

**DETERMINACIÓN DE PLAGUICIDAS EN MUESTRAS DE AGUAS Y
SEDIMENTOS DEL RÍO CAUCA POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE
ALTA RESOLUCIÓN (CLAR)**

YEIMMY YOHANNA TOBAR SALAZAR

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
POPAYÁN
2011**

**DETERMINACIÓN DE PLAGUICIDAS EN MUESTRAS DE AGUAS Y
SEDIMENTOS DEL RIO CAUCA POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE
ALTA RESOLUCIÓN (CLAR)**

Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de Química

YEIMMY YOHANNA TOBAR SALAZAR

DIRECTOR

M. Sc. JOSE ANTONIO GALLO C.

ASESOR

M. Sc. RODRIGO ANDRES SARRIA V.

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
POPAYÁN
2011**

Nota de Aceptación.

Director

José Antonio Gallo C.
M.Sc.

Jurado

Fernando Hernández.
M.Sc.

Jurado

Edier Humberto Pérez
Ph.D

Fecha de Sustentación. Popayán, Mayo 27 de 2011.

*“Solo a ti Dios te dedico en el día de hoy por lo que soy
Todo lo bueno que tengo solo tú lo has hecho realidad
Y en los días de mi vida siempre estarás conmigo
Porque solo tú eres mi faro
Solo tú eres mi creador
Solo tú eres y serás siempre mi señor”*

AGRADECIMIENTOS

A mis padres por ser quienes lucharon día a día y me formaron para ser lo que soy.

A mi hermano por confiar en mí.

Al profesor José Antonio Gallo, gracias por dirigir este trabajo.

A Rodrigo Sarria, gracias por la colaboración en la realización de este trabajo.

Al profesor Fabio Cabezas, por ser mi amigo.

A mis amigos a Andres Vivas, James Muñoz, Adalberto Trujillo, Yuri Cordoba, Lisbeth Benavides, Marcela Suarez, Lisbeth Muñoz, Liliana Bastidas, Victoria Recalde. A mis buenas amigas Anyi Zuñiga y Patricia Gutierrez. Gracias por permitirme conocerlos y brindarme su amistad y colaboración en todo momento.

Agradezco al profesor Fernando Hernández en la Unidad de Análisis Industriales quien facilito el desarrollo del presente trabajo.

A los profesores del Departamento de Química por ayudarme en mi formación profesional.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN	
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	12
2. OBJETIVOS	13
2.1 Objetivo General	13
2.2 Objetivos Específicos	13
3. FUNDAMENTO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE	14
3.1 Descripción general de plaguicidas	14
3.2 Problemática ambiental generada por el uso de plaguicidas	15
3.3 Plaguicidas de estudio	16
3.3.1 Triazinas	16
3.3.1.1 Atrazina	17
3.3.1.2 Simazina	17
3.3.2 Carbamatos	17
3.3.2.1 Carbaril	18
3.3.2.2 Metomil	18
3.3.3 Diuron	18
3.3.4 Propanil	18
3.4 Métodos de análisis de plaguicidas	20
3.4.1 Métodos de extracción para muestras líquidas	21
3.4.1.1 Extracción en fase sólida (SPE)	21
3.4.2 Métodos de extracción para muestras sólidas	24
3.4.2.1 Extracción líquido-sólido (ultrasonido)	24
3.6 Análisis estadístico	26
3.6.1 Diseño de experimentos	26
3.6.2 Diagramas de Pareto	27
3.6.3 Comparaciones no planeadas o a Posteriori	27
4. METODOLOGÍA	28
4.1 Materiales y Reactivos	28
4.1.1 Reactivos y Solventes.	28
4.1.2 Material de referencia certificado	28
4.1.3 Material de laboratorio	29
4.2 Estandarización de la metodología de análisis de plaguicidas por HPLC	29
4.2.1 Preparación de las soluciones estándar	29
4.2.2 Selección de las condiciones de análisis para HPLC	30
4.2.2.1 Selección de la longitud de onda	30
4.2.2.2 Selección de la fase móvil	30
4.2.2.3 Flujo de la fase móvil	30

4.2.3	Determinación de los parámetros de calidad	31
4.2.3.1	Evaluación de la linealidad del sistema	31
4.2.3.2	Determinación de los límites de detección y de cuantificación	31
4.2.3.3	Evaluación de la presión del sistema	31
4.2.3.4	Determinación del porcentaje de recuperación	31
4.3	Sedimentos	32
4.3.1	Extracción por ultrasonido de los plaguicidas en sedimentos.	32
4.3.1.1	Preparación de muestras fortificadas	32
4.3.1.2	Procedimiento de extracción por ultrasonido	32
4.4	Aguas	34
4.4.1	Extracción por SPE de los plaguicidas en aguas	34
4.5	Ubicación geográfica	35
4.6	Recolección de muestras	36
4.6.1	Preparación de muestras	36
4.6.1.1	Muestras de aguas	36
4.6.1.2	Muestras de sedimentos	36
4.7	Programas para tratamiento de datos	36
5.	ANÁLISIS DE RESULTADOS	37
5.1	Optimización de la separación de los plaguicidas por CLAR	37
5.1.1	Selección de la longitud de onda	37
5.1.2	Selección de la fase móvil	39
5.1.3	Selectividad del modificador orgánico	41
5.2	Estandarización del método analítico	43
5.2.1	Parámetros de calidad del método	44
5.2.1.1	Linealidad del sistema	44
5.2.1.2	Estudio de la precisión	47
5.2.2	Determinación del porcentaje de recuperación en aguas y sedimentos	49
5.2.2.1	Determinación del porcentaje de recuperación en la extracción de plaguicidas en aguas por SPE.	49
5.2.2.2	Extracción de plaguicidas en sedimentos por ultrasonido.	52
5.2.2.3	Aplicación a muestras reales.	66
	CONCLUSIONES	71
	RECOMENDACIONES	72
	BIBLIOGRAFÍA	
	ANEXOS	

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1.	Propiedades físicas y químicas de los plaguicidas de estudio	17
Tabla 2.	Matriz de diseño, de un diseño factorial 2^3	27
Tabla 3.	Especificaciones del material de referencia certificado	30
Tabla 4.	Material de laboratorio.	30
Tabla 5.	Variables y niveles del diseño experimental 2^3	35
Tabla 6.	Ubicación geográfica de sitios de muestreo de en el departamento del Valle del Cauca.	37
Tabla 7.	Resolución entre las dos parejas consecutivas de picos frente al porcentaje de componente orgánico	41
Tabla 8.	Condiciones óptimas de trabajo seleccionadas en el análisis por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR)	45
Tabla 9.	Parámetros de calidad del método propuesto.	47
Tabla 10	Coefficientes de regresión.	49
Tabla 11.	Análisis de varianza (ANOVA).	50
Tabla 12.	Precisión intermedia para la simazina	51
Tabla 13.	Análisis de varianza (ANOVA) para la simazina, nivel bajo.	52
Tabla 14.	Porcentaje de recuperación por SPE de los plaguicidas	52
Tabla 15.	% de recuperación para el carbaril	53
Tabla 16.	% de recuperación para la atrazina	54
Tabla 17.	Porcentaje de recuperación de plaguicidas en sedimentos	56
Tabla 18.	Análisis de varianza (ANOVA) para el carbaril	57
Tabla 19.	Comparaciones múltiples: carbaril Tukey HSD	57
Tabla 20.	Análisis de varianza (ANOVA) para la simazina	59
Tabla 21.	Parámetros de la extracción y niveles de los factores utilizados en el diseño.	66
Tabla 22.	Porcentajes de recuperación de los plaguicidas en sedimentos	68
Tabla 23	Sedimentos, muestreo I (Junio 2010).	70

LISTA DE ANEXOS

- ANEXO 1.** Mapa del departamento del Valle del Cauca con los sitios de muestreo.
- ANEXO 2.** Toma de muestra de sedimentos y aguas.
- ANEXO 3.** Cromatogramas obtenidos a diferentes longitudes de onda.
- ANEXO 4.** Determinación del flujo óptimo (Curva de Van Deemter)
- ANEXO 5.** Factor de capacidad o retención
- ANEXO 6.** Composición de la fase móvil MeOH:agua
- ANEXO 7.** Cromatogramas en fase móvil metanol-agua
- ANEXO 8.** Prueba de normalidad (Shapiro – Wilk)
- ANEXO 9.** Prueba de homogeneidad de varianzas (Levene)
- ANEXO 10.** Límites de detección y cuantificación IUPAC
- ANEXO 11.** Linealidad y repetibilidad
- ANEXO 12.** Precisión intermedia
- ANEXO 13.** Estudio del porcentaje de recuperación (Prueba t)
- ANEXO 14.** Cromatograma del extracto blanco de matriz en la extracción fase sólida
- ANEXO 15.** Cromatogramas representativos obtenidos con diferentes solventes de extracción en sedimentos.
- ANEXO 16** Comparación de solventes
- ANEXO 17.** Diseño de experimentos
- ANEXO 18.** Modificación fortificación de sedimentos
- ANEXO 19** Cromatograma representativo del blanco utilizado en la extracción de sedimentos.
- ANEXO 20** Análisis físicos y químicos de sedimentos del río Cauca
- ANEXO 21** Resultados de los muestreos para aguas y sedimentos.

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

%CV	Porcentaje de coeficiente de variación
%R	Porcentaje de recuperación
ACN	Acetonitrilo
AcOET	Acetato de etilo
CV	Coeficiente de variación
CLAR	Cromatografía Líquida de Alta Resolución
CG	Cromatografía de gases
mAU	Miliunidades arbitrarias
MeOH	Metanol
LOD	Límite de Detección
LOQ	Límite de Cuantificación
ppm	Partes por millón
U.V	Ultravioleta
ANOVA	Análisis de varianza

RESUMEN

En los últimos años en Colombia el uso de plaguicidas en la agricultura ha aumentado considerablemente, estos pueden llegar a contaminar aguas superficiales y subterráneas lo cual es un riesgo para la salud humana tanto por exposición directa como a través de residuos en productos de consumo como agua y alimentos.

El río Cauca es uno de los ríos más importantes de Colombia, en su recorrido por el departamento del Valle del Cauca región eminentemente agrícola, con más de 200.000 hectáreas sembradas de caña, se prevé la presencia de cantidades significativas de plaguicidas en sus aguas, sedimentos y biota como consecuencia de la escorrentía de los cultivos.

Este trabajo permitió estandarizar el método cromatográfico para la identificación y cuantificación de plaguicidas pertenecientes a diferentes tipos de estructuras: triazinas (simazina, atrazina), fenilurea (diuron), carbamato (carbaril) y del grupo de las amidas (propanil), en aguas y sedimentos del río Cauca a lo largo del tramo comprendido entre Balsa (Cauca) y Anacaro (Valle del Cauca). Dentro de la metodología que se desarrolló, se realizó la aplicación de técnicas como la extracción en fase sólida (SPE) y ultrasonido.

Se analizó la presencia y distribución de los plaguicidas en aguas (simazina, atrazina, diuron, propanil y carbaril) y en los sedimentos (metomil, simazina, atrazina, diuron, propanil y carbaril). El estudio comprendió las épocas seca y de transición. Los sedimentos fueron colectados en ocho estaciones de muestreo, ubicadas a lo largo del río, los plaguicidas de mayor frecuencia encontrados fueron la simazina, atrazina y diuron.

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La contaminación por residuos de plaguicidas constituye un problema actual de enorme importancia debido a los daños potenciales de estas sustancias sobre el medio ambiente así como en la salud humana. El riesgo que suponen los plaguicidas implica la desaparición de determinados seres vivos, alterando las cadenas tróficas y provocando desequilibrios biológicos, además de los efectos en la salud de los seres humanos por intoxicaciones crónicas y agudas.

El cultivo de la caña de azúcar (*Saccharum officinarum L*) está concentrado fundamentalmente en el valle geográfico del río Cauca. Los agricultores, con el fin de obtener cosechas más satisfactorias, han aplicado diferentes plaguicidas para lograr un control adecuado de plagas, lo que puede generar la contaminación de los ecosistemas por el escurrimiento de estos contaminantes tóxicos al río Cauca que atraviesa toda esta región de tal manera que se supone la presencia de cantidades significativas de plaguicidas, principalmente de aquellos asociados con este tipo de cosechas, en aguas, biota y sedimentos. En Colombia se han realizado diversos estudios de plaguicidas órganoclorados y órganofosfatados, sin embargo la cantidad de sustancias tóxicas emitidas por la agricultura es cada vez mayor y no se tienen suficientes estudios de compuestos como la simazina, atrazina, diuron, carbaril, metomil y propanil, por lo cual es importante el seguimiento y control de dichos contaminantes.

Con base en las consideraciones anteriores, se hace necesario realizar la caracterización, cuantificación y distribución de residuos de plaguicidas en aguas y sedimentos del río Cauca a lo largo del tramo comprendido entre Balsa (Cauca) y Anacaro (Valle del Cauca), aplicando técnicas analíticas apropiadas tales como la extracción en fase sólida (SPE), ultrasonido y cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) con detección ultravioleta.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Establecer los sitios con mayor concentración de plaguicidas de uso agrícola, en el tramo del río Cauca comprendido entre La balsa (Cauca) y Anacaro (Valle del Cauca) y poder determinar si existe o no contaminación.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Optimizar el método para la extracción de plaguicidas en aguas y sedimentos por extracción fase solida (SPE) y ultrasonido respectivamente.

Establecer las condiciones para realizar la extracción de los plaguicidas a estudiar en sedimentos que produzcan el óptimo rendimiento al evaluar factores como: uso de solventes de diferentes polaridades, tiempo de extracción, porcentaje de recuperación etc.

Estandarizar los parámetros analíticos de la técnica cromatográfica para la determinación simultánea de seis plaguicidas pertenecientes a diferentes tipos de estructuras químicas: triazinas (simazina, atrazina), fenilurea (diuron), carbamato (carbaril, metomil) y del grupo de las amidas (propanil) de uso agrícola en el Valle del Cauca.

3. FUNDAMENTO TEORICO Y ESTADO DEL ARTE

3.1 DESCRIPCIÓN GENERAL DE PLAGUICIDAS

Los plaguicidas, incluyen una amplia variedad de productos muy diferentes en su composición y propiedades, se entiende por plaguicida o pesticida, “cualquier sustancia destinada a prevenir, destruir, atraer, repeler o combatir cualquier plaga, incluidas especies indeseadas de plantas o animales, durante la producción y/o almacenamiento, transporte, distribución y elaboración de alimentos, productos agrícolas o alimentos para animales, o que pueda administrarse a los animales para combatir ectoparásitos”. El término incluye las sustancias destinadas a utilizarse como reguladores del crecimiento de las plantas, defoliantes, desecantes, agentes para reducir la densidad de la fruta o inhibidores de la germinación y las sustancias aplicadas a los cultivos antes o después de la cosecha para proteger el producto contra su deterioro durante el almacenamiento y transporte. El término no incluye normalmente los fertilizantes, nutrientes de origen vegetal o animal, aditivos alimentarios ni medicamentos para animales.¹

El uso indiscriminado de plaguicidas se traduce en diversos y hasta impredecibles problemas de salud en humanos y animales, en una acelerada destrucción de la fauna benéfica, desarrollo de resistencia en plagas, resurgencia de plagas primarias y brote de plagas secundarias. La alta y comprobada toxicidad de estos productos químicos destruye organismos micro y macroscópicos necesarios para el mantenimiento de la fertilidad natural de los suelos, degradando el recurso, alterando el equilibrio natural de las plantas, haciéndolas más atractivas al ataque de plagas y enfermedades, contaminando las aguas, el aire y los alimentos. Además de todas estas consecuencias negativas, el productor se enfrenta a los elevados costos alcanzados por estos productos, incidiendo de manera negativa en la relación costo/beneficio y afectando, por ende, los ingresos y calidad de vida del productor y su familia.²La contaminación del medio ambiente se produce principalmente por aplicaciones directas en los cultivos agrícolas, una vez en el suelo, los plaguicidas pueden pasar a aguas superficiales y subterráneas por lixiviación, dependiendo de sus características químicas tales como solubilidad en agua, capacidad de adsorción sobre el suelo, capacidad de ionización, tipo de suelo

¹Codex Alimentarius. Citado por HERNANDEZ BORGES, Javier. Nuevas metodologías de análisis de pesticidas por electroforesis capilar [Tesis de grado].Universidad de la Laguna. 2005. 3 p.

²NIVIA, Elsa. Mujeres y Plaguicidas, una mirada a la situación actual, tendencias y riesgos de los plaguicidas. Estudio de caso en Palmira, Colombia. En: Boletín, RAPALMIRA, ECOFONDO, PAN. Palmira, Colombia. Octubre, 2000. 15 p. ISBN: 958-33-1809-4.

(contenido en arcillas, en materia orgánica, porosidad, etc.), así como de las características topográficas o climáticas (temperatura o grado de precipitación acuosa, etc.)³

3.2 PROBLEMÁTICA AMBIENTAL GENERADA POR EL USO DE PLAGUICIDAS

El río Cauca es uno de los ríos más importantes de Colombia, presenta una longitud total de 1350 km y una cuenca hidrográfica aproximada de 63300 km². Nace en el sur del país cerca del páramo de Sotará en el departamento del Cauca y desemboca en el Brazo de Loba en el río Magdalena en el departamento de Bolívar, al norte del país. El río Cauca brinda grandes beneficios a los departamentos que recorre, como son: Cauca, Valle del Cauca, Quindío, Risaralda, Caldas, Antioquia, Córdoba, Sucre y Bolívar. Este es aprovechado para múltiples propósitos: generación de energía, extracción de materiales, captación de agua, pesca, recreación, etc.⁴

En el recorrido del río Cauca a lo largo del país se identifican claramente cuatro zonas: Alto Cauca, Valle Alto, cañón del Cauca o Cauca Medio y Bajo Cauca. La zona de interés del presente estudio corresponde al Valle Alto del río Cauca, en el tramo comprendido entre las estaciones de monitoreo La Balsa (Cauca) y Anacaro (Valle del Cauca), con una longitud de 389 Km. Este tramo del río se encuentra bajo la jurisdicción de la CVC. El río en esta zona presenta una temperatura media de 24°C, una altura sobre el nivel del mar que varía entre 900 y 1000 m, su ancho y profundidad varían entre 80-150 m y 3.5-8.0 m respectivamente, la precipitación promedio anual es de aproximadamente 1000mm y la humedad promedio mensual oscila entre 70 y 75% .

El río Cauca en su recorrido por el Departamento del Valle del Cauca presenta serios problemas de polución. El Valle del Cauca, por ser una región eminentemente agrícola, con más de 200.000 hectáreas sembradas de caña, se espera la presencia de cantidades significativas de plaguicidas de uso agrícola como la simazina, atrazina, diuron, carbaril, metomil y propanil, en sus aguas, sedimentos y biota como consecuencia de la escorrentía de los cultivos. Otros problemas de contaminación, más visibles se encuentran asociados con el uso inadecuado del suelo, el tratamiento primario o nulo de las descargas de aguas de uso doméstico de los centros urbanos, entre los que se encuentra la

³HERNANDEZ. Op. cit., p. 10

⁴SCHUHMACHER, Marta; OCAMPO-DUQUE, William Andrés y NÚÑEZ María Eugenia. Memoria científico-técnica del proyecto: "Modelo de evaluación ambiental en ríos que reciben Altas cargas contaminantes" Ministerio de asuntos exteriores y de cooperación. España. 2008. p. 6-7.

ciudad de Cali (ciudad de más de dos millones de habitantes), los aportes de aguas residuales de las industrias, la explotación minera, los procesos de deforestación y la contaminación por el inadecuado manejo de los residuos sólidos procedentes de los municipios. Esto ha producido un deterioro creciente y lamentable de la calidad del agua del río. En consecuencia el análisis de sus aguas es muy importante para asegurar y mantener la calidad necesaria para que su utilización no represente ningún peligro para los seres vivos.⁵

Entre los potenciales contaminantes de este río están los plaguicidas de uso agrícola en el Valle del Cauca como los nombrados anteriormente, los cuales presentan notables diferencias en sus solubilidades en medios acuosos y en consecuencia, en los equilibrios de distribución entre la disolución y la materia en suspensión. Este comportamiento justifica el secuestro preferencial en sedimentos de estos contaminantes. “Es conocido que los sedimentos actúan como sumideros intermedios y finales para muchos contaminantes y que además, se producen removilizaciones, especialmente de sustancias orgánicas y parte de los contaminantes pueden pasar a la porción biótica del ecosistema”.⁶

Por lo tanto, la importancia que los sedimentos entren en el diseño de programas de control, radica en la localización de fuentes de contaminación, en el establecimiento de los incrementos producidos en las concentraciones halladas en las proximidades de fuentes y de la evolución de procesos contaminantes acumulativos, etc.⁷

3.3 PLAGUICIDAS DE ESTUDIO

En la tabla 1, se muestran las principales propiedades físico-químicas de los plaguicidas de estudio, la solubilidad en agua, presión de vapor (Pv), el coeficiente de reparto octanol-agua (Kow) y el coeficiente de adsorción (Koc), donde un elevado Koc indica que el plaguicida va a ser retenido por el suelo, mientras que si la solubilidad, es alta, el compuesto podrá ser transportado a otros sistemas inmerso en la disolución acuosa (lixiviación de plaguicidas), la Pv indica su tendencia a ser volatilizado y el Kow su potencial de bioacumulación.⁸

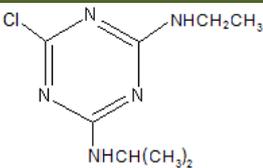
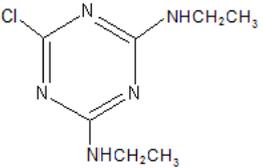
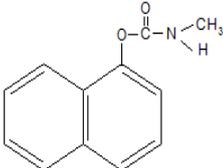
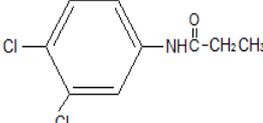
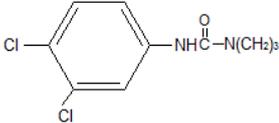
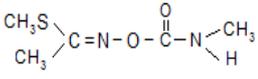
⁵Ibid., p. 8

⁶PINO ESTÉVEZ, Verónica. Extracción y preconcentración micelar. Aplicación a la determinación de hidrocarburos aromáticos policíclicos en muestras de interés medioambiental [Tesis de doctorado]. Universidad de la Laguna. 2002.7-8 p.

⁷Ibid., p. 9

⁸GÓMEZ DE BARREDA FERRAZ, Op. cit., p.13-14

Tabla 1. Propiedades físicas y químicas de los plaguicidas de estudio⁹

Plaguicida	Estructura	Peso Molecular (g/mol)	Solubilidad (mg/L)	Pv (mPa)	Log Kow	Koc
Atrazina		215,7	33 (22 °C)	0.04 (20 °C)	2.34	103
Simazina		201,70	5 (20 °C)	8 · 10 ⁻⁴ (20 °C)	1,96	130
Carbaril		201.22	40 (30°C)	5,3 (25 °C)	1.59- 2.3	300
Propanil		218,08	225 (25 °C)	12 (60 °C)	2,29	149
Diuron		233,10	42 (25 °C)	0,41 (50°C)	-	480
Metomil		162,21	57900 (25°C)	6,65 (25°C)	-	72

3.3.1 Triazinas

La familia de las triazinas representa un grupo de herbicidas ampliamente utilizados en diferentes cultivos (caña de azúcar, maíz, sorgo, trigo y varios tipos de pasturas). Las triazinas son compuestos relativamente móviles que pueden tener efectos nocivos sobre los ecosistemas acuáticos, ingresando a los mismos principalmente por escurrimiento de aguas pluviales provenientes de áreas cultivadas tratadas. Dicha presencia está influenciada por factores como la naturaleza del material sedimentario, el crecimiento de macrófitas y la

⁹GÓMEZ DE BARREDA FERRAZ, Op. cit., p.13.

actividad microbiana, por lo cual las triazinas, están sujetas a degradación biológica, química y fotoquímica. Son resistentes al ataque microbiano debido a su estructura de anillo que presentan tales compuestos, por lo tanto esto indica una menor importancia a los mecanismos biológicos frente a los químicos.¹⁰ En la tabla 1, se presentan propiedades fisicoquímicas de las triazinas a estudiar (atrazina y simazina).

3.3.1.1 Atrazina

La atrazina, es un herbicida selectivo que tiene como mecanismo de acción la inhibición del fotosistema I en el proceso fotosintético en plantas sensibles. Este herbicida tiene actividad tanto en el suelo como vía foliar.¹¹ Está clasificado como peligroso para el medio ambiente y muy tóxico para los organismos acuáticos, no obstante para las aves el nivel de toxicidad es bastante escaso.

3.3.1.2 Simazina

La simazina, al igual que la atrazina, controla gramíneas y latifoliadas en cultivos de maíz, alfalfa, caña de azúcar, manzanos, cítricos, pino y eucalyptus, entre otros. Es de acción sistémica y residual, se absorbe a través del sistema radicular, no teniendo efecto alguno sobre la semilla. Actúa impidiendo la asimilación de CO₂ y la reacción de Hill interfiriendo la función clorofílica.¹²

3.3.2 Carbamatos

Este grupo presenta un gran interés en el campo de los plaguicidas por su gran actividad biológica. Los carbamatos son inhibidores de la acetilcolinesterasa, enzima responsable de la inactivación del neurotransmisor acetilcolina alterando por consiguiente la transmisión del impulso nervioso.¹³ Todos estos productos derivan del ácido carbámico, de fórmula HO-CO-NH₂. Se pueden distinguir tres grandes familias de compuestos: los aril-N-carbamatos, los

¹⁰ BERNAL-GONZÁLEZ, Marisela y DURÁN-DE-BAZÚA Carmen. Degradación de triazinas y carbamatos en agua superficial. XXXI Congreso Interamericano Aidis Santiago – Chile, Octubre de 2008.

¹¹ FUENTES, Celia. Comportamiento y destino ambiental de la atrazina en el suelo: detección por HPLC y ¹⁴C de las concentraciones ambientales bajo condiciones controladas y de campo en Saldaña – Tolima. En: Agronomía Colombiana, 2003. Vol. 21 (1-2).p29-48

¹² GÓMEZ DE BARREDA FERRAZ, Diego. Comportamiento de herbicidas residuales en suelos. Posible contaminación de acuíferos. [Tesis de doctorado]. Universidad Politécnica de Valencia, 1999. p.6

¹³ BERNAL-GONZÁLEZ. Op. cit., p.6-10

carbamatos heterocíclicos y las oximas. En la tabla 1, se presentan propiedades fisicoquímicas de los carbamatos a estudiar (carbaril y metomil).

3.3.2.1 Carbaril

El carbaril, aril-N-metilcarbamato, es un insecticida extensivamente usado en la agricultura para la protección de las cosechas, este compuesto es menos persistente que los plaguicidas organoclorados. Los métodos para el análisis de carbaril por cromatografía de gases (CG) han demostrado ser problemáticos debido a su polaridad y características termolábiles.¹⁴

3.3.2.2 Metomil

El metomil, S-metil-N-(metilcarbamoiloxi)tioacetimidato, es un insecticida de alta toxicidad para peces, aves, abejas y crustáceos. Presenta una alta movilidad en el suelo, en Colombia es usado para la protección de los cultivos de frutas, flores y vegetales.

3.3.3 Diuron

El diuron (tabla 1), es un herbicida que pertenece a la familia del fenilamida y subclase de fenilurea. Se ha usado en diferentes productos agrícolas como la alfalfa, algodón soja, cacao, banano, café, caña de azúcar, etc. También se ha usado en las áreas de no-cosecha como los caminos. Es estable a la oxidación y a la humedad en condiciones normales, en medio neutro y a temperatura ambiente, pero se hidroliza a altas temperaturas, así como en medios ácidos y básicos. Es poco absorbido por el sistema foliar de las plantas. Su acción preferente es residual, por lo que también se absorbe por las raíces. El diuron debido a su alta persistencia puede encontrarse en muchos ambientes como aguas, suelos y sedimentos.¹⁵

3.3.4 Propanil

El propanil (tabla 1), pertenece al grupo de las amidas y se aplica principalmente al control de malas hierbas en cultivos de arroz. Este herbicida tiene una larga actividad residual en suelos y aguas, permaneciendo en ellos

¹⁴BISWAS, Ashim. *et al.* A simple assay for analyzing residues of carbaryl insecticide in buffalo meat by liquid chromatography–photodiode array detection. En: Journal of Chromatography A, febrero 2010. p. 75–81.

¹⁵HIDALGO, Carmen. Simplificación del tratamiento de muestra en el análisis de residuos de herbicidas en aguas mediante aplicación de las técnicas cromatográficas acopladas LC-LC y SPE-LC. [Tesis de doctorado]. Universidad de Jaume .1999. p. 155

durante meses, cuando la actividad microbiana es escasa. Estudios toxicológicos demuestran el serio daño que causa este herbicida a los sistemas acuáticos y en definitiva, a la cadena alimenticia, cuando éste pasa a las aguas, de ahí que sea de vital importancia su análisis y determinación.¹⁶

3.4 MÉTODOS DE ANÁLISIS DE PLAGUICIDAS

Actualmente existen diferentes métodos de análisis que permiten identificar y determinar la concentración de plaguicidas en muestras acuosas y sedimentos. En el desarrollo de estos métodos se deben tener en cuenta dos factores principalmente, por un lado, debido a que las muestras medioambientales son muy complejas, los métodos se basan mayoritariamente en el uso de técnicas de separación, básicamente cromatográficas, con las que se lleva a cabo la separación de los diferentes compuestos; por otro lado, como las concentraciones a las que se encuentran presentes estos compuestos en las muestras medioambientales son muy bajas, se precisan sistemas de detección muy sensibles para su cuantificación, o bien se utiliza una etapa de preconcentración que permita alcanzar los límites de detección necesarios previa a la separación y detección.¹⁷

Entre las técnicas cromatográficas más utilizadas en la actualidad se pueden mencionar principalmente la cromatografía de gases (CG) ampliamente empleada para el análisis multi-residual de plaguicidas, sin embargo, el análisis de compuestos de alto peso molecular, altamente polares o térmicamente lábiles presenta grandes dificultades o es prácticamente imposible de realizar mediante CG. "Este hecho ha provocado que la cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) haya ido ganando terreno en el análisis de este tipo de compuestos, existen otras técnicas cromatográficas de uso minoritario como la cromatografía de fluidos supercríticos (CFS) y la cromatografía de capa fina (CCF). Entre las técnicas no cromatográficas que también se han aplicado al análisis medioambiental se pueden mencionar la electroforesis capilar (EC)".¹⁸

Los plaguicidas suelen estar presentes en el agua a niveles traza por lo que generalmente no es posible determinar su concentración mediante una medida

¹⁶MUÑOZ DE LA PEÑAA, MAHEDERO M. C. and BAUTISTA-SÁNCHEZ, A. Monitoring of phenylurea and propanil herbicides in river water by solid-phase-extraction high performance liquid chromatography with photoinduced-fluorimetric detection. En: Talanta. 2003. vol. 60, p. 279- 285.

¹⁷PEÑALVER, Alejandra. Aplicación de la microextracción en fase sólida al análisis medioambiental [Tesis de doctorado]. Universidad Rovira I Virgili. 2002. 7 p.

¹⁸Ibid., p. 8

instrumental directa y se hace necesario utilizar alguna técnica de preconcentración como etapa previa a la determinación de estos compuestos.

Las técnicas de pretratamiento de muestra más utilizadas son la extracción en fase sólida (SPE), la microextracción en fase sólida (SPME) y la extracción líquido-líquido (LLE) esta última cada vez menos aunque actualmente se están utilizando en mayor número técnicas como la extracción asistida por microondas o la extracción con fluidos supercríticos.

