

OPTIMIZACIÓN DE UN MÉTODO DE EXTRACCIÓN POR ULTRASONIDO PARA DETERMINAR PLAGUICIDAS ORGANOCLORADOS EN SUELOS DE UN ESTRATO ALTITUDINAL DEL MUNICIPIO RIVAS DÁVILA DEL ESTADO MÉRIDA.

OPTIMIZATION OF AN ULTRASOUND EXTRACTION
METHOD TO DETERMINE ORGANOCHLORINE
PESTICIDES IN SOILS OF AN ALTITUDINAL STRATUM OF
THE RIVAS DÁVILA MUNICIPALITY OF THE STATE OF
MÉRIDA.

¹Méndez Fernando, ¹Uzcátegui Jorge, ¹Sulbarán Alí.

¹Laboratorio de Investigación en Físico-química Orgánica, Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes 5101. Mérida, Venezuela. Telf.: 0274-2401377.

E-mail: jorevzca@gmail.com, mendezpfj@gmail.com

Fecha de inicio: 01/2019

Fecha de finalización: 10/2020

DOI: <https://doi.org/10.53766/AGRIANDI/2024.24.e.04>

RESUMEN

En el presente trabajo se determinan los parámetros de optimización para un método de extracción asistido por ultrasonido para la determinación cuantitativa de plaguicidas organoclorados por cromatografía de gases con ECD en suelos agrícolas del Municipio Rivas Dávila del Estado Mérida en el estrato altitudinal comprendido entre 1.000 y 2.000 msnm. Los parámetros optimizados son: 2 g de suelo, una mezcla de solvente acetonitrilo:hexano:diclorometano 3:1:1 v/v, cantidad de solvente 45 mL, 30 min de sonicación, 3 extracciones sucesivas utilizando proporciones en cada extracción de 20,15 y 10 mL y un tiempo de centrifugado de 5 min. Los porcentajes de extracción de las muestras de suelo están por arriba de 71,44 % para heptacloro y 131,55 para metoxicloro, para tres niveles diferentes de fortificación 5, 40 y 80 µg/Kg.

Palabras clave: Análisis químico, cromatografía de gases, plaguicidas organoclorados, proceso de extracción, sonicación, ultrasonido.

ABSTRACT

In the present work we determine the parameters of optimization for a method of extraction with solvent assisted by ultrasound for the quantitative determination of organochlorine pesticides by gas chromatography with ECD in agricultural soils of the Rivas Dávila Municipality of the State of Mérida in the altitudinal stratum between 1,000 and 2,000 meters above sea level. The optimized parameters

are: 2 g of soil, a mixture of acetonitrile:hexane:dichloromethane solvent 3:1:1 v/v, amount of solvent 45 mL, 30 min of sonication, 3 successive extractions using proportions in each extraction of 20, 15 and 10 mL and a centrifugation time of 5 min. The extraction percentages of the soil samples are above 71.44% for heptachlor and 131.55 for methoxychlor, for three different levels of fortification 5, 40 and 80 µg/Kg.

Key words: Chemical analysis, gas chromatography, organochlorine pesticides, extraction process, sonication, ultrasound.

INTRODUCCIÓN

El uso extensivo de plaguicidas para mejorar la productividad agrícola ha jugado un importante rol en el último siglo. Estos compuestos han sido aplicados por décadas para prevenir, repeler o mitigar el efecto de las plagas sobre los cultivos. Aun cuando el uso de los POC's han sido prohibidos a nivel global debido a sus efectos carcinogénicos y mutagénicos (Aktar M., et al 2017), ellos y sus metabolitos, aún están presentes en el ambiente, especialmente en suelos y sedimentos, debido a su persistencia y propiedades lipofílicas. Por lo tanto, el análisis de residuos de POC's en muestras de suelos agrícolas continúa siendo un importante tema de estudio, junto con otros contaminantes ambientales con el objetivo de desarrollar nuevos métodos analíticos que permitan la determinación simultánea de plaguicidas ambientalmente significativos.

Hasta el presente momento más del 60% de los plaguicidas registrados y sus metabolitos pueden ser analizados por cromatografía de gases con detección por captura electrónica, especialmente para la cuantificación de POC's. Los análisis cromatográficos, usualmente son el último paso después de una tediosa preparación de la muestra, para extraer los contaminantes a partir de matrices ambientales por ejemplo: suelos, sedimentos, material vegetal, etc. Para la separación de los compuestos de interés, han sido propuestos varios procedimientos de extracción y limpieza. Estos procedimientos incluyen: extracción Soxhlet, extracción en fase sólida (SPE), extracción líquido-líquido micro dispersiva (DLLME), extracción sólido-líquido (SLE), extracción asistida por ultrasonido (UAE), extracción asistida por microonda (MAE), extracción con líquidos presurizados (PLE), microextracción en fase sólida (SPME), extracción QuEChERS, dispersión de matriz en fase sólida (MSPD).

La preferencia de cada técnica depende principalmente del solvente o

mezclas de ellos, tiempo de análisis, facilidad de operación, etc. Es importante, por lo tanto, proponer métodos para resolver los problemas de tiempo de análisis y consumo de solvente como alternativa a los métodos tradicionales. Aún, cuando existen varios estudios que reportan que la extracción asistida por ultrasonido de analitos orgánicos en suelos y sedimentos es muy efectivo, los estudios para la aplicación de la técnica de ultrasonicación para extraer POC's en suelos es muy rara.

