



UNIVERSIDAD DE CHILE
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas
Departamento de Química Inorgánica y Analítica
Laboratorio de Química Analítica de Residuos de Pesticidas
y Elementos Traza.

**“Eficacia de la extracción asistida por
microondas para determinar plaguicidas
organofosforados en aceites vegetales mediante
cromatografía gaseosa”**

MEMORIA PARA OPTAR AL TITULO DE
QUÍMICO FARMACEUTICO

ADALÍ VERÓNICA QUIÑONES MARAGLIANO

DIRECTOR DE TESIS
Dr. EDWAR FUENTES PEREZ

PROFESOR PATROCINANTE
Dr. EDWAR FUENTES PEREZ

Santiago 2008

Agradecimientos

A Dios por permitirme llegar a este momento y lograr otra meta más en mi vida.

A mis padres por esforzarse y darme la oportunidad de estudiar.

A mi hermana Lorena por ser mi familia y entregarme todo su apoyo en cada decisión y etapa de mi vida.

A mi abuelo Luis y abuela Carmen por todas las enseñanzas y el amor que siempre me han entregado.

A mis amigas María Teresa y Daniella por compartir conmigo altos y bajos, experiencias, aventuras y jornadas de estudio haciendo inolvidables estos años de universidad.

A mis amigos del laboratorio Lizethly, Germán, Sergio, Natalia, Patricia y profesora María E. Baez por hacer que cada momento fuera ameno y convertir el laboratorio en un gran lugar.

A mi profesor Edwar Fuentes por permitirme trabajar junto a él, por toda su paciencia, consejos, enseñanzas, ayuda y confianza depositada en mí en cada etapa de este trabajo.

Por último, a la Universidad de Chile por darme la educación necesaria para enfrentarme a la vida y al mundo.

Los autores agradecen el financiamiento otorgado por Fondecyt

Proyecto 11060461

Resumen

Los pesticidas organofosforados son ampliamente utilizados en el control de plagas en el área agrícola. Sin embargo, debido a sus efectos nocivos para la salud y capacidad de bioacumulación se han desarrollado normas que regulan su uso y presencia de sus residuos en los alimentos.

En esta memoria de Título se desarrolló un método para la determinación de Dimetoato, Diazinón, Metilparatión, Metilpirimifos, Malatión, Fentión, Clorpirifos, Metidatión y Metilazinfos en muestras de aceite de oliva y palta, mediante una extracción asistida por microondas, y cromatografía de gases acoplada a un detector fotométrico de llama (GC-FPD), con una etapa previa de limpieza de los extractos mediante una extracción en fase sólida (SPE) utilizando columnas ENVI-Carb. En primer lugar se desarrolló un método cromatográfico que permitiera una correcta identificación y cuantificación de los nueve plaguicidas. Se determinaron mediante curvas de calibración los parámetros de calidad analítica instrumental, obteniéndose LOD_i entre 2,0-28 $\mu\text{g L}^{-1}$. Se realizó una optimización mediante un diseño Doehlert de los factores que influyen en la etapa de limpieza de las muestras: volumen de extracto cargado en la columna SPE, cantidad de solvente de elución (acetonitrilo) y concentración de diclorometano en el solvente de elución, determinándose los valores óptimos para la limpieza a través del uso de una función de conveniencia (deseabilidad) de la máxima recuperación de los nueve compuestos y la mínima cantidad de aceite co-extraído. Los valores óptimos obtenidos fueron 5 ml de extracto de carga de la columna y 3 ml de solvente de elución de concentración 100% diclorometano. Mediante un diseño experimental Plackett-Burman se evaluaron los factores significativos en el proceso de extracción asistida por microondas, estos fueron: potencia, volumen de extractante (acetonitrilo) y tiempo de extracción. Estos factores fueron simultáneamente optimizados mediante un diseño Doehlert con cinco, siete y tres niveles respectivamente, a través de una función de conveniencia conjunta. Las condiciones óptimas para el proceso de extracción fueron 8 min a 700 W usando 5 ml de acetonitrilo como solvente de extracción. Bajo estas condiciones las recuperaciones para Dimetoato, Diazinón, Metilparatión, Malatión y Metidatión

estuvieron comprendidos entre 80-90%. Sin embargo, las recuperaciones de los plaguicidas con un carácter más lipofílico como Metilpirimifos, Fentión y Clorpirifos fueron menores. Con el objetivo de mejorar la extracción de estos compuestos, se evaluó el efecto de usar una mezcla de acetonitrilo-diclorometano como extractante. Un aumento significativo en las recuperaciones fue observado para los compuestos más hidrofóbicos al utilizar una mezcla de AcN:DCM (90:10) como solvente de extracción. Además se analizó el uso de protectores de analito con el objetivo de compensar el efecto de señal inducido por matriz. Sin embargo, no se observó beneficio en su uso. El método desarrollado fue aplicado a nueve aceites de oliva y dos aceites de palta que se comercializan en Chile, encontrándose en siete muestras de aceite de oliva la presencia de residuos de pesticidas en concentraciones de 0,010-0,177 $\mu\text{g g}^{-1}$. Sin embargo, las concentraciones encontradas son menores a los valores establecidos como Límite Máximos de Residuos en aceite de oliva según la legislación Europea.

Summary

“EFFICACY OF THE MICROWAVE-ASSISTED EXTRACTION TO DETERMINE ORGANOPHOSPHORUS PESTICIDES ON VEGETABLES OILS THROUGH GAS CHROMATOGRAPHY”

Organophosphorus pesticides are used largely in the pest control in the agricultural area. However, due to its noxious effects for health and capacity of bioaccumulation regulations have been established to regulate its application and presence of residues in the foodstuff.

In this study it was developed a method for the determination of Dimethoate, Diazinón, Parathion methyl, Pirimiphos methyl, Malathion, Fenthion, Chlorpyrifos, Methidathion and Azinphos methyl in commercial olive and avocado oil, by means of an Microwave-assisted extraction, and gas chromatography – flame photometric detection (GC- FPD), with a previous stage of clean-up of the extracts through an extraction in solid phase (SPE) using ENVI Carb columns. The chromatographic method was developed to allow a correct identification and quantification of the nine pesticides. Through a calibration curve the instrumental analytical characteristics were determined, obtaining LODi between 2.0-28 $\mu\text{g L}^{-1}$. The optimization of factors that influence on the clean-up step, was achieved through a Doehlert design: Volume of extract added to the SPE column, volume of elution solvent and concentration of dichloromethane in the solvent of elution, defining the optimal values for clean-up by using a function of convenience (desirability) of the maximum recuperation of the nine compounds and the minimal quantity of oil co-extracted. The optimal values obtained are 5 ml of extract loaded to the column, 3 ml of elution solvent of 100 % dichloromethane. Through a Plackett Burman design were evaluated the significant factors in the process of microwaves assisted extraction, these were: Power, volume of extracting solvent (acetonitrile) and time of extraction. These factors were simultaneously optimized through Doehlert design with five, seven and three levels respectively, by using a desirability function. The optimal conditions retained were 8 min at 700 W using 5 mL of acetonitrile as extracting solvent. Under

these conditions the recoveries for Dimethoate, Diazinon, Parathion methyl, Malathion and Methidathion ranged from 80 to 99%. However, the recoveries of the more lipophilic character pesticides like, Pirimiphos methyl, Fenthion and Chlorpyrifos were lower. The addition of dichloromethane to the extraction solvent was evaluated with the aim of increasing the extraction efficiency. A significant increase in the recovery was observed for the more hydrophobic compounds, 90:10 (AcN:DCM) was selected as optimum to extract the organophosphorus compounds from olive oil. Additionally, the used of analyte protectans for compensate the matrix-induced chromatographic response enhancement effect was studied. However, it observed benefit in its use was not. The method developed was determine to analyze organophosphorus residues in nine commercially packed extra virgin olive oils and two commercially packed avocado oils produced in Chile. Seven samples of olive oil contained pesticides residues in concentrations of 0.010-0.177 $\mu\text{g g}^{-1}$. However, none of the olive oil samples contained residues higher than the permitted Maximum Residues Limits established by European legislation.

Índice General

Resumen	ii
Summary	iv
Índice General	vi
Índice de Tablas	ix
Índice de Figuras	xi

	Pag.
1 Introducción	1
2 Objetivos	7
2.1 Objetivo General	7
2.2 Objetivos Específicos	7
3 Procedimiento Experimental	8
3.1 Reactivos, Materiales y Equipos	8
3.1.1 Reactivos	8
3.1.2 Materiales	9
3.1.3 Equipos	9
3.1.4 Equipos de uso General	9
3.2 Soluciones	9
3.3 Aceites Utilizados	10
3.3.1 Aceite de Oliva	10
3.3.2 Aceite de Palta	11
3.4 Método Cromatográfico	11
3.4.1 Desarrollo del Método Cromatográfico	11
3.4.2 Determinación de los parámetros de calidad analítica instrumental	12
3.4.3 Efecto Aumento de señal inducido por matriz	13
3.5. Limpieza de Extractos mediante extracción en fase sólida	14

3.5.1 Optimización etapa limpieza de extractos	14
- Obtención de extractos y fortificación	14
- Diseño experimental optimización limpieza	15
- Limpieza y cuantificación	15
3.5.2 Evaluación del efecto de aumento de señal inducido por la matriz luego de la limpieza	17
3.6 Extracción Asistida por Microondas	17
3.6.1 Diseño Exploratorio Multivariado	17
- Fortificación del aceite	17
- Diseño de Screening	17
- Procedimiento de Extracción	18
3.6.2 Optimización de la Extracción	19
- Diseño de optimización	19
- Procedimiento de extracción	20
3.7 Efecto del uso de protectores de analito (L-Gluconic Γ -Lactona + D- Sorbitol) sobre el efecto de la matriz	21
3.8 Evaluación del efecto del contenido de diclorometano en el extractante sobre la eficiencia de la extracción	22
3.9 Características Analíticas del Método	22
3.9.1 Curva de calibración	22
3.9.2 Determinación Precisión del método	23
3.9.3 Evaluación de la recuperación	23
3.10 Aplicación a muestras reales	24
4 Resultados y Discusión	25
4.1 Desarrollo del método cromatográfico	25
- Determinación del orden y tiempo de elución	25
4.2 Determinación de los parámetros de calidad analítica instrumental	27
4.3 Efecto aumento de señal inducido por matriz	28
4.4 Limpieza de extractos mediante extracción en fase sólida	30
4.4.1 Optimización Etapa limpieza de extractos	30
4.4.2 Determinación de factores significativos	37
4.5 Evaluación del efecto de aumento de señal inducido por la matriz luego	

de la limpieza	39
4.6 Extracción asistida por microondas	40
4.6.1 Diseño exploratorio multivariado	40
4.6.2 Determinación de factores significativos	42
4.6.3 Optimización de la extracción	43
4.7 Efecto del uso de protectores de analito (L-Gluconic Γ -Lactona +D-Sorbitol) sobre el efecto de la matriz	50
4.8 Evaluación del efecto del contenido de diclorometano en el extractante sobre la eficiencia de la extracción	51
4.9 Características Analíticas del método	54
4.9.1 Curva de calibración	54
4.9.2 Evaluación de la recuperación	57
4.10 Aplicación a muestras reales	58
5 Conclusiones	61
6 Bibliografía	63
Anexo 1	66
Anexo 2	73
Anexo 3	76
Presentaciones a congresos y publicación	79

Índice de Tablas

	Pag
TABLA 1 Niveles Diseño experimental Doehlert etapa de limpieza	16
TABLA 2 Matriz de experimentos de Diseño experimental Doehlert etapa de limpieza	16
TABLA 3 Niveles diseño Plackett-Burman Etapa Extracción	18
TABLA 4 Matriz de experimentos diseño Plackett-Burman Extracción	19
TABLA 5 Niveles diseño Doehlert Optimización Extracción	20
TABLA 6 Matriz de experimentos diseño Doehlert Optimización Extracción .	21
TABLA 7 Niveles de concentración curva de calibrado en matriz	23
TABLA 8 Orden de elución de los nueve plaguicidas	25
TABLA 9 Programa de Temperatura GC-FPD	26
TABLA 10 Características analíticas instrumentales para la determinación de los nueve plaguicidas organofosforados mediante GC-FPD en hexano	27
TABLA 11 Características analíticas instrumentales para la determinación de los nueve plaguicidas organofosforados mediante hexano/aceite de oliva 0,3% v/v	28
TABLA 12 Respuestas cromatográficas relativas para los plaguicidas en extracto de aceite versus un patrón en acetona	30
TABLA 13 Matriz de respuesta Diseño Doehlert Optimización limpieza	31
TABLA 14 Valores de Deseabilidad (D) Optimización limpieza	36
TABLA 15 Análisis de varianza Optimización limpieza	37

TABLA 16	Valores óptimos de la etapa de limpieza	38
TABLA 17	Recuperaciones bajo condiciones óptimas de limpieza	38
TABLA 18	Valores de señales cromatográficas obtenidas bajo diferentes condiciones de limpieza	39
TABLA 19	Matriz de respuesta Screening diseño Plackett-Burman	41
TABLA 20	Análisis de varianza Screening	42
TABLA 21	Matriz de experimentos Optimización de la extracción	44
TABLA 22	Análisis de varianza Optimización de la extracción	48
TABLA 23	Valores óptimos para la Extracción Asistida por Microondas	48
TABLA 24	Recuperaciones obtenidas mediante valores óptimos de extracción y limpieza	49
TABLA 25	Porcentajes de recuperaciones utilizando diferentes patrones de calibrado	50
TABLA 26	Porcentajes de recuperaciones utilizando diferentes solventes de extracción	52
TABLA 27	Cantidad de aceite co-extraído método optimizado	53
TABLA 28	Parámetros de calidad analítica del método	57
TABLA 29	Recuperaciones a distintos niveles de contaminación	58
TABLA 30	Parámetros de calidad de los aceites	59
TABLA 31	Análisis de muestras reales	60

Índice de Figuras

FIGURA 1	Cromatograma de los nueve plaguicidas en acetona	26
FIGURA 2	Cromatograma obtenido de una solución patrón en hexano	29
FIGURA 3	Cromatograma obtenido de una solución de extracto fortificado .	29
FIGURA 4	Superficie de respuesta Optimización limpieza	33
FIGURA 5	Superficie de respuesta Deseabilidad de Optimización limpieza	36
FIGURA 6	Diagrama de Pareto función de Deseabilidad Screening	43
FIGURA 7	Superficie de Respuesta Optimización extracción	45
FIGURA 8	Superficie de respuesta Deseabilidad Optimización extracción	47
FIGURA 9	Gráfico de recuperaciones con diferentes solventes de extracción .	52
FIGURA 10	Evaluación de la limpieza con columnas de extracción en fase sólida	55
FIGURA 11	Curva de calibración del método $0,03-0,2 \mu\text{g mL}^{-1}$	54
FIGURA 12	Curva de calibración del método $0,06-0,4 \mu\text{g mL}^{-1}$	55

1. Introducción

El aceite de oliva es consumido desde hace miles de años por los países ribereños del Mediterráneo, considerado pilar fundamental de la Dieta Mediterránea, sus principales productores son los países de la Comunidad Europea constituyendo un 74,6% de la producción mundial (International Olive Oil Council, nov 2007). El aceite de oliva es obtenido exclusivamente desde el fruto del árbol del olivo (*Olea europea L.*), las características propias que determinan la calidad del aceite, están determinadas por el método de su obtención desde el fruto. El aceite de oliva de máxima calidad es obtenido únicamente por procesos mecánicos, físicos y condiciones térmicas particulares que no producen alteraciones al mismo (lavado, decantación, centrifugación y filtración). El aceite de oliva se comercializa bajo distintas denominaciones según sus características de calidad, entre las que podemos mencionar el grado de acidez, índice de peróxidos, el contenido de ceras, contenido de estigmastadieno, valores de K270, Delta-K, evaluación organoléptica, entre otras (Reglamento CE N° 1989 Unión Europea, nov 2003). De la clasificación de los aceites de oliva podemos distinguir entre las más comunes el aceite de oliva extra virgen, que presenta un sabor y aroma excepcional y posee una acidez no superior a 0,8% es el de mayor calidad, el aceite de oliva virgen cuya acidez es menor a un 2,0% aunque de calidad inferior al anterior es excelente para el consumo, el aceite de oliva lampante cuya acidez es superior a un 2,0% y su consumo directo no está autorizado y el aceite de oliva refinado procedente de una refinación por procedimientos químicos de aceites de oliva virgen de alta acidez, este aceite ha perdido sus características organolépticas y propiedades naturales. Tanto el aceite de oliva virgen como extravirgen son ricos en

vitaminas, ácidos grasos monoinsaturados (ácido oleico), polifenoles, entre otros compuestos de naturaleza antioxidante que ayudan a la prevención de enfermedades degenerativas y actúan contra el envejecimiento (Koprivnjak y col., 2008). Debido a estas cualidades este aceite ha sido objeto de una atención creciente por parte de consumidores más interesados en productos saludables, viéndose reflejado en los últimos años un aumento en su consumo motivando así una expansión de la producción mundial. Actualmente Chile posee alrededor de 12000 hectáreas plantadas de olivos entre la región de Atacama y la región del Maule, produciéndose unas 5000 toneladas de aceite de oliva extra virgen, destinado al consumo interno y principalmente a la exportación a EEUU y Asia. En el año 2006 la exportación de aceite de oliva virgen fue aproximadamente de 356 mil kilos incrementándose en el año 2007 con una exportación de 562 mil kilos aproximadamente (Oficina de Estudios y Políticas Agrarias, 2008). En cuanto a la palta, en los últimos años nuestro país ha aumentado significativamente su cultivo y exportación, estimándose en la actualidad más de 35 mil hectáreas plantadas (Centro de Información sobre Recursos Naturales, 2008) y exportándose en el año 2007 aproximadamente 147 mil toneladas de paltas (Oficina de Estudios y Políticas Agrarias, 2008) convirtiéndose en uno de los grandes exportadores a nivel mundial, creando la necesidad de buscar otras alternativas a la comercialización del fruto. La producción de aceite de palta en Chile se inicia en el año 2003, el cual es obtenido utilizando el método de extracción mecánica en frío y su producción alcanza a 150 mil litros los cuales se reparten el mercado chileno, norteamericano y europeo (Avocado oil Chile, 2007).

Como todo cultivo agrícola, el olivo está expuesto a una serie de plagas como la arañuela del olivo (*Liothrips oleae*) que ataca los brotes y frutos, la polilla del olivo

(*Prays oleae*) que daña los nuevos brotes. Sin embargo, la plaga que produce mayor daño en el olivar es la mosca del olivo (*Dacus oleae*) cuyas hembras ponen sus huevos en las aceitunas dejando el fruto marcado. Todas estas plagas afectan la calidad de la aceituna y a su vez la del aceite. Para combatir la variedad de enfermedades que pueden sufrir y así, asegurar la integridad de la aceituna y garantizar la calidad que como producto natural posee el aceite, el olivo es tratado en forma constante con productos que permitan su control, entre ellos los plaguicidas. Con el tiempo la naturaleza de los plaguicidas empleados para el tratamiento del olivar ha tenido que ser diferente a medida que en investigaciones se demuestran los efectos nocivos que ejercerían sobre los seres vivos. Pesticidas orgánicos sintéticos como los órganoclorados fueron utilizados sin control hasta que se demostró su persistencia en el medioambiente por años, su solubilidad en tejidos grasos y su falta de degradación biológica, suponiendo una bioacumulación en el hombre (Ashraf-Khorassani y col., 1996; Voorhees y col., 1998; Fiddler y col., 1999). Esto llevó al desarrollo de pesticidas organofosforados los cuales son inhibidores irreversibles de la enzima acetilcolinesterasa (eritrocitaria y plasmática), encargada de las transmisiones neurológicas de insectos y mamíferos (Mastrantonio y col., 2008). Los plaguicidas organofosforados son altamente tóxicos por lo que los efectos de una exposición crónica pueden ser acumulativos. Investigaciones reciente relaciona a los pesticidas organofosforados con enfermedades como cáncer y Parkinson (Alavanja y col., 2004; Fong y col., 2007). Los residuos de estos plaguicidas por su carácter lipofílico son estabilizados y concentrados por largos periodos en el aceite de oliva (Cabras y col., 1997), por lo que uno de los criterios importantes en la calidad del aceite de oliva es la no detección o la baja concentración de estos residuos. La organización mundial de la

salud (WHO) y la comisión del código alimentario de la Organización de Agricultura y Alimentos de las naciones unidas (FAO), han estudiado la toxicidad de estos plaguicidas y han establecidos límites máximos de residuos (LMRs) en aceitunas y aceite de oliva (Codex Alimentarius Commission, 1996). La gran diversidad de clases y propiedades fisicoquímicas dificultan el desarrollo de metodologías de análisis, por lo que existe una continúa investigación para desarrollar métodos cada vez más sensibles, selectivos y rápidos que puedan ser utilizados en los análisis de rutina para asegurar la calidad del aceite.

Para la determinación de multiresiduos de plaguicidas organofosforados se utiliza preferentemente la cromatografía de gases (GC) debido a su alta eficiencia en la separación, la detección selectiva y simultánea de varios compuestos. Los detectores acoplados que se utilizan comúnmente en el desarrollo de nuevas metodologías analíticas con este propósito son el fotométrico de llama (FPD), el cual es selectivo para compuestos que contienen azufre y fósforo en su estructura (Dugo y col., 2005; Zhiqiang Zhou y col., 2007), nitrógeno-fósforo (Amvrazi y col., 2006) y captura de electrones (ECD) (Yagüe y col., 2005; Raoux y col., 1997; Diaz Plaza y col., 2001), en los últimos años el acoplamiento de la cromatografía de gases a un espectrómetro de masa (MS) permite realizar una detección confirmativa, resolviendo los problemas de identificación que tenían los otros detectores (Barrek y col., 2003; García Reyes y col., 2007). La sensibilidad y selectividad en la determinación se puede mejorar mediante el uso del tadem (MS/MS) que proporcionan los sistemas de trampa de iones (Sheridan y Meola, 1999). Sin embargo, para poder realizar la determinación de los residuos mediante GC, es necesario realizar etapas previas de tratamiento de la muestra con el fin de extraer los analitos de interés y eliminar los componentes co-extraídos de la

matriz para evitar su interferencia en el análisis. La mayoría de las metodologías usadas para la determinación de multiresiduos en aceite de oliva se basan en una extracción líquido-líquido, seguida de una etapa de limpieza (“clean-up”) de los extractos, generalmente mediante una extracción en fase sólida (SPE) con la utilización de diferentes adsorbentes (Amvrazi y col., 2006; Raoux y col., 1997; Diaz Plaza y col., 2001; Lentza Rizos y col., 2001; Tsatsakis y col., 2003). En los últimos años se ha desarrollado un nuevo procedimiento de cromatografía de permeación en gel (GPC) para la eliminación de interferencias, ampliamente utilizada por los laboratorios de análisis de rutina en la determinación de pesticidas en el aceite de oliva, generalmente usada después de una partición líquido-líquido con acetonitrilo (Guardia Rubio y col., 2006; Garrido Frenich y col., 2007; Patel y col., 2005). Otros métodos propuestos como clean-up de la muestra son la micro-extracción en fase sólida (Tsoutsi y col., 2006), dispersión de la matriz en una fase sólida (Ferrer y col., 2005) y congelamiento (Lentza Rizos y col., 2001; Garcés García y col., 2006).

En todos los métodos reportados la extracción líquido-líquido ha sido realizada por agitadores mecánicos o manuales, lo cual tiene como desventaja el número de muestras extraídas por unidad de tiempo (bajo “throughput”). La extracción asistida por microondas (MAE) puede ser utilizada en análisis de rutina reduciendo el tiempo de extracción y la cantidad de solvente utilizado. La MAE se basa en la irradiación de ondas microondas causando el movimiento de las moléculas por migración de iones y rotación de dipolos que contribuyen a un incremento de la temperatura lo que facilita la difusión de compuestos desde la matriz al disolvente. En este estudio se propone la utilización de una extracción asistida por microondas líquido-líquido para la determinación de residuos de Dimetoato, Diazinón, Metilparatión, Metilpirimifos,

Malatión, Fentión, Clorpirifos, Metidatión y Metilazinfos; plaguicidas que son utilizados comúnmente en el árbol del olivo (Rastrelli y col., 2002) entre un solvente y el aceite, seguido de una etapa de limpieza de la muestra mediante una extracción en fase sólida usando columnas ENVI-Carb y la detección y cuantificación mediante GC-FPD. La optimización de las etapas del método se realizó mediante un diseño experimental utilizando una función de deseabilidad de Derringer (Costa Ferreira y col.,2007) para obtener una respuesta única a partir de las respuestas individuales (optimización múltiple). Finalmente el método fue aplicado en la determinación de residuos de los nueve plaguicidas estudiados en aceite de oliva y palta comercializados en Chile.

