

DISEÑO DE EXPERIMENTOS APLICADO EN LA OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN QuEChERS PARA LA DETERMINACIÓN DE PLAGUICIDAS ORGANOCLORADOS Y ORGANOFOSFORADOS EN SUELOS

Jina Marcela MARTÍNEZ-LARA* y Martha Isabel PÁEZ MELO

Departamento de Química, Facultad de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad del Valle, Campus Meléndez. Ciudad Universitaria Meléndez, Calle 13, número 100-00, Cali, Colombia, C. P. 76001

*Autor para correspondencia: jina.martinez@correounivalle.edu.co

(Recibido enero 2016; aceptado abril 2017)

Palabras clave: contaminantes, proceso de extracción, análisis químico, cromatografía de gases

RESUMEN

La metodología QuEChERS fue implementada para la extracción de catorce plaguicidas, diez organoclorados y cuatro organofosforados en muestras de suelo. El análisis se llevó a cabo por cromatografía de gases acoplado a una trampa de iones cuadrupolar en tándem (MS^2). La extracción de los plaguicidas por la metodología seleccionada se ve afectada por diferentes factores, por tanto, la optimización del proceso de extracción incluyó el uso de dos diseños experimentales: un diseño ortogonal Taguchi inicial para determinar los factores de mayor influencia y posteriormente, un diseño factorial fraccionado 2^{5-1} para determinar las condiciones óptimas preparativas. Los resultados mostraron que, el pH, el ultrasonido y el uso de adsorbentes de limpieza son factores poco relevantes en el proceso de preparación. Por el contrario, la cantidad de agua en la matriz, la relación muestra:solvente y las cantidades de $MgSO_4$ y $NaCl$ como sales de partición, juegan un rol importante dentro del proceso. El método final consistió en la hidratación del suelo con 5 mL de agua tipo I, utilizando 10 g de muestra, agitación por 1 min, adición de 10 mL de acetonitrilo como solvente extractor, desplazamiento salino con 2 g de $MgSO_4$, 2 g de $NaCl$ y limpieza final del extracto con 100 mg de octadecilsilano (C_{18}), 10 mg de carbón grafitado y 600 mg de $MgSO_4$ (por mL de extracto). Con el método obtenido, los plaguicidas estudiados pueden ser extraídos cuantitativamente de la matriz, con recuperaciones entre 70 y 120 %, coeficientes de variación menores al 10 % y límites de detección entre 4.9 y 21.7 $\mu g/kg$.

Key words: contaminants, extractive process, chemical analysis, gas chromatography

ABSTRACT

The QuEChERS methodology was implemented for the extraction of fourteen pesticides, ten organochlorines and four organophosphates in soil samples. The analysis was carried out by gas chromatography coupled to a quadrupole ion trap in tandem mode (MS^2). The extraction of the pesticides by the selected methodology is affected by different factors. Therefore, the extraction process optimization included the use of two experimental designs: a Taguchi orthogonal design to determine most influential factors and, subsequently, a fractional factorial design 2^{5-1} to determine the optimal

preparative conditions. Results showed that the pH, sonication and the use of cleaning adsorbents are irrelevant factors in the preparatory process. By contrast, the amount of water in the matrix, the relationship sample:solvent, and the amounts of MgSO₄ and NaCl as partition salts, play an important role in the process. The final method consisted in the soil hydration with 5 mL of water type I, using 10 g of sample, stirring for 1 min, addition of 10 mL of acetonitrile as extractor solvent, salting out with 2 g of MgSO₄, 2 g NaCl, and final cleansing of the extract with 100 mg of octadecylsilane (C₁₈), 10 mg of graphitized carbon and 600 mg of MgSO₄ (per mL of extract). With the final method, the pesticides studied can be extracted quantitatively from the matrix, with recoveries between 70-120 %, coefficients of variation less than 10 % and detection limits between 4.9-21.7 µg/kg.

INTRODUCCIÓN

El suelo es un componente natural no renovable, esencial en todos los ecosistemas terrestres pues en él se desarrolla la mayor parte de los ciclos vitales. La agricultura y la producción de alimentos es uno de sus principales usos. Sin embargo, entre las amenazas para la sostenibilidad de este recurso se encuentran la contaminación, la erosión, la degradación y la expansión urbana (Doran y Zeiss 2000, Alloway 2001). La contaminación del suelo representa en toda medida un peligro tanto para la salud humana como para los ecosistemas en general, ya que las sustancias tóxicas pueden, por diferentes mecanismos, moverse a través de la cadena alimentaria o dispersarse hacia otros sistemas abióticos (Van der Werf 1996, Martin 2000, Khan et al. 2008, Chen et al. 2015, Qu et al. 2015).

Uno de los principales contaminantes producto de la actividad agrícola del suelo suelen ser los plaguicidas, usados para disminuir las pérdidas en la producción agrícola de alimentos. Las características propias de dichos contaminantes, como por ejemplo su naturaleza lipofílica, su hidrofobicidad, su elevada persistencia, su movilidad y su poder de bioacumulación, los hacen compuestos de importancia ambiental y analítica debido a sus efectos adversos (Van der Werf 1996, Gevao et al. 2000, Tao et al. 2005, Arias-Estévez et al. 2008, Aktar et al. 2009). Este tipo de compuestos han sido catalogados como contaminantes prioritarios por entidades como la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA, por sus siglas en inglés) (Alloway 2001, Vega et al. 2008) y su determinación contribuye al esclarecimiento del posible grado de exposición de los seres vivos y de los ecosistemas en general.

El suelo es una matriz heterogénea y compleja, conformada por componentes tanto orgánicos como inorgánicos. Cuando los plaguicidas son depositados en él, se presentan diferentes tipos de interacciones físicas y químicas (adsorción, lixiviación, degradación,

etc.) que son influenciadas por las propiedades del mismo y por el tipo de compuesto con el que interacciona (Gevao et al. 2000, Alloway 2001, Andreu y Picó 2004, Correia-Sá et al. 2012, Vera et al. 2013). Las fuertes interacciones suelo-plaguicida, la gran variedad de compuestos que se pueden encontrar y las propiedades inherentes de esta matriz hacen que el desarrollo e implementación de métodos extractivos de contaminantes sea una tarea desafiante (Gevao et al. 2000, Andreu y Picó 2004, Tadeo et al. 2012).

La extracción sólido-líquido (SLE, por sus siglas en inglés) es uno de los métodos clásicos para la determinación de trazas de plaguicidas en suelos y se basa en el contacto de la muestra con un disolvente apropiado o mezclas. Algunos ejemplos que implican este tipo de extracción son: la extracción por Soxhlet, la agitación, la extracción acelerada con disolventes (ASE, por sus siglas en inglés) y la extracción ultrasónica asistida (UAE, por sus siglas en inglés) (Tor et al. 2006, Lesueur et al. 2008, Djurovic et al. 2012, Tadeo et al. 2012, Ahmadi et al. 2015, Leyva-Morales et al. 2015). En cuanto a los métodos modernos, la extracción asistida por microondas (MAE, por sus siglas en inglés), la extracción con líquido presurizado (PLE, por sus siglas en inglés), la microextracción en fase sólida (SPME, por sus siglas en inglés) y la extracción “rápida, fácil, económica, efectiva, robusta y segura” (QuEChERS, por sus siglas en inglés) han mostrado ser los que requieren menor tiempo de extracción y bajo consumo de solventes (Bouaid et al. 2001, Lesueur et al. 2008, Vega et al. 2008, Correia-Sá et al. 2012, Tadeo et al. 2012, Vera et al. 2013, Masiá et al. 2015).

La metodología QuEChERS inicialmente se aplicó como un método extractivo para vegetales y frutas, pero su uso ha tomado fuerza como método alternativo para la extracción de plaguicidas del suelo (Lesueur et al. 2008, Dong et al. 2009, Drozdzyński y Kowalska 2009, Tadeo et al. 2012, Vera et al. 2013, González-Curbelo et al. 2015, Masiá et al. 2015).

En un principio el enfoque QuEChERS se basó en la extracción de 10 g de muestra con 10 mL de acetonitrilo seguido de un desplazamiento salino con 4 g de $MgSO_4$ y 1 g de NaCl. La limpieza de los extractos incluía una dispersión en fase sólida (d-SPE, por sus siglas en inglés) con una amina primaria-secundaria (PSA, por sus siglas en inglés) (Anastassiades y Lehotay 2003). Este método es flexible, modificable y está creciendo en popularidad debido a todos los beneficios y características que lo definen en su nombre: rápido, fácil, barato, eficaz, robusto y seguro. Sin embargo, una de las debilidades de su uso en suelos radica en que las condiciones de extracción son afectadas por las fuertes interacciones entre los analitos y el suelo, factores como la relación muestra:solvente, solvente:agua o las cantidades de sales usadas en la partición líquido-líquido, tienen una influencia significativa en las recuperaciones obtenidas por este método (Tadeo et al. 2012, Vera et al. 2013).