El propósito de este trabajo, es optimizar un procedimiento de extracción asistida por ultrasonido para la determinación de POC's y sus metabolitos, que pudieran estar presentes en muestras de suelos agrícolas del estrato altitudinal ubicado entre 1000-2000 msnm del municipio Rivas Dávila del estado Mérida. La optimización se efectuó con respecto a: cantidad de suelo agrícola, tipo de mezcla de solventes, cantidad total de solvente, duración del proceso de sonicación, temperatura del proceso de sonicación, número de extracciones y tiempo de centrifugación. El método optimizado fue aplicado a muestras reales de suelo agrícola para cuantificar la presencia de una mezcla de 21 POC's. Por otra parte, los estudios sobre plaguicidas organoclorados (POC's) en suelos agrícolas en el estado Mérida son escasos, en uno de ellos, se reporta la presencia de residuos de DDT y sus metabolitos DDE, DDD, además de α -endosulfan, β -endosulfan, endosulfan sulfato, aldrín, dieldrín, endrín, en suelos agrícolas del Municipio Pueblo Llano.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos:

Hexano (C₆H₁₂) Fisher Scientific. Grado HPLC, 99% de pureza.
diclorometano (CH₂Cl₂) Fisher Scientific. Grado HPLC, 99% de pureza,
acetronitrilo (C₂H₃N) J.T. Baker. 99,4% de pureza.

Las soluciones patrón de POC's utilizadas son:

Mezcla 1. AccuStandard 1.0mg/mL en metil-terc-butil éter. 1mL. Código: M-508P-A. 99.99% de pureza. Contiene los POCs: α -HCH, β -HCH, δ -HCH, γ -HCH, Heptacloro, Aldrín, Heptacloro Epóxido, α -Endosulfan, p,p'-

DDT p,p'-DDD, p,p'-DDE, Metoxicloro, Dieldrin, Endrín, β -Endosulfan, , Endrín Aldehído, Endosulfan Sulfato.

Mezcla 2. AccuStandard 1.0mg/mL en metil-terc-butil éter. 1mL. Código: ISO6468-PEST Lote: 211011259. 99.99% de pureza. Contiene los POCs: α -HCH, β -HCH, δ -HCH, γ -HCH, Heptacloro, Aldrín, Heptacloro Epóxido (Isomero A), α -Endosulfan, p,p'-DDT, o,p'-DDE, p,p'-DDE, o,p'-DDD, p,p'-DDD, o,p'-DDT, Metoxicloro, Dieldrin, Endrín, β -Endosulfan, Heptacloro Epóxido (Isomero B).

Especificaciones del equipo:

Cromatógrafo de Gases. VARIAN Modelo CP-3800, configurado con Inyector 1079 Split-Splitless, y una Columna Capilar Varian CP-Sil 19 CB, 30 m x 0.25 mm DI, 0.25 μ m DF, WCOT FUSED SILICA y Detector de Captura Electrónica con fuente de Ni. Programa de manejo y cuantificación Star Workstation.

Determinación Cromatográfica:

Inyector en modalidad Split 2. T °C = 220, modelo 1079. Rango 1. Temperatura del ECD: 300 °C. Gas de arrastre: Helio (1.2 mL/min). Gas de complemento: Nitrógeno (29 mL/ min).

DISCUSIÓN Y RESULTADOS

Procedimiento de optimización de la metodología por ultrasonido.

Optimización de la cantidad de suelo.

Para la optimización del método de extracción se debe comenzar trabajando con una muestra de suelo no cultivada proveniente de la zona en estudio. Una cantidad exactamente conocida de dicho suelo se dopa con un volumen exactamente conocido de solución patrón de plaguicidas organoclorados.

La concentración de la solución patrón resulta ser de 50ppb de la mezcla patrón de 21 plaguicidas organoclorados. La metodología de extracción a ser optimizada es la extracción por ultrasonido. Dicha metodología se aplica a distintas porciones de suelo tales como: 0,4 g, 1 g, 2 g, 5 g y 10 g, con la finalidad de encontrar la cantidad óptima de suelo que revele la presencia del mayor número de POC's.

El solvente extractante es una mezcla de hexanoacetato de etilo 1:1, por recomendación encontrada en la literatura relacionada con el método de extracción por ultrasonido. En el Cuadro 1, se detallan las áreas resultantes de cada pico de los POC's, respecto a la cantidad de suelo usado en el proceso de extracción. En la última columna, se muestran las áreas que se obtienen para los POC's contenidos en la mezcla patrón de 21 componentes para una concentración de 50 ppb.

Cuadro 1. Áreas de la optimización de las distintas cantidades de suelo.

