

**VALIDACIÓN E IMPLEMENTACIÓN DE UNA METODOLOGÍA PARA LA  
DETERMINACIÓN DEL PLAGUICIDA CARBOFURAN EN UN SUELO  
DEL DEPARTAMENTO DEL CAUCA DEDICADO A CULTIVOS  
HORTÍCOLAS.**

**YENNY ALEJANDRA VALENCIA LÓPEZ**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
POPAYAN  
2008**

**VALIDACIÓN E IMPLEMENTACIÓN DE UNA METODOLOGÍA PARA LA  
DETERMINACIÓN DEL PLAGUICIDA CARBOFURAN EN UN SUELO  
DEL DEPARTAMENTO DEL CAUCA DEDICADO A CULTIVOS  
HORTÍCOLAS.**

**YENNY ALEJANDRA VALENCIA LOPEZ**

Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de  
**QUÍMICA**

**Directora.**

**M. Sc. ELIANA M. VALENCIA CH.**

**Profesora del Departamento de Química**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
POPAYAN  
2008**

**Nota de Aceptación.**

---

---

---

Director

---

Eliana Mercedes Valencia Ch.  
M.Sc.

Jurado

---

Isabel Bravo Realpe.  
M. Sc.

Jurado

---

Fernando J. Hernández Blanco  
M. Sc.

**Fecha de sustentación: Popayán, 30 de Enero de 2008**

*“Siempre estas abriendo ventanas,  
mostrándome que por cualquier rincón entra el sol,  
y me dejas ver que también brilla para mí.*

*Me muestras las estrellas que no veo,  
cuando el cielo está cubierto,  
y el sol que brilla cuando está nublado.”*

*Te dedico Señor Dios todo lo que soy,  
porque gracias a Ti culmino esta etapa de mi vida  
con entusiasmo y alegría, con la esperanza, el anhelo y la ilusión  
de que tú me guiaras en cada uno de los días venideros.*

## **AGRADECIMIENTOS**

*A mi querida familia, por apoyarme siempre, por brindarme la posibilidad de estudiar y confiar en mí.*

*A Erwin por su amor incondicional, por su paciencia y consejos en esos momentos difíciles.*

*A la profesora Eliana Valencia, gracias por dirigir este trabajo con entusiasmo y compartir conmigo sus conocimientos.*

*A mis compañeros del Grupo de Agroquímica, especialmente a Sandra Potosi por brindarme su amistad y colaboración en todo momento.*

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

*Agradezco al Grupo de Investigación en Agroquímica y la Unidad de Análisis Industriales quienes me apoyaron en el desarrollo del presente trabajo.*

## TABLA DE CONTENIDO

	<b>pág</b>
<b>LISTA DE TABLAS.</b>	V
<b>LISTA DE FIGURAS.</b>	VII
<b>LISTA DE ANEXOS.</b>	VIII
<b>LISTA DE ABREVIATURAS.</b>	IX
<b>RESUMEN.</b>	XI
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.</b>	<b>3</b>
<b>3. OBJETIVOS.</b>	<b>5</b>
<b>3.1 OBJETIVO GENERAL</b>	<b>5</b>
<b>3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>	<b>5</b>
<b>4. FUNDAMENTO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE.</b>	<b>6</b>
<b>4.1 TIPOS DE PLAGUICIDAS.</b>	<b>6</b>
<b>4.2 ORIGEN DE LOS PLAGUICIDAS EN EL AMBIENTE.</b>	<b>7</b>
<b>4.3 DINAMICA DE LOS PLAGUICIDAS EN EL SUELO.</b>	<b>7</b>
4.3.1 Mecanismos de la dinámica del plaguicida en el suelo.	8
4.3.2 Procesos que intervienen en la dinámica de los plaguicidas en el suelo.	9
4.3.3 Persistencia de algunos plaguicidas.	10
<b>4.4 PLAGUICIDAS CARBAMATOS.</b>	<b>10</b>
4.4.1 Plaguicidas N-MCs.	11
4.4.2 Modo de acción de los N- MCs.	12
4.4.3 Carbofuran.	13
<b>4.5 MÉTODOS EMPLEADOS EN EL ANÁLISIS DE N- MCs.</b>	<b>17</b>
4.5.1 Técnicas de extracción y limpieza.	17
4.5.2 Técnicas de Determinación.	20
<b>4.6 NORMA TECNICA ISO/IEC 17025 Y BUENAS PRACTICAS DE LABORATORIO (BPL).</b>	<b>22</b>
4.6.1 Validación de métodos analíticos.	23

<b>5.</b>	<b>METODOLOGÍA</b>	26
5.1	EQUIPOS, MATERIALES, SOLVENTES, ESTÁNDARES, REACTIVOS Y SOLUCIONES.	26
	5.1.1 Equipos.	26
	5.1.2 Materiales.	26
	5.1.3 Solventes y reactivos.	27
	5.1.4 Estándar de Carbofuran.	28
	5.1.5 Soluciones patrón y soluciones de trabajo.	28
5.2	OBTENCIÓN Y ANÁLISIS DE LA MUESTRA DE SUELO.	29
	5.2.1 Ubicación geográfica de la zona de muestreo.	29
	5.2.2 Muestreo del suelo.	29
	5.2.3 Caracterización física y química del suelo.	30
5.3	METODOLOGÍA PARA LA DETERMINACIÓN DE CARBOFURAN. EN SUELOS.	30
	5.3.1 Definición de la metodología de base.	30
	5.3.2 Adecuación del sistema instrumental.	33
	5.3.3 Separación Cromatográfica.	33
	5.3.4 Adecuación de la metodología analítica.	33
	5.3.5 Recuperados analíticos.	33
5.4	VALIDACIÓN DEL SISTEMA INSTRUMENTAL.	33
	5.4.1 Especificidad – selectividad instrumental.	34
	5.4.2 Linealidad instrumental.	34
	5.4.3 Precisión instrumental.	34
	5.4.4 Límites críticos instrumentales.	35
5.5	EVALUACIÓN DEL EFECTO MATRIZ.	35
5.6	VALIDACIÓN DE LA METODOLOGÍA.	35
	5.6.1 Especificidad – selectividad.	35
	5.6.2 Linealidad.	36
	5.6.3 Precisión.	36
	5.6.4 Exactitud.	37
	5.6.5 Límite de detección y de cuantificación.	37
	5.6.6 Robustez.	37
5.5	ELABORACIÓN DEL PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDARIZADO (POE).	38

<b>6.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.</b>	39
6.1	CARACTERIZACIÓN FÍSICA Y QUÍMICA DEL SUELO.	39
6.2	DEFINICIÓN DE LA METODOLOGÍA BASE.	41
6.3	ADECUACIÓN DEL SISTEMA INSTRUMENTAL (CROMATÓGRAFO LÍQUIDO DE ALTA EFICIENCIA CON DETECTOR UV).	44
6.4	SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA.	45
	6.4.1 Parámetros Cromatográficos.	45
6.5	VALIDACIÓN DEL SISTEMA INSTRUMENTAL	46
	6.5.1 Especificidad – selectividad instrumental.	46
	6.5.2 Linealidad instrumental.	47
	6.5.3 Precisión instrumental.	50
	6.5.4 Límites críticos instrumentales.	51
6.6	EVALUACIÓN DEL EFECTO MATRIZ.	51
6.7	VALIDACIÓN DE LA METODOLOGÍA.	54
	6.7.1 Especificidad – selectividad.	54
	6.7.2 Linealidad.	55
	6.7.3 Precisión y exactitud.	56
	6.7.4 Límite de detección y de cuantificación.	59
	6.7.5 Robustez.	59
6.8	ELABORACIÓN DEL PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDARIZADO (POE).	63
<b>7.</b>	<b>CONCLUSIONES.</b>	64
<b>8.</b>	<b>RECOMENDACIONES.</b>	66
	<b>BIBLIOGRAFIA</b>	67
	<b>ANEXOS</b>	73



## LISTA DE TABLAS

	<b>Pág.</b>
<b>Tabla 1:</b> Plaguicidas Carbamatos.	12
<b>Tabla 2:</b> Propiedades físicas y químicas del Carbofuran	14
<b>Tabla 3:</b> Insectos combatidos con Carbofuran en algunos cultivos.	14
<b>Tabla 4:</b> Criterios de aceptación para la validación de métodos analíticos.	24
<b>Tabla 5:</b> Análisis físicos y químicos realizados a la muestra de suelo.	30
<b>Tabla 6:</b> Variables en el estudio de robustez para la determinación de Carbofuran en suelos.	37
<b>Tabla 7:</b> Resultados obtenidos de la caracterización física y química del suelo.	39
<b>Tabla 8:</b> Recuperados analíticos empleando en la limpieza cartuchos de aminopropil y C18.	41
<b>Tabla 9:</b> Porcentajes de recuperación obtenidos con ultrasonido y agitación mecánica.	42
<b>Tabla 10:</b> Porcentajes de Recuperación con Agitación Mecánica.	42
<b>Tabla 11:</b> Porcentajes de recuperación para el método 8318A (EPA) y la metodología propuesta.	44
<b>Tabla 12:</b> Concentración de Carbofuran por nivel de calibración.	45
<b>Tabla 13:</b> Parámetros cromatográficos en la determinación de Carbofuran.	45
<b>Tabla 14:</b> Tiempo de retención y factor de respuesta para el Carbofuran.	47
<b>Tabla 15:</b> Evaluación de la linealidad instrumental.	48
<b>Tabla 16:</b> Límites de confianza para la pendiente y el intercepto.	49
<b>Tabla 17:</b> Análisis de varianza ANOVA.	49
<b>Tabla 18:</b> Variación instrumental como repetibilidad por nivel de concentración.	50
<b>Tabla 19:</b> Variación instrumental como precisión intermedia por nivel de concentración.	50

	<b>Pág</b>
<b>Tabla 20:</b> Límite de Detección y de Cuantificación Instrumentales.	51
<b>Tabla 21:</b> Porcentaje de efecto matriz por nivel de concentración.	52
<b>Tabla 22:</b> Regresión lineal para evaluar efecto matriz.	53
<b>Tabla 23:</b> Tiempo de retención y factor de respuesta para Carbofuran en extracto blanco de matriz.	55
<b>Tabla 24:</b> Niveles de fortificación del suelo.	55
<b>Tabla 25:</b> Exactitud y precisión por nivel de concentración de Carbofuran en el ensayo de repetibilidad.	56
<b>Tabla 26:</b> Exactitud y precisión por nivel de concentración de Carbofuran en el ensayo de precisión intermedia.	57
<b>Tabla 27.</b> Precisión intermedia y exactitud para la metodología global.	58
<b>Tabla 28:</b> Comparación de los límites críticos instrumentales y de la metodología.	59
<b>Tabla 29:</b> Matriz del diseño experimental de Youden-Steiner para robustez.	61
<b>Tabla 30:</b> Variabilidad para cada factor en el ensayo de robustez.	62
<b>Tabla 31:</b> Efecto de cada factor sobre el porcentaje de recuperación del plaguicida.	62

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
<b>Figura 1:</b> Destino de los Plaguicidas.	8
<b>Figura 2:</b> Modelo de degradación de un plaguicida.	9
<b>Figura 3:</b> Estructura del Acido Carbámico.	10
<b>Figura 4:</b> Plaguicidas carbamatos.	11
<b>Figura 5:</b> Hidrólisis de acetilcolina.	12
<b>Figura 6:</b> Enlace entre el carbamato y la acetilcolinesterasa.	13
<b>Figura 7:</b> Estructura del Carbofuran.	13
<b>Figura 8:</b> Ruta de degradación de Carbofuran en suelos, aguas y sedimentos.	16
<b>Figura 9:</b> Descripción general de las Normas de Competencia.	22
<b>Figura 10:</b> Mapa político del Departamento del Cauca.	29
<b>Figura 11:</b> Proceso de extracción, limpieza y determinación de Carbofuran en suelos.	31
<b>Figura 12:</b> Cromatogramas (a) Extracto blanco de suelo, (b) extracto blanco de suelo fortificado al nivel dos y (c) Extracto obtenido al fortificar el suelo blanco y someterlo al proceso de extracción, limpieza y determinación	43
<b>Figura 13:</b> Cromatograma de una solución de Carbofuran al nivel dos.	45
<b>Figura 14:</b> Cromatograma del Blanco Instrumental (metanol) (a) variación de longitud de onda a 250 nm y (b) longitud de onda a 205 nm.	46
<b>Figura 15:</b> Cromatograma de una solución estándar de Carbofuran al nivel dos.	47
<b>Figura 16:</b> Gráfica correspondiente a la evaluación de linealidad para Carbofuran.	48
<b>Figura 17:</b> Curva en extracto y solvente para la evaluación del efecto matriz.	52
<b>Figura 18:</b> Cromatograma de extracto blanco de matriz.	54
<b>Figura 19:</b> Cromatograma de una solución de Carbofuran en extracto blanco de matriz al nivel dos de calibración.	55

## LISTA DE ANEXOS

		<b>Pág.</b>
<b>ANEXO 1.</b>	Metodología para la caracterización física y química del suelo.	73
<b>ANEXO 2.</b>	Calculo de la concentración de Carbofuran aplicada por los agricultores de la región.	76
<b>ANEXO 3.</b>	Conversión de unidades de concentración.	77
<b>ANEXO 4.</b>	Parámetros cromatográficos.	77
<b>ANEXO 5.</b>	Prueba de normalidad bajo el método de Shapiro - Wilk.	78
<b>ANEXO 6.</b>	Evaluación de la linealidad.	79
<b>ANEXO 7.</b>	Repetibilidad y precisión intermedia (% C.V.).	84
<b>ANEXO 8.</b>	Límites críticos instrumentales.	84
<b>ANEXO 9.</b>	Evaluación del efecto matriz.	85
<b>ANEXO 10.</b>	Cálculo de la exactitud.	87
<b>ANEXO 11.</b>	Prueba de homogeneidad de varianzas (TEST DE COCHRAN).	88
<b>ANEXO 12.</b>	LOD y LOQ de la metodología	90
<b>ANEXO 13</b>	POE: Análisis del plaguicida Carbofuran en suelos	91

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>N-MCs</b>	N-metilcarbato.
<b>EPA</b>	Agencia de Protección Ambiental.
<b>FAO</b>	Organización para la Alimentación y la Agricultura.
<b>AOAC</b>	Association of Official Analytical Chemists.
<b>IUPAC</b>	Unión Internacional de Química Pura y Aplicada.
<b>BPL</b>	Buenas Prácticas de Laboratorio.
<b>BPA</b>	Buenas Prácticas Agrícolas.
<b>POE</b>	Procedimiento Operativo Estandarizado.
<b>CG</b>	Cromatografía de Gases.
<b>CG-NPD</b>	Cromatografía de gases con detector nitrógeno – fósforo.
<b>NPD</b>	Detector de Nitrógeno – fósforo.
<b>FID</b>	Detector de Ionización de Llama.
<b>UV</b>	Detector de Ultravioleta.
<b>FS</b>	Detector de Fluorescencia.
<b>RP</b>	Modo fase reversa.
<b>NP</b>	Modo fase normal.
<b>HPLC</b>	Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia.
<b>HPLC-UV</b>	Cromatografía líquida con detección ultravioleta.
<b>HPLC-FS</b>	Cromatografía líquida con detección de fluorescencia.
<b>HPLC-RP</b>	Cromatografía líquida en fase reversa
<b>OPA</b>	o-ftalaldehido.
<b>LC-LC</b>	Cromatografía líquida multidimensional.
<b>SPE</b>	Extracción en fase sólida.
<b>C18</b>	Octadecilsilano.
<b>MASE</b>	Extracción soxhlet asistida con microondas.
<b>MAE</b>	Extracción asistida con microondas.
<b>PLL</b>	Partición líquido – líquido.
<b>CC</b>	Cromatografía en columna.
<b>MDSP</b>	Dispersión de la matriz en fase sólida.
<b>GPC</b>	Cromatografía de Permeación por geles.
<b>SFE</b>	Extracción con Fluidos Supercríticos.
<b>BCF</b>	Factor de bioacumulación.
<b>DL<sub>50</sub></b>	Dosis Letal media

<b>k<sub>ow</sub></b>	Coeficiente de partición octanol / agua.
<b>k<sub>d</sub></b>	Coeficiente de adsorción.
<b>P<sub>vp</sub></b>	Presión de vapor.
<b>H´</b>	Constante de Henry.
<b>S</b>	Solubilidad.
<b>t<sub>1/2</sub></b>	Tiempo de vida media.
<b>MO</b>	Materia orgánica.
<b>CIC</b>	Capacidad de intercambio catiónico.
<b>C/N</b>	Relación carbono / nitrógeno.
<b>t<sub>r</sub></b>	Tiempo de retención del analito.
<b>k´</b>	Factor de capacidad.
<b>F<sub>r</sub></b>	Factor de respuesta.
<b>N</b>	Eficiencia.
<b>LOD</b>	Límite de detección.
<b>LOQ</b>	Límite de cuantificación.
<b>r</b>	Coeficiente de correlación.
<b>b</b>	Pendiente.
<b>a</b>	Intercepto.
<b>s<sub>a</sub></b>	Desviación estándar para el intercepto.
<b>s<sub>b</sub></b>	Desviación estándar para la pendiente.
<b>t<sub>a</sub></b>	Estadístico t calculado para el intercepto.
<b>t<sub>b</sub></b>	Estadístico t calculado para la pendiente.
<b>t<sub>r</sub></b>	Estadístico t calculado para el coeficiente de correlación.
<b>t<sub>tab</sub></b>	Estadístico t tabulado a un nivel de confianza del 95 % y n-2 grados de libertad.
<b>ANOVA</b>	Análisis de Varianza
<b>% C.V</b>	Porcentaje de coeficiente de variación.
<b>% R</b>	Porcentaje de recuperación.
<b>% R<sub>prom</sub></b>	Porcentaje de recuperación promedio.
<b>C.V.<sub>tip</sub></b>	Coeficiente de variación típico.
<b>s<sup>2</sup></b>	Varianza.
<b>s</b>	Desviación Estándar.

## RESUMEN

Los efectos adversos de sustancias como los N-MCs sobre el hombre, el ecosistema y los diferentes organismos que en él habitan hacen importante el desarrollo de metodologías analíticas que permitan su determinación y cuantificación.

En este trabajo se validó una metodología analítica que permite cuantificar residuos de Carbofuran en muestras de suelo. La extracción del plaguicida desde la matriz se realizó empleando acetato de etilo y agitación mecánica; los extractos obtenidos se sometieron al proceso de limpieza a través de extracción en fase sólida (SPE) utilizando cartuchos C18, finalmente la determinación y cuantificación del Carbofuran se llevó a cabo mediante cromatografía líquida de alta eficiencia con detección ultravioleta (HPLC-UV) a una longitud de onda de 205 nm.

La metodología validada es específica y selectiva para el Carbofuran; lineal en el rango desde 0.47 hasta 2.36 mg/kg; precisa con un coeficiente de variación típico ( $C.V_{tip}$ ) de 10.78 %; exacta brindando un porcentaje de recuperación para la metodología global (% R) equivalente a 98.25 % y suficientemente sensible con límites de detección y cuantificación equivalentes a 0.045 y 0.149 mg/kg, respectivamente. La metodología validada es robusta ya que es estable frente a cambios susceptibles de producirse durante su utilización en análisis de rutina.

## 1. INTRODUCCION

El incremento a nivel mundial en el uso de plaguicidas durante las últimas décadas ha dejado como consecuencia la presencia de residuos de dichas sustancias, no solamente en los cultivos en los que son aplicados, sino también en los suelos. Plaguicidas como los N-MCs, entre los que está el Carbofuran, son ampliamente utilizados en nuestro País y en nuestro Departamento para el control de diferentes plagas como pulguilla, gusanos de alambre, gorgojo, gusano blanco, pulgones, mosca blanca, entre otros, en diversas variedades de cultivos (cafeto, caña de azúcar, cereales, florales, frutas, hortalizas, tubérculos)<sup>1</sup>.

Teniendo en cuenta los efectos indeseados que pueden ocasionar estas sustancias y considerando que su aplicación es hasta el momento necesaria para el control de las diferentes plagas, se hace imperativa la evaluación de los residuos de plaguicidas en suelos.

Algunos investigadores han aplicado diferentes técnicas analíticas como la espectrofotometría UV y la cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), acopladas a técnicas de extracción, como la extracción con fluidos supercríticos (SFE), la partición líquido – líquido (PLL), la extracción soxhlet asistida con microondas (MASE), entre otras, y técnicas de limpieza, como la cromatografía en columna (CC), la extracción en fase sólida (SPE) y la cromatografía de permeación en geles (GPC), que en conjunto proporcionan una metodología eficiente para la evaluación de residuos de plaguicidas en diferentes matrices entre las cuales se incluyen alimentos, suelos y aguas<sup>2-17</sup>.

A través de esta investigación el grupo de agroquímica de la Universidad del Cauca pretende brindar una herramienta que permita evaluar residuos de plaguicidas como el Carbofuran en suelos, con el fin de advertir posibles efectos indeseados sobre el hombre, los ecosistemas y los individuos que habitan en éste. Además, los resultados obtenidos en este trabajo se emplearán en un futuro, como punto de partida para el desarrollo de metodologías de análisis de plaguicidas multiresiduo; procedimientos que en conjunto pueden ofrecer la posibilidad de llevar a cabo un seguimiento de plaguicidas en los diferentes compartimentos ambientales así como en alimentos.



En la búsqueda de garantizar la calidad e integridad de los datos obtenidos por el laboratorio, y teniendo en cuenta las recomendaciones especificadas en la norma técnica ISO/IEC 17025 y las buenas practicas de laboratorio (BPL)<sup>18-20</sup>, la metodología propuesta se sometió al proceso de validación evaluando diferentes parámetros de desempeño del método analítico.

## 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La actividad agropecuaria ha experimentado en las últimas décadas un incremento de las áreas plantadas tanto en productos de consumo humano, como en productos forrajeros y forestales. Esta situación ha ocasionado el aumento en la liberación de sustancias químicas, ya sean naturales o sintéticas, principalmente en los procesos de producción intensivos<sup>21</sup>. Al liberar estas sustancias en el medio ambiente, ellas se pueden distribuir ampliamente a través de los diferentes compartimentos ambientales (agua, suelo y aire), afectando los diversos ecosistemas.

En el suelo, los plaguicidas interaccionan tanto con la fase sólida como con la solución del mismo. En la fase sólida, los plaguicidas pueden ser retenidos mediante diferentes tipos de interacciones, sin embargo, esta retención puede ser reversible, con lo cual dichas sustancias consiguen difundirse hacia la solución del suelo, y transferirse fácilmente a las aguas subterráneas por procesos de lixiviación, o hacia aguas superficiales por escorrentía<sup>22</sup>. Por otra parte, la falta de selectividad en su acción sobre el patógeno afecta los equilibrios naturales y elimina algunos microorganismos benéficos para el suelo, lo cual puede generar un impacto ambiental indeseado. Estos microorganismos desempeñan un papel muy importante en el mantenimiento de las propiedades físicas y químicas de este compartimento ambiental, las cuales a su vez determinan la fertilidad del mismo. Los microorganismos son los encargados de llevar a cabo los procesos de transformación de la materia orgánica (MO), a partir de la cual son liberados los nutrientes esenciales para el crecimiento de las plantas y sintetizadas sustancias imprescindibles para mantener la bioestructura del mismo. Cuando la MO presente en el suelo no experimenta un adecuado proceso de transformación genera problemas en su estructura (erosión), falta de nutrientes para las plantas, acidez, entre otros, que finalmente en conjunto producen una continua pérdida en la fertilidad<sup>23-26</sup>.

Entre otras especies afectadas se pueden mencionar las abejas, aves, peces y otros organismos, que de forma directa o indirecta pueden tener contacto con este tipo de sustancias.

La aplicación excesiva e inadecuada de plaguicidas implica igualmente un alto riesgo para las personas directamente expuestas quienes no siempre siguen unas Buenas Prácticas Agrícolas (BPA) y no están debidamente capacitadas en el manejo de estas sustancias exponiendo su salud.

Por otra parte, cantidades considerables de plaguicida pueden ser ingeridas por los seres humanos a través de los alimentos, lo que implica un alto riesgo de intoxicación. Algunos investigadores consideran este hecho como la causa de muchas enfermedades entre las que se incluyen mutaciones genéticas y enfermedades cancerígenas<sup>1,27</sup>. Estos efectos indeseados adquieren una mayor importancia al considerar que la aplicación de plaguicidas como el Carbofuran, se realiza muchas veces de forma continua, indiscriminada y en dosis inadecuadas agravando aun más el problema.

En consideración a estas situaciones, importantes organizaciones a nivel mundial como la FAO han reglamentado el uso de plaguicidas con el fin de disminuir el alto riesgo que implica su utilización tanto para el hombre como para los diferentes ecosistemas.

En el Departamento del Cauca se emplean ampliamente plaguicidas carbamatos como el Carbofuran para controlar plagas en diferentes cultivos principalmente tuberculos, frutas y hortalizas; sin embargo, en nuestro departamento no se cuenta con laboratorios especializados en análisis de residuos de plaguicidas que permitan establecer la posible contaminación por estas sustancias en suelos, aguas y alimentos, y de esta forma evaluar el impacto potencial sobre organismos no objetivo. Por ello, en el laboratorio de agroquímica de la Universidad del Cauca se hace necesaria la implementación de metodologías basadas en la norma técnica ISO/IEC 17025 y las BPL que permitan determinar residuos de plaguicidas.

Por los motivos expuestos anteriormente, en este trabajo se validó e implementó una metodología que permite la determinación y cuantificación de residuos de Carbofuran en suelos del Departamento del Cauca dedicados a cultivos hortícolas.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. OBJETIVO GENERAL**

Validar e implementar una metodología analítica que permita la determinación y cuantificación de Carbofuran en suelos, mediante la utilización de cromatografía líquida de alta eficiencia con detección ultravioleta (HPLC-UV).

#### **3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Realizar la Caracterización física y química de un suelo del Departamento del Cauca, Municipio de Cajibío, Vereda la Aurelia, dedicado a cultivos hortícolas.

Desarrollar ensayos preliminares para establecer el método de extracción, limpieza y cuantificación de Carbofuran en suelos.

Validar una metodología para la determinación de Carbofuran en un suelo de cultivos hortícolas del Departamento del Cauca.

Elaborar un procedimiento operativo estandarizado (POE) para el análisis de residuos del plaguicida Carbofuran en suelos.

## 4. FUNDAMENTO TEORICO Y ESTADO DEL ARTE

A finales del siglo XIX, ante las dificultades encontradas por el hombre en dominar las múltiples formas en que las plagas atacaban los cultivos, fue necesario recurrir a los medios químicos para su control. Desde el punto de vista de prevención y control, el empleo de los plaguicidas permitió de forma relativamente rápida y efectiva eliminar estos problemas, sin embargo, esta eficiencia se vio ligada a una serie de efectos desfavorables como las afecciones sobre la fauna beneficiosa, la contaminación ambiental y el desarrollo acelerado de resistencia de los insectos a los plaguicidas<sup>21</sup>.

Los plaguicidas son sustancias que permiten eliminar, controlar y manejar plagas que causan efectos no deseados sobre cultivos agrícolas y forestales, lo que presupone una elevada toxicidad al menos para dichos organismos<sup>21</sup>. Evidentemente, la actividad del plaguicida sobre la especie objetivo no es considerado un problema, ya que en esta se basa su eficacia y la razón de su utilización. Los problemas se derivan de la falta de selectividad, ya que en la liberación de estas sustancias la toxicidad se extiende a otras especies no objetivo. Este posible efecto no intencionado sobre otros organismos, obliga a realizar evaluaciones previas que permitan minimizar los impactos sobre los ecosistemas.

