

UCH-FC
Ch. Ambiental
R 53
C. 1
C. 1

**MÉTODO DE EXTRACCIÓN CON SOLVENTES ASISTIDO POR
MICROONDAS (MASE) Y/O ULTRASONIDO DEL HERBICIDA METIL
BENSULFURON EN SUELOS CHILENOS. DETERMINACIÓN POR HPLC-
DAD**

Seminario de Título

Entregado a la

Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile

En cumplimiento parcial de los requisitos

Para optar al título de

QUÍMICO AMBIENTAL

Luis Guillermo Roa Marín

Director Seminario de Título: Dra. María E. Báez Contreras.

Profesor Patrocinante: Dra. María E. Báez Contreras.

Junio, 2004

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACIÓN
SEMINARIO DE TÍTULO

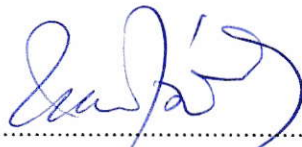
Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias de la
Universidad de Chile que el Seminario de Título presentado por el
alumno

Luis Guillermo Roa Marín

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación del Seminario de
Título como requisito para optar al título de Químico Ambiental

Comisión

Prof. Patrocinante: Dra. María E. Báez C.



.....

M. Sc. Sylvia Copaja C.



.....

Prof. Edward Cornwell G.



.....

Este seminario de título fue financiado en gran parte por un proyecto Facultad-CEPEDEQ (2003) de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. También parte de este trabajo ha sido publicado en el Journal of the Chilean Chemical Society, 48 (39), 41-43, 2003: **“Behaviour of herbicide bensulfuron-methyl in microwave-assisted solvent extraction (MASE) from soils with diferent physicochemical characteristics”**.

Dedicatoria

*A mi linda sobrinita Valentina Belén quien duerme calma. A mis
amiguitos Cristián Tamayo y Marcela Ramírez donde quiera que estén.*

Agradecimientos

Quisiera en primer lugar agradecer a toda mi familia: Hermanos, tíos, primos y abuelitos por el cariño y apoyo brindado durante mis años de estudiante, en especial a mi familia más cercana: mi mamita María, Sonia, mi tío Temo y Cochapis con quien comparto el día a día, entregándome su amor, paciencia y comprensión.

Además quisiera dar las gracias a la profesora Maria Báez por todo el tiempo invertido, confianza, conocimientos, amistad y en especial por su infinita dulzura para conmigo, sin su ayuda no habría sido posible mi formación profesional; también deseo agradecer a todos mis compañeros de laboratorio de Nutrición Vegetal, amigos-compañeros de universidad y a mis amigos personales.

ÍNDICE DE CONTENIDO	Página
Resumen	xiv
Abstract	xvii
I. INTRODUCCIÓN	1
Marco Teórico	6
Objetivos	10
• General	10
• Específicos	10
II. MATERIALES Y MÉTODOS	11
2.1 MATERIALES Y EQUIPOS	11
2.1.1 Materiales	11
2.1.2 Reactivos	11
2.1.3 Soluciones	12
2.1.4 Equipos menores	13
2.1.5 Equipos mayores	13
2.2 MÉTODOS	14
2.2.1 Estudio del comportamiento cromatográfico de MBS, PA y BS	14
Separación de MBS, PA y BS	14
Separación de PA y BS	14
2.2.2 Estudio de modelos de calibración en la separación isocrática de los productos de degradación	15
Aplicación de modelos univariabes	15
Aplicación de un modelo multivariado <i>PCR</i>	17
2.2.3 Parámetros de calidad analítica para la separación en gradiente de MBS, PA y BS	18
2.2.4 Procesamiento de datos	19

2.2.5 Cálculo de parámetros cromatográficos, analíticos y errores en las calibraciones	20
Cálculo de parámetros cromatográficos	20
• Índice de separación	20
• Número de platos teóricos (N)	20
• Coeficiente de absorción molar (ϵ)	21
• Parámetros analíticos	23
• Errores y excesos en los modelos de calibración	24
rmsevcv (root mean squared prediction error based on cross-validation)	24
rmsep (root mean squared prediction error)	25
Excesos de calibración	25
2.2.6 Desarrollo de sistemas de extracción de MBS	26
Estudios preliminares. Isotermas de adsorción y comportamiento de hidrólisis	27
a) Isotermas de adsorción	27
Suelos empleados	28
Procedimiento	29
b) Influencia de la temperatura y el pH sobre la hidrólisis de MBS en $H_2O:CH_3CN$	29
1) Extracción de MBS por ultrasonido	30
• Optimización de parámetros	30
Screening factor	31
Metodología de superficie de respuesta	33
• Estudio de la influencia de factores propios de la matriz	33
Influencia de un segundo paso de extracción	33
Influencia de la presencia de agua y de la relación suelo: agua	34
Influencia de un paso de equilibrio en medio acuoso previo a la extracción y de la concentración de MBS. Estudio de repetibilidad	34
2) Extracción de MBS por microondas (MASE)	36
• Estudio Preliminar. Comportamiento de hidrólisis durante el proceso de extracción	36

Procedimiento	36
• Estudio de la Influencia de factores propios de la matriz	37
Influencia de un segundo paso de extracción	38
Efecto del tipo de suelo, cantidad de muestra, nivel de concentración y tiempo de equilibrio en medio acuoso antes de la extracción	38
III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	39
3.1 Estudio del comportamiento cromatográfico de MBS, PA y BS	
Separación de MBS, PA y BS	39
Separación de PA y BS	42
3.2 Estudio de modelos de calibración en la separación isocrática de los productos de degradación	42
Aplicación de modelos univariados	42
Aplicación de un modelo multivariado PCR	63
3.3 Parámetros de calidad analítica para la separación en gradiente de MBS, PA y BS	72
3.4 Desarrollo de sistemas de extracción del MBS	77
Estudios preliminares. Isotermas de adsorción y comportamiento de hidrólisis	77
a) Isotermas de adsorción	77
b) Influencia de la temperatura y el pH sobre la hidrólisis de MBS en medio H ₂ O/CH ₃ CN	80
1) Extracción de MBS por ultrasonido	84
• Optimización de parámetros	84
Screening factor	84
Metodología de superficie de respuesta	88
• Estudio de la influencia de factores propios de la matriz	93

Influencia de un segundo paso de extracción	93
Influencia de la presencia de agua y de la relación suelo:agua	94
Influencia de un paso de equilibrio en medio acuoso previo a la extracción y de la concentración de MBS. Estudio de repetibilidad	96
2) Extracción de MBS por microondas (MASE)	97
• Estudio preliminar. Comportamiento de hidrólisis durante el proceso de extracción	97
Estudio de la influencia de factores propios de la matriz	101
Influencia de un segundo paso de extracción	101
Efecto de la cantidad de muestra, nivel de concentración y tiempo de equilibrio en medio acuoso antes de la extracción	102
IV. CONCLUSIONES	106
ANEXO 1	108
ANEXO 2	109
BIBLIOGRAFÍA	112

ÍNDICE DE TABLAS	Página
Tabla 1: Características físico-químicas de metil bensulfuron	5
Tabla 2: Propiedades físico-químicas de los suelos	29
Tabla 3: Diseño experimental screening factor. Factores y niveles Empleados	31
Tabla 4: Matriz de diseño experimental	32
Tabla 5: Bloques del diseño experimental	33
Tabla 6: Bloques experimentales desarrollados en las condiciones experimentales seleccionadas en el estudio	35
Tabla 7: Influencia de la composición y flujo de la fase móvil en la separación de MBS, PA y BS	40
Tabla 8: Influencia de la composición y flujo de la fase móvil en la separación de PA y BS	42
Tabla 9: Porcentaje de resolución de los productos de degradación en distintas composiciones de fase móvil	43
Tabla 10: Datos estadísticos de las curvas de calibración para Pirimidinamina, composición CH ₃ CN: H ₂ O 53:47	47
Tabla 11: Datos estadísticos de las curvas de calibración para Pirimidinamina, composición CH ₃ CN: H ₂ O 50:50	48
Tabla 12: Datos estadísticos de las curvas de calibración para Pirimidinamina, composición CH ₃ CN: H ₂ O 45:55	49
Tabla 13: Datos estadísticos de las curvas de calibración para Bencilsulfonamida, composición CH ₃ CN: H ₂ O 53:47	50
Tabla 14: datos estadísticos de las curvas de calibración para Bencilsulfonamida, composición CH ₃ CN: H ₂ O 50:50	51
Tabla 15: datos estadísticos de las curvas de calibración para Bencilsulfonamida, composición CH ₃ CN: H ₂ O 45:55	52

Tabla 16: Errores de predicciones para ambos analitos en la composición 53:47	57
Tabla 17: Errores de predicciones para ambos analitos en la Composición CH ₃ CN:H ₂ O 50:50	57
Tabla 18: Errores de predicciones para ambos analitos en la composición CH ₃ CN:H ₂ O 45:55	58
Tabla 19: Número de platos teóricos (N) y absortividad molar (ϵ) para los productos de degradación en las distintas composiciones	59
Tabla 20: Datos estadísticos para los excesos en las calibración de los productos de degradación. Composición CH ₃ CN:H ₂ O 53:47	62
Tabla 21: Datos estadísticos para los excesos en las calibraciones de los productos de degradación. Composición CH ₃ CN:H ₂ O 50:50	63
Tabla 22: Datos estadísticos para los excesos en las calibraciones de los productos de degradación. Composición CH ₃ CN:H ₂ O 45:55	63
Tabla 23: Porcentaje de resolución de los productos de degradación en distintas composiciones de fase móvil	65
Tabla 24: Datos estadísticos para las distintas modelos en la composición CH ₃ CN:H ₂ O 53:47	66
Tabla 25: Datos estadísticos para las distintas modelos en la composición CH ₃ CN:H ₂ O 50:50	66
Tabla 26: errores de predicción rmsep para ambos analitos en la matriz de validación	68
Tabla 27: Datos estadísticos para los excesos en las calibraciones de los productos de degradación. Composición CH ₃ CN:H ₂ O 50:50	70
Tabla 28: Datos estadísticos para los excesos en las calibraciones de los productos de degradación. Composición CH ₃ CN:H ₂ O 53:47	70
Tabla 29: Parámetros de calidad analítica para Pirimidinamina	74
Tabla 30: Parámetros de calidad analítica para Bencilsulfonamida	75

Tabla 31: Parámetros de calidad analítica para Metil bensulfuron	75
Tabla 32: Constante de Freundlich (K_f y $1/n$), coeficientes de correlación (r), K_d y K_{OM} para la adsorción de MBS	77
Tabla 33: Porcentajes de recuperación de MBS en soluciones acuosas- CH_3CN a varios pH y temperaturas	81
Tabla 34: Matriz de respuesta del diseño screening factor	84
Tabla 35: Efectos de los factores obtenidos del análisis estadísticos ANOVA y su significancia estadística	86
Tabla 36: Metodología de superficie de respuesta. Factores y niveles	88
Tabla 37: Metodología superficie de respuesta. Matriz de diseño y matriz de respuesta observada	90
Tabla 38: Metodología superficie de respuesta. Efectos de los factores obtenidos del análisis estadístico ANOVA	91
Tabla 39: Porcentaje de recuperación del MBS para la primera y segunda extracción	93
Tabla 40: Efecto de la presencia de H_2O y la relación suelo: H_2O en recuperación de MBS desde el suelo PCR (nivel de contaminación $4 \mu\text{g g}^{-1}$)	95
Tabla 41: Porcentajes de recuperación del MBS para los suelos QLT y PCR, en ambos niveles de concentración, diferentes relaciones suelo: H_2O y con un tiempo de equilibrio previo a la extracción	97
Tabla 42: Porcentajes de recuperación de MBS en cada uno de los programas de extracción por MASE	99
Tabla 43: Porcentaje de recuperación de MBS para la primera y segunda extracción por MASE	102
Tabla 44: Efecto del tipo de suelo, cantidad de muestra y nivel de contaminación en la recuperación de MBS, sin equilibrio antes de la extracción	103
Tabla 45: Efecto del tipo de suelo, cantidad de muestra y nivel de contaminación en la recuperación de MBS, con 30 minutos de equilibrio antes de la extracción	103

ÍNDICE DE FIGURAS	Página
Figura 1: Metil bensulfuron y sus principales productos de degradación en el suelo	6
Figura 2: Diseño experimental 5 ² , mezclas ensayadas (azul), concentraciones de BS (verde) y concentraciones de PA (amarillo) en $\mu\text{g mL}^{-1}$	17
Figura 3: Espectros de absorción obtenidas en condiciones isocráticas $\text{CH}_3\text{CN:H}_2\text{O}$ (pH 3) 50:50 y flujo $1,1 \text{ mL min}^{-1}$, PA (rojo) y BS (azul), ambos analitos en una concentración de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$	41
Figura 4: Cromatogramas originales y primera derivada de mezclas de PA y BS obtenidos para diferentes composiciones de fase móvil. a, b y c mezcla en razón 1:1, d en la razón 2:1; a) $\text{CH}_3\text{CN/H}_2\text{O}$, 45:55 b) $\text{CH}_3\text{CN/H}_2\text{O}$, 50:50 c) $\text{CH}_3\text{CN/H}_2\text{O}$, 53:47 d) $\text{CH}_3\text{CN/H}_2\text{O}$, 53:47	46
Figura 5: Cromatogramas originales de los compuestos puros en las tres composiciones de fase móvil	60
Figura 6: Gráficos de excesos para las respuestas instrumentales: áreas áreas derivadas en los modelos univariados 1 y el modelo PCR 1, la curva azul representa los EC experimentales y la curva naranja los EC teóricos, cada gráfico con un aumento en torno al punto (0,0). En la condición más severa de solapamiento	71
Figura 7: Separación de PA, BS y MBS por elución en gradiente (ver sección 2.2.5): $\lambda=234,9$ y $264,9 \text{ nm}$, todos los analitos al nivel de concentración de $2 \mu\text{g mL}^{-1}$. Eje de la ordenada corresponde al tiempo en minutos y el eje de la abcisa a la absorbancia en mUA	73
Figura 8: Curvas de calibración para PA, MBS a $234,9$ y $264,9 \text{ nm}$ y BS a $234,9 \text{ nm}$, en los rangos de 0-2 y 0-0,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para cada analito, respectivamente	76
Figura 9: Isotermas de adsorción para los suelos PCR, QLT y TEM	78
Figura 10: Efecto de la temperatura, tiempo y pH en la hidrólisis de MBS	82
Figura 11: Cromatogramas obtenidos para la incubación a pHs 3,1; 6,9 y 9,4 y dos temperaturas 25 y 90°C . MBS=Metilbensulfuron, PA=Pirimidinamina: BS=Bencilsulfonamida Eje de la ordenada corresponde	83

al tiempo en minutos y el eje de la abcisa a la absorbancia en mUA

Figura 12: Efectos significativos para el diseño de screening factor	87
Figura 13: Superficie de respuesta: Recuperación v/s Potencia-Cantidad de Muestra	92
Figura 14: Superficie de respuesta: Recuperación v/s Temperatura-Cantidad de Muestra	92
Figura 15: Perfiles de temperatura generadas durante los programas de extracción por MASE	98
Figura 16: Cromatogramas del extracto del suelo PCR obtenidos por MASE en los programas 3 y 4	100

RESUMEN

Metilbensulfuron (MBS) es una sulfonilurea de acción herbicida que se utiliza en bajas dosis y que es degradable por hidrólisis química y/o por acción de los microorganismos del suelo. En el presente trabajo se ha abordado el desarrollo de un método de extracción de MBS en suelos chilenos, teniendo en cuenta sus diferentes naturalezas y propiedades fisicoquímicas.

En primer lugar se definieron las mejores condiciones para su determinación analítica en presencia de los principales productos de degradación, pirimidinamina (PA) y bencilsulfonamida (BS), mediante cromatografía líquida en fase inversa con detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD). Para ello, se establecieron los parámetros para la separación en condiciones de elución isocrática de los tres compuestos empleando como fase móvil $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ pH 3,0, en una columna Phenomenex Synergy $4\ \mu\text{m}$ 80 °A, $250\times 4,6\ \text{mm}$. Dadas las dificultades de separación de los dos principales metabolitos y del excesivo tiempo de retención obtenido para MBS, se estudiaron diferentes modelos de calibración univariados en tres condiciones de solapamiento de sus señales cromatográficas: severo, medio y leve. Las respuestas cromatográficas seleccionadas consistieron en áreas y alturas provenientes de los cromatogramas originales y también de su primera derivada. También se usó un modelo de calibración multivariado, *PCR* (Regresión por componentes principales), construido con todas las respuestas, el que se comparó con los modelos univariados, en cualquier condición de solapamiento, presentó los mejores parámetros estadísticos y los menores errores en la cuantificación.

También se desarrolló un método de separación en gradiente empleando una columna de menor longitud y de mayor eficiencia (Zorbax SB-C8, 80 °A, 4,6×150 mm, tamaño de partícula 5 mm) que permitió separar en todos los casos las señales provenientes de las sustancias co-extraídas desde el suelo de las señales de los analitos de interés, obteniéndose parámetros adecuados de calidad analítica a las dos longitudes de onda estudiadas (234,9 y 264,9 nm), la última muy sensible para la determinación de PA. Los límites de detección obtenidos a 234,9 nm fueron: 0,0229; 0,00705 y 0,0272 $\mu\text{g mL}^{-1}$, para MBS, BS y PA respectivamente. Los límites de cuantificación en igual longitud de onda fueron: 0,0765; 0,0230 y 0,0906 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Los valores de r^2 para el intervalo de concentraciones 0,02-2,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ fluctuaron entre 99,96 y 99,98 %.

En la segunda etapa, se estudiaron sólo para MBS sistemas de extracción con solventes asistido por energía de ultrasonido y microondas. Para ello fue necesario realizar dos tipos de estudios previos: i) evaluación de la capacidad de adsorción del herbicida de tres suelos de diferentes características fisicoquímicas, los que fueron empleados como matrices para establecer la factibilidad de aplicación del método ii) su comportamiento de hidrólisis en ausencia de suelo, simulando las condiciones de extracción, en diferentes temperaturas, tiempos y pH, se estableció que un límite de temperatura de 60 °C, 5 minutos de extracción y un intervalo de pH entre 4 y 9 asegura la ausencia de degradación del compuesto.

En el estudio de extracción asistida por ultrasonido se sometieron cinco factores a un diseño experimental “screening factor”; éste dio como resultado que la temperatura, cantidad de muestra, cantidad de solvente y tipo de suelo tenían una importancia

significativa en la recuperación de MBS. Posteriormente se realizó una optimización por medio de un diseño de “superficie de respuesta” en el suelo de mayor capacidad de adsorción, se confirmó que la cantidad de muestra y temperatura eran significativos, y se descartó de forma definitiva la influencia de la potencia sobre la recuperación, el máximo obtenido fue de un 84.5 %. En el estudio de los factores propios de la matriz quedó establecido que un segundo paso de extracción es necesario, como también la presencia de agua (en una relación suelo: agua 1:1, p/v) y un tiempo de equilibrio de 30 minutos previo a la extracción, para obtener recuperaciones del 100 %, con buena repetibilidad, independientemente del tipo de suelo y nivel de concentración del herbicida.

En la extracción por microondas se estableció un programa de extracción a temperatura y presión controladas en tres pasos: 1) 2 minutos a 350 W (40 °C), 2) 3 minutos a 500 W (temperatura variable) y 3) 2 minutos a 0 W, el estudio de hidrólisis en presencia de suelo, fue realizado variando la temperatura en el segundo paso de programa de extracción, confirmando que un límite de 60° C asegura la ausencia de degradación de MBS. El estudio de los factores propios de la matriz en la extracción permitió que un segundo paso de extracción es innecesario, en cambio también resultaron relevantes factores como la relación suelo: agua (en una relación 1: 1, p/v) y un tiempo de equilibrio previo a la extracción de 30 minutos, para asegurar recuperaciones por sobre un 80 %.

El trabajo experimental desarrollado en este seminario de título ha permitido explicar una serie de fenómenos que en su conjunto constituyen un avance no sólo en la investigación sobre la extracción cuantitativa del herbicida MBS desde suelos

empleando técnicas no tradicionales, como microondas y ultrasonido, sino también ha entregado una serie de herramientas metodológicas de cómo abordar un problema de naturaleza multifactorial, integrando factores propios de la técnica de extracción y factores relacionados con el comportamiento del compuesto al contaminar los suelos en condiciones similares a las que ocurren en el medioambiente.

ABSTRACT

Bensulfuron-methyl (BSM) is a sulfonylurea of herbicide used in low dosages. It can be degraded by chemical hydrolysis and/or by the action of microorganisms present in soils. This work involves the development of a method of extraction of MBS in Chilean soils selected according to their nature and different physicochemical properties.

The best conditions for the analytical determination of BSM and its main degradation products, pirimidinamine (PA) and benzilsulfonamide (BS), were studied by using reverse phase HPLC with diode-array detection (DAD). Parameters for the separation in isocratic conditions elution were established for the three compounds by using $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ at pH 3.0 as the mobile phase with a Phenomenex Synergy 4 μm 80 °A, 25×4.6 mm column.

Due to the difficulties to separate the two principal metabolites as well as the high retention time obtained for BSM in isocratic conditions, different one variable calibration models were studied under three conditions of overlapping of the chromatographic signals: severe, medium and light. The chromatographic selected responses were areas and heights obtained from the original chromatograph and the first derivative. A multivariable calibration model was also used, PCR (Principal Components Regression) which was built with all the responses. The comparison between univariable calibration models and the multivariable model gave as a result, that

in every overlapping condition the multivariable model presented the best statistic parameters and the fewer errors in the quantification.

A gradient separation method was also developed using a smaller and efficiency column (Zorbax SB-C8, 80 °A, 4.6×150 mm, particle size 5 mm). This column allowed, in all cases, the separation of the signals of the substances that were extracted from the soil from the signals obtained for the target substance. The analytical quality parameters were appropriated at the two wavelengths under study, 234.9 and 264.9 nm, the last one being extremely sensitive for the determination of PA. Limits the detection obtained at 234.9 nm were: 0.0229, 0.00705 and 0.0272 $\mu\text{g mL}^{-1}$, for BSM, BS and PA respectively; quantification limits at the same wavelengths: 0.0765, 0.0230 y 0.0906 $\mu\text{g mL}^{-1}$; r^2 values for a concentration range of 0.02-2.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ fluctuated between 99.96 and 99.98 %.

The second phase of the present work was focused on BSM and consisted of the study of solvent extraction systems assisted by ultrasound and microwave energy. Two preliminary studies were undertaken: i) evaluation of the capacity of adsorption of the herbicide in three soils with different physical-chemical characteristics. The soils were used as matrices to establish the applicability of the method, ii) the hydrolysis behaviour of BSM in absence of soil, by simulating extraction conditions under different temperature, time and pH. No degradation of BSM was observed at the following condition: temperature limit, 60 °C, time of extraction, 5 minutes and a pH range of 4 - 9.

The effect of five experimental factors on recoveries by the extraction technique assisted by ultrasound energy was established through a screening factor experimental design.

The results of this study showed the temperature, amount of sample, amount of solvent and type of soil played a significant role in the final recovery of BSM.

Subsequently, an optimisation study was undertaken using surface response experimental design in the soil with the largest capacity of adsorption. This design confirmed that the quantity of sample and temperature were of significant importance and discarded the effect of the power on the recovery of the analyte. The maximum obtained was 84.5 %. As a result of the factors originated on the soil matrix it was established that a second extraction was needed. In order to obtain recoveries of approximately 100 % and high repeatability for each soil and concentration range of herbicide under study, the extraction must be done as follows: in presence of water in a soil: water ratio of 1:1 (w/v) with an equilibrium time of 30 minutes before the extraction.

For the study of the microwave based technique a program of extraction was established under controlled temperature and pressure in three steps: 1) 2 minutes at 350 W (40°C), 2) 3 minutes at 500 W (variable temperature) and 3) 2 minutes at 0 W. The hydrolysis study in presence of soil was done varying temperature in the second step of the extraction program confirming that a temperature limit of 60 °C guarantees the absence of decomposition of the BSM.

In this technique a second extraction step was unnecessary, on the other hand, factors such as the soil:water ratio (1:1, w/v) and a time of equilibrium previous to the extraction of 30 minutes are significant to assure recoveries besides a 80 %.

The experimental work developed explains a series of phenomena that all together focuses on to an investigation on quantitative extraction of the herbicide BSM from soil applying non-traditional techniques, like microwave and ultrasound. This research also presents methodological tools that helps to solve a problem of multifactorial nature by integrating factors that are related to extraction techniques and factors that consider the behaviour of the compound under natural conditions were likely contaminations of the soil occur.

I. INTRODUCCIÓN

En el mundo actual, la producción agrícola ha experimentado un aumento significativo para satisfacer las necesidades de la población mundial. En Chile se estima aproximadamente que el 45 % del rendimiento potencial de los cultivos es afectado y destruido por enfermedades, plagas y malezas (FAO, 1997). Para el control de las malezas se requiere del uso de agroquímicos tales como los herbicidas; éstos las eliminan de los cultivos de forma específica, dando como resultado un mejor aprovechamiento de los nutrientes y disponibilidad de agua.

En la aplicación de los herbicidas existe la posibilidad de que una parte de él se incorpore al suelo interactuando de diversas formas, sufriendo por ejemplo degradaciones de tipo química o microbiológica, dando como resultado nuevos productos, que muchas veces son más tóxicos que el herbicida en sí.

En el mercado existe una gran variedad de estos productos, un grupo de agentes de uso reciente son las sulfonilureas, existiendo alrededor de 20 tipos de ellas. Se usan como tratamiento de pre y post emergencia, para el control de malezas anuales y perennes, con bajas dosis de aplicación, las que varían entre 10-100 g ha⁻¹.