El objetivo principal de este trabajo fue la optimización de la metodología QuEChERS por medio de diseños experimentales (DOE, por sus siglas en inglés), usando cromatografía de gases acoplado a una trampa de iones cuadrupolar (GC-ITQ) en modo MS^2 como método analítico. Dos familias de plaguicidas se estudiaron: plaguicidas clorados como el DDT, heptacloro y aldrín, que son parte de la “docena sucia” (Convenio de Estocolmo 2009) y algunos plaguicidas organofosforados de uso actual como clorpirifos, profos y dimetoato. Las mejores condiciones de extracción para ambas familias de plaguicidas fueron establecidas con un diseño experimental de tamizado (diseño Taguchi) para determinar la influencia positiva o negativa de las variables escogidas y con ello reducir el número de factores. Tras el análisis del diseño Taguchi, un diseño factorial fraccional fue usado como diseño final de optimización, en donde con un número reducido de factores y de niveles de trabajo, se determinaron los parámetros significativos y óptimos del proceso.

MATERIALES Y MÉTODOS

Caracterización física del suelo de referencia

Como material de partida para el desarrollo de los experimentos de optimización se colectó suelo sin registro de uso agrícola y se expuso al sol por 48 h. Se aseguró la limpieza del suelo con un análisis de plaguicidas anterior a los procedimientos experimentales de extracción y no se detectó la presencia de los compuestos de estudio. El suelo usado proviene del campus universitario de la Universidad

del Valle (Cali, Colombia). Los parámetros que se determinaron para llevar a cabo la caracterización del suelo fueron: contenido de materia orgánica (MO), densidad aparente, capacidad de campo, pH y textura del suelo.

Reactivos y soluciones

Se estudiaron 14 plaguicidas: cuatro organofosforados (profos, dimetoato, famfur y clorpirifos) y 10 organoclorados (alfa-hexachlorociclohexano (α -BHC), beta-hexachlorociclohexano (β -BHC), metoxicloro, dicloro difenil tricloroetano (DDT), 1,1-dicloro-2,2-bis(4-clorofenil)etano (4,4'-DDE), 1,1-dicloro-2,2-bis(4-clorofenil)etano (4,4'-DDD), endrín, aldrín, alfa-endosulfán y heptacloro). Todos los estándares de plaguicidas se adquirieron en Chem Service y Dr. Ehrenstorfer con una pureza superior al 98 %. Se prepararon 10 mL de una mezcla concentrada (solución madre) a 500 mg/L de cada uno de los plaguicidas. Para ello, se tomó aproximadamente 5 mg de cada estándar y se redisolvió con hexano:acetona en una relación 80:20. Adicionalmente, se prepararon 25 mL de una solución de trabajo a 5 mg/L con 250 μ L de la solución madre.

Para la extracción QuEChERS y el proceso de limpieza d-SPE se utilizó cloruro de sodio (NaCl, 99.8 %, Sigma Aldrich), ácido acético glacial (CH_3COOH , grado HPLC, J.T. Backer), sulfato de magnesio anhidro ($MgSO_4$, 98 %, UCT-ENVIRONCLEAN), amina primaria secundaria (PSA) (UCT-ENVIRONCLEAN), octadecilsilano (C_{18} , UCT-ENVIRONCLEAN) y carbón grafitado (GCB) (Agilent Technologies). Para los análisis químicos se utilizó acetonitrilo (grado HPLC), hexano (grado reactivo) y acetona (grado HPLC) obtenidos en J.T. Backer.

Instrumentación

Los análisis cromatográficos se llevaron a cabo en un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas de trampa iónica cuadrupolar (GC-ITQ700, Thermo Scientific), equipado con una columna capilar de mediana polaridad TR-527 (35 % fenil metilpolisiloxano) de 30 m x 0.25 mm diámetro interno y 0.25 μ m de espesor de película. El helio (pureza 99.9 %) se utilizó como gas portador a una velocidad de flujo de 1 mL/min. La temperatura del inyector se fijó en 240 °C y las inyecciones se realizaron en el modo sin división (splitless). El programa de calentamiento del horno se inició a 70 °C manteniendo la temperatura 3.5 min, paulatinamente se incrementó hasta 180 °C a una velocidad de 25 °C/min. Posteriormente se aumentó hasta 300 °C a un ritmo de 15 °C/min, esta temperatura se mantuvo por 5 min.

La fuente de iones operó a 250 °C, en modo de impacto electrónico a 70 eV, con corriente de emisión de 250 μ A. Los plaguicidas fueron analizados en el espectrómetro de masas ITQ-700, en modo tándem en el tiempo, con dos fraccionamientos sucesivos de las moléculas (MS^2). Los iones precursores de los analitos fueron determinados con base en la intensidad de los valores de relación masa/carga (m/z) obtenidos después de las inyecciones individuales de los compuestos en el modo full-scan (50-450 m/z) del espectrómetro de masas. En el **cuadro I** se muestran los iones precursores para cada plaguicida y datos propios del método instrumental MS^2 de la trampa de iones.

CUADRO I. PARÁMETROS DE TRABAJO DEL ESPECTRÓMETRO DE MASAS. IONES PRECURSORES, ENERGÍAS DE EXCITACIÓN Y RANGO DE MASAS

Compuesto	Ion precursor m/z	Energía de excitación máxima	Rango de masas de trabajo en modo MS^2
Profos	158	0.225	39-158
α -BHC	181	0.45	90-181
β -BHC	181	0.45	90-180.9
Dimetoato	125	0.3	41-125
Heptacloro	272	0.225	68-270
Aldrín	263	0.45	131-262
Clorpirifos	314	0.225	78-313
Endosulfán I	41	0.45	120-240
4,4'-DDE	246	0.45	123-246
Endrín	281	0.3	93-280.9
4,4'-DDD	235	0.225	78-235
DDT	235	0.225	58-235
Famfur	218	0.225	54-218
Metoxicloro	227.12	0.45	113-227.1

α -BHC = alfa-hexaclorociclohexano, β -BHC = beta-hexaclorociclohexano, 4,4'-DDE = 1,1-dicloro-2,2-bis(4-clorofenil)etano, 4,4'-DDD = 1,1-dicloro-2,2-bis(4-clorofenil)etano, DDT = dicloro difenil tricloroetano, m/z = relación masa carga, MS^2 = modo de trabajo del espectrómetro de masas (doble fraccionamiento).

Evaluación y aplicación del método extractivo QuEChERS propuesto y determinación de parámetros de calidad analítica e instrumental

Para la evaluación del método establecido se pesaron 10 $g \pm 0.002$ g de la muestra de suelo en un tubo de centrifuga de 50 mL. Después fueron adicionados 5 mL de agua con una agitación posterior de 1 min, con el objetivo de hidratar los poros de la muestra (Anastassiades y Lehotay 2003, García et al. 2010). A la mezcla se le adicionaron 10 mL de acetonitrilo,

se agitó en vortex por 1 min y se añadieron las sales de partición (2 g de $MgSO_4$ anhidro y 2 g de NaCl), finalmente se volvió a agitar por 1 min. Para permitir la diferenciación de las fases obtenidas se centrifugó la mezcla por 5 min a 3500 rpm. Una alícuota de 2 mL de la fase orgánica obtenida fue adicionada a un tubo de centrifuga de 15 mL, que contenía 200 mg de C_{18} , 20 g de GCB y 1200 mg de $MgSO_4$, se mezcló por 1 min y se llevó a centrifugación por 5 min a 3500 rpm. Del extracto orgánico obtenido se tomó 1 mL y se evaporó hasta sequedad bajo un flujo suave de nitrógeno. Posteriormente se reconstituyó con 1 mL de hexano:acetona (80:20) y se inyectó en el sistema de cromatografía de gases GC-ITQ700.

Dentro de los parámetros de calidad analítica del método extractivo e instrumental, se determinó el rango lineal y dinámico de análisis (r^2) a través de curvas de calibración en matriz, preparadas a partir de extractos orgánicos obtenidos de muestras de suelo libre de plaguicidas. La cuantificación se realizó por el método de calibración externa. La precisión de la metodología extractiva se verificó al calcular el coeficiente de variación (CV) de los porcentajes de recuperación promedio en diferentes días (precisión interdía) y los análisis realizados en un mismo día (intradía), fortificando muestras de suelo de referencia bajo dos niveles (40 y 80 μ g/kg).

La exactitud se evaluó con los porcentajes de recuperación promedio (extracciones por triplicado) y el CV entre las concentraciones obtenidas bajo cuatro niveles de fortificación ($N1 = 40$ μ g/kg, $N2 = 60$ μ g/kg, $N3 = 80$ μ g/kg y $N4 = 100$ μ g/kg). La sensibilidad se evaluó mediante el cálculo de los límites de detección (LD) y límites de cuantificación (LC). Adicionalmente, el método propuesto fue evaluado en tres tipos de suelo bajo dos niveles de fortificación (40 y 80 μ g/kg).