Considerando que las mejores soluciones son las preventivas, la Normativa de Autorización para Plaguicidas de Uso Agrícola, incluye en sus exigencias información concerniente a efectos ecotoxicológicos sobre algunas especies que pueden ser afectadas por el plaguicida en un escenario de aplicación de acuerdo con las BPA<sup>28,29</sup>.

### 4.1 TIPOS DE PLAGUICIDAS.

Existen distintos tipos de plaguicidas y se clasifican de acuerdo con su modo de acción en insecticidas, herbicidas, fungicidas, nematocidas, acaricidas, molusquicidas y rodenticidas. Los *insecticidas* se usan para exterminar insectos perjudiciales para la agricultura e igualmente aquellos que son nocivos para el hombre o los animales domésticos. En la actualidad existen varios centenares de insecticidas, dentro de los que se destacan tres tipos: insecticidas inorgánicos y

orgánicos; en esta última categoría se encuentran los N-MCs, extensamente usados para combatir insectos (pulgones, gorgojo, gusanos) en diversos tipos de cultivos. Los *herbicidas*, atacan e inhiben el crecimiento de arvenses. Los *fungicidas*, son plaguicidas que se usan para combatir el desarrollo de los hongos (fitoparásitos). Los *nematicidas*, combaten nematodos, una de las plagas que más ataca a los cultivos agrícolas. Se estima que provocan pérdidas de alrededor del 10 % del rendimiento de cultivos de importancia económica, equivalentes a 80 mil millones de dólares anuales en todo el mundo. Los *acaricidas*, son especialmente efectivos en el combate de ácaros y garrapatas<sup>30</sup>: Los *molusquicidas*, son plaguicidas utilizados para controlar los moluscos como por ejemplo los caracoles. Los *rodenticidas* son utilizados para combatir y exterminar los roedores<sup>31</sup>.

#### **4.2 ORIGEN DE LOS PLAGUICIDAS EN EL AMBIENTE.**

El principal origen de los plaguicidas en el ambiente es consecuencia de las aplicaciones que se realizan a los cultivos agrícolas y forestales mediante distintos métodos de aplicación terrestres y aéreos. De acuerdo al método de aplicación, estos pueden depositarse en los diferentes compartimentos ambientales, dependiendo de varios factores, entre los cuales están las propiedades físicas, químicas y biológicas del compartimento en cuestión, las propiedades físicas y químicas del plaguicida, la dosis del plaguicida aplicado, la naturaleza de la formulación, las características de la aplicación (tamaño de la gota), la naturaleza y morfología de la superficie vegetal, y las condiciones climáticas.

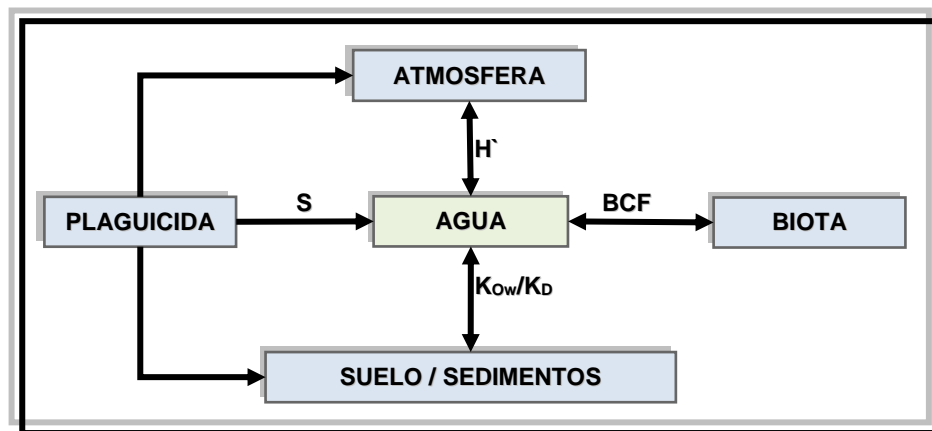
Por otra parte existe también otro fenómeno denominado *deriva de pulverización*, el cual consiste en el movimiento de las gotas del plaguicida hacia un objetivo distinto al de la aplicación, variables como el tamaño de las gotas, el viento y la temperatura afectan la deriva<sup>32</sup>.

#### **4.3 DINÁMICA DE LOS PLAGUICIDAS EN EL SUELO.**

Cuando un plaguicida es liberado en el ambiente, este llega a ser distribuido en los diferentes compartimentos (agua, aire, suelo y biota). El comportamiento, los efectos biológicos y la persistencia del plaguicida son el resultado de su interacción con los diferentes elementos del ambiente, tal como se observa en la figura 1<sup>33</sup>. Freed estableció que la ruta que tienen estas sustancias en el suelo está influenciada por un conjunto de propiedades fisicoquímicas y biológicas que

comprenden la solubilidad ( $S$ ) del plaguicida en el agua relacionada con la lixiviación, la humedad y la temperatura; la hidrólisis que determinará su persistencia en el ambiente o en los organismos (tiempo de vida media,  $t_{1/2}$ ); el coeficiente de adsorción ( $K_d$ ) que regula la tendencia del plaguicida a quedar retenido en el suelo; el coeficiente de reparto ( $K_{ow}$ ) el cual proporciona una estimación de la posible distribución del contaminante entre el suelo y el agua, donde la materia orgánica ejerce un papel fundamental; la Ionización relacionada con la interacción o grado de estabilidad o reactividad del plaguicida; la presión de vapor ( $P_{vp}$ ) relacionada con la Constante de Henry ( $H'$ ), la movilidad atmosférica y la velocidad de evaporación y el Factor de Bioacumulación (BCF) relacionado con  $K_{ow}$  y el contenido de lípidos de cada organismo. Además de estas propiedades, las prácticas de manejo del suelo son determinantes en el destino final del plaguicida en el suelo y en el agua<sup>33</sup>.

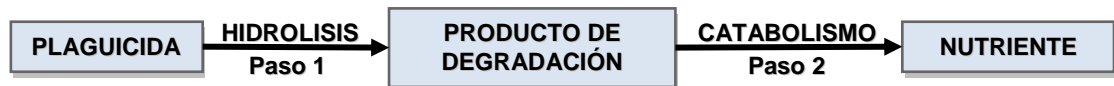
**Figura 1.** Destino de los Plaguicidas.



**4.3.1 Mecanismos de la dinámica del plaguicida en el suelo.** La dinámica que siguen los plaguicidas desde el momento de su aplicación hasta encontrar su sitio de acción, ha sido establecida en cuatro etapas con diferentes procesos que establecen la interacción de las sustancias químicas con los microorganismos. La primera etapa, implica la interacción del producto con el ambiente mientras llega a la superficie del organismo; donde pueden presentarse procesos de adsorción superficial, evaporación, descomposición y distribución del plaguicida. En la segunda etapa tiene lugar la interacción de la sustancia con la superficie del organismo; en la cual se presenta adsorción y expulsión. En la tercera etapa se

produce el paso del plaguicida a través de la superficie externa del organismo, en donde se puede presentar adsorción o interacción química, ésta última ha sido establecida con un modelo metabólico tal como se presenta en la figura 2, mediante el cual los microorganismos del suelo degradan el plaguicida. Aunque se ha planteado este modelo como una vía rápida de degradación, es posible considerar también que pueden tener lugar reacciones de oxidación – reducción, desalquilación y metabolismo conjugativo. Finalmente se genera la acción del producto dentro del organismo, donde tienen lugar diferentes procesos en los que diversos órganos y tejidos sufren lesiones a consecuencia del envenenamiento<sup>34</sup>.

**Figura 2.** Modelo de degradación de un plaguicida.



#### **4.3.2 Procesos que intervienen en la dinámica de los plaguicidas en el suelo.**

Los plaguicidas al entrar en contacto con el suelo se ven afectados por diversos factores de naturaleza física, química y biológica que comprenden lixiviación, evaporación, fotodescomposición, descomposición química y reparto. Estos factores pueden estar influenciados por la dosis unitaria, tipo de formulación, clase de aditivos, uniformidad, tiempo de aplicación y homogeneidad de la incorporación cuando está es de forma mecánica. Adicionalmente, actúan otras variables de naturaleza biótica (poblaciones microbianas propias de cada suelo) y abiótica (composición del suelo, la temperatura, el pH y la humedad).

Sin embargo, en el suelo, los plaguicidas están expuestos a la degradación biológica principalmente. Dicha degradación es generada por la acción de las enzimas secretadas por bacterias, hongos y actinomicetos; la actividad y el desarrollo de esta degradación está condicionada por la temperatura, la humedad, el pH, el oxígeno, la materia orgánica, y los elementos nutritivos, entre otros<sup>34</sup>.

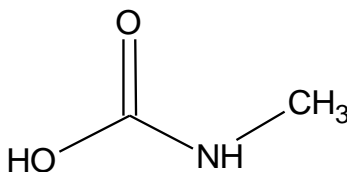


**4.3.3 Persistencia de algunos plaguicidas.** La persistencia de un plaguicida en el ambiente es una característica importante en la determinación del grado de exposición de los organismos a la sustancia de interés. El concepto de persistencia está a menudo relacionado con el tiempo de permanencia o residencia de un plaguicida con actividad en un compartimento particular; a mayor tiempo de residencia, mayor es la persistencia de la sustancia. Respecto a este concepto es importante considerar las tasas de remoción por procesos de degradación químicos, físicos y biológicos (como fotodegradación, oxidación, reducción, hidrólisis, isomerización y conjugación) los cuales se usan para determinar el  $t_{1/2}$  del plaguicida.

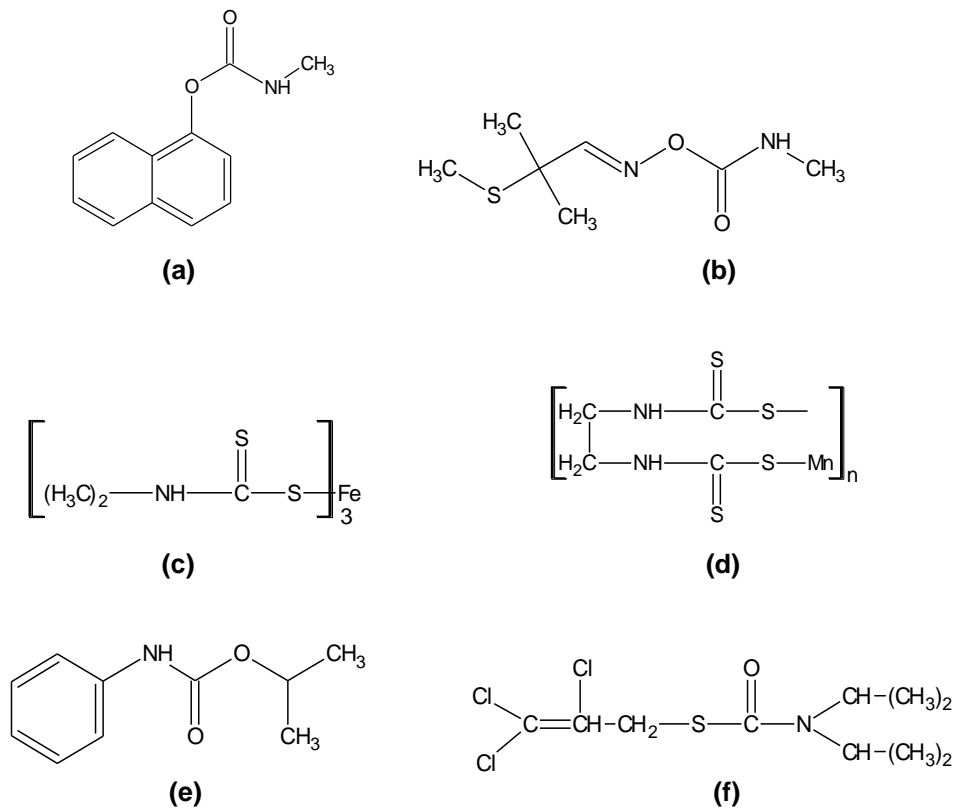
#### 4.4 PLAGUICIDAS CARBAMATOS.

Son derivados del ácido carbámico (figura 3) y presentan una alta actividad biológica. Por ello son utilizados para controlar plagas en diversos cultivos y dependiendo de su estructura química se clasifican en: *insecticidas*, los cuales tienen estructura oxima o aril N- metilcarbamatos, *fungicidas*, que poseen una estructura benzimidazol carbamato y otros presentan una estructura ditio o bisditiocarbamato y *herbicidas*, con estructuras N- fenilcarbamato o N- alquilcarbamato. Algunos ejemplos de cada uno de estos plaguicidas se ilustran en la figura 4<sup>35</sup>.

**Figura 3.** Estructura del Acido Carbámico .



**Figura 4. Plaguicidas Carbamatos.**



Insecticidas: (a) Carbaril y (b) Aldicarb; Fungicidas: (c) Ferbam y (d) Maneb;  
Herbicidas: (e) Propam y (f) Trialate.

**4.4.1 Plaguicidas N-MCs.** Los plaguicidas N-MCs comprenden una importante clase de plaguicidas destacados por su relativa corta persistencia en el ambiente y por ser de amplio espectro, generalmente actúan como insecticidas, acaricidas, nematocidas o molusquicidas. Desde su introducción en 1950 estos han sido empleados mundialmente en una gran cantidad de cultivos, algunos ejemplos se presentan en la tabla 1<sup>36</sup>.

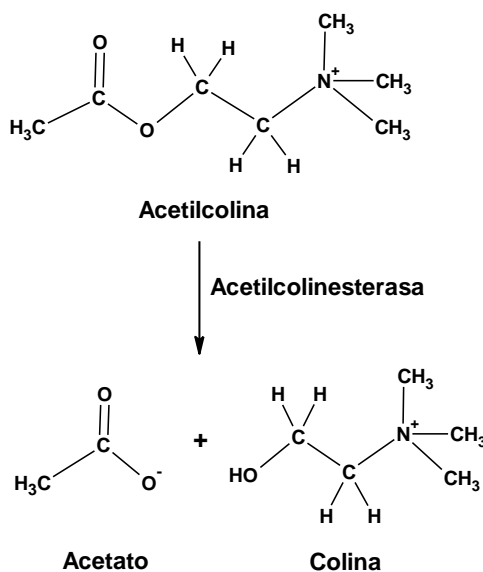
**Tabla 1.** Plaguicidas carbamatos.

Nombre común	Nombre comercial	Clase
Aldicarb	Temik	I, N, A
Aminocarb	Matacil	I, A, M
BPMC, fenobucarb	Bassa, Baycarb, Osbac	I
Carbaryl	Kevin	I
Carbofuran	Furadan, Curaterr	I, N, A
Dioxacarb	Farid, Elocron	I
Ethidimurum	Estilan	H
Formetanate	Carzol, Dicarzol	A, I
Isoprocab, MIPC	Mipsin, Etofolan	I
Methomyl	Lannate	I
Oxamyl	Vydate	I, N, A
XMC	Macbal	I

I: Insecticida, N: Nematicida, A: Acaricida, H: Herbicida.

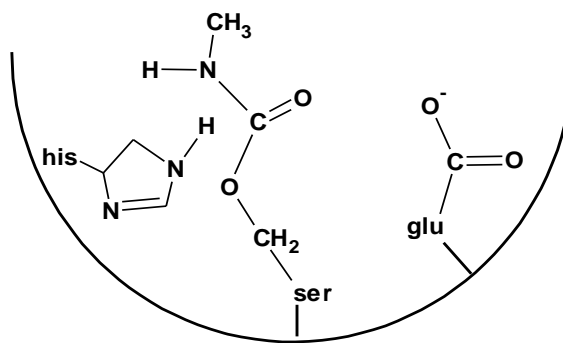
**4.4.2 Modo de acción de los N-MCs.** Los carbamatos, al igual que los compuestos organofosforados, deben sus propiedades insecticidas a la inhibición de la enzima acetil colinesterasa, la cual cataliza la hidrólisis de la acetilcolina (neurotransmisor ampliamente distribuido en el sistema nervioso central) a colina y acetato, la inactivación de esta enzima ocasiona la acumulación de este neurotransmisor previniendo la transmisión nerviosa efectiva a través de la sinapsis y generando síntomas como el incremento en la segregación de saliva, la disminución de la frecuencia cardiaca, convulsiones y hasta a la muerte (figura 5)<sup>21,27,37</sup>.

**Figura 5.** Hidrólisis de Acetilcolina.



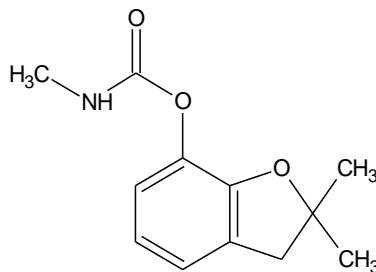
La enzima se envenena por carbamoylación del grupo hidroxilo primario de un residuo de serina en el centro activo de la enzima acetilcolinesterasa tal como se aprecia en la figura 6<sup>21,27,37</sup>.

**Figura 6.** Enlace entre el carbamato y la acetilcolinesterasa.



**4.4.3 Carbofuran.** Su nombre IUPAC es 2,3-dihidro-2,2-dimetilbenzofuran-7-il-metilcarbamato, su estructura química se ilustra en la figura 7, conocido también como Furadan, Bay 70143, Carbodán, Carbosip, Curater, Furacarb<sup>1,38</sup>.

**Figura 7.** Estructura del Carbofuran.



Se presenta como un sólido cristalino e incoloro, algunas de sus propiedades físicas y químicas más relevantes se presentan en la Tabla 2<sup>1,38,39</sup>.

**Tabla 2:** Propiedades físicas y químicas del Carbofuran.

Propiedad	
Formula Molecular	C <sub>12</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>3</sub>
Punto de Ebullición	200 °C
Punto de Fusión	153-154 °C
Solubilidad en Agua	320 mg/L (25 °C)
Solubilidad en Acetona	15%
Presión de Vapor	2,7 mPa a 33°C
Peso Molecular	221.26
Coeficiente de Partición Octanol / Agua (K <sub>ow</sub> )	1,2304-1,4150
Constante de Law Henry's (H')	3.9x10 <sup>-9</sup> atm m <sup>3</sup> /mol

Es un plaguicida de amplio espectro, de actividad acaricida, insecticida y nematocida, actúa por contacto o después de la ingestión. Es usado contra plagas de frutas, vegetales, foliares, del suelo y de cultivos de bosques, aplicado en diferentes variedades de cultivos, entre los que se encuentran la papa, alfalfa, maíz, fresa, lechuga, repollo, etc. En la tabla 3 se mencionan algunos tipos de insectos que son combatidos por el Carbofuran en diferentes clases de cultivos<sup>1,38</sup>.

**Tabla 3:** Insectos combatidos con Carbofuran en algunos cultivos:

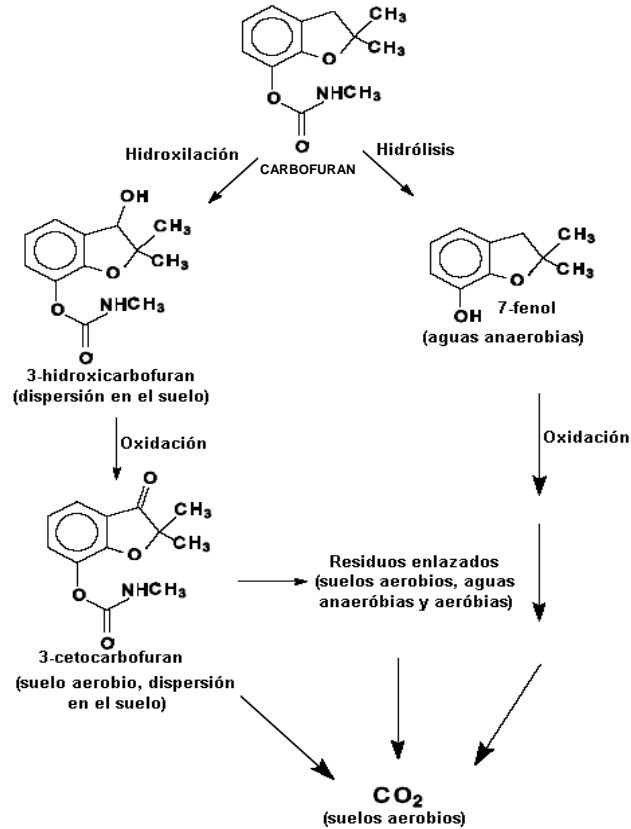
Insecto ( <i>Nombre Científico</i> )	Cultivo
<b>Gusano de la raíz</b> ( <i>Diabrotica sp</i> ) <b>Gusanos Alambre</b> ( <i>Elateridos</i> )	Maíz
<b>Gorgojo</b> ( <i>Phydernus muriceus</i> ) <b>Gusano blanco</b> ( <i>Diloboderus abderus</i> ) <b>Pulgón</b> ( <i>Myzus persicae</i> )	Papa
<b>Cotorritas</b> ( <i>Empoasca spp</i> ) <b>Mosca Blanca</b> ( <i>Bemisia sp</i> )	Poroto
<b>Gusano minador</b> ( <i>Faustinus cubae</i> ) <b>Gusano blanco</b> ( <i>Diloboderus abderus</i> ) <b>Gusano cogollero</b> ( <i>Heliothis virescens</i> ) <b>Pulguilla</b> ( <i>Epitrix parvula</i> )	Tabaco / Tomates

Su alta solubilidad en agua y relativamente bajo  $K_{ow}$  indican que probablemente este plaguicida sea un contaminante potencial de lagos, ríos y aguas subterráneas. Sin embargo, su movilidad es influenciada por la composición del suelo, presentando una movilidad alta en suelos franco arenosos y una movilidad débil en suelos con un mayor contenido de arcillas y alófanos. La cantidad de plaguicida que puede ser adsorbida y retenida en el suelo depende principalmente del contenido y grado de humificación de la MO, encontrándose en los estudios de fraccionamiento contenidos considerables de residuos de plaguicida en las diferentes fracciones húmicas (huminas y ácidos húmicos principalmente)<sup>1,39</sup>.

La estabilidad del Carbofuran es afectada por la exposición directa a la luz, el calentamiento, la presencia de sustancias húmicas y ambientes acuosos que facilitan los procesos de degradación<sup>1</sup>.

Sufre hidrólisis química y microbial, reacciones que se favorecen a valores de pH alcalinos, encontrándose que a pH 9.0 solo el 20 % del Carbofuran permanece después de un día y el producto principal de la reacción es el 7-fenol. En el agua se degrada por hidrólisis química bajo condiciones alcalinas, igualmente sufre degradación microbial. El tiempo de vida media (25 °C) por hidrólisis es de 690, 8.2 y 1.0 semanas a pH de 6.0, 7.0 y 8.0 respectivamente. Y en la vegetación el tiempo de vida media es de casi 4 días cuando se aplica en las raíces y mayor si se aplica sobre las hojas. La vida media del Carbofuran en suelos ácidos es de aproximadamente 321 días. El principal producto de degradación en suelos ácidos es el 3-cetocarbofuran<sup>38,39</sup>. La degradación del Carbofuran a sus correspondientes metabolitos es mayor en climas cálidos que en climas templados, además es importante resaltar que estos metabolitos son igualmente tóxicos que el plaguicida que les dio origen, presentando una mayor solubilidad y por lo tanto una mayor posibilidad de contaminar aguas subterráneas<sup>41</sup>. A continuación se muestra la ruta de degradación de Carbofuran en suelos, aguas y sedimentos (Figuras 8)<sup>42</sup>.

**Figura 8:** Ruta de degradación de Carbofuran en suelos, aguas y sedimentos.



➤ **Efectos toxicológicos y reproductivos:** Este plaguicida se encuentra clasificado dentro de la Toxicidad I (toxicidad alta) y Toxicidad II (toxicidad moderada). Respecto a la toxicidad aguda, es altamente tóxico por inhalación e ingestión y moderadamente tóxico por absorción dérmica. El Carbofuran tiene un efecto inhibitor de la colinesterasa en corto término y reversible. Su DL<sub>50</sub> oral en ratones es de 2 mg/kg y su DL<sub>50</sub> dérmica en conejos es de 1000 mg/kg. La toxicidad crónica ha sido evaluada a altas dosis durante un periodo de dos años mostrando disminución de peso de las ratas en estudio. Los efectos reproductivos se han estudiado a altas dosis durante largos periodos de tiempo causando daño en perros, pero no en ratas ni ratones. Este N-MC causa inhibición de la colinesterasa en humanos y animales, afectando la función del sistema nervioso, es poco absorbido a través de la piel, se metaboliza en el hígado y se excreta en la orina<sup>1,38</sup>.

➤ **Efectos ecológicos:** Es altamente tóxico para pájaros, su DL<sub>50</sub> oral es de 0.238 mg/kg en patos. Igualmente es muy tóxico para muchos peces (DL<sub>50</sub> de 0.38 mg/L en trucha arco iris). Sin embargo posee un bajo potencial de acumulación en organismos acuáticos. Es muy tóxico para abejas con DL<sub>50</sub> de 0.16 µg/abeja<sup>1,38</sup>.

#### **4.5. MÉTODOS EMPLEADOS EN EL ANÁLISIS DE N- MCs.**

La determinación y cuantificación de N-MCs en matrices como suelos y alimentos cobra cada día mayor importancia al considerar los diversos efectos adversos que pueden generar estas sustancias sobre la salud humana, animales y vegetación.

Teniendo en cuenta esta problemática diferentes científicos han desarrollado y aplicado metodologías eficientes que permiten determinar el contenido de estas sustancias en diversas matrices. Estas metodologías requieren de la extracción del plaguicida desde la matriz de interés, la eliminación de interferentes a través de una etapa de limpieza y finalmente la determinación y cuantificación del plaguicida extraído.

**4.5.1 Técnicas de extracción y limpieza.** Las técnicas empleadas para la extracción de plaguicidas N-MCs presentes en muestras de suelo juegan un papel crucial en el análisis subsecuente de estos compuestos debido a su labilidad térmica. La tendencia a la descomposición térmica, dificulta aun más la extracción mediante la aplicación de métodos convencionales como la Extracción Soxhlet, ya que los periodos largos de calentamiento causan la degradación de estos analitos. Con el fin de disminuir los tiempos de extracción, investigadores como Prados y Herrera estudiaron la extracción de N-MCs de muestras de suelo mediante la aplicación de la técnica MASE<sup>2</sup>. Para ello optimizaron parámetros como el poder del microondas, el tiempo de irradiación y el número de ciclos, factores que influyen considerablemente en la eficiencia de la extracción. Además ensayaron cuatro solventes diferentes (agua, acetonitrilo, n-hexano y diclorometano) para el proceso de extracción, encontrando que los mejores resultados se obtuvieron con acetonitrilo. Los extractos fueron analizados por cromatografía líquida de alta eficiencia con un sistema de derivatización post-columna y detección con fluorescencia (HPLC-FS), obteniendo recuperaciones adecuadas para los diferentes N-MCs analizados (oxamyl, dioxacarb, metolcarb, carbofuran y carbaryl)<sup>2</sup>.



Otras técnicas alternativas, como la SFE han sido empleadas para la remoción de N-MCs desde diferentes matrices. Lei Sun y Hian Kee Lee estudiaron la extracción de algunos plaguicidas carbamatos (propoxur, chlorpropham, propham y methiocarb) de muestras de suelo mediante la aplicación de la SFE y Extracción Asistida con Microondas (MAE)<sup>3</sup>. Para la MAE analizaron la influencia de diferentes solventes de extracción como metanol, acetona:hexano (1:1), diclorometano y acetato de etilo, obteniendo los mejores porcentajes de recuperación promedio (%R<sub>prom</sub>) para los carbamatos analizados al utilizar metanol como solvente de extracción (%R<sub>prom</sub> de 89.9 %). Determinaron que la eficiencia de la SFE se incrementa considerablemente al adicionar un modificador orgánico como el metanol al sistema de extracción (CO<sub>2</sub> -10 % metanol) alcanzando un %R<sub>prom</sub> del 92.0 % para los plaguicidas estudiados<sup>3</sup>.

