

Universidad de Carabobo
Facultad Experimental de Ciencias y Tecnología
Departamento de Química



**DETERMINACIÓN DE PLAGUICIDAS ORGANOCORADOS EN SUELOS
AGRICOLAS MEDIANTE GC-MS.**

Implementación de un Procedimiento Validado

Trabajo Especial de Grado para optar al título de Licenciado en Química.

Presentado por: Br. Jeanfranco A. Hernández T.

Tutor: Dr. José R. Jiménez O.

Valencia, Mayo de 2011

INDICE GENERAL

LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABLAS	x
INTRODUCCION	1
1. CAPITULO I. El Problema	3
PLANTEAMIENTO Y JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA	3
SITUACIÓN ACTUAL y SITUACIÓN DESEADA.	4
1.3 OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN	5
1.3.1 Objetivo General	5
1.3.2 Objetivos Específicos	5
1.4 ALCANCE DE LA INVESTIGACIÓN	6
2. CAPITULO II. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA	6
2.1 PESTICIDAS	8
2.1.1 Clasificación de los plaguicidas según su uso	8
2.1.2 Herbicidas	9
2.1.2.1 Triazinas	9
2.1.2.1.1 Atrazina	9
2.1.2.1.2 Simazina	11
2.2 MUESTREO	12
2.2.1 Cuidados y Consideraciones al muestrear Suelo	12
2.2.2 Tipos de Muestreo de Suelo	12
2.2.3 Validación de métodos para muestrear suelo	13
2.3 METODOS DE EXTRACCION DE PLAGUICIDAS	13
2.3.1 Técnicas Clásicas.	14
2.3.2 Extracción Líquida Presurizada (Presurised Liquid Extraction, PLE)	14
2.3.3 Extracción con Fluidos Supercríticos (Supercritical Fluid Extraction SFE).	14
2.3.4 Extracción Asistida por Microondas (Microwave Assisted Extraction MAE)	15
2.3.5 Extracción Ultrasónica (Sonication).	15
2.4 CONCEPTOS ASOCIADOS AL PROCESO DE VALIDACIÓN Y LA TÉCNICA DE CROMATOGRAFÍA ACOPLADO A ESPECTRÓMETRO DE MASAS.	15
2.4.1 Validación.	15
2.4.1.2 Necesidad Analítica (método).	15
2.4.1.3 Puesta a Punto.	16
2.4.1.4 Elección de parámetros de validación. Fijación de parámetros.	16
2.4.1.5 Diseño Experimental y Estadística.	17
2.4.1.6 Calibración Instrumental	17
2.4.1.7 Metodología de la Calibración Analítica	18
2.4.2 Tratamiento Estadístico de Datos Obtenidos	18
2.4.2.1 Selectividad – Especificidad	18
2.4.2.2 Sensibilidad	19
2.4.2.3 Límite de Detección en Métodos Cromatográficos	19
2.4.2.4 Límite de Cuantificación	19
2.4.2.5 Función de Respuesta del método	20

2.4.2.6 Intervalo de Trabajo Validado	20
2.4.2.7 Exactitud	20
2.4.2.8 Incertidumbre	21
2.4.2.8.1 Incertidumbre Estándar	22
2.4.2.9 Precisión	23
2.4.2.9.1 Precisión Intermedia	23
2.4.2.10 Repetibilidad	23
2.4.2.11 Reproducibilidad	24
2.4.2.12 Contraste de significación.	24
2.4.2.12.1 Contraste de significación para el Coeficiente de Correlación de Pearson.	25
2.5. PLANTEAMIENTO DEL MÉTODO.	26
2.5.1 Cromatografía de gases/Espectrometría de masas (GC/MS) en el análisis de plaguicidas.	26
2.6 ANTECEDENTES	27
2.6.1 Desarrollo y validación de un método multiresiduo rápido para la determinación de mezclas de pesticidas utilizando cromatografía de gases-espectrometría de masas: Un caso real en suelos de viñedos.	27
2.6.2 Determinación de multiresiduos de pesticidas en suelo por cromatográfica de gases espectrometría de masas.	28
2.6.3. Diversos estudios en Venezuela que confirman la pertinencia de la investigación y la existencia en altos niveles de pesticidas, en diferentes matrices y estados del país.	28
3. CAPITULO III. MARCO METODOLOGICO	31
3.1 ASPECTOS GENERALES	32
3.1.1 Estrategia Metodológica	32
3.2 MATERIALES y EQUIPOS.	32
3.2.1 Materiales para la Extracción y Muestreo.	32
3.2.2 Equipo de Cromatografía de Gases/Espectrometría masas	32
3.3 MUESTREO	33
3.4 TRATAMIENTO DE LA MUESTRA.	35
3.4.1 Extracción de los Plaguicidas a Estudiar	35
3.5 ANALISIS POR CROMATOGRAFÍA DE GASES.	39
3.5.1 Matriz de Selección para determinar el método cromatográfico	39
3.5.2 Desarrollo del Método Cromatográfico	42
4. CAPITULO IV. ANALISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	45
4.1 Caracterización del Suelo	45
4.2 PUESTA A PUNTO DEL METODO CROMATOGRAFICO	45
4.2.1 Mejora en la Resolución Cromatográfica	45
4.2.2 Implementación de la Técnica de Monitoreo Selectivo de Iones	47
4.3 ANÁLISIS DE RESULTADOS DE LOS PARÁMETROS ESTADÍSTICOS EVALUADOS EN LOS MÉTODOS	48
4.3.1 Límite de detección y Cuantificación.	49

4.3.2 Intervalo de trabajo	49
4.3.3 Estudio de la Linealidad	51
4.3.4 Análisis de exactitud	52
4.3.5 Precisión del método	53
4.3.6 Sensibilidad	54
4.3.7 Medición de Muestras Reales	55
CONCLUSIONES	58
RECOMENDACIONES	60
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	61
Apéndice A	67
Apéndice B	71



LISTA DE FIGURAS

FIGURA	pag
1. Clasificación de los plaguicidas según su uso	9
2. Estructura de la Atrazina	11
3. Estructura de la simazina	11
4. Esquema metodológico general	31
5. Esquema de extracción Soxhlet	38
6. Cromatograma obtenido en esta investigación, previo a la optimización de los parámetros cromatográficos.	46
7. Separación lograda con el método optimizado en esta investigación.	47
8. Estudio del comportamiento lineal de la curva de calibración de la atrazina.	50
9. Estudio del comportamiento lineal de la simazina	51
10. Curva de calibración promedio para la determinación de atrazina y simazina empleando cromatografía de gases/Espectrometría de masas.	52
11. Cromatograma del suelo agrícola por la técnica de corriente total de iones.	56



LISTA DE TABLAS

TABLA

1. Ubicación de cada unidad de muestreo de suelo de referencia y suelo agrícola.	34
2. Escala empleada para evaluar el factor de ponderación	35
3. Comparación de los criterios en la matriz de pares	36
4. Comparación de las opciones de acuerdo al criterio equipos	36
5. Comparación de las opciones de acuerdo al criterio costos	36
6. Comparación de las opciones de acuerdo al criterio cantidad reactivos	37
7. Matriz final en la que se concluye la selección del método de extracción	37
8. Escala empleada para evaluar el factor de ponderación	39
9. Comparación de las opciones de acuerdo al criterio resolución cromatográfica	40
10. Comparación de las opciones de acuerdo al criterio señal/ruido	40
11. Comparación de las opciones de acuerdo al criterio tiempo de corrida	41
12. Matriz final en la que se concluye la selección del método de extracción	41
13. Condiciones cromatográficas del método empleado en este trabajo	42
14. Propiedades del suelo de referencia utilizado en la validación y el suelo agrícola	45
15. Tiempo de Retención e iones hallados por la técnica de monitoreo selectivo de iones SIM	48
16. Límite de detección y cuantificación obtenidos de la validación para la atrazina y la simazina.	49
17. Intervalos de trabajo para la determinación de Atrazina, Simazina en muestras de suelo agrícola.	50
18. Coeficientes de correlación (r) para los resultados experimentales obtenidos del método	52
29. Porcentaje de recuperación obtenido para la atrazina y la simazina	53
20. Resultados de la repetibilidad del método validado	54



Universidad de Carabobo
Facultad Experimental de Ciencias y Tecnología
Departamento de Química

**DETERMINACIÓN DE PLAGUICIDAS ORGANOCOLORADOS EN SUELOS
AGRICOLAS MEDIANTE CG-EM.**

Implementación de un Procedimiento Validado

Autor: Br. Jeanfranco A. Hernández T.

Tutor: Dr. José R. Jiménez O.

Año: 2011

RESUMEN

Actualmente existe una problemática epidemiológica en el municipio Libertador del Edo. Aragua, las autoridades presumen que se deba a la presencia excesiva de plaguicidas organodorados en los suelos agrícolas de la región. Por esto, en el Laboratorio de Servicios Analíticos y de Investigación (LABSAI-UC), se decide generar una respuesta que permita darle una solución a este problema de importancia nacional. Para esto, se validó un procedimiento que permite determinar plaguicidas organodorados, específicamente, atrazina y simazina en suelos agrícolas. Partiendo del muestreo, el posterior tratamiento de la muestra y extracción, hasta el análisis y cuantificación por CG-EM. Para esto se tomaron muestras de suelo que fueron de uso agrícolas, y muestras de suelo que actualmente son de producción agrícola y que se sabe se encuentran en contacto con estos plaguicidas. Luego se trataron las muestras según el método EPA3540C que implica la manipulación de la muestra fresca y tamizado a 2mm, para la posterior extracción a través del método Soxhlet. Finalmente se realizó el análisis por cromatografía de gases acoplado a un espectrómetro de masas. El método validado consta de un intervalo lineal entre los 0,05ppm-0,25ppm, un porcentaje de recuperación del $(100\pm 1)\%$, y un límite de detección para la atrazina y simazina de 0,002ppm y 0,014ppm, respectivamente. En cuanto al suelo agrícola analizado, no se detectaron la atrazina ni la simazina. A pesar de que el método tiene las prestaciones necesarias para detectar este tipo de compuestos.



DEDICATORIA.

Al señor que es el responsable de mi carácter, de mi forma de ser, de mi naturaleza curiosa, pacífica y tranquila; me cuidaba de niño y fue un gran amigo. Mi abuelo Rafael, para mí el único ser que tiene un puesto seguro en el cielo, y me demostró que el ser bondadoso y excelente ser humano trae muy buenos resultados, te quiero y extraño mucho abuelito.



AGRADECIMIENTOS

A Dios todopoderoso, a Jesucristo el salvador y redentor, por darme la vida, las fuerzas para seguir, la seguridad, la paz, las bendiciones y todo lo que he necesitado durante toda la vida. ¡Gracias Señor!

A mis padres Alida y Wixson, por darme todo, toda la vida, por apoyarme económicamente y respetar gran parte de mis decisiones, por darme sus sabios consejos y comprenderme en los momentos mas difíciles, sin ustedes no hubiese sido posible. ¡GRACIAS!

A Eliana mi mejor amiga y compañera, por estar ahí durante los momentos mas difíciles, sobretodo en la realización de este trabajo, somos un buen equipo y ¡lo logramos!

Al tutor José Jiménez por haber creído en mí desde tercer año y darme la oportunidad de aprender tantas cosas. Por sus consejos y por que siempre apoyó mis decisiones aunque no le gustasen.

Al gran amigo y para mi cotutor de este trabajo Víctor Pérez, por que siempre estaba ahí para felicitar pero también para corregir los errores, por ayudarme a muestrear, por sus consejos, charlas y experiencias, por el apoyo y la alegría necesaria en muchos momentos, gracias estimado.

Al jurado evaluador de este trabajo los profesores Arnaldo Armado y Jorge Briceño por sus pertinentes correcciones y su buena disposición durante toda la investigación.

A los profesores David Vega y José Parra, por ser amigos, por ser maestros, por los buenos momentos, por los consejos y la guía; y especialmente al Prof. David por su gran ayuda en fisicoquímica, se lo agradeceré eternamente profesor.



A los compañeros que en cada año que fue pasando fueron muy importantes Orlando Castillo, Juan M. Arismendi, Caterin Sánchez, Rossannie Guasamucare, William Blanco, Jonathan Yépes, Kenya Guzmán, Alejandra Cáceres, Victoria Maurera, Chepe, Ángel Camejo y el que estuvo en todos los años el compadre José V. Bustamante, gracias compañeros y colegas.

A los profesores que marcaron mi formación, haciendo de mi el químico que soy hoy, Ruth Álvarez, Daniel Arias, Xiomara Cardozo, Henry Labrador, José Guaregua, Miguel A. Luis, Juan C. Pereira, Arnaldo Armado, Ronald Blanco, Reina Loaiza, María A. Alvarado y Ángel López.

A los laboratorios de Orgánica y Físicoquímica, que a través de Lesbia Martínez y Beatriz Moy, fueron fundamentales en mi formación. Por ser comprensivas en todo momento y ayudarme aunque fuese una tontería. Por su aporte en cuanto espacio y equipos para la realización de este trabajo; gracias señoras.

A los laboratorios de Alimentos y Petróleo Hidrocarburos y Derivados, que a través de Victoria Maurera, Humberto Martínez y Bari Agüero, fueron de gran apoyo. Por la compañía en momentos de soledad, por prestar los equipos de extracción, por el gran aporte a la realización de este trabajo. A los laboratorios de Química General e investigaciones Bioquímicas, que a través de Dioletis González y Sickleb Noguera hicieron posible la caracterización del suelo realizada en este trabajo, gracias.

Al Lic. Juan Uztariz, de la Dirección General de Salud Ambiental, por su apoyo al momento de muestrear, por sus buenas intenciones y guía desde el principio de la investigación. A la Ing. Beatriz Terán y la Lic. Julymar Marcano, de FUNSEIN por su gran apoyo, por donar el patrón y sus conocimientos para la realización de esta investigación.

A mis hermanos, Desiree y Rubén; a mis sobrinos Moisés, Rubén, Rafael y Victoria. Al tío Omar, por toda la ayuda durante toda la carrera.



INTRODUCCION

Un pesticida o plaguicida es cualquier sustancia o mezcla de sustancias, naturales o sintéticas, formuladas para controlar o repeler cualquier peste que compita con los humanos por alimentos, destruya propiedad y esparza enfermedades. El término peste o plaga incluye: insectos, hierbas, mamíferos y microbios entre otros^[1]. Estudios recientes desarrollados en nuestro país, en Lara^[2-4], Zulia^[5] y Mérida^[6], demuestran la presencia de pesticidas organoclorados en los productos finales de las siembras como frutas, vegetales, además de los suelos y cuerpos de agua agrícolas.

Por la existencia de esta problemática en nuestro país y lo pertinente de la solución de problemas ambientales; en la Universidad de Carabobo nace la idea de crear el Laboratorio de Servicios Analíticos e Investigación (LABSAI), para liderizar, proponer planes de monitoreo y brindar servicios para la medición y control de sustancias contaminantes como los plaguicidas, con las herramientas que brinda la química analítica.

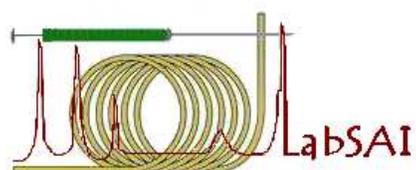
Como parte del marco de acción del laboratorio, se desarrolló este trabajo el cual tiene como objetivo la implementación de un procedimiento para la determinación de pesticidas organoclorados en suelo de origen agrícola con resultados estadísticamente validados. Básicamente se realizó el muestreo de suelos de origen agrícola, el tratamiento de la muestra y el posterior análisis mediante la cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC/MS), así como la determinación de los parámetros necesarios para la validación como linealidad, exactitud, precisión, límites de detección y cuantificación.

Este documento se encuentra dividido en 4 capítulos; el Capítulo I se presenta el planteamiento del problema y los objetivos que cumplió esta investigación. El Capítulo II contiene la revisión bibliográfica realizada para fundamentar las estrategias implementadas y la toma de decisiones para analizar los resultados encontrados en la investigación. El Capítulo III, comprende la metodología que se implementó para cumplir con los objetivos. Finalmente en el capítulo IV y V se encuentran los resultados, el análisis y discusión de los mismos; las conclusiones y recomendaciones respectivamente, es decir, el fruto de esta investigación.



CAPITULO I

El Problema





CAPITULO I.

1.1 PLANTEAMIENTO Y JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA

Los seres humanos han utilizado sustancias químicas para controlar las plagas prácticamente desde el principio de la agricultura^[7], pero el uso no controlado impacta las cosechas, el suelo, los cuerpos de agua aledaños y a largo plazo las aguas subterráneas o fuentes de agua de consumo humano. Por su potencial esparcimiento a través de aire, suelos y agua, la Organización de las Naciones Unidas mediante el Convenio de Estocolmo ha sentado las bases para regular los límites permisibles y de esta forma reducir el impacto ambiental de estas sustancias.

