

UCH-FC
Q. Ambiental
P438
C. 1

**EXTRACCIÓN DEL HERBICIDA ATRAZINA Y SUS METABOLITOS EN
SUELOS CHILENOS MEDIANTE ULTRASONIDO.**



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

Marianela Denise Pérez Palacios

Director Seminario de Título: Dra. María Estrella Báez Contreras

Agosto 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 la alumna:

MARIANELA DENISE PÉREZ PALACIOS

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

Comisión

Profesor Patrocinante :Dra. M^a Estrella Báez C.

:M. Sc Silvia Copaja

:Prof. María Inés Toral

Este seminario de título fue realizado en la Facultad de Ciencias Química y Farmacéuticas de la Universidad de Chile y financiado en gran parte por un proyecto Facultad-CEPEDEQ (2003) de la misma Facultad. Parte de este trabajo se presentó en las XXV Jornadas Chilenas de Químicas, realizadas en la Universidad Católica del Norte, en Antofagasta. Los trabajos presentados fueron dos: “Extracción de atrazina y sus metabolitos en suelo mediante ultrasonido. Uso de métodos multivariados para establecer la influencia de factores instrumentales y ambientales” y “Comportamiento de atrazina y sus metabolitos en suelos Chilenos con diferentes propiedades fisicoquímicas. Además parte de este trabajo fue enviado al Journal of Chilean Chemical Society: “simultaneous determination of atrazine, deethylatrazine, deisopropylatrazine and hydroxyatrazine in soil extracts with HPLC-DAD detection”

AGRADECIMIENTOS.

En primer lugar quiero dar las gracias a la profesora Maruja, quien con una generosidad absoluta no solo me entregó toda su confianza, experiencia y conocimientos si no también su cálida amistad. En ella encontré a una persona de gran calidad, tanto académica como humana, que me brindó todas las herramientas necesarias para potenciar mis aptitudes.

También quiero agradecer a mi familia, a mis Padres que me regalaron la oportunidad de desarrollarme profesionalmente ...a ellos les debo todo lo que soy. A mis hermanos Carly, Ingrid y Javier.

Quiero también dar las gracias a Pablo, por acompañarme en esta etapa que hoy termina y en la nueva que recién comienza, por todo su amor y apoyo.

Además quiero agradecer a mis amigos “pds”, con los cuales compartí los mejores momentos en estos años de estudio, recuerdos que quedarán guardados para siempre en mi memoria y en mi corazón. Gracias Ale, Luciano, Memo, Rafa y Nelson. También a mis amigos Eve, Gabriel, Rodrigo y Jorge.

Y sin duda lo más importante de todo. Quiero agradecer a Dios que me ha regalado todo lo que en esta página he expresado.

INDICE DE CONTENIDO

	pág
I Introducción.	1
II Objetivos.	7
2.1 Objetivos generales.	7
2.2 Objetivos específicos.	7
III. Materiales y métodos.	9
3.1 Materiales.	9
3.2 Equipo menor.	9
3.3 Equipo mayor.	10
3.4 Reactivos.	11
3.5 Disoluciones.	11
3.5.1 Disoluciones estándar de atrazina, deetilatrazina y deisopropilatrazina.	11
3.5.2 Disolución de hidroxiatrazina.	11
3.5.3 Disolución buffer fosfato pH 8,2.	12
3.6 Metodologías.	13
3.6.1.1 Tratamiento de suelos.	13
3.6.1.2 Determinación de humedad.	13
3.6.2 Estudio del método cromatográfico de atrazina y sus metabolitos.	13
3.6.2.1 Condiciones cromatográficas.	13
3.6.2.2 Estudio de la separación en gradiente de atrazina y sus metabolitos.	14
3.6.3 Determinación de los parámetros de calidad analítica del método cromatográfico.	15
3.6.4 Estudio del comportamiento de adsorción de atrazina y sus metabolitos en suelos.	16

	pág
3.6.5 Estudio de los parámetros instrumentales del método de extracción. “Screening factor”.	17
3.6.6 Estudio de los factores relacionados con el comportamiento del plaguicida en la muestra. Modelación a través de superficie de respuesta.	19
3.6.7 Estudio de las variables ambientales en la eficiencia de la extracción.	22
3.6.8 Preconcentración en fase sólida.	25
IV Resultados y discusión.	27
4.1 Clasificación y características fisicoquímicas de los suelos utilizados.	27
4.2 Estudio del método cromatográfico para la determinación de atrazina y sus metabolitos.	28
4.3 Cálculo de los parámetros de calidad analítica para la separación en gradiente.	36
4.4 Estudio del comportamiento de adsorción de atrazina y sus metabolitos en cuatro suelos.	40
4.5 Estudio de los parámetros instrumentales del método de extracción. “Screening factor”.	45
4.6 Estudio de los factores relacionados con el comportamiento del plaguicida en la muestra. Modelación a través de superficie de respuesta.	50
4.7 Estudio de las variables ambientales en la eficiencia de la extracción.	54
4.8 Preconcentración en fase sólida.	59
V Conclusiones.	61
VI Bibliografía.	63
Anexo Cálculos	67

INDICE DE TABLAS

	pág
1.1 Características fisicoquímicas de atrazina y sus metabolitos.	6
3.1 Gradiente 1.	15
3.2 Gradiente 2.	15
3.3 Gradiente 3.	15
3.4 Gradiente 4.	15
3.5 Factores y niveles del diseño experimental. "Screening factor".	17
3.6 Matriz del diseño experimental. "Screening factor".	18
3.7 Factores y niveles del diseño experimental. Superficie de respuesta.	20
3.8 Matriz del diseño experimental. Superficie de respuesta.	20
3.9 Factores y niveles del diseño experimental. Variables ambientales.	23
3.10 Matriz del diseño experimental. Variables ambientales.	23
4.1 Características fisicoquímicas de los suelos.	28
4.2 Influencia del flujo de la fase móvil en la elusión.	29
4.3 Influencia de la composición de la fase móvil en la elusión.	30
4.4 Resolución de DIA, HIA, DEA y AT en gradiente.	32
4.5 LOD, LOQ y Sensibilidad para la determinación de DIA, HIA, DEA y AT por HPLC-DAD (intervalo de calibración 0.02-0.10 $\mu\text{g mL}^{-1}$).	37
4.6 Linealidad para la determinación de DIA, HIA, DEA y AT por HPLC-DAD (intervalo de calibración 0,02 - 5,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$).	37
4.7 Valores de K_f , $1/n$ y r^2 para DIA, HIA, DEA y AT en los suelos.	41
4.8 Matriz de respuesta "Screening factor".	45
4.9 Efectos de los factores y valor de probabilidad del análisis de varianza (ANOVA). "Screening factor".	47
4.10 Matriz de respuesta. Superficie de respuesta.	50
4.11 Efecto de los factores y valor de probabilidad del análisis de varianza (ANOVA). Superficie de respuesta.	51

4.12	Matriz de respuesta. Estudio de los factores ambientales.	55
4.13	Efectos estimados y valores de probabilidad del análisis de varianza (ANOVA). Estudio de los factores ambientales.	56
4.14	Porcentajes de recuperación del ensayo de extracción en fase sólida.	59

INDICE DE FIGURAS

	pág	
1.1	Atrazina y sus principales compuestos de degradación.	6
4.1	Cromatogramas de los cuatro programas en gradiente.	34
4.2	Influencia de la concentración de buffer en el medio de inyección.	35
4.3	Curvas de calibración para DIA, HIA, DEA y AT en los rangos 0,02-0,1 y 0,02-5 $\mu\text{g/mL}$.	39
4.4	Isotermas de los cuatro compuestos en forma individual en los cuatro suelos.	45
4.5	Isotermas de deetilatrazina e hidroxiatrazina en suelo Cunco en forma individual y en mezcla.	45
4.6	Gráfico estandarizado de Pareto para DIA.	48
4.7	Gráfico estandarizado de Pareto para HIA.	48
4.8	Gráfico estandarizado de Pareto para DEA.	49
4.9	Gráfico estandarizado de Pareto para AT.	49
4.10	Superficie de respuesta de HIA tiempo de equilibrio v/s relación agua:suelo.	52
4.11	Superficie de respuesta de DIA, relación agua:suelo v/s concentración.	53
4.12	Superficie de respuesta de AT, tiempo de extracción v/s concentración.	53
4.13	Efectos de los factores sobre el porcentaje de recuperación.	56
4.14	Efectos del valor de K_f sobre el porcentaje de recuperación.	58

RESUMEN

En el presente trabajo se desarrolló un método analítico de extracción que permite la determinación simultánea de atrazina (2-cloro-4-etilamino-6-isopropilamino-1,3,5-triazina) y sus metabolitos, en suelos chilenos con naturaleza fisicoquímica diferente, utilizando ultrasonido. Se logró el desarrollo de un método exacto y preciso y aplicable a una gran variedad de muestras.

En primer lugar se definieron las mejores condiciones para su determinación analítica de atrazina y sus principales productos de degradación, deetilatrazina (2-amino-4-cloro-6-isopropilamino-1,3,5-triazina), deisopropilatrazina (2-amino-4-cloro-6-etilamino-1,3,5-triazina), hidroxiatrazina (2-hidroxi-4-etilamino-6-isopropilamino-1,3,5-triazina), mediante cromatografía líquida en fase inversa con detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD). Se desarrolló un método de separación en gradiente empleando columna de longitud pequeña y gran eficiencia (Zorbax SB-C8 °A, 4,6 x 150 mm, tamaño de partícula 5 mm) que permitió separar las señales provenientes de las sustancias co-extraídas desde el suelo de las señales de los analitos de interés, obteniéndose parámetros de calidad analítica apropiados para la determinación de los cuatro compuestos a bajas concentraciones.

Parte fundamental para la interpretación de los resultados fue el estudio de adsorción de los compuestos, en cuatro suelos con diferentes características fisicoquímicas el cual entregó antecedentes muy importantes del comportamiento de adsorción, reflejados en los resultados obtenidos en las isotermas, en los cuales se vio reflejada la influencia del

pKa de los compuestos y las diferentes propiedades del suelo como por ejemplo el contenido de materia orgánica.

El estudio del método de extracción contempló el uso de diferentes diseños experimentales para la definición de los factores que afectan su eficiencia, esto permitió la obtención de resultados óptimos de recuperación. Ello se logró considerando en el estudio algunos factores relacionados con el comportamiento de los contaminantes en suelos de diferente naturaleza, como también a través del uso de sistemas de contaminación que reproducen las condiciones de equilibrio semejando condiciones naturales de adsorción. Los resultados obtenidos mostraron que los factores significativos en la extracción son: la potencia y la temperatura del baño de ultrasonido y el volumen de solvente utilizado para la extracción.

Se buscó además, la aplicación del método desarrollado en la determinación de estos compuestos al nivel de residuos empleando nuevos sorbentes, para utilizarlos como medio de preconcentración de los extractos. El estudio de preconcentración en columnas de extracción en fase sólida, presentó grandes ventajas obteniéndose porcentajes adecuados de recuperación en la preconcentración y recuperación simultánea tanto de atrazina y sus metabolitos.

ABSTRACT

This work involves the development of a method of extraction of atrazine (2-chloro-4-ethylamino-6-isopropylamino-1,3,5-triazine) and its metabolites, in Chilean soils of different physicochemical properties, using ultrasound. The development of a method exact and precise and applicable to a great variety of samples was obtained.

The best conditions for their analytical determination of atrazine and its main products of degradation, deethylatrazine (2-amino-4-chloro-6-isopropylamino-1,3,5-triazine), deisopropylatrazine (2-amino-4-chloro-6-ethylamino-1,3,5-triazine), hydroxyatrazine (2-hydroxy-4-ethylamino-6-isopropylamino-1,3,5-triazine) were defined, by means of liquid chromatography in reverse phase (HPLC) with diode-array detection (DAD)

A gradient separation method was also developed using small and efficiency column (Zorbax SB-C8 °A, 4.6 x 150 mm, particle size 5 mm) that allowed separates the signals of the substances co-extracted from the soil from the signals of the interest substances, obtaining appropriate parameters of analytical quality for the determination of the four composed to low concentrations.

Important for the interpretation of the results was the compounds adsorption study, in four grounds with different physicochemical characteristics, which gave very important antecedents of the adsorption behavior, showed in the results obtained in the isotherms, in which was reflected the compounds pKa influence and the different soils properties like for example the organic matter content.

The extraction method study contemplated the use of different experimental designs for the definition from the factors that affect their efficiency, this allowed the obtaining of optimal results of recovery. It was obtained considering in the study some factors related to the behavior of the compound in soil of different nature, as also through use of contamination systems that reproduce the conditions of balance resembling natural conditions of adsorption. The obtained results showed that the significant factors in the extraction are: the power and the temperature of the ultrasound bath and the volume of dissolvent used for the extraction. Furthermore it was looked, the application of the method developed in the determination of these compounds at the level of remainders using new sorbent, to be used like preconcentration means. The study of preconcentration using solid-phase extraction, it presented great advantages great obtaining adequate percentage of recovery in the preconcentration and simultaneous recovery of atrazina and its metabolites.

I. INTRODUCCIÓN

El aumento significativo que ha experimentado la actividad agrícola y forestal en las últimas décadas en Chile, principalmente en cultivos destinados a la exportación, ha llevado a un aumento en el uso de plaguicidas para el control de malezas, plagas y enfermedades, en vastas zonas del país, lo que permite un mejor aprovechamiento de los nutrientes y disponibilidad de agua de los cultivos.

La presencia de los plaguicidas en los suelos agrícolas se produce por diversas vías. Algunas veces se debe a los tratamientos que se efectúan directamente en las partes aéreas de las plantas para combatir sus plagas. En estos tratamientos aproximadamente el 50 % del producto se deposita en el suelo, ya que es prácticamente imposible aplicarlo exclusivamente al cultivo; o bien, por arrastre del incorporado a la planta por acción de la lluvia o el viento. Otras veces la aplicación se hace directamente en el suelo y el producto aparece en cantidades mayores. También se debe considerar el arrastre de restos suspendidos en la atmósfera por el viento o la lluvia. El plaguicida, que así queda depositado en el suelo, entra en un ecosistema dinámico e inmediatamente empieza su movimiento hacia otros sistemas como aguas superficiales, aguas subterráneas y la atmósfera, formando un ciclo con un potencial para producir efectos nocivos en los seres vivos, constituyéndose en un tema que cobra gran importancia por estos días desde el punto de vista ambiental.

El problema de la contaminación de aguas subterráneas por plaguicidas, ha recibido en los últimos años gran atención en el mundo, debido a la detección de numerosos compuestos en extensas áreas de cultivo agrícola. Existen estudios que muestran evidencia de transporte de herbicidas obtenida a través de ensayos en campo, apareciendo entre los principales la atrazina y dos de sus principales productos de degradación, como contaminantes hídricos. (Flury, 1996). Pero también existe la posibilidad que estos compuestos se incorporen al suelo interactuando con éste de diversas formas. La presencia de atrazina como contaminante en el ambiente ha sido reconocida en extensas áreas agrícolas a nivel mundial por muchos años.

Atrazina (2-cloro-4-etilamino-6-isopropilamino-1,3,5-triazina) es una clase de herbicida ampliamente utilizado en la agricultura, su mecanismo bioquímico de acción es la interrupción de cadenas enzimáticas en el transporte de electrones, lo que constituye un proceso fundamental en la generación de energía y fotosíntesis. (Roberts, T., 1994)

La atrazina y sus productos de degradación deetilatrazina (2-amino-4-cloro-6-isopropilamino-1,3,5-triazina), deisopropilatrazina (2-amino-4-cloro-6-etilamino-1,3,5-atrazina), hidroxiatrazina (2-hidroxi-4-etilamino-6-isopropil-1,3,5-triazina) han sido escasamente estudiados en suelos considerando éstos en su conjunto y, especialmente, incluyendo aquéllos que se unen más fuertemente a los coloides orgánicos e inorgánicos, como es el caso de la hidroxiatrazina (Hrdlicka y Dolinová, 2001).

Por otra parte, los métodos de extracción han sido estudiados mediante el uso de suelos con bajos contenidos de materia orgánica y por lo tanto, en ausencia de los mecanismos

que permiten la retención intensiva de los compuestos en suelos de gran reactividad (Xiong y col. 1999); cabe señalar que numerosos suelos chilenos alcanzan contenidos de materia orgánica superiores a un 15 %, constituyéndose en suelos muy reactivos frente a la adsorción de plaguicidas.

