



**UNIVERSIDAD DE CARABOBO**  
**FACULTAD EXPERIMENTAL DE CIENCIAS Y TECNOLOGÍA**  
**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**



**DETERMINACIÓN DE PLAGUICIDAS ORGANOCORADOS EN AGUA DE  
POZOS ADYACENTES A ZONAS AGRÍCOLAS MEDIANTE GC-MS.**

**Implementación de un procedimiento validado.**

**(Trabajo Especial de Grado)**

**Presentado por: Br. Eliana Pérez**  
**Tutor académico: Dr. José Jiménez**

Bárbula, Mayo de 2011

*Al azul por matizar el mar...*

*Al azul por sostener el cielo...*

*Al azul por dar color a la tristeza haciendo menos*

*Amargo su sabor...*

*J.R. Jiménez*

## **Agradecimientos**

*Primero que nada a Dios por darme la fuerza para seguir adelante todos los días y enfrentar los obstáculos que se presentan.*

*A mis abuelos, porque aunque tal vez no lo sepan son parte fundamental de quien soy, todo lo que vivieron y la determinación con la que surgieron en sus vidas son un gran ejemplo a seguir... Gracias por el cariño, por quererme como su negrita.*

*A mi mamá, Ligia González, de quien heredé el color de piel, el carácter y los sentimientos a flor de piel, gracias por estar a mi lado a través de todas las etapas de mi vida, por seguir limpiando mis lágrimas y ayudándome a levantar cada vez que me caigo... Te quiero mucho mamá, eres un ser humano maravilloso... Gracias*

*A mi papá, Agustín Pérez, por ser un pilar fundamental en mi vida, quien me ha enseñado que trabajando duro y con valores se puede lograr lo que sea, lo quiero y admiro muchísimo... Gracias.*

*A mis hermanos, quienes empiezan la vida, son verdadera inspiración, espero que tengan en mí un buen modelo a seguir... Son mi alegría, los quiero muchísimo Patricia, Victoria, Arturo y Jesús... Recuerden que siempre tendrán a su hermana mayor para lo que necesiten.*

*A mis tías, Alejandra, Belén, María Luisa, Mary y Nelly... Gracias por apoyarme en todo y confiar en mí... Las quiero mucho...*

*A mis primas-sobrinas Alexandra, Luisabel, Daniela, Valeska, Emimar y Marynell... Son la dicha más grande de mi vida, no se imaginan cuanto las quiero....*

*A mis amigos ... Pablo Carrizalez, Génova Durán, Gabriela Camacaro, José Alberto Hernández(Chepe), Victoria Maurera, Ángel Camejo, Miguel Monsalve, José Vicente Bustamante, Juan Manuel Arismendi, Carlos (Colega), Jesús Hernández... Todos ustedes en diferentes etapas de mi vida me han enseñado tanto y me han ayudado a convertirme en la persona que soy, se que seguirán en mi vida de alguna forma, gracias por todo el cariño y el tiempo que me han dedicado, los adoro.*

*A Jeanfranco Alejandro, gracias por mostrarme la luz entre tanta oscuridad, no matter which road life takes us you will always have a very special place in my heart, cuz you are amazig.... The only exception... thanks...*

*A Víctor Manuel Pérez, simplemente GRACIAS, mas que un amigo, un gran compañero y extraordinario colega... Una estrella en el cielo que brilla más que el sol...*

*A mi tutor, Dr. José Jiménez, Gracias por tantas enseñanzas y lecciones de vida ...*

*A Beatriz Moy y Lesbia Martínez, Gracias por ayudarme en todo lo que he necesitado, porque vaya que las he necesitado, por siempre mostrarme una sonrisa y colaborar aunque las fastidié mucho, "L", Bea... Las quiero mucho...*

*Un agradecimiento especial al Lic. Juan Ustariz y la Ing. Beatriz Terán, cuyos aportes a este trabajo han sido esenciales...*

*A José Gregorio Parra y David Vega, han sido el apoyo mas inusual que he tenido en mi vida, sin embargo, el apoyo mas sincero, se los agradezco muchísimo... Los quiero mucho aunque uds. no acepten que me quieren....*

*A los profesores Jorge Briceño, Xiomara Cardozo, Julissa Brizuela, José Guaregua, Ruth Álvarez, Ángel López, Luis Puerta... Por haber sido personas fundamentales en el desarrollo de mi carrera...*

*A los Laboratorios de PHD, Alimentos y Fisicoquímica por su gran colaboración...*

*Al Laboratorio de Servicios Analíticos y de Investigación... ha sido la mejor escuela...*

*A todos simplemente Gracias....*

**UNIVERSIDAD DE CARABOBO**  
**FACULTAD EXPERIMENTAL DE CIENCIAS Y TECNOLOGÍA**  
**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

**DETERMINACIÓN DE PLAGUICIDAS ORGANOCOLORADOS EN AGUA DE  
POZOS ADYACENTES A ZONAS AGRÍCOLAS MEDIANTE GC-MS.**

Implementación de un procedimiento validado.

**Autor: Eliana Pérez**

**Tutor: Dr. José Jiménez**

Resumen

Actualmente existe una problemática epidemiológica en el municipio Libertador del Edo. Aragua, las autoridades presumen que se deba a la presencia excesiva de plaguicidas organoclorados en los suelos agrícolas de la región. Estos plaguicidas por el efecto de las lluvias, se trasladan a las aguas subterráneas, a las cuales los habitantes de esa población tienen acceso, ya que obtienen el agua de pozos profundos ubicados a pocos metros de las zonas agrícolas. Por esto, el Laboratorio de Servicios Analíticos y de Investigación (LABSAI-UC), decide generar una respuesta que permita darle una solución a este problema de importancia nacional. Para esto, se validó un procedimiento que permite determinar plaguicidas organoclorados, específicamente, atrazina y simazina en aguas de pozos adyacentes a zonas agrícolas, desde el muestreo, incluyendo el tratamiento de la muestra y extracción hasta el análisis y cuantificación por CG-EM. Para esto se tomaron muestras en zonas urbanas y en zonas agrícolas que se sabe se encuentran en contacto con estos plaguicidas. Luego se le realizó una extracción líquido-líquido a la matriz acuosa, se concentró y finalmente se le realizó el análisis por cromatografía de gases acoplado a un espectrómetro de masas. El método validado consta de un rango lineal entre los 0,05ppm-0,25ppm, un porcentaje de recuperación del  $(80\pm 1)\%$ , un límite de detección para la atrazina y simazina 0,005ppm y 0,01ppm respectivamente. En cuanto a las muestras de agua tomadas en zonas agrícolas, se detectaron la atrazina y la simazina en concentraciones de

0,06 y 0,05 ppm respectivamente. Los valores máximos permisibles para estos compuestos no se encuentran regulados por las leyes venezolanas, sin embargo, supera los límites permitidos por regulaciones internacionales.

# ÍNDICE

<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>CAPITULO 1. Planteamiento del problema</b>	<b>3</b>
1.1 Planteamiento del problema	4
1.2 Justificación del problema	7
1.3 Objetivos	8
1.3.1 Objetivo General	8
1.3.2 Objetivos Específicos	8
<b>2. CAPITULO II. Marco teórico</b>	<b>9</b>
2.1 Antecedentes	<b>10</b>
2.1.1 Análisis de pesticidas y metabolitos en aguas superficiales españolas mediante el uso de cromatografía de gases/espectrometría de masa con una extracción previa en fase sólida	<b>10</b>
2.1.2 Residuos de insecticidas organoclorados en yogurt firme de tres marcas comerciales, elaborado en Venezuela	<b>11</b>
2.1.3 Desarrollo y validación de metodología multiresidual para la detección de pesticidas organoclorados, organofosforados y piretoides en aceite de soja.	<b>11</b>
2.1.4 Validación y desarrollo de un método multiresidual para el análisis de 151 residuos de pesticidas en la fresa mediante la aplicación de cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas con triple cuádruplo	<b>12</b>
2.2 Pesticidas	<b>12</b>
2.2.1 Herbicidas	<b>14</b>
2.2.1.2 Triazinas	<b>14</b>
2.2.1.2.1 Atrazina	<b>15</b>
2.2.1.2.2 Simazina	<b>15</b>
2.2.2.1 Organoclorados	<b>16</b>

2.3	Muestreo en cuerpos de agua	16
2.3.1	Tratamiento de muestras de agua para la extracción de pesticidas organoclorados.	18
2.3.2	Consideraciones al manipular muestras de agua.	21
2.3.2.1	Preservación de la muestra	22
2.3.2.2	Intervalo de tiempo entre la toma y el análisis de muestras	22
2.3.2.3	Técnicas de preservación	23
2.4	Conceptos Asociados al proceso de Validación y la Técnica de Cromatografía acoplado a Espectrómetro de Masas.	23
2.4.1	Validación	23
2.7	Planteamientos del método	33
2.7.1	Cromatografía de gases /Espectrometría de masas (GC/MS) en el análisis de plaguicidas.	33
<b>3.</b>	<b>CAPITULO III. Marco metodológico</b>	<b>35</b>
3.1	Aspectos Generales	36
3.1.1	Estrategia Metodológica	36
3.2	Materiales y Equipos	37
3.2.1	Materiales de vidrio	37
3.3	Muestreo	38
3.4	Análisis de la muestra	42
<b>4.</b>	<b>CAPITULO IV. Análisis y discusión de resultados</b>	<b>53</b>
4.1	Análisis Cromatográfico	54
4.2	Análisis de resultados de los parámetros estadísticos evaluados en los métodos.	55
4.2.1	Intervalo de trabajo	56
4.2.2	Linealidad de los métodos estudiados	58
4.2.3	Límite de detección y cuantificación.	59
4.2.4	Análisis de exactitud	60
4.2.5	Precisión del método	61
4.2.6	Sensibilidad	62
4.2.7	Medición de muestras reales	

<b>5. CAPITULO V. Conclusiones</b>	<b>65</b>
5.1 Conclusiones	66
5.2 Recomendaciones	67
<b>APENDICE A</b>	<b>68</b>
<b>APENDICE B</b>	<b>79</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>81</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figuras	Pags.
Esquema 1. Clasificación de los pesticidas.	13
Figura 1. Estructura de la Atrazina	15
Figura 2: Estructura de la simazina	16
Esquema 2. Metodología general	36
Esquema 3. Extracción líquido-líquido	45
Figura 3. Separación cromatográfica utilizando la técnica de monitoreo delectivo de iones (SIM) de la atrazina y la simazina	54
Figura 4. Estudio del comportamiento lineal de la curva de calibración de la atrazina.	56
Figura 5. Estudio del rango lineal de la simazina.	56
Figura 6. Curva de calibración promedio para la determinación de atrazina y simazina empleando cromatografía de gases/Espectrometría de masas.	58
Figura 7. Botellas empleadas para el muestreo	67
Figura 8: Pozo 1 el cual se encuentra cerrado	67
Figura 9. Muestreo en una casa ubicada a 10 metros del pozo	67
Figura 10. Recolección de muestra en el pozo 2	68
Figura 11. Estado en el que se encuentra el pozo 2.	68
Figura 12. Representante de la comunidad firmando el acta de muestreo del pozo 2	68
Figura 13. Recolección de muestra de pozo 3 en un Mercal ubicado a 10 metros del pozo que se encontraba cerrado.	69
Figura 14. Recolección de muestra del pozo 4	69
Figura 15. Firma del acta de muestreo por parte del encargado del lugar, el representante del Ministerio de la Salud y la Alcaldía de Palo Negro.	69
Figura 16. Pozo 6 localizado en alrededor de los cultivos de cambur	70
Figura 17. Recolección de muestra del pozo 6	70
Figura 18. Extracción líquido-líquido de la muestra	76
Figura 19. Kuderna Danish	76

Figura 20. Montaje de concentración empleando la Kuderna-Danish	<b>77</b>
Figura 21 .Cromatograma obtenido en la evaluación del pozo 6	<b>78</b>
Figura 22. Cromatograma obtenido previo a la separación de la atrazina y la simazina.	<b>78</b>
Figura 23. Espectro de masas correspondiente a la atrazina	<b>79</b>
Figura 24. Espectro de masas correspondiente a la simazina	<b>79</b>

## LISTAS DE TABLAS

<b>Tablas</b>	<b>Pags.</b>
Tabla 1. Comparación de los criterios en la matriz de pares	<b>39</b>
Tabla 2. Comparación de las opciones de acuerdo a l criterio preservación de la muestra.	<b>39</b>
Tabla 3. Comparación de las opciones de acuerdo al criterio equipo	<b>39</b>
Tabla 4. Comparación de las opciones de acuerdo al criterio tiempo de muestreo	<b>40</b>
Tabla 5. Matriz final en la que se concluye la selección del método de muestreo.	<b>40</b>
Tabla 6. Comparación de los criterios en la matriz de pares	<b>43</b>
Tabla 7. Comparación de las opciones de acuerdo al criterio equipos	<b>43</b>
Tabla 8. Comparación de las opciones de acuerdo al criterio costos	<b>44</b>
Tabla 9. Comparación de las opciones de acuerdo al criterio cantidad reactivos	<b>44</b>
Tabla 10. Matriz final en la que se concluye la selección del método de extracción	<b>44</b>
Tabla 11. Comparación de los criterios en la matriz de pares	<b>48</b>
Tabla 12. Comparación de las opciones de acuerdo al criterio resolución cromatografica.	<b>48</b>
Tabla 13. Comparación de las opciones de acuerdo al criterio señal/ruido	<b>48</b>
Tabla 14. Comparación de las opciones de acuerdo al criterio tiempo de corrida	<b>49</b>
Tabla 15. Matriz final en la que se concluye la selección del método cromatografico	<b>49</b>
Tabla 16: Modo ionización impacto electrónico SIM	<b>54</b>
Tabla 17: Intervalos de trabajo para la determinación de Atrazina y Simazina en muestras de agua de pozos adyacente a zonas agrícolas.	<b>56</b>

Tabla 18. Coeficientes de correlación $R^2$ para los resultados experimentales obtenidos del método estudiado.	<b>57</b>
Tabla 19. Límite de detección y cuantificación empleados en la validación de la atrazina y la simazina.	<b>59</b>
Tabla 20. Resultados de la repetibilidad del método validado.	<b>60</b>
Tabla 21. Resultados obtenidos en la evaluación del pozo 6	<b>62</b>
Tabla 22. Comparación de estándares y valores de guía para residuos de pesticidas en agua potable.	<b>63</b>

## INTRODUCCIÓN

Estudios realizados en los últimos años han creado una gran preocupación ya que demuestran la presencia de plaguicidas organoclorados en los productos finales de las plantaciones tales como frutas, hortalizas, además de las aguas y los suelos agrícolas. En el año 2007, Pierre F. y Betancourt P.<sup>1</sup>, analizaron los residuos de plaguicidas organoclorados y organofosforados en el cultivo de cebolla en la depresión de Quibor, Estado Lara, en donde evaluaron el manejo de plaguicidas y acumulación de residuos organoclorados y organofosforados en muestras de la cebolla cosechada para el consumo, resultados obtenidos registran la presencia de fungicidas sobre otro tipo de plaguicidas y concluyen que existe una relación entre el uso inadecuado de plaguicidas y la acumulación de residuos en el cultivo de cebolla<sup>1</sup>.

Los plaguicidas organoclorados son moléculas que contienen átomos de carbono, hidrógeno y cloro, son compuestos orgánicos persistentes que tienen la capacidad de ser acumulados en los organismos vivos, son relativamente estables por lo cual son difíciles de degradar, presentan propiedades altamente tóxicas y cancerígenas, de larga duración. Su principal acción tóxica es ejercida sobre el sistema nervioso, interfiriendo en el balance de las neuronas, impidiendo la transmisión normal de los impulsos nerviosos tanto de insectos como en mamíferos<sup>2</sup>. Además, se acumulan en los tejidos grasos pudiendo causar intoxicación crónica, por lo cual su presencia en aguas adyacentes a zonas agrícolas, que pueden ser consideradas como aguas de uso potable, necesitan de un seguimiento exhaustivo.

La Universidad de Carabobo, en conjunto con la Facultad Experimental de Ciencias y Tecnología se ha involucrado en la creación de entes que se encarguen del cuidado y preservación de ambiente, creando laboratorios que analizan y monitorean diversos contaminantes que afectan nuestro entorno. Sin embargo, ningún laboratorio cuenta con un método validado para la determinación de plaguicidas organoclorados en aguas y suelo, por lo cual el Laboratorio de

Servicios Analíticos e Investigación (LABSAI), ha propuesto trabajos en paralelo que permitan cubrir con esta necesidad.

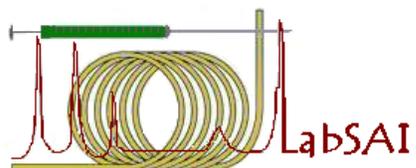
El objetivo de la investigación es implementar un procedimiento para la determinación de pesticidas organoclorados que permita obtener resultados estadísticamente validados, en el análisis de muestras procedentes de pozos de agua adyacentes a zonas agrícolas. Esto se llevó a cabo mediante la aplicación de un método de muestreo, tratamiento de la muestra líquida y posterior análisis de la misma, utilizando la técnica de Cromatografía de gases/Espectrometría de masas (GC/MS), tomando en cuenta los parámetros necesarios para la validación del método bajo las condiciones experimentales del laboratorio, tales como linealidad, exactitud, precisión, límites de detección y de cuantificación, coeficiente de variabilidad del método.

El proyecto de investigación que se presenta a continuación se encuentra estructurado en tres capítulos. En el capítulo I se presenta el planteamiento del problema, la justificación y los objetivos propuestos en la investigación. En el capítulo II, contiene un soporte bibliográfico que fundamenta la investigación. El Capítulo III, comprende la metodología que se implementó para cumplir con los objetivos. En el capítulo IV se encuentran los resultados y el análisis y discusión de los mismos, es decir, el fruto de esta investigación.