Los hoy denominados contaminantes orgánicos persistentes (COP) son compuestos químicos muy poco biodegradables, que conservan largo tiempo su potencial tóxico y cuyas propiedades de bioacumulación y biomagnificación son conocidas^[8]. Existen al menos 500 pesticidas^[9], siendo los organoclorados uno de las categorías más tóxicas, debido a su compleja estructura.

Aunque el uso de plaguicidas organoclorados persistentes, es ilegal hoy en términos generales, estos han sido extensamente utilizados para la agricultura en América Latina durante las últimas décadas^[10-12]. En particular, se han utilizado grandes cantidades en México^[11] para cultivos comerciales. En años más recientes, el uso de plaguicidas organoclorados se ha restringido a programas de salud pública contra enfermedades como la malaria^[12,13].

Actualmente, ninguno de los decretos o leyes como la ley orgánica del ambiente o la ley forestal de suelos y aguas, establecen parámetros que regulen la concentración de pesticidas organoclorados en suelo, aun cuando, como ya se ha visto en este documento, estas sustancias impactan al ambiente.

A pesar de que se sabe y está comprobado lo dañino que pueden ser los pesticidas organoclorados, estos hasta ahora no se han prohibido en el país a pesar de que en otros países sí^[10-12]. Actualmente en el Municipio Libertador del Edo. Aragua, está naciendo una problemática epidemiológica. Las autoridades



presumen que tiene que ver con el uso indiscriminado de plaguicidas organoclorados en las zonas agrícolas, por lo que la Dirección de Salud Ambiental se ha comunicado con entidades académicas de todo el país para buscar una solución a esta problemática, y también poner en marcha alguna herramienta que permita regular el uso indiscriminado de este tipo de compuestos en nuestro país.

Cuando la elaboración de ley que regule sustancias orgánicas persistentes en suelo, entre en marcha en nuestro país, la Universidad no tiene la posibilidad de brindar una respuesta rápida y confiable para el estudio y control de estas sustancias, por lo tanto la participación de nuestra institución esta limitada. Por esta razón en este trabajo se propone este trabajo, la implementación de un método, que permita obtener resultados validados, desde la correcta toma de muestra, asegurando la conservación y manipulación, luego la correcta extracción o tratamiento del suelo, hasta obtener el extracto que fue analizado cuantitativamente a través de una de las técnicas analíticas mas poderosas, como lo es la cromatografía de gases/espectrómetro de masas. Este método es un aporte a la Universidad de Carabobo, específicamente al Laboratorio de Servicios Analíticos y de Investigación (LABSAI) del Departamento de Química de la Facultad Experimental de Ciencias y Tecnología.

De esta forma la facultad está capacitada para ofrecer el servicio de análisis de un agente tóxico que se encuentra presente en nuestros suelos y brindará la oportunidad de la participación efectiva en cualquier proyecto que se desee realizar con relación a los pesticidas en suelo agrícola.

1.2 SITUACIÓN ACTUAL y SITUACIÓN DESEADA

El problema esta demostrado que es grave y contundente, es un deber aprovechar los equipos y herramientas no operatorios para establecer un método para determinar pesticidas organoclorados con resultados estadísticamente validados. Se ha conformado un equipo de trabajo que participa en un macroproyecto, que cuenta con el apoyo interinstitucional y de estudiantes de postgrado. Además de



poseer la competencia y experiencia más que suficiente para desarrollar estos procedimientos.

Todo lo obtenido como producto de esta meta es el procedimiento adecuado para la determinación de pesticidas organoclorados por cromatografía de gases con el detector de espectrometría de masas.

1.3 OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

1.3.1 Objetivo General

Implementar un procedimiento para la determinación de pesticidas organoclorados en suelo de origen agrícola con resultados estadísticamente validados.

1.3.2 Objetivos Específicos.

- ❖ Definir el método de muestreo para la determinación de pesticidas organoclorados en suelos agrícolas.
- ❖ Definir el método de tratamiento y procesamiento de muestras para el análisis en cromatografía de gases.
- ❖ Definir los métodos analíticos de determinación cromatográfica de extractos de pesticidas organoclorados.
- ❖ Determinar los parámetros estadísticos del método implementado, a fin de obtener sus prestaciones analíticas: precisión, exactitud, linealidad, selectividad, intervalo de trabajo, límite de detección, límite de cuantificación.
- ❖ Establecer la estrategia más adecuada para validar el procedimiento a implementar.
- ❖ Validar el procedimiento global para el análisis de muestras de suelo de origen agrícola.



1.4 ALCANCE DE LA INVESTIGACIÓN

Este trabajo se basó en la investigación de los métodos existentes para realizar muestreo de suelos, tratamiento de muestra, extracción y análisis por cromatografía de gases/espectrometría de masas para analizar plaguicidas organoclorados o compuestos orgánicos persistentes.

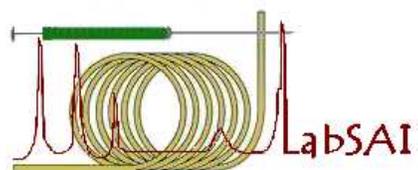
Para cumplir con los objetivos propuestos se realizaron encuestas a los habitantes y agricultores, con esta herramienta se delimitó la zona de muestreo de suelo agrícola, al igual que zonas aledañas que no reciben fumigación o contacto directo con plaguicidas, por lo que los resultados dependen básicamente de la opinión de los encuestados.

En cuanto al método cromatográfico, se realizó una curva de calibración de cinco niveles de concentración, cinco replicas, durante tres días, esto en términos de repetibilidad, y se compararon con los resultados obtenidos en un trabajo que se realiza en paralelo referente al análisis de plaguicidas en agua para evaluar el término de la precisión intermedia. Esta modificación al protocolo de validación de la EURACHEM se debe a que este trabajo se realizó en conjunto a otro que implementa un método para determinar plaguicidas en agua de pozos adyacentes a las zonas agrícolas, se espera que en un futuro se elaboren trabajos que permitan realizar la validación los cinco días y no solo tres sin contar con las limitaciones de patrón certificado que se tuvo en esta investigación. En este trabajo, se validaron dos plaguicidas la atrazina y la simazina, ya que se están usando actualmente en el país y por lo tanto de pertinencia para este trabajo. Además de esto, se caracterizó el suelo obteniendo los parámetros: pH, conductividad, porcentaje de carbono y porcentaje de humedad, a pesar de que esto no es un objetivo de la investigación, por lo que la discusión de estos, se dejan a futuras investigaciones.



CAPITULO II

Revisión Bibliográfica





CAPITULO II

REVISIÓN BIBLIOGRAFICA

En este capítulo el lector encontrará definiciones de términos importantes para la comprensión de esta investigación, y definiciones asociadas al análisis y comprensión de los resultados obtenidos en este trabajo. Además los fundamentos para la toma de decisiones en cuanto a los métodos implementados y al final los antecedentes por la pertinencia que los mismos tienen en todo trabajo científico.

2.1 PESTICIDAS

Este apartado comprende definiciones básicas sobre que es un pesticida o plaguicida, y la descripción de las moléculas a estudiar, para que el lector tenga consciencia de su carácter químico y su impacto ambiental y a la salud humana.

Un pesticida o plaguicida es cualquier sustancia o mezcla de sustancias, naturales o sintéticas, formuladas para controlar o repeler cualquier peste que compita con los humanos por alimentos, destruya propiedad y esparza enfermedades, el término pesticida incluye: insectos, hierbas, mamíferos y microbios entre otros ^[1]. Acá lo importante es saber que pesticida y plaguicida son sinónimos asociados a la palabra utilizada en inglés y en español respectivamente.

2.1.1 Clasificación de los Plaguicidas según su uso

En la figura 1. Se muestra diagrama que permite conocer la clasificación de los plaguicidas según su uso, los que se están estudiando específicamente en esta investigación forman parte de los herbicidas, el subgrupo conocido como triazinas, en las siguientes secciones se dan descripciones más específicas del grupo y subgrupo de plaguicidas de esta investigación.

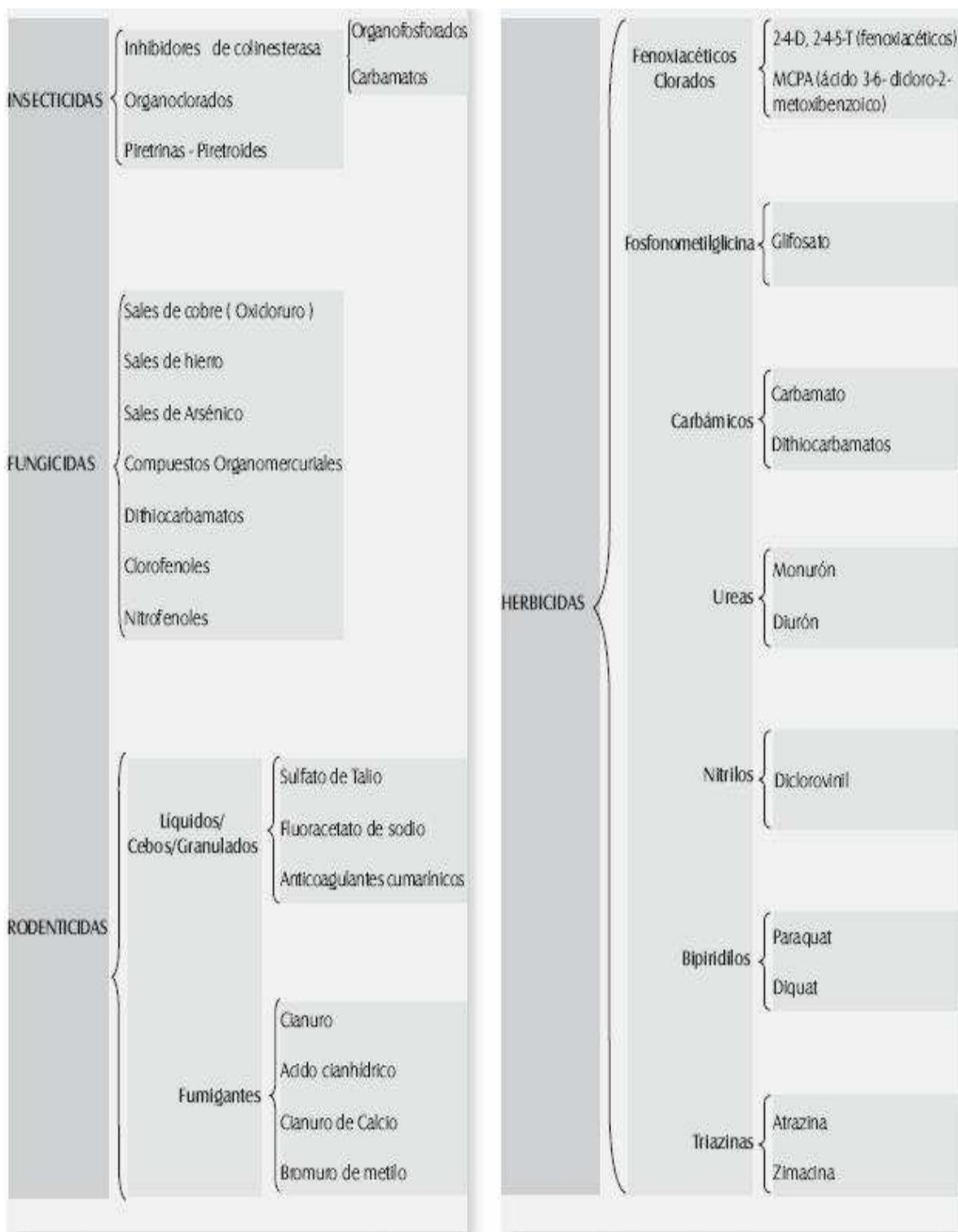


Figura 1. Clasificación de los plaguicidas según su uso.



2.1.2 Herbicidas

Los herbicidas pueden ser clasificados como compuestos que se aplican en el suelo o en el follaje, los cuales son normalmente absorbidos por las raíces o tejidos de las hojas. Estos compuestos pueden ser herbicidas totales o selectivos.

Los herbicidas totales pueden eliminar toda la vegetación mientras que los selectivos pueden controlar las hierbas sin afectar las plantaciones^[17]. Adicionalmente, los herbicidas se clasifican de acuerdo a su composición química.

2.1.2.1 Triazinas

Una gran cantidad de Triazinas se han sintetizado a través del tiempo para controlar malezas y pasto en una gran variedad de siembras como también en suelos sin sembrados. Son muy efectivos en dosis de bajas concentraciones, para exterminar maleza de hoja ancha en plantaciones de maíz. También se emplean en altas concentraciones como agente esterilizador de suelos. En general, este herbicida es aplicado en etapas de pre y post cosecha y son absorbidos por las raíces y el follaje. Estos compuestos presentan una persistencia apreciable en los suelos y pueden mezclarse con otros herbicidas para aumentar el rango de alcance^[17].

2.1.2.1.1 Atrazina

La atrazina, 2-cloro-4etilamino-6isopropilamino, (véase figura 2). Es un compuesto orgánico que consiste en un anillo de s-triazina, el cual es ampliamente utilizado como herbicida. Su uso es controversial debido a sus efectos en especies que no son su objetivo, tales como anfibios. También puede esparcir su contaminación por vías de agua subterránea y llegar a cuencas de agua para consumo humano. Aunque ha sido excluido del proceso de registro de la Unión Europea todavía sigue siendo uno de los herbicidas más utilizados en el mundo^[21]. Según la encuesta elaborada en esta investigación (véase figura A.4, apéndice A) es llamado limpia maíz, por amplio uso en este rubro agrícola.

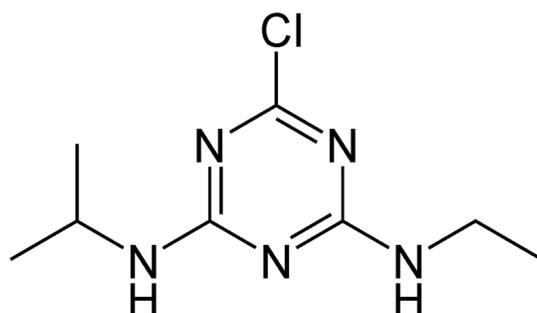


Figura 2. Estructura de la Atrazina

2.1.2.1.2 Simazina

Controla gramíneas y malezas en cultivos de maíz, alfalfa, caña de azúcar, alcaucil, té, manzanos, perales, cítricos, vides, nogales, pino y eucalipto, entre otros, (para conocer su estructura química véase figura 3). Es de acción sistémica y residual. Se absorbe por las raíces. Es un compuesto blanco cristalino que es escasamente soluble en agua. Y es ampliamente utilizado como herbicida residual no selectivo, pero actualmente está prohibido en la Unión Europea. Como la atrazina, actúa inhibiendo la fotosíntesis. Se mantiene activo en los suelos entre 2-7 meses después de su aplicación^[17].

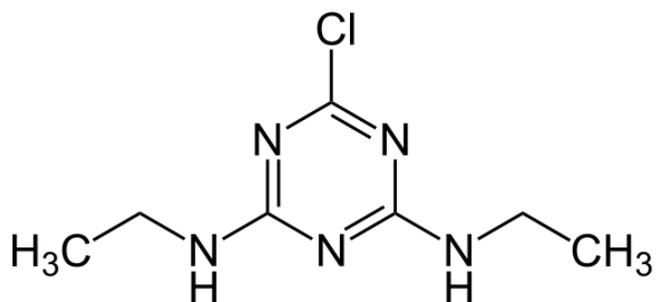


Figura 3. Estructura de la simazina



2.2 MUESTREO

En este apartado se muestra lo concerniente a la investigación realizada para definir el método de muestreo empleado en este trabajo. Se utilizó un método de referencia^[14,15] que se encuentra en mejor detalle en el marco metodológico. En la mayoría de los trabajos publicados a nivel mundial^[36,37] dejan en manos de la experticia del captador, la conveniente selección y manipulación de la muestras. En el capítulo III se observa la metodología empleada en este trabajo para cumplir con el muestreo y en capítulo IV se observan los resultados obtenidos en el ámbito del muestreo en suelo.