3.4.1 Método de extracción de los plaguicidas de estudio en aguas

3.4.1.2 Extracción en fase sólida (SPE)

La SPE se realiza forzando el paso de los analitos disueltos en una matriz líquida a través de un soporte sólido de naturaleza extractante, donde los analitos quedan retenidos para posteriormente ser eluidos con una mínima cantidad de disolvente orgánico. En este proceso se ven implicados mecanismos de absorción, reparto y desorción. La elección de la fase sólida depende de la polaridad de los plaguicidas y del tipo de matriz utilizada. Hoy en día están disponibles muchos tipos de materiales como fases, lo que puede originar diferente selectividad cuando se aplica a la extracción de contaminantes.¹⁹

Las fases estacionarias de SPE se pueden utilizar con diferentes fines, por un lado pueden utilizarse como un filtro químico para la purificación de una muestra, reteniendo los analitos y dejando pasar el resto de los componentes de la matriz, o bien, reteniendo dichos componentes y dejando pasar a los analitos. Por otro lado pueden utilizarse como técnica de preconcentración o de enriquecimiento de trazas, lo que la convierte en una poderosa herramienta sobre todo cuando la concentración de los analitos en la muestra está por debajo del límite de detección de la técnica, también se utilizan para el fraccionamiento de la muestra en diferentes compuestos o grupos de compuestos (eluyendo cada fracción con una fase líquida distinta), así como intercambiadores de disolvente de la muestra (el analito es retenido y el disolvente de elución puede ser distinto al disolvente de la muestra) lo que puede resultar de gran utilidad como paso previo a muchas técnicas de separación. También permite el almacenamiento de analitos que sean inestables en medio líquido o que tengan una elevada volatilidad, así como

¹⁹GARCÍA, A. Análisis de residuos de contaminantes orgánicos en alimentos por técnicas cromatográficas. 2008. Universidad de Valencia. p.41-43

llevar a cabo reacciones de derivatización entre grupos reactivos del analito y los grupos de la superficie del adsorbente.²⁰

La extracción en fase sólida (SPE) es ampliamente utilizada para las muestras de aguas debido a que precisa de menores cantidades de disolventes orgánicos, generalmente tóxicos, los tiempos necesarios para realizar la extracción son menores y la manipulación de la muestra es también menor. A pesar de las ventajas inherentes de la SPE sobre la LLE, es necesario destacar que aunque la cantidad de disolventes orgánicos utilizados en SPE es mucho menor, todavía se utilizan volúmenes relativamente grandes. Es importante pues buscar técnicas alternativas en las que el uso de disolventes orgánicos sea todavía menor, como es el caso de la SPME.²¹

Existen diversas publicaciones referentes a la determinación de plaguicidas (simazina, atrazina, diuron, metomil, propanil y carbaril) utilizando CLAR y SPE entre las que pueden destacarse las siguientes:

Pinto y Jardim,²² emplearon cartuchos C₁₈ para la extracción de plaguicidas en aguas, entre los que se encontraban atrazina y simazina, la determinación se realizó mediante CLAR con detección ultravioleta. Las recuperaciones obtenidas fueron en todos los casos superiores al 75 %, con límites de detección entre 6.2 y 9.3 µg/L.

Ruberu, Draper y Perera,²³ determinaron plaguicidas derivados de la fenilurea entre los que se encontraba el diurón, se extrajo mediante SPE, utilizando tanto discos Empore C18 de 47mm como una precolumna de concentración. Los herbicidas se separaron en una columna en fase reversa con un gradiente de acetonitrilo-agua y se detectaron mediante DAD y detector de fluorescencia, tras fotólisis postcolumna y derivatización de los plaguicidas. Para muestras de agua del río Colorado fortificadas en un rango de concentración de 1 a 50 mg/L, obtuvieron recuperaciones entre 74-104 %.

²⁰ Ibid., p. 12

²¹ PEÑALVER. Op. cit., p. 4

²² PINTO, Glauca Maria F. y JARDIM, Isabel Cristina S.F. Use of solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography for the determination of triazine residues in water: validation of the method. En: Journal of Chromatography A, 2000. Vol. 869, p. 463–469

²³ RUBERU, S.R., DRAPER, W.M. y PERERA, S.K. J. En: Agric. Food Chem. 2000. 48, 4109. Citado por GÓMEZ PACHECO, María del Mar. Determinación de plaguicidas en aguas mediante tratamiento quimiométrico de señales analíticas. En: Revista digital "Investigación y Educación", 2005. Vol.3, no. 20, p. 25. ISSN 1696-7208.

Zhou, Xie y Pang,²⁴ describieron un nuevo método para la determinación de atrazina en muestras de aguas por microextracción en fase líquida dispersiva en combinación con cromatografía líquida de alta eficacia (CLAR). Los posibles parámetros de impacto como el pH de la muestra, los solventes dispersores, el efecto salting-out, y tiempo de extracción fueron investigados. El método propuesto demostró ser una alternativa excelente para el análisis rutinario de atrazina en muestras medioambientales.

Trana, Hyne y Doble,²⁵ aplicaron diferentes técnicas de extracción para la preconcentración de diez herbicidas entre los que se encuentran (2,4-D, atrazina, bensulfuron-metil, clomazona, dicamba, diurón, MCPA, metolaclor, simazina y triclopir) en medio acuoso. La extracción líquido-líquido se realizó con diclorometano y la extracción en fase sólida (SPE) utilizando cartuchos Oasis[®] HLB o SDB-XC Empore[™] discos. Compararon la eficacia de la extracción de estos herbicidas en diferentes matrices, los herbicidas fueron separados y cuantificados por CLAR con detector ultravioleta. La SPE utilizando SDB-XC Empore[™] discos se aplicó para determinar los herbicidas en el área de riego Murrumbidgee (NSW, Australia) durante dos semanas de Octubre a Noviembre de 2005.

Fuentes,²⁶ optimizaron y validaron un método analítico que incluyó extracción, limpieza, y determinación cromatográfica por CLAR los compuestos atrazina, deetilatrazina y deisopropilatrazina en muestras de suelo bajo condiciones controladas y de campo en Saldaña –Tolima. La detección se realizó con un detector ultravioleta-visible a una longitud de onda de 218 nm, empleando una columna RP-18 y fase móvil acetonitrilo: agua, bajo gradiente.

Brondi y Lancas,²⁷ determinaron la presencia de residuos de plaguicidas usados en los cultivos de caña de azúcar (tebutiuron, hexazinona, diuron, 2,4-D y ametrina), en fuentes de agua. Los analitos se aislaron de la matriz de agua a través de las siguientes técnicas: extracción líquido-líquido (LLE); extracción fase sólida (SPE); extracción por fluidos supercríticos (SFE). El análisis del cromatográfico se realizó por cromatografía líquida de alta resolución con

²⁴ZHOU, Qing Xiang; XIE, Guo Hong y PANG, Long. A Rapid determination of atrazine in environmental water samples by a novel liquid phase microextraction. En: Chinese Chemical Letters. 2008. Vol. 19, p. 89–91.

²⁵ TRAN, Anh. T.K; HYNE, Ross. V. y DOBLE, Philip. Determination of commonly used polar herbicides in agricultural drainage waters in Australia by HPLC. En: Chemosphere. 2007. Vol. 67, p. 944–953.

²⁶FUENTES. Op. cit., p. 29-48.

²⁷BRONDI S. H. G.; LANÇAS F.M. Development and validation of a multi-residue analytical methodology to determine the presence of selected pesticides in water through liquid chromatography. En: J. Braz. Chem. Soc. 2005. Vol.16, p. 3.

detector ultravioleta y usando como la fase móvil acetonitrilo/agua. Entre las tres técnicas de extracción evaluadas, los mejores resultados se obtuvieron con la extracción líquido-líquido y extracción en fase sólida.

Ferrer, Hennion, y Barcelo,²⁸ extrajeron triazinas y derivados de la fenilurea de sedimentos y aguas naturales, usando una columna inmunoabsorbente. Para la determinación se utilizó HPLC-MS con ionización química en línea a presión atmosférica. Los límites de detección variaron en el rango de 0.001-0.005 µg/L, obteniéndose recuperaciones altas para todos los compuestos.

Melo, Collins y Jardim,²⁹ validaron un método para la determinación multiresiduo de seis plaguicidas en tomates (tebutiuron, diurón, simazina, atrazina, ametrina y benomil). Utilizando extracción en fase sólida con diferentes materiales C₁₈ y NH₂, hechos en el laboratorio, los resultados fueron comparados con materiales comerciales similares. Realizaron la fortificación en tres niveles (100, 200, 1000 µg/L). El análisis cromatográfico se realizó por CLAR con detector ultravioleta. Los resultados muestran que los materiales de NH₂ son mejores que los C₁₈ y los materiales hechos en el laboratorio dan resultados similares a los comerciales.

Por otro lado, Lee,³⁰ emplearon cartuchos C₁₈ para la extracción de trazas de plaguicidas en sangre y orina humana, entre los que se encontraba el diurón, la determinación se realizó mediante CG con detección por ionización de llama. Las recuperaciones obtenidas fueron en todos los casos superiores al 79 %, con límites de detección entre 0.14-0.16 mg/mL

3.4.2 Método de extracción de los plaguicidas de estudio en sedimentos

3.4.2.1 Extracción líquido-sólido (ultrasonido)

El empleo directo de disolventes para la extracción de analitos de muestras medioambientales es uno de los métodos de extracción más antiguos y usados en química analítica, se pueden clasificar estos métodos en dos grupos: aquellos que necesitan un aporte de calor (Soxhlet) y aquellos que no necesitan calor (agitación o sonicación).³¹

²⁸ FERRER, I., HENNION, M.C. AND BARCELO, D. En: Anal. Chem. 1997 vol. 69, p. 4508. Citado por GÓMEZ PACHECO, Op. cit., p. 27.

²⁹ MELO, Lucio F.C; COLLINS, Carol H. y JARDIM Isabel C.S.F. High-performance liquid chromatographic determination of pesticides in tomatoes using laboratory-made NH₂ and C₁₈ solid-phase extraction materials. En: Journal of Chromatography A, 2005. vol.1073, p. 75–81

³⁰ LEE, X., KUMAZAWA, T., TOMITA, Y., KITABAYASHI, K., HATTORI, H. y SATO, K., J. En: Forensic Toxicol. 1995, vol.13, p. 232. Citado por Gómez Pacheco Op. cit., p. 26.

³¹ ESTEVE, F. Preparación de muestras para el análisis de plaguicidas mediante microondas y fluidos presurizados. [Tesis de doctoral]. Universidad de Valencia. 2007.p. 33-44.

La extracción por ultrasonidos o sonicación, emplea ondas sonoras para producir la agitación de la muestra en el disolvente. Para ello, se puede emplear tanto una sonda como un baño generador de ultrasonidos, repitiendo el proceso dos o tres veces más. Una de las mayores aplicaciones de los ultrasonidos es la extracción, tanto de compuestos orgánicos como de inorgánicos de diversos tipos de muestras (suelos, sedimentos, muestras biológicas, etc.). La extracción asistida por ultrasonido se ha aplicado con buenos resultados a la extracción de muestras de sedimentos, proporcionando un contacto más eficaz entre el sedimento y el disolvente extractante, traduciéndose en una mayor recuperación de los analitos.³²

Los aparatos ultrasónicos comerciales más comunes en laboratorios de química son el baño de limpieza por ultrasonidos y la sonda ultrasónica. El baño presenta las ventajas de ser la fuente de irradiación económicamente más asequible, al tiempo que asegura una sencilla distribución de la energía en el reactor que se coloque en el baño. La sonda destaca por su mayor potencia, y por el hecho de que ésta sea variable.³³

La extracción por ultrasonido se ha seleccionado para muestras de sedimentos debido a que es un método sencillo y requiere cantidades pequeñas de disolventes orgánicos, reduciendo, por lo tanto, el riesgo para la salud humana y el medio ambiente, lo que representa una ventaja en comparación con otros métodos tradicionales.

Existen diversas publicaciones referentes a la determinación de los plaguicidas que se estudian en este trabajo, utilizando CLAR y ultrasonido, entre las que pueden destacarse las siguientes:

Rezic, Horvat, y Babic,³⁴ optimizaron un método para la extracción de plaguicidas por ultrasonido entre los que se encontraba la atrazina, la optimización del procedimiento de extracción fue con respecto a la cantidad de solvente, tiempo de sonicación y número extracciones. El extracto ultrasónico lo compararon con dos métodos tradicionales Soxhlet y agitación magnética.

³²CASTRO JIMÉNEZ, Javier. Determinación, persistencia y distribución de insecticidas de uso agrícola en el medio ambiente. [Tesis doctoral].Madrid, 2002.p19

³³HERNANDEZ. Op. cit., p. 10

³⁴Rezic, I; Horvat, A.J.M; Babic, S; Kastelan-Macan M. Determination of pesticides in honey by ultrasonic solvent extraction and thin-layer chromatography. En: Ultrasonics Sonochemistry. 2005. Vol.12, p.477–48129.

Babic,³⁵ determino atrazina y simazina en muestras de miel, la extracción de los plaguicidas se llevó a cabo por ultrasonido con una solución de benceno:agua 1:1 v/v. La recuperación de los plaguicidas en miel fue de 92.3 ± 2.4 para la atrazina y 94.2 ± 2.8 para el simazina, cuando se extrajeron tres veces por 20 minutos, usando 20 mL de solvente.

Pan, Xiao-Xiao y Liang,³⁶ desarrollaron un método multi-residuos para la determinación de plaguicidas entre el que se encontraban el carbaril y simazina. La optimización del procedimiento de extracción para muestras de vegetales fue respecto a la cantidad de solvente, tiempo de sonicación y el número extracciones. El extracto no necesitó limpieza antes inyectar en equipo (LC-MS-MS). El procedimiento propuesto permite la extracción de seis residuos de plaguicidas en un solo paso con 40 mL de acetato del etilo, 35 minutos de sonicación, proporcionando recuperaciones por encima del 83%.

Babic, Petrovic y Kastelan-Macan³⁷ Optimizaron un método para la extracción de plaguicidas por ultrasonido entre los que se encontraba la atrazina, la optimización del procedimiento de extracción fue con respecto a la cantidad de solvente, tiempo de sonicación y el número extracciones. Por ultrasonido obtuvieron recuperaciones para la atrazina de 103.56 ± 2.8 . Cuando se extrajo una vez por 15 minutos, usando 20 mL de cetona. El extracto ultrasónico lo compararon con dos métodos tradicionales Soxhlet y agitación magnética.

3.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

3.6.1 Diseño de experimentos

3.6.1.2 Diseños factoriales a dos niveles

Uno de los diseños experimentales más utilizados para estudiar el efecto de varios factores (variables de interés) sobre una respuesta (característica estudiada), son los diseños factoriales a dos niveles (valores que puede tomar cada factor), también conocidos como diseños factoriales 2^k .

Estos diseños se caracterizan por plantear experimentos en todas las combinaciones de valores de los factores, y como cada factor toma 2 valores

³⁵ BABIC, Sandra; PETROVIC, Mira; KASTELAN-MACAN, Marija. Ultrasonic solvent extraction of pesticides from soil. En: Journal of Chromatography A, 1998. vol. 823 p. 3–9.

³⁶ PAN, Jian; XIAO-XIAO, xia; LIANG, Juan. Analysis of pesticide multi-residues in leafy vegetables by ultrasonic solvent extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. En: Ultrasonics Sonochemistry. 2008. Vol.15 p.25–32

³⁷ BABIC, Sandra; PETROVIC, Mira; KASTELAN-MACAN, Marija. Ultrasonic solvent extraction of pesticides from soil. En: Journal of Chromatography A. 1998. vol. 823 p. 3–9.

distintos, si el número de factores es k , el número total de experimentos a realizar será 2^k . Por ejemplo, un diseño factorial 2^3 (con 3 factores) requiere la realización de 8 pruebas experimentales, que denominamos “experimentos” o “corridas”. Los dos niveles de los factores se representan con los signos (-) y (+), o con los valores -1 y +1 (o simplemente 1). Para los factores cuantitativos el signo (-) representa al factor en su nivel bajo y el signo (+), en su nivel alto. Para los factores cualitativos, la asignación de los signos (-) y (+) a cada nivel se realiza de forma arbitraria³⁸

La tabla con los niveles a experimentar en cada condición experimental para cada uno de los factores se denomina matriz del diseño. Por ejemplo, la tabla 2, representa la matriz del diseño para un diseño factorial 2^3 . El orden en que aquí se presentan los experimentos es el orden habitual de presentación y se denomina orden estándar. Este orden es muy fácil de recordar y de escribir, ya que en el primer factor los signos aparecen alternados una vez cada uno empezando por el signo (-). En el segundo factor los signos aparecen alternados de 2 en 2, para el tercer factor de 4 en 4, para el cuarto de 8 en 8, y así sucesivamente.³⁹

Tabla 2. Matriz de diseño, de un diseño factorial 2^3

N. de Experimento	Tiempo	Volumen solvente	Número de extracciones
1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1
3	-1	+1	-1
4	+1	+1	-1
5	-1	-1	+1
6	+1	-1	+1
7	-1	+1	+1
8	+1	+1	+1

Planteada la matriz de diseño, hay que realizar los experimentos para obtener la respuesta en cada condición experimental.

Una vez se tienen los valores de la respuesta, ya se puede cuantificar la influencia de los factores sobre dicha respuesta. Esta cuantificación se realiza a través del cálculo de los efectos, que pueden ser efectos principales o

³⁸Correa Espinal A. Órdenes de experimentación en diseños factoriales. Universidad Politécnica de Catalunya [Tesis Doctoral]. 2007. p 3-4

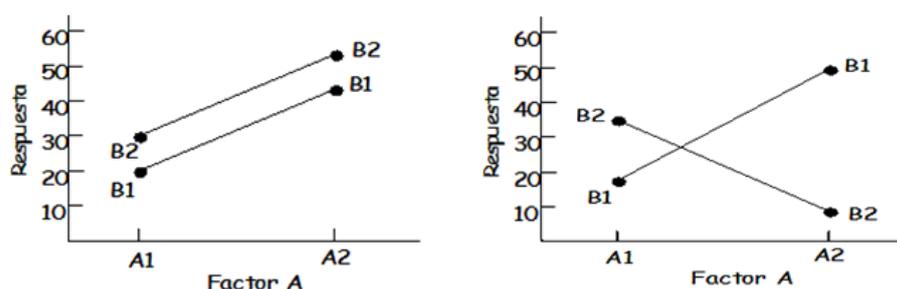
³⁹Ibid., p. 4-5

interacciones, siendo de especial interés el valor de las interacciones de 2 factores.

En general para estudiar los efectos producidos por dos o más factores, los diseños factoriales son los más eficientes. Por diseño factorial se entiende aquel en el que se investigan todas las posibles combinaciones de los niveles de los factores en cada ensayo completo o réplica del experimento. Por ejemplo, si existen “a” niveles del factor A y “b” niveles del factor B, entonces cada réplica del experimento contiene todas las “ab” combinaciones de los tratamientos. El efecto de un factor se define como el cambio en la respuesta producida por un cambio en el nivel del factor. El diseño de experimentos proporciona el marco matemático para cambiar todos los factores simultáneamente, y obtener la información buscada con un número reducido de experimentos, es decir, con la máxima eficiencia.⁴⁰

Un gráfico de efectos principales figura 1, muestra la influencia de cada uno de los factores evaluados. En este tipo de gráfica se representan una serie de líneas que unen el nivel inferior y superior para cada uno de los factores estudiados. La influencia de cada variable viene dada por la pendiente y la longitud de su correspondiente línea. Una pendiente positiva implica un aumento de la eficacia del proceso estudiado al pasar del nivel bajo al nivel alto. Por el contrario, una pendiente de signo negativo implica que la eficiencia del proceso se ve favorecida en el sentido inverso. En cuanto a la longitud, un factor tiene mayor efecto en el proceso estudiado cuanto mayor sea la longitud de la línea.⁴¹

Figura 1. Gráfico de efectos de los factores.



⁴⁰Ferré, J. El diseño factorial completo 2^k . Grupo de Quimiometría y Cualimetría, Departamento de Química Analítica y Química Orgánica, Universidad Rovira i Virgili. Tarragona. <http://www.quimica.urv.es/quimio.p> 1-3.

⁴¹ Ibid., p. 7-8

3.6.2 Diagramas de Pareto

Con el fin de visualizar cuales efectos tienen una mayor influencia sobre la variable de respuesta (% de recuperación), se grafica un diagrama de Pareto estandarizado (efecto dividido sobre su error estándar), donde la línea vertical muestra el límite de decisión para considerar un factor significativo (basado en el efecto estandarizado= efecto estimado/ error estándar, valor $p=0.05$ a un nivel de confianza del 95%). Si el valor absoluto de la estimación del efecto estandarizado es mayor que el valor de $t_{\alpha/2, \nu}$, entonces el efecto será estadísticamente significativo.⁴²

El estudio combinado de los diagramas de Pareto con los gráficos de los efectos principales y de interacción, resulta muy importante para obtener la información necesaria para saber qué factores y de qué modo influyen significativamente el proceso de extracción por ultrasonido.⁴³

3.6.3 Comparaciones no planeadas o a Posteriori

Para averiguar donde están las diferencias significativas entre medias, se aplica la prueba de TukeyHSD (Honest Significant Difference) en la cual se comparan todas las medias entre sí, tomándolas por pares.

4. METODOLOGIA

⁴² Gutierrez Pulido H, Vara Salazar R. Análisis y diseño de experimentos. McGraw-Hill Interamericana. 2004. Mexico. ISBN 970-10-4017-1

⁴³ Ibid., p. 230-232

4.1 MATERIALES Y REACTIVOS

4.1.1 Reactivos y solventes.

Se emplearon los siguientes reactivos: metanol y acetonitrilo grado HPLC marca J.T Baker, acetona, acetato de etilo, metanol, acetonitrilo, hexano, Hidroxido de sodio, marca Merck

4.1.2 Material de referencia certificado.

En la Tabla 2, se reportan las especificaciones comerciales de los patrones de referencia, empleados en este estudio.

Tabla 3. Especificaciones del material de referencia certificado

Sustancia	CAS
Metomil: Qual Grade, Polyscience, Niles, IL	16752-77-5
Simazina: Qual Grade Polyscience Nilles, iL.	122-34-9
Atrazina: Qual Grade Polyscience Nilles, iL.	1912-24-9
Diurón: Qual Grade Polyscience Corp, Nilles, iL	330-54-1
Propanil: (Rogue), Qual Grade Polyscience Nilles, iL.	709-98-8
Carbaril: Chem Service, Pureza: 99,8 %, Lot: 418-13 C	63-25-2

4.1.3 Material de laboratorio.

Tabla 4. Material de laboratorio.

Equipos	Marca
Rota evaporador	Heidolph Laborota 4001
Espectrofotómetro ultravioleta visible	GENESYS™ 6
pH-metro	InoLab WTW pH Level 1
Destilador	Schott GENERATE
Desionizador	E&Q
Plancha con agitador	Fisher Scientific
Centrifugadora	Hermle Labortechnik Z200A
Ultrasonido	Branson MT-1510
Rotaevaporador	Heidolph Laborota 4001
Balanza	Mettler AJ 150
Equipo de SPE	Supelco visiprep DL cat N° 5-7044
Cartuchos RP-18 (40-63µm) 500mg.	Merck- LiChrolut

4.1.4 Programas para el tratamiento de datos.

- Microsoft Office Excel 2007, para el tratamiento estadístico de datos y la realización de gráficos.
- *Software* estadístico SPSS 17.0, para el tratamiento estadístico de datos, el análisis del diseño experimental 2³ y la realización de gráficos.

4.2 ESTANDARIZACION DE LA METODOLOGÍA DE ANÁLISIS DE PLAGUICIDAS POR HPLC.

El análisis cromatográfico se realizó usando un cromatógrafo *Agilent Technologies* 1100, que consta de una bomba cuaternaria *Agilent Technologies* G1311A, un inyector manual *Agilent Technologies Series* 1100G1328A y un detector UV-Vis G1314A, con unacolumna apolar Alltech C18; 3 μ m x 4.0 x 150mm, (Figura 2).

Figura 2. Cromatógrafo líquido de alta eficiencia *Agilent 1100 Series*, utilizado en este estudio.



4.2.1 Preparación de las soluciones estándar.

Antes de proceder a la preparación de las soluciones se realizó la calibración del material volumétrico.

Se prepararon soluciones individuales patrón, pesando la cantidad necesaria de cada plaguicida y disolviendo con acetonitrilo grado HPLC, obteniendo las siguientes concentraciones: simazina 118 ppm, atrazina 100 ppm, carbaril 106 ppm, diuron 104 ppm, metomil 104 ppm, propanil 106 ppm.

Posteriormente se preparó una solución *stock* mezcla de todos los plaguicidas en las siguientes concentraciones: 10 ppm (metomil, diuron y propanil), 5ppm (simazina, atrazina) y 2.5 ppm (carbaril), en acetonitrilo.

Las disoluciones de trabajo se prepararon diariamente a las concentraciones requeridas, por disolución de pequeñas alícuotas de solución *stock* en fase móvil (45:55 ACN: agua) la determinación de la composición de fase móvil se describe en numeral 4.2.2.2. Todas las disoluciones, se hicieron pasar a través de filtros de nylon de 0.45 μm , para posterior inyección en el equipo de HPLC.

4.2.2 Selección de las condiciones de análisis para HPLC.

Para el análisis simultáneo de los plaguicidas (simazina, atrazina, diuron, propanil, carbaril y metomil), se probaron diferentes condiciones de longitud de onda, composición y flujo de la fase móvil.

4.2.2.1 Selección de la longitud de onda

La longitud de onda de trabajo se seleccionó teniendo en cuenta la máxima absorbancia de cada uno de los plaguicidas de estudio, para ello, se tomaron los espectros ultravioleta de cada uno de los analitos, realizando un barrido en la región de 190 a 400 nm, en el espectrofotómetro (figura3), adicionalmente se tuvieron en cuenta los cromatogramas obtenidos a las longitudes de onda de máxima absorción de cada uno de los plaguicidas estudiados.

Figura3. Espectrofotómetro GENESYS™ 6 utilizado en este estudio.



4.2.2.2 Selección de la fase móvil

Se estudio la influencia de la naturaleza del modificador orgánico sobre la separación cromatográfica de la mezcla de plaguicidas estudiados. Se prueba como modificador el acetonitrilo, utilizando una columna de fase reversa C₁₈.

La composición de la fase móvil fue variada de manera isocrática, se ensayaron diferentes fases móviles ACN:agua variando el contenido en ACN entre 60 y 40%. Para la selección apropiada de la fase móvil, un gráfico de $\text{Ln } k$ vs % ACN se construyó con los valores obtenidos experimentalmente.

4.2.2.3 Flujo de la fase móvil

Se estudio el flujo de la fase móvil desde 0.4 hasta 1.1 mL/min mediante una curva de Van Deemter.

4.2.3 Determinación de los parámetros de calidad

Se determinaron parámetros de calidad, tales como precisión (expresada como repetibilidad y precisión intermedia), límite de detección (LOD), límite de cuantificación (LOQ) y linealidad.

4.2.3.1 Evaluación de la linealidad del sistema

La linealidad del sistema se evaluó mediante la curva de calibración. Para este estudio se preparó una curva de calibración en un intervalo de concentración que incluyó seis niveles de concentración entre 0.0125-0.125 mg/L para carbaril, compuesto que presenta la mayor sensibilidad, 0.025-0.25mg/L para simazina y atrazina, 0.05-0.5mg/L para el diuron, metomil y propanil, que presentan la menor sensibilidad a la longitud de onda seleccionada para el análisis simultáneo de los plaguicidas. El análisis se realizó por quintuplicado.

La linealidad se determinó evaluando el rango de concentraciones en que la respuesta del detector es lineal y se reportó como el cuadrado del coeficiente de determinación.

4.2.3.2 Determinación de los límites de detección y de cuantificación

Para la determinación del límite de detección y el límite de cuantificación de los plaguicidas por HPLC-UV se siguió el método sugerido por la IUPAC (1995).⁴⁴

4.2.3.3 Evaluación de la precisión del sistema

La precisión, en términos de áreas, se evaluó con una mezcla de disoluciones patrón, para el estudio de la repetibilidad (intra-día) se llevó a cabo por quintuplicado de cada nivel de la curva en un mismo día, para la precisión intermedia (entre-días) se realizó por triplicado en tres niveles de concentración dentro del rango lineal, durante cinco días.

⁴⁴IUPAC. Nomenclature in Evaluation of Analytical Methods including Detection and Quantification Capabilities. En: Pure and Applied Chemistry. 1995. Vol. 67, p.1699-1723.

4.3 SEDIMENTOS

4.3.2 Extracción por ultrasonido de los plaguicidas en sedimentos.

4.3.1.1 Preparación de muestras fortificadas

Las muestras del sedimento fortificadas se prepararon adicionando 1 mL de mezcla estándar de plaguicidas en acetonitrilo a 1,0g de sedimento seco tamizado (tamaño de grano inferior a <2 mm), se agitó magnéticamente durante una hora, el solvente de las muestras fue evaporado a la temperatura del laboratorio (20-23°C) durante 24 horas. Las muestras fortificadas se guardaron a 4°C hasta que se llevaron a cabo las extracciones por ultrasonido (periodo menor a 15 días).

4.3.1.2 Procedimiento de extracción por ultrasonido

Para llevar a cabo la extracción por ultrasonido de los plaguicidas (simazina, atrazina, diuron, metomil, carbaril y propanil) se tomó como punto de partida la metodología de Vagi *et al*⁴⁵, que se basa en el método 3550C de la EPA (Agencia de Protección Medioambiental de Estados Unidos),⁴⁶ al cual se le han realizado algunas modificaciones, las extracciones se realizaron por triplicado, además se incluyó un blanco. En una primera serie de experimentos la eficiencia de extracción de diferentes disolventes orgánicos (acetona, hexano, acetonitrilo, acetato de etilo y metanol) fue comparada. El procedimiento se realizó de la siguiente manera: 1.0 g de sedimento fortificado con la mezcla estándar de plaguicidas (simazina, atrazina, diuron, propanil, carbaril, metomil) como se describe en la sección 4.3.1.1, se extrajo dos veces en ultrasonido por 15 minutos con 10 mL de cada uno de los solventes, la extracción se llevó a cabo en un erlenmeyer de 50 mL el cual estaba inmerso en el baño de ultrasonidos (Frecuencia 42 kHz, dimensiones de cubeta 140x150x100 mm) manteniendo el nivel de agua sobre el nivel del solvente, la posición de la erlenmeyer fue de 4 cm desde el fondo del recipiente de baño, la temperatura en el baño ultrasónico no excedió los 35 °C. Después de un período de sonicación, cada extracto se centrifugó a 3500 r.p.m por 15 minutos para obtener el supernadante orgánico claro.

Posteriormente, los extractos combinados se llevan a un evaporador rotatorio a vacío a una temperatura de 40 °C para concentrar la muestra hasta sequedad. Se redisolvió en 1 mL de fase móvil y se filtró a través de un filtro de

⁴⁵Vagi M.C., Petsas A.S., M.N., Kostopoulou, Karamanoli, M.K. Lekkas T.D. Determination of organochlorine pesticides in marine sediments samples using ultrasonic solvent extraction followed by GC/ECD. *En Desalination*. 2007. vol. 210 p.146–156

⁴⁶Us Environmental Protection Agency. Method 3550 C. Ultrasonic Extraction. 2000.

nylon de 0,45 μm , con la ayuda de una jeringa y fue guardado en un vial para posterior análisis en HPLC.

La cantidad de plaguicidas extraídos fue determinada por HPLC con detector UV y se calculó el porcentaje de recuperación.

En la segunda serie de experimentos, con el fin de establecer las mejores condiciones de análisis (volumen de disolvente, número de etapas de extracción y tiempo de sonicación) para la extracción por ultrasonido, se aplicó un diseño experimental 2^3 , teniendo en cuenta los resultados obtenidos en las extracciones con cada uno de los solventes (acetona, hexano, acetonitrilo, acetato de etilo y metanol), los experimentos fueron realizados sólo con el solvente que dio el mayor porcentaje de recuperación para la mayoría de los plaguicidas de estudio.

En la tabla 5, se representa el diseño factorial 2^3 y se muestran las variables consideradas: volumen de disolvente, tiempo de sonicación y número de extracciones, con sus niveles máximos (simbolizado como +1) y mínimos (simbolizado como -1).