Estrategia de optimización: diseño de experimentos

Existen diferentes parámetros que pueden afectar el proceso extractivo que se lleva a cabo por el método QuEChERS, como por ejemplo, el tipo de suelo, la hidratación de la muestra, la relación muestra:solvente, sales de partición o el uso de sistemas amortiguadores, entre otros (Vera et al. 2013, González-Curbelo et al. 2015). Para obtener un método que reúna las condiciones extractivas favorables, es conveniente considerar la optimización de este tipo de variables. Como estrategia de proceso se usaron dos diseños: el de Taguchi o de tamizado, para evaluar a grandes rasgos la influencia de diferentes factores tomados como relevantes dentro del proceso y otro

dirigido hacia los factores que mostraron tener un efecto importante en las recuperaciones del proceso extractivo.

En los diferentes ensayos correspondientes a los DOE implementados se tomaron muestras de suelo de referencia, se depositaron en tubos con tapa de rosca y se fortificaron a una concentración de 80 µg/kg con la solución de trabajo. Las muestras contaminadas se agitaron en vórtice por 1 min y se dejaron bajo temperatura ambiente por 48 h para permitir una mayor interacción entre los plaguicidas y la matriz. Posteriormente, dichas muestras fueron sometidas a los experimentos de extracción.

Diseño Taguchi: exploración de factores

El diseño experimental Taguchi fue seleccionado para investigar el efecto de diferentes factores en la recuperación de plaguicidas en las muestras fortificadas. El método DOE con Taguchi de matriz ortogonal es un enfoque basado en un factorial que fusiona técnicas estadísticas y de ingeniería y facilita el estudio del sistema por un conjunto de variables independientes (factores), tanto controlables como incontrollables (dinámico/ruido), sobre una región específica de interés (niveles). En este diseño se emplea un número mínimo de ensayos, se ahorra tiempo, recursos y los resultados obtenidos son insensibles a los cambios ambientales y otros factores de ruido (Taguchi 1987, Venkata Mohan et al. 2007, Gutiérrez y Salazar 2012). Se implementó un diseño Taguchi ortogonal L27 con 10 factores, cada uno a tres niveles. Los factores y los niveles de cada uno se muestran en el **cuadro II**. La secuencia de las corridas (27) fue aleatoria para reducir el sesgo. Las cantidades evaluadas en cada factor fueron elegidas como consecuencia de una revisión bibliográfica

CUADRO II. FACTORES TOMADOS EN CUENTA EN EL DISEÑO TAGUCHI ORTOGONAL

Factor	Niveles (1, 2, 3)
Cantidad de muestra (g)	5, 7.5, 10
Cantidad de solvente (mL)	5, 7.5, 10
Cantidad de agua (mL)	5, 7.5, 10
Cantidad de MgSO ₄ anhidro (g)	2, 4, 6
Cantidad de NaCl (g)	0.5, 1, 2
pH	4, 7, 8
Ultrasonido (min)	0, 5, 15
PSA (mg)	0, 50, 100
C ₁₈ (mg)	0, 50, 100
GCB (mg)	0, 10, 50

PSA = amina primaria secundaria, C₁₈ = octadecilsilano, GCB = carbón grafitado

del proceso de preparación de muestras QuEChERS (Asensio-Ramos et al. 2010, García et al. 2010, Bragança et al. 2012, Correia-Sá et al. 2012, Rouvière et al. 2012).

En el proceso de extracción se evaluaron el efecto de la cantidad de: 1) muestra, 2) solvente, 3) agua, 4) sales de partición y además 5) pH y 6) tiempo de aplicación de ultrasonido. En la limpieza de los extractos se evaluó el efecto de tres diferentes adsorbentes: PSA, C₁₈ y GCB, manteniendo constante la cantidad de sulfato de magnesio (600 mg/mL de extracto). Se tomó como respuesta del sistema los porcentajes de recuperación de cada uno de los plaguicidas obtenidos en las 27 corridas del diseño.

Para el análisis del diseño se utilizó como variable de respuesta los valores del cociente o razón señal/ruido (S/N), arrojados por el programa Minitab 16 y que se calculan a partir de las áreas cromatográficas obtenidas para cada compuesto en cada experimento.

Diseño factorial fraccionado: optimización de condiciones

Un diseño factorial fraccionado (media fracción), con cinco factores, resolución V y 16 corridas se usó como segundo método de verificación de la influencia de los factores en el proceso. Los factores investigados en el diseño 2⁵⁻¹ factorial fraccionado se muestran en el **cuadro III**. Se usaron dos niveles, los valores altos y bajos para cada factor se basan en el análisis del diseño Taguchi y se denotan como -1 y +1 en unidades codificadas.

CUADRO III. FACTORES EVALUADOS Y NIVELES PARA EL DISEÑO FACTORIAL FRACCIONADO 2⁵⁻¹

Factores	Código del factor	Niveles de factor	
		-1	+1
Cantidad de muestra (g)	A	5	10
Cantidad de solvente (mL)	B	7.5	10
Cantidad de agua (mL)	C	5	7.5
Cantidad de MgSO ₄ (g)	D	2	6
Cantidad de NaCl (g)	E	0.5	2

Con base en los experimentos realizados se obtuvieron las ecuaciones polinomiales de segundo orden, para cada plaguicida dichas ecuaciones fueron usadas para optimizar la recuperación de los plaguicidas en un rango entre 80 y 120 %. La generación de los diseños experimentales y el análisis fueron llevados a cabo con el programa Minitab 16 para Windows.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las características del suelo usado como base en el proceso extractivo se muestran en el **cuadro IV**. De manera general, en la zona del Valle del Cauca, región de donde se tomaron las muestras de suelo, predominan los franco-arcillosos con valores de pH entre 5.5 y 7.0 y contenidos de materia orgánica entre 2 y 4 % (Durán 1995). Los valores bajos de densidad aparente son propios de suelos porosos, bien aireados, con buen drenaje y buena penetración de raíces, lo que permite un adecuado desarrollo de las plantas. La importancia de la caracterización del material usado radica en que la cantidad de contaminante que se une al suelo varía con el tipo de analito y con las características del suelo, como el contenido de materia orgánica, el pH, la textura y la fracción mineral, entre otros (Gevao et al. 2000, Loffredo y Senesi 2008, Correia-Sá et al. 2012, Vera et al. 2013).

CUADRO IV. CARACTERIZACIÓN FÍSICA Y QUÍMICA DEL SUELO USADO EN LOS EXPERIMENTOS

Parámetro	Valor
Humedad (%)	14 %
Densidad aparente	1.38 g/cm ³
Capacidad de campo	30 %
pH	6.5
Materia orgánica (%)	2.8

Estos parámetros pueden influir en la movilidad y en la disponibilidad de los analitos y por ende también en la calidad del proceso de extracción, razón por la cual, es pertinente mencionar que el método desarrollado en este caso está enfocado a este tipo de suelo.

Diseño de experimentos

Análisis del diseño experimental preliminar: Taguchi

Se utilizó la relación señal/ruido (S/N) como una medida de robustez que sirve para identificar el factor evaluado que minimiza el efecto de ruido sobre la respuesta (Gutiérrez y Salazar 2012). En el **cuadro V** se muestran las relaciones S/N para cada combinación de niveles de factor evaluados en el diseño correspondiente a dos de los plaguicidas estudiados (DDT, profos). En este caso se eligió la relación “más alto es mejor” que proporciona Minitab 16. Se muestra además dos parámetros: el valor delta, que mide el tamaño del efecto al tomar la diferencia entre el valor más alto y el valor más bajo de cada característica de respuesta (porcentajes de recuperación) y el escalafón, que ordena los factores del efecto más grande (con base en los valores delta) al efecto más pequeño sobre la característica de respuesta. Para los plaguicidas DDT y profos por ejemplo, la cantidad de muestra y solvente son dos factores importantes dentro del proceso (escalafón 1 y 2). En ambos casos, una cantidad de muestra de 10 g y de acetonitrilo (solvente) de 10 mL, arrojaron los mejores resultados.

