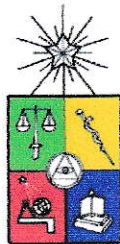


UCH-FC  
Q. Ambiental  
R 457  
C.1

**Desarrollo de un método de extracción de plaguicidas  
hidrofóbicos desde suelos agrícolas con la asistencia de  
microondas**



**Seminario de Título**

**Entregado a la**

**Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile**

**En cumplimiento parcial de los requisitos**

**Para optar al Título de**

**QUIMICO AMBIENTAL**

**Dana Valeska Reyes Mellado**

**Directores Memoria: Dra. María E. Báez  
Dr. Edwar Fuentes**

**Profesor Patrocinante: M. Cs. Sylvia Copaja**

**2005**

UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS

**INFORME DE APROBACIÓN  
MEMORIA DE TÍTULO**

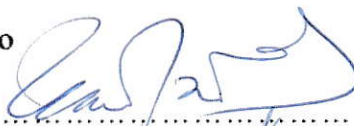
Se informa a la escuela de Pre-grado de la facultad de Ciencias, Universidad de Chile que el Seminario de Título presentado por el alumno.

**DANA VALESKA REYES MELLADO**

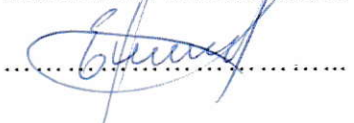
Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la Memoria de Título como requisito para optar al Título de Químico Ambiental.

Directores de la Memoria de Título

Dra. María E. Báez

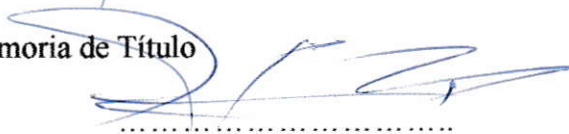


Dr. Edwar Fuentes



Comisión de Evaluación de la Memoria de Título

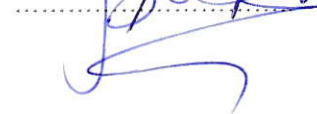
Dr. Edwar Cornwell



M. Cs. Sylvia Copaja



Dr. Hans Stum



*Dedicado a las dos mujeres que más  
me han entregado en esta vida...  
y a quienes amo muchísimo...  
mi mamá y mi hija...*

*Alicia y Antonia.*

## **AGRADECIMIENTOS**

Al finalizar esta etapa de mi vida...quiero agradecer a todos aquellos que de alguna forma han contribuido al cumplimiento de ella...

En primera instancia a mi familia, la cual ha sido parte fundamental en mi formación, en especial a mis Padres Alicia y Renato quienes se han esforzado siempre por darme todo lo necesario para seguir adelante... por su cariño y apoyo incondicional... Gracias.

También quiero agradecer a mis directores de memoria, la profesora Maruja y Edwar quienes además de contribuir con sus conocimientos al desarrollo de este trabajo, me han entregado afecto, confianza y apoyo.

Además agradezco a todo el equipo académico de la Facultad de Ciencias quienes a través de estos largos años me han entregado las herramientas necesarias para concluir con éxito esta etapa, en forma especial a la profesora Sylvia Copaja quien ha estado presente continuamente en la última parte de ella.

Y finalmente agradecer a mi compañero, amigo, amante y futuro esposo Antonio... por todo su apoyo, comprensión y amor entregado en este camino que hemos emprendido juntos...

**Gracias de corazón...**



Este seminario de título fue realizado en la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile y financiado en gran parte por el proyecto Facultad CEPEDEQ (2003-2005) de la misma facultad denominado “Desarrollo de metodologías analíticas para la determinación de residuos de plaguicidas y sus principales productos de degradación en suelos alofánicos y no alofánicos chilenos . Uso de esquemas de optimización multivariada en el estudio del efecto de factores ambientales y parámetros instrumentales en la eficiencia de los métodos de extracción”. Y el proyecto DI (2005-2006) titulado “Desarrollo de metodologías analíticas simples y eficientes para la determinación de residuos de plaguicidas apolares en suelos agrícolas chilenos basadas en extracción asistida por microondas y detección por cromatografía de gases”.

Parte de los resultados de este trabajo se presentó en VI Jornadas de Investigación en Ciencia y tecnología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile en marzo del año en curso y próximamente será publicado en la revista Anal. Chem.

## INDICE DE CONTENIDO

CONTENIDO	PÁGINA
I. Introducción	1
Hipótesis.	8
II. Objetivos	9
2.1Objetivos Generales.	9
2.2Objetivos Específicos.	9
III. Materiales y Métodos	10
3.1 Materiales.	10
3.2 Equipo menor.	10
3.3 Equipo mayor.	11
3.4 Reactivos.	12
3.5 Disoluciones.	13
3.5.1 Disoluciones estándar de clorpirifos, triadimefon, trifluralin, malation, paration y metolaclor.	13
3.5.2 Disoluciones acuosas de cada pesticida para contaminar suelos.	13
3.6 Suelos utilizados.	14
3.6.1 Tratamiento de suelos.	14
3.7 Métodos.	14
3.7.1 Determinación de humedad de los suelos.	14
3.7.2 Determinación de la textura de los suelos.	15

3.7.3 Evaluación del método HPLC-DAD en la determinación de los plaguicidas para el cálculo de los parámetros de las isothermas de adsorción.	15
3.7.4 Determinación intervalo de concentraciones de trabajo en medio acuoso para cada plaguicida.	16
3.7.5 Isothermas de adsorción.	17
3.7.6 Evaluación del método CG-ECD/FPD en la determinación de los plaguicidas.	18
3.7.6.1 Pruebas de separación clorpirifos, paration y malation en cromatografía gaseosa con detector fotométrico de llama.	18
3.7.6.2 Condiciones finales para CG-ECD/FPD	19
3.7.6.3 Determinación de los parámetros de calidad analítica del método en cromatografía de gases.	19
3.7.6.4 Estudio de estabilidad y reparto de los plaguicidas en el proceso de extracción en microondas.	20
3.7.7 Estudio del efecto de los factores relacionados con el método sobre la eficiencia de extracción.	21
3.7.8 Estudio del efecto de factores relacionados con la muestra sobre la eficiencia de la extracción.	24
3.7.9 Metodología de superficie de respuesta. Optimización del método de extracción.	27
3.7.10 Optimización múltiple.	30
3.7.11 Aplicación del método de extracción bajo condiciones óptimas.	30
IV. Resultados y Discusión	32
4.1 Determinación de humedad del suelo.	32
4.2 Características químico-físicas y de textura del suelo.	32
4.3 Evaluación de un método cromatográfico que permita la detección de los plaguicidas en medio acuoso mediante HPLC-DAD.	33

4.4 Evaluación del intervalo de trabajo de concentraciones en medio acuoso para cada plaguicida.	35
4.5 Isotermas de adsorción.	37
4.6 Pruebas de separación clorpirifos, paration y malation en cromatografía gaseosa con detector fotométrico de llama.	41
4.7 Determinación de los parámetros de calidad analítica del método en cromatografía de gases.	42
4.8 Estudio de la estabilidad y reparto de los plaguicidas en el proceso de extracción en microondas.	44
4.9 Estudio del efecto de los factores relacionados con el método sobre la eficiencia de extracción.	45
4.10 Estudio del efecto de los factores relacionados con la muestra sobre la eficiencia de extracción.	51
4.11 Metodología de superficie de respuesta. Optimización del método de extracción.	57
4.12 Optimización múltiple.	66
4.12.1 Condición de Compromiso.	68
4.12.2 Aplicación del método de extracción propuesto.	70
V. CONCLUSIONES	73
VI. BIBLIOGRAFIA	76
VII. APENDICE	80

## INDICE DE TABLAS

TABLA	PÁGINA
1. Plaguicidas y sus propiedades.	6
2. Programas de temperatura probados en la separación de los compuestos.	17
3. Condiciones extracción microondas.	19
4. Factores y niveles del diseño experimental. "Screening factor".	21
5. Matriz del diseño experimental "Screening factor".	21
6. Factores y niveles del diseño experimental. Segundo screening.	23
7. Matriz del diseño experimental. Segundo screening.	24
8. Factores y niveles del diseño experimental. Superficie de respuesta.	26
9. Matriz del diseño experimental. Superficie de respuesta.	27
10. Porcentaje de humedad y factor de corrección.	31
11. Porcentajes de M.O, arena, limo y arcilla en los suelos.	31
12. Tiempos de retención y área de cada compuesto.	33
13. Valores de $K_f$ , $1/n$ , $r$ , $K_{OM}$ y Solubilidad para cada compuesto en suelo Quillota.	37
14. Tiempos de retención en los distintos programas utilizados.	40
15. LOD, LOQ y sensibilidad analítica para la determinación de los 5 compuestos por CG-ECD/FPD (intervalo de calibración 0,02-0,10 $\mu\text{g/mL}$ ).	42
16. Linealidad para la determinación de los 5 compuestos por CG-FPD/ECD (intervalo de calibración 0,02-0,25 $\mu\text{g/mL}$ ).	42



17. Estudio de estabilidad y reparto de los plaguicidas en el proceso de extracción en microondas. Porcentaje de recuperación en cada experiencia realizada.	43
18. Influencia del efecto de los factores sobre el método de extracción. Porcentajes de recuperación de cada compuesto.	44
19. Efectos de los factores y valor de probabilidad del análisis de varianza (ANOVA). “Screening factor”.	46
20. Estudio del efecto de los factores relacionados con la muestra sobre la eficiencia de extracción. Porcentajes de recuperación de cada compuesto.	50
21. Optimización del método de extracción. Porcentajes de recuperación de cada compuesto en suelo QLT.	57
22. Porcentajes de recuperación obtenidos bajo la condición de compromiso para los 5 compuestos en cada uno de los suelos en estudio.	68
23. Recuperación de los compuestos obtenidos bajo la condición de compromiso en el suelo Rancagua.	70

## INDICE DE FIGURAS

FIGURAS	PÁGINA
1. Estructuras químicas de los plaguicidas en estudio	7
2. Curvas de solubilidad clorpirifos y trifluralin	34
3. Curvas de solubilidad de triadimefon, metaloclor, malation y paration	35
4. Isoterma clorpirifos y trifluralin	38
5. Isoterma de triadimefon, metaloclor, malation y paration	38
6. Gráficos Estandarizados Pareto. A: Clorpirifos, B: Trifluralin, C: Triadimefon D: Metolaclor y E: Malation	49
7. Gráficos Estandarizado de Pareto obtenidos en el segundo screening para A: Trifluralin, B: Clorpirifos, C: Triadimefon, D: Malation y E: Metolaclor	53
8. Carta Pareto y Superficie de Respuesta de Trifluralin	59
9. Carta Pareto de Clorpirifos	60
10. Superficie de Respuesta de Clorpirifos	61
11. Carta Pareto y Superficie de Respuesta de Triadimefon	62
12. Carta Pareto y Superficie de Respuesta de Metolaclor	63
13. Superficies de Respuesta para la condición de compromiso de los cuatro plaguicidas, estimadas del diseño compuesto central y optimización múltiple. A: a tiempo extracción constante (5 min.), B: a temperatura extracción constante (100 °C) y C: a un porcentaje de acetonitrilo constante (% 50 v/v)	67



14. Cromatogramas obtenidos en GC-ECD para

(A) un patrón de  $0.1 \mu\text{g mL}^{-1}$  de los plaguicidas:

1. trifluralin, 2. PCNB (patrón interno  $0,05 \mu\text{g mL}^{-1}$ ),

3. metolaclor ( $0,4 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), 4. clorpirifos y 5. triadimefon.

(B) Extracto de suelo Rancagua contaminado con los mismos plaguicidas a  $0,1 \mu\text{g g}^{-1}$  ( $0,4 \mu\text{g g}^{-1}$  metolaclor).

(C) extracto de suelo Rancagua sin contaminar.

71

## RESUMEN

La extracción de contaminantes orgánicos desde matrices ambientales sólidas se ha realizado tradicionalmente mediante la extracción Soxhlet. En la actualidad se han desarrollado variadas metodologías de extracción instrumentales entre ellas la extracción asistida por microondas. En este trabajo se desarrolló un método de extracción de plaguicidas halogenados y fosforados desde suelos de uso agrícola, mediante un medio acuoso y el posterior reparto en un disolvente orgánico, con la asistencia de microondas. El método se basa en la desorción acelerada de compuestos de baja polaridad con un extractante compuesto por agua y acetonitrilo y el posterior reparto en n-hexano. Dado su amplio uso en nuestro país, se consideraron en este estudio los insecticidas clorpirifos, malation y paration, los herbicidas trifluralin y metolaclor y el fungicida triadimefon.

Con fines de interpretación de los resultados del método de extracción, se evaluó el comportamiento de adsorción de los diferentes compuestos sobre la matriz considerada a través de sus isothermas en un suelo "modelo" con un contenido medio de materia orgánica (3,4 %). Se estudió el efecto de los factores experimentales relacionados con la muestra sobre la eficiencia de extracción del método propuesto y se llevó a cabo su optimización mediante diseño experimental. Los factores experimentales estudiados fueron: temperatura y tiempo de extracción, adición de acetonitrilo en el medio acuoso que humecta el suelo. Por otro lado se evaluó el efecto que presentan el tipo de suelo, la masa de suelo y el tiempo de residencia de los compuestos.

Las muestras fueron contaminadas con los compuestos en estudio sometiéndolas a equilibrio en medio acuoso con el fin de simular la contaminación de un suelo en condiciones de campo. El procedimiento analítico completo propuesto consiste en tomar 1 g de suelo, humectarlo con 1 mL de extractante 1:1 de agua-acetonitrilo y utilizar 5 mL de n-hexano para el reparto de los compuestos. El programa de microondas aplicado fue de 2 min. en 250 W y 10 min. a 900 W, con 130°C como temperatura máxima. Posteriormente la fase orgánica se evaporó a sequedad y la muestra fue reconstituida en 1 mL de n-hexano. Una alícuota de 1  $\mu$ L de este extracto se analizó directamente por CG-ECD/FPD, obteniendo cromatogramas limpios, evitando así, procedimientos previos de limpieza.

A excepción de malation y trifluralin las recuperaciones de los compuestos en los suelos en estudio fueron superiores al 80 % con una desviación estándar relativa menor al 9 %. Los límites de detección estuvieron comprendidos entre 0,005 y 0,024  $\mu$ g g<sup>-1</sup>. El método de extracción desarrollado con la asistencia de microondas y el análisis por cromatografía de gases es adecuado para la desorción de los plaguicidas estudiados desde diferentes suelos agrícolas contaminados a nivel de residuos. El método propuesto es eficaz, rápido y limpio para determinar plaguicidas de baja polaridad a nivel de ng g<sup>-1</sup> en suelos.

## ABSTRACT

Traditionally the extraction of organic contaminant from environmental solid samples has been performed by Soxhlet extraction, attained official status in many countries. However, the newer extraction techniques developed for environmental analysis are largely instrumental. In this work, a microwave-assisted extraction through aqueous media and partitioning in n-hexane was developed for the determination of organochlorine and organophosphorus pesticides in agricultural soils. The proposed method is based in the accelerated desorption of low polarity compounds with water-acetonitrile and simultaneous partitioning in n-hexane. Due to its wide use in our country, the insecticides chlorpyrifos, malation and parathion, the herbicides trifluralin and metolachlor and the fungicide triadimefon were considered in this study.

In order to understand the results in the proposed extraction method, adsorption behaviour of pesticides in the studied matrix was evaluated through adsorption isotherms in a soil with medium organic content (3.4%). The experimental and sample related variables affecting the extraction of the target compound from soils were studied and optimized through experimental design. The experimental factor studied were temperature and time of extraction and the addition of acetonitrile to aqueous media used to soak the soil. On the other hand, it was evaluated the effect of type and mass of soil, and time of residence of compounds on the extraction efficiency. With the aim to reproduce as closely as possible the solute-soil sorption occurring in the environment, soils samples were contaminated through a batch equilibrium method with aqueous solution to secure a pesticide sorption process.



The complete analytical procedure proposed consisted of microwave-assisted extraction and partitioning of the pesticides from 1.0 g of soil with 1 mL of 1:1 water/acetonitrile mix and using 5 mL of hexane for trapping. The microwave oven program applied was 2 min at 250 W and 10 min at 900 W, with 130°C as the maximal temperature. The hexane layer was evaporated to dryness; the residue was redissolved and 1  $\mu$ L was directly analyzed by GC-ECD/FPD obtaining clear chromatograms without any additional clean-up step.

Except for malation and trifluralin, the recovery of the pesticides in different soil was higher than 80% and the RSD were below 9%. The limits of detection ranged 0.005 to 0.024  $\mu$ g g<sup>-1</sup>. The developed microwave-assisted extraction method and chromatographic analysis were satisfactory for desorption and quantification of studied pesticides in different agricultural soils contaminated at residue level. The proposed method is efficient and fast to determine hydrophobic pesticide at the ng g<sup>-1</sup> level in different kind of soil.

## I. INTRODUCCIÓN

En el transcurso de los últimos 150 años el hombre ha fabricado diversos compuestos químicos con el objeto de satisfacer las necesidades crecientes del desarrollo tecnológico y mejorar su calidad de vida. Desde el inicio de la revolución industrial, se estiman en más de 120.000 las sustancias químicas de nueva síntesis y los subproductos derivados de los mismos, y esta lista se incrementa cada vez si se considera que se incorporan cerca de 2000 nuevos compuestos cada año (Olea y Fernández, 2001).

Se ha manifestado frecuentemente que la utilización de compuestos químicos ha supuesto un beneficio sustancial en la producción agrícola. Se considera que gracias al empleo de plaguicidas y fertilizantes, las cosechas se han visto incrementadas significativamente y las pérdidas en la producción se han reducido en forma importante. Se sostiene que es indudable el gran beneficio derivado del empleo de los plaguicidas en los programas de salud y en la lucha contra las enfermedades transmitidas por vectores. Pero también se ha señalado el riesgo potencial para la vida animal y humana derivada de la exposición continua a compuestos químicos diseñados como biocidas.

El comportamiento que presentan los plaguicidas en el ecosistema está relacionado con su composición y fuente de origen. El uso indiscriminado de estas sustancias en muchos casos se ha convertido en una potencial fuente de contaminación de las superficies del suelo, aguas superficiales y napas subterráneas, e incluso se han encontrado plaguicidas en muestras de aire presentes en la fase vapor. El transporte global de estas sustancias volátiles y estables, ha sido demostrado por su presencia en zonas remotas (circulo ártico) y en el aire de océanos del mundo (Barriuso, 2000)

En la mayoría de las aplicaciones ambientales se utilizan formulaciones especiales, es decir, productos que contienen el plaguicida en un porcentaje más o menos elevado conjuntamente con aditivos y coadyuvantes que facilitan su acción. Una vez aplicados, la concentración del plaguicida en el medio va variando como consecuencia de procesos de dispersión, volatilización, degradación química y/o biológica y de lixiviación. En que medida ocurran estos procesos depende de las características fisicoquímicas de cada compuesto y también de las propiedades del agua y el suelo, así como de las condiciones ambientales de la zona y del método de aplicación.