Nombre de Plaguicida	Área 0,4 g suelo	Área 1 g suelo	Área 2 g suelo	Área 5 g de suelo	Área 10 g de suelo	Patrón de 50 ppb POC's
α -HCH	ND	ND	13247	29084	42607	1613775
γ -HCH	ND	ND	16126	37497	ND	1370304
Heptacloro	ND	ND	ND	ND	ND	1647365
Aldrin	ND	ND	ND	ND	ND	1177993
β -HCH	ND	ND	ND	6608	7715	330827
δ -HCH	ND	ND	ND	ND	ND	1111904
Heptacloro exo-epóxido	ND	ND	ND	ND	ND	1228706
Endosulfan I	ND	ND	ND	ND	ND	868557
p,p'-DDE	ND	ND	1773423	3082094	3646983	1130211
Dieldrin	ND	ND	8368	19164	38304	1204700
Endrin	ND	ND	26432	58817	97461	972470
p,p'-DDD	ND	6567	30287	58571	72880	731688
Endosulfan II	ND	ND	14394	13175	16610	761480
p,p'-DDT	116911	272294	381687	813791	1345714	451593
Endrin Aldehído	ND	8279	79080	131044	190981	207451
Methoxiclolo	ND	ND	26352	35643	42991	192756
Endosulfan Sulfato	ND	7179	7467	13246	14498	435205
o,p'-DDE	ND	5033	ND	ND	ND	ND
o,p'-DDD	ND	23313	8199	48898	94841	ND
DCPA	ND	ND	24487	30089	30738	ND
o,p'-DDT	ND	ND	83621	160920	252515	ND
POC's, cuantificados	1	4	11	12	11	17

ND: No detectable por el método utilizado/ **NC:** No cuantificable por el método utilizado

Las áreas resultantes para cada plaguicida proveniente de cada cantidad de suelo se comparan con las obtenidas para la solución patrón de 21 plaguicidas organoclorados. Se evidencia que, para 2 g y cantidades superiores, se detecta la presencia de la mayoría de los plaguicidas organoclorados que componen la solución patrón. Los mejores resultados se encuentran con 10 g de suelo. Sin embargo, el uso de grandes cantidades de suelo, implicaría la utilización de volúmenes mayores de solventes costosos y la metodología experimental resultará poco viable en términos económicos.

Optimización de la proporción de solvente o mezcla de solventes extractantes.

Los porcentajes de extracción (triplicado) para las mezcla de solventes solubles extractantes, se muestran en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Porcentajes de extracción para la optimización de las distintas mezclas de solventes.

POC's	%	%	%	%	%	%	%
	HEX:CDM 1:01	HEX:CDM 1:02	HEX:CDM 2:01	DCM:ACN 1:01:00	DCM:ACN 1:02	DCM:ACN 2:01	HEX:DCM:A CN 1:01:01
α -HCH	26,06	22,13	35,77	35,19	25,77	36,95	37,14
γ -HCH	32,04	35,32	51,44	47,52	37,15	44,5	46,42
Heptacloro	32,62	29,87	37,22	40,62	32,07	43,36	42,39
Aldrin	38,4	36,89	43,42	46,82	38,18	49,54	49,82
β -HCH	38,66	50,41	71,78	72,2	43,13	36,25	44,5
δ -HCH	39,24	0	0	91,16	46,83	62,47	50,09
Heptacloro exo-epoxido	45,04	59,77	78,72	63,75	62,28	74,62	77,51
Endosulfan I	41,53	58,86	71,81	75,78	60,75	71,93	78,29
p,p'-DDE	48,26	83,3	73,66	86,4	76,24	92,12	94,68
Dieldrin	51,35	69,94	87,82	77,28	75,55	87,17	96,08
Endrin	47,56	67,45	80,4	91,35	73,38	84	95,05
p,p'-DDD	44,19	73,43	72,39	95,27	80,77	98,85	123,98
Endosulfan II	49,94	84,77	78,08	103,87	85,3	101,12	100,98
p,p'-DDT	62,76	78,99	69,72	108,97	79,61	111,07	135,65
Endrin Aldehido	8,23	12,67	15,91	12,37	8,57	9,59	16,53
Metoxicloro	31,87	75,16	62,13	102,44	90,88	106,91	135,96
Endosulfan Sulfato	51,85	86,04	78,64	106,02	89,52	105,74	112,33

De los resultados expresados en el Cuadro 2, se puede escoger como mejor mezcla extractante, acetonitrilo:hexano:diclorometano, 1:1:1 v/v, ya que esta presenta mayores porcentajes de extracción respecto al número de plaguicidas extraídos, 10 de 17, es decir 58,82%.

La continuación de las pruebas se realiza utilizando mezclas ternarias. Las mezclas ternarias de solventes se efectúan tomando en consideración proporciones de volumen entre los solventes en el intervalo 1-3. La aplicación del procedimiento de extracción por ultrasonido con estas mezclas solubles, se lleva a cabo con el fin de aumentar el área de recuperación de los plaguicidas organoclorados, alfa-HCH, gamma-HCH, heptacloro, aldrín, beta-HCH y delta-HCH, de la mezcla de POC's. Los porcentajes de extracción calculados se muestran en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Porcentajes de extracción para mezclas ternarias de acetronitrilo:hexano:diclorometano.

