuco.

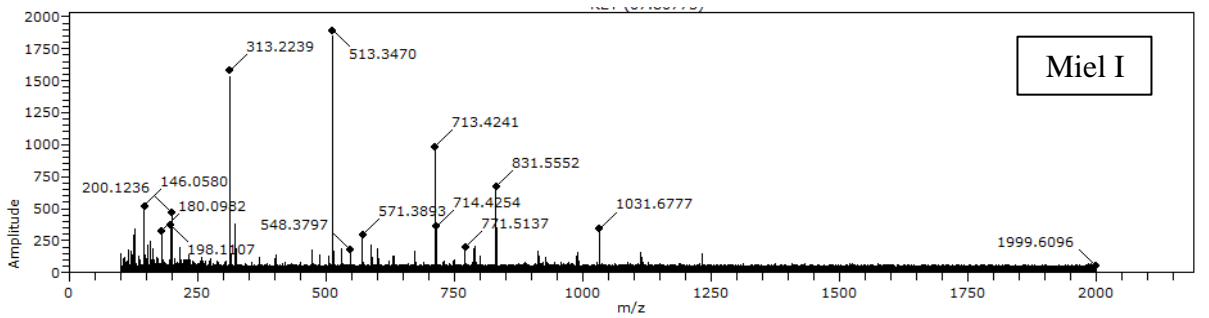
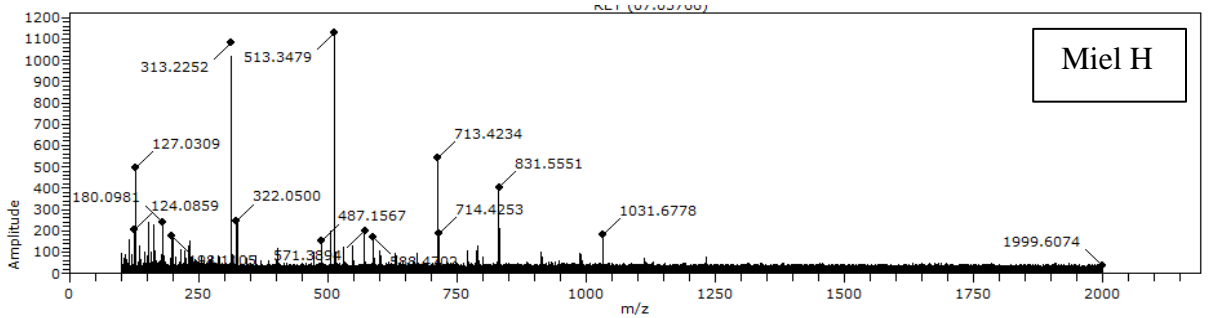
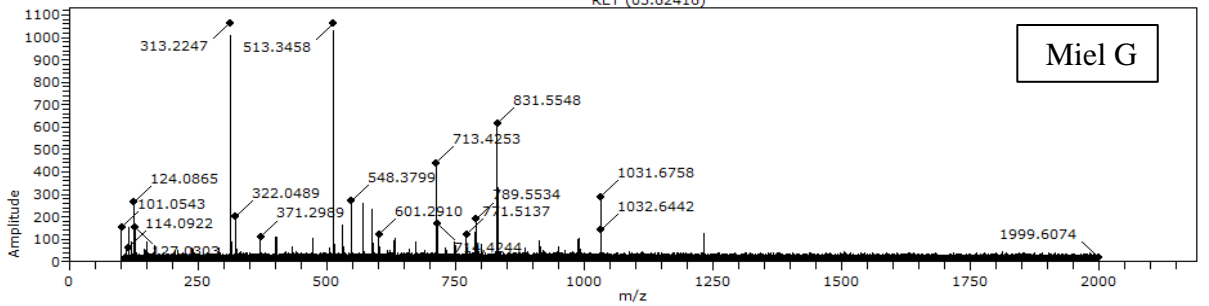
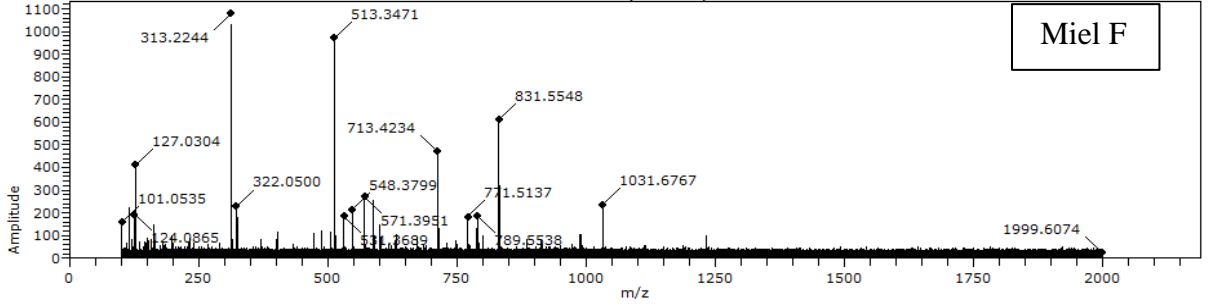
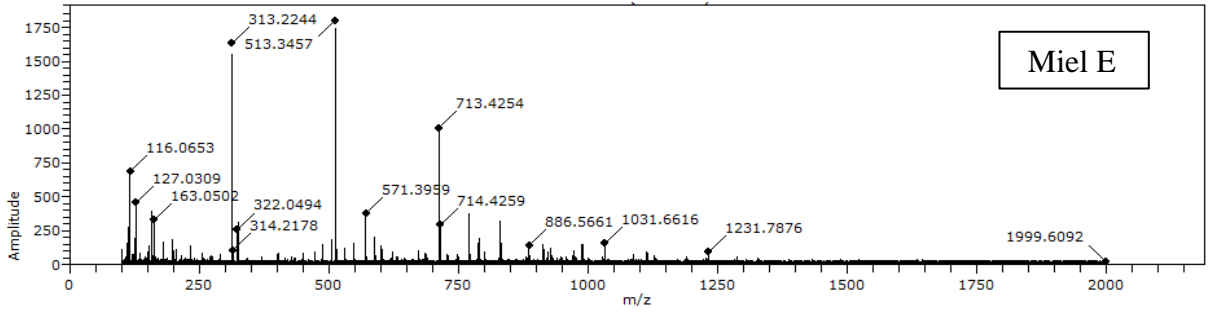


Figura 14: Espectro de masas para extracto acuoso de muestra de miel E-G, sector de Temuco, y H-I sector Valdivia.

Es importante señalar que en algunos de los espectros de masas obtenidos es posible distinguir las señales m/z correspondiente a los calibrantes utilizados para verificar el funcionamiento del equipo, los cuales corresponden a las señales m/z de 121,0508; 322,0481; 622,0289; 922,0097; 1221,9906; 1521,9714; 1821,9523; 2121,9331.

Se analizaron los espectros de masas obtenidos por DSA-TOF-MS para las mieles provenientes de 8 puntos de muestreo en Temuco y de los 2 puntos de muestreo de Valdivia, donde se puede observar una coincidencia en las señales correspondientes a las relaciones m/z : 124,0859; 313,2223; 322,0489; 513,3454; 1999,6074; 1999,7752; 1999,9431; 2000,1111, no identificadas como contaminantes, patrón de señales asociadas a la matriz (tabla 13 - anexo A).

Los resultados obtenidos del análisis de los extractos acuosos de suelo por medio de DSA-TOF-MS, se presenta en la figura 15 (para los otros suelos, figuras del anexo B de la 28 hasta la 45), este espectro de masa corresponde al análisis de suelo del sector 1, y tiene una distribución idéntica a los espectros de masas obtenidos para los otros sitios de muestreo (Anexo B), en general podemos ver que el proceso de extracción con solvente agua y usando ultrasonido no fue efectivo para la extracción de posibles contaminantes, ya que sólo se pueden evidenciar las m/z correspondientes a los calibrantes.

A diferencia de los resultados obtenidos de los extractos acuosos, los resultados del análisis de las muestras de suelo extraídos usando como solvente acetona y ultrasonido por DSA-TOF-MS permiten identificar señales correspondientes a m/z diferentes a los calibrantes utilizados (figura 16 a 24).

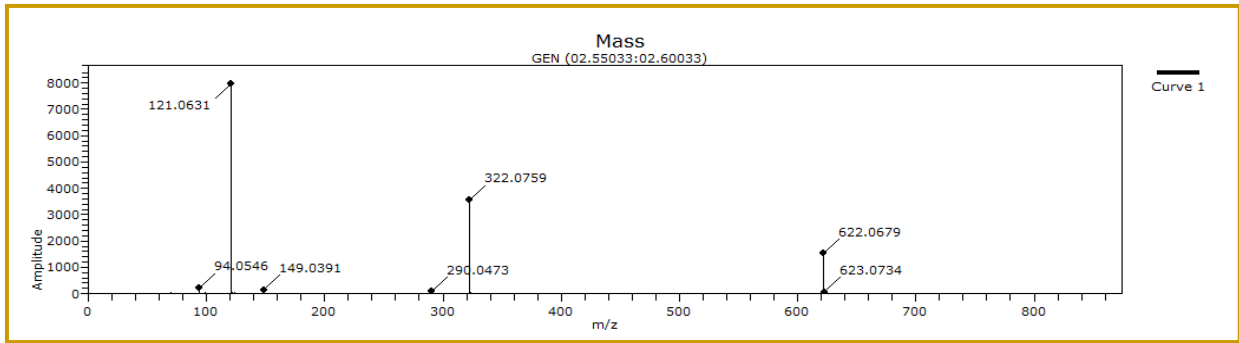


Figura 15: Espectro de masas para extracto acuoso de muestra de suelo 1, sector A.

Se compararon los espectros de masa obtenidos de los extractos de miel con los de suelo de los sectores de muestreo de Temuco, donde es posible identificar señales coincidentes tanto en miel como en suelo, las cuales corresponde a las m/z de 124,0941 y 322,0675 (tabla 13 - anexo A, tabla 14 - anexo B y tabla 15 - anexo C). En relación con los contaminantes identificados a través de DSA-TOF- MS en los extractos de mieles, es posible identificar la señal m/z de 149,031 en los suelos A, C, D E, F y G, y con respecto a la señal m/z de 180,0982 característica del compuesto fenhexamida, no se encontró en los espectros de m/z de los extractos cetónicos de los suelos tanto de Temuco como de Valdivia.

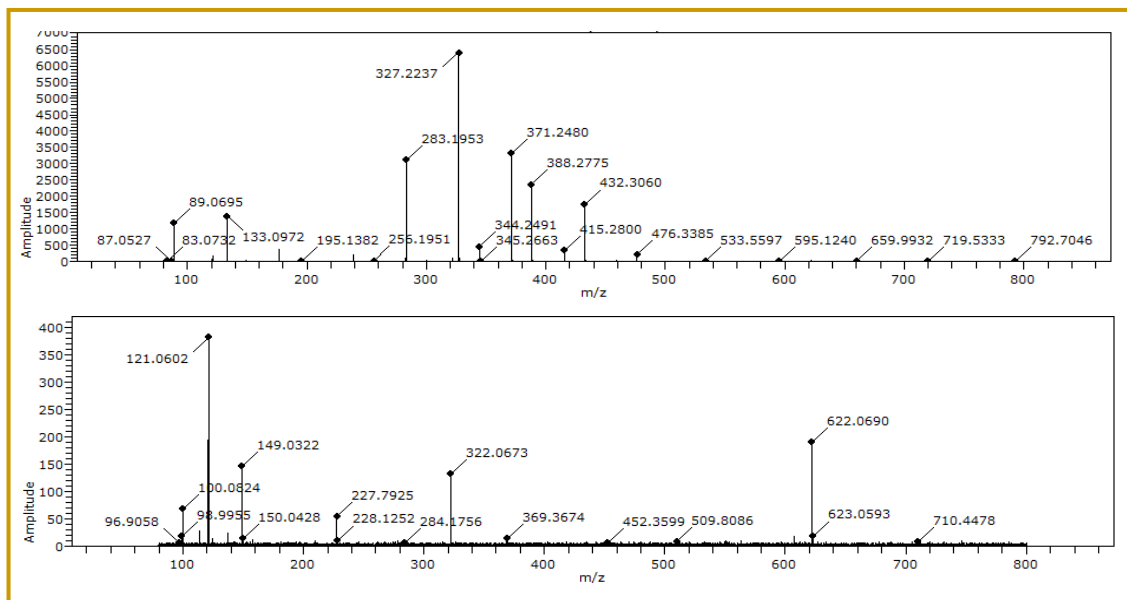


Figura 16: Espectro de masas para extracto cetónico de muestra de suelo 1 y 2, sector A.

