

UCH - FC
Q. Ambiental
L 12b
C. 2



**FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE**

**“EXTRACCIÓN ASISTIDA POR MICROONDAS COMO HERRAMIENTA
ANALÍTICA EFICIENTE PARA DETERMINAR PLAGUICIDAS
ORGANOFOSFORADOS HIDROFÓBICOS EN SUELOS AGRÍCOLAS
POR CROMATOGRFÍA DE GASES”**

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial
de los requisitos para optar al Título de los requisitos para optar al Título de

Químico Ambiental

Ronnie Alejandro Labra Oyanedel



Director de Seminario de Título: Dra. María Estrella Báez
Dr. Edwar Fuentes

Enero de 2009
Santiago - Chile

ESCUELA DE PREGRADO – FACULTAD DE CIENCIAS – UNIVERSIDAD DE CHILE



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

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

RONNIE ALEJANDRO LABRA OYANEDEL

“EXTRACCIÓN ASISTIDA POR MICROONDAS COMO HERRAMIENTA ANALÍTICA EFICIENTE PARA DETERMINAR PLAGUICIDAS ORGANOFOSFORADOS HIDROFÓBICOS EN SUELOS AGRÍCOLAS POR CROMATOGRAFÍA DE GASES”

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Químico Ambiental

COMISIÓN DE EVALUACIÓN

Dra. María Estrella Báez
Director Seminario de Título

Dr. Edwar Fuentes
Director Seminario de Título

M. Cs. Sylvia Copaja
Profesor Patrocinante

Dr. Edward Cornwell
Corrector

Prof. María Inés Toral
Corrector

Santiago de Chile, Enero de 2009



A mi Familia... los de ayer, los de hoy y los que vendrán.





Se agradece el financiamiento otorgado por el departamento de investigación de la Universidad de Chile mediante el proyecto DI 12 04/04-2 titulado: Desarrollo de metodologías analíticas simples y eficientes para la determinación de residuos de plaguicidas apolares en suelos agrícolas chilenos basados en extracción asistida por microondas y detección por cromatografía de gases.

El trabajo desarrollado en la presente memoria, junto a una investigación posterior, fueron publicados en la revista Journal Of Chromatography A, 1169 (2007), 40 - 46.



AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todas aquellas personas que de alguna manera me acompañaron y ayudaron a cursar esta importante etapa de mi vida.

A todos quienes trabajan en el laboratorio de Química Analítica y Vegetal de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile. A la profesora María E. Báez y profesor Edwar Fuentes por su amistad, apoyo, paciencia y comprensión infinita; por guiarme, enseñarme y permitir que este seminario de título se desarrollara en un excelente ambiente de trabajo, por su gran acogida y disposición.

A los profesores miembros de la comisión evaluadora, profesora Sylvia Copaja, profesora María Inés Toral y profesor Edward Cornwell por la disposición, comprensión y aporte a este trabajo.

Finalmente quiero agradecer a mi otra Familia comprendida por mis compañeros del Liceo Manuel Arriaran Barros (Salesianos, La Cisterna) y los del 0630, sin su apoyo y compañía incondicional esto no hubiera sido posible.

Gracias a todos aquellos que partieron de esta vida y brindaron su apoyo desde algún lugar... nunca los olvidare.



Ronnie Alejandro Labra Oyanedel, es Licenciado en Ciencias Ambientales con mención en Química de la Universidad de Chile. Nacido el 22 de Noviembre de 1977 en Santiago de Chile, la enseñanza básica y media fue realizada en el Liceo Manuel Arriarán Barros, obra Don Bosco (La Cisterna). En el año 2005 desarrolló la Unidad de Investigación *“Determinación espectrofotométrica simultánea del herbicida Metil Bensulfuron y sus principales productos de degradación utilizando calibración multivariada”*. Entre el año 2006 y 2007 desarrolló el Seminario de Título *“Extracción asistida por microondas como herramienta analítica eficiente para determinar plaguicidas organofosforados hidrofóbicos en suelos agrícolas por Cromatografía de Gases”*; este trabajo complementado con estudios posteriores fue publicado en la revista Journal Of Chromatography A, 1169 (2007), bajo el nombre de *“Parameters affecting microwave-assisted extraction of organophosphorus pesticides from agricultural soil”*. Entre los años 2007 y 2008 asume como Analista Químico del Laboratorio Inorgánico en Agriquem America S.A. Encargado de la realización de los análisis medioambientales para la NCh 409, 1333 y 2313. Preparación de muestras mediante digestión en microondas para distintas matrices ambientales y análisis de Suelos. En Octubre de 2008 aprueba satisfactoriamente el curso *“Seguridad sanitaria HACCP para supervisores”* de la Asociación Chilena de Seguridad (ACHS). En Enero de 2009 obtiene el título de Químico Ambiental de la Universidad de Chile.





ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
1. Origen y dinámica de los plaguicidas en el suelo.	5
2. Procesos que determinan la dinámica de los plaguicidas en el suelo.	6
2.1 Procesos de transporte y transferencia.	7
2.1.1. Dispersión Global	8
2.1.2. Deriva	8
2.1.3. Volatilización	8
2.1.4. Escurrimiento y Lavado	9
2.1.5. Penetración e incorporación	9
2.1.6. Lixiviación	9
2.1.7. Adsorción y desorción	10
2.2. Procesos de transformación o degradación.	10
2.1.1. Degradación química	10
2.1.2. Degradación biológica	11
3. Características fisicoquímicas de los plaguicidas y su dinámica en el ambiente.	11
4. Plaguicidas en estudio.	16
5. Metodologías de estudio de plaguicidas.	17
5.1. Diseño experimental y análisis por componentes principales.	21
6. Hipótesis	24
6.1. Objetivo General	24
6.2. Objetivos Específicos	25

II. MATERIALES Y MÉTODOS	26
1. Reactivos	26
2. Materiales	27
3. Equipos	27
4. Sistema de extracción.	28
5. Sistema Cromatográfico.	28
6. Suelos utilizados. Clasificación y caracterización.	29
7. Disoluciones.	30
7.1 Disoluciones estándar de Diazinon, Metil Paration, Metil Pirimifos y Paration.	30
7.2 Disolución estándar de Trifenilfosfato (TFF).	31
7.3 Disolución de Aceite de Oliva en Hexano.	31
7.4 Disoluciones para extracción con agentes co-extractantes (Sulfato de Sodio y Citrato de Sodio).	32
8. Métodos.	32
8.1 Pruebas de separación y determinación de Diazinon, Metil Paration, Metil Pirimifos, Paration y Trifenilfosfato (TFF) mediante cromatografía de gases con detector fotométrico de llama (GC-FPD).	32
8.2 Estudio del efecto de Aceite de Oliva, como imitador de matriz (matrix mimic) sobre la señal cromatográfica de los plaguicidas organofosforados.	33
8.3 Determinación de los parámetros de calidad analítica instrumentales.	34
8.4 Estudio de reparto de los plaguicidas organofosforados utilizando la extracción asistida por microondas.	36

8.5 Evaluación de respuesta cromatográfica entre los plaguicidas organofosforados sometidos a reparto y disueltos en n-hexano.	39
8.6 Contaminación de los suelos.	40
8.7 Método de extracción y partición asistido por microondas (MAEP).	41
8.8 Screening o exploración de los factores que afectan la extracción de los plaguicidas utilizando el método MAEP.	42
8.9 Optimización de los factores que afectan la extracción de los plaguicidas utilizando el método MAEP.	44
8.10 Evaluación del efecto del tipo de fortificación del suelo, tiempo y potencia de extracción sobre el método MAEP.	46
8.11 Extracción bajo condiciones optimas utilizando el método MAEP.	48
8.12 Uso de agentes co-extractantes en el método MAEP.	49
III. RESULTADOS Y DISCUSIONES.	51
1. Separación y determinación de Diazinon, Metil Paration, Metil Pirimifos, Paration y Trifenilfosfato (TFF) mediante cromatografía de gases con detector fotométrico de llama (GC-FPD).	51
2. Estudio del efecto de Aceite de Oliva, como imitador de matriz (matrix mimic) sobre la señal cromatográfica de los plaguicidas organofosforados.	52
3. Determinación de los parámetros de calidad analítica instrumentales.	55
4. Estudio de reparto de los plaguicidas organofosforados utilizando la extracción asistida por microondas.	58
5. Comparación de respuesta cromatográfica entre los plaguicidas organofosforados sometidos a reparto y disueltos en n-Hexano.	61

6. Método de extracción y partición asistido por microondas (MAEP).	64
7. Screening o exploración de los factores que afectan la extracción de los plaguicidas utilizando el método MAEP.	65
8. Optimización de los factores que afectan la extracción de los plaguicidas utilizando el método MAEP.	68
9. Evaluación del efecto del tipo de fortificación del suelo, tiempo y potencia de extracción sobre el método MAEP.	75
10. Extracción bajo condiciones óptimas utilizando el método MAEP.	77
11. Uso de agentes co-extractantes en el método MAEP.	78
IV. CONCLUSIONES	80
V. BIBLIOGRAFIA.	82

ÍNDICE DE FIGURAS

<p>Figura 1: Índice de crecimiento anual y adiciones anuales de la población global (Naciones Unidas, perspectivas de las poblaciones del mundo: Revisión 1994; U.S. Oficina de Censo, Centro de programas Internacionales, Base de datos internacional y tablas inéditas.)</p>	1
<p>Figura 2: Dinámica de los plaguicidas en el suelo.</p>	6
<p>Figura 3: Procesos que determinan la dinámica de los plaguicidas en el ecosistema terrestre.</p>	7
<p>Figura 4: Plaguicidas organofosforados en estudio.</p>	16
<p>Figura 5: Cromatógrafo de Gases Hewlett Packard 5890 Series II.</p>	28
<p>Figura 7: Incremento en área y calidad de los cromatogramas por efecto de Aceite de Oliva como imitador de matriz. Plaguicidas: 1. Diazinon, 2. Metil Paration, 3. Metil Pirimifos, 4. Paration y 5. TFF (Patrón interno a 0,1 µg/mL). (a) Cromatograma sin imitador de matriz (b) Cromatograma con Aceite de Oliva como imitador de matriz.</p>	54
<p>Figura 8: Aumento del área de la señal cromatográfica frente a la concentración de Aceite de Oliva.</p>	55
<p>Figura 9: Curvas de Calibración para los plaguicidas organofosforados.</p>	56
<p>Figura 10: Carta Pareto estandarizada de los efectos de los factores experimentales sobre el reparto de los plaguicidas organofosforados.</p>	60
<p>Figura 11 (a-d): Resultados de la prueba de mínimos cuadrados sobre la utilización del método MAEP.</p>	63

Figura 12: Carta Pareto Estandarizada de los factores estudiados en el screening para el Componente Principal I.	67
Figura 13: Superficies de respuesta para la optimización del método MAEP con ACN.	71
Figura 14: Superficies de respuesta para la optimización del método MAEP con MeOH.	73
Figura 15: Superficie de respuesta para la evaluación del método MAEP frente al modo de contaminación y reevaluación de los factores tiempo y potencia. a) muestra la superficie de respuesta para una fortificación mediante secado a temperatura ambiente y b) muestra la superficie de respuesta para una fortificación mediante secado a la estufa a 30 °C por 15 h.	76

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Presión de vapor.	12
Tabla 2: Constante de Henry.	13
Tabla 3: Coeficientes de adsorción de carbón orgánico (Koc).	15
Tabla 4: Propiedades fisicoquímicas de los plaguicidas organofosforados.	17
Tabla 5: Características y propiedades fisicoquímicas de los suelos.	30
Tabla 6: Construcción de la Curva de Calibración de acuerdo a las diluciones correspondientes.	35
Tabla 7: Factores y niveles del diseño experimental factorial multinivel.	37
Tabla 8: Matriz del diseño experimental factorial multinivel.	37
Tabla 9: Construcción de la Curva de Calibración comparada de acuerdo a las diluciones correspondientes (Solvente n-hexano o agua).	39
Tabla 10: Factores y niveles del diseño experimental factorial fraccionado.	43
Tabla 11: Matriz del diseño experimental factorial fraccionado.	43
Tabla 12: Factores y niveles del diseño experimental de compuesto central.	45
Tabla 13: Matriz del diseño experimental de compuesto central.	45
Tabla 14: Factores y niveles del diseño experimental factorial multinivel.	47
Tabla 15: Matriz del diseño experimental factorial multinivel.	47
Tabla 16: Extracción de plaguicidas mediante método MAEP y adición de Citrato o Sulfato de Sodio.	49
Tabla 17: Valores de los Límites de detección y cuantificación.	57
Tabla 18: Valores de la sensibilidad analítica y linealidad.	57

Tabla 19: Experiencias y porcentajes de recuperación para los plaguicidas organofosforados en el estudio de partición o reparto.	58
Tabla 20: Recuperación de los plaguicidas en los distintos suelos en estudio.	64
Tabla 21: Recuperaciones porcentuales obtenidas para las experiencias realizadas en el screening.	65
Tabla 22: Recuperaciones porcentuales obtenidas para la optimización mediante el tiempo y las cantidades correspondientes de ACN como modificador orgánico.	69
Tabla 23: Recuperaciones porcentuales obtenidas para la optimización mediante el tiempo y las cantidades correspondientes de MeOH como modificador orgánico.	72
Tabla 24: Porcentajes de recuperación y desviación estándar de los cuatro compuestos desde los suelos fortificados y obtenidos bajo las condiciones óptimas del método MAEP-GC-FPD.	77
Tabla 25: Extracción mediante la utilización del método MAEP y agentes co-extractantes (Sulfato de Sodio y Citrato de Sodio) desde el suelo Quillota.	79

RESUMEN

Desde hace poco más de medio siglo, la población mundial ha mantenido un crecimiento vertiginoso y con ello algunos problemas no menores han aumentado cada día, como el hambre en algunos continentes, la falta de terrenos fértiles, la destrucción de los recursos naturales y el aumento de la contaminación ambiental. Estos son temas que nos deberían preocupar si pensamos en las consecuencias que podrían ocasionar a las generaciones venideras. La contaminación agraria difusa es un problema difícil de abordar, puesto que no existe una fuente puntual a quien hacer responsable por el daño provocado al medio ambiente natural (aire, agua y suelo). Sin embargo, el propósito de ahora en adelante debería ser adoptar una conciencia agroecológica que permita disminuir el daño y transformarlo en sustentabilidad hacia el futuro. La tarea es difícil pero se debe comenzar por algo, en este sentido la misión desde el punto de vista de la química debe ser la de entregar las herramientas científicas para poder determinar cuantitativamente el daño provocado con la finalidad de regularizar y conocer las dimensiones del problema, además de buscar la forma de detener y remediar los efectos provocados por aquellas malas prácticas humanas.

En este contexto, los plaguicidas organofosforados han sido ampliamente usados para el control de plagas en las últimas cinco décadas. Como consecuencia, estos compuestos pueden encontrarse en suelos y/u otros compartimientos ambientales, constituyendo un peligro potencial para animales

y humanos. Por ello es necesario evaluar regularmente su presencia en suelos mediante métodos analíticos adecuados. En este trabajo se presenta un método para determinar plaguicidas organofosforados (Diazinon, Metil Paration, Metil Pirimifos y Paration) en distintos tipos de suelos de nuestro país. El método está basado en la extracción y partición asistida por microondas ("microwave assisted extraction and partitioning", MAEP) y detección por cromatografía de gases con detector fotométrico de llama (GC-FPD). En primer término se optimizó la determinación cromatográfica de los compuestos de interés y se mejoró la calidad de las señales (intensidad y forma) mediante el uso de aceite de oliva al 0,3% v/v como un "imitador de matriz". Con ello, los límites de detección instrumentales estuvieron comprendidos entre los 0,001-0,012 $\mu\text{g/L}$ y los de cuantificación entre los 0,003-0,036 $\mu\text{g/L}$. A continuación se estudió el reparto de los compuestos entre una solución acuosa y hexano, asistida por microondas. Posteriormente el método de extracción propuesto fue optimizado con la ayuda de herramientas quimiométricas y estadísticas como el diseño de experimentos y análisis de componentes principales. Mediante este análisis se logró encontrar los valores óptimos para la utilización del método MAEP que consiste en medir 1,0 g de suelo fortificado, añadir 1,0 mL de una mezcla metanol-agua (50% v/v) y colocar en el microondas durante 10 min a una potencia de 500 W, logrando obtener de esta manera recuperaciones cercanas al 70%.

ABSTRACT

For a little more than half a century, the world's population has maintained a rapid growth and consequently some problems have increased every day, such as hunger in some continents, the lack of fertile land, the destruction of natural resources and increased of environmental pollution. These are issues that should worry us if we think in the consequences that could lead to future generations. Diffuse agricultural pollution is a difficult problem to address, because there is no point source who make liable for the damage caused to the natural environment (air, water, soil). However, the aim now should be to adopt a conscience agroecological allowing reduce the damage and transform it into sustainability into the future. The task is difficult but we have to start with something, in this sense the mission of the chemistry must be to deliver the scientific tools to be able to determine quantitatively the damage with the aim of regularizing and know the dimensions of the problem, in addition to give some ways to halt and remedy the effects caused by human practices. In this context, the organophosphorus pesticides have been extensively used for pest control for the last five decades. As a consequence, these compounds can be found in soil and / or other environmental matrices, constituing an animals and human health hazard. Therefore it is necessary to regularly evaluate their presence in soil through appropriate analytical methods. In this paper presents a method for determining organophosphorus pesticides (Diazinon, Methyl Parathion, Methyl Pirimiphos and Parathion) in different types of soils in our country. The method

is based on extraction and partition assisted by microwave ("microwave assisted extraction and partitioning," MAEP), and detection by gas chromatography with flame photometric detector (GC-FPD). At first time, the chromatographic analysis was optimized determination of the compounds of interest and improving the quality of the signal (peak intensity and shape) through the use of olive oil at 0.3% v/v as a "matrix mimic." The detection limits were comprised between 0.001-0.012 $\mu\text{g/L}$ and quantification limits between 0.003-0.036 $\mu\text{g/L}$. The partition of compounds between an aqueous solution and hexane, assisted by microwave was also studied. Subsequently, the proposed extraction method was optimized with the help of tools chemometrics and statistics such as design of experiments and principal component analysis. The optimal values for the use of MAEP method is to take 1.0 g of fortified soil, adding 1.0 mL of methanol-water mixture (50% v / v) and place in the microwave for 10 min at 500 W, in this way the recoveries obtained were equal or coger than 70%.