Las sulfonilureas son compuestos polares, de baja toxicidad en mamíferos, no volátiles, con presiones de vapor menores a 10⁻¹⁰ mm Hg, que se comportan como ácidos débiles,

pues presentan un protón ionizable en el grupo amida adyacente al grupo sulfonilo, con valores de pKa entre 3-5, dando como resultado que sus solubilidades en agua se incrementen con el aumento del pH. En medio acuoso experimentan hidrólisis, cuya velocidad depende de la temperatura y el pH; así en suelos con pH ácido la velocidad de hidrólisis es alta. Su adsorción en suelos es baja con valores de Kd menores a 1, dependientes del pH del suelo y el contenido de materia orgánica. Es así como una combinación de factores como: baja adsorción y gran solubilidad en agua, en suelos alcalinos y neutros pueden desencadenar la lixiviación de estos herbicidas bajo condiciones de mucha lluvia. Su persistencia en suelos es variable pudiendo alcanzar hasta alrededor de un año y entre las condiciones que favorecen una mayor vida media se encuentran las bajas temperaturas, altos pH en suelos, pocas precipitaciones y baja actividad microbiana (Smith, 1993).

Metil bensulfuron (metil 2-[[[(4,6-dimetoxipiridin-2-il)amino-carbonil]aminosulfonil]metil]benzoato, MBS), cuyas principales características se observan en la tabla 1, es una sulfonilurea fotosensible, de acción sistémica, cuyos productos de hidrólisis principales son la pirimidinamina (2-amino-4,6-dimetoxipirimidina, PA) y la bencilsulfonamida (2-metoxicarbonil-bencilsulfonamida, BS) (figura 1). Su modo de acción es el resultado de la inhibición de la acetolactato sintetasa, una enzima clave en la biosíntesis de cadenas de aminoácidos ramificados, como valina, leucina, e isoleucina (Beyer y col., 1988; Sabadie, 1996).

Las metodologías instrumentales de extracción son de desarrollo reciente, entre éstas se encuentra la extracción empleando como fuente energética ultrasonido y puede presentar ventajas sobre el clásico método Soxhlet, como es el uso de bajos volúmenes de solvente y tiempo necesarios para la extracción. La extracción por solventes asistida por microondas (MASE) ha sido aplicada en forma exitosa en la extracción de varias clases de contaminantes orgánicos (PAHs, plaguicidas organoclorados, compuestos fenólicos, PCBs, herbicidas fenilureicos, entre otros) en suelos y sedimentos, dando como resultado extractos relativamente limpios, pudiendo así eliminar posteriores procedimientos de "cleanup" para remover los compuesto co-extraídos, antes del análisis final, ya sea por cromatografía de gases con ECD, FID o MS o cromatografía líquida con detección UV o por fluorescencia (Chee y col., 1996, Llompart y col., 1997, Zuloaga y col., 1999, Molins y col., 2000). También han sido descritas técnicas basadas en el uso de ultrasonido, encontrando eficiencias de extracción satisfactorias, combinadas con la simplicidad de uso y bajo consumo de solventes. Babic y col. (1998) lograron mediante el uso de ultrasonido la extracción de siete compuestos pertenecientes a diferentes clases químicas, determinando la eficiencia del método mediante cromatografía en capa fina con evaluación densitométrica. La técnica de ultrasonido también ha sido utilizada en la determinación de una mezcla de plaguicidas de variada naturaleza química (Lagana y col., 2000). Técnicas como la extracción en fluido supercrítico requieren de equipamiento más sofisticado y se describen recuperaciones variables o poco eficientes, especialmente cuando los compuestos son adsorbidos en

suelos con mayor contenido de materia orgánica, como en el caso de atrazina y sus derivados, estudiado por Steinheimer y col. (1994), o algunas sulfonilureas estudiadas por Berglof y col. (1997).

En escasos estudios se presenta la problemática de optimización de los métodos de extracción desde suelos teniendo en cuenta parámetros relacionados con la interacción entre las propiedades físico-químicas de éstos y las propiedades de cada plaguicida en particular. Por otra parte, la presencia y significado de residuos unidos de plaguicidas y de sus metabolitos y/o productos de degradación química o fotoquímica en los suelos, tienen relación con la persistencia, degradación y disponibilidad biológica. En el caso de suelos chilenos y en especial de aquellos derivados de cenizas volcánicas, con una especial reactividad, comparada con la mayoría de los suelos del mundo, la extracción puede resultar difícil, debido a los altos contenidos de materia orgánica y de óxidos, que proporcionan una carga variable que hará propicia la adsorción de herbicidas de carácter ácido. Por otra parte, las bajas dosis de aplicación de MBS dificultan la determinación analítica de sus residuos, siendo esta última de gran importancia para el establecimiento del destino ambiental del producto.

De acuerdo a lo anterior, en el presente trabajo se pretende avanzar en el desarrollo de un método de extracción de MBS en suelos chilenos, teniendo en cuenta su diferente naturaleza y propiedades fisicoquímicas, empleando una estrategia que permita definir las mejores condiciones para su determinación cromatográfica, en presencia de los principales productos de degradación y los parámetros óptimos para lograr la máxima

extracción a los más bajos niveles de concentración. El estudio contempla el uso de las técnicas de extracción por solventes con ayuda de microondas y/o ultrasonido, además de la determinación cromatográfica mediante HPLC con Detector de arreglo de Diodos (DAD). Esta última se usará por sus capacidades para el control de la degradación del producto durante el mismo proceso de extracción y para el control de la aparición de compuestos co-extraídos desde cada matriz. El estudio del método fue realizado empleando muestras de tres suelos con contenido variable de materia orgánica y de diferente origen, los cuales fueron caracterizados en su comportamiento respecto a la adsorción de MBS, mediante el establecimiento de las correspondientes isothermas de adsorción.

Tabla 1: Características fisicoquímicas de metil bensulfuron

Nombre común	metil bensulfuron
Nombre IUPAC	metil 2-[[[(4,6-dimetoxipiridin-2-il)amino-carbon-il]aminosulfonyl]metil]benzoato
Fórmula molecular	$C_6H_{18}N_4O_7S$
Masa Molar	410,4 g mol ⁻¹
Solubilidad en agua	1,1 mg l ⁻¹ (pH 5); 80 mg l ⁻¹ (pH 7); 880 mg l ⁻¹ (pH 8, 25 °C)
Presión de vapor	2,8×10 ⁻¹² Pa (25 °C)
Log K_{ow}	2,17 (pH 5); 0,78 (pH 7); -1,0 (pH 9, 25 °C)
pKa	5,2

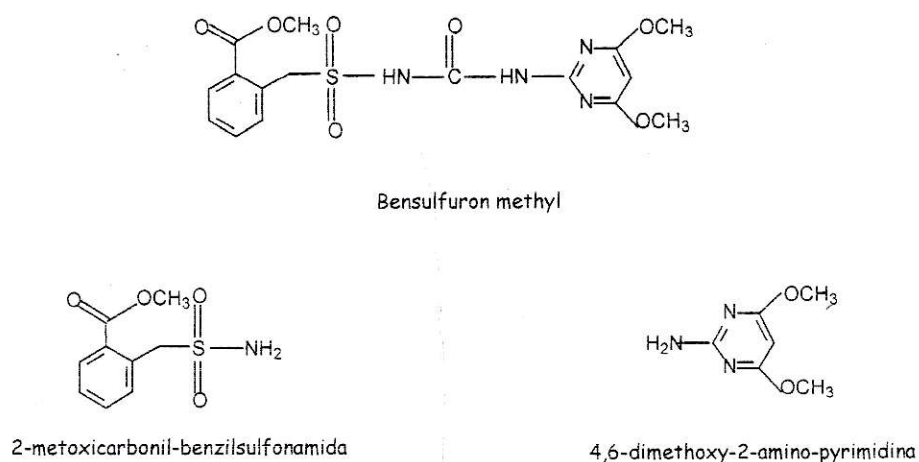


Figura 1: Metil bensulfuron y sus principales productos de degradación en el suelo

MARCO TEÓRICO

Entre las diversas técnicas de extracción con solventes desde matrices ambientales como los suelos asistidas por la aplicación de energía por medios instrumentales, tenemos aquellas basadas en el uso de ultrasonido y de microondas (MASE). Estas técnicas permiten la migración del analito desde la matriz hasta el solvente por fenómenos de transporte y difusión, aunque difieren en los mecanismos para lograr este fin puesto que se trata de técnicas basadas en fenómenos energéticos distintos.

La energía de microondas es energía electromagnética con un intervalo de frecuencias de 300 a 30000 MHz producida por radiación no ionizante que causa un movimiento molecular por migración de iones y rotación de dipolos, pero no causa cambios en la estructura molecular de la materia. Tal movimiento molecular causa un calentamiento de la muestra en un corto tiempo (5-15 minutos), alcanzándose un calentamiento

homogéneo a diferencia del calentamiento conductivo donde existe formación de gradientes de temperatura. Cuando la energía de microondas penetra una muestra, ésta es absorbida a una velocidad dependiente del factor de disipación de ésta, que a su vez depende tanto del factor de pérdida dieléctrica de la muestra y de su constante dieléctrica, la penetración es considerada infinita en materiales transparentes a la energía de microondas y cero en materiales reflexivos como los metales. Usualmente la energía de microondas que es dirigida a la muestra se pierde por dos mecanismos: conducción iónica y rotación de dipolos. La primera es un flujo de corriente producida por los iones disueltos con producción de calor al ser sometidos al campo magnético, debido a la resistencia del flujo iónico; la segunda es una alineación de las moléculas que presentan un momento dipolar permanente o inducido, cuando el campo es removido el desorden molecular es restaurado con liberación de calor.

La energía de ultrasonido es de menor magnitud que la de microondas con un intervalo de frecuencia que se encuentra alrededor de los 20 KHz, produciendo un movimiento mecánico de las moléculas contenidas en una muestra. El solvente de extracción al ser sometido a la energía de ultrasonido sufre un fenómeno conocido como ebullición fría o cavitación a consecuencia de la energía vibracional, que consiste en la formación de una gran cantidad de pequeñas burbujas de vapor (40 μm) que cuando condensan dejan un espacio vacío que es ocupado por las moléculas de solvente frío adyacentes, cuando éstas alcanzan el centro de la cavidad chocan a gran velocidad y producen una onda de choque que se extiende fuera de la burbuja colapsada, formándose a su vez nuevas

burbujas. Tal colapso es capaz de romper estructuras de la matriz y es responsable de la migración del analito hacia el solvente.

Los efectos del ultrasonido han sido explicados para una serie de procesos en forma simple por Suslick (1989). Las ondas de ultrasonido consisten en ciclos de compresión y expansión. Los primeros ejercen una presión positiva sobre el líquido manteniendo las moléculas juntas, mientras que los ciclos de expansión ejercen una presión negativa que provoca el alejamiento de éstas. Durante el ciclo de expansión una onda de sonido de suficiente intensidad puede generar cavidades, debiendo estar asociada una gran presión negativa para poder superar las fuerzas atractivas entre las moléculas. Para que se produzca la cavitación deben haber pequeñas impurezas que reduzcan dichas fuerzas de atracción, dando lugar a la formación de burbujas en la solución. Las burbujas formadas en la cavitación son estables debido a los continuos ciclos de compresión y expansión, sin embargo, si una burbuja crece rápidamente no puede absorber energía tan eficientemente y sin esta energía no podrá sustentarse a si misma. el líquido que la rodea presiona y la cavidad implosiona. Los gases y vapores dentro de la cavidad están comprimidos, generando intenso calor lo que aumentará la temperatura del líquido que rodea inmediatamente la cavidad y se crea una gota local caliente. Aun cuando la temperatura en esa región es extremadamente alta, la región en si misma es muy pequeña, de tal forma que el calor se disipa rápidamente. Muchos fenómenos pueden ocurrir por acción del ultrasonido, como por ejemplo puede conducir a la formación de H o de radicales OH. para formar posteriormente H_2O_2 o bien O_2 .

En relación con extracción se puede señalar que a través del ultrasonido se aceleran las transiciones de fase y los equilibrios de distribución de la sustancia de interés entre el extracto y el solvente de extracción son alcanzados más rápidamente.

OBJETIVOS

General

- Desarrollo de un método de determinación de MBS en presencia de sus principales productos de degradación, en suelos de diferente origen y composición, basado en extracción con solventes empleando energía de microondas o ultrasonido y HPLC con detección por arreglo de diodos

Específicos

- Estudiar el comportamiento cromatográfico de MBS y de sus dos principales productos de degradación a través de la interpretación de los parámetros cromatográficos, mediante HPLC-DAD
- Determinar los parámetros de calidad analítica del método seleccionado para la determinación de MBS y sus productos de degradación
- Establecer el comportamiento de adsorción de MBS frente a tres suelos de distinto origen y composición
- Estudiar y optimizar las condiciones de extracción con solventes asistida con microondas y ultrasonido

II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 MATERIALES Y EQUIPOS

2.1.1 Materiales

- Material de vidrio de uso general y volumétrico clase A.
- Tubos de centrifuga plásticos cónicos de 50 mL Sterilin.
- Micropipeta de desplazamiento de aire 200-1000 mL Brand.
- Membranas para filtración Durapore, 0,22 μm tamaño de poro, 25 mm de diámetro, hidrofílica, blanca, lisa, 100/CX, MILIPORE.
- Sistema de filtración de propileno SWINNEX.

2.1.2 Reactivos

- Agua calidad nanogrado.
- Acetonitrilo grado HPLC, J.T.Baker.
- Ácido Fosfórico 85 %, PA Merk.
- Hidróxido de Sodio granular, PA Merk.
- Ácido Clorhídrico 37 %, PA Merk.
- CaCl_2 , granular 5-15 mm, >95% pureza, Merk.
- Metil bensulfuron (metil 2-[[[(4.6-dimetoxipiridin-2-il)amino-carbon-il]aminosulfonil]metil]benzoato), pureza >99 %, Chem Service.
- Pirimidinamina (2-amino-4.6-dimetoxipirimidina), pureza > 99 %, Dupont.

- Bencilsulfonamida (2-metoxicarbonil-bencilsulfonamida), pureza >99 %, Dupont.
- Helio Extrapuro 99,995 % pureza, $O_2 < 4$ ppm, $H_2O < 2$ ppm, AGA.

2.1.3 Soluciones

- **Fases móviles**

Solución de H_3PO_4 $8,7 \times 10^{-3} M$: se preparó una solución de H_3PO_4 0,87 M disolviendo 10 mL del ácido concentrado (85 % p/v) en 100 mL en H_2O nanopure, luego se tomó 1 mL de ésta solución y se diluyó a 100 mL.

Fase móvil pH 2,8 y pH 3: A un litro de H_2O nanopure fueron agregadas alícuotas de la solución $1 \times 10^{-3} M$ de H_3PO_4 hasta ajustar el pH a 2,8 o 3 según corresponda.

- **Soluciones madre**

MBS: Se pesó 50,2 mg de MBS en una balanza analítica (precisión 0,01 mg), el analito fue disuelto en CH_3CN resultando una solución de $100,4 \mu g mL^{-1}$.

PA: Se pesó 5,55 mg de PA en una balanza analítica (precisión 0,01 mg) y se disolvió en CH_3CN , resultando una solución de $222 \mu g mL^{-1}$.

BS: Se pesó 5,73 mg de BS en una balanza analítica (precisión 0,01 mg) y se disolvió en CH_3CN , resultando una solución de $229,2 \mu g mL^{-1}$.

- **Soluciones contaminantes de MBS**

A partir del estándar de $100,4 \mu g mL^{-1}$ se prepararon soluciones contaminantes acuosas, tomando del estándar concentrado alícuotas de 0,25; 0,5; 1 y 2 mL, y agregadas cada éstas una en un matraz de aforo de 25 mL, y aforadas con H_2O nanopure, resultando soluciones de 1.004; 2.008; 4.016 y $8.032 \mu g mL^{-1}$, respectivamente.

- **Solución de CaCl₂ 0.1 M**

Se pesó 11,1 g de CaCl₂ (exactitud 0,01g) en una balanza y se disolvió en H₂O nanopure, resultando una solución 0,1 M

Todas las soluciones fueron conservadas a -4 °C.

2.1.4 Equipos Menores

- Balanza Analítica 40SM-200AS Precisa.
- Balanza 4000 C Precisa.
- Equipo Purificador de agua NANOpure Ultrapure Water System Barnstead.
- Calefactor y agitador Heidolph GmbH.
- Centrífuga Function Line HERAEUS Instruments.
- Baño Termoregulado GFL.
- pH-metro equipado con un Electrodo KCl-AgCl, y microprocesador pMX 3000/Ph WTW.

2.1.5 Equipos mayores

- Cromatógrafo líquido de alta resolución Waters con Bomba Binaria 600, Detector de arreglos de diodos Waters 996, muestreador automático Waters 717 Plus y el Software para control instrumental, adquisición y procesamiento de datos Millennium 2010. Para el estudio de las condiciones y separación cromatográficas se emplearon dos tipos de columna en fase inversa: Zorbax SB-C₈, 80 °A, 4,6 x 150 mm. tamaño de partícula 5 mm, con una pre-columna Zorbax XDB C₁₈ 4 x 4 mm; y una columna Phenomenex Synergi 4 μ 80 °A, 250 x 4,6 mm, con una pre-columna Bondapack™ C₁₈ 120 Å, 3,9 x 20 mm de 10 μm de tamaño de partícula

- Sistema de Microondas para Digestión Milestone MLS-1200 MEGA, equipado con un sensor de presión y temperatura (ATC-300) y con dos rotores de polipropileno, de 6 y 10 vasos de TMF (Tetrafluormethaxil), con sus respectivas tapas y aros protectores del mismo material, de 435 y 1595 psi de presión máxima, respectivamente, 10 cilindros de PEEK/GFM (Poliesterheton).
- Baño de ultrasonido Elma Transsonic Digital con control de temperatura y potencia.

2.2 MÉTODOS

2.2.1 Estudio del comportamiento cromatográfico de MBS, PA y BS

Separación de MBS, PA y BS

Se estudió el comportamiento cromatográfico isocrático, por medio del uso de diferentes condiciones de flujo y composición de la fase móvil, tanto para MBS y sus derivados. Para esto se usó una columna en fase inversa Phenomenex, se inyectaron en duplicado 20 μL de una solución de $1\mu\text{g mL}^{-1}$ que contenía los tres analitos en estudio. La fase móvil estudiada fue una mezcla de CH_3CN y H_2O (pH 3) cuya composición varió entre 50, 60 y 70 % de CH_3CN . Para cada una de las composiciones se varió el flujo entre 1,0; 0,75; y 0,5 mL min^{-1} . La cuantificación se realizó a 230 nm tanto para MBS como para sus derivados.

Separación de PA y BS

Se estudió el comportamiento cromatográfico isocrático, por medio del uso de diferentes condiciones de flujo y composición de la fase móvil, para los productos de degradación PA y BS. Se inyectaron 20 μL de una solución de $1\mu\text{g mL}^{-1}$ que contenía los dos

analitos en estudio. La fase móvil consistió en CH₃CN:H₂O (pH 3), la composición varió entre 40, 45 y 50 % de CH₃CN. Para cada una de las composiciones se varió el flujo de la fase móvil entre 1,0 y 0,5 mL min⁻¹.

2.2.2 Estudio de modelos de calibración en la separación isocrática de los productos de degradación

Aplicación de modelos univariados

De acuerdo con los resultados del estudio anterior y a la sensibilidad de la separación de los dos productos a las condiciones cromatográficas, se planteó el estudio de varios sistemas de calibración que permitieran la determinación de los compuestos con algún grado de solapamiento. Se variaron las condiciones cromatográficas cambiando la composición de la mezcla CH₃CN:H₂O entre 45, 50 y 53 % de CH₃CN con el propósito de obtener los diferentes grados de solapamiento entre los productos. Estas condiciones cubrieron un amplio intervalo de interferencia, desde totalmente resueltos hasta fuertemente solapados. El flujo de la fase móvil fue 1,1 mL min⁻¹. Se estudiaron seis tipos de respuesta: i) área y altura para cada compuesto del cromatograma original ii) área y altura máximas del cromatograma derivado y iii) área y altura mínimas del cromatograma derivado. Se utilizó una matriz de diseño experimental 5² del tipo cuadrado latino (figura 2). Este diseño consideró la realización de dieciséis experimentos en total: ocho soluciones puras para cada uno de los productos de degradación, los puntos 01, 02, 03 y 04 para BS y 10, 20, 30 y 40 para PA y cuatro mezclas en la razón 1:1 (PA:BS); también se ensayaron mezclas en la razón 1:2 (puntos 12 y 24) y en la razón 2:1 (puntos 21 y 42). Las concentraciones analíticas ensayadas fueron 0,5; 1,0; 1,5

y $2,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ para ambos productos de degradación. Con los puntos del diseño experimental se construyeron diferentes curvas de calibración de acuerdo a dos modelos:

- En el primero se consideraron solo las respuestas instrumentales de cada producto de degradación puro.
- En el segundo se consideraron las respuestas instrumentales de cada producto puro más las correspondientes a las soluciones formando parte de las mezclas con su interferente.

En el primer caso se probó el poder predictivo de dicha curva interpolando las respuestas instrumentales de un set correspondiente a las mezclas (calibración externa). En el segundo caso la calibración y la predicción se realizaron sobre el conjunto total de datos (calibración interna).

Estas curvas fueron evaluadas por parámetros estadísticos (r^2 , pendiente, etc.), errores en las calibraciones y cálculos de excesos en éstas, los que se detallarán en el punto 2.2.5.

Las concentraciones analíticas empleadas en estos estudios se encuentran en la figura 2

2,0	04	14	24	34	44
1,5	03	13	23	33	43
1,0	02	12	22	32	42
0,5	01	11	21	31	41
0	00	10	20	30	40
$\mu\text{g mL}^{-1}$	0	0,5	1,0	1,5	2,0

Figura 2: Diseño experimental 5^2 , mezclas ensayadas (azul), concentraciones de BS (verde) y concentraciones de PA (amarillo) en $\mu\text{g mL}^{-1}$

Aplicación de un modelo multivariado *PCR*

En este estudio, se utilizó la misma matriz de diseño experimental 5^2 descrita en el punto anterior, considerando las mismas concentraciones analíticas. Sin embargo, este diseño fue ensayado en forma completa, es decir se amplió el número de muestras, dando lugar a la realización de los veinticuatro experimentos en total (mezclas y soluciones puras de los productos de degradación) como consecuencia también se ampliaron las razones de PA: BS de 1:4 hasta 4:1. Además, se incluyó una matriz de predicción que consistió en cinco mezclas, cuyas relaciones PA:BS no coincidían a las ensayadas en el diseño experimental, pero estaban comprendidas dentro de sus límites. Los modelos por *PCR* se aplican en Química Analítica para puntos de calibración colineales, implican la construcción de dos matrices, una de calibración del modelo y otra de predicción. En la primera cada punto del diseño experimental 5^2 es descrito por una serie de variables, este

número de m variables dependientes (respuesta instrumental: área, altura, etc.), se escribe como vector columna de dimensiones ($m \times 1$), estas son las llamadas variables del bloque X. La segunda matriz queda descrita por variables independientes, en este caso las concentraciones de PA y BS, esta son las llamadas variables del bloque Y, que también es descrito como vector columna, luego cada muestra es descrita como filas y se corresponde con un número dado de variables X e Y. En la calibración se desea hallar un modelo que relacione los dos conjuntos de datos X e Y.

El procedimiento matemático para la calibración es el siguiente: primero se descomponen la matriz X en una suma de a factores ($a < m$), mediante el análisis de componentes principales, para predecir cuáles de dichos componentes son significativos en el sistema. A continuación se realiza una regresión por mínimos cuadrados entre las concentraciones y los componentes que se consideran significativos. Estos cálculos de matrices se desarrollaron en el programa estadístico The Unscrambler 8.0.

En este estudio solo se emplearon dos composiciones de fase móvil, las correspondientes a 53 y 50 % de CH_3CN . El flujo de la fase móvil fue también de $1,1 \text{ mL min}^{-1}$.

En todas las determinaciones descritas en los puntos anteriores la temperatura de la columna durante el análisis fue de $35 \text{ }^\circ\text{C}$ y la cuantificación se realizó a 230 nm .

2.2.3 Parámetros de calidad analítica para la separación en gradiente de MBS, PA y BS

Se empleó una columna Zorbax SB- C_8 en fase inversa con un programa de elución en gradiente: al inicio la composición de la fase móvil fue H_2O (pH 2,8)/ CH_3CN en la razón 70:30, para aumentar linealmente la concentración de CH_3CN en un minuto hasta

55 %, manteniéndose por 4 minutos para volver a la condición inicial en un minuto y finalmente esta condición mantenida por 6 minutos. La velocidad de flujo fue 1,5 mL min⁻¹. Las concentraciones estudiadas en mezclas de los tres analitos fueron: 0,05; 0,1; 0,15; 0,2; 0,25; 0,5; 1,0; 1,5 y 2,0 µg mL⁻¹. Se inyectaron 20 µL de cada solución en duplicado. Para determinar el límite de detección (LOD), cuantificación (LOQ) y sensibilidad analítica se considerara el rango de concentración entre 0,05 y 0,2 µg mL⁻¹ y linealidad en el rango de 0,05 y 2,0 µg mL⁻¹, además, se determinó el intervalo lineal de las curvas de calibración y la selectividad del método. Se trabajó con el área del pico como respuesta cromatográfica. La cuantificación fue realizada a 234,9 y 264,7 nm, dependiendo del analito.

2.2.4 Procesamiento de datos

Para el desarrollo de todas las experiencias anteriores se establecieron a través del software tres métodos de procesamiento de datos:

- el primero procesa los datos del cromatograma usando un solo canal a una longitud de onda de 230 nm, el que se integró en el modo valle-valle
- el segundo con dos canales a 234,9 nm y 264,9 nm, el que se integró en el modo valle-valle.
- el tercero también con dos canales, ambos procesados a 230 nm, correspondiendo el primero al cromatograma original integrado en el modo "forced drop line" y el segundo a la primera derivada de éste, que es la diferencial de la absorbancia con respecto al tiempo dA/dt . La primera derivada es una función bipolar que pasa por cero en el punto correspondiente al máximo de un pico en el cromatograma original, dando un pico

positivo y otro negativo. Estos se integraron en los modos “reverse horizontal by peak” y “allow negative peak”.

Los parámetros instrumentales para el detector de arreglo de diodos fueron: adquisición de espectros entre 200-300 nm, 1 espectro seg^{-1} de velocidad de adquisición y 1,2 nm de resolución espectral. Para la identificación de MBS y sus derivados se construyó una biblioteca con los espectros característicos para cada analito en particular, según las condiciones cromatográficas de estudio.

