

UNIVERSIDAD DE PANAMÁ
VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO
PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS QUÍMICAS

**DESARROLLO DE UN MÉTODO VOLTAMÉTRICO PARA LA
DETERMINACIÓN DE DIAZINON EN SUELOS**

POR

IRENE ELIZABETH CASTILLERO ROSALES

TESIS PRESENTADA COMO REQUISITO PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS QUÍMICAS CON ESPECIALIZACIÓN EN QUÍMICA
ANALÍTICA

PANAMÁ, REPÚBLICA DE PANAMÁ

2018

DEDICATORIA

Con amor a F.A.B. In Lak'ech Ala K'in

AGRADECIMIENTO

En primer lugar, quiero agradecer a Dios, por haberme permitido llegar hasta este punto y haberme dado salud para lograr mis objetivos.

Quiero agradecer a la Dra. Denis Vega por sus atinados consejos, su orientación y su guía como tutora de mi tesis.

Quiero expresar mi infinito agradecimiento a la MSc. Brenda Checa y a todo su personal en la sección de Sanidad Vegetal del MIDA- río Tapia, quienes estuvieron a disposición en todo momento para apoyarme en el desarrollo de esta tesis. Igualmente, a los profesores Gerardo Cáceres, Carlos Ríos y Abdiel Aponte por brindarme en todo momento su apoyo y sus consejos a lo largo de estos años, les estoy eternamente agradecida.

De manera muy especial quiero agradecer a mi compañero de vida por creer en mí siempre, por alentarme a perseguir mis sueños, por su infinita paciencia y su sincera amistad durante todo este tiempo.

Finalmente quiero agradecer el apoyo de mis padres, hermanos y a toda mi familia, así como los amigos que han estado siempre para mí.

INDICE GENERAL

	Página
DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTO	iii
ÍNDICE GENERAL	iv
ÍNDICE DE TABLAS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
INDICE DE GRÁFICOS	xi
GLOSARIO	xiii
RESUMEN	1
SUMMARY	2
I. INTRODUCCIÓN	
1.1.Introducción	3
1.2. Antecedentes	4
1.3. Problemática del análisis de Diazinon en suelos	6
1.4. Objetivos	8
II. MARCO TEÓRICO	
2.1 Plaguicidas	10
2.1.1. Diazinon: Características Fisicoquímicas	14
2.1.2. Toxicología del Diazinon	17
2.2. Técnicas Electroanalíticas	19

2.2.1. Voltametría	20
2.2.2. Voltametría Cíclica	21
2.2.3. Voltametría de Pulso	22
2.2.4. Voltametría de Onda Cuadrada	24
2.2.5. Voltametría de Pulso Diferencial	24
2.2.6. Polarografía de Pulso Diferencial	25
2.3. Electroodos	26
III. METODOLOGÍA	
3.1. Muestreo	29
3.2 Extracción de plaguicidas en suelos	33
3.2.1. Reactivos y Disolventes	34
3.2.2. Materiales y Equipos	34
3.2.3. Procedimiento	35
3.3. Análisis por cromatografía de gases	38
3.4. Estudio electroquímico	41
3.5. Validación del método	44
3.5.1. Cromatografía de gases	44
3.5.1. Análisis electroquímico	44
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
4.1. Estudio Cromatográfico	45
4.1.1. Estabilidad del Diazinon	45
4.1.2. Especificidad/Selectividad	47

4.1.3. Curva de Calibración, Límite de Detección y Límite de Cuantificación	49
4.1.4. Recuperaciones	57
4.2 Estudio Electroquímico	60
4.2.1. Parámetros para cuantificación de Diazinon	60
4.2.2. Cuantificación electroquímica del Diazinon	65
4.2.3. Estudio de Recuperación	68
4.2.4. Análisis de muestras reales	68
4.3 Discusión de los Resultados	70
V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	
5.1. Conclusiones	74
5.2. Recomendaciones	76
VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77