Tabla 5. Variables y niveles del diseño experimental 2^3

N. de Experimento	Tiempo	Volumen solvente	Número de extracciones	Tiempo (min)	Volumen solvente (mL)	Número de extracciones
1	-1	-1	-1	5	5	1
2	+1	-1	-1	20	5	1
3	-1	+1	-1	5	20	1
4	+1	+1	-1	20	20	1
5	-1	-1	+1	5	5	3
6	+1	-1	+1	20	5	3
7	-1	+1	+1	5	20	3
8	+1	+1	+1	20	20	3

4.3.1.3 Determinación del porcentaje de recuperación en sedimentos.

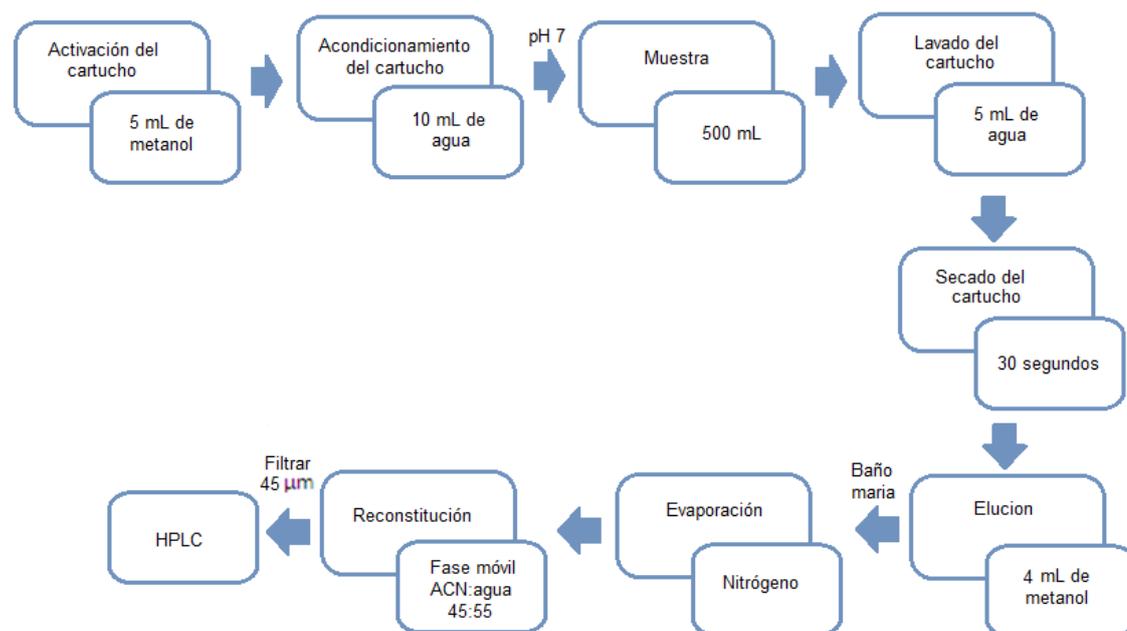
Se determinó el porcentaje de recuperación de los plaguicidas en el procedimiento de extracción por ultrasonido. El estudio se realizó por triplicado a tres niveles de concentración, un nivel bajo, medio y alto: 0.05, 0.2 y 0.5 mg/kg (metomil, diuron y propanil), 0.025, 0.1 y 0.25 mg/kg (simazina y atrazina), 0.0125, 0.05 y 0.125 mg/kg (carbaril). El procedimiento se llevó a cabo con las condiciones óptimas de extracción por ultrasonido encontradas.

4.4 AGUAS

4.4.1 Extracción por SPE de los plaguicidas en aguas

Para la extracción de los plaguicidas (simazina, atrazina, diuron, carbaril, metomil y propanil) en aguas se usó la técnica de extracción en fase sólida (SPE) en cartuchos de C₁₈. Se siguió la metodología de Pichonet *al*⁴⁷, con la modificación que después de la evaporación del solvente se reconstituyó en fase móvil. La metodología de Pichonet *al*, describe un procedimiento para extraer compuestos que incluyen plaguicidas ácidos, neutros y básicos. En la figura 4, se describe el procedimiento de extracción por SPE realizado para el análisis por HPLC.

Figura 4. Método de extracción de los plaguicidas (simazina, atrazina, diuron, propanil, carbaril y metomil) en muestras de aguas por SPE. El flujo fue de 1 mL/min.



4.4.2. Determinación del porcentaje de recuperación en aguas.

⁴⁷V. Pichon, C. Cau Dit Coumes, L. Chen, S. Guenu, M.-C. Hennion. Simple removal of humic and fulvic acid interferences using polymeric sorbents for the simultaneous solid-phase extraction of polar acidic, neutral and basic pesticides. *Chromatography A*, vol. 737. 1996. p 25-33

Se determinó el porcentaje de recuperación de los plaguicidas en el procedimiento de extracción en fase sólida (SPE) para aguas. El estudio se realizó por triplicado a tres niveles de concentración, comprendidos en el rango lineal: 0.05, 0.2 y 0.5 mg/L (Metomil, diuron y propanil), 0.025, 0.1 y 0.25 mg/L (simazina y atrazina), 0.0125, 0.05 y 0.125 mg/L (carbaril). En la figura 5, se muestra el equipo utilizado para la extracción fase sólida.

Figura 5. Equipo utilizado para SPE



4.5 UBICACIÓN GEOGRÁFICA

La zona de estudio corresponde al Valle Alto del río Cauca, en el tramo comprendido entre las estaciones de monitoreo La Balsa (Cauca) y Anacaro (Valle del Cauca), con una longitud de 389 Km. El río en esta zona presenta una temperatura media de 24°C, una altura sobre el nivel del mar que varía entre 900 y 1000 m, su ancho y profundidad varían entre 80-150 y 3.5-8.0 m respectivamente, la precipitación promedio anual es de aproximadamente 1000mm y la humedad promedio mensual oscila entre 70 y 75%. En la tabla 6 se muestran las coordenadas de muestreo y en el anexo 1 se puede observar el mapa con los sitios de muestreo.

Tabla 6. Ubicación geográfica de los sitios de muestreo en el Valle alto del río Cauca.

Ubicación	Estación	Coordenadas	
		W	N
La Balsa	S1	76°35'36.8"	03°05'10.9"
Puente Hormiguero	S2	76°28'36,5"	03°18'0,5"
Juanchito	S3	76°28'31"	03°26'57"
Puerto Isaacs	S4	76°29'09.3"	03°32'53.8"
Paso de la Torre	S5	76°27'06.3"	03°37'46.4"

Mediacanoa	S6	76°20'56.5"	03°53'27.7"
Puente Guayabal	S7	76°06'04.4"	04°24'18.6"
Anacaro	S8	75°57'58.1"	04°47'00.6"

4.6 RECOLECCIÓN DE MUESTRAS.

Las muestras de aguas y sedimentos fueron recolectadas en el río Cauca, en el tramo comprendido entre La Balsa (Cauca) y Anacaro (Valle del Cauca) en ocho estaciones de la Corporación Autónoma Regional del Valle del Cauca (CVC).

Los muestreos se realizaron en Junio y Octubre de 2010, teniendo en cuenta los protocolos de muestreo de Water quality Sampling ISO 5667-6:2005 International Standard y RAS del Min. Desarrollo. 2000. Las expediciones fueron realizadas por el grupo de investigación "Producción más Limpia" (Universidad Javeriana, Cali), con el apoyo del Grupo de Investigación de la Contaminación por metales pesados y plaguicidas Universidad del Valle, véase el anexo 2.

Las muestras de aguas y sedimentos, fueron entregadas por el estudiante de doctorado de la Universidad del Valle M.Sc. Rodrigo Sarria en el laboratorio del Grupo de Investigación en Química Analítica Ambiental (G.I.Q.A), Universidad del Cauca.

4.6.1 Preparación de muestras

4.6.1.1 Muestras de aguas

Las muestras de agua fueron filtradas en membranas de 0.45 μm para eliminar partículas en suspensión. El pH de las muestras fue medido y mantenido en pH 7, un volumen de 500 mL de muestra fue transferido a un balón volumétrico, en seguida las muestras fueron sometidas a extracción fase sólida (SPE) como se describe en el numeral 4.4.1, a temperatura del laboratorio (20-23°C).

4.6.1.2 Muestras de sedimentos

Las muestras de sedimentos liofilizados, fueron homogenizadas y tamizadas a través de un tamiz de tamaño <2 mm, 1.0 g de muestra fue transferido a un erlenmeyer de 50 mL, seguidamente las muestras fueron sometidas a extracción por ultrasonido de acuerdo con el diseño de experimentos véase numeral 4.3.1.2.

5. ANÁLISIS DE RESULTADOS

5.1 Optimización de la separación de los plaguicidas (simazina, atrazina, diuron, carbaril, metomil, propanil) por CLAR

Para la separación e identificación de los seis plaguicidas de interés (simazina, atrazina, diuron, carbaril, metomil y propanil), en el cromatógrafo líquido con detector ultravioleta, se llevó a cabo el estudio de condiciones como longitud de onda, tipo de modificador orgánico, composición y flujo de la fase móvil.

5.1.1 Selección de la longitud de onda

La longitud de onda de trabajo se seleccionó teniendo en cuenta la máxima absorbancia; para ello, se tomaron los espectros de cada uno de los analitos, realizando un barrido en la región de 190 a 400 nm. Los espectros ultravioleta obtenidos de este estudio se muestran en la figura 6, se puede apreciar que la longitud de máxima absorción de cada compuesto fue 220 nm (atrazina), 219 nm (simazina), 219 nm (carbaril), 234 nm (metomil), se obtuvieron dos máximos a dos longitudes de onda, 209 y 248 nm (propanil), 211 y 249 nm (diurón). Adicionalmente se obtuvieron los cromatogramas de cada uno de los compuestos, a diferentes longitudes de onda los cuales se pueden apreciar en el anexo 3.

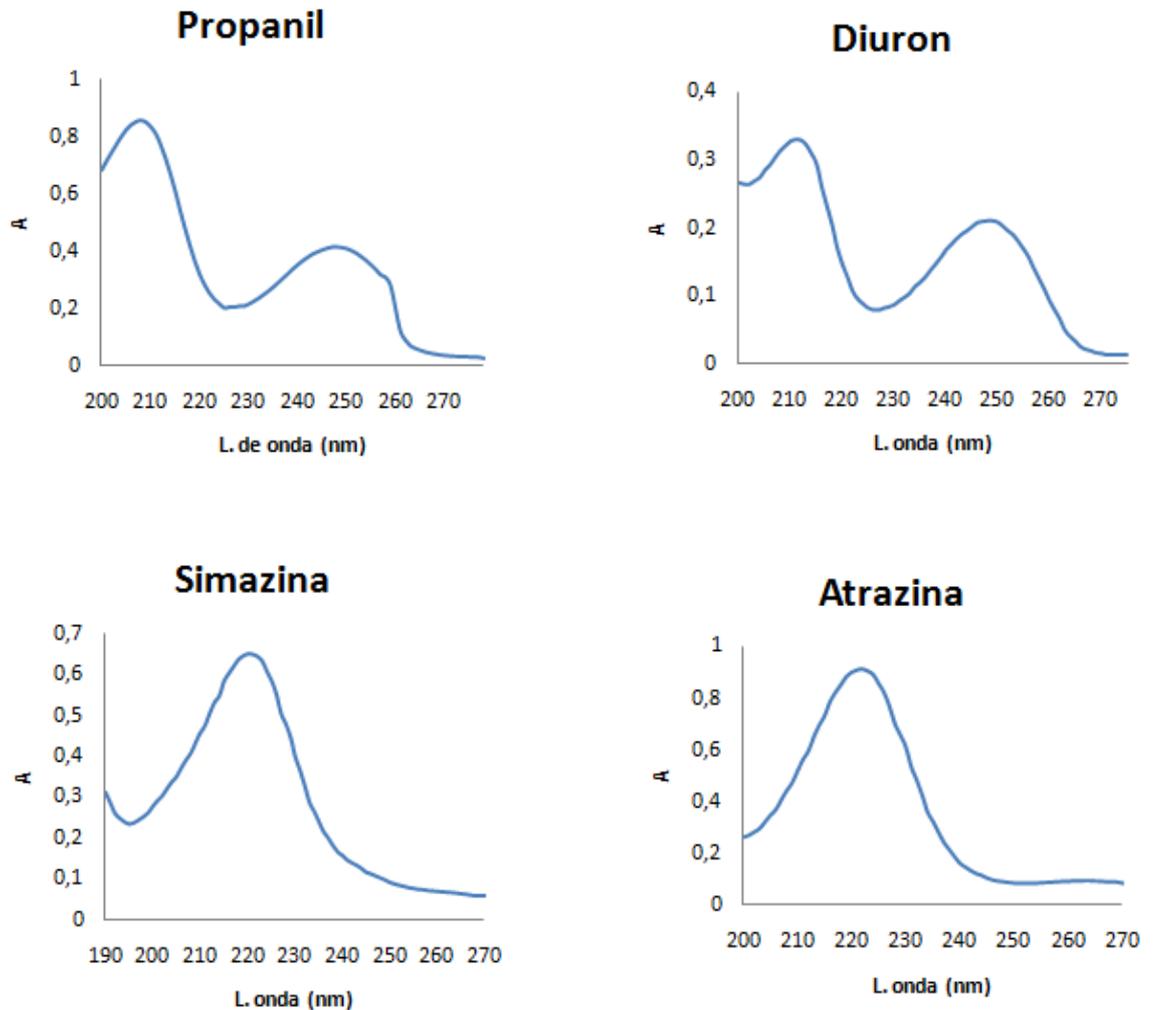
La selección de la longitud de onda se hace, normalmente, a una longitud de onda correspondiente a un pico de absorción, ya que el cambio en la absorbancia por unidad de concentración es mayor en este punto, consiguiéndose, así, la máxima sensibilidad.⁴⁸ Aunque se debe tener en cuenta que la mejor región de longitud de onda para el análisis de una mezcla es aquella donde se superponen los espectros individuales,⁴⁹ por lo tanto, la longitud de onda elegida para el análisis fue de 218 nm, se escogió dicha longitud de onda tratando de obtener la máxima respuesta posible en la determinación simultánea de todos los compuestos. La elección de una sola longitud de onda de trabajo lleva asociada una pérdida de sensibilidad en la

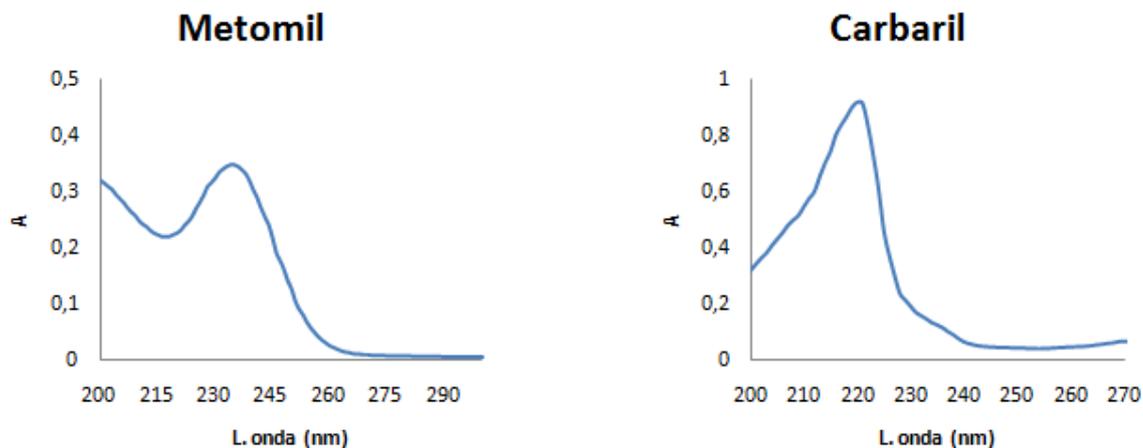
⁴⁸SKOOG Douglas, HOLLER James y NIEMAN Timothy. Principios de análisis instrumental. 5ª. Ed. España: Mc Graw Hill, 2001. P. 369-368.

⁴⁹ HARRIS Daniel. Análisis químico cuantitativo. 3a. ed. México: Grupo editorial iberoamericana, 1992. P. 511-515.

detección para algunos de estos plaguicidas, por esta razón el rango de concentración en la recta de calibración fue más alto para los plaguicidas que presentan menor sensibilidad a esta longitud de onda.

Figura 6. Espectros de absorción de cada uno de los plaguicidas, (metomil, simazina, atrazina, diuron, propanil, carbaril).





5.1.2 Selección de la fase móvil

Para evaluar la mejor condición de separación de los plaguicidas (metomil, simazina, carbaril, atrazina, diuron y propanil), la composición de la fase móvil fue variada de manera isocrática, verificando principalmente la resolución (R_s) para cada composición de fase móvil estudiada, tabla 7.

Con un flujo de 0.9 mL/min, valor obtenido mediante la curva de Van Deemter, la cual se puede apreciar en el anexo 4, se ensayaron diferentes fases móviles ACN/H₂O variando el contenido de ACN entre 60 y 40%, los cromatogramas obtenidos con respecto a este estudio se muestran en la figura 7.

Tabla 7. Resolución entre las dos parejas consecutivas de picos frente al porcentaje de componente orgánico.

Fase móvil	Picos	Resolución				
		1 - 2	2 - 3	3 - 4	4 - 5	5 - 6
60-40		14,62	1,13	6,70	1,62	5,67
55-45		18,97	2,87	6,79	2,32	7,67
50-50		25,48	5,47	7,51	3,78	9,92
45-55		30,95	9,07	7,17	5,80	12,04
40-60		36,82	12,57	5,97	8,00	13,19

(1) Metomil. (2) simazina, (3) Carbaril, (4) Atrazina, (5) Diuron, (6) Propanil. Fase móvil: ACN:Agua; Flujo 0.9 mL/min

En la tabla 7, se muestran los valores de las resoluciones entre las dos parejas consecutivas de picos frente al porcentaje de fase móvil, para los picos 2-3 (carbaril-atrazina) y 4-5 (atrazina-diuron) la resolución es muy baja (<2.5), lo

que se observa en el cromatograma como un solapamiento entre los picos, figura 7a, cuando se disminuye la proporción de ACN en la fase móvil de 60 a 55 % se obtiene una mejora en la resolución, sin embargo, la resolución entre 4 y 5 sigue inferior (<2.5). Al utilizar una fase móvil 40:60 ACN: agua se obtuvo un tiempo superior a los 20 minutos figura 7e, lo cual no resulta apropiado por que hace el análisis demasiado largo. Una buena separación de los plaguicidas se lleva a cabo con proporciones de fase móvil de (45:55) y (50:50) ACN: Agua, v/v, estos presentan una resolución elevada (>2.5), figura 7c y 7d respectivamente, por consiguiente, para una apropiada elección entre estas dos composiciones de fase móvil, se construyó un gráfico de $\ln k$ vs % de ACN figura 8, con los valores obtenidos experimentalmente anexo 5.

Figura 7. Cromatogramas obtenidos en la variación de la composición de la fase móvil, ACN:agua; Flujo 0.9 mL/min, patrón (0.5 mg/L), analizados por HPLC-UV en la columna C₁₈. (1) Metomil, (2) Simazina, (3) Carbaril, (4) Atrazina, (5) Diuron, (6) Propanil.

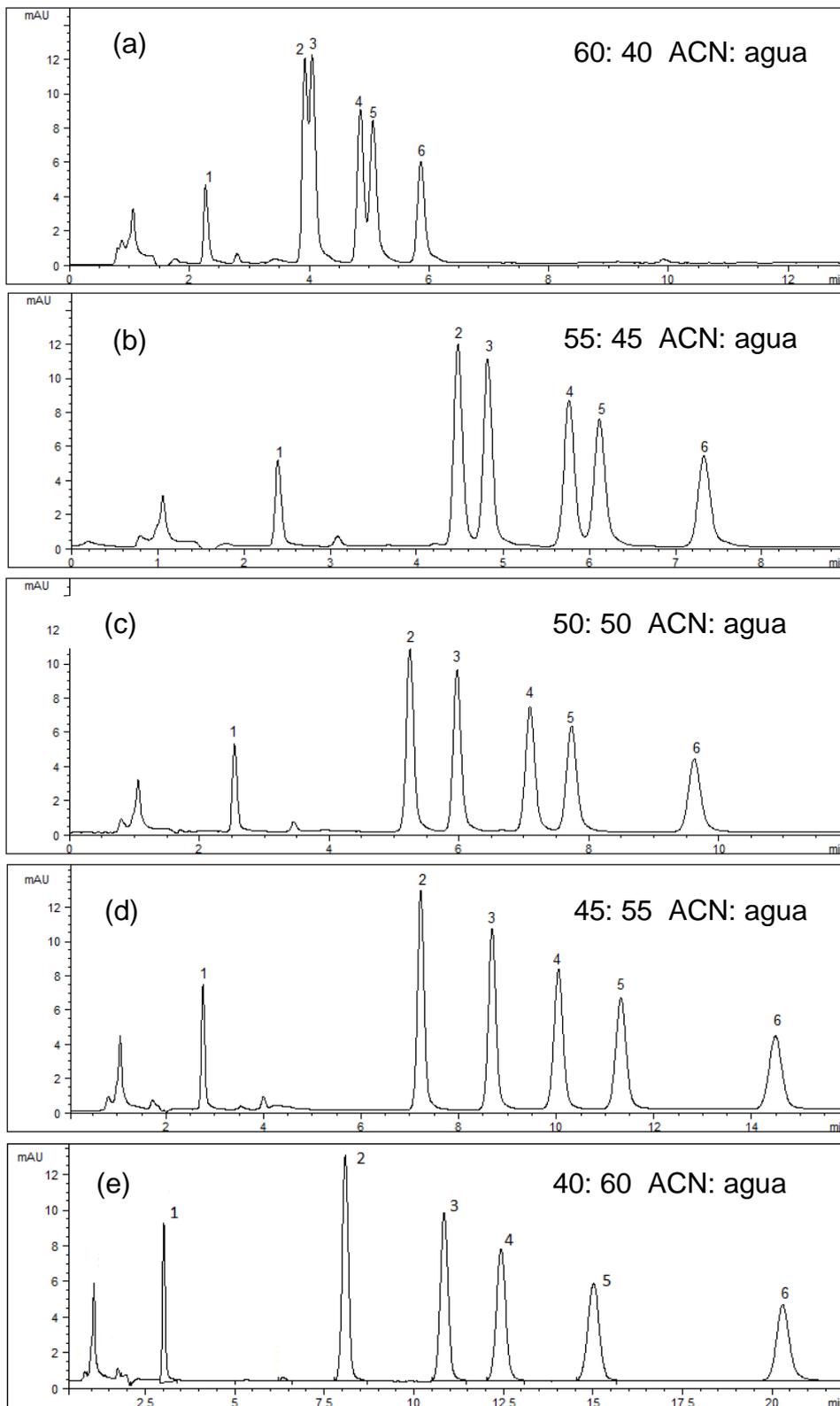
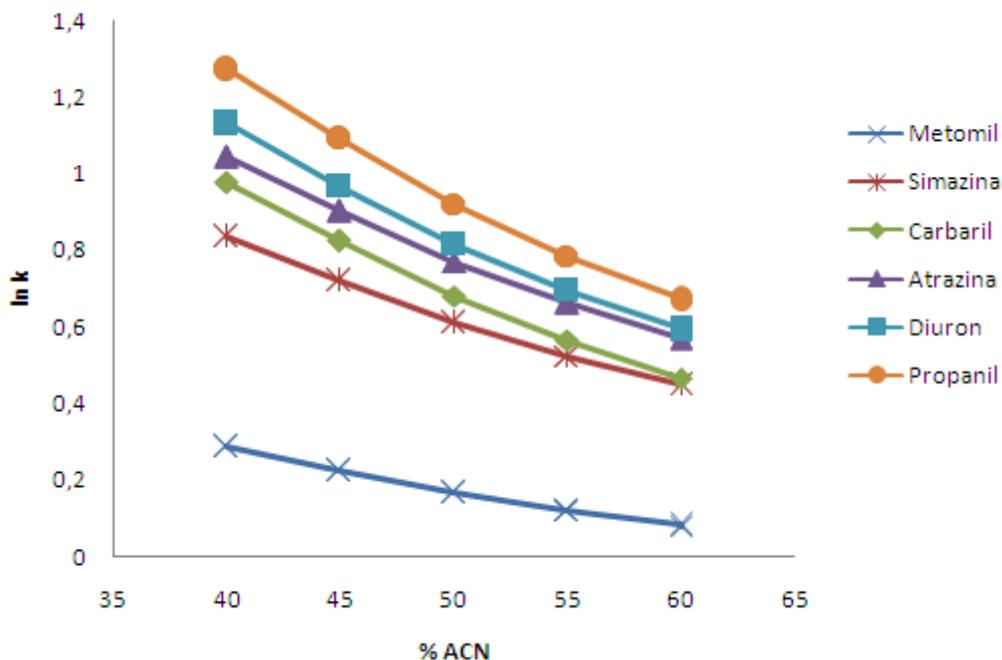


Figura 8. Graficade los valores de Ln k vs % de ACN en la fase móvil.



En la figura 8, se presentan los valores de Ln k frente al porcentaje de ACN en la fase móvil para cada uno de los compuestos estudiados, una aproximación de los puntos indica una separación muy pobre debido a los valores próximos de k (factor de retención o de capacidad), a valores de k demasiado bajos es probable que los analitos no se puedan resolver adecuadamente y para valores altos de k, el tiempo de análisis sería demasiado largo.

Las curvas presentadas en la figura 8 se pueden ajustar a ecuaciones de segundo grado, según la expresión:

$$\text{Ln } k = a + b \cdot \varphi_{\text{Acn}} + c \cdot \varphi_{\text{Acn}}^2 \quad (1)$$

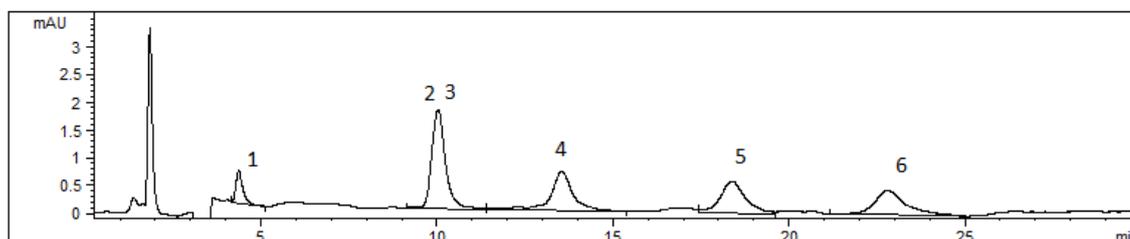
Donde φ representa el porcentaje de acetonitrilo que permite predecir la retención de los plaguicidas en función de la fase móvil. En el anexo 5 se recogen los coeficientes de a , b y c para los plaguicidas estudiados.

De la figura 8 se obtiene que una buena separación de los compuestos se logra con una fase móvil (45:55) v/v ACN: agua, el tiempo de análisis es apropiado para el número de compuestos, con resolución elevada entre los analitos, por consiguiente, se trabajó con una composición de fase móvil ACN: agua (45:55) v/v, con la cual fue posible separar los seis plaguicidas (simazina, atrazina, diuron, propanil, carbaril y metomil) con valores de k entre 1,6 y 12,3 y una resolución mayor a 2.5. Se realizó una elución isocrática, ya que permitió una elución suficientemente rápida de todos los compuestos, los cuales se separan en menos de 17 minutos.

5.1.3 Selectividad del modificador orgánico

Se estudió la selectividad del modificador orgánico de la fase móvil manteniendo constante la fuerza elutrópica, en primer lugar se calculó la composición de las fase móvil MeOH: Agua para que te tenga la misma polaridad (fuerza elutrópica) que la de ACN:agua (45:55), v/v. Para ello se utiliza el concepto de polaridad de un disolvente, teniendo en cuenta que la polaridad de una mezcla de disolventes es la media aritmética de los valores de polaridad de los disolventes puros, ponderada según la fracción de volumen de cada disolvente,⁵⁰ el cálculo se presenta en el anexo 6, la composición de la mezcla que tiene la misma fuerza elutrópica está dada por (55:45)MeOH:agua, con esta fase móvil no se obtiene una buena separación de los compuestos 2-3 (simazina-carbaril), cromatograma figura 9, lo que muestra la selectiva del modificador orgánico ACN frente al MeOH cuando son comparados en composiciones de fase móvil de la misma fuerza elutrópica.

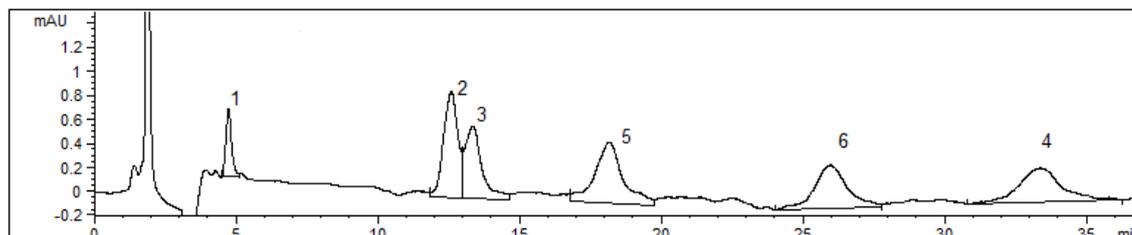
Figura 9. Cromatograma fase móvil MeOH:agua (55:45), v/v, Detección UV: 218 nm, flujo de fase móvil 0.9 mL/ min. (1) Metomil. (2) Simazina, (3) Carbaril, (4) Atrazina, (5) Diuron, (6) Propanil.



En la figura 10, se puede observar que con una composición de fase móvil MeOH:agua (50:50), v/v, se logra una separación de los picos 2 y 3 correspondientes a la simazina y carbaril, pero el tiempo de análisis se extiende por encima de 30 minutos, lo que hace que no sea apropiado ya que el análisis se hace demasiado largo. Se estudiaron otras composiciones de fase móvil utilizando como modificador orgánico el MeOH, los cromatogramas respecto a este estudio se muestran en anexo 7.

⁵⁰Quattrocchi O.; Abelaira S; Laba R, Introducción a la HPLC Aplicación y practica. 1992. p. 284-286.

Figura 10. Cromatograma MeOH:agua (50:50), v/v, detección UV: 218 nm, flujo de fase móvil 0.9 mL/ min. (1) Metomil. (2) Simazina, (3) Carbaril, (4) Atrazina, (5) Diuron, (6) Propanil.

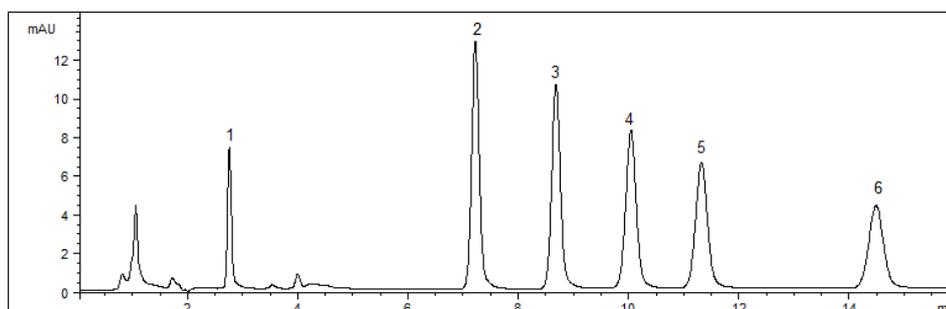


De acuerdo con los resultados anteriores, la fase móvil con la que se obtuvo una óptima separación fue ACN: Agua (45:55) v/v, como puede observarse, figura 11, los compuestos analizados son bien separados en las condiciones establecidas tabla 8.

Tabla 8. Condiciones óptimas de trabajo seleccionadas en el análisis por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR).

Parámetro	Características
Detección	Visible $\lambda = 218$ nm
Elusión	Isocrática
Temperatura	Ambiente (20-23) $^{\circ}$ C
Flujo	0.9 mL/min
Volumen de inyección	20 μ L
Columna	Alltech C ₁₈ ; 3 μ m x 4.0 x 150mm.
Fase Móvil	ACN:agua (45:55) v/v

Figura 11. Cromatograma de la separación de los seis plaguicidas bajo las condiciones de separación óptimas en HPLC-UV. (1) Metomil. (2) Simazina, (3) Carbaril, (4) Atrazina, (5) Diuron, (6) Propanil. Concentración 0.5 ppm.



5.2 ESTANDARIZACION DEL METODO ANALITICO

Después de la optimización de las condiciones de separación, se estudian las características analíticas del método en cuanto a linealidad, precisión (expresada como repetibilidad y precisión intermedia) y límites de detección. Se trabajó solo con las soluciones estándar de (metomil, simazina, carbaril, atrazina, diuron y propanil), por lo que se estandarizó solamente el sistema (bomba, detector, etc.)

Se evaluó la normalidad y homogeneidad de los datos obtenidos aplicando la prueba de normalidad de Shapiro–Wilk, anexo 8 y la prueba de homogeneidad de varianzas de Levene, anexo 9. Se determinó que los datos provienen de una población con distribución normal y son homogéneos, lo que permitió aplicar métodos paramétricos para la evaluación estadística de los datos obtenidos.