2.2.5 Cálculo de parámetros cromatográficos, analíticos y errores en las calibraciones

Cálculo de parámetros cromatográficos

- **Índice de separación (R)**

Para medir la resolución de dos picos cromatográficos se usó el índice de separación definido como:

$$R = \frac{(S_1 - S)}{S_1} \times 100 \quad (1)$$

Donde S_1 es la altura del pico y S representa la altura del valle entre el primer y segundo pico. Esta definición dada por la European Pharmacopeia tiene la ventaja de corregir los errores por asimetrías en los picos. Los valores de R van desde 0 (totalmente solapados) hasta 100 (totalmente resueltos).

- **Número de platos teóricos (N)**

Un pico cromatográfico representa la distribución de moléculas de un analito en una banda y como éste eluye de una columna, en general el ancho de banda es medido a la mitad de la altura del pico. Un número de factores independientes como inyector-

muestra, características del detector, temperatura y procesos de retención en la columna, contribuyen a la dispersión de moléculas en una banda y a su ensanchamiento. Los efectos acumulativos de pequeñas variaciones en estos factores, se describen en términos estadísticos de variancia σ , en el proceso de elución. La teoría clásica cromatográfica considera que los procesos de separación ocurren por una sucesión de equilibrios, mientras mayor el número de estos, mayor es la eficiencia de la columna y menor el ensanchamiento de la banda (variancia). La eficiencia de la columna comúnmente se:

$$N = 16 \left(\frac{t_r}{w} \right)^2 \quad (2)$$

Donde w es el ancho de banda de un pico gaussiano a una altura de 0,134 h y t_r el tiempo de retención. Esta expresión considera que el 95 % de moléculas en una banda están contenidas dentro de 4σ , que corresponde a la intersección de las líneas dibujadas en la tangente de los puntos de inflexión, otro criterio es considerar 6σ a una altura de 0,024 h y N se transforma en:

$$N = 36 \left(\frac{t_r}{\Delta t} \right)^2 \quad (3)$$

Donde Δt corresponde a la diferencia entre el final y el inicio de la integración de un pico y se obtiene directamente del cromatograma. Este criterio fue aplicado para el cálculo en este trabajo.

- **Coefficiente de absorptividad molar (ϵ)**

Para caracterizar el comportamiento espectral de PA y BS en las condiciones cromatográficas estudiadas y posteriormente ser empleado en la interpretación de los

datos obtenidos en los modelos de calibración se calculó el coeficiente de extinción molar.

Cuando un haz de radiación monocromática y paralela P_0 pasa a través de una solución de espesor b y una concentración c de una especie molecular, la potencia del haz disminuye de P_0 a P , debido a las interacciones entre los fotones y las partículas absorbentes.

Tomando en cuenta una transmisión rectilínea, se tiene que la razón entre la potencia de radiación transmitida (o energía radiante que no es absorbida luego de pasar por la muestra) y la potencia del haz de radiación incidente se define como transmitancia:

$$T = \frac{P}{P_0} \quad (4)$$

La absorbancia de una disolución, en cambio, es el log en base 10 del recíproco de la transmitancia por lo que aumenta a medida que aumenta la atenuación del haz de radiación radiante:

$$A = T = \log \frac{P_0}{P} \quad (5)$$

La ley de Beer establece que la transmitancia decrece en progresión geométrica a medida que la concentración aumenta también en progresión geométrica para un paso óptico dado. Relaciona por lo tanto, la absorbancia con la concentración del analito de la siguiente forma:

$$A = \log \frac{P_0}{P} = b \times c \times \varepsilon \quad (6)$$

Donde b es la longitud del camino óptico recorrido, c la concentración de la especie absorbente y ϵ es la constante de proporcionalidad llamada coeficiente de absorptividad molar. Para el cálculo se usaron los analitos puros, en cada una de las tres condiciones de separación isocrática, empleando un valor de b de 1 cm. La absorbancia se obtuvo directamente en el máximo del pico y el coeficiente de absorptividad molar resultó del valor de la pendiente de la relación entre A (variable Y) y c (variable X), dividida por la constante b , en el intervalo lineal.

Parámetros analíticos

En algunas técnicas no es posible llevar a cabo un blanco en las determinaciones (cromatografía, voltamperometría, etc.). Una estimación aproximada del límite de detección estadístico puede ser calculado por la siguiente relación (Cuadros y col., 1993):

$$LOD = 3 \left(\frac{S_{Y/X}}{b} \right) \sqrt{\frac{n-1}{n-2}} \quad (7)$$

Donde b y $S_{Y/X}$ son la pendiente y la desviación estándar de la regresión. Para obtener LOQ se cambia el valor 3 por 10.

La sensibilidad analítica indica la menor variación de concentración que el método analítico es capaz de discernir se calcula por medio de la siguiente relación:

$$sa = \frac{S_{X/Y}}{b} \quad (8)$$

La linealidad es usualmente medida por el coeficiente de correlación (r), y por el coeficiente de determinación (r^2 , generalmente expresado como porcentaje). No obstante valores de r alrededor de uno no necesariamente indican una alta calidad de los datos

analíticos. Luego se puede usar una expresión matemática de la linealidad que es definida como:

$$\text{linealidad} = 1 - \left(\frac{S_b}{b} \right) \times 100 \% \quad (9)$$

Donde S_b y b son la desviación estándar de la pendiente y la pendiente, respectivamente.

Errores y excesos en los modelos de calibración

Para evaluar la habilidad de predicción de errores en los diversos modelos de calibración desarrollados, se emplearan tres índices: *rmsecv*, *rmsep* y excesos de calibración. Los dos primeros evalúan errores en la predicción de concentración en los modelos de calibración para un analito a la vez, el otro evalúa errores en forma conjunta para ambos analitos y las correspondientes bases para el cálculo y el significado de cada uno de ellos son:

- **rmsecv** (root mean squared prediction error based on cross-validation)

Dados n puntos de un set de calibración, se construyen n modelos de calibración. Para cada uno de los modelos, se obtiene un punto diferente y el modelo sin ese punto es usado para predecir el mismo. Finalmente, se obtienen n valores de predicción y el valor de *rmsecv* queda definido como:

$$\text{rmsecv} = \frac{1}{n} \times \sum_{i=1}^n (x_i^* - x_i)^2 \quad (10)$$

Donde X_i^* representa el valor predicho del i -ésimo punto por el modelo sin usar dicho punto, X_i representa el valor real correspondiente y n el número de puntos utilizado en el modelo. El menor valor de *rmsecv* para n modelos, indica que éste presenta una mejor capacidad de predicción. Este tipo de índice puede considerarse como una calibración

interna, pues cada uno de los puntos de predicción es calculado con un modelo diferente, calculado a partir del mismo set de datos del modelo de calibración. Es así como este índice es muy optimista en la predicción de errores.

- **rmsep** (root mean squared prediction error)

Un valor más realista para la capacidad de predicción es obtenido usando este índice, pues utiliza un set de datos de calibración y un set de datos totalmente distinto para propósitos de predicción; el valor de rmsep se define como:

$$rmsep = \sqrt{\frac{1}{m} \times \sum_{i=1}^m (x_i^* - x_i)^2} \quad (11)$$

Donde X_i^* representa el valor predicho del i -ésimo punto externo por el modelo, X_i representa el correspondiente valor real y m el número de puntos utilizados para la predicción. En este caso todos los puntos son predichos utilizando el mismo modelo de calibración. De nuevo un valor más bajo del rmsep, indica una mejor habilidad de predicción.

- **Excesos de calibración**

Con el fin de estudiar en forma conjunta los errores producidos para ambos analitos se aplicó un concepto empleado para calcular los excesos enantioméricos obtenidos en una separación cromatográfica (Verdú-Andrés y col., 2001). A este método se le denominó excesos de calibración (EC) para un modelo dado y se definió como la diferencia entre la proporción de los dos analitos interferidos en una mezcla (solapados), dividido por la suma entre ellos:

$$EC = \frac{(C_{PA} - C_{BS})}{(C_{PA} + C_{BS})} \times 100 \quad (12)$$

Donde C_{PA} y C_{BS} representan las concentraciones de PA y BS en $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente para cada punto del modelo de calibración. El EC se calcula tanto para los valores predichos (encontrados), como para los valores reales (agregados). La representación de la relación entre EC agregados versus EC encontrados, deberá ajustarse a una línea recta con pendiente igual a uno e intercepto cero, si el modelo tiene una alta capacidad de predicción.

2.2.6 Desarrollo de sistemas de extracción de MBS

En este punto, se abordarán una serie de experiencias que convergerán en el objetivo de desarrollar sistemas de extracción con solventes de MBS desde suelos, tanto empleando la energía de ultrasonido como de microondas, tomando en cuenta los efectos de la composición del suelo, en la extractibilidad de los residuos, debido a las diferencias en su composición y en sus propiedades fisicoquímicas, características que transforman a este tipo de sustrato ambiental, en una matriz compleja.

Se consideraron aspectos propios del herbicida, como son su estabilidad frente a la temperatura y pH y la influencia de parámetros relacionados con los equilibrios que representan el comportamiento de adsorción del compuesto en el suelo. También se contemplaron aspectos propios de la técnica de extracción a utilizar, por ejemplo, volumen de solvente, cantidad de muestra, temperatura de extracción, potencia aplicada al sistema, entre otros. La separación cromatográfica fue realizada en gradiente (a

excepción de las isothermas de adsorción) empleando 20 μL como volumen de inyección, temperatura de la columna 35 $^{\circ}\text{C}$ y cuantificación a 234,9 nm.

Estudios preliminares. Isothermas de adsorción y comportamiento de hidrólisis

Con el propósito de estimar la capacidad de adsorción de MBS en los suelos, todos ellos se caracterizaron por los valores de la constante de Freundlich (K_f); estos antecedentes permitirán establecer la factibilidad del desarrollo de los sistemas de extracción. Además, se estudió el comportamiento de hidrólisis de MBS en las condiciones de extracción, en ausencia del suelo, con el fin de establecer los límites de temperatura que podrán utilizarse durante el proceso, puesto que antecedentes bibliográficos indican que éste presenta inestabilidad térmica (Smith, 1993) y experimenta hidrólisis en soluciones acuosas la que es dependiente de la temperatura y el pH (Sabadie, 1996).

a) Isothermas de adsorción

Una isoterma de adsorción, describe en forma gráfica la relación de concentración de una sustancia (adsorbato) entre una fase acuosa (concentración de equilibrio) y la cantidad de ella que es adsorbida por unidad de masa de una superficie adsorbente (en este caso el suelo). Estos estudios se realizan en condiciones constantes de presión, temperatura y cantidad de adsorbente. La investigación ha llevado al planteamiento de una serie de relaciones matemáticas que describan los datos obtenidos del proceso de adsorción, una de estas representaciones puede hacerse por la ecuación de Freundlich, ésta es una expresión empírica que se aplica a soluciones diluidas y tiene la siguiente forma:

$$\frac{x}{m} = K_f \times C^{\frac{1}{n}} \quad (13)$$

Donde K_f y $1/n$ son constantes empíricas, x/m es la cantidad adsorbida en $\mu\text{g g}^{-1}$ y C es la concentración de equilibrio expresada en $\mu\text{g mL}^{-1}$. Esta relación no provee de una interpretación mecanística a escala molecular del proceso de adsorción, sino que representa una aproximación empírica para predecir la distribución de un compuesto particular, entre dos fases (sólido-solución).

Suelos empleados

En este estudio se usaron tres suelos Chilenos previamente caracterizados y de diferente origen:

- Suelo Temuco (TEM): Suelo alofánico derivado de cenizas volcánicas (orden: *Medial, mesic, Entic Dystrandept*), con un alto contenido de MO, de textura franco-limoso de la novena región.
- Suelo Quillota (QLT): Suelo no alofánico (orden: *Entic Xerumbrept*), con un contenido medio de MO, de textura franco-arcilloso de la Quinta región.
- Suelo Pucuro (PCR): Suelo no alofánico (orden: *Mollic Fluviaquent*), con un contenido bajo de MO, de textura franco de la Quinta región.

Sus principales características fisicoquímicas se encuentran en la tabla 2.

Tabla 2: Propiedades fisicoquímicas de los suelos

Suelo	MO (%)	pH	C (%)	CIC mmol Kg ⁻¹	Filo ^a (%) ^b	Esmec ^c (%) ^b	Area Sup ^d (m ² g ⁻¹)
PCR	1,7	7,2	0,8	180	34	18	55,5
QLT	3,8	7,4	1,78	228	40	17	66,7
TEM	21,6	6,3	6,64	555	-	-	198,7

^a filo: filosilicatos

^b Porcentaje en el suelo total

^c Esmec: esmectita

^d Area Superficial

Procedimiento

Se pesaron 2 g de suelo (precisión $\pm 0,01$ g), las muestras fueron colocadas en tubos de vidrio, a los que se agregaron 5 mL de una solución acuosa contaminante de MBS en CaCl₂ 0,01 M. Las concentraciones de dichas soluciones fueron: 0,2; 0,4; 0,8; 1,2 y 1,6 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para el suelo QLT y 0,4; 0,8; 1,2, 1,6 y 2,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para los suelos PCR y TEM. Las muestras fueron incubadas por 16 horas a 30 ± 1 °C con agitación constante, en sistema de equilibrio en "batch". Transcurrido el tiempo de incubación las muestras fueron centrifugadas a 4000 rpm por 15 minutos, el sobrenadante fue filtrado en una membrana de 0,22 μm y recogido en viales para su análisis cromatográfico. Este se realizó inyectando 20 mL en condiciones isocráticas CH₃CN:H₂O 60:40 (pH 2.8 ajustado con H₃PO₄).

b) Influencia de la temperatura y el pH sobre la hidrólisis de MBS en medio H₂O/CH₃CN

Se estudió la influencia de la temperatura y pH el sobre la hidrólisis de MBS en soluciones acuosas de concentración 5.2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ preparadas a pH 3.1; 4.8; 6.9, y 9.4 (pH ajustado con soluciones diluidas de HCl y NaOH respectivamente). Un mL de cada

una de las soluciones fueron mezclados con cinco mL de CH_3CN e incubadas a cuatro temperaturas diferentes en un baño termoregulado, éstas fueron: 25, 50, 75 y 90 °C, en tubos debidamente cerrados. Las muestras se incubaron por cinco y diez minutos, enfriadas en un baño de hielo por diez minutos, filtradas y recogidas en viales para su análisis cromatográfico.

1) Extracción de MBS por ultrasonido

- **Optimización de parámetros**

La optimización de los parámetros en la extracción por ultrasonido de MBS pretende en un primer paso conocer aquellos factores que son significativos en la recuperación. En el presente trabajo se desarrolló un diseño experimental del tipo “screening factor” en dos suelos de muy diferentes características fisicoquímicas (PCR y TEM); a partir del conocimiento de aquellos que resultasen significativos se dará un segundo paso que corresponderá a una optimización de éstos a través de un diseño experimental del tipo “superficie de respuesta” en el suelo de mayor complejidad (TEM).

Para los estudios antes mencionados se contaminaron las muestras de suelo directamente en los tubos, con una solución acuosa de MBS, al nivel de concentración de $2 \mu\text{g g}^{-1}$ y una relación suelo: H_2O 1:1, p/v). Las muestras fueron incubadas por dieciséis horas a temperatura ambiente, con agitación constante, para asegurar la adsorción de MBS en el suelo. Una vez transcurrido el tiempo de incubación las muestras fueron extraídas por cinco minutos, según el protocolo del diseño experimental, enfriadas en hielo por tres minutos, centrifugadas a 4000 rpm por 15 minutos, el sobrenadante fue filtrado y recogido en viales para su análisis cromatográfico.

Screening factor

Se sometieron cinco factores experimentales a un estudio estadístico, mediante un diseño experimental factorial 2^5 , para encontrar aquellos que contribuyen significativamente en la recuperación (variable de respuesta) de MBS desde los suelos. La elección de estos factores y sus niveles se basó en el conocimiento de experiencias con otros herbicidas y en antecedentes bibliográficos (Báez y col., 2003). Se estudiaron los siguientes factores: tipo de suelo, temperatura del baño, potencia, cantidad de solvente y cantidad de muestra. En la tabla 3 se presentan los factores y niveles utilizados en el diseño y en la tabla 4 se resume la matriz del diseño. Se utilizó el paquete estadístico Statgraphics 4.0 para el análisis de datos y el método estadístico de análisis fue ANOVA con un nivel de significancia del 95 %.

Para obtener la desviación estándar del diseño se hicieron duplicados de cuatro experimentos. El diseño experimental factorial implicó la realización de 36 experiencias en total. El orden asignado a cada unidad experimental fue aleatorio y así se trató en el análisis estadístico de los datos, sin embargo, por razones de tipo práctico los experimentos se ordenaron en cuatro bloques experimentales de acuerdo a la temperatura y potencia, éstos se observan en la tabla 5.

Tabla 3: Diseño experimental screening factor. Factores y niveles empleados

Factor	Símbolo	Nivel	
		-1	+1
Tipo de suelo	D	PCR	TEM
Temperatura de Extracción (°C)	A	30	60
Cantidad de solvente (mL)	E	5	10
Potencia	B	4	8
Cantidad de muestra (g)	C	1	3

Tabla 4: Matriz de diseño experimental

Experimento	Niveles de Factores				
	D	A	E	B	C
1	+1	-1	+1	-1	+1
2	+1	-1	+1	-1	-1
3	-1	+1	-1	+1	+1
4	-1	+1	-1	+1	-1
5	+1	+1	-1	+1	+1
6	-1	+1	-1	+1	+1
7*	+1	-1	-1	-1	-1
8	-1	+1	+1	+1	+1
9	-1	-1	+1	-1	-1
10	+1	+1	-1	+1	-1
11*	+1	+1	-1	+1	+1
12	+1	-1	+1	-1	-1
13	+1	-1	-1	-1	-1
14	-1	-1	-1	+1	-1
15	+1	+1	+1	+1	-1
16	-1	-1	-1	-1	+1
17	+1	+1	-1	+1	-1
18	+1	-1	-1	-1	+1
19	+1	+1	+1	+1	+1
20	-1	-1	+1	-1	+1
21	-1	+1	-1	-1	-1
22	-1	-1	-1	-1	+1
23*	-1	-1	-1	-1	-1
24*	-1	+1	+1	-1	-1
25	+1	-1	-1	-1	+1
26	+1	+1	+1	-1	-1
27	-1	+1	+1	+1	-1
28	-1	-1	+1	-1	+1
29	-1	+1	+1	-1	+1
30	+1	-1	+1	-1	+1
31	+1	+1	-1	-1	-1
32	-1	-1	+1	-1	-1

*Experimentos en duplicado

Tabla 5: Bloques del diseño experimental

Bloques	Numero de Experimentos	Temperatura °C	Potencia
1	10	30 °C	4
2	8	30 °C	8
3	9	60 °C	4
4	9	60 °C	8

Metodología de superficie de respuesta

Una vez identificados los factores significativos en la recuperación, se llevó a cabo la optimización en tres parámetros relacionados fundamentalmente con la técnica de extracción, obteniéndose el modelo matemático que explica el sistema y los valores óptimos para cada factor. El plan experimental elegido fue un diseño compuesto central Centrado en la cara $2^3+\alpha$ con seis puntos en el origen. Este diseño implica la ejecución de 20 experimentos, los cuales nacen del estudio de tres niveles para cada factor más los seis puntos centrales. Esta optimización fue realizada sobre la matriz más compleja, el suelo TEM.

- **Estudio de la influencia de factores propios de la matriz**

Se completó la optimización incorporando factores propios de la muestra de suelo y del comportamiento del herbicida en éstos en función de sus propiedades fisico-químicas.

Influencia de un segundo paso de extracción

Este estudio se realizó sobre muestras de los suelos TEM y PCR al nivel $4 \mu\text{g g}^{-1}$, se tomaron 3 g de suelo en duplicado los cuales fueron contaminados, extraídos y analizados según el mismo protocolo anteriormente descrito. La primera y segunda extracción fueron realizadas en las siguientes condiciones experimentales: Temperatura del baño de ultrasonido 60 °C, potencia 8, cinco minutos de extracción, 5 mL y 2 mL de

extractante (CH_3CN) en la primera y segunda extracción, respectivamente. Los extractos obtenidos de la primera y segunda extracción fueron cuantificados en forma separada.

Influencia de la presencia de agua y de la relación suelo:agua

Se contaminó 25 g de suelo PCR seco, a un nivel de $4 \mu\text{g g}^{-1}$, con 10 mL de una solución acuosa de MBS (concentración $10,32 \mu\text{g mL}^{-1}$), la muestra se agitó por una hora y luego se secó en una estufa a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ por 16 horas. Una vez seca la muestra ésta fue molida y homogeneizada en mortero de porcelana, guardada en un frasco de plástico y conservada a $-18 \text{ }^\circ\text{C}$. Se determinó la humedad de la muestra de suelo antes de contaminar y finalizado el procedimiento de contaminación. Se pesó 1, 2 y 3 g (precisión $\pm 0,01\text{g}$) de suelo contaminado y depositado en tubos de vidrio; a cada una de las muestras se agregó 1, 2 y 3 mL de H_2O , respectivamente (relación suelo: H_2O 1:1, p/v) a otra muestra de 1 g se le agregó 0,5 mL de H_2O (relación suelo: H_2O 2:1, p/v). Paralelamente, se constituyó otro set de muestras de 1, 2 y 3 g a las que no se agregó agua. Las muestras fueron extraídas y analizadas según el mismo protocolo anteriormente descrito, sin embargo, se realizó una segunda extracción y en este caso los extractos fueron colectados en un mismo tubo de ensayo.

Influencia de un paso de equilibrio en medio acuoso previo a la extracción y de la concentración de MBS. Estudio de repetibilidad

Para este estudio se utilizaron los suelos PCR y QLT, cada una de las muestras de suelo fue contaminada a niveles inferiores, 1 y $0,5 \mu\text{g g}^{-1}$, siguiendo el procedimiento descrito en la sección anterior, adecuando las concentraciones de las soluciones contaminantes. En esta experiencia se insistió en el estudio de la relación suelo: agua (2:1 y 1:1, p/v) y

se agregó al procedimiento un paso de equilibrio de 30 minutos previo a la extracción con agitación. Se pesaron en quintuplicado 3 g de suelo de cada nivel de contaminación, depositando la muestra en tubos de centrifuga cónicos de plástico, en los que se llevó a cabo la extracción. La experiencia se llevó a cabo en seis bloques de acuerdo los que se describen en la tabla 6.

Tabla 6: Bloques experimentales desarrollados en las condiciones experimentales seleccionadas en el estudio

Bloques	Suelos	Nivel	Suelo :H ₂ O (p/v)	Equilibrio antes de la Extracción
1	PCR y QLT	0.5 µg g ⁻¹	2:1	No
2	PCR y QLT	0.5 µg g ⁻¹	1:1	No
3	PCR y QLT	0.5 µg g ⁻¹	1:1	Sí, 30 minutos
4	PCR y QLT	1 µg g ⁻¹	2:1	No
5	PCR y QLT	1 µg g ⁻¹	1:1	No
6	PCR y QLT	1 µg g ⁻¹	1:1	Sí, 30 minutos

En los bloques experimentales 1, 2, 4 y 5 una vez agregada el H₂O inmediatamente se agregó el extractante, en cambio en los bloques 3 y 6 se agregó el H₂O, se equilibró la muestra por 30 minutos con agitación y luego se agregó el extractante. El procedimiento general adoptado para esta experiencia fue el siguiente:

1. A cada muestra de suelo se agregó la alícuota correspondiente de H₂O.
2. Se agregaron 5 mL de CH₃CN, se agitó la muestra e inmediatamente se procedió a la extracción en el baño del ultrasonido, exceptuando los bloques 3 y 6.
3. Ocurrida la extracción los tubos fueron enfriados en un baño de hielo por tres minutos y centrifugados por quince minutos a 4000 rpm.
4. El sobrenadante fue transferido cuantitativamente a un matraz de aforo de 10 mL.

5. Se sometió nuevamente a extracción pero esta vez con 3 mL de CH_3CN , repitiéndose las operaciones 3 y 4.
6. El suelo fue lavado con 1 mL de CH_3CN y centrifugado por 5 minutos a 4000 rpm, agregándose el líquido sobrenadante al matraz.
7. Se aforaron los extractos a 10 mL con CH_3CN .
8. Se filtraron las muestras para su posterior análisis cromatográfico.

2) Extracción de MBS por microondas (MASE)

- **Estudio preliminar. Comportamiento de hidrólisis durante el proceso de extracción**

El patrón de calentamiento de una muestra por MASE del tipo no conductivo, por lo que el solvente de extracción, alcanza su punto de ebullición en un corto tiempo (5-15 minutos) a diferencia del patrón de calentamiento conductivo (1-2 horas). Dado los antecedentes bibliográficos acerca de la inestabilidad térmica de MBS y que experimenta hidrólisis bajo ciertos intervalos de pH, se hace necesario estudiar en forma dirigida y específica el comportamiento de hidrólisis, bajo las condiciones de extracción por MASE.

Procedimiento

Para este estudio se emplearon dos suelos de diferentes características fisicoquímicas: PCR y TEM. La contaminación de las muestras al nivel $4 \mu\text{g g}^{-1}$ fue realizada directamente en los vasos de extracción, pesando 1 g en duplicado (precisión $\pm 0,01\text{g}$), a los cuales se le agregó 1 mL de una solución acuosa contaminante de MBS de $4 \mu\text{g mL}^{-1}$; las muestras fueron equilibradas por agitación por 1 hora antes de la extracción.

La extracción fue realizada agregando 5 mL de CH₃CN en cada vaso de extracción. El programa de extracción consistió en tres pasos:

1. 2 minutos a 350 W, y 40 °C
2. 3 minutos a 500 W, temperatura variable
3. 2 minutos de ventilación a 0 W

El segundo paso de extracción fue realizado a 60, 70, 80 °C y sin control de temperatura, cada uno de los cuales fueron designados como programas de extracción 1, 2, 3 y 4, respectivamente, en cada programa, se incluyeron ambas muestras de suelo en duplicado con sus correspondientes blancos. Una vez transcurrido el programa, el rotor con los vasos de extracción fue enfriado en un baño de agua por 15 minutos, antes de ser abiertos. Durante el proceso de extracción, fue registrada la temperatura en el interior de los vasos cada 10 segundos.