Finalmente en el capítulo V se encuentran las conclusiones y recomendaciones de este trabajo.

# CAPITULO 1

## EL PROBLEMA



---

## Capítulo I

### 1 El problema

En el presente capítulo se da a conocer el problema y su justificación, así como, los objetivos propuestos en la investigación.

#### 1.1 Planteamiento del problema

El agua, es un líquido incoloro, inodoro e insípido que ocupa tres cuartas partes de la superficie de la tierra, y es indispensable para el desarrollo de la vida. El uso indiscriminado de la misma por parte del sector industrial hace que no cumpla con los parámetros de calidad necesarios para su consumo o desalojo en ríos, lagos y aguas abiertas. El término calidad del agua potable, es utilizado universalmente para indicar la condición del agua en relación a los valores máximos o mínimos de concentración de sustancias o microorganismos que representan un riesgo para la salud humana. Las normas sanitarias venezolanas en conjunto con el Ministerio de Salud, establecen que *“el agua potable debe cumplir con requisitos microbiológicos, organolépticos, físicos, químicos y radiactivos<sup>3</sup>”* para garantizar el suministro de agua apta para el consumo humano.

Los pesticidas son sustancias sintéticas o naturales empleadas para exterminar plagas que puedan infectar siembras y/o cultivos, pero cuyo uso no controlado logra que residuos de los mismos quede en los alimentos o sean absorbidos por la tierra y eventualmente llegue a aguas subterráneas y fuente de agua de consumo humano. Estos agentes contaminantes pueden entrar por agua y aire sin importar fronteras, es por ello que la Organización de las Naciones Unidas mediante el Convenio de Estocolmo<sup>5</sup>, se ha dado a la tarea de regular los límites de concentración permisible de estos compuestos en el ambiente y asegurar la disminución del uso de los mismos.

Los pesticidas están clasificados entre la categoría de compuestos orgánicos persistentes, (POPs sus siglas en inglés), como su nombre lo indica, son compuestos químicos muy estables debido a sus características químicas cuya degradación natural es poco probable y se pueden mantener en el ambiente por

mucho tiempo, a ciertas concentraciones pueden causar efectos adversos al ambiente y a la salud humana, además algunos son los causantes de dificultades en la reproducción humana y el cáncer.

La problemática presentada por los compuestos orgánicos persistentes, en este caso los pesticidas, resulta muy alarmante debido a sus características intrínsecas, primero que nada su toxicidad, también presentan el potencial para acumularse biológicamente en la cadena alimentaria, luego su estabilidad y resistencia a degradación natural y por último que son propensos a transportarse por largos períodos de tiempo por el agua y el aire.

Existen alrededor de 500 tipos de plaguicidas<sup>4</sup>, siendo los organoclorados uno de las categorías más tóxicas, debido a su compleja estructura. En base a esto, el uso de este tipo de sustancias cloradas, ha sido prohibido o restringido en los países pertenecientes a la comunidad europea y los Estados Unidos de America.

De acuerdo al convenio de Estocolmo<sup>5</sup>, auspiciado por el PROGRAMA DE AMBIENTE DE LAS NACIONES UNIDAS, en mayo del 2001 se reunieron los delegados de países de la Comunidad Europea, además de representantes de 90 países más, resolviendo decretar la prohibición de pesticidas tales como el aldrín, Clordano, DDT, dieldrín, endrín, heptacloro, hexaclorobenceno , endosulfán, toxafeno, bifenilos policlorados (PCBs), dibenzo-p-dioxinas policloradas y dibenzofuranos. Estas resoluciones entraron en vigencia en Mayo de 2004,.

Aunque el uso de plaguicidas organoclorados persistentes, es ilegal hoy en términos generales, estos han sido extensamente utilizados para la agricultura en América Latina durante las últimas décadas. En particular, se han utilizado grandes cantidades en México para cultivos comerciales. En años más recientes, el uso de plaguicidas organoclorados se ha restringido a programas de salud pública contra enfermedades como la malaria<sup>6</sup>.

Debido a esta problemática, se ha abordado el uso excesivo de los plaguicidas en latinoamerica, exhortando a los gobiernos a vigilar y hacer cumplir la legislación en cuanto a las normas que regulan su uso, esto se discutió en el Seminario internacional "Control ciudadano para la fiscalización y reducción del uso de

plaguicidas en América Latina”<sup>7</sup>, que se realizó en Santiago de Chile entre los días 25 y 27 de mayo de 1999.

Actualmente, en los decretos que rigen las leyes de aguas venezolanas, específicamente en el decreto No 36.395, el cual se encarga de establecer la “NORMAS SANITARIAS DE CALIDAD DEL AGUA POTABLE, solo se regulan las concentraciones de 22 compuestos orgánicos, entre ellos solo 8 pesticidas organoclorados<sup>3</sup>, de las 500 especies de pesticidas organoclorados conocidas<sup>4</sup>. Para el caso de aguas residuales, en el decreto No. 883, el cual se encarga de establecer las “ NORMAS PARA LA CLASIFICACIÓN Y EL CONTROL DE LA CALIDAD DE LOS CUERPOS DE AGUA VERTIDOS O EFLUENTES LIQUIDOS”, en la cual sólo se clasifican a los plaguicidas en biocidas organofosforados, carbamatos y organoclorados<sup>8</sup>.

Bajo este escenario, es fácil intuir que no hay un conocimiento real sobre el problema al cual se esta enfrentando, ya que no se ha abordado con la claridad que se necesita y por lo cual despierta el interés de ser evaluado, debido a que los pesticidas organoclorados deben ser constantemente monitoreados, estableciendo límites y regulaciones que enfrenten este problema.

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

Debido a que no existe en nuestra facultad la posibilidad de dar respuesta rápida y confiable en el estudio y control de estas sustancias, lo que limita la participación de nuestra institución en estos menesteres, por lo cual el objetivo principal de este trabajo es implementar un procedimiento que permita determinar residuos de plaguicidas en muestras de aguas adyacentes a zonas agrícolas, esto comprende desde la captación de la muestra, en la cual se aplicará un método de muestreo. El tratamiento de muestra acuosa y el análisis de los extractos mediante el uso de la

---

cromatografía de gas/espectrometría masa, con el fin de caracterizar cuantitativamente los pesticidas organoclorados presentes en fuentes de agua que tienen como fin el consumo humano

## **1.2 Justificación del problema**

Esta investigación es de suma importancia ya que el agua es un recurso natural que cada día es desperdiciado y cuyo aseguramiento de la calidad es vital para los seres vivos. Hoy en día hay una serie de movimientos ecológicos que instan a la preservación y regulación del consumo de agua, sin embargo, no es solo la cantidad del agua lo que hay que proteger sino la calidad de la misma. Actualmente el Departamento de Salud Ambiental del Ministerio de Salud de Estado Aragua, específicamente el jefe del Laboratorio de Sustancias Peligrosas, perteneciente a la Dirección de Salud Ambiental, reporta un problema epidemiológico en los habitantes debido a que consumen aguas de pozos profundos que se encuentran entre 20-50 metros del río Aragua, el cual recibe descargas de compuestos orgánicos contaminantes cuyas acciones tóxicas se desconocen. Esto ha despertado el interés en la medición de residuos de pesticidas, así como el monitoreo de su viaje a través de los suelos agrícolas y aguas de consumo humano cercano a la comunidad del Municipio Libertador.

Además se validó el método para que sea de aporte a la Universidad de Carabobo, específicamente a LABSAI, laboratorio perteneciente al Departamento de Química de la Facultad Experimental de Ciencias y Tecnología. De esta forma la facultad está capacitada para ofrecer el servicio de análisis de un agente tóxico que se encuentra presente en nuestras aguas y que debe ser monitoreado.

---

## **1.4 Objetivos**

### **1.4.1 Objetivo General**

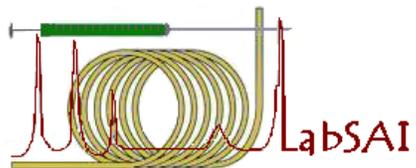
Implementar un procedimiento para la determinación de pesticidas organoclorados que permita obtener resultados estadísticamente validados, en el análisis de muestras procedentes de pozos de aguas naturales adyacentes a zonas agrícolas.

### **1.4.2 Objetivos Específicos**

- Definir el método de muestreo para la determinación de pesticidas organoclorados en pozos de aguas naturales adyacentes al río Aragua en el Municipio Libertador, estado Aragua.
- Establecer el método de extracción de compuestos organoclorados a emplear para la determinación de los residuos de pesticidas en agua.
- Definir los métodos analíticos para la determinación cromatográfica de los extractos de pesticidas.
- Determinar los parámetros estadísticos del método implementado, a fin de obtener sus prestaciones analíticas: precisión, exactitud, linealidad, intervalo de trabajo, límite de detección, límite de cuantificación.
- Validar el procedimiento global para el análisis de muestras reales de aguas de pozos adyacentes a zonas agrícolas.

# **CAPITULO 2**

## **MARCO TEÓRICO**



## **Marco Teórico.**

En este capítulo, se presentan investigaciones realizadas previamente así como los aspectos teóricos que fundamentan la presente investigación.

### **2.1. Antecedentes.**

#### **Análisis de pesticidas y metabolitos en aguas superficiales españolas mediante el uso de cromatografía de gases/espectrometría de masa con una extracción previa en fase sólido<sup>9</sup>.**

En Abril del 2006, Planas Carles, Puig Alejandra, Rivera Josep y Caizach Josep desarrollaron un estudio de 32 pesticidas y metabolitos en las aguas superficiales en España utilizando un método basado en la cromatografía de gases/ espectrometría de masa. Para ello emplearon 9 patrones de estándares de pesticidas, lo que permitió obtener resultados confiables y precisos. Realizaron un muestreo en alrededor de noventa y tres fuentes de aguas superficiales alrededor de España en un período de 4 meses en donde hubo un cambio de época, dichas muestras fueron sometidas a una extracción en fase sólida automatizada utilizando una mezcla de acetato de etilo-metanol y luego fueron analizados por cromatografía de gases. La veracidad de los resultados se demostró por medio de la realización de una curva de calibración de nueve puntos. Se encontró que en el verano cuatro pesticidas se encontraban en la mayoría de las muestras y que tres de ellos excedían los límites de concentración mínima permitida, entre ellos la atrazina.

#### **2.1.2. Residuos de insecticidas organoclorados en yogurt firme de tres marcas comerciales, elaborado en Venezuela.<sup>10</sup>**

Carlos Medina, María Allara, Pedro Izquierdo, Edgar Sánchez, María Y. Piñero y Gabriel Torres pertenecientes a la Universidad del Zulia. Maracaibo, estado Zulia, Venezuela, estudiaron en el 2009 la presencia de residuos de insecticidas organoclorados en yogurt de tres marcas comerciales y distintos tiempos de

almacenamiento, utilizando la técnica de extracción líquido-líquido recomendada por la Asociación Oficial de Químicos Analíticos. Seleccionaron 3 marcas comerciales de yogurt natural firme, elaboradas en Venezuela y distribuidas en el estado Zulia, 3 tiempos de almacenamiento a una temperatura de 4°C, obteniéndose un total 54 muestras. Las muestras se analizaron aplicando la técnica de cromatografía de gases con un detector de captura de electrones. De las muestras analizadas, 48 (88,9%) presentaron residuos de insecticidas organoclorados. En las 3 marcas se encontró en mayor concentración endosulfán, se detectó aldrín en menor concentración, al igual que endrín y lindano. En algunas de las muestras, la concentración de los insecticidas organoclorados excedió los límites máximos de residuos (LMRs); con excepción de hexaclorobenceno para las 3 marcas; heptacloro, aldrín, dieldrín y DDT la primera marca, p,p'-DDE para la segunda marca y lindano para la tercera marca. Debido a estos resultados recomendaron mantener un monitoreo constante de los productos alimenticios elaborados en Venezuela

### **2.1.3. Desarrollo y validación de metodología multiresidual para la detección de pesticidas organoclorados, organofosforados y piretoides en aceite de soja.<sup>11</sup>**

En el año 2005, Ricca A.O., Irurzun M.E., Martínez M.J. y Sanow C desarrollaron y validaron un método para la determinación de multiresiduos de pesticidas organoclorados, organofosforados y piretoides en aceite de soja, ya que Argentina es el primer exportador mundial de soja, este aceite lo exportan a varios países del mundo, cuyos límites de residuos permitidos se rigen por las legislaciones Europeas que cada día son más exigentes, razón por la cual se validó el método. La extracción de los pesticidas se realizó empleando el método Soxhlet en la última cosecha y se mantuvieron las muestras refrigeradas hasta el análisis. Se analizaron específicamente 27 pesticidas, se probaron diferentes mezclas de extracción y se determinaron los tiempos de retención a diferentes condiciones cromatográficas, con detectores específicos y columnas de diferentes polaridades. Se estudió la

reproducibilidad de los métodos de extracción y purificación mediante muestras fortificadas. Se determinaron los parámetros regulares de validación del método y se concluyó que la metodología aplicada permitía reducir la cantidad de muestra a analizar y el uso excesivo de disolventes. Por lo tanto la metodología propuesta es simple, rápida y proporciona buena resolución, mediante el uso de detectores específicos.

#### **2.1.4. Validación y desarrollo de un método multiresidual para el análisis de 151 residuos de pesticidas en la fresa mediante la aplicación de cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas con triple cuádruplo.<sup>12</sup>**

En el 2007, Bolaños, Moreno, Shtereva, Frenich y Martinez Vidal desarrollaron y validaron un método para determinar 151 residuos de pesticidas simultáneamente en las fresas empleando GC/QqQ-Ms/MS. La lista de compuestos a analizar comprendía especies organoclorados, organofosforados, carbamatos, triazoles y dicarboxiamidas. Se realizó una sola extracción de diez gramos de muestra con acetonitrilo seguido por una extracción líquido-líquido. Luego, se limpiaron los extractos empleando una extracción en fase sólida, llevándose a cabo el análisis en 21 minutos. El método se sometió a una validación, donde se obtuvo un rango de recuperación entre 70 y 110%. Los valores de precisión se expresaron en forma de desviación estándar relativa, cuyos valores fueron menores al 18%. Se estudió la linealidad obteniendo un  $R^2$  mayor al 0,98% para todos los compuestos. De acuerdo a los resultados obtenidos en la validación se puede concluir que el método propuesto es adecuado para una aplicación rutinaria.

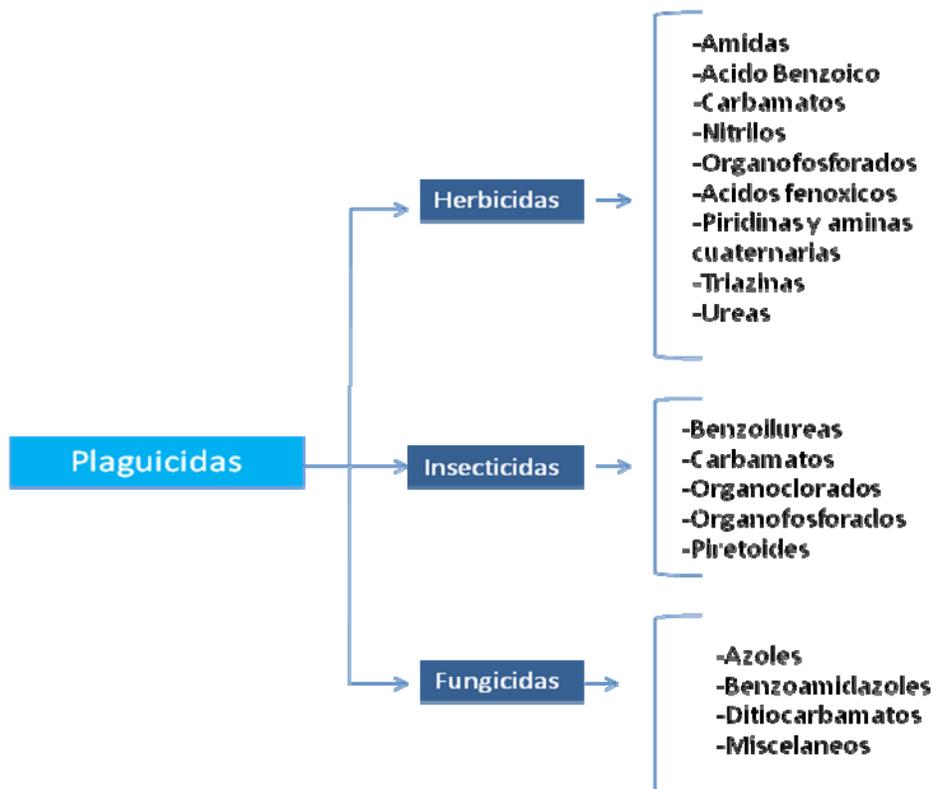
## **2.2. Pesticidas**

El uso de pesticidas es una herramienta que permite asegurar y alcanzar los objetivos de producción de vegetales. Los pesticidas se pueden definir como toda sustancia que se emplea para combatir las plagas agrícolas durante la producción,

comercialización o elaboración de los alimentos o a toda sustancia que pueda administrarse por aplicación interna a los animales para destruir insectos o arácnidos, incluyéndose herbicidas, fungicidas, rodenticidas, reguladores del crecimiento vegetal; no incluyéndose los abonos. Los pesticidas no son necesariamente venenos, pero pueden ser tóxicos.