En muchos casos los plaguicidas se presentan comercialmente en forma de mezclas que incluyen compuestos que pertenecen a familias químicas distintas. La existencia en una misma muestra de diferentes tipos de plaguicidas y las deficiencias aún existentes en el análisis de algunos residuos en diferentes matrices, exige el desarrollo de nuevos métodos para su análisis.

Tradicionalmente la extracción de contaminantes orgánicos desde matrices ambientales se ha realizado mediante métodos no instrumentales como lo es la extracción Soxhlet (SE); esta técnica presenta como desventajas el consumo de grandes volúmenes de disolvente, largos tiempos de extracción y la necesidad de procedimientos de limpieza previos al análisis (Dean y Xiong, 2000).

Actualmente existen nuevas técnicas de extracción instrumentales para el análisis de contaminantes orgánicos en matrices ambientales sólidas como son: la extracción con fluido supercrítico (SFE) (Hawthorne y Miller, 1994, Dean y col., 1996), extracción con fluido presurizado (PFE) (Conte y col., 1997), extracción con agua en condiciones subcríticas (SBWE) (Douglas, 2003) y la extracción asistida por microondas (MAE)



(Molins y col.,1997, Xiong y col., 1999, Dean y Xiong, 2000 y Báez y col., 2003). SFE y SBWE consumen pequeñas volúmenes de disolvente y son muy selectivos, pero el sistema instrumental que se utiliza es complejo y de alto costo. Por otra parte, PFE y MAE necesitan pequeños volúmenes de disolvente y tiempos cortos de extracción y además en el caso de MAE se pueden extraer varias muestras simultáneamente. La desventaja de MAE es su baja selectividad, lo que involucra en algunos casos un procedimiento de limpieza previo. En este sentido la utilización de un disolvente no polar reduce la presencia de interferentes provenientes de la matriz evitando de esta forma el procedimiento de limpieza previo al análisis. Sin embargo de acuerdo a los principios de transferencia de energía de microondas los disolventes apropiados deben generar dipolos, lo que no ocurre en el caso de los disolventes no polares (Molins y col., 1997). Para superar esta desventaja la adición de un porcentaje de agua como medio extractante resulta eficaz dado que a alta temperatura y presión sus propiedades como viscosidad, constante dieléctrica y tensión superficial se ven disminuidas. Algunos autores han discutido la eficacia del agua como medio extractante de compuestos organoclorados y PAHs en matrices ambientales concluyendo que no es posible realizar una extracción eficiente en muestras completamente secas cuando se utiliza hexano o diclorometano como disolvente (Molins y col.1997 y Budzinski, 1999). Aunque el agua es una buena alternativa como extractante en MAE y PFE, la necesidad de un procedimiento de limpieza de los extractos para eliminar interferentes polares coextraídos desde el suelo, la no compatibilidad del extracto acuoso con cromatografía de gases y una baja eficiencia para extraer compuestos poco hidrofílicos son las principales limitaciones.

Como respuesta a estos inconvenientes, han surgido algunas propuestas, basadas en el traspaso de compuestos orgánicos extraídos con un medio acuoso hacia un solvente no polar. En este sentido, algunos autores han propuesto la destilación con arrastre por vapor y reparto en hexano asistida por microondas para extraer compuestos orgánicos de baja polaridad desde diferentes matrices sólidas. El principio supuesto por los autores es la desorción acelerada de los analitos desde la matriz mediante arrastre por el vapor de agua generado por la irradiación con microondas y un posterior traspaso a la fase orgánica en la cual serán cuantificados. During y col.(2003) han informado la extracción de pentaclorofenol desde lodos de plantas de tratamiento de aguas servidas, suelo y madera molida bajo el procedimiento descrito. Los autores expusieron a microondas muestras sólidas tratadas con 8 mL de agua y 4 mL de hexano para el reparto, con lo cual alcanzaron recuperaciones de 85 % a 92% con 35 minutos como tiempo de extracción.

Por otro lado Numata y col.(2003) han informado la extracción de bifenilos policlorados (PCBs) y algunos plaguicidas organoclorados (OCPs) desde sedimento mediante la misma técnica, usando un sistema de vidrio construido especialmente para ser adaptado a un microondas convencional. Los resultados obtenidos muestran recuperaciones que van desde 80 a 100 % para algunos PCBs y OCPs relativamente polares (Numata, 2003). Sin embargo algunos resultados obtenidos por estos autores sugieren que la extracción de los compuestos desde el suelo opera principalmente mediante la disolución en el medio acuoso y reparto simultáneo en n-hexano, más que un efecto de arrastre por vapor, ya que compuestos de muy baja solubilidad en agua mostraron una baja recuperación.

En el presente trabajo se propone la extracción asistida por microondas de plaguicidas de baja polaridad desde suelos agrícolas utilizando un medio acuoso para efectuar la desorción, con la partición simultánea en n-hexano para la obtención de extractos limpios y compatibles con la cromatografía de gases.

Los compuestos considerados en este estudio son 6 plaguicidas de baja polaridad, de propiedades fisico-químicas distintas y de uso frecuente en suelos agrícolas: Trifluralin, Clorpirifos, Triadimefon, Metolaclor, Malation y Paration (Figura 1).

Trifluralin ( $\alpha,\alpha,\alpha$ -trifluoro-2,6-dinitro-N,N-dipropil-*p*-toluidina) es un herbicida de la familia de las dinitroanilinas que son empleadas para controlar gramíneas y plántulas de algunas especies de hoja ancha en un amplio grupo de cultivos. Actúan inhibiendo la división celular, se absorben fácilmente por las raíces de las plántulas en germinación e inhiben el crecimiento de la raíz, a la vez que interfieren con la mitosis (Manual de pesticidas, 1991).

Clorpirifos (O,O-dietil O-3,5,6-tricloro-2-piridil fosforotionato) es un insecticida de la familia de los órgano fosforados y se utiliza en el control de ácaros, parásitos y mosquitos en cultivos de maíz, algodón, gramíneas y árboles frutales. Actúa inhibiendo la enzima acetilcolinesterasa (Manual de pesticidas, 1991)

Triadimefon (1-(4-clorofenoxi)-3,3-dimetil-1-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)) butanona es un fungicida de la familia de los triazoles que controla mohos en cereales, árboles ornamentales, frutales y viñedos. Es un fungicida sistémico que actúa inhibiendo la metilación esteroidal (Manual de pesticidas, 1991).

Metolaclor (2-etil-6-metil-1-N(2-metoxi-1-metiletil) cloroacetamida) es un herbicida de la familia de las cloroacetamidas a través de las cuales se controlan gramíneas anuales



en germinación y algunas malezas de hoja ancha en un amplio grupo de cultivos. Al igual que trifluralin actúan inhibiendo la división celular (Manual de pesticidas, 1991). Malation (S-[ 1,2-bis-(etoxi-carbonil)-etil] -O,O-dimetil-ditiofosfato) y Paration (O,O-Dietil O-p-Nitrofenil tiofosfato) son insecticidas de la familia de los organofosforados; son neurotóxicos e inhiben la enzima acetilcolinesterasa. Se usa para controlar plagas caseras, áfidos, arañas y escamas. También se utilizan extensivamente en la erradicación de mosquitos, langostas, polillas, mosca de la fruta y otras plagas (Manual de pesticidas, 1991).

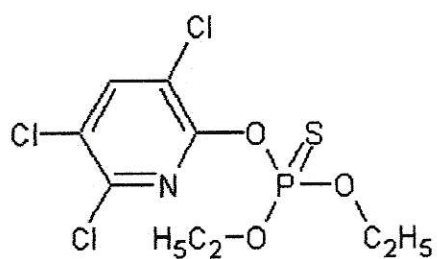
En la tabla 1, se indican algunas de las propiedades de dichos compuestos.

**Tabla 1: Plaguicidas y sus propiedades (Manual de Pesticidas, 1991)**

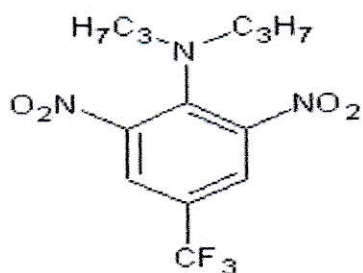
Propiedades	Trifluralin $C_{14}H_{16}ClN_3O_2$	Clorpirifos $C_9H_{11}Cl_3NO_3SP$	Paration $C_{10}H_{14}N_2PS$	Malation $C_{10}H_{19}O_6PS_2$	Triadimefon $C_{14}H_{16}ClN_3O_2$	Metolaclor $C_{15}H_{22}ClNO_2$
Clasificación	Herbicida	Insecticida	Insecticida	Insecticida	Fungicida	Herbicida
Solubilidad (mg/L) a 25°C en agua	0,75	1,18	11	145	260	530
$K_{ow}$ *	118.000	50.000	6.760	560	1.510	2.820
Presión de vapor (mPa) a 25°C	13,7	2,5	0,89	5,3	< 0,1	1,7
Persistencia en suelos (Nº días)	57 a 126	60 a 120	62	365	15	30

(\*) Coeficiente octanol-agua, definido como la relación de concentraciones de un compuesto entre octanol y agua, indica el grado de hidrofobicidad de cada compuesto.

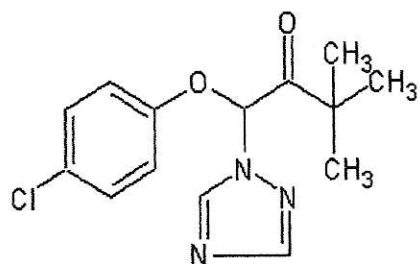
Clorpirifos



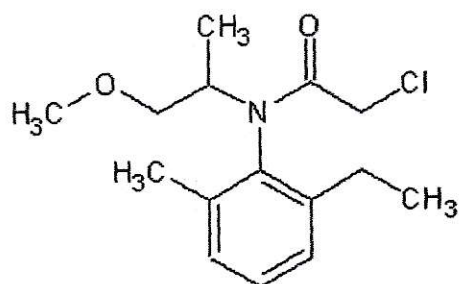
Trifluralin



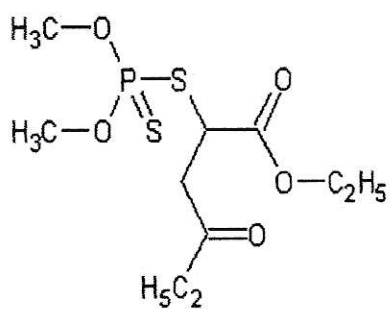
Triadimefon



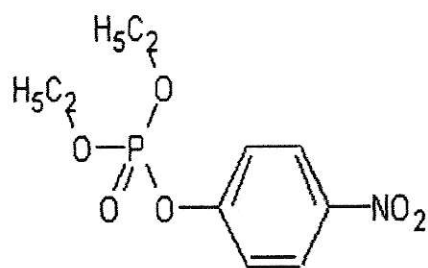
Metolaclor



Malatión



Paratión



**Figura 1: Estructuras químicas de los plaguicidas en estudio**

## **HIPÓTESIS**

Es posible desarrollar un método analítico que permita la extracción eficiente de residuos de plaguicidas de baja polaridad mediante la técnica de arrastre por vapor y reparto líquido-líquido asistida por microondas, desde suelos agrícolas de matriz compleja para su posterior determinación por cromatografía de gases.

Ello supone identificar las variables ambientales e instrumentales que tienen un efecto significativo sobre la eficiencia de la extracción de la técnica propuesta, así como también llevar a cabo la optimización, modelación y validación de esta, aplicando para ello diseños y herramientas estadísticas adecuadas.

## **II. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo general**

Desarrollar un método de extracción que permita extraer eficientemente plaguicidas de baja polaridad o polaridad intermedia a nivel de residuos, desde suelos de uso agrícola con la asistencia de microondas y posterior determinación por cromatografía de gases.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Determinar el comportamiento de adsorción de los plaguicidas Trifluralin, Clorpirifos, Triadimefon, Malation, Metolaclor y Paration en un suelo modelo seleccionado de acuerdo a sus propiedades fisicoquímicas, para el posterior desarrollo de métodos e interpretación de resultados.
- Desarrollar un método basado en cromatografía de gases para la determinación simultánea de todos los compuestos extraídos desde el suelo y la obtención de sus parámetros de calidad analítica.
- Desarrollar un método de extracción basado en el uso de microondas que permita recuperar los compuestos seleccionados desde suelos con diferentes propiedades fisicoquímicas empleando diseños experimentales que den cuenta de la influencia de los factores que afectan la eficiencia de la extracción y la optimización de condiciones instrumentales.



### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1 Materiales**

- Material de vidrio de uso general y volumétrico clase A.
- Micropipeta de desplazamiento de aire 200-1000  $\mu\text{L}$  Brand.
- Tubos de centrifuga cónicos de plástico con tapa de 50 mL, Sterilin.
- Filtros de membrana GV de tamaño de poro de 0,22  $\mu\text{m}$  y 25 mm de diámetro Millipore.
- Filtros de membrana HV de tamaño de poro de 0,45  $\mu\text{m}$  y 47 mm de diámetro Millipore.
- Sistema de filtración de polipropileno Swinnex.
- Jeringas plásticas.
- Viales de vidrio para HPLC

#### **3.2 Equipo menor**

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

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

### **3.3 Equipo mayor**

- Cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC) Waters con Bomba Cuaternaria 600.
- Detector de arreglos de diodos (DAD) Waters 996.
- Muestreador automático Waters 717 Plus.
- Software para control instrumental, adquisición y procesamiento de datos Millennium Versión 2010.
- Columna en fase inversa: Phenomenex SYNERGI 4 $\mu$  Max-RP 80A, 4,6 x 250 mm, tamaño de partícula 5  $\mu$ m, con precolumna Phenomenex C<sub>18</sub> (ODS octadecil), 4 mm x 3 mm. Di
- Microondas para digestión Milestone MLS-1200 MEGA, equipado con un sensor de presión y temperatura (ATC-300) y con dos rotores de polipropileno, de 6 y 10 vasos de TMF (Tetrafluormethaxil), de 435 y 1595 psi de presión máxima, respectivamente.

- Cromatógrafo de gases Hewlet Packard 5890 equipado con detectores de captura de electrones (ECD) y fotométrico de llama (FPD) el cual se utilizó para la detección de los compuestos fosforados, inyector split/splitless y un integrador monocanal.
- Columna HP ULTRA 2 ( 5% Ph Me Silicona) de 25 m de longitud x 0,2 mm de diámetro y film de 0,33  $\mu\text{m}$  utilizada en el ECD.
- Columna HP-5 ( 5% Ph Me Silicona) de 30 m de longitud x 0,25 mm de diámetro y film de 0,25  $\mu\text{m}$  utilizada en el FPD.

### 3.4 Reactivos

- Agua calidad nanogrado.
- Acetonitrilo grado HPLC, Fisher Scientific.
- n-Hexano grado pesticida, Fisher Scientific.
- Clorpirifos 99 % de pureza, Polyscience
- Trifluralin 99 % de pureza, Polyscience.
- Triadimefon 99 % de pureza, Polyscience.
- Malation 99 % de pureza, Polyscience.
- Metolaclor 99 % de pureza, Polyscience.
- Paration 99 % de pureza, Polyscience.
- Sulfato de Sodio Anhidro granulado para el análisis orgánico de trazas, Merck.
- Metanol grado gradiente para HPLC, Merck.
- Pentacloro nitrobenzeno (PCNB), Sigma.
- Trifenil fosfato (TFF), Sigma.

### **3.5 Disoluciones**

#### **3.5.1 Disoluciones estándar de clorpirifos, triadimefon, trifluralin, malation, paration y metolaclor**

Se prepararon disoluciones de los seis plaguicidas por separado, para lo cual se masaron 10,41; 10,70; 10,47; 12,47; 13,03 y 11,88 mg, respectivamente, de los estándares analíticos en una navecilla de vidrio, se pusieron en un matraz de aforo de 10 mL y se completó el volumen con acetona. A partir de estas disoluciones se obtuvieron los patrones de calibración, las disoluciones acuosas y en disolvente orgánico para los estudios realizados en este trabajo.

#### **3.5.2 Disoluciones acuosas de cada pesticida para contaminar suelos**

**Clorpirifos, trifluralin y triadimefon:** Tomando alícuotas de 50  $\mu\text{L}$  a partir de cada estándar preparado previamente en acetona y agregadas cada una de éstas en un matraz de 25 mL, aforadas con agua nanopure, se obtuvieron disoluciones de 2,082; 2,094 y 2,140  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente.

**Malation:** Se tomó una alícuota de 100  $\mu\text{L}$  a partir del estándar y se agregó a un matraz de 25 mL, luego se aforó con agua nanopure, finalmente se obtuvo una disolución de concentración 4,988  $\mu\text{g/mL}$ .

**Metolaclor:** Se tomó una alícuota de 200  $\mu\text{L}$  a partir del estándar y se agregó a un matraz de 25 mL, luego se aforó con agua nanopure, y finalmente se obtuvo una disolución de concentración 9,504  $\mu\text{g/mL}$ .

### **3.6 Suelos utilizados**

En este trabajo se utilizaron tres suelos Chilenos de diferente origen:

**Suelo Vilcún (VLC):** Suelo alofánico (Clasificación: Medial, Mesic, Entic Dystrandept), con un contenido alto de materia orgánica, perteneciente a la comuna de Vilcún, ubicado en la IX región

**Suelo Quillota (QLT):** Suelo no alofánico (Clasificación: Entic Xerumbrept), con un contenido medio de materia orgánica; ubicado en la V región.

**Suelo Pocuro (PCR):** Suelo no alofánico (Clasificación: Mollic Fluviaquent), con un contenido bajo de materia orgánica; ubicado en la V región.

#### **3.6.1 Tratamiento de suelos**

Los suelos utilizados en este estudio fueron secados al aire, tamizados con un tamaño de partícula de 2 mm de diámetro y posteriormente fueron guardados en frascos plásticos sellados a temperatura ambiente.

### **3.7 Métodos**

#### **3.7.1 Determinación de humedad de los suelos**

Se masó muestras de 2 g de cada suelo con una precisión de 0,0001 g, luego fueron secadas en estufa a 105 °C durante cuatro horas, se llevaron a desecador para enfriar durante una hora, para masar nuevamente, la operación se repitió hasta masa constante. Las muestras se realizaron en duplicado.



### **3.7.2 Determinación de la textura de los suelos**

Esta se determinó, para conocer los porcentajes de limo, arcilla y arena de las muestras y se realizó mediante el método de la pipeta descrito en bibliografía (Gee y Bauder, 1986).

### **3.7.3 Evaluación del método HPLC-DAD en la determinación de los plaguicidas para el cálculo de los parámetros de las isotermas de adsorción.**

A partir de las disoluciones estándares se prepararon disoluciones acuosas con un porcentaje de acetonitrilo como cosolvente en los compuestos que presentan menor solubilidad como es el caso de: clorpirifos, trifluralin y paration.