Luego las muestras fueron centrifugadas en los mismos vasos, a 4000 rpm por 15 minutos el sobrenadante fue filtrado y recogido en viales para su análisis cromatográfico.

- **Estudio de la influencia de factores propios de la matriz**

Por analogía de los factores estudiados en la extracción por ultrasonido se decidió explorar factores propios de la muestra de suelo y del comportamiento del herbicida en éstos en función de sus propiedades fisicoquímicas, tales como la influencia de una segunda extracción, la cantidad de muestra, el nivel de concentración, y el tiempo de equilibrio antes de la extracción. Todos estos estudios fueron realizados sobre muestras de suelo contaminadas secas de suelos PCR y QLT, cuyo procedimiento de

contaminación fue descrito en secciones anteriores. El programa de extracción utilizado fue el 1 y CH₃CN el solvente de extracción.

Influencia de un segundo paso de extracción

Este estudio se realizó sobre muestras de suelos contaminados al nivel 1 µg g⁻¹, se pesaron 1g de suelo en triplicado, a estos se le adicionó 1 mL de agua y a continuación el extractante. Los volúmenes fueron 5 y 2 mL para la primera y segunda extracción. Los extractos obtenidos de la primera y segunda extracción, fueron tratados de igual forma que en experimentos antes descritos y cuantificados en forma separada, es así como en todos los puntos subsiguientes el tratamiento de la muestras y el análisis cromatográfico es realizado bajo las mismas condiciones experimentales.

Efecto del tipo de suelo, cantidad de muestra, nivel de concentración y tiempo de equilibrio en medio acuoso antes de la extracción

Cada una de las muestras de suelo fue contaminada a niveles inferiores, 1 y 0,5 µg g⁻¹, adecuando las concentraciones de las soluciones contaminantes. Se pesó 1, 2 y 3 g de cada uno de los suelos en duplicado con su correspondiente blanco de suelo, por nivel, resultando en dos ciclos de extracción. Se adicionó una alícuota de agua, antes de agregar los 5 mL de extractante, manteniendo la relación suelo:H₂O 1:1 (p/v), en paralelo se lleva un set experimental de las mismas características, en el cual al adicionar la alícuota de agua se equilibrio por 30 minutos con agitación antes de agregar el extractante, en total la experiencia resultó en cuatro ciclos de extracción.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Estudio del comportamiento cromatográfico de MBS, PA y BS

Separación de MBS, PA y BS

En la tabla 7 se presentan los resultados de los datos cromatográficos obtenidos tanto para MBS y sus productos de degradación bajo diferentes condiciones de flujo y composición de fase móvil. En dicha tabla se expresan los tiempos de retención y la resolución lograda para los dos productos de degradación. Observamos que una disminución del flujo de la fase móvil provoca un aumento en los tiempos de retención para todos los analitos. Un menor flujo implica una mayor interacción analito-fase estacionaria y una menor resistencia de la columna al paso de la fase móvil lo que se traduce en una disminución de las presiones. Tal efecto también es observable al aumentar la concentración de CH_3CN en la fase móvil en el intervalo de composiciones estudiadas, dado por una disminución de la viscosidad de esta última ($\eta_{\text{CH}_3\text{CN}}=0,37$ y $\eta_{\text{H}_2\text{O}}=1$ a 20°C).

Tabla 7: Influencia de la composición y flujo de la fase móvil en la separación de MBS, PA y BS

Composición CH ₃ CN: H ₂ O	Flujo mL min ⁻¹	Presión Psi	t _R PA min	t _R BS min	t _R MBS min	R PA %	R BS %
50: 50	1,1	1500	3,61	3,85	8,66	65	45
	0,75	950	5,26	5,61	12,86	81	68
	0,5	600	7,89	8,29	19,46	87	77
60: 40	1,1	1300	3,37	3,37	5,52	0	0
	0,75	830	4,87	4,87	8,14	0	0
	0,5	480	7,20	7,20	12,07	0	0
70: 30	1,1	1100	3,2	3,08	4,13	70	13
	0,75	690	4,66	4,47	6,06	75	24
	0,5	380	6,89	6,64	9,03	78	33

En una fase estacionaria apolar se presenta una mayor afinidad por compuestos apolares frente a una fase móvil relativamente polar, de aquí que se observe por ejemplo que para cualquier composición y flujo los dos productos de degradación PA, BS sean eluidos rápidamente y previo al MBS con tiempos de retención de 3,61; 3,85 y 8,66 minutos respectivamente. En la composición 70:30 CH₃CN:H₂O el orden de elución de los productos de degradación se invierte respecto de las demás composiciones en todos los flujos. Al aumentar la proporción del modificador orgánico (índice de polaridad $P_{\text{CH}_3\text{CN}}=6,2$) se aumenta la fuerza de elución para los tres analitos, llevando a una disminución de los tiempos de retención, así por ejemplo en el caso de BS disminuye desde 3,85 hasta 3,08 minutos a un flujo de 1,1 mL min⁻¹.

En el intervalo de composiciones y flujos estudiados se observó solapamiento entre los productos de degradación de MBS. El índice de solapamiento (R) para PA y BS

calculado según la ecuación 1, varió desde 0 hasta 87 % y 0 hasta 77 % para PA y BS, respectivamente, correspondiendo el valor cero al total solapamiento de los picos (total interferencia). Puesto que los datos fueron cuantificados a 230 nm y en esta longitud de onda el máximo de absorción para PA es el doble que para BS a la misma concentración, los valores de R resultan mayores para PA que para BS en todas las composiciones y flujos. Sin embargo, se eligió dicha longitud de onda con el fin de cuantificar los tres analitos simultáneamente. En la figura 3 se presentan los espectros de absorción de los dos productos de degradación. De los datos (tabla 7) se observa que la disminución del flujo de la fase móvil y el aumento de la polaridad permiten una mejor resolución.

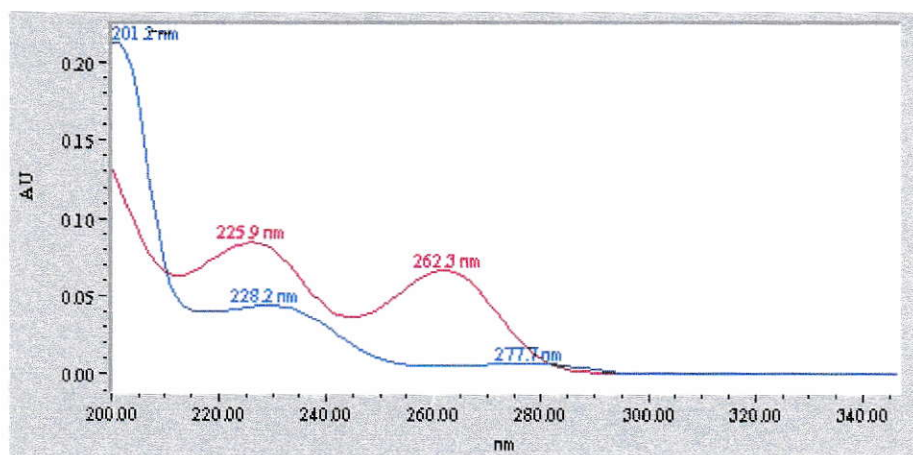


Figura 3: Espectros de absorción obtenidas en condiciones isocráticas $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ (pH 3) 50:50 y flujo $1,1 \text{ mL min}^{-1}$, PA (rojo) y BS (azul), ambos analitos en una concentración de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$

Separación de PA y BS

De acuerdo a los resultados anteriores se buscaron condiciones de flujo y composición que permitieran una total resolución de PA y BS (tabla 8). Los valores de R fluctuaron entre 62-100 % y entre 42-100 % para PA y BS respectivamente, obteniéndose la resolución total para la fase más polar en un flujo de 0,5 mL min⁻¹. Nuevamente los valores de R para PA fueron mayores que para BS. Estos resultados, junto a los anteriores, permiten concluir que la determinación simultánea de los tres compuestos, con una buena resolución de los productos de degradación, llevarían a una excesiva retención de MBS.

Tabla 8: Influencia de la composición y flujo de la fase móvil en la separación de PA y BS

Composición CH ₃ CN: H ₂ O	Flujo mL min ⁻¹	Presión Psi	t _R PA min	t _R BS min	R PA %	R BS %
40: 60	1,1	1620	4,08	4,8	100	100
	0,5	640	8,89	10,50	100	100
45: 55	1,1	1548	3,85	4,28	94	89
	0,5	624	8,26	9,19	97	95
50: 50	1,1	1540	3,72	3,93	62	42
	0,5	588	8,05	8,60	89	82

3.2 Estudio de modelos de calibración en la separación isocrática de los productos de degradación

De acuerdo a los resultados del estudio anterior y a la alta dependencia de la separación de los dos productos frente a variaciones pequeñas en las condiciones cromatográficas.

se planteó el estudio de varios sistemas de calibración que permitieran la determinación de los compuestos con algún grado de solapamiento.

Aplicación de modelos univariados

Para estos estudios se buscó obtener tres grados de solapamiento de los picos variando la composición de la fase móvil, éstos fueron: severo, intermedio y leve. Los tiempos de retención observados para los compuestos puros en 53, 50 y 45 % de CH₃CN fueron 3,54; 3,56 y 3,73 minutos para PA y 3,72; 3,80 y 4,16 minutos para BS, respectivamente.

En la tabla 9 se muestran los índices de separación de picos (R) para las mezclas de los productos de degradación para las tres composiciones estudiadas. Para PA, el valor R varió entre 0-24 %, 53-70 % y 94-96 %; para BS varió entre 0-30 %, 12-42 % y 84-96 % en 53, 50 y 45 % de CH₃CN, respectivamente.

Tabla 9: Porcentaje de resolución de los productos de degradación en distintas composiciones de fase móvil

Composición	53:47 CH ₃ CN:H ₂ O		50:50 CH ₃ CN:H ₂ O		45:55 CH ₃ CN:H ₂ O	
	R PA %	R BS%	R PA %	R BS %	R PA %	R BS
11	24	5	62	42	94	90
42	0	0	70	12	96	84
24	7	30	53	62	95	96
21	0	0	70	12	96	86
12	8	30	56	63	94	94
33	24	0.5	62	39	96	92
22	24	0.3	62	39	96	93
44	23	0.4	61	39	95	91

*Los números corresponden al diseño de la figura 2

Dos tipos de modelos de calibración fueron construidos con las respuestas instrumentales seleccionadas. El primero fue construido para los productos de degradación puros (puntos 01, 02, 03, y 04 para BS y puntos 10, 20, 30 y 40 para PA, figura 2) y el segundo incluye además las mezclas de éstos (puntos 11, 22, 33, 44, 12, 24, 21 y 42 del diseño experimental 5²). Las respuestas fueron de dos tipos, las primeras obtenidas del cromatograma original y las segundas obtenidas de la primera derivada del cromatograma original sin suavizado; cuando el número de puntos de suavizado se incrementa la amplitud de la señal disminuye fuertemente (Parilla y col., 1994). En ambos casos se midieron áreas y alturas (sí provienen del cromatograma derivado se denotan por ¹D). La primera derivada es una función bipolar que pasa por cero en el punto correspondiente al máximo de un pico en el cromatograma original, dando un pico positivo y otro negativo, existiendo por lo tanto cuatro señales correspondientes a los dos picos parcialmente solapados que posibilitan la cuantificación.

Cada punto de calibración es descrito por seis respuestas: área, altura, área ¹D máxima, área ¹D mínima, altura ¹D máxima y altura ¹D mínimo para cada analito. En la figura 4 se muestran cuatro cromatogramas con sus correspondientes cromatogramas derivados para la muestra 11 en todas las composiciones de fase móvil (45, 50 y 53 % de CH₃CN). En esta muestra la mezcla se encuentra en la proporción PA:BS 1:1. También se encuentra el cromatograma de la muestra 42 cuya proporción es PA:BS 2:1, representando la condición más severa de solapamiento, donde solo es posible visualizar en forma clara el primer máximo del cromatograma derivado. De esta forma al emplear el segundo modelo de calibración el número de puntos a considerar para BS será variable, dependiendo de esta condición.

Los resultados de las calibraciones para los productos puros corresponden al modelo 1 y los que incluyen tanto los compuestos puros como formando parte de las mezclas corresponden al modelo 2. Los resultados obtenidos se resumen en las tablas 10 a 15. En dichas tablas se encuentran los valores de la pendiente b y de la ordenada en el origen a (con su correspondiente error estándar S_b y S_a , de la ecuación de calibración $Y = bX + a$, donde Y es la respuesta instrumental, X la concentración ($\mu\text{g mL}^{-1}$) y, finalmente, el coeficiente de determinación, r^2 y el error estándar de la regresión, $S_{x/y}$.

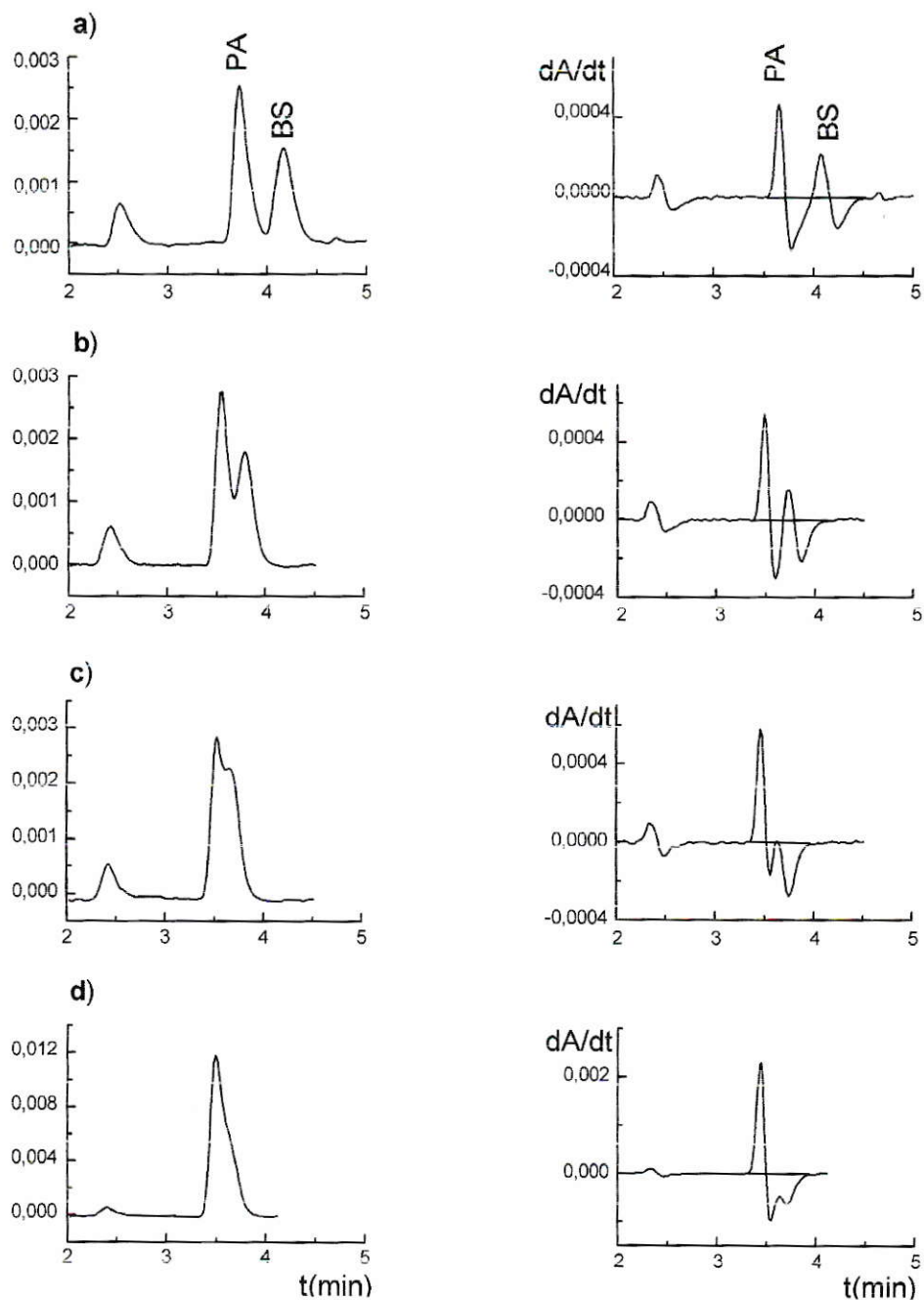


Figura 4: Cromatogramas originales y primera derivada de mezclas de PA y BS obtenidos para diferentes composiciones de fase móvil. a, b y c mezcla en razón 1:1, d en la razón 2:1; a) $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$, 45:55 b) $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$, 50:50 c) $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$, 53:47 d) $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$, 53:47. Eje de la ordenada corresponde al tiempo en minutos y el eje de la abscisa a la absorbancia en mUA

Tabla 10: Datos estadísticos de las curvas de calibración para Pirimidinamina, composición CH₃CN: H₂O 53:47

PA					
Respuesta	n	$b \pm S_b$	$a \pm S_a$	r^2 (%)	$S_{x/y}$
Área 1 ^a	5	57664 ± 966	-749 ± 1215	99,92	1272
Altura 1	5	5754 ± 67	21 ± 84	99,96	88
Area ¹ D máx 1	5	5625 ± 57	25 ± 72	99,97	75
Área ¹ D mín 1	5	5580 ± 116	87 ± 146	99,87	153
Altura ¹ D máx 1	5	1142 ± 15	-4 ± 19	99,94	20
Altura ¹ D mín 1	5	656 ± 4	7 ± 6	99,98	6
Area 2 ^b	11	57847 ± 3427	-5081 ± 4244	96,94	6398
Altura 2	11	5813 ± 56	16 ± 69	99,92	104
Area ¹ D máx 2	13	5721 ± 49	-77 ± 64	99,92	102
Área ¹ D mín 2	9	3051 ± 1922	538 ± 2529	26,47	3365
Altura ¹ D máx 2	13	1150 ± 12	-3 ± 16	99,87	26
Altura ¹ D mín 2	9	489 ± 127	34 ± 167	67,82	223

^a curva de calibración para productos puros

^b curva de calibración que además incluye las mezclas

Tabla 11: Datos estadísticos de las curvas de calibración para Pirimidinamina, composición CH₃CN: H₂O 50:50

PA					
Respuesta	n	$b \pm S_b$	$a \pm S_a$	r^2 (%)	$S_{x/y}$
Area 1 ^a	5	54519 ± 646	341 ± 814	99,96	852
Altura 1	5	5435 ± 56	-1 ± 70	99,97	73
Área ¹ D máx 1	5	5155 ± 18	28 ± 22	99,99	23
Área ¹ D mín 1	5	5368 ± 52	-64 ± 65	99,97	68
Altura ¹ D máx 1	5	1070 ± 11	-4 ± 15	99,96	15
Altura ¹ D mín 1	5	607 ± 2	0.059 ± 2	99,99	2
Área 2 ^b	13	54431 ± 1169	-1413 ± 1520	99,49	2421
Altura 2	13	5519 ± 46	-38 ± 60	99,92	95
Area ¹ D máx 2	13	5246 ± 66	-25 ± 86	99,82	137
Área ¹ D mín 2	13	4189 ± 672	-194 ± 874	77,93	1391
Altura ¹ D máx 2	13	1087 ± 12	-13 ± 16	99,89	25
Altura ¹ D mín 2	13	610 ± 3	-4 ± 4	99,97	6

^a curva de calibración para productos puros

^b curva de calibración que además incluye las mezclas

Tabla 12: Datos estadísticos de las curvas de calibración para los Pirimidinamina, composición CH₃CN: H₂O 45:55

PA					
Respuesta	n	$b \pm S_b$	$a \pm S_a$	r^2 (%)	S_{xy}
Área 1 ^a	5	53129 ± 811	492 ± 1021	99,93	1069
Altura 1	5	4870 ± 44	1 ± 55	99,98	58
Área ¹ D máx 1	5	4787 ± 39	68 ± 49	99,98	51
Área ¹ D mín 1	5	4612 ± 102	12 ± 129	99,85	135
Altura ¹ D máx 1	5	878 ± 5	30 ± 7	99,99	7
Altura ¹ D mín 1	5	509 ± 5	1 ± 7	99,96	7
Área 2 ^b	13	56051 ± 2123	-182 ± 2760	98,45	4395
Altura 2	13	5153 ± 192	-21 ± 249	98,49	397
Área ¹ D máx 2	13	5119 ± 215	-51 ± 279	98,09	445
Área ¹ D mín 2	13	4701 ± 153	-45 ± 199	98,84	317
Altura ¹ D máx 2	13	942 ± 36	-2 ± 47	98,37	75
Altura ¹ D mín 2	13	530 ± 17	-3 ± 22	98,82	36

a curva de calibración para productos puros

b curva de calibración que además incluye las mezclas

Tabla 13: Datos estadísticos de las curvas de calibración para Bencilsulfonamida, composición CH₃CN: H₂O 53:47

BS					
Respuesta	n	$b \pm S_b$	$a \pm S_a$	r^2 (%)	$S_{x/y}$
Área 1 ^a	5	37084 ± 340	-990 ± 428	99,97	449
Altura 1	5	3496 ± 44	-7 ± 55	99,95	58
Área ¹ D máx 1	5	3456 ± 67	-82 ± 84	99,89	88
Área ¹ D mín 1	5	3276 ± 124	277 ± 156	99,57	163
Altura ¹ D máx 1	5	554 ± 3	-0.32 ± 4.47	99,99	5
Altura ¹ D mín 1	5	439 ± 8	11 ± 10	99,86	11
Área 2 ^b	11	40148 ± 2896	-1204 ± 4020	95,52	5686
Altura 2	11	3967 ± 349	-59 ± 485	93,47	686
Área ¹ D máx 2	7	2065 ± 1171	559 ± 1617	38,34	1867
Área ¹ D mín 2	11	3715 ± 374	298 ± 519	91,62	735
Altura ¹ D máx 2	7	381 ± 44	77 ± 199	58,23	230
Altura ¹ D mín 2	11	474 ± 26	7 ± 37	97,23	52

^a curva de calibración para productos puros

^b curva de calibración que además incluye las mezclas

Tabla 14: datos estadísticos de las curvas de calibración para Bencilsulfonamida, composición CH₃CN: H₂O 50:50

BS					
Respuesta	n	$b \pm S_b$	$a \pm S_a$	r^2 (%)	$S_{x/y}$
Area 1 ^a	5	35852 ± 580	505 ± 730	99,92	764
Altura 1	5	3222 ± 53	51 ± 67	99,92	70
Área ¹ D máx 1	5	3148 ± 59	67 ± 74	99,89	78
Área ¹ D mín 1	5	3147 ± 71	-4 ± 90	99,84	94
Altura ¹ D máx 1	5	502 ± 6	8 ± 8	99,95	8
Altura ¹ D mín 1	5	384 ± 2	6 ± 2	99,99	2
Area 2 ^b	13	38476 ± 1478	-89 ± 1945	98,40	3097
Altura 2	13	3277 ± 87	96 ± 114	99,23	182
Area ¹ D máx 2	11	1916 ± 678	290 ± 942	46,39	1332
Área ¹ D mín 2	13	2976 ± 147	322 ± 193	93,37	308
Altura ¹ D máx 2	11	376 ± 70	29 ± 97	76,24	137
Altura ¹ D mín 2	13	371 ± 9	25 ± 12	99,30	19

^a curva de calibración para productos puros

^b curva de calibración que además incluye las mezclas

Tabla 15: datos estadísticos de las curvas de calibración para Bencilsulfonamida, composición CH₃CN: H₂O 45:55

BS					
Respuesta	n	$b \pm S_b$	$a \pm S_a$	r^2 (%)	$S_{x/y}$
Area 1 ^a	5	36268 ± 325	394 ± 409	99,98	429
Altura 1	5	2886 ± 39	14 ± 49	99,94	51
Área ¹ D máx 1	5	2622 ± 86	349 ± 108	99,68	113
Área ¹ D mín 1	5	3068 ± 109	-452 ± 137	99,62	144
Altura ¹ D máx 1	5	401 ± 10	31 ± 12	99,81	13
Altura ¹ D mín 1	5	320 ± 10	-22 ± 13	99,68	14
Área 2 ^b	13	37483 ± 1678	1073 ± 2204	97,84	3509
Altura 2	13	2973 ± 115	17 ± 151	98,37	241
Area ¹ D máx 2	13	2724 ± 112	100 ± 147	98,17	234
Área ¹ D mín 2	13	2988 ± 111	-253 ± 146	98,49	233
Altura ¹ D máx 2	13	423 ± 16	7 ± 21	98,36	34
Altura ¹ D mín 2	13	319 ± 10	-14 ± 13	98,80	22

^a curva de calibración para productos puros

^b curva de calibración que además incluye las mezclas

Todas las calibraciones para los productos puros (modelo 1), para las tres composiciones de fase móvil, presentan un ajuste lineal, con altos valores de r^2 (>99,62 %), indicando que el modelo explica en un porcentaje alto la variabilidad en las respuestas en el intervalo de concentraciones estudiadas. Los parámetros estadísticos obtenidos, permiten señalar que todas las respuestas empleadas sirven con fines de calibración y por ello se usarán como referencia para la evaluación del segundo modelo de calibración, que incluye las mezclas de los compuestos con grado variable de solapamiento.