POC's	% de extracción 1:1:2	% de extracción 2:1:1	% de extracción 1:2:2	% de extracción 2:01:02	% de extracción 1:03:01	% de extracción 1:01:03	% de extracción 2:1:3	% de extracción 1:3:3	% de extracción 3:01:03	% de extracción 3:1:1
α -HCH	37,84	53,58	52,22	46,43	59,55	36,66	33,04	61,61	36,57	63,34
γ -HCH	47,26	49,71	58,65	49,93	55,28	45,59	36,77	58,13	47,98	79,24
Heptacloro	42,33	42,87	44,31	46,66	46,93	47,25	43,12	45,84	44,85	48,79
Aldrín	49,65	49,64	50,32	51,61	52,24	53,52	54,2	55,4	55,47	56,4
β -HCH	46,04	47,77	50,67	55,07	61,7	64,32	65,56	61,7	58,86	74,2
δ -HCH	50,52	52,35	53,79	63,82	53,02	54,11	55,37	54,01	55,18	93,62
Heptacloro exo-epoxido	70,39	73,7	6,22	702,53	62,22	71,13	61,76	53,53	61,83	92,13
Endosulfan I	45,96	56,53	48,07	57,09	56,07	56,09	60,11	59,29	59,84	63,4
p,p'-DDE	86,06	77,82	85,81	77	85,87	76,83	77,07	77,89	80,68	96,36
Dieldrin	79,91	91,89	92,55	94,64	83,27	91,91	82,49	80,77	79,92	94,31
Endrin	51,67	51,27	50,34	50,33	51,26	81,17	48,21	48,17	51,43	51,46
p,p'-DDD	81,14	79,61	72,07	82,56	82,65	80,81	81,14	79,63	82,33	95,83
Endosulfan II	92,76	92,58	92,97	93,12	91,56	92,76	91,56	92,97	95,69	96,88
p,p'-DDT	81,59	82,27	80	93,65	81,45	86,86	71,58	81,5	82,27	83,29
Endrin Aldehyde	11,02	11,5	12	12,01	12	12,98	10,53	12	11,51	11,77
Methoxiclo	93,19	97,33	93,34	94,33	94,07	932,86	933,42	95,94	95,91	93,61
Endosulfan Sulfato	94,47	92,08	92,09	91,91	89,06	914,44	93,36	92,14	89,8	94,78

Del análisis detallado del Cuadro 3, se puede deducir que la mezcla extractante que conduce a los mejores porcentajes de extracción de POC's es acetronitrilo;hexano:diclorometano, 3:1:1 v/v.

Optimización de cantidad de solvente.

Se procedió a realizar las distintas extracciones usando 30, 40, 45, y 50 mL de solvente extractante.

En el Cuadro 4, se presentan los porcentajes de extracción para cada uno de los POC's en función del volumen de mezcla extractante.

Cuadro 4. Porcentajes de extracción de la optimización de las distintas cantidades de solventes.

Nombre de Plaguicida	% para 30mL	% para 40mL	% para 45mL	% para 50mL
α -HCH	71,28	78,07	81,81	73,94
γ -HCH	82,94	83,45	95,71	94,91
Heptacloro	48,66	51,29	58,79	54,02
Aldrín	52,65	54,70	66,83	56,74
β -HCH	77,92	70,08	84,00	91,24
δ -HCH	93,33	91,57	142,16	119,16
Heptacloro exo-epóxido	87,23	81,77	89,34	83,90
Endosulfan I	60,39	60,91	67,30	61,21
p,p'-DDE	97,17	96,14	100,82	98,30
Dieldrín	94,34	88,58	98,60	95,86
Endrin	59,10	35,74	59,11	57,73
p,p'-DDD	101,96	81,66	113,01	151,00
Endosulfan II	95,66	70,22	99,22	96,13
p,p'-DDT	106,30	84,71	108,52	105,17
Endrin Aldehído	12,49	9,02	17,97	11,12
Methoxiclоро	132,84	123,88	137,92	186,77
Endosulfan Sulfato	94,23	76,60	95,36	104,98

Los resultados expresados en el Cuadro 4, indican que el volumen de solvente extractante que arroja los mejores porcentajes de extracción es de 45 mL, puesto que presenta los mejores datos para 13 de los 17 plaguicidas organoclorados estudiados, aproximadamente 76,5%. Sin embargo, es importante destacar que aún se observa baja recuperación para los plaguicidas heptacloro, aldrín y endrín aldehído. A pesar de este inconveniente, se toma como cantidad de solvente extractante optimizada, 45 mL de mezcla acetónitrilo:hexano:diclorometano 3:1:1 v/v.

Optimización del tiempo de sonicación.

En la optimización del tiempo de sonicación se tomó como referencia la metodología de extracción por ultrasonido y el método EPA 3550C. En estas metodologías, se recomienda como tiempo de sonicación 40 min. No obstante, a pesar de ello, se procede a realizar las distintas extracciones usando tiempos de

20, 30, 40 y 45 min.

En resumen, las extracciones hasta este punto se realizan con 2 g de suelo suspendido en 45 ml de una mezcla de acetonitrilo:hexano:diclorometano 3:1:1 v/v. Al respecto, se procede a realizar las extracciones por triplicado de la muestra de suelo dopada para determinar las áreas respectivas de cada plaguicida organoclorado en estudio en función del tiempo de sonicación.

El Cuadro 5, muestra los resultados para los experimentos de extracción a tiempos de sonicación diferentes, conjuntamente con las áreas de la muestra patrón.

Cuadro 5. Porcentajes de extracción para la optimización del tiempo de sonicación.