Clorpirifos y trifluralin de concentración 0,5 mg/L; triadimefon, metolaclor, paration y malation de concentración 5 mg/L. El procesamiento de los datos para cada compuesto se realizó empleando los cromatogramas generados a las siguientes longitudes de onda: a 229 nm para clorpirifos, 225 nm para trifluralin, 222 nm para triadimefon, 275 nm para paration y 210 nm para malation y metolaclor. En éstas se registraron los máximos de absorbancia útiles para la obtención de la mayor sensibilidad en las correspondientes determinaciones analíticas, dando lugar a la creación de seis métodos de procesamiento. Para los fines de evaluación de pureza e identificación de cada compuesto se construyó una biblioteca con los correspondientes espectros. Ello permite al software emplear el método de contraste espectral.

Las siguientes condiciones cromatográficas (HPLC) fueron empleadas:

- Flujo de Helio 20 mL/min.
- Temperatura de Columna 35 °C
- Volumen de inyección 20 µL.
- Longitud de onda de barrido del detector 200-300 nm recogidas de espectros 1s
- Flujo fase móvil 1,1 mL/min.

De acuerdo a la afinidad de los compuestos por la fase estacionaria la elución se realizó en las siguientes condiciones isocráticas: 90 % acetonitrilo y 10 % agua, para clorpirifos y trifluralin. Para triadimefon, malation, paration y metolaclor fue a 70 % acetonitrilo y 30 % de agua.

#### **3.7.4 Determinación intervalo de concentraciones de trabajo en medio acuoso para cada plaguicida.**

Para determinar los intervalos de concentración adecuados para la detección y cuantificación de cada compuesto (dependiendo de su solubilidad en agua). Se utilizó las siguientes concentraciones: para clorpirifos y trifluralin fueron: 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 µg/mL y para triadimefon, malation, paration y metolaclor fueron de: 5, 10, 15, 20 y 25 µg/mL.



### 3.7.5 Isotermas de adsorción

Se estudió el comportamiento de adsorción de los seis compuestos en el suelo Quillota, el cual posee un contenido intermedio de materia orgánica.

En cinco tubos se pesaron 2 g de suelo, a cada tubo se le agregó 10 mL de disolución acuosa del compuesto correspondiente en distintas concentraciones. En el caso de clorpirifos y trifluralin se utilizaron soluciones de 2, 4, 6, 8, 10 y 20  $\mu\text{g/mL}$  (con un 20 % de acetonitrilo en la solución), y para triadimefon, malation, paration y metolaclor las concentraciones fueron de 5, 10, 15, 20, 25 y 50  $\mu\text{g/mL}$ . También se preparó un blanco con 2 g de suelo y 10 mL de agua nanopure. Los tubos se taparon y se agitaron en forma constante durante 17 horas a 30 °C para obtener el equilibrio en sistema "batch". Después del tiempo de agitación las muestras fueron centrifugadas en los mismos tubos a 4000 rpm, se tomó una alícuota de 3 mL del sobrenadante y se diluyó con 3 mL de acetonitrilo, luego cada muestra se filtró en membranas de tamaño de poro de 0,22  $\mu\text{m}$ , se recogió en viales y se determinaron por HPLC-DAD. Todas las muestras se realizaron en duplicado incluidos los blancos. De las mismas disoluciones adicionadas a los suelos se prepararon las disoluciones para fines de calibración.

### 3.7.6 Evaluación del método CG-ECD/FPD en la determinación de los plaguicidas

#### 3.7.6.1 Pruebas de separación clorpirifos, paration y malation en cromatografía gaseosa con detector fotométrico de llama.

Para realizar estas pruebas, se prepararon disoluciones de concentración 0,4 ppm de cada compuesto con 0,4 ppm de TFF en n-hexano en un matraz de aforo de 10 mL, también se preparó una mezcla de los tres plaguicidas de 0,4 ppm mas el patrón interno a la misma concentración. Estas disoluciones se analizaron en el GC-FPD. En la Tabla 2 se presentan los programas de temperatura utilizados para encontrar el que ofreciera la mejor separación.

**Tabla 2: Programas de temperatura probados en la separación de los compuestos**

	Programa 1	Programa 2	Programa 3	Programa 4
Temperatura inicial (°C)	100	45	180	100
Rampa 1 (°C/min.)	30	30	30	30
Temperatura final (°C)	210	170	220	250
Rampa 2 (°C/min.)	15	4	30	15
Temperatura final (°C)	280	200	250	290
Rampa 3 (°C/min.)	0	20	15	0
Temperatura final (°C)	280	270	280	290
Tiempo total (min.)	19,33	22,16	18,33	15,66

### **3.7.6.2 Condiciones finales para CG-ECD/FPD**

Las determinaciones mediante CG-ECD fueron llevadas a cabo bajo las siguientes condiciones: temperatura inyector 250 °C, temperatura detector 300 °C programa para columna capilar 170 °C mantenida 1 min, aumentando a 2,5 °C por min hasta 210 °C mantenida 0 min, aumentando a 15 °C por min hasta 260 °C mantenida por 1 min. 1 µL de las muestras fue inyectado en el modo "split"(razón "split" 1:30). El flujo de gas portador (He) en la columna fue de 1,3 mL/min.

Por su parte las determinaciones mediante CG-FPD se llevaron a cabo con la temperatura del inyector a 250 °C, detector a 280 °C y usando el siguiente programa para la columna: 100 °C mantenida 1min, aumentando a 30 °C por min hasta 250 °C, mantenida 4 min, aumentando a 15 °C por min hasta 290 °C mantenida 3 min. 1 µL de la muestra fue inyectada en el modo "splitless".

### **3.7.6.3 Determinación de los parámetros de calidad analítica del método en cromatografía de gases**

Para la determinación de los parámetros analíticos de este método se realizó una curva de calibración de los 5 compuestos en conjunto, en disolución en las concentraciones: 0,02; 0,04; 0,06; 0,08; 0,10; 0,15; 0,20 y 0,25 µg/mL mas la adición de los patrones internos PCNB y TFF de concentración 0,1 µg/mL. Las disoluciones se inyectaron en duplicado en las condiciones cromatográficas definidas como óptimas para CG-ECD/FPD (3.7.6.2). Para determinar el límite de detección (LOD), cuantificación (LOQ)

y sensibilidad analítica se consideró el intervalo de concentración entre 0,02 y 0,1  $\mu\text{g/mL}$  y la linealidad en el intervalo de 0,02 a 0,25  $\mu\text{g/mL}$ .

#### 3.7.6.4 Estudio de estabilidad y reparto de los plaguicidas en el proceso de extracción en microondas

Para evaluar la estabilidad de los seis plaguicidas y su traspaso desde la fase acuosa a la fase orgánica (n-hexano) se realizaron 3 extracciones en distintas condiciones, de potencia y temperatura. Las que se detallan a continuación:

**Tabla 3: Condiciones extracción microondas**

	Extracción 1	Extracción 2	Extracción 3
Condiciones microondas	2 min a 250 W y 15 min a 650 W Tmax.: 120 °C	2 min a 250 W y 15 min a 750 W Tmax.: 160 °C	2 min a 250 W y 15 min a 650 W Tmax.: 60 °C

#### Procedimiento realizado en cada extracción

A partir de las disoluciones estándares, se prepararon disoluciones en medio mixto agua-acetonitrilo de concentración 2  $\mu\text{g/mL}$  para clorpirifos y trifluralin; y solo en medio acuoso de concentración 4  $\mu\text{g/mL}$  para triadimefon y metaloclor; y 10  $\mu\text{g/mL}$  para malation y paration (malation en medio acuoso y paration en medio mixto). De cada una de estas disoluciones se tomó 2 mL y se agregó a los vasos de microondas, más 5 mL de n-hexano para el reparto de los compuestos. En cada extracción se preparó un blanco y los respectivos duplicados de cada muestra. La extracción en microondas fue realizada según las condiciones descritas en la Tabla 3.



Aplicado el programa de extracción, las muestras fueron transferidas a tubos de centrífuga y se extrajo la fase acuosa, la cual se completó a 4 mL con 2 mL de acetonitrilo. La fase orgánica se trató con 0,3 g de sulfato de sodio anhidro, se traspasó a un matraz de aforo de 10 mL, se agregó TFF y PCNB (1ppm) como patrón interno y se completó el aforo con n-hexano. Las disoluciones patrones se prepararon a partir de las disoluciones estándares, en el caso de la fase acuosa se preparó a la mitad de la concentración original y para la fase orgánica se preparó a 0,4 µg/mL para clorpirifos y trifluralin, a 2,0 µg/mL para malation y paration, y a 0,8 µg/mL para metaloclor y triadimefon, mas 1 ppm de patrón interno. La determinación de clorpirifos, paration y malation en la fase orgánica se realizó en el cromatógrafo de gases con detector fotométrico de llama (GC-FPD). La cuantificación de trifluralin, triadimefon y metaloclor se realizó en el cromatógrafo de gases con el detector de captura de electrones (GC-ECD). El análisis de la fase acuosa se realizó mediante HPLC-DAD.

### **3.7.7 Estudio del efecto de los factores relacionados con el método sobre la eficiencia de extracción.**

Se realizó un diseño estadístico experimental factorial del tipo “screening factor” que contempló 3 factores relacionados con el método cada uno en 2 niveles, es decir,  $2^3$  lo que representa 8 experimentos donde se cuentan todas las combinaciones posibles de los factores y sus niveles, se realizaron 4 experimentos centrales para obtener el error puro o experimental. Este tipo de diseño permite determinar los factores que influyen significativamente en la eficiencia de la extracción y por su naturaleza multivariada permite identificar las interacciones entre los distintos factores. Estos fueron:



Temperatura de extracción, porcentaje de acetonitrilo en la solución acuosa y tiempo de extracción.

En la Tabla 4 se muestran los factores y sus 2 niveles mas el valor central y en la Tabla 5 se presenta la matriz del diseño experimental. Se utilizó el programa estadístico Statgraphics 4.0 para el análisis de datos.

**Tabla 4: Factores y niveles del diseño experimental. "Screening factor"**

FACTOR	NIVELES		
	-1	0	+1
<b>A: Temperatura (°C)</b>	60	90	120
<b>B: %acetonitrilo</b>	0	25	50
<b>C: Tiempo(min.)</b>	5	10	15

**Tabla 5: Matriz del diseño experimental "Screening factor"**

Experimento	A	B	C
1	1	-1	1
2*	0	0	0
3	-1	-1	-1
4	-1	-1	1
5	1	-1	-1
6*	0	0	0
7*	0	0	0
8	1	1	1
9	-1	1	-1
10	1	1	-1
11*	0	0	0
12	-1	1	1

(\*) Experimentos centrales

### **Contaminación de las muestras de suelo**

La contaminación se realizó sobre el suelo Quillota. Se pesó 1 g de suelo en los vasos de microondas y se contaminó con 1 mL de la disolución acuosa que contiene la mezcla de cinco pesticidas: clorpirifos, trifluralin, triadimefon de 2  $\mu\text{g/mL}$ , malation de 4  $\mu\text{g/mL}$  y metaloclor de 8  $\mu\text{g/mL}$ .

Los vasos se cubrieron con papel parafilm y se agitaron en forma continua durante 1 hora a temperatura ambiente para lograr el equilibrio. Luego de esto, las muestras fueron guardadas en refrigerador a 4°C durante toda la noche para evitar posibles degradaciones.

### **Procedimiento de extracción**

Pasadas 17 horas después de la contaminación de las muestras, se les agregó el volumen correspondiente de disolvente indicado por el diseño, mas 5 mL de n-hexano para el reparto de los compuestos. Los vasos se agitaron manualmente para homogeneizar la mezcla del suelo con el disolvente, se taparon y fueron puestos en el rotor del microondas. Se aplicó el programa durante el tiempo y temperatura determinados por el diseño, manteniendo constante la potencia en 750 W. Inmediatamente terminada la extracción, el rotor se refrigeró en corriente de agua. Las muestras fueron trasvasiadas a tubos de centrifuga de los cuales se tomaron alícuotas de 4 mL de la fase orgánica, se colocaron en matraces de 10 mL, se les agregó 0,4 ppm de TFF y 0,8 ppm de PCNB y se aforó con n-hexano. La determinación cromatográfica se realizó utilizando detector de captura de electrones y fotométrico de llama. Los resultados de recuperación se obtuvieron por comparación de las áreas obtenidas en las muestras con aquellas

obtenidas de disoluciones patrón, a través de un factor de respuesta, calculado de acuerdo a las concentraciones y las áreas de los patrones y el patrón interno.

### 3.7.8 Estudio del efecto de factores relacionados con la muestra sobre la eficiencia de la extracción.

Determinados los factores asociados al método que influyen significativamente en la eficiencia de la extracción mediante el primer screening, se procedió a realizar un segundo screening con el objeto de estudiar el efecto de los factores asociados a la muestra. Se consideraron tres factores: tipo de suelo, masa de suelo y tiempo de residencia de los compuestos. Cada factor se estudió a 2 niveles, es decir  $2^3$  lo que resulta en 8 experimentos, más 4 experimentos centrales que permiten estimar el error. En la Tabla 6 se presentan los factores estudiados y sus niveles y en la Tabla 7 se presenta la matriz del diseño experimental.

**Tabla 6: Factores y niveles del diseño experimental. Segundo screening**

Factor	Niveles		
	-1	0	+1
Tipo de suelo ( A )	PCR	QLT	VLC
Tiempo de residencia ( B ) días	2	16	30
Masa de suelo( C ) g	1	2	3

**Tabla 7: Matriz del diseño experimental. Segundo screening**

Experimento	A	B	C
1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1
3	-1	1	-1
4	1	1	-1
5	-1	-1	1
6	1	-1	1
7	-1	1	1
8	1	1	1
9*	0	0	0
10*	0	0	0
11*	0	0	0
12*	0	0	0

(\*)Experimentos centrales

### Contaminación de las muestras de suelo

De acuerdo a los fines de esta experiencia en este caso se tomaron 20 g de cada suelo los cuales se contaminaron con 10 mL de solución acuosa de concentración 0,4  $\mu\text{g/mL}$  en el caso de trifluralin, clorpirifos y triadimefon; y de 0,8  $\mu\text{g/mL}$  para malation; y de 1,6  $\mu\text{g/mL}$  para metaloclor. Se agitaron durante 3 h y luego estas muestras fueron secadas en estufa durante 17 h a 30 °C. Posteriormente la muestra seca fue homogenizada en mortero de porcelana y reservado en frío a -20 °C hasta el momento de la extracción. Se determinó el porcentaje de humedad residual de los suelos luego de este procedimiento por secado en estufa a 105 °C por 15 h.

### **Procedimiento de extracción**

Transcurrido el tiempo estimado por el diseño experimental, se masó los gramos de suelo correspondientes (1, 2 o 3 g ) en el vaso de microondas, se humectó las muestras con una razón de volumen 1:1 en relación a la masa de suelo con una disolución compuesta por un 50 % v/v de agua y acetonitrilo. Se homogeneizó y se le adicionó 5 mL de n-hexano para el reparto de los compuestos y se aplicó el programa de extracción resultante del estudio del primer screening.

Aplicado el programa de extracción y luego que las muestras estuvieron a temperatura ambiente se traspasó el contenido de los vasos a tubos de vidrio de los cuales se tomó una alícuota de 4 mL de la fase orgánica se puso en viales de fondo cónico, en los cuales se evaporó el disolvente en corriente de N<sub>2</sub> hasta sequedad. Posteriormente se redisolvió en 1 mL de n-hexano más 40 µL de la disolución de patrones internos PCNB y TFF de concentración 5 µg/mL. El análisis de las muestras se realizó en el CG-FPD/ECD



### 3.7.9 Metodología de superficie de respuesta. Optimización del método de extracción

Identificados los factores que producen efectos significativos en la recuperación de los compuestos en ambos screening, se realizó un diseño compuesto central, centrado en las caras elaborado para la optimización de la extracción de los compuestos del suelo. Se consideraron tres factores: porcentaje de acetonitrilo en el volumen de humectación, temperatura y tiempo de extracción. Cada factor se estudio a 2 niveles, es decir  $2^3$  lo que resulta en 8 experimentos, más 4 experimentos centrales que permiten estimar el error mas 6 experimentos axiales que permiten ampliar el diseño y generan así una superficie de respuesta. En la Tabla 8 se presentan los factores estudiados y sus niveles y en la Tabla 9 se presenta la matriz del diseño experimental.

**Tabla 8: Factores y niveles del diseño experimental. Superficie de respuesta**

Factor	Niveles		
	-1	0	+1
% v/v CH <sub>3</sub> CN ( A )	25	50	75
Tiempo de extracción ( B ) min.	2	5	8
Temperatura( C ) °C	70	100	130

**Tabla 9: Matriz del diseño experimental. Superficie de respuesta**

Experimento	A	B	C
1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1
3	-1	1	-1
4	1	1	-1
5	-1	-1	1
6	1	-1	1
7	-1	1	1
8	1	1	1
9	-1	0	0
10	1	0	0
11	0	-1	0
12	0	1	0
13	0	0	-1
14	0	0	1
15*	0	0	0
16*	0	0	0
17*	0	0	0
18*	0	0	0

(\*)Experimentos centrales

### **Contaminación de las muestras de suelo**

La contaminación de las muestras se realizó tomando 30 g de suelo Quillota a los cuales se les agregó 15 mL de solución acuosa de concentración 0,2 µg/mL en el caso de trifluralin, clorpirifos y triadimefon; y de 0,4 µg/mL para malation; y de 0,8 µg/mL para metaloclor. Así la concentración de los compuestos en el suelo es de 0,1 µg/g para los tres primeros, 0,2 µg/g para malation y 0,4µg/g para metaloclor. La muestra se agitó durante 3 h en forma continua y luego fue secada en estufa durante 17 h a 30 °C. Posteriormente la muestra seca fue homogeneizada en mortero de porcelana y reservado en frío a -20 °C hasta el momento de la extracción. Se determinó el porcentaje de humedad residual en los suelos por secado a 105 °C por 15 h.

### **Procedimiento de extracción**

La extracción de los compuestos fue realizada a los 7 días luego de su contaminación. Se pesó 1 g de suelo en el vaso de microondas, se humectó la muestra con 1 mL de la solución agua acetonitrilo según el diseño. Se homogeneizó y se le adicionaron 5 mL de n-hexano para el reparto de los compuestos y se aplicó el programa de extracción, de acuerdo al diseño, empleando como condiciones fijas en principio 2 min. a 250 W y en una segunda etapa del programa 900 W como máxima potencia.

Aplicado el programa de extracción y luego que las muestras estuvieron a temperatura ambiente se traspasó el contenido de los vasos a tubos de vidrio de los cuales se tomó una alícuota de 4 mL de la fase orgánica se puso en viales de fondo cónico, los cuales se evaporaron en corriente de N<sub>2</sub> hasta sequedad. Posteriormente se agregó 1 mL de n-

hexano más 40  $\mu\text{L}$  de la solución de patrones internos PCNB y TFF de concentración 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . El análisis de las muestras se realizó en el CG-FPD/ECD.

### **3.7.10 Optimización múltiple**

Una vez que se obtuvieron las superficies de respuesta correspondientes a modelos de polinomios de segundo orden para cada compuesto individualmente, se procedió al análisis conjunto mediante una optimización de respuesta múltiple que incluye a todos los compuestos.

Este análisis estadístico ayuda a determinar la combinación de factores experimentales cuyo valor permite obtener el valor óptimo de varias respuestas, en este caso máxima eficiencia de extracción.