La determinación simultánea de herbicidas y de sus metabolitos en suelos en los últimos años ha despertado un interés creciente, debido al reconocimiento del potencial contaminante que presentan especialmente éstos últimos, pues en la mayoría de las ocasiones se encuentran como compuestos más polares que el producto inicial y por lo tanto más tóxicos (como es el caso de los derivados dealquilados de atrazina) y con mayores posibilidades ya sea de movilización o retención y, en general, las dificultades analíticas se producen debido a los bajos límites de detección que se deben lograr.

Tradicionalmente, los métodos analíticos para el análisis de multiresiduos en matrices ambientales se han basado en el empleo de cromatografía de gases asociada a detectores específicos como NPD, el que presenta una gran selectividad y sensibilidad frente a las triazinas debido a la presencia de átomos de nitrógeno en sus moléculas, o detectores altamente sensibles como ECD, por la presencia de átomos de cloro. La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en tanto, ha sido bastante empleada en la determinación de plaguicidas en extractos acuosos de suelos, principalmente en estudios destinados a establecer el comportamiento fisicoquímico de los compuestos o en estudios de degradación, donde no se requiere una gran sensibilidad, o bajos límites de detección. En los últimos años, se han desarrollando métodos multiresiduos basados en la aplicación de cromatografía líquida, especialmente debido a que muchos plaguicidas y

su metabolitos son difíciles de determinar por cromatografía de gases siendo necesario formar derivados, o bien, simplemente porque son termolábiles.

Los métodos multiresiduos basados en cromatografía líquida han sido abordados en general para aguas. En la actualidad se plantean métodos como el desarrollado por Jeannot y col. (2000) en donde se comparan los resultados obtenidos para 48 compuestos con HPLC-MS, HPLC-MS-MS y HPLC-DAD, empleando como medios de extracción y preconcentración, la extracción líquido-líquido con diclorometano y la extracción en fase sólida. Ello ha sido posible debido al desarrollo de nuevos sorbentes cuya ventaja radica en sus características de retención hidrofílica y lipofílica, generando la posibilidad de lograr simultáneamente la extracción de analitos con diferentes polaridades y características ácido-base.

Además, el uso del detector de arreglo de diodos (DAD) presenta la gran ventaja de permitir registrar la señal de la absorbancia en los dominios del tiempo y longitud de onda, obteniéndose el cromatograma y el espectro respectivo; de esta forma se puede identificar y cuantificar los distintos compuestos en estudio. Con la utilización de un software específico se pueden contrastar los espectros obtenidos con los de estándares puros; estos últimos almacenados en una biblioteca y, de esta forma, se puede identificar el analito, determinar la pureza de los picos cromatográficos o verificar si existen compuestos co-eluyentes.

La extracción con disolventes, usando técnicas de ultrasonido ha sido descrita, proporcionando eficiencias de extracción satisfactorias combinadas con la simplicidad

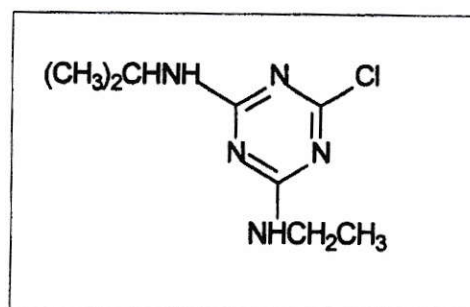
de uso y bajo consumo de disolventes, en comparación con otras técnicas como la extracción con fluido supercrítico, que requiere de equipamiento más sofisticado y para lo cual se han descrito recuperaciones variables o poco eficientes, especialmente cuando los compuestos son adsorbidos en suelos con mayor contenido de materia orgánica, como en el caso de atrazina y sus metabolitos (Steinheimer y col. 1994)

En la actualidad los estudios de extracción de pesticidas con disolventes buscan lograr una gran efectividad en la separación de éstos desde su matriz, tiempos cortos de extracción y el uso de volúmenes mínimos, además de la facilidad de aplicación del método de extracción.

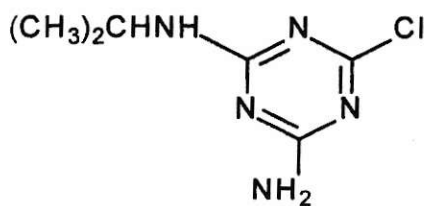
En el presente trabajo se busca desarrollar en primera instancia un método analítico que permita la determinación simultánea de los cuatro compuestos anteriormente señalados, en muestras de suelo variadas en su naturaleza fisicoquímica. Este se basará en el uso de ultrasonido y en el empleo de la técnica HPLC-DAD para su determinación teniendo como objetivo principal el logro de un método exacto y preciso y aplicable a una gran variedad de muestras. Se buscará además avanzar en su aplicación en la determinación de estos compuestos al nivel de residuos empleando los nuevos sorbentes descritos para la extracción en aguas, en este caso utilizándolos como medio de preconcentración de los extractos en función de las condiciones óptimas que se definan para la extracción.

Tabla 1.1 Características fisicoquímicas de atrazina y sus metabolitos

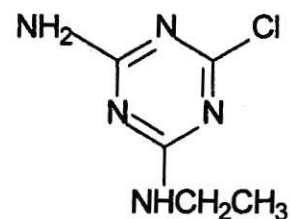
Compuesto	pKa	Log K _{ow}	Solubilidad H ₂ O (mg/mL)	Abreviación
atrazina	1,7	2,50	33	AT
deetilatrazina	1,4	1,52	3200	DEA
deisopropilatrazina	1,5	1,13	670	DIA
hidroxiatrazina	5,2	1,40	5,9	HIA



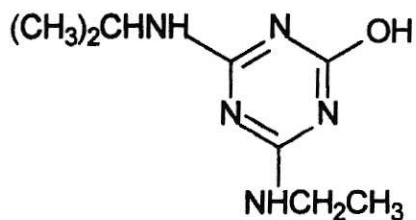
ATRAZINA



DEETILATRAZINA



DEISOPROPILATRAZINA



HIDROXIATRAZINA

Figura 1.1 Atrazina y sus principales compuestos de degradación

II. OBJETIVOS

2.1 Objetivos generales

Desarrollo de un método que permita la determinación de atrazina (AT) y sus productos de degradación, deetilatrazina (DEA), deisopropilatrazina (DIA) e hidroxiatrazina (HIA), en suelos característicos de nuestro país, de naturaleza y composición variada, basado en extracción con disolventes empleando ultrasonido y HPLC con detección por arreglo de diodos.

2.2 Objetivos específicos

- Estudiar el comportamiento cromatográfico de atrazina y sus metabolitos en mezcla mediante HPLC-DAD.
- Determinar los parámetros de calidad analítica del método desarrollado para la determinación simultánea de los cuatro compuestos.
- Establecer el comportamiento de adsorción de atrazina y sus metabolitos en forma individual y en mezcla frente a suelos con propiedades físico-químicas diferentes previamente caracterizados.
- Estudiar y optimizar las condiciones de extracción con disolventes asistida con ultrasonido mediante el uso de métodos multivariados.

- Modelar el efecto de factores propios del suelo, tiempo de residencia de los contaminantes y propiedades físico-químicas de estos últimos en la eficiencia de la extracción.
- Realizar el estudio preliminar de un método de pre-concentración de los extractos con cantidades residuales de los productos mediante retención en fase sólida.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales

- Material de vidrio de uso general y volumétrico clase A.
- Micropipeta de desplazamiento de aire 20-50 μL Brand.
- Tubos de centrifuga cónicos de plástico con tapa de 50 mL, Sterilin.
- Filtros de membrana GV de tamaño de poro de 0,22 μm y 25 mm de diámetro Millipore.
- Filtros de membrana HV de tamaño de poro de 0,45 μm y 47 mm de diámetro Millipore.
- Sistema de filtración de propileno Swinnex.
- Jeringas plásticas.
- Viales de vidrio para HPLC.
- Columnas de extracción Oasis MCX de 6 cm^3 de 150 mg de sorbente.

3.2 Equipo menor

- Balanza analítica 4000 C Precisa ($\pm 0,00001$ g).
- Balanza analítica 40SM-200AS Precisa ($\pm 0,001$ g).
- Equipo purificador de agua NANOpure Ultrapure Water System Barnstead.
- Centrifuga Function Line HERAEUS Instruments 4000 rpm.

- pH-metro equipado con un electrodo KCl-AgCl y microprocesador pH/ION Meter MX 3000/pH WTW.
- Calefactor y agitador Heidolph GmbH.
- Evaporador rotatorio Heidolph VV 2011
- Agitador Heidolph Reax2.
- Agitador Heidolph DGS 304.
- Estufas de secado WTE Binder.
- Sistema de filtración al vacío SM 16309, Sartorius.

3.3 Equipo mayor

- Cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC) Waters con Bomba Binaria 600.
- Detector de arreglos de diodos (DAD) Waters 996.
- Muestreador automático Waters 717 Plus.
- Software para control instrumental, adquisición y procesamiento de datos Millennium 2010.
- Columna en fase inversa: Zorbax SB-C₈, 80 °A, 4,6 x 150 mm, tamaño de partícula 5 mm, con precolumna Zorbax XDB C₁₈ 4 x 4 mm.
- Baño de ultrasonido Transsonic Digital, Elma con control de temperatura y potencia.

3.4 Reactivos

- Agua calidad nanogrado.
- Acetonitrilo grado HPLC, J.T.Baker.
- Ácido clorhídrico 37 % PA, Merck.
- Cloruro de potasio 99 % de pureza, Fluka.
- Fosfato monoácido de sodio 99 % de pureza, Merck.
- Fosfato diácido de potasio 99 % de pureza, Merck.
- Helio Extrapuro 99.95 % de pureza, $O_2 < 4 \text{ mg/L}$, $H_2O < 2 \text{ mg/L}$, AGA.
- Atrazina 99,0 % de pureza, Riedel-de Haen.
- Hidroxiatrazina 99,0 % pureza, Chem Service.
- Deethylatrazina 99,0 % pureza, Chem Service.
- Deisopropilatrazina 99,0 % pureza, Chem Service.

3.5 Disoluciones

3.5.1 Disoluciones estándar de atrazina, deetilatrazina y deisopropilatrazina

Se prepararon disoluciones de los tres compuestos por separado, para lo cual se pesaron 5,55; 5,20 y 5,09 mg, respectivamente, de los estándares en una navecilla de vidrio, se pusieron en un matraz de aforo de 25 mL y se completó el volumen con acetonitrilo. A partir de estas disoluciones se obtuvo los patrones de calibración y las disoluciones para los estudios realizados en este trabajo.

3.5.2 Disolución de hidroxiatrazina

Se preparó una disolución de hidroxiatrazina, para lo cual, se pesó 5,15 mg del estándar en una navecilla de vidrio, se llevó hasta 25 mL con acetonitrilo en un matraz de aforo, antes de aforar se le agregó 250 μ L de ácido clorhídrico concentrado. A partir de esta disolución se obtuvo los patrones de calibración y las disoluciones para las experiencias realizadas en este trabajo.

3.5.3 Disolución buffer fosfato, pH 8,2

Disolución KH_2PO_4 0,066 mol/L

Se pesó 0,90 gramos de KH_2PO_4 , se colocó en un matraz de aforo de 100 mL y se completó el volumen con agua nanopura.

Disolución Na_2HPO_4 0,066 mol/L

Se pesó 9,37 gramos de Na_2HPO_4 , se colocó en un matraz de aforo de 1000 mL y se completó el volumen con agua nanopura.

Preparación buffer fosfato, pH 8,2

A un matraz de aforo de 1000 mL se agregó 37 mL de disolución KH_2PO_4 0,066 mol/L y se aforó hasta la marca con disolución de Na_2HPO_4 0,066 mol/L. De ésta disolución se midió 200 mL, se llevó a un matraz de 1 litro y se completó el volumen con agua nanopura. Finalmente la disolución se filtró en membrana de tamaño de poro de 0,22 μm .

3.6 Metodologías

3.6.1.1 Tratamiento de suelos

Las muestras de suelo Mapocho, Galvarino, Cunco y Quillota fueron secadas al aire y tamizadas a 2 mm y guardadas en frascos plásticos a temperatura ambiente.

3.6.1.2 Determinación de humedad del suelo

Se determinó la humedad de los suelos con el fin de corregir los resultados. Se pesó 2 gramos de cada suelo con una precisión de 0,0001 g, se secaron en estufa a 105°C y durante dos horas, luego se llevaron a desecador para enfriar durante una hora, inmediatamente después se pesaron nuevamente, la operación se repitió hasta peso constante. Las muestras se realizaron en triplicado.

3.6.2 Estudio del método cromatográfico de atrazina y sus metabolitos

Para este estudio se preparó disoluciones de los cuatro compuestos por separado y una solución con los cuatro compuestos en conjunto en una concentración de 0,8 µg/mL. Se usó acetonitrilo como disolvente. Los datos se registraron a 214,0 nm para DIA, DEA y HIA y a 222,0 nm para AT.

3.6.2.1 Condiciones cromatográficas

Se estudió el efecto del flujo de la fase móvil y de su composición en la elusión de los compuestos en estudio manteniendo constantes las siguientes condiciones cromatográficas:

- Flujo de Helio 20 mL/min.
- Temperatura de Columna 35°C
- Volumen de inyección 20 µL.
- Longitud de onda de barrido del detector 200-350 nm

Estudio del flujo de la fase móvil

Se inyectó 20 µL de cada disolución de los compuestos por separado. La composición de la fase móvil se fijó en 50:50 acetonitrilo:buffer fosfato pH 8,2 y se varió el flujo entre 1,25 y 2,0 mL/min.

Estudio de la composición de la fase móvil

Se inyectó 20 µL de cada disolución de los cuatro compuestos por separado. Se fijó el flujo de la fase móvil en 2 mL/min y se varió la composición entre 20 y 50 % de acetonitrilo.

3.6.2.2 Estudio de la separación en gradiente de atrazina y sus metabolitos

Se realizó este estudio con el propósito de mejorar la resolución y la eficiencia en la separación de los cuatro compuestos simultáneamente. Observando los resultados de los estudios anteriores, (sección 3.6.2.1) se estudiaron cuatro posibles gradientes acetonitrilo:buffer pH 8,2. En las Tablas 3.1, 3.2, 3.3 y 3.4 se describen éstos en cuanto a la variación del porcentaje de acetonitrilo a lo largo del programa.

Tabla 3.1: Gradiente 1

Flujo	1,5 mL/min
Tiempo (min)	% CH ₃ CN
0	25
2	25
4	65
6	65
7	25
10	25

Tabla 3.2: Gradiente 2

Flujo	1,2 mL/min
tiempo (min)	% CH ₃ CN
0	25
2	25
4	60
6	60
7	25
12	25

Tabla 3.3: Gradiente 3

Flujo	1,5 mL/min
Tiempo (min)	% CH ₃ CN
0	22
1	22
2	55
4	55
5	22
10	22

Tabla 3.4: Gradiente 4

Flujo	2 mL/min
tiempo (min)	% CH ₃ CN
0	22
1	22
2	37
4	37
5	22
10	22

3.6.3 Determinación de los parámetros de calidad analítica del método cromatográfico

Para la determinación de los parámetros analíticos de este método se realizó una curva de calibración de los cuatro compuestos en conjunto, en solución 1:1 v/v agua:buffer fosfato pH 8,2; en las concentraciones: 0,02; 0,04; 0,06; 0,08; 0,1; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 y 5,0 $\mu\text{g/mL}$. Las disoluciones se inyectaron en duplicado en las condiciones cromatográficas definidas como óptimas (gradiente 4). Para determinar el límite de detección (LOD), cuantificación (LOQ) y sensibilidad analítica se consideró el intervalo de concentración entre 0,02 y 0,1 $\mu\text{g/mL}$ y la linealidad en el intervalo de 0,02 a 5,0 $\mu\text{g/mL}$. Se trabajó con el área del pico como respuesta cromatográfica.

3.6.4 Estudio del comportamiento de adsorción de atrazina y sus metabolitos en suelos

Se estudió el comportamiento de adsorción para los cuatro compuestos AT, DEA, DIA y HIA por separado en cuatro suelos chilenos: Cunco, Quillota, Mapocho y Galvarino. Estos suelos estaban previamente caracterizados y han sido empleados en otros estudios en el laboratorio tanto de adsorción como de metodologías de extracción (Báez y col., 2000, 2003). También se realizaron los estudios de adsorción para los cuatro compuestos en conjunto en los mismos suelos, para determinar posibles fenómenos de competencia por los sitios de adsorción.