5.2.1 Parámetros de calidad del método

5.2.1.1 Linealidad del sistema

Para el estudio de la linealidad del sistema se preparó una curva de calibración en un intervalo de concentración que incluyó 6 concentraciones diferentes entre 0.0125 y 0.125 mg/L para carbaril, compuesto que presenta la mayor sensibilidad, 0.025 y 0.25mg/L para simazina y atrazina, 0.05 y 0.5mg/L para el diuron, metomil y propanil, que presentan la menor sensibilidad.

En la figura 12, se presentan las rectas de calibrado obtenidas para cada uno de los plaguicidas y en la tabla 9 se resume los parámetros del calibrado, coeficiente de determinación, rango de concentración, ecuación de calibración, límites de detección y cuantificación los cuales fueron evaluados con las recomendaciones de la IUPAC véase el anexo 10 y son expresadas en ppm (mg/L) y/o (mg/Kg).

Figura 12. Rectas de calibrado de los plaguicidas de estudio.

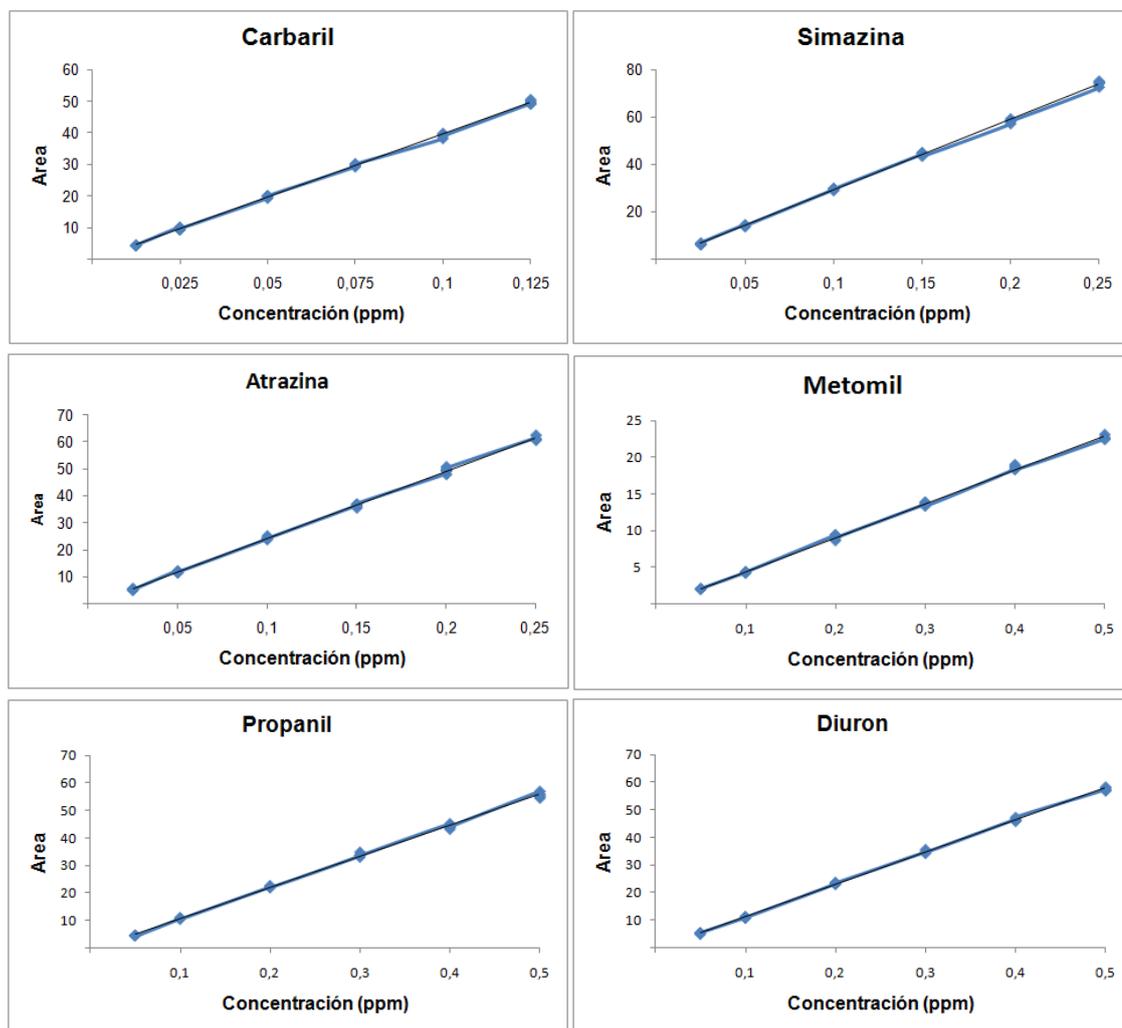


Tabla 9. Parámetros de calidad del método propuesto.

Compuesto	Rango de concentración (ppm)	Ecuación de calibración	R ²	LOD* (ppm)	LOQ* (ppm)
Carbaril	0,0125-0,125	$y = 398,7x - 0,273$	0,9993	0,00123	0,00411
Simazina	0,025-0,25	$y = 298,1x - 0,680$	0,9996	0,00505	0,01683
Atrazina	0,025-0,25	$y = 248,75x - 0,546$	0,9990	0,00231	0,00769
Metomil	0,05-0,5	$y = 46,206x - 0,2119$	0,9987	0,00774	0,02582
Diuron	0,05-0,5	$y = 116,59x - 0,314$	0,9994	0,00446	0,01488
Propanil	0,05-0,5	$y = 113,48x - 0,766$	0,9988	0,00557	0,01855

*IUPAC ppm(mg L⁻¹) o (mg Kg⁻¹)

En la tabla 9, obtenemos información que se refiere al coeficiente de determinación (R^2), el cual expresa la proporción de varianza de la variable dependiente (área) que está explicada por la variable independiente (concentración). Para todos los compuestos estudiados (tabla 9), R^2 toma un valor alto, por ejemplo para el carbaril el R^2 (0.9993), nos indica que el 99.93% de la variación del área está explicada por la concentración, hasta este momento el análisis de regresión, no permite afirmar que las relaciones detectadas sean de tipo causal, solo es posible hablar de grado de relación. Por lo tanto se realizó el análisis de regresión para determinar si hay una relación lineal significativa, los resultados se muestran en la tabla 10.

La tabla 10, muestra los coeficientes de la recta de regresión. La columna etiquetada *coeficientes no estandarizados* contiene los coeficientes de regresión que definen la ecuación de regresión. El coeficiente correspondiente a la *Constante* es el *origen* y el coeficiente correspondiente a *Concentración* es la *pendiente* de la recta de regresión. Adicionalmente, los estadísticos *t* y sus niveles críticos (*sig.*) o (*p-value*) nos permiten contrastar las hipótesis nulas de que los coeficientes de regresión valen cero en la población, estos estadísticos *t* se distribuyen según el modelo de probabilidad *t* de Student con $n-2$ grados de libertad. Por tanto, pueden ser utilizados para decidir si un determinado coeficiente de regresión es significativamente distinto de cero y en consecuencia, si la variable independiente está significativamente relacionada con la dependiente. Al respecto, se tienen dos hipótesis:

H_0 : $r_{xy} = 0$ entonces el coeficiente de correlación obtenido procede de una población cuya correlación es cero ($\rho = 0$)

H_1 : $r_{xy} \neq 0$ el coeficiente de correlación obtenido procede de una población cuya correlación es distinto de cero ($\rho \neq 0$)

La H_0 se rechaza si el valor absoluto de este estadístico es mayor que el correspondiente valor obtenido de tablas, es decir se rechaza la H_0 si $|t_o| > t_{(\alpha/2, n-2)}$ si se utiliza como criterio de rechazo la comparación de la significancia observada (*p-value*) contra la significancia predefinida (α) entonces se rechaza la H_0 si $p\text{-value} < \alpha$

Tabla 10. Coeficientes de regresión.

		Coeficientes no estandarizados		t	Sig.	Intervalo de confianza para B al 95%	
		B	Error típ.			Límite inferior	Límite superior
Metomil	(Constante)	-0,212	0,096	-2,199	0,036	-0,409	-0,014
	Concentración	46,206	0,318	145,461	0,000	45,555	46,857
Simazina	(Constante)	-0,680	,240	-2,837	0,008	-1,171	-0,189
	Concentración	298,138	1,580	188,660	0,000	294,901	301,375
Carbaril	(Constante)	-0,273	0,156	-1,749	0,091	-0,593	0,047
	Concentración	398,703	2,058	193,710	0,000	394,487	402,919
Diuron	(Constante)	-0,314	0,169	-1,857	0,074	-0,660	0,032
	Concentración	116,591	0,557	209,437	0,000	115,451	117,731
Atrazina	(Constante)	-0,546	0,222	-2,463	0,020	-1,001	-0,092
	Concentración	248,755	1,463	170,088	0,000	245,759	251,750
Propanil	(Constante)	-0,766	0,226	-3,384	0,002	-1,230	-0,302
	Concentración	113,476	0,746	152,107	0,000	111,948	115,004

De la tabla 10, por ejemplo para el carbaril se tiene que $t_0 > t_{(0.025, 28)}$ ($193.710 > 2.048$), por lo tanto, se rechaza la H_0 , esta misma conclusión se obtiene por el método del valor de p , donde el valor de p es menor de 0.05. Para todos los compuestos se tiene que la pendiente de la recta de regresión es significativamente distinta de cero, lo cual nos permite concluir que entre la concentración y el área existe relación lineal significativa.

El origen de la recta de regresión no es significativamente distinto de cero (generalmente, contrastar la hipótesis " $B_0=0$ " carece de utilidad, pues no contiene información sobre la relación entre X_i e Y_i), No rechazar que $B_0=0$ significa que el punto de corte de la línea recta pasa por el origen, es decir, pasa por (0.0). Los Límite de confianza de la pendiente (concentración) y del intercepto (constante) a un nivel del 95 % también se muestran en la tabla 10.

Otro enfoque para analizar la significancia del modelo es descomponer la variabilidad observada y a partir de ello probar hipótesis. Con los resultados obtenidos del ANOVA tabla 11, se puede decir si existe o no relación significativa entre las variables. El estadístico F contrasta la hipótesis nula de que el valor poblacional de R es cero y por tanto, nos permite decidir si existe relación lineal significativa entre la variable dependiente y la independiente, F experimental mayor que el tabulado con 1 y n-2 grados de libertad. De igual

manera el valor de p menor que α (0.05) se rechaza la H_0 y se acepta la hipótesis alternativa, este modelo proporciona exactamente el mismo resultado que se obtiene por el contraste t relativo al coeficiente de regresión.

Tabla 11. Análisis de varianza (ANOVA).

Compuesto		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Metomil	Regresión	1623,473	1	1623,473	21158,782	0,000
	Residual	2,148	28	0,077		
	Total	1625,621	29			
Simazina	Regresión	16897,623	1	16897,623	35592,632	0,000
	Residual	13,293	28	0,475		
	Total	16910,916	29			
Carbaril	Regresión	7554,929	1	7554,929	37523,504	0,000
	Residual	5,637	28	0,201		
	Total	7560,566	29			
Diuron	Regresión	10336,672	1	10336,672	43863,680	0,000
	Residual	6,598	28	0,236		
	Total	10343,270	29			
Atrazina	Regresión	11763,423	1	11763,423	28929,975	0,000
	Residual	11,385	28	0,407		
	Total	11774,809	29			
Propanil	Regresión	9791,785	1	9791,785	23136,644	0,000
	Residual	11,850	28	0,423		
	Total	9803,635	29			

$F_{\text{tab}}(\alpha, 1, n-2)$, $F_{\text{exp}} > F_{\text{tab}}(0.05, 1, 28) = 4.20$

5.2.1.2 Estudio de la precisión

-Determinación de la repetibilidad

En los estudio de la repetibilidad, se alcanzaron coeficientes de variación adecuados, lo que demostró la buena precisión del sistema, observándose una variabilidad de los resultados dentro de los límites establecidos para los métodos cromatográficos, $CV \leq 5,0\%$ los resultados se pueden apreciar en el anexo 11.

-Determinación de la precisión intermedia

A continuación se realiza el análisis de los resultados de precisión intermedia para la simazina, el razonamiento utilizado fue el mismo para los demás

plaguicidas, los resultados obtenidos de este estudio para atrazina, carbaril, diuron, metomil y propanil se presentan en el anexo 12.

Los valores que se obtuvieron de precisión intermedia para la simazina se presentan en la tabla 12, se realizó un ANOVA tabla 13, el cual demostró que no existe diferencia significativa entre las precisiones alcanzadas en diferentes días en cada uno de los niveles estudiados.

Tabla 12. Precisión intermedia para la simazina.

Nivel	Día	Promedio	% CV
Bajo	1	6,69	2,24
	2	6,54	2,69
	3	6,79	1,77
	4	6,56	3,57
	5	6,52	3,48
Medio	1	29,11	1,73
	2	29,58	3,82
	3	29,94	1,76
	4	30,05	1,84
	5	29,85	3,80
Alto	1	72,04	1,19
	2	73,77	1,47
	3	72,76	1,40
	4	71,89	1,09
	5	72,99	1,03

En la Tabla 13, se muestra el ANOVA obtenido para los resultados de la simazina en el nivel de baja concentración, $F_{\text{tab}}=3.48$ ($\alpha= 0.05, 4, 10$); $F_{\text{exp}} \leq F_{\text{tab}}$ ($1.182 < 3.48$) lo que indica que no hay diferencias estadísticamente significativa entre el promedio del nivel de concentración en los diferentes días, esta misma conclusión se obtiene por el *valor-p* $> 0,05$. Para los otros dos niveles de concentración medio y alto en los diferentes días se obtienen similares resultados los cuales se pueden apreciar en el anexo 12.

Los resultados obtenidos permitieron establecer que las precisiones son aceptables para los plaguicidas simazina, atrazina, diuron, propanil, metomil y carbaril.

Tabla 13. Análisis de varianza (ANOVA) para la simazina, nivel bajo.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	0,164	4	0,041	1,182	0,376
Intra-grupos	0,347	10	0,035		
Total	0,511	14			

$F_{exp} \leq F_{tab}$ $F_{tab}=3.48$ ($\alpha=0.05$, 4, 10)

5.2.2 Determinación del porcentaje de recuperación en aguas y sedimentos

Se evaluó el porcentaje de recuperación de los plaguicidas por extracción fase sólida y ultrasonido para aguas y sedimentos respectivamente.

5.2.2.1 Determinación del porcentaje de recuperación en la extracción de plaguicidas en aguas por SPE.

El porcentaje de recuperación en la extracción fase sólida se evaluó analizando disoluciones estándar que contenían plaguicidas a diferentes concentraciones dentro del rango de concentraciones evaluado.

Se obtuvieron resultados con recuperaciones por encima del 87% para los plaguicidas atrazina, diuron, propanil y carbaril, para los otros dos compuestos éstas estaban en torno al 70% para la simazina y 15% para el metomil, las desviaciones estándar relativas oscilaron entre 1,3 y 10 % lo cual se puede observar en la tabla 14, para la mayoría de plaguicidas son valores aceptables de recuperaciones ya que están en el rango de 70 a 130 %, de acuerdo con las reglas establecidas por la EPA, con una desviación estándar relativa por debajo del 10 %.

Tabla 14. Porcentaje de recuperación por SPE de los plaguicidas.

	Nivel	Recuperación media (%)	CV(%)
Carbaril	Bajo	105,72	5,99
	Medio	99,84	4,04
	Alto	94,34	8,34
Simazina	Bajo	69,78	2,05
	Medio	77,04	5,53
	Alto	73,96	1,36
Atrazina	Bajo	99,90	3,68
	Medio	87,18	6,29
	Alto	86,26	8,55

La extracción se llevó a cabo por triplicado, n=3.

Tabla 14. (Continuación)

	Nivel	Recuperación media (%)	CV(%)
Diuron	Bajo	102,28	4,29
	Medio	101,92	4,02
	Alto	99,66	5,65
Propanil	Bajo	93,47	9,77
	Medio	106,90	7,40
	Alto	102,61	8,05
Metomil	Bajo	17,72	1,82
	Medio	14,68	3,64
	Alto	15,19	4,28

La extracción se llevó a cabo por triplicado, n=3.

Para determinar si existe diferencia significativa entre la recuperación media y el 100% se aplicó un test estadístico (test de student), los valores de $t_{\text{experimental}}$ se comparan con los tabulados para el intervalo de confianza requerido con n-1 grados de libertad y la exactitud se evalúa para el promedio de recuperaciones de todas las concentraciones. Si $t_{\text{exp}} < t_{\text{tab}}$, no existe diferencia significativa con el 100% de recuperación.

Para el carbaril con los datos de la tabla 15, se tiene que la recuperación media para n=9 medidas es 99.96%, t_{tabulado} (gl:8, $\alpha=0.05$)=2.306, como $t_{\text{exp}} < t_{\text{tab}}$ (0.0149<2.306) para el carbaril no existe diferencia significativa entre la recuperación media y 100%.

Tabla 15. Porcentaje de recuperación para el carbaril.

	Nivel	Recuperación				
Carbaril	Bajo	110,53	108,06	98,55	Promedio (n=9)	99,96
	Medio	104,22	99,03	96,27	S	7,336
	Alto	91,62	103,20	88,19	RSD:	7,339

t_{tabulado} (U:8, $\alpha=0.05$)=2.306

Resultados similares se obtuvieron para el diuron y propanil lo cual se puede apreciar en el anexo 13.

De acuerdo con lo anterior los resultados son satisfactorios para los plaguicidas carbaril, diuron y propanil, al no encontrarse diferencias significativas entre los valores obtenidos y el 100%, por lo tanto, la recuperación media para estos tres compuestos es apropiada.

En la tabla 16, se presentan los datos obtenidos para el estudio de recuperación a tres niveles de concentración para la atrazina, la recuperación media para $n=9$ medidas es 91.11%, el t_{tabulado} ($gl:8, \alpha=0.05$)=2.306, como $2.94 > 2.306$ existe diferencias significativas entre la recuperación media y 100% para la atrazina, similares resultados se obtuvieron para la simazina y metomilos cuales se pueden apreciar en el anexo 13.

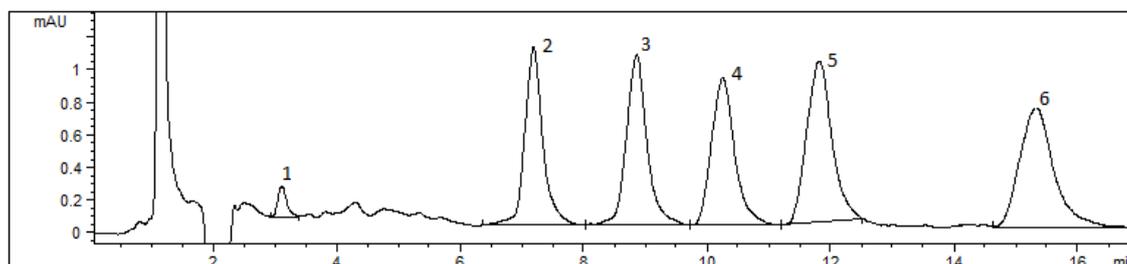
Tabla 16. Porcentaje de recuperación para la Atrazina.

	Nivel	Recuperación				
Atrazina	Bajo	101,30	95,72	102,66	Promedio (n=9)	91,11
	Medio	93,47	84,63	83,44	S	8,25
	Alto	90,04	90,98	77,76	RSD:	9,05

Para los plaguicidas simazina, atrazina y metomil, se obtuvo diferencia significativa entre los valores promedio de recuperaciones de todas las concentraciones y el 100%, sin embargo, los valores de recuperación para la simazina y atrazina son aceptables de acuerdo con lo establecido con la EPA ya que se encuentran en el rango de 70 a 130 %. Para el metomil el porcentaje de recuperación es muy bajo con la metodología propuesta, por lo que habría que utilizar otro tipo de condiciones en la extracción fase sólida con C_{18} , solo para este compuesto, lo cual no resulta apropiado ya que habría la necesidad de más muestra y reactivos, inversión de tiempo, entre otros, solamente para el metomil y uno de los planteamientos de este trabajo es realizar un método multiresiduo, es decir que con una sola metodología permita el estudio de la mayor cantidad de plaguicidas de manera simultánea. Se obtuvieron resultados satisfactorios por extracción fase sólida para los plaguicidas simazina, atrazina, carbaril, diuron y propanil en aguas.

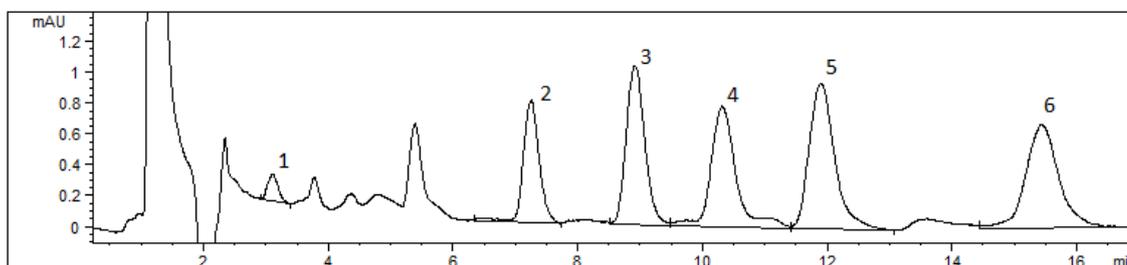
En la figura 13, se muestra un cromatograma representativo obtenido después de la extracción fase sólida, en agua grado HPLC fortificada a 0.05 mg/L (metomil, diuron y propanil), 0.025 mg/L (Simazina y atrazina), 0.0125 mg/L (carbaril). Con fase móvil ACN:agua (45:55) v/v, flujo de fase móvil 0.9 mL/min, UV: 218 nm, columna C_{18} . El cromatograma del extracto blanco de matriz no presenta interferencias a los tiempos de retención de los compuestos (simazina, atrazina, carbaril, diuron y propanil) lo cual se puede apreciar en el anexo 14.

Figura 13. Cromatograma de la extracción fase sólida. (1) metomil, (2) simazina, (3) Carbaril, (4) Atrazina, (5) Diuron, (6) Propanil.



Las recuperaciones de los plaguicidas a pH 7 de acuerdo con la metodología de Pichonet *et al*⁵¹, disminuye la co-extracción de ácidos húmicos y fúlvicos, que puede dificultar el análisis de los plaguicidas más polares que eluyen al inicio del cromatograma. En la figura 14 se presenta un cromatograma obtenido al analizar una muestra de agua de río fortificada y sometida a SPE, no se observó la presencia de un pico grande o joroba característico de los ácidos húmicos y fúlvicos, por lo tanto, el procedimiento de SPE utilizado reduce las interferencias comúnmente encontradas como son los ácidos húmicos y fúlvicos en muestras de aguas superficiales.

Figura 14. Cromatograma muestra de agua real fortificada, pH llevado a 7.



5.2.2.2 Extracción de plaguicidas en sedimentos por ultrasonido.

En el estudio de la extracción de los plaguicidas simazina, atrazina, diuron, propanil, metomil y carbaril, en sedimentos, se investigó la eficiencia de extracción de los plaguicidas con diferentes solventes: acetato de etilo, metanol, acetona, acetonitrilo y hexano, los cuales abarcan un amplio rango de polaridad, los resultados de este estudio se presentan en la tabla 17.

⁵¹V. Pichon, C. Cau Dit Coumes, L. Chen, S. Guenu, M.-C. Hennion. Simple removal of humic and fulvic acid interferences using polymeric sorbents for the simultaneous solid-phase extraction of polar acidic, neutral and basic pesticides. *En: Chromatography A*, Vol. 737. 1996. p 25-33.

Tabla 17. Porcentaje de recuperación de plaguicidas en sedimentos.

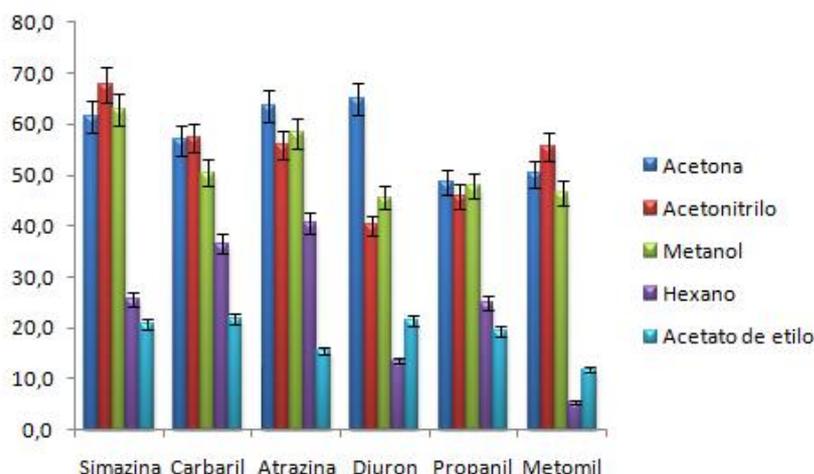
Compuesto	Acetona		Acetonitrilo		Metanol		Hexano		Acetato de etilo	
	%R	%CV	%R	%CV	%R	%CV	%R	%CV	%R	%CV
Simazina	61,5	5,0	67,8	3,4	63,0	4,7	25,6	6,0	20,9	9,0
Carbaril	56,8	3,8	57,2	5,1	50,5	3,3	36,6	5,9	21,7	9,9
Atrazina	63,6	5,5	55,8	7,2	58,3	3,7	40,7	5,9	15,5	5,7
Diuron	64,9	5,0	40,2	5,0	45,6	3,3	13,6	7,3	21,5	8,4
Propanil	48,5	4,3	45,9	5,2	47,8	3,9	24,9	7,5	19,3	3,1
Metomil	50,2	7,8	55,6	6,0	46,6	5,5	5,4	6,5	11,8	6,4

La extracción se llevó a cabo por triplicado, n=3.

En términos generales, las recuperaciones para los distintos solventes en las muestras de sedimentos fueron entorno al 60% para la mayoría de plaguicidas estudiados. Los cromatogramas representativos de este estudio se pueden apreciar en el anexo 15.

En la figura 15, se muestra el porcentaje de recuperación de los plaguicidas (simazina, atrazina, diuron, propanil, metomil y carbaril) en sedimentos, al utilizar diferentes solventes para la extracción. Se puede apreciar que los porcentajes de recuperación obtenidos con acetona, metanol y acetonitrilo para la mayoría de los plaguicidas son superiores a las obtenidas con hexano y acetato de etilo.

Figura 15. Porcentajes de recuperación en sedimentos con diferentes solventes: acetona, acetonitrilo, metanol, hexano y acetato de etilo.



Los porcentajes de recuperación obtenidos con acetona, metanol y acetonitrilo para algunos de los compuestos son muy similares por lo tanto se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA) de un factor, para mirar si existen diferencias

significativa y prueba de Tukey (Honest Significant Difference) cuando fue necesario.

En la tabla 18, se presentan los resultados obtenidos del ANOVA para el carbaril, los cuales indican que si existen diferencias en al menos uno de los promedios, para saber cuáles medias o grupos diferían se realizó un test de comparaciones múltiples (prueba de Tukey) los resultados obtenidos de esta prueba para el carbaril se muestran en la tabla 18.

Tabla 18. Análisis de varianza (ANOVA) para el carbaril.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	84,969	2	42,484	8,065	0,020
Intra-grupos	31,606	6	5,268		
Total	116,575	8			

De acuerdo con los resultados obtenidos de la tabla 19, la prueba de Tukey el grupo de acetona no difiere del grupo de ACN (sig.= 0.974) pero estos dos difieren significativamente del grupo de metanol (sig.<0.05 en ambos casos). Es decir no hay diferencia significativa en la extracción del carbaril al usar como solvente acetonitrilo o acetona, pero si se encontró diferencia significativa al utilizar metanol. De ahí que para el carbaril se puede usar como solvente de extracción acetona o acetonitrilo.

Tabla 19. Comparaciones múltiples: Tukey HSD para el carbaril.

(I) Solvente	(J) Solvente	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.
Acetona	Acetonitrilo	-0,41000	1,87397	0,974
	Metanol	6,30333 [*]	1,87397	0,035
Acetonitrilo	Acetona	0,41000	1,87397	0,974
	Metanol	6,71333 [*]	1,87397	0,027
Metanol	Acetona	-6,30333 [*]	1,87397	0,035
	Acetonitrilo	-6,71333 [*]	1,87397	0,027

* La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.

Para el propanil los resultados obtenidos del ANOVA indican que no hay diferencias estadísticamente significativas entre los promedios, al comparar las recuperaciones obtenidas con metanol, acetona y acetonitrilo. Similares resultados se obtienen para la simazina y atrazina. Para el diuron se encontró que no existe diferencia significativa entre las recuperaciones obtenidas entre acetonitrilo y metanol pero estos dos difieren significativamente de la acetona. Para el metomil se obtuvo no hay diferencia significativa entre el acetonitrilo y acetona, pero si existe diferencia significativa entre el acetonitrilo y el

metanol. Las tablas que se obtuvieron del ANOVA y de la prueba de Tukey se presentan en el anexo 16.

Para elección del solvente más adecuado para la extracción de los plaguicidas (simazina, atrazina, diuron, metomil, carbaril y propanil) se escogió aquel con el que se obtuvieron mayores porcentajes de recuperación para la mayoría de los plaguicidas, también se tuvo en cuenta, los criterios sugeridos por Amparán-Salido *et al*,⁵² baja toxicidad, bajo costo, volatilidad adecuada para la rápida evaporación sin causar pérdidas de los plaguicidas, polaridad apropiada y que produzca un extracto final libre de interferencias co-extractivas. La acetona cumplió con la mayoría de estas características antes mencionadas lo que permitió seleccionarlo como solvente para continuar el estudio de extracción, sin embargo los porcentajes de recuperación en las condiciones descritas anteriormente son bajos, por lo cual, con base en estos resultados y con la finalidad de aumentar la eficiencia de recuperación de los plaguicidas en la extracción con acetona, se evaluó el efecto del tiempo, volumen y número de extracciones en el ultrasonido.

-Optimización de las variables experimentales

Se usó el diseño factorial 2^3 para saber si variables como tiempo de extracción, volumen del solvente y número de extracciones pueden afectar la eficacia de la extracción por ultrasonido de los plaguicidas simazina, atrazina, diuron, propanil, metomil y carbaril; si tales factores lo afectan, como es tal efecto y cual combinación del tiempo, volumen y número de extracciones maximizan la recuperación. Con objeto de obtener la correspondiente tabla de análisis de varianza (ANOVA) y los gráficos de interacción, los valores obtenidos del diseño fueron introducidos en el programa SPSS 17.0

Se utilizó el análisis de varianza (ANOVA) para estimar la significancia de los efectos principales y sus interacciones, tal y como se refleja en la tabla 20, para el simazina los efectos de los factores individuales volumen y extracciones fueron significativos en el proceso de extracción por ultrasonido. Es decir, existen diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los niveles del volumen de disolvente y número de extracciones. Las interacciones de AxB (tiempo-volumen), AxC (tiempo Extracciones) y BxC (volumen-extracciones), también fueron estadísticamente significativas. El factor A (tiempo de extracción) y el

⁵² Amparán-Salido R, T., López Téllez J, y Navarro Rodríguez M. Metodologías para el estudio del impacto de contaminantes plaguicidas. *En*: RETEL revista de toxicológica en línea. 2003. p. 15-18.

factor de interacción triple (tiempo-volumen-extracciones) no afectan de manera significativa la variable de respuesta (% de recuperación).