En dicho segundo modelo se busca incorporar a la calibración situaciones donde exista un grado de interferencia en las señales con el fin de corregir en alguna medida los errores al calcular las concentraciones de los productos en las muestras. Para PA, en la condición severa de solapamiento (53 % de CH_3CN , tabla 9) existen tres respuestas instrumentales cuyos parámetros estadísticos son inapropiados para fines de calibración: área, área ^1D mín y altura ^1D mín. Para el caso del área del cromatograma original el modelo explica solo un 96,94 % de la variabilidad y el error estándar de la regresión es mucho mayor que el establecido para el primer modelo de calibración en área. De igual forma ocurre en el cálculo de la pendiente y ordenada en el origen, donde los valores de error estándar prácticamente se cuadruplican. Para las respuestas en área ^1D mín y altura ^1D mín. los valores de r^2 alcanzan a 26,47 y 67,82 %, respectivamente, con elevados valores del error estándar de la regresión, pendiente y ordenada en el origen. Todo ello hace inviable el uso de estas respuestas con fines de calibración en presencia de interferencia. Sin embargo, en el mismo modelo, al emplear altura, área ^1D máx y altura ^1D máx. los parámetros estadísticos son muy similares a los correspondientes al modelo 1 de calibración. En una condición intermedia de solapamiento (50 % de CH_3CN , tabla

9) solo la calibración basada en el área 1D mín. presenta el menor grado de ajuste al modelo lineal ($r^2 = 77,93\%$). En el caso de área en el cromatograma original, aunque el ajuste lineal parece adecuado, existe una gran imprecisión en la estimación de los parámetros de la ecuación de regresión. El resto de las respuestas resultan apropiadas con fines de calibración.

Al analizar el segundo modelo para BS en la condición más severa de interferencia para todas las respuestas se obtuvo valores de r^2 mucho más bajos que los correspondientes al primer modelo de calibración, alcanzándose un valor de 38,34 % para el área 1D máx y un 58,23 % para la altura 1D máx. En todos los casos también se obtienen valores del error estándar de los parámetros de regresión mucho mayores. En la condición intermedia de solapamiento se produce una situación similar, aunque mucho menos severa. En este caso solo la medición de altura y altura 1D mín servirían con fines de calibración.

En el cromatograma derivado, en el primer pico positivo (1D máx) y el segundo negativo (1D mín) en el cromatograma derivado correspondientes a PA y BS (figura 4) las contribuciones de un analito sobre el otro son mínimas porque corresponden a la primera y última mitad del pico respectivo en el cromatograma original, por lo tanto son las señales menos interferidas. Las mitades restantes generan picos altamente interferidos, siendo la magnitud de esta interferencia proporcional al aumento del solapamiento en los picos, permitiendo explicar los resultados antes expuestos.

En la condición de leve solapamiento tanto para PA como BS al emplear el segundo modelo de calibración, se produce un leve descenso en todos los valores de r^2 los que se mantienen en torno al 98-99 %, con pequeños cambios en los parámetros estadísticos de

la pendiente y ordenada en el origen, siendo más afectados los valores de área del cromatograma original. Este caso será discutido con mayor énfasis al evaluar los errores de predicción de los diferentes modelos de calibración.

En los diversos modelos se observa que las pendientes de las curvas de calibración de las áreas son mayores que las alturas, alcanzando éstas últimas un 10 % como máximo de las primeras, independientemente si provienen del cromatograma original o del derivado. Los cambios en la magnitud de las pendientes (sean éstos aumentos o disminuciones) entre los modelos 1 y 2 indicarán las posibles interferencias entre los productos de degradación en las respuestas y como se observó estas tendrán una mayor magnitud cuando el solapamiento es severo. En esta situación se observan los cambios más significativos en las pendientes correspondientes al modelo 2 con respecto al modelo 1 para BS; para PA sólo se observan disminuciones en el área 1D mín y altura 1D mín. La pérdida de la pureza espectral en los productos de degradación producidos por el solapamiento de los picos provocan una sobre estimación en las respuestas de BS y una subestimación en las respuestas de PA sólo en área 1D mín y altura 1D mín.

La habilidad de predicción de un modelo de calibración no está necesariamente relacionada con la bondad de sus parámetros estadísticos (r^2 , pendiente, etc.), por esta razón este parámetro fue evaluado calculando los errores en las calibraciones a través de las expresiones estadísticas $rmsecv$ y $rmsep$ (Verdú-Andrés y col., 2001), previamente definidos por el uso de las ecuaciones 10 y 11 respectivamente. Los resultados de éste estudio son resumidos en las tablas 16, 17 y 18. Los valores de $rmsep$, en general, son mayores que los de $rmsecv$, el primero considera un set de datos para el modelo de calibración (compuestos puros) y un set distinto para la predicción de errores (mezclas)

siendo ésta una situación mas realista, en cambio en el segundo, la calibración y predicción son realizadas con el mismo set de datos. Ambos índices de predicción de errores para las distintos modelos de calibración, siguen las mismas tendencias en todas las composiciones, salvo para BS en 53 y 50 % de CH₃CN en área ¹D máx y para PA en 53 % de CH₃CN en área ¹D mín.

El uso de los modelos 1 y 2 permitió cumplir con objetivos diferentes, en el primer caso fue posible evaluar con mayor rigor la interferencia producida por el solapamiento de los picos, teniendo en cuenta que la calibración se hace sobre la base de un conjunto de soluciones de analito puras. Por ello los errores de predicción resultan elevados (rmsep). En el segundo modelo de calibración, al incluir tanto el conjunto de soluciones de analito puras, como formando mezclas con el interferente en distintas concentraciones y proporciones se busca atenuar los errores de calibración. Por ello los errores de predicción resultan menores (rmsecv).

En la condición más severa de solapamiento el mejor valor en las predicción de error para BS está en la altura ¹D mín (rmsep = 0,201 µg mL⁻¹). Para PA hay tres respuestas con buenos valores de predicción: altura, altura ¹D máx y área ¹D máx (rmsep = 0,025; 0,032 y 0,021 µg mL⁻¹). Grandes errores de predicción se producen para BS en el máximo del cromatograma derivado (área y altura), en cambio para PA, ello se produce en el mínimo (área y altura). En la condición intermedia los valores son mucho menores en todos los casos, sin embargo, para BS persisten significativos errores de predicción en el máximo del cromatograma derivado. Esta situación se da para PA, solo en el área ¹D mín. De acuerdo a este análisis y a los resultados anteriormente descritos, es posible

descartar de plano como señales útiles con fines de calibración aquellas que provienen del máximo para BS y del mínimo para PA en el cromatograma derivado.

Tabla 16: Errores de predicciones para ambos analitos en la composición CH₃CN:H₂O 53:47

Respuesta	BS		PA	
	rmsecv ^a µg mL ⁻¹	rmsep µg mL ⁻¹	rmsecv µg mL ⁻¹	rmsep µg mL ⁻¹
Área	171	238	111	166
Altura	197	335	19	25
Área ¹ D máx	1480	1131	19	21
Área ¹ D mín	222	357	2219	1121
Altura ¹ D máx.	843	875	24	32
Altura ¹ D mín	124	201	596	632

^a valores de rmsecv y rmsep multiplicados por 10³

Tabla 17: Errores de predicciones para ambos analitos en la composición CH₃CN:H₂O 50:50

Respuesta	BS		PA	
	rmsecv ^a µg mL ⁻¹	rmsep µg mL ⁻¹	rmsecv µg mL ⁻¹	rmsep µg mL ⁻¹
Área	92	144	48	67
Altura	62	78	18	26
Área ¹ D máx	896	831	30	36
Área ¹ D mín	115	130	397	495
Altura ¹ D máx	437	536	11	13
Altura ¹ D mín	58	64	24	31

^a valores de rmsecv y rmsep multiplicados por 10³

Tabla 18: Errores de predicciones para ambos analitos en la composición CH₃CN:H₂O 45:55

Respuesta	BS		PA	
	rmsecv ^a μg mL ⁻¹	rmsep μg mL ⁻¹	rmsecv μg mL ⁻¹	rmsep μg mL ⁻¹
Área	103	131	87	122
Altura	90	108	84	120
Área ¹ D máx	94	91	95	138
Área ¹ D mín	84	88	71	71
Altura ¹ D máx	92	101	90	128
Altura ¹ D mín	75	79	73	100

^a valores de rmsecv y rmsep multiplicados por 10³

Sí bien se observa que los valores de predicción de errores se homogeneizan cuando el solapamiento es leve ($\text{rmsep} \approx 0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$), no son los mejores, además se debe recordar que el parámetro estadístico r^2 estaba en torno al 98 % para ambos compuestos, en los dos modelos. Para analizar esta situación se deben considerar aspectos del comportamiento cromatográfico de los productos frente a la fase móvil. El cambio de composición de ésta se traduce en cambios en la absorptividad molar (ϵ) y en la eficiencia de la columna (N). En la tabla 19 se muestran los valores de N y ϵ para ambos compuestos. La absorptividad molar a 230 nm se incrementa frente a un aumento de la concentración de CH₃CN, siendo mayor para PA que para BS. Ello conduce, en términos generales, a que los errores que se producen en la calibración para PA sean menores, por la menor contribución que tienen las señales de BS, interfiriendo entonces en un menor grado. El valor de N también se incrementa, aumentando de esta forma la eficiencia de la columna, además los valores de N son mayores para PA que para BS. En

la figura 5 se observan los cromatogramas superpuestos para los productos de degradación puros en las distintas composiciones. Así, al disminuir la concentración de CH_3CN se produce un deterioro en la calidad de los datos cromatográficos especialmente cuando se consideran las áreas. Estos efectos también se ven en la anterior figura 4 (a). En ésta, la eficiencia en la separación cromatográfica se propaga a la primera derivada del cromatograma, observando que aun cuando haya una mejor separación de los compuestos al emplear una fase más polar, el cromatograma derivado presenta una menor definición, lo que impedirá realizar una buena integración de señales.

Tabla 19: Número de platos teóricos (N) y absortividad molar (ϵ) para los productos de degradación en las distintas composiciones

Composición $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$	N^a		$\epsilon^b \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$	
	PA	BS	PA	BS
53:47	2349	2090	899	805
50:50	2426	2050	837	736
45:55	2214	1717	760	667

a calculados para los productos de degradación puros a partir de la ecuación 3

b calculados para los productos de degradación puros a partir de la ecuación 6

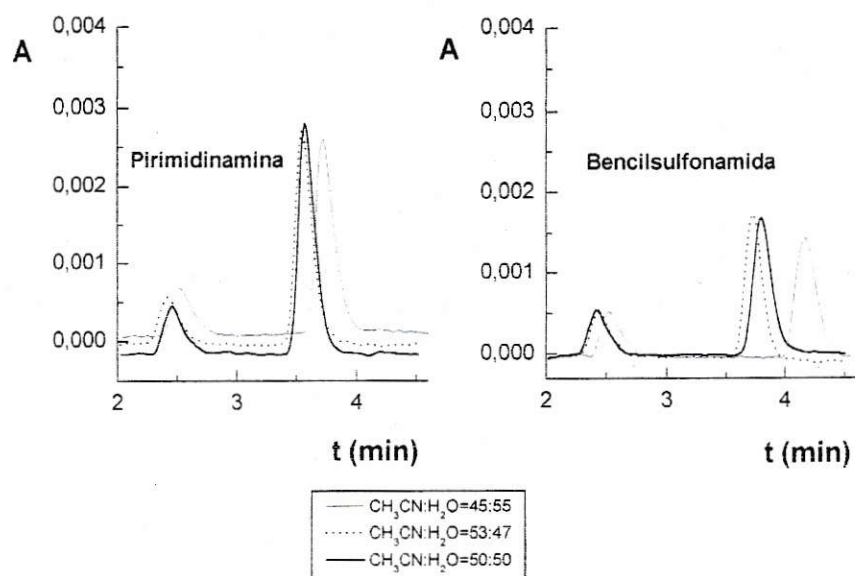


Figura 5: Cromatogramas originales de los compuestos puros en las tres composiciones de fase móvil

Con el fin de establecer de mejor forma la influencia de la interferencia en la predicción de los valores de concentración de ambos analitos conjuntamente se calcularon los excesos de calibración (EC) a partir de la ecuación 12. Las respuestas seleccionadas para calcular los EC fueron aquellas que presentaban los menores valores de rmsep, se empleó el modelo 1 de calibración, fundamentalmente porque éste da cuenta en forma exacta de los errores. Para PA éstos fueron área, altura, altura ¹D máx y área ¹D máx y para BS fueron área, altura, altura ¹D mín y área ¹D mín. Luego se formaron los pares de respuestas resultando cuatro de éstas por composición, ejemplos de ello son: área ¹D mín de PA y área ¹D máx de BS, área de PA y área de BS. Se calculó tanto el exceso de calibración agregado (ECa) como el exceso de calibración encontrado (ECe), interpolando en las correspondientes curvas de calibración las respuestas provenientes

de las mezclas. El exceso de calibración puede alcanzar valores positivos o negativos dependiendo de la proporción de PA:BS, esto tomando como referencia al primer compuesto eluído en la mezcla, luego, si la cantidad de PA>BS se obtienen EC positivos, si PA<BS se obtienen EC negativos y en torno a 0 cuando la relación es PA:BS es aproximadamente 1:1. Los EC agregados variaron entre -33 y 33% en el intervalo de relaciones PA:BS 2:1 y 1:2, respectivamente. Luego se graficó EC_a versus EC_e en cada una de las calibraciones ensayadas siendo posible observar cual de ellas presenta una mejor habilidad de predicción. Si ésta es buena, la recta de regresión tendrá ordenada en el origen cero y una pendiente y un coeficiente de correlación 1. Para comprobar la presencia de errores sistemáticos se puede emplear un test de significancia individual para la pendiente y la ordenada en el origen, considerando como hipótesis nula $H_0: \beta_1=1$ y $\beta_0=0$, respectivamente. Sin embargo, considerar éstas pruebas de hipótesis independientemente podría conllevar a conclusiones erróneas, debido a que no tienen en cuenta la fuerte correlación negativa que existe entre estos dos parámetros cuando han sido calculados por mínimos cuadrados, situación que ha sido descrita y discutida en la literatura. Para hacer la comparación considerando esta observación, se construye una región de confianza conjunta para la pendiente y la ordenada en el origen a un nivel de significancia α . Esta está descrita por una elipse ubicada en un plano, cuya ordenada corresponde a los valores de pendiente y la abscisa a los de la ordenada en el origen. Los límites de la elipse están determinados por la magnitud de los errores experimentales y el grado de confianza elegido. Se asume que el modelo de calibración está libre de errores sistemáticos si el punto $(\beta_1=1, \beta_0=0)$ yace dentro de los límites de la

elipse (Hunter, J. S., 1981). La aplicación de este test a un nivel de significancia $\alpha=0,05$ dejó en evidencia que cuando existe un solapamiento severo el punto (0,1) está fuera de la región de confianza para todos los modelos de calibración univariable estudiados detectándose importantes errores sistemáticos que afectan la exactitud, existiendo diferencias significativas entre las concentraciones agregadas y los valores teóricos esperados de ésta. En la situación intermedia sólo se detectaron errores sistemáticos en los modelos construidos con áreas y alturas provenientes del cromatograma original. En dicho caso los errores aleatorios resultaron de menor magnitud para la pendiente, ordenada en el origen y regresión, por lo que la región de confianza descrita por la elipse es más estrecha. En la condición de solapamiento leve todos los sistemas de calibración se encuentran en la región de confianza conjunta. En las tablas 20, 21 y 22 se resumen los datos estadísticos para el EC en cada una de las composiciones estudiadas. De este estudio se puede concluir en forma más exacta respecto de la influencia de la interferencia que ejerce la presencia de un compuesto en presencia del otro cuando se trabaja sobre la base de calibraciones con las respuestas individuales.

Tabla 20: Datos estadísticos para los excesos en las calibraciones de los productos de degradación. Composición $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ 53:47

Respuesta	$b \pm S_b$	$a \pm S_a$	r^2 (%)	S_{vy}
Áreas	$1,411 \pm 0,169$	$8,94 \pm 3,31$	94,56	6,5
Alturas	$0,747 \pm 0,029$	$12,04 \pm 0,56$	99,41	1,11
Áreas ¹ D	$0,756 \pm 0,063$	$11,66 \pm 1,23$	97,32	2,41
Alturas ¹ D	$0,842 \pm 0,052$	$7,56 \pm 1,02$	98,50	1,99

Tabla 21: Datos estadísticos para los excesos en las calibraciones de los productos de degradación. Composición CH₃CN:H₂O 50:50

Respuesta	$b \pm S_b$	$a \pm S_a$	r^2 (%)	$S_{x/y}$
Áreas	$1,077 \pm 0,025$	$7,16 \pm 0,60$	99,83	1,69
Alturas	$0,941 \pm 0,001$	$2,11 \pm 0,19$	99,96	0,53
Áreas ¹ D	$0,893 \pm 0,076$	$3,75 \pm 1,78$	95,88	5,04
Alturas ¹ D	$0,955 \pm 0,037$	$1,17 \pm 0,88$	99,10	2,48

Tabla 22: Datos estadísticos para los excesos en las calibraciones de los productos de degradación. Composición CH₃CN:H₂O 45:55

Respuesta	$b \pm S_b$	$a \pm S_a$	r^2 (%)	$S_{x/y}$
Áreas	$0,973 \pm 0,02$	$1,25 \pm 0,52$	99,69	1,47
Alturas	$0,989 \pm 0,02$	$-0,02 \pm 0,37$	99,85	1,05
Áreas ¹ D	$1,030 \pm 0,08$	$0,674 \pm 1,87$	96,55	5,30
Alturas ¹ D	$1,002 \pm 0,05$	$-0,064 \pm 1,13$	98,65	3,19

Aplicación de un modelo multivariado PCR

De todos los estudios de calibración realizados a partir del uso de modelos univariados se observó que las variables de respuesta empleadas individualmente no dan cuenta de la concentración real del analito cuando se encuentra en presencia del otro analito interferente, excepto para PA al usar la altura y la altura ¹D máx y área ¹D máx, cuando el grado de solapamiento es severo. Por otra parte, el empleo de la combinación en pares de las mejores respuestas para cada analito para la evaluación de errores (EC) permite señalar que no es posible la determinación cromatográfica conjunta de los dos analitos en solapamiento severo, en ausencia de errores sistemáticos. Teniendo en cuenta los

antecedentes logrados en las experiencias anteriores se procedió a aplicar el modelo multivariado de calibración PCR, en la condición más severa e intermedia de interferencia, ampliando el número de experimentos y ampliando la relación entre ambos analitos, con el fin de construir un mejor modelo de calibración y extender su posibilidad de aplicación a un mayor número de situaciones de grado de solapamiento.

En la tabla 23 se muestran los índices de separación de picos (R) para las mezclas de ambos productos en los cromatogramas.

Para PA el valor R varió entre 69-89 % y 31-71 %; para BS varió entre 28-86 % y 7-69 % en 53 y 50 % de CH_3CN , respectivamente. En la condición más severa se produjo una interferencia total en las mezclas 31 y 41 que corresponden a relaciones PA:BS 3:1 y 4:1.

Con el diseño experimental 5^2 ensayado en forma completa se volvieron a construir curvas de calibración univariadas siguiendo el criterio del modelo 1 de calibración (cada compuesto por separado), con ello se podría concluir acerca de la posibilidad de aplicar éstos en condiciones más extremas de combinación de concentraciones de los analitos. Sobre estas curvas, se interpolaron las respuestas obtenidas de los restantes puntos del diseño (mezclas) considerándose para PA las siguientes señales: área, altura, altura ^1D máx y área ^1D máx y para BS: área, altura, altura ^1D mín y área ^1D mín.

Las mismas respuestas fueron empleadas en la aplicación del modelo multivariado PCR conjuntamente, como variables dependientes. Las variables independientes correspondieron a las concentraciones de PA y BS; en este caso se construyó la matriz de calibración contemplando las concentraciones de las 16 mezclas. Tal matriz corresponde a un modelo de calibración que considera combinaciones lineales entre las

variables seleccionadas y un número definido de componentes principales, éstos fueron uno y dos componentes sugeridos por el programa estadístico The Unscrambler 8.0.

Una vez construidos los modelos éstos se compararon graficando la concentración agregada del analito versus la concentración encontrada en las dos composiciones de fase móvil, empleando las 16 mezclas para los modelos univariados como muestras y en el caso del modelo multivariado se emplearon las mismas que a su vez sirvieron para construir el modelo de calibración. Estos resultados se resumen en las tablas 24 y 25.

Tabla 23: Porcentaje de resolución de los productos de degradación en distintas composiciones de fase móvil

Experimento	53:47		50:50		PA: BS
	R PA %	R BS %	R PA %	R BS %	
14	32	69	69	86	1: 4
13	39	63	72	83	1: 3
12	45	53	75	78	1: 2
11	58	30	81	65	1: 1
24	46	54	73	77	1: 2
23	51	44	76	72	2: 3
22	61	36	79	64	1: 1
21	71	8	84	47	2: 1
34	53	40	78	70	3: 4
33	59	31	79	64	1: 1
32	66	18	82	54	3: 2
31	*	*	86	29	3: 1
44	57	30	80	65	1: 1
43	66	24	82	59	4: 3
42	71	7	85	48	2: 1
41	*	*	89	28	4:1

* Señales totalmente solapadas

Tabla 24: Datos estadísticos para las distintos modelos en la composición CH₃CN:H₂O 53:47

Respuesta	PA			BS		
	b	a	r ²	b	a	r ²
Área	1,0496	-0,0725	0,9954	1,0558	-0,0201	0,9937
Altura	1,0208	-0,0133	0,9996	1,0074	0,0749	0,9966
Área ¹ D ^a	1,0362	-0,0303	0,9974	0,9584	0,1585	0,9838
Altura ¹ D ^b	1,0362	-0,0462	0,9992	0,9864	0,0893	0,9951
PCR 1 ^c	0,9987	0,0018	0,9988	0,9953	0,0073	0,9952
PCR 2 ^d	0,9985	0,003	0,9977	0,9953	0,0054	0,9925

a corresponde Área ¹D máxima para PA y Área ¹D mínima para BS

b corresponde Altura ¹D máxima para PA y Altura ¹D mínimo para BS

c PCR construido con un componente principal

d PCR construido con dos componentes principales

Tabla 25: Datos estadísticos para las distintas modelos en la composición CH₃CN:H₂O 50:50

Respuesta	PA			BS		
	b	a	r ²	b	a	r ²
Área	1,01	-0,0427	0,9988	1,0299	0,0305	0,9987
Altura	1,0175	-0,0182	0,9995	1,0009	0,0302	0,9994
Área ¹ D ^a	0,9617	0,0436	0,9959	1,0265	-0,0113	0,9846
Altura ¹ D ^b	1,0244	-0,0296	0,9988	1,0072	0,0045	0,9964
PCR 1 ^c	0,9991	0,0013	0,9992	0,9989	0,0016	0,999
PCR 2 ^d	1,0002	0,001	0,9987	0,9984	0,001	0,9982

a corresponde Área ¹D máxima para PA y Área ¹D mínima para BS

b corresponde Altura ¹D máxima para PA y Altura ¹D mínimo para BS

c PCR construido con un componente principal

d PCR construido con dos componentes principales

Para todas las respuestas ensayadas se obtienen coeficientes de determinación (r²)

>0,9954 y >0,9925 para PA y BS respectivamente, éstos valores son superiores en la

condición de solapamiento intermedia, indicando que existe una alta relación entre los valores agregados y los teóricos calculados a partir de las curvas de calibración individuales. La inspección de éstos resultados deja también en evidencia la bondad de los modelos *PCR*, para los que se presentan los valores de pendiente y ordenada en el origen más cercanos a 1 y 0, respectivamente. El modelo con dos componentes principales no produce mejores resultados; puesto que no todos los componentes principales contienen la misma información y los primeros son los que describen la mayor variación en los datos, que se asocia a la información mas relevante, mientras que los últimos describen variaciones en los datos que pueden ser debidas a ruido o error experimental, o a un sobre-ajuste del modelo y pueden ser descartados (Blanco y col., 1994).

Para los distintos modelos de calibración se calcularon los valores de predicción de errores *rmsep* y para ello se utilizó la matriz de validación. Esta consistía en cinco mezclas que no correspondían a ningún punto del diseño pero estaban comprendidas entre los límites de éste (tabla 26).

De los errores de predicción para los modelos univariables observamos que para las áreas y alturas los valores de *rmsep* aumentan al doble al aumentar el solapamiento en ambos productos de degradación, las restantes respuestas no presentan una tendencia definida y deben ser analizadas para cada analito y composición en particular; es así como para PA las repuestas provenientes del cromatograma derivado presentan *rmsep* pequeños ($rmsep=0,014 \mu\text{g mL}^{-1}$ altura ¹D máximo, $rmsep= 0,029 \mu\text{g mL}^{-1}$ área ¹D máxima) e inferiores a las respuestas no derivadas ($rmsep=0,058 \mu\text{g mL}^{-1}$ área, $rmsep=$

0,051 $\mu\text{g mL}^{-1}$ altura) cuando el solapamiento entre los picos es severo, en cambio cuando el solapamiento es menor, las diferencias en los errores rmsep tanto de las repuestas originales y las derivadas se homogeneizan (rmsep en torno a 0,03 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Para BS los errores rmsep siguen las mismas tendencias para las repuestas originales y derivadas siendo éstas últimas inferiores, pero superiores a las obtenidas para PA en todas las composiciones estudiadas.

Con respecto al modelo PCR 1, para PA los valores de predicción de errores son 0,027 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y para BS 0,028 $\mu\text{g mL}^{-1}$ en la condición intermedia de solapamiento. En la condición más severa, como era de esperar, los errores de predicción aumentan para BS (rmsep=0,047 $\mu\text{g mL}^{-1}$), pero éste aumento es significativamente inferior a los observados en las restantes modelos de calibración. Para PA la tendencia es la opuesta.