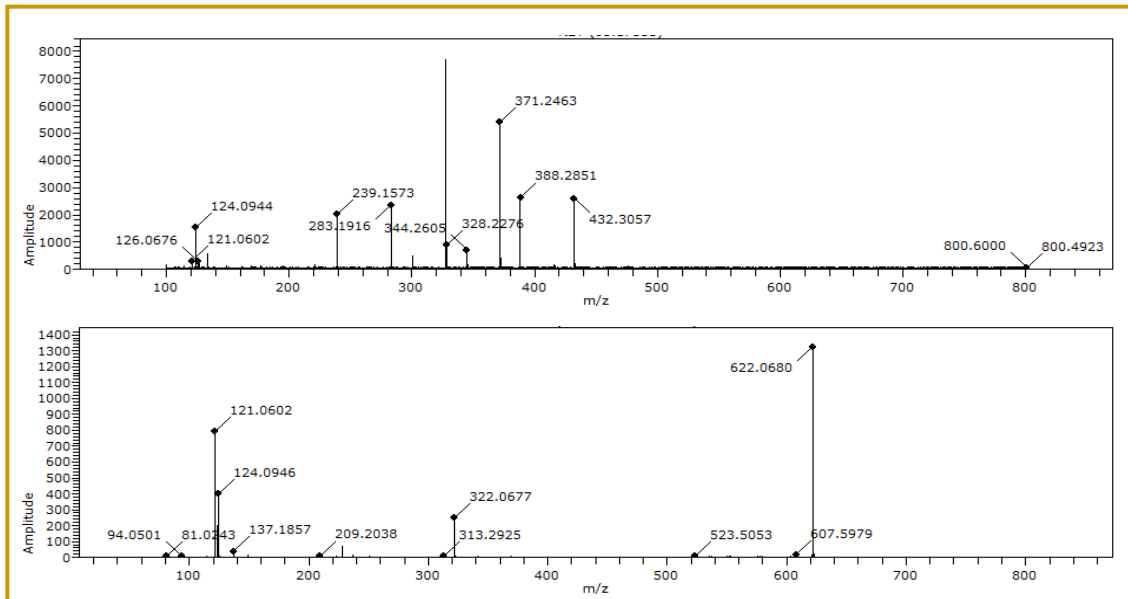


Figura 17: Espectro de masas para extracto cetónico de muestra de suelo 3 y 4 sector B.

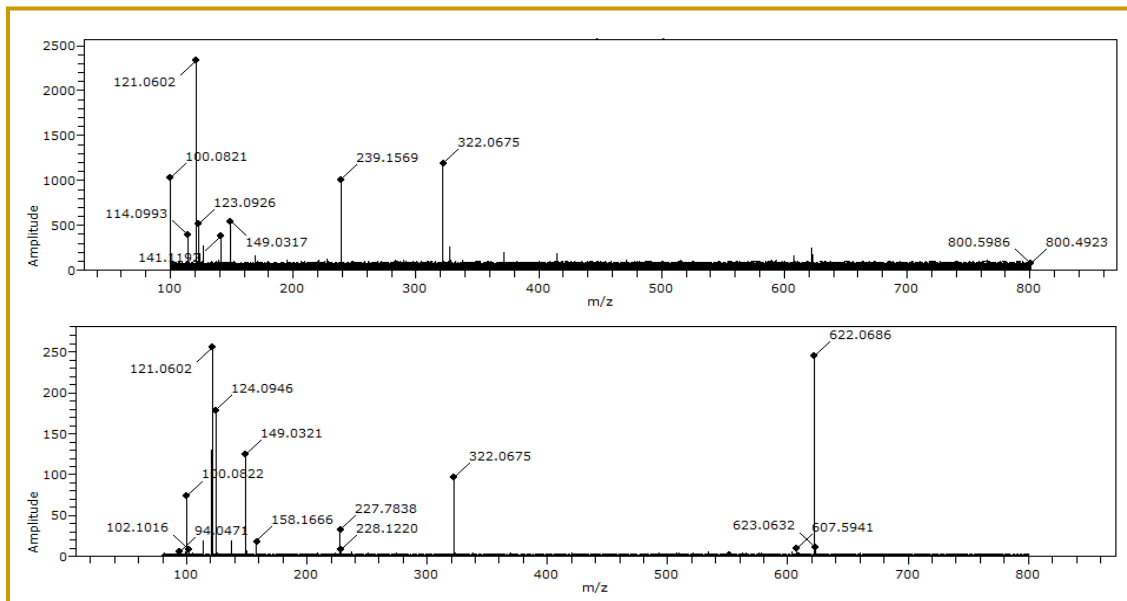


Figura 18: Espectro de masas para extracto cetónico de muestra de suelo 5 y 6 sector C.

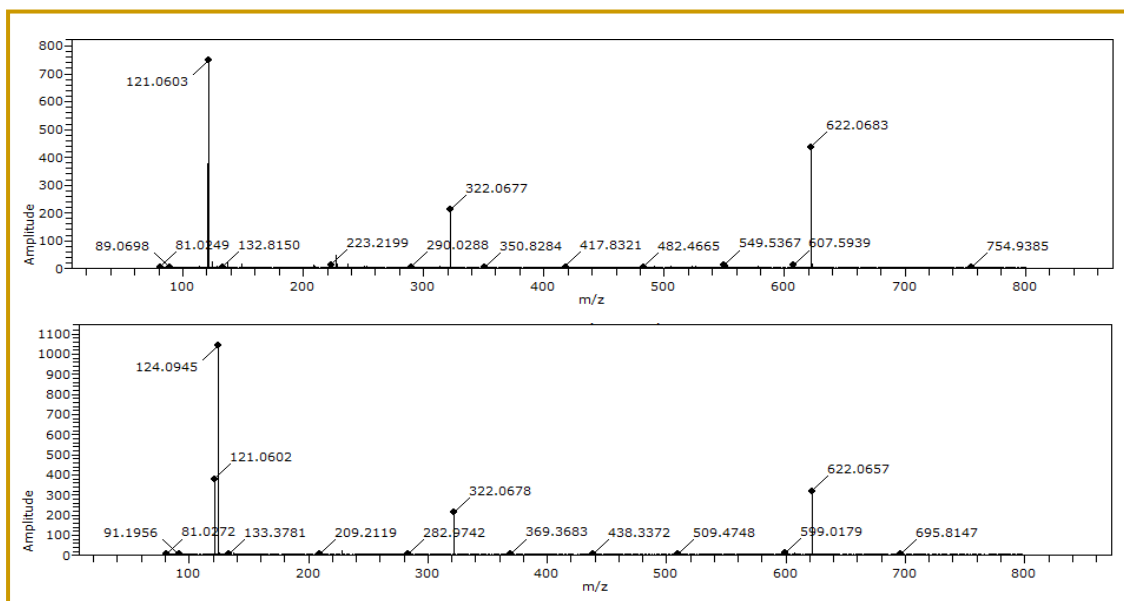


Figura 19: Espectro de masas para extracto cetónico de muestra de suelo 7 y 8, sector D.

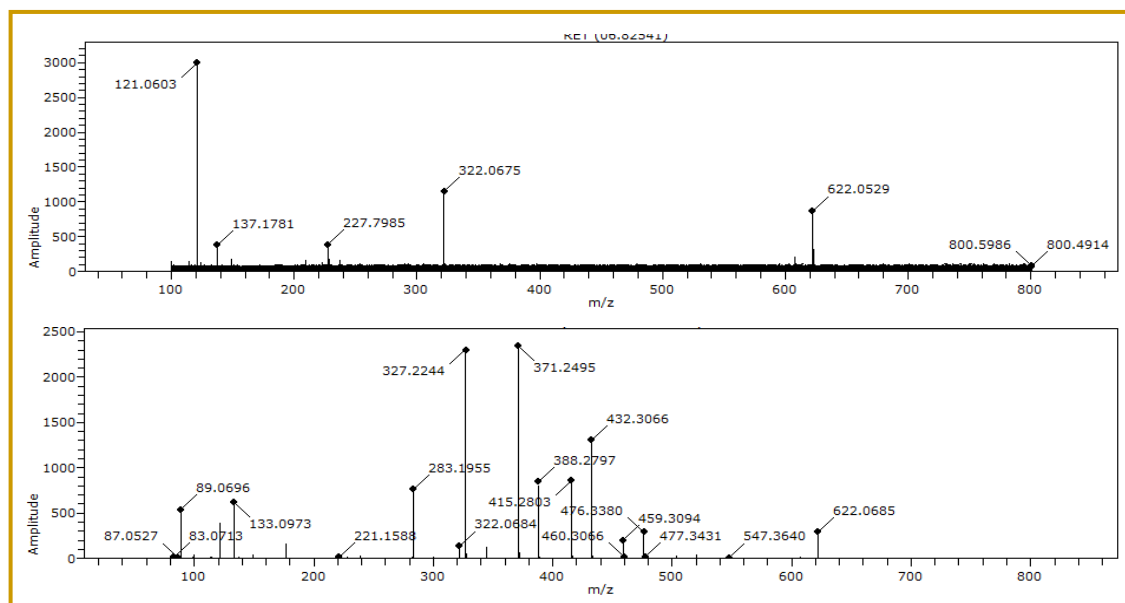


Figura 20: Espectro de masas para extracto cetónico de muestra de suelo 9 y 10, sector E.

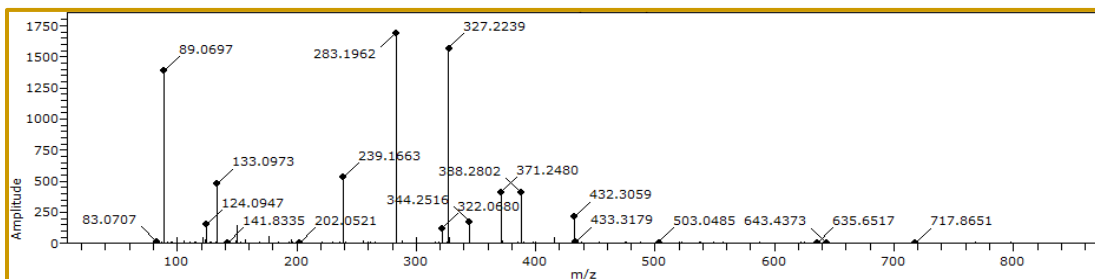


Figura 21: Espectro de masas para extracto cetónico de muestra de suelo 11 sector F (sólo se analizó una muestra, ya que la cantidad de suelo no era suficiente para los análisis).

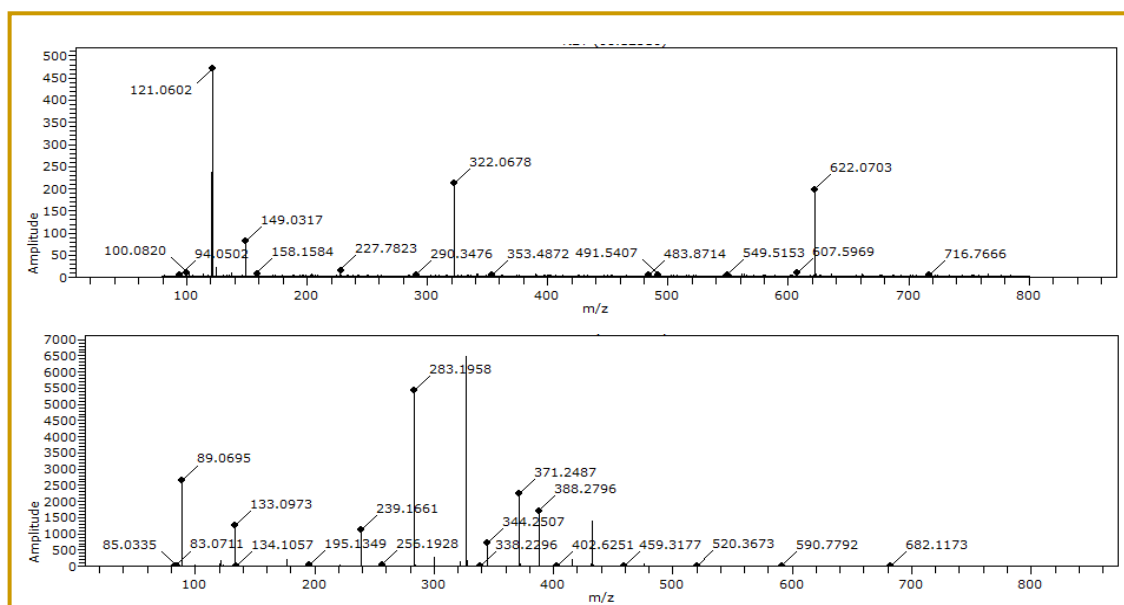


Figura 22: Espectro de masas para extracto cetónico de muestra de suelo 13 y 14, sector G.