### **3.7.11 Aplicación del método de extracción bajo condiciones óptimas**

#### **Contaminación de las muestras de suelo**

La contaminación de las muestras se realizó tomando 20 g de los 3 suelos en estudio, los cuales se contaminaron con 15 mL de solución acuosa de concentración 0,2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en el caso de trifluralin, clorpirifos y triadimefon; y de 0,4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para malation; y de 0,8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para metaloclor. Con lo cual la concentración de los compuestos en el suelo es de 0,1  $\mu\text{g}/\text{g}$  para los tres primeros, 0,2  $\mu\text{g}/\text{g}$  para malation y 0,4  $\mu\text{g}/\text{g}$  para metaloclor. La muestra se agitó durante 3 h y luego fue secada en estufa durante 17 h a 30 °C. Posteriormente la muestra seca fue homogenizada en mortero de porcelana y reservado en frío a -20 °C hasta el momento de la extracción.

### **Procedimiento de extracción**

La extracción de los compuestos fue realizada a los 7 días luego de su contaminación. Se masó 1 g de suelo en el vaso de microondas, se humectó la muestra con 1 ml de disolución extractante que tiene un 50 % v/v de acetonitrilo. Se homogeneizó manualmente y se le adicionó 5 mL de n-hexano para el reparto de los compuestos y se aplicó el programa de extracción, el cual contempla en principio 2 min. a 250 W y luego 10 min. a 900 W para lograr una temperatura máxima de 130 °C.

Aplicado el programa de extracción y luego que las muestras estuvieron a temperatura ambiente se traspasó el contenido de los vasos a tubos de vidrio de los cuales se tomó una alícuota de 4 mL de la fase orgánica se puso en viales de fondo cónico, en los cuales se evaporó el disolvente en corriente de N<sub>2</sub> hasta sequedad. Posteriormente se agregó 1 mL de n-hexano más 40 µL de la solución de patrones internos PCNB y TFF de concentración 5 µg/mL. El análisis de las muestras se realizó en el CG-FPD/ECD.



## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Determinación de humedad del suelo

**Tabla 10: Porcentaje de humedad y factor de corrección**

Suelo	Humedad (%)	fh
VLC	4,961	1,049
QLT	1,265	1,013
PCR	1,508	1,015

Los fh obtenidos se utilizaron para corregir los pesos de las muestras de suelos.

### 4.2 Características químico-físicas y de textura del suelo

En la Tabla 11 se presentan los contenidos de materia orgánica, los porcentajes de arena, limo y arcilla, así como también la clasificación de los suelos según el triángulo de textura (Gee y Bauder, 1986)

**Tabla 11: Porcentajes de M.O, arena, limo y arcilla en los suelos**

	Pocuro	Quillota	Vilcún
<b>M.O (%)</b>	<b>1,8*</b>	<b>3,4*</b>	<b>13,4*</b>
<b>Arena (%)</b>	<b>31,8</b>	<b>30,1</b>	<b>34,3</b>
<b>Limo (%)</b>	<b>51,6</b>	<b>54,1</b>	<b>33,0</b>
<b>Arcilla (%)</b>	<b>16,6</b>	<b>15,8</b>	<b>32,7</b>
<b>Textura</b>	<b>Franco limoso</b>	<b>Franco limoso</b>	<b>Franco arcilloso</b>

(\*)Determinados mediante análisis elemental

Como se puede apreciar en la Tabla 11 el suelo Pocuro y Quillota presentan porcentajes de arena, limo y arcilla muy similar, lo que nos indica que el comportamiento de adsorción de los compuestos en las partículas mas finas de ambos suelos podría ser parecido.

El suelo Vilcún además de ser el que presenta el mayor contenido de materia orgánica, también es el que tiene un porcentaje más alto de arcilla, lo que representaría un potencial de sorción importante para los compuestos en este suelo, ya que pueden ser retenidos en la materia orgánica y/o ser adsorbidos sobre las arcillas.

#### **4.3 Evaluación de un método cromatográfico que permita la detección de los plaguicidas en medio acuoso mediante HPLC-DAD**

En la Tabla 12 se presentan los resultados de los datos cromatográficos obtenidos para los seis plaguicidas con un flujo de 1,1 mL/min. También se presentan los tiempos de retención y el área obtenida para cada compuesto a 220 nm y a la longitud de onda más adecuada en cada caso, la cual corresponde a un máximo de absorción y/o menor interferencia.

**Tabla 12: Tiempos de retención y área de cada compuesto**

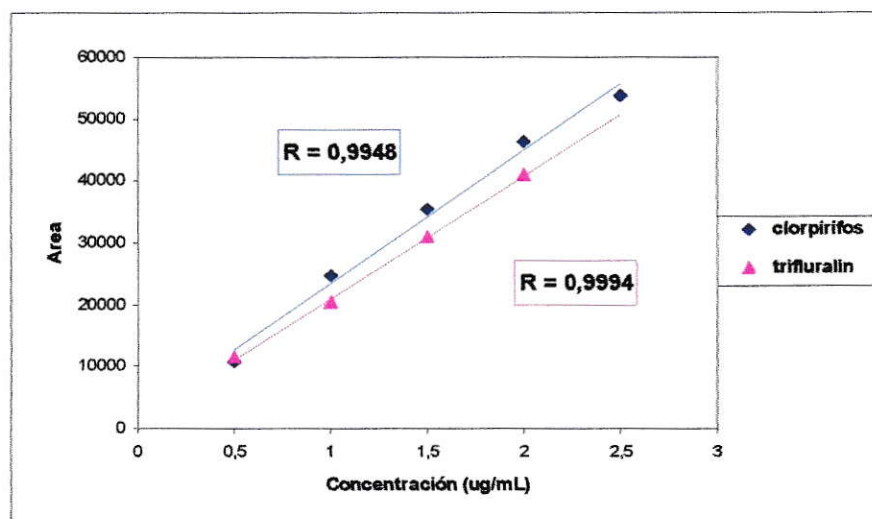
Compuesto	Concentración ( $\mu\text{g/mL}$ )	Composición $\text{CH}_3\text{CN:H}_2\text{O}$	$t_R(\text{min.})$	Área $\lambda=220_{\text{nm}}$	$\lambda_{\text{adecuado}}$ (nm)	Área $\lambda_{\text{adecuado}}$
Clorpirifos	0,5	90:10	5,410	4244	229	5898
Trifluralin	0,5	90:10	5,247	7282	225	7279
Triadimefon	5	70:30	5,547	110528	222	113000
Metolaclor	5	70:30	7,300	38309	210	238000
Malation	5	70:30	6,337	13431	210	12400
Paration	5	70:30	8,197	57296	275	82591

Clorpirifos y trifluralin, se prepararon a una concentración 10 veces menor que el resto de los compuestos debido a su baja solubilidad ( $S_{\text{clorpirifos}}$ : 1,18 mg/L;  $S_{\text{trifluralin}}$ : 0,75 mg/L) en agua, lo cual permite evitar posibles precipitaciones. Debido a su baja polaridad estos compuestos presentan tiempos de retención largos y para eluirlos se requiere aumentar el porcentaje de acetonitrilo de la fase móvil.

#### 4.4 Evaluación del intervalo de trabajo de concentraciones en medio acuoso para cada plaguicida.

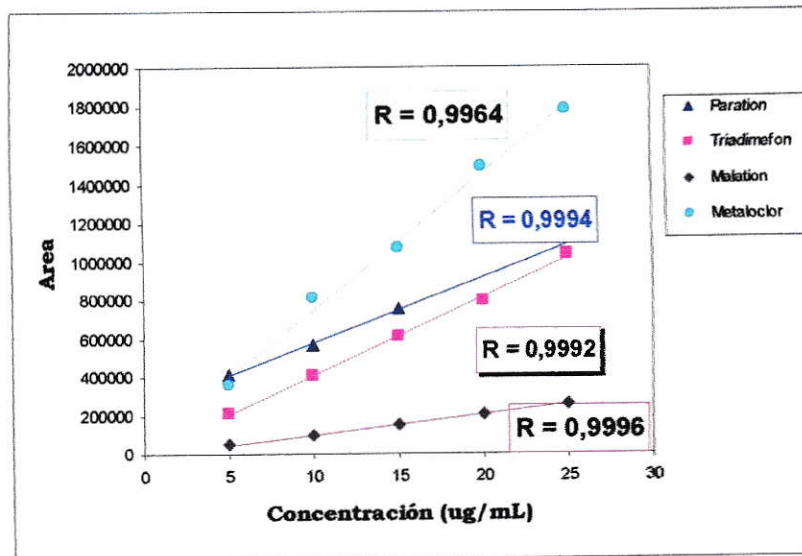
Se construyeron curvas de solubilidad de cada compuesto en medio acuoso, para establecer el intervalo de concentración en el cual estos se mantienen solubles, información que luego sería útil en los estudios de adsorción.

A continuación se muestra los gráficos de las curvas de solubilidad en los intervalos de concentraciones 0,5-2,5 mg/L para clorpirifos y trifluralin; y de 5-25 mg/L para metolaclor, malation y paration a las longitudes de máxima absorbancia, donde se obtienen las áreas de mayor magnitud.



**Figura 2: Curvas de solubilidad clorpirifos y trifluralin**

En la Figura 2, se aprecia la diferencia entre clorpirifos y trifluralin, respecto al mismo intervalo de solubilidad. A pesar que en la literatura se señala un valor de solubilidad de 0,75 mg/L para trifluralin, el resultado obtenido indica que se puede trabajar hasta un valor de 2,0 mg/L sin que se observe precipitación. Para clorpirifos se tiene este mismo límite de concentración.



**Figura 3: Curvas de solubilidad de triadimefon, metaloclor, malation y paration**

La Figura 3, muestra las curvas de solubilidad de metaloclor, triadimefon, paration y malation. Se puede apreciar en los 4 casos que el intervalo de concentración escogido muestra un comportamiento lineal, lo cual obedece a valores de solubilidad elevados en el caso de metaloclor, malation y triadimefon ( $S_{\text{metaloclor}}$ : 530 mg/L;  $S_{\text{malation}}$ : 145 mg/L;  $S_{\text{triadimefon}}$ : 72 mg/L). Paration, solo se midió hasta una concentración de 20 mg/L, ya que a 25 mg/L se observó precipitación evidente ( $S_{\text{paration}} = 11$  mg/L).



#### 4.5 Isotermas de adsorción

Las isotermas de adsorción obtenidas para todos los compuestos se ajustan al modelo empírico descrito por Freundlich, con un coeficiente de correlación  $r > 0,96$ . La forma matemática de esta ecuación puede expresarse como (Boudou y Ribeyre, 1989):

$$C_s = K_f * C_e^{1/n} \quad (4.1)$$

Donde  $C_s$  es la concentración del pesticida adsorbida en el suelo,  $C_e$  es la concentración en equilibrio del pesticida en la fase acuosa,  $K_f$  y  $1/n$  son constantes características de la capacidad de adsorción del compuesto. La constante  $1/n$  es una medida de la no-linealidad de la isoterma y refleja la variación de la adsorción con la concentración. En este caso  $K_f$  es la cantidad de plaguicida adsorbido a una concentración de equilibrio de  $1 \mu\text{g/mL}$  y representa la adsorción a un bajo nivel de concentración. Dicha constante puede ser utilizada para comparar la adsorción relativa de un compuesto sobre diferentes sorbentes

En la Tabla 13 se presentan los valores de las constantes de Freundlich,  $1/n$  y del coeficiente de regresión  $r$  obtenidas para las isotermas de adsorción sobre el suelo QLT, para cada compuesto; clorpirifos, trifluralin y paration obtenidos en medio acuoso con un 20 % de  $\text{CH}_3\text{CN}$  y triadimefon, metaloclor y malation solo en medio acuoso.

**Tabla 13: Valores de  $K_f$ ,  $1/n$ ,  $r$ ,  $K_{OM}$  y Solubilidad para cada compuesto en suelo Quillota**

Pesticidas en Suelo QLT	$K_f$ (mL/g)	$1/n$	$r$	$K_{OM}$	Solubilidad en agua ( $\mu\text{g/mL}$ ) a $20^\circ\text{C}$
Trifluralin	52,2	0,69	0,995	1534	0,75
Clorpirifos	48,8	0,87	0,991	1435	1,18
Paration	4,57	0,75	0,962	135	11
Malation	25,6	0,45	0,991	753	145
Triadimefon	7,45	0,64	0,998	219	260
Metolaclor	4,26	0,72	0,986	125	530

En la Tabla 13 se observa que los valores de  $1/n$  fluctúan entre 0,45 para malation hasta 0,87 para clorpirifos lo cual nos indica en todos los casos que las isotermas de adsorción obtenidas corresponden al tipo L según la clasificación de Giles y col. (1974), con un valor de  $1/n$  entre 0 y 1; este comportamiento se caracteriza porque la pendiente de la curva disminuye al aumentar la concentración; lo cual se explica por una alta afinidad del adsorbente por el adsorbato a bajas concentraciones, la cual disminuye cuando aumenta la concentración debido a una saturación de los sitios de adsorción.

Si bien la partición entre una solución acuosa y la materia orgánica del suelo sería uno de los mecanismos principales de sorción de plaguicidas de baja apolares (Chiou y col., 1979), la no linealidad de la isoterma indica que, sumada a esta partición, hay una adsorción sobre sitios heterogéneos sobre el suelo.

Para determinar la contribución del contenido de materia orgánica (MO) en el proceso de adsorción fueron obtenidos los valores de  $K_{OM}$  ( $K_{OM} = K_f / \%MO \times 100$ ) para cada compuesto respecto al suelo Quillota (Tabla 13). El valor de  $K_{MO}$  entre distintos suelos permite evaluar, mediante una normalización, si junto a la MO hay otros compuestos que contribuyen a la sorción

Clorpirifos y trifluralin, arrojan los valores más altos de  $K_{MO}$  lo cual indica la importancia de la materia orgánica en el proceso de adsorción de estos compuestos por el suelo QLT. Su baja polaridad contribuye a que aumente la afinidad por la fracción orgánica del suelo.

En la Tabla 13 también se aprecian los valores de solubilidad de cada compuesto en agua, comparando estos valores con los calculados para  $K_f$  se establece una relación inversa entre en ambos grupos de compuestos (en azul: compuestos en medio acuoso con un 20 % de acetonitrilo y el resto de los compuestos solo en medio acuoso).

En las Figuras 4 y 5 se presentan las isotermas de clorpirifos, trifluralin, triadimefon, metaloclor, malation y paration respectivamente.

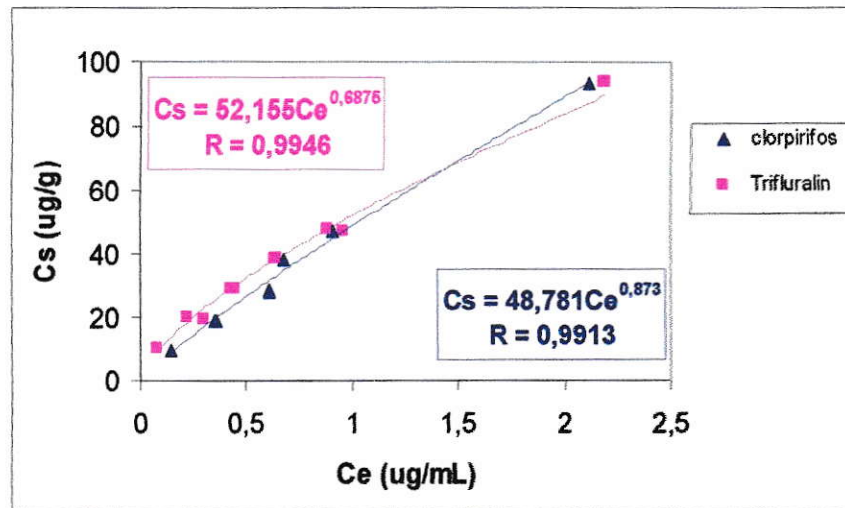


Figura 4: Isotherma clorpirifos y trifluralin

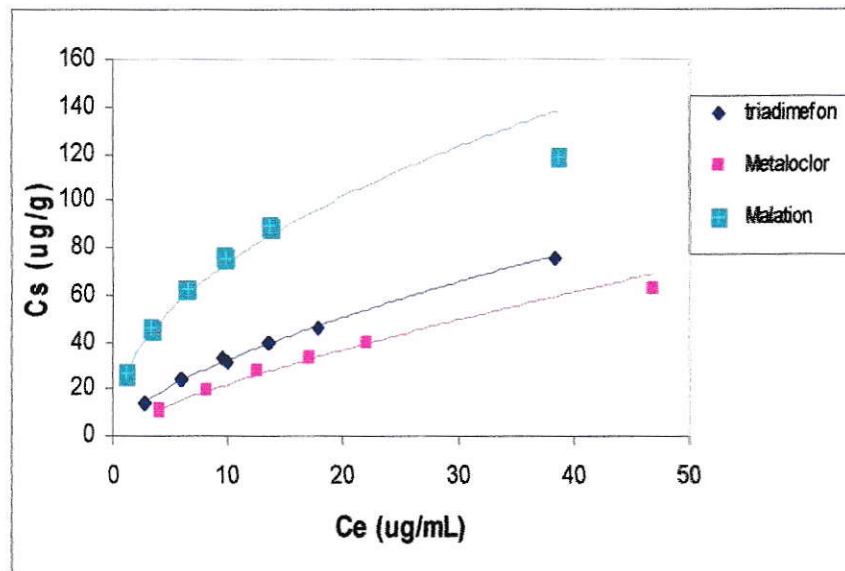


Figura 5: Isotherma de triadimefon, metaloclor, malation y paration

#### 4.6 Pruebas de separación clorpirifos, paration y malation en cromatografía gaseosa con detector fotométrico de llama

En la Tabla 14, se observa el resultado obtenido al aplicar los 4 programas propuestos, se llega a la conclusión que no es posible separar clorpirifos de paration, con la columna que se utilizó en el CG-FPD, debido a la similitud en sus características químico-físicas sin embargo se logró la separación de clorpirifos y malation, lo cual permite su cuantificación en una muestra donde se encuentren ambos compuestos. Debido a lo anteriormente expuesto, se tomó la decisión de no trabajar con paration en las pruebas de extracción posteriores.

**Tabla 14: Tiempos de retención en los distintos programas utilizados**

Programa aplicado	Clorpirifos $t_R$ (min.)	Malation $t_R$ (min.)	Paration $t_R$ (min.)
1	12,759	12,772	12,769
2	20,441	20,135	20,478
3	7,779	7,475	7,810
4	10,304	9,936	10,345



#### 4.7 Determinación de los parámetros de calidad analítica del método en cromatografía de gases

El límite de detección LOD instrumental se determinó tomando en cuenta que en este caso la técnica no entrega una señal medible para el blanco, para lo cual se ha derivado la siguiente relación que es una aproximación del límite de detección estadístico (Cuadros y col., 1993).

$$LOD = 3 \left( \frac{S_{Y/X}}{b} \right) \sqrt{\frac{n-1}{n-2}} \quad (4.2)$$

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

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

$$sa = \frac{S_{Y/X}}{b} \quad (4.3)$$

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

$$linealidad = 1 - \left( \frac{S_b}{b} \right) \times 100 \% \quad (4.4)$$

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

Los parámetros de calidad analítica calculados se observan en las Tablas 15 y 16 para los 5 compuestos, en los dos intervalos de calibración.