CUADRO V. MEDIA DE LAS RELACIONES SEÑAL/RUIDO EN CADA NIVEL INDIVIDUAL PARA LOS PLAGUICIDAS DICLORO DIFENIL TRICLOROETANO (DDT) Y PROFOS

DDT										
Nivel	Muestra	Solvente	mL agua	MgSO ₄	NaCl	pH	PSA	C ₁₈	GCB	Ultrasonido (min)
1	73.97	73.35	77.14	76.92	75.21	76.16	76.13	76.35	76.99	76.20
2	72.70	75.34	74.96	74.20	75.03	75.19	75.10	75.76	75.53	75.34
3	81.53	77.69	74.55	75.45	76.54	75.60	75.60	74.87	74.38	75.28
Delta	8.84	4.34	2.59	2.72	1.51	0.98	1.03	1.49	2.61	0.92
Escalafón	1	2	5	3	6	9	8	7	4	10
Profos										
Nivel	Muestra	Solvente	mL agua	MgSO ₄	NaCl	pH	PSA	C ₁₈	GCB	Ultrasonido (min)
1	64.03	62.87	73.49	70.07	69.87	73.05	72.34	69.92	71.24	71.54
2	66.17	70.75	68.62	68.67	68.94	66.62	69.84	69.90	69.24	67.78
3	83.21	75.27	67.89	71.44	71.53	71.29	68.06	70.63	70.15	71.02
Delta	19.18	12.40	5.59	2.77	2.59	6.43	4.28	0.73	2.01	3.76
Escalafón	1	2	4	7	8	3	5	10	9	6

PSA = amina primaria secundaria, C₁₈ = octadecilsilano, GCB = carbón grafitado, DDT = dicloro difenil tricloroetano

CUADRO VI. ESCALAFONES OBTENIDOS PARA CADA FACTOR y PLAGUICIDA ANALIZADO

Compuesto	muestra (g)	solvente (mL)	agua (mL)	MgSO ₄ (g)	NaCl (g)	pH	PSA (mg)	C ₁₈ (mg)	GCB (mg)	Ultrasonido (min)
Profos	1	2	4	3	5	9	6	8	7	10
α -BHC	2	1	3	5	4	10	7	6	9	8
β -BHC	2	1	4	3	6	5	8	7	10	9
Heptacloro	3	2	4	1	5	6	8	7	9	10
Aldrín	1	3	4	2	5	6	10	8	9	7
Clorpirifos	2	3	4	1	5	6	8	7	9	10
Endosulfán I	1	2	4	3	6	10	5	9	8	7
4,4'-DDE	3	1	4	2	5	6	8	7	10	9
Endrín	1	2	4	3	5	10	6	9	8	7
4,4'-DDD	2	3	5	1	4	9	8	7	6	10
DDT	1	2	4	3	5	8	10	9	6	7
Famfur	3	2	5	1	4	6	10	9	8	7
Metoxicloro	1	2	4	3	6	7	8	9	10	5

α -BHC = alfa-hexaclorociclohexano, β -BHC = beta-hexaclorociclohexano, 4,4'-DDE = 1,1-dicloro-2,2-bis(4-clorofenil)eteno, 4,4'-DDD = 1,1-dicloro-2,2-bis(4-clorofenil)etano, DDT = dicloro difenil tricloroetano, PSA = amina primaria secundaria, C₁₈ = octadecilsilano, GCB = carbón grafitado

Para cada plaguicida, en el **cuadro VI** se presenta un compendio de los escalafones obtenidos para los parámetros evaluados del proceso de extracción. La distribución en un histograma que relaciona la frecuencia de aparición de los escalafones por factor, tomando en cuenta el total de plaguicidas analizados (**Fig. 1**), muestra de manera general qué factores tienen una influencia considerable. Se encontró que la cantidad de muestra, la cantidad de solvente y de sales de partición con escalafón entre 1 y 5, en su mayoría son los factores relevantes. Por otro lado, factores como el ultrasonido, el pH y el uso de ab-

sorbentes en el proceso de limpieza mostraron tener poco efecto, con escalafón entre 6 y 10.

Estos resultados son coherentes con evaluaciones ya reportadas. Se ha encontrado como un factor importante la adición de agua al suelo en diferentes relaciones agua:muestra (1:2, 2:2, 1:1), puesto que la humectación permite una mejor apertura de poros de la matriz, un debilitamiento de las interacciones de los analitos con el suelo y facilita la dispersión y homogeneización del proceso (Correia-Sá et al. 2012, Wang et al. 2012, Fernandes et al. 2013). De igual manera se ha hecho énfasis en la relación

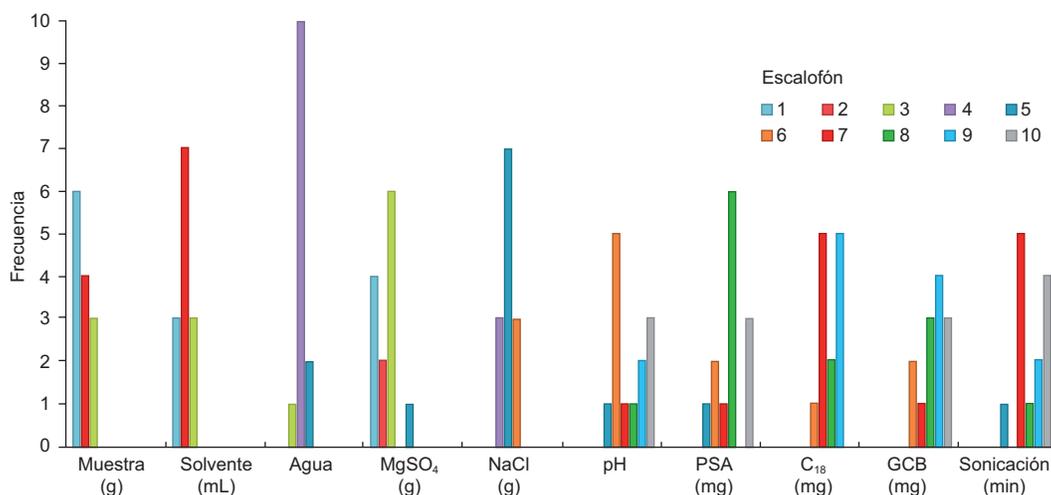


Fig. 1. Frecuencia de aparición de los diferentes escalafones obtenidos para cada factor y cada plaguicida. PSA = amina primaria secundaria, C₁₈ = octadecilsilano, GCB = carbón grafitado

muestra:solvente buscando mejorar la relación de dispersión y homogeneización adecuada que contribuya al desplazamiento efectivo de los contaminantes hacia el solvente de extracción. En cuanto a las cantidades de sales, $MgSO_4$ y $NaCl$, la variación en la relación de éstas afecta la extracción de los compuestos polares y no polares (Anastassiades y Lehotay 2003, Caldas y Bolzan 2011).

De los factores cuyo efecto no fue significativo según el diseño, se esperaba que el ultrasonido permitiera mejorar las recuperaciones al debilitar la fuerte unión suelo:plaguicida (Bragança et al. 2012, Wang et al. 2012). Sin embargo, los resultados mostraron que la agitación con vórtice es suficiente en este caso. En lo que respecta al proceso de limpieza, diversos procedimientos que incluyen QuEChERS como método de extracción implementan d-SPE como método de limpieza, en este caso se encontró que el uso de adsorbentes dispersivos no tiene una influencia significativa en la recuperación de los plaguicidas. García et al. (2010), Caldas y Bolzan (2011) y Wang et al. (2012) concluyeron que lo anterior se debe al hecho de que los coextractos eliminados generalmente por los adsorbentes (lípidos, azúcares, pigmentos, etc.) pueden no estar presentes en los extractos de suelo. En consecuencia, se ha observado que el uso de QuEChERS sin la etapa de limpieza hace el procedimiento más simple, más rápido, más barato y más eficiente (García et al. 2010).

Como consecuencia de los resultados del diseño preliminar implementado, sólo cinco factores fueron elegidos para ser evaluados en la segunda etapa. La

cantidad de muestra, de solvente, de agua y de sales de partición muestran tener efectos importantes entre un nivel y otro, en tanto que el pH y el ultrasonido a nivel de extracción tienen poca influencia. Por tal motivo se decidió optar por llevar a cabo las extracciones a pH 7 (sin adición de amortiguador) y sin etapa de ultrasonido. De igual manera, los resultados parecen mostrar que el proceso de limpieza con los absorbentes es innecesario. Sin embargo, 100 mg de C_{18} , 10 mg de GCB y 600 mg de $MgSO_4$ por mL de extracto fueron usados en todos los ensayos realizados para proteger la vida útil del sistema cromatográfico.

Análisis del diseño factorial fraccionado

Con el diseño factorial fraccionado utilizado en este trabajo se evaluaron simultáneamente los efectos de los cinco factores elegidos como principales. El análisis del diseño permitió obtener los coeficientes para cada factor y con ellos se construyeron las ecuaciones para cada plaguicida, en donde se relaciona el porcentaje de recuperación obtenido en cada caso, con los factores y sus respectivos coeficientes. En el **cuadro VII** se muestran los coeficientes para cada factor analizado y cada plaguicida evaluado en el proceso de extracción.

Con base en el **cuadro VII** se obtuvieron ecuaciones polinómicas de segundo orden, cuya estructura se muestra en la ec. 1, donde los porcentajes de recuperación de cada plaguicida (% $R_{\text{Plaguicida}}$) se relacionan por medio de una ecuación lineal con cada uno de los factores de mayor influencia, determinados a través del diseño de tamizaje.