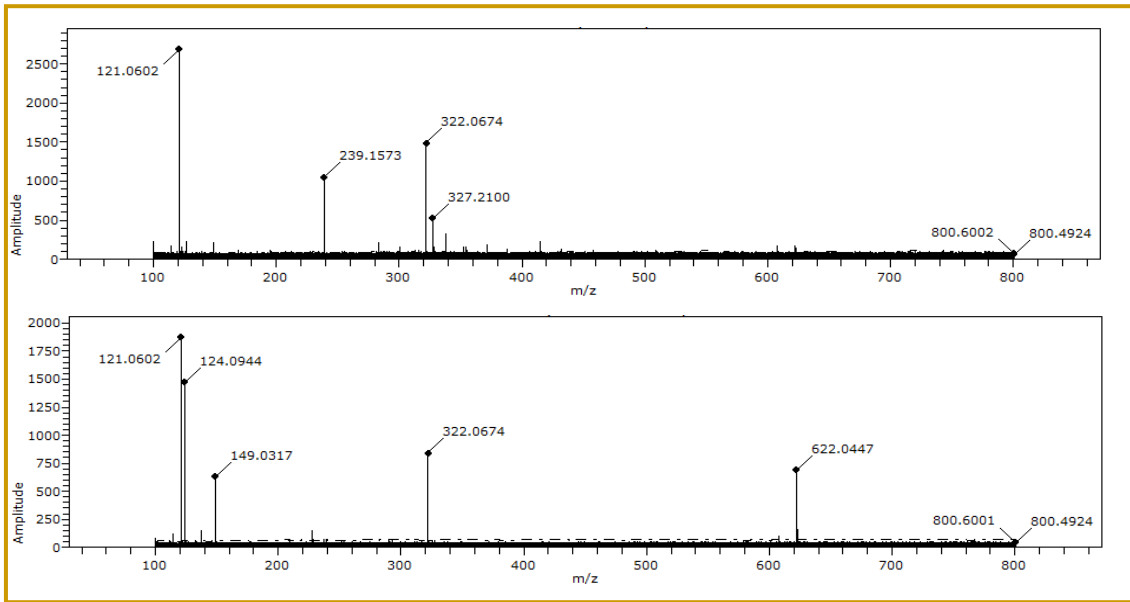


Figura 23: Espectro de masas para extracto cetónico de muestra de suelo 15 y 16, sector H.

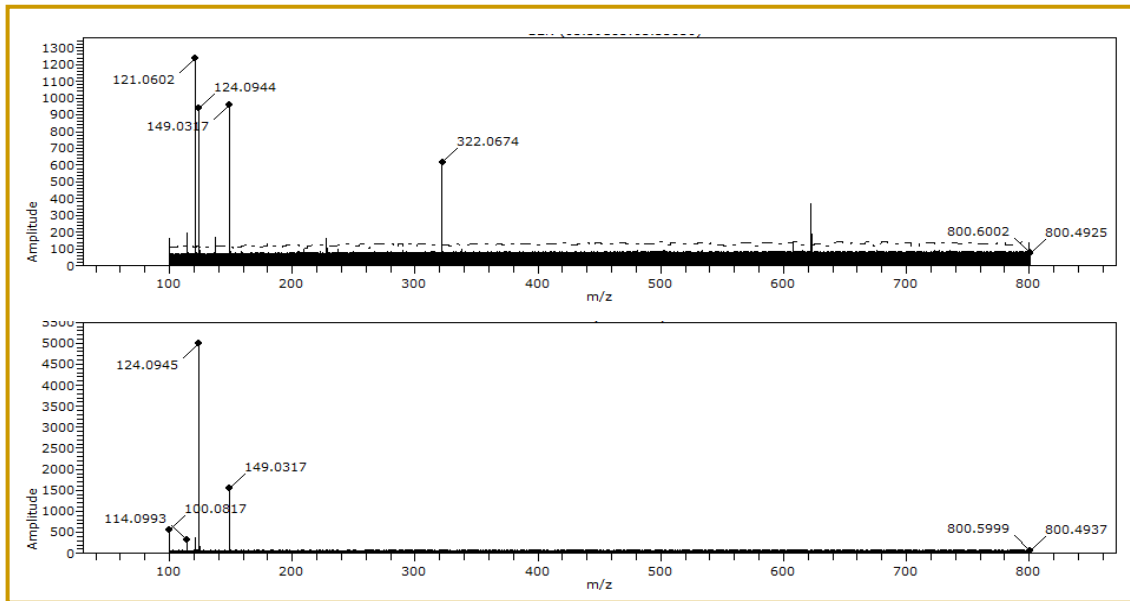


Figura 24: Espectro de masas para extracto cetónico de muestra de suelo 17 y 18, sector I.

En general los resultados obtenidos por medio de la técnica de DSA-TOF MS, mostraron grupos de señales donde hay una diferencia significativa en las señales obtenidas para las mieles versus las señales presentes en los espectros de masa de las soluciones de suelo, esto se debe a que las mieles corresponden a matrices complejas, cuyas características se pueden relacionar a la región de origen, así como al medio ambiente circundante, así como la flora presente (Soares, S. y col. 2017). Las mieles se componen principalmente de fructosa y glucosa, moléculas que proporcionan una serie de señales al realizar un espectro de masa con ionización, donde se destacan aquellas con una intensidad sobre el 20% para fructosa de 15; 29; 31; 43; 60; 73; 103 m/z y para glucosa de 31; 43; 60; 73 (NIST, 2020): Los análisis mediante DSA-TOF-MS, o similares, permiten obtener una huella dactilar de la miel, que como se mencionó anteriormente puede ser utilizada para determinar el origen de las mieles. (Wang, J. y col. 2009), en el caso de esta investigación los resultados se presentan en la tabla 13 del anexo A.

6.2.3 Análisis de contaminantes orgánicos mediante GC- μ ECD

En la figura 25 se presenta un cromatograma para una solución de CP de concentración de 200 μ g/L, correspondiente a uno de los puntos de la curva de calibración. Para disminuir la variabilidad por inyección manual a los estándares se les adicionó PCB 103 (150 μ g/L) como estándar interno (EI), obteniéndose para CP y EI los tiempos de retención de 8,778 min. y 9,196 min, respectivamente.

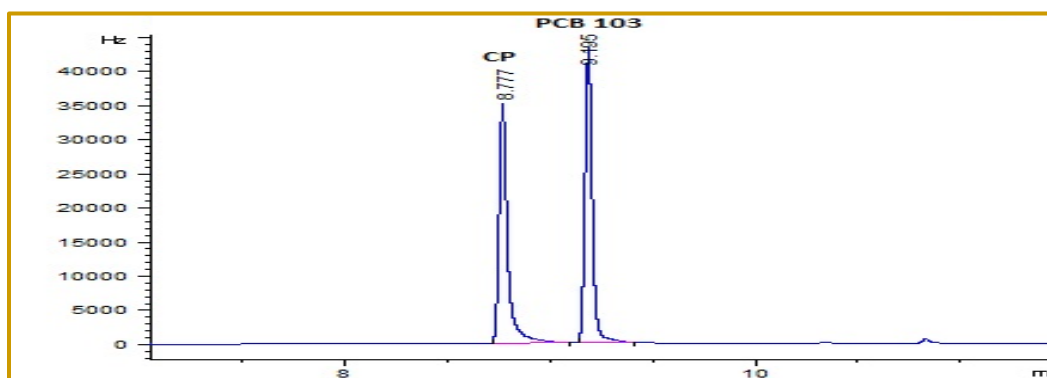


Figura 25: Cromatograma de estándar de CP (200 μ g/L) analizado por GC- μ ECD.

Los resultados de la curva de calibración de CP se presentan en la figura 26, para un rango de concentración entre 24,62 - 401,5 µg/L, cada punto corresponde a un análisis en duplicado, con desviación estándar relativa para todas las concentraciones menores a 3%.

La elección del rango de concentración de la curva de calibración se realizó considerando el límite máximo permitido de CP en miel y otros productos de la apicultura de 50 µg/kg de acuerdo con el REGLAMENTO (UE) 2018/686 DE LA COMISIÓN de 4 de mayo de 2018 (Diario Oficial de la Unión Europea, 2018).

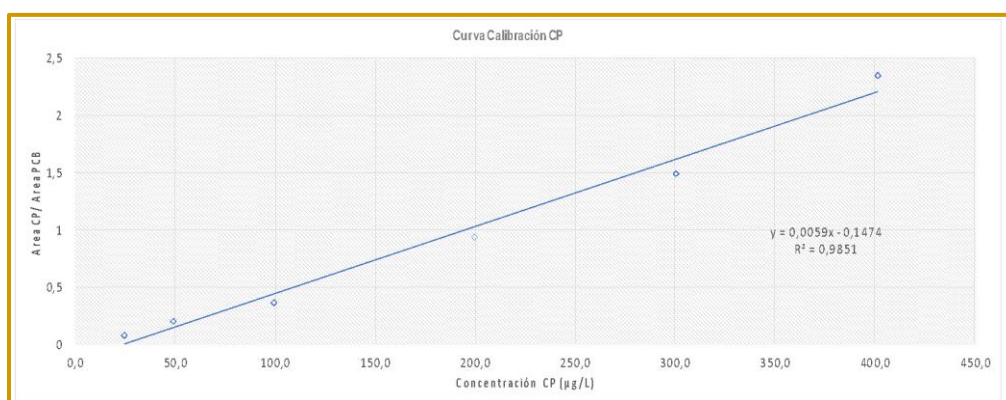


Figura 26: Curva de Calibración CP, análisis por GC- µECD

Los resultados de la evaluación de la replicabilidad y la reproducibilidad se presentan en la tabla 11. La replicabilidad se determinó por medio de la inyección de un extracto de muestra fortificada con CP (59 µg CP/L), este análisis fue realizado en triplicado en un mismo día por el mismo operador y en el mismo laboratorio, la repetibilidad se calculó por las inyecciones de 3 extractos de muestra fortificada (85 µg CP/L) en diferentes días.

Ambos valores de precisión se expresan por medio del cálculo del coeficiente de variación porcentual (CV), donde para la técnica los valores de CV dan cuenta de una alta replicabilidad. En relación con la repetibilidad para CP, este valor fue de

3,7%, lo cual podría corresponder a la variabilidad del equipo GC- μ ECD, debido a la inyección manual.

Tabla 11: Replicabilidad y repetibilidad del análisis CP por GC- μ ECD

Replicabilidad		Repetibilidad	
N° Inyección	Área CP/ Área PCB	Día	Área CP/ Área PCB
1	0,199	Día 1	0,37
2	0,199	Día 2	0,35
3	0,193	Día 3	0,34
Promedio áreas	0,197	Promedio áreas	0,35
Desviación estándar	0,004	Desviación estándar	0,01
CV %	1,8	CV %	3,7

En relación con la obtención de los LD y LC de la técnica, los resultados se presentan en la tabla 12, donde se ha determinado el promedio de las relaciones de las áreas obtenidas de un estándar de concentración de 25 μ g/L. Al reemplazar los valores de la desviación estándar (σ) en las ecuaciones descritas en la sección 5.5.3, e interpolando en las respectivas curvas de calibración para CP ($y=0,0050x-0,1474$), se obtiene un LD y LC de 25,4 μ g/L y 26,3 μ g/L, respectivamente. Los valores de LD y LC obtenidos fueron menores a los reportados por Marsin y col. 2011, cuyos valores fueron 95 y 318 μ g/L para LD y LD, respectivamente.

Tabla 12: Resultados de las inyecciones de CP y de EI en n-hexano para determinar el LD y LC de la técnica por GC- μ ECD.

N° muestra	t CP (min)	A CP (Hz)	tr EI (min)	A PCB	A CP/A EI
1	8,785	425,6	9,2	105928	0,00402
2	8,81	535,2	9,192	129101,9	0,00415
3	8,774	1058,6	9,192	187156,1	0,00566
4	8,775	1193,5	9,191	199361,4	0,00599
5	8,785	560,8	9,2	106017,4	0,00529
6	8,783	542	9,198	113150,9	0,00479
7	8,789	427,8	9,197	106019,3	0,00404
8	8,781	684,7	9,197	118124,9	0,00580
9	8,777	558	9,195	95672,4	0,00583
10	8,778	596,4	9,196	105112,8	0,00567

En relación con los resultados cromatográficos, a continuación, se presenta un cromatograma del análisis de extracto cetónico de suelo, donde se puede apreciar a un tr de 8,818 y 9,435 min la señal correspondiente a CP y SI, respectivamente. No fue posible identificar la señal de clorpirifos en todos los extractos cetónicos, sólo se logró obtener en el cromatograma del suelo del sector E (figura 27), esto puede deberse a que el clorpirifos es inestable, y se pudo evaporar durante el proceso de extracción, evaporación y reconstitución de los extractos.