I. INTRODUCCIÓN

Para nadie es nuevo escuchar hablar de la crisis de la agricultura moderna al ver como la producción de alimentos a nivel mundial no da abasto para satisfacer la demanda creciente de la población mundial que continúa aumentando de manera incontrolada. Estudios indican que se ha registrado un aumento de 3500 millones de habitantes en 40 años y lo que es peor aun, un 25% de la población mundial padece hambre o desnutrición (U.S. Census Bureau, 2004).

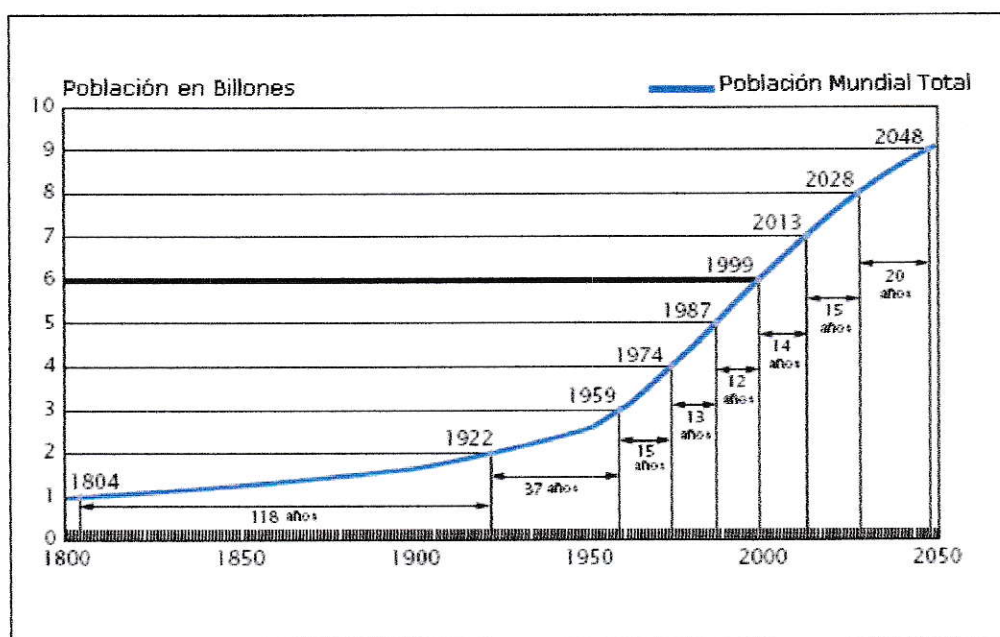


Figura 1: Índice de crecimiento anual y adiciones anuales de la población global (Naciones Unidas, perspectivas de las poblaciones del mundo: Revisión 1994; U.S. Oficina de Censo, Centro de programas Internacionales, Base de datos internacional y tablas inéditas.)

Este cambio se gesta alrededor de los años 50 (Figura 1), coincidentemente cuando comienza la llamada Revolución Verde y con ello una acelerada carrera de producción agrícola que trae consigo la posterior crisis, producto de las repercusiones económicas, sociales y ecológicas de este aumento en la producción sin detenerse a analizar las implicancias que esto podría tener en la comunidad agrícola y el medio ambiente. Las raíces de esta crisis residen en el contexto socioeconómico donde se originó la mayor parte de la agroindustria moderna, un aumento de la productividad tenía como principal limitante para el desarrollo de la economía la llamada "mano de obra", es así como aparece la mecanización temprana de las prácticas agrícolas conduciendo inexorablemente al monocultivo y luego a los fertilizantes químicos que permiten reemplazar las prácticas más laboriosas como la aplicación de estiércol y la rotación de cultivos. La especialización producto de estas malas prácticas traería consigo un aumento en los costos de producción (maquinarias e insumos) y finalmente como producto del monocultivo intensivo la pérdida de diversificación eliminando los mecanismos de auto-regulación convirtiendo a estos monocultivos en agroecosistemas altamente vulnerables, dependientes de grandes cantidades de insumos de origen químico para hacer frente a todas las problemáticas, entre las cuales, las plagas, las pestes, las malezas invasoras y en general todo tipo de organismo que atente contra la productividad agrícola causando una disminución importante en los niveles de producción de alimentos. Durante años se ha tratado de revertir esta difícil situación mediante un nuevo enfoque de la agricultura, la llamada "agricultura

sustentable”, una respuesta a la disminución en la calidad de los recursos naturales o de la base productiva de la agricultura moderna. Sin embargo, la implementación de este nuevo concepto es aún más complejo puesto que el tema de la producción agrícola ha dejado de ser puramente técnico pasando a ser un tema con dimensiones sociales, culturales, políticas y económicas. Hoy por hoy, la discusión y las propuestas más aceptadas por las partes mencionadas se encuentran principalmente avocadas a la substitución de insumos que sean menos nocivos que los productos agroquímicos que han resultado responsables de muchos de los problemas asociados a la contaminación agraria difusa en los últimos años. No obstante, este enfoque aun es deficiente puesto que se concentra en los niveles más superficiales de integración del agroecosistema. En esto, los plaguicidas son un ejemplo, aquellos de alto espectro convencionales están desapareciendo del mercado debido a que las plagas se han vuelto resistentes y los costos impuestos por la reglamentación gubernamental para introducir nuevos productos químicos se vuelven cada vez más prohibitivos (Rosset, 1997).

La contaminación difusa es producida por una infinidad de causas y focos; básicamente los contaminantes son distribuidos por la acción del viento y la lluvia. Ello significa que el clima condiciona el accionar de los agentes erosivos, ya sea de tipo eólico o hídrico, provocando finalmente que el suelo y los océanos sean el principal sumidero de los contaminantes transportados desde el lugar donde fueron utilizados. Ésta es la principal característica de la

contaminación difusa puesto que su problemática se centra en la capacidad de los contaminantes a ser transportados, habitualmente estos contaminantes son esparcidos a la atmósfera y caen finalmente a la superficie del suelo debido a la disminución o cese de la energía cinética del viento, o bien, al ser disueltos por el vapor de agua atmosférico y devuelto por acción de las lluvias. No obstante lo anterior, estos contaminantes pueden reaccionar entre sus diversos tipos de compuestos químicos dando lugar a otro tipo de contaminante que tendrá a su vez una toxicidad y comportamiento diferente del cual fue su origen.

Siendo indiscutibles las ventajas de los plaguicidas en el control de plagas y enfermedades, es necesario señalar también que el uso de estos compuestos lleva consigo indudables repercusiones por el sólo hecho de ser preparaciones tóxicas para ser utilizadas frente a determinados organismos, provocando alteraciones significativas en los ecosistemas y alto riesgo de contaminación en aguas y alimentos de procedencia agrícola, problemas graves en la salud de los operarios dedicados a su manejo y aplicación si no se toman medidas preventivas adecuadas. Con el objeto de minimizar estos efectos negativos es que se hace necesaria regular su utilización mediante normativas que deben ser conocidas, practicadas, respetadas y fiscalizadas para lograr el fin último que es la protección del ser humano y el medio ambiente en riesgo de contaminación.

1. Origen y dinámica de los plaguicidas en el suelo.

Bajo este contexto se hace necesario tener presente el origen y los procesos que determinan la dinámica de los plaguicidas en los ecosistemas terrestres puesto que de ello dependerá finalmente el transporte o absorción por las raíces de las plantas y su posterior disponibilidad para ser incorporado en la cadena alimentaria. La presencia de los plaguicidas en el suelo tiene distintos orígenes (Figura 2) donde la aplicación directa (1), ya sea en la superficie o dentro de éste a una determinada profundidad, y (2) cuando es aplicado a la zona aérea de las plantas; son las principales vías de incorporación del plaguicida al suelo ya que éste no alcanza el objetivo deseado que es la planta sino que es depositado en su mayor parte a la superficie del suelo. Además existen otras vías como el arrastre por acción del agua o el viento, del plaguicida depositado sobre la planta (3) y aun en menor proporción por restos vegetales desprendidos de la planta o que se quedan en el suelo al momento de la recolección del cultivo (4) así como también por el transporte de restos suspendidos en la atmósfera por la acción de la lluvia y el viento a zonas más alejadas (5) (Cornejo, 2001).

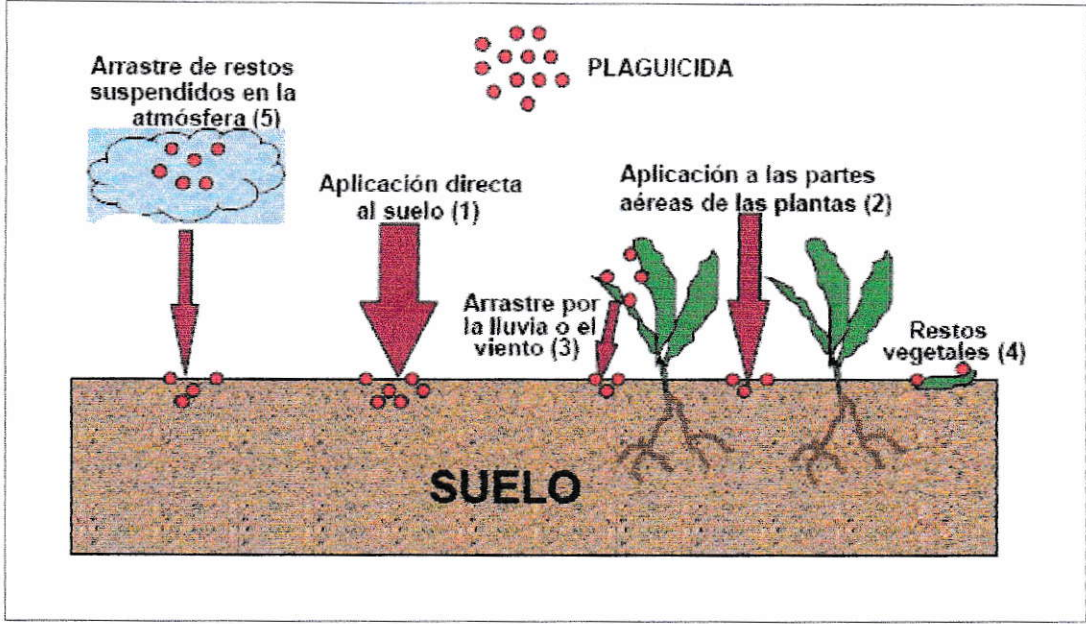


Figura 2: Dinámica de los plaguicidas en el suelo.

2. Procesos que determinan la dinámica de los plaguicidas en el suelo.

Una vez en el suelo, los plaguicidas entran en un ecosistema dinámico y están sometidos a una serie de procesos que determinan su comportamiento (Figura 3) pudiendo agruparse éstos en procesos de transporte o transferencia y procesos de transformación o degradación.

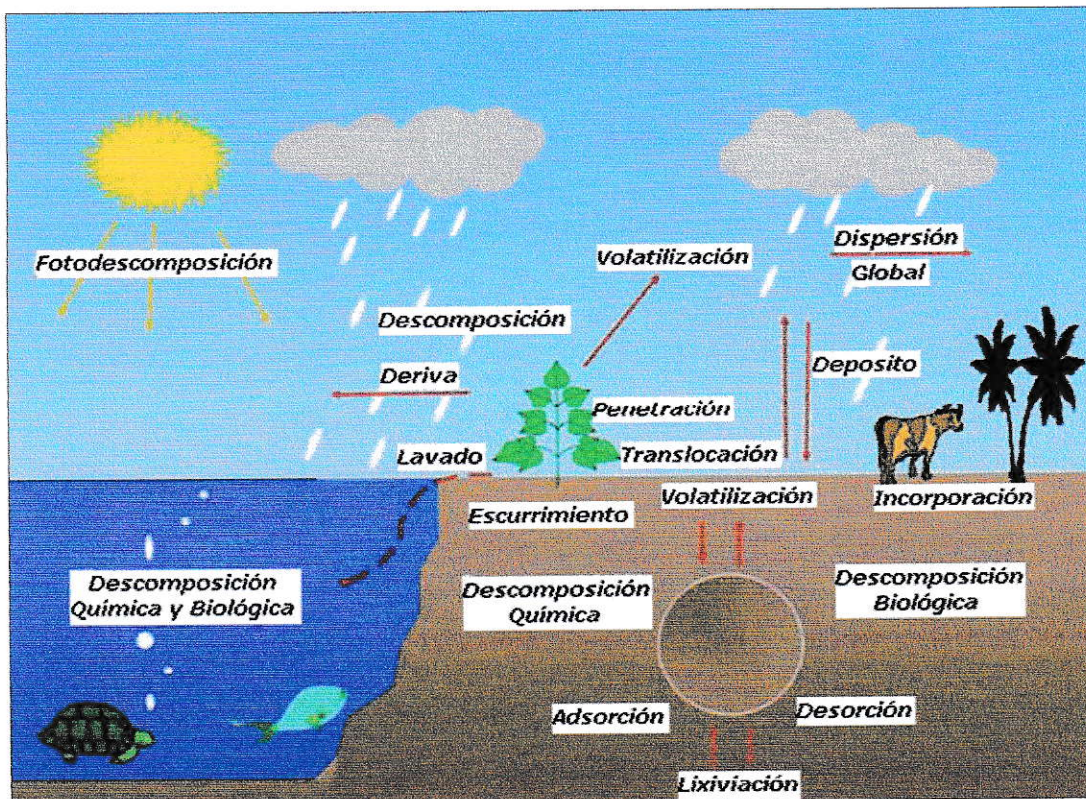


Figura 3: Procesos que determinan la dinámica de los plaguicidas en el ecosistema terrestre.

2.1 Procesos de transporte y transferencia.

El transporte y transferencia se relaciona con la movilidad que le corresponde a cada tipo de plaguicida involucrando los movimientos de gases, líquidos y partículas sólidas dentro de un medio determinado y a través de las interfaces del aire, agua, sedimento, suelo, plantas y animales. En este caso, la importancia de estos procesos radica en que el plaguicida en cuestión no ha sufrido ninguna modificación desde el punto de vista químico, siendo el mismo compuesto dispersado en el momento de su aplicación.

2.1.1. Dispersión Global: dentro de este grupo se encuentra la translocación y depósito debido a que estos procesos también forman parte de la dispersión provocada por la difusión de contaminantes debido a un gradiente de concentración movilizándolos desde zonas con alta concentración a otras menos concentradas. Esta dispersión se produce generalmente por la acción del viento y las lluvias que arrastran a los contaminantes reubicándolos a distancia del lugar donde fueron aplicados.

2.1.2. Deriva: este término se refiere a todo aquel movimiento de los pesticidas hacia lugares donde éstos no fueron aplicados, tiene un carácter normativo, puesto que pretende hacer notar la importancia de la distribución de un pesticida al aplicarse en el medio ambiente y los alcances negativos que éste pudiese llevar a la población humana por medio del bajo control que se tiene sobre estos compuestos, su forma de aplicación y regulación.

2.1.3. Volatilización: ya sea desde la superficie de las plantas o el suelo y desde la solución acuosa en donde se encuentra, ésta tiene que ver con la temperatura ambiental, la presión de vapor, la solubilidad en agua y la masa molar de los compuestos. La volatilidad se mide a partir de la constante de Henry, aquellos plaguicidas que posean una constante baja ($<1,0 \times 10^{-4}$) son poco volátiles por lo cual permanecen solubles en agua. En cambio, plaguicidas con una constante alta (>10) son plaguicidas que pueden volatilizarse.

2.1.4. Escurrimiento y Lavado: todo compuesto que se encuentre sobre la superficie del suelo o de las plantas puede escurrir por efecto del agua que circule por aquel lugar cuando ésta supera la capacidad de infiltración. Dependiendo de las características de la superficie y el caudal de desplazamiento, los compuestos se moverán en alguna dirección particular llegando a distintos lugares incluyendo aguas superficiales de grandes proporciones generando un proceso de lavado superficial.

2.1.5. Penetración e incorporación: cuando un plaguicida se introduce a la planta o vegetal, producto de la naturaleza del cultivo, la extensión temporal de los tratamientos, las propiedades fisicoquímicas de los compuestos, condiciones climáticas y características del suelo se produce un fenómeno de absorción al penetrar el sistema radicular mediante mecanismos y vías similares a las utilizadas para absorber los iones inorgánicos necesarios para el crecimiento y desarrollo de los cultivos, provocándose la acumulación de estos compuestos en el vegetal e incorporándolos a la cadena alimenticia mediante la naturaleza del siguiente nivel trófico que disponen de estos recursos y los transportan hasta los niveles superiores de la cadena.

2.1.6. Lixiviación: este proceso corresponde a un movimiento vertical a través de los distintos horizontes del suelo producto de la acción del agua de disolución y la baja adsorción de los compuestos con los componentes del suelo (materia orgánica, arcilla, óxidos de hierro y aluminio, etc.). Es altamente

preocupante que un compuesto de estas características sufra este tipo de transporte puesto que la contaminación de las napas subterráneas tiene implicancia directa sobre la salud de los seres humanos.

2.1.7. Adsorción y desorción: es la capacidad de un compuesto orgánico a ser adsorbido (retenido) o desorbido (liberado) por los suelos o sedimentos, sobre todo en los coloides de la materia orgánica. La medida de esta tendencia es calculada a través del coeficiente de adsorción de carbono orgánico (K_{oc}), llamado también coeficiente de adsorción suelo/agua. En general, mientras más hidrófobo es un plaguicida más adsorbido será éste por los coloides de materia orgánica.

2.2. Procesos de transformación o degradación.

Todos estos procesos dependen en mayor o menor medida de las condiciones y características del suelo, del plaguicida y el clima; entonces podríamos decir que para cada plaguicida y para cada suelo existe una curva de degradación característica.

2.1.1. Degradación química: se produce debido a las condiciones fisicoquímicas que permiten su degradación. Particularmente existen reacciones de degradación por oxidación, hidrólisis y fotodescomposición, en la cual la radiación ultravioleta y visible (240-700 nm) rompe enlaces de la molécula del plaguicida, especialmente aquellos dobles enlaces conjugados.

2.1.2. Degradación biológica: ésta ocurre por la acción de los microorganismos y sistemas enzimáticos que actúan sobre los compuestos transformándolos completamente. En el suelo los plaguicidas pueden degradarse completamente transformándose en especies inorgánicas de baja masa molar como agua, CO_2 , NH_4^+ , PO_4^{3-} , etc. Este proceso llamado mineralización es lo que idealmente se pretende alcanzar con estos compuestos, transformándolos en materiales disponibles para la vida en los suelos. En contraposición con esto, existen residuos de plaguicidas o productos de degradación que permanecen en los suelos por algún tiempo debido a la formación de enlaces covalentes entre partes del plaguicida y moléculas pertenecientes al suelo como las arcillas y los coloides orgánicos.