2. Objetivos

2.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la posibilidad de utilizar energía de microondas para ayudar a extraer plaguicidas organofosforados desde aceites vegetales para ser determinados por cromatografía de gases

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Optimizar la determinación de los insecticidas organofosforados Clorpirifos, Malatión, Diazinón, Metilpirimifos, Metilazinfos, Dimetoato, Fentión, Metidatión y Metilparatión, mediante GC-FPD.
- Estudiar un método de extracción de los plaguicidas desde aceites de oliva basado en su reparto entre solventes no miscibles con la asistencia de microondas.
- Utilizar medios estadísticos y quimiométricos eficaces para estudiar el efecto de diferentes factores que afecten la extracción de los plaguicidas desde aceites vegetales.
- Optimizar y validar el método de extracción propuesto a través de superficies de respuestas y experimentos de recuperación.
- Aplicar el método validado a muestras reales.

3. Procedimiento Experimental

3.1. REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS

3.1.1. REACTIVOS

- Agua destilada calidad Nanopure
- Acetonitrilo (AcN) grado HPLC, Fisher Scientific
- Hexano Grado Pesticida, Fisher Scientific
- Acetona Grado Pesticida, Fisher Scientific
- Diclorometano óptimo estabilizado con amileno, Fisher Scientific
- Nitrógeno Extrapuro 99,995% de pureza ($H_2O < 3ppm$ $O_2 < 9 ppm$), AGA
- Hidrógeno 99,995% pureza ($H_2O < 5ppm$ $O_2 < 7ppm$), AGA
- Helio Extrapuro 99,995% de pureza ($H_2O < 2ppm$ $O_2 < 5ppm$), AGA
- Aire Sintético Instrumental $21 \pm 2\%$ $O_2 + N_2$, AGA
- D-Sorbitol 99 +% de pureza, Aldrich
- L-Gluconic γ - Lactona 97% de pureza, Aldrich
- Trifenilfosfato (TFF) 99% de pureza, Aldrich
- Clorpirifos, Chem Service 98% de pureza
- Metilazinfos, Chem Service 99% de pureza
- Metidati3n, Chem Service 98% de pureza
- Fenti3n, Chem Service 98% de pureza
- Metilpirimifos, Chem Service 99% de pureza
- Dimetoato, Chem Service 99,1% de pureza
- Malati3n, Chem Service 98% de pureza
- Diazin3n, Chem Service 99% de pureza
- Metilparation, Chem Service 98% de pureza

3.1.2. MATERIALES

- Material de vidrio de uso general y volumétrico clase A
- Micropipeta de desplazamiento de aire 200 – 1000 µL Labopette
- Micropipeta de desplazamiento de aire de 10 – 100 µL Eppendorf
- Columnas para SPE Superclean ENVI-CARB de carbón grafitizado (0,5g-6mL) Supelco
- Viales vidrio ambar con tapa rosca y contratapa de teflón.

3.1.3. EQUIPOS

- Cromatógrafo de Gases HP 5890 Serie II, detector FPD.
- Interface 35900E Agilent
- Software para la adquisición y el procesamiento de datos ChemStation, Agilent.
- Columna HP-5 30m; ID 0,25mm; Film 0,25µm (fenil metil silicona) .
- Equipo de Microondas para la extracción Milestone MLS-1200 MEGA, equipado con rotor de polipropileno de 10 vasos de TMF (Tetrafluormethaxil).
- Software de procesamiento de datos Statgraphics Centurion XV, Microsoft office Excel 2007

3.1.4. EQUIPOS DE USO GENERAL

- Balanza Analítica 40SM – 200AS Precisa(±0,001g)
- Balanza 4000C Precisa (±0,00001g)

3.2. SOLUCIONES

- Se prepararon soluciones de los nueve compuestos por separado, para lo cual se pesaron 13,01mg; 10,05mg; 12,56mg; 12,10mg; 12,10mg; 11,09mg; 10,20mg; 11,36mg; 12,62mg; 14,41mg de Dimetoato, Diazinón, Metilparatión, Metilpirimifos, Malatión, Fentión, Clorpirifos, Metidatión y Metilazinfos respectivamente, llevándose a un matraz de aforo de 10 mL disolviendo con hexano, excepto el Metilazinfos y Dimetoato que se disolvieron con acetona. A partir de estas soluciones se obtuvieron los patrones de calibración en acetona y las soluciones para la fortificación de los aceites en hexano.
- **Solución Gluconolactona:Sorbitol (1:1)**
Se preparó una solución de 20 mg mL⁻¹, para lo cual se pesaron 500mg de D-sorbitol y 500 mg de L-Gluconic γ -Lactona aforando a 25mL en un matraz con una mezcla de H₂O:AcN (7:3).
- **Solución Trifenilfostato**
Se prepara una solución de 1000 mg mL⁻¹, para lo cual se pesaron 26,10 mg de TFF aforando a 25 mL con acetona.

3.3. ACEITES UTILIZADOS

Se analizaron 9 Aceites de Oliva y 2 Aceites de Palta disponibles en el mercado. Además se uso un aceite de oliva extravirgen orgánico para pruebas de recuperación.

3.3.1. ACEITE DE OLIVA

- **Olave:** Aceite de Oliva Extravirgen Orgánico ,acidez máxima 0,2%, Lote: BOR-417 (Para pruebas de recuperación)
- **Chilensis:** Aceite de Oliva Extravirgen, acidez máxima 0,14%, Fecha Elaboración: 25/05/2006.
- **Sol de Aculeo:** Aceite de Oliva Extravirgen acidez máxima 0,3%, Lote: 02-207.
- **Terramater Petralia:** Aceite de Oliva Extravirgen acidez máxima 0,2%.

- **Classic Blend Kardamili:** Aceite de Oliva Extravirgen acidez máxima 0,3% Lote:106-4T104.
- **Terramater Casta:** Aceite de Oliva Extravirgen acidez máxima 0,2%.
- **1492 Frantoio:** Aceite de Oliva extravirgen, Olivares de Quepu.
- **Mestre:** Aceite de oliva extravirgen acidez máxima 0,3%.
- **La crianza** Aceite de oliva extravirgen acidez máxima 0,3%.
- **Monte Cristo** Aceite de oliva extravirgen acidez máxima 0,2%.

3.3.2. ACEITE DE PALTA

- **Razeto:** Aceite de Palta Extravirgen
- **Lamay:** Aceite de Palta Extravirgen

3.4. MÉTODOS

3.4.1. DESARROLLO MÉTODO CROMATOGRÁFICO

- Determinación del orden de elución de los plaguicidas

A partir de la solución patrón de cada uno de los nueve plaguicidas, se prepararon soluciones de de $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ en hexano para determinar el tiempo de retención de los compuestos. Se inyectó $1 \mu\text{L}$ de solución.

Para las mediciones en GC-FPD se utilizó el inyector y el detector a 250°C y 280°C respectivamente, el flujo del gas portador en la columna fue de $0,95 \text{ mL min}^{-1}$, para Hidrógeno 75 mL min^{-1} y el aire 100 mL min^{-1} . El programa de temperatura fue 70°C por 2 min, aumentado a 230°C (40°C /min) manteniendo esa temperatura por 1 min y posteriormente aumentando a 280° (5°C /min) por 1 min.

- Separación cromatográfica de los nueve compuestos inyectados simultáneamente

Se preparó una solución en un matraz de aforo de 10 mL de hexano con los nueve compuestos cada uno $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ y se utilizó TFF $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ como patrón interno, se

inyectó 1 μL de esta solución a distintos programas de temperatura, hasta obtener una buena separación de los nueve compuestos, obteniéndose un programa de temperatura con buena resolución e identificación de cada plaguicida.

3.4.2. DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE CALIDAD ANALÍTICA INSTRUMENTAL

- Curva de calibración realizada en n-Hexano

Se realizó una curva de calibrado con los nueve compuestos en conjunto a las concentraciones 0,02; 0,03; 0,04; 0,05; 0,06; 0,08, 0,16 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para Diazinón, Metilparatión, Metilpirimifos, Fentión, Clorpirifos y 0,04; 0,06; 0,08; 0,10; 0,12; 0,16; 0,32 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para Dimetoato, Malatión, Metidatión y Metilazinfos. La curva se realizó usando como medio n-Hexano y utilizando TFF 0,10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ como patrón interno. Se inyectaron las soluciones en las condiciones cromatográficas definidas como óptimas.

- Curva de calibración realizada en n-Hexano y aceite de oliva 0,3% v/v.

Con el fin de establecer el efecto de la matriz sobre la respuesta cromatográfica se realizó una curva de calibración con los nueve compuestos en conjunto a las concentraciones 0,01; 0,02; 0,03; 0,04; 0,05; 0,06; 0,08; 0,16; 0,32 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para Diazinón, Metilparatión, Metilpirimifos, Fentión, Clorpirifos y 0,02; 0,04; 0,06; 0,08; 0,10; 0,12; 0,16; 0,32 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para Dimetoato, Malatión, Metidatión y Metilazinfos. La curva se realizó usando como medio n-Hexano y aceite de oliva extravirgen orgánico 0,3% v/v y utilizando TFF 0,10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ como patrón interno. Las mediciones fueron realizadas por triplicado bajo las condiciones cromatográficas definidas como óptimas.

Los gráficos de calibración lineal fueron construidos por una regresión de mínimos cuadrados de concentración ($\mu\text{g mL}^{-1}$) versus razón de área del peak del compuesto y área del patrón interno de calibración (A_p/A_{pi})

Para determinar el límite de detección (LOD) estadístico se consideró un intervalo de concentración de 0,01-0,08 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para Diazinón, Metilparatión, Metilpirimifos, Fentión, Clorpirifos y 0,02 – 0,16 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para Dimetoato, Malatión, Metidatión, Metilazinfos.

Para el cálculo estadístico se utilizó la siguiente fórmula

$$LOD = \frac{3S_{y/x}}{b}$$

Donde

$S_{y/x}$: Desviación estándar de la regresión

b : Pendiente de la regresión

Para el análisis de la linealidad de los datos se utilizó la siguiente expresión matemática

$$Linealidad = \left(\frac{S_b}{b} \right) \times 100\%$$

Donde

S_b : Desviación estándar de la pendiente

b : Pendiente

3.4.3. EFECTO AUMENTO DE SEÑAL INDUCIDO POR MATRIZ

Se pesaron 3 g de aceite de oliva extravirgen orgánico al que se le agregó 2 mL de AcN como extractante y se llevó a microondas utilizando un programa propuesto de

2min a 250W y 5min a 500W. Posteriormente se separó el extracto con una pipeta Pasteur y se le agregó los nueve plaguicidas en una concentración de $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ para Diazinón, Metilparatión, Metilpirimifos, Fentión, Clorpirifos y una concentración de $0,2 \mu\text{g mL}^{-1}$ para Dimetoato, Malatión, Metidatión y Metilazinfos. Se evaluó la respuesta cromatográfica comparada con una solución en las mismas concentraciones de los nueve plaguicidas en acetona.

3.5. LIMPIEZA DE EXTRACTOS MEDIANTE EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA

Para la limpieza de los extractos se seleccionó una extracción en fase sólida utilizando una columna ENVI-Carb. La limpieza se realizó acondicionando la columna ENVI-Carb con 4 mL de AcN y posteriormente eluyendo el extracto de matriz obtenido seguido de 2 mL de AcN para lavado del tubo contenedor del extracto y 3 mL de AcN para el lavado de la columna, recibiendo la solución final en un vial.

3.5.1. OPTIMIZACIÓN ETAPA LIMPIEZA DE EXTRACTOS

- Obtención de extractos libres de plaguicidas y fortificación

Se pesaron 5 g de aceite de oliva extravirgen orgánico el cual se diluyó con 5 mL de hexano y se agregó 4 mL de AcN como extractante se llevó a microondas 2 min 250W y 5 min 500W, posteriormente se separó el extracto obtenido con una pipeta Pasteur llevando a un tubo de ensayo.

Los extractos fueron fortificados con una masa fija de los nueve plaguicidas según los MRL establecidos para el aceite de oliva (entre $0,1 - 0,2 \mu\text{g g}^{-1}$), para 5g de aceite se añadió $0,5$ y $1,0 \mu\text{g}$ de los nueve plaguicidas disueltos en $250 \mu\text{l}$ de acetonitrilo. Los que luego de pasar por una columna de extracción en fase sólida, son evaporados y llevados a un volumen final de 2 mL acetona por lo que la concentración para su determinación fue de $0,25$ y $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$.

- Diseño Experimental para la optimización

Se realizó un diseño experimental del tipo Doehlert con $k^2 + k + C_0$ experimentos para optimizar la limpieza de los extractos, considerando 3 factores (k): volumen de elución (mL), % v/v DCM en el solvente de elución y volumen de extracto (mL) en 5, 7 y 3 niveles de estudio respectivamente (Tabla 1). Además se añadieron dos centros extras al diseño (C_0). Con ello se obtuvo el modelo matemático que permite determinar los valores óptimos para cada factor. El diseño fue compuesto por 14 experimentos incluidos 2 puntos centrales.

- Método de limpieza y cuantificación

Según las condiciones de la matriz de experimentos (Tabla 2), los extractos fortificados fueron pasados por la columna ENVI-Carb previamente acondicionada con 4 mL de acetonitrilo, con ayuda de presión positiva, el eluato fue recogido en un vial de 15 mL. Luego se añadió el solvente en la cantidad indicada en la matriz de experimentos para completar la elución de los compuestos. El extracto fue evaporado bajo una corriente de nitrógeno extra puro y el residuo fue re-disuelto en 2 mL de acetona, se agregó patrón interno TFF $0,25 \mu\text{g ml}^{-1}$ y se cuantificaron los compuestos mediante GC-FPD. Como referencia para la calibración se utilizó un patrón de los nueve plaguicidas preparado en medio de matriz y utilizando las condiciones de limpieza de los puntos centrales.

Tabla 1 Niveles Diseño Doehlert optimización Etapa de Limpieza SPE

Nivel	Factor		
	Volumen de elución (mL)	% v/v DCM en solvente de elución	Volumen de extracto (mL)
-1	2	-	-
-0,866	-	0	-
-0,816	-	-	2 + 2 por lavado
-0,577	-	17	-
-0,5	2,8	-	-
-0,289	-	33	-
0	3,5	50	4 + 2 por lavado
0,289	-	67	-
0,5	4,3	-	-
0,577	-	83	-
0,816	-	-	6 + 2 por lavado
0,866	-	100	-
1	5	-	-

Tabla 2 Matriz de Experimentos Diseño Doehlert optimización Etapa de limpieza SPE

Nº Experimento	Volumen de elución (mL)	% v/v DCM en solvente de elución	Volumen de extracto (mL)
1	5	50	4
2	4,3	100	4
3	4,3	67	6
4	2	50	4
5	2,8	0	4
6	2,8	33	2
7	4,3	0	4
8	4,3	33	2
9	2,8	100	4
10	3,5	83	2
11	2,8	67	6
12	3,5	17	6

13	3,5	50	4
14	3,5	50	4

3.5.2. EVALUACIÓN DEL EFECTO DE AUMENTO DE SEÑAL INDUCIDO POR LA MATRIZ LUEGO DE LA LIMPIEZA

A los extractos obtenidos bajo las condiciones óptimas de limpieza se les realizó el siguiente tratamiento:

- a) Extracto en AcN se evaporó a sequedad bajo corriente de nitrógeno extrapuro, fue re-disuelto en 2 mL de acetona y se fortificó con los nueve plaguicidas 0,1-0,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$.
- b) Extracto en AcN se limpió en la columna ENVI-Carb bajo condiciones óptimas, se evaporó con nitrógeno extrapuro, fue re-disuelto en 2 mL de acetona y posteriormente fortificado con los nueve plaguicidas 0,1-0,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Las muestras fueron cuantificadas mediante GC-FPD y se realizó la comparación entre las muestras a), b) y un patrón de los nueve plaguicidas en acetona para evaluar el efecto inducido por la matriz.

3.6. EXTRACCIÓN ASISTIDA POR MICROONDAS

3.6.1. DISEÑO EXPLORATORIO MULTIVARIADO

- Fortificación del aceite

Se pesaron 60g de aceite de oliva extravirgen orgánico y fueron mezclados con 3 mL de una solución de los nueve plaguicidas en n-hexano obteniendo una concentración final de 0,1 $\mu\text{g g}^{-1}$ para Diazinón, Metilparatión, Metilpirimifos, Fentión, Clorpirifos y 0,2 $\mu\text{g g}^{-1}$ para Dimetoato, Malatión, Metidatión y Metilazinfos.

- Diseño de Screening

Se evaluaron seis factores experimentales mediante un diseño Plackett-Burman con 12 experimentos, para encontrar aquellos factores que afectan significativamente la

recuperación de los compuestos. El error experimental necesario para evaluar el efecto de los factores, se obtuvo al incluir en la matriz de experimentos cinco factores fantasmas. La Tabla 3 muestra los niveles utilizados para los factores en estudio y la Tabla 4 presenta la matriz de experimentos.

- Procedimiento de Extracción

Se pesó la masa de aceite fortificado en los vasos del microondas según lo indicado en la matriz de experimentos (Tabla 4), se añadió, cuando correspondía, un volumen equivalente de n-hexano (1:1 masa aceite/volumen hexano) y el volumen correspondiente del solvente para la extracción y reparto (MeOH o AcN). Se procedió a la extracción asistida por microondas según la potencia y tiempo señalada en el diseño experimental. Luego de enfriar los vasos su contenido fue traspasado a un tubo de ensayo en donde se realizó la separación del extracto con una pipeta Pasteur, traspasándose el extracto a otro tubo, los vasos fueron enjuagados con 2 mL del solvente utilizado para la extracción y este volumen se junto con el anterior, el extracto se pasó por las columnas ENVI-Carb para su limpieza según las condiciones óptimas determinadas. El extracto se evaporó en una corriente de nitrógeno y se redisolvió en 2 mL de acetona. Se añadió a las muestras TFF $0,25 \mu\text{g mL}^{-1}$ como patrón interno y se midieron en GC-FPD. Para la cuantificación se utilizó un patrón de los nueve plaguicidas en medio de extracto de matriz a una concentración de $0,3 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Tabla 3 Niveles diseño Plackett-Burman para screening de Extracción asistida por microondas

Factor	Nivel	
	-1	+1
Potencia (W)	300	500
Tiempo (min)	5	3
Masa (g)	3	5
Dilución en n-hexano (1:1 g/mL)	No	Sí
Tipo extractante	MeOH	AcN
Volumen extractante (mL)	2	5

Tabla 4 Matriz de Experimentos Screening diseño Plackett-Burman

Exp	Potencia	Tiempo	Masa	Dilución	Tipo Extr.	Vol.extr	F 1	F 2	F 3	F 4	F 5
1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1
2	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1
3	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1
4	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1
5	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1
6	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1
7	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1
8	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1
9	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1
10	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1
11	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1

3.6.2. OPTIMIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN

Para determinar la condición que permite la máxima eficiencia de extracción de los nueve compuestos, se realizó un diseño Doehlert con $k^2 + k + Co$ experimentos, usando aceite de oliva extravirgen orgánico fortificado $0,05 \mu\text{g g}^{-1}$ para Diazinón, Metilparatión, Metilpirimifos, Fentión, Clorpirifos y $0,1 \mu\text{g g}^{-1}$ para Dimetoato, Malatión, Metidatión y Metilazinfos. La contaminación del aceite para la obtención de los extractos se realizó usando el mismo procedimiento detallado anteriormente (Sección 3.6.1).

- Diseño de Optimización

Se evaluaron 3 factores (k): Volumen de extractante (mL), Potencia (W) y Tiempo (min), con 7, 5 y 3 niveles respectivamente (Tabla 5), se añadieron 2 centros (Co) obteniéndose el modelo matemático que permite determinar los valores óptimos para cada factor. El diseño fue compuesto por 14 experimentos incluidos los 2 puntos centrales (Tabla 6)

- Procedimiento de Extracción

Se pesaron 5g de aceite de oliva extravirgen orgánico fortificado y se extrajeron bajo las condiciones establecidas según el diseño experimental (Tabla 6). Luego se separó el extractante y se procedió con la etapa de limpieza en la columna ENVI-Carb bajo las condiciones óptimas establecidas. Se evaporó la muestra y se re-disolvió en 2mL de acetona. A las muestras se le agregó una concentración de 0,125 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de TFF y se inyectaron en GC-FPD.

Tabla 5 Niveles diseño Doehlert optimización extracción asistida por microondas

Factor			
Nivel	Volumen extractante (mL)	Potencia (W)	Tiempo (min)
-1	-	550	-
-0,866	2	-	-
-0,816	-	-	5
-0,577	2,8	-	-
-0,5	-	620	-
-0,289	3,7	-	-
0	4,5	700	7,5
0,289	5,3	-	-
0,5	-	780	-
0,577	6,2	-	-
0,816	-	-	10
0,866	7	-	-
1	-	850	-

Tabla 6 Matriz de Experimentos diseño Doehlert optimización Extracción asistida por microondas

Nº Experimento	Volumen de extractante (mL)	Potencia (W)	Tiempo (min)
1	7	700	7,5
2	6,2	850	7,5
3	6,2	780	10
4	2	700	7,5
5	2,8	550	7,5
6	2,8	620	5
7	6,2	550	7,5
8	6,2	620	5
9	2,8	850	7,5
10	4,5	780	5
11	2,8	700	10
12	4,5	620	10
13	4,5	700	7,5
14	4,5	700	7,5

3.7. EFECTO DEL USO DE PROTECTORES DE ANALITO (L-GLUCONIC γ - LACTONA + D-SORBITOL) SOBRE EFECTO DE MATRIZ

Se pesaron 5 gramos de aceite de oliva extravirgen orgánico fortificado a $0,05 \mu\text{g g}^{-1}$ para Diazinón, Metilparatión, Metilpirimifos, Fentión, Clorpirifos y $0,1 \mu\text{g g}^{-1}$ para Dimetoato, Malatión, Metidatión y Metilazinfos, se extrajo bajo condiciones óptimas de extracción y limpieza. Se repitió el proceso para 8 muestras, las cuales se evaporaron y redisolviéron en acetona a cuatro de ellas se les agregó $50\mu\text{l}$ de una solución L- Gluconic γ - Lactona : D-Sorbitol $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ (1:1), se agregó TFF $0,2 \mu\text{g mL}^{-1}$ y se inyectaron en GC-FPD. Se realizó una comparación de la magnitud de la señal cromatográfica obtenida de los nueve plaguicidas en muestras con y sin protectores de analitos. Para la comparación se prepararon patrones en distintos medios (acetona pura, acetona más protectores de analito y matriz) con una concentración de $0,125 \mu\text{g mL}^{-1}$ para Diazinón, Metilparatión, Metilpirimifos, Fentión, Clorpirifos y $0,250 \mu\text{g mL}^{-1}$

para Dimetoato, Malatión, Metidatión y Metilazinfos, más TFF $0,2 \mu\text{g mL}^{-1}$ como patrón interno.

3.8. EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL CONTENIDO DE DICLOROMETANO EN EL EXTRACTANTE SOBRE LA EFICIENCIA DE LA EXTRACCIÓN

Se pesaron 5 g de aceite de oliva extravirgen orgánico fortificado a concentraciones de $0,05 \mu\text{g g}^{-1}$ para Diazinón, Metilparatión, Metilpirimifos, Fentión, Clorpirifos y $0,1 \mu\text{g g}^{-1}$ para Dimetoato, Malatión, Metidatión y Metilazinfos. Los plaguicidas se extrajeron bajo condiciones óptimas utilizando como extractante 5 mL de soluciones preparadas a distintas concentraciones de Acetonitrilo:Diclorometano 90:10 ; 80:20 ; 70:30 en cada caso, posteriormente se limpiaron bajo las condiciones óptimas determinados y se midió la recuperación de los nueve pesticidas en GC- FPD.