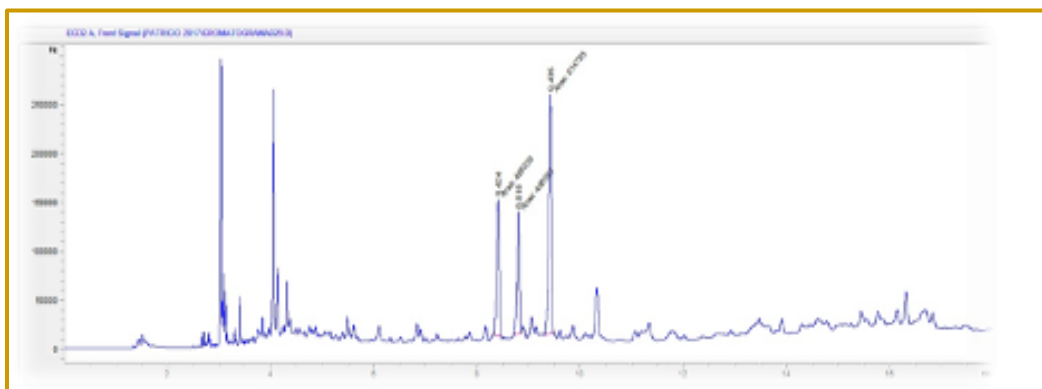


Figura 27: Cromatograma obtenido del análisis del extracto cetónico de suelos.

7. CONCLUSIONES

Los suelos muestreados presentan una textura franco-arenosa, con un pH para los suelos de localidades cercanas a Temuco (suelos 1 a 14) entre $4,70 \pm 0,08$ y $6,61 \pm 0,03$, y para localidades cercanas a Valdivia entre $4,59 \pm 0,05$ y $4,87 \pm 0,04$, con un porcentaje de materia orgánica entre 13,7 y 23,6.

El contenido de metales pesados en los suelos fue similar para los dos puntos de muestreo de cada sector, donde el contenido de Cd, Co, Ni Fe, Cu, Zn y Pb fueron menor a los encontrados en los suelos de Valdivia.

Se pudo determinar que los contaminantes utilizados en este estudio (Ivermectina, Clorpirifos, Flumequina, Vamidotion, Malation, Mebendazol, Vinclozolina, Aldicarb, Tiabendazol, Lindano, Fenti3n, Dimetoato, Cipermetrina, Fenamifos, Imidan, Eti3n, Diclorvos, Iprodiona, Clordano), presentaron una relaci3n m/z similar a la masa molar de cada compuesto, al realizar el an3lisis mediante DSA-TOF-MS.

Se valid3 una metodolog3a por GC- μ ECD para la cuantificaci3n de CP en matriz extracto cet3nico de suelo, donde la replicabilidad y repetibilidad, expresado como el coeficiente de variaci3n es de 1,8% y 3,7% respectivamente. Con un LD y LC de 25,4 μ g/L y 26,3 μ g/L, respectivamente.

En relaci3n con los resultados de los extractos de miel analizados pro DSA-TOF-MS, las se3ales correspondientes a las relaciones m/z: 124,0859; 313,2223; 322,0489; 513,3454; 1999,6074; 1999,7752; 1999,9431; 2000,1111, no identificadas como contaminantes corresponder3an a se3ales asociadas a la matriz.

En los espectros de masas obtenidos de los extractos de mieles por DSA-TOF- MS, es posible identificar las m/z de 149,022 correspondiente a clorpirifos en los sectores E y G y la m/z de 180,098 de fenhexamida en los sectores A, D, E y H.

Se pudo concluir que en los suelos de los sectores A, C, D, E, F y H se encuentra presente clorpirifos el cual fue posible de confirmar por medio de GC- μ ECD, sólo del suelo del sector E.

Este estudio es revelador porque nos muestra la transferencia de contaminantes desde suelo a abeja, luego desde abeja a colmena y finalmente desde colmena a miel. Estos contaminantes persisten debido a la capacidad antioxidante que posee la miel, por lo que las colmenas deben ser ubicadas lejos de cultivos donde se utilicen los compuestos orgánicos que fueron identificados.

8. BIBLIOGRAFÍA

Aloisi, P. 2010. Determination of quality chemical parameters of honey from Chubut (Argentinean Patagonia). Chilean Journal of Agricultural Research, 70(4), 640-645.

ATSDR., 1997. Resumen de salud pública: clorpirifos. [en línea]. <http://www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es_phs84.pdf>. [Consulta: 20 de marzo 2019].

Babic, S. Petrovic, M. and Kastelan-Macan, M. 1998. Ultrasonic solvent extraction of pesticides from soil. Journal of Chromatography A. 823:3-9.

Bachmann, H. 2007. Estudios preliminares de caracterización de miel de abeja: Determinación de carbohidratos por GC/MS y análisis enzimáticos, Tesis de grado para optar al título de Licenciado en Bioquímica y título profesional de Bioquímico, Valdivia, Chile, Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias.

Branko, N., Imamović, B., Medanhodžić-Vuk, S. and Sober, M. 2004. High performance liquid chromatography in pharmaceutical analyses. Bosn J Basic Med Sci. 4(2): 5-9 (2004).

Crespo, C. 2004. Mecánica de suelos y cimentaciones. 5ª ed. México, Limusa. 641p.

Diario Oficial de la Unión Europea, 2018. Reglamento (UE) 2018/686 De La Comisión de 4 de mayo de 2018 que modifica los anexos II y III del Reglamento (CE) nº 396/2005 del Parlamento Europeo y del Consejo por lo que respecta a los límites máximos de residuos de clorpirifós, clorpirifós-metilo y triclopir en determinados productos. [En línea]. <<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/PDF/?uri=CELEX:32018R0686&from=EN>> [Consulta: 15 de diciembre de 2020].

Diez, M.C. 2010. Biological aspects involved in the degradation of organic pollutants. J. Soil. Sci. Plant Nutr. 10(3): 244 – 277 (2010).

Esteriol, M., Copier, C., Román, A., Araneda, M.J., Rubilar, M., Pérez, I. and Auger, J. 2017. Frequency of fungicide-resistant *Botrytis cinerea* populations isolated from 'Thompson Seedles' table grapes Central Valley of Chile. Revista online Ciencia e Investigación Agraria Vol.44 no.3, 2017, Article ISSN 0718-1620. <http://dx.doi.org/10.7764/rcia.v44i3.1721>.

Garrido, T. and Mendoza, J. 2016. Characterization of Dissolved Organic Matter in River Water by Conventional Methods and Direct Sample Analysis-Time of Flight-Mass Spectrometry. Journal of Chemistry. Volume 2016, Article ID 1537370, 11 pages. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/1537370>.

Geisy, J., Solomon, K. Coats, J. Dixon, K. Gidding, J and Kenaga, E. 1999. Chlorpyrifos: Ecological Risk Assessment in North American Aquatic Environments. Environ Contam Toxicol 160:1-129.

Jones, R., McClelland, J. and Cody, R. 2006. Differentiating Writing Inks Using Direct analysis in Real Time Mass Spectrometry. Journal of Forensic Sciences 51(4): 915-8.

Latorre, B.A., Spadaro I. and Rioja, M.E. 2002. Occurrence of resistant strains of *Botrytis cinerea* to anilinopyrimidine fungicides in table grapes in Chile. Crop Prot. 21: 957–961.

Luzio, W., Casanova 2006. Avances en el conocimiento de los suelos de Chile. Registro de propiedad intelectual N° 157.822.130-154.

Manahan, S., 1999. Environmental Chemistry. Lewis Publisher. Boca Raton.

Márquez, S. Mosquera, R. Herrera y M. Monedero, C. 2010. Estudio de la absorción y distribución del clorpirifos en plantas de pasto Kikuyo (*Pennisetum clandestinum* Hochst ex chiov.) cultivadas hidropónicamente. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias* 23: 58-165.

Marsin, M., Umairah, S. Akmam, M. and Ibrahim, W., 2011. Determination of organophosphorus pesticides by dispersive liquid-liquid microextraction coupled with gas chromatography-electron capture detection. *The Malaysian Journal of Analytical Sciences* 15 (2):232 – 239.

Missio da Silva, P., Gauche, C., Valdemiro L., Costa, A. and Fett, R. 2016. Review Honey: Chemical composition, stability and authenticity. *Food Chemistry*. Volume 196, 1 April 2016, Pages 309-323.

NIST, 2020. Libro del Web de Química del NIST, SRD 69. <<https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C57487&Mask=200>> [Consulta: 5 de Julio de 2020].

ODEPA., 2018. Informe Regional 2018, Región de la Araucanía [En línea]. <<https://www.odepa.gob.cl/wp-content/uploads/2018/03/Araucania.pdf>> [Consulta: 15 de septiembre de 2019].

ODEPA., 2018. Informe Regional 2019, Región de Los Ríos [En línea]. <<https://www.odepa.gob.cl/wp-content/uploads/2018/02/Los-Rios.pdf>> [Consulta: 15 de septiembre de 2019].

Sadzawka, A., Grez, R., Mora, M.L., Saavedra, N. and Carrasco, M.A. 2006. Recommended methods for Chilean soils. Commission on Accreditation and Standardization. Chilean Society of Soil Science.

- SAG, 2019.** Lista de Plaguicidas Autorizados – SAG.
<<https://www.sag.gob.cl/content/lista-de-plaguicidas-autorizados-0>> [Consulta: 21 de marzo de 2019].
- Skoog D.,** Holler, J. and Crouch, S. 2008. Principios de Análisis Instrumental, 8th, CENGAGE Learning.
- Stachniuk, A.** and Fornal, E. 2016. Liquid Chromatography-Mass Spectrometry in the Analysis of Pesticide Residues in Food. Food Analytical Methods. 9, 1654- 1665 (2016).
- Soares S.,** Amaral, J., Maria Beatriz P. and Mafra, I. 2017. A Comprehensive Review on the Main Honey Authentication Issues: Production and Origin. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety Vol.16.
- Tor, A.,** Emin Ayden, M. and Özcan, S. 2006. Ultrasonic solvent extraction of organochlorine pesticides from soil. Analytica Chimica Acta. 559:173-180.
- Von Frish, K.** 1999. La vida de las abejas, 10th, Emisferio Sur S.A.
- Watts, M.,** 2012. Clorpirifos: Un posible COP a nivel global. Oficina de Comunicaciones y Administración Red de Acción en Plaguicidas y sus Alternativas de América Latina (RAP-AL). Santiago de Chile.
- Wang J.,** Kliks, M., Qu, W., Jun, S., Shi, G. and Li, Q. 2009. Rapid determination of the geographical origin of honey based on protein fingerprinting and barcoding using MALDI TOF MS. J Agric Food Chem. 2009;57(21):10081-10088. doi:10.1021/jf902286p.

Wang, J. and Li, Q. 2011. Chapter 3 - Chemical Composition, Characterization, and Differentiation of Honey Botanical and Geographical Origins. *Advances in Food and Nutrition Research*. Volume 62, 2011, Pages 89-137.