3. Características fisicoquímicas de los plaguicidas y su dinámica en el ambiente.

Para conocer la dinámica de un plaguicida en el ambiente es indispensable contar con la información del compuesto como sus propiedades fisicoquímicas, además de las características del suelo en donde se quiere aplicar y los procesos que pueden llevarse a cabo. Sin embargo, científicamente no siempre es posible predecir lo que ocurrirá con una molécula de estas características cuando ha entrado en el ambiente, puesto que las condiciones son muy distintas a las utilizadas en un laboratorio.

Presión de vapor: es una medida de la volatilidad de un plaguicida y determina de manera importante la velocidad de volatilización desde el suelo y cuerpos de agua superficiales contaminados (Tabla 1). La presión de vapor varía según la temperatura, incrementando a medida que ésta aumenta y viceversa. Se expresa utilizando unidades de presión como Pascales (Pa), atmósferas (atm) o milímetros de mercurio (mm Hg).

Tabla 1: Presión de vapor.

Presión de vapor del plaguicida (Pa)	Afinidad del plaguicida al suelo o agua	Plaguicida
$< 1,0 \times 10^{-8}$	Alta	Bajo potencial de volatilización
$> 1,0 \times 10^{-3}$	Baja	Alto potencial de volatilización

Constante de la Ley de Henry (Hc): describe la tendencia de un plaguicida a volatilizarse desde un suelo húmedo o desde el agua. Este valor se calcula utilizando la presión de vapor (mPa), la masa molar (g/mol) y la solubilidad en agua (mg/L).

$$Hc = P' * PM * 1 \times 10^{-3} / S_{\text{agua}}$$

Donde P' es la presión de vapor del compuesto, PM es la masa molar y S_{agua} es la solubilidad en agua. Cuando un plaguicida tiene una alta solubilidad en agua con relación a su presión de vapor (a igual temperatura), el plaguicida se

disolverá principalmente en agua (Tabla 2). Un valor elevado de la constante de Henry indica que el plaguicida tiene un potencial elevado para volatilizarse desde un suelo húmedo; por el contrario, un valor bajo indica un potencial elevado para lixiviarse.

Tabla 2: Constante de Henry.

Volatilidad del plaguicida		Rangos del valor de la constante de Henry ($\text{Pa m}^3 / \text{mol}$)	
No volátil	El plaguicida puede disolverse en agua	< 0,0001	Constante Baja <ul style="list-style-type: none"> • Presión de vapor baja • Alta solubilidad • Potencial de lixiviación
Baja volatilidad		0,0001 – 0,01	
Volatilidad moderada	El plaguicida puede volatilizarse	0,01 – 10	Constante Alta <ul style="list-style-type: none"> • Presión de vapor alta • Baja solubilidad • Potencial volatilización
Alta volatilidad		> 10	

Solubilidad en agua: ésta es una medida que determina la máxima concentración de un plaguicida al disolverse en un litro de agua. Las unidades de concentración utilizadas frecuentemente son: miligramo por litro (mg/L) equivalente a una parte por millón (ppm) o bien, microgramo por litro ($\mu\text{g/L}$) que equivale a una parte por billón (ppb). Cabe mencionar que existe una estrecha relación entre la solubilidad y la temperatura, aumentando a medida que ésta también se incrementa. Los plaguicidas con una alta solubilidad en agua se

adsorben débilmente a los suelos y son fácilmente transportados del lugar de aplicación por efecto de las aguas (lluvia, riego o escurrimiento) hasta cuerpos de agua superficiales o subterráneos.

Coefficiente de partición octanol / agua (Kow): Determina la hidrofobicidad de una molécula y constituye un punto clave para definir el lugar del plaguicida en el suelo. Corresponde a la medición de la tendencia de un compuesto para ser separado en una fase orgánica y una acuosa. Los plaguicidas con valores altos de Kow ($>10^4$) son considerados hidrofóbicos; mientras que los plaguicidas que tienen valores bajos de Kow (<10) se consideran relativamente hidrofílicos. Los primeros, tienden a acumularse en superficies orgánicas, tienen alta afinidad por los lípidos y por lo tanto, son potencialmente bioacumulables en la grasa corporal de animales, lo que constituye un riesgo para la salud de las personas.

Coefficientes de adsorción (Koc): Es el coeficiente de adsorción al carbono orgánico, determinando una medida de la afinidad del plaguicida hacia el suelo o los sedimentos, una vez que estos han sido normalizados para la concentración de carbono orgánico (Tabla 3). Es específico para cada plaguicida y es un valor adimensional puesto que se calcula mediante el valor de Kp (Coeficiente de partición entre el suelo o sedimento y el agua) y el Foc (Fracción de carbono orgánico en la fase del suelo o sedimento) de acuerdo a la siguiente relación:

$$Koc = Kp / Foc$$

Tabla 3: Coeficientes de adsorción de carbón orgánico (Koc).

Adsorción del plaguicida al suelo		Valores del coeficiente	
Muy débil	El plaguicida puede ser volátil	Menor a 10	Koc Bajo <ul style="list-style-type: none"> •El plaguicida puede distribuirse en cuerpos de agua o el aire. •El plaguicida puede no fijarse a la materia orgánica del suelo. •La vía de exposición al plaguicida puede ser inhalatoria.
Débil		10 a 100	
Moderada		100 a 1000	
Moderadamente fuerte	El plaguicida puede ser adsorbido por la materia orgánica del suelo y los sedimentos	1000 a 10000	Koc Alto <ul style="list-style-type: none"> •El plaguicida puede fijarse en el suelo, sedimento, biota y materia orgánica. •El plaguicida no puede moverse en aguas superficiales. •La vía de exposición al plaguicida puede ser por la cadena alimenticia.
Fuerte		10000 a 100000	
Muy fuerte		Mayor a 100000	

4. Plaguicidas en estudio.

Se estudiaron cuatro plaguicidas organofosforados (Figura 4), estos compuestos tienen la particularidad de poseer un grupo fosfato dentro de su estructura química y su función principal es ser insecticida para controlar las plagas que atacan los cultivos. No son plaguicidas de tipo sistémico, sino de contacto, inhalación e ingestión. Estos compuestos potencialmente pueden provocar graves daños en el ser humano puesto que son inhibidores de la enzima acetilcolinesterasa (AChE), responsable de la destrucción y término de la actividad biológica del neurotransmisor acetilcolina (ACh), provocando un aumento de ACh, acumulándose y afectando el normal funcionamiento del impulso nervioso alterando la sinapsis neuronal. (Vyas, 1998).

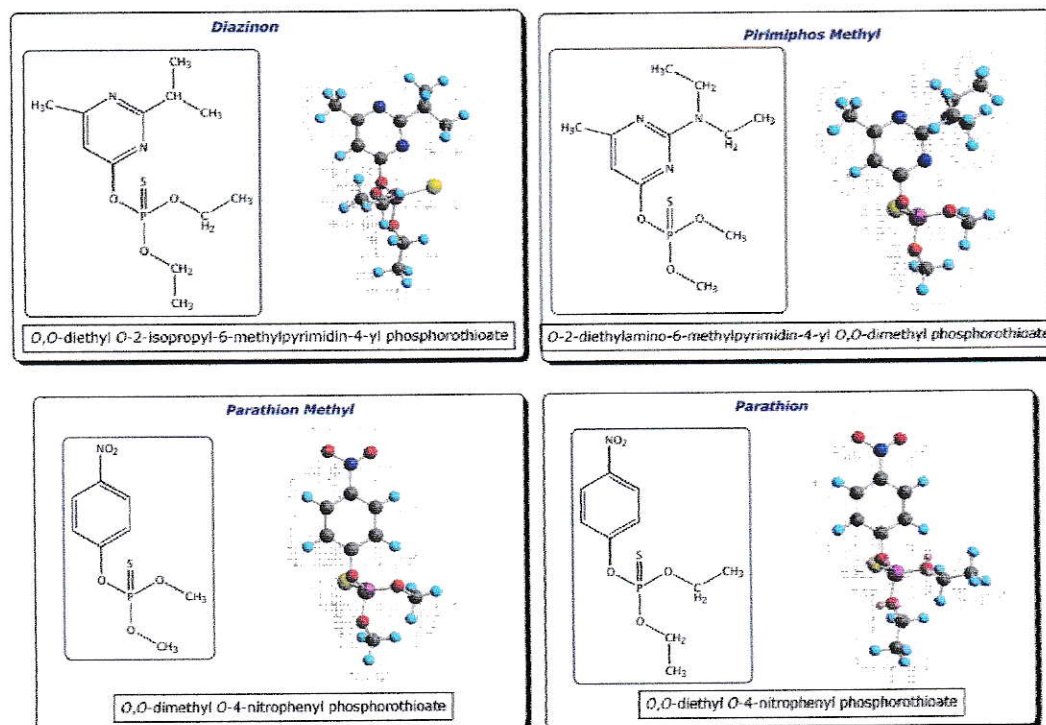


Figura 4: Plaguicidas organofosforados en estudio.

En la Tabla 4 se presentan los valores para algunos de los parámetros que definen las características de estos compuestos.

Tabla 4: Propiedades fisicoquímicas de los plaguicidas organofosforados.

	Diazinon	Metil Paration	Metil Pirimifos	Paration
Masa Molar (g/mol)	304,35	263,21	305,33	291,26
Solubilidad en agua a 20°C (mg/L)	60	55	11	12,4
Coef partición Log Kow a pH 7,0 y 20°C	3,69	3,0	3,9	3,83
Presión de vapor a 25°C (mPa)	11,97	0,2	0,002	0,89
Cte de la Ley de Henry a 25°C (Pa m ³ /mol)	0,061	0,0086	0,000061	0,031
Cte de adsorción de carbón orgánico Koc (mL/g)	643	240	1100	7660

Fuente: US-EPA y Miliarium (Ingeniería Civil y Medioambiente).

5. Metodologías de estudio de plaguicidas.

Existen diversas metodologías de análisis para el estudio de los plaguicidas que particularmente dependen del objetivo que se quiera alcanzar, puesto que pueden estar orientadas a determinar su comportamiento como método de acción y especificidad, detección y cuantificación, destino final en el medio

ambiente, grado de persistencia, niveles de tolerancia y concentraciones máximas permitidas en animales, vegetales, medio ambiente y seres humanos, y varios otros importantes temas que pueden ser estudiados acerca de estos compuestos químicos. En el caso puntual de la determinación en matrices ambientales sólidas como los suelos, una etapa que resulta casi ineludible es su extracción desde la matriz previa a la cuantificación.

Desde el punto de vista de la extracción de plaguicidas lo que se quiere en primer lugar es separar el analito del resto de la matriz, preconcentrar los compuestos para mejorar la sensibilidad y aumentar la selectividad mediante la eliminación de interferencias, todo esto, favorece la detección de los analitos en el nuevo medio donde se encuentran permitiendo cuantificarlos de manera óptima mediante la técnica seleccionada. Convencionalmente existen varios tipos de extracción utilizados, entre los cuales se pueden encontrar la extracción sólido-líquido, líquido-líquido, extracción en fase sólida y la extracción con fluidos supercríticos, en todos los casos la muestra se debe poner en contacto con un extractante (sólido, líquido o fluido supercrítico) en determinadas condiciones con el objeto de debilitar las interacciones entre el analito y la matriz e incrementar las interacciones entre el analito y el extractante. Generalmente estas técnicas analíticas requieren que el analito se encuentre en solución, por lo tanto para muestras sólidas es necesario utilizar algún compuesto líquido que nos permita separar el analito de la muestra,

mientras que para muestras líquidas la extracción va encaminada hacia la preconcentración del analito, cambio de solvente o limpieza de interferentes.

La extracción sólido-líquido es el proceso de extracción más utilizado para muestras sólidas, en este caso la muestra se pone en contacto con el solvente adecuado y se somete a algún proceso más o menos agresivo en función de la fortaleza de las interacciones entre el analito y la matriz. Esta extracción debe ser optimizada, buscando obtener la mayor cantidad posible del analito en estudio y la mínima de otros compuestos no deseados de la matriz. Uno de estos tipos de extracción es la agitación, un procedimiento muy suave que depende además de otros factores como el tipo de matriz. Para interacciones más intensas puede utilizarse la radiación de ultrasonidos que provoca la vibración de las moléculas aumentando la eficacia de los choques entre ellas. Para interacciones aun mas intensas se utiliza la extracción Soxhlet. La mezcla disolvente - muestra se calienta de forma continua sin riesgo de evaporación del analito o del disolvente. Este procedimiento tiene como principal inconveniente el largo tiempo de extracción (12-48 h) y el elevado volumen de disolventes orgánicos que se utilizan para tratar una muestra (300-500 mL). Sin embargo, es el método más utilizado y referencia de todas las técnicas de extracción actuales.

Existen además otras técnicas como la extracción acelerada con disolvente o con líquido a alta presión, basada en la utilización de disolventes orgánicos a

alta presión y temperatura. Su fundamento se basa en que las altas temperaturas aceleran la cinética de la extracción y la elevada presión mantiene el disolvente en estado líquido permitiendo una extracción rápida y segura. En este caso la muestra es colocada en una celda y se añade un volumen de disolvente entre 15 y 40 mL, a continuación se aplica una temperatura de hasta 200 °C y una presión de hasta 20 mPa, después de un periodo de tiempo en estas condiciones, alrededor de 10 a 15 min el extracto puede ser analizado y generalmente sin necesidad de un proceso de limpieza posterior.

La extracción con microondas surge como una alternativa a la extracción Soxhlet con un calentamiento más rápido y eficaz. En este caso la muestra es colocada en un recipiente (este por lo general es capaz de soportar altas temperaturas y presiones siendo de un material resistente e inerte a la muestra y los solventes utilizados) se le adiciona el disolvente y se somete a la radiación de microondas. Posteriormente el extracto debiese ser filtrado y/o limpiado cuando la muestra no quede idealmente limpia para ser cuantificada mediante la técnica de detección seleccionada. El disolvente se debe elegir en función de su comportamiento ante las microondas, su interacción con la matriz y la solubilidad de los analitos. La energía microondas es absorbida por moléculas con momento dipolar permanente produciendo su rotación, siendo esta la responsable del calentamiento de la muestra. La gran ventaja frente a la extracción Soxhlet la presentan los tiempos de análisis, los bajos volúmenes de disolvente y el análisis simultáneo de muestras. La aplicación de esta técnica de

extracción crece cada día y dentro de ellas se cuentan la determinación de PAHs, fenoles y pesticidas organoclorados, organofosforados y triacínicos en distintos tipos de muestras (suelos, sedimentos, etc.). (Boudou, 1989; Volker, 1993; Dean, 2000; Andreu, 2004; Douglas, 2004).

5.1. Diseño experimental y análisis por componentes principales.

Debido al número de factores experimentales que podrían tener efecto sobre la eficiencia de la extracción de un nuevo método propuesto, el proceso de estudio y optimización del mismo resulta ser complejo. Por ello es conveniente utilizar, para este fin, herramientas que permitan simplificar el proceso. En este sentido, el diseño de experimentos y el análisis por componentes principales son parte de estas herramientas y se basan en la utilización de conceptos estadísticos y quimiométricos para diseñar, planificar, explorar, optimizar y cuantificar los resultados de un nuevo procedimiento experimental.

En el diseño experimental el objetivo es llegar por medio de un camino eficiente a obtener la optimización de un proceso con un mínimo de experimentos. Ésta es una técnica orientada a problemas multivariantes, es decir, a sistemas que dependen de muchas variables, involucrando por una parte la descripción de una serie de experimentos que se llevarán a cabo con la intención de desarrollar un modelo y por otro lado, en la optimización de un proceso para determinar la serie de condiciones que son requeridas para obtener un

resultado de características óptimas. Para desarrollar un diseño es necesario saber que la obtención de un modelo depende de los experimentos realizados y que éstos no son llevados a cabo de un modo azaroso sino a través de una planificación considerada cuidadosamente. Se requiere además tener muy claro cuales son los factores o variables manejables de manera controlada para los que deseamos estudiar sus efectos sobre el proceso y que tienen, o podrían tener influencia sobre las características estudiadas (factores pueden ser, concentración de reactivos, pH, volumen de muestra, etc). Los niveles son los diferentes valores que toman los factores al momento de llevarlos a la práctica en el terreno de los experimentos; en este sentido, los es el primer paso a considerar en un diseño de experimentos (niveles para un ensayo con distintos solventes pueden ser, agua – acetona – metanol). Las respuestas son aquellas características del proceso que quiere ser optimizado, por lo tanto, son variables que describen la eficiencia del sistema (respuestas pueden ser, máxima intensidad de señal, mínimo error relativo, máxima recuperación, etc). El diseño experimental se utiliza para desarrollar modelos empíricos, es decir, en situaciones donde no es posible deducir la función de respuesta desde una teoría. Ahora bien, una teoría permite conocer de antemano la relación que existe entre una respuesta y cierto factor, sin embargo, rara vez se conocen los coeficientes de tal función.

En el análisis de problemas multivariantes, el volumen de los datos puede dificultar el reconocimiento de pautas y relaciones. De esta manera, el objetivo

de los métodos de análisis multivariados como el de componentes principales (PCA) es la reducción de los datos. Este análisis permite reducir la cantidad de datos cuando está presente la correlación y la idea principal es encontrar componentes que sean combinaciones lineales de las variables originales capaces de describir a cada muestra. Por ejemplo:

$$Z_1 = a_{11}X_1 + a_{12}X_2 + a_{13}X_3 + \dots + a_{1n}X_n$$

$$Z_2 = a_{21}X_1 + a_{22}X_2 + a_{23}X_3 + \dots + a_{2n}X_n$$

$$Z_n = a_{n1}X_1 + a_{n2}X_2 + a_{n3}X_3 + \dots + a_{nn}X_n$$

Donde Z_1, Z_2, Z_n son las componentes principales de las combinaciones lineales de las variables originales X_1, X_2, X_n . Los coeficientes a_{11}, a_{12} , etc son elegidos de manera tal que las nuevas variables a diferencia de las variables originales no se encuentren correlacionadas entre sí. La generación de este nuevo conjunto de variables puede parecer algo sin sentido, sin embargo, las componentes principales también se eligen de manera que la primera componente (CP1 = Z_1) recoja la mayor parte de la variación que hay en el conjunto de datos, la segunda componente (CP2 = Z_2) recoja la siguiente mayor parte de la variación y así sucesivamente. Por consiguiente, cuando haya una correlación significativa el número de componentes útiles será mucho menor que el número de variables originales. De esta forma es posible simplificar y condensar la información obtenida para poder analizarla de manera más rápida y fácil. (Miller, 2002)

Finalmente y sobre la base de los antecedentes presentados, se plantea la siguiente hipótesis de trabajo.