Procedimiento isotermas de adsorción

En cinco tubos se pesó 2 gramos de suelo, a cada tubo se les agregó 8 mL de solución del compuesto en distintas concentraciones: 1, 2, 3, 4 y 5 $\mu\text{g/mL}$, estas soluciones se prepararon en KCl 0,01 mol/L como electrolito soporte. También se preparó un blanco con 2 gramos de suelo y 8 mL de KCl 0,01 mol/L. Los tubos se taparon y se agitaron en forma constante durante 24 horas a 30°C para obtener el equilibrio en sistema "batch". Después del tiempo de agitación las muestras fueron centrifugadas en los mismos tubos a 4000 rpm, se tomó una alícuota del sobrenadante y se diluyó al 50 % con buffer fosfato pH 8,2; se filtró en membranas de tamaño de poro de 0,22 μm y se analizó cromatográficamente. Todas las muestras se realizaron en duplicado incluidos los blancos. De las mismas disoluciones adicionadas a los suelos se prepararon las disoluciones de calibración, diluyendo al 50 % con buffer fosfato pH 8,2.

3.6.5 Estudio de los parámetros instrumentales del método de extracción.

“Screening factor”

Para el estudio del método de extracción se realizó un diseño estadístico experimental factorial del tipo “screening factor” que contempló 5 factores cada uno en 2 niveles, es decir, 2^5 lo que representa 32 experimentos donde se cuentan todas las combinaciones posibles de los factores y sus niveles, se realizaron repeticiones de 8 de estos experimentos para obtener el error estimado. Este tipo de diseño permite determinar los factores que influyen significativamente en la respuesta instrumental y por su naturaleza multivariada permite identificar las interacciones entre los distintos factores. Estos fueron: cantidad de muestra, volumen de disolvente para la extracción, potencia de ultrasonido, temperatura del baño de ultrasonido y tiempo de extracción. En la Tabla 3.5 se muestran los factores y sus 2 niveles y en la Tabla 3.6 se presenta la matriz del diseño experimental. Se utilizó el programa estadístico Statgraphics 4.0 para el análisis de datos.

Tabla 3.5: Factores y niveles del diseño experimental. “Screening factor”

Factor	Nivel	
	-1	+1
Cantidad de muestra (A)	2 g	4 g
Volumen de disolvente (B)	5 mL	10 mL
Potencia (C)	4	8
Temperatura (D)	50 °C	80 °C
Tiempo de extracción (E)	5 min	10 min

Tabla 3.6: Matriz del diseño experimental "Screening factor".

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

(*) experimentos realizados en duplicado

Contaminación de las muestras de suelo

Para esta experiencia se utilizó el suelo Quillota, pues presenta un contenido intermedio de materia orgánica (1,78 % CO). Se dispuso de 40 tubos de centrifuga cónicos en los que se pesó la cantidad de suelo correspondiente, según el diseño. Las muestras se contaminaron directamente con una solución acuosa de los cuatro compuestos en conjunto en una concentración de 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en una relación agua:suelo 1:1. De esta forma la concentración final de contaminación en el suelo fue 4 $\mu\text{g}/\text{g}$. Los tubos se taparon y se agitaron en forma constante durante 2 horas a temperatura ambiente. Luego de esto, las muestras fueron guardadas en refrigerador durante toda la noche para lograr el equilibrio.

Procedimiento de extracción

A los 40 tubos con el suelo contaminado se les agregó el volumen correspondiente de disolvente indicado por el diseño, los tubos se taparon y se agitaron manualmente para homogeneizar la mezcla del suelo con el disolvente. En todos los casos se empleó acetonitrilo. Después de esto los tubos se sumergieron en el baño de ultrasonido durante el tiempo y a la temperatura y potencia determinados por el diseño. Inmediatamente terminada la extracción, los tubos fueron colocados en hielo para enfriarlos. Los tubos se centrifugaron a 4000 rpm y el sobrenadante se diluyó al 50 % en buffer fosfato pH 8,2, se filtró en membranas de tamaño de poro de 0,22 μm para la determinación cromatográfica mediante HPLC. Los resultados de recuperación se obtuvieron por comparación de las áreas obtenidas en las muestras con aquéllas obtenidas de soluciones patrón, preparadas con un 50 % de buffer fosfato pH 8,2, que representaban un 100 % de recuperación, para cada una de las situaciones planteadas en el diseño.

3.6.6 Estudio de los factores relacionados con el comportamiento del plaguicida en la muestra. Modelación a través de superficie de respuesta

Después de haber identificado los factores instrumentales significativos en el método de extracción, se estudiaron los factores relacionados con el comportamiento de adsorción de atrazina y sus metabolitos en el suelo. Para esto se realizó un diseño experimental de superficie de respuesta en el cual se contemplaron tres factores: concentración del plaguicida en la muestra, tiempo de equilibrio antes de la extracción y relación agua:suelo para el equilibrio antes de la extracción. Cada factor se estudió en tres niveles

con un total de 27 experimentos (3^3). Se realizaron repeticiones de seis de estos experimentos para estimar el error. En la Tabla 3.7 se presentan los factores estudiados y sus tres niveles y en la Tabla 3.8 se presenta la matriz del diseño experimental.

Tabla 3.7: Factores y niveles del diseño experimental. Superficie de respuesta

factor	Nivel		
	-1	0	+1
Concentración del contaminante (A)	1,08 µg/g DIA 0,84 µg/g DEA 1,99 µg/g HIA 1,15 µg/g AT	1,54 µg/g DIA 1,26 µg/g DEA 3,11 µg/g HIA 1,89 µg/g AT	2,01 µg/g DIA 1,57 µg/g DEA 4,10 µg/g HIA 2,41 µg/g AT
Relación agua:suelo (B)	0:1	0,5:1	1:1
Tiempo de equilibrio (C)	0 min	15 min	30 min

Tabla 3.8: Matriz del diseño experimental. Superficie de respuesta

Exp	A	B	C
1	-1	-1	-1
2*	-1	-1	0
3	-1	-1	+1
4	-1	0	-1
5	-1	0	0
6*	-1	0	+1
7*	-1	+1	-1
8	-1	+1	0
9	-1	+1	+1
10	0	-1	-1
11	0	-1	0
12	0	-1	+1
13	0	0	-1
14*	0	0	0
15	0	0	+1
16	0	+1	-1
17	0	+1	0
18*	0	+1	+1
19	+1	-1	-1
20	+1	-1	0
21	+1	-1	+1
22*	+1	0	-1
23	+1	0	0
24	+1	0	+1
25	+1	+1	-1
26	+1	+1	0
27	+1	+1	+1

Contaminación de las muestras de suelo

En este caso se optó por contaminar el suelo eliminando el excedente de solución contaminante y poder disponer finalmente de una muestra seca. Se dispuso de tubos de centrifuga cónicos para la contaminación del suelo Quillota en tres niveles diferentes de concentración. Para ello se prepararon soluciones de los cuatro compuestos en conjunto en las concentraciones 0,65; 1,15 y 1,65 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente. Para cada nivel se contaminaron 60 g de suelo con 240 mL de solución, es decir se contaminó en relación solución:suelo 4:1. Con ello se buscó reproducir las condiciones que se emplearon al determinar la adsorción a través de las isothermas. También se incluyó un blanco de 10 gramos de suelo y 40 mL de agua nanopura. Los tubos se agitaron durante 24 horas. Después de transcurrido este tiempo se realizó la centrifugación de los tubos a 12000 rpm durante 20 minutos y se separó la solución del suelo. Se determinó cromatográficamente la concentración de la solución en equilibrio y por diferencia se calculó la cantidad adsorbida. Del suelo se tomó dos gramos para determinar la humedad residual después de centrifugar, con el fin de calcular la concentración final remanente en el suelo, producto de la adsorción y de la solución que quedó humectando la muestra. Finalmente, las muestras se secaron a 30°C en estufa durante la noche, determinando nuevamente la humedad, con el fin de expresar la concentración de contaminante por gramo de suelo seco. Una vez seco el suelo se guardó en el congelador a -27°C hasta la extracción.

Procedimiento de extracción

Se dispuso de 27 tubos de centrifuga cónicos. En cada tubo se pesó 4 gramos del suelo Quillota contaminado previamente en las respectivas concentraciones. A cada tubo se le agregó la cantidad de agua correspondiente al diseño experimental, los tubos se agitaron el tiempo indicado por el mismo. Después de transcurrido el tiempo de agitación, a cada tubo se le agregó 5 mL de acetonitrilo y se procedió a la extracción a una potencia de 8 y a una temperatura de 80°C durante 10 minutos. Inmediatamente después de la extracción los tubos se sumergieron en hielo para enfriarlos. El sobrenadante se diluyó al 50 % en buffer fosfato pH 8,2; se filtró en membranas de tamaño de poro de 0,22 μm . Las muestras se colocaron en viales para la determinación de su concentración por HPLC.

Los resultados de recuperación se obtuvieron por comparación de las áreas obtenidas en las muestras con aquéllas obtenidas de soluciones patrón, preparadas con un 50 % de buffer fosfato pH 8,2; que representaban un 100 % de recuperación, para cada una de las situaciones planteadas en el diseño.

3.6.7 Estudio de las variables ambientales en la eficiencia de la extracción

Este estudio consideró un factor propio del suelo como es la cantidad de materia orgánica en éstos y dos relacionados con el comportamiento del pesticida: el tiempo de residencia del pesticida y sus metabolitos en el suelo y los valores de pKa. Para esto se eligieron los suelos Galvarino, Mapocho y Cunco. Se consideraron los siguientes

tiempos de residencia del pesticida en el suelo: una semana, un mes y dos meses. Se escogieron tres de los cuatro compuestos de acuerdo a su pKa: DEA, AT y HIA.

Se realizó un diseño experimental con 3 factores y tres niveles, lo que representa un total de 27 experimentos de los cuales se hicieron seis repeticiones. En la Tabla 3.9 se presentan los factores y niveles antes mencionados y en la Tabla 3.10 se muestra la matriz del diseño experimental.

Tabla 3.9: Factores y niveles del diseño experimental factores ambientales

factor	Nivel		
	-1	0	+1
Suelo (% MO) (A)	Galvarino	Mapocho	Cunco
Contaminante (pKa) (B)	DEA	AT	HIA
Tiempo de residencia (C)	1 semana	1 mes	2 meses

Tabla 3.10: Matriz del diseño experimental

Exp	A	B	C
1	-1	-1	-1
2*	-1	-1	0
3	-1	-1	+1
4	-1	0	-1
5	-1	0	0
6	-1	0	+1
7	-1	+1	-1
8	-1	+1	0
9	-1	+1	+1
10	0	-1	-1
11	0	-1	0
12	0	-1	+1
13	0	0	-1
14	0	0	0

Exp	A	B	C
15	0	0	+1
16	0	+1	-1
17	0	+1	0
18	0	+1	+1
19	+1	-1	-1
20	+1	-1	0
21	+1	-1	+1
22	+1	0	-1
23	+1	0	0
24	+1	0	+1
25	+1	+1	-1
26	+1	+1	0
27	+1	+1	+1

(*) experimentos realizados en duplicado.

Contaminación de las muestras de suelo

Cada suelo se contaminó directamente con los tres compuestos por separado según el diseño, con una relación agua:suelo en una proporción 1:2 a un nivel de 3 $\mu\text{g/g}$, para lo cual se preparó disoluciones de los compuestos en una concentración de 6 $\mu\text{g/mL}$ de cada uno. Se pesó 30 gramos de suelo, se colocó en vasos de precipitado y se les agregó 15 mL de la solución contaminante, se agitó durante dos horas y luego las muestras se secaron a 30°C en estufa durante la noche. Se determinó la humedad con el fin de expresar la concentración de contaminante por gramo de suelo seco. Una vez secos los suelos se guardaron en frascos plásticos en congelador a una temperatura de -27°C. También se realizó un blanco manteniendo la misma proporción suelo:agua.

Procedimiento de extracción

Transcurrido el tiempo correspondiente al diseño experimental, en tubos de centrífuga cónicos se pesó 4 gramos de suelo, se les agregó 4 mL de agua nanopura, los tubos se taparon y se agitaron durante 30 minutos. Luego se les agregó 5 mL de acetonitrilo y se llevaron al baño de ultrasonido para la extracción a una temperatura de 80°C y a una potencia de 8 durante 10 minutos. Los tubos se sumergieron inmediatamente en hielo, una vez fríos los tubos se centrifugaron a 4000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se diluyó al 50 % con buffer fosfato pH 8,2; se filtró en membranas de 0,22 μm y se colocó en viales para el análisis cromatográfico. Para el cálculo de recuperaciones se trabajó siempre con el estándar de cada compuesto preparado en acetonitrilo, a partir del cual se prepararon las disoluciones contaminantes en medio acuoso y los estándares

necesarios, también en medio acuoso con un 50 % de buffer fosfato pH 8,2; para cada tiempo de extracción (1 semana, 1 mes, 2 meses) que representaban el 100 % de recuperación.

3.6.8 Preconcentración en fase sólida

Se obtuvo un extracto de suelo Quillota sin contaminar (100 mL) con el procedimiento de extracción descrito en la sección 3.6.7. Dicho extracto representaría la matriz co-extraída. A partir de éste se preparó dos muestras de 10 mL cada una, agregando una alícuota de un estándar en acetonitrilo con los cuatro compuestos, de manera tal de alcanzar las concentraciones 0,022 y 0,044 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Las muestras se realizaron en duplicado y se ajustaron a pH 1,5 con HCl, con el fin de poner a todos los compuestos en su forma catiónica. Las concentraciones anteriores se obtendrían al extraer muestras de suelo, contaminadas a un nivel de 0,05 y 0,1 $\mu\text{g/g}$. empleando el método de extracción desarrollado. Se utilizó columnas de extracción Oasis MCX de 6 cm^3 de 150 mg de sorbente. El procedimiento de preconcentración en las columnas consistió en lo siguiente:

- Se acondicionó las columnas con 2 mL de metanol.
- Se lavó con 2 mL de agua.
- Se pesó los 10 mL de muestra a pH 1,5.
- Se realizó un primer lavado con 2 mL de HCl 0,1 mol/L.
- Se realizó un segundo lavado con 2 mL de metanol.
- Finalmente la muestra se eluyó con 3 mL de metanol con NH_4OH al 4 %.

La muestra fue recogida en un balón de 5 mL y se procedió a evaporar a sequedad en un evaporador rotatorio, empleando un baño de agua a 40 °C. Una vez seca la muestra, se reconstituyó con un mL de mezcla acetonitrilo: buffer pH 8,2 1:1 v/v.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Clasificación y características fisicoquímicas de los suelos utilizados

Quillota: suelo perteneciente al orden Alfisol no alofánico de la Quinta Región (Entic Xerumbrept). Se caracteriza por su contenido medio de materia orgánica, es de textura franco-arcillosa.

Cunco: suelo del orden Andisol, perteneciente al grupo de los Trumaos, alofánico de la Novena Región (Ashy, mesic, Hydric Dystrandept). Se caracteriza por su origen de ceniza volcánica, su alto contenido de carbono orgánico y la presencia de alofán (Al-Si) y óxidos de Fe.

Galvarino: suelo del orden Ultisol, perteneciente al grupo de los rojos arcillosos alofánico de la Novena Región (Fine, mesic, Palehumult). Se caracteriza por su poca cantidad de materia orgánica y alofán, rico en óxidos de Fe cristalinos. Origen volcánico.

Mapocho: suelo del orden Inceptisol, no alofánico de la Región Metropolitana (Clayed, mixed, thermic, Vertic Xerochrepts). Se caracteriza por tener un alto contenido de montmorillonita entre los minerales de arcilla.

Las principales características fisicoquímicas de estos suelo se presentan en la Tabla 4.1.

Tabla 4.1: Características fisicoquímicas de los suelos (Aponete, 2003, Báez y col.).