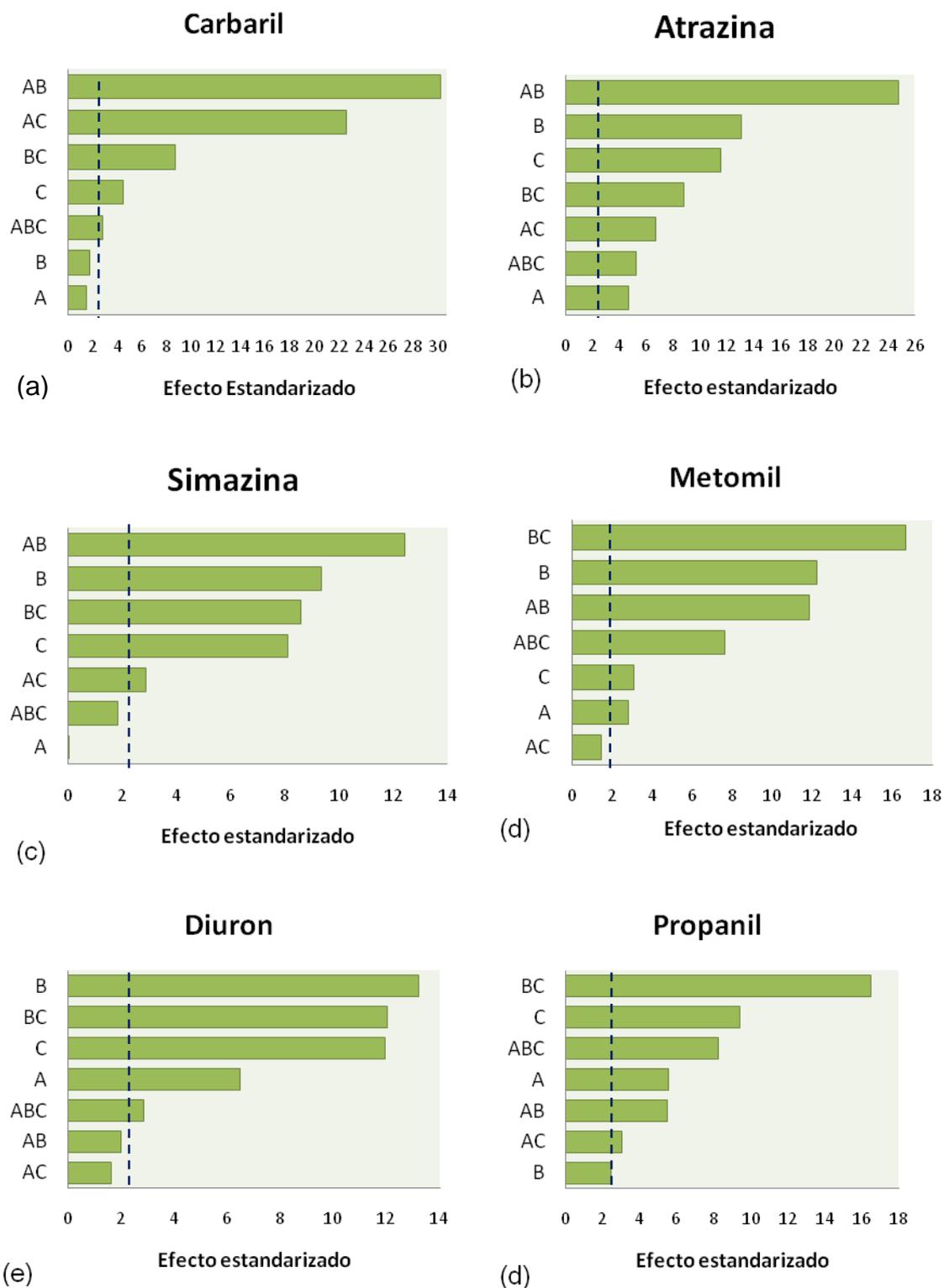
Tabla 20. Análisis de varianza (ANOVA) para lasimazina.

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Tiempo	0,007	1	0,007	0,001	0,975
Volumen	638,375	1	638,375	87,214	0,000
Extracciones	480,776	1	480,776	65,683	0,000
Tiempo * Volumen	1128,635	1	1128,635	154,193	0,000
Tiempo * Extracciones	60,999	1	60,999	8,334	0,011
Volumen * Extracciones	1640,404	1	1640,404	224,110	0,000
Tiempo * Volumen *	24,600	1	24,600	3,361	0,085
Extracciones					
Error	117,114	16	7,320		
Total	99041,983	24			
Total corregida	4090,910	23			

Otra manera de estudiar el efecto de un factor, es mediante un diagrama de Pareto, además de mostrar si un efecto es significativo, permite visualizar en orden de prioridad cuáles de los efectos son los más influyentes.

La figura 16, muestra los diagramas de Pareto obtenidos, tras la realización de los experimentos contenidos en el diseño experimental. En estos diagramas se representan los efectos estandarizados de cada factor e interacción en orden decreciente de magnitud, la línea vertical a 2.1 ($t_{\alpha/2, Y} \rightarrow t_{0.25, 16} = 2.1$) muestra el límite de decisión para considerar un factor significativo ($p=0.05$, al 95%). Si el valor del efecto estandarizado es mayor que 2,1, entonces el efecto será estadísticamente significativo. En estos diagramas, se debe tener en cuenta que la longitud de cada barra en las gráficas es proporcional al valor asociado al efecto estandarizado, lo que permite identificar fácilmente los más importantes, por ejemplo para el simazina figura 16c, puede observarse que los factores que más influyen en la variable de respuesta (% de recuperación) son AxB(tiempo-volumen), B(volumen), BxC(volumen-extracciones) y C (número de extracciones), el factor de menor influencia es el AxC(tiempo-número de extracciones); el factor A (tiempo) y AxBxC(tiempo-volumen-extracciones) no son significativos por lo tanto no influyen.

Figura 16. Diagrama de Pareto, muestra los efectos significativos en la respuesta para los plaguicidas de estudio.



Por otra parte, se obtuvieron las gráficas de los efectos principales y de interacción para cada compuesto. A continuación se lleva a cabo el estudio combinado de los diagramas de Pareto con los gráficos de los efectos principales y de interacción, para cada uno de los plaguicidas, lo cual permite obtener la información necesaria para saber qué factores y de qué modo influye significativamente el proceso de extracción por ultrasonido. Los efectos se estudian en el orden de mayor a menor influencia sobre la variable de respuesta lo cual es indicado por el diagrama de Pareto.

-Simazina

El efecto del factor de interacción AxB (tiempo-volumen) sobre la variable de respuesta (% de recuperación) de acuerdo con el diagrama de Pareto es uno de los factores de mayor influencia, del gráfico de interacción de este factor figura 17a, podemos observar que cuando la extracción se lleva a cabo a un tiempo y volumen alto se tiene un efecto positivo, es decir, la variable de respuesta aumenta; el gráfico del factor individual B (volumen) figura 18a, también muestra un efecto positivo a un nivel alto, lo que indica que el factor A, se debe trabajar en el nivel máximo, para decidir los niveles de los factores B (volumen) y C (extracciones) tenemos en cuenta el gráfico de interacción BxC (volumen-extracción) que tiene prioridad sobre los factores individuales, este gráfico de interacción figura 17b, muestra que a un volumen máximo con un mínimo de extracciones, se obtiene una buena respuesta, el gráfico del factor individual C (extracciones) figura 18b confirma que se debe trabajar con el mínimo de extracciones, hasta ahora se ha definido los niveles de volumen y número de extracciones, para determinar cuál es el nivel más apropiado del tiempo de extracción tenemos en cuenta la figura 17c, en ella podemos observar que los valores obtenidos a un nivel alto y bajo de tiempo son similares, por lo cual, se lleva a cabo una comparación de la recuperación media obtenida en los dos tiempos de extracción, a un nivel máximo de volumen y mínimo de extracciones mediante un test de comparación (ANOVA), se encuentra que no hay diferencia significativa, por lo tanto las mejores condiciones de extracción para la simazina se pueden llevar a cabo a volumen máximo, número de extracciones mínimo y tiempo mínimo o máximo dado que las dos medias son estadísticamente iguales.

Figura 17. Gráficos de efectos de interacción doble para la simazina: (a) tiempo-volumen (AxB); (b) extracciones–volumen (BxC); (c) tiempo-extracciones (AxC).

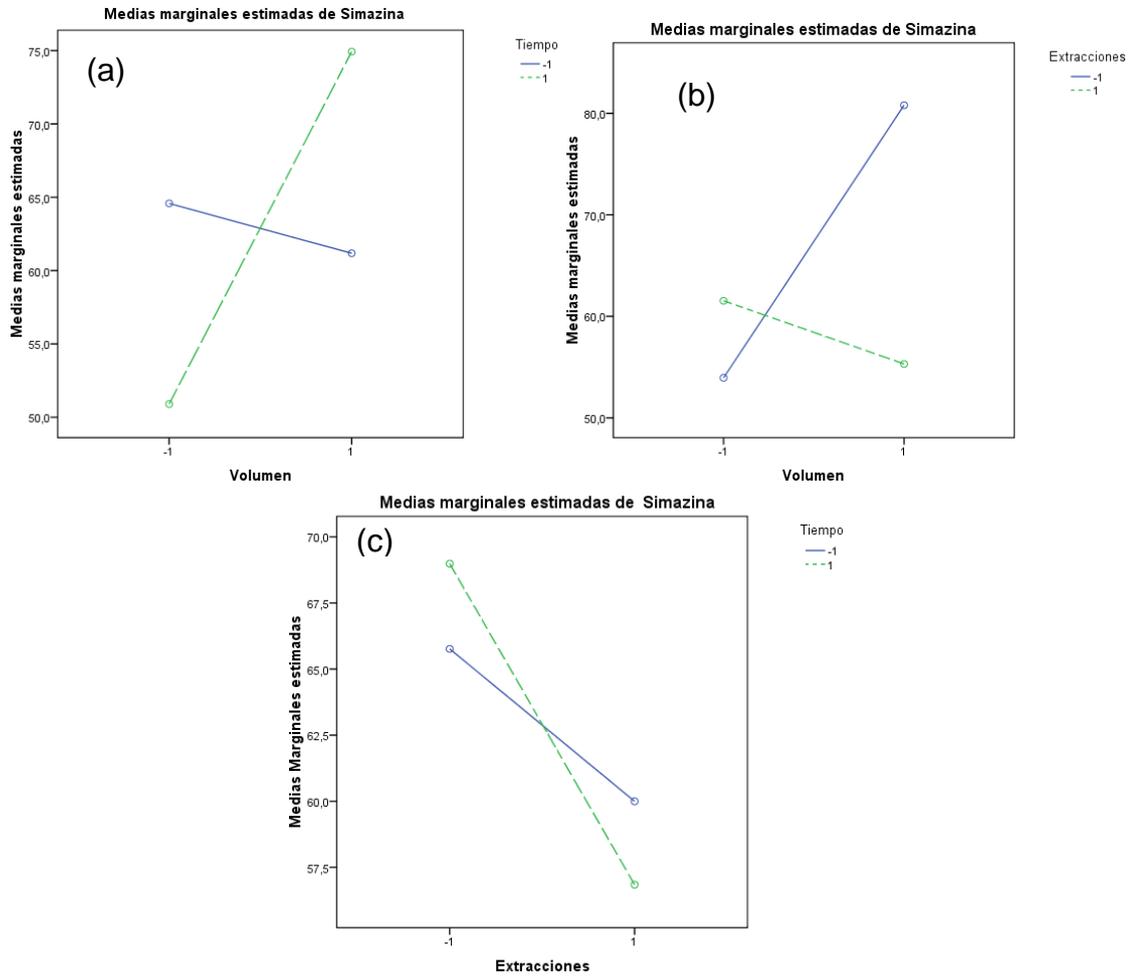
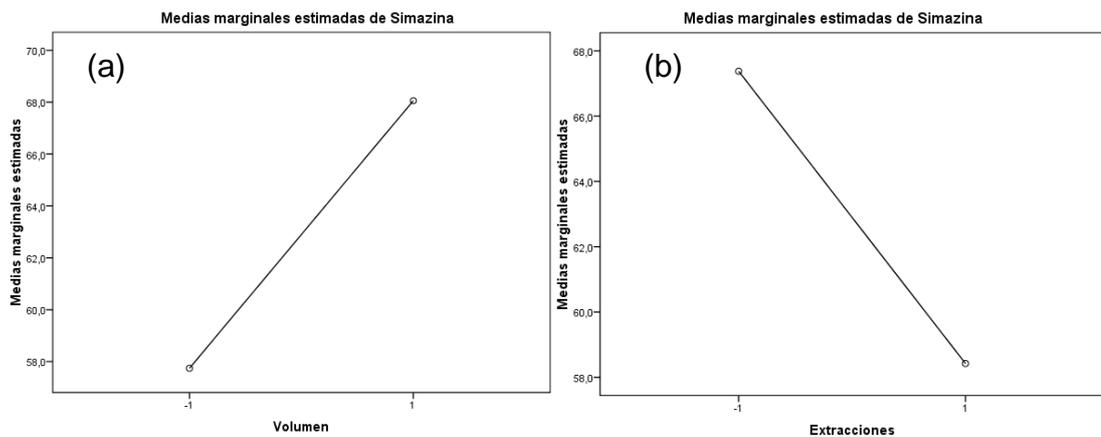


Figura18. Gráficos de efectos individuales para la simazina: (a) extracciones, (b) volumen.



-Atrazina

La tabla de ANOVA del diseño de experimentos para la atrazina se presenta en el anexo 17, se obtiene que todos los efectos de los factores son significativos, lo cual es confirmado con el diagrama de Pareto figura 16 (b), el cual también muestra que el factor que más afecta la variable de respuesta es el de interacción AxB (tiempo- volumen) en la figura 19, podemos observar que la mayor recuperación para la atrazina se obtiene a un nivel máximo de tiempo y mínimo de extracciones, para decidir cuál nivel de volumen se debería usar se tiene en cuenta las gráficas de los efectos individuales B (volumen) y C (extracciones) que de acuerdo con el diagrama de Pareto de la atrazina, son los siguientes en prioridad, la figura 20a, indica que la mayor recuperación se obtiene a volumen máximo y la figura 20b, confirma el efecto positivo sobre la variable de respuesta al utilizar un mínimo de extracciones.

Figura 19. Gráficos de efectos de interacción doble para la atrazina: tiempo-extracciones (AxC).

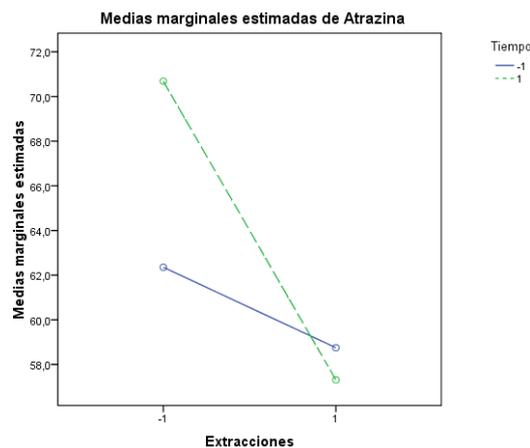
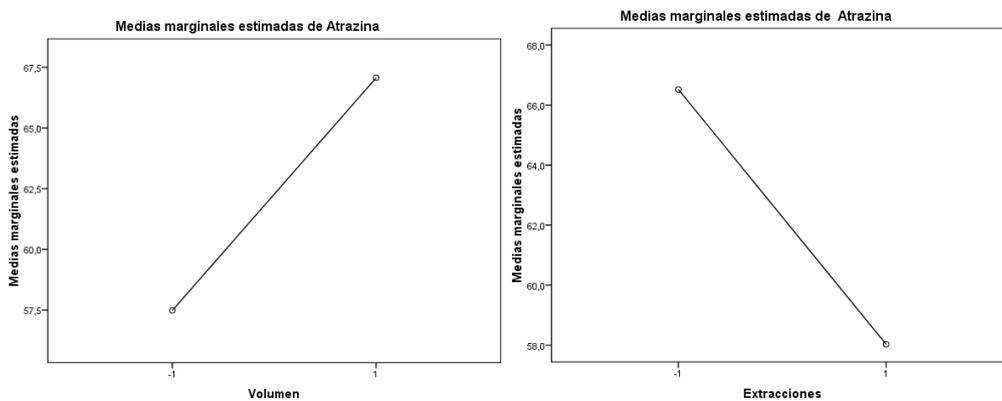


Figura 20. Gráficos de efectos individuales para la atrazina: (a) volumen, (b) extracciones.



Por lo tanto, del análisis anterior de las gráficas individuales y de interacción para la atrazina se obtiene que la mejor condición de extracción se lleva a cabo con un mínimo de extracciones, máximo de tiempo y volumen, condiciones que también permiten obtener buenas recuperaciones para la simazina, esto se explica debido a que son plaguicidas de una misma familia (triazinas) las cuales presentan estructuras y propiedades similares.

-Propanil

De acuerdo con la tabla de ANOVA para el propanil anexo 17, todos los factores son significativos, el efecto del factor BxC (volumen-extracciones) de acuerdo con el diagrama de Pareto figura 16 (d), es el de mayor influencia sobre la variable de respuesta (% de recuperación), en la figura 21 se puede observar que el efecto de incrementar B (volumen) es positivo siempre y cuando C (extracciones) esté en su nivel mínimo; porque si C está en su nivel alto ocurre un efecto negativo. El siguiente factor de influencia para el propanil es C, su gráfico de efecto individual figura 22, nos indica que a un mínimo de extracciones se logra un efecto positivo sobre el porcentaje de recuperación lo que confirma lo antes mencionado. De esta forma se obtiene que los mejores niveles para los factores B y C son máximo y mínimo respectivamente; para decidir el nivel del tiempo de extracción, se analiza la interacción triple AxBxC (tiempo-volumen-extracciones), por la prioridad de esta interacción sobre los demás efectos, en la figura 23a y 23b se puede observar que a un volumen máximo y mínimo de extracciones, el efecto de los dos niveles del factor A (tiempo) sobre la variable de respuesta es similar, por lo tanto, para saber si existe diferencia significativa entre estos niveles de tiempo se realiza una test de comparación (ANOVA), los resultados de esta prueba indicaron que existe diferencia significativa, por lo tanto, el efecto del factor A es mayor cuando está en su nivel alto a un volumen máximo y mínimo de extracciones.

Figura 21. Gráfico del efecto de interacción doble para el propanil: BxC (volumen-extracciones).

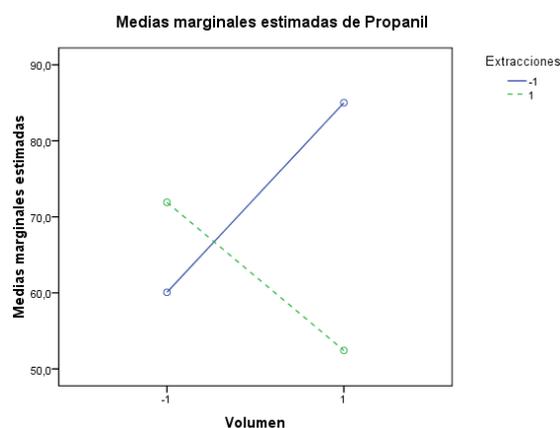


Figura 22. Gráfico de efecto individual C (extracciones) para el propanil.

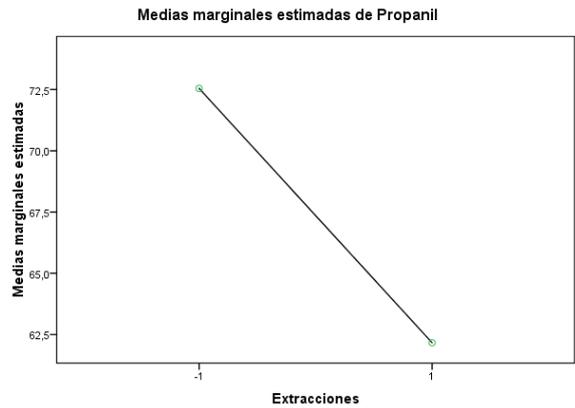
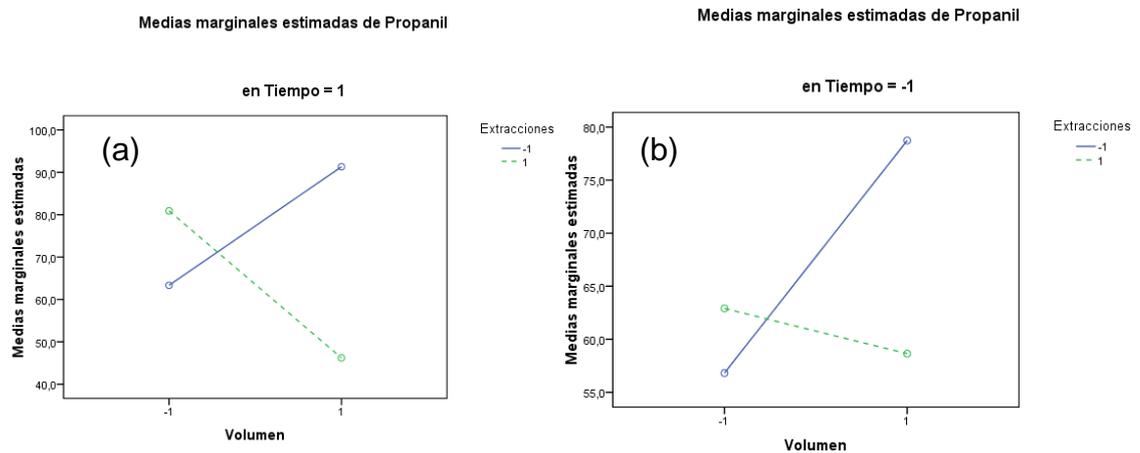


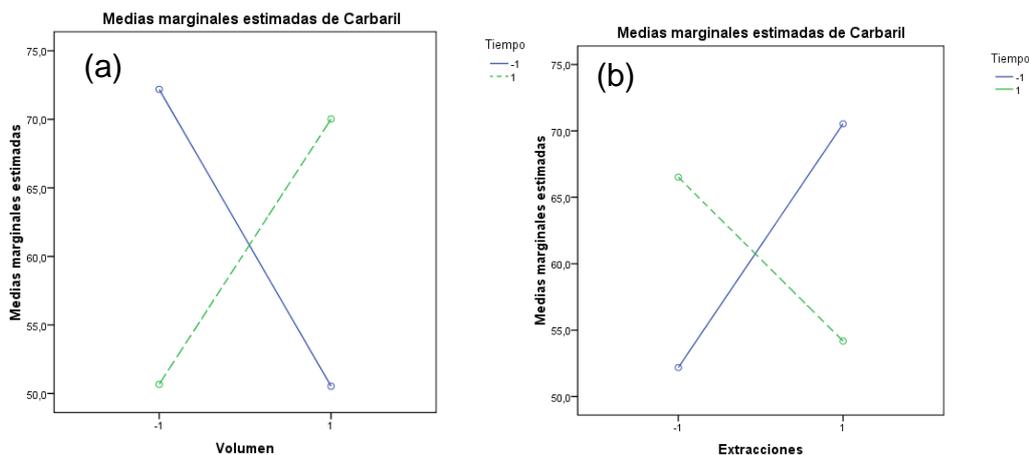
Figura 23. Gráficos de efectos triple AxBxC (tiempo-volumen-extracciones) para el propanil.



-Carbaril

De la tabla de ANOVA para el carbaril (anexo 17) los efectos de los factores individuales A (tiempo) y B (volumen) no son significativos, lo cual también se puede apreciar con el diagrama de Pareto figura 16a, los efectos de los factores de interacción son los de mayor influencia, de acuerdo con los gráficos de interacción figuras 24a y 24b, para la extracción del carbaril se puede utilizar un volumen(-), tiempo(-) y extracciones(+) o volumen(+), tiempo(+) y extracciones(-), para decidir cuáles son las condiciones de extracción más apropiadas, se realizó un test de comparación (ANOVA), los resultados indicaron que no hay diferencia significativa, por lo tanto, se puede utilizar cualquiera de las dos combinaciones de niveles mencionadas anteriormente.

Figura 24. Gráficos de efectos de interacción doble, (a): AxB, (b):AxC para el carbaril.



-Metomil y diuron

En el análisis de los diagramas de Paretofiguras 16e y 16d para el diuron propanilrespectivamente y los gráficos de interacción (anexo 17) siguió el mismo razonamiento que para los demás plaguicidas antes mencionados. Los factores de mayor influencia son diferentes, sin embargo se encontró que las mejores condiciones de extracción para ambos compuestos se llevan a cabo a tiempo mínimo, volumen máximo ynúmero de extracciones mínimo.

-Parámetros de la extracción

En aras a obtener la mayor eficacia en el proceso de extracción por ultrasonido, para la mayoría de plaguicidas, los parámetros del diseño experimental, fueron extracción mínima, tiempo y volumen máximo, aunque los porcentajes de recuperación de metomil y diuron disminuyen con estos parámetros de extracción, se obtienen valores de recuperación alrededor del 80 %, que es aceptable de acuerdo con las reglas establecidas por la EPA. En la tabla 21 se han resumido las condiciones experimentales para la extracción de los plaguicidas simazina, atrazina, diuron, carbaril, metomil y propanil en sedimentos.

Tabla 21. Parámetros de la extracción y niveles de los factores utilizados en el diseño, así como los valores óptimos hallados para la extracción por ultrasonido en sedimentos.

Factor	Fijo	Menor	Mayor	Óptimo
Tiempo de extracción (min)	---	5	20	20
*Volumen de solvente (mL)	---	5	20	20
Número de extracciones	---	1	3	1
Cantidad de sedimento (g)	1	---	---	1

*Solvente acetona

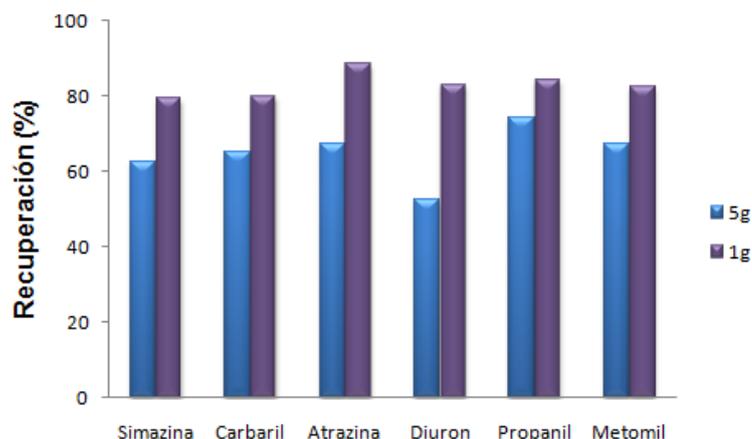
-Robustez del diseño factorial 2³

Se comprobó si una modificación en el volumen solvente puede provocar cambios en las condiciones óptimas de extracción, se realizaron un conjunto de experimentos utilizando mayor cantidad de solvente (30mL), empleando las condiciones de extracción optimizadas, se realizó una prueba de comparación (ANOVA) y se obtuvo que no hay diferencia significativa. También se estudio un tiempo de extracción mayor (30 min) con las condiciones optimizadas ya descritas, los resultados indicaron que para todos los plaguicidas hay una disminución en los porcentajes de recuperación y existe diferencia significativa.

-Influencia de la cantidad de muestra

Con objeto de comprobar si una modificación en la cantidad de muestra puede provocar cambios en las condiciones óptimas de extracción, se realizaron un conjunto de experimentos utilizando mayor cantidad de muestra 5.0g, empleando las condiciones de extracción optimizadas para 1.0 g. En la fortificación de las muestras se siguió el procedimiento descrito anteriormente con algunas modificaciones (anexo 18). Los resultados que se obtienen para cantidades de muestra de 1.0 y 5.0 g, no presenta diferencia significativa, para el propanil, los demás plaguicidas presentan diferencias significativas. Para cantidades de muestra superiores, los resultados indican que las recuperaciones disminuyen, en la figura 25, se muestra el porcentaje de recuperación de los plaguicidas (simazina, atrazina, diuron, propanil, metomil y carbaril) utilizando 1.0 y 5.0 g de sedimento

Figura 25. Influencia de la cantidad de sedimento utilizada en las recuperaciones de los plaguicidas, empleando las condiciones optimizadas para 1.0 g de sedimento.



-Eficacia de la extracción por ultrasonido

Se estudió la recuperación de los plaguicidas en sedimentos fortificados a diferentes concentraciones dentro del rango lineal evaluado a un nivel bajo, medio y alto, utilizando las condiciones experimentales optimizadas.

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 22, las recuperaciones estuvieron por encima del 80% para todos los plaguicidas, son valores aceptables de recuperaciones ya que están en el rango de 70 a 130 %, de acuerdo con las reglas establecidas por la EPA, con una desviación estándar relativa siempre por debajo del 10 %.

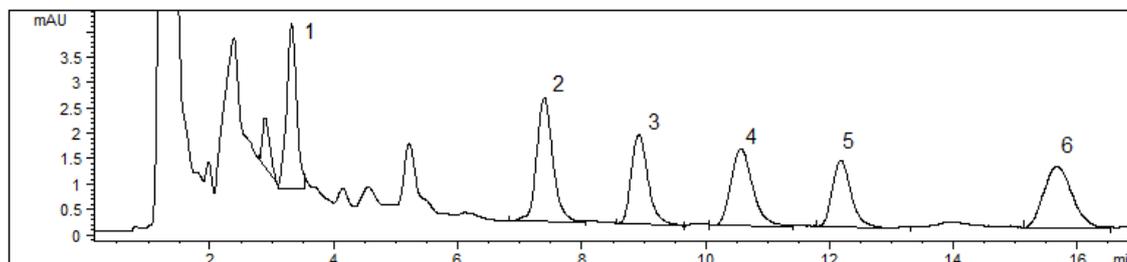
Tabla 22. Porcentajes de recuperación de los plaguicidas en sedimentos.

Compuesto	Nivel	% Recuperación			Promedio	%CV
Simazina	Alto	89,37	84,89	91,44	88,57	3,78
	Medio	92,48	81,56	77,24	83,76	9,38
	Bajo	86,33	87,67	91,16	88,39	2,82
Carbaril	Alto	87,19	83,44	86,42	85,68	2,31
	Medio	81,42	78,93	87,05	82,46	5,05
	Bajo	89,38	78,85	86,68	84,97	6,44
Atrazina	Alto	85,68	90,75	88,95	88,46	2,90
	Medio	95,04	93,65	88,94	92,54	3,46
	Bajo	95,28	87,23	85,05	89,19	6,04
Diuron	Alto	84,07	86,88	89,48	86,81	3,12
	Medio	85,63	87,36	88,06	87,02	1,44
	Bajo	86,74	91,58	89,98	89,44	2,76
Metomil	Alto	83,88	79,80	81,57	81,75	2,51
	Medio	78,88	85,80	90,57	85,08	6,91
	Bajo	87,91	82,14	84,74	84,93	3,40
Propanil	Alto	90,30	88,65	94,39	91,11	3,24
	Medio	99,25	94,88	84,12	92,75	8,40
	Bajo	94,40	88,85	89,25	90,83	3,41

La extracción se llevó a cabo por triplicado, n=3.

En la Figura 26, se muestra un cromatograma representativo del extracto que se obtiene, tras la extracción asistida por ultrasonidos en las condiciones experimentales optimizadas. El sedimento fue previamente fortificado con una disolución patrón a concentraciones de 0.05 mg/L (Metomil, diuron y propanil), 0.025 mg/L (Simazina y atrazina), 0.0125 mg/L (carbaril).

Figura 26. Cromatograma del extracto obtenido de un sedimento fortificado. Fase móvil ACN: agua (45:55) v/v, flujo de fase móvil 0.9 mL/ min, UV: 218 nm, columna C₁₈. (1) Metomil, (2) Simazina, (3) Carbaril, (4) Atrazina, (5) Diuron, (6) Propanil.



El cromatograma representativo del extracto blanco de matriz para sedimentos no se presentó interferencias al tiempo de retención de los compuestos (simazina, atrazina, carbaril, diuron, metomil y propanil) lo cual se puede apreciar en el anexo 19.

5.2.2.3 Aplicación a muestras reales

Finalmente se evaluó la fiabilidad del método descrito analizando agua y sedimentos superficiales del Valle alto del río Cauca, en el tramo La Balsa-Anacaro (S1-S8). Se realizaron pruebas físicas y químicas de las principales variables de las muestras de agua y sedimentos recogidos en las ocho estaciones. Entre los análisis realizados a los sedimentos están el contenido de partículas finas (arcillas y limos) y de MO (carbono orgánico), que contribuye a determinar si un plaguicida será retenido y además inferir posibles acumulamientos a lo largo de un río. En el anexo 20, se presentan los resultados de estos análisis los cuales fueron realizados por el grupo de investigación “Producción más limpia” Universidad Javeriana, Cali.

-Muestras de Sedimentos

A continuación se presentan los resultados de las concentraciones de plaguicidas simazina, atrazina, diuron, propanil, carbaril y metomil, en sedimentos provenientes de los muestreos realizados en Junio y Octubre del 2010 respectivamente.

Los seis plaguicidas analizados en muestras de sedimentos correspondientes al muestreo I (Junio de 2010), estuvieron por debajo del límite de cuantificación o no fueron detectados, tabla 23, lo que representa un resultado preliminar positivo, ya que esto significa que no se detectó la contaminación por parte de

los plaguicidas simazina, atrazina, diuron, metomil, carbaril y propanil en los sedimentos del río Cauca en las estaciones de S1(La Balsa) a la S8(Anacaro).