ANEXO A

Tabla 13: Resumen de señales m/z encontradas en extractos acuosos de muestras de miel.

m/z	Mieles								
	Temuco							Valdivia	
	A	B	C	D	E	F	G	H	I
100,0752					X				
101,0158					X				
101,0534	X	X	X		X	X			
105,0635									X
108,0781							X		X
110,0549					X				
112,0669				X	X				X
114,0523					X				
114,0919				X	X	X	X	X	
116,0649	X			X	X	X	X		X
121,0519	X								X
122,0866									X
123,0431					X				
124,0859	X	X	X	X	X	X	X	X	X
124,0941	X	X	X	X	X	X	X	X	X
127,0303	X	X		X	X	X	X	X	X
136,0716				X	X		X		
146,0580	X		X	X			X	X	X
149,0220					X	X			
152,0618	X			X	X		X	X	X
158,0778	X			X	X			X	X
162,0824				X	X		X	X	X
163,0470	X				X		X		
164,0961				X	X		X		
180,0980	X			X	X		X	X	X
198,1104	X			X	X		X	X	X
200,1237	X			X	X		X	X	X
204,0727					X				
216,1102								X	X

222,0984							X		
225,1311									X
230,1145				X					
232,1116	X			X	X		X		
255,0737					X				
290,1414					X				
313,2223	X	X	X	X	X	X	X	X	X
314,2178					X				
322,0489	X	X	X	X	X	X	X	X	X
322,0675	X	X	X	X	X	X	X	X	X
325,0911	X			X	X		X		
326,1049					X				
371,2989						X			
401,2111						X			
402,2279						X			
451,1406					X				
473,2535					X				
487,1566	X			X	X		X		
504,2053	X				X		X		
513,3454	X	X	X	X	X	X	X	X	X
531,3685		X	X		X	X			
548,3792	X	X	X		X	X	X	X	
571,3886	X	X	X		X	X	X	X	X
588,4574		X	X		X	X	X		
601,2910		X			X	X		X	
602,2130					X				
621,9964					X				
632,4311		X	X			X			
673,3878					X	X		X	
686,5064	X								
713,4232	X	X	X	X	X	X	X	X	X
714,4244	X	X	X	X	X	X	X	X	X
771,5133		X	X	X	X	X		X	X
772,5572					X				
789,5533	X	X	X		X	X			
801,4127					X				
831,5543	X	X	X	X	X	X	X	X	X
832,5306	X		X					X	

886,5647	X								
886,5661					X				
913,5931				X					
917,8016									X
919,8495									X
921,3287									X
922,0123			X		X				X
972,6179			X		X				
989,6687	X	X	X		X				
1031,6616	X	X	X		X	X	X	X	X
1032,6435		X	X		X	X			
1114,6773					X				
1231,7858		X	X		X				
1999,6074	X	X	X	X	X	X	X	X	X
1999,7752	X	X	X	X	X	X	X	X	X
1999,9431	X	X	X	X	X	X	X	X	X
2000,1110	X	X	X	X	X	X	X	X	X

ANEXO B

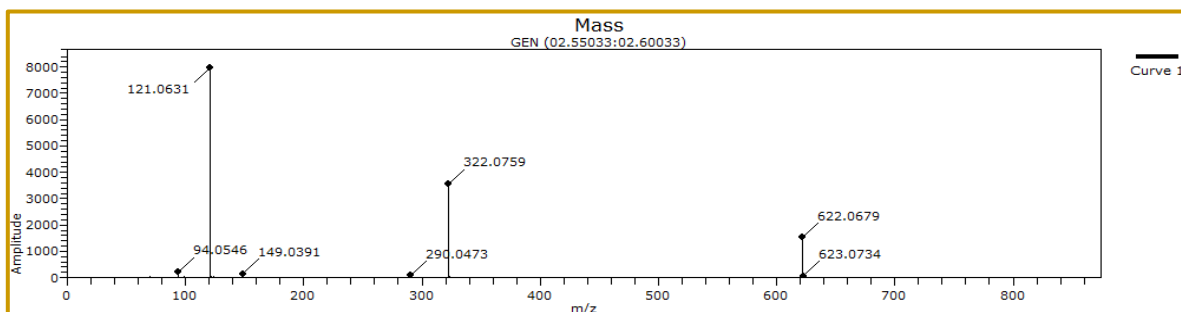


Figura 28: Espectro de masas para extracto acuoso de muestra de suelo 1.

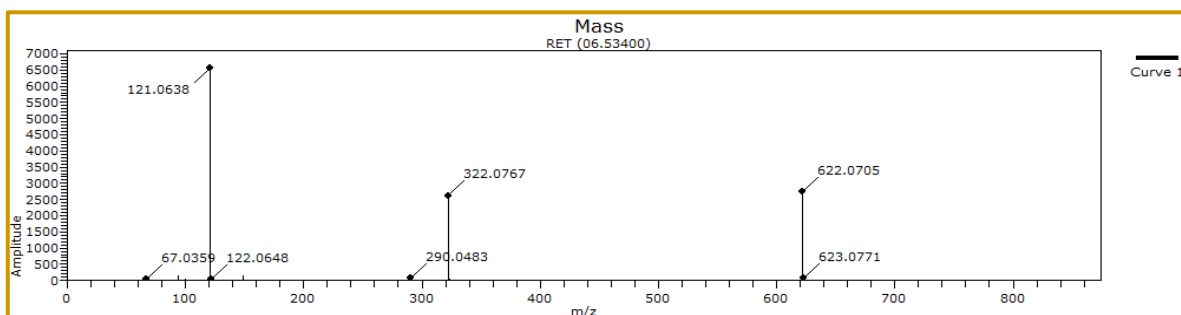


Figura 29: Espectro de masas para extracto acuoso de muestra de suelo 2.

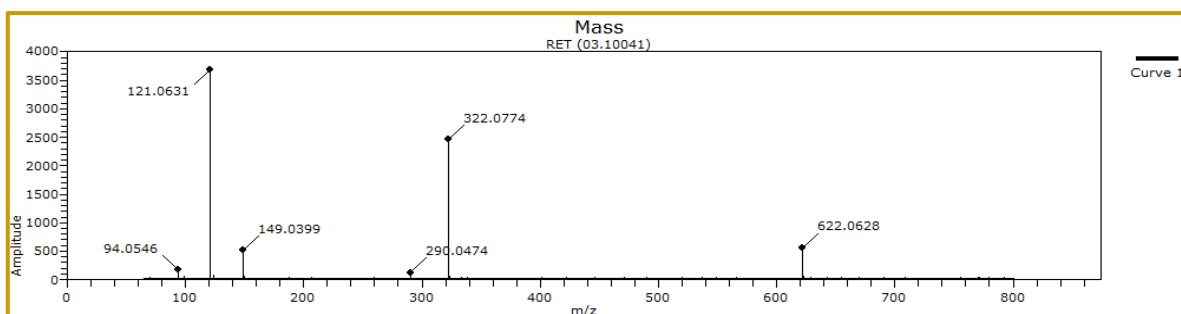


Figura 30: Espectro de masas para extracto acuoso de muestra de suelo 3.

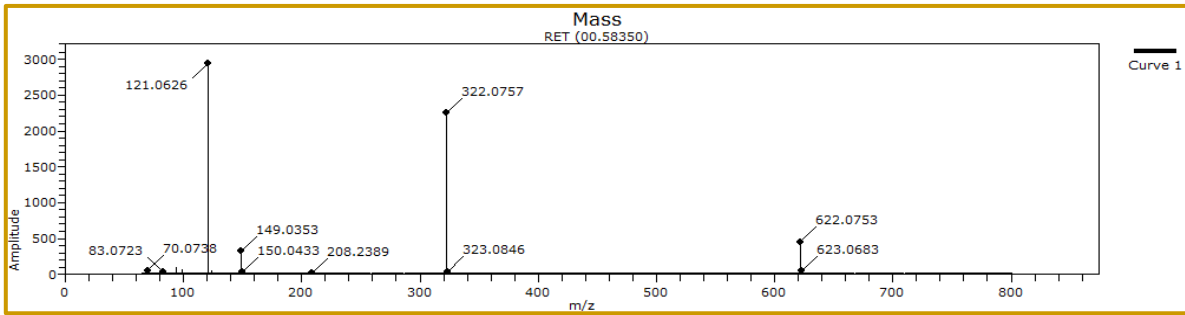


Figura 31: Espectro de masas para extracto acuoso de muestra de suelo 4.

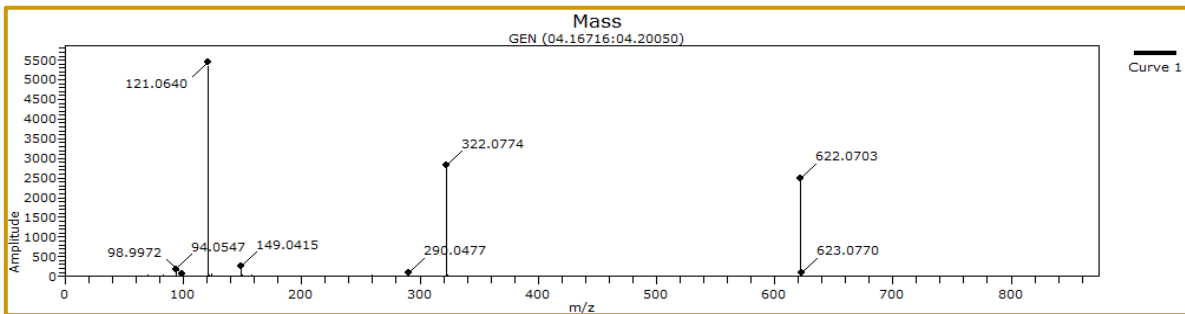


Figura 32: Espectro de masas para extracto acuoso de muestra de suelo 5.

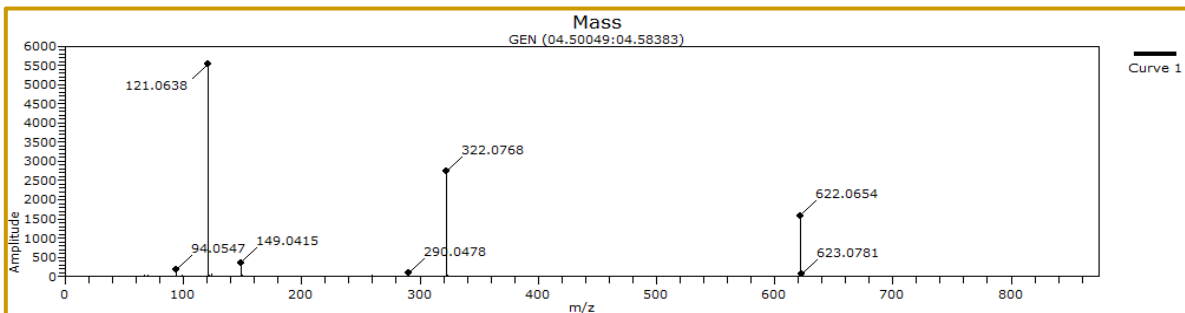


Figura 33: Espectro de masas para extracto acuoso de muestra de suelo 6.

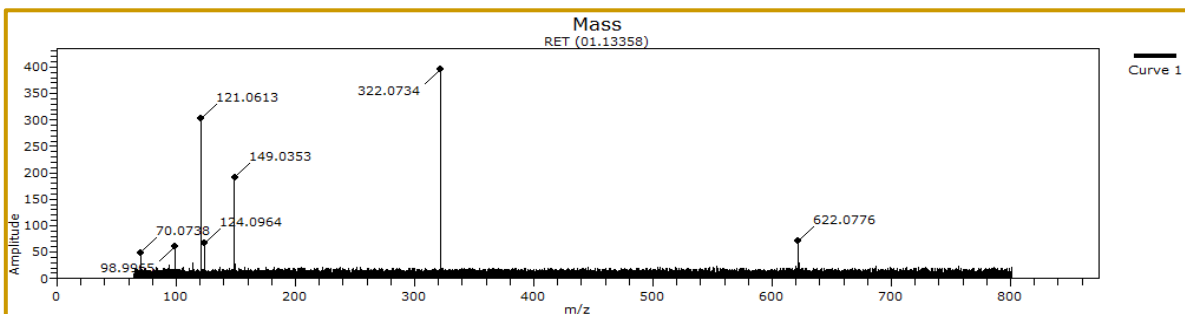


Figura 34: Espectro de masas para extracto acuoso de muestra de suelo 7.

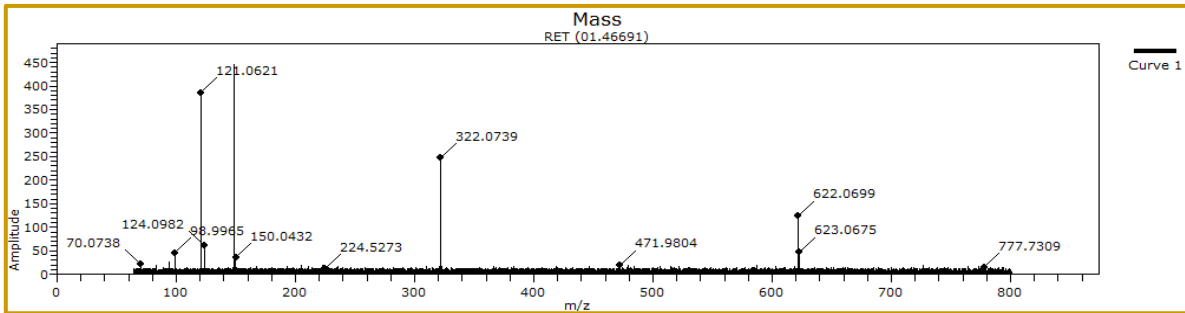


Figura 35: Espectro de masas para extracto acuoso de muestra de suelo 8.

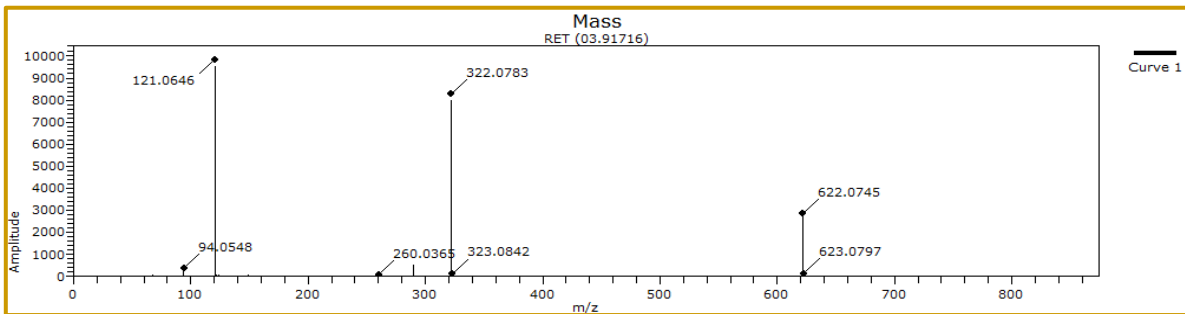


Figura 36: Espectro de masas para extracto acuoso de muestra de suelo 9.