Tabla 26: errores de predicción rmsep para ambos analitos en la matriz de validación

Respuesta	50:50		53:47	
	CH ₃ CN:H ₂ O		CH ₃ CN:H ₂ O	
	PA ^a	BS ^a	PA ^a	BS ^a
Area	25	64	58	138
Altura	24	39	51	91
Area ¹ D ^b	30	113	29	75
Altura ¹ D ^c	37	40	14	58
PCR 1	27	28	24	47

a valores de rmsep $\times 10^{-3} \mu\text{g mL}^{-1}$

b corresponde área ¹D máx para PA y área ¹D mín para BS

c corresponde altura ¹D máx para PA y altura ¹D mín para BS

También fueron calculados los excesos para los distintos modelos de calibración ensayados en el diseño experimental 5² y se les aplicó el test conjunto de la pendiente y la ordenada en el origen ($\alpha=0,05$). Cuando existe un solapamiento severo el punto (0,1)

está fuera de la región de confianza para todos los modelos de calibración concordando con los resultados encontrados en los estudios anteriores, en cambio en los modelos de calibración multivariados (*PCR 1* y *PCR 2*) el punto (0,1) se encuentra dentro de la región de confianza. Cuando el solapamiento es intermedio no se detectaron errores sistemáticos. En las tablas 27 y 28 se observan los parámetros estadísticos de los excesos para las distintas metodologías de calibración. En la figura 6 se observan los gráficos de los excesos y un “zoom” en torno al punto (0,0) en la condición más severa de solapamiento, para las áreas, áreas derivadas y para el modelo multivariado *PCR 1*. En estos gráficos se observa que existen desplazamientos en el sentido negativo de la curva de ajuste de los excesos experimentales (E_{Ca} , exceso de calibración agregado versus E_{Ce} , exceso de calibración encontrado, curva de color azul) con respecto de la curva de ajuste de los excesos teóricos de pendiente 1 y ordenada en el origen 0 (curva de color naranja) para ambos modelos univariados; para el modelo construido con áreas, el desplazamiento a lo largo de la curva de ajuste experimental, es mayor según aumenta la cantidad de BS en la mezcla, indicando que la cantidad estimada por dicho modelo es menor a la agregada en la mezcla, con lo que se obtiene un exceso de calibración también menor al esperado (esto se observa en el primer cuadrante del plano cartesiano) y desplazamientos de todos los puntos en torno a (0,0) en el mismo sentido. En cambio para el modelo del área derivada, esta tendencia es opuesta, pero con desplazamientos en torno a (0,0) mucho mayores y con una menor precisión en el cálculo de la curva de ajuste. Para el modelo *PCR 1* no se observan diferencias significativas entre la curva de ajuste experimental y la teórica de exceso, además con mínimos desplazamientos en

torno al punto (0,0), concordando de esta manera con los resultados del test conjunto de pendiente y ordenada en el origen.

Tabla 27: Datos estadísticos para los excesos en las calibraciones de los productos de degradación. Composición CH₃CN:H₂O 50:50

Respuesta	b ± S_b	a ± S_a	r² (%)	S_{x/y}
Área	1,01 ± 0,01	-3,67 ± 0,29	99,89	1,18
Altura	0,98 ± 0,01	-1,10 ± 0,16	99,97	0,65
Áreas ¹D	0,96 ± 0,03	-0,74 ± 0,98	98,71	3,91
Alturas ¹D	0,99 ± 0,01	-0,54 ± 0,29	99,89	1,17
PCR 1	1,00 ± 0,01	0,05 ± 0,29	99,90	1,15
PCR 2	1,00 ± 0,01	0,15 ± 0,38	99,82	1,52

Tabla 28: Datos estadísticos para los excesos en las calibraciones de los productos de degradación. Composición CH₃CN:H₂O 53:47

Respuesta	b ± S_b	a ± S_a	r² (%)	S_{x/y}
Área	1,09 ± 0,02	-1,66 ± 0,06	99,60	2,06
Altura	0,95 ± 0,01	-3,00 ± 0,19	99,95	0,66
Alturas ¹D	0,97 ± 0,02	-3,08 ± 0,61	99,45	2,15
Alturas ¹D	0,97 ± 0,02	-3,08 ± 0,61	99,54	2,15
PCR 1	0,99 ± 0,02	-0,13 ± 0,55	99,58	1,94
PCR 2	0,99 ± 0,02	-0,08 ± 0,69	99,32	2,46

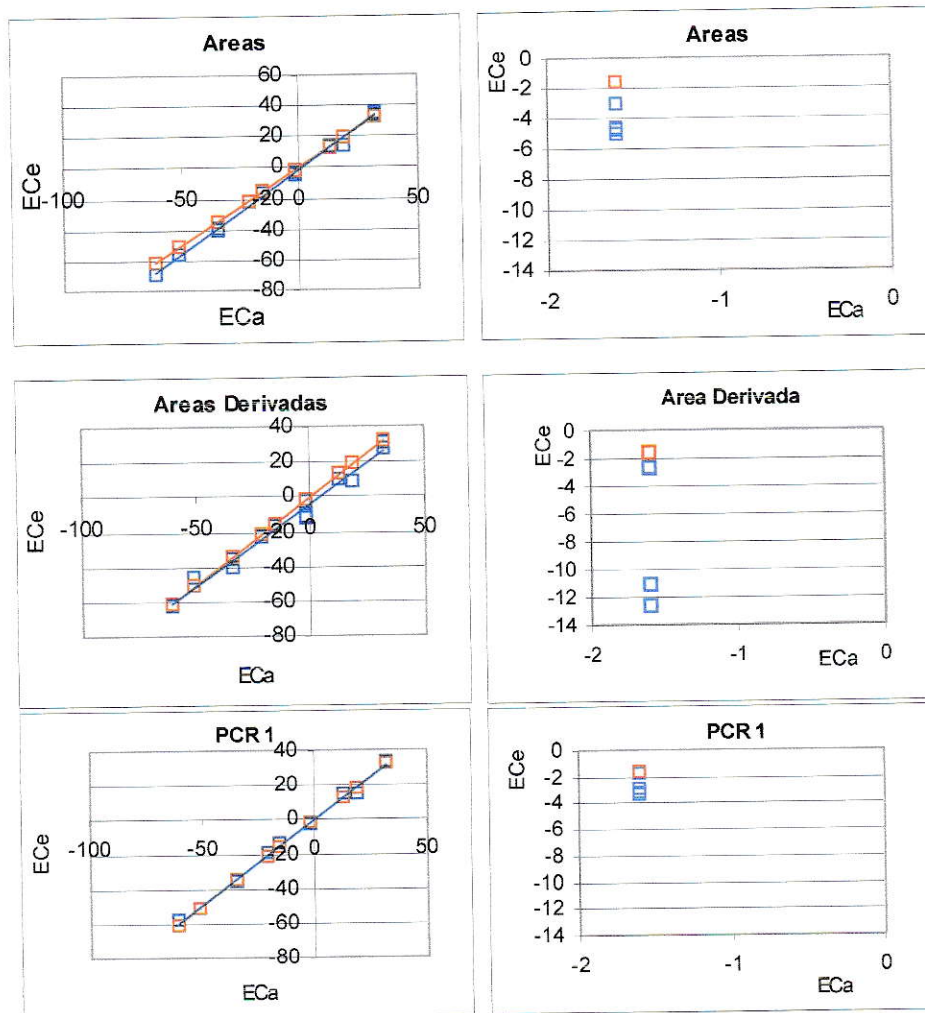


Figura 6: Gráficos de excesos para las respuestas instrumentales: áreas, áreas derivadas en los modelos univariantes 1 y el modelo *PCR 1*, la curva azul representa los EC experimentales y la curva naranja los EC teóricos, cada gráfico con un aumento en torno al punto (0,0). En la condición más severa de solapamiento

3.3 Parámetros de calidad analítica para la separación en gradiente de MBS, PA y BS

Para los estudios posteriores de los métodos de extracción se optó por emplear una columna Zorbax SB-C₈, 80 °A, 4,6 x 150 mm, tamaño de partícula 5 mm por su estabilidad frente a pH extremos, sus especificaciones en relación con la posibilidad de separar con gran eficiencia compuestos de carácter básico, como es el caso de PA, y lograr la separación de los tres compuestos en corto tiempo. La separación cromatográfica obtenida por medio de elución en gradiente entregó una metodología analítica selectiva para MBS y sus productos de degradación, estando ausentes las interferencias debidas a otras especies contenidas en la matriz de la muestra, siendo el tiempo de análisis de cada una de las muestra de diez minutos (incluyendo el tiempo de estabilización para la siguiente inyección). Los tiempos de retención para PA, BS y MBS fueron 1,76; 2,74 y 6,61 minutos, respectivamente. En la Figura 7, se muestran los cromatogramas obtenidos a 234,9 y 264,9 nm, correspondientes a los máximos de MBS y PA. El máximo de BS es 234,9 nm, optándose por la elección del máximo de MBS para la obtención de la mejor sensibilidad.

Los parámetros de calidad analítica se observan en las tablas 29, 30 y 31 para PA, BS y MBS, respectivamente. La cuantificación de PA y MBS es posible a las dos longitudes de onda, 234,9 nm y 264,9 nm mientras que BS sólo es cuantificable a 234,9 nm. Para PA a 234,9 nm los valores de LOD, LOQ y sensibilidad analítica son aproximadamente un tercio de los valores de éstos parámetros obtenidos a 264,9 nm; además la linealidad, el coeficiente de correlación y determinación son superiores en esta última longitud de

onda. En cambio para MBS los parámetros de calidad analítica son superiores a 234,9

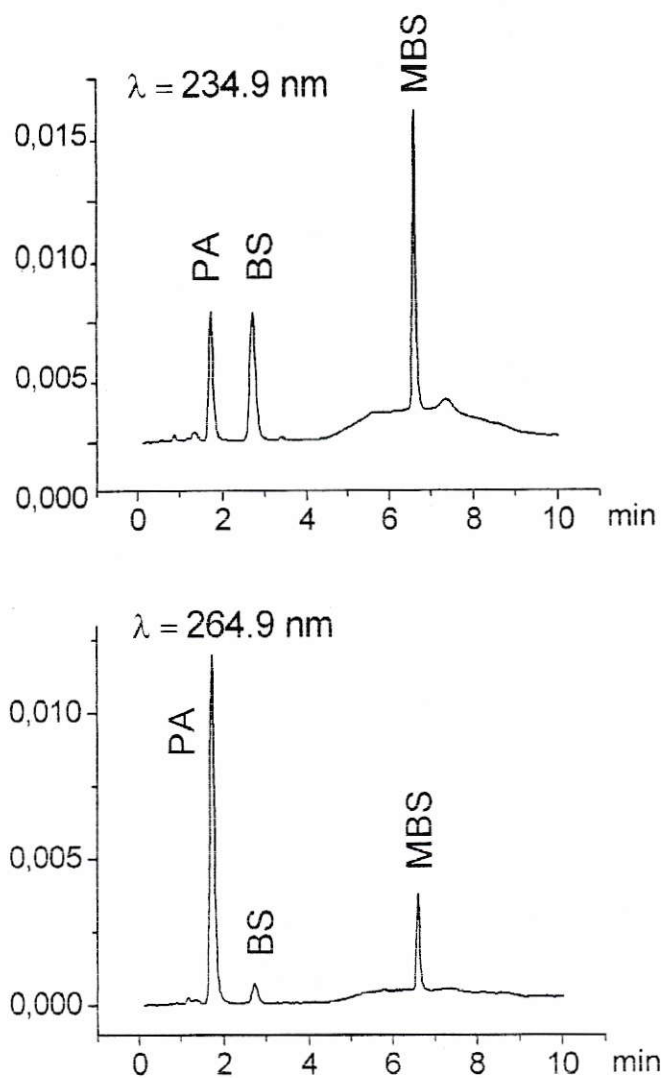


Figura 7: Separación de PA, BS y MBS por elución en gradiente (ver sección 2.2.5): $\lambda=234,9$ y $264,9 \text{ nm}$, todos los analitos al nivel de concentración de $2 \mu\text{g mL}^{-1}$. Eje de la ordenada corresponde al tiempo en minutos y el eje de la abcisa a la absorbancia en mUA

Para BS los parámetros de calidad analítica están en el orden de magnitud, pero levemente inferiores a los obtenidos para PA a $264,9 \text{ nm}$. En la figura 8, se observan las curvas de calibración en el intervalo de concentraciones $0-2 \mu\text{g mL}^{-1}$ y curvas de

calibración en el intervalo 0-0,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para cada uno de los analitos, en 234,9 y 264,9 nm. Del análisis de resultados es posible respuestas instrumentales lineales con r^2 superiores al 99,90 % en el intervalo de concentraciones estudiadas. Para los estudios posteriores en este trabajo se seleccionó como método de separación la elución en gradiente 8 ver secci y $\lambda = 234,9$ nm, pues permite detectar y cuantificar todos los analitos en cuestión con buenos parámetros de calidad analítica.

Tabla 29: Parámetros de calidad analítica para Pirimidinamina

Parámetro	PA	
	$\lambda=234,9$	$\lambda=264,9$
$b \pm S_b$ ($\mu\text{g}^{-1} \text{mL}$)	18370 \pm 97	40846 \pm 97
$a \pm S_a$	-868 \pm 99	-226 \pm 116
$S_{x/y}$	303	356
LOD ($\mu\text{g mL}^{-1}$) $\times 10^{-3}$	27,2	8,35
LOQ ($\mu\text{g mL}^{-1}$) $\times 10^{-3}$	90,6	27,8
r	0,9998	0,9999
r^2 (%)	99,96	99,98
s.a ($\mu\text{g mL}^{-1}$) $\times 10^{-3}$	9,78	3
Linealidad (%)	99,47	99,72

Tabla 30: Parámetros de calidad analítica para Bencilsulfonamida

Parámetro	BS
	$\lambda=234,9$
$b \pm S_b$ ($\mu\text{g}^{-1} \text{mL}$)	24536 ± 64
$a \pm S_a$	529 ± 63
$S_{x/y}$	192
LOD ($\mu\text{g mL}^{-1}$) $\times 10^{-3}$	7,05
LOQ ($\mu\text{g mL}^{-1}$) $\times 10^{-3}$	23,5
r	0,9999
r^2 (%)	99,98
s.a ($\mu\text{g mL}^{-1}$) $\times 10^{-3}$	2,54
Linealidad (%)	99,74

Tabla 31: Parámetros de calidad analítica para Metil bensulfuron

Parámetro	MBS	
	$\lambda=234,9$	$\lambda=264,9$
$b \pm S_b$ ($\mu\text{g}^{-1} \text{mL}$)	31483 ± 170	8229 ± 69
$a \pm S_a$	632 ± 180	141 ± 75
$S_{x/y}$	551	219
LOD ($\mu\text{g mL}^{-1}$) $\times 10^{-3}$	22,9	39
LOQ ($\mu\text{g mL}^{-1}$) $\times 10^{-3}$	76,5	130
r	0,9998	0,9995
r^2 (%)	99,96	99,90
s.a ($\mu\text{g mL}^{-1}$) $\times 10^{-3}$	8,26	14,1
Linealidad (%)	99,46	99,15

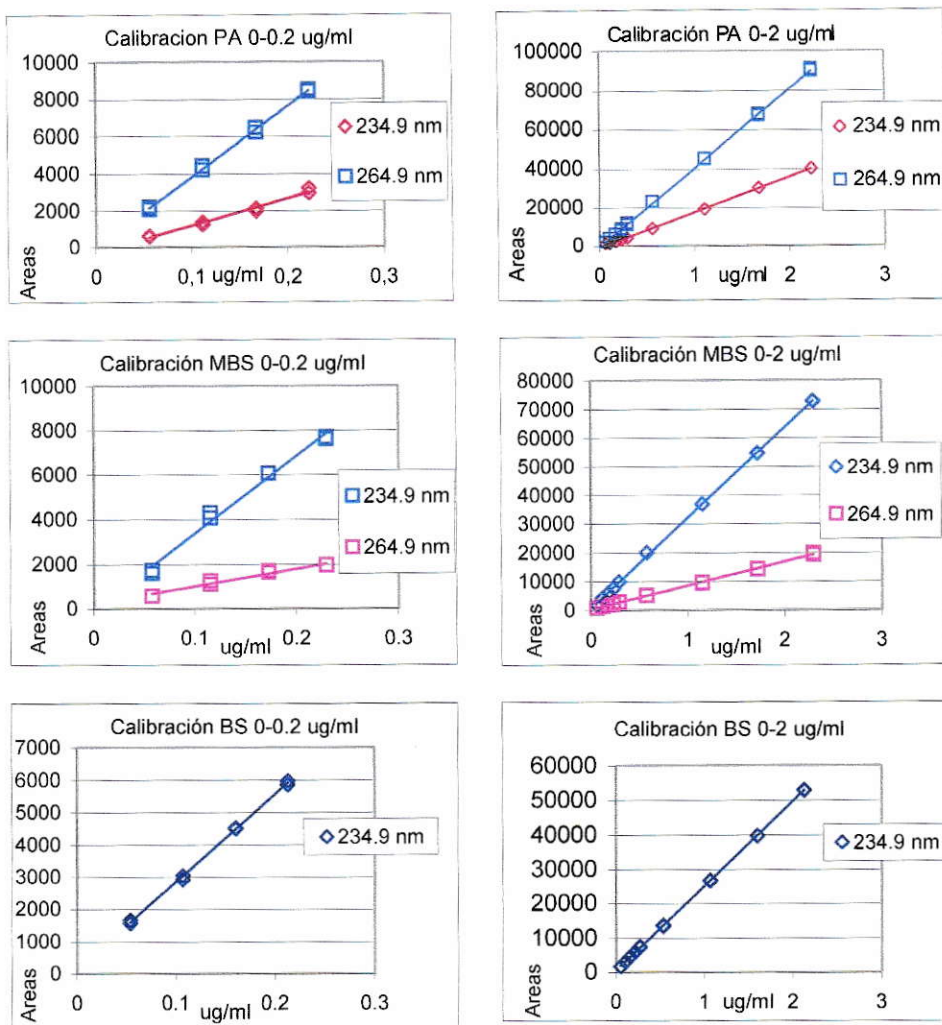


Figura 8: Curvas de calibración para PA, MBS a 234,9 y 264,9 nm y BS a 234,9 nm, en los rangos de 0-2 y 0-0,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para cada analito, respectivamente

3.4 Desarrollo de sistemas de extracción del MBS

Estudios preliminares. Isotermas de adsorción y comportamiento de hidrólisis

a) Isotermas de adsorción

Para los tres suelos estudiados se obtuvieron las isotermas de adsorción para MBS (Figura 9), éstas se ajustaron a la ecuación de Freundlich con valores de $r > 0,9943$. De los valores de K_f se deduce que la capacidad de adsorción sigue el orden TEM > QLT > PCR, coincidiendo con los valores de CIC y área superficial, siendo mayor la adsorción para el suelo alofánico (TEM) con un promedio de 8,8 % de MBS presente en la solución de equilibrio; para los otros suelos estas cantidades son superiores: QLT 28,9 % y PCR 55,3 %. En la tabla 32 se muestran los valores de K_f , $1/n$ y coeficientes de determinación, respectivamente.

Tabla 32: Constante de Freundlich (K_f y $1/n$), coeficientes de correlación (r), K_d y K_{OM} para la adsorción de MBS

Suelo	K_f $\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$	$1/n$	r	K_d $\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$	K_{OM} $\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$
PCR	2,23	1,12	0,9978	2,1	124
QLT	4,41	0,81	0,9991	5,24	138
TEM	24,7	0,99	0,9943	25,5	117

Las isotermas de adsorción obtenidas para los suelos TEM y PCR corresponden a isotermas tipo C según la clasificación de Giles y col. (Giles y col., 1960), con valores de $1/n$ cercanos a 1, para las que se asume un mecanismo de partición según el cual la molécula adsorbida es distribuida entre la fase interfacial y la solución en equilibrio sin un enlace específico entre el adsorbato y el adsorbente, la fracción de sitios libres de

adsorbente no decrece al aumentar la concentración de adsorbato, luego la cantidad adsorbida (x/m) y la concentración de equilibrio (C_{eq}) siguen una relación lineal. Para el suelo QLT se obtuvo una isoterma tipo L con una pendiente $1/n < 1$, este tipo de isoterma se caracteriza porque la pendiente de curva disminuye al aumentar la concentración; se asume que hay una saturación de los sitios de adsorción. Tal comportamiento de adsorción puede ser explicado por una alta afinidad del adsorbente por el adsorbato a bajas concentraciones, la cual disminuye cuando aumenta la concentración.

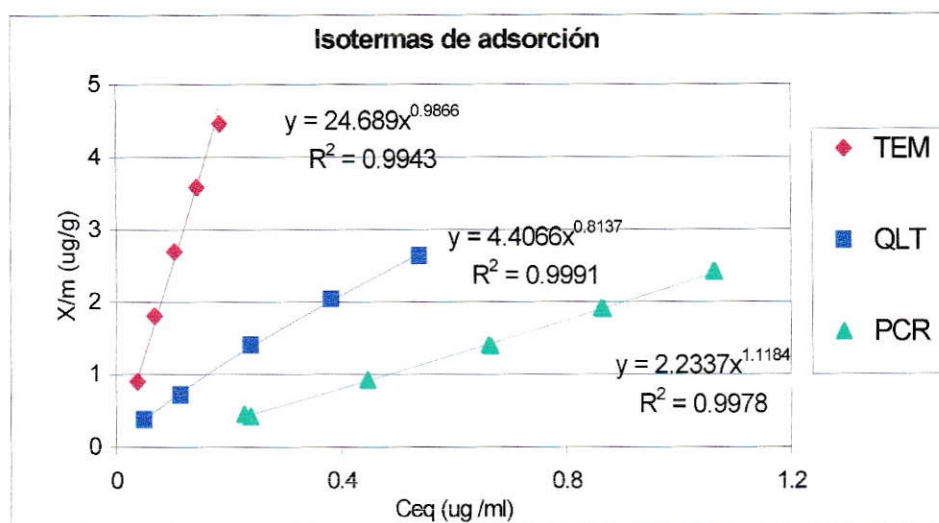


Figura 9: Isotermas de adsorción para los suelos PCR, QLT y TEM

K_f representa adsorción a bajas concentraciones de equilibrio del adsorbato ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$), y valores de $1/n < 1$ tienen un notable impacto en el coeficiente de distribución K_d ($K_d = C_s/C_e$) haciéndolo dependiente de la concentración de equilibrio y obteniéndose valores de éste cada vez menores al aumentar la concentración. Para el suelo QLT ($1/n = 0,81$) los valores de K_d fueron obtenidos como un promedio de la relación.

Para determinar la contribución del contenido de materia orgánica (MO) en el proceso de adsorción fueron obtenidos los valores de K_{OM} ($K_{OM}=K_d/\%MO \times 100$) para cada suelo. Los valores de K_{OM} obtenidos para el suelo TEM ($K_{OM}=117 \text{ cm}^3\text{g}^{-1}$) en comparación con los suelos PCR ($K_{OM}=124 \text{ cm}^3\text{g}^{-1}$) y QLT ($K_{OM}=138 \text{ cm}^3\text{g}^{-1}$) muestran que la contribución de la fracción orgánica al proceso de adsorción es alta en todos los suelos estudiados.

Las sulfonilureas son ácidos débiles ($pK_a=5,2$ para MBS) que exhiben una limitada afinidad por algunos minerales de carácter básico (como la caolinita, sílica gel y alúmina) y se ha descrito previamente una gran afinidad por superficies ácidas (como la bentonita) para clorsulfuron (Shea, 1986) y primisulfuron (Ukrainczyk y Ajwa, 1996). Cuando el pH de la solución del suelo sea mayor que el pK_a predominará la forma aniónica sobre la molecular, es el caso de los suelos QLT y PCR, la especie aniónica debiera ser repelida por las superficies del suelo cargadas negativamente, sin embargo de acuerdo a los datos obtenidos pareciera tener gran relevancia la adsorción del compuesto por la materia orgánica, fundamentalmente a través de puentes de H o fuerzas de van der Waals.

Tomando en consideración la baja solubilidad del MBS en agua 120 mg L^{-1} (pH 7, 25 °C), un tiempo de vida media en suelos de 15 días, una estabilidad de hidrólisis DT_{50} de 143 días (Roberts, 1998) y valores de K_{OC} ($K_{OM} \times 1,724$) >200 para los suelos en estudio, indican que el potencial de lixiviación (Cohen y col., 1984) será moderado para los suelos PCR y QLT y bajo para TEM.

b) Influencia de la temperatura y el pH sobre la hidrólisis de MBS en medio H_2O/CH_3CN

El objetivo de estos experimentos previos fue comprobar la posible degradación de MBS bajo condiciones similares a las que se presentarían en el estudio de los métodos de extracción. El efecto de la humedad de las muestras de suelos sobre las recuperaciones de diferentes clases de compuestos orgánicos mediante MASE ha sido descrito y por ello es un parámetro frecuentemente optimizado. Consecuentemente, la adición de agua a muestras de suelo previamente secadas, con el objetivo de normalizar el contenido de humedad, generará diferentes condiciones de pH, en función de las propiedades del suelo, lo que podría afectar el comportamiento de degradación del herbicida durante el proceso de extracción. Por otra parte es reconocido el hecho de que MBS es susceptible a la hidrólisis y ésta es dependiente del pH y la temperatura. Por ello se definieron las condiciones límites de tiempo, temperatura y pH que aseguraran la ausencia de degradación durante el proceso de extracción.

Los resultados de los experimentos tomando en consideración estos parámetros son mostrados en la tabla 33. A fin de obtener resultados comparables, ellos son expresados como porcentaje de recuperación con respecto a la señal de MBS en soluciones incubadas a pH 5, 25 °C y 5 minutos. Se obtuvieron buenas recuperaciones con valores >95 % a 25 y 50 °C, sin evidencia cromatográfica de degradación. A 75 °C, los valores son significativamente más bajos en todos los pH y particularmente a mayores tiempos de incubación (Figura 10). Esta tendencia es también observada en la temperatura mas alta de este estudio, sin embargo, la desaparición es mucho más intensa al considerar

éstas condiciones y deben considerarse para una apropiada extracción de MBS desde los suelos.

En la solución del suelo existen pH intermedios, de los cuales son representativos los valores 4,8 y 6,9; donde en general se producen las mejores recuperaciones. De acuerdo a los resultados se seleccionó la temperatura 60 °C, la que permitiría estudiar tiempos de extracción de hasta 10 minutos.