Un pesticida es cualquier sustancia o mezcla de ellas, de procedencia natural o sintética, formulada para control o repeler cualquier peste o plaga que compita con los seres humanos por comida, destruya propiedades o propague enfermedades. Estos son usualmente sustancias químicas, aunque pueden ser de procedencia biológica debido a agentes tales como virus o bacterias.<sup>13</sup>

A continuación se muestra un esquema en el esquema 1 que permite ver la clasificación de los pesticidas según su función.



Esquema 1. Clasificación de los pesticidas.

### **2.2.1 Herbicidas**

Los herbicidas pueden ser clasificados como compuestos que se aplican en el suelo o en el follaje, los cuales son normalmente absorbidos por las raíces o tejidos de las hojas respectivamente. Estos compuestos pueden ser herbicidas totales o selectivos. Los herbicidas totales pueden eliminar toda la vegetación mientras que los selectivos pueden controlar las hierbas sin afectar las plantaciones. Estas sustancias químicas pueden ser aplicadas en diferentes etapas de las plantaciones, ya sea pre o post siembra, y estos tratamientos dependerán de la hierba que se necesite controlar en una plantación específica.<sup>13</sup>

Adicionalmente, los herbicidas se clasifican de acuerdo a su composición química.

#### **2.2.1.1 Organoclorados**

Son de bajo costo y amplio espectro, su persistencia va desde moderada a muy persistentes, y sus residuos se encuentran en el ambiente y en los seres vivos. Son liposolubles, solubles en compuestos orgánicos de baja polaridad. Se acumulan en el tejido graso y se metabolizan lentamente. Son estables química y bioquímicamente. Se caracterizan por tener una estructura cíclica y átomos de cloro; dependiendo de dicha estructura, los pesticidas organoclorados se clasifican en tres grupos principales:

#### **2.2.1.2 Amidas**

Conforman una larga variedad de compuestos herbicidas, los cuales tiene la fórmula:  $R_1\text{-CO-N-(R}_2\text{-R}_3\text{)}$ .

Los componentes claves en este grupo son las cloroacetamidas N-sustituidas, estas son herbicidas de pre-emergencia muy efectivas para arremeter contra el pasto anual y las hierbas que crecen en las hojas. En general, estos compuestos son aplicados en el suelo y son empleados en varias plantaciones tales como las de maíz, soya y caña de azúcar. Estos herbicidas son normalmente absorbidos por los brotes y raíces y son en general, compuestos que no se almacenan en los suelos<sup>13</sup>.

### 2.2.1.2.1 Triazinas

Las triazinas son uno de los tres compuestos químicos orgánicos, isómeros entre ellos cuya fórmula molecular es  $C_3H_3N_3$ . Una gran cantidad de triazinas se han sintetizado a través del tiempo para controlar malezas y pasto en una gran variedad de siembras como también en suelos sin sembrados. Son muy efectivos en dosis de bajas concentraciones, para exterminar maleza de hoja ancha en plantaciones de maíz. También se emplean en altas concentraciones como agente esterilizador de suelos. En general, este herbicida es aplicado en etapas de pre y post cosecha y son absorbidos por las raíces y el follaje. Estos compuestos presentan una persistencia apreciable en los suelos y pueden mezclarse con otros herbicidas para aumentar el rango de alcance.

#### 2.2.1.2.1.1 Atrazina

La atrazina, 2-cloro-4etilamino-6isopropilamino, es un compuesto orgánico que consiste en un anillo de s-triazina, el cual es ampliamente utilizado como herbicida. Su uso es controversial debido a sus efectos en especies que no son su objetivo, tales como anfibios. También porque puede esparcir su contaminación por vías de agua subterránea y llegar a cuencas de agua para consumo humano. Aunque ha sido excluido del proceso de registro de la Unión Europea todavía sigue siendo uno de los herbicidas más utilizados en el mundo.<sup>14</sup>

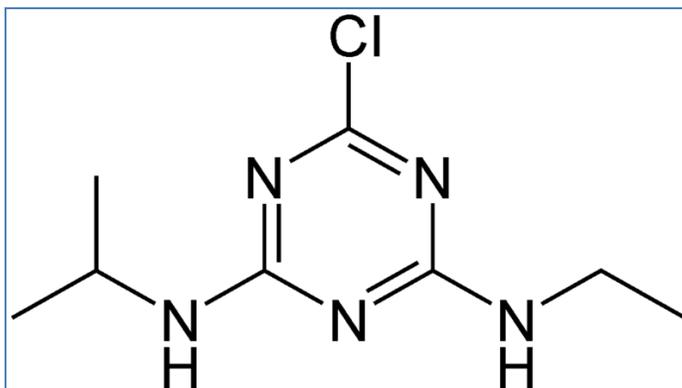


Figura 1. Estructura de la Atrazina

### 2.2.1.2.1.2 Simazina

La simazina pertenece al grupo de las triazinas y se emplea desde hace 45 años, al igual que la Atrazina. Controla gramíneas y malezas en cultivos de maíz, alfalfa, caña de azúcar, alcaucil, té, manzanos, perales, cítricos, vides, nogales, pino y eucalipto, entre otros. Es de acción sistémica y residual. Se absorbe por las raíces. Es un compuesto blanco cristalino que es escasamente soluble en agua. Y es ampliamente utilizado como herbicida residual no selectivo, pero actualmente esta prohibido en la Unión Europea. Como la antrazina, actúa inhibiendo la fotosíntesis. Se mantiene activo en los suelos entre 2-7 meses después de su aplicación.<sup>15</sup>

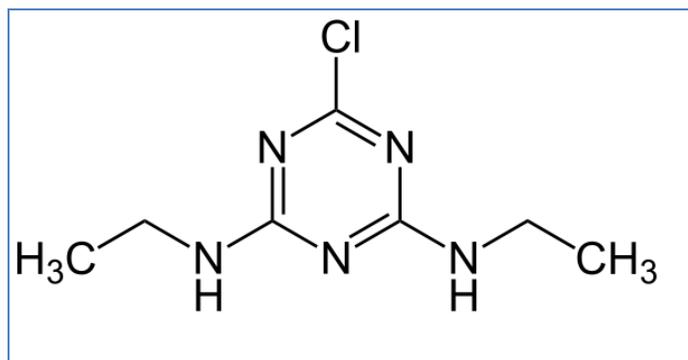


Figura 2: Estructura de la simazina

## 2.3 Muestreo en cuerpos de agua

Este es uno de los puntos en los que se ha estado llevando a cabo una fuerte investigación bibliográfica, ya que para poder asegurar que los resultados estén estadísticamente validados es necesario un control riguroso sobre la captación, preservación y manipulación de la muestra.

Existen diversos organismos internacionales que son los pioneros en el desarrollo de métodos analíticos, y por lo tanto son los responsables de los métodos existentes en la normalización. En el muestreo de cuerpos de agua, sucede algo interesante y es que todas las organizaciones como la EPA<sup>16</sup>, ASTM<sup>17</sup>, y en nuestro país COVENIN<sup>18</sup>, no difieren en sus métodos de captación y preservación de muestras, esto puede deberse a la falta de tecnología aplicada a los equipos de muestreo manual, sin embargo hay uno que se encarga de describir la recolección y

preservación de muestras de cuerpos de agua en el que se desean analizar compuestos orgánicos, como los pesticidas, este método se encuentra reflejado en el Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater.<sup>19</sup>, el protocolo como tal que se planea seguir para el muestreo se detalla en el siguiente Capítulo de este documento.

El análisis del agua tiene su inicio en el muestreo. La muestra de agua debe ser lo más representativa posible, es decir, que las características de la muestra corresponda a las características de un gran volumen total.

### **2.3.1 Plan de Captación**

Un correcto muestreo se logra siguiendo un plan de captación, el cual debe abarcar los siguientes puntos:

1. Preparación de un croquis de captación.
2. Establecer la naturaleza del o los análisis.
3. Preparación de los envases toma muestra.
4. Información del aspecto preliminar de la muestra (color, olor y sabor).
5. Información del entorno del lugar de captación y condiciones climáticas.
6. Técnicas de conservación de muestra, previo al análisis.

### **2.3.2 Toma de muestras**

Muestra simple, la cual proporciona información sobre la calidad en un punto y momento dado. Esto es importante a la hora de establecer las características del agua en un punto de la red de abastecimiento de una población.

### **2.3.3 Envases porta muestra**

- Siguiendo las metodologías de análisis se hará la selección del volumen del envase toma muestra y el material del mismo.

- Los envases deben estar limpios y secos. En algunos casos deben contener únicamente un agente químico para preservar la muestra o bien para inhibir el cloro en los envases para análisis microbiológicos.
- La identificación de la muestra debe realizarse una vez captada la muestra.

#### **2.3.4 Tratamiento de muestras de agua para la extracción de pesticidas organoclorados.**

Al igual que el apartado anterior, se ha estado llevando a cabo una exhaustiva investigación, sobre los métodos de extracción y tratamiento de muestras de aguas en los que se quiere determinar pesticidas organoclorados. Ya que, todo lo relacionado a este trabajo debe adaptarse a la disponibilidad de equipos y materiales del LABSAI. A continuación se presentan algunos métodos de forma general, cabe destacar que la decisión a la que se ha llegado a este trabajo es que se ajustará u optimizará el método planteado en el Standard Method For Examination of Water and Wastewater<sup>23</sup>, ya que, el mismo es un método estandarizado lo que asegura la repetibilidad de los resultados y se puede ajustar a la disponibilidad de los equipos del LABSAI.

##### **2.3.4.1 Extracción Líquido-Líquido (LLE por sus siglas en ingles).**

Este es el método que se utilizará, ajustándose a las condiciones del LABSAI, se mostrará en detalle en el siguiente capítulo de este documento, acá se presentaran las generalidades ventajas y desventajas, para que el lector, pueda evaluar por si mismo la factibilidad de este método y por qué es tan aplicado a nivel mundial. LLE es uno de los métodos más modernos utilizados para analizar pesticidas en muestras de agua, básicamente por su simplicidad y por su inclusión en diversas literaturas estandarizadas como el de la EPA<sup>20</sup>. Dependiendo del tipo de analito a analizar se pueden utilizar diversos solventes. Este método se basa en la distinta distribución de los componentes de la muestra entre dos disolventes inmiscibles, donde matriz y analito tienen diferente solubilidad en cada uno de ellos. Cuando se

alcanza el equilibrio, la concentración de analito en cada disolvente viene determinada por el coeficiente de distribución.

#### **2.3.4.1.2 Ventajas**

El método estandarizado LLE es un método madurado y ampliamente probado. Se necesitan relativamente pocos equipos y no se necesita una experticia extrema del analista. Es aplicable a un amplio rango de pesticidas. A través de este método se han encontrado excelentes resultados al utilizar un espectrómetro de masas.

#### **2.3.4.1.3 Desventajas**

La desventaja más notable de este método es el empleo de volúmenes considerables de solventes orgánicos, lo que lo hace menos amigable ambientalmente que otros métodos desarrollados posteriormente. Los grandes volúmenes de solventes pueden llegar a ser un problema para la salud del analista y la generación de residuos. Normalmente es laborioso, consume mucho tiempo, y demandante físicamente. La preparación de 6-8 muestras puede tomar fácilmente 1 día de trabajo. Normalmente este método no se ajusta para muestras con sólidos suspendidos o altos niveles de materia orgánica en la superficie.

#### **2.3.4.2 Micro extracción líquido-líquido.**

Este método es básicamente la miniaturización del LLE, y se puede observar en forma detallada en la referencia<sup>9</sup>. Aquí presentaremos las ventajas y desventajas del método, pero la variable de peso, es la no disponibilidad de equipos necesarios para su implementación.

##### **2.3.4.2.1 Ventajas**

Micro-LLE es la mejora del LLE, y se utiliza una pequeña cantidad de solvente orgánico, tomando en cuenta que para análisis cromatográficos se utiliza una pequeña fracción de la fase orgánica. Al consumir mucho menos reactivo, este método consume mucho menos tiempo y es mucho más económico, y ha

presentado buenos límites de detección, y sensibilidad al utilizarse detectores de masa.

#### **2.3.4.2.2 Desventajas**

La pequeña escala en la que se trabaja con estas microextracciones no permite que la fase orgánica se enriquezca totalmente de los pesticidas a cuantificar. Es difícil de automatizar y las habilidades del analista toman gran peso para la obtención de buenos resultados. Es aplicable solo para pesticidas no polares, ya que el solvente debe ser totalmente inmiscible en agua. Al haber una recuperación ineficiente, es necesaria la implementación de un estándar interno en la extracción.

#### **2.3.4.3 Extracción en fase sólida. (Estándar SPE por sus siglas en Ingles).**

Este método se ha investigado y ha generado resultados excelentes con respecto al resto de los métodos de tratamiento de muestra que se pueden encontrar en la bibliografía. Por la eficiencia y la tendencia a la futura implementación de la extracción en fase sólida o SPE es pertinente describirla someramente en este documento.

Básicamente el pesticida presente en el agua, se adsorbe sobre una superficie activa sólida, entre los empleados frecuentemente se puede citar la sílica gel y el carbón activado, y posteriormente por técnicas como la cromatografía líquida de alto desempeño se puede recuperar y cuantificar los pesticidas presentes en la superficie activa. Al igual que los anteriores se puede ver el método en detalle en la referencia <sup>9</sup> y acá se presentaran las ventajas y desventajas para que el lector esté consciente de las virtudes de este método.

#### **2.3.4.3.1 Ventajas**

Al comparar SPE con LLE el primero presenta ventajas considerables. SPE necesita de un menor tiempo para el análisis, consume muchísimo menos solventes orgánicos y en muchos casos es más económico que la extracción líquido-líquido. Además de la facilidad para transportarse ya sea del campo al laboratorio o de un

laboratorio a otro. Por ejemplo: se tratan muestras de agua in situ, y solo los cartuchos de adsorbente deben transportarse al laboratorio para el posterior análisis. La automatización o semiautomatización puede alcanzarse en un futuro cercano.

#### **2.3.4.3.2 Desventajas**

La variabilidad de la configuración de los cartuchos de adsorción (por ejemplo masa de adsorbente por tubo) y cada tipo de SPE es inherente de cada tipo de pesticida a estudiar. Esto aunado a las condiciones experimentales como el flujo, acondicionamiento, efecto de la matriz, puede hacer de la recuperación de pesticidas muy variable. Las muestras de agua adaptables a este sistema deben ser limpias, como aguas de pozo, probablemente sea necesario el filtrado del agua, por lo que la fracción de analito a fin con los sólidos suspendidos no se pueden analizar.

#### **2.3.5 Consideraciones al manipular muestras de agua.**

Uno de los requerimientos básicos en el programa de muestreo es una manipulación ausente de procesos de deterioro o de contaminación antes de iniciar los análisis en el laboratorio; en el muestreo de aguas, antes de coleccionar la muestra es necesario purgar el recipiente dos o tres veces, a menos que contenga agentes preservativos. Dependiendo del tipo de determinación, el recipiente se llena completamente (esto para la mayoría de las determinaciones de compuestos orgánicos), o se deja un espacio para aireación o mezcla (por ejemplo en análisis microbiológicos); si el recipiente contiene preservativos no puede ser rebosado, lo cual ocasionaría una pérdida por dilución. Excepto cuando el muestreo tiene como objetivo el análisis de compuestos orgánicos, se debe dejar un espacio de aire equivalente a aproximadamente 1% del volumen del recipiente, para permitir la expansión térmica durante su transporte.

#### **2.3.5.1 Preservación de la muestra**

Es prácticamente imposible la preservación completa e inequívoca de las muestras de aguas residuales domésticas e industriales y de aguas naturales.

Independientemente de la naturaleza de la muestra, nunca puede lograrse la completa estabilidad de todos sus constituyentes; en el mejor de los casos, las técnicas de preservación solamente pueden retardar los cambios químicos y biológicos, que continúan inevitablemente después de que la muestra se retira de su fuente.

Naturaleza de los cambios en la muestra: Los cambios químicos son función de las condiciones físicas y suceden en la estructura de ciertos constituyentes. Los cationes metálicos pueden precipitarse como hidróxidos, formar complejos con otros constituyentes, e incluso algunos, tales como aluminio, cadmio, cromo, cobre, hierro, plomo, manganeso, plata y zinc, se pueden adsorber en las superficies de los recipientes (vidrio, plástico, cuarzo, etc.). Bajo determinadas condiciones oxidantes o reductoras, los iones pueden cambiar de estado de valencia; otros constituyentes se pueden disolver o volatilizar con el paso del tiempo.

Los cambios biológicos que tienen lugar en una muestra pueden cambiar la valencia de un elemento o radical; los constituyentes solubles pueden convertirse en materiales orgánicamente enlazados a las estructuras celulares; o la ruptura de las células puede liberar el material celular hacia la solución. Los ciclos del nitrógeno y del fósforo son ejemplos de la influencia biológica en la composición de la muestra. La actividad microbiológica puede ser responsable de cambios en el contenido de nitrato-nitrito-amonio, disminución de la concentración de fenoles y de la DBO, o de la reducción del sulfato a sulfuro.

#### **2.3.5.2 Intervalo de tiempo entre la toma y el análisis de muestras**

Los resultados analíticos son más exactos en la medida que el tiempo transcurrido entre la toma de la muestra y su análisis sea menor, hecho especialmente cierto cuando las concentraciones de los analito están en el orden de mg/L. Para evaluar ciertos constituyentes y parámetros físicos, se requiere su análisis inmediato en el campo. Para las muestras compuestas se registra el tiempo en el momento de finalizar la operación de composición. Los cambios provocados por el crecimiento de microorganismos se retardan por almacenamiento de la muestra en la oscuridad y a

baja temperatura (<4 °C pero sin congelar). Registrar el tiempo transcurrido hasta el momento del análisis de la muestra, y la técnica de preservación aplicada.