La técnica de SFE ha sido aplicada, recientemente, y ofrece también numerosas ventajas como la no utilización de solventes y tiempos cortos de preparación de muestras, disminuyendo la exposición de los analistas a solventes orgánicos tóxicos y reduciendo la necesidad de espacio y material, sin embargo, la aplicación de esta técnica es limitada debido a que requiere de un equipo costoso.

La Extracción con Ultrasonido es una poderosa herramienta en la aceleración de los procesos analíticos. Este tipo de vibraciones sonoras superiores al nivel auditivo humano, agitan la disolución produciendo burbujas microscópicas que se dilatan y contraen, estas burbujas pueden alcanzar un tamaño crítico por encima del cual explotan. Además de agitar la disolución las burbujas pueden romper una superficie sólida y formar grietas microscópicas que ayudarán a romper el sólido. En consecuencia, esta energía es de gran ayuda en el pre-tratamiento de muestras sólidas para facilitar y acelerar la extracción de compuestos orgánicos e inorgánicos<sup>4,5</sup>.

Sánchez – Brunete y Tadeo desarrollaron un método multiresiduo para el análisis de insecticidas carbamatos (oxamil, propoxur, carbofuran, carbaril y metiocarb) en suelos<sup>6</sup>. El método está basado en la extracción asistida con ultrasonido de muestras de suelos en pequeñas columnas, usando un volumen bajo de metanol. Los residuos de los plaguicidas estudiados en las muestras de suelo fueron determinados por cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa (HPLC-RP) con detección de fluorescencia. La separación de los carbamatos fue llevada a cabo sobre columnas C8 empleando como fase móvil metanol – agua<sup>6</sup>.

La Agitación mecánica es una de las técnicas de extracción comúnmente empleadas en los laboratorios de análisis de suelos y alimentos, considerando que es una técnica económica que ofrece recuperados favorables como lo han determinado algunos investigadores mediante la aplicación de agitación para la extracción de diferentes sustancias en diversas matrices. La EPA en el método 8318A aplica esta técnica de extracción para la determinación y cuantificación de N-MCs (aldicarb, carbaryl, carbofuran, entre otros) en muestras de suelo. Empleando acetonitrilo como solvente de extracción, la muestra de suelo se agita durante 4 horas, los extractos obtenidos son sometidos al proceso de limpieza mediante SPE empleando cartuchos C18 y acetonitrilo como solvente de elución. La determinación y cuantificación se realiza por HPLC con derivatización post columna y detección de fluorescencia (FS). La metodología ofrece recuperados en el rango de 65-80 % con % C:V entre 4.4-11 % para los N-MCs estudiados<sup>7</sup>.

En general, para el proceso de extracción la estrategia más efectiva es escoger el solvente que recupere al máximo los analitos de interés y extraiga una mínima cantidad de impurezas.

Actualmente se ha generado interés en reducir la cantidad de solventes orgánicos usados en la extracción de plaguicidas. La SPE ha sido una alternativa pues provee eficiencia en la limpieza y extracción, además de permitir la concentración de contaminantes en el análisis de muestras ambientales. Como consecuencia de ello se ha incrementado el uso de esta técnica, la cual se aplica pasando una disolución que contiene analito(s) sobre una fase sólida (o fase estacionaria) que lo(s) adsorbe específicamente. Después de la adsorción, los analitos se eluyen con una pequeña cantidad de otro disolvente extractor, con el que interacciona más fuertemente que con la fase estacionaria<sup>4,8-10</sup>.

Los diferentes tipos de interacciones que se dan en la SPE son: interacciones polares las cuales incluyen puentes de hidrógeno, interacciones dipolo – dipolo y otras interacciones entre átomos del analito y los grupos polares de la fase estacionaria; interacciones no polares que ocurren entre los enlaces carbono – hidrógeno del adsorbente y los enlaces carbono – hidrógeno de los analitos; interacciones iónicas entre moléculas de analito con cargas opuestas a las del adsorbente e interacciones múltiples las cuales incluyen los mecanismos descritos anteriormente<sup>4</sup>.

Nunes, Ribeiro y otros, realizaron un estudio comparativo de diferentes procedimientos de limpieza para la determinación de N-MCs, el cual incluyó la aplicación de técnicas como la CC y la SPE para el análisis de aldicarb, carbaril, carbofuran, metomil, entre otros, en extractos de alimentos<sup>8</sup>. Considerando los %R obtenidos para los diferentes plaguicidas analizados, seleccionaron la alúmina desactivada y el celite – carbón silanizado como materiales adsorbentes eficientes para la CC, con sistemas de elusión de cloruro de metileno:metanol (99:1) y tolueno:acetonitrilo (75:25) respectivamente, obteniendo % R en el rango de 77 - 105 % con %C.V entre 2.5 y 6.6 % para los N-MCs estudiados. Concluyeron para la técnica de SPE que el empleo de cartuchos con rellenos C8 y CN en modo fase reversa (RP) y fase normal (NP) respectivamente, permiten obtener extractos más limpios, brindando % R en el rango de 79 – 100 % con %C.V entre 2.3 y 5.5 % para los N-MCs estudiados<sup>8</sup>.

El procedimiento de limpieza es llevado a cabo con el fin de remover compuestos que puedan interferir en la determinación cromatográfica o espectrofotométrica, o ser perjudiciales para la instrumentación analítica. Las técnicas de limpieza comúnmente empleadas para extractos con plaguicidas carbamatos son la PLL, CC, y SPE, aunque muchos métodos requieren combinaciones de estas. También se ha empleado con menor frecuencia la GPC como método de limpieza<sup>11,35</sup>. Otra técnica usada es la *Dispersión de la Matriz en Fase Sólida* (MDSP) la cual se emplea para muestras de pequeño tamaño para garantizar la representatividad de la misma<sup>11,12</sup>.

**4.5.2 Técnicas de Determinación.** La determinación directa de plaguicidas carbamatos por cromatografía de gases (GC) es complicada debido a su labilidad térmica. Se han empleado técnicas de derivatización, separación por GC y detección por captura electrónica, aunque los plaguicidas con estructura carbamoil oxima (oxamil y metomil) no se han logrado determinar ya que requieren consideraciones especiales y deben ser analizados por HPLC<sup>6</sup>.

Existen otros estudios en los que se realiza el análisis directo de éstos analitos por cromatografía de gases con detector de nitrógeno-fósforo (CG-NPD), pero no incluyen el estudio de metabolitos de degradación<sup>13</sup>. Se han desarrollado estudios de estabilidad de plaguicidas carbamatos y análisis por CG con detector de ionización de llama (FID) y NPD, pero algunos N-MCs como aldicarb, aldicarb

sulfóxido y metomil no se han detectado bajo las condiciones de trabajo por ser oximas alifáticas polares<sup>14</sup>.

Moye y otros, fueron los primeros en adaptar la técnica de HPLC–FS con derivatización post-columna para la determinación de N-MCs<sup>11,15,16</sup>. Su técnica incluyó una separación en RP seguida por una hidrólisis básica que liberaba metil amina la cual reaccionaba con o-ftalaldehído (OPA) - mercaptoetanol para formar un isoindol altamente fluorescente<sup>11,15,16</sup>.

También se encuentran diversos estudios en los que se emplea la HPLC-UV, en donde no se requiere la hidrolisis y el proceso de derivatización<sup>8,9,11,17</sup>.

Khin Zan y Somporn Chantara desarrollaron un método para la determinación de residuos de Carbofuran y Carboxin en Coles. Para la extracción de los plaguicidas utilizaron acetato de etilo y un baño ultrasonido. La etapa de limpieza fue sometida a un riguroso proceso de optimización en el cual evaluaron diferentes parámetros entre los que se incluyen tipo de fase estacionaria (C18 y florisil), nivel de concentración de plaguicida (0.5, 1 y 2 ppm), composición del sistema de elución (acetonitrilo:agua), entre otros. Determinaron que los dos tipos de fases estacionarias ensayadas brindan % R favorables en un rango de 93 a 106 % a un nivel de concentración 0.5 ppm con un sistema de elución acetonitrilo:agua (70:30). Sin embargo, el florisil permitió obtener % R en el rango de 60 a 106 % para los tres niveles de concentración ensayados. La determinación y cuantificación de los plaguicidas fue realizada mediante HPLC-UV ( $\lambda=205$  nm)<sup>9</sup>.

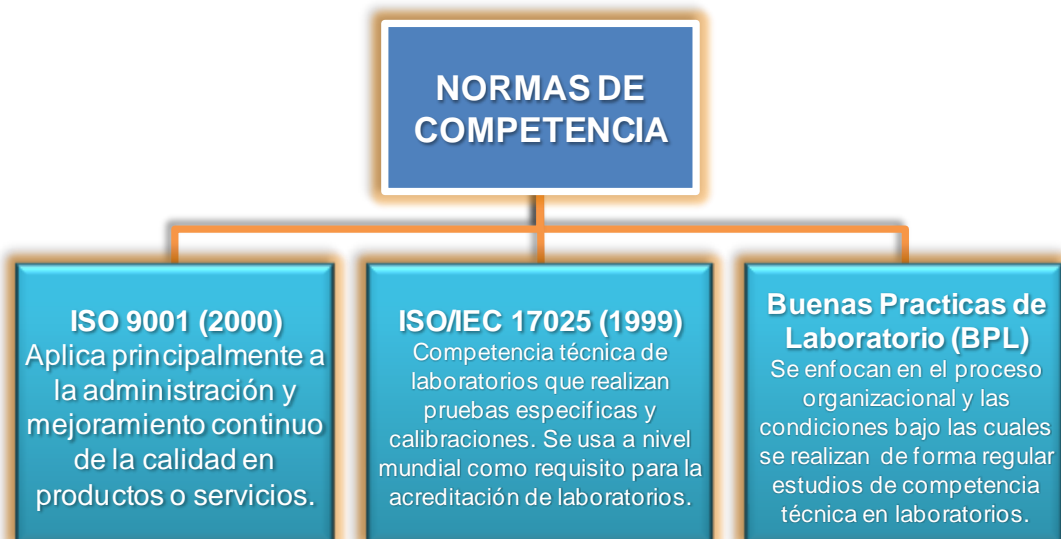
Recientemente se han desarrollado técnicas analíticas rápidas, sensibles y confiables para el seguimiento de este tipo de analitos, como la técnica de cromatografía líquida multidimensional (LC-LC) que emplea el acople cromatográfico para lograr selectividad y sensibilidad con un alto potencial de automatización. Investigadores como Parrilla y Martínez emplearon esta técnica cromatográfica para analizar algunos plaguicidas polares y sus metabolitos como el aldicarb, aldicarb sulfóxido, aldicarb sulfona, carbofuran y 3- hidroxicarbofuran en muestras de orina humana. Utilizaron una simple extracción en fase sólida con carbón grafitado, obteniendo recuperaciones entre el 84 y el 110 % con dispersiones (%C.V) entre el 4 y el 8 %<sup>17</sup>.

#### 4.6 NORMA TECNICA ISO/IEC 17025 Y BUENAS PRACTICAS DE LABORATORIO (BPL).

La función principal de un laboratorio es realizar las pruebas y ensayos requeridos para establecer las propiedades o características que describen un sistema, material o producto. Este servicio es efectivo si los resultados que se suministran son válidos, confiables y describen en forma precisa las propiedades de las muestras analizadas, lo que permite elaborar conclusiones sobre su calidad y sirve como base adecuada para la toma de cualquier acción o decisión. Para ello, es necesaria la implementación de un Sistema de Gestión de la Calidad que comprenda la estructura organizacional, el conjunto de recursos, responsabilidades y procedimientos establecidos para asegurar que los productos, procesos o servicios cumplen satisfactoriamente con el fin destinado<sup>18,19</sup>.

Entre las normas de competencia más reconocidas para la implementación del sistema de gestión de la calidad se encuentran principalmente tres grupos: ISO 9001 (2000), ISO/IEC 17025 (1999) y las BPL, los cuales tienen su aplicación de acuerdo con las necesidades individuales de cada laboratorio (Figura 9)<sup>19</sup>.

**Figura 9:** Descripción general de las Normas de Competencia<sup>19</sup>.



**4.6.1 Validación de métodos analíticos:** La validación de varios procesos consecutivos para lograr un resultado confiable se lleva a cabo utilizando un método de análisis, el cual debe ser validado empleando las BPL, para ello se requiere el establecimiento de unos Procedimientos Operativos Estandarizados (POE) o protocolos. Estos describen en forma detallada las actividades realizadas en el laboratorio con el fin de proveer uniformidad, consistencia y confianza en cada una de las actividades llevadas a cabo en el laboratorio; reducir errores sistemáticos y proveer entrenamiento y guía para el personal de nuevo ingreso<sup>19,20</sup>.

El proceso de validación del método de análisis consiste en demostrar experimentalmente la funcionalidad del método para las aplicaciones analíticas propuestas, como también en obtener la evidencia documentada del procedimiento seguido, lo cual debe corresponder a un diseño experimental, un tratamiento estadístico apropiado y unos criterios de aceptación de acuerdo con los atributos que describen cada método.

La selección de los criterios a evaluar durante la validación de un método de análisis dependen de la categoría en la que se encuentre dicho método, para ello la FAO ha establecido tres tipos de categorías<sup>20</sup>:

- Categoría I: para la cuantificación de materia prima o principio activo en producto terminado.
- Categoría II: para determinar impurezas en materia prima o compuestos de degradación en producto terminado, o para el análisis de residuos en material biológico o alimentos.
- Categoría III: para determinar las características de funcionamiento como disolución o liberación de droga.

Las metodologías para el análisis de residuos de plaguicidas en diferentes matrices se encuentran clasificadas en la categoría II, para su validación la FAO sugiere la evaluación de los siguientes parámetros: selectividad, linealidad, rango de linealidad, exactitud, precisión, límites críticos (límites de detección y cuantificación) y robustez.

Las definiciones establecidas por la IUPAC para algunos criterios de aceptación se presentan en la Tabla 4<sup>19-20</sup>.

**Tabla 4:** Criterios de aceptación para la validación de métodos analíticos.

<b>Parámetro</b>	<b>Definición</b>
<b>Selectividad (Especificidad).</b>	Propiedad del método de producir una señal medible debida solo a la presencia del analito, libre de interferencia de otros componentes, en la matriz de la muestra <sup>20,43-45</sup> .
<b>Linealidad.</b>	Proporcionalidad entre la concentración de analito y su respuesta. Se grafica la respuesta en función de la concentración y se efectúa el tratamiento estadístico de los datos determinando el intercepto, la pendiente y el coeficiente de correlación <sup>20,43-45</sup> .
<b>Rango de Linealidad.</b>	Intervalo comprendido entre la concentración mínima y máxima de analito para el cual el método ha sido probado y dentro del cual se puede efectuar la cuantificación por interpolación en una curva estándar <sup>43-45</sup> .
<b>Exactitud.</b>	Corresponde a la concordancia entre el valor medido y el valor aceptado como referencia. La exactitud o bien podría llamarse “inexactitud”, debe ser tan pequeña como sea posible para que el valor medido se aproxime al de referencia <sup>20,43-45</sup> .
<b>Precisión.</b>	Dispersión de las medidas alrededor de su valor medio o central. Corresponde al grado de concordancia entre ensayos individuales cuando el método se aplica repetidamente a múltiples alícuotas de una muestra homogénea. Se especifica en términos de desviación estándar o desviación estándar relativa. Se evalúa a tres niveles (precisión intermedia, repetibilidad y reproducibilidad) <sup>20,43-45</sup> .
<b>Precisión Intermedia.</b>	Precisión obtenida bajo las mismas condiciones de operación en intervalos de tiempo diferentes (mínimo cinco días diferentes) por el mismo analista, sobre las misma muestra homogénea, usando los mismos equipos <sup>20,43-45</sup> .
<b>Repetibilidad.</b>	Precisión obtenida bajo las mismas condiciones de operación en intervalos cortos de tiempo (mismo día) por el mismo analista, sobre la misma muestra homogénea, usando los mismos equipos <sup>20,43-45</sup> .
<b>Reproducibilidad.</b>	Expresa la precisión entre resultados obtenidos mediante la aplicación del mismo método por diferentes operadores y usando diferentes equipos, sobre replicas de porciones analíticas <sup>20,43-45</sup> .

**Continuación Tabla 4:** Criterios de aceptación para la validación de métodos analíticos.

Parámetro	Definición
<b>Límites Críticos:</b>	
<b>Límite de Detección (LOD).</b>	Corresponde a la menor concentración de analito que puede detectarse, pero no necesariamente cuantificarse en una muestra en las condiciones establecidas y se expresa en unidades de concentración <sup>20,43-45</sup> .
<b>Límite de Cuantificación (LOQ)</b>	Corresponde a la menor concentración de analito que puede determinarse con precisión y exactitud razonables en las condiciones establecidas y se expresa también en unidades de concentración. Mínima concentración de analito que puede ser cuantificada con precisión y exactitud aceptable <sup>20,43-45</sup> .
<b>Robustez.</b>	Medida de la capacidad del método analítico para permanecer inalterado ante pequeñas pero deliberadas variaciones en ciertos parámetros, proporcionando idea de su fiabilidad o “estabilidad” durante su empleo en rutina. <sup>20,43,46</sup> .

Con el diseño e implementación de los sistemas de validación se puede garantizar que el resultado de la determinación analítica que se obtiene, a través de un proceso validado reúne los atributos de calidad con los que fue diseñado, y que la probabilidad de error es mínima<sup>18,19</sup>.



## 5. METODOLOGÍA.

### 5.1 EQUIPOS, MATERIALES, SOLVENTES, ESTÁNDARES, REACTIVOS Y SOLUCIONES.

#### 5.1.1 Equipos

- Cromatógrafo líquido de alta eficiencia (HP Serie 1100), que incluye:
  - Desgasificador (HP G1322A).
  - Bomba Cuaternaria (HP G1311A).
  - Detector de Ultravioleta (HP G1314A).
  - Inyector manual Reordine (Loop de 20µL).
  - Columna analítica C-18 (Spherisorb ODS-2, 5 µm de tamaño de partícula, 25 cm x 4.6 mm de diámetro interno, Supelco, Waters).
- Evaporador rotatorio (BÜCHI B-480).
- Balanza analítica (OHAUS AR 2140).
- Bomba de vacío (GAST LR 39793).
- Plancha de calentamiento con agitación (CORNING).
- Ultrasonido (BRANSON 1510).
- Agitador mecánico (YANKEE I-16043).
- Horno (WTB BLINDER FD-53).
- Centrífuga (HERMLE Z300 ).
- pH-metro (METROHM pH metro 744).
- Equipo de Extracción en Fase Sólida (Supelco).
- Espectrofotómetro Visible (20 Genesys LR 45227).
- Espectrofotómetro UV-vis (Genesys™ 6).
- Equipo Kjeldahl (BÜCHI K-314)

#### 5.1.2 Materiales

- Tamiz malla 2 mm.
- Cajas Petri para humedad.
- Hidrómetro de Bouyoucos.
- Bureta de 10 y 25 mL.
- Probeta para Bouyoucos.
- Termómetro de 0-100 °C.

- Probetas de 10, 25, 50 y 100 mL.
- Balones para rota evaporador de 25 y 50.
- Erlenmeyer de 50, 100 y 250 mL.
- Pipetas aforadas de 2, 5, 10 y 25 mL.
- Vasos de precipitados de 50 y 100 mL.
- Balones aforados de 2, 5, 10, 25, 50, 100 y 250 mL.
- Jeringa para HPLC de 25 y 50  $\mu$ L.
- Transferpipetas de 5 – 50  $\mu$ L, 10 - 100  $\mu$ L y de 100 - 1000  $\mu$ L.
- Espátulas.
- Embudos de vástago corto.
- Embudos buchner.
- Erlenmeyer para vacío.
- Membranas Millipore 0.45  $\mu$ m.
- Membranas Millipore 0.22  $\mu$ m.
- Viales de 5 mL color ámbar.
- Pipetas pasteur.
- Jeringas desechables (5 mL).

### 5.1.3 Solventes y reactivos

Los reactivos empleados para el análisis de suelos fueron:

- Hexametáfosfato de sodio (Carlo Erba).
- Carbonato de sodio (Merck).
- Cloruro de potasio (Mallinckrodt).
- Hidróxido de sodio (Mallinckrodt).
- Ácido Clorhídrico (Mallinckrodt).
- Fluoruro de Sodio (Merck).
- Fenolftaleína (Merck).
- Verde de bromocresol (Carlo Erba).
- Rojo de metilo (Carlo Erba).
- Azul de metileno (Merck).
- Etanol 90 % (Mallinckrodt).
- Cloruro de Bario (Chemi).
- Trietanolamina (Merck).
- Ácido sulfúrico concentrado (Mallinckrodt).

- Ácido fosfórico 85 % (J. T. Baker).
- Dicromato de potasio (Mol. Labs).
- Sulfato ferroso heptahidratado (Mallinckrodt).
- Indicador de ferroína (Mol. Labs).
- Catalizador para nitrógeno (Merck).
- Hidróxido de sodio técnico.
- Ácido bórico (Carlo Erba).
- Acetato de amonio (Carlo Erba).
- Formaldehido (Mallinckrodt).

Todos los solventes se filtraron a través de una membrana de 0.45  $\mu\text{m}$  en un sistema de desgasificación Millipore antes de su uso.

Los reactivos empleados en el desarrollo de la metodología para la extracción, limpieza y determinación de Carbofuran en Suelos fueron los siguientes:

- Acetato de etilo (EM Science, Fisher Scientific).
- Acetonitrilo grado HPLC (Merck).
- Metanol grado HPLC (Fisher Scientific).
- Agua desionizada.
- Sulfato de Sódio Anhidro (Merck).
- Cartuchos aminopropil (Waters).
- Cartuchos SPE C-18 (Merck)
- $\text{N}_2$  (AP 99.995 %, grado 4.5, Agafano S.A).
- Agua grado HPLC (Merck).
- Acetona analítica (Mallinckrodt).

#### **5.1.4 Estándar de Carbofuran.**

El estándar analítico de Carbofuran empleado se obtuvo del Dr.Ehrenstorfer, (Augsburg, Alemania), con pureza de 98 %.

#### **5.1.5 Soluciones patrón y soluciones de trabajo.**

La solución patrón (concentración aproximada de 500 ppm) y soluciones de trabajo (concentración aproximada de 50 ppm) de Carbofuran se prepararon en metanol y se almacenaron en el refrigerador a 3-4°C.

## 5.2 OBTENCIÓN Y ANÁLISIS DE LA MUESTRA DE SUELO.

**5.2.1 Ubicación geográfica de la zona de muestreo.** El suelo de estudio se tomó en La finca Santa Rosa de la vereda La Aurelia, Municipio de Cajibío, Departamento del Cauca (Figura 10), ubicado a 1740 metros sobre el nivel del mar, con una precipitación pluvial de 1500 mm a 19 °C , dedicada principalmente a cultivos hortícolas y cafeto. Esta muestra de suelo corresponde a zonas de la finca en donde no se aplican N-MCs para el control de plagas (exentas de Carbofuran).

**Figura 10:** Mapa político del Departamento del Cauca.



**5.2.2 Muestreo del suelo.** Para tomar la muestra de suelo, se delimitó el área de estudio y se identificaron las respectivas unidades de muestreo de acuerdo con la altura, topografía o relieve, tipo de cultivo, vegetación, etc. Se seleccionó una unidad de muestreo y se cruzó en zig-zag, haciendo sondeos en la capa arable que comprende alrededor de 20 a 30 cm de profundidad. Se tomaron entre 10 y 15 submuestras mezclándolas homogéneamente y se formó con estas una muestra compuesta de aproximadamente 1 Kg. La muestra compuesta se empacó en bolsa plástica identificándose con nombre de la finca, vereda, municipio, fecha de muestreo y se trasladó inmediatamente al laboratorio de agroquímica de la Universidad del Cauca. Se determinó en primera instancia la humedad de campo y posteriormente se extendió sobre hojas de papel y se secó al aire en un lugar seco y a la sombra por 24 horas. La muestra seca se molió y tamizó por un tamiz de 2 mm<sup>19,47</sup>.

**5.2.3 Caracterización física y química del suelo.** Con el objeto de identificar el tipo de suelo, se realizaron los análisis físicos y químicos recomendados por la EPA y mencionados en la Tabla 5, de acuerdo con la metodología estandarizada en el Laboratorio de Agroquímica de la Universidad del Cauca<sup>19,47</sup>. Los protocolos empleados para la determinación se muestran en el Anexo 1.

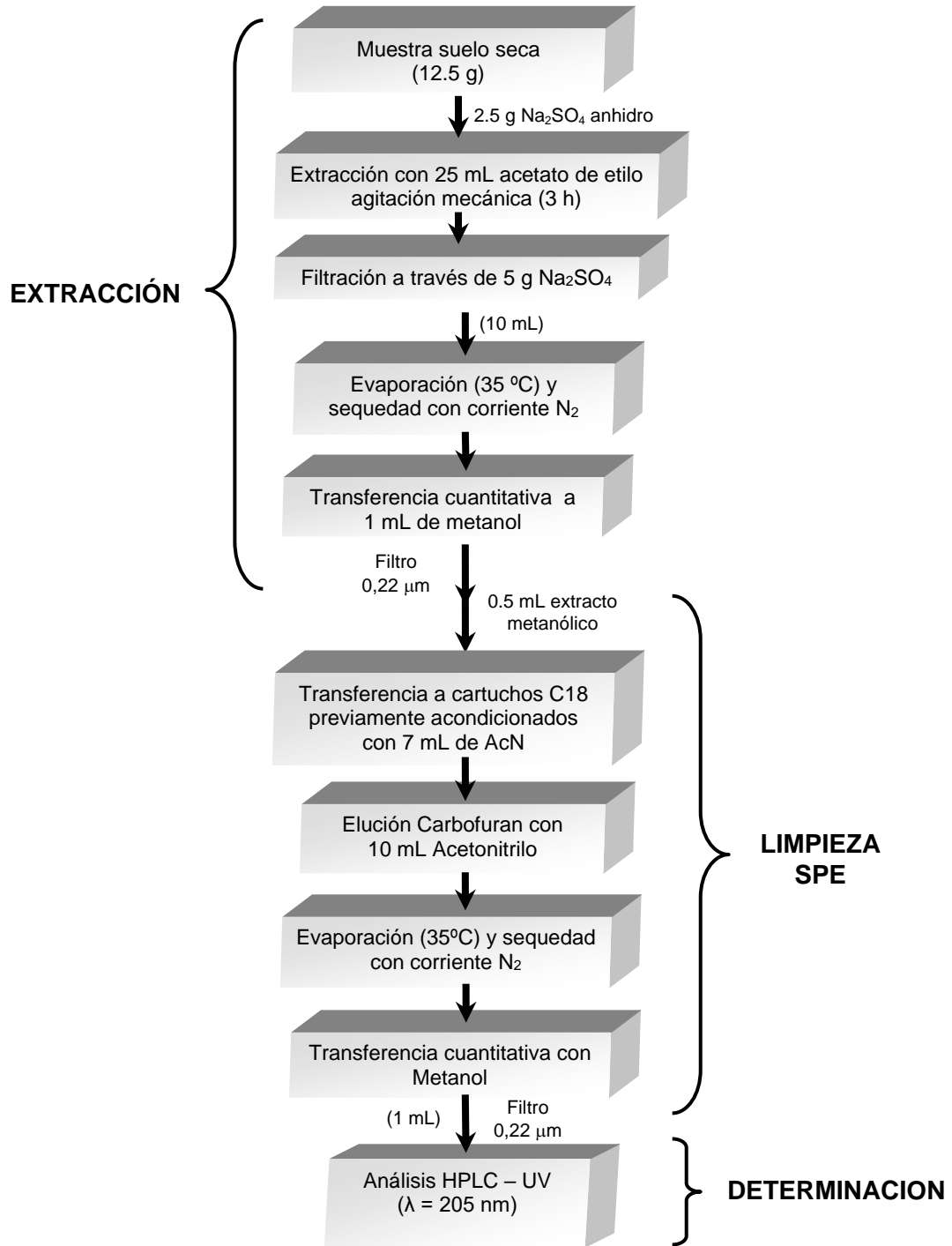
**Tabla 5:** Análisis físicos y químicos realizados a la muestra de suelo.