POC's	% 20 min	% 30 min	% 40 min	% 45 min
α -HCH	68,99	81,81	77,58	80,61
γ -HCH	78,96	95,71	94,21	95,22
Heptacloro	51,68	58,79	57,62	58,80
Aldrin	58,81	66,83	66,50	67,00
β -HCH	83,63	84,00	83,15	84,86
δ -HCH	114,09	142,16	137,54	140,28
Heptacloro exo-epoxido	76,71	89,34	85,58	87,63
Endosulfan I	57,61	67,30	67,09	658,69
p,p'-DDE	91,11	100,82	100,00	100,76
Dieldrin	82,20	98,60	98,05	98,39
Endrin	53,48	59,11	59,06	58,89
p,p'-DDD	100,34	113,01	112,96	112,89
Endosulfan II	90,41	99,22	99,11	99,18
p,p'-DDT	101,39	108,52	108,30	108,55
Endrin Aldehído	17,44	17,97	18,06	17,78
Methoxicloro	130,37	137,92	128,75	127,38
Endosulfan Sulfato	92,05	95,36	97,71	95,35

Los resultados expresados en el Cuadro 5, indican que para el tiempo de 30 min se obtienen los mejores porcentajes de extracción para 16 de los 17 plaguicidas organoclorados en estudio, es decir 94,12%. Por lo tanto, el tiempo de extracción optimizado se determina como 30 min para cada extracción por ultrasonido.

Optimización de la temperatura.

En las extracciones realizadas con 20, 30, 40°C como temperaturas del baño

de sonicación, se usó 45mL de la mezcla 3:1:1 acetonitrilo:hexano:diclorometano como solvente, con un tiempo de 30 min de sonicación. Los resultados se encuentran representados en el Cuadro 6.

Cuadro 6. Porcentajes de extracción de las distintas temperaturas del baño de sonicación.

Nombre de Plaguicida	% 20 °C	% 30 °C	% 40 °C
α -HCH	68,65	81,08	81,36
γ - HCH	78,27	94,98	94,21
Heptacloro	44,84	59,04	58,38
Aldrín	58,99	66,50	66,50
β -HCH	83,63	84,00	83,15
δ -HCH	114,09	142,16	137,54
Heptacloro exo-epoxido	77,56	89,31	87,61
Endosulfan I	63,51	67,91	65,85
p,p'-DDE	91,22	100,90	100,00
Dieldrin	83,60	98,05	96,58
Endrin	57,29	59,03	59,05
p,p'-DDD	109,92	112,83	112,49
Endosulfan II	9,65	98,99	98,65
p,p'-DDT	106,03	108,29	108,18
Endrin Aldehído	16,06	17,91	18,14
Methoxicloro	129,02	137,29	133,71
Endosulfan Sulfato	92,05	95,11	92,58

En el cuadro 6, se observa que utilizando como temperatura del baño 20 °C, los porcentajes de extracción de los distintos plaguicidas organoclorados disminuye, mientras que para 30 y 40 °C, los porcentajes de extracción son similares. Una observación más cuidadosa permite deducir que los mejores porcentajes de extracción se obtienen usando como temperatura del baño de sonicación 30 °C, por tanto, ésta se toma como temperatura optimizada.

Optimización del número de extracciones.

Para la optimización del número de extracciones se toma como referencia el trabajo de Cortés (2012), el cual consiste en la aplicación de nuevas metodologías y técnicas de microextracción líquido-líquido para la determinación

de contaminantes orgánicos. En éste se somete la muestra a distintos números de extracciones basándose en el coeficiente de reparto. Para efectos de la optimización del número de extracciones de la metodología experimental del presente trabajo de investigación, se realiza en primera instancia tres extracciones de la muestra de suelo dopada, con tres porciones de 15 mL de la mezcla acetoneitrilo:hexano:diclorometano 3:1:1 v/v. Las extracciones se llevaron a cabo con 2 g de suelo suspendidos en tres ocasiones sucesivamente en 15 mL de solvente, bajo 30 min de sonicación a una temperatura de 30 °C. El Cuadro 7, contiene los porcentajes de extracción con 15 mL de solvente extractante para cada uno de los tres procesos. La siguiente columna contiene la sumatoria de cada porcentaje de extracción y la última despliega los porcentajes obtenidos con una sola extracción con 45 mL de solvente extractante sin cambio de recipiente.

Cuadro 7. Porcentajes de extracción para extracciones sucesivas en la misma muestra.

Nombre del Plaguicida	% 1era 15 mL	% 2da 15 mL	% 3era 15 mL	Σ %	% con 45 mL
α-HCH	55,56	9,85	2,41	67,82	81,81
γ-HCH	62,32	11,39	2,43	76,13	95,71
Heptacloro	41,44	7,47	1,48	50,4	58,79
Aldrín	54,78	6,33	1,17	62,27	66,83
β-HCH	55,94	12,32	3,44	71,7	84
δ-HCH	67,77	10,85	4,77	82,60	142,16
Heptacloro exo-epoxido	67,06	11,7	2,19	80,96	89,34
Endosulfan I	53,51	9,28	1,9	64,69	67,3
p,p'-DDE	78,13	13,49	2,96	94,57	100,82
Dieldrin	76,4	13,01	2,97	92,38	98,6
Endrin	46,66	8,77	2,23	57,66	59,11
p,p'-DDD	87,25	17,86	4,62	109,73	113,01
Endosulfan II	76,5	13,6	2,77	92,87	99,22
p,p'-DDT	79,41	14,42	2,82	96,65	108,52
Endrin Aldehído	13,02	0	0	13,02	17,97
Metoxicloro	88,35	20,66	14,92	123,93	137,92
Endosulfan Sulfato	73,17	15,43	3,63	92,24	95,36