2.2.1 Cuidados y Consideraciones al muestrear Suelo

Es importante mantener en mente que lo que se quiere es tener una muestra lo más representativa posible del suelo en cuestión. Durante el muestreo hay que evitar: fumar, comer, o manipular otros productos (cal, fertilizantes, cemento, etc.) para evitar la contaminación de la muestra y obtener resultados falsos. No se puede muestrear cerca de: caminos, canales, viviendas, linderos, establos, saladeros, estiércol, estanques o lugares donde se almacenen productos químicos, materiales orgánicos, o en lugares donde hubo quemaduras recientes. Es necesario lavarse bien las manos antes de hacer el muestreo. No es conveniente utilizar bolsas o costales donde se hayan empacado productos químicos, fertilizantes, cal o plaguicidas^[14,34,35].

2.2.2 Tipos de Muestreo de Suelo

Para el muestreo de suelos existe la técnica de las grillas o cuadrículas, que consiste en dividir el sector a muestrear en un cuadrado, que en su interior tiene cuadros de alrededor de (40x40) cm este tipo de muestreo se utiliza en áreas pequeñas, y cuando se quiere monitorear selectivamente alguna región específica del suelo, ya que se deben tomar un alto número de muestras^[14,34,35].

También es muy utilizada el muestreo en zig-zag, donde se delimita el área a muestrear y posteriormente se camina en forma de zig-zag en el área



delimitada, y se toma la muestra en cada punto donde se cambie de dirección al caminar, muy utilizado en muestreo de zonas agrícolas, y para la determinación de compuestos organoclorados, por la facilidad de abarcar grandes terrenos y se asegura la aleatoriedad al muestrear.

2.2.3 Validación de Métodos para el Muestreo de Suelos

Uno de los frutos de esta investigación bibliográfica, es que se encontró lo necesario para validar el método de muestreo de suelos y el porque hay pocos trabajos en lo que a esto se refiere, publicaciones^[34,35] hablan de un alto costo del análisis, por lo que en Europa^[34], se propone un software que se puede ajustar a las características del suelo y permite modelar el muestreo de forma computarizada y así evaluar si el costo es conveniente o no.

La herramienta computacional^[34], permite modelar según: el tipo de suelo, y la extensión del espacio muestrear, el costo y la cantidad de reactivos necesarios para realizar la validación experimental, dejando a criterio de la organización que pretende validar el método si emprende la validación o no. Con esta justificación y sabiendo por otras publicaciones^[36,37] que es totalmente valido dejar el muestreo en manos de la experticia del captador, en este trabajo en el marco metodológico se encuentra en detalle el tipo de muestreo realizado, pero no se valido como tal.

2.3 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE PLAGUICIDAS

En este apartado se presentan los métodos mas utilizados para extraer plaguicidas de suelos, además de dar fundamento a la selección del método de extracción que utilizó en este trabajo.

Lo mas importante de la recolección de información es la selección del solvente a utilizar para la extracción, las publicaciones donde se hacen estudios en mezclas de pesticidas multicomponentes se han obtenido muy buenos resultados con diclorometano^[38-40], en otros estudios han utilizado una mezcla acetato de etilo-agua (70:30 v/v)^[17]. El que se toma como referencia es el



propuesto por la norma EPA3540C, ya que al ser un método estandarizado se espera obtener mejores resultados.

2.3.1 Técnicas Clásicas

Las dos técnicas clásicas para la extracción de pesticidas de suelos son la agitación con solvente-filtrado y el método Soxhlet. Estas técnicas tienen la ventaja de ser simples y de bajo costo, pero son engorrosas, laboriosas, difíciles de automatizar, no selectivas y utilizan grandes volúmenes de solventes orgánicos^[17]. La técnica a emplear en este trabajo es la que involucra al método Soxhlet con diclorometano como solvente (ver mas detalles Capitulo III), ya que se cuenta con los equipos y además es una técnica confiable utilizada como referencia para realizar comparaciones del desempeño de nuevos métodos [17,37,42].

2.3.2 Extracción Líquida Presurizada (Presurised Liquid Extraction, PLE)

Para solucionar estos problemas se han desarrollado nuevas técnicas, la extracción con solvente (ASE) también llamada extracción líquida presurizada (PLE) es una técnica mucho mas rápida, que puede ser automatizada y que utiliza pequeños volúmenes de solvente, el único detalle es que las altas temperaturas usadas para alcanzar las altas presiones degradan o afectan a algunos pesticidas^[17].

2.3.3 Extracción con Fluidos Supercríticos (Supercritical Fluid Extraction, SFE)

La extracción con fluidos supercríticos (SFE) utiliza fluidos a temperatura y presión críticas o cercanas a los niveles críticos. En estas condiciones estos fluidos tienen comportamiento semejante a líquidos; el CO₂ es ampliamente utilizado por su bajo costo, baja temperatura (31.1°C) y presión crítica (73.8 atm)^[17].



2.3.4 Extracción Asistida por Microondas (Microwave Assisted Extraction, MAE)

Esta extracción tiene como ventajas su rapidez, permite extraer múltiples muestras al mismo tiempo. Pero los viales de extracción son costosos, y deben llevarse a temperatura ambiente antes de su apertura para el uso.

2.3.5 Extracción Ultrasónica (Sonication)

La Extracción Ultrasónica o Sonication con diversos solventes orgánicos también ha sido ampliamente utilizada para extraer pesticidas de suelos. Al igual que su versión miniaturizada, la cual está siendo desarrollada. En este método la muestra de suelo se coloca en una columna pequeña y se lleva a un baño de ultrasonido, donde los pesticidas se extraen con poco solvente y asistido por las ondas ultrasónicas.

2.4 CONCEPTOS ASOCIADOS AL PROCESO DE VALIDACIÓN Y LA TÉCNICA DE CROMATOGRAFÍA ACOPLADO A ESPECTRÓMETRO DE MASAS

2.4.1 Validación

La validación es un requerimiento importante en la práctica del análisis químico. Validación es el proceso de evaluar las características de funcionamiento de un método o procedimiento de medida y verificar que se cumplan con los requisitos exigidos por los datos de modo que se pueda asegurar la calidad y eficacia del mismo y así se puedan brindar resultados confiables^[42].

Para llevar a cabo el proceso la validación de un método se debe aplicar los pasos siguientes:

2.4.1.2 Necesidad Analítica (método)

Una vez establecido, por el ente responsable, la necesidad de tener a disposición del laboratorio un procedimiento analítico que satisfaga una determinada



demanda, deberá procederse a la elección del método más adecuado, para lo que se puede acudir a la bibliografía especializada [45,52].

Aun en el caso de que el método elegido este publicado como norma internacional, nacional o regional, y con el objeto de atender los requisitos de la norma ISO 17025, es conveniente (en muchos casos precisos, es necesario complementar la norma con información adicional para asegurar su correcta aplicación) proceder a la elaboración de un procedimiento interno que recoja, por un lado todos los aspectos técnicos del método y por otro los aspectos formales y de calidad de la norma ISO 17025. Dicho procedimiento interno (borrador, mientras no sea válido) deberá realizarse teniendo en cuenta lo que se especifique en el sistema de la calidad del laboratorio^[52].

2.4.1.3 Puesta a Punto

La puesta a punto de un método es una actividad previa a la validación que debe realizar el laboratorio para llegar a tener un conocimiento general del mismo. Con esta actividad se consigue que el método “funcione” dando unas respuestas razonables aceptables y consistentes^[47,52].

2.4.1.4 Elección de parámetros de validación. Fijación de parámetros

La norma ISO 17025 establece “La validación incluye la especificación de los requisitos, la determinación de las características de los métodos, una comprobación de que pueden satisfacer los requisitos utilizando el método, y una declaración de la validez del método”, los requisitos que deben cumplir los métodos deben ser especificados previamente a la validación y son conocidos como objetivos de validación^[42,47,52].

Los parámetros necesarios para la validación de un método son:

- Selectividad
- Linealidad
- Limite de detección.
- Limite de cuantificación.



- Precisión (Repetibilidad y reproducibilidad)
- Exactitud.

2.4.1.5. Diseño Experimental y Estadística

En el momento de obtener la variable de respuesta de los parámetros seleccionados, esta no se obtendrá de un modo secuencial, sino como resultado final de un diseño experimental adecuado que contemplara los objetivos que se persigue conseguir, y en vías de optimizar los resultados obtenidos.

El siguiente proceso pretende ser representativo de un método analítico y se compone de las fases siguientes^[52]:

- ✓ Selección de los tipos de muestras a ensayar.
- ✓ Determinación del número de submuestras por muestras a procesar.
- ✓ Procesamiento de todas las submuestras simultáneamente (en condiciones de repetibilidad) siguiendo el método analítico.
- ✓ Lectura (normalmente instrumental) de una señal (cromatograma) que produce cada una de las submuestras (el número de lecturas que se debe obtener de cada submuestra depende normalmente del instrumento o sistema de medida de su estabilidad a corto plazo, tiempo de respuesta y es recomendable que sea siempre posible mayor de una).
- ✓ Interpolación, contra una recta de calibrado del instrumento o sistema de medida, de la lectura obtenida para convertirla en resultado (la recta de calibrado mencionada, que mas adelante se definirá como función de respuesta instrumental, se obtiene generalmente por la lectura de la señal que producen una serie de patrones de trabajo limpios (no tienen en cuenta la matriz de la muestra problema).

2.4.1.6 Calibración Instrumental

Es el proceso por el que se asegura que un sistema es apropiado para el uso que se desea darle y que se desempeña de acuerdo con las especificaciones dadas



por el fabricante. Es decir, asegurarse de que el instrumento funciona correctamente^[42].

2.4.1.7 Metodología de la Calibración Analítica

Se debe establecer una relación inequívoca entre la señal instrumental y la concentración del analito^[45].

Pueden aplicarse distintos métodos de uso de estándares con este fin. Los más utilizados son:

- Estándar Externo: Se construye una curva patrón utilizando diluciones de un estándar y se relaciona la concentración con la señal obtenida, que luego se extrapola a las muestras utilizadas.
- Agregado de Estándar: El estándar es agregado a las muestras a analizar, se relaciona la señal obtenida en muestras con patrón con aquellas a las que no fue agregado el estándar.
- Estándar Interno: Se utiliza como estándar una sustancia distinta del analito y que frente al método analítico utilizado genera señales que pueden ser correlacionadas con la concentración y posteriormente referidas al analito en cuestión. El patrón debe ser adicionado a la muestra y blanco.

Como se ha podido ver, la metodología empleada en esta investigación es el agregado de estándar, por la necesidad de validar el método con las condiciones más cercanas a lo establecido por parámetros internacionales.

2.4.2 Tratamiento Estadístico de Datos Obtenidos

En esta sección, se hablará un poco de la parte matemática para conseguir los parámetros de validación.

2.4.2.1 Selectividad – Especificidad

Son mediciones que garantizan la confiabilidad de las mediciones en presencia de interferencias. La especificidad se considera generalmente que es el 100 % de la selectividad pero el acuerdo no es universal^[42]. Es bastante difícil establecer que



nada interfiere ya que siempre existe la posibilidad de encontrar algunas interferencias no reconocidas hasta el momento del análisis. Habrá casos en donde las interferencias químicas puedan ser identificadas para un método en particular pero que sean improbables las oportunidades de encontrarlas en la vida real^[42,52].

2.4.2.2 Sensibilidad

Es la pendiente de la recta de calibración que se obtiene cuando el resultado o señal de la medida se representa frente a la cantidad o concentración del analito. En otras palabras corresponde al cambio en la respuesta del instrumento que corresponde a un cambio de concentración del analito^[42].

2.4.2.3 Límite de Detección en Métodos Cromatográficos

Es definido como la concentración mas baja que puede ser determinada para ser estadísticamente diferente al blanco. Esta concentración se recomienda que sea tres veces la desviación estándar por encima del promedio de diferencia entre las señales del blanco y de la muestra, lo que corresponde a un 99% de confianza^[62]. Para métodos que utilicen una curva de calibración para alcanzar determinaciones cuantitativas, la IUPAC establece que el límite de detección se calcula como sigue:

$$LD = \frac{S_a}{b} * 3 \quad \text{Ec.1}$$

Donde S_a es la desviación estándar del intercepto de la curva de calibración, y b es la pendiente de dicha curva^[61].

2.4.2.4 Limite de Cuantificación

Se define como el nivel superior en el cual se obtendrán los resultados. La diferencia correspondiente entre blanco-muestra se recomienda que sea diez veces la desviación estándar por encima del blanco lo que corresponde al 99% de confianza.



Según el enfoque de la IUPAC^[61]. El límite de cuantificación se determina a partir de la siguiente ecuación:

$$LC = LD * 3,3 \quad \text{Ec. 2}$$

2.4.2.5 Función de Respuesta del método

Es la que se determina cuando se calcula la recuperación del método y puede coincidir exactamente con la instrumental cuando la recuperación es 100 %. Si la función de respuesta no coincide con la instrumental, los datos pueden presentarse corregidos con el factor de recuperación encontrada o sin corregir^[42].

2.4.2.6 Intervalo de Trabajo Validado

Dentro del intervalo de trabajo puede existir un rango de respuesta lineal (intervalo lineal); los cálculos de regresión por si solos pueden ser insuficientes para establecer la linealidad; se deben complementar con una inspección visual de la línea y de los residuos. En general los controles de linealidad requieren efectuarse con al menos 10 concentraciones o valores diferentes^[42,52]. El intervalo de trabajo puede coincidir con el estudio de la función de respuesta, como intervalo de trabajo deseable, pero pueden haber disminuido como resultado del proceso de validación. Normalmente estará comprendido entre el límite de cuantificación y el último nivel de concentración donde se puede comprobar la linealidad del método [42,52].

2.4.2.7 Exactitud

La exactitud expresa la cercanía de un resultado al valor verdadero. Normalmente la exactitud se estudia como dos componentes: la veracidad y la precisión. La veracidad es una expresión de que tan cercana se encuentra la media de un conjunto de resultados del valor real. La veracidad se expresa en términos de sesgo.

La exactitud del método puede establecerse por la comparación de los resultados, obtenidos en el diseño experimental, de la concentración reportada por



el fabricante de los patrones, observando el grado de concordia entre el valor obtenido y valor esperado^[42].

La recuperación en cada punto se calcula mediante la siguiente expresión (conocida también como porcentaje de recuperación):

$$\text{Porcentaje de Recuperación} = \frac{X_{\text{obtenido}}}{X_{\text{esperado}}}$$

Ec. 3

Donde: X_{obtenido} : Es el resultado obtenido del análisis del material de referencia.

X_{esperado} : Es el valor teórico del mismo.

La recuperación global del método se calcula a partir de la media de las individuales en cada punto, cuando las recuperaciones en los diversos niveles son similares.

2.4.2.8 Incertidumbre

La incertidumbre de un resultado es un parámetro que describe un intervalo dentro del cual se espera que se encuentre la cantidad medida, teniendo en cuenta todas las fuentes de error.

La definición del término incertidumbre de acuerdo a las normas COVENIN 2552:1999^[48] es la siguiente:

“Parámetro, asociado con el resultado de una medición que caracteriza la dispersión de los valores que pudieran ser razonablemente atribuidos al mensurado”.

La incertidumbre de la medición no implica duda acerca de la validez de un mensurado; por el contrario, el conocimiento de la incertidumbre implica el incremento de la confianza en la validez del resultado de una medición. “El resultado de una medición esta completo únicamente cuando está acompañado por una declaración cuantitativa de la incertidumbre, que expresa la calidad del mismo y permite valorar la confiabilidad en este resultado”.



Para expresar la incertidumbre se emplean dos símbolos. La incertidumbre estándar (u) expresa el concepto como una desviación estándar. La incertidumbre expandida (U) define un intervalo que abarca una fracción grande de valores dentro de los cuales caerá la cantidad que se está midiendo y se obtiene multiplicando u por un factor de cobertura, k , elegido según el grado de confianza exigido para el rango^[42].

$$U = u \cdot k \quad \text{Ec. 4}$$

En este trabajo se planea determinar la incertidumbre estándar, también conocida desviación estándar.

2.4.2.8.1 Incertidumbre Estándar

Antes de la combinación, todas las contribuciones de incertidumbre deben expresarse como las incertidumbres estándar, es decir, como las desviaciones estándar. Esto puede involucrar la conversión de alguna otra medida de dispersión. Las reglas siguientes dan alguna guía para convertir un componente de incertidumbre a una desviación estándar (véase Ec.5)^[52].

Donde el componente de incertidumbre se evaluó experimentalmente desde la dispersión de medidas repetidas, puede expresarse como una desviación estándar. Para la contribución de la incertidumbre en simples medidas, la incertidumbre estándar es simplemente la desviación normal observada; para resultados sujetos a promedios, se usa la desviación normal de la media.