<b>Análisis</b>	<b>Método</b>
<b>Humedad de Campo</b>	Método gravimétrico.
<b>Humedad Higroscópica</b>	Método gravimétrico.
<b>Textura</b>	Método de Bouyoucos
<b>pH</b>	Método Potenciométrico.
<b>Acidez intercambiable</b>	Método Volumétrico
<b>Hidrógeno de Cambio</b>	Método Volumétrico
<b>Aluminio Intercambiable</b>	Método Volumétrico
<b>Acidez Titulable</b>	Método Volumétrico
<b>Materia Orgánica</b>	Método de Walckley–Black.
<b>Determinación de CIC</b>	Método Volumétrico
<b>Determinación de Nitrógeno</b>	Método de Kjeldhal.

### **5.3 METODOLOGÍA PARA LA DETERMINACIÓN DE CARBOFURAN EN SUELOS.**

**5.3.1 Definición de la metodología de base.** Teniendo en cuenta la revisión bibliográfica se definió la metodología de base (figura 11), considerando el plaguicida de interés (Carbofuran) y la matriz a trabajar (suelo)<sup>2-17</sup>. Se emplearon métodos de extracción y limpieza que implicaron poca cantidad de solventes y bajos tiempos de análisis con respecto a otras metodologías<sup>5,7</sup>. Se utilizó una técnica separativa que exhibió parámetros cromatográficos apropiados y una metodología analítica que permitió obtener recuperados analíticos adecuados.

**Figura 11:** Proceso de extracción, limpieza y determinación de Carbofuran en suelos.



- **Fortificación de Suelos.** El suelo seco y tamizado por malla 10 se fortificó con cantidades variables de la solución de trabajo de 50 ppm en presencia de sulfato de sodio anhidro. Se permitió el contacto entre el plaguicida y el suelo y la evaporación del solvente durante 15 minutos aproximadamente.
  
- **Extracción del plaguicida.** El suelo fortificado se sometió al proceso de extracción mediante agitación mecánica durante tres horas empleando como solvente acetato de etilo. El extracto se filtró a través de sulfato de sodio anhidro, posteriormente se concentró en un rotaevaporador a 35 °C hasta un volumen aproximado de 0.5 mL. A continuación, se llevó a sequedad con corriente de N<sub>2</sub> y finalmente se realizó la transferencia cuantitativa del extracto con metanol a un volumen de 1 mL, filtrándolo a través de membranas de nylon de 0.22 μm.
  
- **Limpieza de extractos.** Los extractos en metanol se sometieron al proceso de SPE. En esta etapa se emplearon cartuchos C18 y acetonitrilo grado HPLC para la activación de los cartuchos y la elución del Carbofuran<sup>9,10</sup>. El extracto limpio se concentró en evaporador rotatorio a 35 °C y se llevó a sequedad con corriente de N<sub>2</sub>. Finalmente se realizó la transferencia cuantitativa con metanol a un volumen de 1 mL.
  
- **Determinación y cuantificación del plaguicida por HPLC-UV.** El extracto en metanol obtenido de la etapa de limpieza se filtró a través de una membrana de 0.22 μm de nylon. El extracto filtrado fue analizado en el HPLC empleando una columna C18 y acetonitrilo:agua en una proporción 60:40 como fase móvil, finalmente el Carbofuran se detectó por UV a una longitud de onda de 205 nm. La cuantificación del plaguicida de interés se realizó empleando curvas de calibración del patrón en solvente (metanol).
  
- **Obtención del Blanco de Matriz.** El suelo libre del plaguicida de interés, seco y tamizado por malla 10 se somete a los procesos de extracción, limpieza y cuantificación descritos anteriormente (Figura 11).

**5.3.2 Adecuación del sistema instrumental.** Partiendo de los parámetros establecidos en la metodología de base, se adecuó el sistema instrumental por HPLC-UV.

Se determinaron individualmente las concentraciones de plaguicida para las cuales la señal fue adecuada y se definió el intervalo de concentraciones de trabajo teniendo en cuenta la cantidad de Carbofuran comercial (Furadan) aplicado por parte de los agricultores de la región (Anexo 2 y 3).

**5.3.3 Separación Cromatográfica.** Para obtener una adecuada separación del analito y las posibles interferencias se evaluaron algunos parámetros cromatográficos como: tiempo de retención ( $t_r$ ), factor de capacidad ( $k'$ ), factor de respuesta ( $F_r$ ) y eficiencia ( $N$ ). Esto se realizó variando la composición de los solventes de elución (agua y acetonitrilo), el flujo de la fase móvil durante la corrida cromatográfica y las condiciones de detección.

**5.3.4 Adecuación de la metodología analítica.** El blanco de la muestra de suelo fue procesado y analizado de acuerdo con la metodología descrita. El extracto del blanco de la matriz fue previamente analizado en el HPLC-UV para evaluar posibles interferencias.

**5.3.5 Recuperados analíticos.** Se llevó a cabo empleando suelo blanco y estándar de Carbofuran. Se fortificó el suelo, se sometió al proceso de extracción, limpieza y posterior cuantificación. El área obtenida se comparó con extracto blanco de matriz fortificado al mismo nivel y se evaluó el porcentaje de recuperación (% R) obtenido, mediante la relación entre las dos áreas.

## **5.4 VALIDACIÓN DEL SISTEMA INSTRUMENTAL.**

La validación instrumental se llevó a cabo empleando soluciones de Carbofuran preparadas en metanol.

En esta etapa se evaluaron parámetros como la especificidad, selectividad, linealidad, LOD y LOQ instrumentales y precisión. Estos parámetros se analizaron mediante estadístico t de Student y el análisis de varianza (ANOVA)<sup>35,44</sup>.



**5.4.1 Especificidad – selectividad instrumental.** Se evaluó al nivel dos de calibración. Se preparó una solución del plaguicida a una concentración aproximada de 50 µg/mL, a partir de esta se realizaron diluciones al nivel dos de calibración (1.5 µg/mL aproximadamente). Se determinaron el  $t_r$  del plaguicida y el  $F_r$  a la longitud de onda de máxima absorción del Carbofuran. Se tomó también un blanco de reactivos, es decir el solvente en el que se disolvió el analito de referencia (metanol) y se inyectó en el HPLC. Se espera que el solvente no presente interferencias con la señal del Carbofuran<sup>35</sup>.

**5.4.2 Linealidad instrumental.** Se prepararon curvas de calibración a cinco niveles de concentración. La evaluación de la linealidad instrumental se realizó tomando tres curvas de calibración preparadas e inyectadas el mismo día. Se probó la normalidad de los resultados con el test de Shapiro - Wilk, y la linealidad se evaluó empleando el estadístico t de Student, en donde se analizan el intercepto (a), la pendiente (b) y el coeficiente de correlación (r). Igualmente mediante un análisis de varianza (ANOVA) se evaluó la regresión y se verificó el desvío de la linealidad. Se espera que el sistema instrumental seleccionado presente linealidad, donde la pendiente sea significativamente diferente de cero, el intercepto sea significativamente igual a cero, y que exista correlación entre la respuesta y la concentración, que haya regresión lineal entre la respuesta y la concentración y no se presente desvío de la linealidad<sup>35</sup>.

**5.4.3 Precisión instrumental:** Se evaluó como repetibilidad y precisión intermedia en el rango de calibración.

➤ **Repetibilidad.** Se prepararon tres soluciones del patrón de Carbofuran a cada nivel según la curva de calibración y se inyectaron el mismo día, bajo las mismas condiciones. También se realizó una curva de calibración cada día y los resultados se interpolaron en ésta, se determinaron los valores en unidades de concentración de cada una de ellas. Se evalúa mediante el % CV por nivel de concentración<sup>35</sup>.

➤ **Precisión intermedia.** Se prepararon cinco soluciones de los patrones de Carbofuran a cada nivel según la curva de calibración, las cuales se prepararon e inyectaron durante cinco días diferentes. Se realizó una curva de calibración cada día y los resultados se interpolaron en esta. Se determinaron los valores en

unidades de concentración de cada una de ellas. El tratamiento estadístico realizado es igual al de repetibilidad<sup>35</sup>.

**5.4.4 Límites críticos instrumentales.** El LOD y LOQ se determinaron preparando tres curvas de calibración en solvente e inyectándolas en el HPLC-UV. La evaluación se realizó mediante el método sugerido por la IUPAC<sup>44</sup>, se espera que la sensibilidad instrumental sea suficiente para determinar los residuos de Carbofuran al nivel de las concentraciones aplicadas por los agricultores de la región o a concentraciones menores (Anexo 2).

## **5.5 EVALUACIÓN DEL EFECTO MATRIZ.**

Para determinar el efecto de los componentes de la matriz sobre la función de calibración, se prepararon tres réplicas de la curva de calibración en solvente, tres réplicas de la misma curva de calibración en extracto de matriz blanco, se inyectaron en el HPLC y se determinaron las respuestas para cada uno de los niveles de calibración. Se espera que el método de análisis no presente efecto matriz, lo cual se evaluó mediante test pareado y el método de regresión lineal<sup>44</sup>. También se calculó el porcentaje de efecto matriz como una aproximación cualitativa de dicho efecto y se muestran las curvas en solvente y en extracto.

## **5.6 VALIDACIÓN DE LA METODOLOGÍA.**

Se llevó a cabo empleando suelo blanco y Carbofuran analítico en las concentraciones seleccionadas.

Se evaluaron parámetros como la especificidad, selectividad, linealidad, LOD y LOQ, precisión, exactitud, y robustez. Los cuales se analizan estadísticamente mediante pruebas como test t de Student, ANOVA, test pareado, prueba de límites de confianza, prueba de Cochran y prueba de Youden - Steiner<sup>20,43,46</sup>.

**5.6.1 Especificidad – selectividad.** Se inyectó inicialmente un blanco de matriz. Se determinó si el blanco de matriz presentaba alguna señal significativa en el tiempo de retención del analito. Se preparó extracto de matriz fortificado al nivel dos de calibración y se analizó en el sistema instrumental seleccionado. Se espera que el blanco de matriz no presente interferencias con el Carbofuran<sup>35</sup>.

**5.6.2 Linealidad.** Si el método analítico no presenta efecto matriz, las muestras se pueden analizar empleando curvas de calibración preparadas en solvente y la linealidad corresponde a la obtenida en la evaluación de la linealidad instrumental, de lo contrario se debe cuantificar con curvas preparadas en extracto de suelo blanco<sup>35</sup>.

**5.6.3 Precisión.** Se evaluó como repetibilidad y precisión intermedia en el rango de calibración.

➤ **Repetibilidad.** (Se evaluó a cinco niveles de concentración, cinco réplicas por nivel). Se tomaron porciones analíticas de matriz exentas de Carbofuran, se fortificaron para obtener el nivel correspondiente, se realizó el proceso de extracción, limpieza y se inyectaron las réplicas el mismo día, bajo las mismas condiciones. También se realizó una curva de calibración en solvente cada día y los resultados de los análisis correspondientes se interpolaron en ésta, se determinaron los valores en unidades de concentración de cada una de ellas. Se determinó la normalidad de los valores obtenidos. Se evaluó mediante el % C.V, y se estableció si dichos valores están dentro del rango establecido en los criterios para la validación de metodologías en el análisis de residuos de plaguicidas de la IUPAC<sup>44</sup>.

➤ **Precisión intermedia.** Se evaluó a cinco niveles de concentración y cinco réplicas por nivel. Se realizó el mismo procedimiento empleado en la evaluación de repetibilidad. Las porciones analíticas se fortificaron, extrajeron, limpiaron e inyectaron durante cinco días diferentes. También se realizó una curva de calibración cada día y los resultados de los análisis correspondientes se interpolaron en ésta. Se determinaron los valores en unidades de concentración de cada una de ellas. El tratamiento es igual al realizado en la evaluación de la repetibilidad. Se evalúa la homogeneidad de las varianzas para especificar los % C.V para el plaguicida en el rango de calibración estudiado. Si hay homogeneidad de varianzas, se especifica el valor del  $C.V_{tip}$  que corresponde a la dispersión global de la metodología<sup>48</sup>.

**5.6.4 Exactitud.** Se evaluó como % R; con los resultados obtenidos de repetibilidad y precisión intermedia se calcularon los % R para el N-MC por nivel de concentración. Con los resultados de precisión intermedia se determinó la homogeneidad de las varianzas entre niveles, lo cual permite calcular el % R para el plaguicida empleando la metodología descrita<sup>35</sup>.

**5.6.5 Límite de detección y de cuantificación.** La evaluación se realizó mediante el método sugerido por la IUPAC. Se inyectó en el HPLC extracto blanco de matriz. Se determinó el ruido en el tiempo de retención correspondiente al del analito, (mínimo cinco réplicas). El promedio de estas áreas se interpola en una curva de calibración. La concentración obtenida en µg/mL se multiplicó por tres y por diez veces para el cálculo del límite de LOD y LOQ respectivamente. Estas concentraciones se convirtieron a mg/Kg de matriz y se compararon con los resultados obtenidos en los ensayos de LOD y LOQ instrumentales. Se espera que la sensibilidad sea suficiente para determinar los residuos del N-MC al nivel de las concentraciones normalmente aplicadas sobre los cultivos por parte de los agricultores en el departamento del Cauca<sup>35,45</sup>.

**5.6.6 Robustez:** Se seleccionaron los parámetros experimentales que podrían representar deliberadas variaciones en la metodología tanto en la extracción, como en la limpieza y la determinación. Este estudio se realizó con n variables en n+1 ensayos. Se aplicó el diseño experimental de Youden-Steiner<sup>20,43,46</sup>. Las variables seleccionadas se mencionan en la tabla 6.

**Tabla 6:** Variables en el estudio de robustez para la determinación de Carbofuran en suelos.

Variable	Valor de Validación	Valor Alterado
Tiempo de Agitación	3 Horas	2 Horas
Volumen del Solvente de Extracción	25 mL	15 mL
Temperatura Rota evaporador	35 °C	40 °C
Volumen de extracto sobre cartucho SPE	500 µL	800 µL
Volumen de Solvente de elución SPE	10 mL	5 mL
Tiempo entre preparación del extracción e inyección	6 Horas	24 Horas
Flujo fase móvil HPLC	0,7 mL/min	1,0 mL/min

## **5.7 ELABORACIÓN DEL PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDARIZADO (POE).**

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el proceso de validación de la metodología se realiza un POE que describe en forma detallada todas las actividades llevadas a cabo en el laboratorio para la determinación de Carbofuran en suelos. Además se incluye el procedimiento correspondiente al manejo de los resultados<sup>19</sup>.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1 CARACTERIZACIÓN FÍSICA Y QUÍMICA DEL SUELO.

Los resultados obtenidos de la caracterización física y química del suelo se presentan en la tabla 7 y corresponden al promedio de tres replicas.

**Tabla 7:** Resultados obtenidos de la caracterización física y química del suelo.

PARAMETRO*	VALOR	Interpretación
Humedad de Campo	43.45 %	Alta
Humedad Higroscópica	16.24 %	Alta
Textura	Franco Arenoso	----
pH	5.66	Acido
Acidez Intercambiable	0.135 meq/100 g	Baja
Aluminio Intercambiable	0.111 meq/100 g	Bajo.
Hidrógeno de Cambio	0.023 meq/100 g	Bajo
Acidez Titulable	50.77 meq/100 g	Alto
Carbono Orgánico	8.95 %	Muy Alto
Materia Orgánica	15.43 %	Muy Alto
Nitrógeno Total	1.15 %	Muy Alto
Relación C/N	7.78	Baja
CIC	61.32 meq/100 g	Alto

\*Textura: Bouyucos; pH: relación suelo:agua (1:1); Acidez Intercambiable y Titulable: método volumétrico; Materia Orgánica: Wakley Black; Nitrógeno Total: Método de Kjeldhal; CIC: Método volumétrico

Como se observa en la tabla 7, la muestra de suelo obtenida de La finca Santa Rosa se caracterizó física y químicamente, con el fin de determinar las propiedades aproximadas que deben presentar los suelos para los cuales es aplicable la metodología de análisis de Carbofuran que se validará.

El suelo analizado presentó textura franco – arenosa. Este tipo de suelos se caracterizan por ser ligeros, de buen drenaje interno y baja capacidad retentiva de agua y abonos. Los espacios entre partículas generados por el tamaño de las arenas (0.02-0.2 mm), permiten una mayor aireación del suelo, lo que hace susceptible al plaguicida a fenómenos de oxidación y volatilización, además facilita su proceso de transporte a través del suelo. Sin embargo, el elevado contenido de materia orgánica influye en la capacidad de retención de agua del suelo presentándose un porcentaje de humedad relativamente alto<sup>35,49</sup>.

La acidez activa del suelo proveniente de los iones  $H^+$  presentes en las sales solubles, los coloides de arcilla, la materia orgánica, entre otros, mostro que dicho suelo presenta un pH ácido<sup>23,24</sup>. Un análisis más detallado respecto a la acidez del suelo se llevó a cabo realizando la medición de los diferentes tipos de acidez; acidez intercambiable y titulable<sup>25</sup>.

La acidez intercambiable está determinada por el intercambio de iones  $Al^{3+}$  y  $H^+$ . Estos iones adsorbidos sobre la superficie de los coloides son desplazados por el KCl, quedando libres en la solución del suelo en forma de cloruros. La acidez intercambiable del suelo analizado es baja, sin embargo, el mayor aporte a este tipo de acidez es realizado por el aluminio intercambiable ( $Al^{3+}$  y  $Al(OH)_2^+$ ), mientras el aporte efectuado por el hidrogeno de cambio es mínimo. Aunque no es posible generalizar respecto a los niveles tóxicos de aluminio intercambiable en los suelos, ya que esto depende del tipo de suelo y del cultivo, es posible sugerir que el nivel de aluminio determinado no representa toxicidad para la planta<sup>23-26,50</sup>.

El valor determinado para la acidez titulable del suelo es alto, y se considera que es generado por el elevado contenido de materia orgánica, los óxidos hidratados de Fe y Al, los grupos  $OH^-$  de las aristas de las arcillas, entre otros<sup>23-26</sup>. Igualmente los grupos carboxílicos y fenólicos del humus y la materia orgánica se pueden disociar y liberar iones  $H^+$  que disminuyen el valor del pH del suelo.

Las características ácidas que presentó el suelo permitieron emplear esta muestra en el proceso de validación para la determinación de Carbofuran, considerando que los N-MCs sufren procesos de hidrólisis a pHs alcalinos, se garantiza de esta forma la estabilidad del Carbofuran durante el estudio<sup>35</sup>. Por otra parte este plaguicida no sufre cambios por efecto de carga ya que no es iónico al valor de pH encontrado<sup>39,42,51</sup>.

La fracción orgánica del suelo regula los procesos que allí ocurren, influye sobre las características físicas y químicas, y es el centro de aproximadamente todas las actividades biológicas del mismo<sup>23,50</sup>. El suelo analizado presenta un elevado porcentaje de materia orgánica, el cual influye notablemente en la retención de plaguicidas y otros contaminantes orgánicos en el suelo<sup>41,52-56</sup>.

A través de la determinación de carbono orgánico y nitrógeno total fue posible calcular la relación entre el contenido de estos dos importantes macronutrientes

(C/N), la cual debe encontrarse entre 9 y 14. El valor determinado indica que la velocidad de mineralización de la materia orgánica es alta, en donde posiblemente se encuentre materia orgánica que no esté adecuadamente humificada, generando posibles pérdidas de plaguicida por procesos de lixiviación<sup>23,50</sup>.

El valor obtenido para la CIC es relativamente alto, siendo congruente con el elevado %M.O presente en el suelo. Algunos investigadores han encontrado correlación significativa entre la CIC y la capacidad de retención de plaguicidas en suelos. Sin embargo, es importante mencionar que principalmente las huminas y los ácidos húmicos son la fracciones de la MO responsables de la retención de estas sustancias, mientras que los ácidos fúlvicos facilitan la solubilización de los mismos y por ende su posibilidad de pérdidas por procesos de lixiviación<sup>41</sup>.

## 6.2. DEFINICIÓN DE LA METODOLOGIA BASE.

Para seleccionar la metodología de base se escogió una técnica separativa que exhibiera factores cromatográficos apropiados y una metodología analítica que permitiera obtener % R adecuados. Para ello, y con base en la literatura<sup>2-17</sup> inicialmente se propuso utilizar como técnica de extracción baño ultrasonido y cartuchos de aminopropil para la limpieza, sin embargo, los porcentajes de recuperación obtenidos no superaron el 50 % por lo que se evaluó la etapa del proceso en la que se presentaban las perdidas del plaguicida. Se encontró que el proceso de limpieza con cartuchos de aminopropil no era eficiente. Teniendo en cuenta estos resultados se realizó la limpieza de los extractos con cartuchos C18. Los recuperados analíticos empleando aminopropil y C18 se muestran en la tabla 8.

**Tabla 8:** Recuperados analíticos empleando en la limpieza cartuchos de aminopropil y C18.

CARTUCHO SPE	Volumen AcOEt (mL)	Tiempo de Extracción Ultrasonido (min)	%R
C18	25	15	63.9
Aminopropil	25	15	47.0

\*%R resultados de dos replicas al nivel dos de calibración (aprox. 1.5 µg/mL)



Los resultados mostraron también que el baño ultrasonido empleado hasta el momento como técnica de extracción no brindaba la suficientemente eficiencia (Tabla 9); por ello se ensayó la extracción con agitación mecánica realizando pruebas a diferentes tiempos, proporcionando porcentajes de recuperación superiores (Tabla 10). Esto debido posiblemente a la potencia del ultrasonido (10 Watt, 42 KHz). Otras metodologías en las que se aplica esta técnica de extracción utilizan ultrasonidos con mayor potencia<sup>5,7</sup>.

**Tabla 9:** Porcentajes de recuperación obtenidos con ultrasonido y agitación mecánica.

Técnica de Extracción	Tiempo de Extracción	%R
Ultrasonido	20 min	52.7
Agitación Mecánica	3 Horas	99.3

\*%R resultados de dos replicas al nivel dos de calibración (aprox. 1.5 µg/mL)

**Tabla 10:** Porcentajes de Recuperación con Agitación Mecánica.

Volumen AcOEt (mL)	Tiempo (Horas)	%R
25	1	41.3
25	2	80.3
25	3	99.1

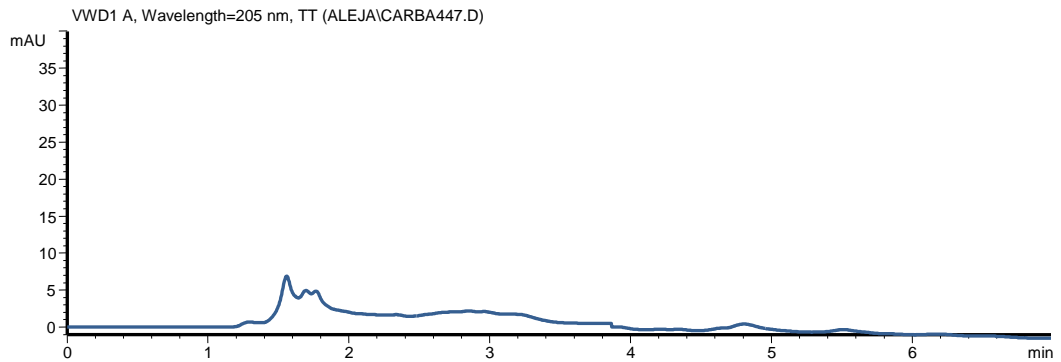
\*%R resultados de dos replicas al nivel dos de calibración (aprox. 1.5 µg/mL)

De acuerdo con los resultados obtenidos se determinó que la agitación mecánica durante un periodo continuo de tres horas es la técnica de extracción más eficiente y los cartuchos de C18 permiten realizar una adecuada limpieza de los extractos.

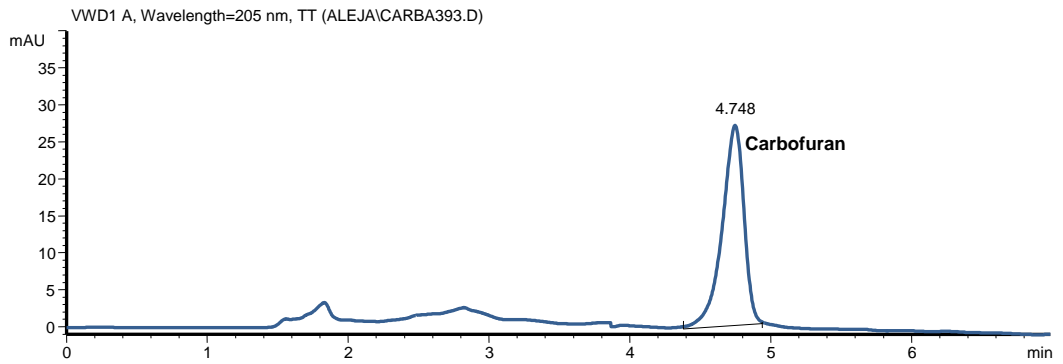
En la figura 12 se muestran los cromatogramas obtenidos para extracto blanco de suelo, extracto blanco de suelo fortificado al nivel dos de concentración y extracto obtenido al fortificar el suelo blanco y someterlo al proceso de extracción, limpieza y determinación.

**Figura 12:** Cromatogramas (a) extracto blanco de suelo, (b) extracto blanco de suelo fortificado al nivel dos y (c) Extracto obtenido al fortificar el suelo blanco y someterlo al proceso de extracción, limpieza y determinación.

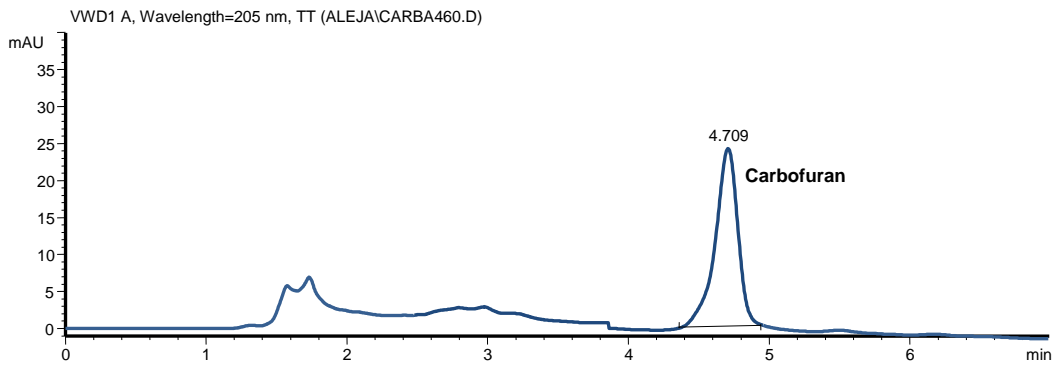
(a)



(b)



(c)



El método propuesto es similar al Método 8318A de la EPA en el cual se realiza la extracción con 50 mL de acetonitrilo y agitación mecánica durante un periodo continuo de dos horas. Lavados sucesivos con dos porciones de 20 mL del mismo solvente y dos horas más de agitación. La limpieza de los extractos se realiza por SPE empleando cartuchos C18 y la elución se realiza con acetonitrilo. La determinación se lleva a cabo por HPLC-FS aplicando elución con acetonitrilo:agua y derivatización con o-ftalaldehido 2-mercaptoetanol<sup>7</sup>.

Las ventajas de la nueva metodología propuesta se reflejan en la disminución del consumo de solventes y los tiempos de extracción, brindando porcentajes de recuperación superiores como se observa en la tabla 11.