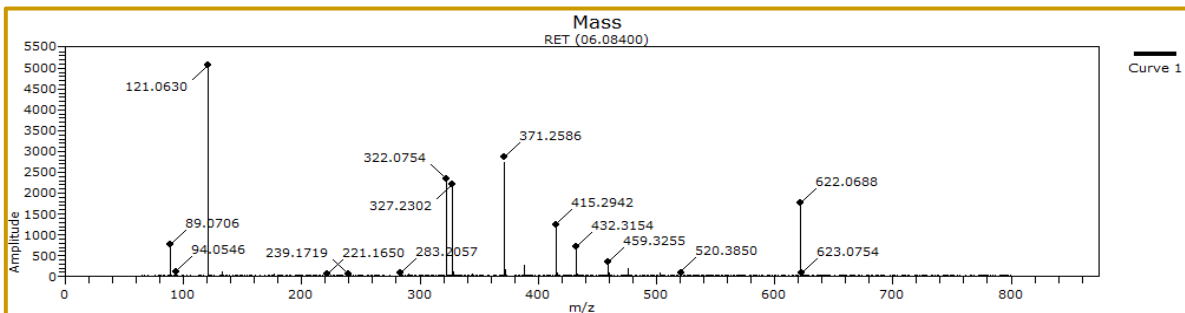


Figura 37: Espectro de masas para extracto acuoso de muestra de suelo 10.

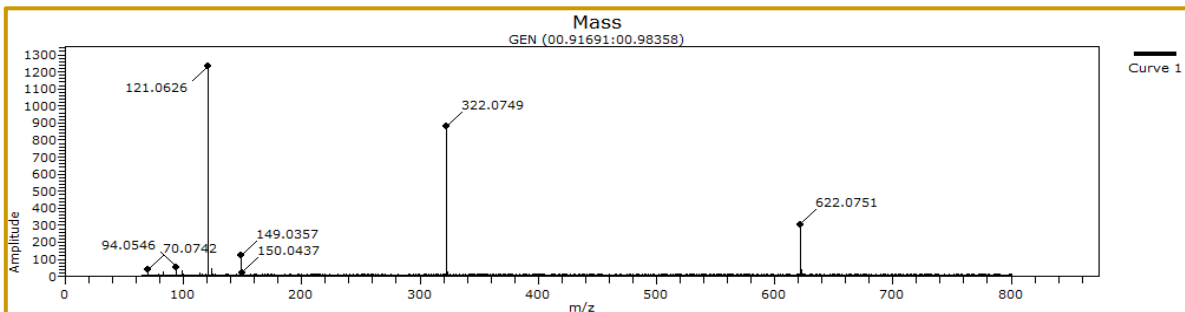


Figura 38: Espectro de masas para extracto acuoso de muestra de suelo 11.

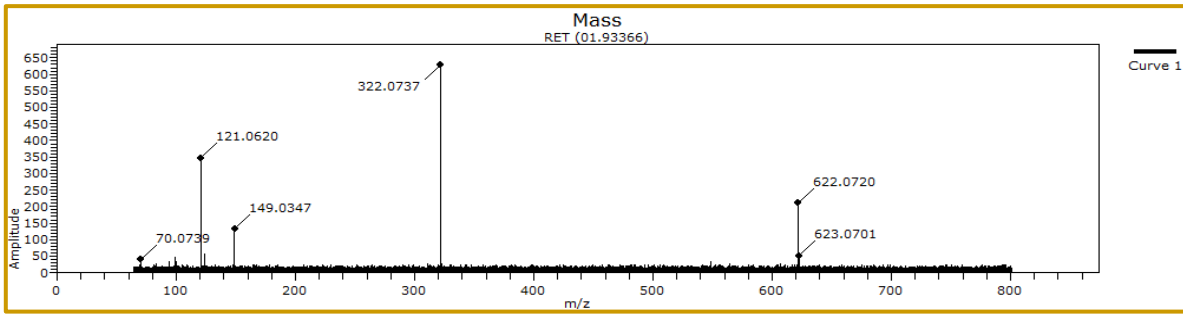


Figura 39: Espectro de masas para extracto acuoso de muestra de suelo 12.

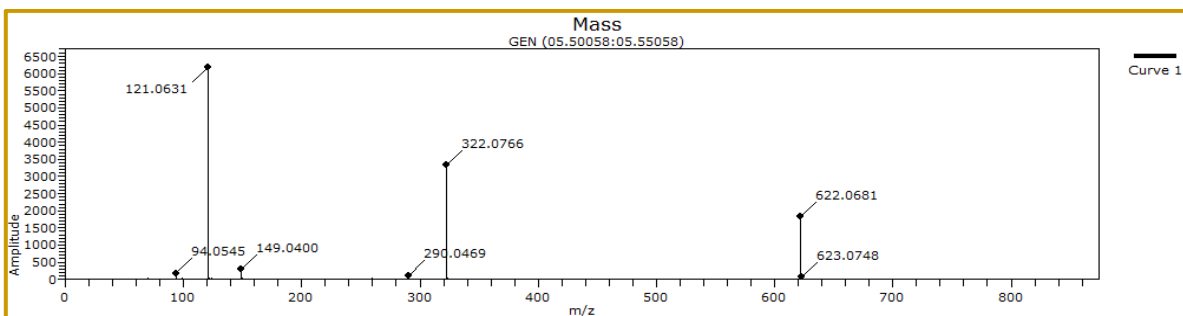


Figura 40: Espectro de masas para extracto acuoso de muestra de suelo 13.

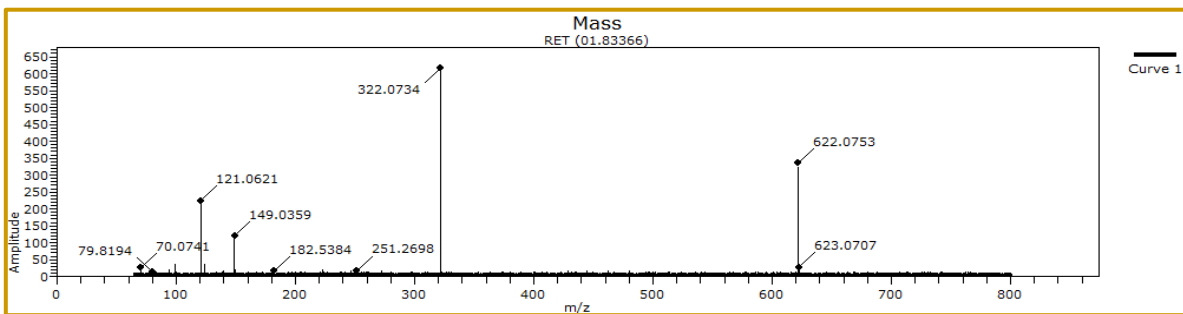


Figura 41: Espectro de masas para extracto acuoso de muestra de suelo 14.

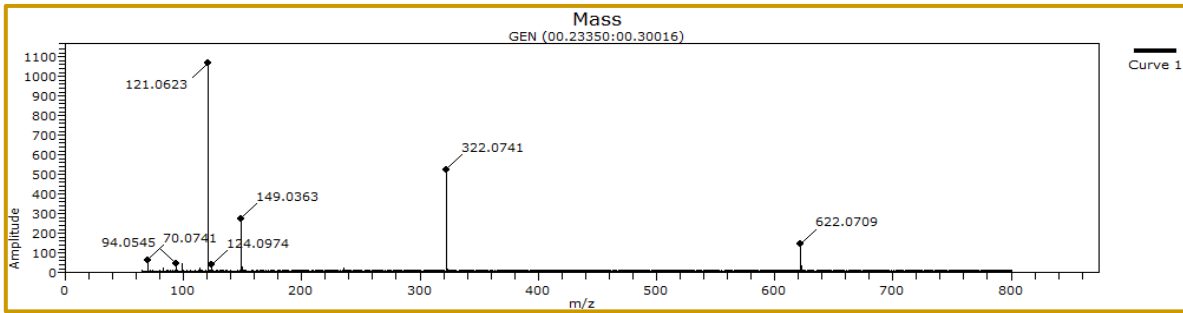


Figura 42: Espectro de masas para extracto acuoso de muestra de suelo 15.

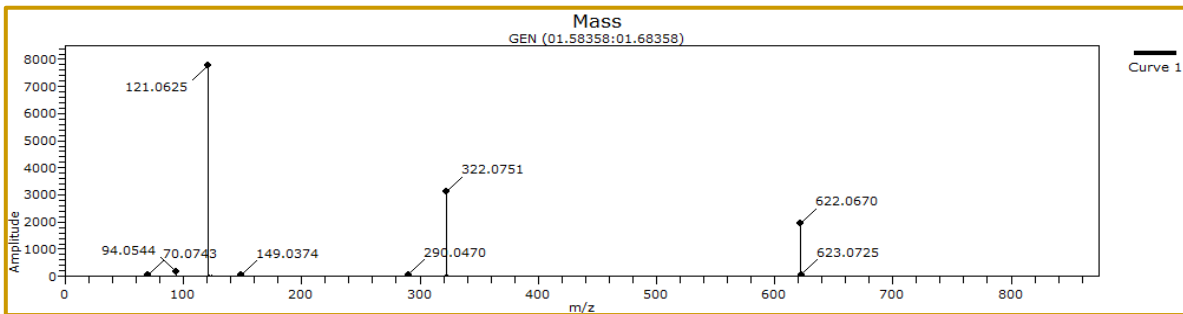


Figura 43: Espectro de masas para extracto acuoso de muestra de suelo 16.

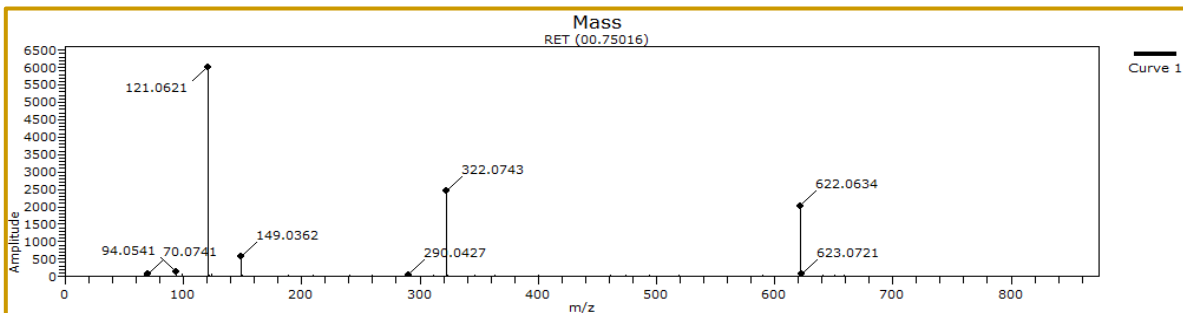


Figura 44: Espectro de masas para extracto acuoso de muestra de suelo 17.

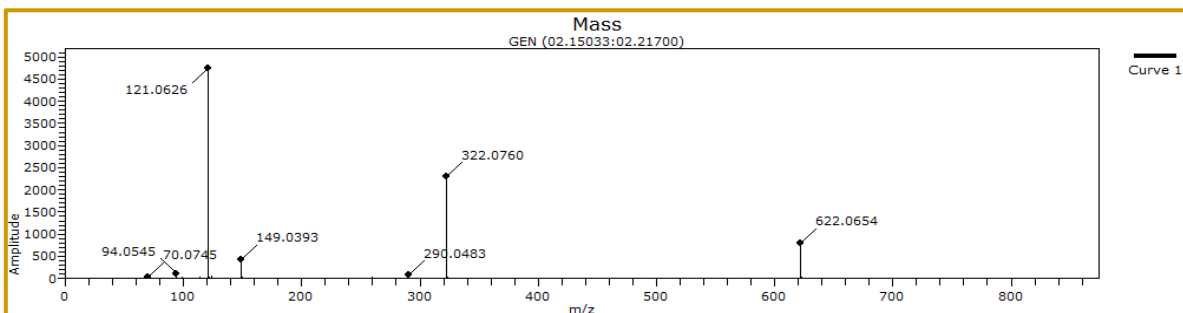


Figura 45: Espectro de masas para extracto acuoso de muestra de suelo 18.