De los resultados mostrados en el Cuadro 7, se infiere que los mejores porcentajes de extracción se obtienen para la extracción con 45 mL de solvente extractante en porciones de 15 mL en un solo recipiente. Adicionalmente, se demuestra que solamente son necesarias tres extracciones sucesivas, ya que en la tercera extracción el porcentaje de extracción de plaguicidas organoclorados es muy pequeño (entre 0% y 5%), este comportamiento se observa para el 94,12% de los POC's. La excepción está representada por metoxicloro (aproximadamente 15% de extracción en la tercera extracción). Una vez que estas extracciones individuales se extraen en un sólo recipiente, nos encontramos con buenos porcentajes de extracción para la mayoría de los plaguicidas organoclorados en estudio, a excepción de: heptacloro (59%) endosulfan I (67%), endrín (59%) y endrín aldehído (18%). Con el objetivo de mejorar los porcentajes de extracción de los plaguicidas organoclorados mencionados, se procede a variar en cada una de las tres extracciones las distintas cantidades de solventes, para un volumen total de 45 mL.

Las cantidades de cada solvente se escogen de tal manera que la suma total sea de 45 mL, empezando con 5 mL del primer solvente, repartiendo la diferencia entre los otros dos solventes. Para la mezcla número 2, se fijan 5 mL para el segundo solvente y la diferencia se reparte entre el primer y tercer solvente. Para la mezcla 3, se fija 5 mL para el tercer solvente y la diferencia se reparte entre el primer y segundo solvente. El volumen máximo de cada solvente no puede ser mayor a 20 mL se limitó a 20 mL. La construcción de las mezclas adicionales, sigue el mismo esquema que el explicado anteriormente, la diferencia estriba que en este caso el volumen de inicio para el primer solvente es de 10 mL.

Siguiendo el mismo patrón se prepararon mezclas tomando en consideración que el volumen de inicio para el primer solvente es 15 mL y finalmente se preparan mezclas tomando en consideración que el volumen de inicio para el primer solvente es 20 mL. Todos los volúmenes de solvente usados son múltiplos de 5. El análisis detallado de los porcentajes de extracción para cada mezcla indica que los mejores resultados se logran con volúmenes de mezclas de solventes de 20 mL para la primera extracción 15 mL para la segunda y 10 mL para la tercera. Los resultados correspondientes a los porcentajes de recuperación de cada tipo de mezcla se encuentran en el Cuadro 8.

Cuadro 8. Porcentajes de extracción de POC's para distintos volúmenes de extracción.

Nombre de Plaguicidas	% extracción 20, 5, 10	% extracción 20,20,5	% extracción 20,10,15	% extracción 20,15,10
α -HCH	82,25	82,25	83,41	87,49
γ -HCH	95,75	95,75	96,51	98,09
Heptacloro	60,78	60,78	66,43	71,39
Aldrin	68,34	68,34	70,62	74,04
β -HCH	85,65	85,65	83,07	87,75
δ -HCH	104,19	104,19	108,76	113,27
Heptacloro exo-epoxido	89,18	89,18	90,69	91,42
Endosulfan I	71,12	71,12	72,27	75,73
p,p'-DDE	99,10	99,10	97,82	99,90
Dieldrin	98,61	98,61	98,01	98,81
Endrin	71,15	71,15	69,62	77,80
p,p'-DDD	92,63	92,63	91,64	96,39
Endosulfan II	98,69	98,69	96,49	99,52
p,p'-DDT	105,66	105,66	107,73	109,46
Endrin Aldehído	18,13	18,13	18,49	18,99
Methoxicloro	140,12	140,12	143,08	139,35
Endosulfan Sulfato	96,68	96,68	95,42	99,82

El análisis detallado de estos resultados indica que los volúmenes de cada extracción con la mezcla acetoniitrilo:hexano:diclorometano 3:1:1 v/v que dan los mejores porcentajes de extracción, son 20 mL de la mezcla extractante para la primera extracción, 15 mL para la segunda extracción y 10 mL para la tercera extracción.

Optimización del tiempo de centrifugación.

El tiempo de centrifugación de la suspensión se varía en intervalos de 5 minutos hasta 15 minutos de centrifugación a una velocidad fija de 3.000 rpm. Los resultados se muestran en el Cuadro 9.

Cuadro 9. Porcentajes de extracción para la optimización del tiempo de centrifugación.

Nombre de Plaguicida	% 5 min	% 10 min	% 15 min
Alfa-HCH	87,65	87,51	87,50
Gamma-HCH	98,12	98,09	98,78
Heptachlor	71,44	71,43	71,44
Aldrin	74,12	74,05	74,35
Beta-HCH	87,77	87,69	87,66
Delta-HCH	114,04	113,26	113,00
Heptacloro exo-epoxido	86,92	91,51	90,18
Endosulfan I	76,58	75,73	76,67
p,p´-DDE	100,02	99,90	100,00
Dieldrin	98,87	98,86	98,59
Endrin	77,81	77,81	77,81
p,p´-DDD	96,49	96,38	96,40
Endosulfan II	99,47	99,52	99,48
p,p´-DDT	109,84	109,45	109,47
Endrin Aldehído	19,08	18,96	19,12
Metoxicloro	131,55	139,61	137,99
Endosulfan Sulfato	99,94	99,81	99,94

En el Cuadro 9, se observa que los mejores resultados respecto a los porcentajes de extracción se obtienen para 5 min y 10 min. Con el objetivo de reducir el tiempo de análisis de la extracción de los POC´s en suelos agrícolas se determina fijar el tiempo de centrifugación en 5 minutos. Una vez obtenidos los parámetros optimizados, se procedió a aplicar el nuevo método de extracción a un número de muestras reales para determinar cuantitativamente todos los POC´s, con el fin de conocer el porcentaje de extracción de cada plaguicida, tomando en cuenta las limitaciones del método optimizado.