3.9. CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS DEL MÉTODO

3.9.1. CURVA DE CALIBRACIÓN

Se preparó una curva de calibrado en medio de extractos obtenidos pesando 5g de aceite de oliva extravirgen orgánico a los que se agregó 5ml de extractante AcN:DCM (90:10) y se procedió al proceso de extracción bajo condiciones óptimas de potencia y temperatura. Posteriormente se limpiaron los extractos obtenidos bajo las condiciones óptimas determinadas y se contaminaron a 7 niveles (Tabla 7) con los nueve plaguicidas, se evaporaron las muestras y fueron redisueltas en 2 mL de acetona y se le agregó patrón interno TFF $0,2 \mu\text{g mL}^{-1}$ para su medición en GC-FPD, las mediciones se realizaron por triplicado.

Tabla 7 Niveles de concentración en $\mu\text{g mL}^{-1}$ para la curva de calibrado en medio de matriz

Nivel de concentración	Grupo A	Grupo B
1	0,06	0,03
2	0,08	0,04
3	0,1	0,05
4	0,16	0,08
5	0,2	0,1
6	0,32	0,16
7	0,4	0,2

Grupo A: Dimetoato, Malatión, Metidation, Metilazinfos.; Grupo B: Diazinón, Metilparation, Metilpirimifos, Fentión, Clorpirifos.

3.9.2. DETERMINACIÓN DE LA PRECISIÓN DEL MÉTODO

Se fortificó aceite de oliva extravirgen orgánico $0,05 \mu\text{g g}^{-1}$ con una solución de los nueve plaguicidas. Se realizó el proceso de extracción y limpieza bajo las condiciones óptimas determinadas, luego se evaporaron y se redisolieron las muestras en 2 mL de acetona, se agregó patrón interno TFF $0,2 \mu\text{g mL}^{-1}$, y se midieron en GC-FPD. La precisión fue determinada mediante el cálculo de la desviación estándar relativa del porcentaje de recuperación de los compuestos, para cinco repeticiones.

3.9.3. EVALUACIÓN DE LA RECUPERACIÓN

Se fortificó aceite de oliva extravirgen orgánico a 3 niveles $0,03 \mu\text{g g}^{-1}$; $0,06 \mu\text{g g}^{-1}$ y $0,120 \mu\text{g g}^{-1}$ con una solución de los nueve plaguicidas. Se procedió con la extracción y limpieza bajo condiciones óptimas, luego de la evaporación y redisolución en 2 mL de acetona se agregó patrón interno TFF $0,2 \mu\text{g mL}^{-1}$ y se midieron en GC-FPD. Las muestras fueron medidas en triplicado.

Para cada nivel de fortificación se consideró un patrón de calibrado de los nueve plaguicidas en matriz disuelto en 2 mL de acetona a las concentraciones $0,075 \mu\text{g mL}^{-1}$, $0,150 \mu\text{g mL}^{-1}$ y $0,300 \mu\text{g mL}^{-1}$ según corresponda.

3.10. APLICACIÓN A MUESTRAS REALES

El método desarrollado fue aplicado para determinar residuos de plaguicidas organofosforados en aceites que se producen y comercializan en Chile. Se pesaron 5g de nueve aceites de oliva diferentes y 5 g de dos aceites de palta diferentes, se procedió a la extracción, limpieza y medición bajo las condiciones óptimas determinadas. Como patrón de calibración se utilizó un patrón en matriz de aceite de oliva extravirgen orgánico con los nueve plaguicidas a una concentración de $0,075 \mu\text{g mL}^{-1}$ y TFF $0,10 \mu\text{g mL}^{-1}$.

4. Resultados y Discusión

4.1. DESARROLLO DEL MÉTODO CROMATOGRÁFICO

- Determinación de orden y tiempo de elución

En la Tabla 8 se muestra el orden de elución de los compuestos que se determinó a través de un programa estándar de temperatura. Según los resultados obtenidos para cada plaguicida observamos que para Metilpirimifos, Malatión, Fentión y Clorpirifos los tiempos de retención son demasiados cercanos para obtener una buena resolución de cada compuesto, por lo que se desarrolló un método cromatográfico que permitiera la separación e identificación efectiva de los nueve plaguicidas en los extractos obtenidos. Las condiciones finales que permitieron una óptima separación e identificación de los nueve plaguicidas con una duración de 31,6 minutos se presentan en la Tabla 9. En la Figura 1 se presenta un cromatograma típico en acetona con los tiempos de retención de los nueve plaguicidas.

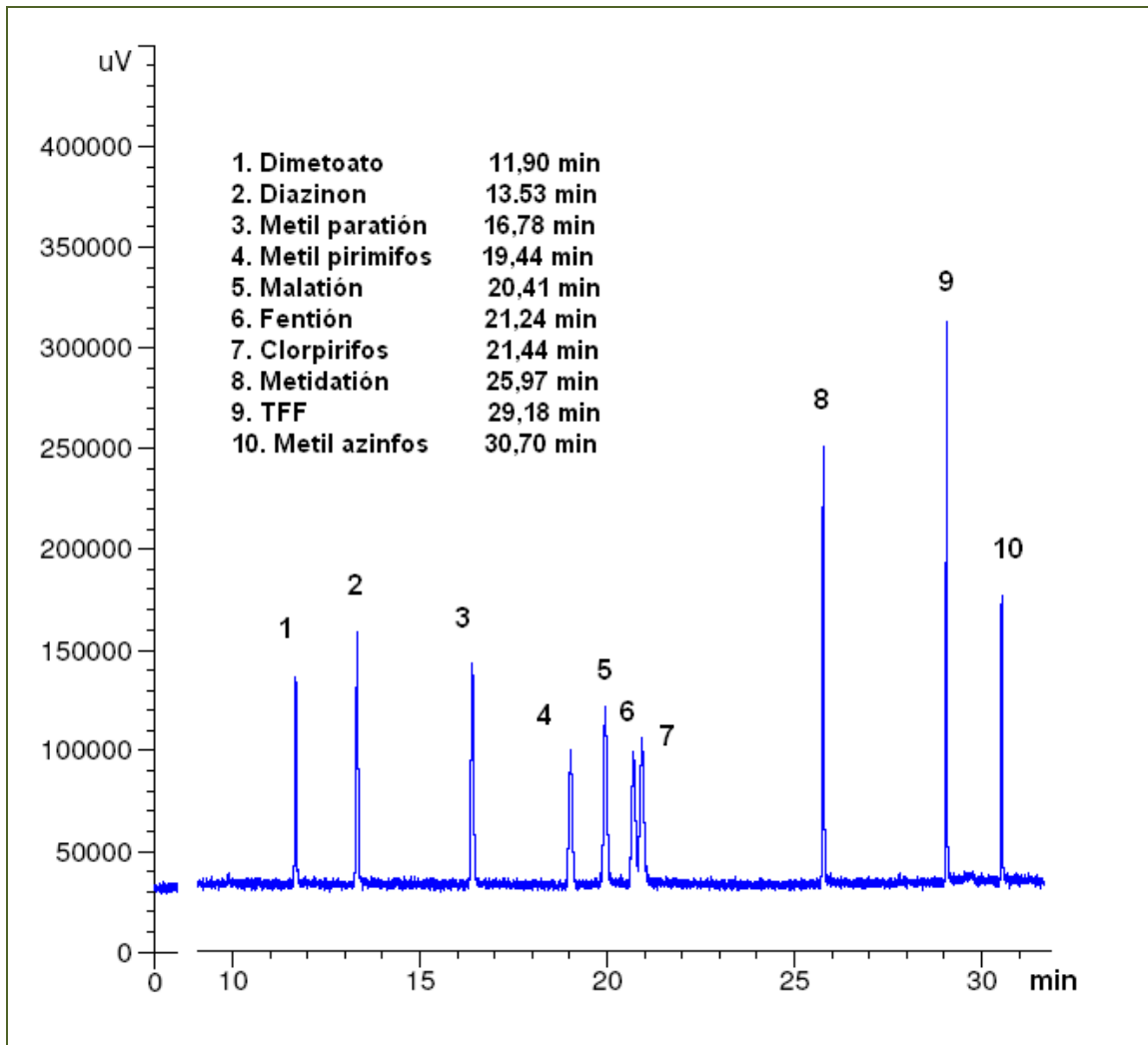
Tabla 8 Orden de elución de los nueve plaguicidas

Orden	Plaguicida	Tiempo de Retención (min)
1	Dimetoato	7,856
2	Diazinón	8,105
3	Metilparatión	8,775
4	Metilpirimifos	9,052
5	Malatión	9,174
6	Fentión	9,339
7	Clorpirifos	9,369
8	Metidatión	10,422
9	Metilazinfos	15,146

Tabla 9 Programa de Temperatura final GC-FPD

70°C	2 min
70°C	180°C c/30°C min.
180°C	18 min.
180°C	280°C c/5°C min
280°C	4 min

Figura 1 Cromatograma nueve plaguicidas en acetona a una concentración de 0,1 µg mL⁻¹ para Diazinón, Metilparatión, Metilpirimifos, Fentión, Clorpirifos y 0,2 µg mL⁻¹ para Dimetoato, Malatión, Metidatión y Metilazinfos



4.2. DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE CALIDAD ANALÍTICA INSTRUMENTAL

Los parámetros de calidad analítica instrumental para los nueve plaguicidas se observan en la Tabla 10 y Tabla 11. Los valores de linealidad (S_b/b) fueron menores al 10% por lo que la respuesta de todos los compuestos fue lineal en el intervalo estudiado. (Anexo 1 curvas de calibración)

Se puede observar que los límites de detección obtenidos en presencia de matriz se ven levemente incrementados, lo que se debe a la obtención de una señal más ruidosa.

Al comparar los valores de las pendientes obtenidas en ambas curvas se ve un incremento en la sensibilidad de la curva realizada en presencia de matriz, lo que se debe al efecto de incremento de señal inducido por matriz (Kichner y col.,2007), que es causado por componentes de la matriz probablemente lípidos, pigmentos y otros de alto peso molecular, los cuales se unen a sitios activos del inserto y de la cabeza de la columna permitiendo así un mayor ingreso de los compuestos al sistema.

Tabla 10 Características analíticas instrumentales para la determinación de los nueve plaguicidas organofosforados mediante GC-FPD en hexano

Compuesto	Pendiente (<i>b</i>) mL μg^{-1}	R	Linealidad (%)	Desviación Estándar de la Regresión ($S_{y/x}$)	Límite de detección ($\mu\text{g ml}^{-1}$)
Dimetoato ^a	65,7	0,982	9,6	0,061	0,028
Diazinón ^b	85,7	0,996	4,6	0,019	0,007
Metilparatión ^b	97,4	0,999	1,1	0,005	0,002
Metilpirimifos ^b	77,8	0,997	3,6	0,013	0,005
Malatión ^a	67,0	0,993	6,0	0,044	0,011
Fentión ^b	92,3	0,998	2,9	0,013	0,004
Clorpirifos ^b	99,2	0,992	6,3	0,031	0,009
Metidatión ^a	71,8	0,998	3,0	0,021	0,009
Metilazinfos ^a	35,3	0,991	6,9	0,024	0,020

a: 0,02 – 0,16 $\mu\text{g ml}^{-1}$; b: 0,01 – 0,08 $\mu\text{g ml}^{-1}$

Tabla 11 Características analíticas instrumentales para la determinación de los nueve plaguicidas organofosforados mediante GC-FPD en hexano/aceite de oliva 0,3% v/v

Compuesto	Pendiente (<i>b</i>) mL μg^{-1}	R	Linealidad (%)	Desviación Estándar de la Regresión ($S_{y/x}$)	Límite de Detección ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
Dimetoato ^a	100	0,985	7,7	0,092	0,027
Diazinón ^b	94,7	0,990	7,0	0,039	0,012
Metilparatión ^b	125	0,996	4,2	0,025	0,006
Metilpirimifos ^b	95,7	0,983	9,2	0,037	0,012

Malatión^a	91,0	0,997	3,9	0,035	0,012
Fentión^b	113	0,988	7,9	0,043	0,011
Clorpirifos^b	118	0,991	6,8	0,039	0,010
Metidatión^a	101	0,995	4,8	0,047	0,014
Metilazinfos^a	58,4	0,988	7,8	0,049	0,025

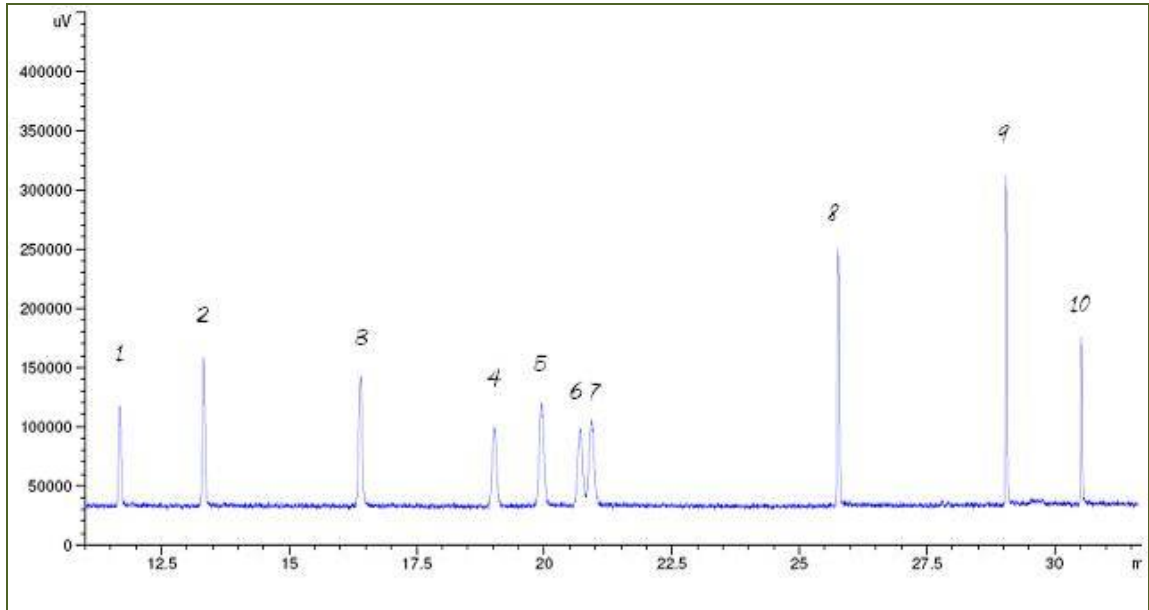
a: 0,02 – 0,16 $\mu\text{g mL}^{-1}$; b: 0,01 – 0,08 $\mu\text{g mL}^{-1}$

4.3. EFECTO AUMENTO DE SEÑAL INDUCIDO POR MATRIZ

Se comparó la respuesta cromatográfica de la solución de extracto fortificado con los nueve plaguicidas, con un patrón de estos en acetona.

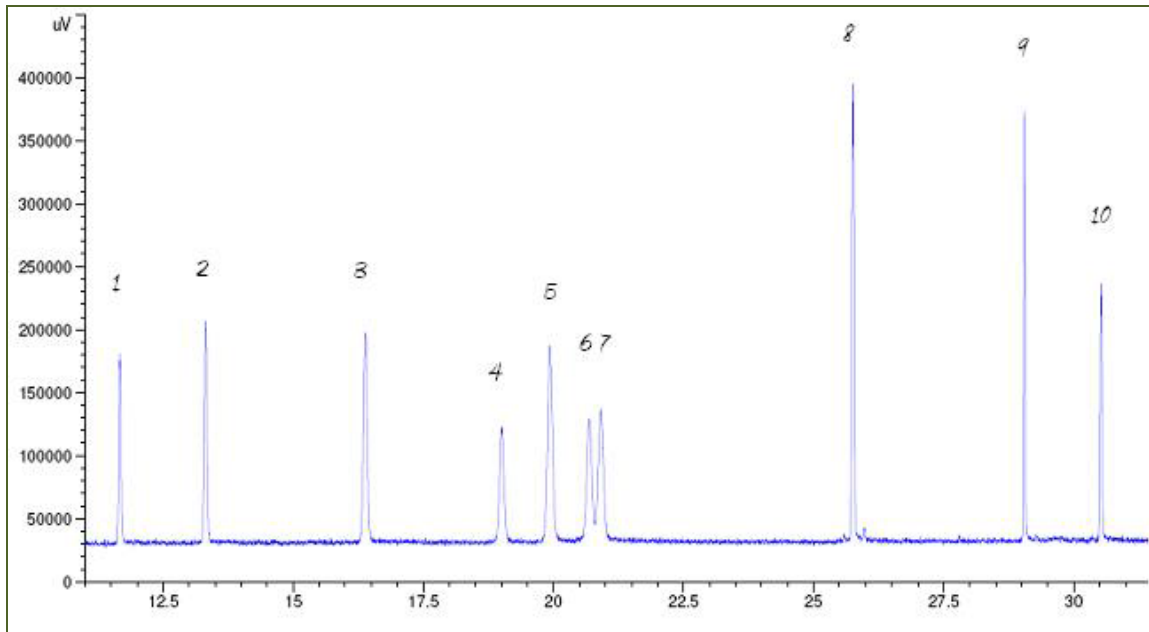
La respuesta cromatográfica de los plaguicidas en acetona (Figura 2) es menor que la obtenida en el extracto fortificado (Figura 3). Los incrementos varían entre 1,15 y 1,53 veces (Tabla 12) dependiendo del compuesto considerado, siendo mayor en los casos de Metilazinfos, Metidatión y Malatión. Este efecto conocido como “incremento de señal inducido por matriz” el cual ya había sido observado al evaluar los parámetros de calidad analítica instrumentales, crea la necesidad de limpieza el extracto previo a la determinación cromatográfica.

Figura 2 Cromatograma obtenido de una solución patrón en acetona



Plaguicidas: 1.Dimetoato, 5.Malati3n,8.Metidati3n, 10.Metilazinfos($0,2\mu\text{g ml}^{-1}$), 6.Fenti3n, 7.Clorpirifos,2.Diazin3n, 3.Metilparati3n, 4.Metilpirimifos($0,1\mu\text{g ml}^{-1}$), 9.TFF (patr3n interno a $0,1\mu\text{g ml}^{-1}$)

Figura 3 Cromatograma obtenido de una soluci3n de extracto fortificado



Plaguicidas: 1.Dimetoato, 5.Malati3n,8.Metidati3n, 10.Metilazinfos($0,2\mu\text{g ml}^{-1}$), 6.Fenti3n, 7.Clorpirifos,2.Diazin3n, 3.Metilparati3n, 4.Metilpirimifos($0,1\mu\text{g ml}^{-1}$), 9.TFF (patr3n interno a $0,1\mu\text{g ml}^{-1}$)

Tabla 12 Respuestas cromatogr3ficas relativas para los plaguicidas en extracto de aceite versus a un patr3n en acetona

Plaguicida	Acetona	Extracto aceite
Dimetoato ^a	1.00	1.33
Diazinón ^b	1.00	1.15
Metilparatión ^b	1.00	1.27
Metilpirimifos ^b	1.00	1.20
Malatión ^a	1.00	1.43
Fentión ^b	1.00	1.27
Clorpirifos ^b	1.00	1.23
Metidatión ^a	1.00	1.44
Metilazinfos ^a	1.00	1.53

a: 0.2µg mL⁻¹ y b:0,1µg mL⁻¹.

4.4. LIMPIEZA DE EXTRACTOS MEDIANTE EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA

4.4.1. OPTIMIZACIÓN ETAPA DE LIMPIEZA DE EXTRACTOS

En la Tabla 13 se muestra la matriz de respuesta para la optimización de la limpieza de los extractos, los datos se presentan como porcentaje de recuperación de los nueve plaguicidas además de la cantidad de aceite co-extraído (mg) en cada experimento.

Tabla 13 Matriz de Respuesta diseño Doehlert Optimización etapa de Limpieza (porcentajes de recuperación)

Nº Experimento	Dimetoato	Diazinon	Metil paration	Metil pirimifos	Malation	Fention	Clorpirifos	Metidation	Metil azinfos	Mg aceite co-extr
1	81,5	51	65,5	37,5	62,15	48,38	52,6	63,3	43,6	6
2	99	70,88	78,6	61,16	82,55	70,82	79,8	87,2	85,6	9,6
3	100,9	73,38	79,3	59,14	82,08	75,12	84,2	87,1	81,9	10,9
4	69,4	39,64	48,5	20,26	52,72	24	126,4	52,4	11,6	4,8
5	87,7	62,58	71,5	20,06	87,86	0	0	88,3	25	3,4
6	68,7	32,9	43,1	35,5	36,9	0	0	40,9	1,6	3,3
7	105,2	75	88,7	43,98	93,78	0	0	100,7	1,7	2,6
8	100,4	61,94	82,4	43,66	81,87	37,84	15,7	86,9	9,9	3,5
9	79,9	99,14	92,7	100,2	103,09	91,02	95	102,2	91,8	9,3
10	59,8	52,3	57,4	47	55,22	50,42	61,6	54,2	48,5	3,5
11	77,2	71,32	85,1	61,44	76,38	61,78	67,3	76,7	54,2	11,1
12	77,3	58,2	79,2	40,72	79,15	0	0	77,9	3,5	13,2
13	59,4	48,4	43,9	34,1	42,3	37,3	39,8	42,3	24,3	5,2
14	89,8	54,1	54	42,7	54	53,1	55,6	53,5	34,4	5,1

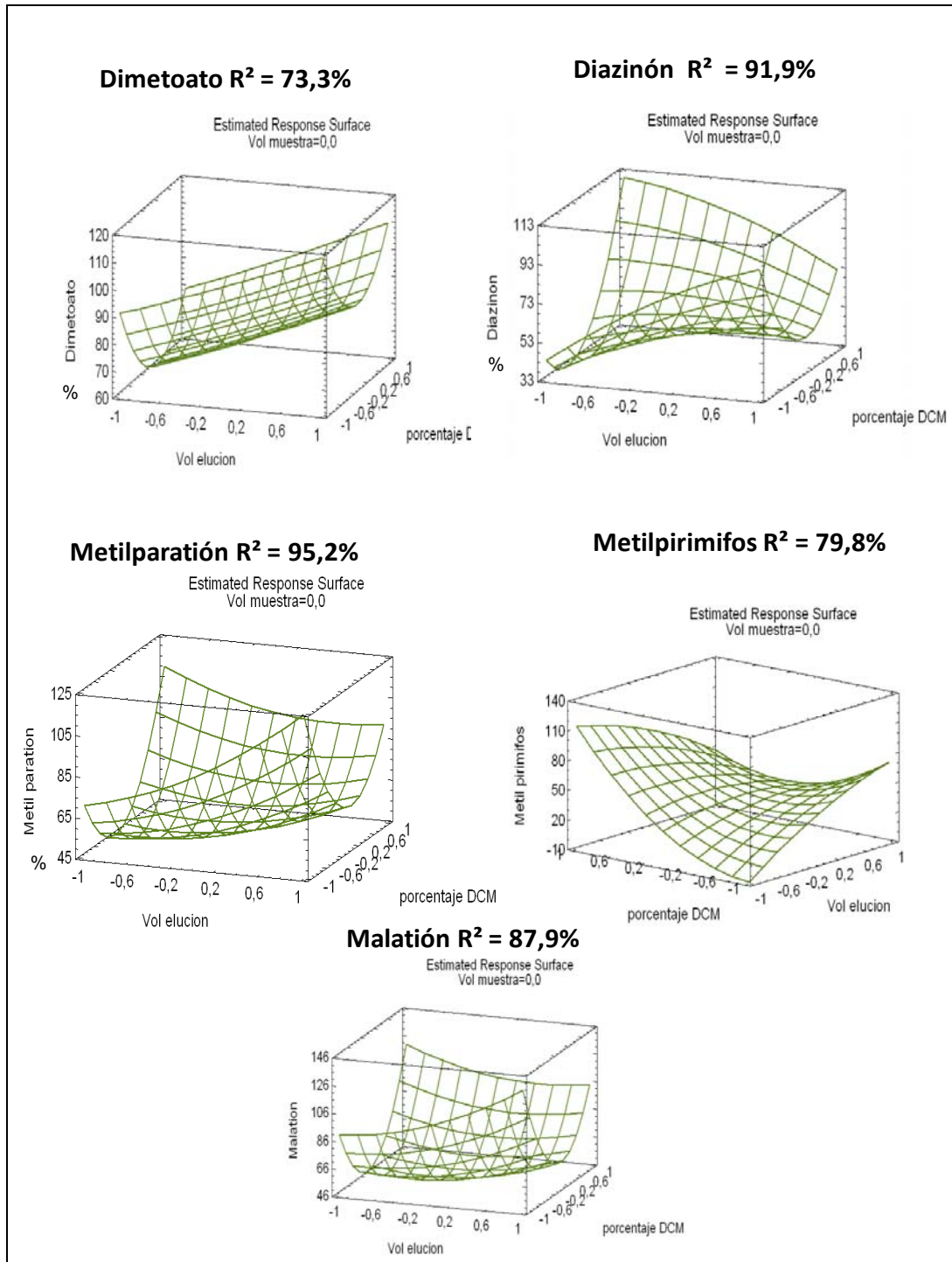
Para la determinación de los parámetros óptimos de limpieza de los extractos se analizó cada uno de los compuestos obteniéndose una superficie de respuesta estimada las que se presentan en las Figura 4. (Anexo 2 Diagramas de Pareto)

En el análisis individual de las superficies de respuestas obtenidas de la optimización del método de limpieza podemos observar que para Dimetoato, Diazinón, Metilparatión, Metilpirimifos, Malatión y Metidatión el porcentaje de diclorometano en el extractante tienen un efecto dual, de acuerdo a ello la elución cuantitativa de estos compuestos se puede lograr de dos maneras, mayor volumen de solvente con menor porcentaje de diclorometano o menor volumen de solvente con mayor porcentaje de diclorometano.