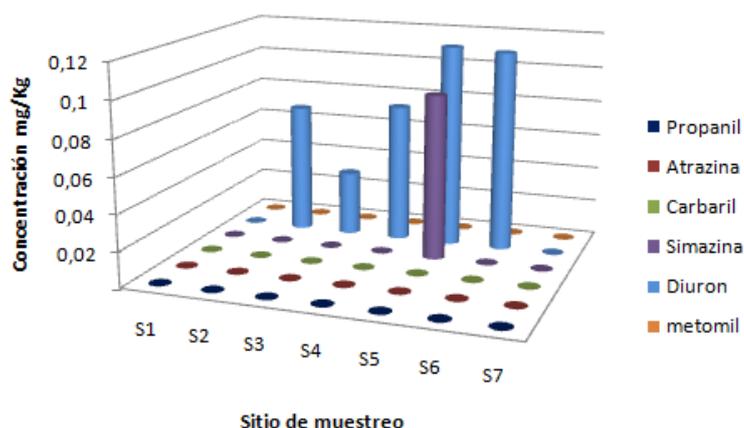
Tabla 23. Sedimentos, muestreo I (Junio 2010).

Estaciones		Carbaril	Simazina	Atrazina	Diuron	Propanil	Metomil
S1	La Balsa	nd	nd	< lc	nd	nd	nd
S2	Pte. Hormiguero	nd	nd	nd	nd	nd	nd
S3	Juanchito	nd	nd	nd	nd	nd	nd
S4	Pto. Isaacs	nd	nd	nd	nd	nd	nd
S5	Paso de la Torre	nd	nd	nd	nd	nd	nd
S6	Mediacanoa	nd	nd	<lc	nd	nd	nd
S7	Pte. Guayabal	nd	< lc	nd	nd	nd	nd
S8	Anacaro	nd	nd	nd	nd	nd	nd

Concentración: ppm (reportado como mg/Kg de sedimento base seca); nd: no detectado;lc: Límite de cuantificación

Sin embargo, en el muestreo II, en las estaciones S2 (Puente Hormiguero) a la S6 (Mediacanoa), se encontró la presencia de diuron con rangos de concentración entre $0,036 \pm 0,003$ y $0,115 \pm 0,002$ mg/Kg, en la estación S5 (Paso de la Torre) se encontró la presencia de simazina en concentración de $0,093 \pm 0,003$ mg/Kg. Se puede observar que el sitio que mayor contaminación presenta en cuanto a los plaguicidas de estudio es la estación S5 (Paso de la Torre), lo cual se puede apreciar en la figura 27.

Figura 27. Niveles encontrados de plaguicidas en sedimentos, muestreo II(Octubre).



Para la interpretación de los resultados, se tiene en cuenta que varios factores puede afectar la distribución de los plaguicidas en un ambiente determinado, entre estos factores se encuentra la precipitación, por lo cual se tuvo en cuenta

el boletín informativo sobre el monitoreo del fenómeno de "La Niña" para el año 2010 (IDEAM).⁵³

El muestreo I se realizó en el mes de Junio temporada seca de mitad de año, las lluvias presentan una disminución en su frecuencia e intensidad. El inicio de la segunda temporada de lluvias del año fue después de la segunda quincena de Septiembre donde se registró un incremento paulatino de las precipitaciones, el muestreo II se realizó en el mes de Octubre donde los porcentajes de precipitación evidenciaron los efectos climáticos de la fase de maduración del fenómeno de "La Niña"; ya que se registraron lluvias con excesos entre moderados y altos de acuerdo con el informe de la IDEAM.

Para efectos del presente estudio esto es importante, ya que la precipitación es un factor influyente en la remoción de los residuos de plaguicidas y su resultante deposición en los sedimentos, de esa forma se explica por qué es posible cuantificar plaguicidas los cuales en el muestreo anterior no fueron detectados, según *Masís et al.*,⁵⁴ los contaminantes orgánicos usualmente, pueden ser solubilizados y eventualmente distribuidos en el agua, luego pueden ser adsorbidos a la superficie de las partículas de sedimento; por consiguiente al detectarse más residuos de plaguicidas en el muestreo II, puede ser resultado de una persistencia alta.

En la figura 27, también se puede observar que el diuron, se halla en todas las estaciones desde S2 a S6, la mayor incidencia del diuron en sedimentos se puede deber a que su persistencia varía de moderada a alta (1 mes a un año) y su valor de coeficiente de adsorción del carbono orgánico Koc es el más alto en relación con los demás plaguicidas estudiados, lo que representa una mayor capacidad de este compuesto para ser adsorbido por la materia orgánica (MO) presente en el sedimento.

Los resultados obtenidos de MO en los sedimentos se pueden apreciar en el anexo 18. El contenido de MO presente en las diferentes estaciones, muestra un comportamiento relativamente heterogéneo con rangos mínimos y máximos de 0.19 y 0.58 % respectivamente, lo cual indica una menor probabilidad de que los plaguicidas estudiados con valor de Koc bajo se adhieran al sedimento. El Koc además de representar la capacidad de un compuesto para ser

⁵³Boletín informativo sobre el monitoreo de los Fenómenos de "El Niño" y "La Niña" IDEAM, 2010. <http://pronosticos.ideam.gov.co>

⁵⁴Masís F, Valdez J, Coto T y León S. RESIDUOS DE AGROQUÍMICOS EN SEDIMENTOS DE RÍOS, POÁS, COSTA RICA. Nota Técnica Agronomía Costarricense. 2008 Vol, 32(1). ISSN:0377-9424p.113-123.

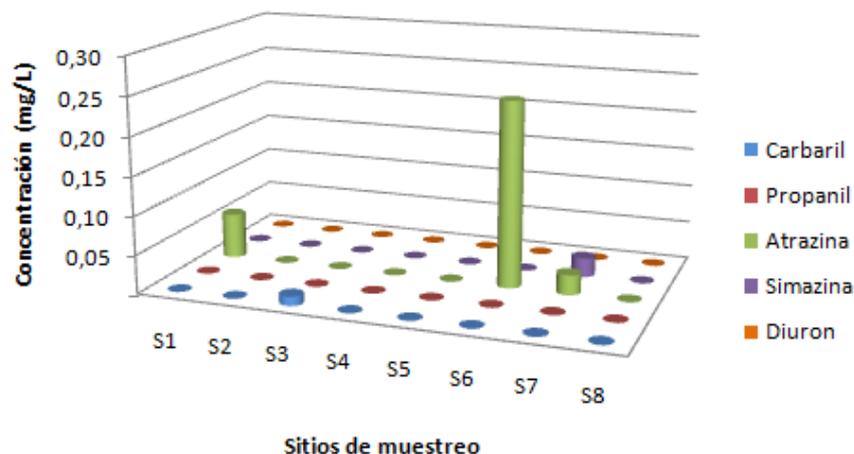
adsorbido por la materia orgánica también relaciona la capacidad de adsorción con la arcilla presente.

-Muestras de aguas

A continuación se presentan los resultados de las concentraciones de plaguicidas simazina, atrazina, diuron, propanil y carbaril en aguas provenientes de los muestreos realizados en Junio y Octubre del 2010 respectivamente.

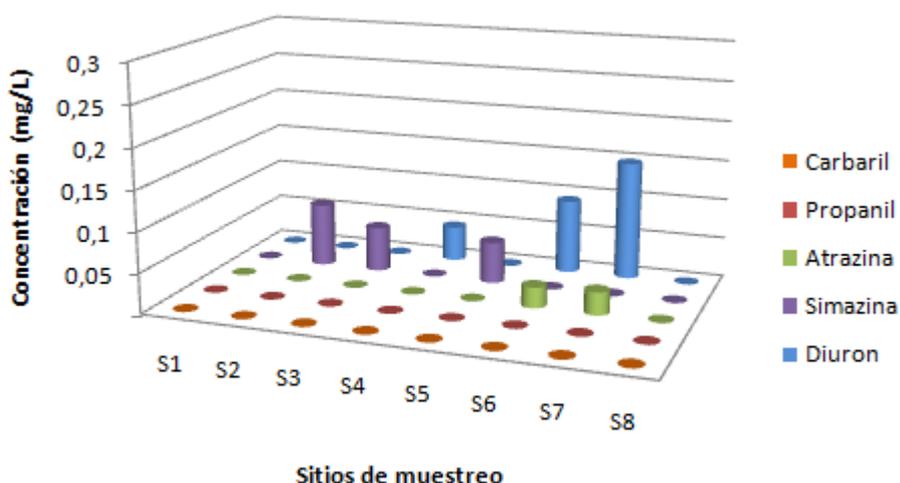
Los niveles de los plaguicidas encontrados en muestras de aguas se detallan en la anexo 21. De los compuestos analizados, se detectaron tres plaguicidas que se identifican en la figura 28, la atrazina fue el plaguicida de mayor incidencia, el cual se encontró en tres de las ocho estaciones de muestreo S1(Paso de la Balsa), S6 (Mediacanoa) y S7 (Puente Guayabal) con un rango de concentración entre $0,0258 \pm 0,0002$ y $0,2405 \pm 0,0006$ mg/L; El carbaril solo se detectó en la estación de S3 (Juanchito) en concentración de $0,0125 \pm 0,0005$ mg/Ly la simazina en la estación S7 (Puente Guayabal) en concentración de $0,0248 \pm 0,0002$ mg/L. Los demás compuestos no fueron detectados.

Figura 28. Niveles encontrados de plaguicidas en aguas (muestreo I).



En la figura 29, se puede apreciar que para el muestreo II, los compuestos más frecuentemente encontrados pertenecen al grupo de las triazinas (simazina y atrazina), seguido del diuron, las concentraciones de plaguicidas halladas en los sitios de muestreo estuvieron para el diuron en un rango de $0,044 \pm 0,003$ y $0,148 \pm 0,002$ mg/L; atrazina entre $0,026 \pm 0,002$ y $0,029 \pm 0,003$ mg/L y para la simazina entre $0,052 \pm 0,002$ y $0,079 \pm 0,002$ mg/L.

Figura 29. Niveles encontrados de plaguicidas en aguas (muestreo II).



Los resultados obtenidos en general muestran que en la estación S1 (La Balsa) durante el estudio solo se detecta un plaguicida (atrazina), entre otras razones, porque está ubicada en el tramo del río con menor número de descargas, lo que disminuye la posibilidad de contaminación. En las estaciones desde S2 (Puente Hormiguero) a S6 (Mediacanoa) en aguas como en sedimentos, se observa un incremento en la concentración de los niveles de plaguicidas detectados, lo que se puede deber a la mayor actividad agrícola e industrial (descargas puntuales y dispersas de la zona urbana de Cali, las aguas residuales de la zona industrial, así como las descargas de algunos de los ríos tributarios al río Cauca, los cuales reciben aguas residuales industriales y domésticas de diferentes municipios e industria). Entre la estación S7 (Puente Guayabal) y S8 (Anacaro) disminuye la concentración de los plaguicidas estudiados, esto es posible debido a una recuperación natural que presenta el río, un aumento en los caudales y la reducción significativa de los aportes de carga contaminante.

Los resultados obtenidos en este estudio sirven como base de datos y contribuyen a la detección de sitios con mayor riesgo de altas descargas sobre el río, así como también para poder formular estrategias de mejoramiento ambiental.

CONCLUSIONES

- El análisis simultáneo de simazina, atrazina, diuron, carbaril y propanil, por la técnica analítica HPLC, cumplen con los requerimientos necesarios y aseguran, de esta manera, la calidad y la confianza de los resultados, por ende, su aplicabilidad para el análisis de los plaguicidas de estudio, en matrices de aguas y sedimentos, bajo las condiciones de trabajo establecidas.
- La metodología de extracción fase sólida resultó confiable para cinco de los plaguicidas estudiados, los porcentajes de recuperación estuvieron por encima del 87% para los plaguicidas atrazina, diuron, propanil y carbaril, para la simazina estaban en torno al 70%, estos son valores aceptables de recuperaciones ya que están en el rango de 70 a 130 % de acuerdo con las reglas establecidas por la EPA.
- El uso del diseño factorial de tres niveles permitió optimizar las variables experimentales: volumen de solvente, tiempo de extracción y número de extracciones, en la extracción por ultrasonido de los plaguicidas simazina, atrazina, diuron, propanil, metomil y carbaril, en sedimentos superficiales. Las extracciones realizadas con las condiciones experimentales establecidas presentan recuperaciones, para todos los plaguicidas superiores al 80%, lo que está acorde con lo establecido por la EPA.
- En general los resultados de la aplicación de esta metodología en muestras reales evidencian que desde la estación S2 (Puente Hormiguero) hasta la S6 (Mediacanoa) tanto en aguas como en sedimentos, los plaguicidas de mayor frecuencia encontrados son la simazina, atrazina y diuron, lo que se puede deber a la mayor actividad agrícola e industrial en esta zona.
- Los niveles de concentración de los plaguicidas alcanzados en las muestras de agua de las ocho estaciones en los dos muestreos se encuentran en entre no detectables y unos valores máximos de $(0,2405 \pm 0,0006)$ ppm de atrazina, $(0,079 \pm 0,002)$ ppm de simazina, $(0,148 \pm 0,002)$ ppm de diuron, $(0,0125 \pm 0,0005)$ ppm de carbaril.
- En los sedimentos procedentes del primer muestreo la simazina y atrazina estaban en concentraciones abajo de los límites de cuantificación, los demás plaguicidas analizados no fueron detectados. En los sedimentos del

segundo muestreo fueron encontrados dos de los ocho plaguicidas, específicamente simazina ($0,093 \pm 0,003$)ppmy diuron($0,115 \pm 0,002$)ppm.

- Se encontró que existe contaminación de los plaguicidas atrazina y diuron, ya que están por encima de los límites máximos permisibles (valor individual máximo admisible de 0.1 mg/L) que deben cumplir los vertimientos a las aguas superficiales, marinas, a los sistemas de alcantarillados público y al suelo que establece el Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial de la República de Colombia, en el proyecto de resolución, artículo 5, párrafo primero, Residuos de Ingredientes Activos de Plaguicidas y de PCB.

RECOMENDACIONES

Es importante destacar que con este trabajo se abren nuevas investigaciones, las cuales pueden ir dirigidas, primero a ampliar la investigación a los metabolitos o compuestos de degradación de los plaguicidas estudiados y segundo evaluar al metomil en unam metodología permita su estudio junto a otros plaguicidas de manera simultánea. En la extracción de sedimentos se recomienda utilizar mezclas de solventes para observar el efecto sobre porcentaje de recuperación de los plaguicidas estudiados, existen diversas publicaciones referentes a la extracción de plaguicidas con mezclas de solventes con la que obtienen buenos porcentajes de recuperación.

Finalmente se debe ampliar la investigación del río Cauca en el departamento del Cauca, para establecer los niveles de plaguicidas comúnmente usados en esta zona en aguas y sedimentos estos últimos buenos indicadores para evaluar la penetración de estas sustancias en el medio ambiente.

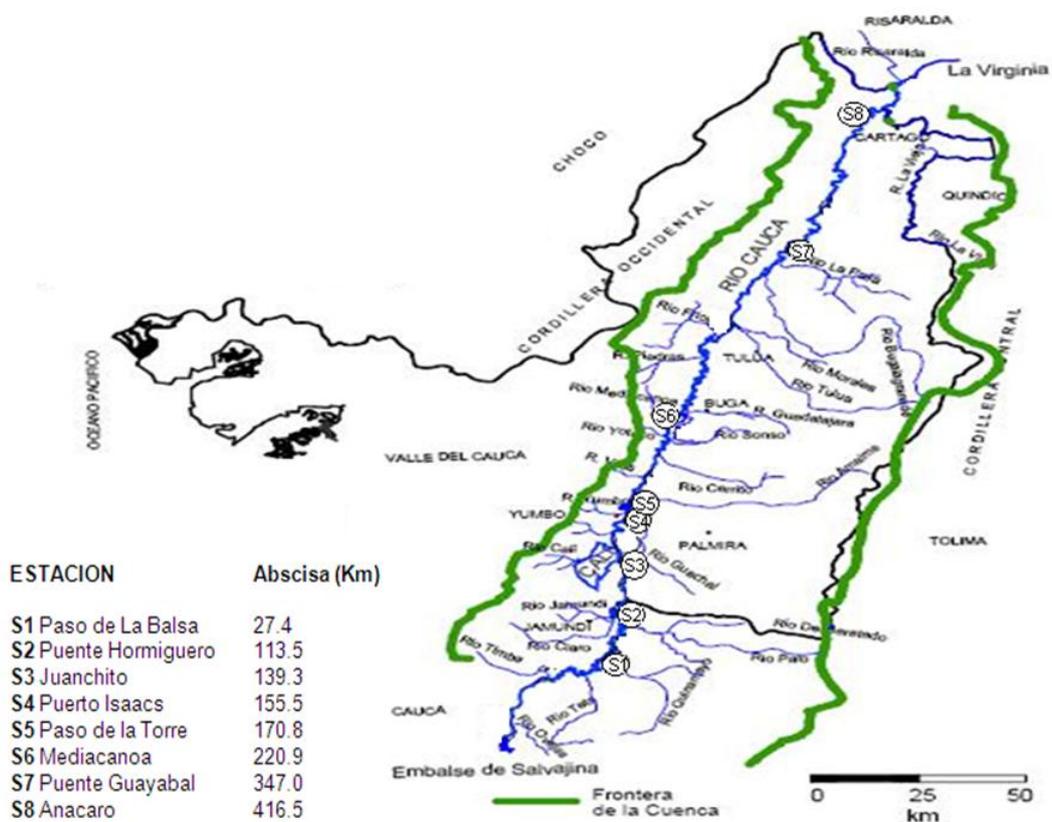
BIBLIOGRAFÍA

1. BERNAL-GONZÁLEZ, Marisela y DURÁN-DE-BAZÚA Carmen. Degradación de triazinas y carbamatos en agua superficial. XXXI Congreso Interamericano Aidis Santiago – Chile, octubre de 2008. p.10
2. BISWAS, Ashim. et al. A simple assay for analyzing residues of carbaryl insecticide in buffalo meat by liquid chromatography–photodiode array detection. En: J. Braz. Chem. Soc. Febrero, 2010. Vol.16, p.5
3. BORGES, J. Nuevas metodologías de análisis de pesticidas por electroforesis capilar. [Tesis de grado]. Universidad de la Laguna. 2005. 3-25 pp.
4. BABIC, Sandra; PETROVIC, Mira; KASTELAN-MACAN, Maria. Ultrasonic solvent extraction of pesticides from soil. En: Journal of Chromatography A, 1998. vol. 823 p. 3–9
5. BRONDI S. H. G.; LANÇAS F.M. Development and validation of a multi-residue analytical methodology to determine the presence of selected pesticides in water through liquid chromatography. En: J. Braz. Chem. Soc. 2005. Vol.16, no p.3
6. CASTRO JIMÉNEZ, Javier. Determinación, persistencia y distribución de Insecticidas de uso agrícola en el medio ambiente. [Tesis doctoral] Madrid, 2002. p19
7. ESTEVE, F. Preparación de muestras para el análisis de plaguicidas mediante microondas y fluidos presurizados. [Tesis de doctoral]. Universidad de Valencia. 2007.p. 33-44.
8. ESTEVE, F. y otros. 2006. Microwave-assisted extraction of pyrethroid insecticides from semi permeable membrane devices (SPMDs) used to indoor air monitoring. En: Analytica Chimica. 2006. p. 118-127
9. ESTEVE, F. Microwave-assisted extraction of pyrethroid insecticides from soil. En: Analytica Chimica. 2004. p. 73-78
10. FUENTES, Celia. Comportamiento y destino ambiental de la atrazina en el suelo: detección por HPLC y ¹⁴C de las concentraciones ambientales bajo condiciones controladas y de campo en Saldaña –Tolima. En: Agronomía Colombiana, 2003. Vol. 21 (1-2) p.29-48
11. FERRER, I., HENNION, M.C. AND BARCELO, D., En: Anal. Chem. 1997 vol. 69, p. 4508. Citado por GÓMEZ PACHECO.
12. GARCÍA, A. Análisis de residuos de contaminantes orgánicos en alimentos por técnicas cromatográficas. [Tesis de grado]. Universidad de Valencia. 2008. p.41-43
13. G.M.F. PINTO, I.C.S.F. JARDIM. Use of solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography for the determination of triazine residues in water: validation of the method. En: Journal of Chromatography A, 2000. Vol. 869, p. 463–469

14. GÓMEZ DE BARREDA FERRAZ, Diego. Comportamiento de herbicidas residuales en suelos. Posible contaminación de acuíferos. [Tesis doctoral]. Universidad Politécnica de Valencia, 1999. p. 6
15. GÓMEZ PACHECOM. Determinación de plaguicidas en aguas mediante tratamiento quimiométrico de señales analíticas. En: Revista digital "Investigación y Educación" 2005. vol. 3. no 20, p. 25. ISSN 1696-7208.
16. HERNANDEZ BORGES, Javier. Nuevas metodologías de análisis de pesticidas por electroforesis capilar [Tesis de doctorado]. Universidad de la Laguna. 2005. 3 p.
17. HIDALGO, Carmen. Simplificación del tratamiento de muestra en el análisis de residuos de herbicidas en aguas mediante aplicación de las técnicas cromatográficas acopladas LC-LC y SPE-LC. [Tesis de doctorado]. Universidad de Jaume .1999, 155 p.
18. LOEWY, R. Plaguicidas en aguas subterráneas del Alto Valle de Rio Negro y Neuquen.[Tesis de grado]. Universidad Nacional del Comahue. 2000, 1-4.p
19. LUCIO F.C. MELO, C. H.; COLLINS, I.High-performance liquid chromatographic determination of pesticides in tomatoes using laboratory-made NH₂ and C18 solid-phase extraction materials. En: Journal of Chromatography A, 2005. p. 75–81
20. LEE, X., KUMAZAWA, T., TOMITA, Y., KITABAYASHI, K., HATTORI, H. y SATO, K., J.En: Forensic Toxicol. 1995, vol.13, p. 232. Citado por GÓMEZ PACHECO
21. VALDEZ, F; COTO T., LEÓN S. Residuos de agroquímicos en sedimentos de ríos, Poás, Costa Rica. En: Nota Técnica Agronomía Costarricense. 2008. Vol 32, no 1. p.113-123. ISSN:0377-9424
22. MUÑOZ DE LA PEÑA A. MAHEDERO M. C. y BAUTISTA-SÁNCHEZ, A. Monitoring of phenylurea and propanil herbicides in river water by solid-phase-extraction high performance liquid chromatography with photoinduced-fluorimetric detection. En: Talanta. 2003. vol. 60, p. 279-285.
23. MELO, Lucio F.C; COLLINS, Carol H. y JARDIM Isabel C.S.F. High-performance liquid chromatographic determination of pesticides in tomatoes using laboratory-made NH₂ and C18 solid-phase extraction materials. En: Journal of Chromatography A, 2005. vol.1073, p. 75–81
24. NIVIA, Elsa. Mujeres y Plaguicidas, una mirada a la situación actual, tendencias y riesgos de los plaguicidas. Estudio de caso en Palmira, Colombia. En: Boletín, RAPALMIRA, ECOFONDO, PAN. Palmira, Colombia. Octubre, 2000. 15 p. ISBN: 958-33-1809-4.
25. PINTO, Glaucia Maria F. y JARDIM, Isabel Cristina S.F. Use of solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography for the determination of triazine residues in water: validation of the method. En: Journal of Chromatography A, 2000. Vol. 869, p. 463–469
26. PAN, Jian; XIAO-XIAO, Xia; LIANG, Juan. Analysis of pesticide multi-residues in leafy vegetables by ultrasonic solvent extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. En: Ultrasonics Sonochemistry. 2008. Vol.15 p.25–32

27. PITARCH, E. Desarrollo de metodología analítica para la determinación de plaguicidas organofosforados y organoclorados en muestras biológicas humanas. [Tesis de doctoral]. 2001. Universidad de Jaume I de Castelló. pp.17-18.
28. PEÑALVER, Alejandra. Aplicación de la microextracción en fase sólida al análisis medioambiental [Tesis de doctorado]. Universidad Rovira I Virgili. 2002. 7-9, 18 p.
29. PEÑALVER A.M. Evaluation of different parameters in the solid-phase microextraction process. En: Chromatographia, 2000. Vol.50 p.685-688.
30. PINO ESTÉVEZ, Verónica. Extracción y preconcentración micelar. Aplicación a la determinación de hidrocarburos aromáticos policíclicos en muestras de interés medioambiental [Tesis de doctorado]. Universidad de la Laguna. 2002. 7-8 p.
31. PICHON V., CAU DIT COUMES C., CHEN L., GUENU S., HENNION M.-C. Simple removal of humic and fulvic acid interferences using polymeric sorbents for the simultaneous solid-phase extraction of polar acidic, neutral and basic pesticides. Journal of Chromatography A, 1996. Vol. 737 p. 25-33
32. RUBERU, S.R., DRAPER, W.M. y PERERA, S.K. J. En: Agric. Food Chem. 2000. 48, 4109. Citado por GÓMEZ PACHECO, María del Mar. Determinación de plaguicidas en aguas mediante tratamiento quimiométrico de señales analíticas. En: Revista digital "Investigación y Educación", 2005. Vol.3, no. 20, p. 25. ISSN 1696-7208.
33. Rezic, I; Horvat, A.J.M; Babic, S; Kastelan-Macan M. Determination of pesticides in honey by ultrasonic solvent extraction and thin-layer chromatography. En: Ultrasonics Sonochemistry. 2005. Vol.12, p.477-48129.
34. SCHUHMACHER, M.; OCAMPO-DUQUEW. A. Y NÚÑEZ, M. E. Memoria científico-técnica del proyecto: "Modelo de evaluación ambiental en ríos que reciben altas cargas contaminantes" Ministerio de asuntos exteriores y de cooperación. 2008. Gobierno de España. 6-7 p.
35. TOR A., AYDIN M. E.; Ö ZCANS. Ultrasonic solvent extraction of organochlorinepesticides from soil. En:Analytica Chimica. 2006. P.173-180
36. TRAN, Anh. T.K; HYNE, Ross. V. y DOBLE, Philip. Determination of commonly used polar herbicides in agricultural drainage waters in Australia by HPLC. En: Chemosphere. 2007. Vol. 67, p. 944-953. 2010
37. VAGIA M.C., PETSASB A.S., KOSTOPOULOUA M.N., KARAMANOLIA M.K., LEKKASB T.D. Determination of organochlorine pesticides in marine sedimentssamples using ultrasonic solvent extraction followed byGC/ECD. En: Desalination. 2007. Vol. 210 146-156.

ANEXO 1. Mapa del departamento del Valle del Cauca con los sitios de muestreo.



ANEXO 2. Toma de muestra de sedimentos y aguas.

La recolección de muestras de aguas y sedimentos se desarrolló en ocho puntos del río Cauca en el Valle alto del río Cauca en el tramo entre La Balsa y Anacaro. En cada sitio se establecieron las coordenadas geográficas con GPS y las características del lugar, tales como el registro de las condiciones meteorológicas al momento de la colecta, temperatura, etc. Todas las muestras fueron tomadas en la ribera occidental del río, la toma de muestras se realizó por el método de “muestreo compuesto” para sedimentos y “muestro simple” para aguas, se siguieron los protocolos de muestreo de Water quality Sampling ISO 5667-6:2005 International Standard y RAS del Ministerio de Desarrollo. 2000.

- Sedimentos

Se colectó aproximadamente 1kg de muestra compuesta (20 a 30 submuestras) de sedimento de tipo fluvial en una zona de tres metros. Las muestras se recolectaron a 5 cm del sedimento superficial húmedo en forma oblicua con pala de acero inoxidable. Las muestras se depositan en bolsas Ziploc® transparente debidamente etiquetadas y se conservaron frías durante su traslado. Posteriormente el sedimento se pesó y se secó a temperatura ambiente durante un periodo de 3 a 5 días protegido de la luz; una vez secos los sedimentos se pasaron por un tamiz de 2 mm, se liofilizaron (con el fin de eliminar el agua remanente y darle estabilidad a las muestras) se guardaron hasta su posterior análisis. A las muestras se les determinó: humedad, pH, textura y contenido de materia orgánica.

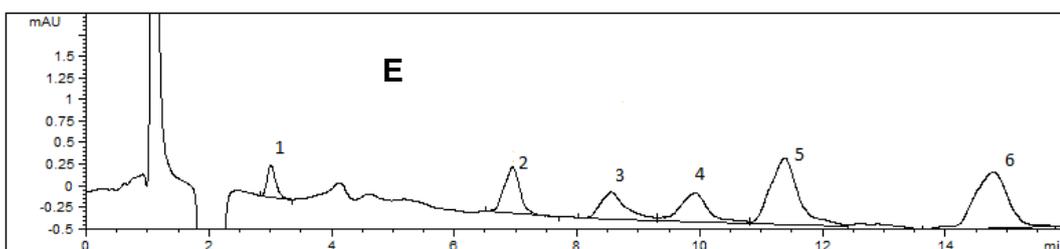
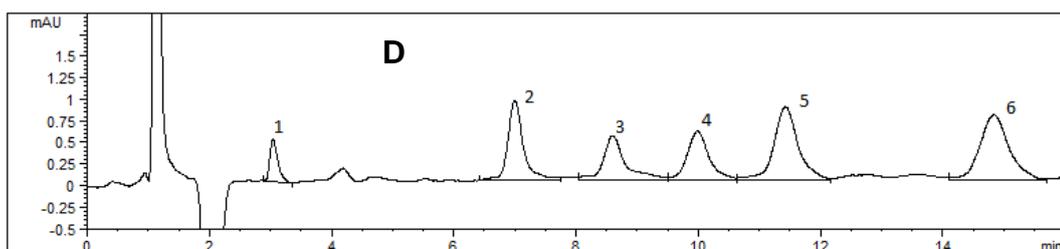
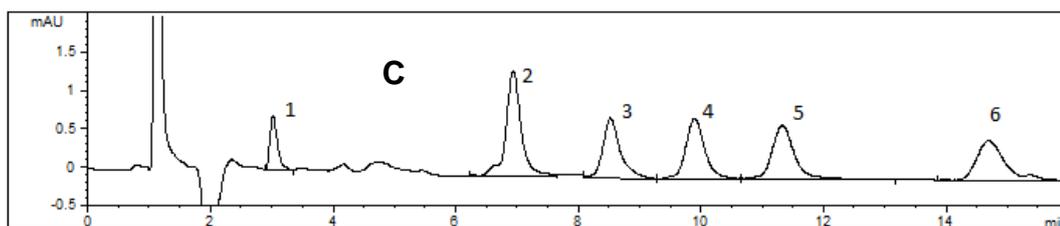
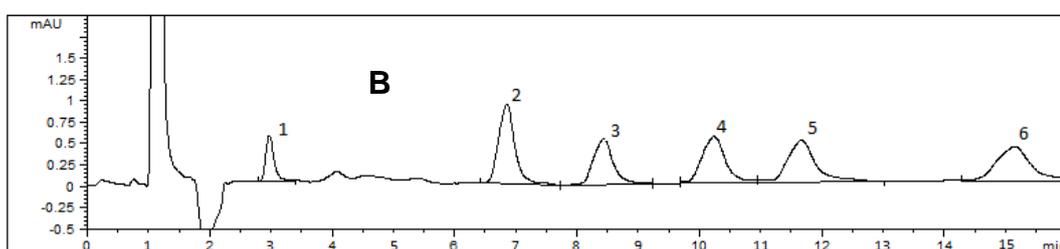
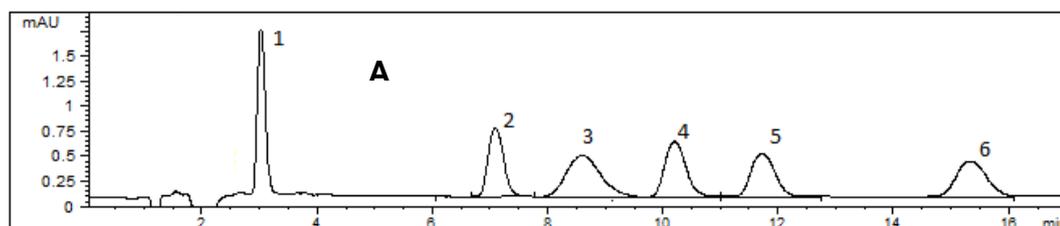
-Aguas

El muestreo se llevó de forma manual, el tipo de muestreo fue simple, en el momento de la toma de muestras se hicieron 2 enjuagues previos con el agua del río y después la toma de la muestra de agua superficial a unos 30 cm de profundidad, las muestras se tomaron en botellas de vidrio ámbar de 1L de capacidad y refrigeradas en campo, en el laboratorio, las muestras se conservaron en oscuridad a aproximadamente a 4°C hasta su extracción. A las muestras se les midieron los parámetros fisicoquímicos pH, temperatura y conductividad eléctrica, etc.