6. Hipótesis

Es posible extraer eficientemente residuos de plaguicidas organofosforados hidrofóbicos desde suelos agrícolas mediante extracción sólido-líquido utilizando una mezcla de agua-solvente orgánico y reparto simultáneo en hexano, con la asistencia de microondas, para su determinación por cromatografía de gases.

Lo anterior implica identificar las variables experimentales que tienen un efecto significativo sobre la eficiencia de la extracción del método propuesto, optimizarlo y validarlo con el apoyo de herramientas quimiométricas y estadísticas adecuadas.

6.1. Objetivo General

Desarrollar un método analítico para la determinación de plaguicidas organofosforados en suelos agrícolas, basado en una extracción asistida por microondas y determinación mediante cromatografía de gases con detector fotométrico de llama (GC-FPD)

6.2. *Objetivos Específicos*

- i) Optimizar la determinación de los insecticidas organofosforados Diazinon, Metil Paration, Metil Pirimifos y Paration mediante GC-FPD.
- ii) Proponer, desarrollar y optimizar un método de extracción de los insecticidas desde los suelos agrícolas con características diferentes, utilizando un medio acuoso para la desorción y partición simultanea en n-hexano asistida por microondas.
- iii) Incorporar herramientas estadísticas y quimiométricas adecuadas para estudiar y optimizar las diferentes variables experimentales que afecten la eficiencia de extracción de los compuestos desde el suelo.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Reactivos

- Solventes
- Acetona grado pesticidas, Fisher
- Acetonitrilo grado HPLC, Fisher
- Agua calidad nanogrado
- Hexano grado pesticidas, Fisher
- Metanol grado HPLC, Fisher
- Gases
- Aire sintético (21±2% O₂ + N₂), AGA
- Helio, AGA
- Hidrógeno, AGA
- Nitrógeno extra puro (99,995%), AGA
- Pesticidas
- Diazinon (99%), Chem Service
- Metil Paratión (98%), Chem Service
- Metil Pirimifos (99%), Chem Service
- Paratión (98%), Chem Service
- Trifenilfosfato - TFF (99%), Aldrich
- Otros Compuestos
- Aceite de Oliva (Imitador de matriz)
- Citrato de Sodio, PA Merck

- Hidróxido de Sodio granular, PA Merck
- Sulfato de Sodio grado pesticidas, Merck

2. Materiales

- Jeringas de Vidrio (10 μ L) para inyección de muestras al Cromatógrafo de Gases, Hewlett Packard
- Material de vidrio de uso general y volumétrico clase A
- Micro pipetas de desplazamiento de aire de 20-100 μ L y de 100-1000 μ L, Eppendorf
- Mortero de porcelana
- Viales de vidrio (5 mL) con fondo cónico para evaporación de solvente y redisolución
- Viales de vidrio (15 mL) color ámbar para guardar soluciones patrón

3. Equipos

- Balanza Analítica Precisa 40SM-200AS (\pm 0,001 g)
- Balanza de precisión Precisa 4000 C (\pm 0,00001 g)
- Equipo de purificación de agua NANOpure Ultrapure Water System Barnstead
- Estufa para secado WTB Binder

4. Sistema de extracción.

Horno de microondas para digestión Milestone MLS-1200 Mega, dispone de 2 carruseles de polipropileno (6 y 10 vasos) de TMF (Tetrafluormethaxil).

5. Sistema Cromatográfico.

Cromatógrafo de Gases Hewlett Packard 5890 Series II (Figura 5) provisto con detector fotométrico de llama (FPD) específico para fósforo, inyección manual split/splitless y un integrador monocanal para la adquisición de resultados. Para el estudio realizado se utilizó una columna capilar HP Ultra 2 (25 m x 0,2 mm d.i., 0,33 μm de espesor de recubrimiento (Poli (5% difenil / 95% dimetil) Siloxano).



Figura 5: Cromatógrafo de Gases Hewlett Packard 5890 Series II.

Las condiciones utilizadas del detector fueron: flujo de aire de 100 mL/min, hidrógeno de 75 mL/min, nitrógeno como gas auxiliar de 20 mL/min y helio como gas portador.

6. Suelos utilizados. Clasificación y caracterización.

Se utilizaron cinco tipos de suelos con diferentes características y propiedades fisicoquímicas, provenientes de distintas zonas agrícolas de Chile. Tres son de tipo no alofánico, Pocuro (PCR) y Quillota (QTA) provenientes del Valle del Aconcagua (Región de Valparaíso) y Rancagua (RGA) proveniente del Valle del Cachapoal (Región del Libertador Gral. Bernardo O'Higgins); y dos de tipo alofánico, Temuco (TEM) y Vilcún (VLC) provenientes de la Región de la Araucanía. En la Tabla 5 se describen las principales características y propiedades fisicoquímicas de estos suelos, los cuales fueron recogidos entre 0-20 cm de profundidad, secados al aire, tamizados de tal forma de obtener un diámetro de partícula de 2,0 mm y posteriormente guardados en frascos plásticos sellados a temperatura ambiente.

Tabla 5: Características y propiedades fisicoquímicas de los suelos.

Suelo	MO (%)	pH	Arcilla (%)	Limo (%)	Arena (%)	Textura
TEM	12,0	6,3	22,6	58,6	18,8	Franco limo arcilloso
VLC	13,4	6,3	32,7	33,0	34,3	Franco arcilloso
QTA	3,1	7,4	15,8	54,1	30,1	Franco limoso
RGA	1,9	6,9	15,7	44,9	39,4	Franco
PCR	1,8	7,2	17,5	50,7	31,8	Franco limoso

7. Disoluciones.

7.1 Disoluciones estándar de Diazinon, Metil Paration, Metil Pirimifos y Paration.

Se prepararon disoluciones de cada uno de los plaguicidas. Se masó en forma individual una cantidad de patron de Diazinon, Metil Paration, Metil Pirimifos y Paration: 10,78; 11,39; 11,89 y 10,84 mg respectivamente. A continuación cada muestra se traspasó cuantitativamente a un matraz de aforo de 10 mL y se completo el volumen con acetona. Estas disoluciones fueron utilizadas como punto de partida para preparar las disoluciones patrones de calibración, disoluciones acuosas para fortificación de suelos y en otros solventes orgánicos para los estudios realizados.

7.2 Disolución estándar de Trifenilfosfato (TFF).

Se preparó una disolución de Trifenilfosfato (TFF) para ser utilizado como estándar interno en todos los procesos de determinación cromatográfica; su finalidad es la de comparar el área de la señal de cualquiera de los compuestos con el área de la señal de éste, tomándolo como un valor de referencia para estandarizar la respuesta cromatográfica. Se pesó 26,10 mg de TFF, los que fueron traspasados cuantitativamente a un matraz de 25 mL y se completó el volumen con acetona. Esta disolución fue utilizada como punto de partida para ser agregada a cada uno de los patrones de calibración y muestras que fueron determinadas mediante cromatografía de gases. La concentración de este patrón se estableció en 0,1044 µg/mL para cada medida realizada.

7.3 Disolución de Aceite de Oliva en Hexano.

Se preparó una disolución al 0,3% v/v de aceite de oliva en hexano la que se usó para enrasar los patrones de la curva de calibración y los extractos luego del proceso de extracción en microondas. Esta solución de aceite de oliva se utilizó como imitador de matriz ("matrix mimic") en la determinación cromatográfica de los compuestos.

7.4 Disoluciones para extracción con agentes co-extractantes (Sulfato de Sodio y Citrato de Sodio).

Se masó 24,87 mg de sulfato de sodio (Na_2SO_4) o 25,71 mg de citrato de sodio ($\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3 \times 2\text{H}_2\text{O}$) y se llevaron a un matraz de aforo de 25 mL completando su volumen con agua nanopure, alcanzándose una concentración de 994,4 mg/L y 1028,4 mg/L (902,5 mg/L para la molécula anhidra), respectivamente. De estas disoluciones se midieron 5 mL ó 12,5 mL y se llevaron a matraces de 25 mL, añadiéndoles luego la cantidad de agua y/o metanol necesaria para alcanzar la proporción 1:1 v/v Agua/MeOH. Las concentraciones de los co-extractantes en las soluciones de extracción fueron de 497 mg/L y 199 mg/L para sulfato de sodio y 451 mg/L y 181 mg/L para citrato de sodio.

8. Métodos.

8.1 Pruebas de separación y determinación de Diazinon, Metil Paration, Metil Pirimifos, Paration y Trifenilfosfato (TFF) mediante cromatografía de gases con detector fotométrico de llama (GC-FPD).

A partir de las disoluciones estándar de cada plaguicida se procedió a realizar una dilución hasta una concentración de 0,216 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para Diazinon, 0,228 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para Metil Paration, 0,238 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para Metil Pirimifos y 0,217 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para Paration; estas diluciones se hicieron en matraces de aforo de 10 mL para cada

uno y otro igual con una mezcla de los cuatro plaguicidas más el patrón interno (TFF) a 0,418 µg/mL en cada una de ellas. A continuación se obtuvieron los cromatogramas mediante GC-FPD.

Mediante el siguiente programa se obtuvo la resolución de los cuatro compuestos más el patrón interno.

- Temperatura del Inyector: 250 °C.
- Temperatura del Detector: 280 °C.
- Inyección de 1,0 µL en modo "splitless".
- Temperatura Inicial: 70 °C mantenida por 2 min.
- Rampa A: 40 °C / min hasta 230 °C mantenida por 1 min.
- Rampa B: 10 °C / min hasta 280 °C mantenida por 1 min.
- Rampa C: 10 °C / min hasta 290 °C mantenida por 3 min.
- Tiempo Total: 17 min.

8.2 Estudio del efecto de Aceite de Oliva, como imitador de matriz (matrix mimic) sobre la señal cromatográfica de los plaguicidas organofosforados.

Se preparó una solución de 10 mL que contenían los cuatro plaguicidas organofosforados a una concentración de 0,1078 µg/mL para Diazinon, 0,2278 µg/mL para Metil Paration, 0,1190 µg/mL para Metil Pirimifos y 0,2168 µg/mL para Paration, además del patrón interno (TFF) a 0,1044 µg/mL. Estas

soluciones se llevaron al aforo con una solución de n-hexano y aceite de oliva a 0; 0,1; 0,2 y 0,3% v/v. A continuación se determinaron por cromatografía de gases (GC-FPD) bajo las condiciones óptimas de separación (II.8.1).

8.3 Determinación de los parámetros de calidad analítica instrumentales.

A partir de las disoluciones estándar iniciales para los cuatro plaguicidas organofosforados (II.7.1) se midieron 0,25 mL de la disolución de Diazinon y Metil Pirimifos, separadamente se midieron 0,5 mL de la disolución de Metil Paration y Paration llevándose a un matraz de aforo de 5,0 mL y se completó el aforo con con n-hexano. En seguida se midieron 0,25 mL de cada una de las soluciones anteriores y se llevaron a un matraz de aforo de 25 mL y se completó el volumen con n-hexano, llegando a una concentración de 0,539 $\mu\text{g/mL}$ para Diazinon; 0,595 $\mu\text{g/mL}$ para Metil Pirimifos; 1,084 $\mu\text{g/mL}$ para Paration y 1,139 $\mu\text{g/mL}$ para Metil Paration. Esta disolución fue utilizada para preparar la curva de calibración al tomar los volúmenes indicados en la Tabla 6, agregando además 0,02 mL de una dilución intermedia de TFF (52,2 $\mu\text{g/mL}$) y enrasando hasta los 10 mL con la solución de aceite de oliva al 0,3% v/v en n-hexano (II.7.3).

Tabla 6: Construcción de la Curva de Calibración de acuerdo a las diluciones correspondientes.

Punto N°	Volumen de la Solución (mL) (*)	Concentración Diazinon ($\mu\text{g/mL}$)	Concentración Metil Paration ($\mu\text{g/mL}$)	Concentración Metil Pirimifos ($\mu\text{g/mL}$)	Concentración Paration ($\mu\text{g/mL}$)
1	0,05	0,0027	0,0057	0,0029	0,0054
2	0,1	0,0054	0,0114	0,0059	0,0108
3	0,2	0,0108	0,0228	0,0119	0,0217
4	0,3	0,0162	0,0342	0,0179	0,0325
5	0,4	0,0216	0,0456	0,0238	0,0434
6	0,5	0,0270	0,0570	0,0298	0,0542
7	0,75	0,0404	0,0854	0,0446	0,0813
8	1,0	0,0539	0,1139	0,0595	0,1084
9	1,25	0,0674	0,1424	0,0744	0,1355
10	1,5	0,0809	0,1709	0,0893	0,1626
11	2,0	0,1078	0,2278	0,1190	0,2168

(*) Volumen de la alícuota que se debe extraer desde la solución de 0,5 ó 1,0 $\mu\text{g/mL}$ para llevarla a un volumen de 10 mL en un matraz de aforo con el objeto de obtener las concentraciones que se observan en cada punto de la curva.

Utilizando las condiciones óptimas para la determinación mediante el método GC-FPD (II.8.1) y a partir de esta curva de calibración se obtuvo el límite de detección (LOD), cuantificación (LOQ) y la sensibilidad analítica; para obtener estos resultados se utilizan los puntos 1, 2, 4, 5 y 6. Mientras que para calcular la linealidad se utilizan los puntos 6, 7, 8, 9, 10 y 11.

8.4 Estudio de reparto de los plaguicidas organofosforados utilizando la extracción asistida por microondas.

A partir de las disoluciones estándar para los cuatro plaguicidas organofosforados (II.7.1) se preparan disoluciones acuosas diluidas de 10 mL con alícuotas de 0,05 mL para Diazinon y Metil Pirimifos, y de 0,1 mL para Metil Paration y Paration. En seguida se tomaron 0,5 mL de cada una de estas soluciones y se llevaron nuevamente a 10 mL pero esta vez en tres tipos distintos de solventes; agua, agua/metanol o agua/acetonitrilo, estos dos últimos en proporción 1:1. En todos los casos se obtuvieron concentraciones de 0,2695 µg/mL para Diazinon; 0,2975 µg/mL para Metil Pirimifos; 0,542 µg/mL para Paration y 0,5695 µg/mL para Metil Paration. Utilizando estas soluciones se realizó el estudio de reparto.

Para evaluar el reparto de los plaguicidas desde la fase acuosa a la fase orgánica en n-Hexano, utilizando el procedimiento asistido por microondas, se realizan los siguientes pasos:

- Se midió 2,0 mL de la solución que contiene a los cuatro plaguicidas (agua, agua/metanol o agua/acetonitrilo) y se depositan en un vaso de microondas.
- Se agregaron 5,0 mL de n-hexano.
- Se introducen las muestras al horno de microondas con una etapa inicial de 2 min a 250 W y en una segunda etapa de 3 o 6 min a 300 o 600 W según el diseño experimental factorial multinivel.

Con este diseño se realizó un análisis estadístico para los tres factores a distintos niveles, es decir, $(2^2 * 3^1)$ lo que significa que se estudian dos factores a dos niveles y un factor a tres niveles; a esto se le suman cuatro duplicados al azar para poder estimar el error experimental. Con este diseño se pueden determinar los efectos individuales y las principales interacciones entre los factores. En la Tabla 7 se muestran los factores y niveles a los cuales fueron realizados los experimentos y en la Tabla 8 se muestra la matriz del diseño experimental. Para el análisis de datos y creación de la matriz experimental se utilizó el programa estadístico Statgraphics 5.1.

Tabla 7: Factores y niveles del diseño experimental factorial multinivel.

Factor	Niveles		
	-1	0	+1
A: Modif. Orgánico	Agua	Agua/Metanol	Agua/Acetonitrilo
B: Potencia (W)	300		600
C: Tiempo (min)	3		6

Tabla 8: Matriz del diseño experimental factorial multinivel.

Experimentos	A	B	C
1	-1	-1	-1
2	0	-1	-1
3	+1	-1	-1
4	-1	+1	-1
5	0	+1	-1
6	+1	+1	-1
7	-1	-1	+1

8	0	-1	+1
9	+1	-1	+1
10	-1	+1	+1
11	0	+1	+1
12	+1	+1	+1
3*	+1	-1	-1
5*	0	+1	-1
7*	-1	-1	+1
11*	0	+1	+1

Una vez realizada la extracción:

- Se extrajo el carrusel con los vasos que contienen las muestras y se enfriaron hasta alcanzar una temperatura cercana a la temperatura ambiente procurando con ello eliminar la pérdida de solvente por evaporación a altas temperaturas.
- Se extrajo el sobrenadante (fase orgánica de n-hexano) a viales de fondo cónico mediante una pipeta Pasteur. A continuación se llevó a sequedad mediante la evaporación bajo una corriente de nitrógeno puro (N₂).
- Finalmente se redisolvió con 1,0 mL de la solución de aceite de oliva al 0,3% v/v en n-hexano, se añadió una cantidad de 0,05 mL de la dilución de patrón interno (TFF) de 2,088 µg/mL con lo cual se logra alcanzar la concentración deseada de 0,1044 µg/mL.
- Se cuantificó mediante las condiciones óptimas para la determinación con GC-FPD (II.8.1).

8.5 Evaluación de respuesta cromatográfica entre los plaguicidas organofosforados sometidos a reparto y disueltos en n-hexano.

Se construyeron dos curvas de calibración (Tabla 9), una en medio de n-hexano a partir de una solución con los cuatro plaguicidas organofosforados de concentración 0,539 µg/mL para Diazinon; 0,595 µg/mL para Metil Pirimifos; 1,084 µg/mL para Paration y 1,139 µg/mL para Metil Paration (II.8.3) y otra en medio acuoso realizando el mismo procedimiento de las diluciones desde el estándar en acetona pero esta vez utilizando agua como solvente.

Tabla 9: Construcción de la Curva de Calibración comparada de acuerdo a las diluciones correspondientes (Solvente n-hexano o agua).

Punto N°	Volumen Solución Madre (mL) (*)	Concentración Diazinon (µg/mL)	Concentración Metil Paration (µg/mL)	Concentración Metil Pirimifos (µg/mL)	Concentración Paration (µg/mL)
1	0,25	0,0135	0,0285	0,0149	0,0271
2	0,5	0,0270	0,0570	0,0298	0,0542
3	1,0	0,0539	0,1139	0,0595	0,1084
4	1,5	0,0809	0,1709	0,0893	0,1626
5	2,0	0,1078	0,2278	0,1190	0,2168

(*) Volumen de la alícuota que se debe extraer desde la solución de 0,5 o 1,0 µg/mL para llevarla a un volumen de 10 mL en un matraz de aforo con el objeto de obtener las concentraciones que se observan en cada punto de la curva.