CUADRO VII. COEFICIENTES ESTIMADOS PARA EL PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN (UNIDADES CODIFICADAS)

Compuesto	β_0	β_1	β_2	β_3	β_4	β_5	β_{12}	β_{13}	β_{14}	β_{15}	β_{23}	β_{24}	β_{25}	β_{34}	β_{35}	β_{45}
Profos	86.6	3.2	-2.4	14.5	8.1	-0.6	-23.7	25.4	0.3	-28.6	-22.2	-8.8	17.7	28.2	-28.4	0.4
α -BHC	82.8	-9.9	9.3	5.1	-22.7	0.6	-10.9	7.7	-8.4	-14.3	-6.9	-10.3	-5.7	28.5	-5.5	9.5
β -BHC	84.0	3.7	7.5	10.0	-10.8	13.8	-19.3	11.3	-9.4	-13.5	-3.9	-10.5	-2.7	23.7	-7.5	-0.9
Heptacloro	46.1	-1.9	4.6	4.1	-8.8	2.1	0.5	2.4	-5.7	-7.8	0.9	-0.8	0.7	16.0	-10.3	5.3
Aldrin	42.6	-3.5	4.1	3.9	-8.4	4.2	-0.4	1.7	-3.5	-7.5	0.6	0.1	2.5	12.1	-9.1	4.6
Clorpirifos	62.2	-7.9	0.6	13.6	-16.3	0.0	-1.1	-1.2	-0.6	5.3	-6.9	6.7	1.8	11.5	-10.3	9.4
Endosulfán I	39.0	-2.8	-1.8	8.8	-11.8	2.0	-0.8	1.7	0.7	4.8	-7.0	4.7	1.3	5.1	-6.0	4.6
4,4'-DDE	69.9	-5.0	-4.9	15.2	-17.2	1.6	3.8	-6.3	2.7	5.0	-7.2	8.4	10.0	8.2	-19.2	12.3
Endrín	64.6	-4.9	5.1	8.0	-20.8	5.5	0.2	-10.9	-5.6	1.5	-7.0	-2.7	8.4	7.8	-14.6	8.1
4,4'-DDD	79.2	-5.6	-7.6	19.1	-20.2	-0.6	4.5	-8.5	4.3	11.0	-9.9	10.4	8.8	6.9	-23.6	14.5
DDT	70.6	-3.4	-6.1	14.9	-16.5	1.2	6.5	-6.9	2.2	7.6	-6.9	8.2	7.1	10.5	-21.5	12.6
Metoxicloro	86.5	1.3	-8.9	19.5	-22.3	2.2	0.9	-4.1	-0.6	15.1	-8.9	8.8	-1.5	9.9	-20.9	12.6
Famfur	119.5	12.0	-10.8	21.8	11.1	6.9	-31.9	28.9	2.3	-25.6	-28.6	-3.9	24.8	24.9	-42.6	2.5
Dimetoato	128.9	2.3	-16.8	24.4	-0.9	3.6	-14.3	18.4	0.6	-14.2	-28.2	6.7	16.7	31.6	-44.2	10.0

α -BHC = alfa-hexaclorociclohexano, β -BHC = beta-hexaclorociclohexano, 4,4'-DDE = 1,1-dicloro-2,2-bis(4-clorofenil)eteno, 4,4'-DDD = 1,1-dicloro-2,2-bis(4-clorofenil)etano, DDT = dicloro difenil tricloroetano

$$\begin{aligned} \%R_{Plaguicida} = & \beta_0 + \beta_1A + \beta_2B + \beta_3C + \\ & \beta_4D + \beta_5E + \beta_1\beta_2AB + \beta_1\beta_3AC + \beta_1\beta_4AD + \\ & \beta_1\beta_5AE + \beta_2\beta_3BC + \beta_2\beta_4BD + \beta_2\beta_5BE + \\ & \beta_3\beta_4CD + \beta_3\beta_5CE + \beta_4\beta_5DE \end{aligned} \quad (1)$$

Este modelo consta de cinco efectos principales que corresponden a los cinco factores seleccionados (A: gramos de muestra, B: mL de solvente, C: mL de agua, D: gramos de MgSO₄, E: gramos de NaCl) y se incluye las interacciones entre estos (AB-DE). Los coeficientes β_0 , β_1 a β_5 y $\beta_1\beta_2$ a $\beta_2\beta_5$ representan el coeficiente de intercepción, los coeficientes de los factores principales y los coeficientes de interacción, respectivamente. La verificación de los modelos obtenidos para cada plaguicida se realizó con tres experimentos de extracción (identificados como

Exp. 1, Exp. 2 y Exp. 3, fortificados a 90 $\mu\text{g}/\text{kg}$) con cantidades aleatorias de los diferentes factores (**Cuadro VIII**). El porcentaje de recuperación (% R) obtenido experimentalmente fue comparado con el % R teórico calculado con o sin interacciones entre factores (**Fig. 2**).

CUADRO VIII. EXPERIMENTOS DE VERIFICACIÓN DE LOS MODELOS POLINOMIALES

Factores	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3
Muestra (g)	1	-1	1
Solvente (mL)	1	-1	-1
Agua (mL)	-1	-1	-1
MgSO ₄ (g)	-1	-1	-1
NaCl (g)	1	1	1

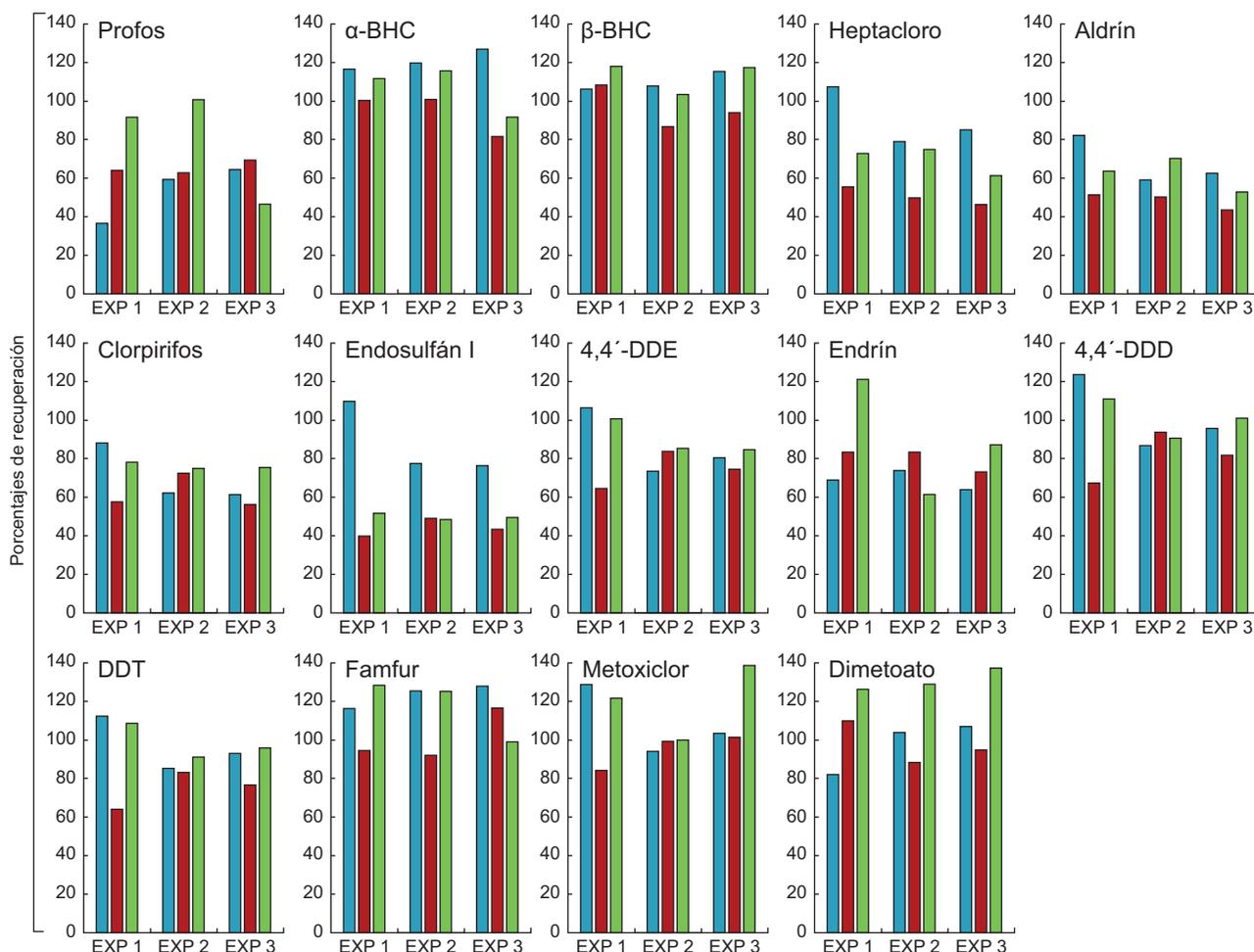


Fig. 2. Comparación entre los porcentajes de recuperación (% R) obtenidos en los experimentos de verificación de los modelos polinomiales para cada plaguicida (EXP 1, EXP 2, EXP 3). % R experimentales (barra azul), % R modelados sin interacciones entre factores (barra roja), % R modelados con interacción entre factores (barra verde). α -BHC = alfa-hexaclorociclohexano, β -BHC = beta-hexaclorociclohexano, 4,4'-DDE = 1,1-dicloro-2,2-bis(4-clorofenil)etano, 4,4'-DDD = 1,1-dicloro-2,2-bis(4-clorofenil)etano, DDT = dicloro difenil tricloroetano

Como se muestra en la **figura 2**, en la mayoría de los casos los porcentajes de recuperación calculados teóricamente para cada plaguicida concuerdan con las recuperaciones obtenidas experimentalmente. La poca relación de algunos de los resultados es consecuencia de los errores inherentes no sólo en las recuperaciones obtenidas en los experimentos de evaluación, sino también en las incertidumbres de los datos usados en la construcción de los modelos. Asimismo, el efecto matriz propio de las evaluaciones cromatográficas puede ser parte de la variación en las mediciones (Erney et al. 1993).