Las botellas fueron lavadas previamente con detergente neutro y agua destilada a temperatura ambiente, posteriormente con agua destilada caliente y secadas con aire, las tapas fueron cubiertas con papel aluminio. Las botellas fueron etiquetadas con el nombre del lugar, fecha y hora de muestreo.

ANEXO 3. Cromatogramas obtenidos a diferentes longitudes de onda.

Cromatogramas obtenidos a diferentes longitudes de onda A: 234 nm, B: 220 nm, C: 218nm, D: 214, E: 210 nm. (1): metomil, (2): simazina, (3): carbaril, (4): atrazina, (5): diuron, (6): propanil.



ANEXO 4. Determinación del flujo óptimo (curva de Van Deemter).

Para seleccionar el flujo de la fase móvil adecuado, se realizó la curva de Van Deemter, la determinación de la altura equivalente de plato teórico y la velocidad lineal promedio se tuvieron en cuenta las ecuaciones 1, 2 y 3, se grafica v (cm/s) vs H (cm), con los datos experimentales reportados en la tabla 1. El analito eluido fue el propanil.

La eficacia de una columna cromatográfica: la altura equivalente de plato teórico o H y el número de platos teóricos N . Los dos están relacionados por la ecuación

$$N = \frac{L}{H} \quad (1)$$

Donde L : longitud de la columna (cm).

La eficacia de la columna cromatográfica aumenta cuando mayor es el número de platos, y cuando menor es la altura de plato.

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{w} \right)^2 \quad (2)$$

Dónde: w es el ancho del pico a considerar y t_R es su tiempo de retención

Velocidad lineal promedio es

$$v = \frac{L}{t_R}$$

Dónde: L = Longitud de la columna en centímetros (cm)

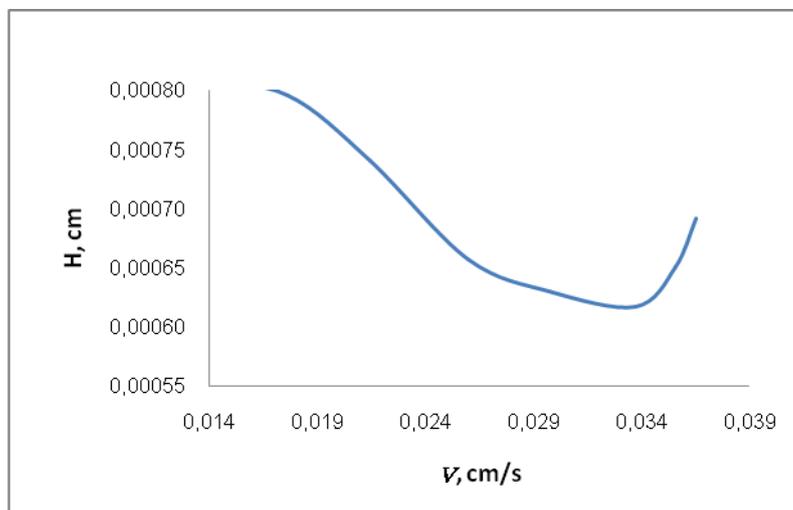
t_R = Tiempo de retención en segundos (s)

Datos de velocidad lineal promedio (v) y altura equivalente de plato teórico (H), para curva de Van Deemter

v (cm/s)	H (cm)
0,014	0,00081
0,018	0,00080
0,021	0,00074
0,026	0,00066
0,030	0,00063
0,034	0,00062
0,036	0,00065
0,037	0,00069

ANEXO 4. (Continuación)

Curva de Van Deemter velocidad lineal promedio (v) vs altura equivalente de plato teórico (H).



El valor de flujo óptimo obtenido mediante la curva de Van Deemter, fue de 0.9 mL/min en términos de velocidad lineal promedio 0,034 cm/s, para la columna (Alltech C18; 3 μ m x 4.0 x 150mm). Donde la curva presenta la menor altura equivalente del plato teórico, conduciendo así a un aumento del número de platos teóricos que es lo apropiado a la hora de determinar el flujo.

ANEXO 5. Factor de capacidad o retención

Factores de capacidad a diferente proporción de fase móvil ACN-agua

Fase móvil ACN-agua	k					
	Metomil	Simazina	Carbaril	Atrazina	Diuron	Propanil
60-40	1,202	2,811	2,928	3,709	3,913	4,688
55-45	1,320	3,342	3,676	4,591	4,934	6,108
50-50	1,466	4,088	4,792	5,883	6,506	8,343
45-55	1,674	5,238	6,655	7,973	9,215	12,285
40-60	1,929	6,840	9,505	11,049	13,532	18,733

Factores de capacidad (Ln k) de los plaguicidas en función del porcentaje de modificador orgánico (ACN) en la fase móvil.

Compuestos	Ln k				
	60%	55%	50%	45%	40%
Metomil	0,080	0,120	0,166	0,224	0,285
Simazina	0,449	0,524	0,612	0,719	0,835
Carbaril	0,467	0,565	0,681	0,823	0,978
Atrazina	0,569	0,662	0,770	0,902	1,043
Diuron	0,592	0,693	0,813	0,964	1,131
Propanil	0,671	0,786	0,921	1,089	1,273

Las curvas Ln k vs % ACN se pueden ajustar a ecuaciones de segundo grado, según la expresión:

$$\text{Ln } k = a + b \cdot \varphi_{\text{Acn}} + c \cdot \varphi_{\text{Acn}}^2$$

Coefficientes de regresión entre el factor de capacidad y el porcentaje de acetonitrilo de la fase móvil para los plaguicidas estudiados.

Compuesto	a	b	c
Metomil	1,0722	- 0,0259	0,0002
Simazina	2,3064	- 0,0484	0,0003
Carbaril	2,9596	- 0,0655	0,0004
Atrazina	2,8335	- 0,0587	0,0003
Diuron	3,3318	- 0,0737	0,0005
Propanil	3,6401	- 0,0785	0,0005

ANEXO 6. Composición de fase móvil MeOH:agua

Se calcula la composición de la mezcla Metanol-agua de igual fuerza de elución que Acetonitrilo:agua (45:55).

Según Snyder

$$S_{\text{MeOH}} \Phi_{\text{MeOH}} = S_{\text{ACN}} \Phi_{\text{ACN}}$$

$$\Phi_{\text{MeOH}} = \frac{S_{\text{ACN}} \Phi_{\text{ACN}}}{S_{\text{MeOH}}}$$

Donde Φ = fracción de volumen de solvente

S = fuerza elución

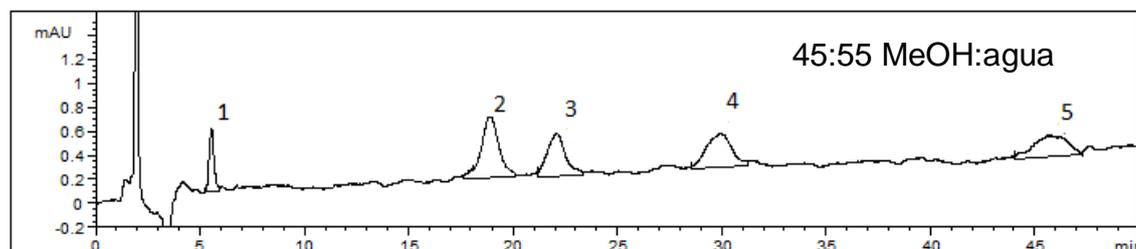
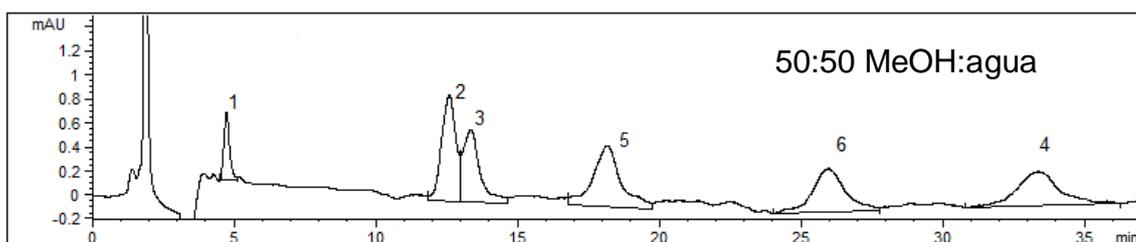
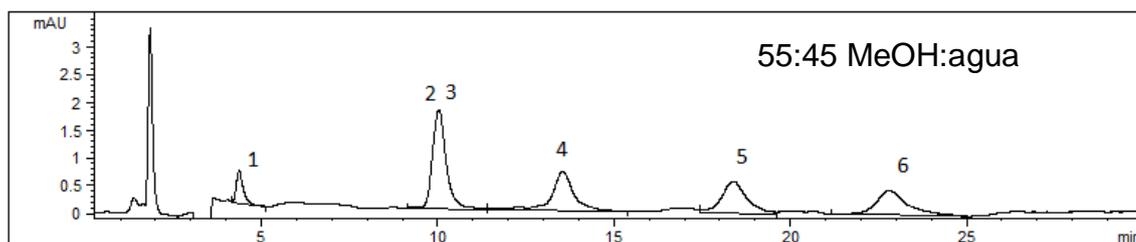
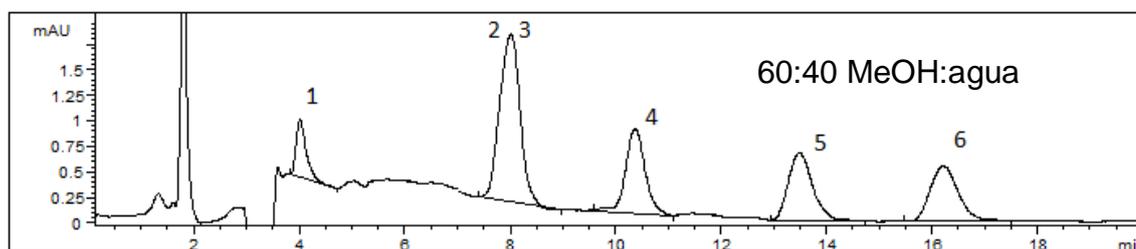
Fuerza de elución de solventes en fase reversa⁵⁵

solvente	Fuerza de elución
Agua	0.0
MeOH	2.6
ACN	3.2

Una mezcla ACN:agua (45:55) tendrá aproximadamente la misma fuerza de elución que una mezcla MeOH:agua (55: 45)

⁵⁵Quattrocchi O.; Abelaira S; Laba R, Introducción a la HPLC Aplicación y practica. 1992. pp284.

ANEXO 7. Cromatogramas fase móvil metanol-agua



ANEXO 8. Prueba de normalidad (Shapiro – Wilk)

Resultados obtenidos con la prueba de Shapiro-Wilk para la linealidad y repetibilidad instrumental con cada compuesto, utilizado el software SPSS 17.0

	Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl*	Sig.*
Carbaril	0,980	5	0,937
	0,814	5	0,105
	0,796	5	0,075
	0,914	5	0,494
	0,910	5	0,466
	0,930	5	0,596
Simazina	0,814	5	0,106
	0,843	5	0,174
	0,948	5	0,724
	0,859	5	0,226
	0,867	5	0,255
	0,863	5	0,240
Metomil	0,850	5	0,194
	0,980	5	0,937
	0,896	5	0,387
	0,905	5	0,437
	0,950	5	0,740
	0,840	5	0,164
Propanil	0,959	5	0,798
	0,797	5	0,077
	0,925	5	0,565
	0,874	5	0,283
	0,945	5	0,704
	0,946	5	0,709
Diuron	0,787	5	0,063
	0,799	5	0,079
	0,920	5	0,532
	0,827	5	0,132
	0,931	5	0,600
	0,844	5	0,176
Atrazina	0,901	5	0,415
	0,959	5	0,801
	0,945	5	0,700
	0,798	5	0,078
	0,970	5	0,877
	0,792	5	0,069

*gl, grados de libertad; Sig., significancia.

Los valores para la significancia obtenidos en la prueba de Shapiro – Wilk son superiores a 0.05, por lo que H_0 se acepta y se concluye que los datos provienen una población con distribución normal y con ello se cumple uno de los supuestos paramétricos en los que se basa este análisis.

ANEXO 9. Prueba de homogeneidad de varianzas (Levene)

Resultados obtenidos con la prueba de prueba de homogeneidad de varianzas para la linealidad y repetibilidad instrumental con cada compuesto, utilizado el software SPSS 17.0

Compuesto	Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
Carbaril	1,787	5	24	0,154
Simazina	0,879	5	24	0,510
Atrazina	1,539	5	24	0,215
Metomil	2,579	5	24	0,053
Propanil	2,367	5	24	0,070
Diuron	2,199	5	24	0,088

El p-valor asociado al estadístico de contraste es mayor que el nivel de significación fijado en este caso 0.05, aceptamos la H_0 de igualdad de varianzas y con ello se cumple uno de los supuestos paramétricos en los que se basa este análisis.

ANEXO 10. Límites de detección y cuantificación IUPAC

El límite de detección (LOD) se define como la cantidad de analito presente que se deriva de la menor señal analítica que puede detectarse con certeza razonable (Y_{LOD}). Si analizamos un blanco de la muestra varias veces y obtuviéramos la señal media (\bar{Y}_o) y su desviación estándar, $s_{\bar{Y}_o}$, las señales mayores a $Y_{LOD} = \bar{Y}_o \pm 3s_{\bar{Y}_o}$ caerían fuera de la gaussiana del blanco analítico y podríamos asignarlas a la presencia de analito. Si tenemos una recta de calibrado de ecuación $y = bx + a$, el LOD se calcularía como:

$$X_{LOD} = \frac{Y_{LOD} - a}{b}$$

Como la señal del blanco debe coincidir con la ordenada del blanco analítico (puesto que es la señal que se obtendría a una concentración de analito igual a cero), el LOD se calculará como:

$$X_{LOD} = \frac{3s_a}{b}$$

Siendo s_a la desviación estándar de la ordenada.

El límite de cuantificación (LOQ) se define como la cantidad de analito presente derivada de la menor señal analítica que puede ser medida con precisión y exactitud. De manera análoga al LOD, la IUPAC propone como LOQ al valor $Y_{LOQ} = \bar{Y}_o \pm 10s_{\bar{Y}_o}$ lleva a una concentración, a partir de la recta de calibrado:

$$X_{LOQ} = \frac{10s_a}{b}$$

ANEXO 11. Linealidad y repetibilidad

Linealidad y repetibilidad para el carbaril

Concentración (mg/L)	Área 1	Área 2	Área 3	Área 4	Área 5	Promedio	Desviación estándar	%CV
0,0125	4,596	4,399	4,553	4,476	4,520	4,509	0,075	1,67
0,025	10,295	9,435	9,553	9,540	9,740	9,713	0,344	3,54
0,05	19,428	20,167	20,140	19,784	20,154	19,935	0,325	1,63
0,075	29,340	29,682	30,169	29,754	30,200	29,829	0,360	1,21
0,1	38,275	39,857	39,344	39,430	39,178	39,217	0,583	1,49
0,125	49,469	49,928	49,094	49,282	50,511	49,657	0,569	1,15

Linealidad y repetibilidad para la simazina

Concentración (mg/L)	Área 1	Área 2	Área 3	Área 4	Área 5	Promedio	Desviación estándar	%CV
0,025	6,289	6,394	6,547	6,289	6,989	6,502	0,292	4,50
0,05	14,661	13,835	14,131	14,132	14,131	14,178	0,299	2,11
0,1	29,455	29,832	29,973	28,990	29,632	29,576	0,382	1,29
0,15	44,426	44,826	44,566	44,967	43,457	44,448	0,594	1,34
0,2	57,120	58,290	59,107	58,290	58,290	58,219	0,709	1,22
0,25	72,484	74,973	74,533	74,134	74,133	74,052	0,942	1,27

Linealidad y repetibilidad para el metomil

Concentración (mg/L)	Área 1	Área 2	Área 3	Área 4	Área 5	Promedio	Desviación estándar	%CV
0,05	2,013	2,089	2,060	2,074	2,081	2,063	0,030	1,47
0,1	4,276	4,318	4,222	4,414	4,330	4,312	0,071	1,64
0,2	9,391	9,410	8,649	9,020	9,030	9,100	0,314	3,45
0,3	13,617	13,615	13,865	13,825	13,317	13,648	0,218	1,60
0,4	18,412	18,693	18,687	18,952	18,290	18,607	0,261	1,40
0,5	22,555	23,042	22,610	22,483	22,399	22,618	0,250	1,11

Linealidad y repetibilidad para el propanil

Concentración (mg/L)	Área 1	Área 2	Área 3	Área 4	Área 5	Promedio	Desviación estándar	%CV
0,05	4,337	4,424	4,437	4,487	4,362	4,428	0,051	1,16
0,1	10,839	10,855	10,396	10,837	10,626	10,711	0,200	1,87
0,2	22,334	21,958	22,121	22,628	22,123	22,233	0,258	1,16
0,3	33,731	34,909	33,092	33,790	33,800	33,864	0,655	1,93
0,4	45,321	43,327	44,044	44,311	44,320	44,265	0,716	1,62
0,5	57,471	56,172	54,757	55,182	55,470	55,810	0,915	1,64

ANEXO 11. (Continuación)

Linealidad y repetibilidad para el diuron

Concentración (mg/L)	Área 1	Área 2	Área 3	Área 4	Área 5	Promedio	Desviación estándar	%CV
0,05	5,485	5,469	5,019	5,324	5,441	5,348	0,194	3,63
0,1	10,919	11,088	11,444	11,003	10,919	11,075	0,218	1,97
0,2	23,127	23,371	23,801	23,433	23,433	23,433	0,242	1,03
0,3	34,714	34,783	34,390	35,678	34,573	34,828	0,499	1,43
0,4	46,548	46,172	46,647	46,012	47,360	46,548	0,524	1,13
0,5	57,363	58,365	57,095	57,094	58,096	57,603	0,591	1,03

Linealidad y repetibilidad para la atrazina

Concentración (mg/L)	Área 1	Área 2	Área 3	Área 4	Área 5	Promedio	Desviación estándar	%CV
0,025	5,882	5,217	5,533	5,375	5,296	5,460	0,263	4,82
0,05	12,403	11,617	11,983	12,010	11,800	11,963	0,293	2,45
0,1	23,982	24,429	25,293	24,638	24,206	24,510	0,502	2,05
0,15	36,370	37,001	37,059	35,685	37,030	36,629	0,600	1,64
0,2	48,064	49,399	50,919	49,491	50,159	49,606	1,056	2,13
0,25	61,245	60,746	60,995	62,583	61,121	61,338	0,720	1,17

ANEXO12. Precisión intermedia

Resultados de precisión intermedia del carbaril.

Nivel	[ppm]	Día	Área 1	Área 2	Área 3	Promedio	Desviación	%RDS
Bajo	0.0125	1	5,16	4,89	4,96	5,00	0,14	2,78
		2	4,97	4,84	4,57	4,79	0,20	4,25
		3	4,77	4,88	4,97	4,87	0,10	2,10
		4	4,84	4,96	4,61	4,81	0,18	3,72
		5	5,12	5,03	5,16	5,10	0,06	1,25
Medio	0.05	1	19,43	19,01	19,17	19,20	0,21	1,09
		2	19,87	20,68	20,14	20,23	0,41	2,04
		3	19,57	19,01	20,35	19,64	0,67	3,41
		4	19,64	20,56	20,75	20,32	0,60	2,93
		5	19,33	20,17	19,56	19,69	0,43	2,20
Alto	0.125	1	50,09	49,24	49,03	49,45	0,57	1,14
		2	49,13	50,16	48,64	49,31	0,78	1,58
		3	50,13	49,35	51,96	50,48	1,34	2,66
		4	51,24	49,47	48,93	49,88	1,20	2,42
		5	51,37	50,41	49,13	50,30	1,12	2,23

Anova del carbaril, nivel bajo.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	0,217	4	0,054	2,525	0,107
Intra-grupos	0,215	10	0,021		
Total	0,432	14			

$F_{tab}=3.48$ ($\alpha=0.05, 4, 10$) $F_{exp} \leq F_{tab}$ $2.525 < 3.48$

Anova del carbaril, nivel medio.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	2,532	4	0,633	2,618	0,099
Intra-grupos	2,418	10	0,242		
Total	4,950	14			

$F_{tab}=3.48$ ($\alpha=0.05, 4, 10$); $F_{exp} \leq F_{tab}$ $2.618 < 3.48$

Anova del carbaril, nivel alto.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	3,138	4	0,785	0,722	0,596
Intra-grupos	10,870	10	1,087		
Total	14,008	14			

$F_{tab}=3.48$ ($\alpha=0.05, 4, 10$) $F_{exp} \leq F_{tab}$ $0.722 < 3.48$

ANEXO12. (Continuación)

Resultados de precisión intermedia de la atrazina.

Nivel	[]ppm	Día	Área 1	Área 2	Área 3	Promedio	Desviación	%RDS
Bajo	0.025	1	6,20	5,74	5,85	5,93	0,24	4,00
		2	6,01	6,13	6,15	6,10	0,08	1,25
		3	5,81	5,76	5,87	5,81	0,05	0,94
		4	6,25	6,13	5,83	6,07	0,22	3,58
		5	5,84	5,94	5,78	5,85	0,08	1,33
Medio	0.1	1	23,98	24,43	25,29	24,57	0,67	2,71
		2	23,73	23,79	24,35	23,96	0,34	1,44
		3	24,37	24,68	25,03	24,69	0,33	1,35
		4	23,69	23,96	24,56	24,07	0,45	1,85
		5	24,50	23,92	23,90	24,11	0,34	1,42
Alto	0.25	1	61,25	63,58	60,75	61,86	1,51	2,45
		2	61,35	59,59	61,97	60,97	1,24	2,03
		3	58,97	59,45	60,63	59,68	0,86	1,44
		4	60,26	61,01	62,36	61,21	1,07	1,74
		5	59,46	58,48	60,14	59,36	0,83	1,40

Anova de la atrazina, nivel bajo.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	0,193	4	0,048	2,013	0,169
Intra-grupos	0,240	10	0,024		
Total	0,432	14			

$F_{tab}=3.48$ ($\alpha=0.05, 4, 10$); $F_{exp} \leq F_{tab}$ ($2.013 < 3.48$)

Anova de la atrazina, nivel medio.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	1,295	4	0,324	1,646	0,238
Intra-grupos	1,967	10	0,197		
Total	3,262	14			

$F_{tab}=3.48$ ($\alpha=0.05, 4, 10$); $F_{exp} \leq F_{tab}$ ($1.646 < 3.48$)

Anova de la atrazina, nivel alto.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	13,419	4	3,355	2,636	0,097
Intra-grupos	12,729	10	1,273		
Total	26,148	14			

$F_{tab}=3.48$ ($\alpha=0.05, 4, 10$); $F_{exp} \leq F_{tab}$ ($2.636 < 3.48$)

ANEXO12. (Continuación)

Resultados de precisión intermedia del diuron.

Nivel	[]ppm		Área 1	Área 2	Área 3	Promedio	Desviación	%RDS
Bajo	0.05	1	5,48	5,36	5,24	5,36	0,12	2,32
		2	5,29	5,57	5,02	5,29	0,27	5,16
		3	5,12	5,09	5,43	5,21	0,18	3,52
		4	5,69	5,47	5,21	5,46	0,24	4,33
		5	5,41	5,15	5,46	5,34	0,17	3,13
Medio	0.2	1	23,13	22,89	21,99	22,67	0,60	2,66
		2	24,36	23,55	23,37	23,76	0,53	2,21
		3	23,10	22,37	23,99	23,15	0,81	3,50
		4	24,37	23,80	21,35	23,17	1,61	6,93
		5	22,15	24,63	23,35	23,38	1,24	5,29
Alto	0.5	1	58,10	57,98	59,63	58,83	0,92	1,57
		2	63,26	60,29	61,29	59,83	1,51	2,53
		3	58,01	60,13	62,99	60,83	2,50	4,10
		4	61,24	57,09	58,31	61,83	2,13	3,44
		5	61,37	61,17	59,99	62,83	0,75	1,19

Anova del diuron, nivel bajo.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	0,095	4	0,024	0,576	0,687
Intra-grupos	0,415	10	0,041		
Total	0,510	14			

$F_{\text{tab}}=3.48$ ($\alpha=0.05, 4, 10$) $F_{\text{exp}} \leq F_{\text{tab}}$ ($0.576 < 3.48$)

Anova del diuron, nivel medio.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	1,876	4	0,469	0,434	0,781
Intra-grupos	10,803	10	1,080		
Total	12,679	14			

$F_{\text{tab}}=3.48$ ($\alpha=0.05, 4, 10$) $F_{\text{exp}} \leq F_{\text{tab}}$ ($0.434 < 3.48$)

Anova del diuron, nivel alto.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	20,183	4	5,046	1,745	0,216
Intra-grupos	28,915	10	2,892		
Total	49,098	14			

$F_{\text{tab}}=3.48$ ($\alpha=0.05, 4, 10$) $F_{\text{exp}} \leq F_{\text{tab}}$ ($1.745 < 3.48$)

ANEXO12. (Continuación)

Resultados de precisión intermedia del propanil.

Nivel	[]ppm	Área 1	Área 2	Área 3	Promedio	Desviación	%RDS	
Bajo	0.05	1	4,42	4,56	4,35	4,45	0,11	2,45
		2	4,31	4,33	4,34	4,33	0,01	0,29
		3	4,46	4,37	4,62	4,48	0,13	2,89
		4	4,57	4,44	4,24	4,42	0,17	3,76
		5	4,14	4,46	4,53	4,38	0,21	4,79
Medio	0.2	1	22,33	22,46	21,79	22,19	0,36	1,61
		2	23,59	21,70	21,96	22,42	1,03	4,57
		3	22,53	22,14	22,87	22,51	0,36	1,61
		4	20,99	22,12	21,99	21,70	0,62	2,85
		5	22,37	24,13	23,66	23,38	0,91	3,89
Alto	0.5	1	56,18	57,24	58,90	57,44	1,37	2,38
		2	57,37	56,37	59,76	57,83	1,74	3,01
		3	57,10	59,26	56,37	57,58	1,50	2,61
		4	57,01	54,76	59,86	57,21	2,56	4,47
		5	58,01	59,37	55,70	57,69	1,86	3,22

Anova del propanil, nivel bajo.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	0,044	4	0,011	0,549	0,704
Intra-grupos	0,200	10	0,020		
Total	0,245	14			

$F_{\text{tab}}=3.48$ ($\alpha=0.05, 4, 10$) $F_{\text{exp}} \leq F_{\text{tab}}$ ($0.549 < 3.48$)

Anova del propanil, nivel medio.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	4,527	4	1,132	2,243	0,137
Intra-grupos	5,046	10	0,505		
Total	9,573	14			

$F_{\text{tab}}=3.48$ ($\alpha=0.05, 4, 10$) $F_{\text{exp}} \leq F_{\text{tab}}$ ($2.243 < 3.48$)

Anova del propanil, nivel alto.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	0,683	4	0,171	0,050	0,995
Intra-grupos	34,312	10	3,431		
Total	34,994	14			

$F_{\text{tab}}=3.48$ ($\alpha=0.05, 4, 10$) $F_{\text{exp}} \leq F_{\text{tab}}$ ($0.05 < 3.48$)

ANEXO12. (Continuación)

Resultados de precisión intermedia de la simazina.

Nivel	[] ppm	Día	Área 1	Área 2	Área 3	Promedio	Desviación	%RDS
Bajo	0.025	1	6,55	6,85	6,68	6,69	0,15	2,24
		2	6,74	6,49	6,39	6,54	0,18	2,69
		3	6,65	6,85	6,87	6,79	0,12	1,77
		4	6,67	6,29	6,71	6,56	0,23	3,57
		5	6,59	6,70	6,27	6,52	0,23	3,48
Medio	0.1	1	29,45	28,53	29,35	29,11	0,50	1,73
		2	28,35	30,56	29,83	29,58	1,13	3,82
		3	29,53	30,53	29,75	29,94	0,53	1,76
		4	29,54	29,97	30,64	30,05	0,55	1,84
		5	28,96	31,12	29,46	29,85	1,13	3,80
Alto	0.25	1	72,48	72,58	71,05	72,04	0,86	1,19
		2	73,46	72,87	74,97	73,77	1,08	1,47
		3	73,94	72,13	72,21	72,76	1,02	1,40
		4	71,01	72,53	72,13	71,89	0,79	1,09
		5	73,63	72,16	73,19	72,99	0,75	1,03

Anova de la simazina, nivel medio.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	1,684	4	0,421	0,620	0,659
Intra-grupos	6,796	10	0,680		
Total	8,480	14			

$F_{\text{tab}}=3.48$ ($\alpha=0.05$, 4, 10); $F_{\text{exp}} \leq F_{\text{tab}}$ 0.620 < 3.48

Anova de la simazina, nivel alto.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	6,959	4	1,740	2,109	0,154
Intra-grupos	8,251	10	0,825		
Total	15,210	14			

$F_{\text{tab}}=3.48$ ($\alpha=0.05$, 4, 10); $F_{\text{exp}} \leq F_{\text{tab}}$ 2.109 < 3.48

Anexo 13. Estudio del porcentaje de recuperación (Prueba t)

Si $t_{exp} < t_{tab}$, no existe diferencia significativa con el 100% de recuperación y la exactitud es apropiada⁵⁶. En este caso el valor de t se calcula como:

$$t_{exp} = \frac{|100 - R|\sqrt{n}}{RSD}$$

Porcentaje de recuperación para el diuron.