ÍNDICE DE TABLAS

No. de Tabla	Título	Página
Tabla 1:	Propiedades fisicoquímicas del Diazinon	16
Tabla 2:	Mezcla de plaguicidas para preparar curva de calibración	36
Tabla 3:	Estabilidad del Diazinon	45
Tabla 4:	Tiempo de Retención de los plaguicidas estudiados	46
Tabla 5:	Especificidad de los analitos estudiados	48
Tabla 6:	Áreas Relativas Promedio de plaguicidas estudiados	50
Tabla 7:	Parámetros estadísticos para la cuantificación de Cadusafos	51
Tabla 8:	Parámetros estadísticos para la cuantificación de Terbufos	52
Tabla 9:	Parámetros estadísticos para la cuantificación de Diazinon	53
Tabla 10:	Parámetros estadísticos para la cuantificación de Malatión	54
Tabla 11:	Parámetros estadísticos para la cuantificación de Clorpirifos	55
Tabla 12:	Ensayo de Recuperación para 1mg/L de plaguicida, ensayo 1	57
Tabla 13:	Ensayo de Recuperación para 1mg/L de plaguicida, ensayo 2	58
Tabla 14:	Ensayo de Recuperación para 1mg/L de plaguicida, ensayo 2	58
Tabla 15:	Coefficiente de variación y desviación estándar para los ensayos de recuperación	59
Tabla 16:	Condiciones para voltametría cíclica	64
Tabla 17:	Condiciones de análisis para voltametría de pulso diferencial	65
Tabla 18:	Límite de detección y cuantificación del método electroquímico	67

Tabla 19:	Ensayos de recuperación de Diazinon para una conc. De 0,5mg/L	68
Tabla 20:	Niveles de Diazinon encontrados en muestras reales	69

ÍNDICE DE FIGURAS

No. de figura	Título	Página
Figura 1:	Clasificación cronológica de los plaguicidas	11
Figura 2:	Vías más usuales de movimiento de plaguicidas en el medio ambiente	14
Figura 3:	Estructura química del Diazinon	15
Figura 4:	Estructura química del Diazoxon	18
Figura 5:	Ejemplo de voltamograma cíclico	22
Figura 6:	Ejemplo de voltamograma de pulso	23
Figura 7:	Ejemplo de voltamograma de onda cuadrada	24
Figura 8:	Ejemplo de voltamograma de pulso diferencial	25
Figura 9:	Estructura general de un electrodo serigrafiado	27
Figura 10:	Distribución de submuestras en el terreno de muestreo	30
Figura 11:	Ubicación geográfica del Espino de la Chorrera Verba Odrec	31
Figura 12:	Toma de muestra de suelos	32
Figura 13:	Técnica de extracción SAESC	37
Figura 14:	Cromatógrafo de gases Agilent 6890	38
Figura 15:	Mantenimiento preventivo de GC-NPD	40
Figura 16:	Potenciostato PSTAT mini - Metrohm	41
Figura 17:	Cromatograma de blanco de suelo	47

Figura 18:	Cromatograma de Cadusafos, Terbufos, Diazinon, Malatión y Clorpirifos a una concentración de 0,1 mg/L	47
Figura 19:	Cromatograma de nivel 1 de la curva de calibración, concentración de 0,1 mg/L	49
Figura 20:	Cromatogramas superpuestos para niveles 1, 3 y 5 de la curva de calibración.	50
Figura 21:	Voltamograma cíclico. Rojo: Diazinon. Azul: señal de fondo	64
Figura 22:	Curva de calibración para Diazinon en matriz de suelo	65