Tabla 14: Resumen de señales m/z encontradas en extractos acuosos de muestras de suelos.

m/z	Miel A		Miel B		Miel C		Miel D		Miel E		Miel F		Miel G		Miel H		Miel I	
	Suelo 1	Suelo 2	Suelo 3	Suelo 4	Suelo 5	Suelo 6	Suelo 7	Suelo 8	Suelo 9	Suelo 10	Suelo 11	Suelo 12	Suelo 13	Suelo 14	Suelo 15	Suelo 16	Suelo 17	Suelo 18
121,0519	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X			X	X	X	X	X	X
122,0668		X																
124,0859			X		X	X	X	X			X			X				
124,0941	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
149,0220	X	X	X	X	X	X	X	X			X	X	X	X	X	X	X	X
290,1414	X	X	X		X	X								X				
322,0489	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
322,0675	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
327,2306										X								
371,2989										X								
415,2942										X								
622,0705	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

ANEXO C

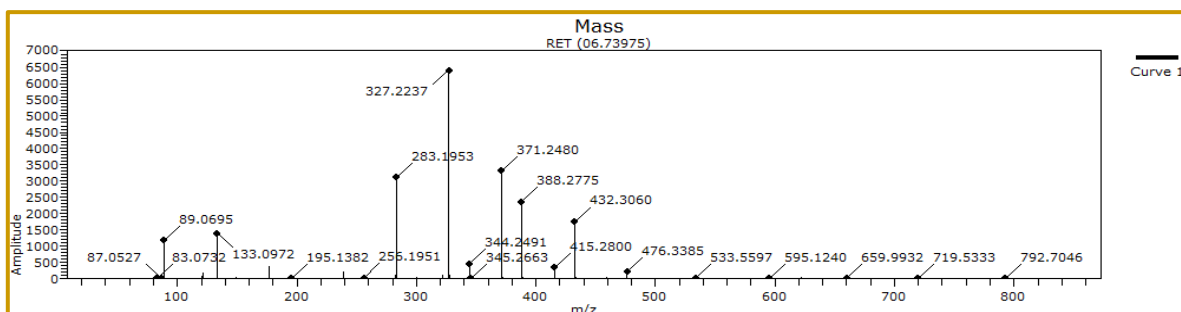


Figura 46: Espectro de masas para extracto cetónico de muestra de suelo 1.

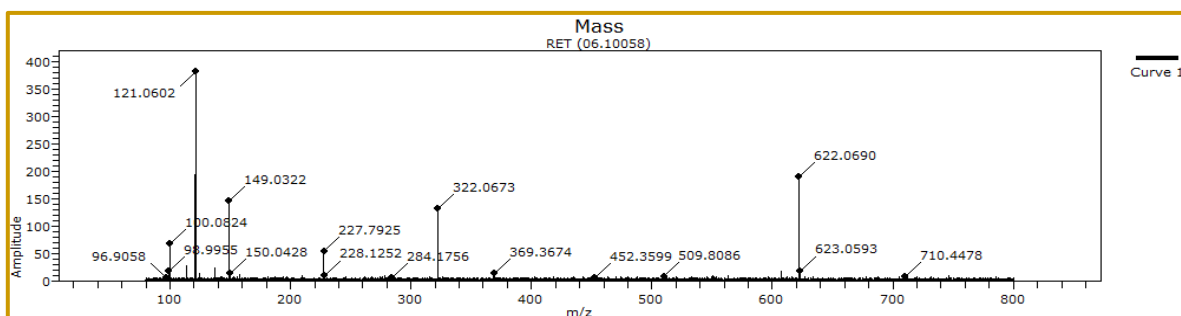


Figura 47: Espectro de masas para extracto cetónico de muestra de suelo 2.

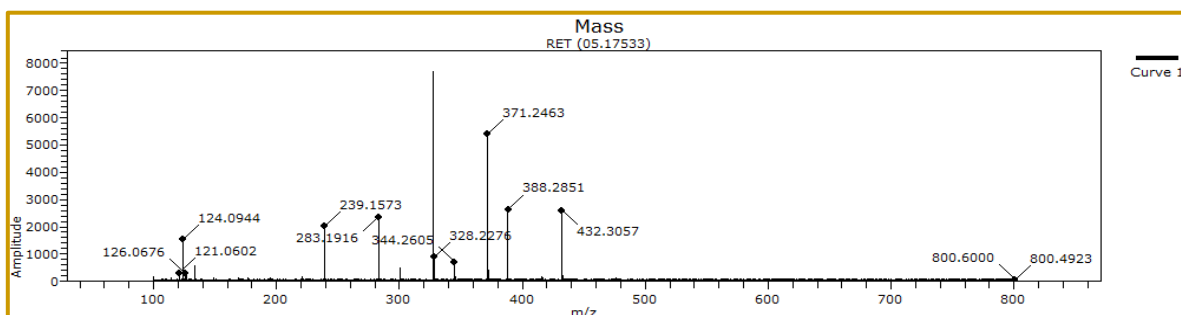


Figura 48: Espectro de masas para extracto cetónico de muestra de suelo 3.

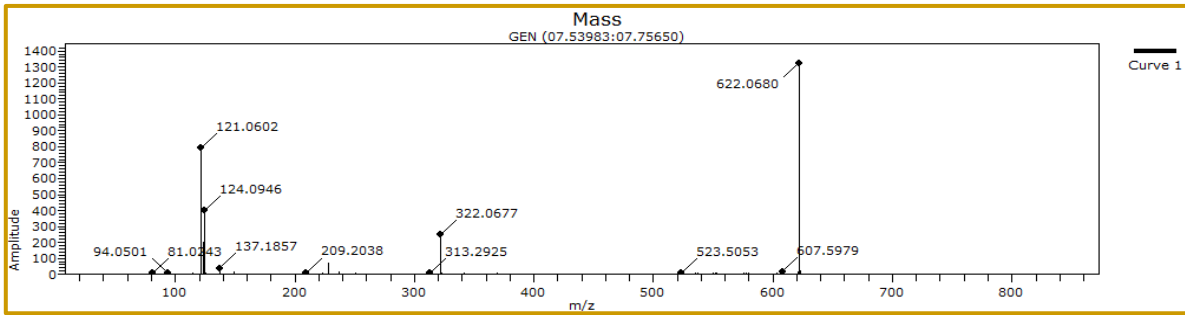


Figura 49: Espectro de masas para extracto cetónico de muestra de suelo 4.

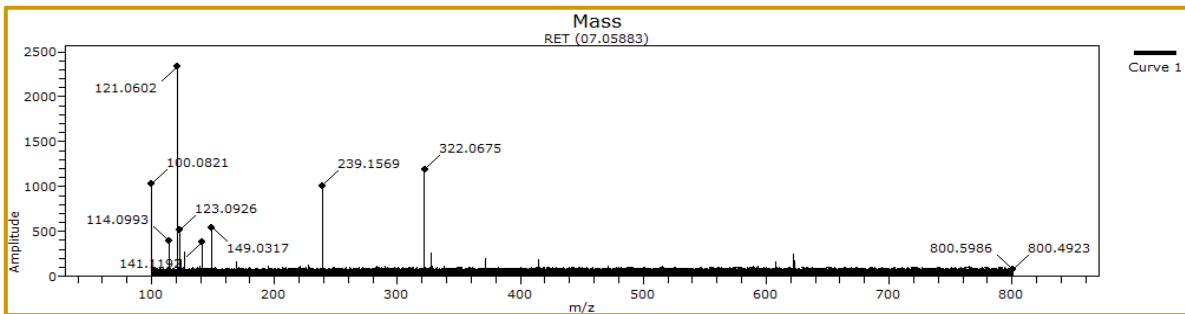


Figura 50: Espectro de masas para extracto cetónico de muestra de suelo 5.

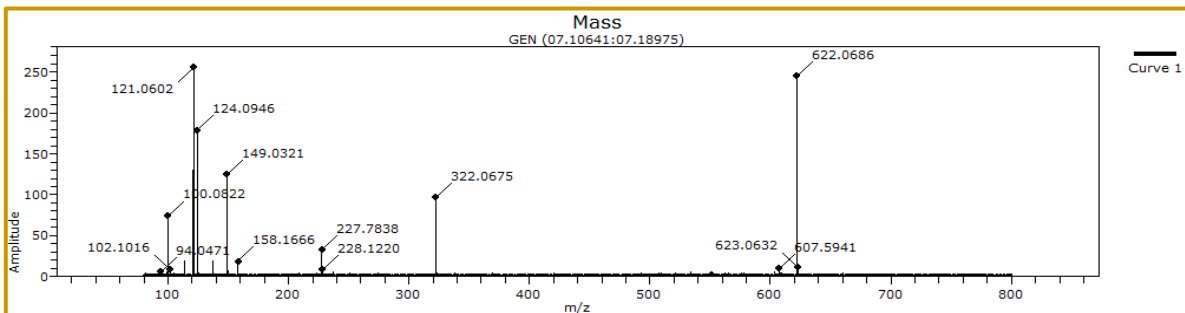


Figura 51: Espectro de masas para extracto cetónico de muestra de suelo 6.

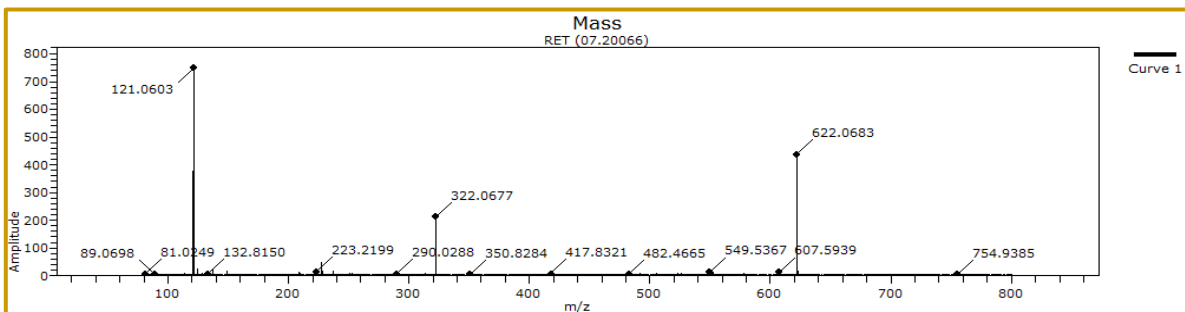


Figura 52: Espectro de masas para extracto cetónico de muestra de suelo 7.

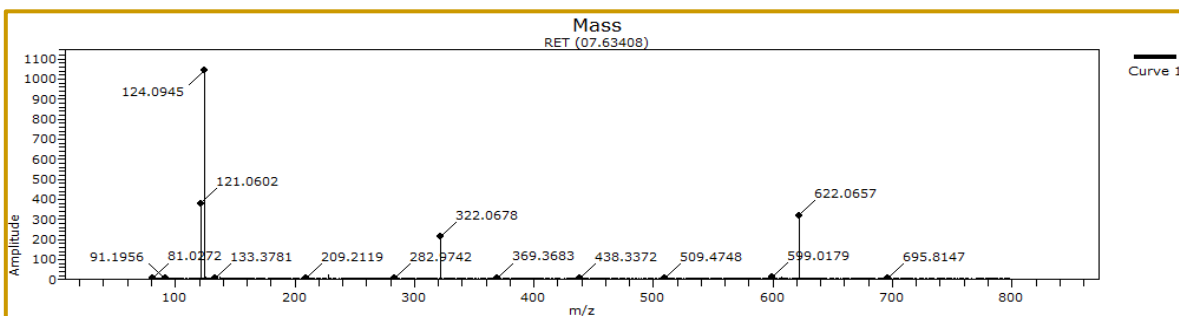


Figura 53: Espectro de masas para extracto cetónico de muestra de suelo 8.

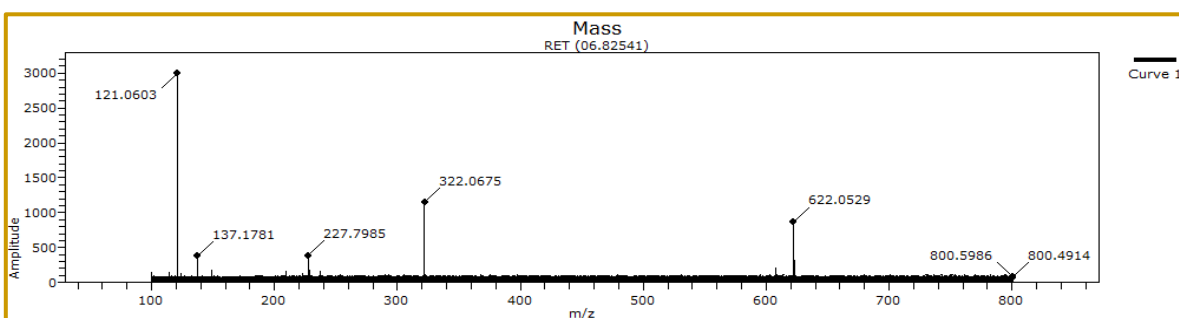


Figura 54: Espectro de masas para extracto cetónico de muestra de suelo 9.