Donde una estimación de incertidumbre se deriva de los resultados y datos anteriores, puede expresarse como una desviación normal. Sin embargo donde un intervalo de confianza se da con un nivel de confianza, (en el formulario $\pm a$ a $p\%$) entonces divide el valor a por el punto apropiado del porcentaje de la distribución Normal para el nivel de confianza dado para calcular la desviación normal.



$$Sb = \sqrt{\frac{(X - \bar{X})^2}{(n - 1)}}$$

Ec. 5

2.4.2.9 Precisión

La precisión de un procedimiento analítico se expresa con los valores cercanos entre una serie de medidas obtenidas a partir de múltiples muestras. La precisión es usualmente expresada en tres niveles: repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad. La Repetibilidad es una medida de la precisión bajo las mismas condiciones de operación en un período corto de tiempo, comúnmente referido como precisión entre días.

La International Conference on Harmonization (ICH) permite dos formas de investigar la repetibilidad:

- Un mínimo de 9 determinaciones cubriendo un rango específico para el procedimiento con 3 concentraciones y 3 replicas.
- Un mínimo de 6 determinaciones al 100% de la concentración.

Debe reportarse la desviación estándar y el coeficiente de variación (desviación estándar relativa) ^[61,64].

2.4.2.9.1 Precisión Intermedia

La precisión intermedia es definida como la variación dentro del mismo laboratorio. El establecimiento de que se utilizará para determinarla depende de las circunstancias bajo las que se encuentre el experimento. Los parámetros típicos empleados incluyen variación de día a día, variación del analista y variación del equipo ^[61].

2.4.2.10 Repetibilidad

La repetibilidad viene dada por la obtención de resultados independientes de una prueba con el mismo método, con los mismos accesorios de laboratorio, en el



mismo laboratorio, por el mismo operador, usando el mismo equipo en intervalos de tiempo. Puede determinarse de una manera para un Laboratorio^[42].

Es necesario tener en cuenta que:

- Deben obtenerse suficientes datos o mediciones.
- Todos los pasos del método (incluidos la toma y preparación de la muestra, así como la calibración) deben realizarse n-veces.

2.4.2.11 Reproducibilidad

Cualitativamente es el grado de concordancia entre dos resultados individuales obtenidos con el mismo método sobre una materia idéntica sometida al ensayo, pero en condiciones diferentes, es decir, distintos analista, distintos laboratorios o distintas épocas.

Sin embargo, cuantitativamente es el valor por debajo de cual esta situado, con una probabilidad específica, el valor absoluto de la diferencia entre dos resultados individuales obtenidos en las condiciones anteriormente expuestas. Normalmente la probabilidad es de 95%.

Al realizar validaciones, lo que se establece es realizar el estudio interlaboratorios para la verificar los resultados. La reproducibilidad se hallará en este trabajo de manera intermedia, porque no se cuenta con otro laboratorio para verificar los resultados^[42].

2.4.2.12 Contraste de significación

Los métodos analíticos deben utilizar todas las herramientas para eliminar la mayor cantidad de errores sistemáticos posibles. Esto significa que el valor dado para la cantidad de analito debería ser el valor verdadero. Esta propiedad de un método analítico se puede contrastar al aplicar el método a una muestra de ensayo estándar que contenga una cantidad definida del analito. Sin embargo, incluso si no existieran errores sistemáticos, los errores aleatorios hacen poco probable que la cantidad medida sea exactamente igual que la cantidad patrón conocida. Para definir si la diferencia del valor promedio experimental con



respecto al valor verdadero es debido a errores aleatorios, se puede aplicar una prueba estadística denominada contraste de significación^[42,52].

Entre las pruebas de contraste de significación están las siguientes:

- ✓ Comparación de una media experimental con un valor conocido.
- ✓ Comparación de dos media experimentales
- ✓ El contraste F para la comparación de desviación estándar
- ✓ Datos anómalos

2.4.2.12.1 Contraste de significación para el Coeficiente de Correlación de Pearson

Cuando se trabaja con curvas de calibración es necesario ajustar la curva obtenida a una línea recta ideal, la diferencia entre la curva obtenida y una línea recta geoméricamente perfecta se conoce como el coeficiente de correlación de Pearson (r^2), este es un índice que mide el grado de variación entre distintas variables relacionadas linealmente^[67]. Una vez calculado el valor del coeficiente de correlación se necesita determinar si tal valor obtenido muestra que las variables están relacionadas en realidad.

Un coeficiente de correlación se dice que es significativo si se puede afirmar, con una cierta probabilidad que es diferente de cero^[64].

Es por ello que se plantean dos hipótesis posibles:

H_0 : El coeficiente de correlación obtenido procede de una población cuya correlación es cero.

H_1 : El coeficiente de correlación obtenido procede de una población cuyo coeficiente de correlación es distinto de cero^[67].

Para aplicar la prueba de contraste se calcula la $t_{\text{experimental}}$ mediante la ecuación 6. Esta se compara con la $t_{\text{crítica}}$ (valor que se encuentra en el apéndice del Miller y Miller^[42]). Si la de $t_{\text{experimental}}$ es mayor que el valor de $t_{\text{crítica}}$, la hipótesis nula es rechazada. Por lo tanto existe una correlación entre los datos,



asegurando la linealidad de la curva y por lo tanto la linealidad del método analítico a validar.

$$t_{\text{experimental}} = \frac{r}{\sqrt{\frac{1-r^2}{N-2}}} \quad \text{Ec. 6}$$

2.5 PLANTEAMIENTO DEL MÉTODO

2.5.1 Cromatografía de gases/Espectrometría de masas (GC/MS) en el análisis de plaguicidas

Los datos sobre residuos obtenidos mediante espectrometría de masas suponen las pruebas más definitivas y, cuando se dispone del equipo necesario, constituyen la técnica de confirmación preferible. La técnica también se utiliza normalmente a efectos de selección de residuos^[17].

Generalmente el análisis de residuos mediante espectrometría de masas se aplica conjuntamente con una técnica cromatográfica de separación, con el fin de obtener simultáneamente datos sobre el tiempo de retención, la relación masa/carga en los iones y la abundancia de los mismos. La transmisión cuantitativa de analitos lábiles a través del sistema cromatográfico plantea problemas semejantes a los experimentados con otros detectores^[49].

En lo que respecta a la cuantificación, los iones que se controlan deben ser los más específicos del analito, los que sufran menos interferencias y aquellos en los cuales la relación señal/ruido sea buena^[49].

Cuando se utiliza el monitoreo selectivo de iones (SIM), los intervalos de tolerancia de la relación de iones y los tiempos de retención basados en la inyección del plaguicida a la concentración cercana al nivel crítico deberían haberse establecido en este punto. Los intervalos de tolerancia para las relaciones iónicas deben estar dentro de los límites de $\pm 30\%$ de la relación iónica absoluta^[43]. Cuando 2 ó 3 relaciones iónicas seleccionadas están dentro de los intervalos de tolerancia establecidos, se confirma el residuo. Para un pequeño número de



plaguicidas la espectrometría de masas probablemente solo muestre un ión específico, en cuyo caso debe buscarse una confirmación alternativa^[17,43,49,50].

Cuando los iones detectados indican la posible presencia de un residuo, el resultado puede comunicarse como identificado provisionalmente. Sin embargo, cuando el resultado de lugar a una medida reglamentaria o los resultados se utilicen con otra finalidad, se buscará mayor confirmación de la identidad del analito. Esto puede lograrse con el mismo instrumental de GC-MS, inyectando compuestos tipo ajustados a la matriz del analito, para compensar la influencia de la matriz sobre las relaciones iónicas. En este caso, deben realizarse inyecciones posteriores del compuesto tipo ajustado a la matriz y la muestra sospechosa. Dos relaciones iónicas medidas en una muestra deben estar dentro del intervalo de tolerancia calculado en base a las relaciones iónicas en el compuesto tipo ajustado a la matriz. Se considerará que el residuo ha sido confirmado si cumple la norma general expuesta anteriormente. Si las relaciones iónicas no se encuentran dentro de los intervalos de tolerancia, puede obtenerse una confirmación adicional de la identidad utilizando otras técnicas analíticas, por ejemplo espectrometría infrarroja^[17,43,49,50].

2.6 ANTECEDENTES

2.6.1 Desarrollo y validación de un método multiresiduo rápido para la determinación de mezclas de pesticidas utilizando cromatografía de gases-espectrometría de masas: Un caso real en suelos de viñedos^[16]

En 2008, Schreck y colaboradores desarrollaron esta investigación. En este trabajo, realizan el estudio de suelos de viñedos franceses, validando un método sin utilizar patrones de suelo certificado, y realizan la validación y cuantificación a través de GC/MS, y la extracción del pesticida a través de la técnica que emplea fluidos supercríticos; concluyendo que el método se ajusta para conocer las concentraciones de los pesticidas de ese tipo de suelo y solucionando un problema ambiental. La publicación presentada es una base de esta investigación; se confirma la factibilidad de la metodología que consiste en el enriquecimiento de



suelos de la misma zona y con las mismas características del suelo contaminado. Además fundamenta que se puede cuantificar y validar mezclas multiresiduos con la técnica cromatografía de gases-espectrómetro de masas, las condiciones del método cromatográfico será el método de referencia o partida, porque es el mismo equipo con el que se cuenta en LABSAI. El método de extracción no es el mismo, pero si presentan como referencias otras publicaciones que se ajustan a lo que se desea plantear en este trabajo.

2.6.2 Determinación de multiresiduos de pesticidas en suelo por cromatografía de gases espectrometría de masas^[51]

Sánchez, Alberó y Colaboradores en el 2004, desarrollaron un método para determinar distintos tipos de pesticidas en suelo. Determinaron los pesticidas por cromatografía de gases acoplado a un espectrómetro de masas. Llegando a la conclusión de que el método es lineal en un rango de 25-1000ppb con un coeficiente de correlación alrededor a 0,999. De este trabajo se obtiene la verificación de la metodología, que la toma de muestras de suelo y la determinación de su porcentaje de recuperación son factibles para la cuantificación y posterior validación de un método analítico, sin hacer uso de patrones de suelo certificado, obteniendo excelentes resultados con la cromatografía de gases y la espectrometría de masas.

2.6.3. Diversos estudios en Venezuela que confirman la pertinencia de la investigación y la existencia en altos niveles de pesticidas, en diferentes matrices y estados del país

Se realizó un estudio para determinar el contenido de organoclorados en cebollas producidas en la depresión de Quibor Edo. Lara^[4]. Se detectó sobredosificación de plaguicidas orgaclorados como el butaclor y degradados del DDT. Se utilizó la cromatografía de gases como técnica de análisis y cuantificación. Teniendo como conclusión final que el uso indiscriminado de plaguicidas es un hecho actual de nuestro país y esta relacionado a las altas concentraciones de residuos de organoclorados y organofosforados en las cebollas producidas en nuestro país.



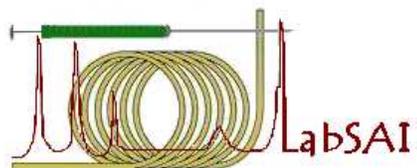
En otra investigación llevada a cabo en Mérida^[6], se estudió la laguna Urao de Lagunillas, encontrando también altos niveles de pesticidas. Utilizando cromatografía de gases con detector de captura de electrones. Al tratarse de una matriz acuosa, como método de extracción se utilizó el de la EPA-608, que consiste en el reparto de fases en una extracción liquido-liquido. En total fueron 17 plaguicidas organoclorados los evaluados en este trabajo, incluyendo el DDT, Aldrin, endrin, heptacloro y metoxicloro.

Se puede pensar que las mencionadas publicaciones no tienen que ver con lo realizado en esta investigación, pero en ambos se utiliza cromatografía de gases, y se estudian pesticidas organoclorados, demostrando que este problema es real y existe en nuestro país, lo que funciona como antecedente ya que da como aporte el reflejo de la existencia de plaguicidas organoclorados en diversas matrices que tienen contacto con los habitantes de nuestro país.



CAPITULO III

Marco Metodológico



CAPITULO III MARCO METODOLÓGICO

3.1 ASPECTOS GENERALES

Este apartado contiene la documentación en general, con lo referente a la metodología desarrollada.

3.1.1 Estrategia Metodológica

Para cumplir con los objetivos correspondientes a los aspectos planteados en el presente trabajo, se propone el siguiente esquema metodológico:

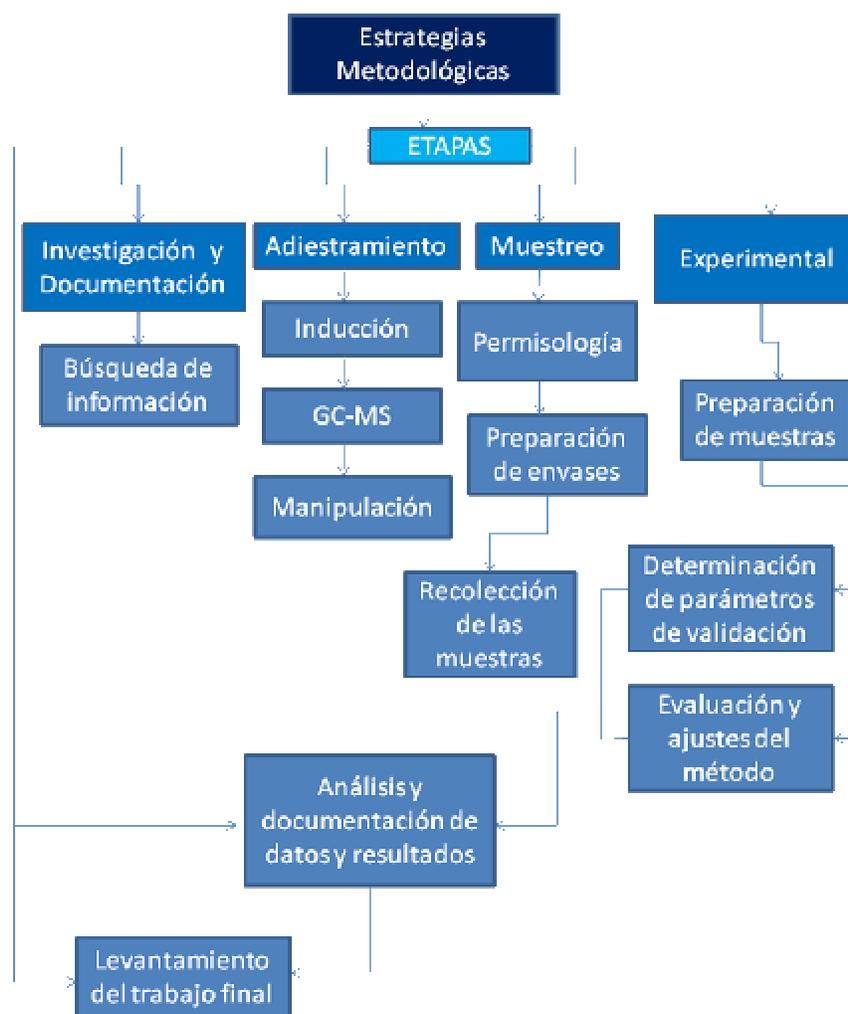


Figura 4. Esquema metodológico general



3.2 MATERIALES y EQUIPOS.

3.2.1 Materiales para la Extracción y Muestreo

Comprende toda la vidriería y equipos comunes del laboratorio (balanzas, equipos de extracción Soxhlet, mantas de calentamiento, material volumétrico en general), necesario para haber extraído los plaguicidas en el presente trabajo. Actualmente, el laboratorio se encuentra dotado de todo el material necesario para llevar a cabo los procedimientos correspondientes a la validación de los métodos planteados. Este aspecto es importante, ya que la validación debe realizarse contando con todo el material y equipos propios del laboratorio. Entendiéndose, que el espíritu fundamental de una validación se enfoca en los resultados obtenidos a través de estos materiales y recursos, si alguno de estos equipos cambia, es necesario llevar a cabo una revalidación de los métodos^[59]. Así como Machete, pala o palín, Cuchillo, Balde, Bolsas plásticas limpias, Marcadores y Hojas para identificar la muestras en el procedimiento de Muestreo.

3.2.2 Equipo de Cromatografía de Gases/Espectrometría masas

Este es el equipo central en el que se llevó a cabo la parte experimental de la determinación de plaguicidas organoclorados, a fin de realizar la validación.