ÍNDICE DE GRAFICOS

No de Gráfico	Título	Página
Gráfico 1	Estabilidad de los analitos estudiados	45
Gráfico 2	Especificidad de los analitos estudiados	48
Gráfico 3	Curva de calibración para Cadusafos	51
Gráfico 4	Curva de calibración para Terbufos	52
Gráfico 5	Curva de calibración para Diazinon	53
Gráfico 6	Curva de calibración para Malatión	54
Gráfico 7	Curva de calibración para Clorpirifos	55
Gráfico 8	Comparativo de límites de detección y cuantificación para plaguicidas estudiados	56
Gráfico 9	Recuperación relativa para los plaguicidas estudiados	59
Gráfico 10	Intensidad de corriente para electrodo de oro a pH 6 y buffer Britton Robinson	60
Gráfico 11	Intensidad de corriente para electrodo de oro a pH 6 y buffer Citrato	61
Gráfico 12	Intensidad de corriente para electrodo de oro a pH 9 y buffer Britton Robinson	61
Gráfico 13	Intensidad de corriente para electrodo de carbono a pH 6 y buffer Britton Robinson	62
Gráfico 14	Comportamiento de los electros de oro y de carbono	62

Gráfico 15	Comparativo de señal de los electrodos de oro y carbono a las velocidades de barrido estudiadas	63
Gráfico 16	Curva de calibración para cuantificación electroquímica de Diazinon.	66

GLOSARIO

Abreviatura /acrónimo	Significado
AChE	Acetil colinesterasa
CODEX	Comisión creada por la Food and Agricultural Organization, FAO, y la Organización Mundial de la Salud, OMS pertenecientes a la ONU.
CVm	Coeficiente de variación de la pendiente
DDT	Dicloro Difenil Tricloroetano
GC	Cromatografía de gases
HCH	Hexacloro Hexano
IDA	Ingesta Diaria Admisible expresada en unidades de mg/ kg/ día
IDAAN	Instituto de Acueductos y Alcantarillados Nacionales
LC	Límite de cuantificación
LC ₅₀	Concentración letal de una sustancia
LD	Límite de detección
LD ₅₀	Dosis letal de una sustancia
MIDA	Ministerio de Desarrollo Agropecuario
MINSA	Ministerio de Salud
NPD	Detector de nitrógeno y fósforo
ODS	Objetivos de Desarrollo Sostenible
OP	Organofosforado
Prom.	Promedio

PTFE	Politetrafluoroetileno, más conocido como teflón
Rec. Abs.	Recuperación absoluta
Rec. Rel.	Recuperación relativa al patrón interno
RLIN	Programa de regresión lineal
s	Desviación estándar
SAESC	Extracción asistida por sonicación en columnas pequeñas
SENACYT	Secretaría Nacional de Ciencia Tecnología e Innovación
TPP	Trifenil fosfato

RESUMEN

Este trabajo ha logrado la implementación por primera vez en la Universidad de Panamá, de una metodología para la extracción simultánea de residuos de plaguicidas en suelos a través de la extracción asistida por sonicación en columnas pequeñas (SAESC), y su cuantificación por cromatografía de gases, además se ha desarrollado un método Voltamétrico para detectar y cuantificar Diazinon dentro de la matriz de suelo, alcanzando un límite de cuantificación de 0,3 mg/L. Esta metodología fue probada en muestras fortificadas y en muestras reales de suelo cultivado, encontrándose en estas últimas hasta 65 ng/kg de Diazinon en suelo.

SUMMARY

This work has achieved for, the first time at Universidad of Panamá, the implementation of a novel methodology for the extraction of multiresidue pesticides on soil through the technique named Sonic Assisted Extraction in Small Columns (SAESC), additionally it has been done the quantification with Gas Chromatography – NP detector.

The second part of this work is the development of a voltametric method for the detection and quantification of Diazinon in soil. It has been achieved the limit of quantification of about 0,3 mg/L and we have found Diazinon in real samples up to 65 ng/kg of cultivated soil.