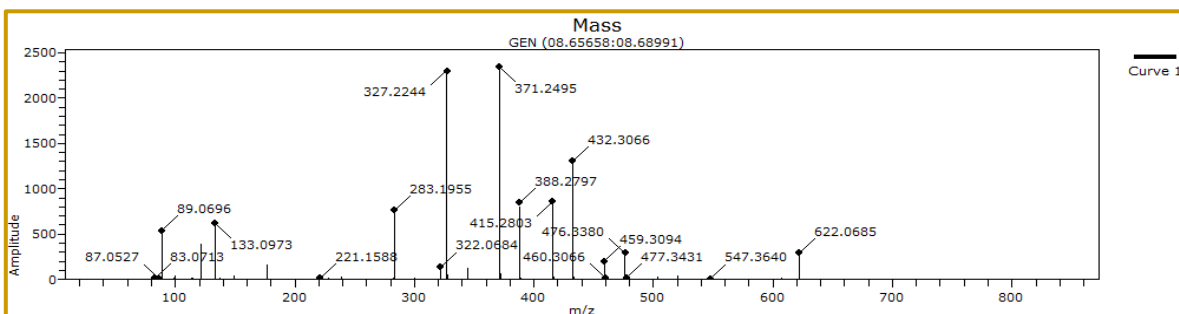


Figura 55: Espectro de masas para extracto cetónico de muestra de suelo 10.

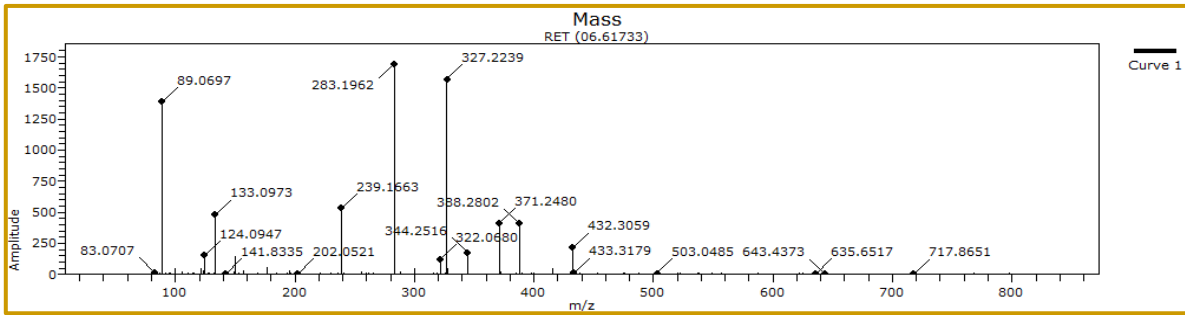


Figura 56: Espectro de masas para extracto cetónico de muestra de suelo 11.

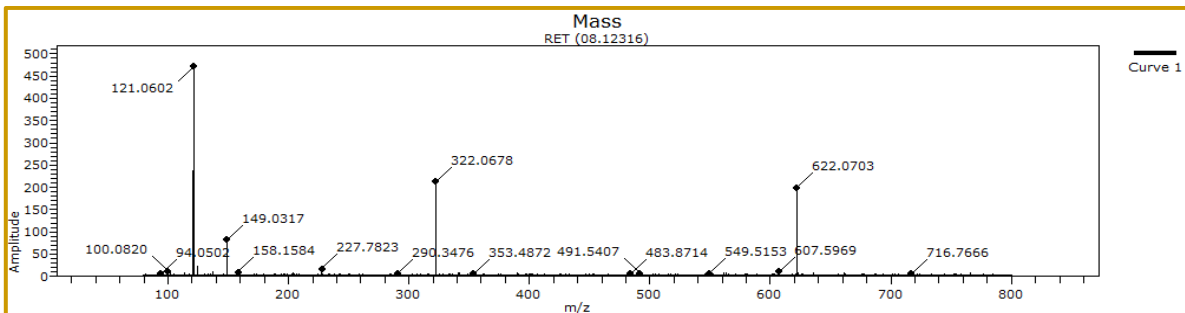


Figura 57: Espectro de masas para extracto cetónico de muestra de suelo 13.

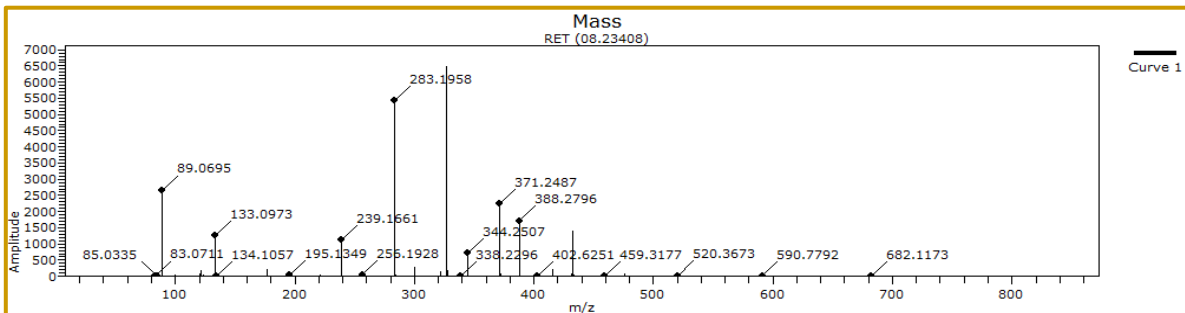


Figura 58: Espectro de masas para extracto cetónico de muestra de suelo 14.

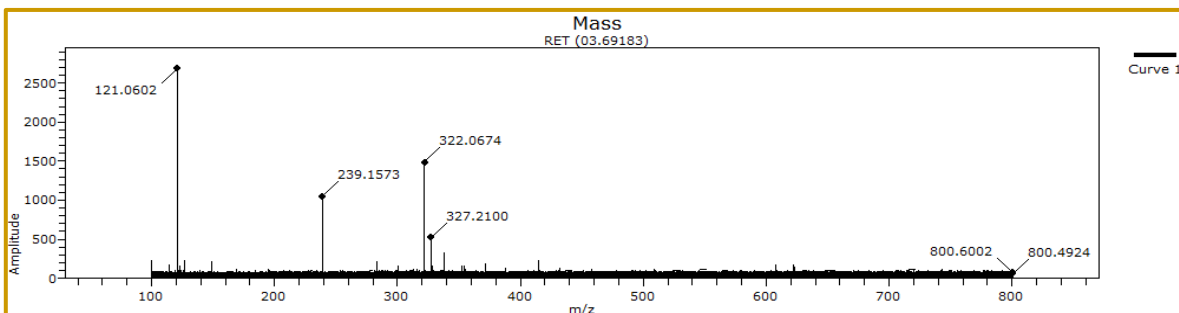


Figura 59: Espectro de masas para extracto cetónico de muestra de suelo 15.

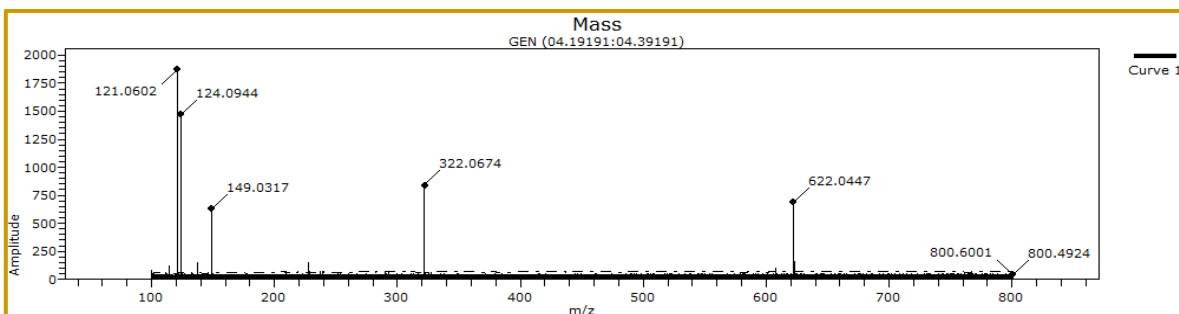


Figura 60: Espectro de masas para extracto cetónico de muestra de suelo 16.

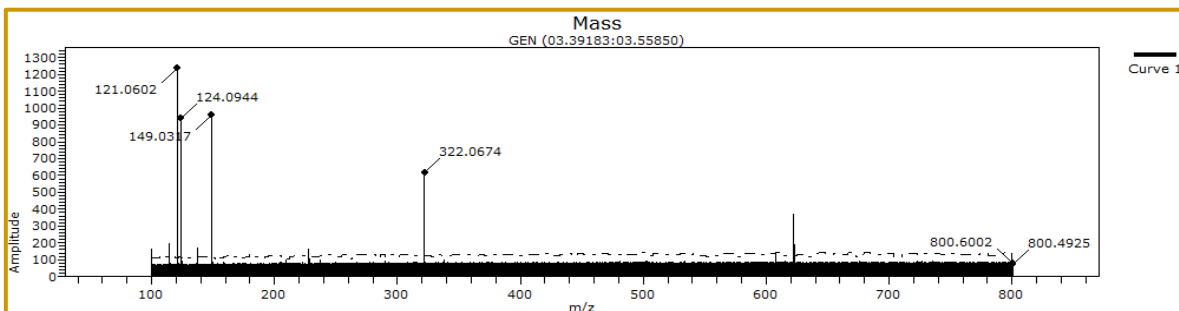


Figura 61: Espectro de masas para extracto cetónico de muestra de suelo 17.

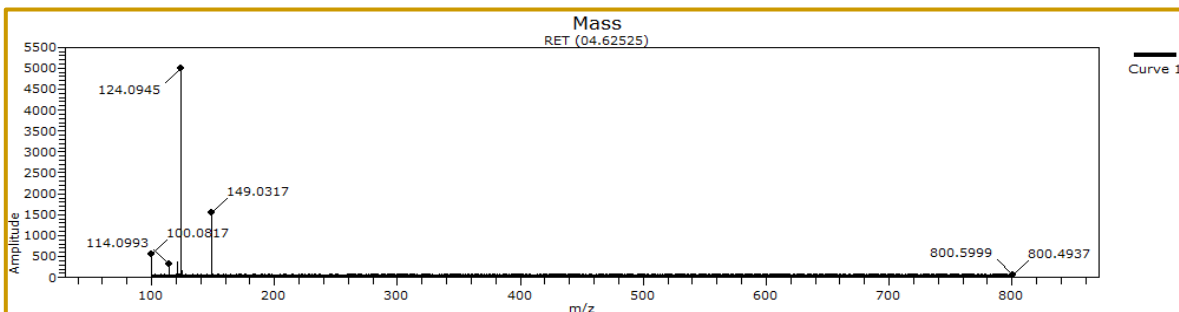


Figura 62: Espectro de masas para extracto cetónico de muestra de suelo 18.

Tabla 15: Resumen de señales m/z encontradas en extractos cetónicos de muestras de suelos.

m/z	Miel A		Miel B		Miel C		Miel D		Miel E		Miel F		Miel G		Miel H		Miel I	
	Suelo 1	Suelo 2	Suelo 3	Suelo 4	Suelo 5	Suelo 6	Suelo 7	Suelo 8	Suelo 9	Suelo 10	Suelo 11	Suelo 12	Suelo 13	Suelo 14	Suelo 15	Suelo 16	Suelo 17	Suelo 18
89,0695	X									X	X			X				
100,0752					X	X				X								X
114,0919					X	X												X
121,0519	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X			X	X	X	X	X	X
123,0431					X													
124,0859			X	X		X		X			X					X	X	X
124,0941	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
127,0303			X															
133,0972	X		X							X	X			X				
137,1781									X									
149,0220	X	X			X	X							X			X	X	X
150,1263											X							
177,1239	X									X	X			X				
227,7925		X							X									
239,1673	X		X		X						X			X	X			
256,1928														X				
283,1953	X		X							X	X			X				
300,2175			X											X				
322,0489	X	X		X	X	X	X	X	X	X			X	X	X	X	X	
322,0675	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
327,2306	X		X							X	X			X	X			
344,2491	X		X							X	X			X				
371,2989	X		X							X	X			X				
388,2775	X		X							X	X			X				
415,2942										X	X			X				
432,3020	X		X							X	X			X				
476,3385	X									X				X				
622,0705	X	X		X		X	X	X	X	X			X			X		
800,5986									X						X	X	X	X