Se obtuvieron los cromatogramas de la curva en *n*-hexano directamente; mientras que para la curva en medio acuoso se procedió de igual manera a como se detalló en el punto (II.8.4).

8.6 Contaminación de los suelos.

Para contaminar los suelos con los plaguicidas en estudio se realizó el siguiente procedimiento:

- Se masó por separado 20 g de cada suelo seco y tamizado previamente (II.6) en un vaso de precipitado de 200 mL.
- Se le agregó 10 mL de la solución acuosa para contaminar el suelo. Esta solución se preparó a partir del estándar en acetona (II.7.1), pasando por una dilución intermedia para llegar finalmente a una concentración de 0,216 $\mu\text{g/mL}$ para Diazinon; 0,238 $\mu\text{g/mL}$ para Metil Pirimifos; 0,434 $\mu\text{g/mL}$ para Paration y 0,456 $\mu\text{g/mL}$ para Metil Paration en medio acuoso.
- Se agitaron los recipientes mecánicamente durante 2 h, procurando una buena homogenización.
- Se colocaron todos los recipientes dentro de la estufa a 30 °C procurando un secado lento durante 15 h.
- Se extrajeron los suelos contaminados desde los vasos de precipitado y una vez secos se homogenizaron mediante la utilización de un mortero de porcelana.

- Se almacenaron los distintos suelos en frascos plásticos, rotulados debidamente y en condiciones de -20 °C por 20 días antes de ser utilizados para la extracción.

8.7 Método de extracción y partición asistido por microondas (MAEP).

Se realizó una primera extracción utilizando el método MAEP para establecer cual de los suelos en estudio sería el que posteriormente se utilizaría para evaluar el efecto de los diferentes factores que afectan la extracción de los plaguicidas y que también nos serviría para realizar la optimización del método propuesto.

El método de extracción contempló los siguientes pasos:

- Se tomó 1,0 g de suelo contaminado con los plaguicidas en estudio, cada suelo fue masado directamente en el vaso de microondas donde se realizó la extracción (cada suelo se extrajo en duplicado para los efectos del cálculo de error experimental).
- Se agregó 1,0 mL de solución extractante (Agua / ACN), se agitó manualmente procurando una buena homogeneización y se adicionaron 5,0 mL de n-hexano.
- Se introdujeron las muestras al horno de microondas con un programa de 2 min iniciales a una potencia de 250 W y 10 min a una potencia de 900 W.

- Se extrajo el carrusel con los vasos que contienen las muestras y se enfriaron hasta alcanzar una temperatura cercana a la temperatura ambiental procurando con ello eliminar la pérdida de solvente por evaporación a altas temperaturas.
- Se extrajo el sobrenadante (fase orgánica de n-hexano) a tubos de fondo cónico mediante una pipeta Pasteur. A continuación se llevó a sequedad mediante la evaporación bajo una corriente de nitrógeno puro (N_2).
- Finalmente se redisolvió con 1,0 mL de la solución de aceite de oliva al 0,3% v/v en n-hexano, se añadió una cantidad de 0,05 mL de la dilución de patrón interno (TFF) de 2,088 $\mu\text{g}/\text{mL}$ con lo cual se logra alcanzar la concentración deseada de 0,1044 $\mu\text{g}/\text{mL}$.
- Se cuantificó mediante las condiciones óptimas para la determinación con GC-FPD (II.8.1).

8.8 Screening o exploración de los factores que afectan la extracción de los plaguicidas utilizando el método MAEP.

Se realizó un "Screening" o exploración para evaluar el efecto de cinco factores sobre la eficiencia de la extracción mediante un diseño experimental del tipo factorial fraccionado. Este diseño realiza un análisis estadístico para los cinco factores a dos niveles, es decir, 2^{5-1} lo que representa a 16 experimentos; a éstos se suman cuatro duplicados al azar para poder estimar el error

experimental. Mediante la utilización de este diseño es posible determinar la importancia o influencia de cada uno de los factores y las interacciones dobles más significativas sobre la eficiencia de la extracción utilizando el método (MAEP). En la Tabla 10 se muestran los factores y niveles a los cuales fueron realizados los experimentos y en la Tabla 11 se muestra la matriz del diseño experimental. Para el análisis de datos y creación de la matriz experimental se utilizó el programa estadístico Statgraphics 5.1.

Tabla 10: Factores y niveles del diseño experimental factorial fraccionado.

Factor	Niveles	
	-1	+1
A: Cantidad de modif. Orgánico (%v/v)	25	75
B: Tipo de modif. Orgánico	Metanol (MeOH)	Acetonitrilo (ACN)
C: Tiempo (min)	5	10
D: Potencia (W)	300	600
E: Volumen extractante (ml)	1	3

Tabla 11: Matriz del diseño experimental factorial fraccionado.

Experimento	A	B	C	D	E
1	-1	-1	-1	-1	+1
2	-1	-1	-1	+1	-1
3	-1	-1	+1	-1	-1
4	-1	-1	+1	+1	+1
5	-1	+1	-1	-1	-1
6	-1	+1	-1	+1	+1
7	-1	+1	+1	-1	+1
8	-1	+1	+1	+1	-1

9	+1	-1	-1	-1	-1
10	+1	-1	-1	+1	+1
11	+1	-1	+1	-1	+1
12	+1	-1	+1	+1	-1
13	+1	+1	-1	-1	+1
14	+1	+1	-1	+1	-1
15	+1	+1	+1	-1	-1
16	+1	+1	+1	+1	+1
1*	-1	-1	-1	-1	+1
8*	-1	+1	+1	+1	-1
10*	+1	-1	-1	+1	+1
16*	+1	+1	+1	+1	+1

Para evaluar el efecto de los factores sobre la extracción de los plaguicidas, utilizando el procedimiento asistido por microondas (MAEP), se realizaron los mismos pasos detallados en el punto (II.8.7), siguiendo además los detalles del diseño experimental.

8.9 Optimización de los factores que afectan la extracción de los plaguicidas utilizando el método MAEP.

Para realizar la optimización del método considerando los factores estudiados en el "Screening" mencionado anteriormente, se estableció un valor fijo para aquellos factores definidos como no significativos. Se fija el volumen de extractante en 1 mL, la potencia en 500 W y el modificador orgánico a utilizar en una primera instancia fue Acetonitrilo (ACN).

Se realizó un diseño experimental del tipo compuesto central. Este diseño realiza un análisis estadístico para los dos factores a optimizar con dos niveles, es decir, $2^2 + 2 \cdot 2 + 4$ centros lo que representa a 12 experimentos; a éstos se suman cuatro duplicados al azar para mejorar la estimación del error experimental. Mediante la utilización de este diseño es posible determinar una superficie de respuesta y con ello encontrar el valor óptimo que permita la mejor extracción utilizando el método (MAEP). En la Tabla 12 se muestran los factores y niveles a los cuales fueron realizados los experimentos y en la Tabla 13 se muestra la matriz del diseño experimental. Para el análisis de datos y creación de la matriz experimental se utilizó el programa estadístico Statgraphics 5.1.

Tabla 12: Factores y niveles del diseño experimental de compuesto central.

Factor	Niveles				
	$-\alpha$	-1	0	+1	$+\alpha$
A: Tiempo (min)	3	4	6,5	9	10
B: Cantidad de ACN (%v/v)	15	21,5	37,5	53,5	60
B': Cantidad de MeOH (%v/v)	20	29	50	71	80

Tabla 13: Matriz del diseño experimental de compuesto central.

Experimentos	A	B o B'
1	-1	-1
2	+1	-1
3	-1	+1
4	+1	+1

5	$-\alpha$	0
6	$+\alpha$	0
7	0	$-\alpha$
8	0	$+\alpha$
9	0	0
10	0	0
11	0	0
12	0	0
5*	$-\alpha$	0
6*	$+\alpha$	0
7*	0	$-\alpha$
8*	0	$+\alpha$

Para la optimización del método MAEP, se realizaron los mismos pasos detallados en el punto (II.8.7), siguiendo además los detalles del diseño experimental. Esta misma experiencia fue repetida, pero esta vez se utilizó MeOH como modificador orgánico en la solución extractante, de acuerdo con los porcentajes señalados en la Tabla 13 (Este cambio se observa en la tabla como B').

8.10 Evaluación del efecto del tipo de fortificación del suelo, tiempo y potencia de extracción sobre el método MAEP.

Se realizó un estudio del efecto de estos tres factores experimentales sobre la eficiencia de la extracción utilizando un diseño factorial multinivel. Este diseño realiza un análisis estadístico para los tres factores a distintos niveles, es decir,

$(3^2 * 2^1)$ lo que significa que se estudian dos factores a tres niveles y un factor a dos niveles. Con este diseño se pueden determinar los efectos individuales y las principales interacciones entre los factores. En la Tabla 14 se muestran los factores y niveles a los cuales fueron realizados los experimentos y en la Tabla 15 se muestra la matriz del diseño experimental. Para el análisis de datos y creación de la matriz experimental se utilizó el programa estadístico Statgraphics 5.1.

Tabla 14: Factores y niveles del diseño experimental factorial multinivel.

Factor	Niveles		
	-1	0	+1
A: Tiempo (min)	5	10	15
B: Potencia (W)	400	600	800
C: Modo de Contaminación (Temperatura de secado)	Temperatura ambiente (20 °C)		Temperatura estufa (30 °C)

Tabla 15: Matriz del diseño experimental factorial multinivel.

Experimentos	A	B	C
1	-1	-1	-1
2	0	-1	-1
3	+1	-1	-1
4	-1	0	-1
5	0	0	-1
6	+1	0	-1
7	-1	+1	-1
8	0	+1	-1
9	+1	+1	-1

10	-1	-1	+1
11	0	-1	+1
12	+1	-1	+1
13	-1	0	+1
14	0	0	+1
15	+1	0	+1
16	-1	+1	+1
17	0	+1	+1
18	+1	+1	+1

Para evaluar el efecto se siguieron los mismos pasos ya descritos para el método MAEP, considerando el tiempo y potencia según el diseño experimental.

8.11 Extracción bajo condiciones optimas utilizando el método MAEP.

Utilizando la metodología descrita en el punto (II.8.6) para la contaminación o fortificación de los suelos y el punto (II.8.7) para la extracción de los plaguicidas en estudio se procede a realizar el mismo procedimiento para todos los suelos que se estaban estudiando mediante las condiciones óptimas de extracción:

- Masa de muestra: 1,0 g.
- Volumen de solución extractante: 1,0 mL.
- Composición solución extractante: agua-metanol (50% v/v).
- Tiempo de extracción: 10 min.
- Potencia de extracción: 500 W.

8.12 Uso de agentes co-extractantes en el método MAEP.

Para esta extracción se probaron dos agentes co-extractantes que fueron añadidos a la solución de agua/metanol (50% v/v) utilizada en la extracción; una de Citrato de Sodio y otra de Sulfato de Sodio (II.7.4) (Tabla 16).

- Se aplicó el mismo procedimiento de extracción ya descrito, con la única diferencia que esta vez se agregó al suelo 1,0 mL de solución extractante Agua / MeOH (50% v/v) que contenía la mezcla con Citrato o Sulfato de Sodio, según la Tabla 16.

Tabla 16: Extracción de plaguicidas mediante método MAEP y adición de Citrato o Sulfato de Sodio.

Experimento (*)	Solución extractante (**)
1	Citrato (180,5 mg/L)
2	Citrato (451,25 mg/L)
3	Agua/MeOH (50% v/v)
4	Sulfato (198,88 mg/L)
5	Sulfato (497,2 mg/L)

(*) Todos los experimentos fueron realizados en duplicado.

(**) Todas las soluciones contienen Agua/MeOH (50% v/v).

- Se introducen las muestras de suelo al horno de microondas con un programa de 2 min iniciales a una potencia de 250 W y 10 min finales a una potencia de 500 W.

- Los pasos siguientes se mantienen de la misma manera que en las extracciones anteriores.

III. RESULTADOS Y DISCUSIONES.

1. Separación y determinación de Diazinon, Metil Paration, Metil Pirimifos, Paration y Trifenilfosfato (TFF) mediante cromatografía de gases con detector fotométrico de llama (GC-FPD).

Para la determinación de los plaguicidas organofosforados se utilizó el programa detallado en la sección (II.8.1), dando como resultado la separación de los compuestos basado en los distintos coeficientes de partición, producto del cociente entre la concentración de un compuesto en la fase estacionaria y su concentración en la fase móvil, lo que finalmente se traduce en la diferencia de velocidad a la cual se desplazan dentro de la columna. Además, por tratarse de compuestos con características estructurales muy similares fue necesario utilizar gradientes de temperatura que provocan la mayor separación de los compuestos haciendo que aquellos compuestos con presiones de vapor superiores se desplacen más rápidamente y aparezcan con un menor tiempo de retención como se observa en la Figura 6.

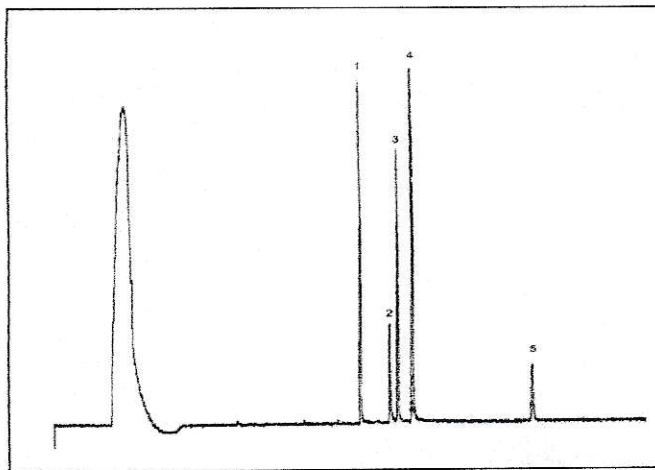


Figura 6: Cromatograma del conjunto de plaguicidas organofosforados a una concentración de 0,1 $\mu\text{g/mL}$ para Diazinon y Metil Pirimifos y 0,2 $\mu\text{g/mL}$ para Paration y Metil Paration. Plaguicidas: 1. Diazinon, 2. Metil Paration, 3. Metil Pirimifos, 4. Paration y 5. TFF (Patrón interno a 0,1 $\mu\text{g/mL}$).

2. Estudio del efecto de Aceite de Oliva, como imitador de matriz (matrix mimic) sobre la señal cromatográfica de los plaguicidas organofosforados.

El análisis mediante GC-FPD mostró señales atenuadas e irreproducibles para Metil Paration y Paration. Este efecto fue menor para Diazinon y Metil Pirimifos. En cromatografía gaseosa este es un problema común y se debe a interacciones indeseadas entre los analitos y los sitios activos del sistema de inyección y/o de la columna cuando no existe matriz en la solución inyectada. Un mejoramiento significativo de la calidad de las señales se obtiene cuando componentes de la matriz se encuentran presentes en la muestra y llenan estos sitios activos, producto de esto se reducen las interacciones con los analitos e

incrementa su transferencia a la columna. Este efecto se ha llamado "mejoramiento de respuesta cromatográfica inducida por la matriz" según D. R. Erney y col. (1993, citado por E. Fuentes y col. 2007) y puede lograrse al añadir un compuesto que imite a la matriz y proteja al analito de las interacciones no deseadas. Han sido evaluados una variedad de compuestos utilizados como imitadores de matriz por varios autores para mejorar la calidad de los análisis por GC (Anastassiades y col., 2003; Wong y col., 2003; Mastovska y col., 2005; Sanchez Brunete y col., 2005). Se han informados buenos resultados al utilizar ácido L-gulonico γ -lactona (Anastassiades y col., 2003; Mastovska y col., 2005), aceite de maíz (Wong y col., 2003) y aceite de oliva (Sanchez Brunete y col., 2005). Debido a su solubilidad en hexano y disponibilidad inmediata seleccionamos al aceite de oliva como el imitador de matriz para mejorar nuestro análisis cromatográfico. Al añadir diversas cantidades de aceite de oliva a las soluciones que contienen los plaguicidas disueltos en hexano (II.8.2), se obtuvo respuestas cromatográficas mejoradas, observándose un incremento notorio en el área de las señales, así como también en su calidad, es decir, picos más agudos y mejor definidos (Figura 7). El efecto protector de analito del aceite de oliva se debería a que sus componentes (ácidos grasos de cadena larga, especialmente el ácido oleico y linoleico) cubrirían los sitios ya mencionados.

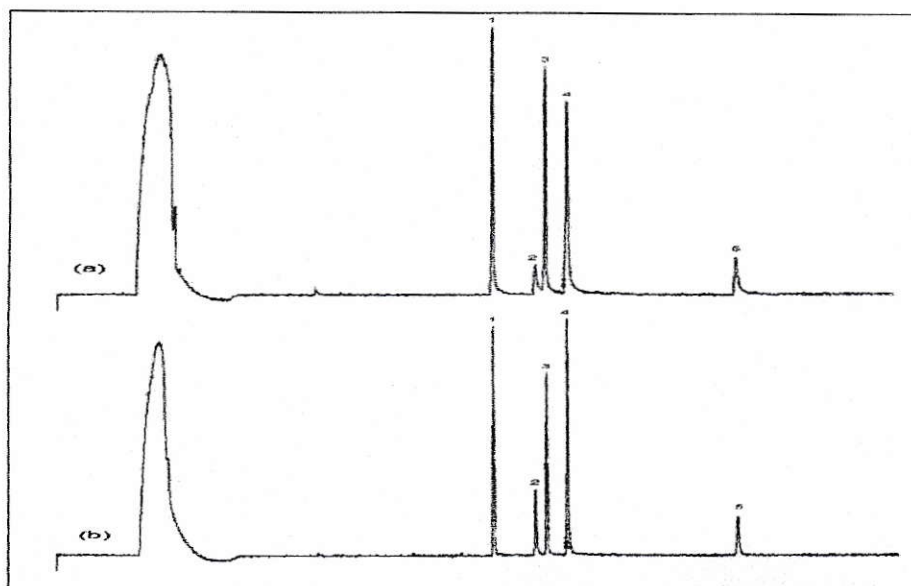


Figura 7: Incremento en área y calidad de los cromatogramas por efecto de Aceite de Oliva como imitador de matriz. Plaguicidas: 1. Diazinon, 2. Metil Paration, 3. Metil Pirimifos, 4. Paration y 5. TFF (Patrón interno a 0,1 $\mu\text{g/mL}$).
 (a) Cromatograma sin imitador de matriz (b) Cromatograma con Aceite de Oliva como imitador de matriz.