I. INTRODUCCIÓN

1.1. INTRODUCCIÓN

Ya en el año 70 A.C Plinio sugería el uso de Arsénico para eliminar insectos, el cobre y el mercurio también han sido utilizados como plaguicidas a lo largo de la historia. Sin embargo, durante el último medio siglo, la revolución química que entró en fase de aceleración al final de la segunda guerra mundial ha provocado una gigantesca oleada de sustancias sintéticas, entre ellas los plaguicidas, que han penetrado en todos los rincones de la tierra. (Colborn, 1997)

En la actualidad existen métodos analíticos muy diversos para la determinación de plaguicidas, destacando la cromatografía de Gases por presentar un elevado número de aplicaciones, su facilidad en el manejo, en la identificación y cuantificación de los resultados (X Luo et al 2005). No obstante, la gran variedad de plaguicidas, y de muestras en las que podemos encontrarlos, permite que se continúe investigando en el desarrollo y puesta a punto de métodos más rápidos, selectivos, y que se apliquen nuevas técnicas, en ocasiones resultado del acoplamiento de las ya existentes, con el fin de obtener datos cada vez más sensibles y fiables.

Debido a que muchos de los compuestos orgánicos utilizados como plaguicidas contienen grupos electroactivos, tanto en oxidación como en reducción, las técnicas voltamperométricas y en especial las potenciométricas, están abriendo nuevos caminos para la determinación de la creciente variedad de plaguicidas (T. Lazarevic et al, 2013). Estas técnicas pueden resultar competitivas con respecto a las referidas anteriormente, incluso más adecuadas en algunos casos, por su sensibilidad, precisión y posibilidad de

simplificar la metodología analítica o reduciendo el proceso de limpieza (“clean-up”), lo que conduce a métodos más rápidos. Así mismo requieren una instrumentación más sencilla y por consiguiente un menor costo.

Por ello el desarrollo de nuevas metodologías juega un papel muy importante para la detección de bajos niveles de concentraciones de residuos de contaminantes, y las técnicas electroanalíticas representan una alternativa barata, sencilla y rápida para el análisis de plaguicidas, asegurando que el uso de estos químicos que protegen a los cultivos, no causen daños al ambiente ni a la población (J. Castro et al. 2001)

Debido a la necesidad de información actual sobre el estado de los suelos agrícolas en el país, se ha desarrollado un método electroquímico capaz de detectar Diazinon. El proyecto se ha llevado a cabo en dos etapas, la primera consiste en la optimización del muestreo, extracción y cuantificación de plaguicidas organofosforados mediante técnicas cromatográficas y luego se ha realizado el desarrollo del método electroquímico. Este proyecto de carácter interinstitucional ha sido financiado por SENACYT, MIDA y Universidad de Panamá.

1.2. ANTECEDENTES

En los últimos años, la producción agrícola ha experimentado un rápido crecimiento, debido, entre otras causas, a la protección dada a los diversos cultivos contra plagas, enfermedades, malas hierbas, entre otros. Existen diversas modalidades para llevar a cabo esta protección, siendo la aplicación de plaguicidas una de las más importantes. (C. Sánchez-Brunete et al, 2003).

La utilización masiva de plaguicidas en agricultura ha tenido, aparte de sus innegables beneficios, un impacto medioambiental negativo debido a sus distintos niveles de toxicidad. Estos efectos adversos hacen que sea necesario llevar a cabo un control riguroso de la concentración de estas sustancias tóxicas en aguas, suelos, cultivos, alimentos; en fluidos y tejidos animales. (J. García, 1999).

La agricultura en Panamá representa una gran fuente de ingresos, pero trae como consecuencia un gran uso de plaguicidas, y se remonta al menos a la década de 1930. (J. Espinoza 1984).

Debido a la problemática del mal uso de los plaguicidas, el Ministerio de Desarrollo Agropecuario (MIDA) ha realizado diversos estudios, encontrándose la presencia de residuos de plaguicidas en substratos ambientales, peces y crustáceos (Jenkins 1995). Entre ellos destacamos el estudio de Rodríguez, J. A. y Lamoth, L. (1994) en el que se examinaron 229 muestras de 32 cultivos de las provincias de Coclé, Chiriquí, Herrera, Los Santos, Veraguas y Panamá, demostrando que el 22% de las muestras contenían residuos de plaguicidas y que el 20% de éstas presentaron violaciones a las normas internacionales.