**Tabla 15: LOD, LOQ y sensibilidad analítica para la determinación de los 5 compuestos por CG-ECD/FPD (intervalo de calibración 0,02-0,10  $\mu\text{g/mL}$ )**

	$a \pm S_a$	$b \pm S_b$	$S_{Y/X}$	LOD ( $\mu\text{g/mL}$ )	LOQ ( $\mu\text{g/mL}$ )	Sensibilidad ( $\mu\text{g/mL}$ )
Clorpirifos	-0,0058 $\pm$ 0,0087	5,202 $\pm$ 0,123	0,0083	0,0048	0,0159	0,0016
Trifluralin	0,0024 $\pm$ 0,0109	6,784 $\pm$ 0,157	0,0104	0,0046	0,0153	0,0015
Triadimefon	-0,029 $\pm$ 0,029	13,69 $\pm$ 0,404	0,0273	0,0060	0,0199	0,0019
Metolaclor	0,0027 $\pm$ 0,0068	0,7852 $\pm$ 0,022	0,0064	0,0240	0,0815	0,0082
Malation	0,0356 $\pm$ 0,028	3,096 $\pm$ 0,209	0,0273	0,0260	0,0882	0,0088

**Tabla 16: Linealidad para la determinación de los 5 compuestos por CG-FPD/ECD (intervalo de calibración 0,02-0,25  $\mu\text{g/mL}$ )**

	$a \pm S_a$	$b \pm S_b$	$S_{Y/X}$	r	$r^2$ %	Linealidad %
Clorpirifos	0,0155 $\pm$ 0,0087	5,1394 $\pm$ 0,0640	0,0137	0,9995	99,91	98,75
Trifluralin	0,0257 $\pm$ 0,0096	6,6470 $\pm$ 0,0712	0,0152	0,9996	99,93	98,93
Triadimefon	0,0516 $\pm$ 0,0289	13,515 $\pm$ 0,2131	0,0456	0,9992	99,85	98,42
Metolaclor	0,0111 $\pm$ 0,0061	0,8474 $\pm$ 0,0113	0,0097	0,9995	99,89	98,67
Malation	0,0527 $\pm$ 0,0485	4,4017 $\pm$ 0,0791	0,0767	0,9971	99,42	98,20

En la Tabla 15 se aprecia que los límites de detección más bajos corresponden a trifluralin y clorpirifos y el más alto lo tiene malation. Según LOD y LOQ calculados es posible determinar concentraciones en los suelos del orden de 0,02  $\mu\text{g/g}$  en el caso de clorpirifos, trifluralin y triadimefon; y de 0,08  $\mu\text{g/g}$  para metolaclor y malation, al extraer 1 g de suelo con estos valores de concentración y concentrado posteriormente a 1 mL.

Los resultados indican que la respuesta del detector es lineal con valores de  $r^2$  superiores al 99.42 % en el intervalo de concentraciones estudiadas.

#### 4.8 Estudio de la estabilidad y reparto de los plaguicidas en el proceso de extracción en microondas

**Tabla 17: Estudio de estabilidad y reparto de los plaguicidas en el proceso de extracción en microondas. Porcentaje de recuperación en cada experiencia realizada**

Condiciones:	Experiencia 1	Experiencia 2	Experiencia 3	Experiencia 4
	T máx.: 60°C	T máx.: 120°C	T máx.: 160°C	T máx.: 60°C
Clorpirifos	61,1	66,7	40,7	94,0
Trifluralin	99,8	56,8	66,0	90,0
Triadimefon	99,4	99,7	61,2	*
Metolaclor	91,1	84,9	*	*
Malation	80,1	91,2	*	*
Paration	98,1	95,4	*	*

(\*) No se realizó la experiencia

En términos generales, se observa que una menor temperatura favorece el paso de los compuestos desde la fase acuosa hacia la fase orgánica (n-hexano). Esto es más evidente en el caso de trifluralin con una recuperación de 99,8 %, la cual disminuye considerablemente a las temperaturas de 120 °C y 160 °C, disminuyendo la recuperación de clorpirifos a un 40,7 % en esta experiencia. Por esta razón no se realizó la recuperación de metaloclor, malation y paration, ya que sus porcentajes de recuperación son mayores al 80 % en las 2 experiencias previas. En una experiencia adicional a 60 °C



con un 50 % v/v de acetonitrilo en la fase acuosa, la recuperación de clorpirifos y trifluralin fue mayor al 90 %, lo que muestra la importancia de este modificador orgánico.

#### **4.9 Estudio del efecto de los factores relacionados con el método sobre la eficiencia de extracción.**

En la Tabla 18 se muestra la matriz de respuesta representada por los valores de porcentaje de recuperación de los 5 compuestos para los 12 experimentos descritos en la matriz experimental presentada en la Tabla 4

**Tabla 18: Influencia del efecto de los factores sobre el método de extracción. Porcentajes de recuperación de cada compuesto.**

Experimento	Clorpirifos %	Trifluralin %	Triadimefon %	Metolactor %	Malation %
1	89,7	43,8	85,9	85,6	31,8
2*	67,1	46,0	98,1	78,8	32,7
3	65,3	56,5	100,3	99,8	66,1
4	87,9	81,2	76,8	82,1	45,1
5	80,6	56,1	98,9	91,6	31,7
6*	67,8	47,5	97,8	92,4	37,2
7*	70,7	53,6	97,5	91,5	44,1
8	72,6	69,2	71,0	81,6	27,3
9	54,3	47,0	99,9	95,4	54,8
10	63,0	60,4	99,8	106,1	33,4
11*	71,4	45,6	97,3	98,4	41,6
12	66,5	58,0	95,0	82,7	37,3

(\*) Experimentos centrales

Los porcentajes de recuperación de clorpirifos fluctuaron entre un 54,3 y un 89,7 %; para trifluralin el intervalo varió entre un 43,8 y un 81,2 %; triadimefon entre un 71,0 y un 100,3 %; metaloclor entre un 78,8 y un 106,1 % y malation entre un 27,3 y 66,1 %.

Los resultados encontrados se analizaron por análisis de varianza (ANOVA) el cual permite describir el sistema mediante un modelo lineal de primer orden, tal modelo explica el efecto de los factores y sus interacciones sobre la eficiencia de extracción. Los factores significativos se obtuvieron comparando el valor de los cuadrados medios de los efectos y sus interacciones contra un estimado del error experimental al cuadrado de donde se obtienen los valores de “p-value”. En el caso que estos valores sean menores que 0,05 se considera que el factor es estadísticamente significativo a un nivel de confianza de 95 %. En este caso la hipótesis nula es que el efecto no es significativo y el menor valor de “p-value” es evidencia de que la hipótesis no se cumple. Además para probar la idoneidad del modelo, se llevó a cabo la prueba de carencia de ajuste o “Lack-of-fit”, de esta forma el análisis se hace más sensible y se puede discriminar la contribución de cada factor en la variabilidad de los datos (Raymond y Douglas, 1995).



**Tabla 19: Efectos de los factores y valor de probabilidad del análisis de varianza (ANOVA). "Screening factor"**

Factor	Clorpirifos		Trifluralin		Triadimefon	
	Efecto	p-value	Efecto	p-value	Efecto	p-value
A: Temperatura	<b>7,975</b>	<b>0,0129</b>	-3,30	0,2972	-12,15	0,0967
B: Acetonitrilo	<b>13,38</b>	<b>0,0030</b>	8,05	0,0546	<b>-25,3</b>	<b>0,0156</b>
C: Tiempo	<b>-16,78</b>	<b>0,0015</b>	-0,75	0,7935	0,05	0,9928
AB	-0,575	0,7265	<b>15,6</b>	<b>0,0095</b>	-7,35	0,2439
AC	-4,075	0,0745	<b>-9,80</b>	<b>0,0334</b>	4,70	0,4233
BC	-2,475	0,1969	1,85	0,5313	1,60	0,7735
Lack-of-fit	0,1169		0,0232		<b>0,0572</b>	

Factor	Metolaclor		Malation	
	Efecto	p-value	Efecto	p-value
A: Temperatura	1,225	0,8470	<b>-79,775</b>	<b>0,0014</b>
B: Acetonitrilo	-15,23	0,0795	-11,125	0,0519
C: Tiempo	1,675	0,7925	-5,475	0,2208
AB	3,575	0,5829	4,075	0,3344
AC	-0,025	0,9968	8,125	0,1061
BC	-3,375	0,6031	-0,675	0,8614
Lack-of-fit	<b>0,6444</b>		<b>0,6733</b>	

Los valores en negrita representan los factores significativos

En el caso de clorpirifos la temperatura, el tiempo y el porcentaje de acetonitrilo son significativos. La temperatura y el porcentaje de acetonitrilo tienen un efecto positivo en la extracción, no es así con el tiempo, por lo tanto una disminución en el tiempo y un aumento en la temperatura y en la cantidad de acetonitrilo en el medio acuoso favorece la extracción.

Si bien los factores considerados individualmente no tienen efecto significativo sobre la extracción de trifluralin, las interacciones entre éstos sí lo tienen, por lo tanto es conveniente considerarlos al momento de la optimización. Por otro lado se observa un

efecto positivo marginalmente significativo del porcentaje de acetonitrilo en el medio de extracción

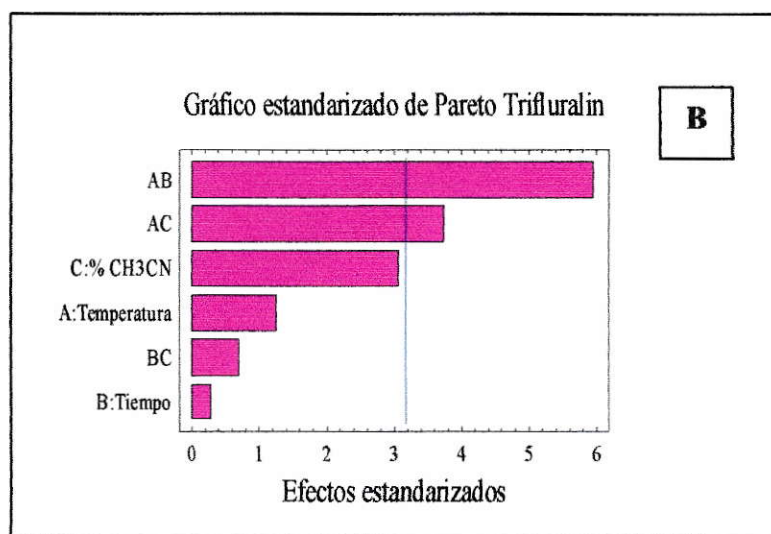
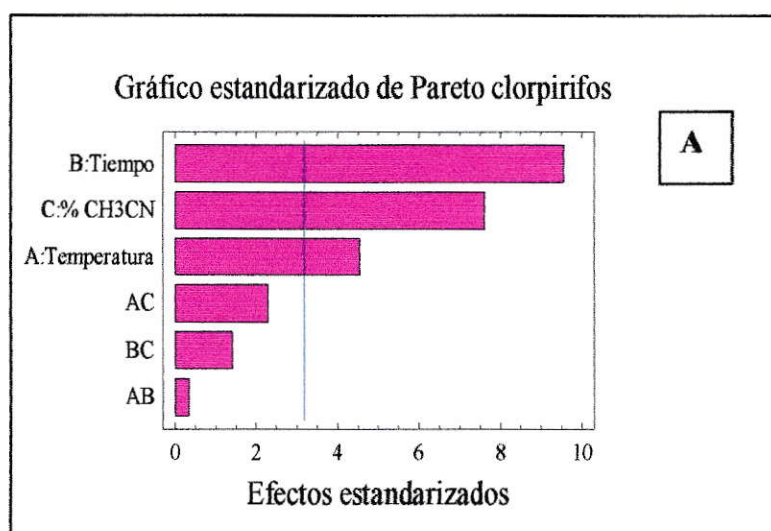
Triadimefon solo se ve afectado negativamente por el porcentaje de acetonitrilo en el medio de extracción.

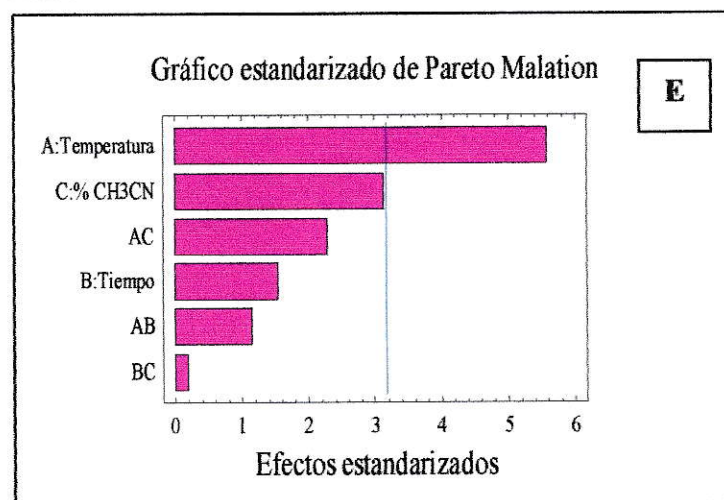
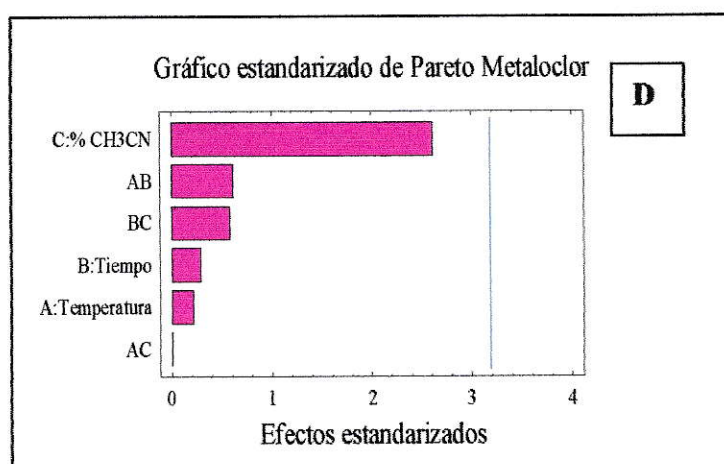
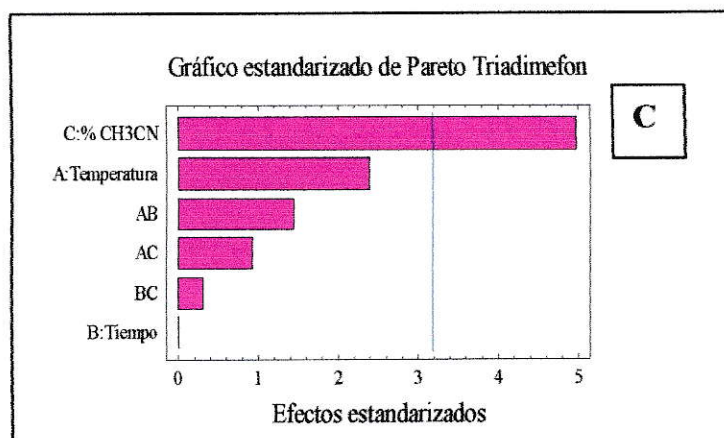
Para metolaclor ninguna de las variables en estudio afecta significativamente su extracción.

En el caso de malation, el efecto significativo en la extracción corresponde a la temperatura y marginalmente al porcentaje de acetonitrilo con un efecto negativo, por lo tanto al disminuir estas variables se podría mejorar el porcentaje de recuperación en la extracción.

En la Figura 6 se presentan los gráficos estandarizados Pareto en donde se ordenan los efectos estimados y sus interacciones. La lineal vertical representa el test de significancia al 95 %. Los resultados de esta experiencia indican que, si bien el agua a temperaturas mayores a 100 °C y presiones mayores a la atmosférica resulta ser un medio bastante eficiente para extraer desde el suelo compuestos orgánicos que son ligeramente solubles a temperatura ambiente, su eficiencia no es suficiente para extraer compuestos mas hidrofóbicos como el clorpirifos. Cuando se adiciona al agua un modificador orgánico como acetonitrilo se mejora la eficiencia de extracción de estos compuestos. Sin embargo, al mismo tiempo, el medio se torna menos eficiente para extraer los compuestos de mayor solubilidad en agua como triadimefon. Por esta razón la cantidad de acetonitrilo en el medio acuoso de extracción necesita ser optimizados para lograr una máxima eficiencia de extracción de todos los compuestos bajo una condición óptima única.

Por otra parte, inicialmente se planteaba como parte de la hipótesis de trabajo que el arrastre por vapor de agua generado en el proceso microondas, sería el responsable de la extracción de los compuestos desde el suelo y su posterior traspaso a la fase orgánica. Sin embargo, la adición de acetonitrilo al medio como extractante para favorecer la recuperación de clorpirifos y trifluralin, ambos con una baja solubilidad en agua, indica que la extracción procede más bien por la disolución de los compuestos en el medio extractante seguido del reparto en n-hexano.





**Figura 6: Gráficos Estandarizados Pareto. A: Clorpirifos, B: Trifluralin, C: Triadimefon D: Metolaclor y E: Malation**



#### 4.10 Estudio del efecto de los factores relacionados con la muestra sobre la eficiencia de extracción.

En la Tabla 20 se muestra la matriz de respuesta representada por los valores de porcentaje de recuperación de los 5 compuestos para los 12 experimentos descritos en la matriz experimental.