Suelo	% C	% Fe (Ox)	% Al (Ox)	% Si (Ox)	CIC cmol(+)kg ⁻¹	Area (m ² /g)	pH (H ₂ O)	pH (KCl)
Cunco	8,1	1,0	1,7	0,6	79,2	140	4,91	4,73
Galvarino	1,3	2,1	0,5	0,2	28,5	130	5,60	4,76
Mapocho	2,3	0,6	0,5	0,6	33,2	127	7,11	6,41
Quillota	1,8	-	-	-	22,8	66	7,28	6,85

4.2 Estudio del método cromatográfico para la determinación de atrazina y sus metabolitos

Estudio del flujo de la fase móvil

Para concluir en este estudio se calculó la eficiencia de la columna para la elusión de cada analito y condición de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$N = 36 \left(\frac{tr}{\Delta t} \right)^2 \quad (4.1)$$

donde Δt corresponde a la diferencia entre el final y el inicio de la integración de un pico y se obtiene directamente del cromatograma.

DIA, DEA presentan un máximo a 214 nm, HIA a 215,3 nm y AT a 222 nm. En la Tabla 4.2 se presentan los resultados cromatográficos obtenidos para los cuatro compuestos manteniendo fija la composición de la fase móvil y variando el flujo. En la Tabla 4.2 se incluyen también los valores, presión alcanzada, tiempo de retención, tiempos de inicio y final de integración de la señal y el valor de N (número de platos teóricos) para cada condición, para los compuestos determinados en forma independiente.

Tabla 4.2: Influencia del flujo de la fase móvil en la elución (AN:buffer pH 8,2 50:50 v/v)

flujo (mL/min)	presión Psi	Compuesto	t retención (min)	t inicio (min)	t final (min)	t fin-t ini (Δt)	N
1,25	1047	DIA	1,81	1,71	2,31	0,60	328
		HIA	1,77	1,67	2,32	0,65	267
		DEA	2,03	1,89	2,59	0,70	301
		AT	3,22	2,89	3,62	0,73	700
1,5	1275	DIA	1,53	1,41	1,96	0,55	279
		HIA	1,49	1,41	1,91	0,50	320
		DEA	1,70	1,50	2,04	0,54	357
		AT	2,70	2,53	3,15	0,62	683
1,75	1500	DIA	1,33	1,21	1,66	0,45	314
		HIA	1,30	1,22	1,6	0,38	421
		DEA	1,47	1,37	1,86	0,49	324
		AT	2,32	2,18	2,73	0,55	641
2,0	1722	DIA	1,17	1,09	1,49	0,40	308
		HIA	1,15	1,07	1,41	0,34	412
		DEA	1,30	1,22	1,64	0,42	343
		AT	2,08	1,93	2,46	0,53	554

Se observa que un aumento del flujo de la fase móvil provoca una disminución en los tiempos de retención tanto para atrazina como para sus metabolitos, debido a que al aumentar el flujo se produce menor interacción entre el analito y la fase estacionaria. Los picos cromatográficos se hacen cada vez más angostos, condición favorable para la cuantificación, especialmente de los metabolitos. Por otra parte, si se comparan los valores de N, la columna resulta muy eficiente principalmente para atrazina, aun cuando en relación al flujo no se defina claramente un óptimo hacia los mayores valores de flujo, lo que si ocurre para los metabolitos, especialmente para HIA. En todos los casos se produjo una superposición de DIA y HIA y hacia los mayores valores de flujo, se produciría un solapamiento severo incluyendo DEA. De acuerdo a estos resultados se fijó el flujo de fase móvil en 2 mL/min, debido a que se obtienen anchos de picos menores.

Estudio de la composición de la fase móvil

Los resultados de este estudio se encuentran en la Tabla 4.3. En ésta también se muestran: la presión, el tiempo de retención y los tiempos de inicio y final de la integración, obtenidos para los cuatro compuestos en las diferentes condiciones en forma individual.

Tabla 4.3: Influencia de la composición de la fase móvil en la elusión

% AN	Presión Psi	compuesto	t retención (min)	t inicio (min)	t final (min)	t fin-t ini (Δt)
20 %	2112	DIA	2,27	2,12	2,67	0,55
		HIA	3,30	3,10	3,85	0,75
		DEA	3,66	3,41	4,29	0,88
		AT	17,10	16,30	17,76	1,46
30 %	2031	DIA	1,57	1,44	1,91	0,47
		HIA	1,70	1,56	2,06	0,50
		DEA	2,08	1,95	2,43	0,48
		AT	6,09	5,78	6,79	1,01
40 %	1896	DIA	1,31	1,21	1,63	0,42
		HIA	1,29	1,21	1,64	0,43
		DEA	1,55	1,45	1,85	0,40
		AT	3,17	2,97	3,62	0,65
50 %	1722	DIA	1,17	1,09	1,49	0,40
		HIA	1,15	1,07	1,41	0,34
		DEA	1,30	1,22	1,64	0,42
		AT	2,08	1,93	2,46	0,53

El CH_3CN es menos viscoso que el H_2O ($\eta_{\text{CH}_3\text{CN}} = 0,37$ y $\eta_{\text{H}_2\text{O}} = 1$ a 20°C) por lo que al aumentar el porcentaje de CH_3CN se produce una menor resistencia de la columna y por lo tanto una menor presión. También se produce una disminución en los tiempos de retención y de los anchos de los picos.

Una columna de fase inversa se caracteriza porque su fase estacionaria es apolar, la cual tiene una mayor afinidad por los compuestos apolares, sobre todo si se tiene en cuenta la utilización de una fase móvil polar como es en este caso el agua. Esto se observa claramente en los resultados obtenidos para la composición 20:80 AN/ H_2O en donde los

compuestos más polares DIA, DEA y HIA se eluyen primero con tiempos de retención de 2,27; 3,30 y 3,66 minutos, respectivamente y la atrazina, que es el compuesto más apolar de los cuatro, se queda retenida por un tiempo de 17,10 minutos. Al aumentar el porcentaje de acetonitrilo se disminuye la polaridad de la fase móvil, debido a que el acetonitrilo presenta un menor índice de polaridad que el agua ($P_{\text{CH}_3\text{CN}} = 5,8$, $P_{\text{H}_2\text{O}} = 10,2$), de esta forma se explica la disminución en los tiempos de elusión para los cuatro compuestos, especialmente para AT cuyo tiempo de elusión disminuye de 17,10 a 2,08 minutos cuando el porcentaje de acetonitrilo se aumenta de 20 a 50 %. A partir de estos resultados se pudo concluir que era necesario desarrollar un sistema en gradiente para la completa separación de los cuatro compuestos.

Determinación simultánea de atrazina y sus metabolitos

En la Tabla 4.4 se presentan los resultados cromatográficos obtenidos a partir de los cuatro programas en gradiente estudiados. Con el fin de comparar los resultados se calculó el % de resolución del primer compuesto respecto del adyacente utilizando la ecuación.

$$R = \left(\frac{S_1 - S}{S_1} \right) \times 100 \quad (4.2) \quad (\text{Verdú-Andrés y col, 2001})$$

Donde S_1 es la altura del pico y S representa la altura del valle entre el primer y segundo pico.

En el caso de AT se calculó respecto de un compuesto co-eluyente proveniente del sistema.

Tabla 4.4: Resolución de DIA, HIA, DEA y AT en gradiente.

Grad.	DIA		HIA		DEA		AT	
	t ret (min)	% resol	t ret (min)	% resol	t ret (min)	% resol	t ret (min)	% resol
1	2,39	87	2,81	82	3,61	100	8,22	85
2	2,98	90	3,49	84	4,48	100	9,69	93
3	2,69	99	3,44	96	4,34	100	7,39	95
4	2,08	100	2,73	100	3,33	100	7,89	100

Como se observa de los datos, tanto el programa 3 como 4 permiten una buena resolución. Ello se logra disminuyendo en el inicio del programa la concentración de acetonitrilo desde 25 a 22 %. Una disminución del flujo desde 1,5 a 1,2 mL/min, no mejoró la resolución. Los primeros tres programas sin embargo generan señales interferentes derivadas del exceso de acetonitrilo en las etapas finales (55 %). En el gradiente 4 se manifiesta una ausencia total de dichas señales, sin afectar mayormente el tiempo de retención de la atrazina, con una concentración de 37 % de acetonitrilo. En la Figura 4.1 se presentan los cromatogramas correspondientes a los cuatro programas. Entre los cuatro gradientes no se presentaron mayores diferencias en cuanto a eficiencia cromatográfica para AT, DEA y DIA, sin embargo, en todos los casos se produce un desdoblamiento de la señal de HIA. Esta situación es atribuible a que este compuesto es el más susceptible de presentarse simultáneamente en la forma molecular e ionizada debido a su pKa (5,3). De acuerdo al vehículo empleado para la inyección (acetonitrilo) y al recorrido que sufre la muestra desde que fue inyectada y llega al detector, a pesar de ser transportada por una fase móvil controlada en su pH, no alcanza a presentarse en su forma molecular en su totalidad. Ello fue atribuido a la menor longitud de la

columna (15 cm), pues dicha situación no fue observable en columnas de mayores dimensiones.

Con el objetivo de mejorar la señal se realizó un estudio de la mejor composición del vehículo de inyección, mediante la adición de cantidades variables del buffer a la solución del estándar (preparado inicialmente en acetonitrilo): mezcla AN:buffer = 8,2 100:0; 75:25; 50:50 y 25:75 v/v. En la Figura 4.2 se observa el efecto de la mayor concentración de buffer, tanto para el caso de HIA individualmente, como para los cuatro compuestos conformando la mezcla, mejorando la eficiencia cromatográfica en los tres primeros compuestos eluyentes. Finalmente, se optó por la mezcla 50:50, debido a la calidad de la señal y a la mayor facilidad para la preparación del estándar de calibración y posteriormente de las muestras. La columna Sorbax SB-C8 está diseñada para reducir o eliminar la fuerte adsorción de compuestos básicos, lo que se traduce en tiempos de retención menores y en la posibilidad de lograr la separación de compuestos de polaridad similar. Ello permitiría también trabajar en presencia de los materiales húmicos solubles que se extraerán tanto con disolventes orgánicos como acuosos desde los suelos.

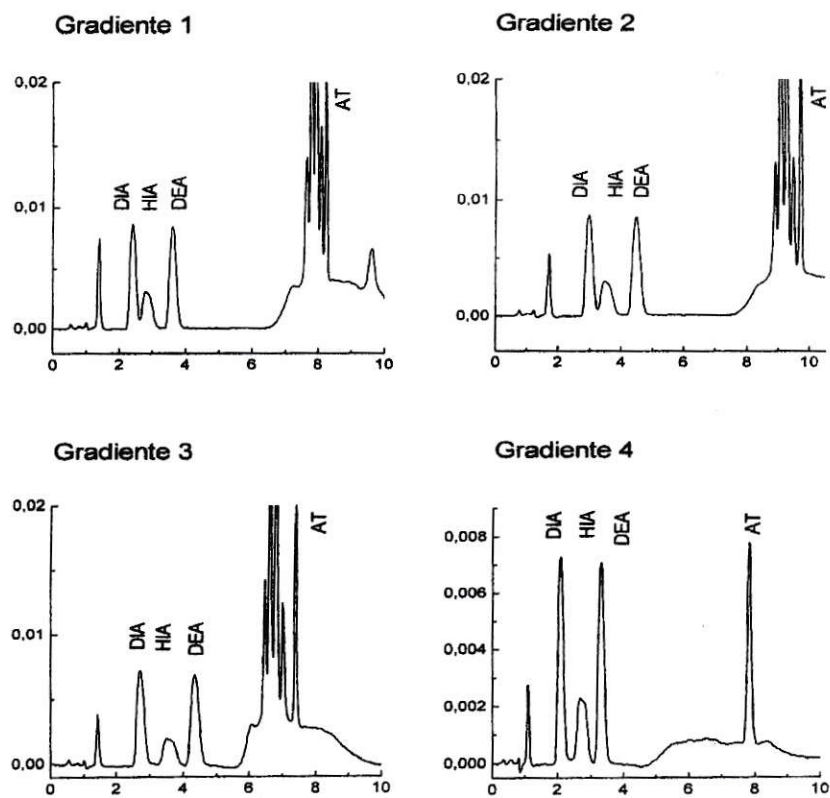


Figura 4.1: Cromatogramas de los cuatro programas en gradiente: Gradiente 1, gradiente 2, gradiente 3, gradiente 4. El eje de la ordena corresponde al tiempo en minutos y el eje de la abcisa, a la absorbancia en mUA.

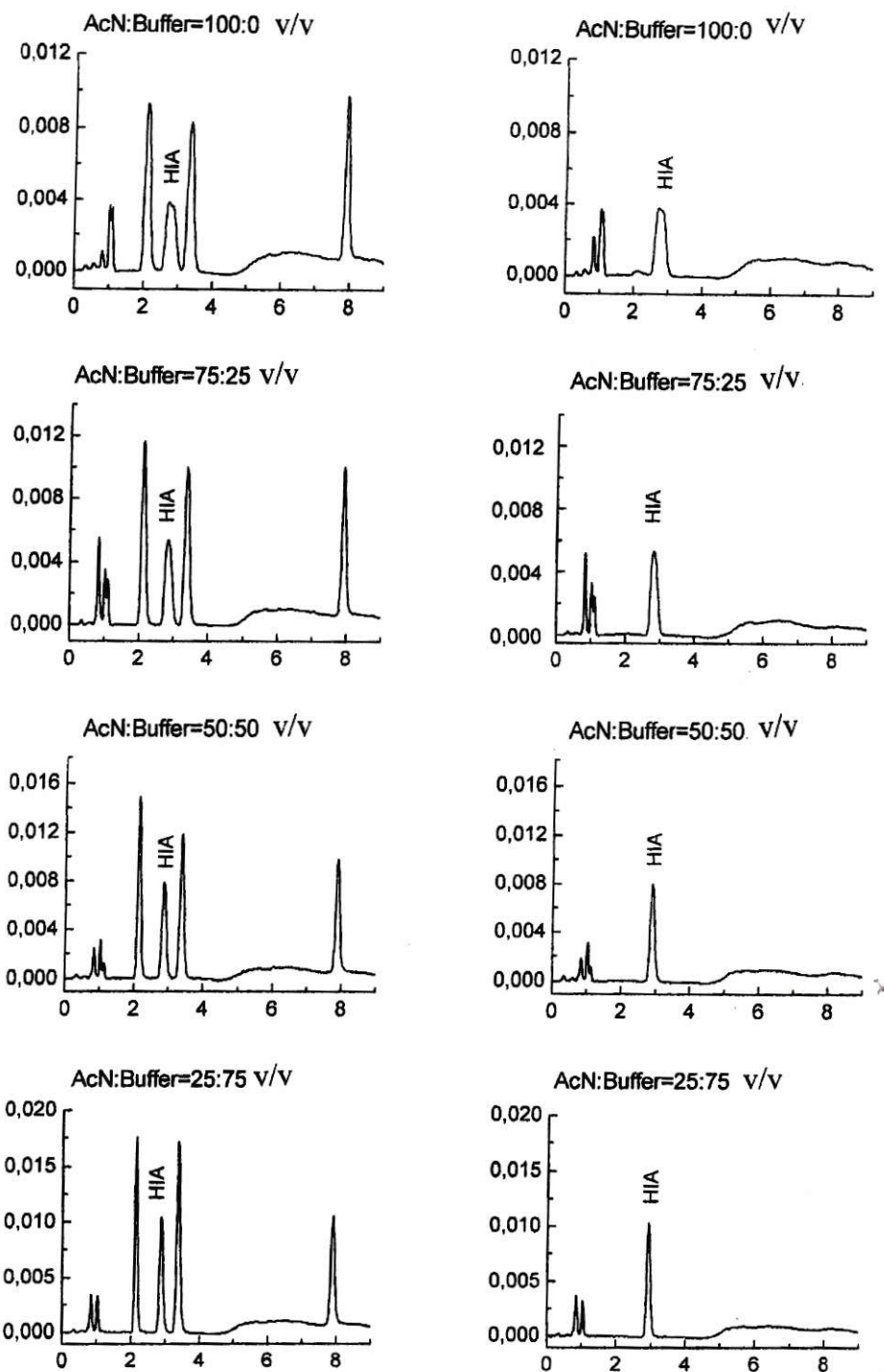


Figura 4.2: Influencia de la cantidad de buffer en la muestra. El eje de la ordenada corresponde al tiempo en minutos y el eje de la abscisa, a la absorbancia en mUA.