### **2.3.5.3 Técnicas de preservación**

Los métodos de preservación incluyen las siguientes operaciones: control del pH, adición de reactivos, uso de botellas ámbar y opacas, refrigeración, filtración y congelamiento; y obran para: (a) retardar la acción biológica, (b) retardar la hidrólisis de los compuestos o complejos químicos, (c) reducir la volatilidad de los constituyentes, y (d) reducir los efectos de absorción.

La conservación de una muestra de agua dependerá del parámetro o analizar que nos marcará el tipo de envase, el agente preservante y el tiempo máximo de almacenamiento.

Con carácter general, el análisis debe ser lo más rápido posible con relación a la toma de muestras, lo que puede garantizar una mínima alteración de la muestra de agua desde su origen hasta el laboratorio de análisis.

La adición de preservativos químicos sólo es aplicable cuando estos no interfieren con los análisis a realizarse, y deben agregarse previamente a la botella de muestra de tal manera que todas las porciones de muestra se preserven de inmediato.

## **2.4 Conceptos Asociados al proceso de Validación y la Técnica de Cromatografía acoplado a Espectrómetro de Masas.**

### **2.4.1 Validación**

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

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

#### **2.4.1.2 Necesidad Analítica (método)**

Una vez establecida, por la autoridad responsable, la necesidad de tener a disposición del laboratorio un procedimiento analítico que satisfaga una determinada demanda, deberá procederse a la elección del método más adecuado, para lo que se puede acudir a la bibliografía más específica.<sup>20</sup>

Aun en el caso de que el método elegido esté publicado como norma internacional, nacional o regional, y con el objeto de atender los requisitos de la norma ISO 17025, es conveniente (en muchos casos preciso, cuando es necesario complementar la norma con información adicional para asegurar su correcta aplicación) proceder a la elaboración de un procedimiento interno que recoja, por un lado todos los aspectos técnicos del método y por otro los aspectos formales y de calidad de la norma ISO 17025. Dicho procedimiento interno (borrador, mientras no sea válido) deberá realizarse teniendo en cuenta lo que se especifique en el sistema de la calidad del laboratorio.<sup>24</sup>

#### **2.4.1.3 Puesta a Punto**

La puesta a punto de un método es una actividad previa a la validación que debe realizar el laboratorio para llegar a tener un conocimiento general del mismo. Con esta actividad se consigue que el método “funcione” dando unas respuestas razonables aceptables y consistentes<sup>24</sup>

#### **2.4.1.4 Elección de parámetros de validación. Fijación de parámetros**

La norma ISO 17025 establece “La validación incluye la especificación de los requisitos, la determinación de las características de los métodos, una comprobación de que pueden satisfacer los requisitos utilizando el método, y una declaración de la validez del método”, los requisitos que deben cumplir los métodos deben ser especificado previamente a la validación y son conocidos como objetivos de validación<sup>24</sup>

Los parámetros necesarios para la validación de un método son:

- Selectividad
- Linealidad

- Limite de detección.
- Limite de cuantificación.
- Precisión (Repetibilidad y reproducibilidad).
- Exactitud.

#### **2.4.1.5 Diseño Experimental y Estadística**

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

El siguiente proceso pretende ser representativo de un método analítico y se compone de las fases: <sup>24</sup>

- Selección de los tipos de muestras a ensayar.
- Determinación del número de submuestras por muestras a procesar.
- Procesamiento de todas las submuestras simultáneamente (en condiciones de repetibilidad) siguiendo el método analítico, junto con el blanco (es una muestra que tiene todos los componentes de la muestra problema excepto el analito problema, y que ante la dificultades que normalmente se tiene para conseguir una matriz limpia del analito problema, suele aproximarse con un blanco reactivo)
- Lectura (normalmente instrumental) de una señal que produce cada una de las submuestras y el blanco (el número de lecturas que se debe obtener de cada submuestras y el blanco depende normalmente del instrumento o sistema de medida de su estabilidad a corto plazo, tiempo de respuesta y es recomendable que sea siempre posible mayor de una).
- Interpolación, contra una recta de calibrado del instrumento o sistema de medida, de la lectura obtenida para convertirla en resultado ( la recta de calibrado mencionada, se obtiene generalmente por la lectura de la señal que producen una serie de patrones de trabajo limpios (no tienen en cuenta la matriz de la muestra problema que se preparan en el laboratorio a partir de

patrones trazables o productos químicos normalizados o que se han adquirido como tales), tras la realización de diversos cálculos en los que se tienen en cuenta la sustracción de la aportación debida al blanco.

#### **2.4.1.6 Muestras de la que se disponen para la validación**

- Patrones de trabajo limpios a 3 niveles de concentración
- Blanco

#### **2.4.1.7 Materiales de referencias a tres niveles de concentración**

- Bajo, cercano al límite de cuantificación.
- Medio, próximo a los valores mas esperados.
- Alto, cercano al mayor valor de intervalo de trabajo.

Debido a que no se cuenta con los materiales certificados necesarios, esta etapa de la estrategia se seguirá enriqueciendo las muestras con patrones certificados.

#### **2.4.1.8 Calibración Instrumental**

Es el proceso por el que se asegura que un sistema es apropiado para el uso que se desea darle y que se desempeña de acuerdo con las especificaciones dadas por el fabricante. Es decir, asegurarse de que el instrumento funciona correctamente. Para esto se utilizan materiales o patrones de referencia.

#### **2.4.1.9 Calibración Metodológica Analítica**

Se debe establecer una relación inequívoca entre la señal instrumental y la concentración del analito.

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

- Estándar Externo: Se construye una curva patrón utilizando diluciones de un estándar y se relaciona la concentración con la señal obtenida, que luego se extrapola a las muestras utilizadas.

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

## **2.5 Tratamiento Estadístico de Datos Obtenidos**

Los patrones y blancos se preparan cada día para recoger la variabilidad que provienen de dicha preparación. Si se parte de una solución madre no es necesario preparar dicha solución cada día, siempre cuando esté controlado su deriva.<sup>21</sup>

### **2.5.1 Selectividad – Especificidad**

Son mediciones que garantizan la confiabilidad de las mediciones en la presencia de interferencias. La especificidad se considera generalmente que es el 100 % de la selectividad pero el acuerdo no es universal. Cuando la etapa de la medición no es específica, es posible establecer que ciertos analitos no interfieren, habiendo primero revisado que este es el caso. Es bastante difícil establecer que nada interfiere ya que siempre existe la posibilidad de encontrar algunas interferencias no reconocida hasta el momento del análisis. Habrá casos en donde las interferencias químicas puedan ser identificadas para un método en particular pero que sean improbables las oportunidades de encontrarlas en la vida real<sup>24</sup>

### **2.5.2 Sensibilidad**

Es la pendiente de la recta de calibración que se obtiene cuando el resultado o señal de la medida se representa frente a la cantidad o concentración del analito. El cambio en la respuesta del instrumento que corresponde a un cambio de concentración del analito.

### 2.5.3 Límite de Detección

Es definido como la concentración más baja que puede ser determinada para ser estadísticamente diferente al blanco. Esta concentración se recomienda que sea tres veces la desviación estándar por encima del promedio de diferencia entre las señales del blanco y de la muestra, lo que corresponde a un 99% de confianza.

$$LD = 3S_a/b \quad (\text{Ecuación 1})$$

Donde  $S_a$  es la desviación estándar de la curva de calibración y  $b$  es la pendiente obtenida<sup>26</sup>, en condiciones de reproducibilidad, de los resultados de las submuestras de blanco convertida a resultado final sobre muestra.<sup>22</sup>

### 2.5.4 Límite de Cuantificación

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

El límite de cuantificación se determina a partir de la siguiente ecuación:

$$LC = 3,3LOD \quad (\text{Ecuación 2})$$

Dentro del intervalo de trabajo puede existir un rango de respuesta lineal (intervalo lineal); los cálculos de regresión por si solos pueden ser insuficientes para establecer la linealidad; se deben complementar con una inspección visual de la línea y de los residuos. En general los controles de linealidad requieren efectuarse con al menos 10 concentraciones o valores diferentes.<sup>26</sup>

### 2.5.5 Función de Respuesta del método

Es la que se determina cuando se calcula la recuperación del método y puede coincidir exactamente con la instrumental cuando la recuperación es 100 %. Si la función de respuesta no coincide con la instrumental, los datos pueden presentarse corregidos con el factor de recuperación encontrada o sin corregir.<sup>22</sup>

### 2.5.6 Intervalo de Trabajo Validado

El intervalo de trabajo puede coincidir con el que utilizamos al principio, en el estudio de la función de respuesta, como intervalo de trabajo deseable, pero pueden haber disminuido como resultado del proceso de validación. Normalmente estará

comprendido entre el límite de cuantificación y el valor asignado al mayor patrón utilizado.<sup>22</sup>

### **2.5.7 Exactitud**

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

La exactitud del método puede establecerse por la comparación de los resultados, obtenidos en el diseño experimental, de los materiales de referencia (MR) con los valores teóricos de los mismos, observando el grado de concordia entre el valor obtenido y valor esperado.<sup>22</sup>

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

$$\% \text{ Recuperación} = (X_{\text{obtenido}} / X_{\text{esperado}}) * 100 \quad (\text{Ecuación 3})$$

Donde:

$X_{\text{obtenido}}$ : Es el resultado obtenido del análisis del material de referencia.

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

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

La presentación de los resultados finales sobre muestra siempre deberán tener en cuenta el factor de recuperación.<sup>22</sup>

### **2.5.8 Precisión**

La precisión es la proximidad entre resultados de análisis independientes obtenidos bajo condiciones estipuladas. Depende sólo de la distribución de los errores aleatorios y no se relaciona con el valor verdadero o valor especificado. Se computa como desviación estándar de los resultados de los análisis. El estudio de la precisión se realiza calculando, a través del análisis simple de varianza (ANOVA),

las desviaciones estándar de repetibilidad y de reproducibilidad para cada uno de los niveles de trabajo <sup>22</sup>.

### **2.5.9 Repetibilidad**

La repetibilidad viene dada por la obtención de resultados independientes de una prueba con el mismo método, con los mismos accesorios de laboratorio, en el mismo laboratorio, por el mismo operador, usando el mismo equipo en intervalos de tiempo. Puede determinarse de una manera para un Laboratorio. Es necesario tener en cuenta que:

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

### **2.5.10 Reproducibilidad**

Cualitativamente es el grado de concordancia entre dos resultados individuales obtenidos con el mismo método sobre una materia idéntica sometida al ensayo, pero en condiciones diferentes, es decir, distintos analista, distintos laboratorios y/o distintas épocas. En este caso se realizará la reproducibilidad intermedia, que consiste en la comparación de la repetibilidad encontrada de los análisis realizados semanalmente.

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

## **2.6 Validación de un Método**

Se puede interpretar la validación del método como el proceso de definición de las necesidades analíticas y la confirmación de que el método en cuestión ha considerado capacidades consistente con la aplicación que requiere. Está implícito que será necesario evaluar las capacidades de desempeño del método. El juicio de

la aptitud del método es importante; en el paso de evaluación de los parámetros de desempeño.

La validación del método generalmente se considera que está relacionada estrechamente con el desarrollo del método, de hecho no es posible determinar exactamente donde termina el desarrollo del método y cuando empieza la validación. Mucho de los parámetros de desempeño del método que están asociados a su validación y por lo general son evaluados, por lo menos aproximadamente, como parte del desarrollo del método.

Los métodos deben ser validados cuando sea necesario verificar que sus parámetros de desempeño son adecuados para el uso en un problema analítico en particular. Por ejemplo:

- Un nuevo método desarrollado para un problema en particular.
- Un método establecido revisado para incorporar mejoras o extenderlo a un nuevo problema.
- Cuando el control de calidad indica que un método establecido está cambiado con el tiempo.
- Un método establecido usado en un laboratorio diferente o con diferentes analistas o con diferentes instrumentaciones.
- Para demostrar la equivalencia entre dos métodos: un método nuevo y un método de referencia.

El alcance de la validación o la revalidación requerida dependerá de la naturaleza de los cambios hechos al aplicar nuevamente un método a diferentes laboratorios, en la instrumentación, en los operadores y en las circunstancias en las cuales el método va a ser utilizado. Algún grado de validación siempre es apropiado aun cuando se usan métodos de referencias publicados o aparentemente bien caracterizados<sup>22</sup>.

### **2.6.1 Efecto matriz**

La matriz se puede definir como un conjunto de componentes de la muestra. El análisis de muestras reales se complica debido a la presencia de múltiples componentes en la misma, ya que la matriz puede contener especies con

propiedades químicas parecidas a las del analito o estas especies pudieran reaccionar con los mismos reactivos del analito e impedir que la respuesta del instrumento de medición se distinga fácilmente del analito.

El efecto matriz causa errores sistemáticos proporcional manifestándose con un cambio de las pendientes de las curvas de calibrado en ausencia y presencia de la muestra. Es por eso necesario realizar un estudio estadístico de la diferencia significativa entre las pendientes de ambas curvas para así evaluar la presencia o no de efecto matriz sobre el sistema. También el análisis de un interferente en específico sobre una muestra, se aplica la misma metodología del efecto matriz.

### **2.6.2 Contraste de significación.**

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

Entre las pruebas de contraste de significación están las siguientes:

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

## **2.7 Planteamientos del método**

### **2.7.1 Cromatografía de gases /Espectrometría de masas (GC/MS) en el análisis de plaguicidas.**

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

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

En lo que respecta a la cuantificación, los iones que se controlen deberán ser los más específicos del analito, los que sufran menos interferencias y aquellos en los cuales la relación señal/ruido sea buena.

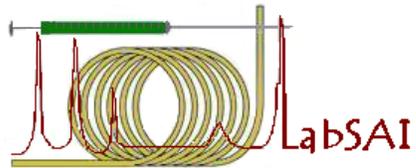
Cuando se utiliza el monitoreo selectivo de iones (SIM), los intervalos de tolerancia de la relación de iones y los tiempos de retención basados en la inyección del plaguicida a la concentración cercana al nivel crítico deberían haberse establecido en este punto. Los intervalos de tolerancia para las relaciones iónicas deben estar dentro de los límites de  $\pm 30\%$  de la relación iónica absoluta. Cuando 2 ó 3 relaciones iónicas seleccionadas están dentro de los intervalos de tolerancia establecidos, se confirma el residuo.<sup>23</sup>

Cuando los iones detectados indican todavía la posible presencia de un residuo, el resultado puede comunicarse como identificado provisionalmente. Sin embargo, cuando el resultado de lugar a una medida reglamentaria o los resultados se utilicen con otra finalidad, se buscará mayor confirmación de la identidad del analito. Esto puede lograrse con el mismo instrumental de GC-MS, inyectando compuestos tipo ajustados a la matriz del analito, para compensar la influencia de la matriz sobre las relaciones iónicas. En este caso, deben realizarse inyecciones posteriores del

compuesto tipo ajustado a la matriz y la muestra sospechosa. Dos relaciones iónicas medidas en una muestra deben estar dentro del intervalo de tolerancia calculado en base a las relaciones iónicas en el compuesto tipo ajustado a la matriz. Se considerará que el residuo ha sido confirmado si cumple la norma general expuesta anteriormente.

# CAPITULO 3

## *MARCO METODOLÓGICO*



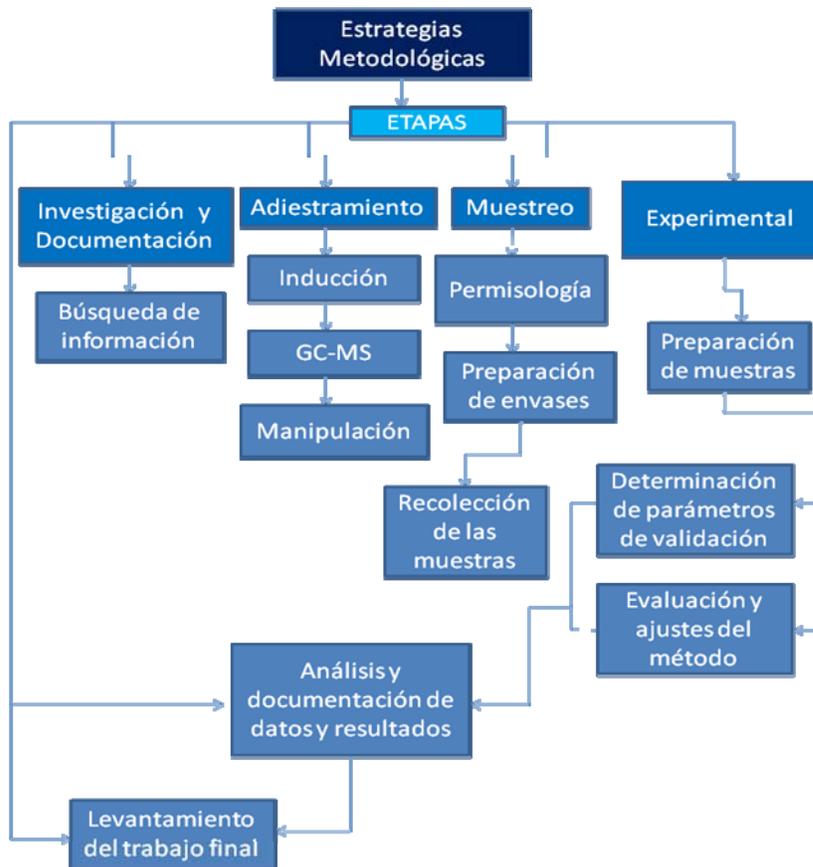
## **Marco metodológico**

### **3.1 Aspectos Generales**

El siguiente capítulo presenta la documentación en general, que comprende lo referente a la metodología aplicada.