**Tabla 20: Estudio del efecto de los factores relacionados con la muestra sobre la eficiencia de extracción. Porcentajes de recuperación de cada compuesto.**

Experimento	Clorpirifos %	Trifluralin %	Triadimefon %	Metaloctor %	Malation %
1	61,7	76,7	98,2	103,5	31,6
2	94,7	81,9	82,3	91,7	10,5
3	21,2	90,6	55,0	71,8	12,0
4	51,0	98,3	54,3	86,3	5,40
5	52,1	80,7	84,5	96,6	15,7
6	94,5	78,1	75,6	91,2	8,70
7	22,9	64,4	46,0	70,0	9,50
8	53,0	78,4	39,9	70,0	2,70
9*	64,4	62,4	58,5	73,9	9,30
10*	64,1	67,4	55,6	83,2	8,40
11*	81,9	83,3	71,1	94,0	6,70
12*	68,9	72,5	62,7	80,7	9,90

(\*)Experimentos centrales

En rojo se aprecian los porcentajes de recuperación más altos para cada compuesto. El experimento 2, realizado sobre 1 g de suelo Vilcún, con 2 días de residencia arrojó en el caso de clorpirifos el porcentaje de recuperación mayor. El experimento 4, realizado

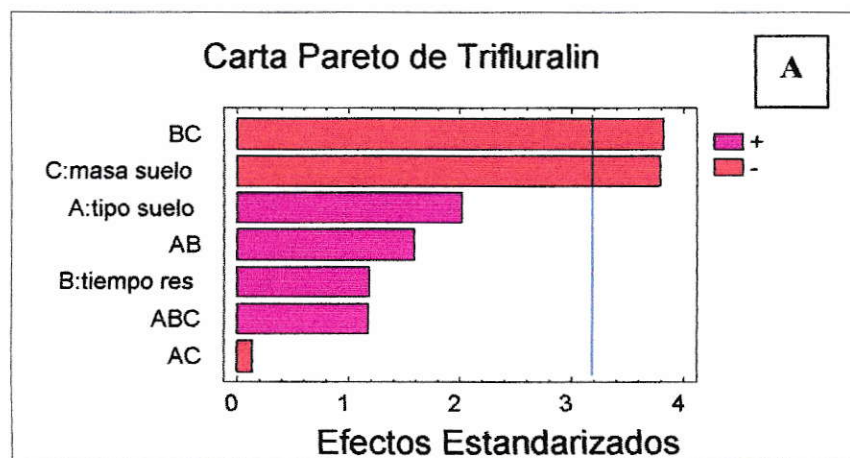


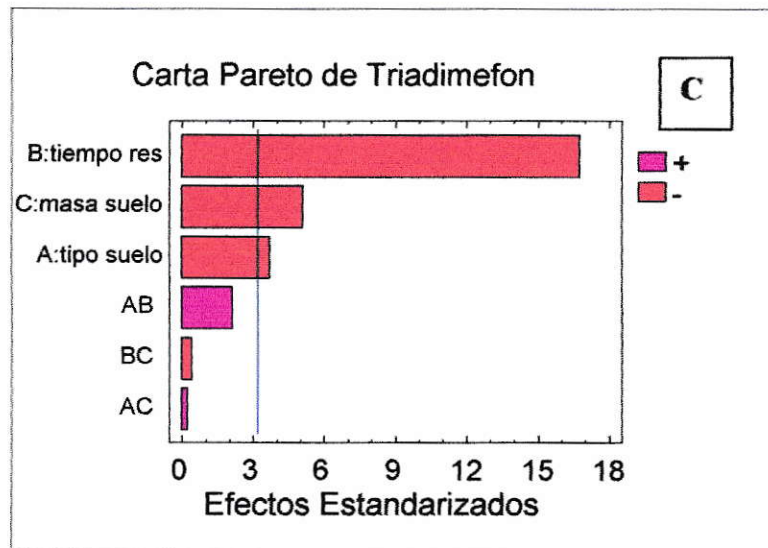
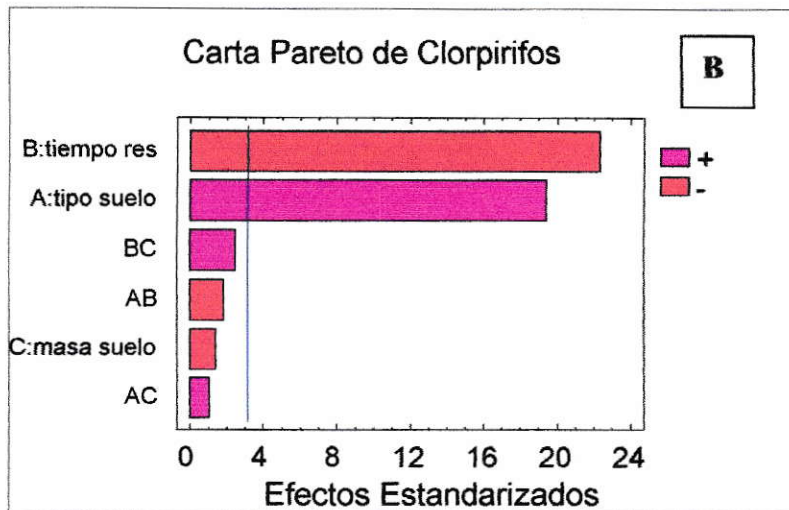
sobre 3 g de suelo Vilcún, con 2 días de residencia entrega el valor más alto de recuperación para trifluralin. En el caso de triadimefon y metaloclor el experimento 1, realizado sobre 1g de suelo Pocuro, con el menor tiempo de residencia arrojan los porcentajes de recuperación más altos en ambos compuestos.

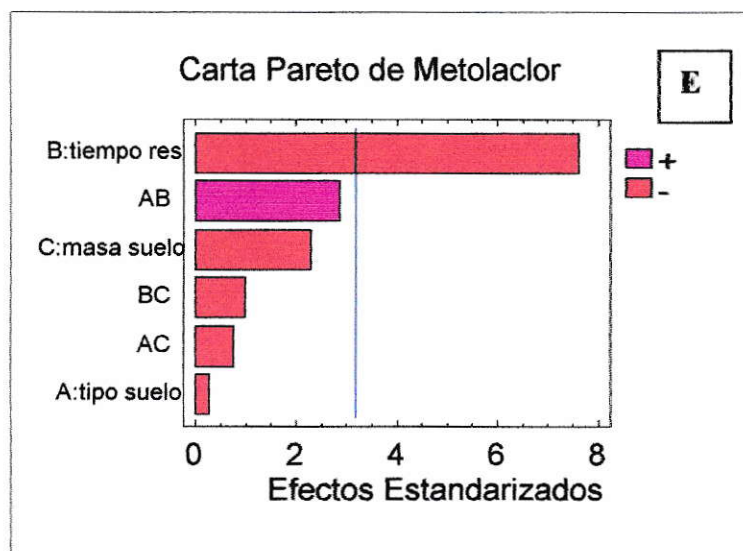
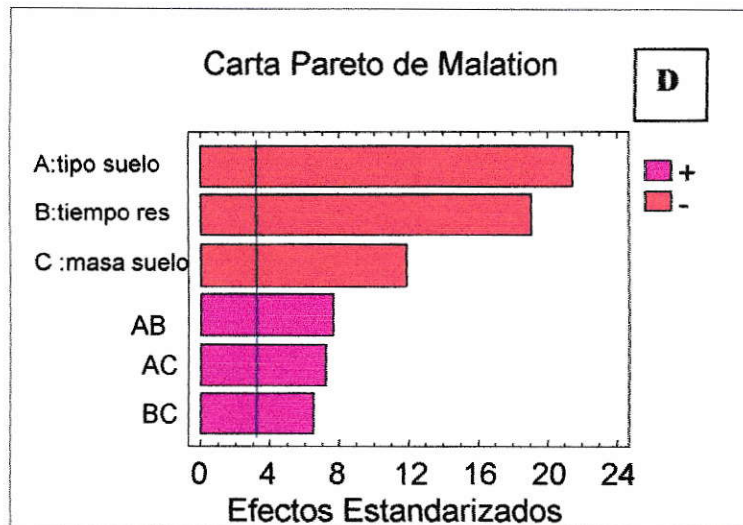
Malation es el compuesto de recuperación más baja en todos los experimentos, con un 31 % de recuperación como valor máximo en el experimento 1 donde al igual que los compuestos anteriores su recuperación se ve favorecida a un menor tiempo de residencia, desde suelo PCR.

El análisis de varianza evalúa la significancia estadística de los factores, de esta forma se puede determinar si los factores son o no significativos a un nivel de confianza dado. En este caso también se usó el nivel de confianza de 95 %. Para determinar la importancia de los factores analizados en este diseño se comparan los valores de “p-value” o valor de probabilidad de cada factor con el valor de significancia que en este caso corresponde a 0,05.

En la Figura 7 se aprecian las cartas pareto de cada compuesto donde se muestran los efectos significativos positivos y negativos de cada variable y las correspondientes interacciones entre ellas.







**Figura 7: Gráficos Estandarizado de Pareto obtenidos en el segundo screening para A: Trifluralin, B: Clorpirifos, C: Triadimefon, D: Malation y E: Metolaclor**

El tiempo de residencia tiene un efecto negativo sobre el rendimiento de extracción de todos los compuestos, con excepción de trifluralin en cuyo caso se presenta un efecto positivo, pero no significativo.

Con el transcurso del tiempo una porción de los compuestos se tornan más resistentes a la extracción con el método en estudio. La disminución en la recuperación debido al tiempo de residencia es un hecho conocido y se explica por la formación de fuertes asociaciones con la matriz. Este fenómeno se ha explicado de acuerdo a si los analitos son incorporados por absorción en tiempos de contacto prolongados. Este último mecanismo involucra una sorción en sitios remotos al interior de la matriz del suelo (Dec y Bollag, 1997).

La masa de suelo tiene un efecto negativo sobre la extracción de todos los compuestos, pero solo en el caso de trifluralin y triadimefon el efecto es significativo. Ello podría asociarse a que a mayor masa utilizada en la extracción, también necesita más disolución acuosa, ya que la relación masa suelo:solución acuosa es 1:1, lo que incrementó la temperatura pudiendo afectar a la extracción o la estabilidad de los compuestos, o simplemente hay una menor eficiencia en el proceso microondas en su conjunto por la presencia de una mayor masa. El efecto negativo de la cantidad de masa sobre la eficiencia de extracción de metabenzthiazuron desde suelos PCR y QLT ya ha sido previamente descrito para métodos que utilizan microondas (Báez y col., 2003).

En cuanto al tipo de suelo y contrario a lo que se pensó originalmente, para el caso de clorpirifos y marginalmente para trifluralin, el aumento en el contenido de materia orgánica (definido como el parámetro que indica mayor complejidad en el suelo) tuvo un efecto positivo sobre el rendimiento de extracción de ambos compuestos. Ello podría



explicarse teniendo en cuenta que en suelos con mayor porcentaje de materia orgánica ambos compuestos se asocian a ella preferentemente, formando interacciones hidrófobas de carácter débil por lo que su extracción se hace más fácil. Es decir hay una porción que incluye un reparto en la materia orgánica. Pero además, estos compuestos también se asociarían en segundo término a otros constituyentes del suelo, como lo serían las arcillas, asociación que pasaría a ser prioritaria si el contenido de materia orgánica en el suelo es bajo y por ello se hace difícil su extracción (suelos Pocuro y Quillota), ya que los enlaces con las arcillas son mucho más fuertes. Kim y Feagley (1998). han determinado que trifluralin se une intensamente a un suelo con sólo un 1,14 % de carbono orgánico y 31% de arcilla, presentando un valor de  $K_f$  de  $9,97 \text{ cm}^3/\text{g}$  y una baja capacidad de lixiviación con agua; mientras que metolaclor en el mismo suelo presentó un  $K_f$  de  $1,54 \text{ cm}^3/\text{g}$ , siendo lixiviado hasta en un 65 %. Calderón y col. (1999) han observado una baja tendencia a la lixiviación de trifluralin en columnas de suelos agrícolas que contienen un 1.25 % materia orgánica y 25 % de arcilla.

En cambio metolaclor y triadimefon tendrían principalmente la capacidad de interactuar con la materia orgánica y una limitada afinidad con las arcillas, sobre todo en el caso del primer compuesto, por lo cual el efecto negativo de la complejidad del suelo es sólo marginal.

En el caso de malation es probable que su adsorción sea principalmente sobre las arcillas, siendo poco afín con la materia orgánica, lo que se aprecia en menores porcentajes de recuperación en el suelo orgánico Vilcún el cual presenta un mayor contenido de arcilla. Ello lo convierte en el compuesto más difícil de extraer desde cualquiera de los suelos considerados debido a la fuerte interacción que establecería con



las arcillas. El gráfico estandarizado Pareto en este caso muestra como significativos todos los factores y sus interacciones, esto se debe precisamente a los bajos porcentajes de recuperación en cada experimento, lo que provoca que el modelo no explique con certeza como afecta la variabilidad de los factores en la extracción.

Si bien el contenido de MO en el suelo fue elegido inicialmente como el parámetro para definir complejidad de este, al parecer es más adecuada la razón entre porcentaje de arcilla y porcentaje de MO. En la medida que esta razón se incrementa, se hace más dificultosa la extracción de trifluralin y clorpirifos desde el suelo.

#### **4.11 Metodología de superficie de respuesta. Optimización del método de extracción.**

A partir de los resultados obtenidos en los 2 screening previos y luego de haber identificado los factores que tienen un efecto significativo en la eficiencia de extracción de los compuestos, se optimizó el método de extracción. En la Tabla 21 se muestra la matriz de respuesta para el diseño experimental, el cual da lugar a una superficie de respuesta.

**Tabla 21: Optimización del método de extracción. Porcentajes de recuperación de cada compuesto en suelo QLT.**

Experimento	Clorpirifos %	Trifluralin %	Triadimefon %	Metolaclor %	Malation %
1	66,2	52,7	101,2	79,6	0
2	72,5	56,9	46,7	57,3	0
3	71,4	59,2	104,0	77,9	0
4	75,9	53,2	52,2	62,9	0
5	60,4	49,3	101,6	71,3	0
6	74,1	54,6	54,4	61,8	0
7	75,2	65,3	102,0	76,6	0
8	75,3	64,1	45,0	53,4	0
9	68,1	29,1	79,5	90,2	0
10	67,9	41,8	47,2	72,3	0
11	78,0	48,6	86,7	88,6	0
12	68,1	44,9	76,7	86,5	0
13	75,0	58,7	88,2	91,2	0
14	76,0	59,5	106,2	97,3	0
15*	76,8	61,1	100,0	91,7	0
16**	71,9	57,9	85,7	91,2	0
17*	74,5	56,7	91,3	94,9	0
18*	73,7	57,3	92,0	91,1	0

**(\*)Experimentos Centrales**

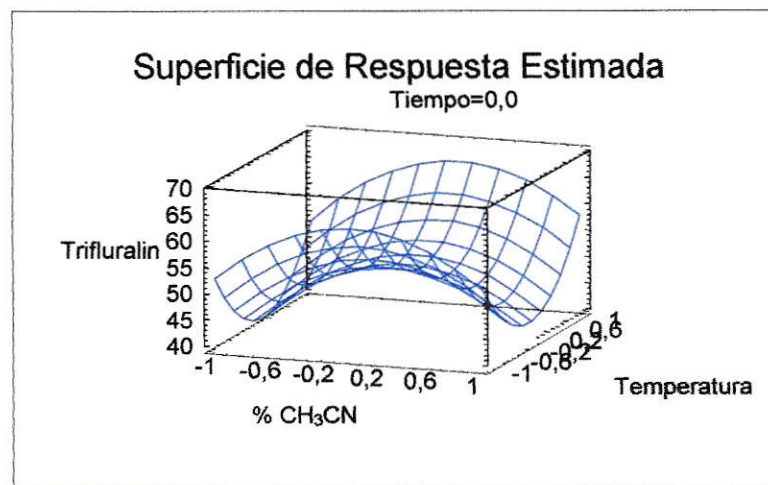
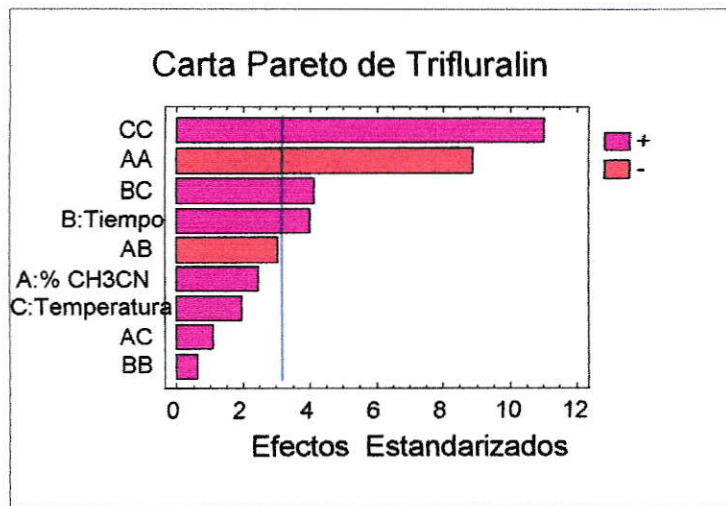
Los porcentajes de recuperación variaron entre 60,4 % y 76,8% para clorpirifos, 29,1 % y 65,3 % para trifluralin, 45,0 % y 106,2 % para triadimefon, 53,4 % y 97,3 % para metolaclor y de 0 % en el caso de malation

Para la construcción del modelo matemático empleado y la obtención de los niveles óptimos se deben considerar aquellos términos asociados a las interacciones de segundo orden y los términos cuadráticos que sean significativos para el modelo. El modelo lineal de segundo orden ajustado para obtener la superficie de respuesta estimada fue:

$$R = \beta_0 + \sum \beta_i \chi_i + \sum \beta_{ii} \chi_i^2 + \sum \sum \beta_{ij} \chi_i \chi_j + \varepsilon \quad (4.4)$$

Donde R es el porcentaje de recuperación de cada compuesto,  $\beta_i$  son los parámetros del modelo de los factores individuales,  $\beta_{ii}$  son los parámetros de los términos cuadráticos,  $\beta_{ij}$  son los parámetros de los términos de las interacciones y  $\varepsilon$  es un término que representa otras fuentes de variabilidad, que incluyen efectos tales como mediciones de error en la respuesta, fuentes de variación inherentes al sistema (ruido de fondo) y el efecto de otros factores no considerados. El tratamiento estadístico de  $\varepsilon$  asume una distribución normal, con varianza  $\sigma^2$  y media  $\mu = 0$  (Raymond y Douglas, 1995)

Nuevamente el análisis de varianza evalúa la significancia estadística de los factores, de esta forma se puede determinar si los factores son o no significativos a un nivel de confianza de 95 % ( $\alpha=0,05$ ).



**Figura 8: Carta Pareto y Superficie de Respuesta de Trifluralin**

En el caso de trifluralin los datos de la optimización no se ajustan bien al modelo escogido para representarlos (un polinomio de segundo orden) con un “lack-of-fit” de 0,011. Además el modelo solo explica el 61 % de las variaciones de la respuesta. La carta pareto muestra como significativo el término cuadrático de la temperatura, lo que significa que una temperatura más alta favorece la recuperación del compuesto. La



interacción tiempo - temperatura también tiene un efecto positivo en la recuperación, lo que es lógico dado que una mayor temperatura necesita un tiempo más prolongado para lograrla.