4.3 Cálculo de los parámetros de calidad analítica para la separación en gradiente.

La separación cromatográfica en gradiente obtenida permite dejar fuera las interferencias debidas a otras especies contenidas en la matriz de la muestra, además permite el análisis de las muestras en un tiempo de diez minutos incluyendo el tiempo de estabilización de las condiciones iniciales para la siguiente inyección. Los tiempos de retención para DIA, HIA, DEA y AT fueron 2,08; 2,73; 3,33 y 7,89 minutos, respectivamente.

El límite de detección LOD se determinó tomando en cuenta que en este caso la técnica no permite determinar un blanco, para lo cual se utilizó la siguiente relación que es una aproximación del límite de detección estadístico (Cuadros y col., 1993).

$$LOD = 3 \left(\frac{S_{y/x}}{b} \right) \sqrt{\frac{n-1}{n-2}} \quad (4.3)$$

Donde b y $S_{y/x}$ son la pendiente y la desviación estándar de la regresión. Para obtener LOQ se utiliza la misma relación reemplazando el valor 3 por 10.

La sensibilidad analítica, que corresponde a la variación más pequeña de concentración que el método analítico puede definir se calculó por medio de la siguiente relación:

$$sa = \frac{S_{y/x}}{b} \quad (4.4)$$

La linealidad suele expresarse en términos del coeficiente de correlación (r) y el coeficiente de determinación (r^2), pero una relación matemática que describe mejor la calidad de los datos analíticos es la siguiente:

$$linealidad = 1 - \left(\frac{S_b}{b} \right) \times 100 \% \quad (4.5)$$

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

Los parámetros de calidad analítica calculados se observan en las Tablas 4.5 y 4.6 para los cuatro compuestos, en los dos intervalos de calibración.

Los resultados indican que la respuesta del detector es lineal con valores de r^2 superiores al 99.98 % en el intervalo de concentraciones estudiadas.

Tabla 4.5: LOD, LOQ y sensibilidad para la determinación de DIA, HIA, DEA y AT por HPLC-DAD (intervalo de calibración 0,02-0,10 $\mu\text{g/mL}$)

	$a \pm S_a$	$b \pm S_b$	$S_{Y/X}$	LOD ($\mu\text{g/mL}$)	LOQ ($\mu\text{g/mL}$)	Sensibilidad ($\mu\text{g/mL}$)
DIA	$383,4 \pm 77.6$	104360 ± 1170	104,7	0,0028	0,0094	0,0001
HIA	$205,4 \pm 40.3$	57210 ± 608	54,4	0,0027	0,0090	0,001
DEA	$237,4 \pm 84.8$	95395 ± 1278	1144,3	0,0034	0,0112	0,0012
AT	$-415,7 \pm 25.8$	104685 ± 389	34,8	0,0009	0,0031	0,0003

Tabla 4.6: Linealidad para la determinación de DIA, HIA, DEA y AT por HPLC-DAD (intervalo de calibración 0,02-5,0 $\mu\text{g/mL}$)

	$a \pm S_a$	$b \pm S_b$	$S_{Y/X}$	r	r^2 %	Linealidad %
DIA	-276 ± 468	104684 ± 260	1720	0,9999	99,99	99,75
HIA	-42 ± 376	65159 ± 208	1379	0,9999	99,88	99,68
DEA	-1185 ± 549	104462 ± 304	2014	0,9999	99,98	99,71
AT	-500 ± 306	101698 ± 170	1123	0,9999	99,99	99,83

Los resultados muestran que los límites de detección para los cuatro compuestos están dentro del mismo orden, siendo la atrazina la que presenta el límite de detección más bajo. Los valores de LOD y LOQ son apropiados para el estudio de los cuatro compuestos en extractos de suelos que provengan de sistemas en donde se hayan empleado relaciones de extracción suelo extractante 1:10, teniendo una concentración de 0,5 $\mu\text{g/g}$ y también de 0,1 $\mu\text{g/g}$. En estas condiciones se alcanzarían concentraciones en los extractos iguales a 0,05 y 0,01 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

La atrazina presenta los mejores parámetros analíticos, incluyendo la sensibilidad analítica y linealidad. La hidroxiatrazina presenta la menor sensibilidad, sin embargo no se ven afectados el resto de los parámetros.

En la Figura 4.3 se muestra los gráficos de las curvas de calibración en los intervalos de concentraciones 0,02-0,1 $\mu\text{g/mL}$ y 0,02-5,0 $\mu\text{g/mL}$ para los cuatro compuestos.

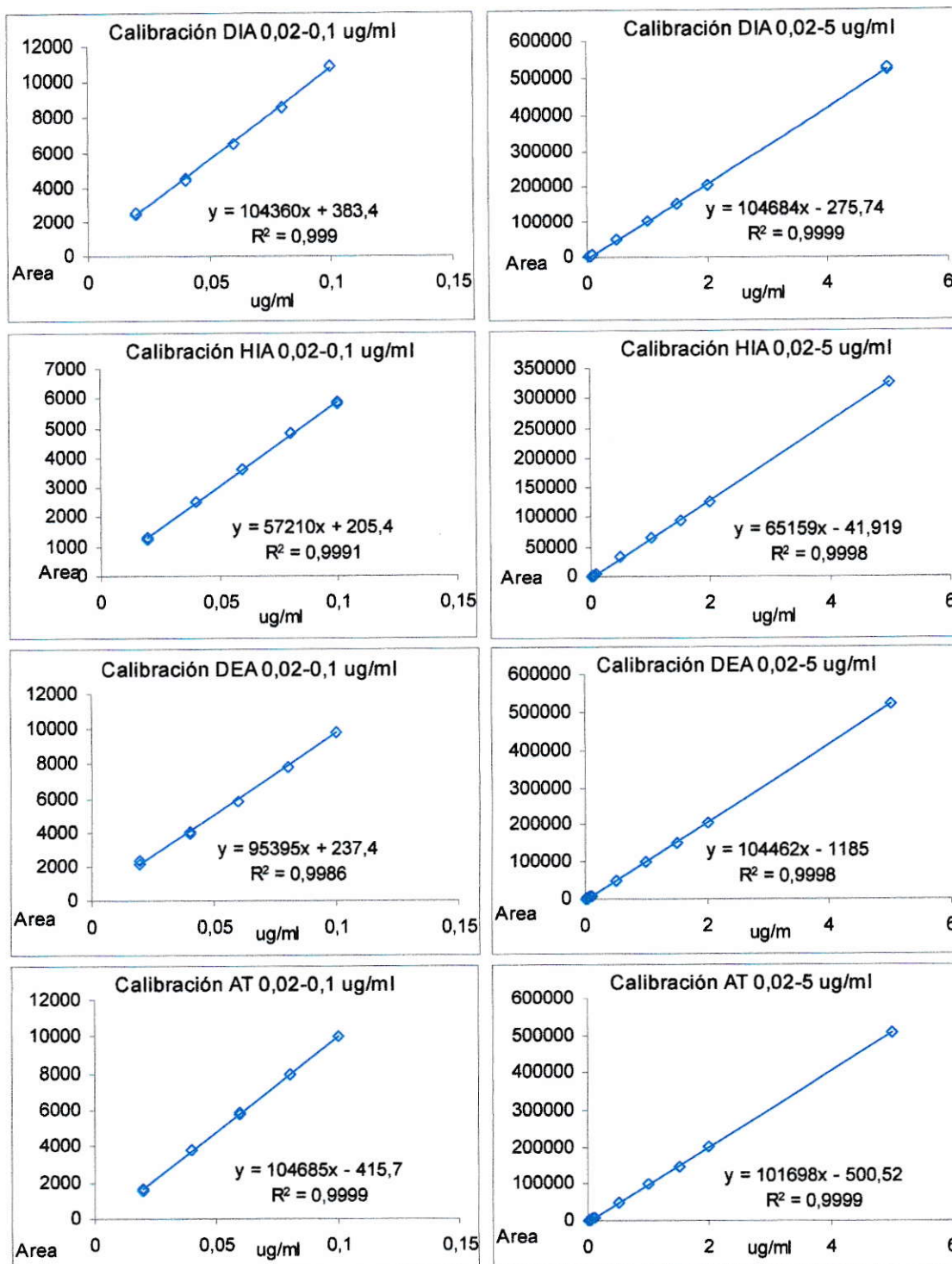


Figura 4.3: Curvas de calibración para DIA, HIA, DEA y AT en los rangos 0,02-0,1 µg/mL y 0,02-5 µg/mL

4.4 Estudio del comportamiento de adsorción de atrazina y sus metabolitos en 4 suelos

Se determinaron las isothermas usando el modelo empírico descrito por Freundlich el cual relaciona las concentraciones del adsorbato en la fase acuosa y en el adsorbente, en este caso el suelo, luego del proceso de adsorción. La relación matemática que usa el modelo es:

$$\frac{x}{m} = K_f * C^{\frac{1}{n}} \quad (4.6)$$

Donde x/m es la concentración del pesticida adsorbida en el suelo, C es la concentración en equilibrio del pesticida en la fase acuosa, K_f y n son constantes empíricas. La constante n es una medida de la no-linealidad de la isoterma e indica la dependencia de la adsorción con la concentración. K_f puede ser utilizado para comparar la adsorción relativa de un compuesto sobre diferentes sorbentes.

En la Tabla 4.7 se presentan los valores de las constantes de Freundlich, $1/n$ y del coeficiente de determinación r^2 obtenidas para las isothermas de adsorción de los cuatro suelos tanto para los compuestos por separado como para los cuatro compuestos en conjunto.

Tabla 4.7: Valores de K_f , $1/n$ y r^2 para DIA, HIA, DEA y AT en los suelos

		Suelo Galvarino	Suelo Quillota	Suelo Mapocho	Suelo Cunco
DIA	K_f	1,039	1,9187	1,1432	9,2489
	$1/n$	0,8566	0,5857	0,6252	0,6268
	r^2	0,9913	0,9993	0,9906	0,9966
	K_f	0,7073	1,2067	0,7387	4,4768
	$1/n$	0,649	0,6407	0,8119	0,5534
	r^2	0,9792	0,9899	0,9911	0,9933
HIA	K_f	36,181	5,4713	11,603	21,701
	$1/n$	0,7867	0,5464	0,8399	0,4507
	r^2	0,9948	0,9926	0,9892	0,9982
	K_f	37,136	3,1755	9,5626	17,991
	$1/n$	0,842	0,9517	1,1913	0,665
	r^2	0,9793	0,9939	0,9867	0,9905
DEA	K_f	0,715	1,4011	0,797	6,6202
	$1/n$	0,54	0,5634	0,6027	0,7019
	r^2	0,9924	0,9952	0,9973	0,9972
	K_f	0,5077	0,7257	0,275	2,9358
	$1/n$	0,4814	0,9505	1,292	0,6464
	r^2	0,9751	0,9854	0,9908	0,9899
AT	K_f	0,8996	2,4443	1,517	10,082
	$1/n$	0,8388	0,7232	0,7743	0,7803
	r^2	0,9925	0,9985	0,9975	0,9975
	K_f	0,8394	1,5076	1,1548	4,7544
	$1/n$	0,7177	0,6546	0,7988	0,6683
	r^2	0,9863	0,9917	0,9925	0,9836

(*) Isotermas realizadas con los cuatro compuestos en mezcla

El ajuste al modelo de Freundlich entregó coeficientes de determinación que varían en el intervalo 0,9993 - 0,9906 para los compuestos puros y en el intervalo 0,9939 - 0,9751 para los cuatro compuestos en mezcla.

En la Figura 4.4 se presentan los resultados para las isotermas individuales de deisopropilatrizona, deetilatrizona, hidroxilatrizona y atrazina en los cuatro suelos. Para DIA, DEA y AT los valores de K_f muestran una alta adsorción en el suelo Cunco y la adsorción más baja en el suelo Galvarino. Esto coincide con los contenidos de materia orgánica presente en los suelos y además con la capacidad de intercambio catiónico de los mismos (Tabla 4.1), siendo el suelo Cunco el que presenta un mayor contenido de

materia orgánica y una mayor reactividad representada por su valor de CIC. De esta forma se explican también los bajos valores de K_f que presentan estos tres compuestos en el suelo Galvarino. La materia orgánica juega un papel muy importante en la adsorción de estos compuestos en el suelo, en especial los ácidos húmicos, debido a la gran capacidad de éstos de formar enlaces del tipo puente de hidrógeno con los compuestos en estudio.

La hidroxiatrazina presentó un comportamiento muy diferente. Los valores de K_f indican que la mayor adsorción la presenta el suelo Galvarino encontrando un valor incluso mayor que los obtenidos en el suelo Cunco para los otros compuestos y para la propia hidroxiatrazina. En general, también presenta una considerable adsorción en todos los suelos.

Un factor importante en la adsorción de HIA en los suelos está relacionado con la diferencia que existe entre su pK_a y el pH de la solución de suelo. Al pH de éstos, AT, DEA y DIA se encuentran en forma molecular, sin embargo, HIA con un pK_a de 5,2 se encontraría en la forma protonada (aproximadamente un 60 % en un suelo de pH 5,0, como es el caso de los suelos Cunco y Galvarino), lo que permitía un mecanismo de adsorción adicional. Esto explica la mayor adsorción de HIA sobre los 4 suelos con respecto a los otros compuestos. Al pH de los suelos los grupos alcohólicos y fenólicos del ácido húmico con un pK_a aproximado de 8, se asume que están en forma molecular, mientras que los grupos carboxílicos con un pK_a de 5,2 coexisten en la forma molecular y aniónica, de esta forma se producen enlaces iónicos entre el ácido húmico ionizado y la forma protonada de la HIA.

En el caso del suelo Galvarino, éste se caracteriza por su bajo contenido de materia orgánica y la presencia de minerales del tipo caolinita. En este mineral los enlaces de hidrógeno pueden ser mayores para HIA que para los otros tres compuestos debido a la forma cetónica de ésta, observada con frecuencia en arcillas. Además la acidez superficial de la caolinita permite que se produzca el fenómeno de intercambio catiónico con la HIA en forma protonada (Moreau y Kervevan, 1998). De esta forma se explica que este suelo solo presente una gran adsorción de HIA a diferencia de lo que pasa con AT, DIA y DEA.

Los resultados obtenidos del estudio de las isotermas de los cuatro compuestos en mezcla en los cuatro suelos, realizado con el fin de determinar los posibles fenómenos de competencia por los sitios de adsorción muestran una disminución para DIA, DEA y AT. A pesar de que también se observa una disminución de HIA en los suelos ésta es mucho menor que para los otros tres compuestos, sobre todo en el caso del suelo Galvarino en donde ésta se mantiene sin variación. La Figura 4.5 corresponde a las isotermas de DEA en el suelo Cunco, tanto la realizada en forma individual como la realizada en mezcla de los cuatro compuestos. Además se presenta la misma comparación para HIA. En éstos se observa con mayor claridad la diferencia en la disminución de DEA en el suelo Cunco, el cual contiene como ya se señaló un alto contenido de materia orgánica, sin embargo en el mismo suelo la adsorción de HIA varía muy poco. Como ya se ha visto, en la adsorción de AT, DEA y DIA, predominan los mecanismos basados en los contenidos de materia orgánica por lo que se genera una competencia entre ellos, a diferencia de los mecanismos adicionales y de gran importancia para HIA.

Los antecedentes anteriores constituyen una base para el diseño y la interpretación de los resultados de los estudios del método de extracción.