Para Fentión, Clorpirifos y Metilazinfos, según el análisis de las superficies de respuesta obtenidas la recuperación cuantitativa se lograría sólo con mayores porcentajes de diclorometano en el solvente de elución.

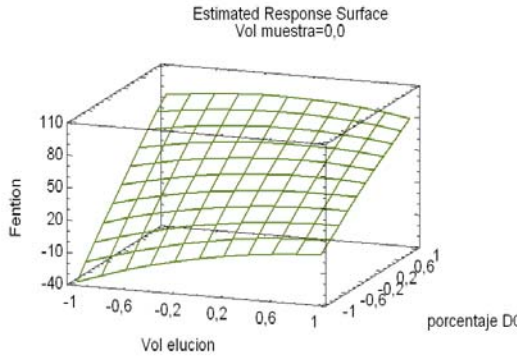
Además de la determinación de los porcentajes de recuperación de los nueve plaguicidas en los extractos obtenidos luego de la limpieza SPE, se determinó la cantidad de aceite co-extraído para evaluar la eficiencia de la limpieza. El objetivo es obtener la mínima cantidad de aceite co-extraído en la limpieza, para disminuir el efecto del aumento de señal inducido por la matriz. Según la superficie de respuesta obtenida tanto al aumentar el volumen de elución como el porcentaje de diclorometano en este, aumenta la cantidad de aceite co-extraído, siendo más importante este último factor.

Figura 4 Superficies de Respuesta Optimización Limpieza

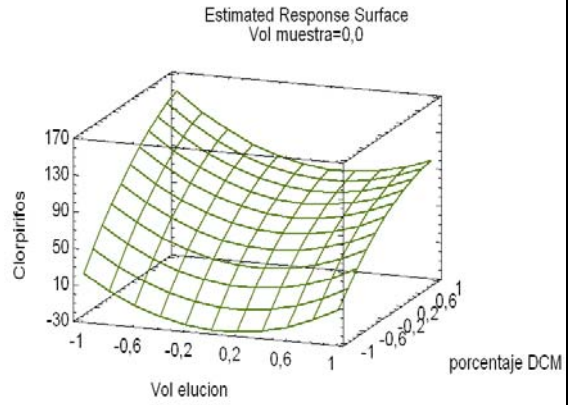


Continuación Figura 4 Superficies de Respuesta Optimización limpieza

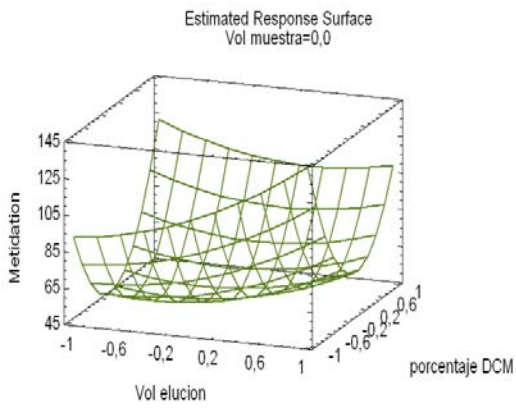
Fentión $R^2 = 92,8\%$



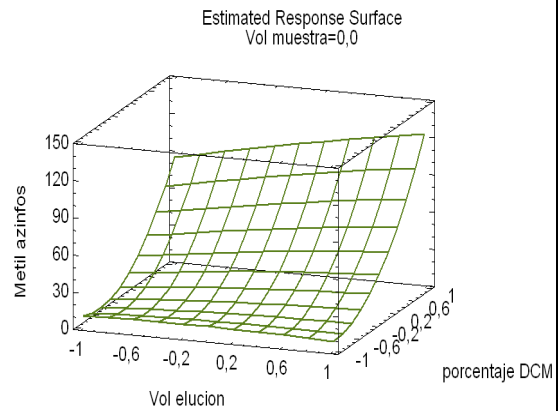
Clorpirifos $R^2 = 88,2\%$



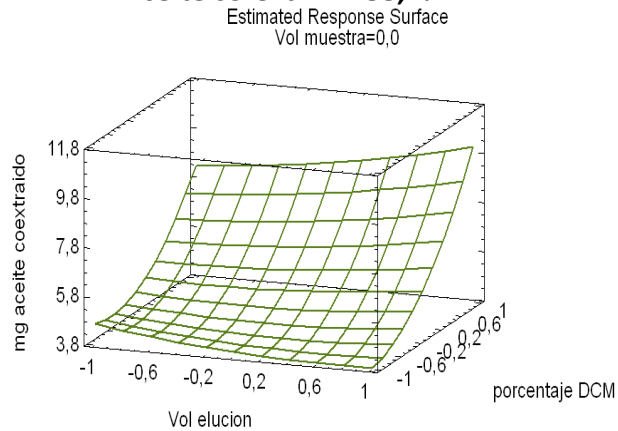
Metidation $R^2 = 89,9\%$



Metilazinfos $R^2 = 92,0\%$



Aceite co-ext $R^2 = 88,4\%$



Con el objetivo de encontrar la condición óptima de limpieza de los nueve plaguicidas en conjunto se generó una superficie de respuesta a partir de una respuesta combinada única. Esta se obtiene mediante una función de conveniencia o deseabilidad ($d(y)$ y D) ver Anexo 3.

Para la obtención de los valores de deseabilidad de los nueve plaguicidas en la optimización de la limpieza se utilizó como valor mínimo (y^{min}) el porcentaje menor de recuperación obtenido en la serie de experimentos. El valor máximo (y^{max}) fue de 110% de recuperación para los plaguicidas, excepto Clorpirifos que fue de 130%. El valor objetivo (y^{target}) fue 100% de recuperación para los nueve plaguicidas y los valores de los exponentes s y t fue de 2 para cada función bilateral, con un coeficiente de impacto igual a 3.

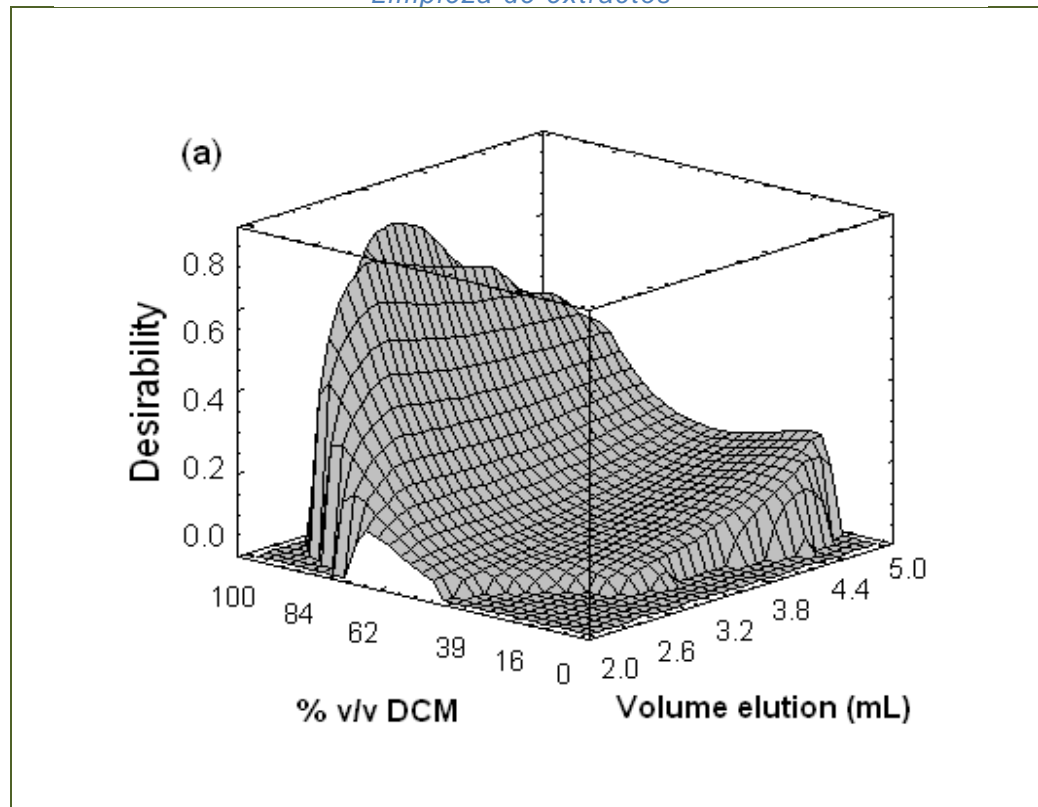
Para el valor del aceite co-extraído, se utilizó el valor mínimo (y^{min}) y el valor máximo (y^{max}) obtenidos de la serie de experimentos. El objetivo de la función fue minimizar la extracción de aceite co-extraído y el exponente s para llegar al objetivo fue 2, con un coeficiente de impacto igual a 2.

Los valores de deseabilidad obtenidos para la serie de experimentos se muestran en la Tabla 14. La superficie de respuesta obtenida (Figura 6) del análisis de deseabilidad total nos indica que al aumentar la concentración de DCM en la solución de elución aumenta el valor de D y se alcanza un valor máximo de D a una alta concentración de DCM y un volumen medio de solvente en la elución.

Tabla 14 Valores de Deseabilidad (D) Optimización etapa de limpieza

Nº Experimento	Deseabilidad
1	0,168
2	0,463
3	0,437
4	0,014
5	0,0
6	0,0
7	0,0
8	0,179
9	0,614
10	0,080
11	0,298
12	0,0
13	0,103
14	0,138

Figura 5 Superficie de Respuesta Deseabilidad Optimización Limpieza de extractos



4.4.2. DETERMINACIÓN DE FACTORES SIGNIFICATIVOS

El resultado del análisis de varianza (ANOVA) y la estimación de los coeficientes para un modelo de segundo orden obtenidos de acuerdo al diseño de optimización Doehlert, se presentan en la Tabla 15. Los valores se presentan por separado para cada efecto y las diferentes interacciones, los efectos que presenten P-value < 0,05 son significativos con un nivel de confianza del 95,0%. El modelo ajustado representa adecuadamente los datos ya que, la carencia de ajuste (lack of fit) no fue significativa con un P- value > 0,05. La regresión fue significativa con un nivel de confianza de 90% y el coeficiente de determinación (R^2) fue de 0,9284. La ANOVA muestra que solo el contenido de DCM en el solvente de elución tiene un efecto significativo positivo sobre la deseabilidad total ($P < 0,05$).

Tabla 15 Análisis de Varianza Optimización etapa de limpieza

Source	Df	Coeficiente	Suma de cuadrados	Promedio cuadrado	F-ratio	P-value
Constante	1	0,121				
VEIs	1	0,0591	0,0140	0,0140	22,4	0,133
DCM	1	0,285	0,324	0,324	519	0,028
Vext	1	0,0970	0,0377	0,0377	60,3	0,082
VEIs ²	1	-0,0297	0,00088	0,00088	1,41	0,445
VEIs x DCM	1	-0,0872	0,00570	0,00570	9,13	0,204
VEIs x Vext	1	0,00613	0,00002	0,00002	0,04	0,880
DCM ²	1	0,208	0,0432	0,0432	69,2	0,076
DCM x Vext	1	0,350	0,0736	0,0736	118	0,059
Vext ²	1	0,0226	0,00056	0,00056	0,90	0,517
Regresión	9	-	0,4851	0,0539	5,73	0,054
Error residual	4	-	0,0374	0,0094		
Lack of fit	3	-	0,0368	0,0123	20,5	0,161
Error puro	1	-	0,00062	0,00062		
Total	13	-	0,5225			

Df: grados de libertad; VEIs: volumen de elución; DCM: porcentaje de diclorometano contenido en el solvente de elución; Vext: volumen de extractante.

En la Tabla 16 se resumen los valores óptimos para los factores estudiados que influyen en el proceso de limpieza de la muestra, valores con los que se obtiene el mayor porcentaje de recuperación para los nueve plaguicidas y la menor cantidad de aceite co-extraído. Las condiciones finales obtenidas de la optimización fueron: 5mL de extracto, 3mL de solvente de elución 100% DCM.

Tabla 16 Valores óptimos de la etapa de limpieza

Factor	Valor codificado			Valor natural
	Mínimo	Máximo	Óptimo	Óptimo
Vol. elución (ml)	-1,0	1,0	-0,273346	3,0 mL
Porcentaje DCM	-0,866	0,866	0,856653	100%
Vol muestra (ml)	-0,817	0,817	0,17811	5,0 mL

Los porcentajes de recuperación para los nueve plaguicidas y la cantidad de aceite co-extraído obtenidos bajo las condiciones óptimas de limpieza se presentan en la Tabla 17. Se obtuvieron porcentajes de recuperación entre 88 ± 7 y $112 \pm 11\%$ y $8,9 \pm 1,2$ mg de aceite co-extraído (aproximadamente 2 mg por g de aceite)

Tabla 17 Recuperación bajo condiciones óptimas etapa limpieza

Respuesta	Recuperación (%)
Dimetoato	107 ± 3
Diazinón	88 ± 7
Metilparatión	98 ± 5
Metilpirimifos	87 ± 12
Malatión	112 ± 11
Fentión	89 ± 7
Clorpirifos	96 ± 4
Metidatión	110 ± 13
Metilazinfos	107 ± 11
Aceite co-extraído (mg)	$8,9 \pm 1,2$

4.5. EVALUACIÓN DEL EFECTO DE AUMENTO DE SEÑAL INDUCIDO POR LA MATRIZ LUEGO DE LA LIMPIEZA

En la Tabla 18 se presentan los valores de señal relativas obtenidas para extractos con y sin limpieza por SPE. El aumento de señal inducido por la matriz es entre un 13-50% dependiendo del compuesto (columna A) en referencia a un patrón en acetona de los nueve plaguicidas. Se observa que al realizar la limpieza de la matriz mediante la columna SPE bajo las condiciones óptimas, las señales de los diferentes compuestos fueron más cercanas a las señales obtenidas en un patrón de acetona con un aumento de la señal entre 1 -20% (columna B).

Tabla 18 Valores de señales cromatográficas relativas obtenidas para extractos con y sin limpieza

Plaguicida	9 OPPs en acetona	9 OPPs en extracto fortificado A	Matriz SPE luego contaminación 9 OPPs B
Dimetoato	1,00	1,13	1,06
Diazinón	1,00	1,18	1,06
Metilparatión	1,00	1,26	1,10
Metilpirimifos	1,00	1,17	1,03
Malatión	1,00	1,50	1,12
Fentión	1,00	1,31	1,20
Clorpirifos	1,00	1,27	1,12
Metidatión	1,00	1,46	1,13
Metilazinfos	1,00	1,40	1,01

4.6. EXTRACCIÓN ASISTIDA POR MICROONDAS

4.6.1. DISEÑO EXPLORATORIO MULTIVARIADO

Para el análisis de los factores significativos en la extracción asistida por microondas se realizó un Diseño Plackett-Burmann de 12 experimentos, los resultados en porcentaje de recuperación de los nueve plaguicidas se muestran en la Tabla 19.

El efecto de señal inducido por matriz que se analizó anteriormente, lo podemos ver en los experimentos número 4 y 6 donde las recuperaciones de los plaguicidas son mayores al 100%. Para realizar una evaluación simultánea del efecto de los factores experimentales sobre la extracción de los nueve plaguicidas, se utilizó la respuesta de conveniencia (D) en el Screening. Los valores de deseabilidad de los nueve plaguicidas se obtuvieron mediante la maximización de la respuesta con $s = 1$ y un coeficiente de impacto $l = 3$. La deseabilidad total obtenida se presenta en la Tabla 19.

Tabla 19 Matriz de respuesta screening diseño Plackett-Burman (porcentajes de recuperación)

Exp	Dimetoato	Diazinon	Metil paration	Metil pirimifos	Malation	Fention	Clorpirifos	Metidation	Metil azinfos	Deseabilidad (D)
1	40,3	38,3	45,9	38,4	47,5	31,8	28,8	36,0	20,8	0,047
2	126,1	64,8	71,9	56,7	82,8	53,6	49,1	60,9	58,7	0,275
3	50,4	26,2	43,9	23,1	53,7	29,6	23,9	34,4	32,7	0,046
4	118,6	128,8	129,0	118,4	155,9	108,1	97,0	145,7	122,0	0,677
5	105,8	51,6	89,3	36,8	85,1	55,3	50,6	71,6	77,8	0,273
6	200,9	171,2	186,5	142,9	237,6	98,5	151,8	193,9	169,3	0,984
7	108,8	65,1	73,3	55,2	86,6	60,8	46,8	69,3	60,1	0,284
8	37,0	22,1	46,6	18,6	45,3	23,3	25,1	37,8	32,1	0,015
9	32,5	41,9	55,9	39,9	59,0	48,4	47,3	53,6	49,7	0,103
10	98,2	101,4	108,3	98,2	125,9	110,3	91,7	120,3	92,2	0,543
11	69,2	50,8	48,7	47,9	59,2	39,4	35,5	41,6	37,8	0,131
12	48,9	36,2	35,1	30,1	43,8	25,5	21,2	32,7	25,5	0,014

4.6.2. DETERMINACIÓN DE FACTORES SIGNIFICATIVOS

En la Tabla 20 se presentan los valores de el análisis de varianza (ANOVA) de la regresión de los factores experimentales en la deseabilidad total. En orden decreciente, potencia, volumen de solvente extractante, masa de aceite y tiempo tienen un efecto significativo positivo sobre la eficiencia de la extracción asistida por microondas (con un 90% de probabilidad). El tipo de extractante (acetonitrilo o metanol) y la dilución de la masa de aceite con hexano no tienen efecto en la eficiencia de la extracción. El error del modelo necesario para evaluar la significancia de los efectos se determinó mediante la siguiente expresión:

$$S_e = \sqrt{\frac{\sum (f)_i^2}{n_i}}$$

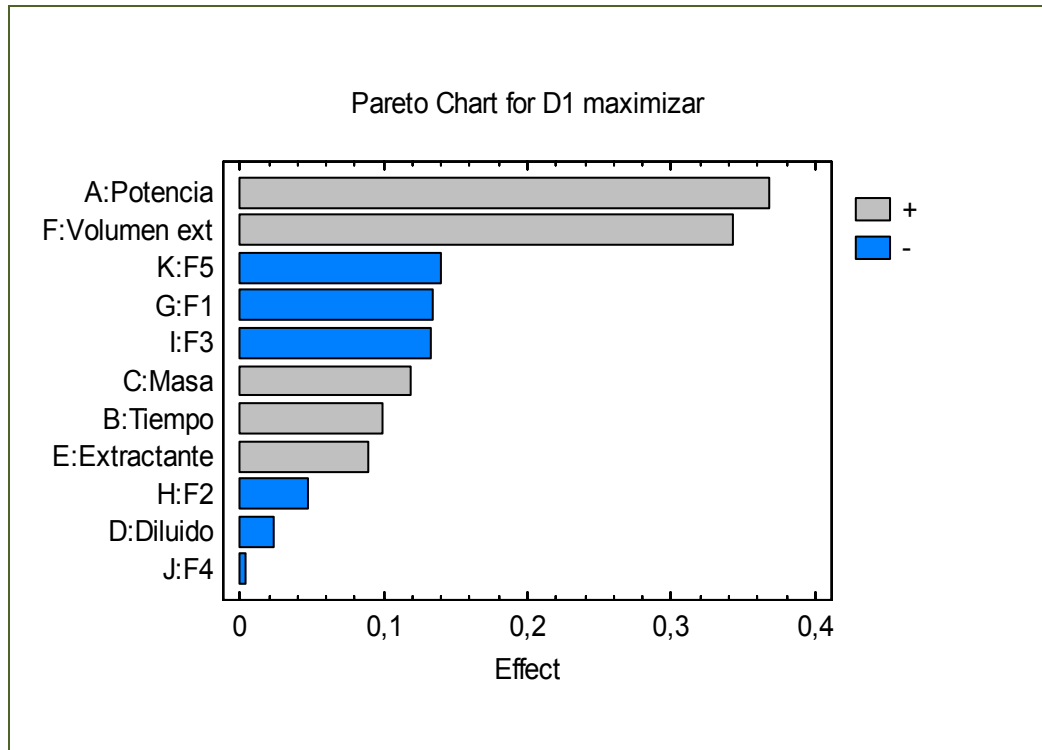
Donde f corresponde a los efectos de los factores fantasmas incluidos en el diseño y n_i es igual a 5. El valor de S_e es de 0,1022. La Figura 6 presenta los valores de los efectos estimados para cada factor, donde en todos los efectos estudiados, excepto el efecto de la dilución con n-hexano, tienen efecto positivo.

Tabla 20 Análisis de Varianza Screening

Factor	Efecto Estimado	F-Ratio ^a	P-Value
A:Potencia	0,3677	38,8	0,000
B:Tiempo	0,0992	2,83	0,093
C:Masa	0,1193	4,09	0,043
D:Diluido	-0,0231	0,15	0,695
E:Extractante	0,0889	2,27	0,132
F:Volumen ext.	0,3423	33,7	0,000
G:F1	-0,1343	-	-
H:F2	-0,0469	-	-
I:F3	-0,1327	-	-
J:F4	-0,0032	-	-
K:F5	-0,1395	-	-

a: F-Ratio fue obtenido desde el error experimental (0,1022) calculado con el efecto de los factores fantasmas

Figura 6 Diagrama de Pareto función de Deseabilidad



4.6.3. OPTIMIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN

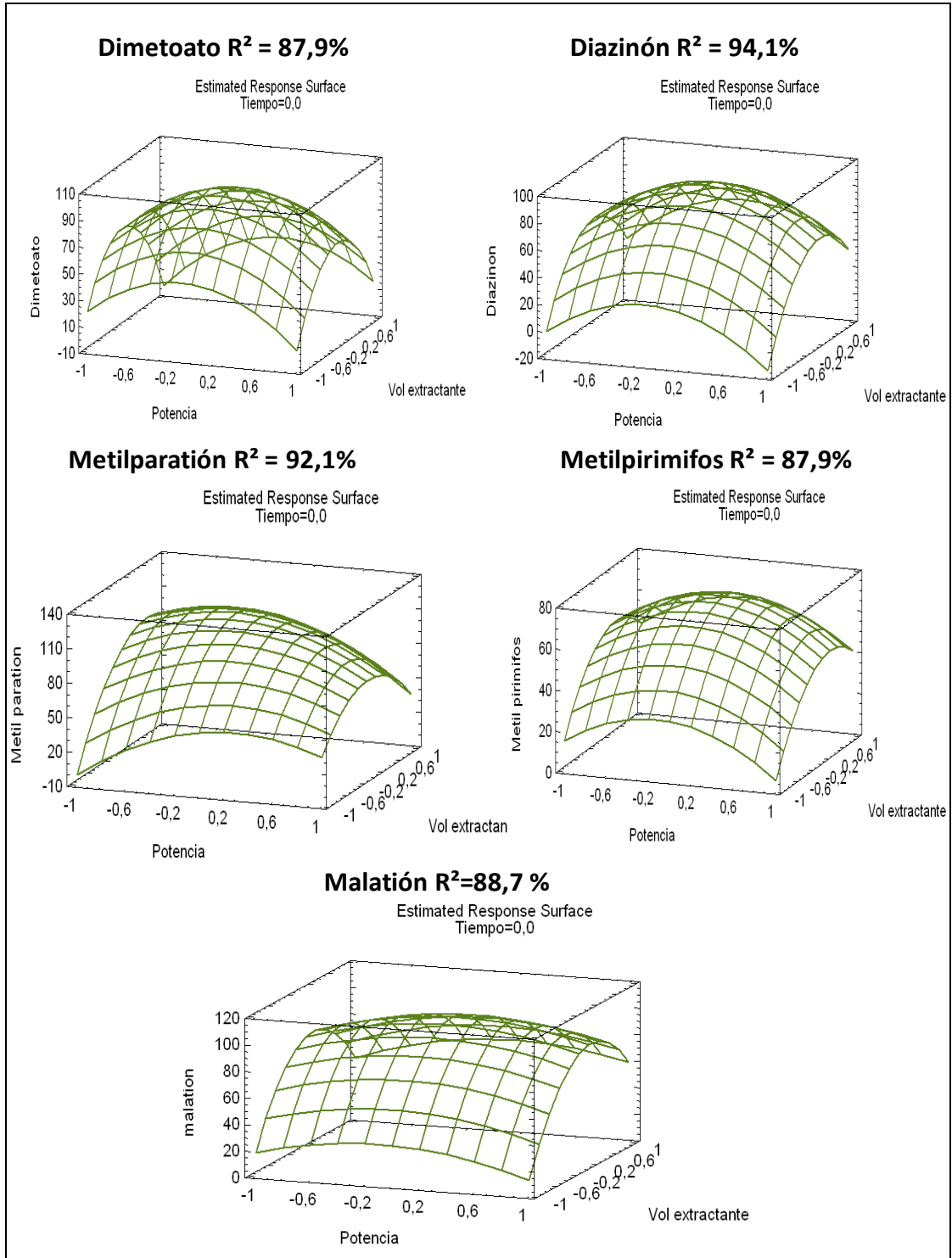
Con los factores ya definidos, se utilizó un diseño de optimización Doehlert con cinco, siete y tres niveles para potencia, volumen de extractante y tiempo respectivamente, para optimizar la extracción. La Tabla 21 muestra los porcentaje de recuperaciones de los nueve plaguicidas obtenidos y la cantidad de aceite co-extraído en las mediciones.