- ✓ Cromatógrafo de gases Agilent GC-6890N
- ✓ Espectrómetro de masas Agilent MSD-5973
- ✓ Columna capilar DB-1MS: 30m de largo x 0,25mm diámetro x 0,25µm espesor de fase estacionaria.
- ✓ Composición de la fase estacionaria: 100% difenilpolixilosano.
- ✓ Jeringa de Inyección: Agilent Gold Standard Syringe (10,00±0,01)µL
- ✓ Dispositivo de Inyección Automático: Agilent 7683B Series Inyector.
- ✓ Patrón Certificado: ACCU-STANDARD M-505R-2.
- ✓ Base de datos de identificación de compuestos: Librería NIST Chemstation Library 2.d



3.3 MUESTREO

Para cumplir el primer objetivo específico de esta investigación se investigó en la bibliografía si existe o no un método estándar que defina como debe muestrearse suelo para determinar plaguicidas organoclorados. Como se puede ver en el capítulo III no existen métodos estandarizados para el muestreo de suelos, de “ninguna índole”, normalmente se deja esta parte a la experticia del muestreador por lo que el método implementado se tomó del trabajo realizado por Schoeneberger, J., Wysocki y Carillo, I., Suarez^[14,15].

En el apéndice A, se observa la encuesta realizada a los agricultores y habitantes de la zona para determinar o delimitar la zona de muestreo. El suelo de validación o referencia proviene de un terreno que hace aproximadamente 10 años era de producción agrícola, actualmente en el mismo se encuentran varias urbanizaciones. El Lic. Juan Uztariz, como asesor técnico, propuso muestrear los suelos cercanos a los pozos de agua que hoy en día abastecen a las urbanizaciones mencionadas anteriormente. Se asume que el suelo cercano a cada pozo debería tener características semejantes puesto a que pertenecían a una misma finca, el procedimiento realizado para tomar los diversos puntos de muestreo fue el siguiente:

- Cada unidad de suelo cercana a los pozos de agua se denominó unidad de muestreo.
- Dentro de cada unidad de muestreo, se tomó una muestra de suelo que es en realidad una muestra compuesta, es decir, dicha muestra se compone de varias submuestras tomadas aleatoriamente en la unidad. El número de submuestras fue entre cuatro y cinco por cada unidad.
- Para tomar cada punto o submuestras, se realizó un recorrido sobre el terreno en zig-zag, tomando submuestras en cada vértice donde se cambió la dirección del recorrido.



- En cada punto de muestreo se removieron las plantas y hojas de un área de 40 cm x 40 cm, y se introdujo la pala hasta aproximadamente 20 cm de profundidad, transfiriéndose aproximadamente 2 Kg de suelo a un balde plástico limpio. Las herramientas se limpiaron después de tomar cada submuestra.
- Se removieron piedras, raíces gruesas, lombrices e insectos del suelo. Al final las submuestras se mezclaron en el balde hasta que se completó el número total de submuestras deseado.
- Posteriormente se transfirió aproximadamente 1 Kg. de suelo a una bolsa plástica limpia. La bolsa se cerró y marcó con el nombre o número del terreno muestreado.
- Se tomaron en total 14 submuestras, que se mezclaron para obtener una mezcla compuesta total para la validación. En la tabla 1 se muestran las coordenadas de cada unidad de muestreo de suelo de referencia o suelo para el proceso de validación.
- Para muestrear el suelo agrícola, se tomaron 20 submuestras en una unidad de muestreo. Las coordenadas de la finca de donde se obtuvieron las muestras se observan en la tabla 1 (suelo agrícola).

Tabla 1. Ubicación de cada unidad de muestreo de suelo de referencia y suelo agrícola.

Suelo	Unidad	Sector	Coordenadas
Referencia	1	San Antonio	N10°09.791' W067°32.14' Elev:433m
	2	Santa Elena	N10°09.896' W96°32.557' Elev: 445m
	3	Las Vegas	N10°9.097' W67°32.977'
Agrícola	1	San Luis	N10°10.709' W067°31.879' Elev: 448m

Las actas de muestreo firmadas por los representantes de la comunidad, Ministerio de la Salud y Alcaldía de Palo Negro, se encuentran en el Apéndice A.



3.4 TRATAMIENTO DE LA MUESTRA

Para cumplir con el segundo objetivo planteado en esta investigación se realizó el tratamiento de la muestra. Para esto se siguió el método 3540C^[54] de la Agencia de protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA) consistió en mantener el suelo muestreado a temperatura ambiente y no expuesta al sol, es decir, la muestra fresca.

Se realizó el tamizado del suelo a 2mm, principalmente para remover cualquier sustancia ajena al suelo.

3.4.1 Extracción de los plaguicidas a Estudiar

Como continuación del segundo objetivo de este trabajo, fue necesario implementar un método para la extracción de los plaguicidas en la muestra. Como hoy en día existen diversas técnicas para realizar la extracción de plaguicidas organoclorados, se plantea la siguiente matriz de selección que permite fundamentar que el método que se utilizó en este trabajo es el más eficiente para las condiciones del LABSAI.

Se comparan los métodos propuestos por El-Saeid^[55] que utiliza extracción asistida por microondas (MAE), Schrecka^[16] que utiliza extracción presurizada (PLE), y el método 3540C^[54], que utiliza extracción Soxhlet. Los criterios empleados para la selección son los cantidad de reactivos, costo, equipos y tiempo de extracción.

Tabla 2. Escala empleada para evaluar el factor de ponderación^[56]:

10: Mucho menos	5: Menos	1: Igual	1/10: Mucho mas	1/5: Mas
-----------------	----------	----------	-----------------	----------

**Tabla 3.** Comparación de los criterios en la matriz de pares

	E	C	R	Suma	Factor de ponderación (FP)*
Equipos(R)		10	10	20	0,48
Costo (C)	10		10	20	0,48
Cantidad de Reactivos (E)	1	1		2	0,05
Total				42	

* El factor de ponderación se obtiene aplicando la fórmula $FP = \text{Suma} / \text{Total}$

Tabla 4. Comparación de las opciones de acuerdo al criterio equipos

Equipos	Soxhlet	MAE	PLE	Suma	Peso de la Opción (FO)*
Soxhlet		10	10	20,0	0,97
MAE	1/5		1/5	0,4	0,02
PLE	1/10	1/5		0,3	0,01
Total				20,7	

Tabla 5. Comparación de las opciones de acuerdo al criterio costos

Equipos	LL	LS	ME	Suma	Peso de la Opción (FO)*
Soxhlet		10	10	20,0	0,970
MAE	1/5		1/10	0,3	0,015
PLE	1/10	1/5		0,3	0,015
Total				20,6	

**Tabla 6.** Comparación de las opciones de acuerdo al criterio cantidad reactivos

Equipos	LL	LS	ME	Suma	Peso de la Opción (FO) *
Soxhlet		1/5	1/10	0,3	0,01
MAE	5		5	10	0,40
PLE	10	5		15	0,59
Total				25,3	

Tabla 7. Matriz final en la que se concluye la selección del método de extracción

	Equipos	Costos	Cantidad de reactivos	Puntaje Final
Soxhlet	0,48 x 0,97	0,48 x 0,97	0,05 x 0,01	0,94
	0,47	0,47	0,0005	
MAE	0,48 x 0,02	0,48 x 0,015	0,05 x 0,40	0,03
	0,001	0,007	0,02	
PLE	0,48 x 0,01	0,48 x 0,015	0,05 x 0,59	0,04
	0,005	0,007	0,03	

Como se puede observar en la tabla 7, debido a la relación, equipos, costos y cantidad de reactivos, se seleccionó y empleó la Extracción Soxhlet (Método EPA3540C^[54]). El procedimiento se muestra en la figura 7. En la cual se explica paso a paso el procedimiento realizado para realizar la extracción a la muestra de suelo una vez recolectada.

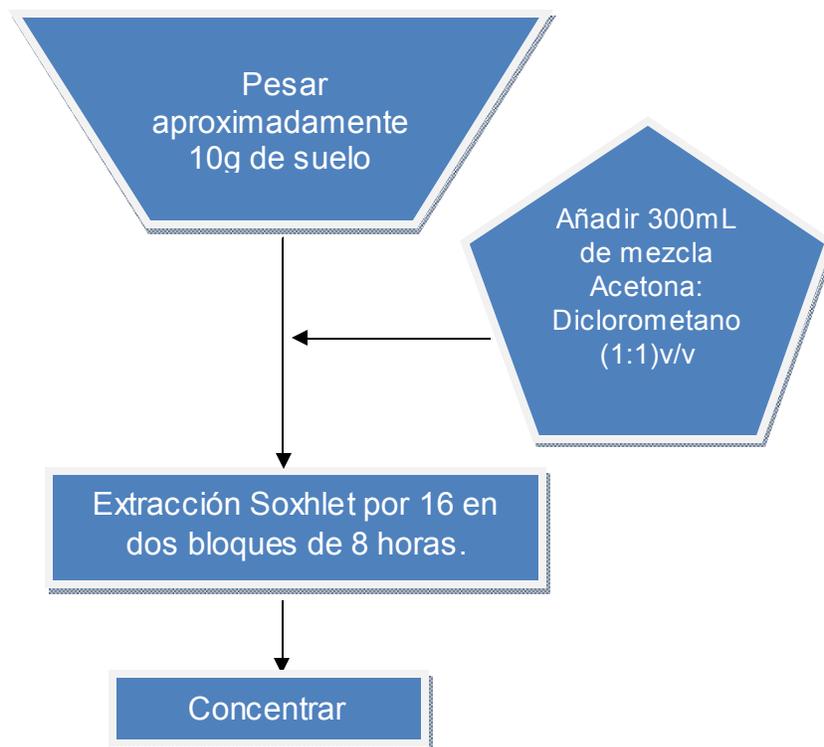


Figura 5. Esquema de extracción Soxhlet

Para concentrar, se llevó a cabo un proceso de evaporación controlada, utilizando un equipo volumétrico denominado Kuderna Danish (ver figura B.1 Apéndice B). Este método de concentración consiste, en colocar el extracto en un balón de cuello alargado de aproximadamente 250mL, acoplado en su parte inferior por esmerilado, a un recipiente graduado de 1mL de capacidad, el cual se coloca en un baño de agua a una temperatura constante de 80°C, el solvente recircula en una columna Snyder de 3 esferas y es condensado. Las sustancias de mayor punto de ebullición, en este caso los plaguicidas organoclorados y otras contaminantes no volátiles que pueda contener la muestra, se concentran a 1mL. Una vez concentrados los compuestos orgánicos, estos se refrigeraron y se inyectaron en el cromatógrafo de gases.



Para comprobar la eficiencia del método, en el capítulo 4 se explica como se determinó la exactitud del método de extracción aplicado.

3.5 ANALISIS POR CROMATOGRAFÍA DE GASES

3.5.1 Matriz de Selección para determinar el método cromatográfico

Para cumplir con el tercer objetivo propuesto en esta investigación, a través del cual, se debían establecer las condiciones cromatográficas para separar e identificar plaguicidas organoclorados, se empleó una matriz de selección, ya que existen diversos métodos cromatográficos estandarizados y no estandarizados, para tomar una decisión fundamentada en herramientas estadísticas se elaboró la mencionada matriz de selección.

Esta matriz se realizó comparando los métodos propuestos por: la EPA según el método 505^[57], el fabricante del equipo (Agilent)^[58] para determinar plaguicidas organoclorados y el método desarrollado en esta investigación, en el Laboratorio de Servicios Analíticos y de Investigación (LABSAI).

Los criterios empleados para la selección son: la resolución cromatográfica, la relación señal/ruido y el tiempo de la corrida.

Tabla 8. Comparación de los criterios en la matriz de pares

	R	SR	T	Suma	Factor de ponderación (FP)*
Resolución cromatográfica (R)		10	10	20	0,4
Señal/Ruido (SR)	10		10	20	0,4
Tiempo de corrida (T)	5	5		10	0,2
Total				50	

*El factor de ponderación se obtiene aplicando la fórmula $FP = \text{Suma} / \text{Total}$

**Tabla 9.** Comparación de las opciones de acuerdo al criterio resolución cromatográfica.

	M5	A	L	Suma	Peso de la Opción (FO)*
Método 505 (M5)		1	5	6	0,27
Agilent (A)	1		1/5	1,2	0,05
LABSAI (L)	5	10		15	0,68
Total				20,7	

Tabla 10. Comparación de las opciones de acuerdo al criterio señal/ruido

	M5	A	L	Suma	Peso de la Opción (FO)*
Método 505 (M5)		5	1/5	5,2	0,17
Agilent (A)	5		1/5	5,2	0,17
LABSAI (L)	10	10		20	0,66
Total				30,4	

Tabla 11. Comparación de las opciones de acuerdo al criterio tiempo de corrida

	M5	A	L	Suma	Peso de la Opción (FO)*
Método 505 (M5)		1	1	2	0,33
Agilent (A)	1		1	2	0,33
LABSAI (L)	1	1		2	0,33
Total				6	

**Tabla 12.** Matriz final en la que se concluye la selección del método de extracción

	Resolución cromatográfica	Relación señal/ruido	Tiempo de corrida	Puntaje Final
Método 505	0,4 x 0,27	0,4 x 0,17	0,2 x 0,33	0,25
	0,11	0,07	0,07	
Agilent	0,4 x 0,05	0,4 x 0,17	0,2 x 0,33	0,16
	0,02	0,07	0,07	
LABSAI	0,4 x 0,68	0,4 x 0,66	0,2 x 0,33	0,60
	0,27	0,26	0,07	

De acuerdo con los resultados obtenidos a partir de la matriz de selección, las condiciones cromatográficas empleadas en la separación e identificación de plaguicidas organoclorados se muestran a continuación:

Tabla 13. Condiciones cromatográficas del método empleado en este trabajo.

Inyector	Horno	Gas de arrastre	Detector
Temperatura: 150°C. Modo: splitless	70°C 25°C/min. hasta 150 °C, se mantiene 5 min. Luego hasta 220°C 4°C/min.	Helio UAP 99,9999%. Presión constante: 4.99 psi. Velocidad promedio: 32 cm/s	Interfase: 300°C Fuente: 130°C Cuadripolo: 250°C



3.5.2 Desarrollo del Método Cromatográfico.

Para establecer las condiciones cromatográficas óptimas para la separación de los analitos a estudiar, se partió de métodos cromatográficos empleados en la bibliografía^[57,58] en donde se estudia compuestos organoclorados, y se emplea un equipo de cromatografía de gases similar al existente en LABSAI.

En las primeras pruebas realizadas con el patrón certificado, se logró la identificación cromatográfica haciendo uso de la base de datos del equipo (véase sección 3.2.2), a través de la técnica Total Ion Current TIC, de dos plaguicidas organoclorados, la atrazina y la simazina. Pero aun la resolución cromatográfica no era la más conveniente para realizar la validación de los resultados a obtener.

Para mejorar la resolución cromatográfica, se le realizó mantenimiento al equipo para bajar la línea base de los cromatogramas, dicho mantenimiento constó de:

- Cambio el liner del puerto de inyección.
- Cambio de las férulas en las conexiones de la columna.
- Ajuste de las nueces de conexión de la columna al detector y al puerto de inyección.

Se realizaron modificaciones en la presión del gas de arrastre y se variaron las temperaturas en el horno para obtener una mejor separación, sin embargo, no se obtuvieron resultados eficientes para la cuantificación de la atrazina y la simazina por lo cual se realizó la búsqueda de un método cromatográfico que utilizara un patrón semejante al empleado en este trabajo.

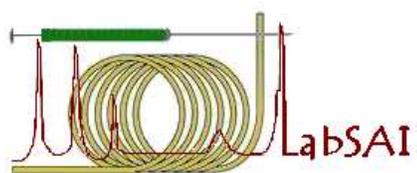
El patrón certificado disponible para realizar esta investigación fue elaborado para trabajar bajo el método 505 de la Environmental Protection Agency (EPA)^[57], en dicho método se trabaja con 4 patrones entre los cuales se encuentra el empleado en este trabajo, razón por la cual se hizo un cambio de columna de la planteada en inicio HP-5MS a la DB-1MS. Con la que finalmente se logró obtener la resolución cromatográfica necesaria para poder validar los resultados.



Una vez definida y realizada la parte experimental de este trabajo, se procedió al análisis de los resultados, ya que a partir de los mismos se evaluó la eficiencia del procedimiento de determinación de plaguicidas organoclorados en muestras de suelo y la validación del mismo. Esto se puede observar en el capítulo 4, que viene a continuación.



CAPITULO IV



Análisis y Discusión de Resultados



CAPITULO IV

ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

4.1 CARACTERIZACIÓN DEL SUELO

A pesar de que este trabajo no tiene como objetivos, el estudio de las características o propiedades de los suelos agrícolas, conocer o evaluar la influencia de alguna de estas variables en la detección de plaguicidas organoclorados, sino validar el protocolo de determinación desde la toma de muestra hasta la cuantificación por CG-EM, se determinaron cuatro parámetros que son de relevancia al trabajar con suelo. Se presentan estos resultados como producto de esta investigación. En la tabla 14 se observan los valores de pH, porcentaje de humedad, conductividad y porcentaje de carbono, obtenidos para el suelo que se utilizó para la validación (referencia) y el agrícola.