#### **3.1.1 Estrategia Metodológica**

Para cumplir con el propósito correspondiente a la validación del procedimiento para la determinación de plaguicidas organoclorados en muestras de agua de pozos adyacentes a zonas agrícolas e implementación del mismo, se plantearon cuatro objetivos específicos en esta investigación, las actividades generales que se llevaron a cabo para el cumplimiento de los mismos se organizaron de forma esquemática, y se pueden observar en la figura 4.



Esquema 2. Metodología general.

En el esquema 2 se presenta una metodología en la cual se describe de manera general, lo correspondiente a la estrategia metodológica que se empleó, el cual se encuentra estructurado en etapas que representan cada una de las actividades fundamentales del presente trabajo, enfocadas a los objetivos planteados. En la primera etapa, investigación y documentación; se realizó una previa revisión bibliográfica sobre los métodos de determinación de pesticidas organoclorados empleando la técnica de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas, además de todo lo relacionado con los aspectos teóricos de los pesticidas, propiedades y efectos, legislación y revisión de métodos de extracción e identificación existentes.

La segunda etapa, corresponde al adiestramiento en el equipo de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas, en el cual se adquirieron los conocimientos y destrezas necesarias, para manipular dicho equipo de manera

adecuada. Como tercera etapa se estableció la técnica de muestreo a aplicar, se tramitaron los permisos y se acondicionaron los equipos necesarios para la realización del muestreo así como se preparó todo el material necesario y se llevó a cabo la recolección de las muestras. Por último, para llevar a cabo la implementación de dichos métodos, en la cuarta etapa; se determinaron los parámetros de validación y se ajustaron los métodos seleccionados de manera que cumplan con los requisitos exigidos por el Laboratorio y las normativas nacionales e internacionales que regulan los límites de concentración permisibles de plaguicidas organoclorados en agua.

## **3.2 Materiales y Equipos**

### **3.2.1 Materiales de vidrio**

Comprende todo el material de laboratorio (material de vidrio, volumétrico), utilizado para realizar la parte experimental del presente trabajo. Este aspecto es importante, ya que la validación debe realizarse contando con todo el material y equipos propios del laboratorio. Entendiéndose, que el espíritu fundamental de una validación se enfoca en los resultados obtenidos a través de estos materiales y recursos, si alguno de estos recursos cambia, es necesario llevar a cabo una revalidación de los métodos.

### **3.3 Muestreo**

Para cumplir con el primer objetivo propuesto en esta investigación, en el cual se debía definir el método de toma de muestra a aplicar, se empleó una matriz de selección, ya que existen diversos organismos internacionales que son los pioneros en el desarrollo de métodos analíticos, y por lo tanto son los responsables de los métodos de muestreo existentes en la normalización. Esta matriz se realizó comparando los métodos propuestos por la ASTM<sup>17</sup>, el Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater<sup>19</sup> y en nuestro país COVENIN<sup>18</sup>.

Los criterios empleados para la selección son los equipos, tiempo de muestreo y preservación de muestras aplicadas al analito en estudio, plaguicidas

organoclorados, todos los métodos antes mencionados muestran similitudes en los protocolos de toma de muestra a seguir, sin embargo, se hizo hincapié en la preservación de la muestra tomando en cuenta el analito a estudiar.

El objetivo de la matriz de selección es juzgar cada criterio contra los demás, para lo cual se crea una tabla de pares, ver tabla 1. Escala empleada para evaluar el factor de ponderación<sup>24</sup>:

10: Mucho más importante.

1/5: Menos importante

5: Más importante

1/10: Mucho menos importante.

1: Igual

Tabla 1. Comparación de los criterios en la matriz de pares

	PM	E	TM	Suma	Factor de ponderación (FP)*
Preservación de muestras (PM)		10	5	15	0,86
Equipos (E)	1/5		1	1.2	0,07
Tiempo de muestreo (TM)	1/5	1		1.2	0,07
Total				17.4	

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

Tabla 2. Comparación de las opciones de acuerdo a l criterio preservación de la muestra.

Preservación de la muestra	SM	ASTM	COVENIN	Suma	Peso de la opción (PO)*
Standard Methods (SM)		10	10	20,0	0,89
ASTM	1/5		1	1,2	0,05
COVENIN	1/5	1		1,2	0,05
Total				22,4	

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

Tabla 3. Comparación de las opciones de acuerdo al criterio equipo.

Equipos	SM	ASTM	COVENIN	Suma	Peso de la opción (PO)*
Standard Methods (SM)		1	1	2	0,33

ASTM	1		1	2	0,33
COVENIN	1	1		2	0,33
Total				6	

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

Tabla 4. Comparación de las opciones de acuerdo al criterio tiempo de muestreo.

Tiempo de muestreo	SM	ASTM	COVENIN	Suma	Peso de la opción (PO)*
Standard Methods (SM)		1	1	2	0,33
ASTM	1		1	2	0,33
COVENIN	1	1		2	0,33
Total				6	

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

En las tablas 2,3 y 4 respectivamente se puede observar una comparación de cada opción con el criterio a estudiar, en la cual se establece, mediante la puntuación establecida, las diferencias de método en comparación al otro.

Tabla 5. Matriz final en la que se concluye la selección del método de muestreo.

	Preservación de la muestra		Equipos		Tiempo de muestreo		Puntaje Final
	F.P.	P.O.	F.P.	P.O.	F.P.	P.O.	
Standard Methods (SM)	0,86 x 0,89		0,07 x 0,33		0,07 x 0,33		0,8
	0,77		0,02		0,02		
ASTM	0,86 x 0,05		0,07 x 0,33		0,07 x 0,33		0,08
	0,04		0,02		0,02		
COVENIN	0,86 x 0,05		0,07 x 0,33		0,07 x 0,33		0,08
	0,04		0,02		0,02		

Por último, en la tabla 5, se construye la matriz final, en la cual se etiqueta las filas con las opciones y las columnas con los criterios. Se multiplica el factor de ponderación (F.P.) por el peso de la opción (P.O.) respectivo. Luego se suma cada fila para obtener el puntaje final. En la tabla 5 se puede observar, que de acuerdo a los requerimientos deseados por este estudio de investigación, la opción idónea para la recolección de las muestras de aguas es el método de toma de muestra planteado en el Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater<sup>23</sup>, el cual se aplicó. Éste recomienda:

- Para ríos, lagos y otros cuerpos de agua este método propone la toma de muestra directa sino hay materiales o sustancias peligrosas que afecten la salud directa del analista. De todas formas es recomendable usar protección como guantes de látex.
- Colocar el envase bajo el agua con el agujero de entrada hacia arriba, si hay presencia de sedimentos hay que evitar la turbulencia en los mismos.

Se deben tomar al menos 1litro por cada captación.

Para la recolección de las muestras de agua de pozos profundos (entre 150 y 170 m de profundidad) adyacentes a zonas agrícolas, se seleccionaron 5 pozos ubicados en el municipio libertador del Estado Aragua. La selección de los mismos, se realizó en conjunto con el representante del Ministerio de Salud, el Lic. Juan Ustariz, jefe del Laboratorio de Sustancias Peligrosas del Departamento de Salud Ambiental del estado Aragua. La selección fue establecida, debido a la sospecha de posible contaminación con sustancias tóxicas por parte de dicha institución de salud ambiental. Cabe destacar que los pozos profundos de agua se encuentran aproximadamente entre 20 y 50 metros del río Aragua, el cual se presume estar contaminado. Estos pozos de agua son los que surten a la mayoría de los habitantes de la población del Municipio Libertador y se encuentran rodeados por fincas y sembradíos, que hacen uso de los pesticidas para el control de plagas, maleza, entre otros.

El muestreo realizado fue de tipo simple, es decir, se tomó una muestra en un punto específico, en un tiempo determinado. Para la recolección, se dejó correr el agua de los grifos adjuntos a los pozos aproximadamente diez minutos, luego se curó la botella previamente lavada con agua del pozo y por último se tomó un litro de agua del mismo.

Las botellas empleadas fueron botellas de vidrio de 1 litro de capacidad que se cubrieron con papel aluminio para evitar la incidencia de la muestra con la luz solar y se identificaron con números correspondientes a la toma de la muestra.

En cada pozo se recolectaron dos muestras de agua, esto se realizó a fin de trabajar con dos replicas en el análisis del contenido de pesticidas organoclorados en muestras reales.

Una vez realizada la toma de muestra, estas se preservaron con ácido ascórbico 0,01M a una temperatura de 4° C antes de su tratamiento, para cumplir con el protocolo establecido por Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater<sup>19</sup>.

Los pozos a estudiados se localizan específicamente en:

- Pozo #1: Calle 53 Urbanización San Antonio N 10° 09,791', W 067°32,140', este pozo se encuentra a 20 metros del río Aragua.
- Pozo #2: Urbanización Santa Elena Calle B N 10°09,896' W 096°32,557'
- Pozo #3: Urbanización La Carrizalera N 10°09,602' W 067°32,915'
- Pozo#4: Sector Las Vegas Agropecuaria Los dos N10°9,907' W 67° 32,977'
- Pozo#5: Sector Los Hornos N 10°09,585' W 067°33,271'

A fin de tener un registro del procedimientos de muestreo, se llenaron actas que fueron firmadas por los representantes de la comunidad, del Ministerio de la Salud y Alcaldía de Palo Negro, las mismas se encuentran en el Apéndice A de éste trabajo en conjunto con imágenes propias de la recolección.

### **3.4 Análisis de la muestra**

Para cumplir con el segundo objetivo propuesto de la investigación, en el cual se debía establecer el método de extracción a aplicar, para separar los plaguicidas



Líquido-líquido(LL)		10	10	20,0	0,97
Líquido-sólido (LS)	1/5		1/5	0,4	0,02
Micro-extracción (ME)	1/10	1/5		0,3	0,01
Total				20,7	

Tabla 8. Comparación de las opciones de acuerdo al criterio costos

Equipos	LL	LS	ME	Suma	Peso de la Opción (FO)*
Líquido-líquido(LL)		10	10	20,0	0,970
Líquido-sólido (LS)	1/5		1/10	0,3	0,015
Micro-extracción (ME)	1/10	1/5		0,3	0,015
Total				20,6	

Tabla 9. Comparación de las opciones de acuerdo al criterio cantidad reactivos

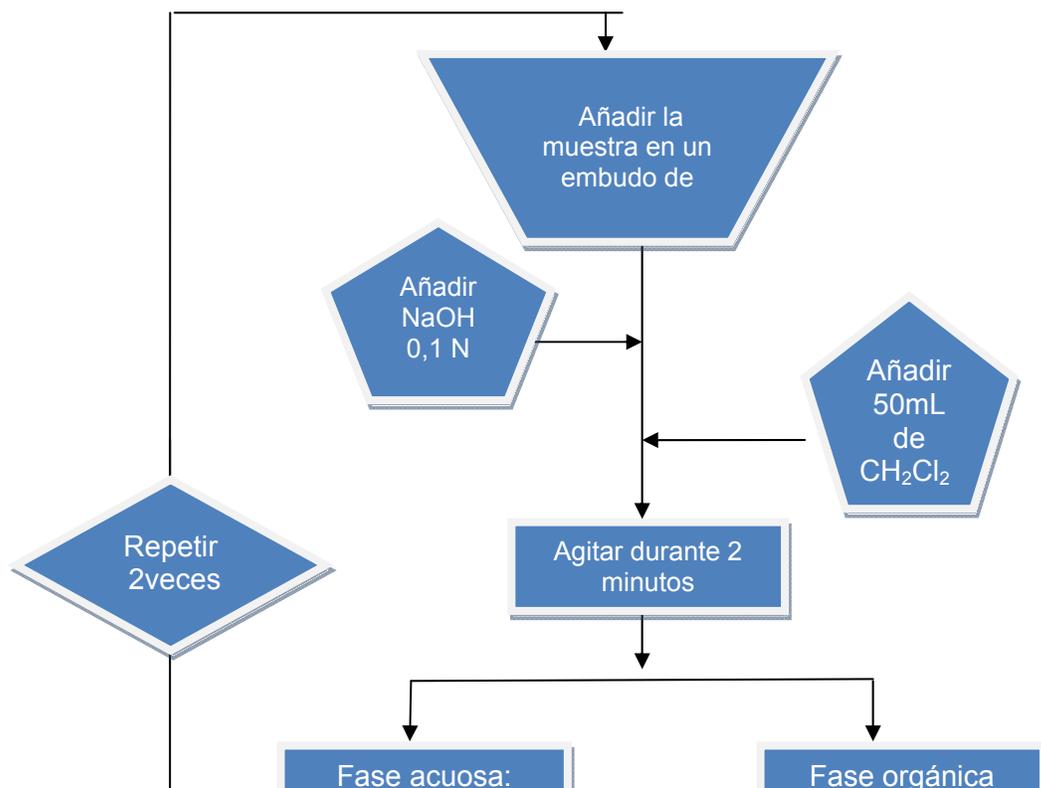
Equipos	LL	LS	ME	Suma	Peso de la Opción (FO)*
Líquido-líquido(LL)		1/5	1/10	0,3	0,01
Líquido-sólido (LS)	5		5	10	0,40
Micro-extracción (ME)	10	5		15	0,59
Total				25,3	

Tabla 10. Matriz final en la que se concluye la selección del método de extracción

	Equipos		Costos		Cantidad de reactivos		Puntaje Final
	F.P.	P.O.	F.P.	P.O.	F.P.	P.O.	

Líquido-líquido	0,48 x 0,97	0,48 x 0,97	0,05 x 0,01	0,94
	0,47	0,47	0,0005	
Líquido-sólido	0,48 x 0,02	0,48 x 0,015	0,05 x 0,40	0,03
	0,001	0,007	0,02	
Micro-extracción	0,48 x 0,01	0,48 x 0,015	0,05 x 0,59	0,04
	0,005	0,007	0,03	

Como se puede observar en la tabla 10, debido a la relación, equipos, costos y cantidad de reactivos, se seleccionó y empleó la Extracción líquido-líquido (Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater 6410B)<sup>23</sup>, el principio de éste método en el reparto de los analitos entre una fase acuosa y una fase orgánica, en donde se separan los compuestos orgánicos de la matriz acuosa, utilizando cloruro de metileno ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ). El procedimiento se muestra en la figura 5., en la cual se explica paso a paso el procedimiento realizado para analizar la muestra de agua una vez recolectada.



### Esquema 3. Extracción líquido-líquido

En el embudo de separación se agregó 1 litro de agua, de las muestras recolectadas en los pozos del Municipio Libertador, se utilizaron porciones de 50 mL de diclorometano hasta completar un volumen de 350mL para agentes básicos y neutros. Una vez trasvasada el agua al embudo se le agregó solución de hidróxido de sodio hasta alcanzar un pH aproximado a 11, este se midió con papel indicador de pH. Este procedimiento se realiza ya que a pH mayor a 11 se asegura la eliminación de interferencias que puedan afectar las mediciones de los compuestos orgánicos a estudiar. Se le añadieron aproximadamente 7 alícuotas de 50 mL de diclorometano, la primera se agregó en la botella vacía de la muestra para arrastrar trazas de analito en el interior del envase, luego se trasvaso al embudo de separación y se agitó durante dos minutos con apertura constante de la válvula para liberar la presión del sistema. Se dejó separarse la capa orgánica de la fase acuosa durante diez minutos. Se desalojó el extracto en un envase ámbar hasta que se obtuvo un volumen de 350 ml de fase orgánica.

Luego se llevó a cabo un proceso de evaporación controlada para lograr la concentración de los analitos en los extractos, utilizando un equipo volumétrico denominado Kuderna Danish (ver figura 21 Apéndice A). Se empleó este equipo de

concentración según las especificaciones del protocolo de extracción utilizado, Extracción líquido-líquido (Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater 6410B)<sup>23</sup>. Este método de concentración consiste, en colocar el extracto en un balón de cuello alargado de aproximadamente 250 ml, acoplado en su parte inferior por esmerilado, a un recipiente graduado de 1 ml de capacidad, el cual se coloca en un baño de agua a una temperatura constante de 70°C, el solvente recircula en una columna Snyder de 3 esferas y es condensado. Las sustancias de mayor punto de ebullición, en este caso los plaguicidas organoclorados y otras contaminantes no volátiles que pueda contener la muestra, se concentran a 1 mL, dicho montaje se puede observar en el Apéndice A.

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

Una vez concentrados los compuestos orgánicos, estos se mantuvieron refrigerados hasta su inyección en el cromatógrafo de gases.

### **3.5 Equipo de Cromatografía de Gases/Espectrometría masas**

Es el equipo principal en el que se llevó a cabo la parte experimental de la determinación de plaguicidas organoclorados en muestras de agua, a fin de realizar el procedimiento de la validación.

Descripción del equipo:

- ✓ Cromatógrafo de gases Agilent GC-6890N
- ✓ Espectrometro de masas Agilent MSD-5973
- ✓ Columna: DB-1MS de 30 m de longitud x 0,25 mm de DI. 0,25 micrones.
- ✓ Gas portador: Helio
- ✓ Patrón accustandard M-505R-2
- ✓

#### **3.5.1 Condiciones Cromatográficas empleadas**

Para cumplir con el tercer objetivo propuesto de la investigación, en el cual se debía establecer las condiciones cromatográficas empleadas, para separar e identificar los plaguicidas organoclorados, se empleó una matriz de selección, ya que existen

diversos métodos de cromatográficos que son empleados con éste mismo propósito. Esta matriz se realizó comparando los métodos propuestos por la bibliografía, el método EPA 505, Agilent para plaguicidas organoclorados y el desarrollado en este trabajo, en LABSAI.

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

Escala empleada para evaluar el factor de ponderación<sup>26</sup>:

10: Más importante

5: Importante

1/5: Menos importante

1: Igual

1/10: Mucho menos importante.