Tabla 33: Porcentajes de recuperación de MBS en soluciones acuosas-CH₃CN a varios pH y temperaturas

pH	25°C		50°C		75°C		90°C	
	5 min	10 min	5 min	10 min	5 min	10 min	5 min	10 min
3.1	97,3	97,2	97,2	95,9	84,7	71,6	52,7	38,2
4.8	100,0	99,7	97,5	96,6	94,3	76,8	76,1	35,5
6.9	99,0	98,5	96,4	95,7	94,8	81,5	66,3	34,3
9.4	98,5	97,2	98,1	96,6	91,9	90,5	47,1	42,2

Se han señalado aumentos de la reactividad de MBS con la disminución del pH para este herbicida. La constante de velocidad de hidrólisis obtenida a pH 4 y 40° C es 25 y 4,5 veces mas grande que a pH 7 y 10 a la misma temperatura, respectivamente (Berger y Wolf,1996). El efecto de la temperatura para la catálisis ácida también ha sido descrito, la constante de velocidad a 40 °C es 18 veces más grande que la obtenida a 22 °C. MBS es descrito como una sulfonilurea hidrolizable en el enlace sulfonilo como consecuencia de la carga positiva del carbono del grupo carbonílico. La figura 11 muestra cromatogramas obtenidos en los experimentos de hidrólisis en el tiempo de incubación de 10 minutos a 25 y 90 °C. En los análisis se obtuvo valores de pureza e igualación de espectros apropiados, dando picos espectralmente homogéneos para MBS

y sus productos de degradación (cuando son observados), a excepción de PA a pH 3,1, donde existe evidencia espectral de un compuesto coeluyente.

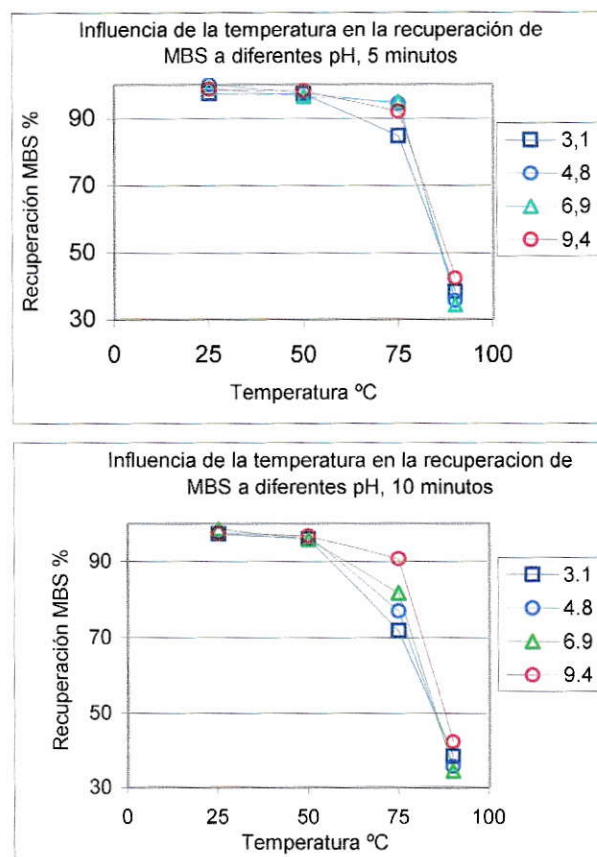


Figura 10: Efecto de la temperatura, tiempo y pH en la hidrólisis de MBS

En estas condiciones experimentales un vía de degradación más compleja es observada. La ruptura del enlace sulfonilurea seguido por una ciclación secundaria de la BS a [1H-2, 3-benzothiazin-4 (3H)-one 2,2-dioxide] ha sido descrita (Berger y Wolfe, 1996). La misma vía de degradación bajo condiciones ácidas y básicas ha sido observada para distintas sulfonilureas, formándose sacarina (Smith, 1993). La ruptura del anillo de PA

también ha sido señalada bajo condiciones ácidas de pH. A pH 9,4 y 90 °C se observó una gran disipación sin una significativa detección de los productos de degradación, probablemente ambos experimentan una descomposición consecutiva a ésta temperatura. La transformación de BS por ciclación es muy dependiente del pH, por ejemplo, casi inmediata a pH 10, ver anexo 1 (Sabadie, 1997).

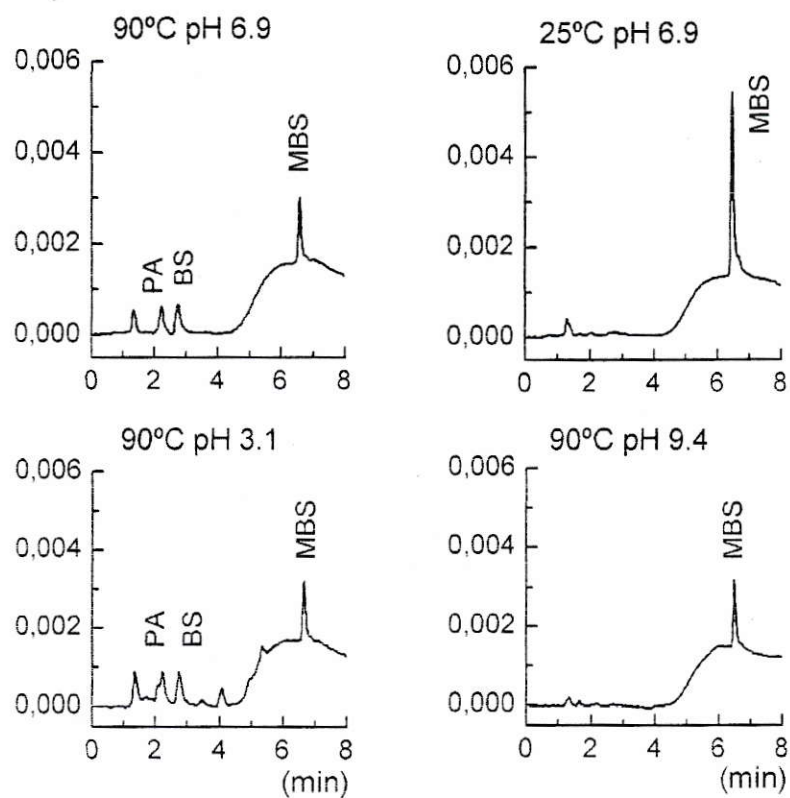


Figura 11: Cromatogramas obtenidos para la incubación a pHs 3,1; 6,9 y 9,4 y dos temperaturas 25 y 90°C. MBS=Metilbensulfuron, PA= Pirimidinamina; BS=Bencilsulfonamida Eje de la ordenada corresponde al tiempo en minutos y el eje de la abscisa a la absorbancia en mUA

1) Extracción de MBS por ultrasonido

- Optimización de parámetros

Screening factor

La tabla 34 muestra la matriz de respuesta para el diseño experimental screening factor y

la tabla 35 muestra los efectos de cada factor obtenidos del análisis estadístico ANOVA.

Tabla 34: Matriz de respuesta del diseño screening factor

Experimento	% Recuperación	Experimento	% Recuperación
1	79,32	17	79,64
2	81,63	18	81,36
3	85,91	19	73,71
4	80,79	20	86,31
5	83,6	21	76,32
6	88,71	22	88,97
7 ^a	84,18	23 ^a	83,29
8	81,63	24 ^a	72,79
9	80,15	25	80,32
10	81,25	26	67,06
11 ^a	87,13	27	76,24
12	80,46	28	85,8
13	78,33	29	78,94
14	84,06	30	80,02
15	76,02	31	82,00
16	85,76	32	77,73

^a valores en duplicado

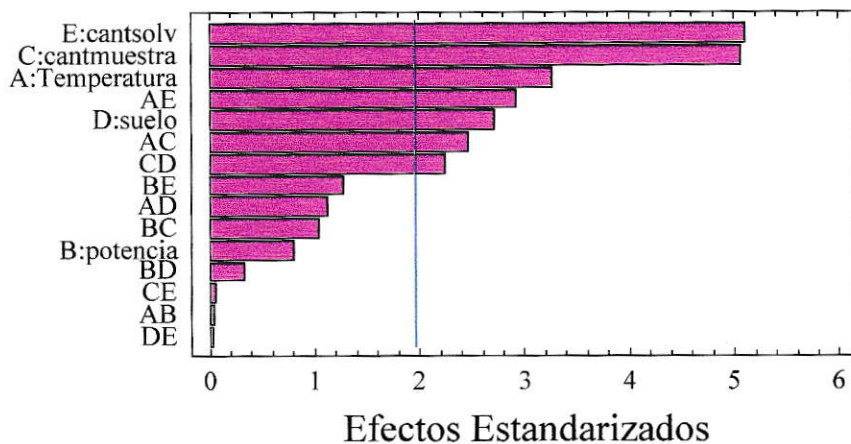
Los porcentajes de recuperación de MBS fluctuaron entre un 67,06 y un 88,97 % habiéndose estimado un error estándar a partir de los duplicados de un 2,43 %. Los resultados encontrados se analizaron por análisis de varianza (ANOVA) el que permitió describir el sistema mediante un modelo lineal de primer orden, tal modelo ajustado explica un 79,23 % de la variabilidad y entrega un máximo operacional de 88,31 % en la recuperación de MBS. A partir del análisis estadístico se obtienen los efectos estimados de cada factor y de las interacciones. Es posible advertir que los factores significativos fueron cuatro: cantidad de solvente (E), cantidad de muestra (C), temperatura (A) y tipo de suelo (D), además de tres interacciones: AC (temperatura–cantidad de muestra), AE (temperatura–cantidad de solvente) y CD (cantidad de muestra–tipo de suelo) a un nivel de significancia del 95 %. La significancia estadística de cada efecto se obtiene comparando los cuadrados medios contra un estimado del error experimental obteniendo los valores correspondientes de “p-value”. Cuando éstos son menores que 0,05 el efecto será significativo a un nivel de confianza de un 95 %. En este caso la hipótesis nula es que el efecto no es significativo y un menor valor de p-value es mejor evidencia en contra de dicha hipótesis. En la tabla 35 se observan los factores y las interacciones significativas obtenidas del análisis estadístico ANOVA y en la figura 12 en forma gráfica.

El factor cantidad de solvente fue muy significativo y su signo negativo indica que el uso de una menor cantidad induciría a una mayor recuperación de MBS, tal efecto puede ser consecuencia de un mejor aprovechamiento de la energía de ultrasonido. También fue muy significativo el factor cantidad de muestra, pero su signo fue positivo.

Tabla 35: Efectos de los factores obtenidos del análisis estadístico ANOVA y su significancia estadística

Factor	Efecto	p-value ($\alpha= 0.05$)	Significancia
Tipo de Suelo (D)	-2,3256	0,0068	Significativo
Temperatura (A)	-2,8031	0,0011	Significativo
Cantidad de Solvente (E)	-4,3719	0,0000	Significativo
Potencia (B)	-0,6844	0,4757	No Significativo
Cantidad de Muestra (C)	4,3394	0,0000	Significativo
AB	0,0294	0,9727	No Significativo
AC	2,1056	0,0143	Significativo
AD	0,9606	0,2635	No Significativo
AE	-2,4956	0,0037	Significativo
BC	0,8869	0,3019	No Significativo
BD	0,2744	0,7494	No Significativo
BE	1,0881	0,2053	No Significativo
CD	-1,9144	0,0259	Significativo
CE	0,0369	0,9658	No Significativo
DE	-0,0156	0,0817	No Significativo

Gráfico Estandarizado de Pareto



12: Efectos significativos para el diseño de screening factor

De acuerdo a los datos obtenidos se optó por emplear en las siguientes pruebas 5 mL de solvente. Respecto al suelo, se eligió aquel con mayor contenido de materia orgánica para tenerlo como base para una posible optimización, debido al posible efecto negativo de este factor sobre la recuperación, este comportamiento además es consecuente con la capacidad de adsorción de los suelos con mayor contenido de materia orgánica, demostrada en las experiencias de adsorción. Aunque la potencia no resultó un factor significativo, su efecto podría estar confundido y por ello se optó por estudiar un intervalo hacia los valores mayores; con respecto a las cantidades de muestra se estudiaron los valores 1, 2 y 3 g debido a la pequeña cantidad de solvente seleccionada.

Finalmente, para el caso de la temperatura, se buscó establecer en el sentido de las menores temperaturas, manteniendo como mínimo 40 °C. Así, el estudio basado en la metodología de superficie de respuesta tuvo como sentido principalmente el de confirmar efectos, reduciendo el número de factores en juego, empleando la matriz de mayor complejidad.

Metodología de superficie de respuesta

La tabla 36 muestra los factores y niveles codificados utilizados en el diseño de optimización. La tabla 37 muestra la matriz de diseño experimental aumentada con la matriz de las respuestas observadas.

Tabla 36: Metodología de superficie de respuesta. Factores y niveles

Factor	Símbolo	Nivel		
		-1	0	+1
Temperatura (°C)	C	40	50	60
Potencia	A	7	8	9
Cantidad de muestra (g)	B	1	2	3

La tabla 38 describe el análisis estadístico de la optimización instrumental mediante ANOVA. Para la construcción del modelo matemático del sistema y la obtención de los niveles óptimos, se deben considerar aquellos términos asociados a las interacciones de segundo orden y los términos cuadráticos que sean significativos para el modelo. El modelo lineal de segundo orden ajustado para obtener la superficie de respuesta estimada fue:

$$R = \beta_0 + \sum_{i=1}^n \beta_i \chi_i + \sum_{i=1}^n \beta_{ii} \chi_i^2 + \sum \sum \beta_{ij} \chi_i \chi_j + \varepsilon$$

Donde R es el % de recuperación de MBS, β_i son los parámetros del modelo de los factores individuales, β_{ii} son los parámetros de los términos cuadráticos, β_{ij} son los parámetros de los términos de las interacciones y ε es un término que representa otras fuentes de variabilidad, que incluyen efectos tales como mediciones de error en la respuesta, fuentes de variación inherentes al sistema (ruido de fondo), el efecto de otros factores no considerados, etc. El tratamiento estadístico de ε asume una distribución normal, con varianza σ^2 y media $\mu = 0$. El coeficiente de determinación mostró que el modelo explica un 57,98 % de la variabilidad en la respuesta. Para probar la idoneidad del modelo, se llevó a cabo el test de carencia de ajuste (Lack-of-fit) dando como resultado un p-value menor que el nivel de significancia elegido ($\alpha=0,05$), por lo tanto la ecuación estimada no explica satisfactoriamente los datos observados. Dado que en el ANOVA se incluyó el test de la carencia de ajuste haciendo más sensible el análisis, se pudo discriminar la contribución de cada factor en la variabilidad de los datos. De acuerdo a ello, resultaron significativos nuevamente, la cantidad de muestra y la temperatura en el mismo sentido descrito a través del diseño de screening factor. La potencia resultó no significativa.

El proceso de extracción asistido por energía de ultrasonido es básicamente un proceso exotérmico, por ello un aumento de la temperatura en el baño podría significar una barrera energética e impedir el fenómeno de cavitación que es el que finalmente induce la ruptura de estructuras y facilita el acceso del solvente de extracción, explicando de esa forma su efecto negativo. Por otra parte una temperatura externa mayor provocará una

mayor inclusión de vapor en la cavidad debido a la mayor presión de vapor lo que amortiguará la implosión bajando la temperatura del proceso.

Tabla 37: Metodología superficie de respuesta. Matriz de diseño y matriz de respuesta observada

Matriz de Diseño				Matriz de Respuesta
Experimento	A	B	C	% Recuperación
1	-1	-1	-1	86,95
2	-1	1	-1	82,55
3	-1	-1	1	84,65
4	-1	1	1	85,43
5	1	-1	-1	76,70
6	1	1	-1	79,92
7	1	-1	1	85,82
8	1	1	1	80,83
9	0	-1	0	86,09
10	0	1	0	89,23
11	0	0	-1	84,16
12	0	0	1	88,06
13	-1	0	0	87,61
14	1	0	0	85,44
15	0	0	0	84,25
16	0	0	0	86,27
17	0	0	0	83,69
18	0	0	0	85,78
19	0	0	0	82,67
20	0	0	0	85,96

Tabla 38: Metodología superficie de respuesta. Efectos de los factores obtenidos del análisis estadístico ANOVA

Factor	Efecto	p-value	Error Estimado
Temperatura (C)	-3,676	0,0103	Significativo
Potencia (A)	-0,430	0,6592	No Significativo
Cantidad de Muestra (B)	2,922	0,0245	Significativo
AA	0,045	0,9807	No Significativo
AB	-0,7325	0,5073	No Significativo
AC	0,4875	0,6548	No Significativo
BB	-3,0554	0,1413	No Significativo
BC	2,2385	0,0675	No Significativo
CC	-2,2254	0,2595	No Significativo
Lack of fit		0,0406	Significativo

En las figuras 13 y 14 se observan las superficies de respuesta obtenidas para la recuperación en función de: la potencia-cantidad de muestra y temperatura-cantidad de muestra, respectivamente. En ambos casos se observa la influencia de la cantidad de muestra; por otra parte la respuesta independiente respecto de la potencia y la dependencia negativa respecto a la temperatura.

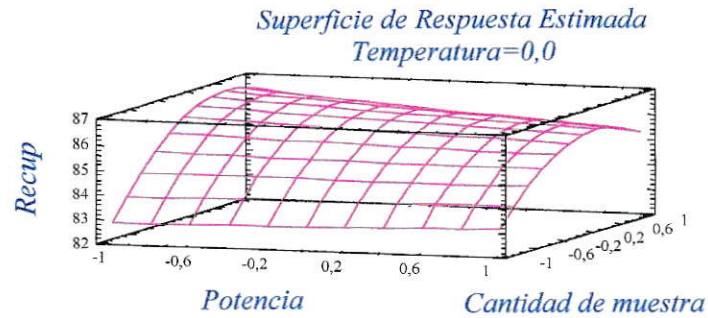


Figura 13: Superficie de respuesta: Recuperación v/s Potencia-Cantidad de Muestra

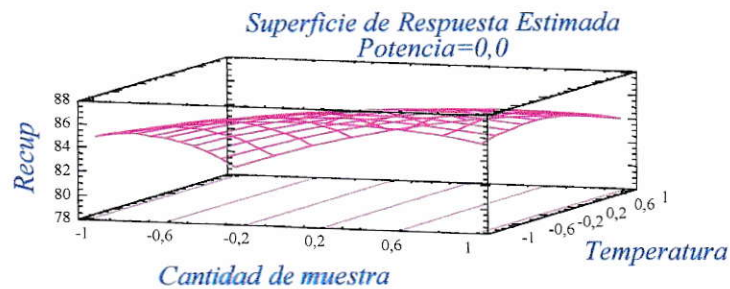


Figura 14: Superficie de respuesta: Recuperación v/s Temperatura-Cantidad de Muestra

Al observar los gráficos podemos advertir que no se aprecia un máximo bien definido, Es importante advertir que se ha reducido la región operacional del sistema, es decir aquella en la cual el método de extracción y los procesos fisicoquímicos son teóricamente posibles de experimentar y obtener una respuesta observable, a una región de interés. Esta última quedó definida a partir de los resultados del estudio de screening factor. Por lo anterior el punto estacionario (óptimo) podría representar un máximo local y no un máximo global.

- **Estudio de la influencia de factores propios de la matriz**

Debido a que los óptimos operacionales alcanzados no superaron en promedio un 84 % se consideró continuar el estudio considerando factores propios de los equilibrios existentes en el proceso de adsorción. De acuerdo a los resultados anteriores se prosiguieron las experiencias empleando 3 g de muestra, 5 mL de solvente, la potencia 9 y 60 °C, dado que al utilizar mayor cantidad de muestra el efecto de la temperatura es menor.

Influencia de un segundo paso de extracción

Los resultados de los experimentos obtenidos expresados como porcentaje de recuperación de MBS, para los dos suelos con mayor y menor contenido de MO para la primera y segunda extracción se muestran en la tabla 39.

Tabla 39: Porcentaje de recuperación del MBS para la primera y segunda extracción

Suelo	Primera extracción ^a (%) recuperación de MBS	Segunda extracción ^a (%) recuperación de MBS
TEM	89,85	7,71
PCR	92,18	8,33

^a promedio de duplicados

Los resultados obtenidos muestran que una primera etapa de extracción es capaz de recuperar un 89,85 % de MBS desde el suelo TEM, éste presenta una gran capacidad de adsorción ($K_f=24,7 \text{ cm}^3\text{g}^{-1}$) con un 91,24 % del herbicida presente en el sólido (calculado a partir de los coeficientes de la correspondiente isoterma), una segunda etapa recupera un 7,71 %, indicando que el reemplazo del extractante permite que el equilibrio entre la cantidad adsorbida en el sólido se favorezca en el sentido de la desorción del

MBS. Para el suelo PCR la tendencia es la misma, alcanzándose el 100% de recuperación, siendo esperable debido a su menor capacidad de adsorción ($K_f=2,23 \text{ cm}^3\text{g}^{-1}$) y con un porcentaje en el sólido de sólo un 44,72 % de la cantidad inicial. Luego se observa que, a pesar de las diferentes capacidades de adsorción de los suelos estudiados, es necesaria una segunda extracción para recuperar en forma total el herbicida.

Influencia de la presencia de agua y de la relación suelo:agua

Todos los estudios anteriores se realizaron por contaminación directa del suelo en los propios tubos de extracción, con soluciones acuosas, manteniendo siempre una relación suelo:agua 1:1 (p/v). Sin embargo ello, no constituye una situación real para el análisis de muestras contaminadas, las que normalmente serán secadas para su conservación. Sobre la base de estas consideraciones y teniendo en cuenta información de la literatura para otros contaminantes y de la propia experiencia del laboratorio en otras técnicas de extracción (Báez y col., 2003), se procedió a estudiar el efecto de este parámetro en la extracción por ultrasonido.

Los resultados de los factores estudiados son mostrados en la tabla 40. Cuando la extracción se realiza sin la presencia de agua la recuperación de MBS es escasa, un 4,43 % cuando se utiliza 1 g de muestra, si se adicionan 0,5 y 1 mL la recuperación aumenta a un 77,2 % y 93,9 %, respectivamente. Este comportamiento también es observable cuando las cantidades de muestra son mayores.

Lo anterior se puede explicar en función de la incorporación de agua en las estructuras laminares de los filosilicatos de las arcillas o en la propia materia orgánica, formando parte del agua estructural del suelo y permitiendo un mejor acceso del solvente de

extracción hacia los sitios de adsorción. Por otra parte también es posible favorecer el fenómeno de cavitación provocado por el ultrasonido con la presencia de agua interactuando en la superficie del suelo. Se describe este efecto en función de una distorsión de la cavidad provocada por el campo del ultrasonido, produciéndose una marcada asimetría, lo que a su vez provocaría un jet (chorro) de líquido dirigido hacia la superficie que se movería a gran velocidad, erosionando la superficie sólida (Suslick, 1989). Ello junto con la implosión de la cavidad, las altas temperaturas y presiones locales generadas favorecerían el proceso de desorción del compuesto, especialmente pues en esas condiciones se formaría temporalmente agua supercrítica, la que presenta un carácter hidrofóbico con mejores propiedades para la solubilización de compuestos en alguna medida apolares.

Tabla 40: Efecto de la presencia de H₂O y la relación suelo:H₂O en recuperación de MBS desde el suelo PCR (nivel de contaminación 4 µg g⁻¹)

Cantidad de suelo (g)	Cantidad de Agua(mL)	suelo:H ₂ O p/v	% Recuperación
1	–	–	4,43
1	0,5	2:1	77,2
1	1	1:1	93,9
2	–	–	20,2
2	2	1:1	98,01
3	–	–	14,5
3	3	1:1	99,2

a promedio de duplicados

Influencia de un paso de equilibrio en medio acuoso previo a la extracción y de la concentración de MBS. Estudio de repetibilidad

Los resultados para los diferentes factores estudiados en la extracción se observan en la tabla 41. Para el suelo QLT cuando la relación suelo:H₂O es 2:1 (p/v) las recuperaciones son las mas bajas y menores al nivel 0,5 $\mu\text{g g}^{-1}$ que al nivel 1 $\mu\text{g g}^{-1}$; tal efecto puede explicarse porque durante el proceso de adsorción la probabilidad de encontrar un mayor número disponible de sitios activos será mayor cuando la cantidad de adsorbato es menor, esto para una misma cantidad de sitios de adsorción, luego la desorción se dificultaría mas a bajas concentraciones del herbicida. Cuando la relación suelo:H₂O es 1:1 (p/v) aumentan las recuperaciones al nivel 0,5 $\mu\text{g g}^{-1}$, pero siguen siendo inferiores con respecto al nivel 1 $\mu\text{g g}^{-1}$. Las recuperaciones de ambos niveles al incluir un periodo de equilibrio (30 minutos) con agitación del suelo con agua antes de realizar la extracción son independientes del nivel de concentración y alcanzan niveles en torno al 100 %. Para el suelo PCR el comportamiento fue similar.

De los resultados de la desviación estándar relativa puede señalarse que en las condiciones óptimas de extracción la repetibilidad es muy adecuada, con un valor máximo de 3.89 % , considerando que corresponde a la determinación de 5 muestras.

Tabla 41: Porcentajes de recuperación del MBS para los suelos QLT y PCR, en ambos niveles de concentración, diferentes relaciones suelo:H₂O y con un tiempo de equilibrio previo a la extracción

Suelo	QLT		PCR	
	0,5 ug g ⁻¹	1 ug g ⁻¹	0,5 ug g ⁻¹	1 ug g ⁻¹
Suelo:H ₂ O	Rec ^b (%)	Rec ^b (%)	Rec ^b (%)	Rec ^b (%)
p/v				
2:1	69,8 (5,39) ^c	75,4 (1,98)	78,2 (1,34)	83,4 (1,17)
1:1	77,1 (2,35)	87,4 (1,42)	83,0 (2,8)	97,8 (1,49)
1:1, Eq ^a	99,2 (1,61)	104 (2,82)	101 (3,89)	101 (2,68)

a Eq: Tiempo de equilibrio de 30 min antes de agregar el extractante

b Rec: % de recuperación del MBS

c desviación estándar para n=5

2) Extracción de MBS por microondas (MASE)

• Estudio preliminar. Comportamiento de hidrólisis durante el proceso de extracción

El efecto del contenido de humedad en las muestras de suelo en la recuperación de varios tipos de compuestos orgánicos mediante MASE ha sido descrito en la literatura (Molins y col., 1997, Budzinski y col., 1999). Como se señaló anteriormente, la adición de agua a una muestra de suelo seco para normalizar el contenido de humedad, generando diferentes condiciones de pH en función de las propiedades del suelo puede afectar el comportamiento de hidrólisis del herbicida durante el proceso de extracción. Los siguientes resultados se refieren al comportamiento seguido por MBS en diferentes condiciones de extracción utilizando MASE.