Tabla 14. Propiedades del suelo de referencia utilizado en la validación y el suelo agrícola

Suelo	pH $\pm\Delta$ pH	%h $\pm\Delta$ %h	Cond $\pm\Delta$ μ S	%C $\pm\Delta$ %C
Referencia	7,1 \pm 0,2	6,0 \pm 0,6	141 \pm 16	50 \pm 15
Agrícola	7,3 \pm 0,5	12,5 \pm 0,2	388 \pm 130	31 \pm 1

Donde %h es el termino porcentaje de humedad, Cond. Es la conductividad expresada en microSiemens y el %C es el porcentaje de carbono.

4.2 PUESTA A PUNTO DEL METODO CROMATOGRAFICO

4.2.1 Mejora en la Resolución Cromatográfica

En cuanto al análisis cromatográfico se refiere, entre los resultados más relevantes se encuentra la mejora en la resolución cromatográfica, en términos de la separación de la atrazina y la simazina. En la figura 2 del método 505 de la EPA^[57] se observa que no lograron separar estos dos compuestos (también véase figura 6, cromatograma antes de la optimización del método cromatográfico de este trabajo), se puede decir que es debido a similitud en



cuanto a estructura (véase capítulo II) y punto de ebullición (ambos entre 210-220°C) los desarrolladores del mencionado método, utilizan tres patrones certificados distintos, el primero similar al que se usó en esta investigación, y uno que presenta la atrazina pero no contiene simazina y el último que contiene la simazina pero no la atrazina.

Por otro lado, para lograr una separación efectiva (véase figura 7) se tuvo que preparar la columna cromatográfica con isotermas antes de llegar al rango de temperatura de ebullición de dichos compuestos, se observó que temperaturas como las recomendadas por el método 505^[57] no logran una separación efectiva y pobre calidad de la resolución cromatográfica. Se presume que es por que el método EPA propone condiciones de calentamiento agresivas que para un detector tan sensible como el espectrómetro de masas no es favorable.

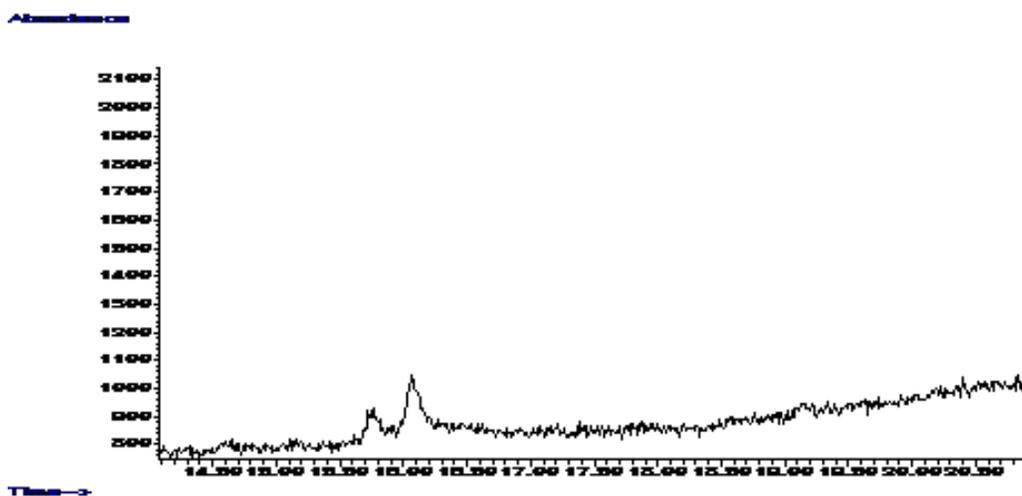


Figura 6. Cromatograma obtenido en esta investigación, previo a la optimización de los parámetros cromatográficos.

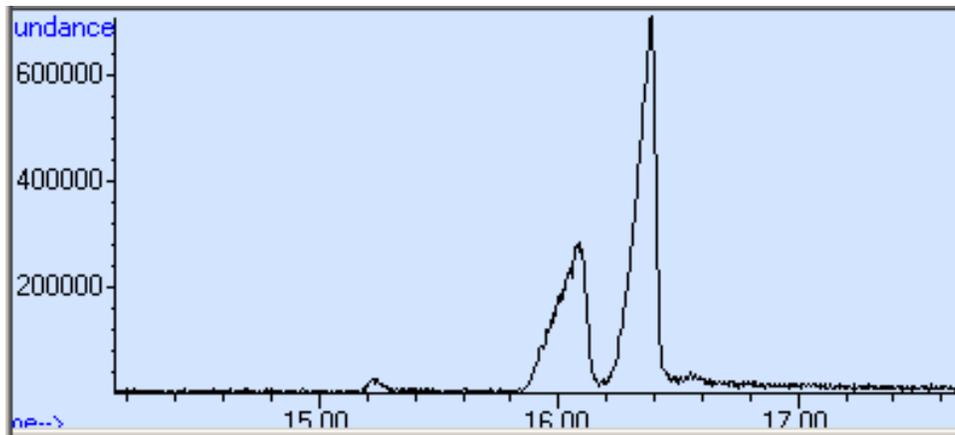


Figura 7. Separación lograda con el método optimizado en esta investigación.

4.2.2 Implementación de la Técnica de Monitoreo Selectivo de Iones

Una vez separados e identificados la atrazina y la simazina, se realizaron diluciones cuantitativas para establecer el intervalo de trabajo y el límite de detección a emplear en la validación.

Para ello se utilizó la técnica de Monitoreo Selectivo de Iones (SIM), en la cual se utilizaron dos iones característicos de cada analito y se configuró el detector para funcionar en modo de impacto de electrones, esta configuración permite ajustar electrónicamente el filamento del detector para que los diferenciales de potencial eléctrico sean lo más cercanos posibles a la relación m/z de los iones que se desean analizar, logrando mayor selectividad que cuando se trabaja con el monitoreo total de iones, básicamente porque en este último, electrónicamente el espectrómetro debe detectar un rango que va de los 40 m/z hasta los 600 m/z lo que implica mayor capacidad de monitoreo pero pérdida de selectividad ^{[43],[60]}.

En la tabla 15 se observan los tiempos de retención de los dos plaguicidas estudiados, y los iones de cuantificación como resultados de la implementación de la técnica SIM.



Tabla 15: Tiempo de Retención e iones hallados por la técnica de monitoreo selectivo de iones SIM

Plaguicida	Tiempo de retención (min.)	iones de cuantificación (m/z)
Simazina	16,068	200,215
Atrazina	16,345	44,201

Otro resultado, del desarrollo de la metodología cromatográfica, es la detección de algunos silicatos presentes en el patrón certificado. Es importante porque el patrón está diseñado para ser analizado con un detector de captura de electrones compuestos como los silicatos son indetectables para éste, pero al emplear un espectrómetro de masas, la identificación es completa para cualquier matriz a analizar. Este resultado también se encuentra reportado en trabajos^[66] que utilizan un detector y patrones semejantes a los empleados en este trabajo; los mencionados silicatos son los preservantes de los patrones de plaguicidas organoclorados^[66], se presume que es para evitar la interacción de compuestos organoclorados con las paredes de cualquier recipiente de vidrio que los contenga en solución.

4.3 ANÁLISIS DE RESULTADOS DE LOS PARÁMETROS ESTADÍSTICOS EVALUADOS EN LOS MÉTODOS

El objetivo general de esta investigación es implementar un procedimiento para la determinación de pesticidas organoclorados en suelo de origen agrícola para ser implementado en el Laboratorio de Servicios Analíticos y de Investigación (LABSAI-UC). A través de la validación se obtienen resultados soportados en un amplio trabajo estadístico, que permite establecer con determinado grado de confianza la incertidumbre de cualquier medición realizada, entre los términos o figuras de mérito desarrolladas en esta investigación se encuentran:

- Límite de Detección.
- Límite de Cuantificación.
- Intervalo de trabajo
- Linealidad.



- Exactitud
- Precisión
- Sensibilidad

4.3.1 Límite de detección y Cuantificación

Para estimar los límites de detección y cuantificación, se empleó el enfoque de la IUPAC^[61], se realizaron los cálculos por medio de la ecuación 1 y 2 (véase capítulo 2). En la tabla 16 se reflejan los resultados obtenidos.

Tabla 16. Límite de detección y cuantificación obtenidos de la validación para la atrazina y la simazina.

Analito	Unidades	Límite de detección (LD)	Límite de cuantificación (LC)
Atrazina	µg/mL	0,002	0,006
Simazina	µg/mL	0,014	0,048

El límite de detección es un parámetro importante en los métodos analíticos, sobretodo cuando se miden analitos que deben encontrarse a nivel de trazas. Comparando los resultados obtenidos con los valores reportados por el método 505 de la Environmental Protection Agency^[57], los cuales reportan un límite de detección para la atrazina 0,002ppm y para la simazina 0,007ppm; se puede concluir que el método validado en esta investigación es eficiente para la determinación de trazas de atrazina y simazina. En este punto radica gran pertinencia de este trabajo porque estos compuestos son utilizados actualmente como herbicidas en diversas regiones agrícolas del país y específicamente en la región estudiada en este trabajo.

4.3.2 Intervalo de trabajo

Para el estudio del intervalo de trabajo se emplea la metodología para el estudio del rango lineal propuesta por Huan^[63]. Los valores de concentración en la tabla 17, corresponden a los intervalos de trabajo del método validado en esta investigación. Este intervalo corresponde al rango lineal de la curva de



calibración que se observa en las figuras 8 y 9. Como se puede observar en las mencionadas figuras, por encima del intervalo de trabajo seleccionado en esta investigación, se observa un cambio brusco de la pendiente, así como una apreciable disminución en la calidad del coeficiente de correlación. Para trabajar en concentraciones superiores a las de esta investigación, es necesario implementar otra metodología de calibración, conocida como calibración mixta o multivariable^[43].

Tabla 17: Intervalos de trabajo para la determinación de Atrazina, Simazina en muestras de suelo agrícola.

Analito	concentración (µg/mL)
Atrazina	0,05- 0,20
Simazina	0,05 - 0,25

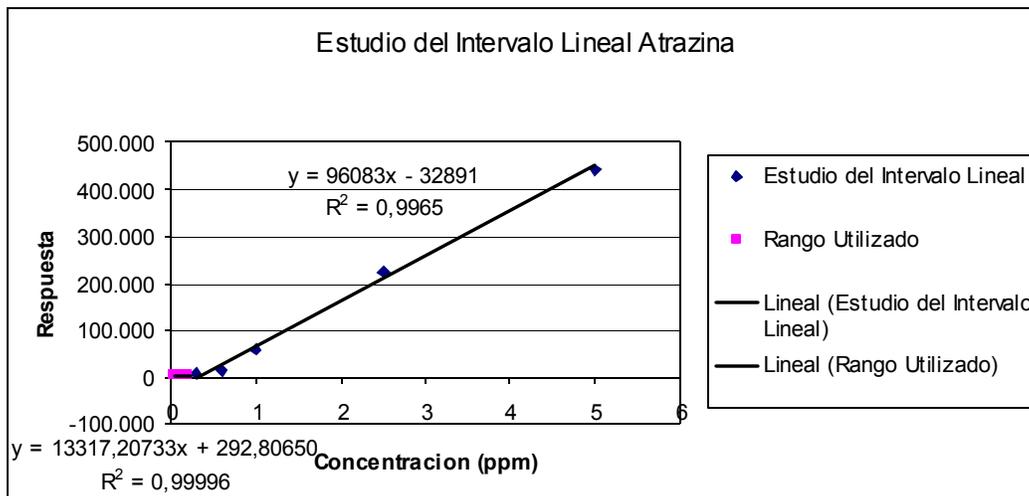


Figura 8. Estudio del comportamiento lineal de la curva de calibración de la atrazina.

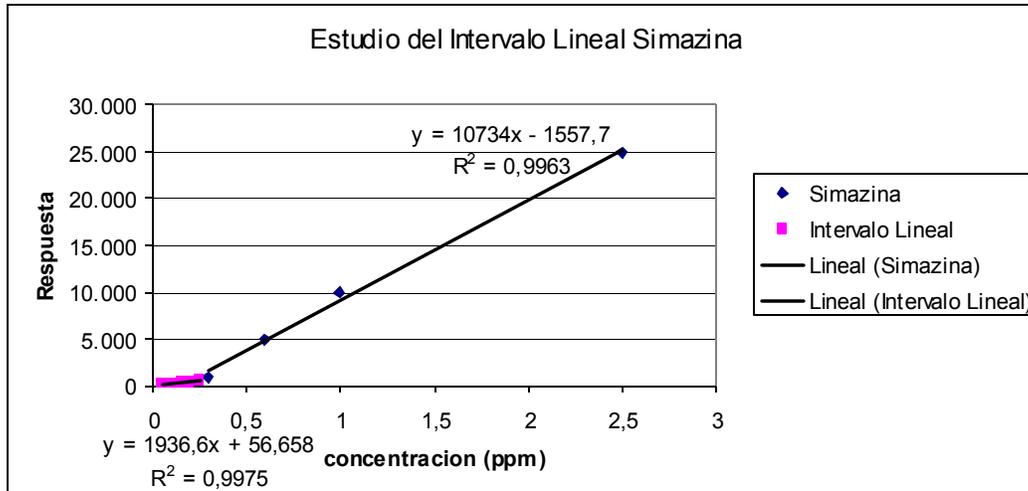


Figura 9. Estudio del comportamiento lineal de la simazina.

Esto indica que se pueden determinar las concentraciones de estos pesticidas organoclorados a niveles de trazas. A pesar de que no existe una ley o decreto en nuestro país que regule la atrazina y simazina en suelos si se compara con los límites permisibles por los reglamentos de agua potable a nivel mundial. El método funciona ya que la concentración máxima permitida (0,02ppm)^[21] se encuentra en el rango de trabajo de este método.

4.3.3 Estudio de la Linealidad

Para la determinación de la precisión, exactitud e incertidumbre, se realizaron cinco niveles mas un blanco, tomando en cuenta los requisitos establecidos en el protocolo de la EURACHEM^[52]. Para saber como se ajustan los puntos experimentales, a una función lineal, fue necesario calcular el coeficiente de correlación (r) para los resultados promedio de los patrones encontrados en condiciones de precisión intermedia.

En la tabla 18, se pueden observar los coeficientes de correlación correspondientes a las curvas de calibración de la atrazina y la simazina, los cuales se aproximan a 1. Sin embargo como se explicó en el Capítulo II sección 2.4.2.12.1 esto no es suficiente para la validación del resultado, para corroborar estadísticamente se calculó la $t_{\text{experimental}}$ del método, al ser mayores que la t_{critica} se puede afirmar que la correlación entre las dos variables es prácticamente



perfecta positiva, es decir, a medida que aumenta una de ellas aumenta la otra^[64].

Tabla 18. Coeficientes de correlación (r) para los resultados experimentales obtenidos del método

Analito	Coefficiente de correlación (r^2)	t experimental	t crítica *
Atrazina	0,99996	1910,46	3,18
Simazina	0,9975	241,36	3,18

*148 grados de libertad a un 95% de confianza. El crítico extraído del Miller y Miller^[43].

A continuación, se muestra en la figura 10 la curva de calibración promedio para la atrazina y la simazina con su respectiva ecuación de la recta.

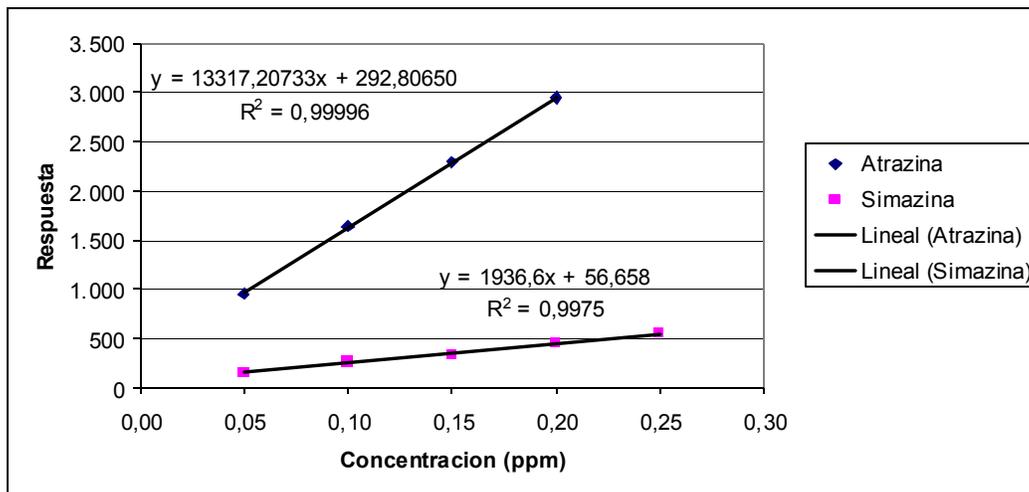


Figura 10. Curva de calibración promedio para la determinación de atrazina y simazina empleando cromatografía de gases/Espectrometría de masas.