Tabla 11. Comparación de los criterios en la matriz de pares

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

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

Tabla 12. Comparación de las opciones de acuerdo al criterio resolución cromatografica.

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

Tabla 13. Comparación de las opciones de acuerdo al criterio señal/ruido

	M5	A	L	Suma	Peso de la
--	----	---	---	------	------------

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

Tabla 14. Comparación de las opciones de acuerdo al criterio tiempo de corrida

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

Tabla 15. Matriz final en la que se concluye la selección del método de cromatografico

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

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

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

### **3.5.1 Desarrollo del método cromatográfico**

Para establecer las condiciones cromatográficas óptimas para la separación de los analitos que se estudiaron, se partió de métodos cromatográficos empleados en estudios anteriores reportados en la bibliografía. En el 2008, Usma J., Villegas C., Arrubla J.<sup>31</sup> Evaluaron el grado de contaminación por pesticidas organoclorados del río Otún mediante cromatografía de gases acoplado a un espectrómetro de masas con las características y accesorios similares a los encontrados en LABSAI. En las primeras pruebas realizadas se logró la identificación cromatográfica de tres plaguicidas, la atrazina, simazina y alacloro haciendo uso de la librería NIST Chemstation Library 2.d Total Ion Current TIC.

Cabe destacar que el patrón de referencia con el cual se trabajó, fue diseñado por el fabricante para ser analizado por micro-extracción y un detector de captura de electrones, el cual es específico para la identificación de compuestos halogenados. Sin embargo se pudieron detectar empleando el espectrómetro de masa, la atrazina, simazina y alaclor, los cuales se encuentran en una concentración significativa en dicho patrón.

Con el propósito de disminuir la abundancia en la señal de la línea base, lo cual permite observar las señales de analitos a bajas concentraciones se le realizó mantenimiento al equipo, el cual constó de:

- Cambio el liner en el puerto de inyección.
- Cambio de las férulas de vespel-grafito en las conexiones de la columna y se apretaron las nueces de conexión de la misma para asegurar que no haya pérdidas de presión y se mantenga estable la presión del gas de arrastre.

Adicionalmente, se realizaron modificaciones en la presión del gas de arrastre y se variaron las temperaturas en el horno para obtener una mejor separación, sin embargo, no se obtuvieron resultados eficientes para la cuantificación de la atrazina y la simazina por lo cual se hizo una revisión bibliográfica de las especificaciones del patrón de referencia. Éste fue elaborado para ser analizado por el método 505 de la Environmental Protection Agency (EPA)<sup>25</sup>, en dicho método se recomienda trabajar con 4 patrones de diferentes grupos de pesticidas entre los cuales se encuentra el patrón utilizado en la investigación (M-505-2R).

A pesar de que las dimensiones de la columna no son las mismas a las de la columna empleada en el método 505<sup>25</sup>, luego de una ardua jornada de modificación de las condiciones Cromatográficas y constantes inyecciones se logró establecer el método cromatográfico de manera de lograr una buena separación entre la atrazina y la simazina, alcanzando una definición de picos analíticamente aceptables para su cuantificación. Cabe destacar que inicialmente se empleó una columna DB-5MS cuya composición es 5% dimetil 95% difenilpolisiloxano, la cual no arrojó resultados satisfactorios, ya que no se logró una separación entre la simazina y la atrazina que permitiera cuantificarlas, razón por la cual se hizo un cambio a la columna DB1-MS (100% difenilpolisiloxano), con similares dimensiones. Previo a las pruebas de separación se acondicionó la columna cromatográfica, para lo que se dejó la misma durante 24 horas con flujo de gas de arrastre de 1mL/min con una temperatura constante en el horno de 250°C.

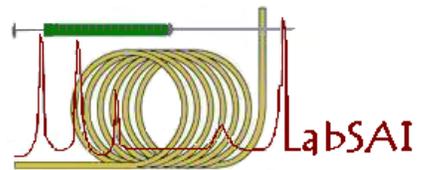
Una vez separados e identificados los analitos en altas concentraciones, se procedió a la inyección de soluciones diluidas de los mismos para determinar el

límite de detección y cuantificación del método, así como el rango de trabajo a emplear.

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

## **CAPITULO 4**

## ANÁLISIS DE RESULTADOS



## **Capítulo 4**

### **Análisis de resultados**

En este capítulo se presentan y se analizan los resultados obtenidos en la validación del procedimiento para la determinación de pesticidas organoclorados en aguas procedentes de pozos profundos adyacentes a zonas agrícolas, en el cual se determinaron la atrazina y la simazina, por ser los herbicidas organoclorados utilizados actualmente por el sector agrícola en nuestro país. Adicionalmente, una vez validado el método, se evaluaron aguas de 5 pozos ubicados en las zonas urbanas en el Municipio Libertador- Edo. Aragua y un pozo ubicado en la zona agrícola de la misma localidad.

#### **4.1.- Análisis Cromatográfico:**

##### **4.1.1 Puesta a punto del método cromatográfico**

###### **4.1.1.1 Mejora en la Resolución Cromatográfica e Implementación de la Técnica de Monitoreo Selectivo de Iones**

En cuanto al análisis cromatográfico se refiere, entre los resultados más relevantes se encuentra la mejora en la resolución cromatográfica, en términos de la separación de la atrazina y la simazina.

Vale la pena resaltar que la atrazina y la simazina son isómeros, lo que significa que sus propiedades fisicoquímicas son semejantes, por lo tanto su separación es compleja. Incluso en el método 505<sup>25</sup> no logran la misma, razón por la cual utilizan varios patrones, en donde uno de ellos sólo contiene la atrazina y otro la simazina, lo que resulta un logro para la investigación.

Se pudo observar que para conseguir una separación efectiva se debe preparar la columna con isotermas antes de llegar al rango de temperatura de ebullición de dichos compuestos que se encuentran entre 210-220 °C, ya que los cambios bruscos de temperatura como los recomendados por la bibliografía el método antes mencionado<sup>25</sup>, en el cual la temperatura del horno empieza a 180°C no logra una separación efectiva y causan alteraciones en la línea base, aumentando la abundancia iónica de la misma. Un cromatograma característico de dicha separación se observa en la figura 6. Para ello se utilizó la técnica de Monitoreo Selectivo de Iones (SIM), en la cual se utilizaron dos iones característicos de cada analito y se configuró el detector para funcionar en modo de impacto de electrones, esta configuración permite ajustar electrónicamente el filamento del detector para que los diferenciales de potencial eléctrico sean lo más cercanos posibles a la relación m/z de los iones que se desean analizar, logrando mayor selectividad que cuando se trabaja con el monitoreo total de iones, básicamente

porque en este último, electrónicamente el espectrómetro debe detectar un rango que va de los 40m/z hasta los 600m/z lo que implica mayor capacidad de monitoreo pero pérdida de selectividad en la cual se utilizaron dos iones característicos de cada analito y se colocaron en el método cromatográfico previo a la inyección, de tal forma que sólo aparecieran en el cromatograma final los analitos en estudio, este detector nos da una confiable información de resultados debido a la información sobre tiempo de retención y espectro de masa, en la figura 3 se puede observar la separación de la atrazina y la simazina utilizando la técnica de monitoreo selectivo de iones. Los espectros de masa correspondientes a la atrazina y la simazina se pueden observar en el apéndice B del trabajo.

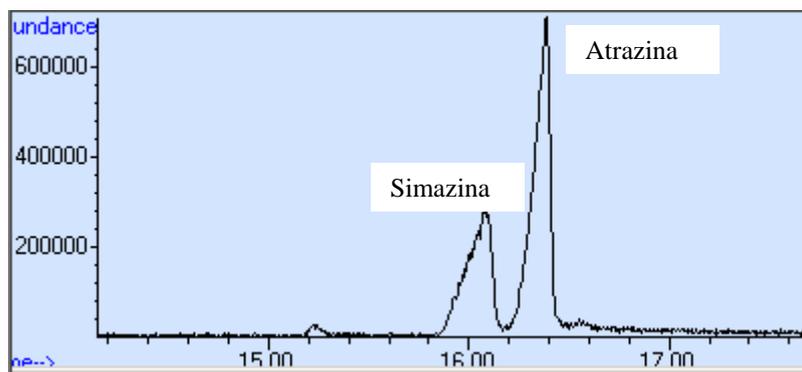


Figura 3. Separación cromatográfica utilizando la técnica de monitoreo selectivo de iones (SIM) de la atrazina y la simazina

En la tabla 16 se pueden observar los iones característicos de cada analito y su tiempo de retención correspondientes a la atrazina y simazina.

Tabla 16: Modo ionización impacto electrónico SIM

Plaguicida	Tiempo de retención (min)	Iones de cuantificación (m/z)
Atrazina	16,397	200,215
Simazina	16,068	44,201

#### 4.2 Análisis de resultados de los parámetros estadísticos evaluados en los métodos.

Como se hizo referencia en el capítulo 1, el Laboratorio busca implementar un procedimiento para la determinación de plaguicidas organoclorados en pozos de agua adyacentes a zonas agrícolas, mediante la validación del método cromatográfico con el propósito de garantizar resultados confiables. Para lograr resultados fiables tal estudio se basó en la determinación de los parámetros de desempeño o figuras de

mérito, que son parte importante de la validación de métodos, entre los cuales se determinaron:

- Intervalo de trabajo.
- Linealidad.
- Límite de detección.
- Límite de cuantificación.
- Exactitud.
- Precisión.
- Sensibilidad.

#### 4.2.1 Intervalo de trabajo

Los valores de concentración reportados en la tabla 17, corresponden a los intervalos de trabajo experimentales del método validado. Los cuales están comprendidos desde un valor cercano al límite de cuantificación hasta el último punto de la función lineal.

Lo antes expuesto indica que se pueden determinar la concentraciones de estos pesticidas organoclorados a niveles de trazas (ppm- $\mu\text{g/mL}$ ), así como también en concentraciones elevadas que superan los límites permisibles por los reglamentos de agua potable a nivel mundial, ya que la atrazina y la simazina no se encuentran reguladas por el decreto N° 36.395 Norma Sanitaria de aguas potables de la República Bolivariana de Venezuela.<sup>3</sup>

La validación del método cromatográfico para la determinación de la atrazina y simazina se realizó entre un rango de concentración 0,050 y 0,250 ppm para ambos analitos, ya que se buscaba abarcar un mayor rango de concentración posible. Cabe destacar que por estudios paralelos a ésta investigación en la cual se analiza la matriz suelo, se estableció un delta de separación de 0,05 para que el rango de trabajo incluyera mayores concentraciones ya que las concentraciones de los analitos en suelos son mayores debido a que el plaguicida se aplica directamente al mismo. Una vez obtenida la variable de respuesta (área del pico), se graficó la curva de calibración y se observó que la linealidad en el estudio de la atrazina no se cumple para una concentración de 0,25 ppm. Posteriormente, se hicieron estudios con concentraciones mayores y se observó que a concentraciones mayores a 0,25 ppm logra cumplir con la linealidad estadística requerida pero en otro nivel, por lo cual se recomienda para trabajos futuros la construcción de una curva de calibración multinivel. Esto se puede observar en las gráficas 4 y 5 respectivamente. Debido a estos resultados se decidió trabajar con la atrazina en un rango lineal de concentración entre 0,050 y 0,200 ppm.

Tabla 17: Intervalos de trabajo para la determinación de Atrazina y Simazina en muestras de agua de pozos adyacente a zonas agrícolas.

Analito	Rango de trabajo concentración (µg/mL)
Atrazina	0,050- 0,200
Simazina	0,050 – 0,250

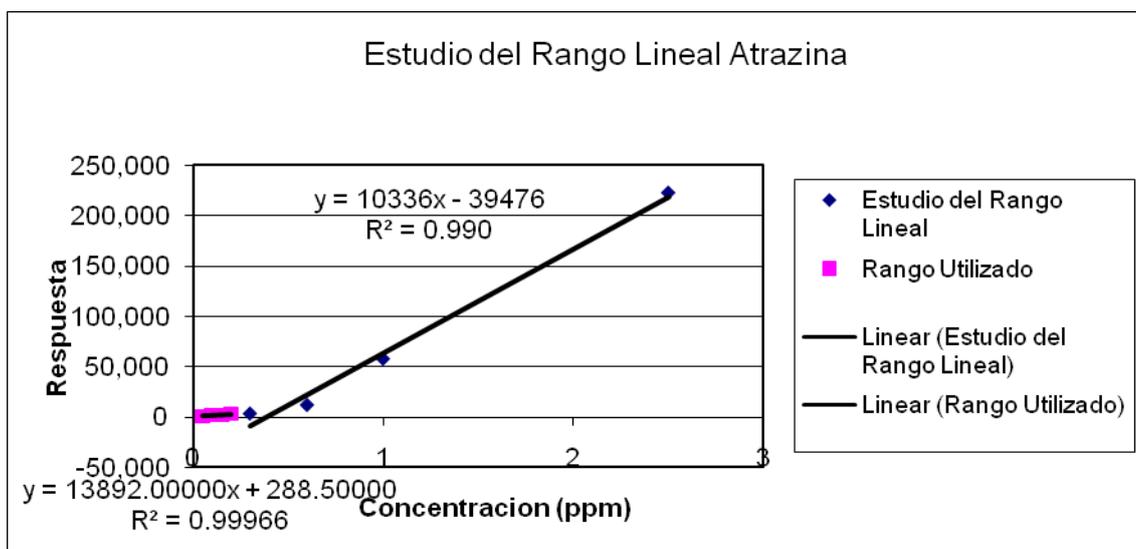


Figura 4. Estudio del comportamiento lineal de la curva de calibración de la atrazina.

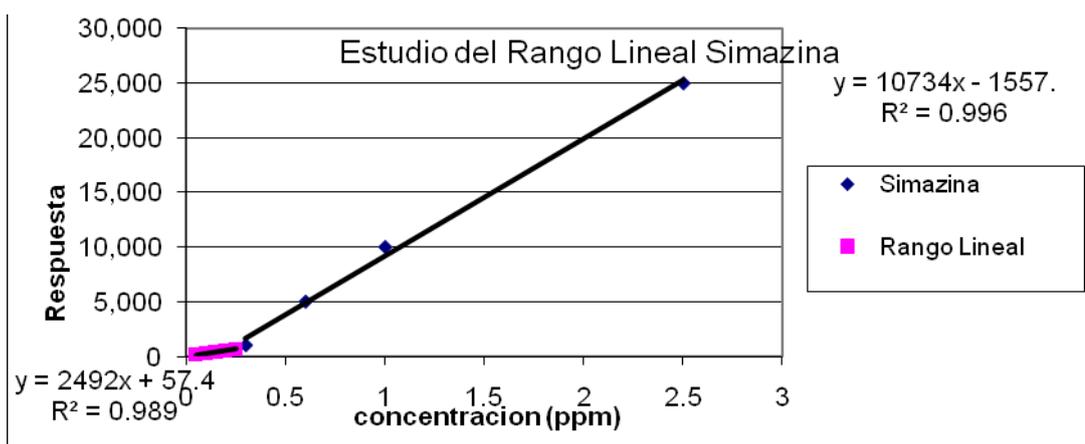


Figura 5. Estudio del rango lineal de la simazina.

#### 4.2.2 Linealidad del método estudiado

Para la determinación de la linealidad, precisión, exactitud e incertidumbre, se realizaron cinco niveles de concentración mas un blanco, tomando en cuenta los requisitos establecidos en el protocolo de la EURACHEM. Esto es, con cinco réplicas en cinco días diferentes, donde la variable de respuesta fue el área del pico cromatográfico obtenido en las corridas, con el objetivo de evaluar la linealidad del método. Para saber como se ajustan los puntos experimentales, a una función lineal, fue necesario calcular el coeficiente de correlación  $R^2$  para los resultados promedio de los patrones encontrados en condiciones de precisión intermedia.

Tabla 18. Coeficientes de correlación  $R^2$  para los resultados experimentales obtenidos del método estudiado.

<b>Análito</b>	<b>Coeficiente de correlación (<math>r^2</math>)</b>	<b>t experimental</b>	<b>t crítica*</b>
<b>Atrazina</b>	0,999	93,46	3,18
<b>Simazina</b>	0,989	47,97	3,18

\* Los grados de libertad a un 95% de confianza para el contraste de significancia son 3.<sup>21</sup>

El coeficiente de correlación de Pearson, es un índice que mide el grado de variación entre distintas variables relacionadas linealmente. En la tabla 3 se pueden observar los coeficientes de correlación correspondientes a las curvas de calibración de la atrazina y la simazina, los cuales se aproximan a 1, Esto quiere decir que la correlación entre las dos variables es prácticamente “perfecta positiva”, es decir, a medida que aumenta una variable aumenta la otra.<sup>26</sup>

Una vez calculado el valor del coeficiente de correlación, se necesitaba determinar si tal valor obtenido muestra que las variables están realmente relacionadas. Un coeficiente de correlación se dice que es significativo si se puede afirmar, con una cierta probabilidad, que es diferente de cero<sup>24</sup>.