**Tabla 11:** Porcentajes de recuperación para el método 8318A (EPA) y la metodología propuesta.

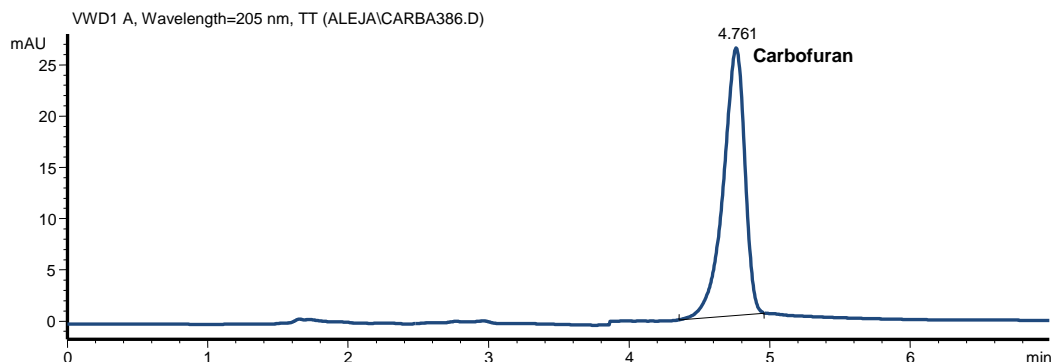
Metodología	%R
Método 8318A	73
Metodología Propuesta	99*

\*%R resultados de dos replicas al nivel dos de calibración.

### **6.3 ADECUACIÓN DEL SISTEMA INSTRUMENTAL (CROMATÓGRAFO LÍQUIDO DE ALTA EFICIENCIA CON DETECTOR UV).**

La longitud de onda seleccionada para la detección del Carbofuran fue de 205 nm. Después de ensayar diferentes proporciones de solventes se seleccionó como fase móvil acetonitrilo:agua en proporción de 60:40 y modo isocrático, a un flujo de 0.7 mL/min. Condiciones que en conjunto brindaron una separación cromatográfica adecuada para la determinación y cuantificación del Carbofuran (Figura 13).

**Figura 13:** Cromatograma de una solución de Carbofuran al nivel dos.



Mediante la aplicación del método instrumental mencionado se determinó el intervalo de concentraciones de trabajo el cual se presenta en la tabla 12.

**Tabla 12:** Concentración de Carbofuran por nivel de calibración.

N1	N2	N3	N4	N5
0.99 µg/mL	1.5 µg/mL	1.99 µg/mL	3.0 µg/mL	4.94 µg/mL

\*N corresponde a cada nivel de concentración.

## 6.4 SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA

**6.4.1 Parámetros Cromatográficos.** Para evidenciar una separación cromatográfica adecuada empleando la fase móvil previamente mencionada, se determinaron los parámetros cromatográficos tales como  $k'$  y N, los cuales se presentan en la tabla 13.

**Tabla 13:** Parámetros cromatográficos en la determinación de Carbofuran.

PLAGUICIDA	$k'$	N
Carbofuran	1,80	4634

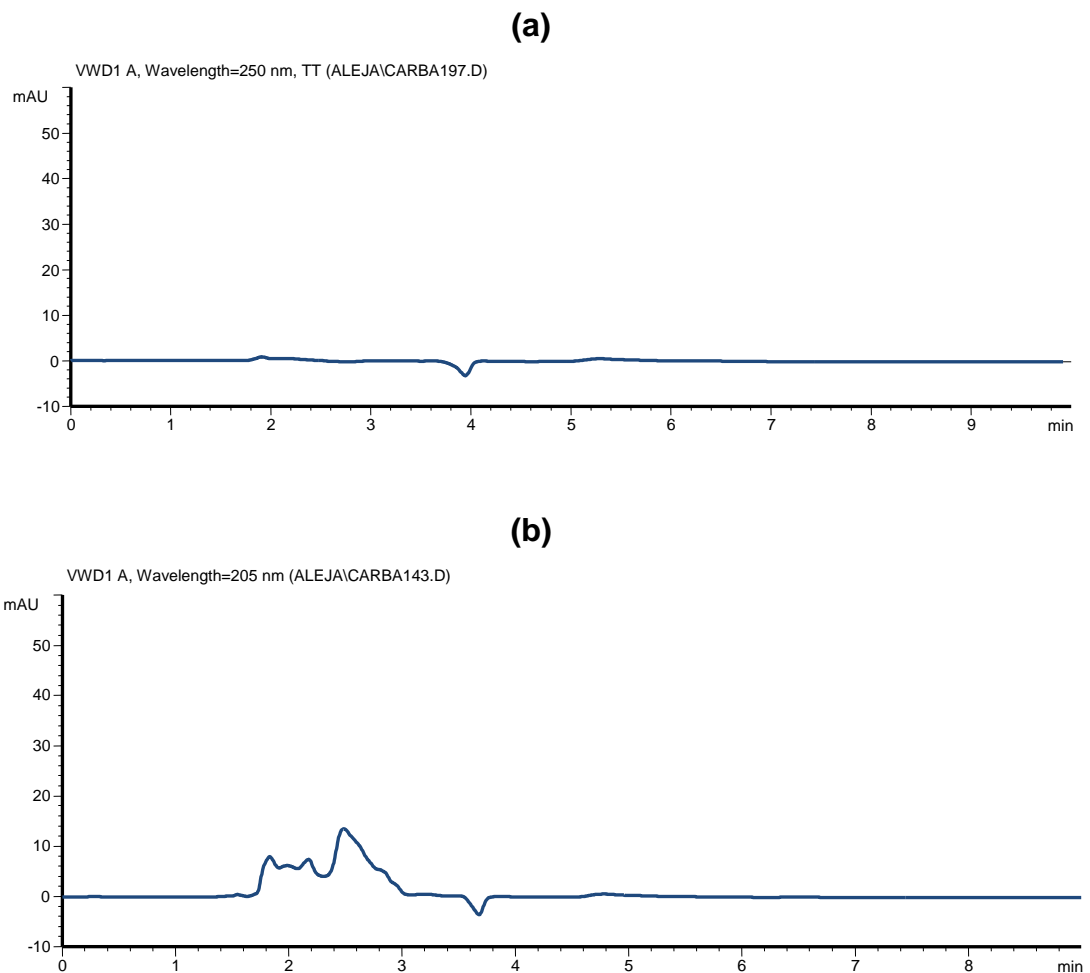
K, factor de capacidad; N, eficiencia, calculados respecto a N2.

El factor de capacidad y la eficiencia se ajustaron realizando variaciones en la fuerza de elución y el flujo de la fase móvil, los valores obtenidos para estos parámetros indican un adecuado método de análisis del Carbofuran en un periodo corto de tiempo.

## 6.5 VALIDACIÓN DEL SISTEMA INSTRUMENTAL.

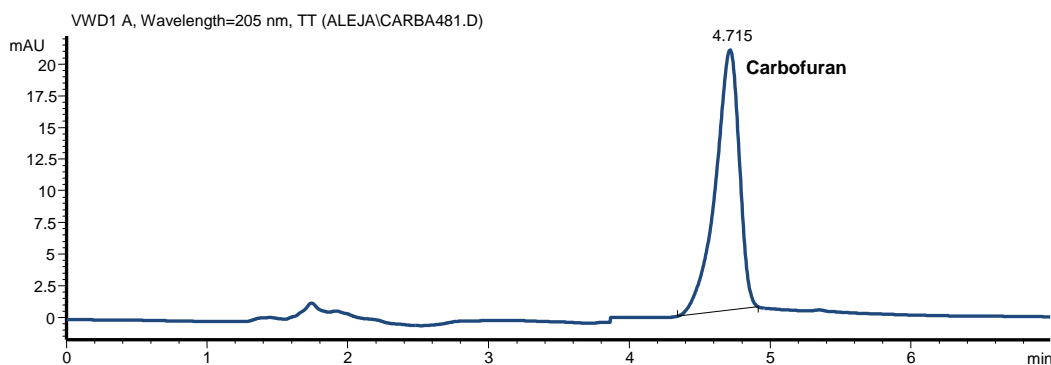
**6.5.1 Especificidad – selectividad instrumental.** El solvente empleado en la preparación de los estándares o blanco instrumental (metanol) no presentó interferentes al tiempo de retención del Carbofuran como se observa en la figura 14(a). Al principio de la corrida cromatográfica se minimizaron las señales correspondientes al metanol empleando una longitud de onda de 250 nm hasta un tiempo de tres minutos en donde se varió a la longitud de onda de máxima absorción del Carbofuran (205 nm) (Figura 14).

**Figura 14:** Cromatograma del Blanco Instrumental (metanol) (a) variación de longitud de onda a 250 nm y (b) longitud de onda a 205 nm.



Por otra parte, se verificó la ausencia de impurezas en los estándares de calibración inyectando en el cromatógrafo líquido el nivel dos de la curva, para el cual se obtuvo el cromatograma ilustrado en la figura 15, en este se evidencia claramente el pico del analito. En la tabla 14 se muestran los tiempos de retención y el factor de respuesta.

**Figura 15:** Cromatograma de una solución estándar de Carbofuran al nivel dos.



**Tabla 14:** Tiempo de retención y factor de respuesta para el Carbofuran.

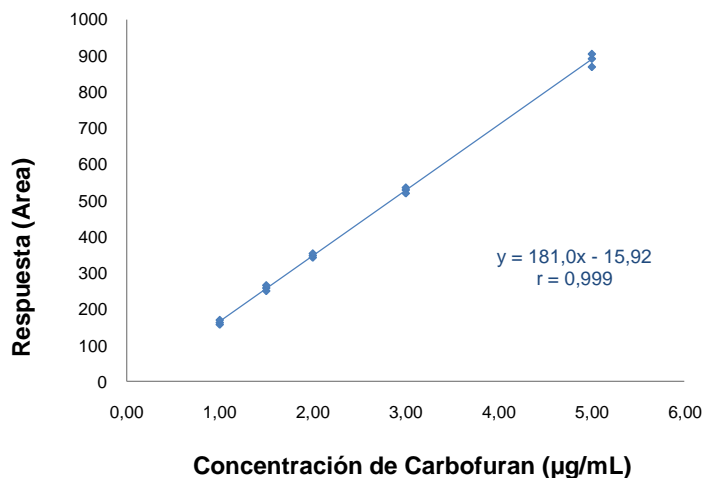
PLAGUICIDA	tr (min)	Fr (area/concentración)
Carbofuran	4,76 ± 0,08	173,84

tr, tiempo de retención; Fr, factor de respuesta.

Los resultados muestran que el sistema instrumental es selectivo porque da una respuesta clara para el Carbofuran, tal como lo demuestran el tiempo de retención y el factor de respuesta.

**6.5.2 Linealidad instrumental.** Se evaluó la normalidad de los resultados aplicando la prueba de normalidad de Shapiro - Wilk, los cálculos correspondientes se presentan en el Anexo 5<sup>57</sup>. De esta manera se determinó que los datos provienen de una población con distribución normal, lo que permitió aplicar métodos paramétricos para la evaluación estadística de los resultados obtenidos. En la Figura 16 se ilustra una de las curvas de calibración y seguidamente en la tabla 15 se presentan los valores de b, a y r obtenidos para dicha curva.

**Figura 16:** Gráfica correspondiente a la evaluación de linealidad para Carbofuran.



**Tabla 15:** Evaluación de la linealidad instrumental.

PARAMETRO	SIMBOLO	VALOR
<b>Coefficiente de Correlación</b>	r	0.999
<b>Pendiente</b>	b	181,07
<b>Intercepto</b>	a	-15.92
<b>Desviación Estándar para el intercepto</b>	S <sub>a</sub>	4.78
<b>Desviación Estándar para la pendiente</b>	S <sub>b</sub>	1.67
<b>Estadístico t calculado para el intercepto</b>	t <sub>a</sub>	-3.33
<b>Estadístico t calculado para el pendiente</b>	t <sub>b</sub>	108.64
<b>Estadístico t calculado para r</b>	t <sub>r</sub>	108.64

t<sub>a</sub> tab, t<sub>b</sub> tab, t<sub>r</sub> tab : 2,16 (nivel de confianza: 95%, n-2 grados de libertad)

Como se observa en la tabla 15, se encontró que la pendiente es significativamente diferente de cero, y existe correlación significativa entre la concentración del analito y la respuesta (área) (Anexo 6)<sup>35,44,57</sup>. Sin embargo, se estableció que el intercepto es significativamente diferente cero, razón por la cual el valor calculado para este parámetro debe ser considerado al evaluar la concentración de Carbofuran en muestras reales a través de curvas de calibración preparadas en solvente.

En la tabla 16 se presentan los límites de confianza para la pendiente y el intercepto.

**Tabla 16:** Límites de confianza para la pendiente y el intercepto.

Plaguicida	$b \pm LCb_{\alpha=0,05}$		$a \pm LCa_{\alpha=0,05}$	
<b>Carbofuran</b>	177.47	184.67	-5.59	-26.27

$b \pm LCb$  son los límites inferior y superior para la pendiente;  $a \pm LCa$  son los límites inferior y superior para el intercepto, a un nivel de confianza del 95%

Con el fin de evaluar la regresión significativa entre la concentración del analito y la respuesta (área), y el desvío de la linealidad, se aplicó el test estadístico “Prueba F de Fischer”, para ello se realiza un análisis de varianzas (ANOVA) en el que se establecen las siguientes hipótesis:

Para la regresión lineal se tiene como  $H_0$ , “no hay regresión significativa en la curva de calibración”, y  $H_1$ , hay regresión significativa en la curva de calibración. Aquí  $F_{calc} > F_{teórico}$ , para una regresión significativa entre  $x$  y  $y$  (se rechaza la hipótesis nula).

Para el desvío de la linealidad se tiene como  $H_0$ , no hay desvío significativo de la linealidad en la curva de calibración,  $H_1$ , hay desvío significativo de la linealidad en la curva de calibración. Aquí  $F_{calc} < F_{teórico}$ , para un desvío no significativo de la linealidad (se acepta la hipótesis nula)<sup>35,44,58</sup>.

Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 17, en donde se muestra que no hay desvío significativo de la linealidad, así como también que existe regresión significativa entre la concentración de Carbofuran y la respuesta (área) brindada por el equipo. Los cálculos correspondientes se ilustran en el Anexo 6<sup>35,44,57</sup>.

**Tabla 17:** Análisis de varianza ANOVA.

Fuente de variación	Grados de libertad (gl)	Suma de cuadrados	Cuadrados Medios	F cal	F tab
<b>Regresión</b>	1	983636,34	983636,34	9400,78	4,96
<b>Error</b>	13	1083,36			
Carencia de ajuste o linealidad	3	37,03	12,34	0,12	3,71
Error puro	10	1046,33	104,63		
<b>Total</b>	14	984719,69			



### 6.5.3 Precisión instrumental.

➤ **Repetibilidad:** Se evaluó mediante el % C.V por nivel de concentración de plaguicida (Anexo 7)<sup>35,44</sup>. Los resultados se muestran en la tabla 18.

**Tabla 18:** Variación instrumental como repetibilidad por nivel de concentración.

NIVEL	Concentración (ppm)	% C.V*
N1	0.99	3,85
N2	1.50	3,02
N3	1.99	1,62
N4	3.0	1,50
N5	4.94	2,04

\*% C.V, Porcentaje de coeficiente de variación (n=3); n, replicas por nivel.

Se observa que para periodos cortos de tiempo (durante el mismo día) la variabilidad en la respuesta brindada por el equipo es baja, respecto a los obtenidos en otros estudios de validación, en los cuales se han encontrado % C.V hasta del 9.5%<sup>35,44</sup>.

➤ **Precisión Intermedia:** Se evaluó mediante el % C.V. por nivel de calibración<sup>35,44</sup>. En la siguiente tabla se muestran los resultados obtenidos.

**Tabla 19:** Variación instrumental como precisión intermedia por nivel de concentración.

NIVEL	Concentración (ppm)	%C.V
N1	0.99	4,78
N2	1.50	3,99
N3	1.99	3,67
N4	3.0	2,23
N5	4.94	2,50

\*% C.V Coeficiente de variación (n=5); N, nivel de calibración; n, replicas por nivel

Los % C.V presentados en la tabla 19 son inferiores a los obtenidos en otras investigaciones en las que se han establecido % C.V hasta del 12 %.

Respecto a los resultados correspondientes a los ensayos de repetibilidad y precisión intermedia instrumentales, se observa una mayor variabilidad en los

datos generados en días diferentes, lo cual se refleja en el incremento de los % C.V en el estudio de precisión intermedia. Esto debido probablemente a la preparación de nuevas soluciones de calibración y a la variabilidad en el comportamiento del equipo entre días<sup>35,44</sup>.

**6.5.4 Límites críticos instrumentales.** Los límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) instrumentales, se determinaron a través del método sugerido por la IUPAC como se presenta en el Anexo 8<sup>44</sup>, los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla:

**Tabla 20:** Límite de Detección y de Cuantificación Instrumentales.

PLAGUICIDA	N1 (µg/mL)	LOD (µg/mL)	LOQ (µg/mL)
Carbofuran	1,0	0,116	0,388

Los valores de LOD y LOQ obtenidos son menores que el primer nivel de la curva de calibración, por lo cual se puede decir que el método instrumental es suficientemente sensible para determinar los residuos del plaguicida estudiado. Además, dichos valores son inferiores a las cantidades normalmente aplicadas por los agricultores de la región en diferentes cultivos (Anexo 2 y 3).

Los niveles de la curva de calibración seleccionados corresponden a los sugeridos por la EPA para el análisis de Carbofuran en suelos<sup>7</sup>.

## 6.6 EVALUACIÓN DEL EFECTO MATRIZ.

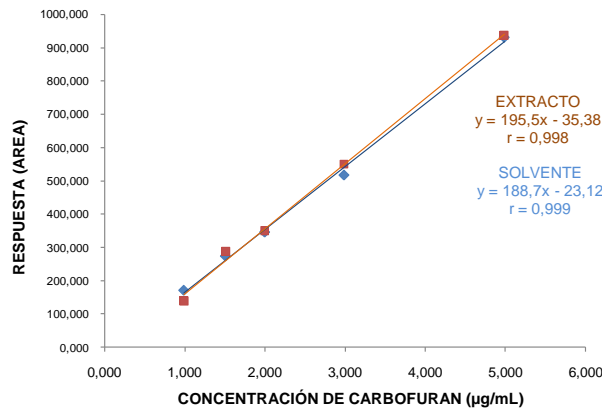
En HPLC a diferencia de CG el efecto matriz es poco común. En CG la posibilidad de efecto matriz es mayor, debido al proceso de volatilización de la muestra que ocurre en el puerto de inyección. Las sustancias co-extraídas pueden competir por los sitios activos en las partes del inyector (glass liner), así como también los componentes de la matriz no volátiles tienden a acumularse en la sección inicial de la columna originando sitios activos polares, donde se pueden generar los procesos indeseados de adsorción o descomposición de los analitos<sup>44</sup>.

Estos fenómenos son poco probables en HPLC, ya que el puerto de inyección únicamente actúa como receptor inicial de la muestra y no se presentan cambios físicos o químicos en ésta; razón por la cual se encuentran múltiples

investigaciones en las cuales se han cuantificado residuos de plaguicidas por HPLC empleando curvas de calibración en solvente<sup>3,7,9,35</sup>. Sin embargo, es importante tener en cuenta algunas de las recomendaciones que realizan diferentes entidades como la AOAC, FAO, EPA entre otras, en el libro “Principles and Practices of Method Validation”, en donde se sugiere la aplicación de diferentes métodos estadísticos para la evaluación del efecto matriz<sup>44</sup>.

La evaluación inicial de este efecto se realizó mediante el trazado de las curvas en solvente y en extracto (Figura 17), y el cálculo correspondiente al porcentaje de efecto matriz que relaciona la respuesta obtenida en extracto matriz con la respuesta obtenida en solvente. En la tabla 21 se muestran los porcentajes de efecto matriz para cada nivel de calibración. Aunque este cálculo no brinda una estimación estadística significativa del efecto matriz, provee una información visual clara.

**Figura 17:** Curva en extracto y solvente para la evaluación del efecto matriz.



**Tabla 21:** Porcentaje de efecto matriz por nivel de concentración.

NIVEL	N1	N2	N3	N4	N5
% E.M	80,86	104,87	101,09	106,35	100,76

\*N, nivel de calibración; %E.M, porcentaje de efecto matriz.

Aparentemente, algunos valores de % E.M se alejan un poco del 100 % lo que podría sugerir la existencia de efecto matriz, sin embargo, esto debe corroborarse mediante pruebas estadísticas como el método de regresión lineal y test pareado.

Para la aplicación del método de regresión lineal se realizó una gráfica que relaciona la respuesta del analito en extracto de matriz en función de la respuesta del analito en solvente. Se calculó a, b, sus desviaciones estándar ( $s_a$  y  $s_b$ ), r y los intervalos de confianza para b y a, los resultados obtenidos se muestran en la tabla 22 y los cálculos correspondientes se presentan en el anexo 9<sup>44</sup>.

**Tabla 22:** Regresión lineal para evaluar efecto matriz.

PARAMETRO	SIMBOLO	VALOR
Coefficiente de correlación	r	0,997
Pendiente	b	1,034
Intercepto	a	-10,42
Desviación estándar del intercepto	$s_a$	10,98
Desviación estándar de la pendiente	$s_b$	0,021
Intervalo de confianza para la pendiente	$b-LCb_{\alpha=0,05}$	0,99
	$b+LCb_{\alpha=0,05}$	1,08
Intervalo de confianza para el intercepto	$a-LCb_{\alpha=0,05}$	-34,14
	$a+LCb_{\alpha=0,05}$	13,30

$t_{tab}$ : 2.160 (nivel de confianza: 95%, n-2 grados de libertad)

Se observa que uno y cero están incluidos en los intervalos de confianza calculados para b y a, respectivamente. Por lo tanto, se concluye que tanto b como a no difieren significativamente de los valores de la línea de regresión lineal, (1 y 0 para b y a respectivamente), por lo que no hay diferencia entre las respuestas en solvente y en extracto, es decir no hay efecto inducido por la matriz<sup>44</sup>.

Con el objeto de corroborar el resultado obtenido mediante el método de regresión lineal, se aplicó la prueba estadística test pareado. Los cálculos correspondientes se muestran en el anexo 9. Los resultados indicaron la ausencia de efecto matriz al obtener un valor experimental para t inferior al valor de  $t_{tab}$  a un nivel de confianza del 95 % y n-1 grados de libertad<sup>44</sup>.

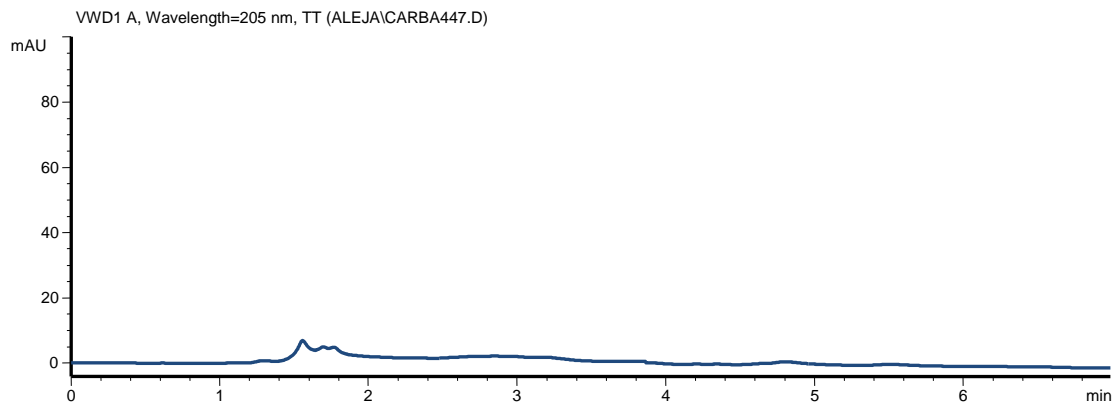
Las pruebas estadísticas realizadas muestran que no hay efecto matriz por lo cual se cuantificó el Carbofuran en muestras reales mediante la interpolación de las respuestas en curvas preparadas en solvente.

La ausencia de efecto matriz proporciona algunas ventajas entre las que se incluyen la disminución en los costos y tiempos de análisis. Se evita la saturación de la columna cromatográfica con sustancias indeseadas, protegiéndola e incrementando el tiempo de vida de la misma.

## 6.7 VALIDACIÓN DE LA METODOLOGÍA.

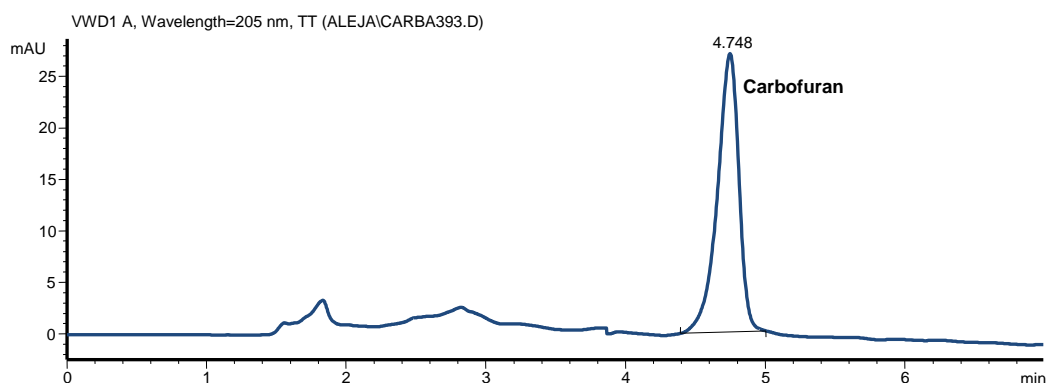
**6.7.1 Especificidad – selectividad.** Como se observa en la figura 18 el extracto blanco de matriz no presentó interferencias al tiempo de retención del Carbofuran.

**Figura 18:** Cromatograma de extracto blanco de matriz.



Se preparó e inyectó una solución de Carbofuran en extracto blanco de matriz al nivel dos de la curva de calibración (figura 19). En la tabla 23 se presentan el tiempo de retención y el factor de respuesta para el Carbofuran.

**Figura 19:** Cromatograma de una solución de Carbofuran en extracto blanco de matriz al nivel dos de calibración.



**Tabla 23:** Tiempo de retención y factor de respuesta para Carbofuran en extracto blanco de matriz.

PLAGUICIDA	tr (min)	Fr (area/concentración)
Carbofuran	4,75 ± 0,06	161.03

tr, tiempo de retención; Fr, factor de respuesta.

**6.7.2 Linealidad.** Corresponde a la linealidad determinada en la validación instrumental, ya que no se presentó efecto matriz significativo y por ello las muestras de suelo fortificadas a cinco niveles de concentración se cuantificaron con curvas de calibración preparadas en solvente en un rango de calibración de 0.99 a 4.94 µg/mL, correspondientes a 0.5 y 2.4 mg/Kg aproximadamente (Anexo 3). Dichos niveles se muestran en la tabla 24.

**Tabla 24:** Niveles de fortificación del suelo.

N1		N2		N3		N4		N5	
µg/mL	mg/Kg	µg/mL	mg/Kg	µg/mL	mg/Kg	µg/mL	mg/Kg	µg/mL	mg/Kg
0.99	0.48	1.50	0.72	1.99	0.95	3.0	1.44	4.94	2.37

\*N corresponde a cada nivel de concentración; µg/ml: µg de Carbofuran/mL de solución; mg/kg: mg de Carbofuran/Kg de suelo seco.

### 6.7.3 Precisión y Exactitud.

➤ **Repetibilidad:** Los resultados obtenidos se convirtieron en unidades de concentración usando la curva de calibración preparada en solvente e inyectada el mismo día del análisis. Se evaluó la normalidad de los datos a través del método de Shapiro - Wilk (anexo 5), los resultados indicaron que los datos obtenidos provienen de una población con distribución normal.