Tras la verificación de los modelos, las ecuaciones obtenidas para cada plaguicida se usaron en la optimización de las respuestas. Se tomó como objetivo un 100 % en el porcentaje de recuperación de los plaguicidas en la matriz de análisis. Se empleó la opción “gráfica de optimización” del programa Minitab 16, para identificar la configuración de factores que dan la mejor respuesta a pronosticar. En el programa, se estableció el 100 % como el valor deseado (óptimo) de recuperación y un rango de trabajo efectivo entre 80 % (mínimo) y 120 % (máximo).

En el **cuadro IX** se muestran los valores óptimos obtenidos de cada factor para cada plaguicida. Relaciones 1:1 y 1:2 muestra:solvente, relaciones 2:1 muestra:agua, así como relaciones 2:1 y 1:1 MgSO₄:NaCl, fueron encontradas como óptimas en el proceso de extracción. Debido a que no se detectó para todos los compuestos una uniformidad en las cantidades óptimas, se construyó un diagrama de

frecuencias para determinar las cantidades de mayor frecuencia entre los plaguicidas para cada factor (**Fig. 3**). Los valores óptimos, fueron elegidos tomando en cuenta las cantidades de mayor frecuencia: 10 g de muestra, 10 mL de acetonitrilo, 5 mL de agua, 2 g de MgSO₄ y 2 g de NaCl.

Evaluación del método

Para evaluar el método QuEChERS se determinó: linealidad, precisión, exactitud, límites de detección (LD) y límites de cuantificación (LC). Los resultados para cada uno de los parámetros evaluados se resumen en el **cuadro X**. Los rangos dinámicos lineales se obtuvieron en el intervalo de 10.2 a 258.6 µg/kg, los coeficientes de regresión (r^2) superaron 0.990 para todos los analitos. El LD del método (con base en la relación S/N = 3) para los analitos seleccionados varió de 4.9 a 21.7 µg/kg y LC (con base en la relación S/N =10) de 9.9 a 38.4 µg/kg. El CV (%) de los procesos de extracción y determinación de los analitos fue en promedio 5.3 %. En la **figura 4** se muestra el compendio de las evaluaciones de recuperación realizadas a las muestras fortificadas bajo cuatro diferentes concentraciones. En su mayoría, los porcentajes de recuperación calculados estuvieron entre 70 y 120 %, los cuales se consideran como aceptables dentro del análisis de residuos de plaguicidas en matrices ambientales (SANTE 2015).

Con el objetivo de observar la robustez del método, éste fue evaluado en tres diferentes tipos de suelos, identificados como S1, S2 y S3 (**Cuadro XI**).

CUADRO IX. CANTIDADES ÓPTIMAS PRONOSTICADAS DE CADA FACTOR PARA LOS PLAGUICIDAS ANALIZADOS

Plaguicida	Muestra (g)	Solvente (mL)	Agua (mL)	MgSO ₄ (g)	NaCl (g)
Profos	9.938	7.736	7.115	4.703	2.000
α-BHC	9.996	9.985	7.500	4.192	0.500
Dimetoato	9.966	8.183	7.500	2.000	2.000
Famfur	9.981	7.542	5.034	2.000	1.970
Metoxicloro	5.000	7.500	5.000	2.003	1.958
DDT	10.000	8.707	5.000	2.213	2.000
4,4'-DDD	9.997	7.500	5.007	2.008	1.998
Endrín	5.079	10.000	5.268	2.655	2.000
Aldrin	5.000	10.000	5.000	2.000	2.000
Endosulfán I	5.000	7.500	7.500	2.000	0.500
Clorpirifos	8.879	7.500	7.500	2.758	0.500
Heptacloro	5.000	10.000	5.000	2.000	2.000
β-BHC	10.000	9.963	5.000	2.255	0.500
4,4'-DDE	9.999	9.998	5.005	2.000	1.998

α-BHC = alfa-hexaclorociclohexano, β-BHC = beta-hexaclorociclohexano, 4,4'-DDE = 1,1-dicloro-2,2-bis(4-clorofenil)etano, 4,4'-DDD = 1,1-dicloro-2,2-bis(4-clorofenil)etano, DDT = dicloro difenil tricloroetano

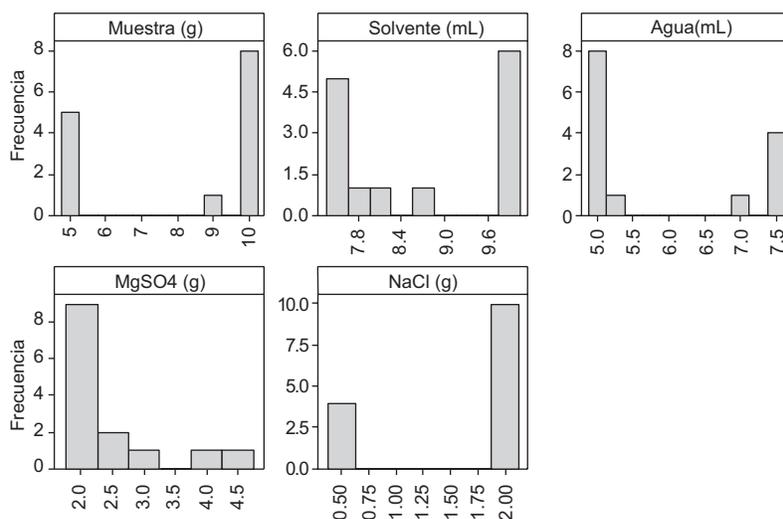


Fig. 3. Frecuencias óptimas pronosticadas para cada factor evaluado

CUADRO X. DATOS ANALÍTICOS DE LA METODOLOGÍA QUECHERS OBTENIDA PARA LA EXTRACCIÓN DE PLAGUICIDAS EN MUESTRAS DE SUELO

Analito	Linealidad		LD ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	LC ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Precisión*	
	Rango lineal ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	R^2			CV (%) intradía (n=6)	CV (%) interdía (n=6)
Profos	27.1-135.0	0.9902	18.2	29.1	1.5	10.6
α -BHC	10.3-161.8	0.9942	5.8	9.9	3.1	10.3
β -BHC	18.5-190.3	0.9930	10.2	17.3	2.3	10.4
Dimetoato	26.6-199.9	0.9928	17.1	27.8	0.5	1.7
Heptacloro	21.5-157.3	0.9903	15.7	22.7	3.2	6.8
Aldrin	23.2-166.2	0.9930	15.8	24.9	2.5	5.4
Clorpirifos	21.7-158.8	0.9942	18.6	19.3	3.0	6.5
Endosulfán I	21.2-214.1	0.9947	20.5	26.9	4.1	7.3
4,4'-DDE	11.9-140.9	0.9954	4.9	11.9	3.6	6.5
Endrín	22.3-258.6	0.9970	18.4	23.7	4.8	10.4
4,4'-DDD	10.2-194.4	0.9970	9.04	12.5	5.1	6.7
DDT	14.9-194.4	0.9941	8.5	13.9	3.5	5.0
Famfur	25.9-169.5	0.9912	20.3	26.4	4.1	10.9
Metoxicloro	30.6-158.1	0.9905	21.7	38.4	2.5	4.8
Crterios de aceptación	$R^2 > 0.99$	-	-	-	$\leq 20\%$	$\leq 20\%$

*Precisión evaluada bajo dos niveles de fortificación (40 y 120 $\mu\text{g}/\text{kg}$). α -BHC = alfa-hexaclorociclohexano, β -BHC = beta-hexaclorociclohexano, 4,4'-DDE = 1,1-dicloro-2,2-bis(4-clorofenil)eteno, 4,4'-DDD = 1,1-dicloro-2,2-bis(4-clorofenil)etano, DDT = dicloro difenil tricloroetano, R^2 = coeficiente de determinación, LD = límite de detección, LC = límite de cuantificación, CV = coeficiente de variación.