Según este estudio, las señales cromatográficas de los plaguicidas organofosforados se vieron beneficiadas por el efecto del aceite de oliva conforme se aumentaba la concentración de éste en la solución. Ello resultó particularmente notorio en el caso de Paration y Metil Paration que muestran incrementos en sus áreas entre 2 y 40 veces, respectivamente (Figura 8). No obstante lo anterior y pudiendo ser contraproducente para la integridad de la columna del equipo cromatográfico no se aumentó dicha concentración por sobre el 0,3% v/v ya que para la finalidad requerida el resultado ya era bastante adecuado.

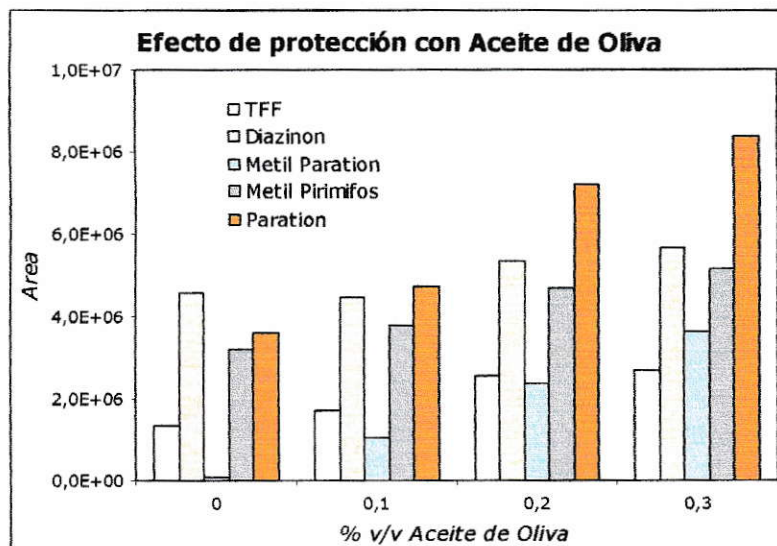


Figura 8: Aumento del área de la señal cromatográfica frente a la concentración de Aceite de Oliva.

De esta manera, los parámetros de calidad analítica fueron establecidos bajo esta condición.

3. Determinación de los parámetros de calidad analítica instrumentales.

Debido a las diferentes respuestas cromatográficas de los plaguicidas es posible agruparlos de acuerdo a la similitud de su señal de respuesta, como resultado entonces podemos observar por separado las curvas de calibración de los plaguicidas organofosforados en el Figura 9. Al evaluar el modelo lineal al que se ajustaron los datos mediante test F, en todos los casos se obtuvo un valor de p menor que 0,01; lo que indica que efectivamente hay una correlación

lineal entre la respuesta cromatográfica y la concentración de los analitos, con un 99% de probabilidad.

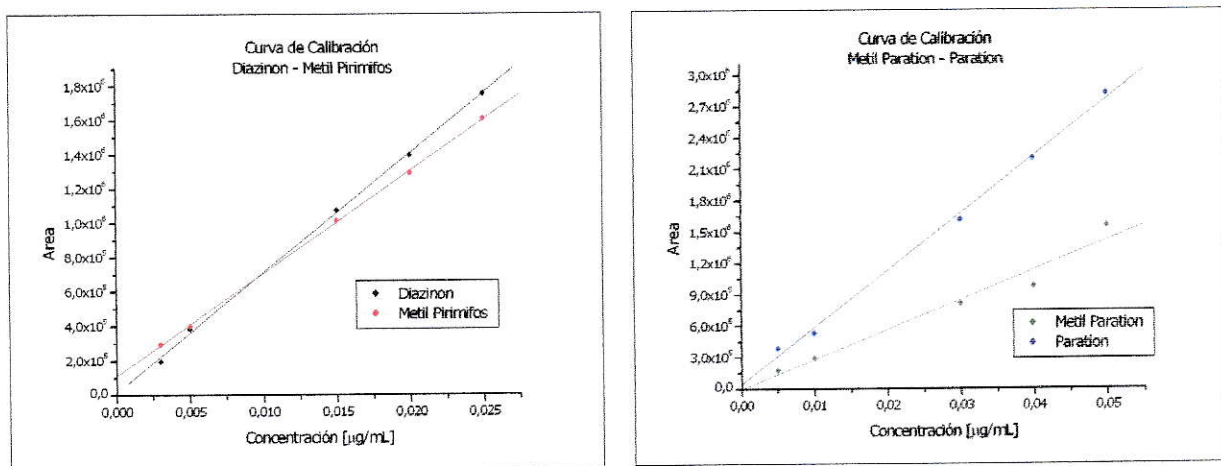


Figura 9: Curvas de Calibración para los plaguicidas organofosforados.

Los parámetros de calidad analítica instrumentales fueron calculados en función de las curvas de calibración realizadas de acuerdo al procedimiento y las concentraciones detalladas en la sección (II.8.3). Los valores del límite de detección (LOD), límite de cuantificación (LOQ), sensibilidad analítica (S) y linealidad (L) se calcularon de la siguiente manera:

Límite de detección (LOD) y Límite de cuantificación (LOQ).

$$LOD = \frac{3Sy/x}{b} \sqrt{\frac{N-2}{N-1}} \quad LOQ = \frac{10Sy/x}{b} \sqrt{\frac{N-2}{N-1}}$$

Tabla 17: Valores de los Límites de detección y cuantificación.

Compuesto	R ²	Pendiente	Intercepto	Sy/x	N	LOD	LOQ
Diazinon	0,99875	5,836 x 10 ⁻⁷	49840,17	22401	5	0,001	0,003
Metil Paration	0,99054	2,152 x 10 ⁻⁷	100486,52	79624	5	0,012	0,036
Metil Pirimifos	0,99803	5,049 x 10 ⁻⁷	149489,19	15539	5	0,001	0,003
Paration	0,99499	4,260 x 10 ⁻⁷	145965,55	47780	5	0,003	0,011

Sensibilidad Analítica (S) y Linealidad (L).

$$S = \frac{Sy/x}{b} \quad L = 1 - \left(\frac{Sb}{b} \right)$$

Tabla 18: Valores de la sensibilidad analítica y linealidad.

Compuesto	R ²	Pendiente	Intercepto	Sb	Sensibilidad	Linealidad
Diazinon	0,99875	5,836 x 10 ⁻⁷	49840,17	8,41 x 10 ⁻⁵	0,0004	0,9856
Metil	0,99054	2,152 x 10 ⁻⁷	100486,52	7,15 x 10 ⁻⁴	0,004	0,9967
Metil	0,99803	5,049 x 10 ⁻⁷	149489,19	9,16 x 10 ⁻⁵	0,0003	0,9819
Paration	0,99499	4,260 x 10 ⁻⁷	145965,55	2,13 x 10 ⁻⁵	0,001	0,9950

^a.- Se considera aceptable en linealidad un valor de $(1 - Sb/b) > (1 - 0,1/t_{(n-2)})$. En este caso y calculando el valor con $t_6 = 2,447$ para $n = 8$ (numero de puntos de la curva) el valor límite es 0,9591.

Donde Sy/x representa la desviación estándar de la regresión, Sb la desviación estándar de la pendiente, N al número de puntos de la curva de calibración y b al valor de la pendiente. Del análisis estadístico se desprende que el modelo lineal, con el cual se calculan los parámetros de calidad analítica instrumentales, es capaz de explicar un ajuste sobre el 99,8% para Diazinon y Metil Pirimifos, 99,5% para Paration y 99,1% para Metil Paration. El límite de

cuantificación instrumental fue de 0,003 $\mu\text{g/mL}$ para Diazinon y Metil Pirimifos, 0,011 $\mu\text{g/mL}$ para Paration y 0,036 $\mu\text{g/mL}$ para Metil Paration. Mientras que la sensibilidad analítica, o mínima diferencia en concentración que se puede discriminar estuvo comprendida entre 0,0004 y 0,004 $\mu\text{g/mL}$.

4. Estudio de reparto de los plaguicidas organofosforados utilizando la extracción asistida por microondas.

Este estudio fue llevado a cabo para evaluar la partición de los plaguicidas entre la solución acuosa (agua con y sin modificador orgánico) y n-hexano luego de someter la muestra a un calentamiento utilizando energía de microondas. Se utilizó el diseño experimental y el procedimiento detallado en la sección (II.8.4.) La Tabla 19 muestra las experiencias realizadas y los porcentajes de recuperación obtenidos para cada uno de los plaguicidas estudiados, mientras que la Figura 10 muestra las cartas pareto que permiten ver el efecto de los tres factores experimentales.

Tabla 19: Experiencias y porcentajes de recuperación para los plaguicidas organofosforados en el estudio de partición o reparto.

Exp	Modificador Orgánico	Potencia (W)	Tiempo (min)	Diazinon	Metil Paration	Metil Pirimifos	Paration
1	Agua	300	3	89,9	55,8	86,4	87,1
2	Agua/MeOH	300	3	92,3	72,5	83,9	80,1

3	Agua/ACN	300	3	84,2	27,9	87,6	55,3
4	Agua	600	3	91,5	66	89,2	87,6
5	Agua/MeOH	600	3	86,8	60,1	91,8	71,8
6	Agua/ACN	600	3	90,5	98,2	85,7	60,1
7	Agua	300	6	69,1	61,3	63,3	64,4
8	Agua/MeOH	300	6	88,2	80,4	91,7	72,3
9	Agua/ACN	300	6	80,5	35,1	81,8	86,2
10	Agua	600	6	83,4	124	77,5	80,7
11	Agua/MeOH	600	6	102	114	108	94,2
12	Agua/ACN	600	6	104	98,8	105	80,2
3*	Agua/ACN	300	3	94,7	31,7	104	66,2
5*	Agua/MeOH	600	3	89,9	66,5	94,6	84,5
7*	Agua	300	6	81,8	69,8	74,9	67,9
11*	Agua/MeOH	600	6	84,8	87	89,7	94,4

* Duplicados de las experiencias.

La partición con n-hexano de Diazinon y Metil Pirimifos no se vio afectada por factores experimentales y se observaron recuperaciones cercanas al 90% en casi todos los experimentos. La potencia y el tiempo tuvieron un efecto positivo sobre la partición de Metil Paration, alcanzando recuperaciones cuantitativas a 500 W y 6 min, independiente de la composición de la solución acuosa. La partición de Paration fue afectada positivamente por la interacción entre el tiempo de extracción y la composición de la solución. Esto significa que para una recuperación cuantitativa de Paration desde una mezcla de agua con modificador orgánico, se requieren 6 min como tiempo de irradiación de la muestra. Como se obtienen cuatro respuestas que corresponden a cada uno de los compuestos, pudiendo ser bastante diferentes entre sí, se realizó un análisis

por componentes principales (PCA) para simplificar y combinar estas respuestas en una sola; esta respuesta es capaz de explicar la mayor variabilidad de los resultados. El efecto de los factores experimentales sobre esta respuesta se observa en la Figura 10, donde la potencia y la interacción del tiempo con el modificador orgánico son significativos confirmando el análisis anterior.

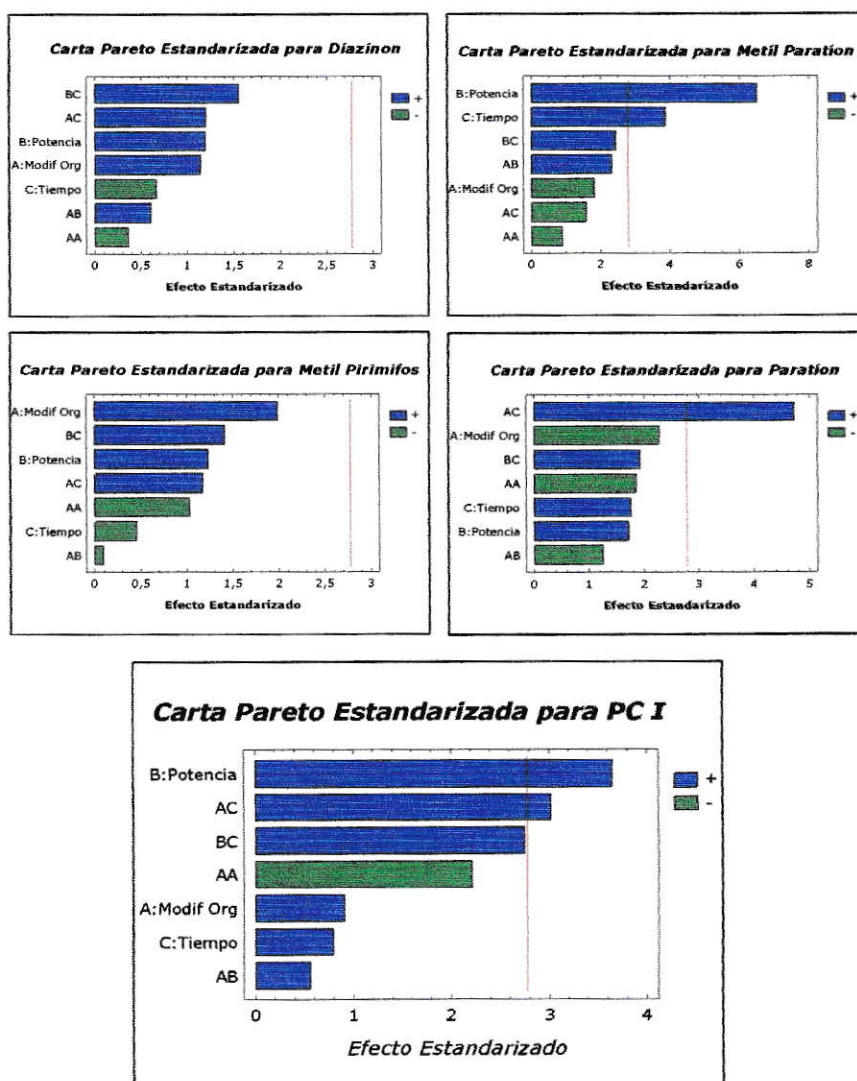
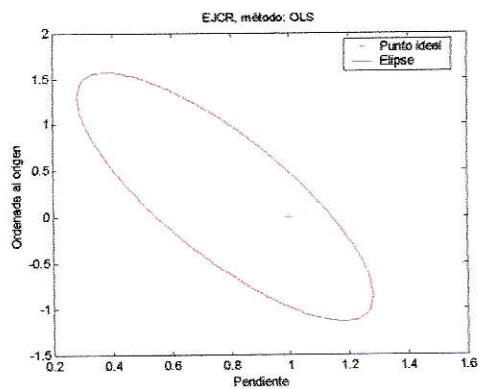
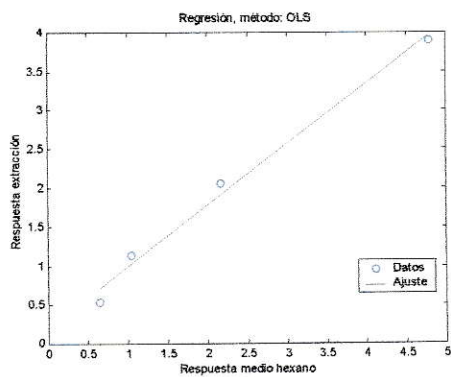


Figura 10: Carta Pareto estandarizada de los efectos de los factores experimentales sobre el reparto de los plaguicidas organofosforados.

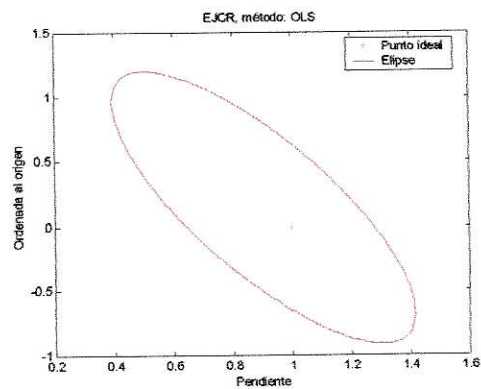
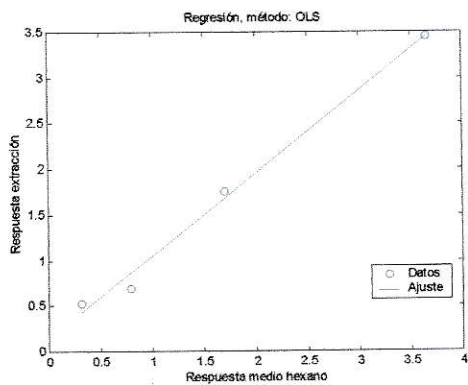
5. Comparación de respuesta cromatográfica entre los plaguicidas organofosforados sometidos a reparto y disueltos en n-Hexano.