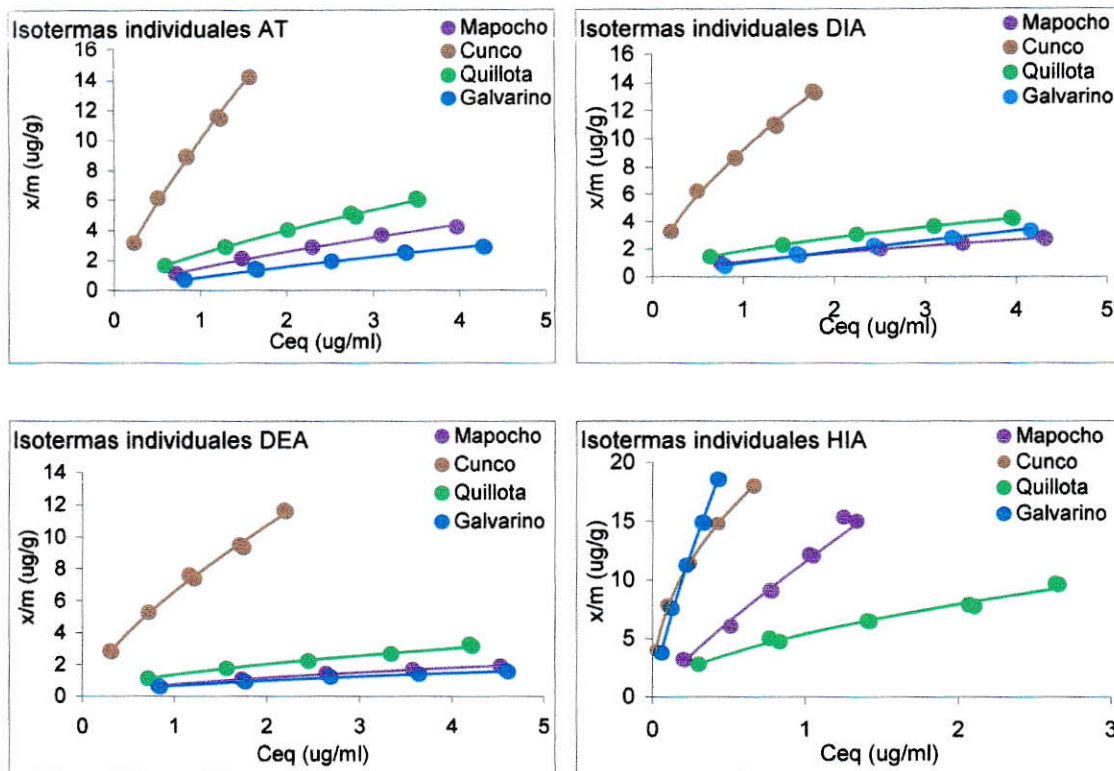


Figura 4.4 Isothermas de los cuatro compuestos en forma individual en los cuatro suelos

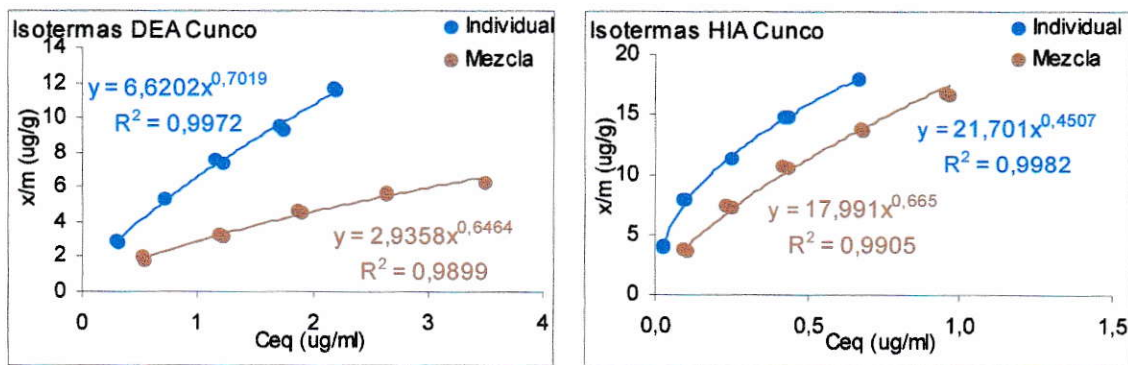


Figura 4.5 Isothermas de deetilatrazina e hidroxiatrazina en suelo Cunco en forma individual y en mezcla.

4.5 Estudio de los parámetros instrumentales del método de extracción. “Screening factor”

En la Tabla 4.8 se muestra la matriz de respuesta representada por los valores de porcentaje de recuperación de los cuatro compuestos para los 32 experimentos descritos en la matriz experimental (sección 3.6.5)

Tabla 4.8: Matriz de respuesta “Screening factor”

exp	% DIA	% HIA	% DEA	% AT	exp	% DIA	% HIA	% DEA	% AT
1*	95,02	81,67	93,55	96,87	17	96,08	83,16	95,86	97,49
2	96,70	86,65	96,02	97,73	18	95,77	83,15	97,66	98,69
3	96,13	88,44	97,50	95,84	19*	97,77	87,29	97,98	98,81
4	96,19	91,51	94,87	95,39	20	99,56	91,75	98,95	99,02
5*	98,08	84,41	96,71	97,30	21	95,60	84,48	95,15	95,43
6	98,44	84,35	96,26	96,73	22	96,87	85,28	95,95	97,03
7	97,75	93,83	98,19	98,49	23*	99,31	94,17	99,18	99,49
8	99,03	93,40	98,75	99,00	24	99,89	94,62	99,78	99,98
9	92,38	79,42	97,61	97,47	25	95,13	79,05	94,28	97,21
10*	97,61	81,22	97,44	95,96	26	98,55	84,62	98,20	95,19
11	97,42	77,82	98,90	97,33	27	94,47	85,81	96,32	92,96
12	96,29	87,51	96,47	99,29	28*	94,83	89,36	94,56	96,94
13	95,96	84,74	97,12	95,15	29	96,86	86,89	96,06	95,20
14*	95,89	81,83	97,46	96,03	30	95,62	85,78	98,73	98,01
15	97,48	85,03	97,99	94,87	31	96,42	89,83	95,45	94,48
16	96,97	83,31	95,97	95,13	32*	96,89	89,87	99,11	94,03

*experimentos realizados en duplicado

Los porcentajes de recuperación variaron entre 92,38 y 99,89 % para deisopropilatrazina, 79,05 y 94,62 % para hidroxiatrazina, 93,55 y 99,78 % para deetilatrazina y 92,96 y 99,98 % para atrazina.

A estos resultados se les realizó análisis de varianza (ANOVA) mediante el software Statgraphics en la versión 4.0, que permite describir el sistema mediante un modelo lineal de primer orden, de esta forma se puede encontrar la relación entre el porcentaje

de extracción de atrazina y sus metabolitos y las cinco variables que se estudiaron en el diseño.

El error estimado es calculado por el Software a través de la siguiente expresión:

$$S = \sqrt{\frac{\sum (X_{i1} - X_{i2})^2}{2n}} \quad (4.7)$$

donde x_{i1} y x_{i2} son los experimentos realizados en duplicado, el primero y el replicado respectivamente, n es el número de experimentos.

El análisis estadístico, entrega los efectos estimados de cada factor y de sus interacciones. La significancia de los factores se obtuvo comparando el valor de los cuadrados medios de los efectos y sus interacciones con el valor del estimado del error experimental al cuadrado de donde se obtienen los valores de “p-value”. Si dichos valores son menores que 0,05 se considera que el factor es estadísticamente significativo a un nivel de confianza de 95 %. En este caso la hipótesis nula es que el efecto no es significativo y el menor valor de “p-value” es evidencia de que la hipótesis no se cumple. Además para probar la idoneidad del modelo, se llevó a cabo el test de carencia de ajuste o “Lac-of-fit”, de esta forma el análisis se hace mas sensible y se puede discriminar la contribución de cada factor en la variabilidad de los datos.

En la Tabla 4.9 se muestran los valores de los efectos de los factores y sus interacciones.

Tabla 4.9: Efectos de los factores y valor de probabilidad del análisis de varianza (ANOVA). "Screening factor"

factor	DIA		HIA		DEA		AT	
	efecto	p-value	Efecto	p-value	efecto	p-value	efecto	p-value
A: cantidad muestra	0,0841	0,6486	1,9199	0,0071	0,1133	0,5687	-0,0102	0,9235
B: volumen disolvente	-1,5387	0,0000	-3,2202	0,0001	-0,3282	0,1235	-1,9135	0,0000
C: potencia	1,4430	0,0000	2,7301	0,0002	0,9273	0,0008	0,2674	0,0260
D: temperatura	1,0028	0,0004	5,8353	0,0000	1,009	0,0006	0,3450	0,0098
E: tiempo extracción	0,0507	0,7869	0,3624	0,5912	0,8874	0,0014	0,2076	0,0800
AB	-0,3155	0,1110	1,7556	0,0127	-0,8099	0,0022	-1,0405	0,0000
AC	-0,7056	0,0033	0,1906	0,7722	-0,1303	0,5124	-0,4093	0,0032
AD	0,0318	0,8620	0,6836	0,3042	0,0892	0,6518	-0,2130	0,0685
AE	-0,4990	0,0225	-2,2029	0,0028	-0,5318	0,0231	-0,4033	0,0039
BC	-0,4250	0,0371	0,3611	0,5750	-0,3517	0,0919	-0,7694	0,0000
BD	-0,5917	0,0103	-2,1065	0,0043	-1,3942	0,0001	-0,8578	0,0000
BE	0,0836	0,6573	-0,0793	0,9061	-0,3231	0,1327	0,07699	0,4832
CD	0,0881	0,6329	0,2810	0,6699	0,3303	0,1180	0,1284	0,2437
CE	0,0162	0,9286	-0,0594	0,9271	-0,2746	0,1793	0,4110	0,0029
DE	-0,0797	0,6780	0,4562	0,5081	0,1391	0,5029	0,4579	0,0021
Estimado del error	1,3488		1,9917		0,5847		0,3149	

Los valores en negrita representan los factores significativos.

La potencia y la temperatura son significativas para los cuatro compuestos con un efecto positivo sobre la extracción, mientras que el efecto volumen de disolvente fue significativo para DIA, HIA y AT en sentido negativo lo que indica que el uso de un menor volumen de disolvente induce a una mayor recuperación, esto se puede atribuir a que la energía de ultrasonido tendrá una mayor eficiencia a medida que actúe sobre una menor masa de disolvente. En el caso de DEA el efecto es muy bajo comparado con el error estimado experimental. De los valores de los efectos estimados, se puede deducir que la HIA es la que entrega mayor información sobre la influencia de los factores en las posibilidades de recuperación de los analitos. En los casos anteriormente mencionados, puede señalarse que a pesar del efecto significativo de algunos factores, ello no da lugar

a diferencias muy importantes en los porcentajes de recuperación, especialmente si se tiene en cuenta que éstos superan en todos los casos el 92 %.

En las Figuras 4.6 a la 4.9 se presentan los gráficos de Pareto en donde se ordenan los efectos estimados y sus interacciones en orden decreciente de importancia para los cuatro analitos en estudio.

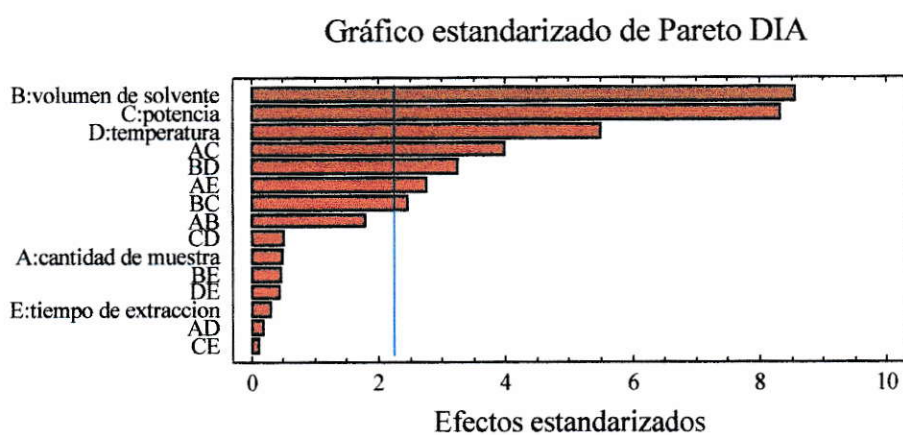


Figura 4.6: Gráfico estandarizado de Pareto para DIA

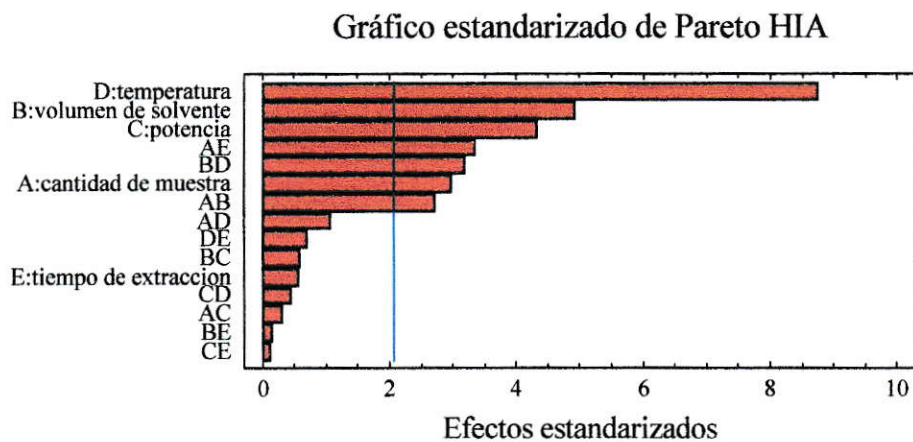


Figura 4.7: Gráfico estandarizado de Pareto para HIA

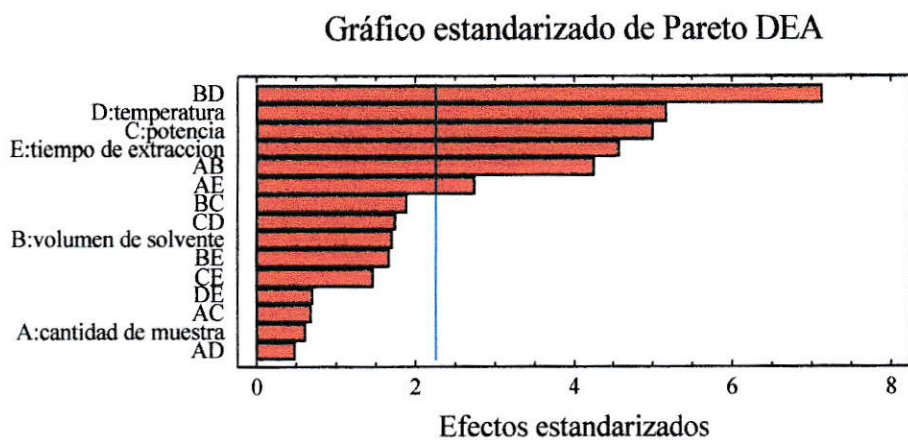


Figura 4.8: Gráfico estandarizado de Pareto para DEA

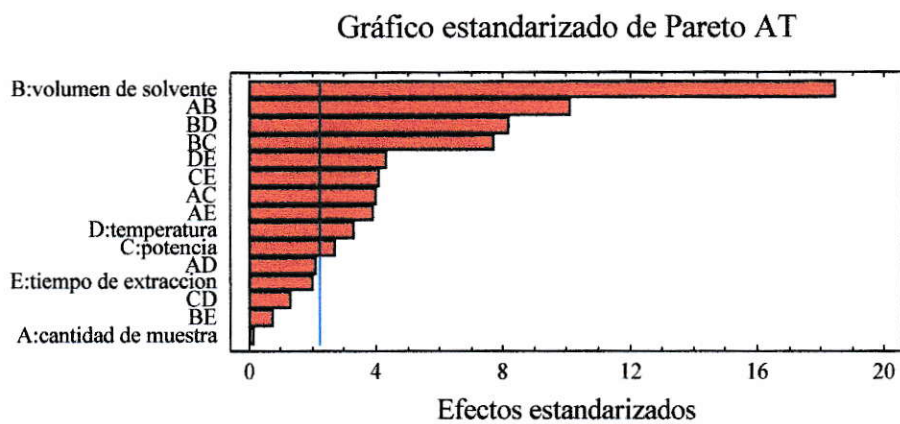


Figura 4.9: Gráfico estandarizado de Pareto para AT

4.6 Estudio de los factores relacionados con el comportamiento del plaguicida en la muestra. Modelación a través de superficie de respuesta

Luego de haber identificado los factores que tienen significancia en la diferencia en los porcentajes de recuperación observados en la matriz de respuesta del “screening factor” para los cuatro compuestos, se optimizó el método de extracción. En la Tabla 4.10 se muestra la matriz de respuesta para el diseño experimental descrito en la sección 3.6.6 el cual se realizó usando la metodología de superficie de respuesta.