Las superficies de respuesta individuales obtenidas para cada uno de los plaguicidas y del aceite co-extraído (Figura 7) muestran que tanto la potencia como el volumen de extracción, registrándose un valor máximo como óptimo. El detalle del análisis de varianza se presenta a continuación en la Tabla 22.

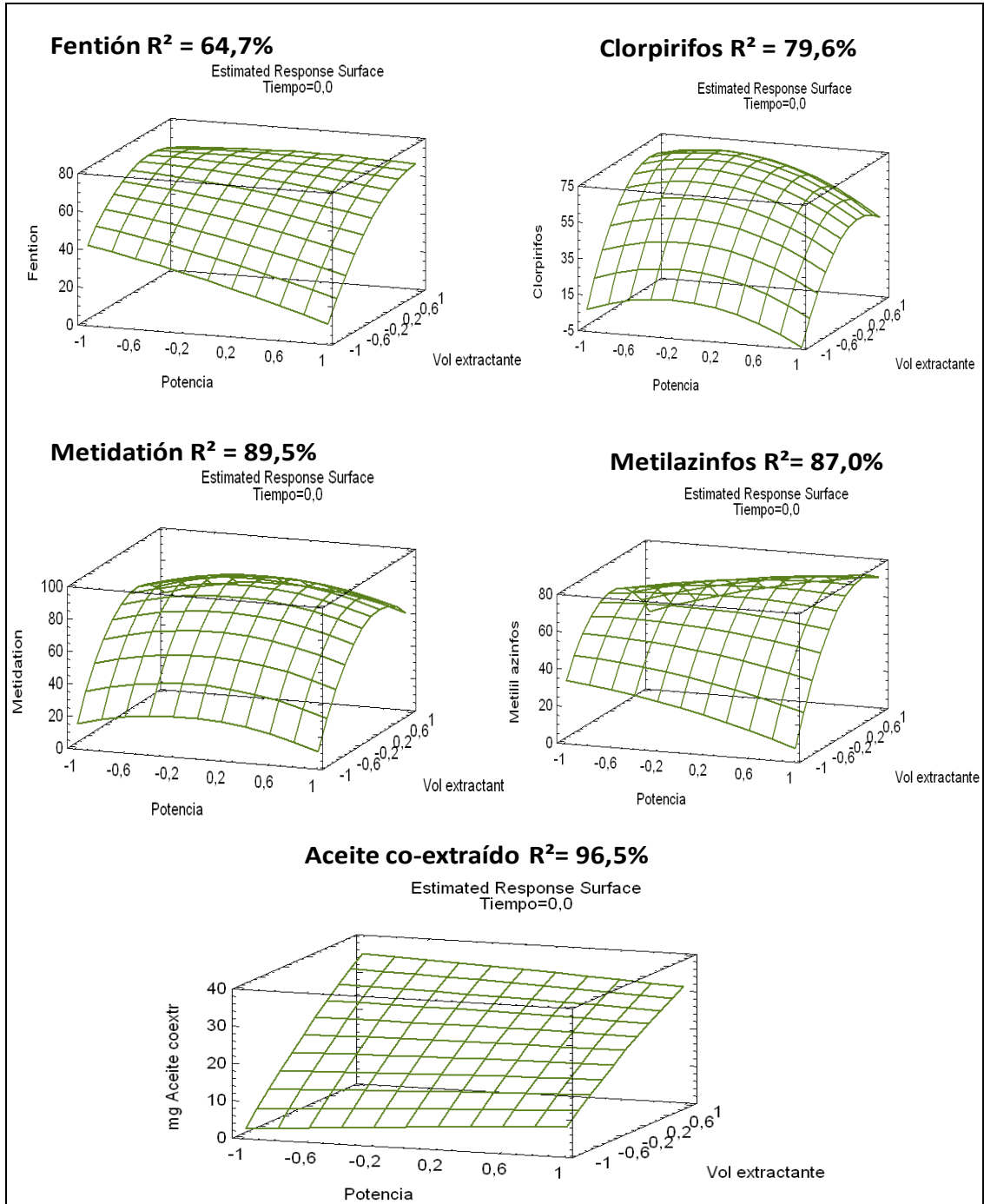
Tabla 21 Matriz de experimentos Optimización de la Extracción (porcentajes de recuperación)

Exp	Dimetoato	Diazinon	Metil paration	Metil pirimifos	Malation	Fention	Clorpirifos	Metidation	Metil azinfos	mg aceite	Deseabilidad
1	59,08	52	78	46,08	93,88	66,24	52,16	77,72	68,8	22,25	0,573
2	67,64	71,44	87,44	68,08	85,44	69,52	60,08	77	78,48	29,09	0,714
3	64,2	72,48	58,96	51,36	63,52	43,04	45,12	57,44	58,2	27,67	0,469
4	70,72	58,72	78,56	52,32	77,48	53,36	49,2	62,28	64,24	19,76	0,555
5	41	27,28	35,6	26,4	36,88	39,84	23,12	31,88	29,52	8,55	0,035
6	49,52	41,76	56,8	38,32	63,96	44	38,48	46,68	43,08	15,09	0,308
7	35,56	26,08	57,68	31,92	42,28	33,6	24,64	31,28	32,6	8,12	0,071
8	40,72	26,96	47,04	34,64	40,8	0	0	30,48	40,4	13,05	0,0
9	58,76	63,68	102,4	59,84	72,44	61,52	64,64	75,4	51,68	33,57	0,599
10	66,92	50,88	60,4	41,44	76,84	54,56	53,2	59,56	44,48	32,95	0,432
11	29,24	67,04	90,08	74,96	81,6	87,68	82,56	83,2	90,76	22,85	0,448
12	160,8	76,24	66,08	58,8	79,04	42,8	34,24	54,6	49,92	13,79	0,526
13	100,0	89,76	110,32	72,24	99,48	64,24	62	82,76	71,08	19,52	0,849
14	100,0	86,8	104	64,08	103,32	59,68	67,44	80,84	69	22,95	0,817

Figura 7 Superficies de Respuesta Optimización extracción

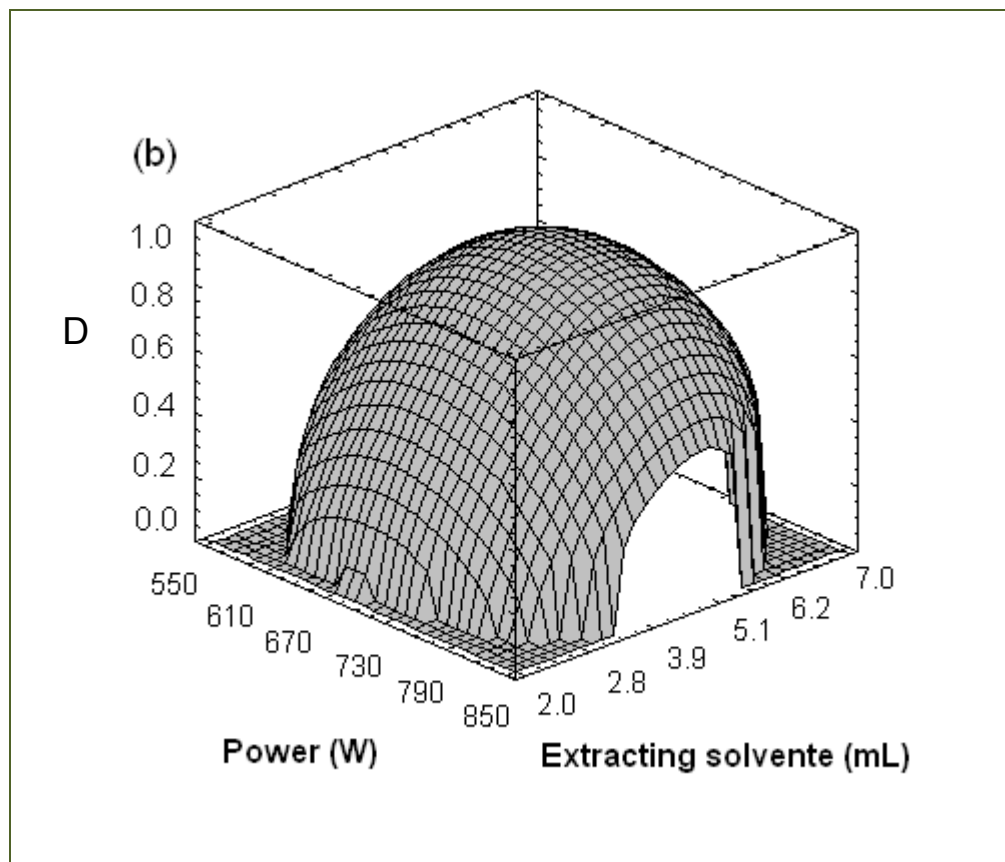


Continuación Figura 7 Superficies de Respuesta Optimización Extracción



Al igual que en la optimización de la limpieza, para encontrar la condición óptima de extracción de los nueve compuestos, se generó una superficie de respuesta a partir de la deseabilidad total. Para ello determinó la función de deseabilidad para cada plaguicida maximizando la respuesta con valor de $s = 1$ y el coeficiente de impacto $I = 3$. Los valores de deseabilidad obtenidos se presentan en la Tabla 21 y la superficie de respuesta obtenida se muestra en la Figura 8 donde podemos observar que el máximo se encuentra en las condiciones centrales del diseño.

Figura 8 Superficie de Respuesta Deseabilidad Optimización Extracción



El estudio del análisis de varianza (ANOVA) y los coeficientes estimados para un modelo de segundo orden con D como respuesta, se muestran en la Tabla 22. El

modelo representa adecuadamente los datos ya que la carencia de ajuste (Lack of fit) no fue significativa ($P > 0,05$), la regresión fue significativa con un nivel de confianza de un 95% y el coeficiente de determinación fue de 0,9397. De acuerdo al ANOVA y en concordancia con lo observado en el screening, el volumen del solvente de extracción, su término cuadrático y los términos cuadráticos del tiempo y potencia tienen un efecto significativo sobre la extracción ($P < 0,05$). Es decir que los tres factores tienen un efecto limitante, disminuyendo la eficiencia de extracción más allá de un valor óptimo. Las condiciones óptimas de extracción determinadas se muestran en la Tabla 23.

Tabla 22 Análisis de Varianza Optimización de la extracción

Source	Df	Coefficiente	Suma de cuadrados	Promedio cuadrado	F-ratio	P-value
Constante	1	0,832				
P	1	-0,0108	0,00046	0,00046	0,811	0,533
Vexs	1	0,245	0,240	0,240	419	0,031
T	1	0,129	0,0667	0,0667	117	0,059
P ²	1	-0,350	0,123	0,123	215	0,043
P x VExs	1	0,0392	0,00115	0,00115	2,02	0,391
P x T	1	0,158	0,0151	0,0151	26,4	0,123
VExs ²	1	-0,589	0,347	0,347	607	0,026
VExs x T	1	-0,315	0,0594	0,0594	104	0,062
T ²	1	-0,538	0,317	0,317	555	0,027
Regresión	9	-	0,8287	0,0921	6,92	0,039
Error residual	4	-	0,0533	0,0133		
Lack of fit	3	-	0,0527	0,0176	29,3	0,135
Error puro	1	-	0,00057	0,00057		
Total	13	-	0,8820			

Código de Source P: potencia; VExs: volumen solvente extractante; T: tiempo de extracción.

Tabla 23 Valores óptimos para MAE

Factor	Valor codificado			Valor natural
	Mínimo	Máximo	Óptimo	Óptimo
Potencia (W)	-1,0	1,0	-0,051	700 W
Vol.extractante (ml)	-0,866	0,866	0,210	5mL
Tiempo	-0,817	0,817	0,174	8min

Para el desarrollo de la extracción en el laboratorio se utilizó una potencia de 700W, 5mL de solvente extractante (acetonitrilo) y 8 min el proceso de extracción en el horno microondas.

En la Tabla 24 se presentan los valores en porcentaje de recuperación obtenidos bajo las condiciones óptimas establecidas por el modelo. Además se indica la solubilidad en agua de cada plaguicida. Se observa en la tabla que los porcentajes de recuperación obtenidos varían entre un 62-99%, siendo las menores recuperaciones las de Clorpirifos, Fentión, Metilpirimifos y Metilazinfos, lo que se asocia a su baja solubilidad en agua por lo cual el reparto en el solvente de extracción es menor por su alta afinidad por el aceite. De hecho al evaluar la correlación entre el porcentaje de recuperación de cada compuesto y el logaritmo de su solubilidad en agua, se obtiene un valor de $r = 0,8323$ lo que representa una correlación significativa con un 95% de probabilidad.

Tabla 24 Recuperaciones obtenidas bajo condiciones óptimas de extracción y limpieza

Respuesta	Porcentaje Obtenido	Solubilidad en agua mg L⁻¹	Log solubilidad en agua
Dimetoato	99 ± 8	39800	4,60
Diazinon	80 ± 8	60	1,78
Metil paration	95 ± 8	70	1,85
Metil pirimifos	70 ± 6	5	0,70
Malation	96 ± 9	125	2,10
Fention	65 ± 4	4	0,60
Clorpirifos	62 ± 5	1,39	0,14
Metidation	81 ± 6	221	2,34
Metilil azinfos	76 ± 5	28	1,45

4.7. EFECTO DEL USO DE PROTECTORES DE ANALITO (L-GLUCONIC Γ - LACTONA + D-SORBITOL) SOBRE EFECTO DE MATRIZ

En otras investigaciones se ha visto que para compensar el efecto de aumento de señal cromatográfica inducida por la matriz se han utilizado protectores de analito (Kirchner y col.,2007) estos compuestos se agregan en la misma concentración a los extractos y al patrón de calibrado libre de matriz, generando un mismo medio con el fin de compensar el efecto de la matriz en los extractos. Se realizó una comparación de los porcentajes de recuperación de muestras calibradas con diferentes patrones (Tabla 25) donde se observa que no existen mayores diferencias en los porcentajes de recuperación obtenidos en las muestras calibradas con o sin protectores de analitos. Al observar los diferentes patrones de calibrado, el patrón en medio de matriz es con el que se obtienen mejores porcentajes de recuperación de los plaguicidas 55-108% y una SD 4-17%. Por lo tanto, se mantuvo el uso como patrón de calibración una solución de los nueve compuestos disueltos en matriz.

Tabla 25 Porcentajes de recuperación utilizando diferentes patrones de calibrado

Compuesto	Patrón 9 OPPs acetona		Patrón 9 OPPs + protectores en acetona		Patrón 9 Opps en matriz	
	S/P \pm SD	C/P \pm SD	S/P \pm SD	C/P \pm SD	S/P \pm SD	C/P \pm SD
Dimetoato	101 \pm 9	117 \pm 3	66 \pm 6	78 \pm 3	108 \pm 10	134 \pm 13
Diazinón	55 \pm 6	71 \pm 18	45 \pm 5	54 \pm 11	73 \pm 8	76 \pm 5
Metilparatión	96 \pm 7	83 \pm 14	69 \pm 5	70 \pm 5	87 \pm 6	84 \pm 4
Metilpirimifos	64 \pm 14	53 \pm 4	67 \pm 15	57 \pm 6	73 \pm 17	62 \pm 6
Malatión	96 \pm 13	95 \pm 18	94 \pm 12	91 \pm 17	104 \pm 14	98 \pm 18
Fentión	76 \pm 17	68 \pm 11	68 \pm 16	66 \pm 16	75 \pm 17	72 \pm 16
Clorpirifos	64 \pm 11	57 \pm 5	61 \pm 10	55 \pm 4	55 \pm 9	52 \pm 5
Metidatión	77 \pm 4	72 \pm 6	65 \pm 3	61 \pm 5	79 \pm 4	73 \pm 6
Metilazinfos	70 \pm 7	66 \pm 3	60 \pm 8	60 \pm 4	77 \pm 8	67 \pm 7

S/P : sin protector de analito; C/P: con protector de analito.

4.8. EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL CONTENIDO DE DICLOROMETANO EN EL EXTRACTANTE SOBRE LA EFICIENCIA DE LA EXTRACCIÓN

Dado que las recuperaciones finales obtenidas para los plaguicidas más hidrofóbicos como Fentión, Clorpirifos, Metilazinfos y Metilpirimifos son bajas en relación al resto de los plaguicidas, se determinó evaluar el efecto del contenido de diclorometano (DCM) en el solvente de extracción (Raoux y col., 1997) por lo que se compararon los porcentajes de recuperación de los nueve plaguicidas y la cantidad de aceite co-extraído con y sin limpieza SPE en extracciones realizadas con diferentes mezclas de AcN:DCM como solvente extractante. En la Tabla 26 y Figura 9 se presentan los porcentajes de recuperación obtenidos. Podemos observar un incremento en la recuperación al utilizar como solvente de extracción una solución de 90:10 (AcN:DCM) de los compuestos de carácter más hidrofóbico como lo son el Metilpirimifos, Fentión, Clorpirifos y Metilazinfos, obteniéndose recuperaciones iguales o mayores a 73%. Sin embargo, al aumentar el porcentaje de DCM en el solvente de extracción se observa una disminución en la recuperación de los plaguicidas. Además en la Tabla 27 y Figura 10, se presentan los valores de mg de aceite co-extraído por g de aceite, donde podemos observar la cantidad de aceite co-extraído que aumenta exponencialmente con la cantidad de DCM en el solvente de elución, además vemos que si bien la limpieza mediante la columna ENVI-Carb disminuye el contenido de aceite co-extraído en la muestra final, su eficiencia es menor a mayores porcentajes de DCM en el solvente de extracción. Por los valores obtenidos en las recuperación de los nueve plaguicidas (73-100 % \pm 5-9%) la composición óptima del solvente de extracción fue de 90:10 (AcN:DCM).

Tabla 26 Porcentajes de Recuperación utilizando diferentes solventes de extracción

Plaguicida	100:0 (ACN:DCM)	90:10 (ACN:DCM)	80:20 (ACN:DCM)	70:30 (ACN:DCM)
Dimetoato	99 ± 8	97 ± 9	100 ± 5	86 ± 4
Diazinón	80 ± 8	83 ± 7	66 ± 3	54 ± 5
Metilparatión	95 ± 8	91 ± 7	85 ± 10	84 ± 10
Metilpirimifos	70 ± 6	80 ± 7	80 ± 6	79 ± 5
Malatión	96 ± 9	90 ± 7	90 ± 10	85 ± 5
Fentión	65 ± 4	73 ± 6	68 ± 4	65 ± 5
Clorpirifos	62 ± 5	75 ± 5	62 ± 5	60 ± 9
Metidatión	81 ± 6	80 ± 7	71 ± 4	62 ± 4
Metilazinfos	76 ± 5	88 ± 5	78 ± 5	66 ± 6

Figura 9 Gráfico de recuperaciones con diferentes solventes de extracción

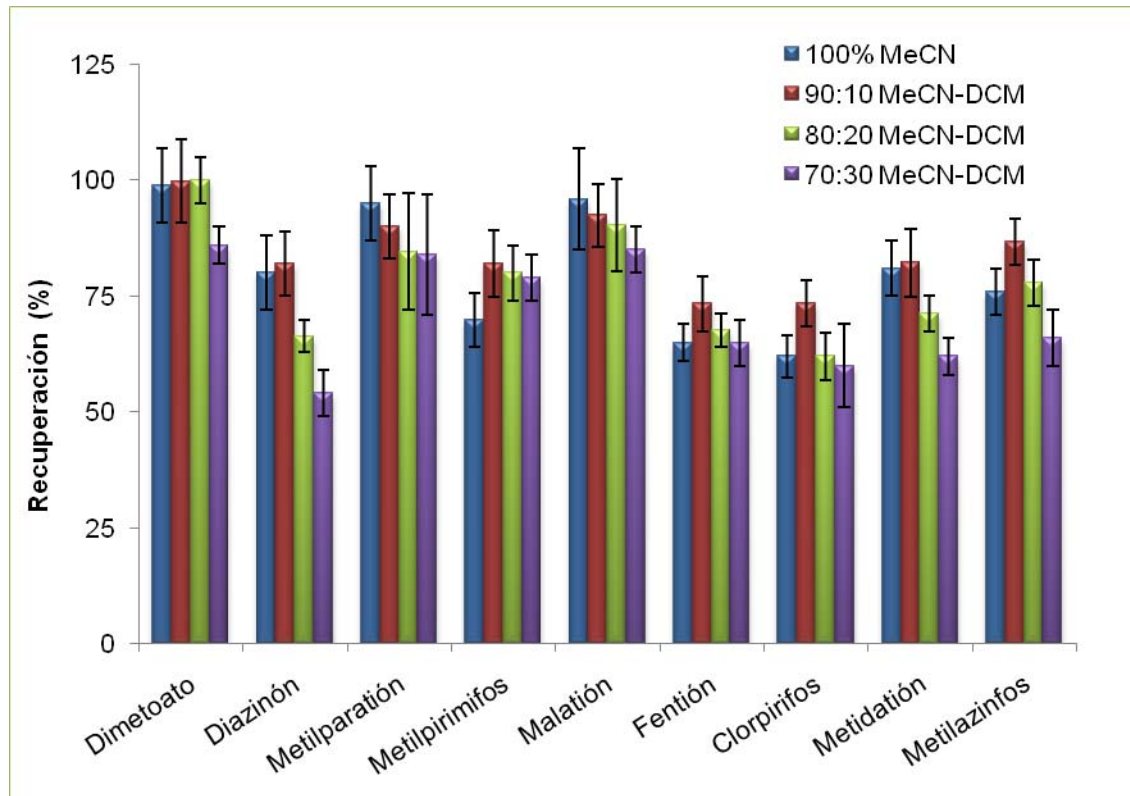
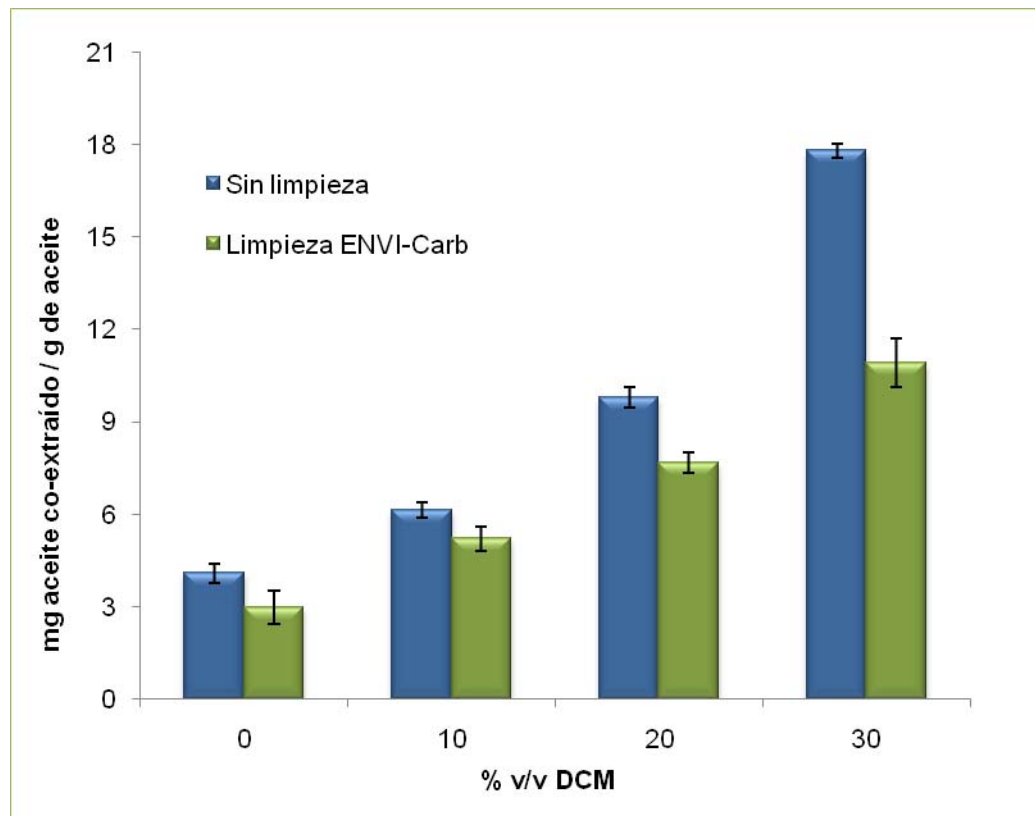


Tabla 27 Cantidad de Aceite co-extraído método optimizado

Extractante ACN:DCM	Aceite co-extraído S/L SPE (mg/g)	Aceite co-extraído C/L SPE (mg/g)
100:0	4,4 ± 0,3	2,97 ± 0,55
90:10	6,1 ± 0,25	5,21 ± 0,4
80:20	9,8 ± 0,33	7,66 ± 0,33
70:30	17,8 ± 0,22	10,92 ± 0,78

S/L: sin limpieza; C/L: con limpieza.