La exactitud y la precisión por nivel de concentración en el ensayo de repetibilidad se evaluaron a través del cálculo de los % R y los % C.V, respectivamente (Anexo 10)<sup>35,44,58</sup>. Los resultados obtenidos se presentan en la siguiente tabla.

**Tabla 25:** Exactitud y precisión por nivel de concentración de Carbofuran en el ensayo de repetibilidad.

NIVEL	% R	% C.V
1	128,08	7,65
2	112,00	6,74
3	112,46	5,01
4	97,60	3,98
5	98,70	2,58

\*C.V, Coeficiente de variación; %R: porcentaje de recuperación

La tabla 25 muestra que existe concordancia entre los resultados obtenidos en periodos cortos de tiempo (el mismo día), ya que dichos valores son inferiores al 15 %<sup>44</sup>. Además los porcentajes de recuperación son adecuados ya que se encuentran entre el 70 y el 120 %, valores establecidos por la EPA como criterio de aceptación en la validación de métodos para el análisis de residuos de plaguicidas y drogas veterinarias para concentraciones entre 0.4 y 2.0 mg/kg<sup>44</sup>, excepto al nivel 1 que presenta un % R superior al 120 %, pero cuya variabilidad es adecuada.

Por otra parte, se demostró que existe homogeneidad de varianzas mediante la aplicación del test estadístico de Cochran respecto a los cinco niveles de concentración estudiados, los resultados se presentan en el anexo 11.

➤ **Precisión intermedia:** Los resultados obtenidos se convirtieron en unidades de concentración usando la curva de calibración preparada en solvente e inyectada el mismo día del análisis. Se probó la normalidad de los resultados obtenidos a través de la prueba de normalidad de Shapiro - Wilk, encontrando que dichos valores provienen de una población con distribución normal (anexo 5).

La exactitud y la precisión por nivel de concentración en el ensayo de precisión intermedia se evaluaron mediante el cálculo de los % R y los % C.V, respectivamente. Los resultados obtenidos se presentan en la siguiente tabla (Anexo 10).

**Tabla 26:** Exactitud y precisión por nivel de concentración de Carbofuran en el ensayo de precisión intermedia.

NIVEL	% R	% C.V
1	97,03	10,68
2	99,23	8,64
3	99,89	5,98
4	93,16	13,35
5	101,94	13,49

\*%C.V, Coeficiente de variación; %R: porcentaje de recuperación

Se observa que existe concordancia entre los resultados obtenidos durante diferentes días, esto se puede decir ya que los % C.V son inferiores al 16 %<sup>44</sup>. Igualmente, los %R son adecuados por encontrarse entre el 70 y 120 % , tal como lo establece la EPA en los “Criterios de Aceptación en la Validación Intra-Laboratorio para el Análisis de Residuos de Plaguicidas y Drogas Veterinarias” para concentraciones entre 0.4 y 2.0 mg/kg<sup>44</sup>.

Los % C.V mostrados en las tablas 25 y 26 muestran que se presenta una mayor variabilidad en los datos obtenidos en días diferentes (precisión intermedia) respecto a los obtenidos durante la aplicación de la metodología en el estudio de repetibilidad (el mismo día). Esto debido probablemente a la preparación de nuevas porciones analíticas fortificadas y evaluadas en diferentes curvas de calibración, así como también a posibles variaciones del instrumento y del entorno en general.



Con el fin de evaluar si la variabilidad de los resultados es afectada por los niveles de concentración, se realizó la prueba de homogeneidad de varianzas mediante la aplicación del test de Cochran. Los cálculos correspondientes se presentan en el anexo 11<sup>44</sup>.

Los resultados de esta prueba indicaron homogeneidad de varianzas, es decir, que el nivel de concentración de Carbofuran no afectó la variabilidad en los resultados. Por ello fue posible determinar un coeficiente de variación para la metodología global ( $C.V_{tip}$ )<sup>35,44</sup>.

Ya que la estimación de varianzas basadas en un pequeño número de muestras es imprecisa, la mejor estimación de la precisión del método es el promedio de las varianzas obtenidas; el cálculo adecuado es a través del coeficiente de variación típico ( $C.V_{tip}$ ) que depende del promedio de las varianzas de los recuperados y de la recuperación promedio como se muestra en la siguiente ecuación<sup>35,44</sup>:

$$C.V_{tip} = \frac{\sqrt{s^2_{prom}}}{X_{prom}}$$

Donde,  $s^2_{prom}$  es el promedio de las varianzas de los recuperados, y  $X_{prom}$  es el promedio de los recuperados.

Igualmente es posible calcular el % R del plaguicida para la metodología global.

En la tabla 27 se resumen los resultados de exactitud y precisión como precisión intermedia para el plaguicida y para la metodología en general.

**Tabla 27.** Precisión intermedia y exactitud para la metodología global.

NIVEL	% R	% C.V	s	s <sup>2</sup>	CV <sub>tip</sub>
1	97,03	10,63	10,31	106,33	<b>10,78</b>
2	99,23	8,59	8,53	72,73	
3	99,89	5,99	5,98	35,78	
4	93,16	13,40	12,48	155,80	
5	101,94	13,51	13,77	189,73	
<b>% R<sub>prom</sub> y % C.V<sub>r</sub></b>	<b>98,25</b>	<b>10,42</b>	<b>s<sup>2</sup><sub>prom</sub></b>	<b>112,07</b>	

\*%CV<sub>r</sub>: coeficiente de variación incluyendo todo el rango de calibración;  $CV_r = [(\sqrt{s^2_{prom}}) * 100] / \%R_{prom}$ ;  $s^2_{prom}$ , promedio de las varianzas de los recuperados; C.V<sub>tip</sub>, Coeficiente .de variación típico.

Los % R del plaguicida para cada nivel de concentración son adecuados, lo cual se ve reflejado en el porcentaje de recuperación promedio de la metodología (%R<sub>prom</sub>). La dispersión de la metodología global es apropiada y aunque los experimentos se realizan en días diferentes el método es preciso. Estos resultados indican que la metodología propuesta es adecuada para realizar análisis de rutina en la determinación de residuos de Carbofuran en suelos.

**6.7.4 Límites de detección y de cuantificación.** Se determinaron los límites de detección y cuantificación para la metodología empleando extracto blanco de matriz (Anexo 12). Los valores calculados para LOD y LOQ se presentan en la Tabla 28, donde se muestran también los resultados para los límites críticos instrumentales.

**Tabla 28:** Comparación de los límites críticos instrumentales y de la metodología.

NIVEL 1 (mg/Kg)	mg/Kg				Furadan aplicado (mg/Kg)
	LOD <sub>METOD</sub>	LOD <sub>INST</sub>	LOQ <sub>METOD</sub>	LOQ <sub>INST</sub>	
0.48	0.045	0.054	0.149	0.182	0.49

\*mg/kg: mg de Carbofuran/Kg de suelo seco.

Como se observa en la tabla 28, los límites críticos tanto para la metodología como los instrumentales son muy similares, lo cual se espera considerando que no hay efecto significativo inducido por la matriz.

Por otra parte, la metodología validada ofrece la sensibilidad suficiente para determinar residuos de Carbofuran en suelos del departamento del Cauca, teniendo en cuenta que los límites críticos determinados son inferiores respecto a la cantidad de Carbofuran (Furadan) aplicada por parte de los agricultores de la región (Anexo 2).

**6.7.5 Robustez.** La matriz que se empleó para realizar el estudio de robustez mediante el diseño experimental de Youden - Steiner se muestra en la tabla 29. Para cada factor se calculó el efecto que supone utilizar el valor indicado en el método validado y el alternativo<sup>20,43,46</sup>.

El efecto de cada una de las variables se determinó evaluando los porcentajes de recuperación obtenidos en cada experimento. Para ello se calculó la media de los

cuatro análisis que contienen la variable en su valor de validación (letras en mayúsculas) y aquellos que corresponden al valor alterado (letras en minúsculas), de tal forma que el efecto de cambio para el factor A (tiempo de agitación) se determina a través de la siguiente diferencia<sup>20</sup>:

$$V_A = \frac{1}{4} [(s+t+u+v) - (w+x+y+z)]$$

Una inspección detallada de la matriz del diseño experimental de Youden-Steiner presentada en la tabla 29, indica que la media de los resultados (s+t+u+v) es equivalente al valor de validación representado por "A", ya que las seis variables restantes se anulan entre si como consecuencia de que existen siempre dos mayúsculas y dos minúsculas representativas de cada factor. Análogamente, la media de los resultados (w+x+y+z) equivale al valor alterado representado por "a"; mediante la comparación de estos dos valores medios se determinó la influencia de la variable en estudio. Para calcular el efecto de cambio o variabilidad para los otros factores se procedió de forma similar, aplicando las ecuaciones presentadas en la tabla 30<sup>20,46</sup>.

**Tabla 29.** Matriz del diseño experimental de Youden-Steiner para robustez<sup>46</sup>.

		<b>EXPERIMENTOS</b>							
		<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>
<b>FACTORES</b>		<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>a</b>	<b>a</b>	<b>a</b>	<b>a</b>
		AGITACIÓN 3H	AGITACIÓN 3H	AGITACIÓN 3H	AGITACIÓN 3H	AGITACIÓN 2H	AGITACIÓN 2H	AGITACIÓN 2H	AGITACIÓN 2H
		<b>B</b>	<b>B</b>	<b>b</b>	<b>b</b>	<b>B</b>	<b>B</b>	<b>b</b>	<b>b</b>
		VOL. AcOEt 25 mL	VOL. AcOEt 25 mL	VOL. AcOEt 15 mL	VOL. AcOEt 15 mL	VOL. AcOEt 25 mL	VOL. AcOEt 25 mL	VOL. AcOEt 15 mL	VOL. AcOEt 15 mL
		<b>C</b>	<b>c</b>	<b>C</b>	<b>c</b>	<b>C</b>	<b>c</b>	<b>C</b>	<b>c</b>
		35°C ROTAEVA.	40°C ROTAEVA.	35°C ROTAEVA.	40°C ROTAEVA.	35°C ROTAEVA.	40°C ROTAEVA.	35°C ROTAEVA.	40°C ROTAEVA.
		<b>D</b>	<b>D</b>	<b>d</b>	<b>d</b>	<b>d</b>	<b>d</b>	<b>D</b>	<b>D</b>
		500 µL EXTRACTO SPE	500 µL EXTRACTO SPE	800 µL EXTRACTO SPE	800 µL EXTRACTO SPE	800 µL EXTRACTO SPE	800 µL EXTRACTO SPE	500 µL EXTRACTO SPE	500 µL EXTRACTO SPE
		<b>E</b>	<b>e</b>	<b>E</b>	<b>e</b>	<b>e</b>	<b>E</b>	<b>e</b>	<b>E</b>
		10 mL AcN ELUCION SPE	5 mL AcN ELUCION SPE	10 mL AcN ELUCION SPE	5 mL AcN ELUCION SPE	5 mL AcN ELUCION SPE	10 mL AcN ELUCION SPE	5 mL AcN ELUCION SPE	10 mL AcN ELUCION SPE
		<b>F</b>	<b>f</b>	<b>f</b>	<b>F</b>	<b>F</b>	<b>f</b>	<b>f</b>	<b>F</b>
		TIEMPO DE INYECCIÓN 6 H	TIEMPO DE INYECCIÓN 24 H	TIEMPO DE INYECCIÓN 24 H	TIEMPO DE INYECCIÓN 6 H	TIEMPO DE INYECCIÓN 6 H	TIEMPO DE INYECCIÓN 24 H	TIEMPO DE INYECCIÓN 24 H	TIEMPO DE INYECCIÓN 6 H
	<b>G</b>	<b>g</b>	<b>g</b>	<b>G</b>	<b>g</b>	<b>G</b>	<b>G</b>	<b>g</b>	
	FLUJO FM 0.7 mL/min	FLUJO FM 1.0 mL/min	FLUJO FM 1.0 mL/min	FLUJO FM 0.7 mL/min	FLUJO FM 1.0 mL/min	FLUJO FM 0.7 mL/min	FLUJO FM 0.7 mL/min	FLUJO FM 1.0 mL/min	
<b>RESULTADO</b>		<b>s</b>	<b>t</b>	<b>u</b>	<b>v</b>	<b>w</b>	<b>x</b>	<b>y</b>	<b>z</b>

**Tabla 30:** Variabilidad para cada factor en el ensayo de robustez

VARIABLE	VALOR DE VALIDACIÓN	VALOR ALTERADO	VARIABILIDAD
Tiempo de extracción en el Agitador.	3 horas	2 Horas	$V_A = 1/4 (s+t+u+v) - 1/4 (w+x+y+z)$
Volumen de solvente para la extracción.	25 mL	15 mL	$V_B = 1/4 (s+t+w+x) - 1/4 (u+v+y+z)$
Secado en el evaporador rotatorio.	35 °C	40 °C	$V_C = 1/4 (s+u+w+y) - 1/4 (t+v+x+z)$
Volumen de extracto para SPE.	500 µl	800 µL	$V_D = 1/4 (s+t+y+z) - 1/4 (u+v+w+x)$
Volumen de solvente para la elución en SPE.	10 mL	5 mL	$V_E = 1/4 (s+u+x+z) - 1/4 (t+v+w+y)$
Tiempo entre preparación e inyección	6 Horas	24 Horas	$V_F = 1/4 (s+v+w+z) - 1/4 (t+u+x+y)$
Flujo FM en HPLC.	0,7 mL / min	1,0 mL/min	$V_G = 1/4 (s+v+x+y) - 1/4 (t+u+w+z)$

Las diferencias mayores indican que los factores correspondientes tienen mayor influencia que el resto sobre la precisión del método. Estadísticamente para decidir si la influencia de un factor es relevante se compara el valor del efecto con la expresión  $s\sqrt{2}$ , donde  $s$  es la desviación estándar obtenida en el ensayo de repetibilidad del método. Las diferencias superiores en valor absoluto al resultado de esta expresión se consideran significativas, los resultados se muestran en la siguiente tabla<sup>43,46</sup>.

**Tabla 31.** Efecto de cada factor sobre el porcentaje de recuperación del plaguicida.

VARIABLE	VARIABILIDAD	$s\sqrt{2}$
Tiempo de extracción en el Agitador	$IV_{Al} = 5,11$	
Volumen de solvente de extracción.	$IV_{Bl} = 8,43$	
Secado en el evaporador rotatorio	$IV_{Cl} = 0,90$	
Volumen extracto SPE	$IV_{Dl} = 2,67$	9,73
Volumen de solvente de elución en SPE	$IV_{El} = 10,13$	
Tiempo entre preparación e inyección	$IV_{Fl} = 4,91$	
Flujo FM en HPLC	$IV_{Gl} = 27,69$	

s: desviación estándar;  $s = [(CV_r * \%R_{pr})/100]$  donde  $CV_r = 6.25$  y  $\%R_{pr} = 110.0$  (en el ensayo de repetibilidad);  $s = 6.88$

La tabla 31 muestra que los factores que influyen en mayor proporción sobre la recuperación del plaguicida son el flujo de la FM en el HPLC y el volumen del solvente de elución en los cartuchos de SPE, razón por la cual es importante controlar éstos parámetros al realizar la determinación de residuos de Carbofuran en suelos. Sin embargo, en algunos ensayos preliminares se observó la influencia considerable en el tiempo de extracción como se aprecia en la tabla 10, por lo que

se estableció un periodo de tres horas de agitación para asegurar una adecuada extracción del plaguicida.

Teniendo en cuenta que la variabilidad obtenida para la mayoría de factores seleccionados es inferior al valor de  $s\sqrt{2}$ , se considera que la metodología validada es robusta es decir estable frente a pequeños cambios susceptibles de producirse durante su utilización en análisis de rutina, proporcionando de esta manera resultados válidos.

## **6.8 ELABORACIÓN DEL PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDARIZADO (POE).**

El POE describe en forma detallada el procedimiento que se debe seguir para realizar el análisis de Carbofuran en muestras de suelo. Este documento comprende un objetivo principal, notas de seguridad, alcance, preparación de soluciones, elaboración de la curva de calibración, preparación de la matriz, procesamiento de la muestra (homogenización, toma y análisis de la porción analítica), preparación de los recuperados de control y su análisis, confirmación de muestras positivas, manejo de resultados y bibliografía básica. La descripción del POE se encuentra en el anexo 13.

El laboratorio debe contar con una muestra de suelo exenta de N-MCs, la cual es empleada para la preparación de dos recuperados de control fortificados. Estos controles son sometidos al mismo proceso de extracción, limpieza y determinación realizado a las muestras, con el fin de llevar a cabo un control del desempeño de la metodología.

## 7. CONCLUSIONES

Los análisis físicos y químicos realizados a la muestra de suelo obtenida de la Finca Santa Rosa en el municipio de Cajibío, Departamento de Cauca, permitieron establecer las propiedades aproximadas que deben presentar los suelos para los cuales es aplicable la metodología validada. El pH ácido del suelo es uno de los parámetros más relevantes, considerando que el Carbofuran es estable a valores de pH ácidos y se hidroliza a valores de pH alcalinos. De esta forma se garantiza la estabilidad del plaguicida durante la aplicación de la metodología validada.

Se validó el sistema instrumental empleando HPLC-UV, el cual brindó selectividad por presentar una respuesta clara para el analito de interés; linealidad en el rango de 0.99 a 5.0 µg/mL con un coeficiente de correlación de aproximadamente 0.999; preciso con % C.V desde 1.50 a 4.78 %; y suficientemente sensible para permitir la detección y cuantificación de residuos de Carbofuran en suelos, al nivel de las concentraciones aplicadas sobre diversos cultivos.

Mediante la aplicación de diferentes pruebas estadísticas se constató la ausencia de efecto matriz, por ello es posible realizar la cuantificación del Carbofuran en muestras reales empleando curvas preparadas en solvente, disminuyendo de esta manera los costos y tiempos de análisis, e incrementando el tiempo de vida de la columna cromatográfica.

La validación de la metodología mostro linealidad en el rango de 0.47 a 2.36 mg/Kg, específica y selectiva para el plaguicida de interés, precisa considerando que los % C.V se encuentran entre el 2.58 y 13.49 %, y exacta con % R entre 93 y 120 %. Suficientemente sensible con LOD y LOQ de 0.045 y 0.149 mg/Kg respectivamente.

Considerando que el nivel de concentración no influye en la recuperación del plaguicida se tiene que el % R y la precisión para la metodología global fueron equivalentes al 98.25 y 10.78% respectivamente, valores que se encuentran dentro de los rangos establecidos por la IUPAC<sup>44</sup>.

El estudio de robustez reveló que algunos factores como el volumen de solvente de elución en la SPE y el flujo de la FM en el HPLC, deben ser controlados con el fin de obtener resultados adecuados. Sin embargo, ya que la mayoría de los factores exhibieron una variabilidad baja, se considera que la metodología es robusta bajo las condiciones de trabajo establecidas.

El proceso de validación e implementación de la metodología analítica propuesta permitió llevar a cabo la formulación del correspondiente procedimiento operativo estandarizado (POE), el cual se encuentra anexo al finalizar este documento.



## **8. RECOMENDACIONES**

Someter la metodología a estudios inter-laboratorios para evaluar la reproducibilidad de la misma.

Aplicar la metodología validada para el análisis de muestras de suelo en donde podrían encontrarse residuos de Carbofuran, con el fin de predecir posibles efectos sobre otros compartimentos ambientales y sobre los ecosistemas en general.

Implementar la metodología validada a diferentes matrices, como alimentos y agua, con el fin de ampliar la aplicabilidad de la misma, evaluando los parámetros de validación que sean necesarios.

Emplear la metodología como punto de partida para el desarrollo de metodologías de análisis de plaguicidas multiresiduo, que permitan llevar a cabo un seguimiento de este tipo de sustancias en los diferentes compartimentos ambientales así como en alimentos.

## BIBLIOGRAFIA

1. DEBRA, E. Ph. D. Document of EPA, Interim Registration Eligibility Decision (IRED). Document for Carbofuran (2006); p. 1-38.
2. PRADOS; HERRERA. Study of the feasibility of focused microwave – assisted Soxhlet extraction of N-methylcarbamates from soil. En: Journal of Chromatog. A, 953 (2002); p. 133 – 140.
3. LEI SUN; HIAN KEE LEE. Optimization of microwave – assisted extraction and supercritical fluid extraction of carbamate pesticides in soil by experimental design methodology. En: Journal of Chromatog A, 1014 (2002); p.165 – 177.
4. SOGORB; VILLANOVA. Técnicas analíticas de contaminantes químicos, Aplicaciones toxicológicas, mediambientales y alimentarias. Editorial Diaz de Santos. España (2004); p. 15-16, 27-37.
5. EPA. Method 3550B. Ultrasonic Extraction (1996); p. 1-14.
6. SANCHEZ, RODRIGUEZ. Multiresidue analysis of carbamate pesticides in soil by sonication – assisted extraction in small columns and liquid chromatography. En: Journal of Chromatog. A, 1007 (2003); p. 85 – 91.
7. EPA. Method 8318A N-Methylcarbamates by High performance liquid chromatography (2000); p. 1-26.
8. NUNES. G. S. y otros. Comparison of Different Clean-up Procedures for the Determination of N-Methylcarbamate Insecticides in Vegetable Matrices by HPLC with UV detection. En: J Chromatogr A, 795 (1998); p. 43 – 51.
9. KHIN L. Z., y SOMPORN C. Optimization Method of Determination of Carbofuran and Carboxin Residues in Cabbages by SPE and HPLC-UV. En: Chiang Mai J. Sci., 34 (2) (2007); p. 227-234.
10. COOK. J., y otros. Multiresidue Analysis of Pesticides in Fresh Fruits and Vegetables Using Procedures Developed by the Florida Department of Agriculture and Consumer Services, En: J. of AOAC international, 82, No. 6 (1999); p. 1419 – 1435.

11. McGARVEY. B. D. High-Performance Liquid Chromatographic Methods for the Determination of N-Methylcarbamate Pesticides in Water, Soil, Plants and Air. En: *J. Chromatography*, 642 (1993); p. 89 - 105.
12. TADEO, y otros. Analysis of Herbicide Residues in Cereals, Fruit and Vegetables, En: *J Chromatogr A*, 882 (2000); p. 175 - 191.
13. BUSCEMA. I., y otros. Método de Extracción líquido sólido para el análisis de Residuos de Plaguicidas N-metilcarbamatos en aguas, Facultad de Agronomía, Universidad de Zulia, Maracaibo - Venezuela (1999).
14. SANTOS. M., RUBIO. S., TOLEDANO. G., y POLO-DÍEZ. L. Stability Studies of Carbamate Pesticides and Analysis by Gas Chromatography with Flame Ionization and Nitrogen-Phosphorus Detection. En: *J Chromatogr A.*, 921(2001); p. 287-296.
15. KRAUSSE. R. T. Resolution, Sensitivity and Selectivity of a High-Performance Liquid Chromatographic Post-Column Fluorimetric Labeling Technique for Determination of Carbamate Insecticides. En: *J Chromatogr.*, 185 (1979); p. 615-624.
16. KRAUSSE. R. T. Multiresidue Method for Determining N-Methylcarbamate Insecticides in Crops, Using High Performance Liquid Chromatography. En: *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 63 (1980); p. 1114-1124.
17. PARRILLA., MARTINEZ VIDAL., MARTINEZ FERNANDEZ. Reversed – phase liquid chromatographic column switching for the determination of N-methylcarbamates and some of their main metabolites in urine. En: *Journal of Chromatog. B*, 738 (2000); p. 387-394.
18. ICONTEC. Cómo Implementar un Sistema de Gestión Práctico y Eficaz en Laboratorios de Ensayo y Calibración (2004); p. 40-51, 67-87.
19. IGAC, Métodos Analíticos del Laboratorio de Suelos. Imprenta Nacional de Colombia, Sexta Edición (2006); p. 3-22, 26-48, 51-121. 332-333.
20. FAO, Proyecto TCP/RLA/3013 (A) “Desarrollo de un sistema integral de Aseguramiento de Calidad para Laboratorios de Análisis de Alimentos en América del Sur”. En: Taller Subregional sobre Aseguramiento de Calidad y

- Validación de Metodologías para Análisis Químicos, Bogotá (Colombia) (2005); p. 1-28.
21. R. CREMLYN., Plaguicidas Modernos y su acción bioquímica. Editorial Limusa, México (1982); p. 11-333. 1982.
22. CACERES. T., YING. GUANG-GUO., KOOKANA. R. Sorption of Pesticides Used in Banana Production on Soils of Ecuador, En: Aust. J. Soil Res., 40 (2002); p.. 1085-1094.
23. SOCIEDAD COLOMBIANA DE CIENCIAS DEL SUELO (SCCS). Fundamentos para la Interpretación de Análisis de Suelos, Plantas y Agua para riego. Tercera Edición, Santafé de Bogotá, Colombia (1990); p. 141-155, 164-183, 186-190, 197-205, 227-239.
24. LOPEZ RITAS J., y LOPEZ MELIDA J., El diagnóstico de suelos y plantas. Métodos de campo y laboratorio. Cuarta edición, Ediciones Mundi-Prensa. Madrid (1985); p. 89-91, 112-115.
25. SOCIEDAD COLOMBIANA DE LA CIENCIA DEL SUELO (SCCS). Fertilidad de Suelos. Diagnóstico y Control. SCCS, Segunda Edición (2001); p. 13-14, 113-116, 155-217.
26. GIRALDO E. Agroquímica: Un estudio de los nutrientes esenciales en la producción agrícola. Universidad del Cauca, Facened, Departamento de Química, Popayán (2002).
27. CROSBY. D. G., Environmental Toxicology and Chemistry, New York Oxford, Oxford University Press (1998); p. 23-29.
28. MINISTERIO DE SALUD, DECRETO No. 775 de Noviembre 8 de 1990, Bogotá - Colombia.
29. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). Código Internacional de Conducta para la Distribución y Utilización de Plaguicidas. Roma (2003).
30. EPA. Disponible en internet: <<http://www.epa.gov/pesticides/about/types.htm>>. Última actualización: Julio 24 de 2007

31. Disponible en internet: [http://www.pesticides.gov.uk/about\\_pesticides.asp?id=219](http://www.pesticides.gov.uk/about_pesticides.asp?id=219). Última actualización: 2007.
32. EPA. Disponible en internet: <http://www.epa.gov/pesticides/about/index.htm> Última actualización: Julio de 2007.
33. LINDE. C., Physico-Chemical Properties and Environmental Fate of Pesticides, En: Environmental Hazards Assessment Program, Environmental Protection Agency, California.
34. TOLEDO. C., Dinámica de los Plaguicidas sobre el suelo, Contaminación de suelos y sedimentos. Laboratorio Químico de Monitoreo Ambiental LAQMA LTDA (1999).
35. VALENCIA M., Tesis de grado maestría: Determinación de residuos N-metilcarbamatos en fresa (*fragaria spp.*) y evaluación de la adsorción - desorción de <sup>14</sup>C-carbofuran en suelos del mismo cultivo, Director: GUERRERO J., Facultad de Ciencias, Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia. (2005).
36. BRIAN D. M., High -Performance liquid chromatography methods for the determination of N-methylcarbamate pesticides in water, soil, plants and air. En: Journal of Chromatography, 642 (1993); p. 89 – 105.
37. Universidad del Alcala. Disponible en internet: [http://www2.uah.es/tejedor\\_bio/bioquimica\\_ambiental/BA-RES-12.pdf](http://www2.uah.es/tejedor_bio/bioquimica_ambiental/BA-RES-12.pdf) .
38. Disponible en internet: <http://extoxnet.orst.edu/pips/carbofur.htm> Última actualización: Junio de 1996.
39. EVERT. S., Environmental Fate of Carbofuran, Environmental Monitoring Branco. Department of Pesticide Regulation, Sacramento (2002).
40. Dupont Agrosoluciones. Disponible en internet: [http://agrosoluciones.dupont.com/esp/ficha\\_tecnica.php?producto=40](http://agrosoluciones.dupont.com/esp/ficha_tecnica.php?producto=40) ().