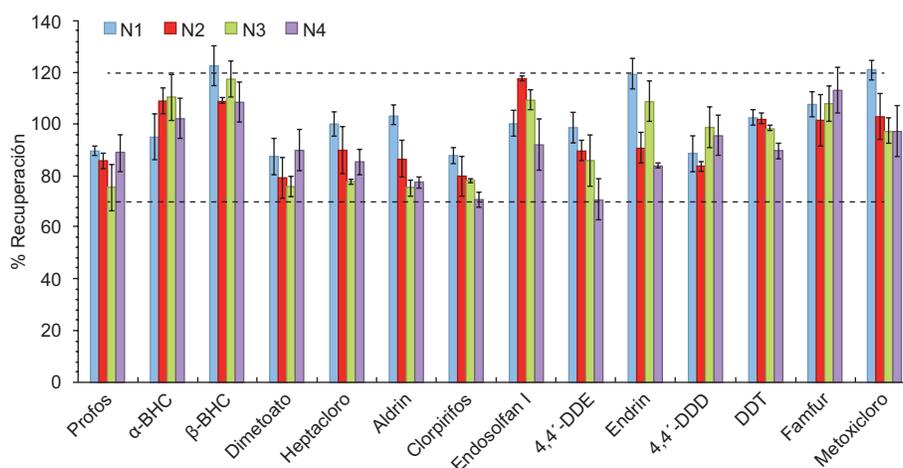


Fig. 4. Porcentajes de recuperación obtenidos con el método extractivo optimizado. Evaluación bajo tres diferentes niveles de fortificación (N1 = 40 µg/kg, N2 = 60 µg/kg, N3 = 80 µg/kg, N4 = 100 µg/kg; rango aceptable 70-120 %). α-BHC = alfa-hexaclorociclohexano, β-BHC = beta-hexaclorociclohexano, 4,4'-DDE = 1,1-dicloro-2,2-bis(4-clorofenil)etano, 4,4'-DDD = 1,1-dicloro-2,2-bis(4-clorofenil)etano, DDT = dicloro difenil tricloroetano

CUADRO XI. SUELOS CON DIFERENTES CARACTERÍSTICAS EVALUADOS CON LA METODOLOGÍA DE EXTRACCIÓN PROPUESTA

Parámetro	S1 (El Carmelo, Valle del Cauca)	S2 (Departamento de Córdoba, Colombia)	S3 (Valle del Cauca)
Textura	Franco-arcilloso	Arcilloso	Franco-arenoso
pH	7.47	6.74	7.66
MO (%)	0.97	2.73	0.76

S1, S2, S3 = tipos de suelos evaluados, MO = materia orgánica

En la **figura 5** se muestra el promedio de los porcentajes de recuperación obtenidos para cada plaguicida en cada nivel de fortificación evaluado (nivel 1: 40 µg/kg, nivel 2: 80 µg/kg). En el caso de S1 y S3, que corresponden a muestras de suelo franco arcilloso y franco arenoso respectivamente, los porcentajes de recuperación estuvieron en rangos similares (70-110 %). Sin embargo, para el suelo S2 con textura arcillosa y mayor cantidad de MO, los porcentajes de recuperación fueron más bajos, aunque en un rango aceptable (60-90 %). Las recuperaciones obtenidas para el suelo S2, menores en comparación con S1 y S3, se pueden asociar con su mayor contenido de arcilla. Estas partículas son capaces de adsorber y formar agregados con los plaguicidas, lo que disminuye su difusión a través de los poros del suelo y a su vez dificulta la penetración del solvente extractor en la matriz (Li et al. 2003). De manera general se obtuvieron resultados aceptables en las evaluaciones del método propuesto.

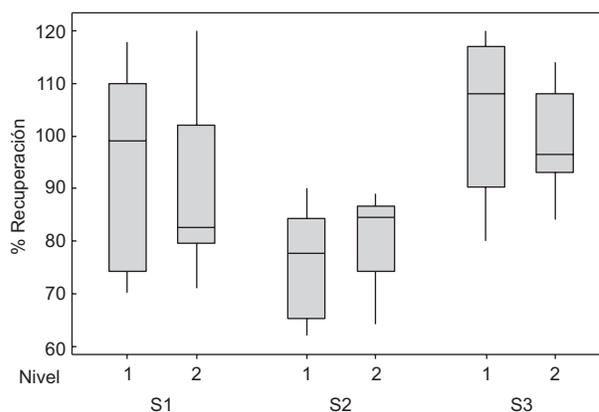


Fig. 5. Distribución en diagramas de caja de los porcentajes medios obtenidos en los experimentos de recuperación de los plaguicidas evaluados en tres tipos de suelo (S1, S2, S3) bajo dos niveles de fortificación: nivel 1 = 40 µg/kg y nivel 2 = 80 µg/kg. S1 = suelo franco-arcilloso, S2 = suelo arcilloso, S3 = suelo franco-arenoso

CONCLUSIONES

La implementación de los diseños Taguchi y factorial fraccionado 2^{5-1} , permitió la optimización del proceso de extracción de los plaguicidas en el suelo evaluado. Las cantidades de muestra, sales de partición (MgSO_4 y NaCl) y solvente de extracción, así como la humedad del suelo, resultaron ser los factores experimentales de mayor influencia en la recuperación de los analitos estudiados. Para el método final optimizado se obtuvieron rangos lineales entre 11.9 y 258.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$, porcentajes de recuperación entre 70 y 120 %, con CV menores al 10 %. Los LD y LC del método estuvieron entre 4.9 y 21.7 $\mu\text{g}/\text{kg}$, y 9.9 y 38.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectivamente. Finalmente, se verificó la robustez del método al evaluarlo en suelos con diferentes características de textura, pH y MO, encontrando porcentajes de recuperación entre el 60 y 90 %.

REFERENCIAS

- Ahmadi K., Abdollahzadeh Y., Asadollahzadeh M., Hemmati A., Tavakoli H. y Torkaman R. (2015). Chemometric assisted ultrasound leaching-solid phase extraction followed by dispersive-solidification liquid-liquid microextraction for determination of organophosphorus pesticides in soil samples. *Talanta* 137, 167-173. DOI: 10.1016/j.talanta.2015.01.031
- 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. DOI: 10.2478/v10102-009-0001-7
- Alloway B.J. (2001). Soil pollution and land contamination. En: *Pollution: causes, effects and control.* (R.M. Harrison, Ed.). Royal Society of Chemistry, Cambridge, RU, pp. 352-376. DOI: 10.1039/9781847551719
- Anastassiades M. y Lehotay S. J. (2003). Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce. *J. AOAC Int.* 86, 412-431.
- Andreu V. y Picó Y. (2004). Determination of pesticides and their degradation products in soil: critical review and comparison of methods. *Trends Anal. Chem.* 23 (10-11), 772-789. DOI: 10.1016/j.trac.2004.07.008
- Arias-Estévez M., López-Periago E., Martínez-Carballo E., Simal-Gándara J., Mejuto J. y García-Río L. (2008). The mobility and degradation of pesticides in soils and the pollution of groundwater resources. *Agric. Ecosyst. Environ.* 123 (4), 247-260. DOI: 10.1016/j.agee.2007.07.011
- Asensio-Ramos M., Hernández-Borges J., Ravelo-Pérez L. y Rodríguez-Delgado M. (2010). Evaluation of a modified QuEChERS method for the extraction of pesticides from agricultural, ornamental and forestal soils. *Anal. Bioanal. Chem.* 396 (6), 2307-2319. DOI: 10.1007/s00216-009-3440-2
- Bouaid A., Ramos L. y González M. (2001). Solid-phase microextraction method for the determination of atrazine and four organophosphorus pesticides in soil samples by gas chromatography. *J. Chromatogr. A.* 939 (1-2), 13-21. DOI: 10.1016/S0021-9673(01)01332-2
- Bragança I., Plácido A., Paíga P., Domingues V. F. y Delerue-Matos C. (2012). QuEChERS: A new sample preparation approach for the determination of ibuprofen and its metabolites in soils. *Sci. Total Environ.* 433, 281-289. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2012.06.035
- Caldas S. y Bolzan C. (2011). Evaluation of a modified QuEChERS extraction of multiple classes of pesticides from a rice paddy soil by LC-APCI-MS/MS. *J. Agric. Food Chem.* 59 (22), 11918-11926. DOI: 10.1021/jf202878s
- Chen M., Xu P., Zeng G., Yang C., Huang D. y Zhang J. (2015). Bioremediation of soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons, petroleum, pesticides, chlorophenols and heavy metals by composting: Applications, microbes and future research needs. *Biotechnol. Adv.* 33 (6) Part. 1, 745-755. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2015.05.003
- Convenio de Estocolmo (2009). Convenio de estocolmo sobre contaminantes orgánicos persistentes (COP) enmendado en 2009. [en línea]. <http://chm.pops.int/TheConvention/Overview/TextoftheConvention/tabid/2232/Default.aspx> 20/12/2015
- Correia-Sá L., Fernandes V. C., Carvalho M., Calhau C., Domingues V.F. y Delerue-Matos C. (2012). Optimization of QuEChERS method for the analysis of organochlorine pesticides in soils with diverse organic matter. *J. Sep. Sci.* 35 (12), 1521-1530. DOI: 10.1002/jssc.201200087
- Djurovic R., Djordjevic T., Radivojevic L., Santric L. y Gajic-Umiljendic J. (2012). Multiresidue analysis of pesticides in soil by liquid-solid extraction procedure. *Pestic. Phytomed.* 27 (3), 239-244. DOI: 10.2298/PIF1203239D
- Dong F., Liu X., Cheng L., Chen W., Li J., Qin D. y Zheng Y. (2009). Determination of metaflumizone residues in cabbage and soil using ultra-performance liquid chromatography/ESI-MS/MS. *J. Sep. Sci.* 32 (21), 3692-3697. DOI: 10.1002/jssc.200900338
- Doran J. W. y Zeiss M. R. (2000). Soil health and sustainability: managing the biotic component of soil quality. *Appl. Soil Ecol.* 15 (1), 3-11. DOI: 10.1016/S0929-1393(00)00067-6