Figura 10 Evaluación limpieza columna SPE

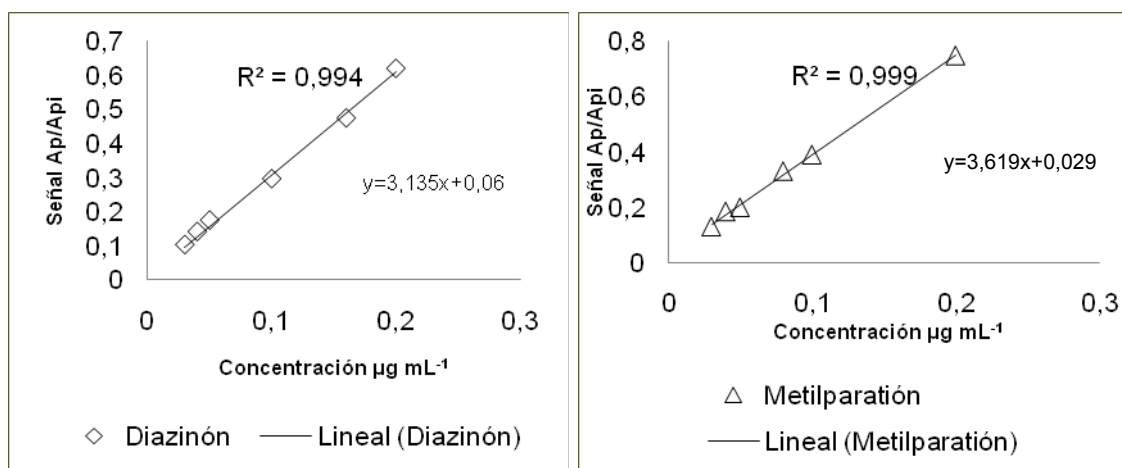


4.9. CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS DEL MÉTODO

4.9.1. CURVA DE CALIBRACIÓN

La linealidad fue estudiada en el intervalo $0,03 - 0,2 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($0,012 - 0,08 \mu\text{g g}^{-1}$) para Diazinón, Metilparatión, Metilpirimifos, Fentión y Clorpirifos; y entre $0,06 - 0,4 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($0,06 - 0,04 \mu\text{g g}^{-1}$) para Dimetoato, Malatión, Metidatión y Metilazinfos, utilizando patrones preparados en extracto de aceite extravirgen orgánico obtenidos luego del proceso de extracción y limpieza. Los gráficos de calibración fueron construidos a través de una regresión de mínimos cuadrados de concentración ($\mu\text{g mL}^{-1}$) versus la razón de área del peak del patrón con respecto al patrón interno (Ap/Api) de los estándares de calibración (Figura 11 y 12).

Figura 11 Curva Calibrado $0,03-0,2 \mu\text{g mL}^{-1}$



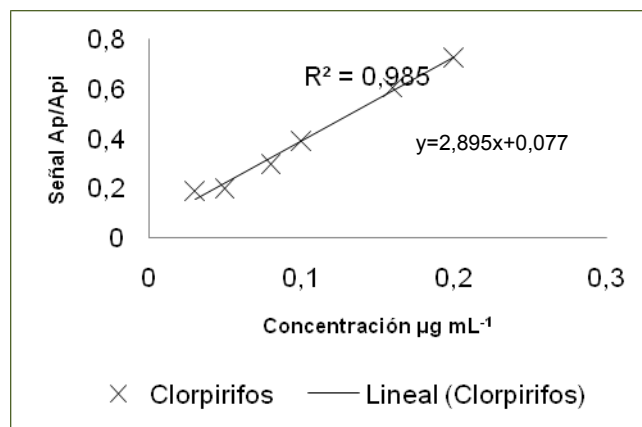
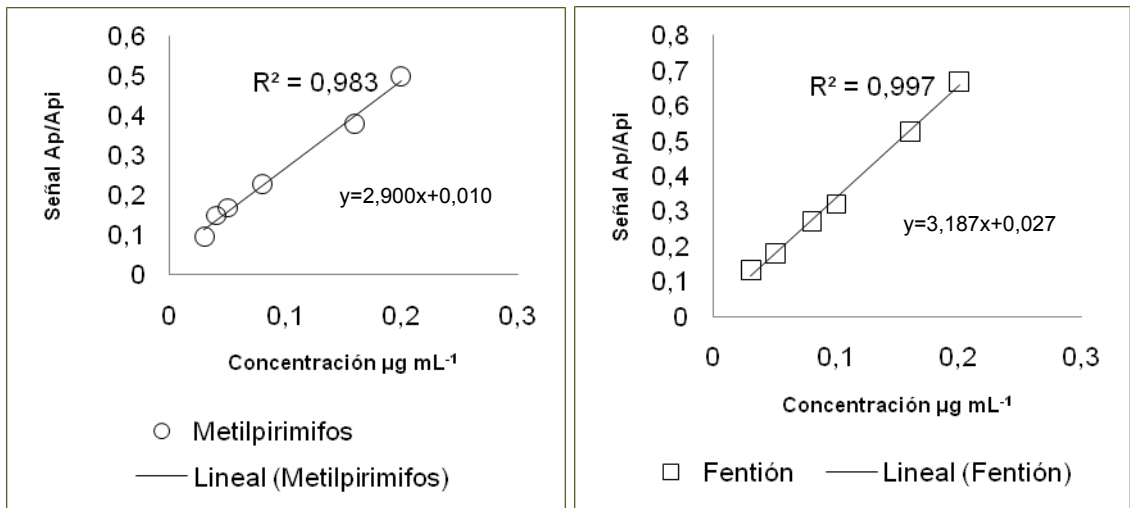
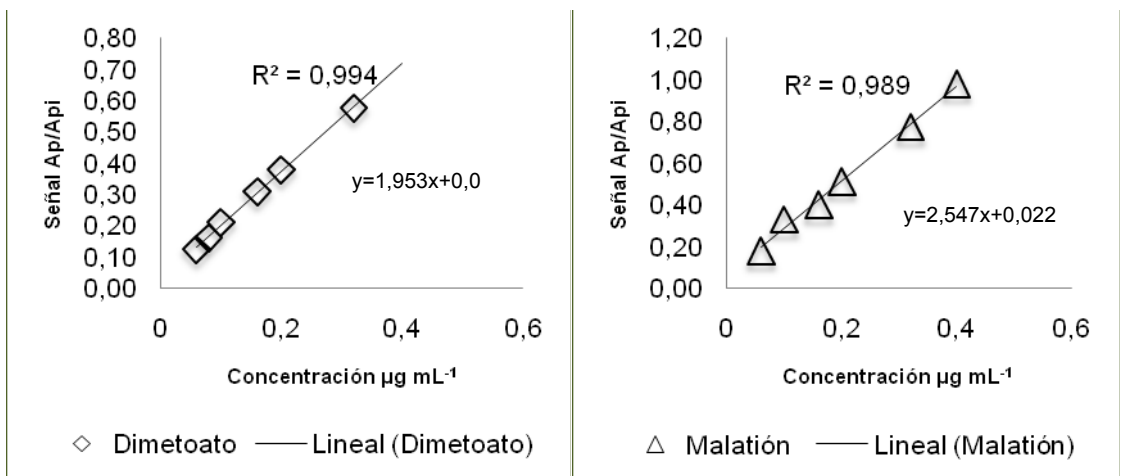
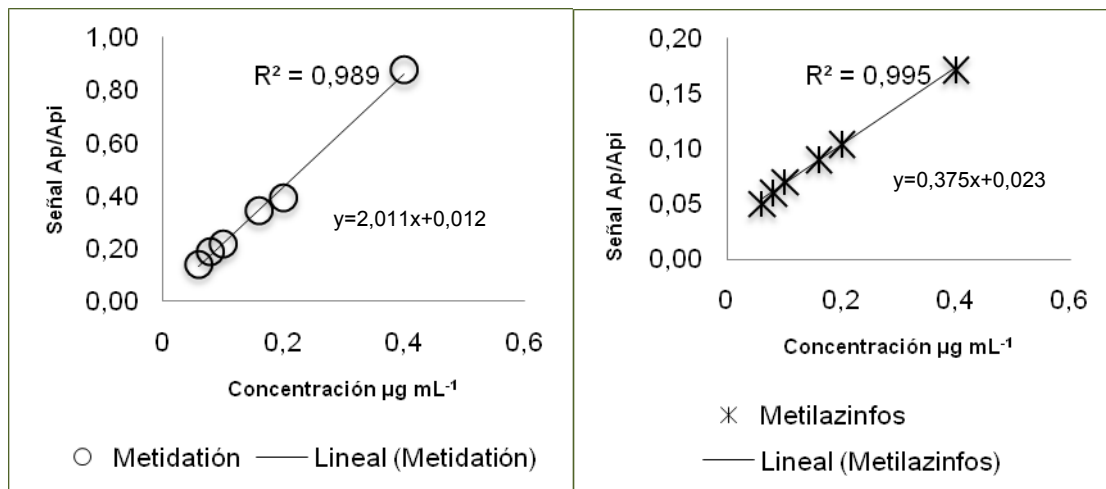


Figura 12 Curva de Calibrado 0,06-0,4 $\mu\text{g mL}^{-1}$





Los parámetros de calidad analítica se resumen en la Tabla 28. La respuesta de todos los compuestos fue lineal en el intervalo estudiado con valores de correlación entre 0,983 – 0,999, además la linealidad se corrobora por que la desviación estándar relativa de la pendiente (s_b/b ; donde s_b es la desviación estándar de la pendiente y b es la pendiente) tiene valores iguales o inferiores al 10%. La sensibilidad analítica ($s_{y/x}/b$; donde $s_{y/x}$ es la desviación estándar de la regresión) que indica las mínimas diferencias de concentración detectadas por el método tiene valor entre 0,001 y 0,002 $\mu\text{g g}^{-1}$. Los límites de cuantificación del método (mLOQ) están comprendidos entre valores entre 0,007 y 0,020 $\mu\text{g g}^{-1}$. Se evaluó además el límite de cuantificación a partir de la regresión (rLOQ) en una curva de seis puntos mediante la siguiente expresión:

$$LOQ = 10 \left(\frac{S_{y/x}}{b} \right) \times \left[\frac{(n-2)}{(n-1)} \right]^{1/2}$$

Donde n es el número de puntos de la curva.

La precisión del método se expresó mediante los valores de la desviación estándar relativa obtenidos en una serie de mediciones (RSD, $n=5$) de un aceite fortificado con 0,05 $\mu\text{g g}^{-1}$ de cada compuesto, los valores fueron iguales o inferiores a 10,5%.

Tabla 28 Parámetros de Calidad Analítica del método

Compuesto	Intervalo de concentración ($\mu\text{g g}^{-1}$)	R	b	S_b / b (%)	S_{vix} / b ($\mu\text{g g}^{-1}$)	mLOQ ($\mu\text{g g}^{-1}$)	rLOQ ($\mu\text{g g}^{-1}$)	RSD (%)
Dimetoato	0.024-0.16	0.994	1,953	5.1	0.001	0.013	0.010	10,5
Diazinón	0.012-0.08	0.994	3,153	5.6	0.001	0.007	0.006	6,9
Metilparatión	0.012-0.08	0.999	3,619	2.1	0.001	0.009	0.003	7,0
Metilpirimifos	0.012-0.08	0.983	2,900	10.0	0.001	0.015	0.010	7,3
Malatión	0.024-0.16	0.989	2,547	7.4	0.002	0.012	0.014	6,7
Fentión	0.012-0.08	0.991	3,187	7.9	0.001	0.013	0.007	9,8
Clorpirifos	0.012-0.08	0.985	2,895	10.0	0.001	0.013	0.007	7,5
Metidatión	0.024-0.16	0.989	2,011	6.8	0.002	0.010	0.014	7.3
Metilazinfos	0.024-0.16	0.995	0,375	5.6	0.001	0.020	0.010	6,1

4.9.2. EVALUACIÓN DE LA RECUPERACIÓN

Las recuperaciones de los nueve plaguicidas obtenidas desde muestras a distintos niveles de contaminación ($0,03 \mu\text{g g}^{-1}$, $0,06 \mu\text{g g}^{-1}$ y $0,12 \mu\text{g g}^{-1}$) se presentan en la Tabla 29. Estas van desde un 60% (Fentión y Clorpirifos) a un 104% para Dimetoato. Los valores de desviación estándar de las mediciones son menores a un 10%. Los menores porcentajes de recuperación fueron los obtenidos para Fentión y Clorpirifos en las concentraciones de $0,06$ y $0,12 \mu\text{g g}^{-1}$. Esto podría deberse a que a mayores concentraciones hay una pérdida en la eficiencia de la extracción para estos compuestos (más hidrofóbicos) por parte del solvente de extracción.

Tabla 29 Recuperaciones a distintos niveles de contaminación

Compuesto	0,03 $\mu\text{g g}^{-1}$	0,06 $\mu\text{g g}^{-1}$	0,12 $\mu\text{g g}^{-1}$
Dimetoato	95 \pm 2	95 \pm 8	104 \pm 5
Diazinón	70 \pm 1	85 \pm 8	99 \pm 2
Metilparatión	93 \pm 10	83 \pm 8	81 \pm 2
Metilpirimifos	76 \pm 2	77 \pm 7	94 \pm 3
Malatión	100 \pm 10	85 \pm 8	85 \pm 4
Fentión	73 \pm 7	64 \pm 5	60 \pm 4
Clorpirifos	77 \pm 2	64 \pm 5	60 \pm 2
Metidatión	80 \pm 3	81 \pm 7	82 \pm 2
Metilazinfos	93 \pm 7	95 \pm 9	84 \pm 6

4.10. APLICACIÓN A MUESTRAS REALES

El método desarrollado fue aplicado a nueve aceites de oliva extravirgen y a dos aceites de palta que se comercializan en Chile. En la Tabla 30 se presentan los resultados obtenidos. Además en la Tabla 31 como parámetro de calidad de los aceites se indica el porcentaje de acidez, K270 e índice de peróxidos, los cuales se encuentran dentro de los parámetros establecidos como máximo para aceite de oliva extravirgen (Olive Oil, D.Boskou.,2006). De los nueve aceites de oliva extravirgen analizados, siete presentaron residuos de pesticidas. De estos, tres contenían residuos de Diazinón en 0,046; 0,110 y 0,143 $\mu\text{g g}^{-1}$. Residuos de Clorpirifos fueron detectados en cuatro muestras en concentraciones de 0,014; 0,021 y 0,177 $\mu\text{g g}^{-1}$. Residuos de Metilazinfos fueron detectados en una de las muestras en una concentración de 0,028 $\mu\text{g g}^{-1}$ y residuos de Metidatión fueron encontrados en una muestra a 0,010 $\mu\text{g g}^{-1}$. Sin embargo, los Límites Máximos de Residuos en aceite de Oliva virgen establecidos por la Unión Europea (Alimentarius Pesticide Residues in Food-Maximum Residues Limits.,1996) de los nueve plaguicidas estudiados sólo están determinados para Dimetoato, Metilpirimifos, Fentión y Metidatión, siendo la cantidad detectada de Metidatión menor a este límite. Para el caso de Diazinón, Metilparatión, Malatión,

Clorpirifos y Metilazinfos no se encuentra registrado en la legislación Europea un Límite Máximo de residuos que pueda contener el aceite de Oliva virgen, sólo se encuentra el Límite Máximo de Residuos descrito de Aceitunas para Aceite (Pesticide residues MRLs.,UE 2008) y según este límite los residuos detectados de Clorpirifos, Metidatió n y Metilazinfos están bajo el máximo, sin embargo el residuo de Diazinón se encuentra sobre el máximo permitido a aceitunas para elaboración de aceite.

Tabla 30 Parámetros de Calidad aceites

Muestra	Acidez (% ac. Oleico)	K270 (% λ)	Indice peróxidos (mq/kg)
Aceite oliva:			
Mestre	0,16	0,12	11,00
Casta (Terra Mater)	0,64	0,09	16,00
Kardamili	0,17	0,09	11,50
Sol Aculeo	0,15	0,10	5,60
Chilensis	0,31	0,07	8,75
Petralia (Terra Mater)	-	-	-
Monte Cristo	0,21	0,11	3,70
La Crianza	0,19	0,12	4,04
1492	-	-	-
Aceite palta:			
Razeto	0,33	0,07	7,82
Lamay	0,44	0,07	7,69
Límite máx permitido ^a	0,8	0,33	20

a: Olive oil: Chemistry and technology, American Oil Chemists Society Press.,2006

Tabla 31 Análisis de Muestras Reales

Plaguicida	Mestre	Casta	Kardamili	Petralia	Monte Cristo	La crianza	1492	MRL ^a Aceite de Oliva Virgen	MRL ^b Aceitunas para Aceite
Dimetoato								1	2
Diazinón		0,046	0,110	0,143				nr	0,01
Metilparatión								nr	0,02
Metilpirimifos								5	0,05
Malatión								nr	0,02
Fentión								1	1
Clorpirifos	0,177		0,021		0,014	0,021		nr	0,05
Metidatión							0,010	1	1
Metilazinfos		0,028						nr	0,05

Valores expresados en $\mu\text{g g}^{-1}$; ^a Codex Alimentarius Commission, Codex Alimentarius Pesticide Residues in Food – Maximum Residues Limits, 2nd ed.; FHO/WHO: Rome, Italy, 1996; Vol.2B. ^b MRL_s Regulación (EC) nº396 Unión Europea.,2005.

nr: no reportado.

5. Conclusiones

- El método cromatográfico GC-FPD desarrollado permite una óptima separación e identificación de los nueve plaguicidas estudiados, lográndose límites de detección instrumentales comprendidos entre $0,002 - 0,028 \mu\text{g mL}^{-1}$ en un tiempo de 31.6 min.
- Mediante un diseño exploratorio multivariado (Plackett-Burman) se obtuvieron los factores experimentales que tiene efecto sobre la eficiencia de extracción, optimizándose estos factores mediante un diseño Doehlert y el uso de una función de conveniencia conjunta de los nueve plaguicidas y el aceite co-extraído (*D*), la cual nos entregó las condiciones óptimas de extracción, en las que obtenemos un máximo de recuperación de cada compuesto y una mínima cantidad de aceite co-extraído.
- En el proceso de extracción de los plaguicidas desde aceite, también se extraen componentes de la matriz como lípidos, pigmentos y otros compuestos de alto peso molecular los que generan el conocido “efecto de señal inducido por matriz”, aumentando la respuesta cromatográfica de los plaguicidas. A través de la optimización de la etapa de limpieza, mediante la utilización de columnas para extracción en fase sólida, ENVI-Carb, fue posible disminuir el contenido de matriz co-extraída de la muestra.
- La utilización de protectores de analito para neutralizar el efecto inducido por la matriz no mostró mayor beneficio sobre la utilización de un patrón de calibrado libre de residuos (aceite orgánico) obtenido bajo las mismas condiciones de extracción y limpieza.
- El uso de una mezcla de acetonitrilo-diclorometano como solución extractante, permitió incrementar la eficiencia de la extracción asistida por microondas para

los plaguicidas de carácter más hidrofóbico como lo son Metilpirimifos, Fentión, Clorpirifos y Metilazinfos.

- El estudio de los parámetros de calidad analítica del método nos entregó un límite de cuantificación (mLOQ) de los nueve compuestos en un rango de 0,007-0,020 $\mu\text{g g}^{-1}$, con una sensibilidad analítica entre 0,001-0,002 $\mu\text{g g}^{-1}$.
- El método de extracción asistida por microondas con posterior extracción en fase sólida y medición mediante GC-FPD es un método simple, selectivo y sensible que permite la determinación de residuos de plaguicidas organofosforados en aceite de oliva y palta.
- En la aplicación del método a muestras de aceite de oliva y palta comercializado en Chile, se detectó la presencia de Diazinón, Clorpirifos, Metidatión y metilazinfos en seis muestras de aceite de oliva en concentraciones menores a las que permite Límite Máximo de Residuos de la Unión Europea.