4.3.4 Análisis de exactitud

La exactitud puede determinarse a través de la recuperación y la precisión, y además es solo un parámetro cualitativo, cuya información, transmite una idea de si el método en estudio es malo o es bueno.

Para estimar la exactitud del método estudiado se empleó el porcentaje de recuperación del analito. Se impregno aproximadamente 10g de suelo para alcanzar un concentración aproximada de $0,15\mu\text{g}/\text{mL}$ con el patrón de



referencia, y se realizó el mismo proceso de extracción, análisis y cuantificación por CG-EM que para la muestra real y el blanco, por triplicado.

Empleando la ecuación 3 mostrada en el capítulo 2, se calculó el porcentaje de recuperación (véase tabla 19). Al comparar el porcentaje de recuperación de esta investigación con el obtenido por la bibliografía empleando este método de extracción^[65], se confirma que es posible alcanzar estos niveles de exactitud con el procedimiento validado en este trabajo.

Tabla 19. Porcentaje de recuperación obtenido para la atrazina y la simazina.

Analito	Fortificación (ppm)	%recuperación	%promedio	Sb
Atrazina	0,15	101,30	100	1
		99,02		
		99,99		
Simazina		100,00	100	1
		98,99		
		100,99		

4.3.5 Precisión del método

Basados en los criterios estadísticos (véase capítulo II), los resultados obtenidos se muestran en la tabla 20. De acuerdo con la bibliografía^[61] para muestras con un rango de concentración entre 0,01 y 1,00 ppm la desviación estándar relativa es aceptable para la repetibilidad entre 1,0-2,5%. Lo cual indica que el método aplicado para la determinación de atrazina y simazina empleando cromatografía de gases acoplado a un espectrómetro de masas cumple con el parámetro de repetibilidad.

A pesar de que en la concentración 0,10ppm de la simazina se nota que el valor de %RSD es un poco elevado, este comportamiento se considera aceptable, ya que existe la teoría de Horwitz quien demostró que la desviación estándar relativa de un método varía con la concentración^[61], dicha teoría denota que el coeficiente de variación aumenta con la disminución de la concentración en que se encuentre el analito en la muestra, debido a que el



método es menos sensible a la simazina que a la atrazina refleja un error mayor cuando esta se encuentra en concentraciones muy bajas, sin embargo no indica que el método no pueda detectarla y cuantificarla.

Para el estudio mas profundo de la precisión, se estudia la reproducibilidad. En este trabajo se empleó la precisión intermedia (véase capítulo II) es un parámetro que permite conocer la precisión de un método cuando no se poseen laboratorios para realizar comparación de resultados. En esta investigación se implementó la variación del analista. Obteniendo resultados de total precisión intermedia.

Tabla 20. Resultados de la repetibilidad del método validado.

Analito	Nivel (ppm)	Respuesta			Xprom	Sr	%RSD
		Día 1	Día 2	Día 3			
Atrazina	0,05	978	946	938	954	21	2
	0,10	1633	1621	1644	1.632	11	1
	0,15	2282	2241	2343	2.289	51	2
	0,20	2954	2941	2969	2.955	14	0,5
Simazina	0,05	156	155	155	155	1	0,5
	0,10	255	252	263	257	5	2,1
	0,15	333	338	337	336	2	0,7
	0,20	443	441	435	440	5	1
	0,25	543	553	548	548	5	0,9

Donde: Xprom: es el promedio de las respuestas, Sr: es la desviación estándar, y el %RSD: es la desviación estándar relativa.

4.3.6 Sensibilidad

Este parámetro se puede definir como el cambio en la respuesta del instrumento correspondiente al cambio en la concentración del analito.

Teóricamente se sabe que el método más sensible es aquel cuya curva de calibrado tenga la mayor pendiente^[61]. Al observar la figura 8, se puede concluir que, la sensibilidad del método es mayor para la determinación de atrazina que para el análisis de la simazina.



4.3.7 Medición de Muestras Reales

La implementación del método validado en este trabajo comprende el muestreo y determinación de atrazina y simazina, en suelos que actualmente se encuentran fumigándose con estos plaguicidas, ya que son fincas de producción agrícola.

La selección del suelo a analizar se realizó bajo el asesoramiento del Lic. Juan Uztariz, jefe del Laboratorio de Sustancias Peligrosas, de la Dirección de Salud Ambiental del Ministerio de Salud. Al personal de agricultores se le aplicó una encuesta para poder tener conocimiento del tipo de plaguicidas que se están utilizando actualmente, así como estar al tanto de las condiciones climáticas en los últimos meses entre otros detalles (véase apéndice A).

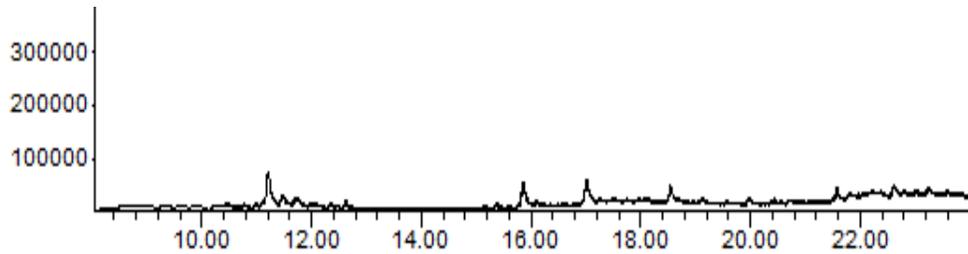
Este suelo se trató, y se realizó el mismo procedimiento de extracción que para todas las muestras de validación (véase capítulo III). Se procedió al análisis por cromatografía de gases-espectrometría de masas en modo SIM para determinar si el método que fue validado detectaba atrazina o simazina en el extracto, se encuentra el resultado de este análisis, el cual fue no detectado para estos plaguicidas.

La investigación bibliográfica que comprende las moléculas a estudiar (véase capítulo II) permite decir que, estos plaguicidas tienen un tiempo de duración en la corteza superior del suelo de máximo tres meses, el suelo fue fumigado aproximadamente dos meses y medio antes del análisis, además de esto, quince días antes de realizar el muestreo, los agricultores señalaron que hubo fuertes lluvias en la zona (para ver estos datos, véase apéndice B). Lo que indica que en la profundidad a la que se tomaron las muestras de este estudio, no fue posible detectar estos compuestos.

Sin embargo, cabe destacar, que en el trabajo realizado en paralelo con esta investigación se determinaron estos plaguicidas en el pozo de agua subterránea de esta finca. Esto permite presumir que el comportamiento que reporta la bibliografía (véase capítulo II), la atrazina percoló contaminando las aguas subterráneas. Aunque no se detectaron plaguicidas con el método validado, se realizó el análisis por espectrometría de masas pero con la técnica de corriente total de iones (TIC) véase figura 11, para aprovechar la



herramienta de espectrometría de masas y ver si el método de extracción es apto para extraer otro tipo de compuestos orgánicos persistentes. Para este análisis, se puede decir que se consiguieron compuestos alifáticos de alto peso molecular, resultado de esperarse, puesto a que el suelo agrícola es rico en sustancias orgánicas^[25] y el método de extracción utilizado en esta investigación es útil para compuestos orgánicos persistentes.

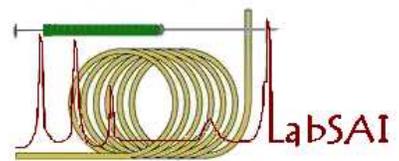


Time-->

Figura 11. Cromatograma del suelo agrícola por la técnica de corriente total de iones.



CAPITULO V



Conclusiones y Recomendaciones



CONCLUSIONES

La validación de métodos de muestreo de suelos suele ser muy costosa y poco eficiente, por lo que la captación de la muestra se deja en manos de la experticia del analista.

El método de extracción utilizado en esta investigación es el óptimo para ser implementado en el laboratorio de servicios analíticos y de investigación (LABSAI-UC) sustentado en una matriz de selección en comparación a otros métodos estandarizados, tomando como criterio el costo, equipos y cantidad de reactivo a emplear.

El método cromatográfico desarrollado en esta investigación es el más óptimo, al ser comparado a través de una matriz de selección con métodos estandarizados que se emplean para análisis de plaguicidas organoclorados.

Al trabajar con la atrazina y la simazina, es necesario aplicar isotermas antes de la rampa de calentamiento propuesta por la mayoría de los métodos estandarizados para lograr resolución cromatográfica aceptable en términos de la separación de estos dos analitos.

La implementación de la técnica de monitoreo selectivo de iones fue determinante para poder detectar los plaguicidas de este estudio a niveles de trazas.

El límite de detección y cuantificación validado en esta investigación, para la atrazina es de 0,002ppm y 0,014ppm respectivamente.

El límite de detección y cuantificación validado en este trabajo para la simazina es de 0,006ppm y 0,048ppm respectivamente.

Al comparar el límite de detección y cuantificación validado en este trabajo con el método 505 de la Agencia de protección ambiental (EPA) se



puede decir que es un límite apto para encontrar trazas de atrazina y simazina en suelos agrícolas.

El intervalo de trabajo validado en esta investigación para la atrazina y simazina es de (0,05-0,20) ppm y (0,05-0,25) ppm respectivamente, esto es útil para trabajar en muestras ambientales donde las concentraciones de estos compuestos se encuentran a nivel de trazas.

Al hacer un estudio estadístico del coeficiente de correlación de Pearson se puede asegurar que la correlación entre las dos variables (respuesta vs concentración) es prácticamente perfecta positiva, es decir, a medida que aumenta una de ellas aumenta la otra.

El porcentaje de recuperación para la atrazina y simazina es de (100 ± 1) % indicando alta exactitud del método validado en esta investigación.

La desviación estándar relativa se encuentra entre un 1,0-2,5%. Lo cual indica que el método aplicado para la determinación de atrazina y simazina empleando cromatografía de gases acoplado a un espectrómetro de masas cumple con el parámetro de repetibilidad dentro de lo encontrado para esta técnica.

La determinación de atrazina y simazina así como otros plaguicidas organoclorados resultó negativa o no detectado, se cumple lo que dice la bibliografía y es que la atrazina es un agente que percola en el suelo contaminando las aguas subterráneas.



RECOMENDACIONES

De la experiencia obtenida en este trabajo sobre el muestreo de suelos agrícolas, se recomienda seleccionar apropiadamente el suelo de referencia, puesto que al no ser suelos agrícolas la toma de muestra puede ser muy complicada y tediosa.

Comprobar que no hay un efecto en la extracción Soxhlet tanto positivo como negativo al realizarla en dos bloques de 8 horas y no 16 horas continuas como establece el método estandarizado.

Se recomienda realizar el estudio con cinco días de análisis, tal como lo recomienda la EURACHEM, para verificar los resultados obtenidos en esta investigación.

Al menos un mes antes de la investigación se recomienda al menos un mes antes de realizar la validación, realizar un mantenimiento profundo al equipo, e inyectar solo compuestos puros, para bajar la relación de iones en el espectrómetro de masas.

Realizar un monitoreo de la atrazina, simazina, DDT y endosulfan en suelos y aguas de pozos adyacentes a zonas agrícolas del municipio libertador del Edo. Aragua.

Realizar un trabajo de validación, pero enfocado a los plaguicidas organofosforados y carbamatos ampliamente utilizados actualmente en nuestro país.

**REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.**

- [1]. Hornsby, G., Wauchope, D., Herner, E., (1996) "Pesticide Properties in the Environment", Springer-Verlag, New York.
- [2]. Ministerio de Agricultura y Tierras (MAT), (2005) "Anuario Estadístico Agropecuario Rubro Cebolla" UEMAT-Lara, Circuitos Agroalimentarios, Barquisimeto, Venezuela.
- [3]. Torres, D., Capote, T., (2000). "Evaluación de un método para la determinación de pesticidas organoclorados en sedimentos". Trabajo de grado. Universidad Centro Occidental Lisandro Alvarado.
- [4]. Pierre, F., Betancourt, P., (2007) "Residuos de Pesticidas Organoclorados y Organofosforados en el cultivo de Cebolla en la depresión de Quíbor Venezuela" *Bioagro* 19(2):69-78.2007
- [5]. Piñero, M., Izquierdo, P., Cagnasso M., Urdaneta, A., (2007) "Residuos de plaguicidas organoclorados en 4 tipos de aceites vegetales" *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, Vol. 57 N° 4, 2007.
- [6]. Uzcátegui, J., González, S., Torres, M., Hernández, M., Valera, N., Erazo, D., Abdul, A., y Mendoza, G., (2010) "Presencia de Plaguicidas Organoclorados en las Aguas del Monumento Natural Laguna de Urao, Lagunillas, Municipio Sucre, Estado Mérida, Venezuela" XXIX Congreso Latinoamericano de Química-CLAQ 2010.
- [7]. Maldonado, H., (1997) "El uso de plaguicidas, la salud y la educación agrícola". *Geoenseñanza*, (2): 62-75.
- [8]. Gil, M., (2006) "Informe ciudadano de la situación de los contaminantes orgánicos persistentes en Venezuela". Proyecto Internacional de Eliminación de los COP. Venezuela Fundación Agua Clara.
- [9]. Lutz, A., Greulich, K., Kempe, G., Viet h, B., (2006) "Residue analysis of 500 high priority pesticides: better by GC-MS or LC-MS/S". *Mass Spectrometry Reviews* 25,838-865.
- [10]. República Bolivariana de Venezuela, Ministerio del Poder Popular para el Ambiente. "Informe preliminar de inventario sobre contaminantes orgánicos persistentes". Archivo Nacional de la República.



- [11]. Carvajal, A., (2001) "Los Contaminantes Orgánicos Persistentes (COP) en México". Greenpeace México, Campaña de Tóxicos.
- [12]. Koning, H., Cantahede, A., Benavides, L., (1994) "Desechos peligrosos y salud en América Latina y el Caribe". Centro Panamericano de Ingeniería Sanitaria y Ciencias del Ambiente (CEPIS) de la OPS.
- [13]. Roberts, D., Laughlin, L., Hsheih, P., Legters, J., (1997) "DDT, global strategies and Malaria control crisis in South America". *Emerging Infectious Diseases*, Vol. 3, No. 3.
- [14]. Schoeneberger, J., Wysocki, C., Benham, D., (1998). "Field book for describing and sampling soils". Natural Resources Conservation Service, USDA, National Soil Survey Center, Lincoln, NE.
- [15]. Carillo, I., Suarez, R., (1995). "Como obtener una buena muestra para el análisis de suelos". *Cenicafé. Avances Técnicos*, 214: 1-4 p.
- [16]. Schrecka, E., Gereta, L., Gontierb, M., (2008) "Development and validation of a rapid multiresidue method for pesticide determination using gas chromatography–mass spectrometry: A realistic case in vineyard soils" *Talanta* 77 (2008) 298–303.
- [17]. Tadeo, J., (2008) "Analysis of Pesticides in Food and Environmental Samples" CRC Press Taylor & Francis Group.
- [18]. U.S. National Library of Medicine. (1995) "Hazardous Substances Databank". Bethesda, MD, 1995.9-10
- [19]. Metcalf, R., (2002). "Insect Control" in *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry* Wiley-VCH, Weinheim.
- [20]. Plimmer, R., (2003). "The Encyclopedia of Agrochemicals, (Vol. 3)". New York: John Wiley & Sons.
- [21]. Environmental Protection Agency. (2006). "Triazine Cumulative Risk Assessment and Atrazine, Simazine, and Propazine Decisions".
- [22]. Environmental Protection Agency, (2009). "Restricted Use Products (RUP) Report: Six Month Summary List"
- [23]. Tomlin, C., (2000) "The Pesticide Manual". British Crop Protection Council.