La superficie de respuesta estimada presenta una zona de recuperación con un valor máximo óptimo de 72% de recuperación para un 50% de acetonitrilo, con el tiempo máximo de 8 minutos y la temperatura máxima de 130 °C. Además el modelo matemático predice en los pasos ascendentes un 100% de recuperación para un 50 % de acetonitrilo, 7 minutos y 160° C

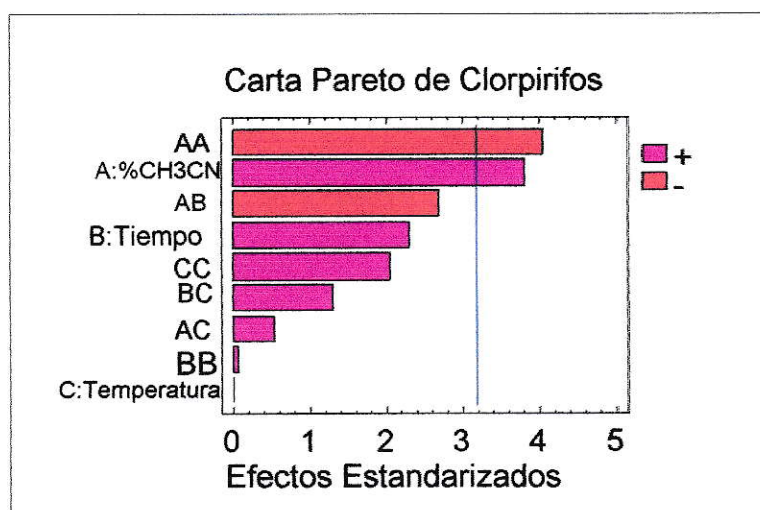
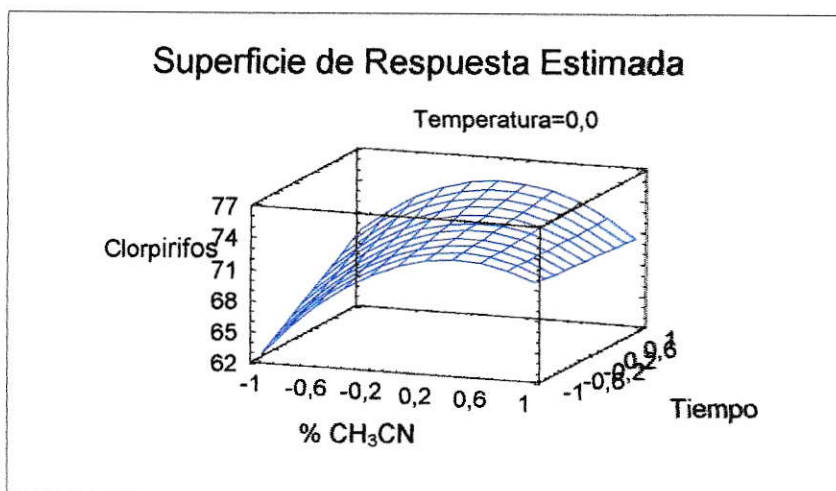


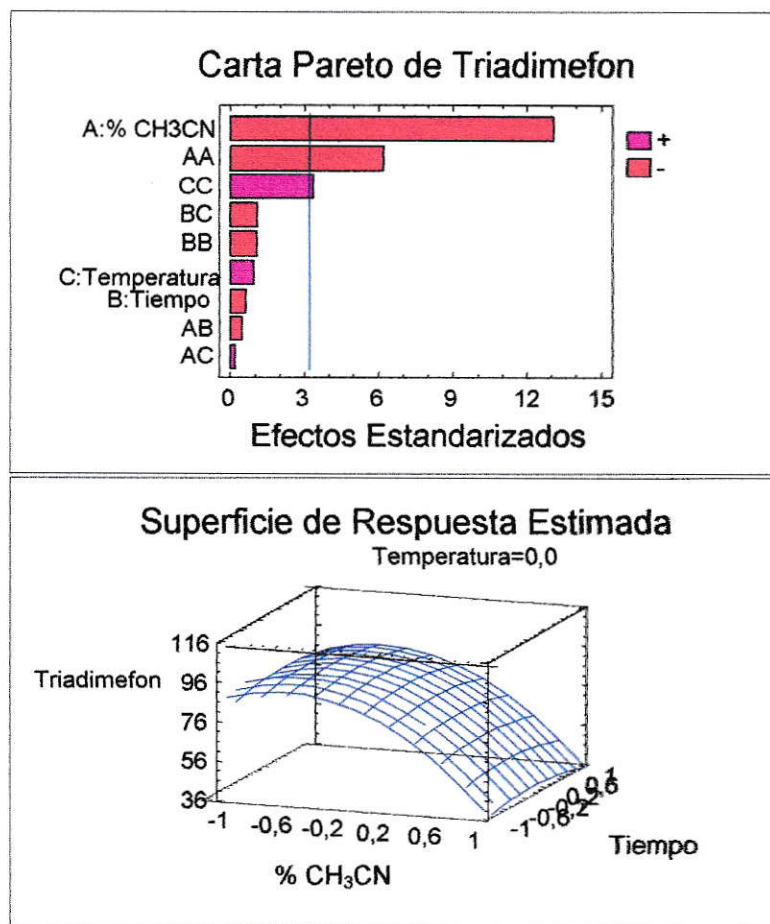
Figura 9: Carta Pareto de Clorpirifos



**Figura 10: Superficie de Respuesta de Clorpirifos**

En el caso de clorpirifos, los datos de la optimización se ajustan bien al modelo escogido para representarlos, ya que la carencia de ajuste presenta un valor de  $p > 0,05$ . Sin embargo el modelo sólo explica el 55% de las variaciones.

Según el ANOVA, solamente el porcentaje de acetonitrilo y su término cuadrático presentaron un efecto positivo significativo. Tal como se aprecia en la tabla 21, la extracción de clorpirifos fue superior a la de trifluralin, pero no se logró más de un 78% de recuperación. La superficie de respuesta entrega como valor óptimo un 77% de recuperación para un 50 % v/v de acetonitrilo, 8 minutos y 70° C. Además el modelo matemático predice en los pasos ascendentes un 88% de recuperación para un 50 % v/v de acetonitrilo, 9 minutos y 160° C

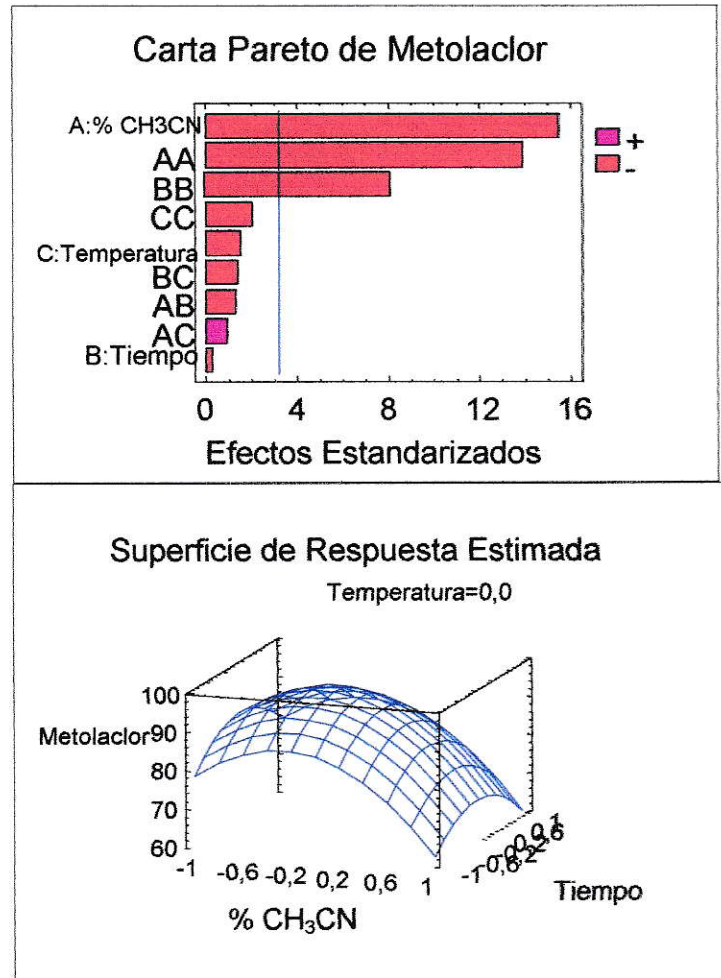


**Figura 11: Carta Pareto y Superficie de Respuesta de Triadimefon**

Para triadimefon, los datos de la optimización se ajustan bien al modelo escogido para representarlos, ya que la carencia de ajuste presenta un valor de  $p > 0,05$ . Además el modelo explica el 93% de la variación registrada.

Según el ANOVA, solamente el porcentaje de acetonitrilo y su término cuadrático presentaron un efecto negativo significativo. Tal como se aprecia en la tabla 21, la eficiencia en la extracción de triadimefon es muy dependiente de la presencia de acetonitrilo, ya que con un porcentaje de éste de un 75% la recuperación es sólo del 50% aproximadamente. Con porcentajes de acetonitrilo iguales o menores a 50% la

recuperación supera al 80%. La superficie de respuesta muestra una zona de recuperación máxima con un valor óptimo de un 100% de recuperación para un 37% de acetonitrilo, 4 minutos y 130° C. Además el modelo matemático predice en los pasos ascendentes un 89% de recuperación para un 50 % de acetonitrilo, 5 minutos y 100° C, es decir el centro del modelo



**Figura 12: Carta Pareto y Superficie de Respuesta de Metolactor**



Para metolaclor, los datos de la optimización se ajustan bien al modelo escogido para representarlos, ya que la carencia de ajuste presenta un valor de  $p > 0,05$ . Además el modelo explica el 95% de la variación registrada.

Según el ANOVA, solamente el porcentaje de acetonitrilo, su término cuadrático y el término cuadrático del tiempo presentaron un efecto negativo significativo. Tal como se aprecia en la tabla 21, y al igual que para triadimefon, la eficiencia en la extracción de metolaclor es muy dependiente de la presencia de acetonitrilo, ya que con un 75 % v/v la recuperación es sólo del 60% aproximadamente. Con porcentajes de acetonitrilo del 50% v/v la recuperación supera al 90%. La superficie de respuesta estimada muestra una zona donde se pueden obtener los valores óptimos de recuperación para un 43% v/v de acetonitrilo, 5 minutos y 93° C el valor sería del orden de 97 %. Además el modelo matemático predice en los pasos ascendentes un 94% de recuperación para un 50 % de acetonitrilo, 5 minutos y 100° C, es el centro del modelo.

En el caso de malation, éste no fue extraído bajo ninguna de las condiciones o su concentración en el extracto estuvo bajo el límite de detección. Por ello no pudo realizarse el análisis llevado a cabo con los otros compuestos. Ello está en concordancia con el hecho de que malation siempre resultó ser el compuesto de más difícil extracción, lo cual puede estar ligado a que éste se adsorbe fuertemente sobre las arcillas, haciendo muy difícil su extracción con el medio estudiado.

Hay que destacar que en este caso la contaminación se realizó retirando el excedente de la solución acuosa, mediante secado y conservando las muestras hasta cumplido el tiempo de residencia planteado por el diseño, lo cual tiene como objetivo igualar condiciones de campo en cuanto al manejo que se daría en la manipulación de muestras

reales. La recuperación en este caso es la del plaguicida adsorbido en el suelo y no la suma de éste más el remanente en la solución de equilibrio, como pudo suceder en el primer diseño experimental. Ello explica que a partir del segundo "Screening" la recuperación de malation disminuyera drásticamente, debido a que en tiempos mas prolongados de contacto entre los compuestos y las partículas de suelo, la adsorción se ve favorecida por la formación de enlaces más fuertes en micrositios de adsorción. (Dec y Bollag, 1997).

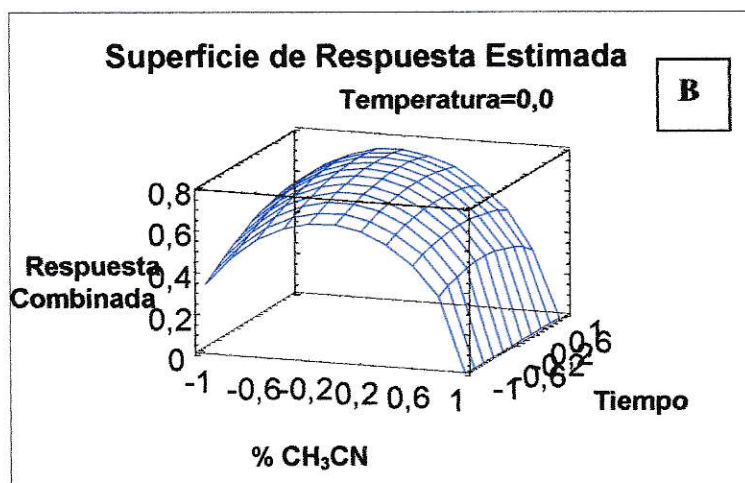
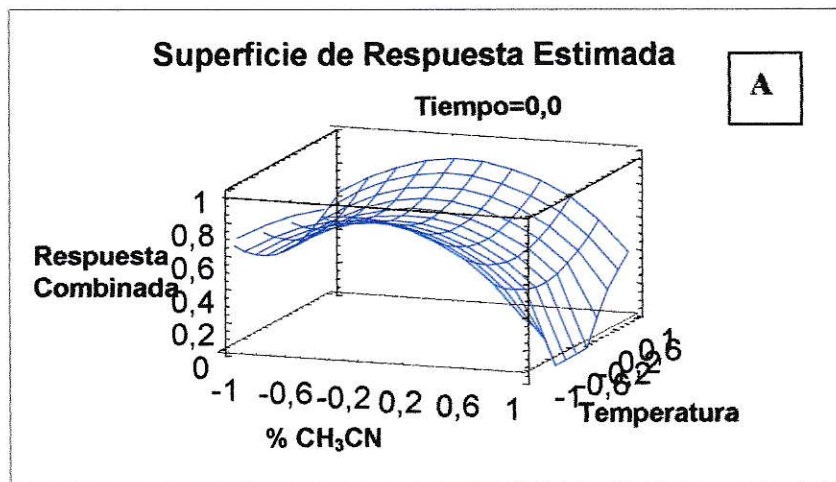
De acuerdo a los resultados anteriormente expuestos, es necesario llegar a una condición de compromiso entre las variables, que permita obtener los máximos porcentajes de recuperación para cada compuesto, en especial aquellos en que la recuperación no supera el 70%

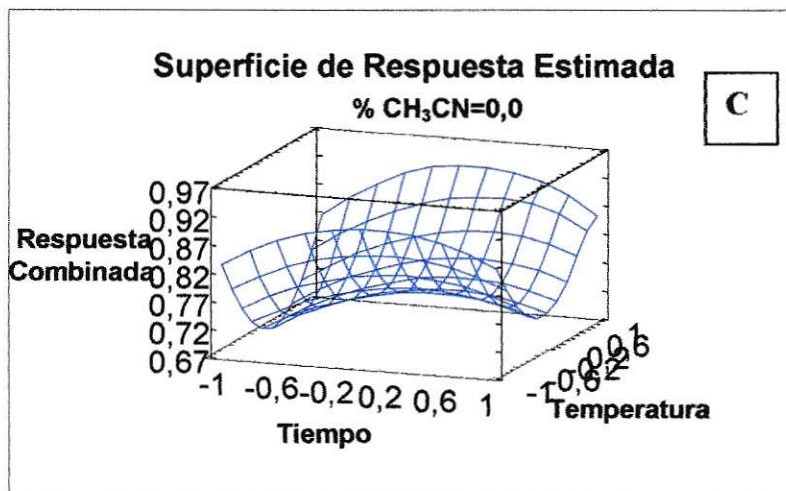
#### **4.12 Optimización múltiple**

Este análisis ayuda a determinar la combinación de factores experimentales cuyo valor permite obtener el máximo de extracción de todos los compuestos. Esto se logra mediante la maximización de una "Respuesta Deseable Combinada". El análisis múltiple predice como máxima extracción un 78% trifluralin, 78% clorpirifos, 100% triadimefon, 89% metolaclor; logrado bajo una condición de compromiso de 47% acetonitrilo, 5,3 minutos y 140°C

Si se observa la Tabla 21, se puede apreciar que el experimento 14 es el que se acerca al máximo deseable (60% trifluralin, 76% clorpirifos, 106% triadimefon y 97% metolaclor) correspondiente a 50% acetonitrilo, 5 minutos de extracción a 130° C.

Tal como se observa en la Figura 13, las máximas respuestas de compromiso se logran con un porcentaje de 50 % v/v de acetonitrilo, con temperaturas entre 100 y 130° C, siendo el tiempo un factor de menor importancia, pudiendo ir desde 5 a 8 minutos o más.





**Figura 13:** Superficies de Respuesta para la condición de compromiso de los cuatro plaguicidas, estimadas del diseño compuesto central y optimización múltiple. A: a tiempo extracción constante (5 min.), B: a temperatura extracción constante (100 °C) y C: a un porcentaje de acetonitrilo constante (% 50 v/v)

#### 4.12.1 Condición de Compromiso

Se seleccionó como condición experimental de compromiso 50 % v/v de acetonitrilo como medio extractante, 130 °C como temperatura máxima (a 900 W de potencia en el microondas). Si bien el tiempo no fue un factor significativo, se eligió 10 min para mantener estas condiciones estables durante un tiempo mayor. Bajo estas condiciones se extrajeron los compuestos desde los suelos estudiados.



**Tabla 22: Porcentajes de recuperación obtenidos bajo la condición de compromiso para los 5 compuestos en cada uno de los suelos en estudio.**

	Pocuro	Quillota	Vilcún
<b>Trifluralin</b>	58 ± 3	63 ± 2	71 ± 1
<b>Clorpirifos</b>	100 ± 7	89 ± 6	101 ± 4
<b>Triadimefon</b>	98 ± 5	93 ± 3	92 ± 3
<b>Metolaclor</b>	90 ± 8	99 ± 3	103 ± 5
<b>Malation</b>	17,2 ± 0,4	14,8 ± 0,4	0,0

La condición de compromiso aplicada permite obtener resultados óptimos de recuperación para clorpirifos, triadimefon y metaloclor, lo que permite validar el método de extracción propuesto, ello se ha logrado considerando que estos compuestos representan a familias químicas distintas, su comportamiento como contaminantes en suelos de naturaleza diversa y la forma de contaminación a nivel residual que reproducen las condiciones de campo.

Al observar la Tabla 22 se aprecia que trifluralin presenta porcentajes de recuperación inferiores al 90 % lo cual esta estrechamente ligado al tipo de adsorción que tienen los suelos respecto de este compuesto. Shen y col. (2001) han observado que plaguicidas de baja polaridad pueden ser eficazmente adsorbidos en la materia orgánica del suelo o en las arcillas. El tipo de adsorción estaría estrechamente ligado al tipo de arcilla y a las propiedades del plaguicida. Estructuras planas de tipo aromáticas sustituidas favorecerían la adsorción sobre arcillas, debido a que los sustituyentes unidos al anillo aromático serían los responsables de retirar densidad de carga electrónica al anillo y de esta forma favorecerían la formación de un complejo dador-aceptor de electrones por

parte de la molécula aromática la cual formaría un enlace con las moléculas de siloxano correspondiente a las arcillas.

No se descarta pérdida por volatilidad del compuesto en el proceso de extracción, puesto que trifluralin es el que presenta la presión de vapor mas alta de todos los compuestos en estudio (ver Tabla 1) y puede que parte de lo que no se extrae sea debido a la perdida por volatilidad.

Malation resultó ser el compuesto de menor recuperación en todas las experiencias realizadas, lo que nos indica que el método de extracción propuesto en este caso no es aplicable. Los bajos porcentajes de recuperación obtenidos obedecen a la fuerte adsorción sobre la fracción mineral del suelo. Padrón Sanz y col. (2005) realizaron estudios de extracción micelar de organofosforados en suelos agrícolas con la asistencia de microondas. Malation era uno de los compuestos en estudio, obtuvieron bajas recuperaciones de este compuesto en muestras sometidas a diferentes tiempos de residencia, e incluso en el período de un mes de residencia la recuperación fue nula, lo que ellos atribuyen a una fuerte asociación a la fracción fina del suelo.