El porcentaje de extracción que se calcula para cada una de las muestras reales en el presente trabajo se mide con el objetivo de corroborar la eficiencia del método de extracción optimizado para detectar y cuantificar POC´s. Para el cálculo del porcentaje de extracción se realizó el dopaje de tres muestras de suelo con los patrones de POC´s a tres distintas concentraciones las cuales fueron 5, 40 y 80 µg/Kgsuelo. Se realizó el proceso de extracción con el método

optimizado antes mencionado, posteriormente al obtener los cromatogramas se analizaron las áreas de pico y se obtuvieron los porcentajes de extracción. A continuación se presentan los resultados de los porcentajes de extracción de 22 POC's.

Los resultados de porcentaje de extracción que se reportan en el Cuadro 10, se establecen tomando en consideración un nivel de dopaje de 5 µg/Kg. Las extracciones se realizaron por triplicado, utilizando el método optimizado anteriormente descrito.

Cuadro 10. Porcentajes de extracción de los plaguicidas organoclorados.

Plaguicida	% Réplica 1	% Réplica 2	% Réplica 3	Promedio%
α -HCH	85,22	84,35	87,22	85,60
γ - HCH	90,28	91,09	90,34	90,57
Heptacloro	83,25	81,54	84,58	83,12
Aldrín	94,36	95,38	95,58	95,11
β -HCH	100,24	103,58	100,45	101,42
δ -HCH	98,56	97,57	98,9	98,34
Heptacloro exo-epoxido	92,09	94,05	94,28	93,47
Endosulfan I	102,25	100,26	103,34	101,95
p,p'-DDE	100,86	100,85	98,56	100,09
Dieldrin	97,85	97,65	96,02	97,17
Endrin	92,35	93,58	93,65	93,19
p,p'-DDD	104,85	103,12	104,48	104,15
Endosulfan II	98,25	99,08	98,58	98,64
p,p'-DDT	100,68	101,84	100,05	100,86
Endrin Aldehído	96,56	95,75	96,14	96,15
Metoxicloro	97,47	95,15	97,36	96,66
Endosulfan Sulfato	100,85	100,05	102,02	100,97
α -HCH	98,12	98,58	97,25	97,98
γ - HCH	95,87	95,58	96,58	96,01
Heptacloro	83,58	84,48	83,13	83,73
Aldrín	100,33	102,18	100,46	100,99
β -HCH	34,02	32,58	34,75	33,78

Los resultados en el Cuadro 10, muestran que el método optimizado establece un intervalo de porcentaje de extracción entre 83,73% para metoxicloro y 104,15 para p,p'-DDE. La excepción se marca muy evidentemente con el plaguicida organoclorado endrín aldehído, para el cual se obtiene un porcentaje de extracción de 33,78%. Esto indica la exactitud del mismo debido a que en el método EPA 8081A, se establece que el intervalo óptimo de porcentajes de

extracción se encuentra dado entre 70-130%. Claramente, el método de extracción optimizado no es aplicable al plaguicida endrín aldehído del total de plaguicidas analizados. Como es del conocimiento, el método optimizado es un multiresidual y la falla para uno de ellos no invalida el método como tal, puesto que por el mismo se pueden cuantificar e identificar 21 plaguicidas de 22 posibles en un 95,45%.

Se debe mencionar que el método optimizado mejora cuantitativamente el método de extracción con Soxhlet 8081A, que es el utilizado en análisis rutinarios del Laboratorio de Físico-Química Orgánica.

CONCLUSIONES

Se demuestra que el método asistido por ultrasonido optimizado en este trabajo de investigación es eficiente para la extracción de POC's puesto que se extraen con altos porcentajes de extracción. El método es de relativa facilidad de realización experimental, consume bajas cantidades de solvente, se lleva a cabo en corto tiempo, por lo tanto es factible procesar un número alto de muestras. Requiere pequeñas cantidades de suelo agrícola y temperaturas de extracción muy cercanas a las ambientales. No requiere de instrumentación complicada. El método mencionado no puede ser aplicado para el endrín aldehído ya que el porcentaje de extracción obtenido es muy bajo. Se puede afirmar que es absolutamente aplicable para los 20 POC's analizados y una opción suficientemente aplicable para suelos agrícolas del tipo que se encuentran entre los 800 y 2000 msmn en el Páramo Andino Merideño y otros en distintas regiones del país.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- A. Żwir-Ferenc, M. Biziuk. 2006. Solid Phase Extraction Technique – Trends, Opportunities and Applications. Polish J. of Environ. Stud. Vol. 15(5), 677-690.
- Ahmed Hussen, Negussie Megersa, Jan Åke Jönsson. 2017. Effect of Aging Organochlorine Pesticides in Various Soil Types on Their Extractability Using Selective Pressurized Liquid Extraction. Journal of Environmental Protection, Vol. 8, 867-883.
- Aktar M. W, Sengupta D. y Chowdhury A. 2009. Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. Interdiscip. Toxicol. 2 (1), 1-12.