41. DELLE A., Factors Affecting Sorption of organic compounds in Natural Sorbents / Water Systems and sorption coefficients for selected pollutants. A Review. En: J. Phys. Chem, Vol. 30, No 1, Rome, Italy (2001).
42. FAO. Disponible en internet: <<http://www.fao.org/WAICENT/FAOINFO/AGRICULT/AGP/AGPP/Pesticid/JM PR/Download/2001>>. Última actualización: 2007.
43. QUATTROCCHI. O., y otros, Introducción a la HPLC. Aplicación y Práctica, Impreso en artes gráficas Ferro S.A., Buenos Aires (1992); p. 283 – 287, 301-327.
44. FAJGELJ., AMBRUS., Principles and Practices of Method Validation, Royal Society of Chemistry, Budapest (Hungria) (2000); p. 243-248, 138-175, 179-187.
45. M. THOMPSON et al, Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report), En: Pure and Applied Chemistry 74 (2002); p. 835–855.
46. Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria. AEFI, Validación de Métodos Analíticos. Sociedad de Validación de Sistemas, S.L. Barcelona, (2001).
47. BRAVO I., GIRALDO E., Manual de Prácticas de Laboratorio de Química Agrícola: Análisis de suelo. Universidad del Cauca (1999).
48. AMBRUS. A., Worked Example for Validation of a Multi-residue Method. En: Ambrus, A; Fajgelj., Principles and Practices of Method Validation. Royal Society of Chemistry. UK. (2000); p. 157-175.
49. EPA. Fate, Transport and Transformation Test Guidelines. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Sediment and Soil Adsorption/Desorption Isotherm (1998).
50. FASSBENDER, H. W., BORNEMISZA E., Química de los suelos con Énfasis en suelos de América Latina, Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura, Costa Rica (1987); p. 45-87, 199-246.

51. EISLER R., Carbofuran Hazards to Fish, Wildlife, and Invertebrates: A Synoptic Review, U.S. Fish and Wildlife Service Biological Report 85 (1.3), 36 pp.
52. SALISBURY F. B., ROSS C. W. Fisiología Vegetal, Grupo Editorial Iberoamericana, México D. F (1994); p. 143.
53. ANDRADES. M., RODRÍGUEZ. M., BERNAL. M., SANCHEZ-MARTIN. M., SANCHEZ-CAMAZANO. M., Influencia de la Modificación de Suelos con un Surfactante Catiónico en el Incremento de Adsorción de Pesticidas por Suelos. En: Estudios de la Zona No Saturada del Suelo. 6 (2003); p. 343-348.
54. BASKARAN. S., BOLAN. N., RAHMAN. A., TILLMAN. R., Pesticide Sorption by Allophanic and Non-Allophanic Soils of New Zealand. En: *J. of Agr. Res.* 39 (1996); p. 297-310.
55. SÁNCHEZ. L., ROMERO. E., SÁNCHEZ. F., DIOS. G., CASTILLO. A., CABRERA. J., PEÑA. A., Efecto de la Adición de Materia Orgánica y Surfactantes Sobre el Comportamiento de Metidation en Suelos de La Vega de Granada. En: Estudios de la Zona No Saturada del suelo (1999); p.109-114.
56. CASTILLO A., DELFINO M., SUBOVSKY M., y otros, Movilidad de Carbofuran en Columnas de Suelo. Universidad Nacional del Nordeste. En: Comunicaciones científicas y tecnológicas (2003).
57. MILLER, N. J., MILLER, J. C., Estadística y Quimiometría para Química Analítica, Pearson Education S.A., Cuarta Edición, Madrid (2002).
58. DANGOND J. J., GUERRERO J. A., Metodología para la Determinación de Residuos de Fungicidas Benzimidazolicos en Fresa y Lechuga por HPLC-DAD. En: Revista Colombiana de Química. v.35, N°.1, Bogotá (2006).

## ANEXOS

### ANEXO 1: METODOLOGIA PARA LA CARACTERIZACIÓN FÍSICA Y QUÍMICA DEL SUELO.

A continuación se presentan las especificaciones de las metodologías aplicadas en el análisis físico y químico realizado a la muestra de suelo utilizada para la validación.

#### 1. Análisis Físicos<sup>18,47</sup>.

➤ **Humedad de campo.** Se refiere al contenido de agua con relación al peso o volumen de la masa de suelo. En este caso se determina por el método gravimétrico que es la relación entre la masa de agua y la masa de los sólidos del suelo. Este método consiste en pesar la muestra antes y después del calentamiento a 105°C con el objeto de eliminar el agua superficial en una estufa con circulación de aire forzado.

➤ **Humedad.** Igualmente se determina por el método gravimétrico una vez seca la muestra al aire. Este valor se utilizará para expresar los resultados en base seca.

➤ **Densidad real.** Se determina mediante el método del picnómetro, que consiste en determinar la masa y el volumen de los sólidos del suelo a través de un frasco de volumen conocido.

➤ **Densidad aparente.** Es la relación entre la masa del suelo por unidad de volumen aparente de suelo seco. Se determina mediante el método del terrón parafinado, que consiste en separar cuidadosamente del suelo "in situ" terrones de 50 a 100g y luego pesarlos, recubrirlos con parafina, volverlos a pesar y determinar el volumen por el desplazamiento que produce el terrón parafinado en el agua.

➤ **Textura.** Se refiere a las proporciones de arena limo y arcilla (partículas menores de 2mm de diámetro) que se encuentran en una masa de suelo. Se determina mediante el método de Bouyoucos que consiste en medir la cantidad de sólidos en suspensión por medio de un hidrómetro. La profundidad del centro de flotación del Hidrómetro varía con la densidad de la suspensión y también con la



textura. Después de 40 segundos, todas las partículas mayores de 50 micras sedimentarán de tal manera que no tendrán influencia sobre el hidrómetro. Las lecturas realizadas una hora después, corresponden a partículas mayores de 5 micras y a las dos horas a partículas menores de 2 micras. El método se fundamenta en la ley de Stockes (ecuación 1A) que dice que la velocidad de caída de las partículas de diferente tamaño en un medio líquido es directamente proporcional al cuadrado del radio de la partícula. En resumen, la ley de Stockes está dada por la siguiente ecuación:

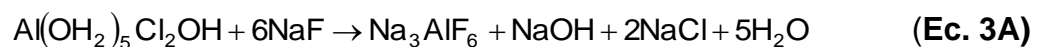
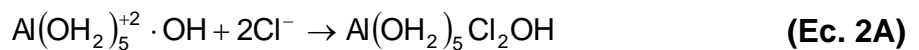
$$V = \frac{2g(d_s - d')r^2}{9\mu} \quad (\text{Ec. 1A})$$

Donde g es la gravedad,  $d_s$  es la densidad de las partículas,  $d'$  es la densidad del medio en que se encuentran y  $\mu$  la viscosidad del medio.

## 2. Análisis Químicos<sup>18,47</sup>.

➤ **pH.** Se determina mediante el método potenciométrico, en una suspensión suelo: agua en relación 1:1.

➤ **Acidez Intercambiable.** Se determina mediante el método de desplazamiento con una solución neutra de KCl 1N, que consiste en desplazar los iones  $H^+$  y  $Al^{+3}$  de la fase coloidal, por agitación de la muestra de suelo con una solución neutra de KCl. Los iones desplazados son titulados con soda en presencia de fenolftaleína, proceso representado en las siguientes ecuaciones.

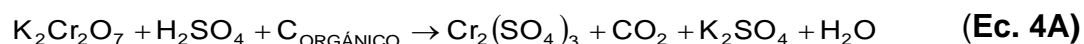


La diferencia entre acidez intercambiable y acidez de aluminio da como resultado la acidez debida a  $H^+$ .

➤ **Acidez Titulable.** Se determina con una solución extractora buffer de pH 8.2 la cual ésta constituida por una solución desplazante de  $BaCl_2$  y una solución de trietanolamina. Esta última es una base débil que retiene las especies iónicas tales como  $Al(OH_2)_6^{+3}$ ,  $Al(OH_2)_5^{+2}$ ,  $Al(OH_2)_4^{+1}$ , etc. Se agrega trietanolamina al

suelo en exceso y al terminar la reacción se determina la trietanolamina que no reaccionó titulándola con HCl utilizando como indicador verde de bromocresol e indicador mixto. Para determinar la cantidad de meq de trietanolamina agregada se hace un blanco y se titula también con HCl. La diferencia entre los meq totales de trietanolamina y los meq de trietanolamina en exceso se determinan los meq de acidez titulable.

➤ **Materia Orgánica.** Se establece mediante el método de Walckley–Black, el cual consiste en oxidar el carbono orgánico presente en el suelo con un oxidante en medio ácido, de acuerdo con la ecuación 4A.



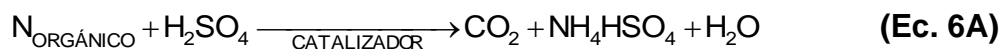
➤ **Determinación de la Capacidad de Intercambio Catiónico (CIC).** Consiste en desplazar todos los cationes que tiene el suelo y reemplazarlos por otro catión, en este caso  $\text{NH}_4^+$ . El suelo seco tamizado, se satura con acetato de amonio, tratando de llevar la saturación al máximo. El ion amonio se desplaza con  $\text{Na}^+$  (NaCl al 10%), dando lugar a la formación de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ; seguidamente se adiciona formol neutralizado al 40% de tal manera que se produzca la reacción representada en la siguiente ecuación.



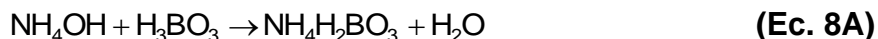
El HCl generado, finalmente se valora con NaOH 0.1N en presencia de fenolftaleína.

➤ **Determinación de nitrógeno por el método de Kjeldhal.** Este método es el utilizado universalmente para la determinación cuantitativa de nitrógeno procedente de diversos materiales, y esta basado en tres etapas:

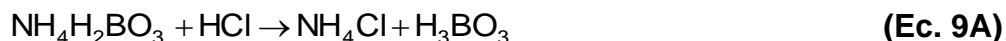
**Oxidación de la muestra.** La muestra se trata con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  y catalizadores los cuales tienen el propósito de oxidar la materia orgánica y convertir el nitrógeno en sulfato ácido de amonio, según la siguiente reacción:



**Descomposición del Sulfato ácido de amonio.** El sulfato ácido de amonio se descompone por un exceso de álcali para liberar el amoníaco, él cual se recoge por destilación sobre ácido bórico, de acuerdo con las siguientes reacciones.



**Titulación de Borato de Amonio.** El borato de amonio formado en el paso anterior se valora con HCl, usando como indicador de punto final una mezcla de rojo de metilo y azul de metilo o rojo de metilo y verde de bromocresol. La reacción implicada en este paso se aprecia en la ecuación 9A.



## ANEXO 2: CALCULO DE LA CONCENTRACIÓN DE CARBOFURAN APLICADA POR LOS AGRICULTORES DE LA REGION.

**Presentación Comercial:** Furadan.

**Principio Activo:** 330 g/L de Carbofuran.

Según la información proporcionada por algunos agrónomos, los agricultores de la región aplican normalmente 3 L de Furadan disueltos en 2 canecas de 200 L de agua por hectárea, lo cual equivale a:

$$\frac{330 \text{ g Carbofuran}}{1000 \text{ mL Furadan}} \times \frac{1000 \text{ mg Carbofuran}}{1 \text{ g Carbofuran}} \times \frac{3000 \text{ mL Furadan}}{\text{Ha Suelo}} \times \frac{1 \text{ Ha Suelo}}{2.0 \times 10^9 \text{ g Suelo}} \times \frac{1000 \text{ g Suelo}}{1 \text{ Kg Suelo}}$$

$$= 0.49 \text{ mg Carbofuran} / \text{Kg Suelo}$$

### ANEXO 3. CONVERSIÓN DE UNIDADES DE CONCENTRACIÓN.

La conversión de unidades de concentración se realizó teniendo en cuenta cada una de las etapas del proceso (extracción, limpieza y determinación) esquematizadas en la figura 11.

A continuación se muestra el cálculo representativo para la conversión de  $\mu\text{g/mL}$  a  $\text{mg/Kg}$  Suelo al nivel 1 de calibración.

$$\frac{1.0 \text{ mg Carbofuran}}{1000 \text{ mL Solución}} \times \frac{1 \text{ mL Solución}}{0.5 \text{ mL Solución}} \times \frac{1 \text{ mL Solución}}{10 \text{ mL Solución}} \times \frac{25 \text{ mL Solución}}{10.47 \text{ g SS}} \times \frac{1000 \text{ g SS}}{1 \text{ Kg SS}} \\ = 0.48 \text{ mg Carbofuran} / \text{Kg SS}$$

Donde el valor del suelo seco (SS) se obtuvo mediante el siguiente cálculo:

$$12.5 \text{ g Suelo} \times 16.24\% \text{ Humedad} = 2.03 \text{ g} \\ 12.5 \text{ g Suelo} - 2.03 \text{ g} = 10.47 \text{ g SS}$$

### ANEXO 4. PARÁMETROS CROMATOGRÁFICOS.

➤ **Factor de capacidad<sup>43</sup>:**

$$K' = \frac{t_R - t_m}{t_m} \quad (\text{Ec. 10A})$$

Donde:

$t_R$  es el tiempo de retención dado por el equipo

$t_m$  es el tiempo muerto.

➤ **Eficiencia<sup>43</sup>:**

$$N = 5.55 \left( \frac{t_n}{w_{1/2}} \right)^2 \quad (\text{Ec. 11A})$$

Donde:

$t_n$  es el tiempo de retención del pico enésimo

$w_{1/2}$  es el ancho del pico medido a media altura

➤ **Factor de respuesta<sup>43</sup>:**

$$Fr = \frac{\text{Re spuesta del analito (área)}}{\text{Concentración del analito } (\mu\text{g} / \text{mL})} \quad (\text{Ec. 12A})$$

## ANEXO 5. PRUEBA DE NORMALIDAD BAJO EL MÉTODO DE SHAPIRO - WILK.

Para realizar el análisis correspondiente a la normalidad de los datos se empleo el paquete estadístico SPSS para Windows versión 11.5.2.1. Se aplicó la prueba estadística de Shapiro – Wilk, para la cual se tiene como hipótesis nula ( $H_0$ ) que los datos provienen de una distribución normal, para ello se requiere que el valor de significancia (sig) obtenido al realizar la prueba estadística sea mayor de 0.05 para un nivel de confianza del 95 %<sup>35</sup>. En la tabla A1, se muestran los resultados de ésta prueba para la evaluación de la linealidad, repetibilidad y precisión intermedia instrumentales, y para la repetibilidad y precisión intermedia de la metodología.

**Tabla A1:** Resultados para la evaluación de la normalidad de los datos en la evaluación de linealidad y repetibilidad instrumental, precisión intermedia instrumental, repetibilidad y precisión intermedia de la metodología.

Datos correspondientes a:	SHAPIRO - WILK		
	Estadístico	gl*	Sig.*
Linealidad y repetibilidad instrumental.	,900	4	,430
	,878	4	,330
	,972	4	,857
	,990	4	,958
	,914	4	,506
Precisión intermedia instrumental.	,842	5	,170
	,924	5	,555
	,851	5	,197
	,939	5	,660
	,798	5	,077
Repetibilidad de la metodología.	,950	5	,735
	,844	5	,177
	,852	5	,202
	,989	5	,976
	,807	5	,093
Precisión intermedia de la metodología.	,882	4	,347
	,933	5	,619
	,900	5	,408
	,971	5	,882
	,974	4	,863

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

Como se observa en la tabla A1 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<sup>35</sup>.

## ANEXO 6. EVALUACIÓN DE LA LINEALIDAD<sup>35,44</sup>.

- **Evaluación de pendiente, intercepto y coeficiente de correlación.** Primero se trazan los puntos sobre un plano cartesiano para realizar una inspección visual de los puntos, luego se evalúa si el rango de calibración es lineal. Para estimar el ajuste de los datos a una línea recta se calcula el **Coeficiente de Correlación** ( $r$ )<sup>44,58</sup>. El valor de  $r$  está dado por la ecuación:

$$r = \frac{\sum_i \{ (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y}) \}}{\left\{ \left[ \sum_i (x_i - \bar{x})^2 \right] \left[ \sum_i (y_i - \bar{y})^2 \right] \right\}^{1/2}} \quad \text{(Ec. 13A)}$$

Para evaluar si  $r$  es realmente significativo se emplea un **Contraste Estadístico (t)**, en el que se tienen en cuenta el número de datos usados, mediante la ecuación<sup>44,58</sup>:

$$t_{calc} = \frac{|r| \sqrt{n-2}}{\sqrt{1-r^2}} \quad \text{(Ec. 14A)}$$

Como hipótesis nula ( $H_0$ ) se tiene que “No existe correlación entre  $x$  e  $y$ ”. El valor  $t_{calc}$  se compara con el valor  $t_{tab}$  a  $(n-2)$  grados de libertad y al nivel de significación deseado. Si  $t_{calc} > t_{tab}$  se rechaza  $H_0$  y se concluye que existe correlación significativa<sup>44,58</sup>.

Posteriormente, ya sabiendo que hay relación lineal entre la señal analítica ( $y$ ) y la concentración ( $x$ ), entonces se busca la “mejor” línea recta a través de los puntos de la gráfica de calibrado.

Se calcula la **Pendiente** y el **Intercepto** de la recta mediante las ecuaciones.

$$b = \frac{\sum_i \{ (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y}) \}}{\sum_i (x_i - \bar{x})^2} \quad (\text{Ec. 15A})$$

$$a = \bar{y} - b\bar{x} \quad (\text{Ec. 16A})$$

Los valores calculados para la pendiente (b) y el intercepto (a) se evalúan mediante el estadístico t, en donde:

- Para la pendiente se tiene como H<sub>0</sub>: “b no es significativamente diferente de cero”, la cual se rechaza cuando el valor de **t<sub>calc</sub> > t<sub>tab</sub>**.
- Para el intercepto se tiene como H<sub>0</sub>: “a no es significativamente diferente de cero”, esta se acepta cuando el valor de **t<sub>calc</sub> < t<sub>tab</sub>**.

De esta forma se tendrá la recta de regresión de **y** sobre **x**. Adicionalmente se calculan los **Errores en la Pendiente y Ordenada en el Origen** de la recta de regresión. Inicialmente se realiza el cálculo del estadístico **s<sub>y/x</sub>** (errores aleatorios en la dirección y), posteriormente se calculan las **Desviaciones Estándar de la Pendiente y del Intercepto**, (**s<sub>b</sub>** y **s<sub>a</sub>**).

$$s_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{n-2}} \quad (\text{Ec. 17A})$$

$$s_b = \frac{s_{y/x}}{\sqrt{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}} \quad (\text{Ec. 18A})$$

$$s_a = s_{y/x} \sqrt{\frac{\sum_i x_i^2}{n \sum_i (x_i - \bar{x})^2}} \quad (\text{Ec. 19A})$$

Los valores de **s<sub>b</sub>** y **s<sub>a</sub>** se utilizan para estimar los límites de confianza de la pendiente y del intercepto, mediante las ecuaciones.

$$b = b \pm t(n-2) s_b, \quad a = a \pm t(n-2) s_a \quad (\text{Ec. 20A})$$

➤ **Análisis de Varianza (ANOVA)**<sup>39,58</sup>. Para evaluar la regresión y el desvío de la linealidad, se calcula el estadístico “Prueba F de Fischer”, para ello se establecen las siguientes hipótesis:

Para la regresión lineal se tiene como H<sub>0</sub>: no hay regresión significativa en la curva de calibración, y H<sub>1</sub>, hay regresión significativa en la curva de calibración. Aquí **F<sub>calc</sub> > F<sub>teórico</sub>**, para una regresión significativa entre **x** y **y** (se rechaza la hipótesis nula).

Para el desvío de la linealidad se tiene como H<sub>0</sub>: no hay desvío significativo de la linealidad en la curva de calibración, H<sub>1</sub>, hay desvío significativo de la linealidad en la curva de calibración. Aquí **F<sub>calc</sub> < F<sub>teórico</sub>**, para un desvío no significativo de la linealidad (se acepta la hipótesis nula)<sup>35,44,58</sup>.

Las ecuaciones que se emplean para el ANOVA son las siguientes:

$$\begin{aligned}
 SCR &= bS_{xy} \\
 SCE &= SCT - SCR \\
 SCE_p &= \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^m y_{ij}^2 - \left( \frac{\sum_{i=1}^k y_i^2}{m} \right) \quad \text{(Ec. 21A)} \\
 SCT = S_{yy} &= \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^m y_{ij}^2 - \left( \frac{\sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^m y_{ij}}{n} \right)^2
 \end{aligned}$$

En donde se tiene que m es el número de replicas, n es el número de datos totales, k es el número de niveles, Y es el valor promedio de y, X es el valor promedio de x y Y\* el valor de y obtenido a partir de la ecuación de regresión (y estimado)<sup>35,44,58</sup>.

**Tabla A2.** Modelo del análisis de varianza en la evaluación de la linealidad.

Fuente de variación	Grados de libertad (gl)	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	F cal
Regresión	1	SCR	SCR/1	(SCR/1)/s <sup>2</sup>
Error	n-2	SCE		
Carencia de ajuste o linealidad	k-2	SCE-SCE <sub>p</sub>	(SCE-SCE <sub>p</sub> )/k-2	(SCE-SCE <sub>p</sub> )/((k-2)*s <sup>2</sup> )
Error puro	n-k	SCE <sub>p</sub>	SCE <sub>p</sub> /(n-k)=s <sup>2</sup>	
Total	n-1	SCT		



**Tabla A3.** Evaluación de la linealidad.

NIVEL	$x_i$	$y_i$	$x_i^2$	$y_i^2$	$x_i y_i$	$x_i - X$	$(x_i - X)^2$	$y_i - Y$	$(y_i - Y)^2$	$(x_i - X)(y_i - Y)$	$Y^*$	$(y_i - Y^*)$	$(y_i - Y^*)^2$
1	1,00	156,52	1,00	24497,88	156,52	-1,50	2,25	-280,24	78535,54	420,36	165,15	-8,63	74,48
	1,00	161,94	1,00	26223,92	161,94	-1,50	2,25	-274,82	75527,09	412,23	165,15	-3,21	10,31
	1,00	169,01	1,00	28563,70	169,01	-1,50	2,25	-267,75	71691,09	401,63	165,15	3,86	14,89
2	1,50	249,50	2,25	62251,75	374,25	-1,00	1,00	-187,26	35065,16	187,26	255,69	-6,13	38,23
	1,50	257,60	2,25	66358,79	386,40	-1,00	1,00	-179,16	32097,56	179,15	255,69	1,92	3,67
	1,50	265,06	2,25	70255,74	397,58	-1,00	1,00	-171,70	29481,55	171,70	255,69	9,37	87,84
3	2,00	341,79	4,00	116821,09	683,58	-0,50	0,25	-94,97	9019,09	47,48	346,22	-4,43	19,64
	2,00	347,22	4,00	120563,81	694,45	-0,50	0,25	-89,54	8016,86	44,77	346,22	1,00	1,00
	2,00	353,05	4,00	124644,30	706,10	-0,50	0,25	-83,71	7007,35	41,85	346,22	6,82	46,61
4	3,00	528,93	9,00	279765,89	1586,79	0,50	0,25	92,17	8495,14	46,08	527,29	1,63	2,66
	3,00	519,56	9,00	269947,79	1558,69	0,50	0,25	82,80	6856,68	41,40	527,29	-7,73	59,78
	3,00	535,33	9,00	286580,35	1605,99	0,50	0,25	98,57	9716,45	49,28	527,29	8,03	64,56
5	5,00	891,76	25,00	795237,68	4458,80	2,50	6,25	455,00	207025,9	1137,50	889,45	2,31	5,36
	5,00	904,99	25,00	819006,90	4524,95	2,50	6,25	468,23	219239,4	1170,57	889,45	15,54	241,63
	5,00	869,13	25,00	755388,70	4345,65	2,50	6,25	432,37	186944,7	1080,92	889,45	-20,31	412,68
$\Sigma$	37,50	6551,39	123,75	3846108,3	21810,72	0,000	30,00	0,000	984719,7	5432,23	6551,39	-1,251E-12	1083,36
$\Sigma^2$	1406,20	4,3E+07	15314,06	1,48E+13	4,75E+08	0,00	900,00	0,00	9,69E+11	2,95E+07	4,29E+07	1,56E-24	1,17E+06

**Tabla A4.** Parámetros de evaluación de la linealidad.

X	Y	r	$t_{cal}$	b	a	$S_{y/x}$	$S_b$	$S_a$	$t_a$	$t_b$	$t_{tab(95\%)}$
2,50	436,76	0,9994	108,64	181,07	-15,93	9,13	1,67	4,79	-3,33	108,64	2,16

Empleando el paquete estadístico SPSS, se corroboraron los resultados obtenidos para las pruebas t de Student y ANOVA, aplicadas a los datos correspondientes al ensayo de repetibilidad instrumental. En la siguiente tabla se muestran los resultados proporcionados por el programa:

**Tabla A5:** Regresión y prueba t de Student para r, b y a empleando paquete estadístico SPSS para el ensayo de repetibilidad instrumental.

**Resumen del modelo**

Modelo	R	R cuadrado	R cuadrado corregida	Error típ. de la estimación
1	,999 <sup>a</sup>	,999	,999	9,12882

a. Variables predictoras: (Constante), CONCENTRACION (ppm)

**Coefficientes**

Modelo		Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados	t	Sig.
		B	Error típ.	Beta		
1	(Constante)	-15,926	4,787		-3,327	,005
	CONCENTRACION (ppm)	181,074	1,667	,999	108,643	,000

a. Variable dependiente: AREA (mUA)

**Tabla A6:** ANOVA mediante paquete estadístico SPSS para el ensayo de repetibilidad instrumental.

**ANOVA<sup>b</sup>**

Modelo		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
1	Regresión	983636,339	1	983636,339	11803,346	,000 <sup>a</sup>
	Residual	1083,360	13	83,335		
	Total	984719,699	14			

a. Variables predictoras: (Constante), CONCENTRACION (ppm)

b. Variable dependiente: AREA (mUA)

## ANEXO 7. REPETIBILIDAD Y PRECISIÓN INTERMEDIA (% C.V.)

El porcentaje de coeficiente de variación (% C.V) se calculó mediante la aplicación de la siguiente ecuación<sup>44,58</sup>:

$$\% C.V. = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 \quad (\text{Ec. 22A})$$

Donde:

$\% C.V.$  es el porcentaje de coeficiente de variación

$s$  es la desviación estándar

$\bar{x}$  es el promedio

## ANEXO 8. LÍMITES CRÍTICOS INSTRUMENTALES

Los límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) se calcularon según el método de la IUPAC con base a las ecuaciones<sup>44,58</sup>:

$$LOD = \frac{3 s_{interceptos}}{m_{prom}} \quad LOQ = \frac{10 s_{interceptos}}{m_{prom}} \quad (\text{Ec. 23A})$$

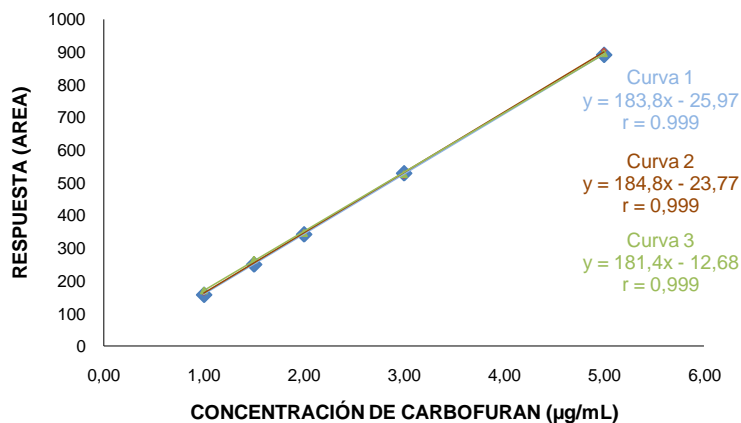
Donde:

$s_{interceptos}$  es la desviación estándar de los interceptos

$m_{prom}$  es el promedio de las pendientes

En la Figura A1 se ilustran las tres curvas de calibración, cuyas ecuaciones permiten calcular la desviación estándar de los interceptos y el promedio de las pendientes (tabla A7)

**Figura A1:** Curvas de calibración en solvente (metanol).



**Tabla A7.** Cálculo de LOD y LOQ instrumental para Carbofuran según el método de la IUPAC.

CURVA	PENDIENTE	INTERCEPTO	S <sub>intercepto</sub>	m <sub>promedio</sub>	LOD (ug/mL)	LOQ (ug/mL)
1	183,87	-25,97				
2	184,81	-23,77	7,12	183,38	0,116	0,388
3	181,46	-12,69				

Para 3 curvas de calibración (5 niveles) S<sub>interceptos</sub>, desviación estándar de los interceptos, m<sub>promedio</sub>, promedio de las pendientes

## ANEXO 9. EVALUACIÓN DEL EFECTO MATRIZ.

- **Porcentaje de efecto matriz mediante la ecuación<sup>44,58</sup>.**

$$\% E.M. = \frac{\text{Area en extracto}}{\text{Area en solvente}} \times 100 \quad (\text{Ec. 24A})$$

- **Método de Regresión Lineal.** Se basa en la gráfica de la respuesta del analito en extracto de matriz en función de la respuesta del analito en solvente. Se calcula el intercepto, la pendiente, sus desviaciones estándar y los intervalos de confianza, si 1 esta incluido en el intervalo de confianza calculado para la pendiente y 0 incluido en el intervalo de confianza del intercepto, se concluye que la pendiente y el intercepto no difieren significativamente de los valores de la línea de regresión lineal, (1 y 0 para pendiente e intercepto respectivamente), y no hay diferencia entre las respuestas en solvente y en extracto, es decir no hay efecto inducido por la matriz<sup>33,44,58</sup>.