Tabla 4.10: Matriz de respuesta. Superficie de respuesta

exp	DIA %rec	HIA %rec	DEA %rec	AT %rec	exp	DIA %rec	HIA %rec	DEA %rec	AT %rec
1	48,16	0	44,50	51,32	14*	95,96	56,04	71,40	77,49
2*	50,68	0	45,93	47,49	15	95,53	61,48	71,65	75,38
3	51,22	0	46,91	52,76	16	75,07	59,07	83,43	74,60
4	88,89	59,25	70,36	76,62	17	85,66	63,30	89,78	87,64
5	86,09	58,80	68,70	74,08	18*	97,49	71,72	96,38	92,86
6*	89,31	56,25	71,31	79,14	19	59,03	0	58,61	55,84
7*	91,90	57,88	80,92	76,72	20	56,65	0	56,68	56,23
8	91,06	57,94	82,47	84,41	21	57,77	0	54,08	57,78
9	99,28	66,44	99,47	93,52	22*	72,10	49,37	59,92	57,39
10	59,39	0	55,12	55,21	23	96,69	56,92	69,72	79,50
11	61,28	0	53,29	57,56	24	96,37	66,00	74,18	82,03
12	60,34	0	54,21	53,39	25	95,97	68,72	87,03	80,83
13	92,17	55,89	68,53	75,30	26	99,09	71,42	87,20	93,22
					27	99,80	73,99	98,53	94,50

(*) experimentos realizados en duplicado.

Los porcentajes de recuperación variaron entre 48,16 y 99,80 % para deisopropilatrizona, 0 y 71,72 % para hidroxiatrazina, 44,50 y 99,47 % para deetilatrizona y 47,49 y 93,90 % para atrazina.

Nuevamente el análisis de varianza evalúa la significancia estadística de los factores, de esta forma se puede determinar si los factores son o no significativos a un nivel de confianza dado. En este caso también se usó el nivel de confianza de 95 % ($\alpha=0,05$). Para determinar la importancia de los factores analizados en este diseño se comparan los valores de “p-value” o valor de probabilidad de cada factor con el valor de significancia que en este caso corresponde a 0,05. La Tabla 4.10 muestra el análisis de varianza correspondiente al diseño experimental empleado.

Tabla 4.11: Efecto de los factores y valor de probabilidad del análisis de varianza (ANOVA). Superficie de respuesta

Deisopropilatrizona		
factor	efecto	p-value
A: Concentración	2,6806	0,3525
B: Relac agua:suelo	37,1501	0,0000
C: Tpo de equilibrio	7,7941	0,0114
AA	-3,2907	0,5087
AB	-2,6668	0,4617
AC	5,0714	0,1566
BB	-30,2843	0,0000
BC	4,2785	0,2420
CC	-3,3736	0,4982

hidroxiatrizona		
factor	efecto	p-value
A: Concentración	1,6732	0,1913
B: Relac agua:suelo	65,8184	0,0000
C: Tpo de equilibrio	5,6858	0,0001
AA	0,0358	0,9869
AB	4,8790	0,0049
AC	1,5338	0,3245
BB	-48,1481	0,0000
BC	4,9275	0,0046
CC	1,1894	0,5866

Deethylatrizona		
factor	efecto	p-value
A: Concentración	3,0125	0,0794
B: Relac agua:suelo	37,1173	0,0000
C: Tpo de equilibrio	7,0129	0,0003
AA	-4,4934	0,1283
AB	-3,8522	0,0755
AC	0,6616	0,7452
BB	2,0219	0,4765
BC	7,0944	0,0023
CC	0,9998	0,7287

atrazina		
factor	efecto	p-value
A: Concentración	1,76	0,3989
B: Relac agua:suelo	32,51	0,0000
C: Tpo de equilibrio	9,98	0,0001
AA	-2,49	0,4905
AB	-1,77	0,5008
AC	4,44	0,0902
BB	-8,83	0,0187
BC	7,08	0,0117
CC	-2,71	0,4738

Los valores en negrita representan los factores significativos.

En la Tabla 4.11 se observa que para dos de los factores en los cuatro analitos, el valor de probabilidad es menor que el valor de significancia 0,05; lo que nos indica que estos

factores, relación agua:suelo y tiempo de equilibrio antes de la extracción son significativos para obtener un mayor porcentaje de recuperación, siendo la relación agua:suelo la que tiene la mayor influencia. Se encontró para el análisis de cada compuesto, un coeficiente de determinación R^2 de 90,52 % para DIA, 99,29 % para HIA, 96,06 % para DEA, 92,69 % para AT, es decir el modelo empleado explica en dichos porcentajes la variabilidad encontrada en los porcentajes de recuperación de los correspondientes analitos.

En las Figuras 4.10 a la 4.12 se presentan algunas de las superficies de respuestas obtenidas en el análisis. En ellas se observa con claridad cual es la importancia que tienen los factores estudiados en la variación de los porcentajes de recuperación.

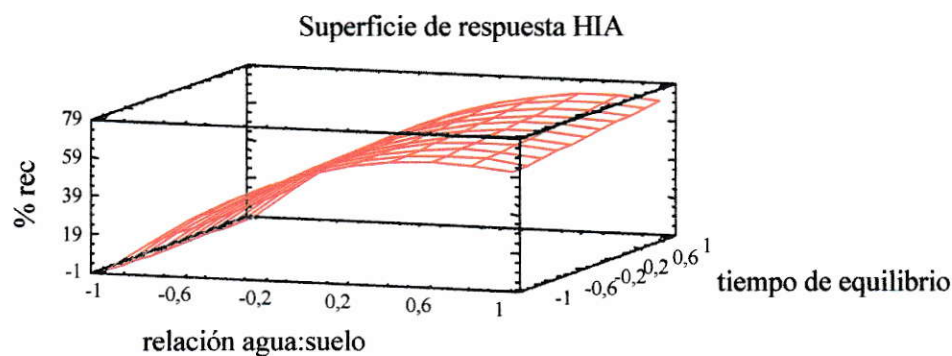


Figura 4.10: Superficie de respuesta de HIA tiempo de equilibrio v/s relación agua:suelo

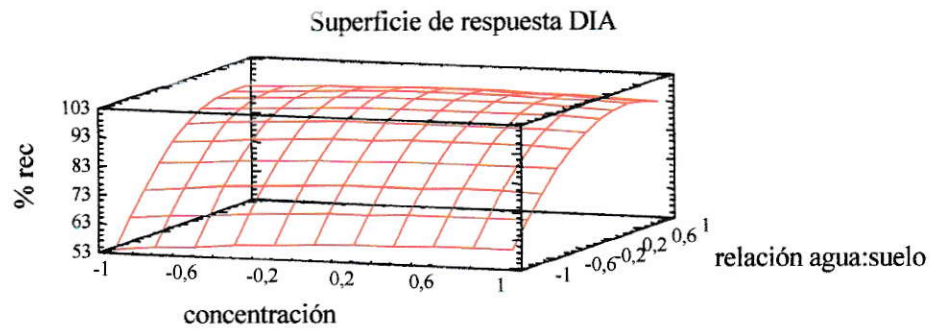


Figura 11 : Superficie de respuesta de DIA, relación agua:suelo v/s concentración

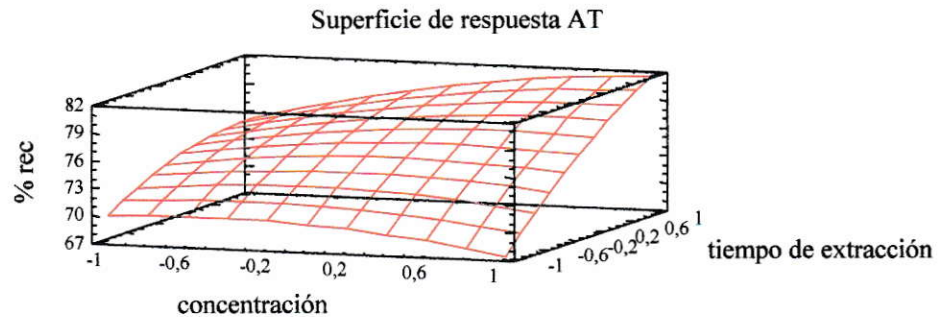


Figura 12 : Superficie de respuesta de AT, tiempo de extracción v/s concentración

Se observa la marcada influencia de la relación agua:suelo para el equilibrio previo a la extracción, además de la influencia del tiempo que se agita la muestra para dicho equilibrio. Para la obtención de mayores porcentajes de recuperación se debe utilizar una relación agua:suelo 1:1 y un tiempo de agitación cercano a los 30 minutos. En el caso de la hidroxiatrazina esto se observa con mayor claridad, por las características del proceso de adsorción de ésta en el suelo y simplemente no se obtiene su recuperación cuando la relación es 0:1. Cabe destacar que en este caso la contaminación se realizó retirando el excedente de las soluciones en equilibrio, secando y conservando las muestras en condiciones similares al manejo que se daría en la manipulación de muestras reales.

Además la cantidad a recuperar en esta situación es la del plaguicida adsorbido en el suelo y no la suma de éste más el remanente en la solución de equilibrio, como ocurriera en el diseño experimental de "Screening Factor". Ello explica que en el caso de HIA se encuentren % de recuperación menores que los obtenidos en dicho diseño. En el caso de la superficie de respuesta correspondiente a AT, debe considerarse además que ésta se ha construido sobre la base de la condición de relación agua:suelo 0,5:1 y por ello no se observan los porcentajes óptimos cercanos al 100 %. Además en la Figura se afirma el hecho de que la concentración con la que fue contaminado el suelo no tiene influencia en relación en cuanto a la recuperación de plaguicida, ya que a las distintas concentraciones, el porcentaje de recuperación se mantuvo casi invariable.

El método definitivo consiste en el uso de 4 g de muestra, una relación agua:suelo 1:1 p/v y un tiempo de 30 minutos para el equilibrio de la muestra antes de la extracción, un volumen de disolvente de 5 mL y una potencia de 8 y 80 °C para el baño de ultrasonido durante la extracción.

4.7 Estudio de los variables ambientales en la eficiencia de la extracción

En la Tabla 4.12 se presenta la matriz de respuesta para el diseño experimental descrito en la sección 3.6.7 realizado con la metodología de superficie de respuesta.

Tabla 4.12: Matriz de respuesta. Estudio de los factores ambientales

experimento	% recuperación	experimento	% recuperación	experimento	% recuperación
1	98,05	10	96,17	18*	91,43
1*	99,59	10*	96,94	19	93,6
2	98,97	11	96,90	20	92,42
3	97,41	12	95,45	20*	92,66
4	98,94	13	99,47	21	94,38
5	99,76	13*	99,37	22	93,76
6	99,79	14	97,33	23	94,38
7	73,66	15	98,35	24	93,26
8	41,24	16	93,99	25	51,27
8*	42,21	17	90,54	26	53,51
9	45,09	18	92,89	27	52,47

(*) experimentos realizados en duplicado.

Como se puede observar los porcentajes de recuperación variaron entre 41,24 y 99,79%. Los menores porcentajes de recuperación corresponden a la HIA, que como se ha señalado presenta los mayores valores de K_f entre los suelos. Los porcentajes cercanos a un 50 % corresponden al suelo Cunco (experimentos 25, 26 y 27) y los cercanos al 40 % al suelo Galvarino (experimentos 8 y 9, presentando un valor bajo, 73,7 % también en el experimento 7). El resto de los valores son todos superiores al 90 % y corresponden a AT y DEA en los tres suelos estudiados.

La Tabla 4.13 corresponde a los resultados derivados por el análisis de varianza, en ella se muestran los valores de los efectos estimados de los factores, y el valor de probabilidad o “p-value” para un nivel de confianza dado de 95 % con un $\alpha < 0,05$.

Tabla 4.13: Efectos estimados y valores de probabilidad del análisis de varianza (ANOVA). Estudio de los factores ambientales

Factor	Efecto	p-value
Suelo (% MO)	-3,9796	0,0802
Contaminante (pKa)	-30,0718	0,0107
Tiempo de residencia	-3,5307	0,0902

Se observa que sólo uno de los factores presenta un valor de probabilidad $< 0,05$ y es el tipo de contaminante. En una primera aproximación, este efecto podría atribuirse a la diferencia entre los valores de pKa de los contaminantes, factor que determina, como se señaló anteriormente las posibilidades de adsorción de éstos.

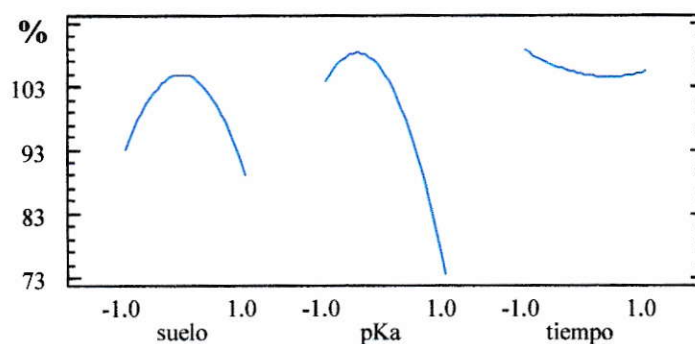


Figura 4.13: Efectos de los factores sobre el porcentaje de recuperación

En la Figura 4.13 se muestran los efectos de los tres factores sobre el porcentaje de recuperación. El efecto del pKa es negativo, al aumentar éste disminuye la cantidad que se extrae del compuesto. En cuanto a los suelos, una de las propiedades importantes que los diferencian es la cantidad de materia orgánica, sin embargo en este caso no resultó ser un factor significativo. Ello se explica a través de otros tipos de interacciones

con la fracción arcilla, como en el caso del suelo Galvarino que, aunque tiene un contenido de materia orgánica bajo, que podría facilitar la extracción, presenta los menores porcentajes de recuperación de hidroxiatrazina.

En cuanto al tiempo de residencia del compuesto en el suelo este no tiene influencia en el porcentaje de recuperación de los compuestos en la extracción. Sin embargo se observó que la HIA en el suelo Galvarino presenta un comportamiento particular en cuanto al tiempo de residencia ya que el porcentaje varió de un 73 % extraído la primera semana hasta cerca de un 40 % extraído luego de 2 meses. Ello indicaría la formación de residuos unidos, difícilmente extraíbles mediante disolventes.

Con el objeto de describir mejor las interacciones que influyen en la eficiencia del método para la recuperación de compuestos con diferentes propiedades, se realizó un análisis de regresión empleando un modelo lineal, donde se incorporó el % de recuperación como variable dependiente y el valor de K_f obtenido para cada plaguicida en cada suelo como variable independiente; se emplearon todos los datos teniendo en cuenta que el tiempo de residencia no resultó ser un factor significativo.

Los resultados se encuentran en la Figura 4.14; en el gráfico se incorporan los intervalos de confianza a un nivel de 95 %. La ecuación de regresión que describe esta relación es:

$$\% \text{ Recuperación} = 101,031 (\pm 2,301) - 1,460 (\pm 0,153) K_f$$

El coeficiente de correlación (r) para esta ecuación fue $-0,8864$ con un $p\text{-value} < 0,01$ mostrando que existe una alta correlación entre las variables relacionadas. El valor de r^2 fue 78,57 %. Del análisis estadístico, tres datos de los incluidos aparecen con valores de residuales inusuales; aquellos de los experimentos 7, 25 y 27, el primero de ellos

correspondiente a HIA con un tiempo de residencia en el suelo Galvarino de una semana y los dos siguientes al mismo compuesto en el suelo Cunco, con un tiempo de residencia de 1 semana y 2 meses, respectivamente.