Para evaluar las diferencias entre las respuestas cromatográficas de los compuestos disueltos en n-hexano y de los sometidos a MAEP, se realizó una comparación a través de una prueba de mínimos cuadrados con cinco puntos (Cardone, 1983; Boque y Rius, 1993). No se observaron diferencias sistemáticas ya que el punto (1,0) se encontró incluido dentro del intervalo de confianza de la pendiente e intercepto para todos los compuestos. La Figura 11 (a-d) muestra los resultados a la prueba de mínimos cuadrados para cada compuesto. En la Figura 11, la grafica de la izquierda muestra como la variable independiente contiene los datos de la respuesta de los analitos disueltos en n-hexano y la variable dependiente aquellos datos de la respuesta de los analitos una vez realizada la extracción y partición con microondas (MAEP), ajustados mediante este análisis estadístico. Mientras que la grafica de la derecha muestra una elipse construida con los valores obtenidos mediante el ajuste para cada punto sobre la pendiente y la ordenada al origen. Los resultados muestran que, bajo condiciones experimentales adecuadas (500 W y 6 min), la transferencia de compuestos de la mezcla acuosa a n-hexano no es un factor limitante en el método de extracción propuesto.

a) Diazinon

Pendiente: $0,78044 \pm 0,24223$ Desviación estándar: $0,056114$ Ordenada: $0,21986 \pm 0,6541$ Desviación estándar: $0,15153$ 

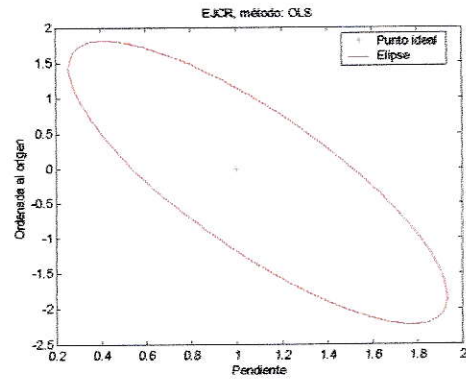
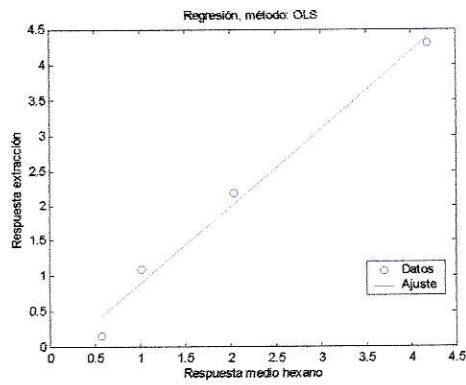
b) Metil Paration

Pendiente: $0,90448 \pm 0,24828$ Desviación estándar: $0,057515$ Ordenada: $0,14286 \pm 0,51218$ Desviación estándar: $0,11865$ 

c) Metil Pirimifos

Pendiente: $1,0958 \pm 0,40679$ Desviación estándar: 0,094237

Ordenada: $-0,20498 \pm 0,97733$ Desviación estándar: 0,22641



d) Paration

Pendiente: $0,91771 \pm 0,080901$ Desviación estándar: 0,018741

Ordenada: $0,2856 \pm 0,33769$ Desviación estándar: 0,07823

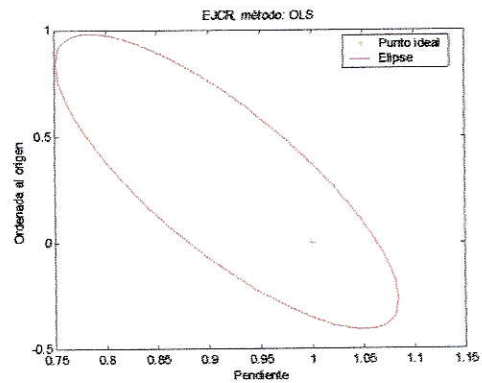
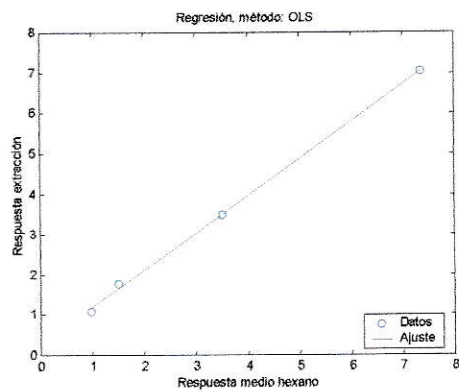


Figura 11 (a-d): Resultados de la prueba de mínimos cuadrados sobre la utilización del método MAEP.

6. Método de extracción y partición asistido por microondas (MAEP).

Esta primera extracción mediante el método MAEP realizada a los cinco suelos en estudio con las condiciones óptimas descritas en (II.8.7) y realizadas en un trabajo previo con plaguicidas organoclorados (Fuentes y col., 2006). Las recuperaciones de los plaguicidas se muestran a continuación en la siguiente Tabla 20.

Tabla 20: Recuperación de los plaguicidas en los distintos suelos en estudio.

Suelo	Diazinon	Metil Pirimifos	Paration	Metil Paration
Pocuro	29 ± 3	39 ± 3	75 ± 10	95 ± 25
Quillota*	27 ± 1	34 ± 1	65 ± 7	54 ± 1
Rancagua	27 ± 1	39 ± 3	73 ± 6	82 ± 15
Temuco	26 ± 2	31 ± 1	74 ± 2	88 ± 13
Vilcún	24 ± 1	32 ± 2	70 ± 4	112 ± 7

*suelo seleccionado.

Se puede observar que las mayores recuperaciones fueron obtenidas para Paration y Metil Paration independiente de los suelos utilizados, mientras que Diazinon y Metil Pirimifos fueron recuperados en porcentajes inferiores a un 40% para los mismos casos. Ello muestra como la adsorción de estos compuestos es mayor que los dos anteriores bajo las mismas condiciones. Sin embargo, la finalidad de esta extracción inicial es encontrar aquel suelo que nos entregue las menores recuperaciones para poder realizar el estudio exploratorio o "screening" de los factores que pueden afectar al método de extracción y la

posterior optimización del mismo. Bajo esta lógica se puede decir que el suelo Quillota, el cual entrega las recuperaciones más bajas, es el que se utilizó para optimizar la metodología y posteriormente utilizarla con mejor éxito en todos los suelos bajo estudio.

7. Screening o exploración de los factores que afectan la extracción de los plaguicidas utilizando el método MAEP.

Utilizando la metodología expuesta (II.8.8) fue posible encontrar los resultados de la exploración de los factores que afectan la extracción de los plaguicidas desde el suelo Quillota. La Tabla 21 muestra las recuperaciones porcentuales obtenidas.

Tabla 21: Recuperaciones porcentuales obtenidas para las experiencias realizadas en el screening.

Experiencia	Diazinon	M. Paration	M. Pirimifos	Paration
1	65,3	92,1	71,4	60,5
2	59,8	57,6	63,9	55,9
3	49,8	65,8	57,1	53,4
4	33,1	0,0	36,8	17,7
5	59,0	54,2	58,8	58,7
6	46,5	50,5	58,3	51,0
7	41,2	47,8	38,8	50,7
8	53,7	18,8	46,3	36,5
9	58,2	93,0	69,1	75,2
10	31,7	28,2	49,1	57,2

11	44,9	68,6	50,1	57,6
12	45,4	33,8	50,1	47,0
13	13,2	0,0	6,3	0,0
14	54,4	101,5	59,2	73,3
15	52,3	121,6	62,1	62,1
16	34,9	0,0	38,1	22,0
1*	46,0	101,5	57,4	64,4
8*	48,4	30,5	52,8	42,8
10*	56,9	49,2	47,1	58,0
16*	31,5	0,0	38,0	22,3

*Experiencias duplicadas.

Con el objeto de observar el efecto de los factores sobre cada uno de los plaguicidas es necesario hacer un análisis de las cartas Pareto estandarizadas que entregan gráficamente el alcance de los resultados obtenidos. Ahora bien, como se observó anteriormente para el caso del estudio de reparto, es posible hacer un análisis previo por componentes principales (PCA), que simplifica y condensa de mejor manera los resultados obtenidos. El primer componente principal, obtenido de la normalización de los valores de la recuperación, representa el 86% de la varianza total de los datos de la recuperación de los cuatro plaguicidas ($Z_1 = 0,491 \cdot \text{Diazinon} + 0,480 \cdot \text{Metil paration} + 0,516 \cdot \text{Metil pirimifos} + 0,512 \cdot \text{Paration}$), y mostró que Diazinón, Metil Paration y Metil Pirimifos presentan recuperaciones similares bajo un conjunto de condiciones experimentales, mientras que la recuperación de Metil Paration es diferente. En la Figura 12 se muestra la Carta Pareto Estandarizada que indica los factores

significativos sobre la respuesta combinada obtenida del primer componente principal (CP 1).

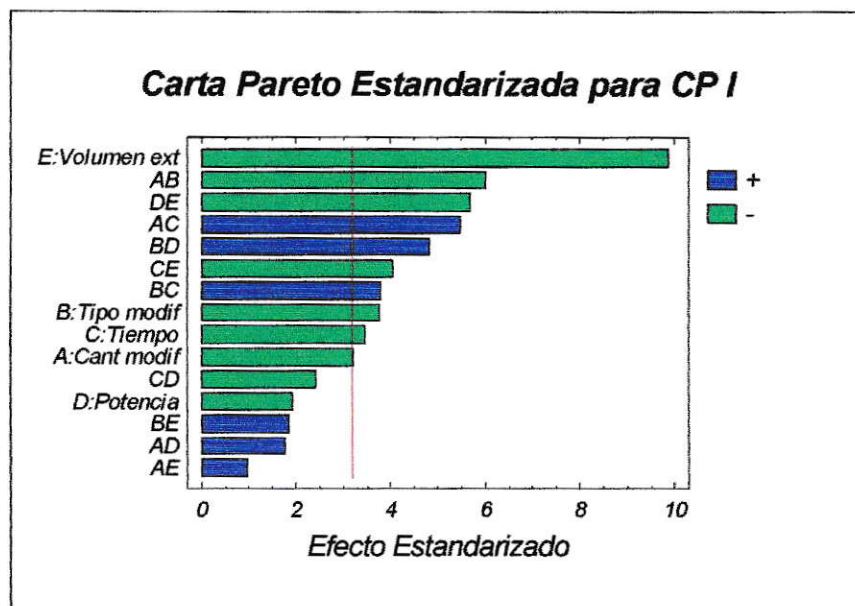


Figura 12: Carta Pareto Estandarizada de los factores estudiados en el screening para el Componente Principal I.

La grafica indica que el volumen de la solución extractante, el tipo y cantidad de modificador orgánico en el agua y el tiempo de extracción tuvieron un efecto negativo significativo en la eficiencia de MAEP. Varias interacciones de estos factores también tuvieron un efecto significativo, por ejemplo, la interacción AB negativa significa que existe una mayor influencia sobre la extracción cuando se aumenta la cantidad de modificador en la solución y se utiliza metanol (MeOH) como extractante, o bien al disminuir la cantidad de modificador pero utilizando acetonitrilo (ACN). Además, para lograr el mismo efecto en la extracción, se encontró que la interacción DE negativa indica que se debería aumentar la

potencia y disminuir el volumen de extractante, o bien bajar la potencia y utilizar mayor volumen de extractante. Por otra parte, también existen interacciones positivas como AC que se maximiza al utilizar una mayor cantidad de modificador en la solución y más tiempo de exposición a la energía de microondas, o bien, disminuyendo ambos factores. Finalmente, la potencia no es un factor significativo, a pesar de que esta incluido en interacciones significativas con el volumen de extracción de la solución y el tipo de modificador. Excluyendo la potencia del modelo utilizado, encontramos que el valor ajustado de R^2 por el número de grados de libertad otorgado fue 0,9066 y el valor p fue 0,1512 para la falta de ajuste, (con un 95% de nivel de confianza). En la regresión por ANOVA para el segundo componente principal (CP 2), no se encontraron factores significativos.

8. Optimización de los factores que afectan la extracción de los plaguicidas utilizando el método MAEP.

La optimización del método se realizó mediante la metodología (II.8.9). A partir del resultado de la exploración previa y del estudio de partición, el volumen de solución extractante y la potencia fueron fijados en 1,0 mL y 500 W, respectivamente.

a) Optimización utilizando el factor tiempo y ACN como modificador orgánico.

Estos factores fueron tomados en consideración bajo aspectos tales como la disminución del tiempo de análisis y la menor utilización de solventes orgánicos por cuanto involucran un mayor costo. De esta manera y haciendo uso de los parámetros establecidos en la Tabla 22 para los factores A y B se obtuvieron los siguientes resultados de recuperación.

Tabla 22: Recuperaciones porcentuales obtenidas para la optimización mediante el tiempo y las cantidades correspondientes de ACN como modificador orgánico.

Exp	Tiempo (min)	Cant Modif (% v/v)	Diazinon	M Paration	M Pirimifos	Paration
1	4,0	21,5	59,8	67,3	64,8	67,3
2	9,0	21,5	59,6	82,6	65,9	68,9
3	4,0	53,5	54,8	62,5	61,8	68,4
4	9,0	53,5	54,1	49,1	60,1	53,7
5	3,0	37,5	56,8	75,4	62,6	69,0
6	10,0	37,5	51,8	54,0	56,9	58,3
7	6,5	15	53,2	61,9	54,2	50,6
8	6,5	60	50,9	0,0	57,4	51,4
9	6,5	37,5	50,7	65,0	53,1	65,3
10	6,5	37,5	59,8	68,9	58,0	56,1
11	6,5	37,5	59,1	64,0	51,8	56,1
12	6,5	37,5	59,8	67,3	64,8	67,3

En general, las recuperaciones fueron bajas, con valores promedio comprendidos entre 60 y 65% para los cuatro compuestos. El análisis por componentes principales de estas recuperaciones normalizadas entrega un 62% del total de la variación de los resultados para la primera componente principal (CP 1; $Z_1 = 0,485 \cdot \text{Diazinon} + 0,510 \cdot \text{Metil paration} + 0,474 \cdot \text{Metil pirimifos} + 0,530 \cdot \text{Paration}$) representadas de manera casi equivalente por los cuatro plaguicidas, mientras que sólo un 20% de la variación es explicada por la segunda componente principal (CP 2; $Z_2 = -0,450 \cdot \text{Diazinon} - 0,521 \cdot \text{Metil paration} + 0,640 \cdot \text{Metil pirimifos} + 0,341 \cdot \text{Paration}$) y es representada por los valores de Metil Pirimifos principalmente y en menor medida, prácticamente la mitad del anterior, sobre la variación de Paration. Esto indica que la variación de los resultados se encuentra repartida entre los tres primeros componentes principales por lo que su descripción de la optimización de los factores no cuenta con una alta confiabilidad. No obstante lo anterior, es posible determinar una superficie de respuesta para los componentes principales y estimar los valores óptimos para los factores en estudio. La superficie de respuesta de los valores obtenidos mediante la regresión sobre ambas componentes principales se muestra en la Figura 13.

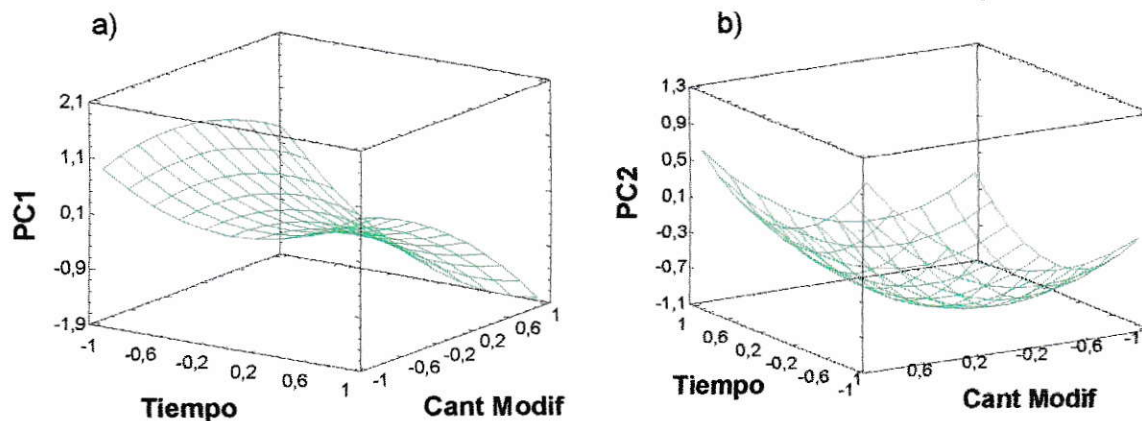


Figura 13: Superficies de respuesta para la optimización del método MAEP con ACN.

La superficie de respuesta para la primera componente principal (CP 1) en la Figura 13a) muestra que las condiciones óptimas para la extracción serían utilizando un tiempo de extracción de 4 min y un porcentaje de ACN de un 37%(v/v). En cambio, la superficie de respuesta para el segundo componente principal (CP 2) en la Figura 13b) muestra un mínimo, por lo tanto es menos evidente la interpretación para maximización de la extracción. Este modelo de ajuste es capaz de explicar el 59% de la variabilidad de los resultados sobre CP 1 y un 70% sobre CP 2, siendo muy poca la representatividad de los resultados para la componente principal que nos interesa. Por este motivo y debido a los bajos porcentajes de recuperación que se obtuvieron, se llevó a cabo una nueva optimización utilizando esta vez metanol como modificador orgánico.

b) Optimización utilizando el factor tiempo y MeOH como modificador orgánico.

Se procedió a realizar una nueva optimización utilizando MeOH como modificador orgánico y con ello también fue necesario modificar las cantidades que deben ser utilizadas como se predijo en el estudio exploratorio. Volviendo a los parámetros establecidos en la Tabla 23 ahora para los factores A y B' es posible encontrar los siguientes resultados de recuperación.

Tabla 23: Recuperaciones porcentuales obtenidas para la optimización mediante el tiempo y las cantidades correspondientes de MeOH como modificador orgánico.

Exp	Tiempo (min)	Cant Modif (% v/v)	Diazinon	M Paration	M Pirimifos	Paration
1	4,0	29	50,7	41,4	52,2	52,3
2	9,0	29	76,3	44,6	74,2	63,5
3	4,0	71	49,9	55,2	51,2	46,7
4	9,0	71	51,4	71,1	56,1	57,3
5	3,0	50	44,8	47,1	46,7	51,2
6	10,0	50	57,5	90,0	59,4	63,5
7	6,5	20	39,9	43,4	40,1	39,5
8	6,5	80	50,8	38,3	46,7	48,4
9	6,5	50	64,7	54,0	66,2	62,7
10	6,5	50	58,5	66,9	58,9	62,0
11	6,5	50	50,7	41,4	52,2	52,3
12	6,5	50	76,3	44,6	74,2	63,5

En este caso el análisis por componentes principales da cuenta de un 74% del total de la variación de los resultados para el primer componente principal (CP 1; $Z_1 = 0,538 \cdot \text{Diazinon} + 0,280 \cdot \text{Metil Paration} + 0,563 \cdot \text{Metil Pirimifos} + 0,561 \cdot \text{Paration}$) y se encuentra principalmente representado por la recuperación de Diazinon, Metil Pirimifos y Paration. El segundo componente principal (CP 2; $Z_2 = -0,366 \cdot \text{Diazinon} + 0,895 \cdot \text{Metil Paration} - 0,223 \cdot \text{Metil Pirimifos} + 0,127 \cdot \text{Paration}$) da cuenta del 24% de la variación de los resultados y está principalmente determinada por la recuperación de Metil Paration. La superficie de respuesta de los valores obtenidos mediante la regresión sobre ambas componentes principales se muestra en la Figura 14

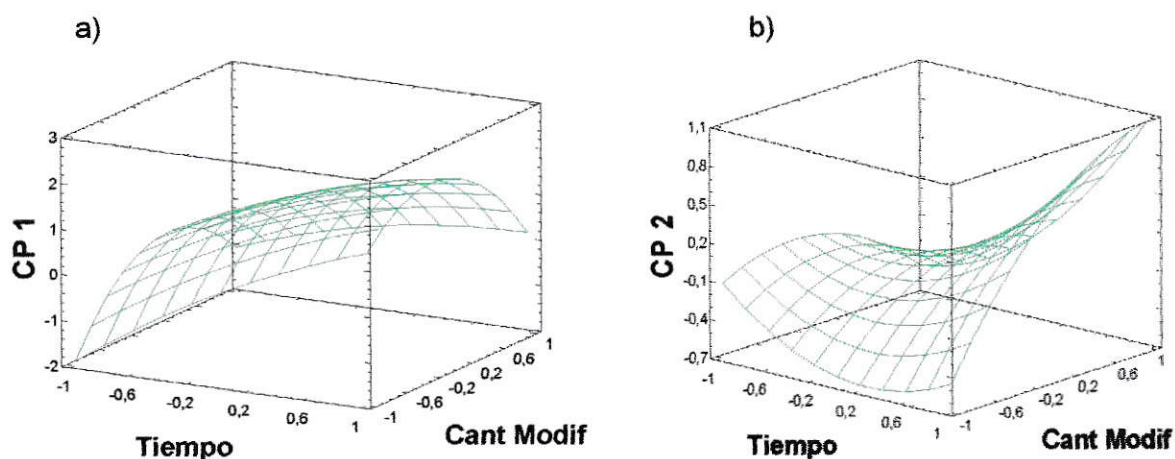


Figura 14: Superficies de respuesta para la optimización del método MAEP con MeOH.