**Tabla A8.** Evaluación del efecto matriz por el método de regresión lineal

r	b	a	s <sub>a</sub>	s <sub>b</sub>	b-LCb <sub>α=0,05</sub>	b+LCb <sub>α=0,05</sub>	a-LCb <sub>α=0,05</sub>	a+LCb <sub>α=0,05</sub>
0,9973	1,0341	-10,4181	10,980	0,021	0,99	1,08	-34,14	13,30

Como se observa en la tabla A8, se tiene que el intervalo de confianza de la pendiente incluye el 1 y el intervalo de confianza del intercepto incluye el 0. La evaluación se realizó a un nivel de confianza del 95 % y n-2 grados de libertad.

➤ **Test Pareado:** Es desarrollado con los valores promedio de tres replicas de las curvas de calibración en extracto y en solvente. Se calcula las diferencias ( $d_i$ ) entre las áreas obtenidas en extracto y en solvente para cada nivel de la curva de calibración. Además se determina la desviación estándar de las diferencias<sup>35,44,58</sup>. Con los valores obtenidos se calcula el estadístico t empleando la siguiente ecuación:

$$t = \left| \frac{\bar{d} \sqrt{n}}{S_D} \right| \quad (\text{Ec. 25A})$$

Como hipótesis nula ( $H_0$ ) se tiene que “no hay diferencia significativa entre las respuestas obtenidas en extracto y en solvente” por lo cual se dice que no hay efecto significativo de la matriz.

En la tabla A9 se muestran los cálculos correspondientes al test pareado para la evaluación de efecto matriz.

**Tabla A9:** Test pareado para la evaluación de efecto matriz.

PARAMETRO	VALOR
Grados de Libertad	4
Promedio de Diferencias ( $\bar{d}$ )	4,86
Desviación Estándar ( $S_D$ )	23,86
$t_{cal}$	0,45

$t_{tab}$ , 2.78 (nivel de confianza: 95%, n-1 grados de libertad)

Como se observa en la tabla A9 el valor de  $t_{cal}$  es menor que el  $t_{tab}$  a un nivel de confianza del 95%, por lo que la  $H_0$  se acepta y se concluye que no hay efecto inducido por la matriz<sup>35,44,58</sup>.

## ANEXO 10. CALCULO DE LA EXACTITUD

Los porcentajes de recuperación para cada nivel de concentración se calcularon aplicando la siguiente ecuación<sup>44,58</sup>:

$$\%R = \frac{C_c}{C_f} \times 100 \quad (\text{Ec. 26A})$$

Donde:

$C_c$  es la concentración experimental de Carbofuran interpolada en la curva de calibración.

$C_f$  es la concentración teórica de Carbofuran al nivel de fortificación seleccionado (Tabla 24).

**Tabla A10:** Exactitud en términos de %R obtenidos en el ensayo de repetibilidad.

NIVELES	Recuperados (%R)				
	Réplicas de cada nivel de concentración				
	1	2	3	4	5
N1	114,02	122,76	136,47	138,73	127,37
N2	112,74	115,39	97,68	113,51	119,95
N3	112,07	112,18	119,14	110,46	125,39
N4	91,35	102,08	99,65	97,34	95,36
N5	97,65	98,17	93,02	99,57	99,07

**Tabla A11:** Exactitud en términos de %R obtenidos en el ensayo de precisión intermedia.

NIVELES	Recuperados (%R)				
	Réplicas de cada nivel de concentración				
	1	2	3	4	5
N1	95,38	87,87	94,25	92,89	114,74
N2	100,57	94,74	97,88	90,14	112,81
N3	94,92	101,46	99,35	94,50	109,19
N4	74,93	108,12	100,68	90,14	91,92
N5	96,83	92,17	126,20	95,65	98,85

## ANEXO 11. PRUEBA DE HOMOGENEIDAD DE VARIANZAS (TEST DE COCHRAN)

Para evaluar la homogeneidad de las varianzas se empleó el estadístico de prueba G de Cochran, donde se tiene como hipótesis nula ( $H_0$ ) que el nivel de concentración no afecta la variabilidad en los resultados de los porcentajes de recuperación. En éste caso el valor de  $G_{calc}$  debe ser menor que el  $G_{tab}$  para que el factor de concentración no afecte la variabilidad de los resultados y la hipótesis nula se acepte a un nivel de confianza del 95 %<sup>35,44,58</sup>.

La ecuación que se emplea para el evaluador es la siguiente:

$$G_{calc} = \frac{s_{mayor}^2}{s_1^2 + s_2^2 + s_3^2 + s_4^2 + s_5^2} \quad (\text{Ec. 27A})$$

Donde:

$s_{mayor}^2$  es la varianza mayor

$s_{(1-5)}^2$  son las varianzas para cada concentración

Los resultados obtenidos para los ensayos de repetibilidad y precisión intermedia se presentan en las tablas A12 y A13 respectivamente.

**Tabla A12.** Prueba de homogeneidad de varianzas en la evaluación de repetibilidad de la metodología.

NIVELES	Recuperados					s	s <sup>2</sup>	G <sub>exp</sub>	G <sub>tab</sub>
	Réplicas de cada nivel de concentración								
	1	2	3	4	5				
N1	114,02	122,76	136,47	138,73	127,37	10,12	102,51		
N2	112,74	115,39	97,68	113,51	119,95	8,40	70,60		
N3	112,07	112,18	119,14	110,46	125,39	6,29	39,63	0,434	0,544
N4	91,35	102,08	99,65	97,34	95,36	4,10	16,87		
N5	97,65	98,17	93,02	99,57	99,07	2,61	6,82		
						<b>promedios</b>	<b>47,29</b>		

\*G<sub>tab</sub> al 95% de confianza.

**Tabla A13.** Prueba de homogeneidad de varianzas en la evaluación de la precisión intermedia de la metodología.

NIVEL	Recuperados					s	s <sup>2</sup>	G <sub>cal</sub>	G <sub>tab</sub>
	Réplicas de cada nivel de concentración								
	1	2	3	4	5				
N1	95,38	87,87	94,25	92,89	114,74	10,31	106,33	0,339	0,544
N2	100,57	94,74	97,88	90,14	112,81	8,53	72,72		
N3	94,92	101,46	99,35	94,50	109,19	5,98	35,77		
N4	74,93	108,12	100,68	90,14	91,92	12,48	155,79		
N5	96,83	92,17	126,20	95,65	98,85	13,77	189,73		
<b>Promedios</b>							112,07		

\*G<sub>tab</sub> al 95% de confianza.

Como se observa en las tablas A12 y A13 el valor de **G<sub>calc</sub>** es menor que el de **G<sub>tab</sub>** por lo cual la hipótesis nula se acepta y se concluye que hay homogeneidad de varianzas, esto permite establecer que la concentración no afectó la variabilidad de los resultados y es posible calcular el coeficiente de variación para la metodología global correspondiente al C.V<sub>tip</sub> empleando los resultados obtenidos en el ensayo de precisión intermedia para la metodología<sup>35,44,58</sup>.

Con el fin de constatar los resultados obtenidos a través de la prueba G de Cochran, se evaluó la homogeneidad de la varianzas mediante el estadístico de Levene a través del programa SPSS. Los resultados se muestran a la siguiente tabla, mostrando iguales resultados.

**Tabla A14:** Prueba de homogeneidad de varianzas empleando paquete estadístico SPSS:

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
,567	4	20	,689



## ANEXO 12: LOD Y LOQ DE LA METODOLOGIA.

**Tabla A15:** Determinación LOD y LOQ para la metodología.

REPLICA	AREA*	PROMEDIO AREAS	Concentración** (µg/mL)
1	0,713		
2	1,397		
3	1,268	1,527	0,032
4	2,960		
5	1,296		

\* Área correspondiente al ruido en el  $t_r$  del Carbofuran.

\*\*Concentración obtenida al interpolar el promedio de las áreas en una curva de calibración

El LOD y LOQ se calcularon multiplicando la concentración (µg/mL) especificada en la tabla A15, por 3 y por 10 respectivamente<sup>35</sup>. Los valores obtenidos se expresaron en mg de Carbofuran/Kg de suelo seco, empleando los factores de conversión indicados en el anexo 3. Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla.

**Tabla A16:** LOD yLOQ de la metodología.

PLAGUICIDA	N1 (mg/Kg)	(mg/Kg)	
		LOD	LOQ
Carbofuran	0.48	0.045	0.149

\*mg/kg: mg de Carbofuran/Kg de suelo seco; LOD=3\*Concentración

**ANEXO 13.**  
**POE: ANÁLISIS DEL PLAGUICIDA CARBOFURAN EN SUELOS**



ANÁLISIS DEL PLAGUICIDA CARBOFURAN EN SUELOS					
Folio No.: POE procedimientos					
Archivo electrónico: C:\AGROQUIMICA \ DOCUMENTOS \ POES \ POES DE PROCEDIMIENTOS\ M-1 ANÁLISIS DEL PLAGUICIDA CARBOFURAN EN SUELOS POR HPLC-UV.DOC					
POE TIPO Y No.	M-1	ELABORADO POR	Firma	SFPR Código	Fecha
Revisión No.	1		Firma	YAVL Código	10/12/07
Fecha efectiva:	10/12/07	AUTORIZADO POR	Firma	EMVC Código	Fecha
Total de páginas:	8		Firma		10/12/07

## OBJETIVO

Este POE describe el procedimiento que se debe seguir para la determinación de Carbofuran en suelos utilizando extracción con acetato de etilo, limpieza por extracción en fase sólida y análisis por HPLC con detección UV en el Laboratorio de Agroquímica de la Universidad del Cauca.

## NOTAS DE SEGURIDAD

- ✓ Use guantes, bata, protección respiratoria y gafas protectoras todo el tiempo.
- ✓ Todas las inyecciones en el HPLC HP 1100 se hacen bajo el método **ALCARBA6.M**. El método se encuentra documentado en la carpeta metodologías analíticas del Laboratorio de Agroquímica.

## ALCANCE

Este procedimiento aplica para el plaguicida Carbofuran en las concentraciones establecidas en la Tabla 1.

## Reactivos

- ✓ Acetato de etilo (EM Science, Fisher Scientific).
- ✓ Sulfato de Sodio Anhidro (Merck).
- ✓ Acetonitrilo grado HPLC (Merck).
- ✓ Metanol grado HPLC (Fisher Scientific).



- ✓ Agua desionizada.
- ✓ Carbofuran Dr.Ehrenstorfer, (Augsburg, Alemania), con pureza de 98%.
- ✓ Cartuchos SPE C-18 (Merck)
- ✓ N<sub>2</sub> (AP 99.995 %, grado 4.5, Agafano S.A).
- ✓ Acetona analítica (Mallinckrodt).
- ✓ Algodón lavado con acetato de etilo

## 1. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

### 1.1 SOLUCIÓN PATRÓN Y SOLUCIÓN DE TRABAJO

Prepare 10 mL de la solución patrón de aproximadamente 500 µg/mL y a partir de esta una solución de trabajo con concentración aproximada de 50 µg/mL. Ésta última se usará para fortificar las porciones analíticas y preparar las curvas de calibración a los niveles especificados en la Tabla 1.

**Tabla No. 1** Concentración de Carbofuran para método ALCARBA6.M

N1 (µg/mL)	N2 (µg/mL)	N3 (µg/mL)	N4 (µg/mL)	N5 (µg/mL)
1.0	1.5	2.0	3.0	5.0

\*N corresponde a cada nivel de calibración.

Manténgalas en el congelador y sáquelas con mínimo 45 minutos de anticipación a su uso a un desecador. Estas soluciones se preparan en metanol grado HPLC.

## 2. CURVA DE CALIBRACIÓN INSTRUMENTAL

Prepare una curva de calibración de Carbofuran por dilución de la solución de trabajo (aprox. 50 µg/mL) para el método **ALCARBA6.M** preparada en el numeral 1.2 en balones aforados de 2 mL, de la siguiente manera:

- 2.1 Prepare 5 balones aforados de 2 mL clase A, limpios y secos.
- 2.2 Prepare un vaso de 2 mL limpio y seco.
- 2.3 Llene el vaso con cantidad suficiente para preparar las diluciones correspondientes a los niveles de calibración (aprox. 1.5 mL).
- 2.4 Marque los balones con N y # según nivel de la curva.
- 2.5 Realice las adiciones con ayuda de una micropipeta
- 2.6 Al balón N1 adicione aprox. 100 µL de la solución de trabajo.
- 2.7 Al balón N2 adicione aprox. 150 µL de la solución de trabajo.



- 2.8 Al balón N3 adicione aprox. 200  $\mu$ L de la solución de trabajo.
- 2.9 Al balón N4 adicione aprox. 300  $\mu$ L de la solución de trabajo.
- 2.10 Al balón N5 adicione aprox. 500  $\mu$ L de la solución de trabajo.
- 2.11 Lleve a volumen los balones con metanol grado HPLC.
- 2.12 Transfiera cada una de las soluciones en viales debidamente etiquetados y tápelos. Asegúrese que no haya pérdidas por volatilización, si es necesario cubra con papel vinipel.

### 3. PREPARACIÓN DE LA MATRIZ

- 3.1 La muestra debe ser en cantidad suficiente (1kg o más).
- 3.2 Empaque en bolsa plástica identificándola con nombre de la finca, vereda, municipio, fecha de muestreo.
- 3.3 Determine la humedad de campo según el manual de agroquímica.
- 3.4 Extienda la muestra sobre hojas de papel y seque al aire en un lugar seco y a la sombra.
- 3.5 La muestra seca se muele y se pasa por un tamiz de 2 mm.
- 3.6 Determine la humedad higroscópica según el manual de agroquímica.

### 4. PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA

#### 4.1 HOMOGENIZADO DE LA MATRIZ

- 4.1.1 Con cuidado extienda la totalidad de la muestra sobre hojas de papel
- 4.1.2 Mezclar tirando de las esquinas opuestas, alternando las diagonales.
- 4.1.3 Luego dividir en 4 partes, de las cuales se guardan dos partes opuestas.
- 4.1.4 Volver a mezclar y repetir el cuarteo alternando las diagonales.
- 4.1.5 Realice este procedimiento hasta obtener aproximadamente 40 g de muestra.

#### 4.1 TOMA Y ANÁLISIS DE LA PORCIÓN ANALÍTICA

##### 4.1.2 Extracción

- 4.1.2.1 Tome 12.5 gramos de suelo previamente cuarteado en un erlenmeyer de 250 mL.
- 4.1.2.2 Inmediatamente añada 5 g de sulfato de sodio anhidro y 25 mL de acetato de etilo grado analítico.
- 4.1.2.3 Extraiga durante 3 horas en un agitador mecánico.



- 4.1.2.4 Filtre el extracto a través de un embudo que contenga algodón previamente lavado con acetato de etilo y 2.5 g de sulfato de sodio.
- 4.1.2.5 Recoja el filtrado en una probeta de 25mL hasta tomar un volumen de 10mL exactamente.
- 4.1.2.6 Transfiéralos a un balón en forma de pera de 20 mL.
- 4.1.2.7 Concentre hasta un volumen aproximado de 0.5 mL en el evaporador rotatorio (BÜCHI B-480) usando una temperatura de 35°C, 130 rpm y programe en controlador de presión 190 hPa.
- 4.1.2.8 Lleve a sequedad en corriente de nitrógeno.
- 4.1.2.9 Adicione 1 mL de metanol grado HPLC con una micropipeta y agite por 30 s en un vortex.
- 4.1.2.10 Filtre por membranas de Nylon de 0.22µm.
- 4.1.2.11 Coloque el extracto en un vial.

### 4.1.3 Limpieza

- 4.1.3.1 Activar el cartucho SPE C18 con 7mL de acetonitrilo grado HPLC a un flujo constante aproximado de 1mL/min.
- 4.1.3.2 Suspenda el flujo cuando queden aprox. 0.5 mL de solvente en el cartucho evitando que este se seque.
- 4.1.3.3 Descarte este primer volumen de elución.
- 4.1.3.4 Tome 500 µL del extracto obtenido en la etapa de extracción y adiciónelos en el cartucho de SPE C18.
- 4.1.3.5 Permita el contacto del extracto por algunos segundos.
- 4.1.3.6 Eluir con 10mL de acetonitrilo grado HPLC a un flujo de aprox 1.0 mL/min.
- 4.1.3.7 Recoja en un balón pera de 20mL.
- 4.1.3.8 Concentre hasta un volumen aproximado de 0.5 mL en el evaporador rotatorio (BÜCHI B-480) usando una temperatura de 35°C, 130 rpm y programe en controlador de presión 210 hPa.
- 4.1.3.9 Lleve a sequedad en corriente de nitrógeno
- 4.1.3.10 Adicione 1mL de metanol grado HPLC y homogenice por 30 s en un vortex.
- 4.1.3.11 Filtre a través de una membrana de Nylon de 0.22 µm.
- 4.1.3.12 Coloque el extracto en un vial tápelo adecuadamente.
- 4.1.3.13 Inyecte en el HPLC bajo el método ALCARBA6.M



## 5. RECUPERADOS DE CONTROL

Las porciones para los recuperados se toman del mismo homogenizado del cual se toma el blanco de matriz.

### 5.1 BLANCO DE MATRIZ

#### 5.1.1 Homogenización

- 5.1.1.1 Realice el cuarteo del suelo establecido como matriz blanco hasta obtener aproximadamente 40 g de muestra.
- 5.1.1.2 Tome 12.5 gramos para preparar el blanco de matriz en un Erlenmeyer de 250 mL.

#### 5.1.2 Extracción

- 5.1.2.1 Tome 12.5 gramos de suelo en una erlenmeyer de 250 mL.
- 5.1.2.2 Inmediatamente añada 5 g de sulfato de sodio anhidro y 25 mL de acetato de etilo grado analítico.
- 5.1.2.3 Extraiga durante 3 horas en un agitador mecánico.
- 5.1.2.4 Filtre el extracto a través de un embudo que contenga algodón previamente lavado con acetato de etilo y 2.5 g de sulfato de sodio anhidro (previamente seco a 105°C por 12 h).
- 5.1.2.5 Recoja el filtrado en una probeta de 25mL hasta tomar un volumen de 10mL exactamente.
- 5.1.2.6 Transfiéralos a un balón en forma de pera de 20 mL.
- 5.1.2.7 Concentre hasta un volumen aproximado de 0.5 mL en el evaporador rotatorio (BÜCHI B-480) usando una temperatura de 35°C, 130 rpm y programe en controlador de presión 190 hPa.
- 5.1.2.8 Lleve a sequedad en corriente de nitrógeno.
- 5.1.2.9 Adicione 1 mL de metanol grado HPLC y homogenice por 30 s en un vortex.
- 5.1.2.10 Filtre por membranas de Nylon de 0.22µm.
- 5.1.2.11 Coloque el extracto en un vial previamente etiquetado.



### 5.1.3 Limpieza.

- 5.1.3.1 Activar el cartucho SPE C18 con 7mL de acetonitrilo grado HPLC a un flujo aproximado de 1mL/min.
- 5.1.3.2 Suspenda el flujo cuando queden aprox. 0.5 mL de solvente en el cartucho evitando que este se seque.
- 5.1.3.3 Descarte este primer volumen de elución.
- 5.1.3.4 Tome 500  $\mu$ L del extracto y adiciónelos en el cartucho de SPE C18.
- 5.1.3.5 Permita el contacto del extracto por algunos segundos.
- 5.1.3.6 Eluir con 10mL de acetonitrilo grado HPLC a un flujo de aprox 1.0 mL/min.
- 5.1.3.7 Recoja en un balón pera de 20mL.
- 5.1.3.8 Concentre hasta un volumen aproximado de 0.5 mL en el evaporador rotatorio (BÜCHI B-480) usando una temperatura de 35°C, 130 rpm y programe en controlador de presión 210 hPa.
- 5.1.3.9 Lleve a sequedad en corriente de nitrógeno
- 5.1.3.10 Adicione 1mL de metanol grado HPLC y homogenice por 30 s en un vortex.
- 5.1.3.11 Filtre a través de una membrana de Nylon de 0.22  $\mu$ m.
- 5.1.3.12 Coloque el extracto en un vial tápelo adecuadamente.
- 5.1.3.13 Inyecte en el HPLC bajo el método ALCARBA6.M

## 5.2 FORTIFICACION DE RECUPERADOS DE CONTROL

### 5.2.1 Extracción

- 5.2.1.1 Tome 12.5 gramos del suelo previamente cuarteado en un Erlenmeyer de 250 mL.
- 5.2.1.2 Fortifique al nivel 2 de calibración, con 61  $\mu$ L aproximadamente de la Solución de trabajo directamente sobre la matriz.
- 5.2.1.3 Inmediatamente añada 5 g de sulfato de sodio anhidro y permita el contacto entre el plaguicida y el suelo y la evaporación del solvente durante aprox. 15 min.
- 5.2.1.4 Adicione 25 mL de acetato de etilo grado analítico.
- 5.2.1.5 Extraiga durante 3 horas en un agitador mecánico
- 5.2.1.6 Filtre el extracto a través de un embudo que contenga algodón previamente lavado con acetato de etilo y 2.5 g de sulfato de sodio anhidro.
- 5.2.1.7 Recoja el filtrado en una probeta de 25mL hasta tomar un volumen de 10mL exactamente.





- 5.2.1.8 Transfiéralos a un balón en forma de pera de 20 mL.
- 5.2.1.9 Concentre hasta un volumen aproximado de 0.5 mL en el evaporador rotatorio (BÜCHI B-480) usando una temperatura de 35°C, 130 rpm y programe en controlador de presión 190 hPa.
- 5.2.1.10 Lleve a sequedad en corriente de nitrógeno.
- 5.2.1.11 Adicione 1 mL de metanol grado HPLC y homogenice por 30 s en un vortex.
- 5.2.1.12 Filtre por membranas de Nylon de 0.22µm.
- 5.2.1.13 Coloque el extracto en un vial previamente etiquetado.

## 5.2.2 Limpieza

- 5.2.2.1 Activar el cartucho SPE C18 con 7mL de acetonitrilo grado HPLC a un flujo aproximado de 1mL/min.
- 5.2.2.2 Suspanda el flujo cuando queden aprox. 0.5 mL de solvente en el cartucho evitando que este se seque.
- 5.2.2.3 Descarte este primer volumen de elución.
- 5.2.2.4 Tome 500 µL del extracto y adiciónelos en el cartucho de SPE C18.
- 5.2.2.5 Permita el contacto del extracto por algunos segundos.
- 5.2.2.6 Eluir con 10mL de acetonitrilo grado HPLC a un flujo de aprox 1.0 mL/min.
- 5.2.2.7 Recoja en un balón pera de 20mL.
- 5.2.2.8 Concentre hasta un volumen aproximado de 0.5 mL en el evaporador rotatorio (BÜCHI B-480) usando una temperatura de 35°C, 130 rpm y programe en controlador de presión 210 hPa.
- 5.2.2.9 Lleve a sequedad en corriente de nitrógeno
- 5.2.2.10 Adicione 1mL de metanol grado HPLC y homogenice por 30 s en un vortex.
- 5.2.2.11 Filtre a través de una membrana de Nylon de 0.22 µm.
- 5.2.2.12 Coloque el extracto en un vial tápelo adecuadamente.
- 5.2.2.13 Inyecte en el HPLC bajo el método ALCARBA6.M.

## 6 CONFIRMACIÓN DE MUESTRAS POSITIVAS

En la eventualidad de que una muestra resulte positiva, es decir con una concentración de analito superior o igual al Límite máximo de residuos, el análisis será realizado bajo las mismas condiciones por otro operador.



## 7 MANEJO DE RESULTADOS

Todos los resultados obtenidos en la experimentación (reportes del HPLC de inyecciones para curva de calibración, recuperados y la muestra, cálculos y resultados) deben ser archivados en la carpeta de servicios.

Expresar en mg/kg los resultados, para lo cual multiplique el valor de concentración hallado por el factor de conversión 0.48.

**Tabla No. 2** Porcentaje de recuperación, límites de detección y cuantificación del método ALCARBA6.M

PLAGUICIDA	% R	% C.V	LD (mg/Kg)	LC (mg/Kg)	Incertidumbre Máxima (u)
Carbofuran	98.25	10.78	0.04	0.15	0.34

\*%R: porcentaje de recuperación; % C.V: Coeficiente de Variación; LD: Límite de Detección; LC: Límite de Cuantificación.

## REFERENCIAS

- ✓ Analytical Methods for Pesticide Residues in Foodstuffs. 6<sup>th</sup> Edition. Ministry of Public Health, Welfare and Sport, The Netherlands, 1996.
- ✓ Holstege, D. et al. A rapid multiresidue screen for organophosphorus, organochlorine, and N-methyl carbamate insecticides in plant and animal tissue. Journal of AOAC International. Vol 77 N° 5, 1994. 1263-1274
- ✓ Krause, Richard T. Método multiresiduo para determinación de N-metilcarbamatos en productos de cosecha por HPLC. J. Assoc. off Anal.Chem. 1980 63 (5) 1114-1124
- ✓ Valencia, Eliana M. Determinación de residuos de N-metilcarbamatos en fresa (*Fragaria* spp.) y evaluación de la adsorción-desorción de <sup>14</sup>C-carbofuran en suelos del mismo cultivo. Tesis de maestría. 2005
- ✓ Epa, Method 8318<sup>a</sup>, N-Methylcarbamates by High Performance Liquid Chromatography, 2002. 1-26
- ✓ IGAC, Métodos Analíticos de Laboratorio de Suelos, Imprenta Nacional de Colombia, Sexta Edición. 2006. 3-22, 26-48, 51-121, 332-333.
- ✓ BRAVO I., GIRALDO E., Manual de Prácticas de Laboratorio de Química Agrícola: Análisis de Suelos, Unicauca. 1999