- Ali Tor, Mehmet Emin Aydin, Senar Özcan. 2006. Ultrasonic solvent extraction of organochlorine pesticides from soil. *Analytica Chimica Acta* 559, 173–180.
- Anna Laura Capriotti, Chiara Cavaliere, Piero Giansanti, Riccardo Gubbio, Roberto Samperi and Aldo Laganà. 2010. Recent developments in matrix solid-phase dispersion extraction. *Journal of Chromatography A*. 1217(16) 2521-2532.
- Castro J, Sánchez-Brunete C. 2001. Multiresidue analysis of insecticides in soils by gas chromatography with electron-capture detection and confirmation by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography*. 65, pág.45.
- EPA Method 3550 C. 1996. Ultrasonic extraction. U.S. Environmental Protection Agency. Revision 3. 1-6.
- EPA Method 8081 A. 1996. Organochlorine pesticides by gas chromatography. U.S. Environmental Protection Agency. Revision 1. 1-7.
- España Amórtegui, J. C. 2013. Análisis de residuos de plaguicidas en frutas colombianas de exportación y cereales (Doctoral dissertation).
- J. Beltran, F.J. López, F. Hernández. 2000. Solid-phase microextraction in pesticide residue analysis. *Journal of Chromatography A*, 885 389–404,
- Jina Marcela Martínez-Lara y Martha Isabel Páez Melo. 2017. Diseño de experimentos aplicado en la optimización del método de extracción quechers para la determinación de plaguicidas organoclorados y organofosforados en suelos. *Rev. Int. Contam. Ambie.* 33 (4) 559-573.
- Mara C. Avendaño, Pablo Roqué, Miriam E. 2018. Palomeque An Efficient Extraction Method of Persistent Organic Pesticides in Soil Samples for Their Chromatographic Determination. *Soil and Sediment Contamination*, vol. 0, no. 0, 1–13.
- Md. Musfiqur Rahman, A. M. Abd El-Aty, Sung-Woo Kim, Sung Chul Shin, Ho-Chul Shin, Jae-Han Shim. 2017. Quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe sample preparation approach for pesticide residue analysis using traditional detectors in chromatography: A review. *J. Sep. Sci.*, 40, 203–212
- Mosquera, D. 2012. Estandarización de un método para la cuantificación de pesticidas organoclorados y organofosforados en suelos por cromatografía de gases con detectores FID y ECD. Tesis de Química Industrial, Universidad tecnológica de Pereira, facultad de tecnologías, Escuela de Química.
- Muhammad Sajid, Justyna Plotka-Wasyłka. 2018. Combined extraction and microextraction techniques: Recent trends and future perspectives. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. Vol. 103, 74-86.
- Muhammad Sajid, Khalid Alhooshani. 2018. Dispersive liquid-liquid microextraction based binary extraction techniques prior to chromatographic analysis: A review. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. Vol. 108, 167-182.
- Norma Tombesi, Karla Pozo, Andrés Arias, Mónica Alvarez, Petra Pribylova, Ondrej Audy, Jana Klánová. 2018. Records of organochlorine pesticides in soils and sediments on the southwest of Buenos Aires Province, Argentina. *Environmental Earth Sciences* 77:403.
- Qiangfeng Wang, Renji Chen, William Shatner, Yan Cao, Yu Bai. State of the art on the technique of dispersive Liquid-liquid microextraction. *Ultrasonics*

Sonochemistry.

- Uzcátegui, J., Araujo, Y., Mendoza, L. 2011. Residuos de plaguicidas organoclorados y su relación con parámetros físico-químicos en suelos del Municipio Pueblo Llano, Estado Mérida. *Bioagro* 23(2):115-120.
- Barcellos, R., Pizzolato, T. 2018. Combining extraction and purification steps in sample preparation for environmental matrices: A review of matrix solid phase dispersion (MSPD) and pressurized liquid extraction (PLE) applications. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. Vol. 109, 83-96.
- Sângela Nascimento do Carmo, Josias Merib, Adriana Neves Dias, Joni Stolberg, Dilma Budziak, Eduardo Carasek. 2017. A low-cost biosorbent-based coating for the highly sensitive determination of organochlorine pesticides by solid-phase microextraction and gas chromatography-electron capture detection. *Journal of Chromatography A*, 1525 23–31.
- Sergio David Leal Soto, Ana Isabel Valenzuela Quintanar, María de Lourdes Gutiérrez Coronado, María del Carmen Bermúdez Almada, et al. 2014. Residuos de plaguicidas organoclorados en suelos agrícolas. *terra latinoamericana*, 32 (1).
- Takashi Miyawaki, Kazuhiro Tobiishi, Shigeyuki Takenaka & Kiwao Kadokami. 2017. A Rapid Method, Combining Microwave-Assisted Extraction and Gas Chromatography-Mass Spectrometry with a Database, for Determining Organochlorine Pesticides and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Soils and Sediments. *Soil and Sediment Contamination*, 27(1), 31-45.
- Ulrike Mülow-Stollin, Petra Lehnik-Habrink, Stephanie Kluge, Wolfram Bremser, Christian Piechotta. 2017. Efficiency Evaluation of Extraction Methods for Analysis of OCPs and PCBs in Soils of Varying TOC. *Journal of Environmental Protection*, Vol. 8, 693-713.
- Zhang, H., Lu, Y. 2005. Classification and ordination of DDT and HCH in soil samples from the Guanting Reservoir, China. *Chemosphere*. 60, 762-769.