6. Bibliografía

1. Amvrazl G. Elpiniki and Albanis A. Triantafyllos. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.54: 9642-9651, 2006
2. Ashraf-Khorassani, M. y Taylor, L.. *J. Agric. Food Chem*, 44: 3540-3547, 1996.
3. Asociación gremial de productores y comercializadores de aceite de palta de Chile, <http://www.avocadooilchile.cl/>.
4. Barrek, S., Paise, O. y Grenier-Loustalot, M. F. (2003). *Anal. Bional. Chem.* 376: 355.
5. Boskou D. in D. Boskou (Ed), *Olive Oil: Chemistry and Technology*, American Oil Chemists Society Press, 2nd ed.,2006.
6. Cabras P., A. Angioni, V.L Garau, M. Melis, F.M.Pirisi, M. Karim, E. V. Minewlli, *J. Agric Food Chem.* 45 (1997) 2244
7. Centro de información y recursos naturales CIREN <http://www.ciren.cl/>.
8. Chin-Shih Fong , Ruey-Meei Wu, Jia-Ching Shieh ,Ya-Ting Chao ,Yi-Ping Fu ,Chiz-Liang Kuao ,Chun-Wen Cheng. *Clinica Chimica Acta* 378: 136–141, 2007.
9. Codex Alimentarius Commission, *Codex Alimentarius Pesticide Residues in Food-Maximum Residues Limits*, Vol.2B, FHO/WHO, Rome, 2nd ed.,1996.
10. Colin F. Poole, *Journal of Chromatography A* 1158 (2007), 241-250.
11. Costa Ferreira S, Roy Edward Bruns y col., *Journal of Chromatography A*, 1158 (2007) 2-14.
12. Diario Oficial de la Unión Europea. Reglamento (CE) N° 1989/2003 de la Comisión de 6 de noviembre de 2003 que modifica el Reglamento (CEE) n° 2568/91, relativo a las características de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva y sobre sus métodos de análisis.
13. Diaz Plaza E.M, J.M. Cortés, A. Vázquez, J. Villén, *J. Chromatogr. A* 912 (2001) 297

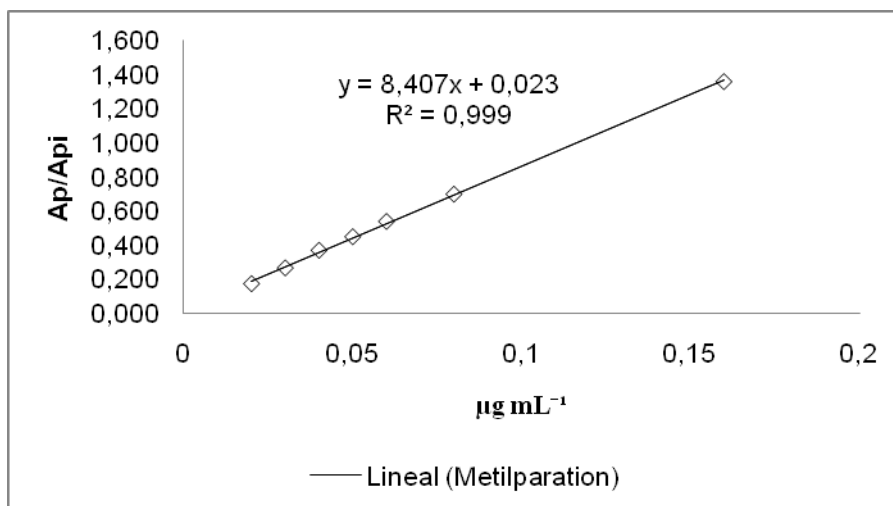
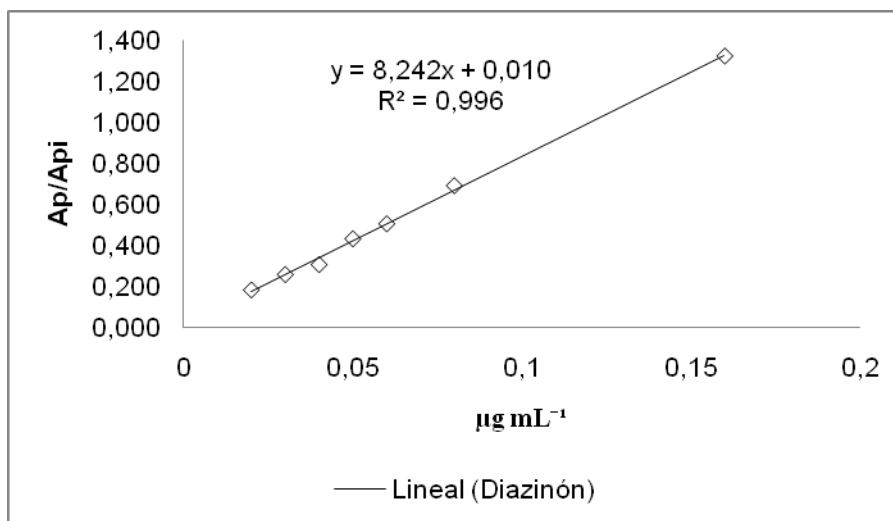
14. Dugo G., Di Bella G., La Torre L., Saitta M. *Food Control* 16: 435-438, 2005.
15. Ferrer C., M. Jose Gómez, F. García Reyes, I. Ferrer, E.M. Thurman, A.R. Fernández Alba J. *Chromatogr. A* 1069 (2005) 183
16. Garcés García M., E.M. Brun, R. Puchades, A. Maquieira, *Anal. Chim. Acta* 556(2006) 347.
17. García Reyes J.F, C. Ferrer, M.J. Gomez Ramos, A. Molina Diaz, A.R. Fernandez Alba, *Trends Anal. Chem* 26 (2007) 239
18. Garrido Frenich A., J.L. Fernandez Moreno, J.L. Martinez Vidal, F.J. Arrebola Liébanas, *J. Agric. Food Chem.* 55 (2007) 8346
19. Guardia Rubio M., M.L Fernandez De Cordoba, M.J. Ayora Cañada, A. Ruiz Medina, *J. Chromatogr. A* 1108 (2006) 231
20. INTERNATIONAL OLIVE OIL COUNCIL, Production Nov.2007 [en línea] <http://www.internationaloliveoil.org/downloads/production1_ang.PDF>
21. Kirchner M., Húsková R., Matisová E., Mocák J., *Journal of Chromatography* (2007)
22. Lentza Rizos Ch., E.J. Avramides, E. Visi, *J. Chromatogr. A* 912(2001) 297
23. Lentza Rizos Ch., E.J. Avramides, F. Cherasco, *J.Chromatogr. A* 912 (2001) 135
24. Mastrantonio Guido, Hans-Georg Mack , Della Védova Carlos Omar. *J Mol Model.*14:813–821, 2008.
25. Michael C. R. Alavanja, Mustafa Dosemeci, Claudine Samanic, Jay Lubin, Charles F.Lynch, Charles Knott, Joseph Barker, Jane A. Hoppin, Dale P. Sandler, Joseph Coble, Kent Thomas, and Aaron Blair. *American Journal of Epidemiology* 160:876–885, 2004.
26. Oficina de Estudios y Políticas Agrarias (ODEPA), información del Servicio Nacional de Aduanas.
27. Olivera Koprivnjak, Dubravka Škevin, Srečko Valic, Valerija Majetic, Sandra Petricevic, Ivica Ljubenkov. *Food Chemistry*, 111: 121–126, 2008.
28. Patel K., R.J. Fussell, M. Hetmanski, D.M. Goodall, B.J. Keely, *J.Chromatogr. A* 1068 (2005) 289.
29. Raoux R., J.L Coustille, S. Rambaud, *Oleagineaux, Corps Gras, Lipides* 4 (1997) 71.

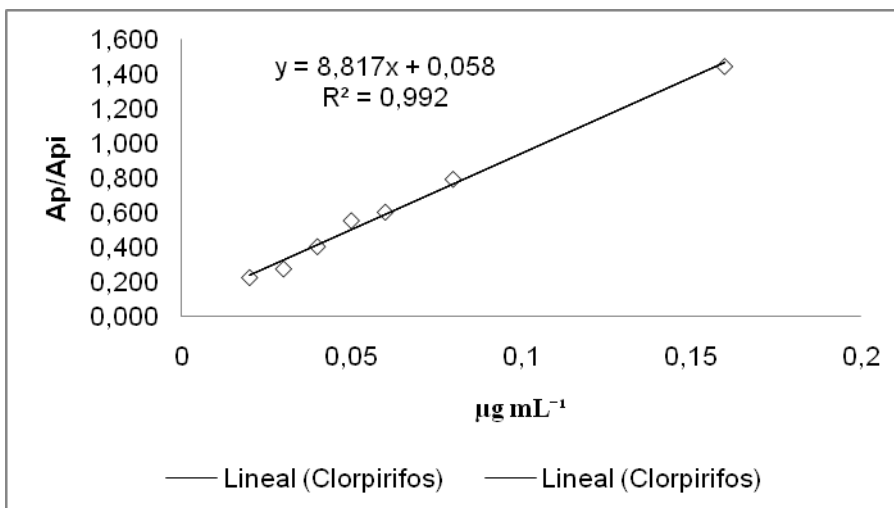
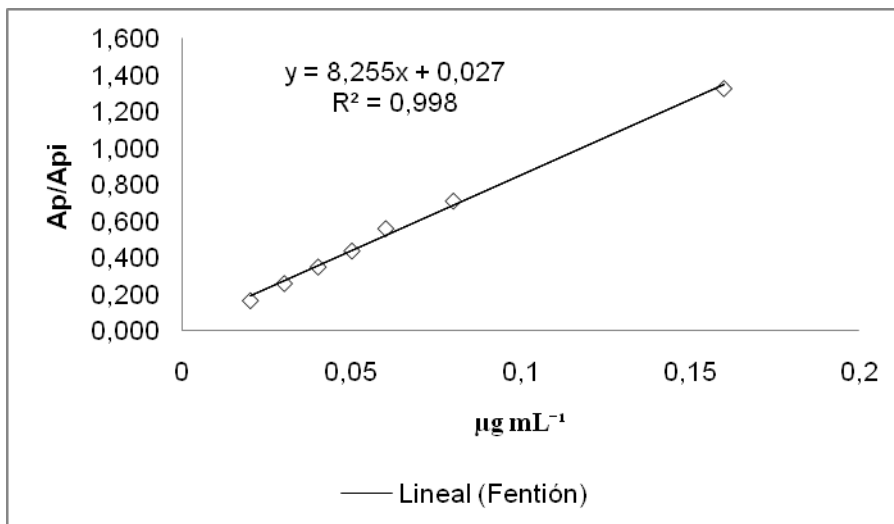
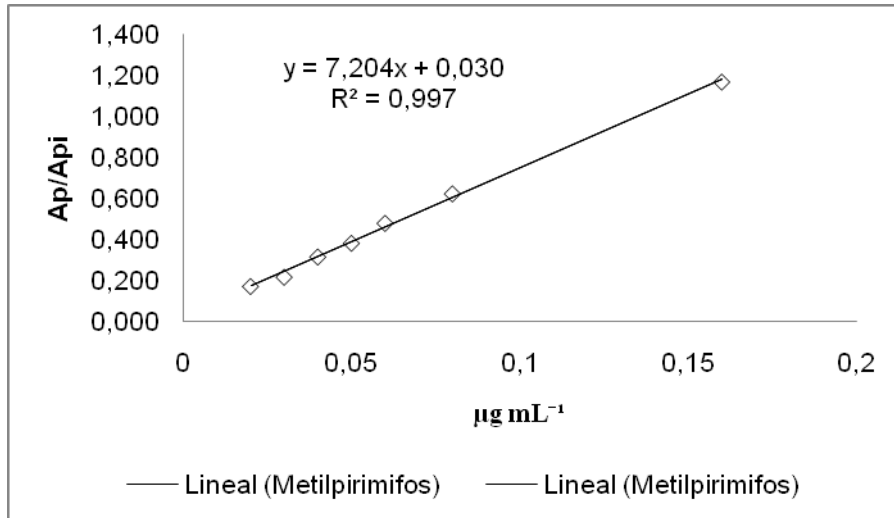
30. Rastrelli L., K. Totaro, F. De Simeone, *Food Chem*, 79 (2002) 303.
31. Sheridan R. S. y Meola J. R. (1999) *J. Chromatogr. A*, 730: 177.
32. Tsatsakis A.M, I. N. Tsakiris, M.N. Tzatzarakis, Z.B. Agourakis, M. Tutudaki, A.K Alegakis, *Food Addit. Contam.* 20 (2003) 553.
33. Tsoutsi C., I. Konstantinou, D. Hela, T. Albanis, *Anal. Chim. Acta* 573-574 (2006) 216.
34. Voorhees Kent, Gharaibeh Ahmad, Murugaverl B. *J. Agric. Food Chem.* 46: 2353-2359, 1998.
35. Walter Fiddler, John W. Pensabene, Robert A. Gates, Dan J. Donoghue. *J. Agric. Food Chem.* 47: 206-211, 1999.
36. Yagüe C., S. Bayarri, P. Conchello, R. Lázaro, C. Pérez-Arquillué, A. Herrera, A. Ariño, *J. Agric. Food Chem.* 53 (2005) 5105.
37. Zhiqiang Zhou L.L, C. Pan, C. Qian, S. Jiang, F. Liu, *Chromatographia* 66 (2007), 625.

Anexo 1

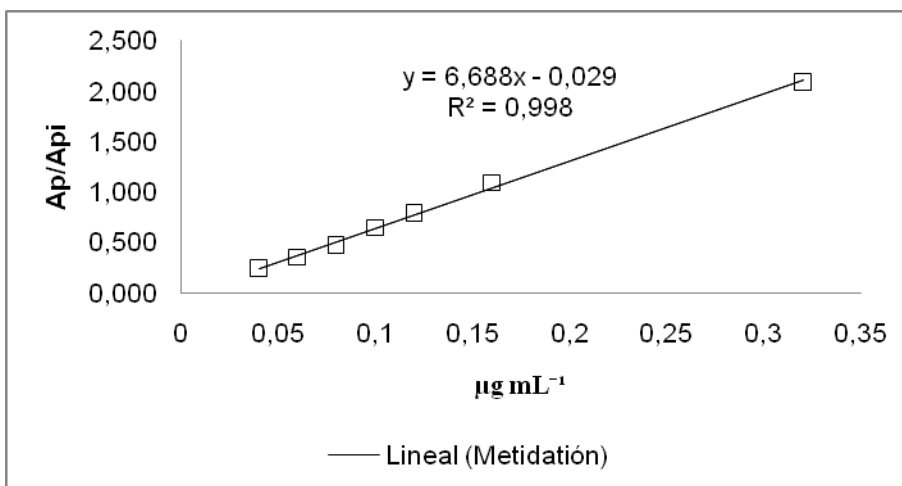
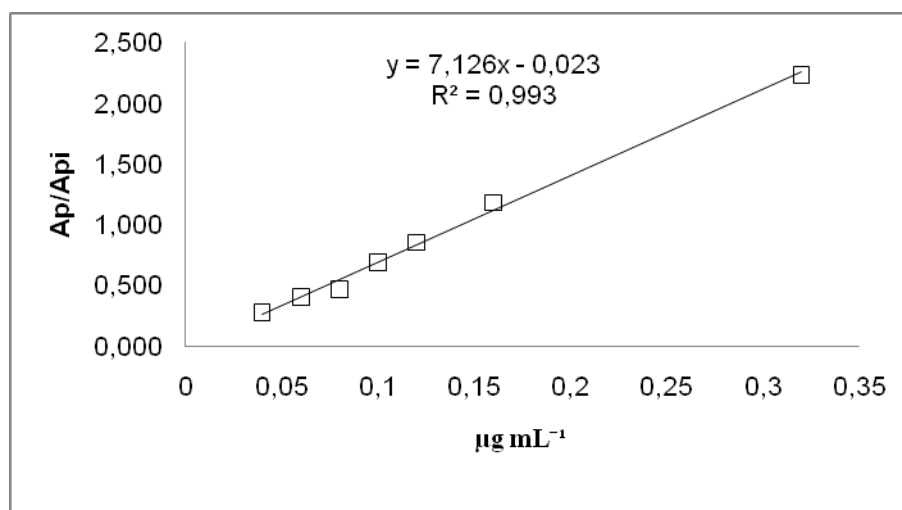
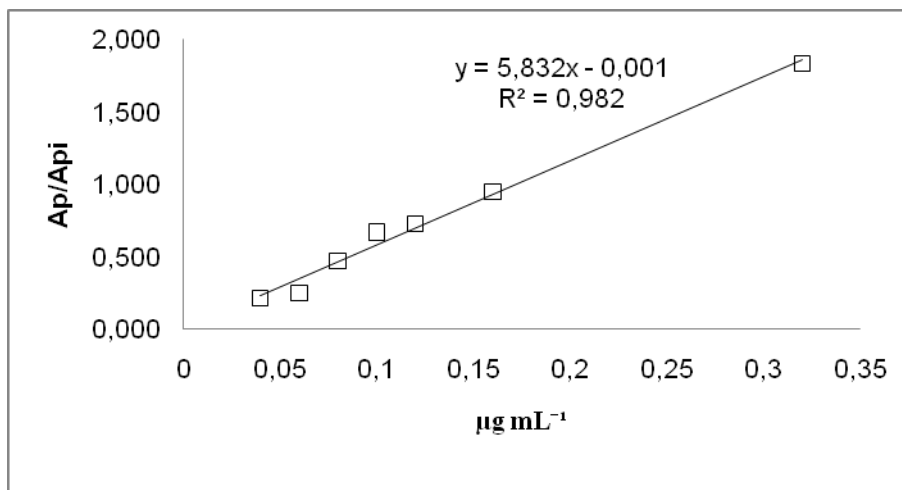
Determinación parámetros de calidad analítica instrumental.

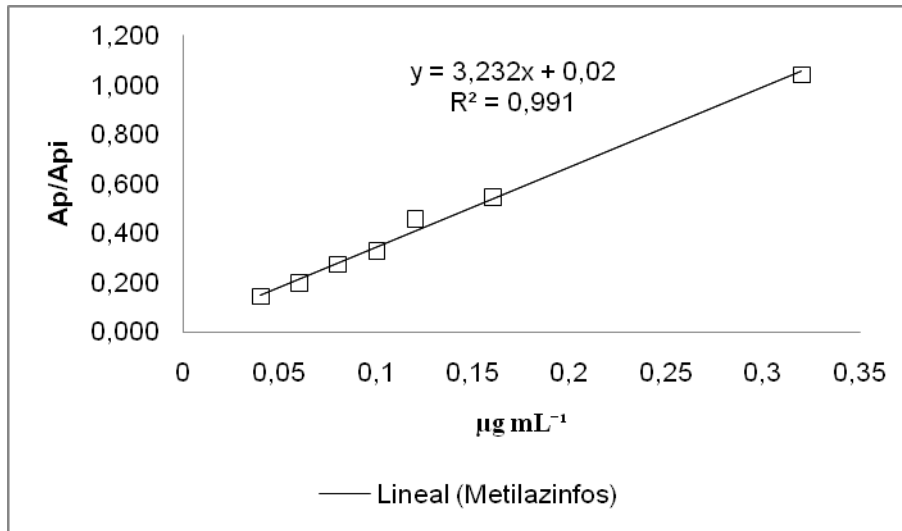
Curva calibrado hexano 0,02-0,16 $\mu\text{g mL}^{-1}$



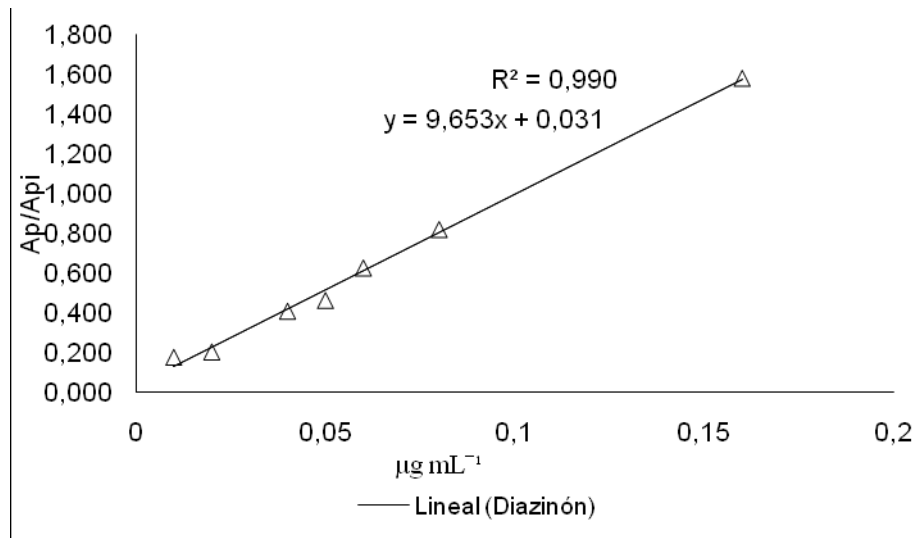


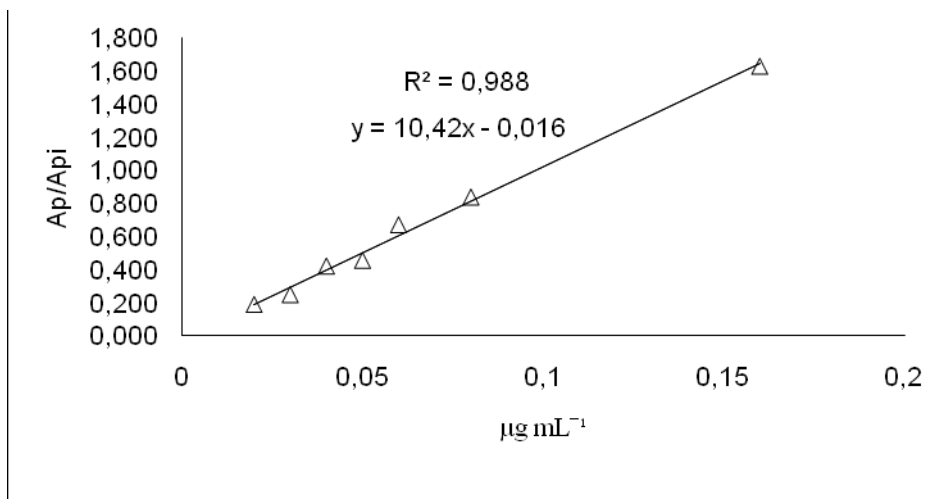
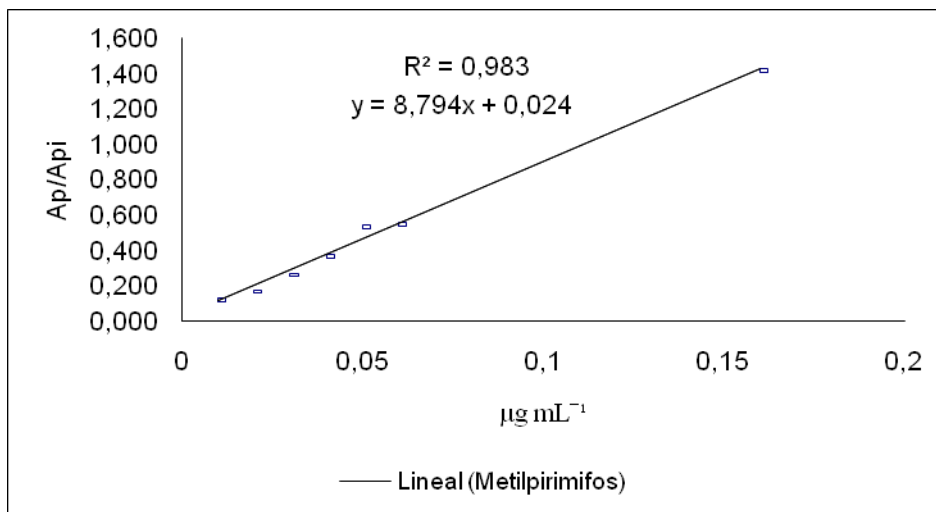
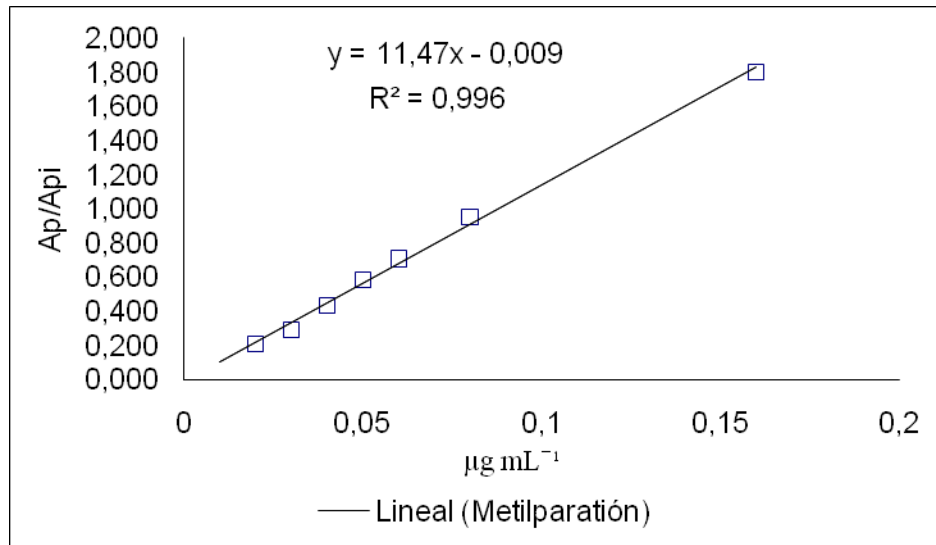
Curva calibrado hexano 0,04-0,32 $\mu\text{g mL}^{-1}$