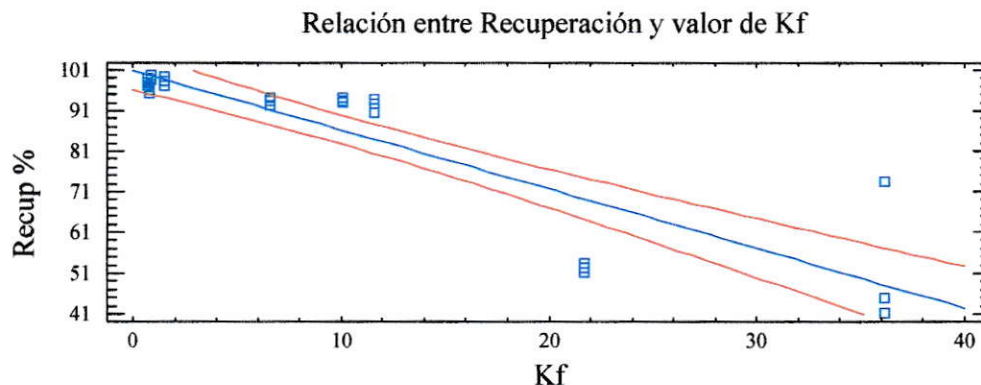


Figura 4.14: Efectos del valor de Kf sobre el porcentaje de recuperación

La constante de Freundlich, aun cuando no permite una aproximación clara a los mecanismos e intensidad con que el adsorbato interacciona con el sustrato, permite realizar un ordenamiento en cuanto a las capacidades de adsorción de compuestos orgánicos que presentan los suelos. De los resultados anteriores se puede concluir que el valor de Kf es un antecedente complementario que debe ser considerado al interpretar los datos obtenidos sobre la eficiencia de un método de extracción de residuos en suelos. Como conclusión final acerca del estudio del método de extracción empleando ultrasonido se puede indicar que la estrategia utilizada, que contempló el uso de diferentes diseños experimentales para la definición de los factores que afectan su eficiencia, ha permitido la obtención de resultados óptimos de recuperación. Ello se ha

logrado considerando en el estudio algunos factores relacionados con el comportamiento de los contaminantes en suelos de diferente naturaleza, como también a través de la incorporación de compuestos de una misma familia pero presentando diferentes propiedades físico-químicas y el uso de sistemas de contaminación que reproducen las condiciones de equilibrio en que la adsorción del soluto se presenta en un medio natural.

4.8 Preconcentración en fase sólida

En la Tabla 4.14 se presentan los resultados obtenidos en los estudios de preconcentración en fase sólida.

Tabla: 4.14: Porcentajes de recuperación del ensayo de extracción en fase sólida

Compuesto	% rec	% rec
	0,022 ($\mu\text{g/mL}$)	0,044 ($\mu\text{g/mL}$)
Deisopropilatrizona	92,09	93,30
Hidroxiatrizona	98,49	100,65
Deetilatrizona	92,61	94,12
Atrizona	91,11	96,14

En el procedimiento de extracción en las columnas Oasis MCX, el control del pH juega un papel fundamental en la retención y elución de los compuestos en la columna. La muestra se lleva a pH 1,5 de esta forma los compuestos se protonan siendo retenidos en la columna como cationes, luego, para eluirlos se utiliza una solución de metanol en medio básico, el cual lleva a los compuestos a su forma molecular para ser recuperados.

Los resultados obtenidos en el estudio de preconcentración de las soluciones de extractos de suelo, muestran que éstas presentan grandes ventajas como: los altos porcentajes de recuperación obtenidos para los cuatro compuestos que variaron entre 91,11 y 100,65 %, lo que indica además, que las columnas son muy eficientes para determinar simultáneamente compuestos con distintas polaridades en matrices complejas como es el caso de los extractos de suelo. En relación con esto último, se debe señalar que a pesar del fuerte factor de concentración de los extractos (10 veces), el método de separación cromatográfica entregó resultados de adecuada pureza espectral para cada uno de los compuestos, es decir, no se produjo un aumento de co-eluyentes provocando una interferencia en la determinación cuantitativa de los compuestos de interés. Otra ventaja es el reducido tiempo de análisis necesario para obtener la preconcentración. Esto coincide con los resultados obtenidos por Peruzzi y col. (2000).

Se debe mencionar que éste es solo un estudio preliminar que indica que es posible realizar otros estudios que contemplen la extracción de DIA, HIA, DEA y AT a bajos niveles de concentración. Según estos resultados se pueden alcanzar determinaciones de los cuatro analitos realizando la extracción en las condiciones establecidas para el método en niveles de concentración muy inferiores a 0,05 $\mu\text{g/g}$ de suelo seco, los que son esperables como residuos de acuerdo a las dosis de aplicación de atrazina en suelos.

V. CONCLUSIONES

1. El método cromatográfico desarrollado permite la determinación de atrazina y de los tres metabolitos simultáneamente, con una buena resolución y en un reducido tiempo de análisis.
2. El pH del vehículo de inyección de la muestra tiene una gran influencia sobre la señal cromatográfica de debido a la forma en que se encuentran los analitos.
3. Los parámetros de calidad analítica obtenidos para la separación en gradiente indican que los valores de LOD y LOQ son apropiados para el estudio de los cuatro compuestos a bajas concentraciones, obteniendo también una respuesta lineal del detector en el intervalo de concentraciones estudiadas.
4. Un mayor contenido de materia orgánica en los suelos induce a una mayor adsorción de atrazina y sus metabolitos.
5. Hidroxiatrazina presenta una mayor posibilidad de ser adsorbida en los suelos en comparación con los otros compuestos debido a su valor de pKa y a las interacciones que se establecen con la materia orgánica y con algunos filosilicatos de la arcilla en los suelos, como por ejemplo la caolinita.
6. La potencia y la temperatura del baño de ultrasonido son significativas, a con un efecto positivo en la extracción de los analitos, a mayor potencia y temperatura se obtiene un mayor porcentaje de recuperación. La cantidad de solvente también es un factor significativo con un efecto negativo en la extracción.

7. La presencia de agua y un mayor tiempo en la etapa de equilibrio de pre-extracción son fundamentales para obtener mayores porcentajes de recuperación.
8. El método definitivo de extracción, de acuerdo al diseño experimental, consiste en el uso de 4 g de muestra, una relación agua:suelo 1:1 p/v y un tiempo de 30 minutos para el equilibrio de la muestra antes de la extracción, un volumen de disolvente de 5 mL y una potencia de 8 y 80 °C para el baño de ultrasonido durante la extracción.
9. Los compuestos básicos que presenten un mayor valor de pKa presentan menores valores de porcentajes de recuperación, debido a sus mayores posibilidades de adsorción y formación de residuos unidos tanto en suelos con un mayor porcentaje de materia orgánica, como con presencia importante de minerales que participen específicamente en dicho proceso.
10. Además del valor de pKa se debe tener en cuenta el valor de la constante de Freundlich, K_f , para la interpretación de los datos sobre la eficiencia del método de extracción.
11. Las columnas de extracción en fase sólida Oasis MCX, presentan grandes ventajas con porcentajes de recuperación adecuados en la preconcentración y recuperación simultánea tanto de atrazina como de sus metabolitos, los cuales presentan muy diferentes propiedades físico-químicas. Ello permitirá la determinación de los cuatro analitos en niveles residuales, esperables en muestras de suelo sometidos a tratamientos con el herbicida en condiciones de campo.

VI. BIBLIOGRAFIA

- Báez, M. E., Aponte, A., Sánchez-Rasero, 2000 F. 3 Microwave-assisted solvent extraction of the herbicide methabenzthiazuron from soil samples and some soil natural organic and inorganic constituents. *Analyst*. 128:1478-1484
- Celis, R., Cornejo, J., hermosín, M., Koskinen, W. 1997. Sorption-desorption of atrazine and simazine by model soil colloidal components. *Soil. Sci. Soc. Am.* 61:436-443.
- Celis, R., Barriuso, E., Houot, S. 1998. Sorption and desorption of atrazine by sludge-amended soil: dissolved organic matter effects. *J. Environ. Qual.* 27:1348-1356.
- Clay, S., Allmaras, R., Koskinen, W., Wyse, D. 1988. Desorption of atrazine and cyanazine from soil. *J. Environ. Qual.* 17:719-723.
- Cuadros, L., García, A., Jiménez, C., Román, M. 1993. Estimation of performance characteristics of an analytical method using the data set of the calibration experiment. *Analytical Letters*. 26:1243-1258.
- Flury, M. 1996. Experimental evidence of transport of pesticides through field soil-A review. *J. Environ. Qual.* 25:25-45.

Hrdlicka, A., Dolinová, J. 2001. Automated hot solvent extraction and HPLC determination of atrazine and its degradations products in soil. *J. Liq. Chromatog. Rel. Technol.* 24:721-734.

Loos, R., Niessner, R. 1999. Analysis of atrazine, terbutylazine and their N-dealkylated chloro and hydroxy metabolites by solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry and capillary electrophoresis-ultraviolet detection. *J. Chromatogr. A.* 835:217-229.

Moreau, C., Mouvet, C. 1997. Sorption and desorption of atrazine, deethylatrazine, and hydroxyatrazine by soil and aquifer solids. *J. Environ. Qual.* 26:416-424.

Moreau-Kervévan , C., Mouvet, C. 1998. Adsorption and desorption of atrazine, deethylatrazine and hydroxyatrazine by soil components. *J. Environ. Qual.* 27:46-53.

Peruzzi, M., Bartolucci, G., Cioni, F. 2000. Determination of phenoxyalkanoic acids and other herbicides at the ng/mL level in water by solid-phase extraction with poly(divinylbenzene-co-N-vinylpyrrolidone) sorbent and high-performance liquid chromatography-diode-array detection. *J. Chromatogr. A.* 867:169-175.

- Piccolo, A., Conte, P., Scheunert, I., Paci, M. 1998. Atrazine interactios with soil humic substances of different molecular structure. *J. Environ. Qual.* 27:1324-1333.
- Roberts, T. (Editor). 1994 Metabolic pathways of agrochemicals. Part 1: Herbicides and plant growth regulators. *The Royal Society of Chemsitry.* 629-635.
- Saez, A., gómez de Barreda, D., Gamon, M., García de la Cuadra, J., lorenzo, E., Peris, C. 1996. UV detection of triazine herbicides and their hydroxilated and dealkylated degradation products in well water. *J. Chromatogr. A.* 721:107-112.
- Seybold, C., Mersie, W. 1996. Adsorption and desorption of atrazine, deethylatrazine, deisopropylatrazine, hidroxyatrazine, and metolachlor in two soils from Virginia. *J. Environ. Qual.* 25:1179-1185.
- Somasundaram, L., Coats, J., Racke, K. 1991. Mobility of pesticides and their hydrlysis metabolites in soil. *Environ. Toxicol. Chem.* 10:185-194.
- Steinheimer, T., Pfeiffer, R., Scoggin, K. 1994. Extraction of atrazine , cyanazine, desethylatrazine, desisopropylatrazine, and metalachlor form fortified western cornblet soils by SFE whit CO₂. *Anal. Chem.* 66:645-650.
- Suslick, K.1989. The chemical effects of ultrasound. *Sci. Am.* February: 80-86

Verdú-Andrés, J., Herraéz-Hernández, R., Camping-Falcó, P. 2001. Análisis 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.

Werber, J. 1970. Adsorption of s-triazines by montmorillonite as a function of pH and molecular structure. *Soil. Sci. Soc. Am.* 34:401-404.

Xiong, G., Liang, J., Zou, S., Zhang, Z. 1999. Comparison of microwave-assisted extraction of triazines from soils using water and organic disolventes as the extractants. *Talanta.* 48:333-339.

Ziyou, M., Trubey, R., Keil, Z., Sparks, D. 1997. Study of the effects of environmental variables and supercritical fluid extraction parameters on the extractability of pesticide residues from soils using a multivariate optimization scheme. *Environ. sci. technol.* 31:1934-1939.

ANEXO CÁLCULOS.

Cálculo del número de platos teóricos (N)

Se calculó el número de platos teóricos N por medio de la ecuación 4.1:

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

donde Δt corresponde a la diferencia entre el final y el inicio de la integración de un pico y se obtiene directamente del cromatograma.

Por ejemplo para los resultados presentados en la tabla 4.2 para DIA a 1,5 mL/min de flujo, reemplazando en la ecuación, se calculó N de la siguiente forma.

Flujo mL/min	Compuesto	t retención	t inicial	t final
1,5	DIA	1,81	1,71	2,31

$$N = 36 \times (1,81 / (2,31 - 1,71))^2 = 328$$

Cálculo de índice de separación (R)

Este cálculo se realizó usando la ecuación 4.2.

$$R = \left(\frac{S_1 - S}{S_1} \right) \times 100 \quad (\text{Verdú-Andrés y col, 2001})$$

Donde S_1 es la altura del pico y S representa la altura del valle entre el primer y segundo pico, las cuales se miden directamente del cromatograma, la unidad de altura es U_v . Por ejemplo para los resultados presentados en la tabla 4.4, el valor de %R para DIA utilizando en gradiente 1, se calculó de la siguiente forma:

$$S_1 = 9812 U_v \text{ y } S = 1280 U_v$$

Reemplazando en la ecuación obtenemos:

$$R = \frac{(9812 U_v - 1280 U_v)}{9812 U_v} \times 100 = 87 \%$$

Cálculo de isothermas de adsorción.

Se determinaron las isothermas mediante la ecuación:

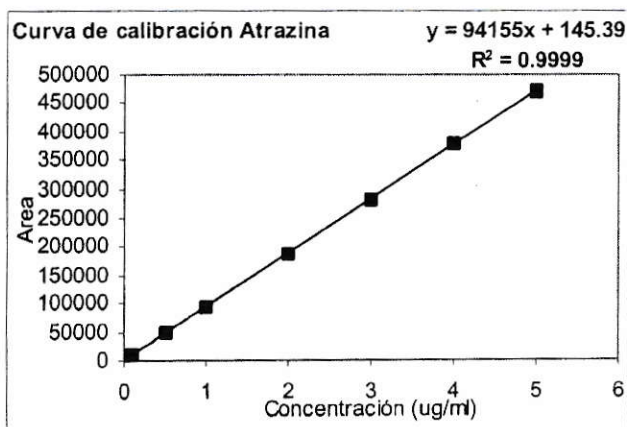
$$\frac{x}{m} = K_f * C^{\frac{1}{n}} \quad (4.6)$$

Donde x/m es la concentración del pesticida adsorbida en el suelo, C es la concentración en equilibrio del pesticida en la fase acuosa, K_f y n son constantes empíricas. La constante n es una medida de la no-linealidad de la isoterma e indica la dependencia de la adsorción con la concentración.

Para obtener K_f se graficó, en todos los casos, la concentración en equilibrio del compuesto en fase acuosa (C) versus la concentración del mismo adsorbida por el suelo (x/m). Para esto fue necesario calcular las concentraciones a partir de las áreas cromatográficas obtenidas.

Por ejemplo para la isoterma de atrazina en suelo Cunco, se realizó una curva de calibración:

Concentración (µg/mL)	Area
0,1	9638
0,1	10242
0,5	48288
0,5	47678
1	93656
1	92340
2	188876
2	187920
3	282082
3	281514
4	379166
4	377834
5	467636
5	472810



En la siguiente tabla se presentan los valores de: concentración inicial de la solución contaminante, el área medida en el análisis cromatográfico de las soluciones después del tiempo de equilibrio y la concentración de la solución en equilibrio calculada a partir de la curva de calibración.

Tubo	C inicial ($\mu\text{g/mL}$)	Area medida	C en equilibrio ($\mu\text{g/mL}$)
1	1	67668	0.7171
2	1	68334	0.7242
3	2	139042	1.4752
4	2	139796	1.4832
5	3	216442	2.2972
6	3	215828	2.2907
7	4	291926	3.0989
8	4	290932	3.0884
9	5	373690	3.9673
10	5	373266	3.9628

La concentración final de atrazina adsorbida en el suelo, fue calculada en $\mu\text{g/g}$ de suelo seco. Para calcular los gramos de suelo seco, se le restó el porcentaje de humedad (2,82 % Mapocho), por lo tanto, si se pesaron 2 gramos de suelo seco al aire, la cantidad de suelo seco en cada tubo fue 1,95 gramos.

Luego la concentración final de atrazina en el suelo se calculó con la siguiente relación.

$$x/m = \frac{(C_{\text{final}} - C_{\text{inicial}}) \times 1,95 \text{ gr de suelo seco}}{8 \text{ mL (solución contaminante)}}$$

Los resultados obtenidos se presentan en la siguiente tabla.

Tubo	C inicial ($\mu\text{g/mL}$)	C en equilibrio ($\mu\text{g/mL}$)	Cini-Ceq ($\mu\text{g/mL}$)	x/m ($\mu\text{g/g}$)
1	1	0.7171	0.2829	1.1603
2	1	0.7242	0.2758	1.1312
3	2	1.4752	0.5248	2.1527
4	2	1.4832	0.5168	2.1199
5	3	2.2972	0.7028	2.8827
6	3	2.2907	0.7093	2.9094
7	4	3.0989	0.9011	3.6961
8	4	3.0884	0.9116	3.7394
9	5	3.9673	1.0327	4.2359
10	5	3.9628	1.0372	4.2544

Finalmente se graficó concentración de atrazina en equilibrio versus x/m.