En la figura 15 se observan los perfiles de temperaturas desarrollados durante los cuatro programas energéticos de extracción desarrollados.

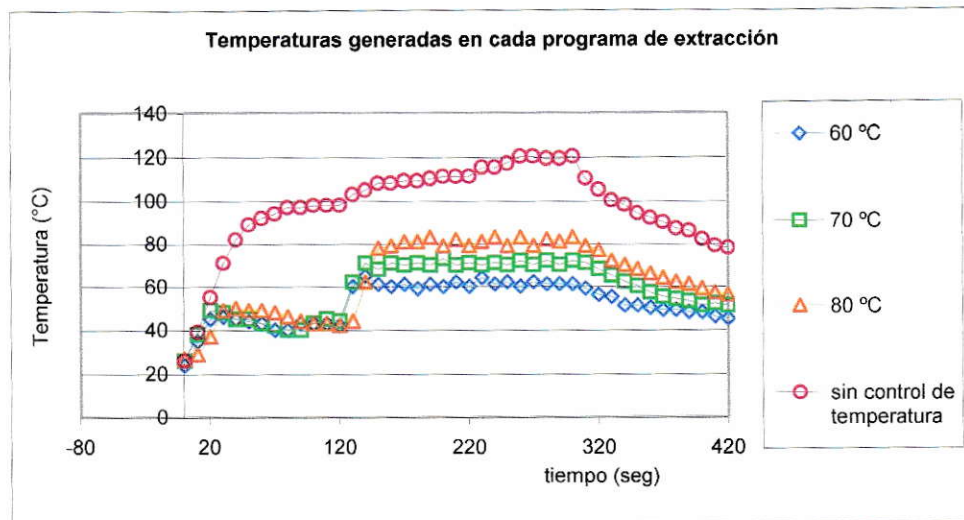


Figura 15: Perfiles de temperatura generadas durante los programas de extracción por MASE

De la figura 15 se desprende que el límite de temperatura establecido en el programa de extracción es controlado en forma muy precisa. Las temperaturas alcanzadas en el segundo paso del programa de extracción fueron 64, 72, 83 y 120 °C para los programas 1, 2, 3 y 4, respectivamente.

Los resultados de los experimentos de extracción en los suelos son mostrados en la tabla 42.

Tabla 42: Porcentajes de recuperación de MBS en cada uno de los programas de extracción por MASE

Suelo	PCR	TEM
Programa de extracción	Recuperación MBS (%) ^a	Recuperación MBS (%) ^b
1	94,9	94,3
2	90,5	88,4
3	73,5	66,1
4	3,5	1

a promedio de duplicados

b promedio de duplicados

Los porcentajes de recuperación más bajos obtenidos en los programas 2, 3 y 4 con respecto al programa 1 indican la posible degradación de MBS en las condiciones de extracción, para ambos tipos de suelos. Se produce una total degradación de MBS cuando no existe control de la temperatura, con la evidencia cromatográfica de la detección a niveles traza de los productos de degradación para los suelos estudiados. PA y BS no fueron detectados después de realizar la extracción en los programas 1 y 2 en ambos tipos de suelos. En el suelo PCR a 80 °C (programa 3) (Figura 16) ambos productos de degradación son observados, pero la pureza del primer pico eluido (PA) demuestra la co-elución de algunos constituyentes del suelo co-extraídos en el procedimiento analítico, lo que se desprendió del cromatograma del blanco del suelo, el que presenta la misma impureza al mismo tiempo de retención.

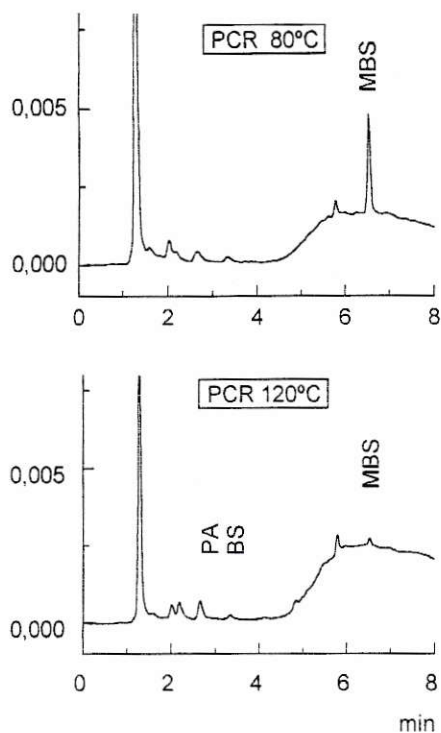


Figura 16: Cromatogramas del extracto del suelo PCR obtenidos por MASE en los programas 3 y 4 Eje de la ordenada corresponde al tiempo en minutos y el eje de la abscisa a la absorbancia en mUA

Los bajos porcentajes de recuperación obtenidos para el suelo TEM pueden ser explicados por su alta capacidad de adsorción ($K_f=24,7 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$) de MBS y no por una degradación hidrolítica originada en el ciclo de extracción puesto que no se encontró evidencia cromatográfica de degradación a estos niveles de contaminación. Sin embargo, conviene resaltar que sólo se conoce el comportamiento de adsorción de MBS y no de los productos de degradación, siendo posible que haya habido una ligera degradación y los productos inmediatamente haber sido fuertemente adsorbidos y no extraídos desde la matriz, especialmente para el caso de PA.

Estos resultados indican que la aplicación de MASE en la extracción de MBS es factible y las diferencias encontradas en la recuperación del analito están relacionadas con el tipo de suelo, indicando que es necesario optimizar condiciones, especialmente en suelos con altos contenidos de materia orgánica. Se decidió establecer como programa 1 de extracción, pues este asegura la no-degradación del MBS.

Estudio de la influencia de factores propios de la matriz

Según la experiencia lograda con la aplicación de ultrasonido se procedió a explorar la influencia de factores propios de la matriz como son una segunda extracción en muestras contaminadas secas, la cantidad de muestra, el nivel de contaminación y el tiempo de equilibrio previo con agua de la muestra conservada en seco.

Influencia de un segundo paso de extracción

Los resultados de los experimentos obtenidos para la primera y segunda extracción se muestran en la tabla 43. Estos muestran que una primera etapa es capaz de recuperar un 61,5 % de MBS desde el suelo QLT, éste presenta una capacidad media de adsorción ($K_f = 4,41 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$) con un 71,1 % del herbicida presente en el sólido. En ambos tipos de suelo una segunda etapa se hace innecesaria, puesto que sólo se recuperó alrededor de un 2 % de MBS, además implica una mayor manipulación de la muestra que puede favorecer la propagación de errores en la determinación analítica.

Tabla 43: Porcentaje de recuperación de MBS para la primera y segunda extracción por MASE

Suelo	Primera extracción ^a (%) recuperación de MBS	Segunda extracción ^b (%) recuperación de MBS
QLT	61,5	1,9
PCR	71,2	1,9

a promedio de triplicados

b promedio de triplicados

Efecto de la cantidad de muestra, nivel de concentración y tiempo de equilibrio en medio acuoso antes de la extracción

Uno de los factores que influye en la recuperación de los analitos al emplear microondas es la cantidad de agua presente en la matriz, señalándose en muchos casos la necesidad de adición de ésta previamente a la extracción, transformándose en un parámetro crítico para la total recuperación. Así por ejemplo se describen recuperaciones muy variables de linuron y otras ureas sustituidas al variar entre 10 y 70 % el porcentaje de agua adicionada a una arena enriquecida con ácido húmico, con un claro descenso en las recuperaciones a mayor humedad siendo necesario, sin embargo, la presencia de al menos un 10% para la obtención de resultados cuantitativos (Molins y col., 2000). Por otro lado, en el estudio de un método de extracción de methabenzthiazuron, otra urea que se une fuertemente a los suelos derivados de cenizas volcánicas, se señala que para la obtención de adecuados porcentajes de recuperación es necesaria una relación suelo: agua igual a 1:1 (Báez y col., 2003).

Los resultados obtenidos para las variables estudiadas se observan en las tablas 44 y 45, sin equilibrio previo y con 30 minutos de equilibrio previo, respectivamente.

Tabla 44: Efecto del tipo de suelo, cantidad de muestra y nivel de contaminación en la recuperación de MBS, sin equilibrio antes de la extracción

Nivel de concentración	Cantidad de muestra (g)	Rec ^a MBS (%)	
		PCR	QLT
0,5 ug g ⁻¹	1	86,05	70,09
0,5 ug g ⁻¹	2	83,06	73,54
0,5 ug g ⁻¹	3	79,59	72,40
1 ug g ⁻¹	1	75,40	66,44
1 ug g ⁻¹	2	79,20	73,83
1 ug g ⁻¹	3	81,06	74,60

a Rec= Recuperación

Tabla 45: Efecto del tipo de suelo, cantidad de muestra y nivel de contaminación en la recuperación de MBS, con 30 minutos de equilibrio antes de la extracción

Nivel de concentración	Cantidad de muestra (g)	Rec ^a MBS (%)	
		PCR	QLT
0,5 ug g ⁻¹	1	80,81	78,5
0,5 ug g ⁻¹	2	80,88	73,6
0,5 ug g ⁻¹	3	86,85	80,56
1 ug g ⁻¹	1	80,58	72,72
1 ug g ⁻¹	2	86,02	80,58
1 ug g ⁻¹	3	89,38	82,67

a Rec= Recuperación

Los porcentajes de recuperación en el suelo PCR son mayores que para el suelo QLT, independientemente del nivel de concentración y cantidad de muestra estando este comportamiento en estrecha relación con las distintas capacidades de adsorción que presentan éstos suelos y que fue discutida en secciones anteriores.

Las menores recuperaciones se obtienen cuando no existe equilibrio previo con agua: PCR; 75,40 % y QLT; 72,40 %. Como se dijo en párrafos previos, la presencia del agua durante el proceso de extracción es fundamental y de los resultados obtenidos se desprende por ejemplo que cuando existe equilibrio antes de la extracción, la recuperación aumenta cuando se usan mayores cantidades de muestra, obteniéndose recuperaciones de un 89,38 % y de un 82,67 % para el suelo PCR y QLT, respectivamente, en caso contrario los resultados no siguen una tendencia clara y en algunas situaciones la recuperación disminuye cuando aumenta la cantidad de muestra. Como en ambas situaciones estuvo presente el agua en la extracción, las mayores recuperaciones se obtuvieron por una mejor hidratación de la estructura del suelo y por consiguiente un mejor acceso del solvente hacia los sitios de adsorción. Aunque los mecanismos de extracción difieren respecto a los de la técnica de ultrasonido, la absorción de la energía de microondas por parte del agua da lugar a una elevación de la temperatura y presión lo que permitiría la difusión de los compuestos desde la matriz hacia el solvente que la rodea. También se estima que la disminución de la polaridad de ésta a mayores temperaturas produciría un aumento de la solubilidad de compuestos apolares (Xiong y col., 1999). Por otra parte, el agua es un solvente que interactúa fuertemente con las partículas coloidales del suelo, siendo parte importante en los fenómenos de adsorción-desorción y participa, como se señaló anteriormente, formando parte de la estructura del mismo, facilitando el acceso de la energía de microondas a los espacios interlaminares de las arcillas y a los microporos de la materia orgánica, que es donde se encuentran principalmente los sitios de adsorción.

El trabajo experimental desarrollado en este seminario de título ha permitido explicar una serie de fenómenos que en su conjunto constituyen un avance no sólo en la investigación sobre el herbicida MBS, sino también se ha entregado una serie de herramientas metodológicas de como abordar dicho problema. Si bien se ha dado una interpretación a muchos de los problemas planteados en los objetivos, surgen inmediatamente proyecciones en el mismo tema de investigación.

Dadas las bajas dosis de aplicación de MBS, una de las proyecciones es el desarrollo de una etapa de preconcentración del herbicida en los extractos mediante el uso de fase sólida, con el objetivo de detectarlo en los niveles en que se encontraría en el ambiente. También la aplicabilidad de los métodos de extracción con solventes asistidos tanto por ultrasonido y microondas, debería ser ensayada en suelos de diversas características encontrados a lo largo del país.

Finalmente, con respecto a los productos de degradación se debería estudiar su comportamiento de adsorción en los suelos y extractabilidad según los sistemas de extracción (ultrasonido y microondas), teniendo en consideración las diferentes características fisicoquímicas de éstos.

IV. CONCLUSIONES

1. Todos los modelos de calibración ensayados son lineales ya sean estos univariados como el multivariado, para ambos productos de degradación.
2. Un aumento en el grado de solapamiento en los productos de degradación, provoca un aumento en los errores (rmsep, rmsecv y EC), si se usan modelos univariados con el objetivo de la cuantificación, en cambio cuando se usa un modelo multivariado (PCR) disminuyen dichos errores.
3. Los errores en la cuantificación son más evidentes para BS que para PA, pues la primera presenta un menor coeficiente de absorción molar a 230 nm.
4. Las diferentes capacidades de adsorción del MBS, encontradas en los suelos estudiados, es atribuible casi en su totalidad al contenido de materia orgánica de éstos.
5. La degradación hidrolítica del MBS es mínima (<10 %) hasta una temperatura de 60 °C, entre los pH 4 y 9 y con un tiempo de extracción de 5 minutos, esto con la evidencia cromatográfica de la ausencia de los principales productos de degradación.
6. Una primera etapa de extracción empleando ultrasonido permite recuperar sobre un 80 %, es necesaria una segunda etapa de extracción para obtener recuperaciones del 100 % del MBS.

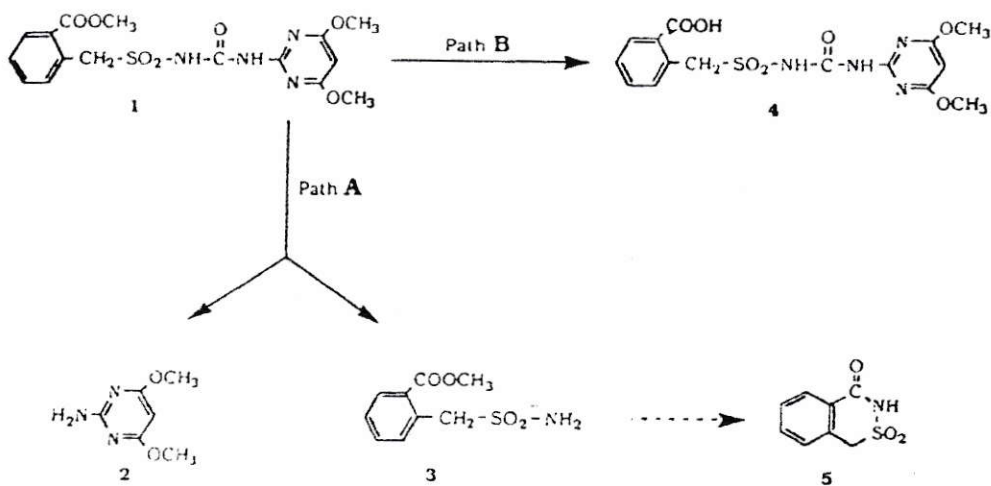
7. La presencia de agua en la relación suelo: H₂O 1:1 (p/v) y un tiempo de equilibrio de 30 minutos previo a la extracción son fundamentales para obtener una total recuperación de MBS con resultados repetibles y exactos, independiente del tipo de suelo y nivel de concentración.
8. El método definitivo de extracción requiere del uso de 3 g de muestra, 3 mL de agua, 30 minutos de equilibrio previo a la extracción, 5 mL de CH₃CN, 5 minutos como tiempo de extracción, 60 °C como temperatura del baño del ultrasonido y una potencia de 9.
9. Una segunda etapa de extracción al emplear microondas es innecesaria, pues no se detecta una cantidad significativa de MBS al realizar dicho procedimiento.
10. El uso de una cantidad de muestra de 3 g, una relación suelo: agua de 1:1 (p/v) y un tiempo de equilibrio de 30 minutos previo a la extracción, aseguran recuperaciones por sobre el 80 %, independiente del tipo de suelo y cantidad de muestra.
11. El programa de extracción definitivo consistió en tres pasos: 2 minutos a 350 W, y 40 °C, 3 minutos a 500 W, 60 °C, 2 minutos de ventilación a 0 W; dicho programa a temperatura y presión controlados asegura la ausencia de degradación durante la ejecución de éste.

ANEXO 1

Esquema de la hidrólisis química de MBS

1= MBS, 2= Bensulfuron, 2= PA, 3= BS. La vía B del esquema esta referida a pHs alcalinos y la vía A a pHs neutros y ácidos (Sabadie.,1997).

412 J. Sabadie



ANEXO 2

Cálculo de índice de separación (R)

Este índice, se calcula usando la ecuación 1 descrita en la sección 2.2.5:

$$R = \frac{(S_1 - S)}{S_1} \times 100 \quad (1)$$

Donde S_1 es la altura del pico y S representa la altura del valle entre el primer y segundo pico medidas directamente del cromatograma en unidades de altura (U_v), por ejemplo para la tabla 7 en la composición $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ 50:50 y flujo $1,1 \text{ mL min}^{-1}$ tenemos para PA los siguientes datos:

$$S_1 = 9967 U_v$$

$$S = 3479 U_v$$

Reemplazando en la ecuación 1 tenemos:

$$R = \frac{(9967U_v - 3479U_v)}{9967U_v} \times 100 = 65$$

Cálculo del número de platos teóricos (N)

El número de platos teóricos, fue calculado por medio de la ecuación 3, descrita en la sección 2.2.5:

$$N = 36 \left(\frac{tr}{\Delta t} \right)^2 \quad (3)$$

Donde Δt corresponde a la diferencia entre el final y el inicio de la integración de un pico y se obtiene directamente del cromatograma y tr el tiempo de retención. Tomando

estos datos experimentales en cada nivel de concentración y composición, para obtener un valor de N, por medio de la aplicación de la ecuación 3. Finalmente se calcula un valor promedio de N . Por ejemplo en la tabla 19, para BS en la composición CH₃CN:H₂O 53:47, tenemos:

$\mu\text{g mL}^{-1}$	t_R	inicio	final	Δt	$(\Delta t / t_R)^2$	N
0,5115	3,72	3,54	3,97	0,43	73,79	2656
1,0230	3,73	3,55	4,02	0,47	63,84	2297
1,5345	3,74	3,54	4,04	0,50	55,95	2014
2,0480	3,73	3,53	4,03	0,50	55,65	2003
0,5115	3,66	3,47	3,89	0,42	77,09	2273
Promedio=2349						

Cálculo del Coeficiente de absortividad molar (ϵ)

Se calculó el coeficiente de extinción molar usando la ecuación 6 :

$$A = \log \frac{P_0}{P} = b \times c \times \epsilon \quad (6)$$

Donde b es la longitud del camino óptico recorrido, c la concentración de la especie absorbente y ϵ es la constante de proporcionalidad llamada coeficiente de absortividad molar. Para el cálculo se usaron los analitos puros, en cada una de las tres condiciones de separación isocrática, empleando un valor de b de 1 cm. La absorbancia se obtuvo

directamente en el máximo del pico y el coeficiente de absortividad molar resultó del valor de la pendiente de la relación entre A (variable Y) y c (variable X), dividida por la constante b, en el intervalo lineal. Por ejemplo para PA en la composición 53:47 CH₃CN:H₂O, la relación entre al absorbancia y la concentración en el intervalo de concentración entre 0,5-2,0 µg mL⁻¹ dio la siguiente ecuación lineal de la recta:

$$A=0.0058c+0.00005 \quad (r^2=0.9996)$$

Donde la pendiente corresponde al producto de ε y b, despejando la ecuación para ε, multiplicando por un factor de 1000 y por la masa molar de PA se obtiene el siguiente valor de ε:

$$\varepsilon = 1000 \left(\frac{L}{cm \times g} \right) \times 0,0058 \times 155 g \times mol^{-1} = 899 M^{-1} cm^{-1}$$

BIBLIOGRAFÍA

- Babic, S., Petrovic, M., Kastelan-Macan, M. 1998. Ultrasonic Solvent extraction of Pesticides from soils. *J. of Chromatogr. A.* 823:3-9.
- Báez, M. E., Aponte, A., Sánchez-Rasero, F. 2003. Microwave-assisted solvent extraction of the herbicide methabenzthiazuron from soils and some soil natural organic and inorganic constituents. Influence of environmental factors on its extractability. *Analyst.* 128: 1478-1484.
- Berger, B. M., Wolfe, L. 1996. Hydrolysis and biodegradation of sulfonylurea herbicides in aqueous buffers and anaerobic waters-sediment system: assessing fate pathways using molecular descriptors. *Environmental Toxicology and Chemistry.* 15: 1500-1507.
- Berglof, T., Koskinen, W., Kylin, H. 1997. Supercritical fluid extraction of metsulfuron methyl, sulfometuron methyl, and nicosulfuron from soils. *Intern. J. Environ. Anal. Chem.* 70:37-45.
- Beyer, E. M., Duffy, M. J., Hay, J. V., Schlueter, D. D. 1988. Sulfonylureas herbicides. In P.C. Kearney and D.D. Kaufmann, eds. ; *Herbicides: Chemistry, degradation and mode of action.* Vol. 3, Marcel Dekker, New York, NY, USA pp. 117-89
- Blanco, M., Coello, J., MasPOCH, S., Ruiz, A. 1994. Calibración Multivariada: Regresión en componentes principales (PCR) y Regresión Parcial con mínimos cuadrados (PLSR). En: Cela, R. *Avances en Quimiometría Práctica.* Universidad de Santiago de Compostela. Pp 355- 439.
- Budzinski, H., Letelier, M., Garrigues, P., Menach, K. J. 1999. Optimisation of microwave-assisted extraction in open cell of polycyclic aromatic hydrocarbon from soil and sediment. Study of moisture effect. *J. Chromatogr. A* 837: 187-200
- Chee, K., Wong, M., Lee, H. 1995. Optimisation of microwave-assisted solvent extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons in marine sediments using a microwave extraction system with high-performance liquid chromatography-fluorescence detection and gas chromatography-mass spectrometry. *J. of Chromatogr. A* 723:159-271.
- Cohen, S., Creeger, S., Cassel, R., Enfield, C. 1984. In treatment and disposal of Pesticides wastes; Krueger, R. F., Seober, J.N., Eds. American Chemical Society: Washington, DC, ACS Symposium Series 259.
- Cuadros, L., García, A., Jiménez, C., Román, M. 1993. Estimation of performance characteristics of an analytical method using the data set of calibration experiment. *Anal. Lett.* 26: 1243-1258
- Giles, C., Macewan, T., Nakhwa, S., Smith, D. 1960. Study in adsorption part IX. A system of classification of solution adsorption isotherm, and its use in diagnosis of adsorption mechanisms and in measurement of specific surface areas of solids. *J. Chem. Soc.* 3973-3993

- Hunter, J. S. 1981. Calibration and the straight line: Current statistical Practices. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 64: 574-583.
- Lagana, A., Fago, G., Marino, A., Penazzi, V. 2000. Liquid chromatography mass spectrometry tandem for multiresidue determination of selected post-emergence herbicides after soil column extraction. *Anal. Chim. Acta* 415 : 41-56.
- Llompart, M. P., Lorenzo, R. A., Cela, R., Li, K., Bélanger, J. M. R., Paré, J. R. J. 1997. Evaluation of supercritical fluid extraction, microwave-assisted and sonication in the determination of some phenolic compounds from various soil matrices. *J. Chromatogr. A.* 774: 243-251.
- Molins, C., Hogendoor E., Dijkman., Heusinkveld, H., Baumann, R. 2000. Determination of linuron and related compound in soil by microwave-assisted solvent extraction and Reverse-phase Liquid Chromatography with UV detection. *J. Chromatogr. A* 869: 487-496.
- Molins, C., Hogendoor, E. A., Heusinkveld, H. G. A., Van Zoonen, P. Baumann . 1997. Microwave assisted solvent extraction (MASE) of organochlorine pesticides from soil samples. *Inter. J. Environ. Anal. Chem.* 68: 155-169.
- Parrilla, P., Martinez Galera, M., Martinez Vidal, J. L., Garrido Frenich, A. 1994. Determination of fenamiphos and folpet in waters by time-domain differentiation of High-performance Liquid Chromatographic peak. *Analyst* 119: 2231-2236.
- Roberts, T. 1998. *Metabolic Pathways of Agrochemical. Part I: Herbicides and Plant Growth Regulators.* Ed. The Royal Society of Chemistry.
- Sabadie, J. Alcoholysis and chemical hydrolysis of Bensulfuron-methyl. 1996. *Weed Research* 36: 441-448.
- Sabadie, J. Degradation of Bensulfuron-methyl on various minerals and humic acids. 1997. *Weed Research* 37: 411-418.
- Shea, P. J. 1986. Chlorsulfuron dissociation and adsorption on select adsorbents and soils. *Weed Science* 34: 747-748.
- Smith, A. E. 1993. A review of analytical methods for sulfonylureas herbicides in soils. *Intern. J. Environ. Anal. Chem.* 59: 97-106.
- Steinheimer, T., Pfeiffer, R., Scoggin, K. 1994. Extraction of atrazine, Cyanazine, Desethylatrazine, Desisopropylatrazine, and Methachlor from fortified western corblet soil by SFE with CO₂. *Anal. Chem.* 66: 645-650.
- Suslick, K. 1989. The chemical effects of ultrasound. *Scientific American.* February: 80-86.
- Ukrainczyk, L., Ajwa, H. A. 1996. Primisulfuron sorption on minerals and soils. *Soil Science Society of America Journal* 60:460-7
- Verdú-Andrés, J., Herraéz-Hernández, R., Campins-Falcó, P. 2001. Analysis of enantiomers giving partially overlapped peak by using different treatments of the

chromatographic ultraviolet signal: quantification of pseudoephedrine enantiomers. *J. Chromatogr. A* 930: 95-107.

Xiong, G., Tang, B., He, M., Zhao, M., Zhang, Z. 1999. Comparison of microwave-assisted extraction of triazines from soils using water and organic solvent as the extractants. *Talanta* 48: 333-339.

Zuloaga, O., Etxebarria, N., Fernández, L. A., Madariaga, J. M. 1999. Optimisation and comparison microwave-assisted extraction and soxhlet extraction for the determination of polychlorinated biphenyl in soil samples using an experimental design approach. *Talanta* 50: 345-357.