La superficie de respuesta para la primera componente principal (CP 1) en la Figura 14a) muestra que las condiciones óptimas para la extracción serían

utilizando un tiempo de extracción de 10 min y un porcentaje de MeOH de un 45%(v/v). En cambio, la superficie de respuesta para el segundo componente principal (CP 2) en la Figura 14b) muestra una respuesta óptima de extracción con igual tiempo de extracción y un porcentaje de MeOH sobre el 50%(v/v). Este modelo de ajuste es capaz de explicar el 77% de la variabilidad de los resultados sobre CP 1 y sólo un 48% sobre CP 2. Debido a esto, las predicciones de las condiciones óptimas son más confiables al tomar los resultados obtenidos en la superficie de respuesta de CP 1. Finalmente, las condiciones óptimas que se utilizarán para la extracción mediante el método MAEP fueron 10 min a 500 W usando 1,0 mL de la solución extractante por gramo de suelo con una concentración de 50% (v/v) de MeOH.

Sin embargo, aún bajo estas condiciones óptimas, las recuperaciones obtenidas fueron: 65,8% para Diazinon, 78,5% para Metil Paration, 67,6% para Metil Pirimifos y 65,8% para Paration. Debido a esto, y con el objetivo de aumentar el porcentaje de extracción, se recurrió a otra estrategia que fue más allá de los factores estudiados anteriormente.

9. Evaluación del efecto del tipo de fortificación del suelo, tiempo y potencia de extracción sobre el método MAEP.

En la búsqueda de un nuevo factor que permita mejorar la extracción del método propuesto, se propuso la evaluación del tipo de fortificación del suelo, esto se refiere principalmente al tipo de secado que se utiliza en la última etapa de la fortificación de los suelos en estudio (II.8.6), ya que pudiese ocurrir una pérdida de los plaguicidas por volatilización debido a la temperatura y el tiempo al que éstos son expuestos. Además se hizo una reevaluación de los factores tiempo y potencia mediante la metodología detallada en (II.8.10).

En este caso el análisis por componentes principales es capaz de dar cuenta de un 86,5% de la variación total de los resultados con el primer componente principal (CP 1; $Z_1 = 0,513 \cdot \text{Diazinon} + 0,456 \cdot \text{Metil paration} + 0,522 \cdot \text{Metil pirimifos} + 0,506481 \cdot \text{Paration}$), el que está representado en forma equivalente por las recuperaciones de los cuatro plaguicidas. En cambio la segunda componente principal (CP 2; $Z_2 = 0,360 \cdot \text{Diazinon} - 0,861 \cdot \text{Metil paration} + 0,357 \cdot \text{Metil pirimifos} + 0,0431 \cdot \text{Paration}$) sólo da cuenta de un 9% de la variación. La superficie de respuesta de los valores obtenidos mediante la regresión sobre la primera componente principal (CP 1) para ambos tipos de fortificación se muestra en la Figura 15 a) y b).

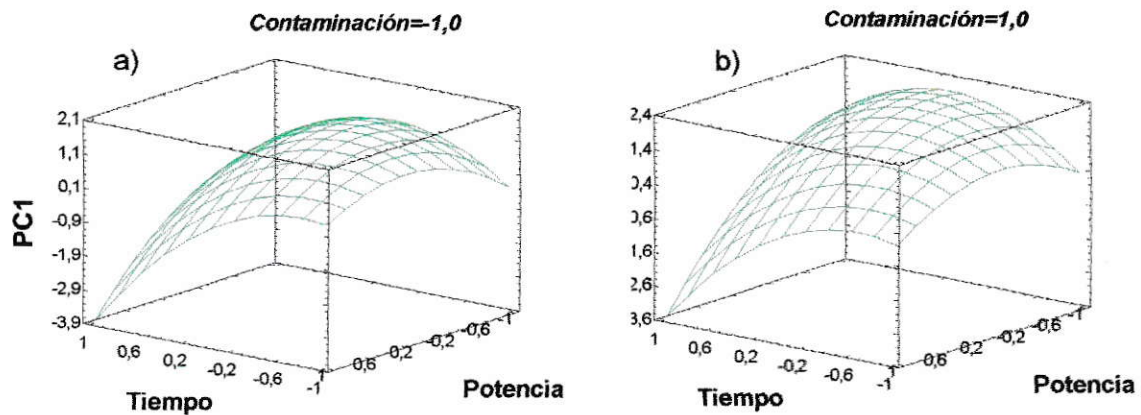


Figura 15: Superficie de respuesta para la evaluación del método MAEP frente al modo de contaminación y reevaluación de los factores tiempo y potencia. a) muestra la superficie de respuesta para una fortificación mediante secado a temperatura ambiente y b) muestra la superficie de respuesta para una fortificación mediante secado a la estufa a 30 °C por 15 h.

Según los resultados obtenidos es importante destacar que el tipo de secado en el proceso de contaminación de los suelos tiene una influencia sobre la respuesta a la extracción utilizando el método MAEP, en la Figura 15 se puede ver que el valor máximo de la puntuación es mayor cuando el modo de contaminación es con un secado a la estufa a 30 °C durante 15 h (contaminación = 1,0) mientras que éste disminuye cuando el modo de contaminación se realiza mediante un secado a temperatura ambiente de 20°C (contaminación = -1,0). Por otra parte, la reevaluación de los factores tiempo y potencia corroboran los análisis anteriores entregando un valor óptimo de 500

W de potencia y 10 min de tiempo de exposición a la energía microondas. Finalmente cabe mencionar que el modelo utilizado explica un 72,4% de la variabilidad en los resultados mediante la CP 1. Nuevamente las recuperaciones de los plaguicidas en estudio no superaron el 65% desde el suelo Quillota.

10. Extracción bajo condiciones óptimas utilizando el método MAEP.

Mediante la utilización de la metodología (II.8.11) se realizó una extracción bajo las condiciones óptimas establecidas para cuantificar la extracción de los plaguicidas en estudio desde los distintos suelos propuestos (Tabla 24).

Tabla 24: Porcentajes de recuperación y desviación estándar de los cuatro compuestos desde los suelos fortificados y obtenidos bajo las condiciones óptimas del método MAEP-GC-FPD.

	TEM	VLC	QTA	RGA	PCR
Diazinon	49 ± 5	62 ± 11	57 ± 6	47 ± 6	50 ± 3
Metil Paration	81 ± 8	82 ± 10	55 ± 9	54 ± 16	45 ± 9
Metil Pirimifos	49 ± 5	65 ± 10	68 ± 4	57 ± 4	57 ± 4
Paration	72 ± 5	64 ± 6	66 ± 5	62 ± 3	62 ± 3

Sin embargo, a pesar de encontrarse en condiciones óptimas, la recuperación de los compuestos desde los suelo fueron inferiores o iguales al 72%, a

excepción de Metil Paration en los suelos Temuco y Vilcún. Estas bajas recuperaciones se deben probablemente a una fuerte adsorción de los compuestos organofosforados sobre el suelo, por parte de componentes que dificultan la extracción. De hecho, los parámetros de adsorción obtenidos a partir del modelo empírico de Freundlich (Essington, 2004), K_f y $1/n$, de estos compuestos en el suelo de Quillota varió de 56 a 110 mL/g y de 0,38 a 0,58, respectivamente. Estos valores reflejan una alta capacidad de adsorción por parte de sitios heterogéneos en la materia orgánica y minerales en las arcillas. La adsorción de los pesticidas organofosforados en los minerales de arcilla ya se ha descrito (Barón, 1978; Mingelgrin, 1985; Sánchez, 1991) como responsable de la baja movilidad de algunos de estos compuestos en los suelos.

11. Uso de agentes co-extractantes en el método MAEP.

Debido a las bajas recuperaciones alcanzadas para todos los plaguicidas en estudio se propuso realizar un ensayo con dos agentes co-extractantes que pudiesen ser capaces de desplazar mediante una mayor afinidad por los sitios activos en la materia orgánica y los minerales de arcilla a los plaguicidas que se encuentran adsorbidos en estas superficies, provocando su desligamiento y posterior recuperación mediante la metodología optimizada. El procedimiento se encuentra detallado en el punto (II.8.12).

Tabla 25: Extracción mediante la utilización del método MAEP y agentes co-extractantes (Sulfato de Sodio y Citrato de Sodio) desde el suelo Quillota.

Experiencia	Diazinon	M. Paration	M. Pirimifos	Paration
Citrato (200mg/L)				
1	52,6	40,8	58,6	54,8
2	54,6	54,6	69,0	61,8
Citrato (500mg/L)				
1	55,2	56,6	62,9	62,2
2	49,3	49,5	53,5	50,2
Sulfato (200mg/L)				
1	48,8	48,6	57,5	59,6
2	27,3	39,6	55,1	57,5
Sulfato (500mg/L)				
1	55,0	61,2	63,2	62,0
2	27,3	42,6	49,9	53,9

Como se puede observar en la Tabla 25 ninguno de los agentes utilizados para generar un fenómeno de intercambio en el suelo fueron capaces de aumentar la eficiencia de la extracción. Debido a esto, se mantiene la convicción de que la adsorción de los plaguicidas organofosforados a los sitios activos del suelo que pueden interactuar con moléculas orgánicas de estas características es demasiado fuerte como para ser desorbidos tan fácilmente.

IV. CONCLUSIONES

- ✓ Utilizando un cromatógrafo de gases con detector fotométrico de llama (GC-FPD) fue posible llevar a cabo la separación analítica de los plaguicidas organofosforados en estudio, además se logró mejorar la calidad de la respuesta cromatográfica en cuanto a la intensidad y calidad de la señal por medio de Aceite de Oliva como imitador de matriz.

- ✓ Fue posible desarrollar un método de extracción de los cuatro plaguicidas organofosforados basado en una extracción sólido-líquido y posterior reparto en n-hexano con la asistencia de microondas.

- ✓ El método de extracción desarrollado permite llevar a cabo una limpieza in situ del extracto gracias a la partición entre solvente acuoso y el n-hexano. Esto favorece el costo y tiempo del análisis producto de que no es necesario filtrar o limpiar la muestra mediante un proceso de “clean-up” antes de la determinación cromatográfica.

- ✓ La utilización de herramientas estadísticas y quimiométricas (Diseño experimental y análisis por componentes principales) simplificó el estudio y optimización del método propuesto.

- ✓ Los estudios de recuperación realizados con suelos que contienen los plaguicidas efectivamente adsorbidos, producto del tipo de fortificación empleado, permite la evaluación crítica de la eficiencia del método de extracción propuesto.

- ✓ Las recuperaciones de los cuatro compuestos desde diferentes suelos bajo las condiciones óptimas pueden ser iguales o menores que el 65%, lo que se explica en base a la gran capacidad e intensidad de adsorción de los analitos estudiados sobre los suelos.

- ✓ El uso de agentes co-extractantes (Sulfato y Citrato de sodio) para incrementar la eficiencia de extracción del método, no fue efectiva a las concentraciones empleadas. Queda propuesto aplicar otros compuestos, como fosfato, para este mismo propósito.

V. BIBLIOGRAFIA.

Acevedo, Edmundo. La agricultura del siglo XX y sus desafíos al comenzar el nuevo milenio: el caso de Chile.

Anastassiades, M.; Mastovska, K.; Lehotay, S. Evaluation of analyte protectants to improve gas chromatographic analysis of pesticides. *Journal of Chromatography A*. 2003. 1015. 163-184.

Andreu, Vicente; Pico, Yolanda. Determination of pesticides and their degradation products in soil: critical review and comparison of methods. *Trends in Analytical chemistry*. 2004.

Báez, María; Rodríguez, Manuel; Lastra, Olga; Contreras, Paola. Solid phase extraction of organophosphorous, triazine and triazole-derived pesticides from water samples. A critical study. *High resolution chromatography*. 1997.

Barla, Rafael. *Diccionario para la educación ambiental*. 2003.

Barriuso, E. Contaminaciones con pesticidas utilizados en agricultura: El comportamiento de los pesticidas en el suelo como base para la interpretación y la previsión de los riesgos de contaminación. 2000, XVII congreso Argentino de la Ciencia del Suelo. Mar del Plata (Argentina).

Bienes, Ramón. Contaminación agraria difusa. Universidad de Alcalá de Henares.

Boque, R.; Rius, F. Straight line calibration: something more than slopes, intercept and correlations coefficients. *Journal of Chemical Education*. 1993. Volume 70, No. 10.

Bouaid, A.; Ramos, L.; Gonzalez, M.J.; Fernández, P.; Camara, C. Solid-phase microextraction for the determination of atrazine and four organophosphorous pesticides in soil samples by gas chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2001. 939. 13-21.

Boudou, A. *Aquatic Ecotoxicology: Fundamental Concepts and Methodologies* Volume I, 1989, pp 108-119

Cardone, Mario J. Method performance. Detection and determination of error in analytical methodology. Part I: In the method verification program. *Journal of Analytical Chemistry*. 1983. Volume 66, No. 5.

Cornejo, Juan. *Dinámica de Plaguicidas en Ecosistemas Terrestres*, Congreso: Implementación del Convenio de COPs, Madrid, 2001.

De la Colina, Clara; Sanchez-Rasero, Francisco; Dios, Gonzalo; Romero, Esperanzo; Peña, Aranzazu. Use of a solid phase extraction method for the analysis of pesticides in groundwater by gas chromatography with electron capture and flame photometric detectors. *Analyst*. 1995.

Dean, J. and Xiong, G. Extraction of organic pollutants from environmental matrices: Selection of extraction technique. *Trends in Analytical Chemistry*, 2000, Volume 19, No. 9.

Douglas E. Modern Extraction Techniques. *Anal. Chem.* 2004, 76, 4659-4664.

Erney, D.; Gillespie, G.; Gilvidis, D. *Journal of chromatography A*. 1993.

Fuentes, Edwar; Báez, María; Reyes, Dana. Microwave-assisted extraction through an aqueous medium and simultaneous cleanup by partition on hexane for determining pesticides in agricultural soils by gas chromatography: A critical study. *Analytica Chimica Acta*. 2006, 578, 122-130.

Mc Bride, M.B. *Environmental Chemistry of Soils* Oxford University Press. NY. Capítulo 10: Organic Pollutants in Soils. 1994, pp 342-392.

Miliarium (Ingeniería Civil y Medioambiente). www.miliarium.com.

Miller, James and Millar, Jane. Estadística y Quimiometría para Química Analítica. 4ta Edición. 2002.

Molins, C. Microwave Assisted Solvent Extraction (MASE) of Organochlorine Pesticides From Soil Samples. International Journal of Environmental Analytical Chemistry, 1997, Volume 68, No. 2, pp 155-169.

Rosset, Peter. Agro ecología y Desarrollo (Chile) 11/12:2-12 (1997).

U.S. Census Bureau, International Population Reports WP/02, Global Population Profile: 2002, U.S. Government Printing Office, Washington DC, 2004.

U.S. EPA, Agencia de protección ambiental de Estados Unidos. www.epa.gov

Volker S. and Wolfgang L. Universal Sample Enrichment Technique for Organochlorine Pesticides in Environmental and Biological Samples Using a Redesigned Simultaneous Steam Distillation-Solvent Extraction Apparatus. Anal. Chem. 1993, 65, 3677-3683

Vyas,NB; Mineau,P; Rivera-Milán,F. 1998. Taller Internacional de Capacitación en Procedimientos de Monitoreo en Agroecosistemas. Sub-Programa Fauna Silvestre, Coordinadora: Dra. M.E. Zaccagninni. EEA INTA Paraná.

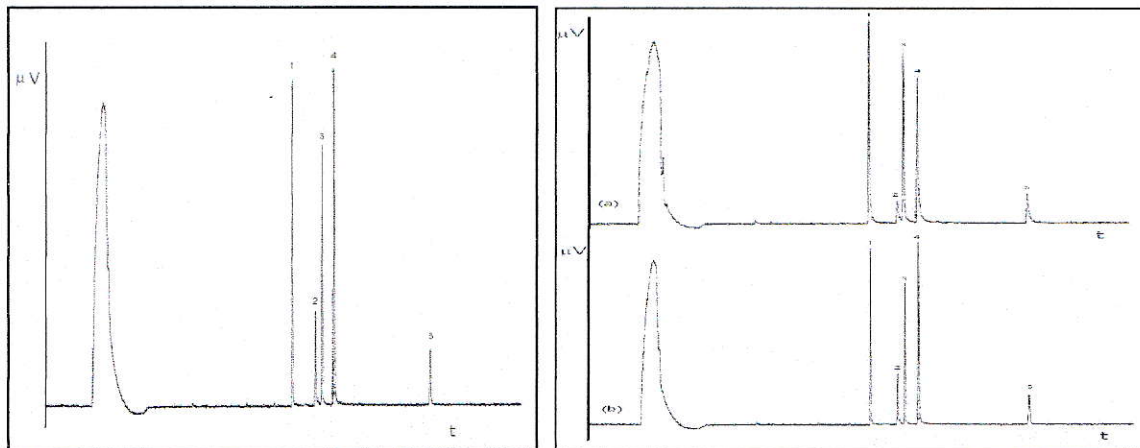
FE DE ERRATA

Página 29, primer párrafo:

Debe decir: Las condiciones utilizadas del detector fueron: flujo de aire de 100 mL/min, hidrógeno de 75 mL/min, nitrógeno como gas auxiliar de 20 mL/min y helio como gas portador de 0,65 mL/min.

Página 52 y 54:

Debe decir: Rótulo de los ejes.



Página 82:

Debe decir: Según corresponda por orden alfabético.

Mastovská, Katerina; Lehotay, Steven and Anastassiades, Michelangelo.
Combination of analyte protectants to overcome matrix effects in routine GC