Es por ello que se plantean dos hipótesis posibles:

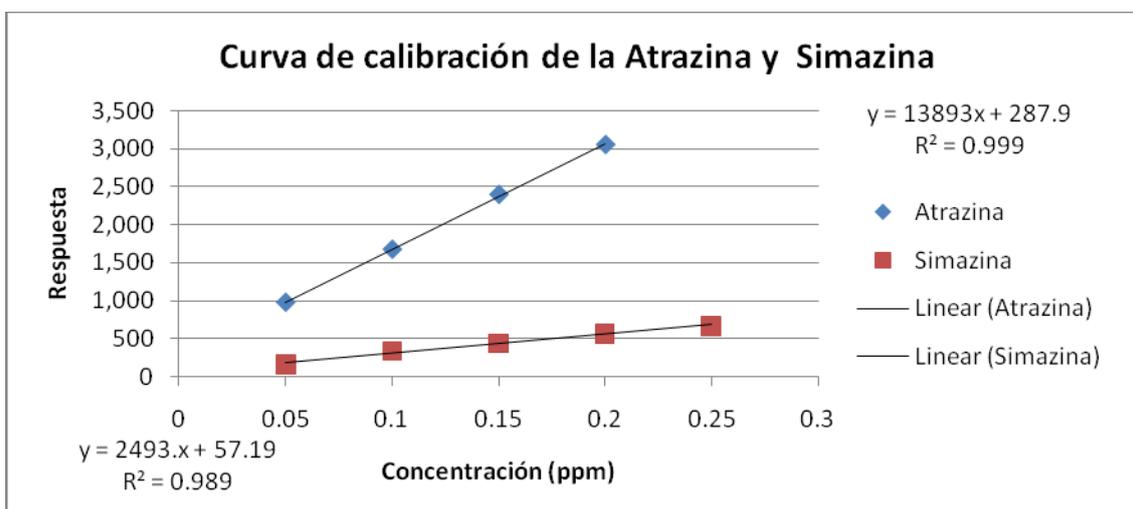
$H_0$ : El coeficiente de correlación obtenido procede de una población cuya correlación es cero.

$H_1$ : El coeficiente de correlación obtenido procede de una población cuyo coeficiente de correlación es distinto de cero.

Al aplicar la prueba de contraste (Ver ecuación 4 en el apéndice A) con la hipótesis nula, calculando el estadístico  $t$  a los  $r^2$  obtenidos en las curvas de calibración de la atrazina y la simazina, se observa que el valor de  $t_{experimental}$  es mayor que el valor de  $t$

*crítica*, para los dos casos, y la hipótesis nula es rechazada. Por lo tanto existe una correlación entre los datos, asegurando la linealidad del método tanto para la atrazina como para la simazina.

A continuación, se muestra en la figura 6, la curva de calibración promedio para la atrazina y la simazina con su respectiva ecuación de la recta.



**Figura 6.** Curva de calibración promedio para la determinación de atrazina y simazina empleando cromatografía de gases/Espectrometría de masas.

Para la determinación de plaguicidas organoclorados en muestras de agua, se realizaron 5 patrones más un blanco. La figura 6 muestra los resultados de los patrones de atrazina y simazina promedio, de 5 días de inyección utilizando 5 réplicas, mediante el monitoreo selectivo de iones mediante la técnica de cromatografía de gases acoplado a un espectrómetro de masas. Los puntos reflejados corresponden a cada nivel de concentración, los cuales se ajustan perfectamente a una línea recta, demostrando una buena correlación entre variables en el método aplicado.

#### 4.2.3 Límite de detección y cuantificación.

Para estimar los límites de detección y cuantificación, se empleó el enfoque de la IUPAC para métodos cromatográficos<sup>27</sup>, se realizaron los cálculos en función del error del intercepto y la pendiente de cada curva de calibración, estos fueron evaluados por medio de la ecuación 1 y 2 respectivamente, mostrados en el capítulo 2. En la tabla 19, se reflejan los resultados correspondientes.

Tabla 19. Límite de detección y cuantificación empleados en la validación de la atrazina y la simazina.

<b>Analito</b>	<b>Unidades</b>	<b>Límite de detección (LD)</b>	<b>Límite de cuantificación (LQ)</b>
Atrazina	ppm	0,005	0,020
Simazina	ppm	0,010	0,030

El límite de detección es un parámetro importante en los métodos analíticos, sobretodo cuando se miden analitos que deben encontrarse a nivel de concentraciones de trazas. Comparando los resultados obtenidos con los valores reportados por el método 505 de la Environmental Protection Agency<sup>24</sup>, los cuales reportan un límite de detección para la atrazina 0,002ppm y para la simazina 0,007ppm y en donde utilizan un detector de captura de electrones, el cual es utilizado específicamente para la determinación de halógenos, se puede concluir que es un método empleado en ésta investigación es eficiente para la determinación de trazas de atrazina y simazina. Esto resulta de gran importancia, ya que estos compuestos son los utilizados actualmente en la región agrícola del país como herbicidas. Para corroborar esta información se realizó visitas a fincas en el municipio Libertador en Palo Negro-Edo. Aragua, ya que actualmente solo existe una empresa nacional que administra los pesticidas utilizados por el sector agrícola.

Para la determinación del límite de cuantificación, se utilizó la ecuación 2,( ver el capítulo 2), a partir de los valores obtenidos se estableció el rango de trabajo, para que este se encontrara dentro de la capacidad de detección del método y equipo empleados.

#### 4.2.4 **Análisis de exactitud**

La exactitud, puede determinarse a través de la recuperación y la precisión, sin embargo, es solo un parámetro cualitativo, cuya información, transmite una idea general de la eficacia del método. Para estimar la exactitud del método estudiado se empleo el porcentaje de recuperación del analito, para lo cual se agregó 1,00 ml de patrón concentrado en 1 litro de agua cruda, obtenida del agua que surte el Departamento de química de FACYT. A esta muestra se le realizó todo el proceso de extracción y concentración similar al de las muestras reales estudiadas, encontrándose un porcentaje de recuperación de 80(±1)%v/v para la atrazina y la simasina. El resultado obtenido se determinó empleando la ecuación 3 mostrada en el capítulo 2, el cual comparado con el obtenido por la bibliografía empleando este mismo

método de extracción es muy parecido estadísticamente<sup>28</sup>, ya que se puede considerar un buen porcentaje de recuperación entre el 80-100 %, de acuerdo a los trabajos de investigación realizados por el Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla (CSIC)<sup>29</sup>.

#### 4.2.5 Precisión del método

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

La International Conference of Harmonization (ICH) establece dos formas de investigar la repetitividad<sup>30</sup>:

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

También, establece que debe reportarse la desviación estándar y el coeficiente de variación (desviación estándar relativa).

Basados en los criterios estadísticos, los resultados obtenidos en el estudio se muestran en la tabla 20.

Tabla 20. Resultados de la repetitividad del método validado.

Analito	Repetibilidad a diferentes concentraciones(ppm)						
	Concentración (ppm)	Repuesta Día 1	Repuesta Día 2	Repuesta Día 3	Promedio	Desviación Estándar (Sr)	Desviación estándar relativa (%RSD)
Atrazina	0,050	974	972	984	977	21	2
	0,100	1664	1716	1644	1675	19	1
	0,150	2359	2330	2498	2396	45	2
	0,200	2989	2980	3186	3052	58	2
Simazina	0,050	150	148	165	157	25	3
	0,100	336	329	311	335	27	2
	0,150	456	416	437	436	23	1
	0,200	513	587	583	561	41	2
	0,250	636	697	668	667	38	2

De acuerdo con estudios realizados para determinar la repetibilidad<sup>27</sup> para muestras con un rango de concentración entre 0,01 y 1,00 ppm la desviación estándar relativa es aceptable para la repetibilidad entre 1,0-2,5%. Lo cual indica que el método aplicado para la determinación de atrazina y simazina, empleando cromatografía de gases acoplado a un espectrómetro de masas, cumple con el parámetro de repetibilidad. A pesar de que en la concentración más baja de la simazina se nota que el valor de %RSD es un poco elevado, éste comportamiento se considera aceptable, ya que existe tomando en cuenta la teoría de Horwitz quien demostró que la desviación estándar relativa de un método varía con la concentración.<sup>22</sup> Dicha teoría denota que el coeficiente de variación aumenta con la disminución de la concentración en que se encuentre el analito en la muestra, debido a que el método es menos sensible a la simazina, que a la atrazina refleja un error mayor cuando esta se encuentra en concentraciones muy bajas, sin embargo no indica que el método no pueda detectarla y cuantificarla adecuadamente.

#### **4.2.6 Sensibilidad**

Este parámetro, se puede definir como el cambio en la respuesta del instrumento correspondiente a la variación en la concentración del analito. Teóricamente sabemos que el método más sensible es aquel cuya curva de calibrado tenga la mayor valor de la pendiente. Para el caso en estudio sería aplicable, debido a que la señal es la misma. Considerando lo descrito anteriormente, se puede concluir que, la sensibilidad del método para la determinación de atrazina es mayor que para la determinación de simazina. Sin embargo para ambos analitos se puede decir que el método es bastante sensible y confiable.

#### **4.3 Medición de muestras reales**

Conjunto con la implementación del método para la determinación de plaguicidas organoclorados y la validación del mismo para la determinación de atrazina y simazina se realizó un muestreo en el cual se seleccionaron con ayuda del Lic. Juan Ustariz, jefe del Laboratorio de Sustancias Peligrosas, perteneciente a la Dirección de Salud Ambiental del Ministerio de Salud, división Estado Aragua, cinco pozos de agua que surte a gran parte de la población del municipio Libertador de Palo Negro. Adicionalmente se tomó una muestra de agua de un pozo perteneciente a una finca con sembradíos de cambur y que utilizan la atrazina como herbicida.

Dichas muestras se conservaron con ácido ascórbico 0,01 M y se refrigeraron por un lapso menor de 12 horas. Luego se les realizó el procedimiento explicado en el capítulo 3 y se midieron sus extractos utilizando la técnica de cromatografía de gases/espectrometría de masas por corriente total de iones y por monitoreo selectivo de iones, aproximadamente una semana después de haber sido extraídos, sin embargo se encontraban refrigerados a una temperatura de 4°C para su conservación. No se detectaron trazas de simazina y atrazina en las muestras de pozos de agua perteneciente a las zonas urbanas, los cromatogramas característicos se muestran en el apéndice B de este trabajo.

Sin embargo, en el análisis realizado a la muestra de la finca, denominada pozo 6 se encontraron trazas de simazina y atrazina en una concentración que puede ser cuantificado con la curva de calibración previamente validada. Los resultados obtenidos se pueden ver en la tabla 21, además el cromatograma y espectro característico se puede observar en el apéndice B de este trabajo.

Tabla 21. Resultados obtenidos en la evaluación del pozo 6

Analito	Área del pico(m <sup>2</sup> )	Concentración (ppm)
Atrazina	1019	0,06
Simazina	153	0,05

Los resultados obtenidos demuestran que el método es eficiente para la determinación de atrazina y simazina en muestras reales, sin embargo, surge una gran preocupación debido a que estos compuestos que no se encuentran regulados en la gaceta oficial N° 36.395 y que además son los compuestos a los que tienen acceso los agricultores de nuestro país. Debido a que no existe un conocimiento real de las especies que manipulan los trabajadores y personas del área, por comodidad o desconocimiento no toman las medidas de seguridad para esparcir estos compuestos e ingieren el agua de estos pozos como agua potable a pesar de que se les recomienda que no lo hagan. Este tipo de análisis no es sólo importante a nivel analítico sino que también es de interés social, ya que gracias a las herramientas que como químicos manejamos podemos alertar y colaborar en la concientización de las personas, alcaldías, ministerios y otros entes que puedan ayudar a mejorar la calidad de vida de trabajadores y familias cercanas a los sectores agrícolas del país. De acuerdo a Límites regulatorios para residuos de pesticidas en agua (reporte técnico IUPAC)<sup>31</sup>, los valores de guía basados en la salud para residuos de pesticidas en aguas de consumo humano, en las establecen un valor de 0,002 ppm de límite de detección.

Adicionalmente, dicho reporte hace un recopilado de los límites regulatorios de residuos de pesticidas en varios países, los cuales se muestran en la tabla 22.

Como se puede observar en la tabla 22, los valores de concentración obtenidos en las muestras del pozo 6 superan los límites de concentración permisibles en países desarrollados con Estados Unidos, entre otros. Estos resultados nos indican que existe una problemática que debe ser tomada en cuenta

Tabla 22. Comparación de estándares y valores de guía para residuos de pesticidas en agua potable.<sup>31</sup>

Plaguicida	WHO GV (ppm)	USA MCL (ppm)	USA MCLG (ppm)	NZ MAV (PPM)	Aust GV (ppm)	Aust HV (ppm)	Canadá MAC (PPM)
Atrazina	0,002	0,003	0,003	0,002P	0,0005	0,02	0,005 <sup>b</sup>
Simazina	0,002	0,004	0,004	0,002P	0,0005	0,02	0,01

Abreviaciones:

GV: Valor guía gobierno australiano; Aust: Australia

MCL: nivel máximo de contaminante (USA). USA: Estados Unidos de América.

MCLG: meta del nivel máximo de contaminante (USA)

HV: Valor límite aconsejable para la salud

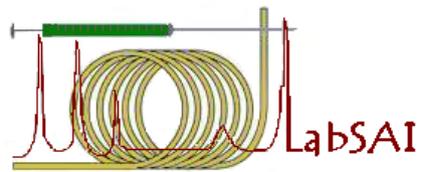
P: provisional MAV; MAV: valor máximo aceptable(NZ).; NZ: Nueva Zelanda

I: ínterin MAC; MAC: concentración máxima aceptable Canadá.

<sup>b</sup>Atrazina + metabolitos

# **CAPITULO 5**

## **CONCLUSIONES**



## 5.1 CONCLUSIONES

- El Espectrómetro de masas puede detectar plaguicidas organoclorados a nivel de trazas con un límite de detección para la atrazina de 0,005 ppm y para la simazina de 0,01 ppm.
- El método cromatográfico validado es lineal y preciso en un rango de trabajo para la atrazina de 0,05-0,20 ppm y para la simazina entre 0,05-0,025 ppm.
- El método de extracción empleado para el tratamiento de muestras reales es muy eficaz para la obtención de plaguicidas organoclorados con un 80% de porcentaje de recuperación para la atrazina y la simazina.
- Los pozos de agua que surten a la mayor parte de la población del Municipio Libertador- Estado Aragua necesitan de un plan de mantenimiento constante ya que no cuentan con la infraestructura adecuada para el suministro de agua blanca a la población.
- La atrazina y simazina son plaguicidas organoclorados que son compuestos orgánicos persistentes cuyo uso indiscriminado y trazas a nivel ambiental debe ser monitoreado constantemente.
- El procedimiento implementado para la determinación de plaguicidas organoclorados en agua es eficiente para el procesamiento de muestras reales.

## 5.2 RECOMENDACIONES

- Debe hacerse un muestreo entre las fincas localizadas en el sector agrícola del Municipio Libertador-Estado Aragua para determinar la concentración de atrazina y simazina en los pozos de agua de la zona.
- Establecer relaciones con la Alcaldía de Palo Negro para alertar y concientizar a la población sobre los daños que ocasiona la ingesta de plaguicidas organoclorados.
- Realizar un estudio de pesticidas organofosforados, quienes a pesar de degradarse mucho más rápido que los organoclorados, también son tóxicos en grandes concentraciones y actualmente estos son los que suministran las empresas de productos agrícolas.

## APÉNDICE A

### Preparación de las botellas utilizadas para el muestreo



Figura 7. Botellas empleadas para el muestreo

### Muestreo realizado para la recolección de muestras reales en la determinación de plaguicidas organoclorados en aguas.



Figura 8: Pozo 1 el cual se encuentra cerrado

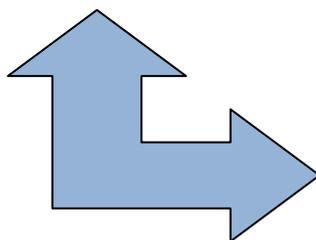


Figura 9. Muestreo en una casa ubicada a 10 metros del pozo



Figura 10. Recolección de muestra en el pozo 2



Figura 11. Estado en el que se encuentra el pozo 2.



Figura 12. Representante de la comunidad firmando el acta de muestreo del pozo 2



Figura 13. Recolección de muestra de pozo 3 en un Mercal ubicado a 10 metros del pozo que se encontraba cerrado.



Figura 14. Recolección de muestra del pozo 4



Figura 15. Firma del acta de muestreo por parte del encargado del lugar, el representante del Ministerio de la Salud y la Alcaldía de Palo Negro.

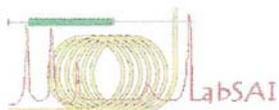


Figura 16. Pozo 6 localizado en alrededor de los cultivos de cambur



Figura 17. Recolección de muestra del pozo 6

## Actas de muestreo



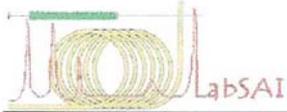
Laboratorio de Servicios  
Analíticos y de Investigación, UC.

### FORMATO DE RECOLECCION DE MUESTRAS.

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

Punto	Características	Coordenadas	Punto	Características	Coordenadas
1	Fria Hernández	N10° 09' 31"			20m del
	calle 10 casas	W076° 32'		Nicolasa H	rio Aragua
	frente al Pozo	140'		12402 044	
	Pozo Urb	Elev 433m			
	San Antonio				

Observaciones: Telefono Fria Hernández:  
04169291113



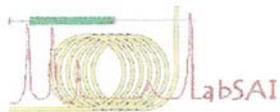
Laboratorio de Servicios  
Analíticos y de Investigación, UC.

FORMATO DE RECOLECCION DE MUESTRAS.

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

Punto	Características	Coordenadas	Punto	Características	Coordenadas
<u>1</u>	<u>Pozo Santa Elena Urb.</u>	<u>10°09'59" N</u>	<u>Pozo de</u>	<u>Custogestión</u>	
	<u>Calle B</u>	<u>8445m</u>			

Observaciones: Wilmer Uilena 0426-6315754 (COD. DE DEPORTE).  
Jairo Diaz 0412-2477628 C.C. 2992 A Vcl

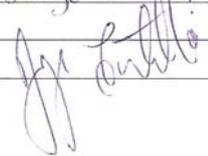


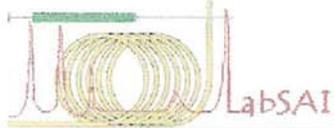
Laboratorio de Servicios  
Analíticos y de Investigación, UC.