#### **4.12.2 Aplicación del método de extracción propuesto**

La extracción bajo la condición de compromiso a la cual se llegó fue aplicada a un cuarto suelo de uso agrícola proveniente de la VI región. El suelo Rancagua (RCG) contiene un 4,3 % MO, un 39,4 % de arena, un 44,9 % de limo y un 15,7 % de arcilla, lo que permite clasificarlo como un suelo franco.

El suelo RCG fue obtenido de un predio de cultivo de manzanas, en el cual se aplica clorpirifos para el control de insectos y parásitos. El objetivo de utilizar este suelo fue

evaluar la eficacia del método de extracción propuesto determinando los niveles residuales que pudiesen existir y a la vez utilizar muestras contaminadas con los compuestos en estudio para comparar los resultados obtenidos en los diferentes suelos. Ya que en el sitio donde se recolectó, el suelo se aplica clorpirifos, se llevó a cabo la extracción del suelo sin contaminar experimentalmente en triplicado para evaluar su presencia.

En la Tabla 23 se muestran las recuperaciones obtenidas en el suelo RCG y en la Figura 14 se muestran los cromatogramas obtenidos para este suelo. El cual se observa muy similar al patrón lo que refleja la limpieza del método.

Cabe destacar que el tratamiento de las muestras fue realizado según el procedimiento descrito en la sección 3.6.15.

**Tabla 23: Recuperación de los compuestos obtenidos bajo la condición de compromiso en el suelo Rancagua**

	Clorpirifos	Trifluralin	Triadimefon	Metolaclor
<b>RCG (%)</b>	80 ± 3	71 ± 1	85 ± 7	103 ± 5
<b>RCG<sup>a</sup></b>	< 0,02	ND <sup>b</sup>	ND <sup>b</sup>	ND <sup>b</sup>

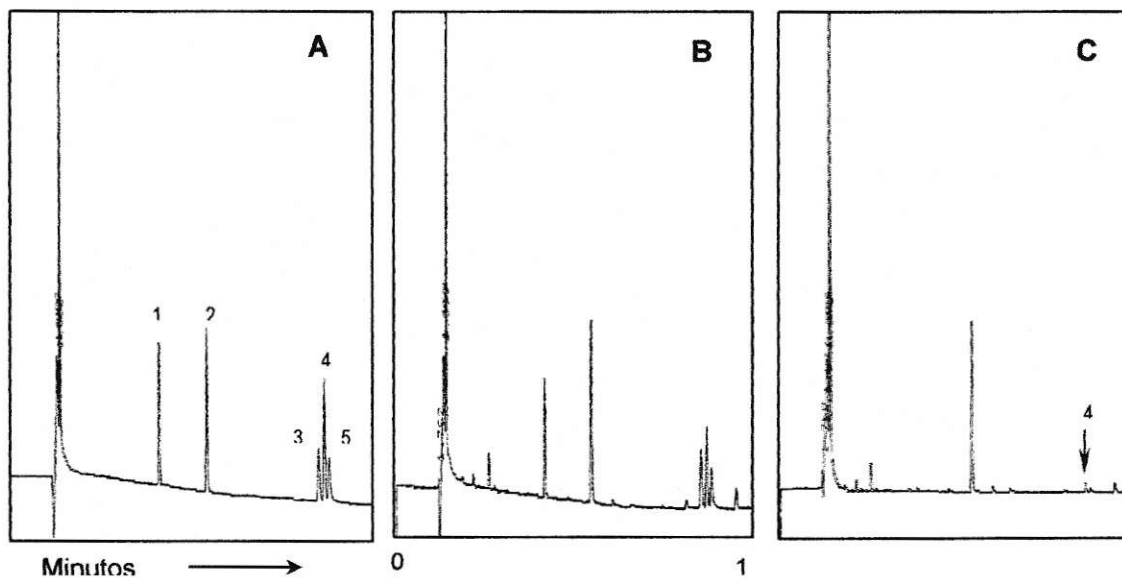
a: Contenido residual detectado µg/g

b: No detectado

Las recuperaciones obtenidas en este suelo, muestran una similitud con respecto a los tres suelos estudiados anteriormente, los porcentajes se acercan a los determinados en el suelo QLT, con excepción de clorpirifos y triadimefon en los cuales la recuperación es un poco menor.



Se detectó sólo clorpirifos como plaguicida a nivel residual. Esto refleja el uso de estos compuestos como controladores fitosanitarios. Según la declaración de ventas de plaguicidas en el 2003 del servicio agrícola y ganadero (SAG), clorpirifos presenta el volumen más alto de ventas de insecticidas en la región de Rancagua.



**Figura 14:** Cromatogramas obtenidos en GC-ECD para (A) un patrón de  $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$  de los plaguicidas: 1. trifluralin, 2. PCNB (patrón interno  $0,05 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), 3. metolaclor ( $0,4 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), 4. clorpirifos y 5. triadimefon. (B) Extracto de suelo Rancagua contaminado con los mismos plaguicidas a  $0,1 \mu\text{g g}^{-1}$  ( $0,4 \mu\text{g g}^{-1}$  metolaclor). (C) extracto de suelo Rancagua sin contaminar.

Los resultados obtenidos bajo la condición de compromiso en el suelo RCG, validan el método de extracción propuesto para la recuperación de trifluralin, clorpirifos, triadimefon y metolaclor.



## V. CONCLUSIONES

- ❖ El método analítico desarrollado permite extraer clorpirifos, triadimefon y metolaclor con una recuperación mayor al 90% en los 3 suelos estudiados.
- ❖ Si bien el método analítico desarrollado permite determinar trifluralin en los 3 suelos estudiados, su recuperación no es cuantitativa debido a que parte de este compuesto puede ser adsorbido en la fracción mineral del suelo. Sin embargo, no se descarta pérdidas que se pueden atribuir a su volatilidad en el proceso de extracción o bien su degradación durante el tiempo de residencia en el suelo.
- ❖ La extracción procede más bien por la disolución de los compuestos en el medio extractante seguido del reparto en n-hexano.
- ❖ El método analítico desarrollado no es adecuado para determinar y cuantificar la presencia de malation en los 3 suelos en estudio.
- ❖ La fracción orgánica favorece la recuperación de los compuestos en especial en el caso de trifluralin y clorpirifos.
- ❖ No solo la materia orgánica del suelo es responsable de la adsorción de compuestos de baja polaridad. La fracción mineral también tiene un aporte importante a la hora de ofrecer sitios de adsorción.
- ❖ Los factores masa de suelo y tiempo de residencia influyen negativamente en la recuperación de los plaguicidas en estudio.
- ❖ Triadimefon y metolaclor son compuestos que se recuperan sin grandes problemas, la condición de extracción es que el porcentaje de acetonitrilo en el extractante acuoso sea menor o igual al 50 % v/v.

- ❖ La disolución extractante agua-acetonitrilo permite la recuperación de compuestos de diferente polaridad y el posterior reparto en hexano evitando un proceso de limpieza previo al análisis por GC.
- ❖ El método desarrollado permite reducir el consumo de disolvente orgánico y tiempo de extracción. Así, el método de extracción asistido por microondas con detector ECD proporciona un método simple, selectivo y sensible para determinar los plaguicidas hidrófobos a un nivel de concentración de  $\mu\text{g g}^{-1}$  en diferentes tipos de suelos.
- ❖ El método de extracción desarrollado fue aplicado con buenos resultados al suelo RCG, en el cual se detectó un nivel residual de clorpirifos demostrando con ello la eficacia y validez del mismo.

### **Consideraciones Finales**

El diseño experimental utilizado en el desarrollo de este trabajo ha permitido obtener el máximo de información posible respecto de las interacciones entre los distintos factores que influirían en la extracción, minimizando significativamente el número de experimentos y conduciendo a una optimización efectiva teniendo en cuenta la naturaleza multivariada del problema a resolver. Por otra parte, la simulación de las condiciones de campo en cuanto a la forma de contaminación y las concentraciones de los compuestos a un nivel de residuos otorgan a este trabajo una mayor validez científica frente a otros trabajos abundantes en la literatura y que no consideran estos aspectos.

## VI. BIBLIOGRAFIA

Báez, M.E., Aponte A., Sánchez Rasero F. 2003. Microwave-assisted solvent extraction of the herbicide methabenzthiazuron from soils and some soil natural organic and inorganic constituents. Influence of environmental factors on its extractability. *Analyst. Rev.*128: 1478-1484.

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

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

Budzinski H., Letellier M., Garrigues P. and Le Menach K. 1999. Optimisation of the microwave-assisted extraction in open cell polycyclic aromatic hydrocarbons from soils and sediments. Study of moisture effect, *J. Chromatogr. Rev.* 837: 187 – 200.

Calderón M. J., Hermosín M. C., Cornejo J. y Moreno F. 1999. “Movilidad de trifluralina en laboreo tradicional y de conservación”, In *Estudios de la Zona No Saturada del Suelo*. Eds. R. Muñoz-Carpena, A. Ritter, C. Tascón. ICIA, Tenerife, Spain, Pp 83 – 88.

Chiou, C.T., Peters L. J. and Freed V. H. 1979. A physical concept of soil-water equilibria for non-ionic organic compounds. *Science Rev.* 206: 831-832.



Conte E., Milani R., Morali G. y Abballe F. 1997. Comparison between accelerated solvent extraction and traditional extraction methods for the analysis of the herbicide diflufenican in soil. *J. Chromatogr. A. Rev.* 765:121 – 125.

Cuadros, L., García, A., Jiménez, C. and Román, M. 1993. Estimation of performance characteristics of an analytical method using the data set of the calibration experiment. *Analytical Letters. Rev.* 26:1243-1258.

Dean, J. and Xiong, G., 2000. Extraction of organic pollutants from environmental matrices: Selection of extraction technique. *Trends in analytical Chemistry. Rev.* 19: 553-564.

Dean J. R., Barnabas I. J. y Owen S. P. 1996. Influence of pesticide–soil interactions on the recovery of pesticides using supercritical fluid extraction. *Analyst. Rev.* 121: 465-468.

Dec J. and Bollag, J.M. 1997. Determination of covalent and non covalent binding interactions between xenobiotic chemicals and soil. *Soil Sci. Rev.* 162: 858 – 874.

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

During R. A., Zhang X., Hummel H. E., Czynski J. and Gath S. 2003. Microwave-assisted steam distillation with simultaneous liquid/liquid extraction of pentachlorophenol from organic waste and soils. *Anal. Bioanal. Chem. Rev* 375: 584-.588

Gee, G.W., and Bauder. 1986. Particle size analysis, In: *Methods of soils analysis, Part 1*, A. Klute (ed.), Agronomy N° 9, 2<sup>nd</sup> ed. Amer. Soc. of Agron., Inc., Soil Sa. Soc. of Amer. Madison, Wisc. Pp 404-409.

Giles, C. H., Smith D. and Huitson J. 1974. A general treatment and classification of the solute adsorption isotherm. I. Theoretical. *J. Colloid Interface Sci. Rev.* 47:755-765.

Hawthorne S. B. y Millar D.J.1994.Direct Comparison of Soxhlet and Low- and High-Temperature Supercritical CO<sub>2</sub> Extraction Efficiencies of Organics from Environmental Solids. . *Anal. Chem. Rev.* 66: 4005-4012.

Kim J. H and Feagley S. E. 1998. Adsorption and leaching of trifluralin, metolachlor and metribuzin in a commerce soil. *J. Environ. Sci. Health B33 Rev.* 5: 529-546.

Molins C., Hogendoorn E. A., Heusinkveld H. G. A., Van Zoonen P. and Baumann R. 1997. Microwave assisted solvent extraction (MASE) of organochlorine pesticides from soil samples. *Int. J. Environ. Anal. Chem. Rev.* 68: 155 – 169.

Numata M., Yarita T., Aoyagi Y. and Takatsu A. 2003. Microwave-assisted steam distillation for simple determination of polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides in sediments, *Anal. Chem. Rev.* 75: 1450-1457.

Olea N. and Fernandez M.F. 2001. Implementación del convenio de contaminantes organicos persistentes. Madrid, pp 26-27.

Padrón Sanz C., Halko R., Sosa Ferrera Z. and Santana Rodríguez J.J. 2005. Combination of microwave assisted micellar extraction and liquid chromatography for the determination of organophosphorous pesticides in soil samples. *J. Chromatogr. A. Rev.* 1078: 13 – 21.

Raymond H. Myers y Douglas C. 1995. Montgomery. Response Surface Methodology. Process and Product Optimization Using Designed Experiments. Wiley-Intescience Publication, John Wiley and Sons, USA.

Raymond J.H. 1991. The Pesticide Manual, 9<sup>th</sup> Edition. Pp 166, 524, 648, y 851.

Servicio Agrícola y Ganadero de Chile (SAG). 2003. Declaración de Ventas de Plaguicidas. Subdepartamento de Plaguicidas y Fertilizantes. Pp 47 – 58.

Sheng G., Johnston C.T., Teppen B.J. and Boyd S.A. 2001. Potential contribution of smectite clays and organic matter to pesticide retention in soils. J. Agric. Food Chem. Rev. 49: 2899-2907.

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

## VII. APENDICE

### Cálculo de los parámetros de la isoterma de adsorción de Freundlich

Para la obtención de los parámetros, se utilizó el modelo matemático de Freundlich.

$$C_s = K_f * C_e^{1/n}$$

donde;

$C_s$  = Cantidad de sustancia adsorbida por unidad de masa de adsorbente

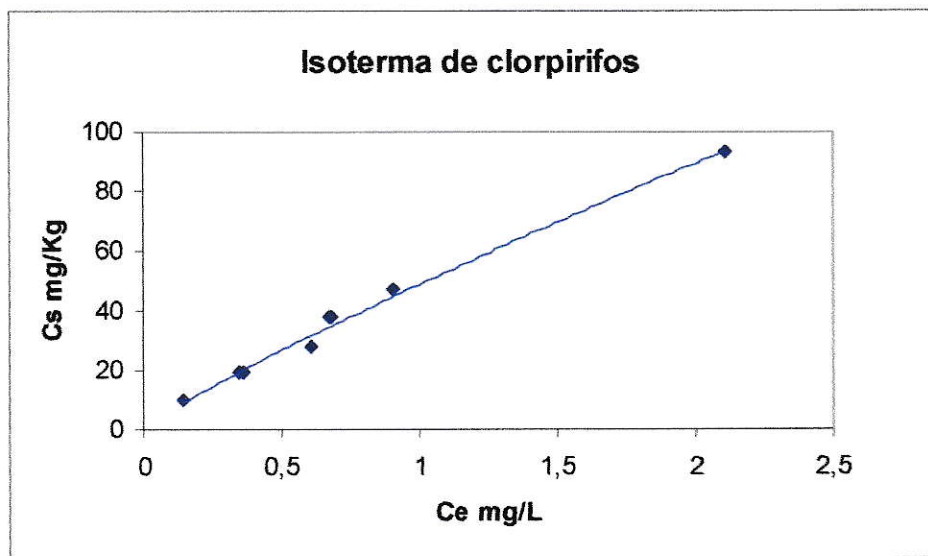
$C_e$  = Concentración del plaguicida en el equilibrio

$K_f$  y  $1/n$  son constantes empíricas de cada sistema

Para obtener  $K_f$  se graficó, en todos los casos, la concentración en equilibrio del compuesto en fase acuosa ( $C_e$ ) versus la concentración del mismo adsorbida por el suelo ( $C_s$ ).



**Ejemplo:** Para determinar la isoterma de clorpirifos se realizo un ajuste potencial de los datos, lo cual nos permite obtener en forma inmediata la constante  $K_f$



$$C_s = 48,781 \times C_e^{0,873}$$

$$R^2 = 0,9827$$

La pendiente es:  $1/n = 0,873$  y el valor de  $K_f = 48,781$

**Construcción de modelos empíricos a partir del diseño experimental y pruebas de importancia de efectos.**

Los modelos empíricos contruidos a partir del diseño de experimentos consideran la respuesta medida ( $y$ ) y los factores que afectan a dicha respuesta ( $x_i$ ). En general se obtienen modelos lineales del tipo:

$$y = \beta_0 + \sum \beta_i x_i + \varepsilon$$

Donde  $\beta_i$  = coeficientes de regresión,  $\varepsilon$  = término asociado al residuo

Estos modelos permiten evaluar el efecto de factores individualmente. Sin embargo, también es posible evaluar el efecto de las interacciones entre factores, con lo cual el modelo resulta ser:

$$y = \beta_0 + \sum \beta_i x_i + \sum \sum \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon$$

La obtención de los coeficientes de regresión se realiza mediante un análisis matricial que contempla el vector de medidas ( $Y$ ) y la matriz de niveles ( $X$ ), de manera que:

$$\beta_i = (X' X)^{-1} X' y_i \quad X' : \text{matriz transpuesta}, X^{-1} : \text{matriz inversa}$$

Es decir  $\beta_i = \sum (y_i \times \text{columna } x_i) / n \text{ experimentos diseño}$

**Ejemplo:** Determinación del coeficiente de regresión asociado al efecto de la temperatura sobre la extracción de clorpirifos (primer screening). La matriz del diseño se encuentra en la Tabla 3 y la respuesta correspondiente en la Tabla 4

Experimento	$x_1$ (temperatura)	y (recuperación)
1	1	89,7
2*	0	67,1
3	-1	65,3
4	-1	87,9
5	1	80,6
6*	0	67,8
7*	0	70,7
8	1	72,6
9	-1	54,3
10	1	63,0
11*	0	71,4
12	-1	66,5

(\*) Experimentos centrales

$$\beta_{\text{temperatura}} = (89,7 - 65,3 - 87,9 + 80,6 + 72,6 - 54,3 + 63,0 - 66,5) / 8 = 3,9875$$

$$\beta_{\text{temperatura}} = 3,9875 \text{ Coeficiente de regresión, para } 0 \leq x \leq 1$$

$$e\beta_{\text{temperatura}} = 2(3,9875) = 7,975 \text{ Efecto estimado, para } -1 \leq x \leq 1$$

Para determinar si un efecto estimado sobre la extracción es significativo, se realiza una prueba que compara los cuadrados medios del efecto y del error experimental (prueba F).

Si el valor F obtenido tiene un valor de p asociado  $< 0,05$  (95% probabilidad), ello indica que el efecto es significativo.

$$F = (\text{cuadrado medio } e\beta_i) / (\text{cuadrado medio error experimental})$$

$$F = \frac{[ (n (e\beta_i)^2) / 4 ] / 1 \text{ grado de libertad}}{[ \Sigma (y_{i0} - \text{prom } y_0)^2 ] / n_0 - 1 \text{ grados libertad}}$$

Donde n : número experimentos diseño

$e\beta_i$  : efecto estimado

$y_{i0}$  : respuesta experimentos centrales replicados

prom  $y_0$  : respuesta promedio experimentos centrales

$n_0$  : número de réplicas experimento central

**Ejemplo:** evaluación importancia del efecto de la temperatura sobre la extracción de clorpirifos

$$F = \frac{[(8 (7,975)^2) / 4] / 1}{[13,45] / 4 - 1} = 28,37$$

Valor de p para  $F = 28,37$  (95% probabilidad) = 0,0129

Como  $p < 0,05$  entonces el efecto de la temperatura es significativo