- Drozdzyński D. y Kowalska J. (2009). Rapid analysis of organic farming insecticides in soil and produce using ultra-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 394 (8), 2241-2247. DOI: 10.1007/s00216-009-2931-5
- Durán R.Q. (1995). Fertilización y Nutrición. En *Cenicaña: El cultivo de caña en la zona azucarera de Colombia*. (D. Cassalet, A. Torres, E. Isaacs, Eds.). Cenicaña, Cali, Colombia, pp. 153-178.
- Erney D. R., Gillespie A. M., Gilvydis D. M. y Poole C. F. (1993). Explanation of the matrix-induced chromatographic response enhancement of organophosphorus pesticides during open tubular column gas chromatography with splitless or hot on-column injection and flame photometric detection. *J. Chromatogr. A.* 638 (1), 57-63. DOI: 10.1016/0021-9673(93)85007-T
- Fernandes V. C., Domingues V. F., Mateus N. y Delerue-Matos C. (2013). Multiresidue pesticides analysis in soils using modified QuEChERS with disposable pipette extraction and dispersive solid-phase extraction. *J. Sep Sci.* 36 (2), 376-382. DOI: 10.1002/jssc.201200673
- García C., Fernández M., Herrero S., Casas A. y Pérez, J. (2010). Simplified QuEChERS approach for the extraction of chlorinated compounds from soil samples. *Talanta* 81 (1-2), 385-391. DOI: 10.1016/j.talanta.2009.12.013
- Gevao B., Sample K. T. y Jones K. C. (2000). Bound pesticide residues in soils: a review. *Environ. Pollut.* 108 (1), 3-14. DOI: 10.1016/S0269-7491(99)00197-9
- González-Curbelo M. Á., Socas-Rodríguez B., Herrera-Herrera A. V., González-Sálamo J., Hernández-Borges J. y Rodríguez-Delgado M. Á. (2015). Evolution and applications of the QuEChERS method. *Trends Anal. Chem.* 71, 169-185. DOI: 10.1016/j.trac.2015.04.012
- Gutiérrez H. y Salazar R. (2012). *Análisis y diseño de experimentos*. 3a ed. McGraw-Hill. Mexico, D.F., México, 504 pp.
- Khan S., Cao Q., Zheng Y. M., Huang Y. Z., y Zhu Y. G. (2008). Health risks of heavy metals in contaminated soils and food crops irrigated with wastewater in Beijing, China. *Environ. Pollut.* 152 (3), 686-692. DOI: 10.1016/j.envpol.2007.06.056
- Lesueur C., Gartner M., Mentler A. y Fuerhacker M. (2008). Comparison of four extraction methods for the analysis of 24 pesticides in soil samples with gas chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-ion trap-mass spectrometry. *Talanta* 75 (1), 284-293. DOI: 10.1016/j.talanta.2007.11.031
- Leyva-Morales J. B., Valdez-Torres J. B., Bastidas-Bastidas P. J. y Betancourt-Lozano M. (2015). Validation and application of a multi-residue method, using accelerated solvent extraction followed by gas chromatography, for pesticides quantification in soil. *J. Chromatogr. Sci.* 53 (10), 1623-1630. DOI: 10.1093/chromsci/bmv063
- Li H., Sheng G., Teppen B., Johnston C. y Boyd S. (2003). Sorption and desorption of pesticides by clay minerals and humic acid-clay complexes. *Soil Sci. Am. J.* 67 (1), 122-131. DOI: 10.2136/sssaj2003.0122
- Loffredo E. y Senesi N. (2008). The role of natural organic matter (humic substances) on adsorption of pesticides possessing endocrine disruptor activity. En: *The fate of persistent organic pollutants in the environment* (E. Mehmetli, B. Koumanova, Eds.). Springer, Dordrecht, Holanda, pp. 369-383. DOI: 10.1007/978-1-4020-6642-9_27
- Martin A. (2000). Aging, bioavailability, and overestimation of risk from environmental pollutants. *Environ. Sci. Technol.* 34 (20), 4259-4265. DOI: 10.1021/es001069+
- Masiá A., Vázquez K., Campo J. y Picó Y. (2015). Assessment of two extraction methods to determine pesticides in soils, sediments and sludges. Application to the Túria River Basin. *J. Chromatogr. A.* 1378, 19-31. DOI: 10.1016/j.chroma.2014.11.079
- Vega D., Sosa Z., Santana J.J., Pocrull E. y Borrull F. (2008). Determination of organochlorine pesticides from agricultural soils using pressurized liquid extraction. *Soil Sediment Contam.* 17 (1), 1-11. DOI: 10.1080/15320380701741263
- García C., Fernández M. E., Herrero S., Casas A. M., Pérez J. L. y Moreno B. (2010). Simplified QuEChERS approach for the extraction of chlorinated compounds from soil samples. *Talanta* 81 (1-2), 385-391. DOI: 10.1016/j.talanta.2009.12.013
- Qu C., Qi S., Yang D., Huang H., Zhang J., Chen W. y Xing X. (2015). Risk assessment and influence factors of organochlorine pesticides (OCPs) in agricultural soils of the hill region: A case study from Ningde, southeast China. *J. Geochem. Explor.* 149, 43-51. DOI: 10.1016/j.gexplo.2014.11.002
- Rouvière F., Buleté A., Cren-Olivé C. y Arnaudguilhem C. (2012). Multiresidue analysis of aromatic organochlorines in soil by gas chromatography-mass spectrometry and QuEChERS extraction based on water/dichloromethane partitioning. Comparison with accelerated solvent extraction. *Talanta* 93, 336-344. DOI: 10.1016/j.talanta.2012.02.048
- SANTE (2015). *Guidance of Health and Food Safety, SANTE/11945/2015*. Analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed. Guía. Unión Europea., 42 pp.
- Tadeo J. L., Pérez R. A., Alberto B., García-Valcárcel A. I. y Sánchez-Brunete C. (2012). Review of sample preparation techniques for the analysis of pesticide

- residues in soil. *J. AOAC Int.* 95 (5), 1258-1272.
DOI: 10.5740/jaoacint.SGE_Tadeo
- Taguchi G. (1987). *System of experimental design: Engineering methods to optimize quality and minimize costs*. UNIPUB/Kraus International Publications. Nueva York, EUA, 531 pp.
- Tao S., Xu F. L., Wang X. J., Liu W. X., Gong Z. M., Fang J. Y. y Luo Y. M. (2005). Organochlorine pesticides in agricultural soil and vegetables from Tianjin, China. *Environ. Sci. Technol.* 39 (8), 2494-2499. DOI: 10.1021/es048885s
- Tor A., Aydin M.E. y Özcan S. (2006). Ultrasonic solvent extraction of organochlorine pesticides from soil. *Anal. Chim. Acta.* 559 (2), 173-180. DOI: 10.1016/j.aca.2005.11.078
- Van der Werf H. M. (1996). Assessing the impact of pesticides on the environment. *Agric. Ecosyst. Environ.* 60 (2-3), 81-96. DOI: 10.1016/S0167-8809(96)01096-1
- Venkata S., Sirisha K., Sreenivas R. y Sarma P.N. (2007). Bioslurry phase remediation of chlorpyrifos contaminated soil: process evaluation and optimization by Taguchi design of experimental (DOE) methodology. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 68 (2), 252-262.
DOI: 10.1016/j.ecoenv.2007.06.002
- Vera J., Correia-Sá L., Paíga P., Bragança I., Fernandes V. C., Domingues V.F. y Delerue-Matos C. (2013). QuEChERS and soil analysis. An Overview. *Sample Prep.* 1, 54-77. DOI: 10.2478/sample-2013-0006
- Wang Y., Du L., Zhou X., Tan H., Bai L., Zeng D. y Tian H. (2012). QuEChERS extraction for high performance liquid chromatographic determination of pyrazosulfuron-ethyl in soils. *J. Chem. Soc. Pak.* 34 (1), 28-32.