	Nivel	Recuperación				
Diuron	Bajo	104,21	97,26	105,38	Promedio (n=9)	101,29
	Medio	104,90	97,25	103,61	S	4,29
	Alto	95,64	106,09	97,26	RSD:	4,24

$t_{tabulado}$ (U:8, $\alpha=0.05$)=2.306, $t_{exp} < t_{tab}$ (0,912 < 2.306)

Porcentaje de recuperación para el propanil

	Nivel	Recuperación				
Propanil	Bajo	90,12	103,81	86,49	Promedio (n=9)	100,99
	Medio	109,61	113,09	97,99	S	9,42
	Alto	108,31	106,38	93,13	RSD:	9,33

$t_{tabulado}$ (U:8, $\alpha=0.05$)=2.306, $t_{exp} < t_{tab}$ (0,319 < 2.306)

Porcentaje de recuperación para la simazina

	Nivel	Recuperación				
Simazina	Bajo	69,4	68,58	71,37	Promedio (n=9)	73,59
	Medio	77,10	81,26	72,75	S	3,90
	Alto	73,23	75,10	73,55	RSD:	5,30

$t_{tabulado}$ (U:8, $\alpha=0.05$)=2.306, $t_{experimental}$ = 14.940, 14.940 > 2.306

Porcentaje de recuperación para el metomil

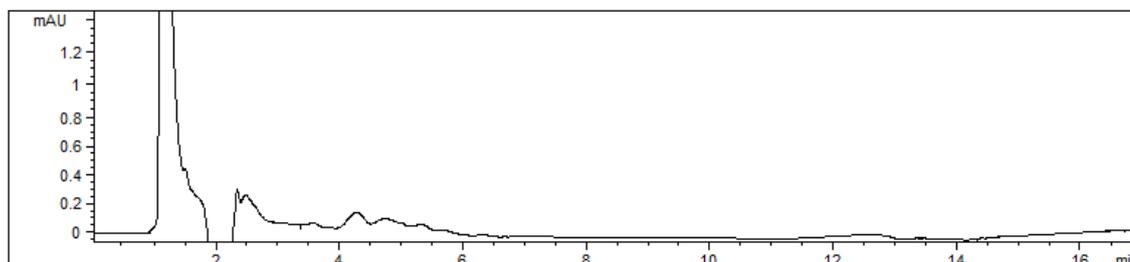
	Nivel	Recuperación				
Metomil	Bajo	17,75	18,03	17,39	Promedio (n=9)	15,86
	Medio	14,25	15,28	14,51	S	1,48
	Alto	14,49	15,78	15,29	RSD:	9,34

$t_{tabulado}$ (U:8, $\alpha=0.05$)=2.306, $t_{experimental}$ = 27.02, 27.02 > 2.306

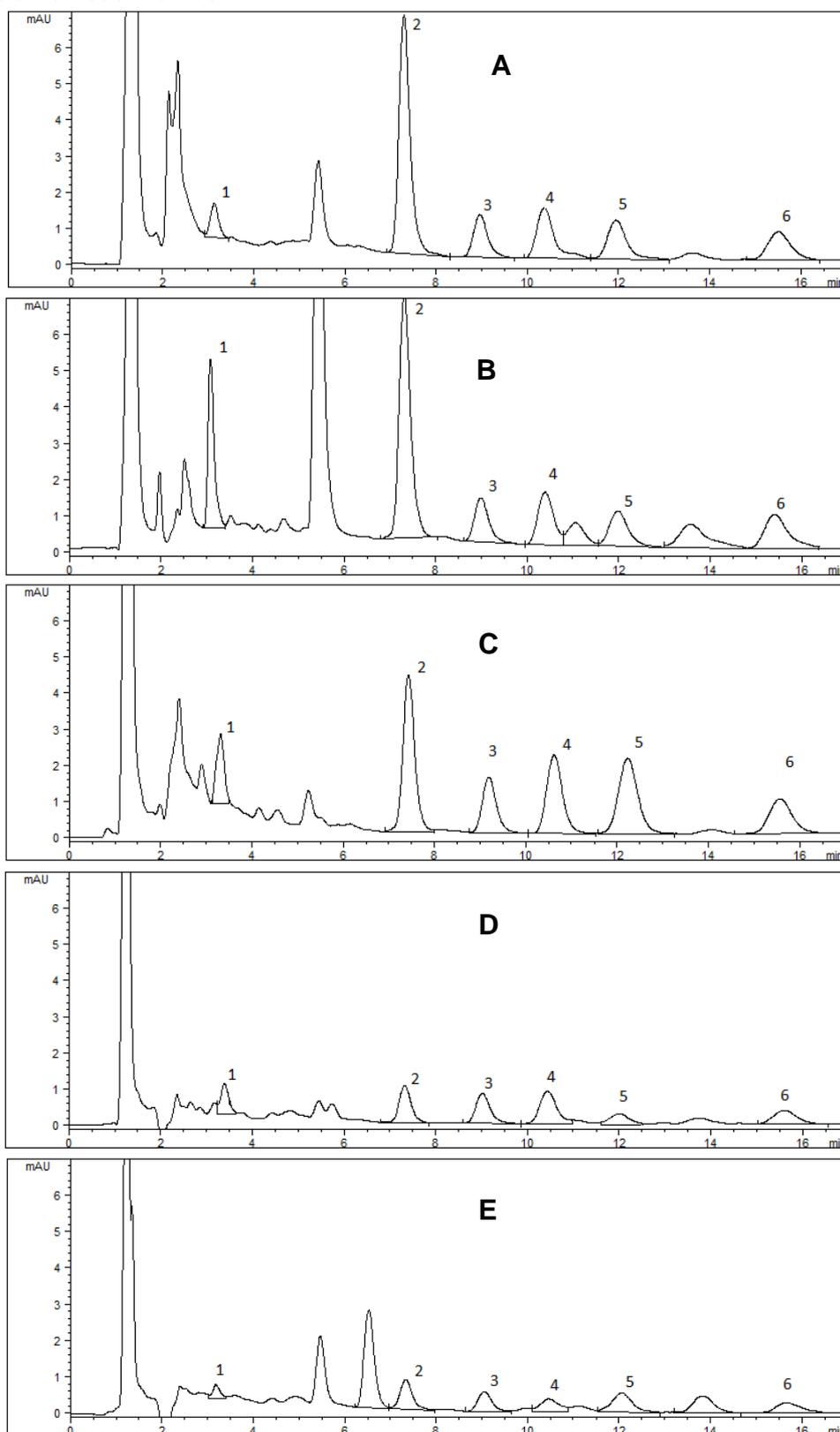
⁵⁶Quattrocchi O.; Abelaira S; Laba R, Introducción a la HPLC Aplicación y practica. 1992. p. 319-321

Anexo 14. Cromatograma del extracto blanco de matriz en la extracción fase sólida

Cromatograma del extracto blanco de matriz. Fase móvil ACN: agua (45:55) v/v, flujo de fase móvil 0.9 mL/ min, UV: 218 nm, columna C₁₈.



Anexo 15. Cromatogramas representativos obtenidos con diferentes solventes de extracción en sedimentos.



Cromatograma A: Metanol, B: Acetonitrilo, C: Acetona, D: Hexano, E: Acetato de etilo. Fase móvil ACN:agua (45:55) v/v; flujo de fase móvil 0.9 mL/ min, UV: 218 nm, columna C₁₈.

ANEXO 16. Prueba de ANOVA para la comparación de solventes de extracción en sedimentos

ANOVA para el propanil

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	11,650	2	5,825	1,298	0,340
Intra-grupos	26,925	6	4,488		
Total	38,575	8			

ANOVA para la atrazina

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	93,255	2	46,628	4,222	0,072
Intra-grupos	66,259	6	11,043		
Total	159,514	8			

ANOVA para la simazina

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	65,727	2	32,864	4,177	0,073
Intra-grupos	47,205	6	7,867		
Total	112,932	8			

ANOVA para el diuron

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	1016,073	2	508,037	90,468	0,000
Intra-grupos	33,694	6	5,616		
Total	1049,767	8			

Comparaciones múltiples HSD de Tukey para el diuron

(I) Solvente	(J) Solvente	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.
Acetona	Acetonitrilo	24,76894*	1,93488	0,000
	Metanol	19,30627*	1,93488	0,000
Acetonitrilo	Acetona	-24,76894*	1,93488	0,000
	Metanol	-5,46266	1,93488	0,068
Metanol	Acetona	-19,30627*	1,93488	0,000
	Acetonitrilo	5,46266	1,93488	0,068

*La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.

ANEXO16. (Continuación)

ANOVA para el metomil

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	124,344	2	62,172	5,604	0,042
Intra-grupos	66,561	6	11,093		
Total	190,904	8			

Comparaciones múltiples HSD de Tukey para el metomil

(I) Solvente	(J) Solvente	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.
Acetona	Acetonitrilo	-5,42260	2,71949	0,194
	Metanol	3,62262	2,71949	0,430
Acetonitrilo	Acetona	5,42260	2,71949	0,194
	Metanol	9,04521 [*]	2,71949	0,037
Metanol	Acetona	-3,62262	2,71949	0,430
	Acetonitrilo	-9,04521 [*]	2,71949	0,037

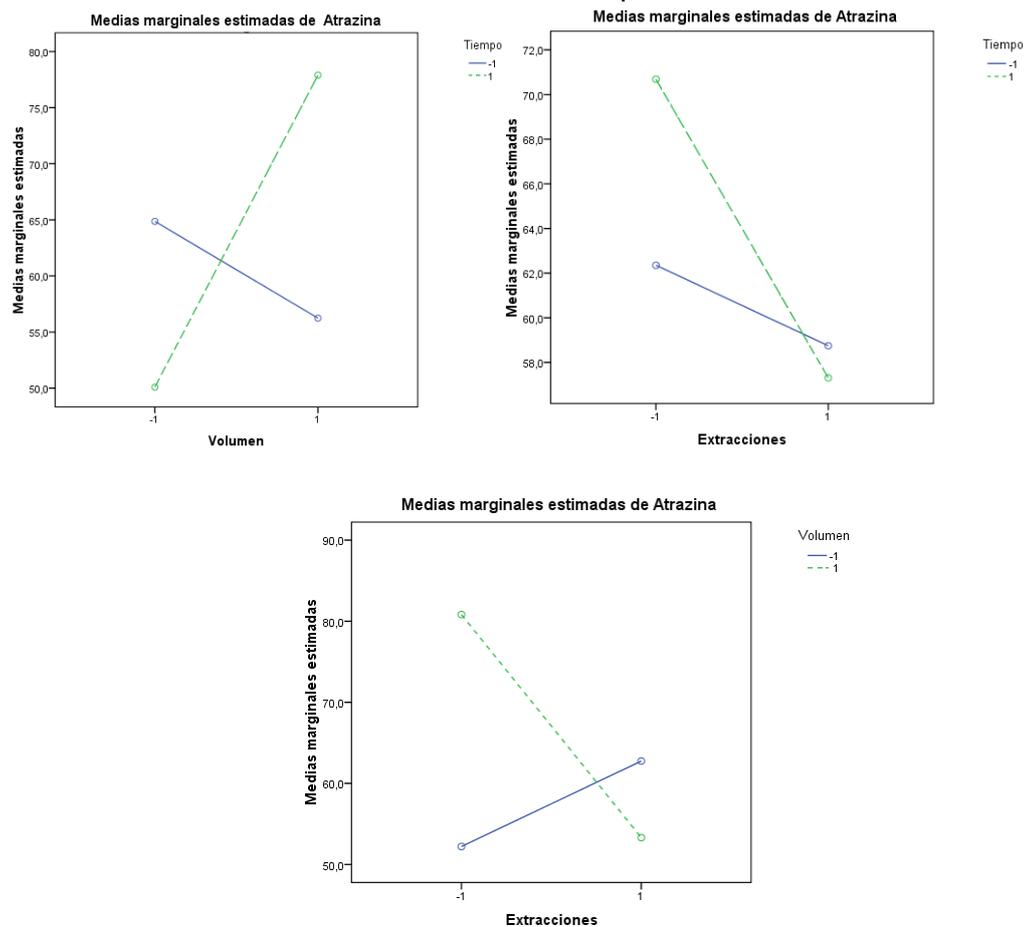
*. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.

ANEXO 17. Diseño de experimentos

Diseño de experimentos, ANOVA la atrazina.

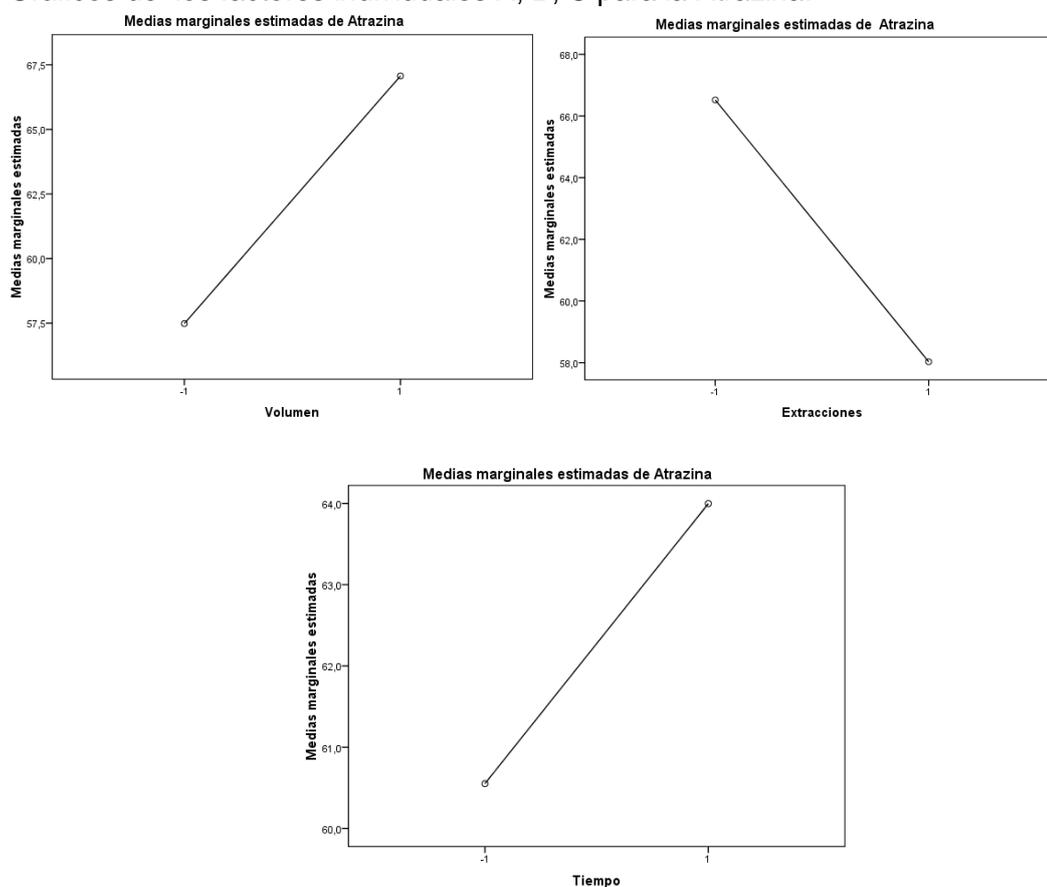
Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Tiempo	71,277	1	71,277	22,032	0,000
Volumen	551,425	1	551,425	170,451	0,000
Extracciones	432,311	1	432,311	133,632	0,000
Tiempo * Volumen	1989,625	1	1989,625	615,013	0,000
Tiempo * Extracciones	143,179	1	143,179	44,258	0,000
Volumen *	2171,704	1	2171,704	671,295	0,000
Extracciones					
Tiempo * Volumen *	88,397	1	88,397	27,324	0,000
Extracciones					
Error	51,762	16	3,235		
Total	98575,894	24			
Total corregida	5499,679	23			

Gráficos de interacción doble AxB, AxC, CxB para la atrazina.



ANEXO 17. (Continuación)

Gráficos de los factores individuales A, B, C para la Atrazina.



Diseño de experimentos, ANOVA para el propanil.

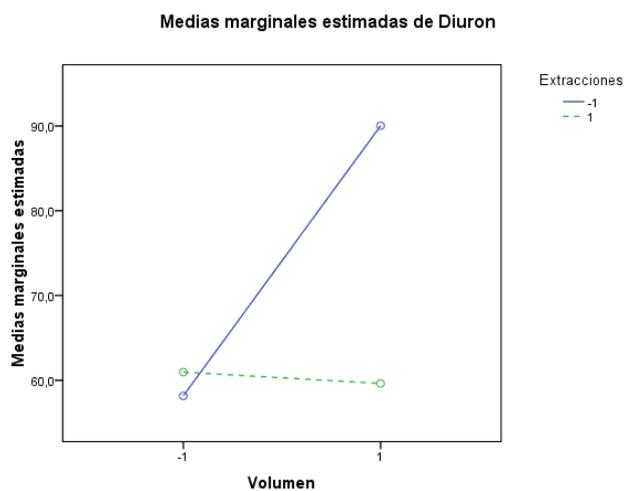
Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Tiempo	227,932	1	227,932	31,010	0,000
Volumen	44,777	1	44,777	6,092	0,025
Extracciones	646,840	1	646,840	88,002	0,000
Tiempo * Volumen	222,821	1	222,821	30,315	0,000
Tiempo * Extracciones	68,445	1	68,445	9,312	0,008
Volumen * Extracciones	2962,504	1	2962,504	403,046	0,000
Tiempo * Volumen * Extracciones	499,484	1	499,484	67,954	0,000
Error	117,605	16	7,350		
Total	113673,807	24			
Total corregida	4790,409	23			

ANEXO 17. (Continuación)

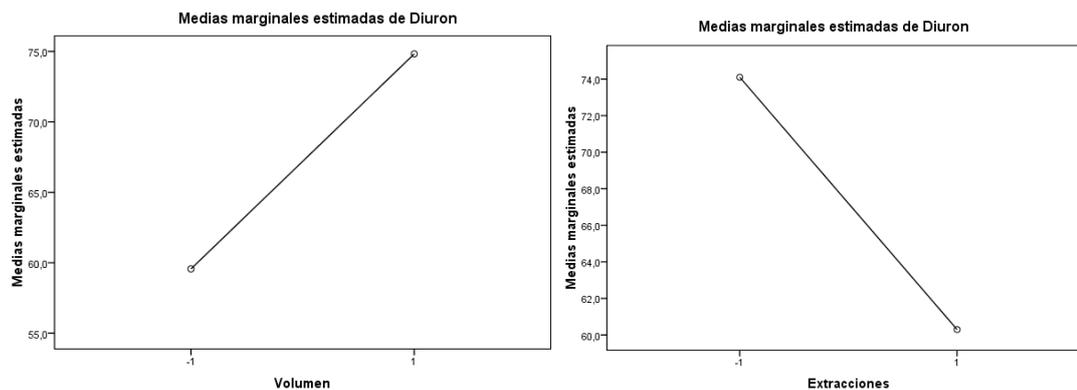
Diseño de experimentos, ANOVA para el diuron.

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Tiempo	335,553	1	335,553	41,902	0,000
Volumen	1397,511	1	1397,511	174,512	0,000
Extracciones	1142,916	1	1142,916	142,720	0,000
Tiempo * Volumen	31,556	1	31,556	3,941	0,065
Tiempo * Extracciones	20,535	1	20,535	2,564	0,129
Volumen * Extracciones	1654,024	1	1654,024	206,544	0,000
Tiempo * Volumen * Extracciones	65,274	1	65,274	8,151	0,011
Error	128,130	16	8,008		
Total	113150,283	24			
Total corregida	4775,499	23			

Gráficos de interacción doble BxC para el diuron.

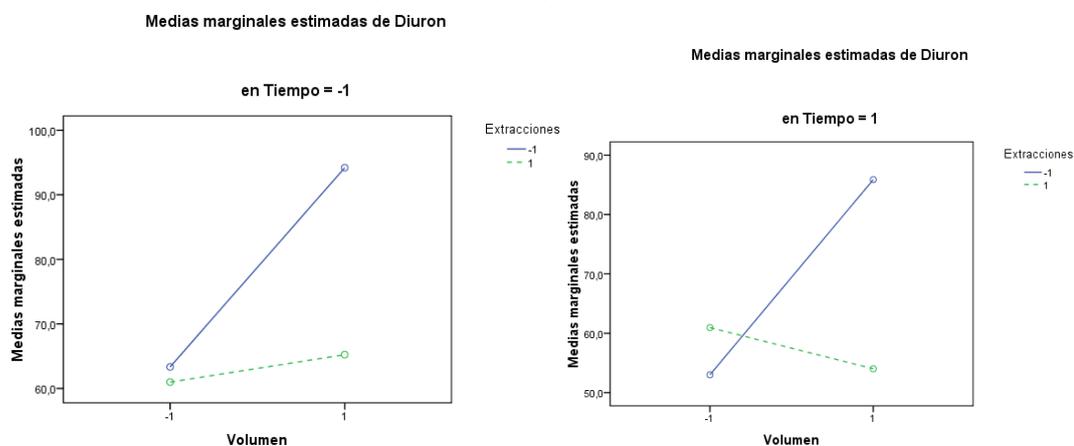


Gráficos de los factores individuales B y C para el diuron.



ANEXO 17. (Continuación)

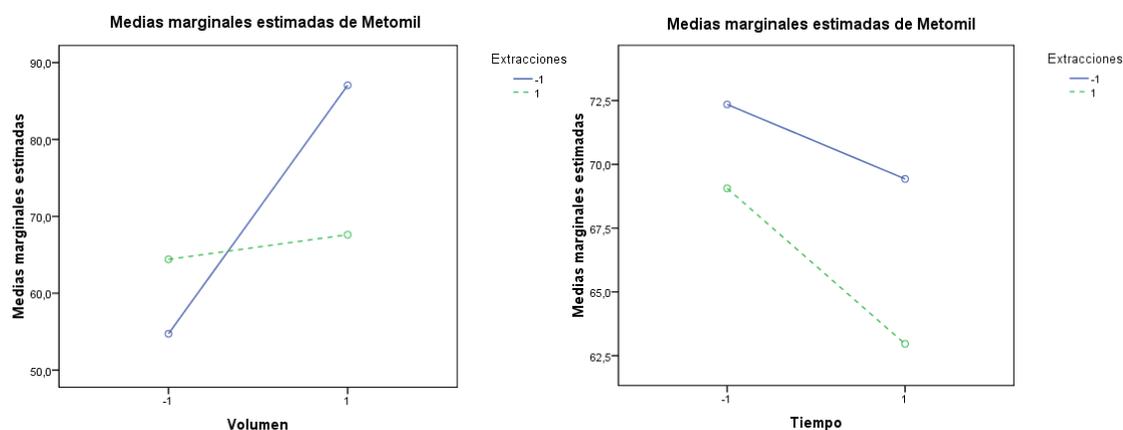
Gráficos de interacción triple Ax₂B₂C₂ para el diuron.



Diseño de experimentos, ANOVA para el metomil.

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Tiempo	121,905	1	121,905	10,211	0,006
Volumen	1894,104	1	1894,104	158,652	0,000
Extracciones	142,740	1	142,740	11,956	0,003
Tiempo * Volumen	1783,478	1	1783,478	149,386	0,000
Tiempo * Extracciones	15,216	1	15,216	1,275	0,276
Volumen * Extracciones	1272,107	1	1272,107	106,553	0,000
Tiempo * Volumen *	636,025	1	636,025	53,274	0,000
Extracciones					
Error	191,019	16	11,939		
Total	118507,625	24			
Total corregida	6056,596	23			

Gráficos de interacción doble B₂C₂, A₂C₂ para el Metomil.

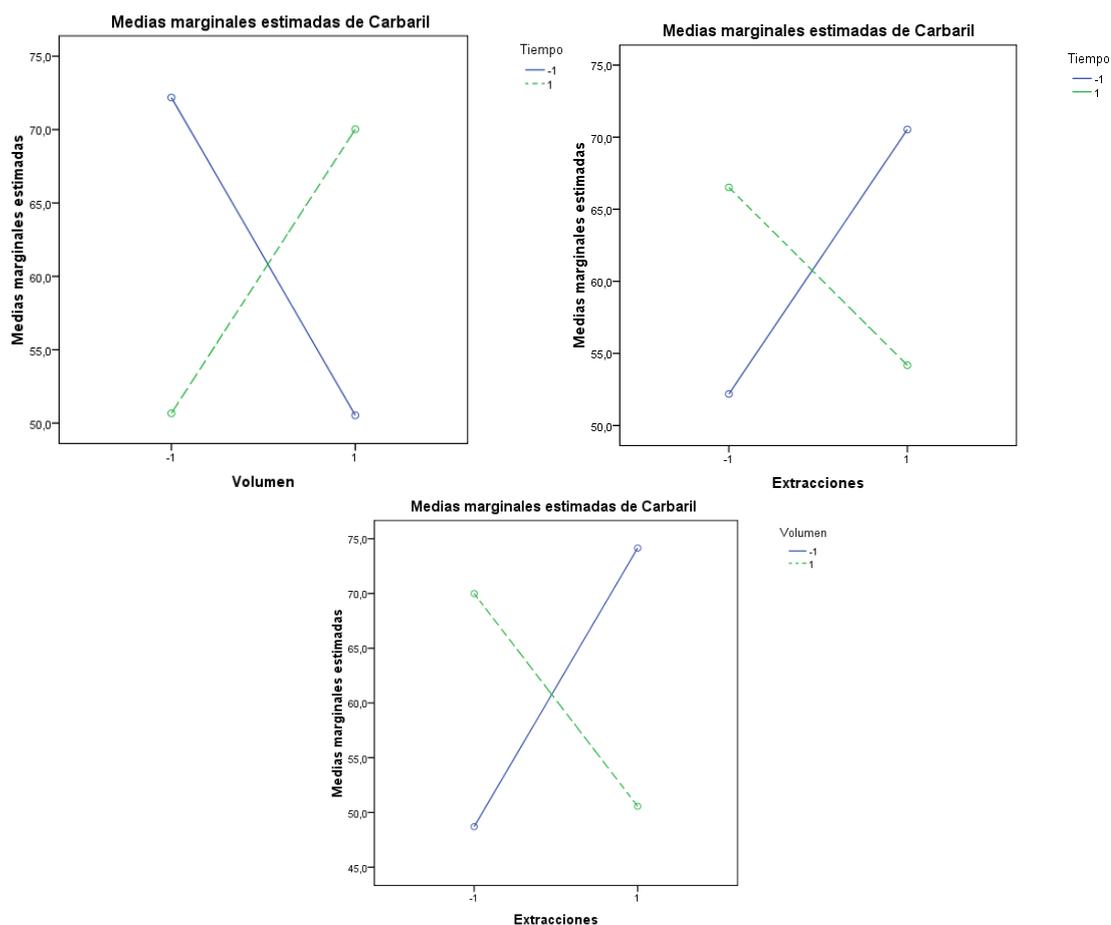


ANEXO 17. (Continuación)

Diseño de experimentos, ANOVA para el carbaril

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Tiempo	6,153	1	6,153	2,219	0,156
Volumen	7,926	1	7,926	2,858	0,110
Extracciones	54,216	1	54,216	19,549	0,000
Tiempo * Volumen	2522,976	1	2522,976	909,701	0,000
Tiempo * Extracciones	1412,385	1	1412,385	509,259	0,000
Volumen * Extracciones	3019,347	1	3019,347	1088,676	0,000
Tiempo * Volumen *	21,675	1	21,675	7,815	0,013
Extracciones					
Error	44,375	16	2,773		
Total	95963,155	24			
Total corregida	7089,053	23			

Gráficos de efectos de interacción doble, AxB, AxC, BxC para el carbaril.

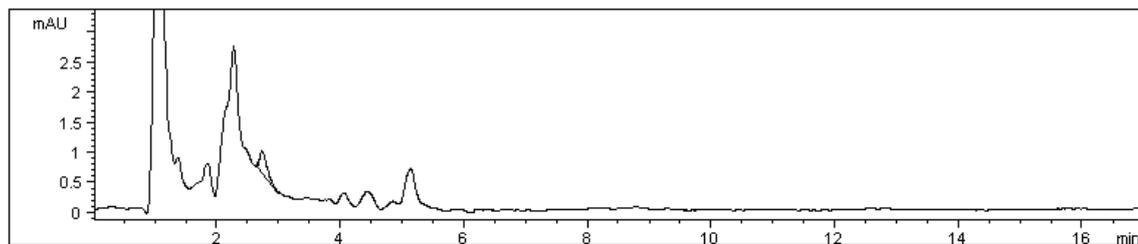


Anexo 18.Modificación en la fortificación de sedimentos.

En el estudio de la Influencia de la cantidad de muestra, la fortificación de sedimentos se modificó cuando la cantidad de sedimento se aumentó 1.0 a 5.0 g, por que 1 mL de solvente no es suficiente para que se lleve a cabo una agitación uniforme, por lo tanto, las muestras del sedimento fortificadas se prepararon adicionando 3 mL de mezcla estándar de plaguicidas en acetonitrilo a 5.0 g de sedimento seco tamizado (tamaño de grano inferior a <2 mm), se agitó magnéticamente durante una hora, el solvente de las muestras fue evaporado a la temperatura del laboratorio (20-23°C) durante 24 horas. Las muestras fortificadas se guardaron a 4°C hasta que se llevaron a cabo las extracciones por ultrasonido (periodo menor a 15 días).

Anexo 19. Cromatograma representativo del blanco utilizado en la extracción de sedimentos.

Cromatograma del extracto obtenido del sedimento utilizado como blanco. Fase móvil ACN: agua (45:55) v/v, flujo de fase móvil 0.9 mL/ min, UV: 218 nm, columna C₁₈.



Anexo 20. Análisis físicos y químicos de aguas y sedimentos del río Cauca

Métodos de análisis físicos y químicos para sedimentos

Determinación de Humedad.	Mediante el método gravimétrico
Determinación de Textura.	Método de Bouyoucos
Determinación de pH.	Método potenciométrico

Características de las muestras de sedimentos; muestreo I (Junio 2010).

Estación	Nombre	Tipo	pH	%MOT	Clasificación
S1	La Balsa	Fluvial	5,37	0,38	Franco-Limoso
S2	P. Hormiguero	Fluvial	5,21		Franco-Limoso
S3	Juanchito	Fluvial	4,71	0,58	Franco
S4	P. Isaacs	Fluvial	5,40	0,46	Franco-Limoso
S5	P. de la torre	Fluvial	6,18	0,51	Franco-Limoso
S6	Mediacanoa	Fluvial	6,86	0,34	Franco-Arenoso
S7	P. Guayabal	Fluvial	6,23	0,58	Franco-Limoso
S8	Anacaro	Fluvial	8,04	0,37	Franco-Limoso

Características de las muestras de sedimentos; muestreo II (Octubre 2010).

Estación	Nombre	Tipo	pH	%MOT	Clasificación
S1	La Balsa	Fluvial	5,51	0,29	Franco-Limoso
S2	Pte. Hormiguero	Fluvial	5,25	0,24	Franco-Limoso
S3	Juanchito	Fluvial	7,57	0,23	Franco-Limoso
S4	Pto. Isaacs	Fluvial	5,67	0,32	Franco-Limoso
S5	Paso de la Torre	Fluvial	6,38	0,21	Franco-Limoso
S6	Mediacanoa	Fluvial	7,14	0,17	Franco-Limoso
S7	Pte. Guayabal	Fluvial	6,12	0,27	Franco-Limoso
S8	Anacaro	Fluvial	6,32	0,19	Franco-Limoso

Características de las muestras de aguas

Sitio de muestreo	Ubicación	pH	
		muestreo I	muestreo II
S1	La Balsa	6,66	7,49
S2	Pte. Hormiguero	6,95	7,24
S3	Juanchito	6,85	7,12
S4	Pto. Isaacs	6,86	7,02
S5	Paso de la Torre	6,82	7,26
S6	Mediacanoa	6,85	7,25
S7	Pte. Guayabal	7,33	7,23
S8	Anacaro	6,76	7,13

Anexo 21. Resultados de los muestreos para aguas y sedimentos.

Resultados obtenidos en muestreo I (Junio 2010) para las muestras de sedimentos.

Estaciones	Carbaril	Simazina	Atrazina	Diuron	Propanil	Metomil
S1	nd	nd	< lc	nd	nd	nd
S2	nd	nd	nd	nd	nd	nd
S3	nd	nd	nd	nd	nd	nd
S4	nd	nd	nd	nd	nd	nd
S5	nd	nd	nd	nd	nd	nd
S6	nd	nd	<lc	nd	nd	nd
S7	nd	< lc	nd	nd	nd	nd

Concentración: ppm (reportado como mg/Kg de sedimento base seca); nd: no detectado;lc: Límite de cuantificación

Resultados obtenidos en muestreo II (Octubre 2010), para las muestras de sedimentos.

Estaciones	Carbaril	Simazina	Atrazina	Diuron	Propanil	Metomil
S1	nd	< lc	nd	nd	nd	nd
S2	nd	< lc	nd	0,074 ± 0,002	nd	nd
S3	nd	nd	nd	0,036 ± 0,003	nd	nd
S4	nd	nd	nd	0,078 ± 0,001	nd	nd
S5	< lc	0,093 ± 0,003	nd	0,115 ± 0,002	nd	nd
S6	nd	nd	nd	0,113 ± 0,003	nd	nd
S7	nd	nd	nd	nd	nd	nd

Concentración: ppm (reportado como mg/Kg de sedimento base seca); nd: no detectado; lc: Límite de cuantificación

Resultados obtenidos en muestreo I (Junio 2010), para las muestras de aguas.

Estaciones	Carbaril	Simazina	Atrazina	Diuron	Propanil
S1	nd	nd	0,0594 ± 0,0003	nd	nd
S2	nd	nd	nd	nd	nd
S3	0,0125 ± 0,0005	nd	nd	nd	nd
S4	nd	nd	nd	nd	nd
S5	nd	nd	nd	nd	nd
S6	nd	nd	0,2405±0,0006	nd	nd
S7	nd	0,0248 ± 0,0002	0,0258 ± 0,0002	nd	nd
S8	nd	nd	nd	nd	nd

nd:no detectado, Concentración: ppm (mg/L)

Anexo 21. (Continuación)

Resultados obtenidos en muestreo II (Octubre 2010), para las muestras de aguas.

Estaciones	Carbaril	Simazina	Atrazina	Diuron	Propanil
S1	nd	<lc	nd	nd	nd
S2	nd	0,079 ± 0,002	nd	nd	nd
S3	nd	0,056 ± 0,005	nd	nd	nd
S4	nd	nd	nd	0,044 ± 0,003	nd
S5	nd	0,052 ± 0,002	nd	nd	nd
S6	nd	<lc	0,026 ± 0,002	0,093 ± 0,004	nd
S7	nd	nd	0,029 ± 0,003	0,148 ± 0,002	nd
S8	nd	nd	nd	nd	nd

nd: no detectado; lc: Límite de cuantificación; Concentración: ppm (mg/L)