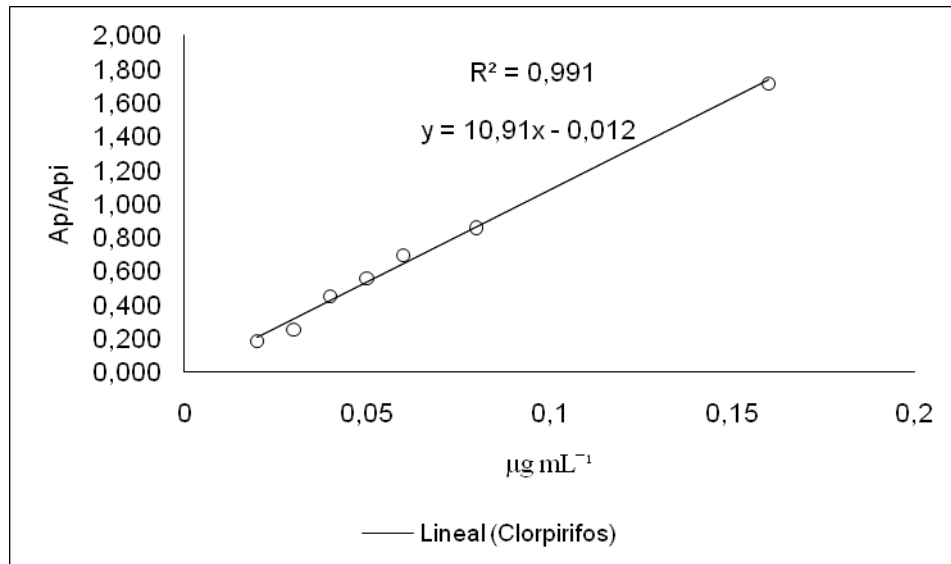




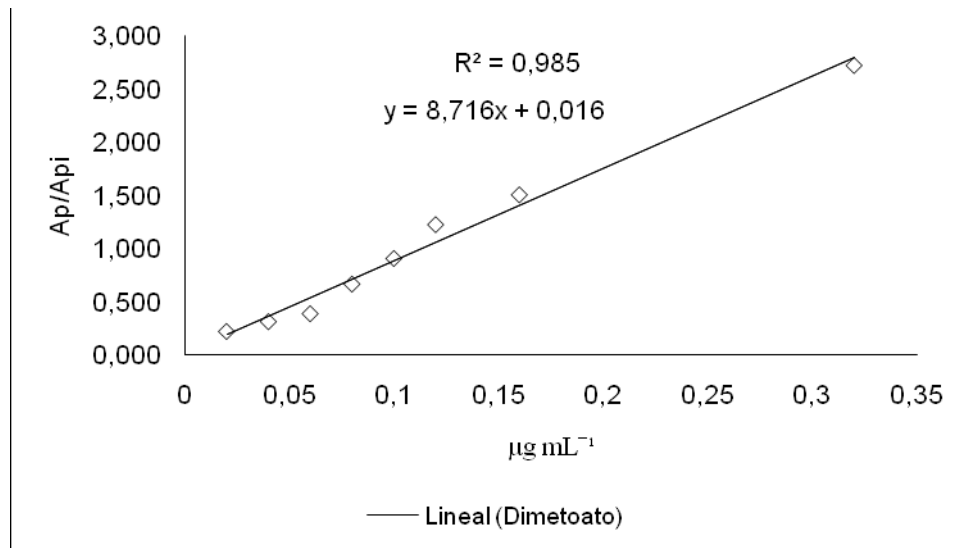
Curva Calibrado aceite-hexano 0,3% v/v 0,02-0,16 $\mu\text{g mL}^{-1}$

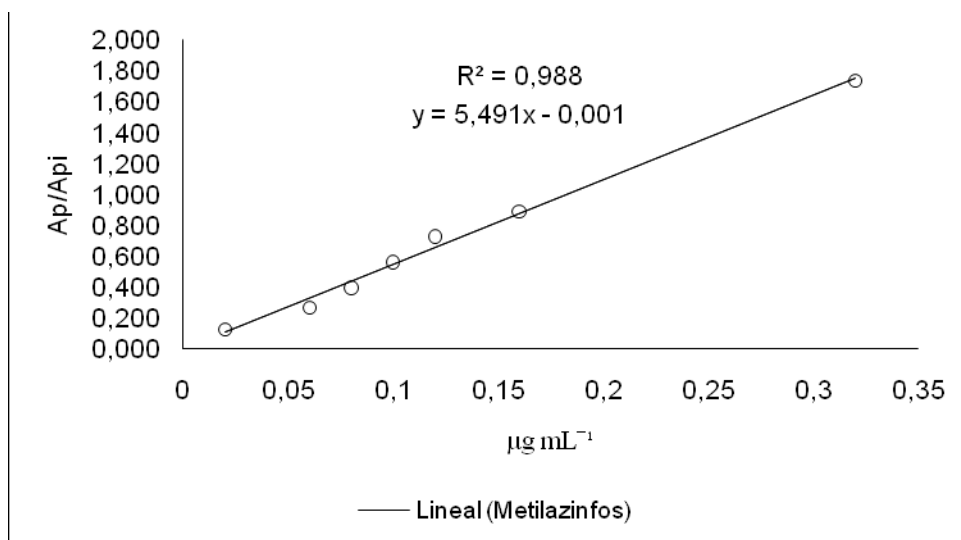
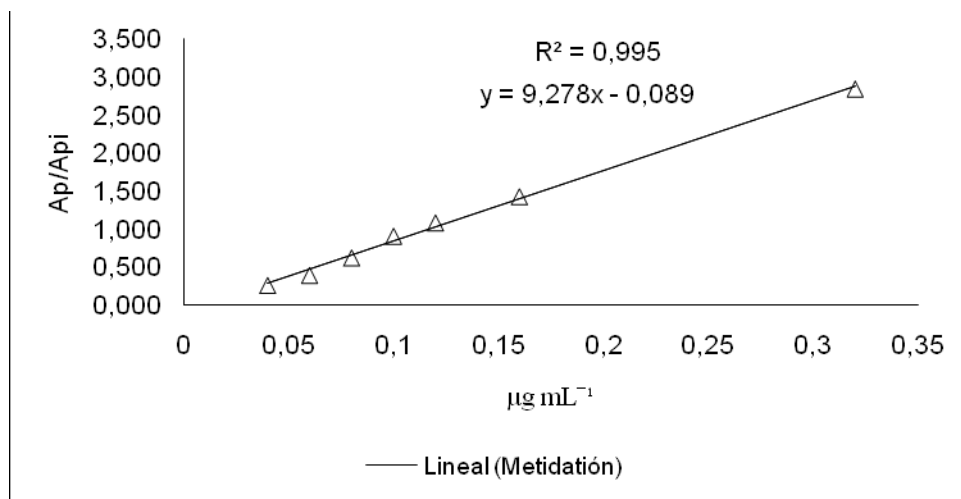
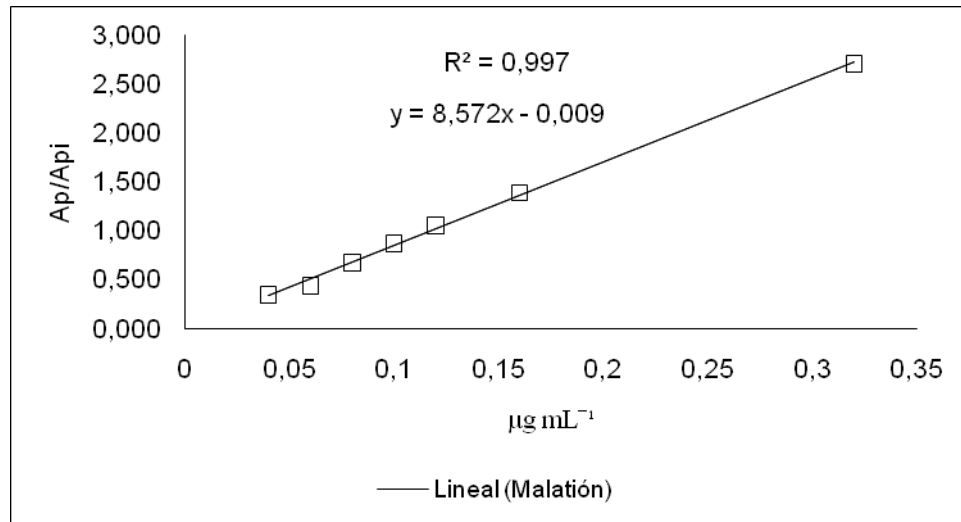






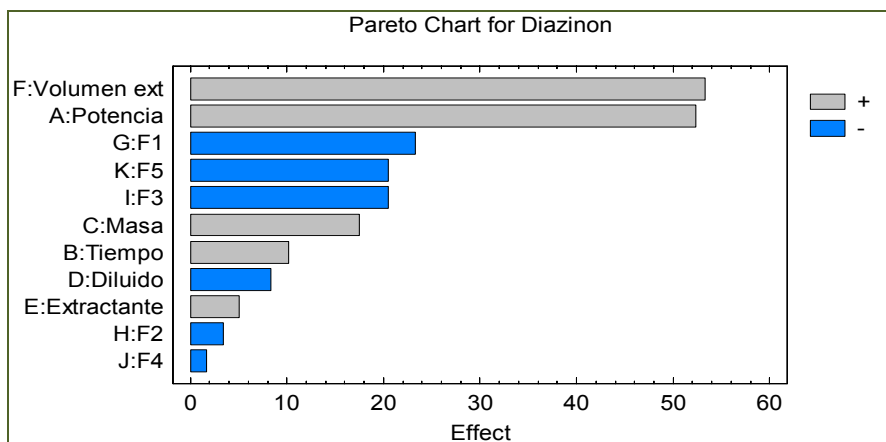
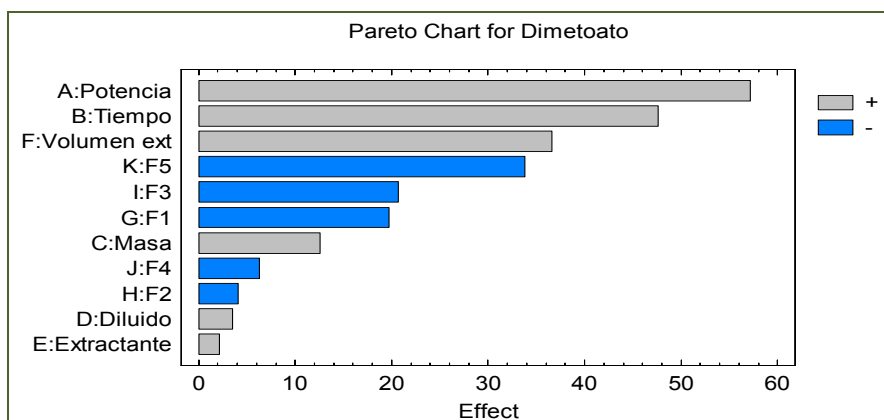
Curva Calibrado aceite-hexano 0,3% v/v 0,04-0,32 $\mu\text{g mL}^{-1}$

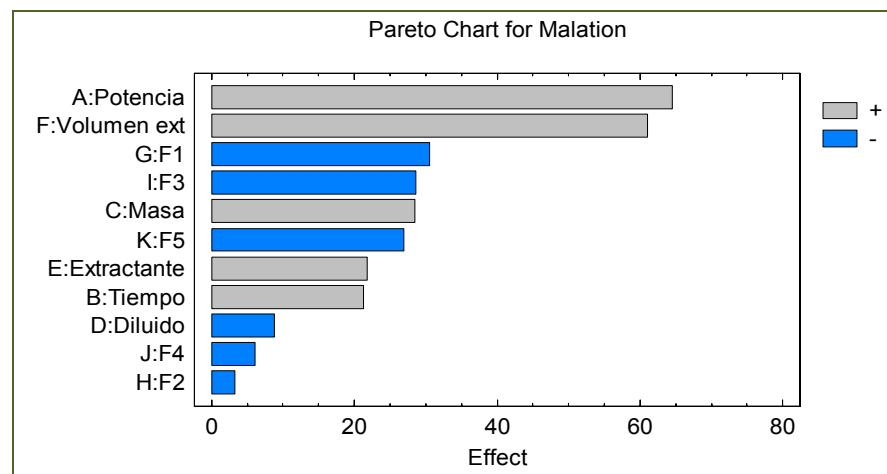
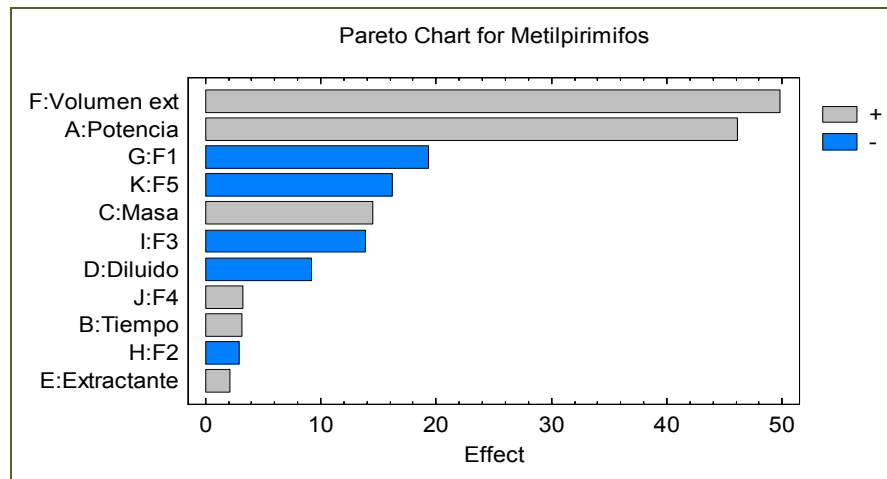
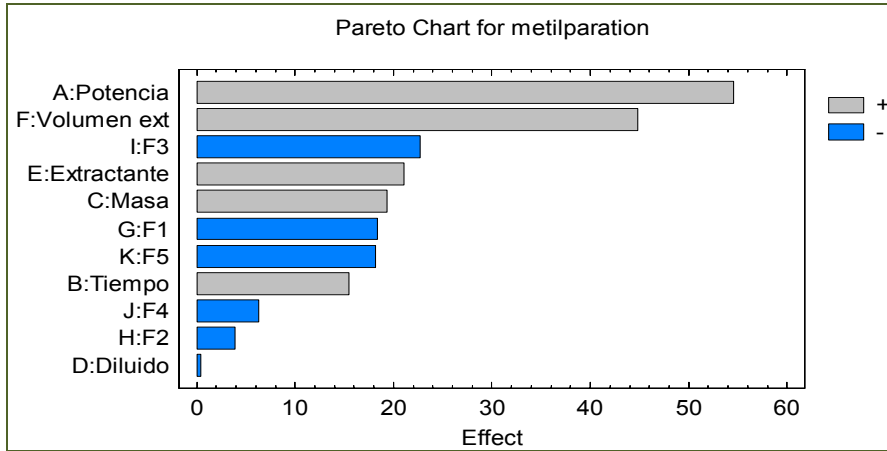


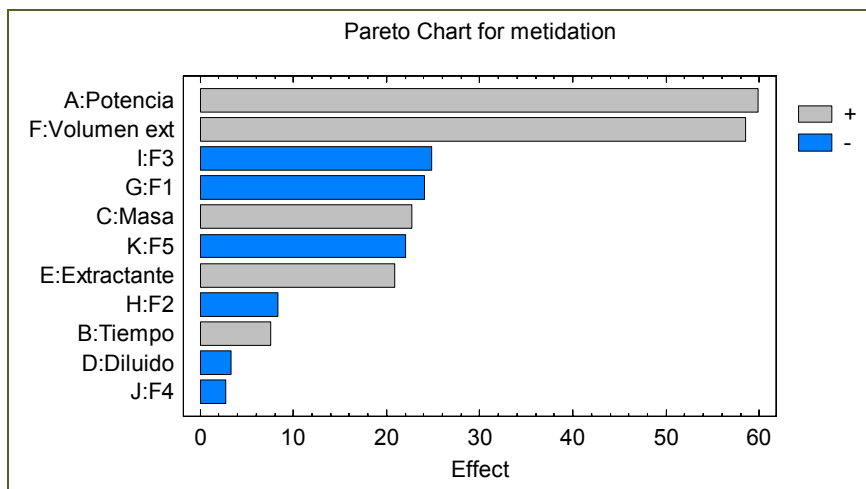
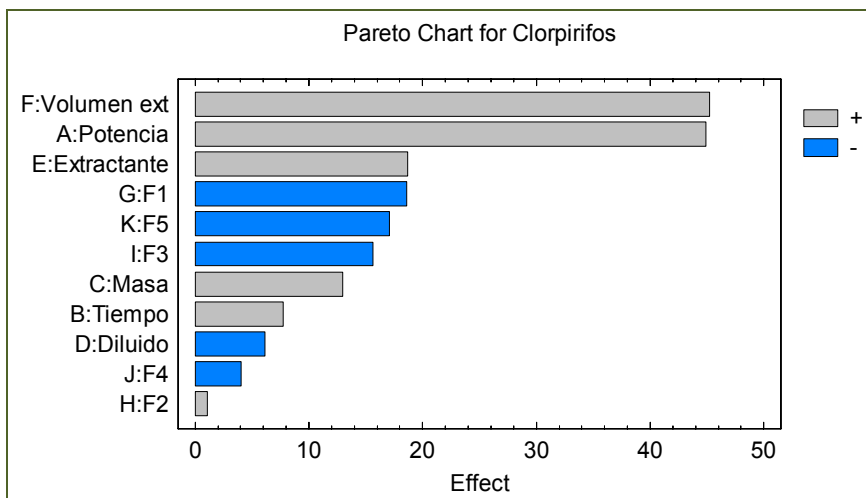
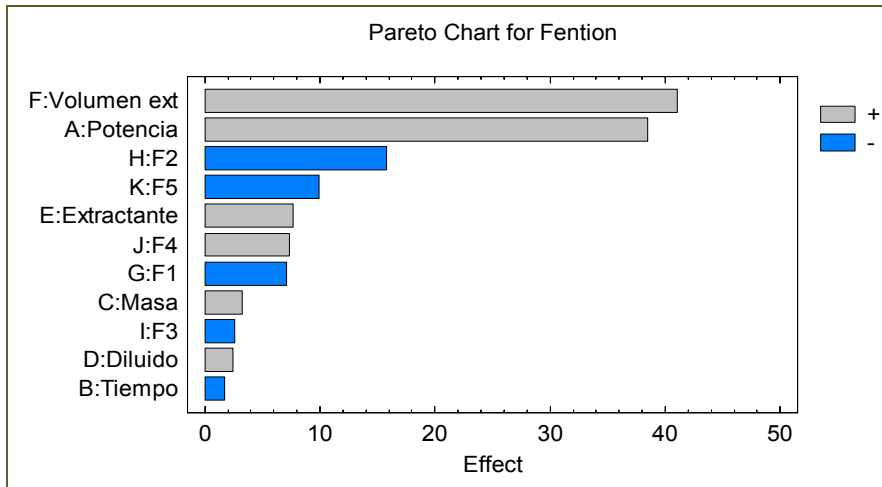


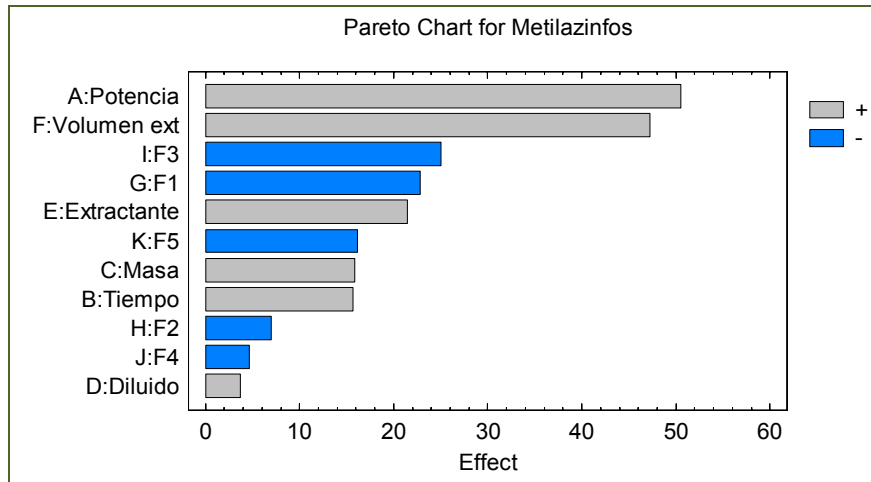
Anexo 2

Diagramas de Pareto Screening Diseño Plackett-Burman etapa de extracción asistida por microondas.









Anexo 3

La función de deseabilidad $d(y)$ permite transformar el valor (y) de una respuesta dada en una escala de 0 a 1, $d(y) = 1$ representa el valor ideal de la respuesta y corresponde a una deseabilidad parcial. La deseabilidad total (D), se obtiene a través de el promedio geométrico de las deseabilidades parciales $d(y)$.

$$D = (d_1(Y_1) \times d_2(Y_2) \times \dots \times d_k(Y_k))^{\frac{1}{k}}$$

Donde

$d_k(Y_k)$: Función de deseabilidad para una respuesta

k : es el número de respuestas

La función $d(y)$ puede tomar diferentes formas dependiendo si la respuesta se maximizará, minimizará o se buscará un valor objetivo.

Si se busca maximizar la respuesta, la función de deseabilidad unilateral estará definida por la siguiente expresión

$$d = \begin{cases} 0 & \text{Si } \hat{y} < y^{\text{mín}} \\ \left(\frac{\hat{y} - y^{\text{mín}}}{y^{\text{máx}} - y^{\text{mín}}} \right)^s & \text{Si } y^{\text{mín}} \leq \hat{y} \leq y^{\text{máx}} \\ 1 & \text{Si } \hat{y} > y^{\text{máx}} \end{cases}$$

Donde

\hat{y} : Es el valor previsto de la respuesta variable.

$y^{mín}$: Es el valor del límite inferior de la respuesta.

$y^{máx}$: Es el valor del límite superior de la respuesta.

Si deseamos minimizar la respuesta se define la función de deseabilidad unilateral como,

$$d = \begin{cases} 1 & \text{Si } \hat{y} < y^{mín} \\ \left(\frac{\hat{y} - y^{máx}}{y^{mín} - y^{máx}} \right)^s & \text{Si } y^{mín} \leq \hat{y} \leq y^{máx} \\ 0 & \text{Si } \hat{y} > y^{máx} \end{cases}$$

Si tenemos como objetivo un valor específico la función bilateral se expresa,

$$d = \begin{cases} 0 & \text{Si } \hat{y} < y^{mín} \\ \left(\frac{\hat{y} - y^{mín}}{y^{target} - y^{mín}} \right)^s & \text{Si } y^{mín} \leq \hat{y} \leq y^{target} \\ \left(\frac{\hat{y} - y^{máx}}{y^{target} - y^{máx}} \right)^t & \text{Si } y^{target} \leq \hat{y} \leq y^{máx} \\ 0 & \text{Si } \hat{y} > y^{máx} \end{cases}$$

y^{target} : valor objetivo que se desea alcanzar.

Los exponentes s y t se determinan de acuerdo a la importancia del valor de la respuesta y su cercanía con el valor deseado. En la función de deseabilidad total

(combinación de respuestas), pueden existir respuestas consideradas más importantes que otras por lo que se define un coeficiente de impacto I_j para cada respuesta donde

$$1 \leq I_j \leq 5$$

El valor más alto de I_j indica la importancia mayor de la respuesta. La función de deseabilidad total basada en el coeficiente de impacto será:

$$D = \left\{ d_1^{I_1} d_2^{I_2} \dots d_m^{I_m} \right\}^{1/\left(\sum_{j=1}^m I_j \right)}$$

Presentaciones a congresos y publicación.

1. Factibilidad de la extracción asistida por microondas para determinar plaguicidas organofosforados en aceite de oliva.

XXVII Jornadas Chilenas de Química, Termas de Chillan 20 – 23 Noviembre 2007.

2. Determinación de plaguicidas organofosforados en aceite de oliva y palta mediante extracción asistida por microondas y cromatografía de gases.

IX Jornadas de Investigación en Ciencia y Tecnología, FCQyF Universidad de Chile, 22 Abril 2008.

3. Alternativas para determinar plaguicidas organofosforados en aceite de oliva y palta. Evaluación de la extracción asistida por microondas asociada con purificación mediante reparto sólido – líquido.

XXVIII Congreso Latinoamericano de Química, San Juan, Puerto Rico, 27 Julio – 1 Agosto 2008.

4. Suitability of microwave – assisted extraction coupled with solid – phase extraction for organophosphorus pesticide determination in olive oil.

Edwar Fuentes, María E. Baez, Adalí Quiñones. Journal of Chromatography A, 2008 (en prensa).