- [24]. Roberts, D., Laughlin L., Hsueh, P., Legters, J., (1997) "DDT, global strategies and Malaria control crisis in South America". *Emerging Infectious Diseases* 3(3).
- [25]. White, R., (1971) "Pesticides in the Environment". Marcel Dekker, New York.
- [26]. Metcalf, R., (2002). "Insect Control" *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry* Wiley-VCH.
- [27]. Stenersen, J., (2004) "CHEMICAL PESTICIDES MODE OF ACTION AND TOXICOLOGY" CRC Press
- [28]. Casida, E., Quistad, G., (1998). "Golden age of insecticide research: past, present, or future?" *Annu. Rev. Entomol.* , 43, 1–16.
- [29]. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. (2007) "Heptachlor and Heptachlor Epoxide". ATSDR-Fact Sheet.30.
- [31]. Commission for Environmental Cooperation (2006). "North American Regional Action Plan on lindane and other hexachlorocyclohexane (HCH) isomers".
- [32]. Devine, M., Duke, O., Fedke, C. (1993). "Physiology of Herbicide Action". Prentice Hall, New York.
- [33]. Hjelm, O., (1996). "Organohalogenes in Forest Soil". Department of Water and Environmental Studies, Linköping University, Linköping.
- [34]. Stolbovoy, V., Filippi, N., Montanarella, L., Piazzini, M., Petrella, F., Gallego, J., Selvaradjou, S., (2006) "Validation of the EU Soil Sampling Protocol To Verify The Changes of Organic Carbon Stock in Mineral Soil (Piemonte Region, Italy)". European Commission Joint Research Centre. EUR 22339 EN.
- [35]. Occupational and Residential Exposure Test Guidelines. (2001) "Soil Residue Dissipation" OPPTS 875.2200
- [36]. Reetz, H., "Efficient Fertilizer Use Manual — Soil Sampling". Mosaic.
- [37]. United States Environmental Protection Agency. (1992) "Preparation of Soil Sampling Protocols: Sampling Techniques and Strategies". EPA/600/R-92/128
- [38]. Schmeck, T., Wenclawiak, B., (2005) "Sediment Matrix Induced Response Enhancement in the Gas Chromatographic–Mass Spectrometric Quantification



of Insecticides in Four Different Solvent Extracts from Ultrasonic and Soxhlet Extraction” *Chromatographia* 62,159-165.

[39]. J.V. Cizdziel, V.F. Hodge, *Microchem. J.* 64 (2000) 85.

[40]. Fatoki, O., Awofolu, R., (2003). “Methods for selective determination of persistent organochlorine pesticide residues in water and sediments by capillary gas chromatography and electron-capture detection”. *Journal of Chromatography A.* (983): 225-226.

[41]. Sediment Matrix Induced Response Enhancement in the Gas Chromatographic–Mass Spectrometric Quantification of Insecticides in Four Different Solvent Extracts from Ultrasonic and Soxhlet Extraction

[42]. Miller, J., Miller J., (2002). “Estadística y quimiometría para química analítica”. Cuarta Edición. Editorial Pearson Prentice Hall. Madrid

[43]. Dass, C., (2007) “Fundamentals of Contemporary Mass Spectrometry” Wiley-Interscience Series on Mass Spectrometry. Wiley.

[44]. Karasali, H., Balayannis, G., Hourdakis, A., Ambrusb, A., (2006) “Development and single-laboratory validation of a new gas chromatographic multi-pesticide method of analysis of commercial emulsifiable concentrate formulations containing alachlor, chlorpyrifos methyl, fenthion and trifluralin as active ingredients *Journal of Chromatography A*, 1129 (2006) 300–303

[45]. Fifield, F., Kealey, D., (2000) “Principles and Practice of Analytical Chemistry Fifth Edition”. Blackwell Science Ltd.

[46]. Winefordner, J., [2000] “Statistical Methods in Analytical Chemistry Second Edition” John Wiley & Sons.

[47]. Ruiz, S., Aviata, L., (2001). “Incertidumbre de la Medición: Teoría y Práctica. Primera edición”. Consultores C.A. Maracay. Aragua

[48]. Norma Venezolana COVENIN 2552:1999 OIML V 2:1993. Fondonorma.

[49]. Cazes, J., (2002) “Encyclopedia of Chromatography” Marcel Dekker, Inc.

[50]. Lee, P., (2003) “Handbook of Residue Analytical Methods for Agrochemicals Vol. 1-2”. John Wiley & Sons Ltd.

[51]. Sánchez, C., Albero, B., Tadeo, J., (2004) “Multiresidue determination of pesticides in soil by gas chromatography-mass spectrometry”. *J. Agric. Food Chem.*, 526, 1445.



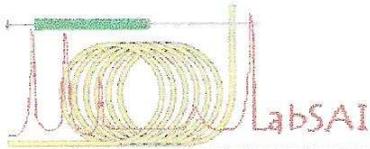
- [52]. Centro nacional de metrología, (1998) “Guía de laboratorio para validación de métodos y tópicos relacionados. EURACHEM”. CENAM- MEXICO. Primera edición en inglés.
- [53]. Vencill, K., (2002). “WSSA herbicide handbook 8th edition”. Weed Science Society of America. Lawrence, KS, USA.
- [54]. Environmental Protection Agency (1996) “3540C Soxhlet Extraction”
- [55]. Saeid, M., Al-Wabel, G., (2010) “One-step Extraction of Multiresidue Pesticides in Soil by Microwave-assisted Extraction Technique Journal of Applied Sciences 10(16):1775-1780.
- [56]. IESA (2009), “Herramientas de Calidad” Cap 6. Matriz de selección.
- [57]. Munch, J., Environmental Protection Agency, (1995) “method 505 analysis of organohalide pesticides and commercial polychlorinated biphenyl (pcb) products in water by microextraction and gas chromatography” Revision 2.1 U.S. Environmental Protection Agency Cincinnati, Ohio 45268
- [58]. Environmental Protection Agency, Agilent Technologies (1996) “Method 8081A Organochlorine Pesticides by Gas Chromatography”
- [59]. Eurachem Group., (1998) “The fitness for purpose of analytical methods a laboratory guide to method validation and related topics”. United Kingdom.
- [60] Agilent Technologies (2004) “Mass Spectrometer 5970, Hardware Information”.
- [61]. Riley, C., Rosanske, T., (1996). “Development and validation of analytical methods”. Elsevier Science, 57-59
- [62]. Wahlich J., Carr, J., (1990) “A practical validation in pharmaceutical analysis” Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, 8, 619-623
- [63]. Huang, Y., Jun, L., Chen, B., (2007) “Simultaneous determination of 102 pesticide residues in Chinese teas by gas chromatography–mass spectrometry Journal of Chromatography B, 853 (2007) 154–162
- [64] Cohen, J., Cohen, P., (1983) “Applied multiple regression/correlation analysis for the behavioral sciences”. Hillsdale, NJ: Lawrence Erlbaum Associates, Inc.



- [65]. Barriada, E., Concha, M., (2003) "Microwave-assisted extraction versus Soxhlet extraction in the analysis of 21 organochlorine pesticides in plants" *Journal of Chromatography A*, 1008, 1, 115-122
- [66]. Usma, J., Villegas, C., (2008) "Evaluación del grado de contaminación por pesticidas organoclorados del Río Otún, mediante GC-MS". *Scientia et Technica* Año XIV.
- [67]. Etxeberria, J. (1999). *Regresión Múltiple*. Cuadernos de Estadística. Ed. La Muralla S.A. Espérides, Salamanca.



APENDICE A



Laboratorio de Servicios
Analíticos y de Investigación, UC.

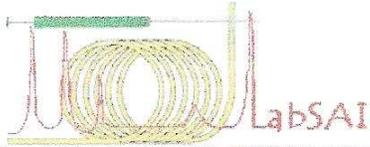
FORMATO DE RECOLECCION DE MUESTRAS.

1. Nro de Muestra: 1
2. Muestra de: Agua - Suelo X
3. Tipo de Muestra: Simple - Mixta: - Compuesta: X
 Blanco: X (En caso de ser mixta o compuesta) Cantidad de puntos que componen la muestra: 4

Punto	Características	Coordenadas	Punto	Características	Coordenadas
1	Muy duro,	N10°09.791'			
2	muchas rocas	W067°3214'			
3	Opaco	Elev: 433m			
4	arcilloso				
	Pozo Urb				
	San Antonio				
	20m del Rio Aragua				

Observaciones: Nicolosa H. Tlfon Flia. Hernandez = 0416-9291113

Figura A1. Formato de muestreo de la unidad 1 del suelo de referencia.



Laboratorio de Servicios
Analíticos y de Investigación, UC.

FORMATO DE RECOLECCION DE MUESTRAS.

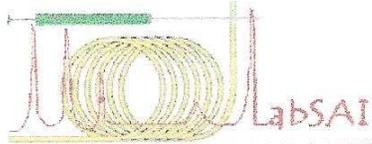
1. Nro de Muestra: 2
2. Muestra de: Agua — Suelo X
3. Tipo de Muestra: Simple — Mixta: — Compuesta: X
Blanco: X (En caso de ser mixta o compuesta) Cantidad de puntos que componen la muestra: 5

Punto	Características	Coordenadas	Punto	Características	Coordenadas
1	20cm sembrar	N10°09'896'			
2	3ra con la	W96°32.557'			
3	muestra #7	Elev: 445m			
4	Antiguo sembrar				
5	dis de caña y maíz, piso muy duro en la superficie				
	Urb Santa Elena				
	Final Calle B				

Observaciones: Wilmer Valera (0426-6315754)

Jose Diaz (0412-3477628)

Figura A2. Formato de muestreo de la unidad 2 del suelo de referencia.



Laboratorio de Servicios
Analíticos y de Investigación, UC.

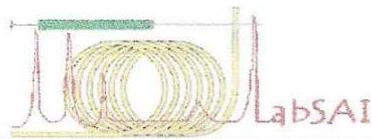
FORMATO DE RECOLECCION DE MUESTRAS.

1. Nro de Muestra: 3, 4, 5.
2. Muestra de: Agua — Suelo X
3. Tipo de Muestra: Simple — Mixta: — Compuesta: X
Blanco: X (En caso de ser mixta o compuesta) Cantidad de puntos que componen la muestra:

Punto	Características	Coordenadas	Punto	Características	Coordenadas
	Se sembraba	N 10° 9' 097"			
	maíz	W 60° 32' 32977"			
	Suelo Arcilloso				
	Arroz				
	Al lado de una				
	agropecuaria				
	Agropecuaria Los				
	Dos. Sector Las				
	Vegas. Se mangla-				
	llinas. Sector Los				
	Vegas				

Observaciones: Marcelino Vargas 0424.3379231
CI 7983237

Figura A3. Formato de muestreo de la unidad 3 del suelo de referencia.



Laboratorio de Servicios
Analíticos y de Investigación, UC.

Encuesta para la apropiada captación
de muestras de suelo y su posterior
análisis en el laboratorio de Servicios
Analíticos y de Investigación
LABSAI, para la tesis de Grado de
Jeanfranco Hernández.

1. ¿Fumiga Ud. Su plantación?: No Si ¿En que momento del año se realizan las fumigaciones?
Cada 3 meses, pero es variable algunas necesario fumigar otras no.
2. ¿Al fumigar donde aplica el producto?
Tierra Planta Hojas Frutos: Hongos: Insectos o animalitos que observe en su plantación:
Otro: Aspersión - tractor.
3. ¿Qué productos utiliza en su plantación?
Atrazina - limpia maiz
Gramoxone
Gramozil
hierbatox
4. ¿Aplica algún producto directamente sobre el suelo? ¿Sobre la tierra? No
Si: _____
5. ¿Cuándo fue la última vez que fumigó? ¿En que plantación o sector lo hizo? No mas de dos meses, sector el potrero.
6. ¿en periodo de fumigación cada cuanto o con que frecuencia lo realiza?
Diariamente: Semanalmente: Mensualmente: Otra
forma: una sola vez con el tractor se le pone y listo.
7. ¿Cual es la plantación o sector que mas necesita fumigación?
Sorop - ~~manzano~~ - Maiz, pero ~~es variable~~ ^{pero}
sembramos cambiar lo cual no se le pone nada, pero como dice es muy variable y relativo según el momento.

Figura A4. Formato de muestreo del suelo agrícola.

APENDICE B

EVAPORATIVE CONCENTRATORS

Kuderna-Danish

Developed in the laboratories of Julius Hyman and Company for the concentration of trace amounts of sample dissolved in organic solvents. It is very useful in sample preparation before analysis with solvents such as petroleum ether or hexane.

Preparation involves filling the flask to between 40 to 60 percent of capacity. To prevent sample loss initially, the column should be pre-wet with about 1 mL of the solvent used in the concentration. The column is designed to speed evaporation with reduced hold-up.

The charged assembly should be placed over a vigorously boiling water bath. The water level should be maintained just below the lower joint and the apparatus mounted so that the lower rounded surface of the flask is bathed in steam. The final sample remains in the lower tube for further analysis. Lower tube is ungraduated.

If solvent is allowed to escape, the entire assembly should be set up in a hood. For solvent recovery, a 547300 or 547400 Solvent Recovery Apparatus may be added to this unit. Series 570025 and 570035 have graduated concentrator tubes.



With Hooks and Springs

Article Number	Flask Cap. (mL)	Tube Cap. (mL)	Approx. Overall Height (mm)
570000-0125	125	5	505
570000-0250	250	10	540
570000-0500 ←	500	15	620
570000-0503	500	15	620
570000-1000	1000	20	655

Component Parts

503000-0121	Column, 3 Chamber, \$ 24/40
570001-0125	Flask, \$ 24/40 Top, \$ 14/20 Bottom, 125 mL
570001-0250	Flask, \$ 24/40 Top, \$ 19/22 Bottom, 250 mL
570001-0500	Flask, \$ 24/40 Top, \$ 19/22 Bottom, 500 mL
570001-1000	Flask, \$ 24/40 Top, \$ 24/25 Bottom, 1000 mL
570002-0125	Concentrator Tube, \$ 14/20, 5 mL
570002-0250	Concentrator Tube, \$ 19/22, 10 mL
570002-0500	Concentrator Tube, \$ 19/22, 15 mL
570002-1000	Concentrator Tube, \$ 24/25, 20 mL
662750-0012	1/2" Springs, Pkg./10 Pairs (1 Pair Supplied)

With Polyacetal Clamp

Article	Flask	Tube	Approx. Overall
---------	-------	------	-----------------



Figura B.1. Esquema del concentrador Kuderna Danis h.

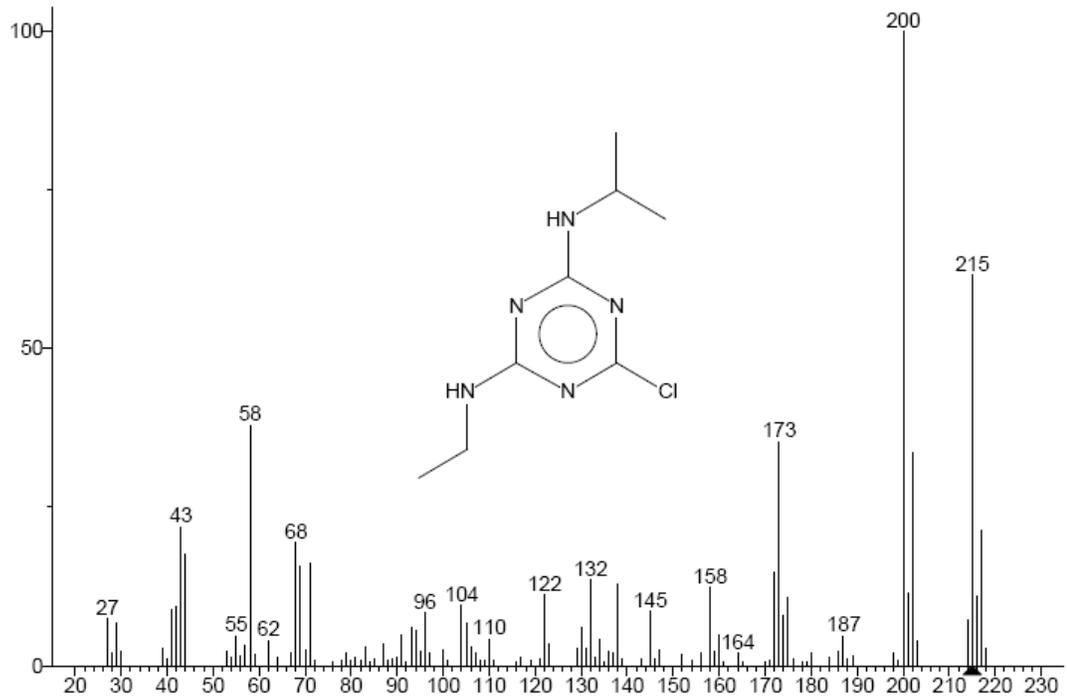


Figura B.2. Espectro de masa de la atrazina.



Figura B.3. Espectro de masa de la simazina.