FORMATO DE RECOLECCION DE MUESTRAS.

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

Punto	Características	Coordenadas	Punto	Características	Coordenadas
1	Hercalia	N10°09'50.2"			
	Carrizaleta	W067°32.915'			
		Alt: 429m			

Observaciones: Jorge Castillo CI: 114717419 cd. 0414-0706387  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  




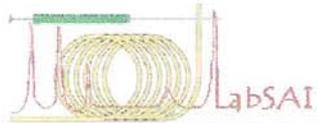
Laboratorio de Servicios  
Analíticos y de Investigación, UC.

FORMATO DE RECOLECCION DE MUESTRAS.

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

Punto	Características	Coordenadas	Punto	Características	Coordenadas
1	Agropecuaria los Dos Sector las Vegas	N 10° 9' 09" A W 67° 32' 9" W		Agua de limpieza de la agropecuaria.	

Observaciones: \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_



Laboratorio de Servicios  
Analíticos y de Investigación, UC.

FORMATO DE RECOLECCION DE MUESTRAS.

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

Punto	Características	Coordenadas	Punto	Características	Coordenadas
	Pozo los Hornos	N10°09.585'			
		W067°33.271'			
		Elev 448m			
	160 m				
	Rio a 25m				
	Aragua				

Observaciones: Omaira Navas C.I. 15.275.123  
Comisionada Juvica de Asuntos Ambientales, Alcaldía Libertador.  
0412 8908111

JUAN VZTARIZ LAB. Químico MPP Salud  
3284478. Tlf. 0424. 4430012

## Extracción y concentración de las muestras



Figura 18. Extracción líquido-líquido de la muestra

### EVAPORATIVE CONCENTRATORS

#### Kuderna-Danish

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

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

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

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

#### With Hooks and Springs

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

#### Component Parts

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

#### With Polyacetal Clamp

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

Figura 19. Kuderna Danish



Figura 20. Montaje de concentración empleando la Kuderna-Danish

## APENDICE B

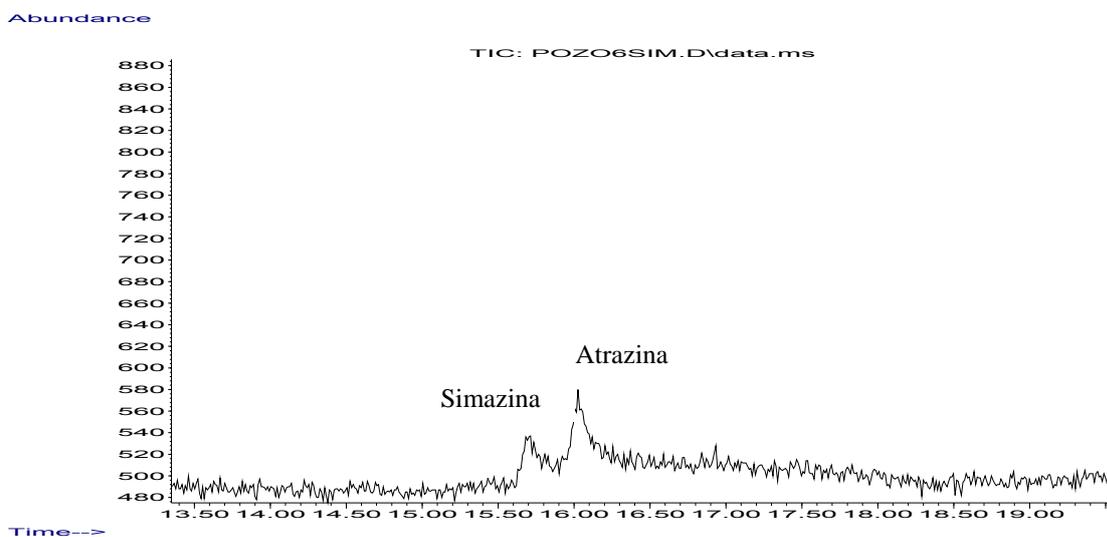


Figura 21 .Cromatograma obtenido en la evaluación del pozo 6

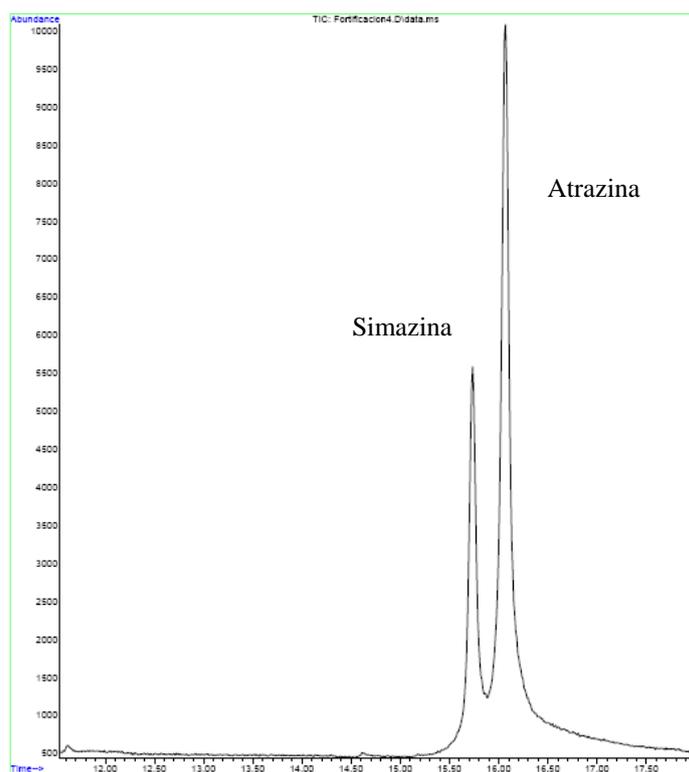


Figura 22. Cromatograma obtenido previo a la separación de la atrazina y la simazina.

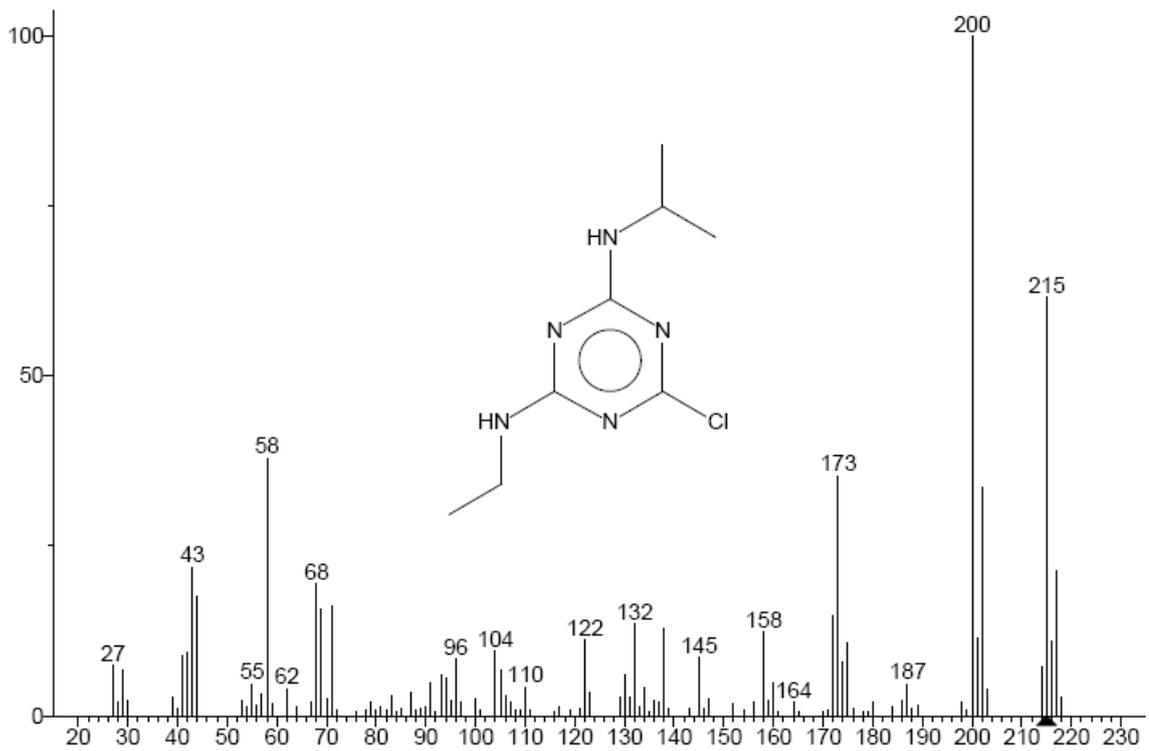


Figura 23. Espectro de masas correspondiente a la atrazina

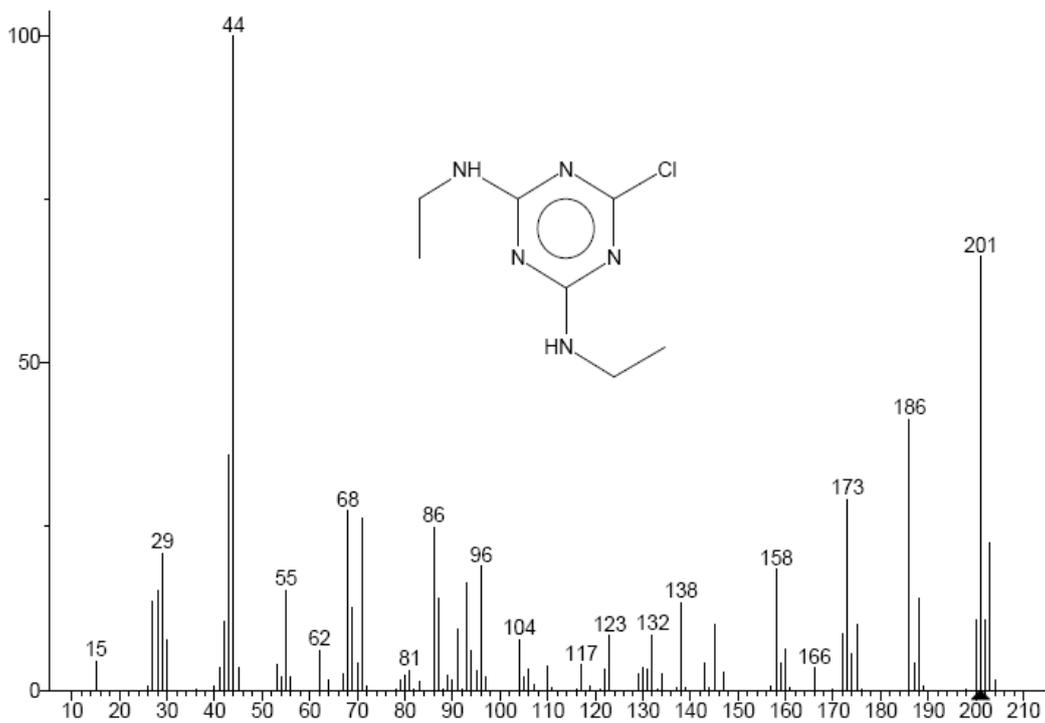


Figura 24. Espectro de masas correspondiente a la simazina

---

## BIBLIOGRAFÍA

- <sup>1</sup> Betancourt, P. Pierre,F. 2007. Residuos de plaguicidas organoclorados y organofosforados en el cultivo de cebolla en la depresión de Quibor, Venezuela. Bioagro. Volumen N° 19(2) 69-78.
- <sup>2</sup> Ware, G. Whitacere, D. 2004. An introduction to insecticide. The pesticide book. Meister Publication. Willoughby, Ohio.
- <sup>3</sup> Gaceta oficial decreto No. 36395 NORMAS SANITARIAS DE CALIDAD DEL AGUA POTABLE. Venezuela. 1998.
- <sup>4</sup> Alder,L. Greulich,K. Gunther,K. Vieth,B. 2006. Residue analysis of 500 High priority pesticides: Better by GC-MS or LC-MS/MS? Wiley Interscience. Mass Spectrometry Reviews, 25,838-865.
- <sup>5</sup> CONVENIO DE ESTOCOLMO SOBRE CONTAMINANTES ORGÁNICOS PERSISTENTES
- <sup>6</sup> Allsopp M. Erry,B. 2000. Compuestos orgánicos persistentes en Latinoamérica. Laboratorios de investigación de Greenpeace. Universidad de Exteter, Reino Unido.
- <sup>7</sup> Salvarrey, A. Gristo P. 2005. Capacidades y casos relevantes en la gestión de plaguicidas obsoletos y sitios contaminados en América Latina y el Caribe. Centro Coordinador del Convenio de Brasilea para América Latina y el Caribe. Uruguay.
- <sup>8</sup> Gaceta oficial decreto No. 883 NORMAS PARA LA CLASIFICACION Y EL CONTROL DE CALIDAD DE LOS CUERPOS DE AGUAS VERTIDOS O EFLUENTES LIQUIDOS. Venezuela. 1995.
- <sup>9</sup> Planas Carles, Puig Alejandra, rivera Josep y Caizach Josep. Análisis de pesticidas y metabolitos en aguas superficiales españolas mediante el uso de cromatografía de gases/espectrometría de masa con una extracción previa en fase sólido

---

<sup>10</sup> Carlos Medina, María Allara, Pedro Izquierdo, Edgar Sánchez, María Y. Piñero y Gabriel Torres. 2009. Residuos de insecticidas organoclorados en yogurt firme de tres marcas comerciales, elaborado en Venezuela. Universidad del Zulia. Maracaibo, estado Zulia, Venezuela.

<sup>11</sup> Ricca A.O., Irurzun M.E., Martínez M.J. y Sanow C. 2005. Desarrollo y validación de metodología multiresidual para la detección de pesticidas organoclorados, organofosforados y piretoides en aceite de soja. Protección vegetal. 434-437.

<sup>12</sup> Bolaños, Moreno, Shtereva, Frenich y Martínez Vidal. 2007. Validación y desarrollo de un método multiresidual para el análisis de 151 residuos de pesticidas en la fresa mediante la aplicación de cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas con triple cuádruplo. RCM. Wiley Interscience. 21:2282-2294.

<sup>13</sup> Tadeo, Jose L. 2008. Analysis of pesticides in food and environmental samples. Taylor and Francis Group, LLC. Estados Unidos. páginas 3-27

<sup>14</sup> Vencill, W.K. 2002. WSSA herbicide handbook (8th edition). Weed Science Society of America. Lawrence, KS, USA.

<sup>15</sup> Environmental Protection Agency. 2006. Triazine Cumulative Risk Assessment and Atrazine, Simazine, and Propazine Decisions.

<sup>16</sup> Environmental Protection Agency. EPA 3510C

<sup>17</sup> ASTM 3337 Practical Standard for Sampling Closed Water

<sup>18</sup> Norma venezolana COVENIN 2552:1999 OIML V 2:1993. Fondonorma

<sup>19</sup> AWWA-APHA-WPCF. 1997. "Métodos normalizados para el análisis de aguas potables y residuales". Madrid. Edición 17. 6410-B

<sup>20</sup> Guía de laboratorio para validación de métodos y tópicos relacionados. EURACHEM. Centro nacional de metrología. CENAM- MEXICO. Primera edición en inglés 1998.

<sup>21</sup> Miller J, Miller J. 2002. Estadística y quimiometría para química analítica. Cuarta Edición. Editorial Pearson Prentice Hall. Madrid

- 
- <sup>22</sup> Sifredo Ruiz, Luis Aviata.2001. Incertidumbre de la Medición: Teoría y Práctica. Primera edición. ConsultoresC.A. Maracay. Aragua.
- <sup>23</sup> Soboleva E. Ahad K. Ambrus A.2004. Aplicabilidad de algunos criterios de MS para la confirmación de residuos de plaguicidas. Analyst, 129, 1123-1129.
- <sup>24</sup> IESA. 2009. Herramientas de calidad. Capitulo 6 .Matriz de Selección.
- <sup>25</sup> Munch J. W. 1995. Método 505. ANALYSIS OF ORGANOHALIDE PESTICIDES AND COMMERCIAL POLYCHLORINATED BIPHENYL (PCB) PRODUCTS IN WATER BY MICROEXTRACTION AND GAS CHROMATOGRAPHY.
- <sup>26</sup> Cohen, J., & Cohen, P. 1983. Applied multiple regression/correlation analysis for the behavioral sciences. Hillsdale, NJ: Lawrence Erlbaum Associates, Inc.
- <sup>27</sup> Riley, C.Rosanske, T. 1996. Development and validation of analytical methods. Elsevier Science, 57-59
- <sup>28</sup> Usma J.,Villegas C., Arrubla J. 2008. EVALUACIÓN DEL GRADO DE CONTAMINACIÓN POR PESTICIDAS ORGANOCORADOS DEL RÍO OTÚN, MEDIANTE GC-MS. Scientia et Technica Año XIV, No 40 .Universidad Tecnológica de Pereira. ISSN 0122- 1701
- <sup>29</sup> Villaverde J. 2008. Priority pesticides and their degradation products in river sediments from Portugal.Science Direct. (390):507-51
- <sup>30</sup> Chan C., Lam H. 2004. Analytical method validation and instrument performance verification. Wiley-Interscience. Páginas 17-20
- <sup>31</sup> Hamilton D.J., Ambrus A., R. M. Dieterle R.M. 2003. REGULATORY LIMITS FOR PESTICIDE RESIDUES IN WATER (IUPAC Technical Report). Pure Appl. Chem., Vol. 75, No. 8, pp. 1123–1155