Entre los plaguicidas más tóxicos y utilizados por los agricultores tenemos los organofosforados, destacándose el Diazinon; este es un insecticida no sistémico que es ampliamente utilizado para controlar insectos en distintos tipos de cultivos, y sus residuos han sido detectados tanto en aguas superficiales como subterráneas y a su vez se ha comprobado ser muy persistente en los distintos tipos de suelos (J. Castro et al, 2001).

Los plaguicidas organofosforados afectan al ser humano, inhibiendo la producción de la enzima colinesterasa, la cual es importante en el correcto funcionamiento del

sistema nervioso, pero a diferencia de otros grupos de plaguicidas, cuya inhibición es reversible, la acción de los plaguicidas organofosforados es irreversible y requiere de tratamiento inmediato luego de una intoxicación con el mismo, ya que de lo contrario puede ocasionar la muerte (Arienzo,1994).

Actualmente existe un anteproyecto de ley que establece los niveles de los distintos contaminantes en muestras de suelo; y es importante recalcar que para establecer valores en una norma es de carácter primordial contar con datos que indiquen los valores de fondo de los contaminantes y poder desarrollar así directrices que se acoplen a la realidad de Panamá.

1.3. PROBLEMÁTICA DEL ANÁLISIS DE DIAZINON EN SUELOS

Los plaguicidas se clasifican de acuerdo con el tipo de plaga que controlan y también de acuerdo con su estructura química. El Diazinon es un insecticida organofosforado inhibidor de la enzima Acetilcolinesterasa (AChE). Es muy soluble en compuestos poco polares. Se descompone fácilmente si se encuentra expuesto a la luz, sin embargo, en suelos puede estar biológicamente disponible hasta por seis meses y hasta 184 días en aguas subterráneas; es relativamente tóxico y una vez en el organismo es oxidado rápidamente a Diazoxón, cuya capacidad de inhibición de AChE es mucho mayor y en donde puede permanecer hasta 12 horas, lo que podría desencadenar efectos tóxicos agudos por exposiciones elevadas en un corto tiempo, o efectos crónicos por exposición prolongada en el tiempo (E. Ronald, 2000). Algunos de los objetivos de desarrollo sostenible 2017, buscan: salud y bienestar (ODS 3), trabajo decente (ODS 8), producción y consumo responsables (ODS 12), y vida de ecosistemas terrestres (ODS

15), por lo que las entidades académicas debemos procurar aportar con las investigaciones al cumplimiento de estos (UN, 2015). Poder garantizar un medio ambiente limpio y áreas de cultivo seguras para los trabajadores puede hacerse a través de monitoreos constantes en diversas matrices de los contaminantes tales como plaguicidas. La regulación de las sustancias químicas utilizadas en el agro requiere de estudios que revelen los niveles de estas sustancias presentes en el ambiente de manera que se pueda evaluar integralmente para tomar las medidas pertinentes.

El uso de plaguicidas sintéticos en la agricultura es un hecho que se ha extendido a nivel mundial, sin embargo, su análisis en matrices ambientales, en especial en suelos es complejo, requiere de ciertas facilidades y tiene muchas limitantes como lo es una extracción cuantitativa del plaguicida en la matriz, la rápida degradación que sufren éstas sustancias una vez extraídas, la reproducibilidad y la sensibilidad de la metodología utilizada (C Sánchez et al, 1998).

1.4. OBJETIVOS

Objetivo general:

- Desarrollar un método electroquímico para la detección y cuantificación de Diazinon en suelos arcillosos.

Objetivos específicos

- Optimizar el proceso de tratamiento de muestra de suelo para extracción de Diazinon.
- Optimizar las condiciones instrumentales de un Cromatógrafo de gases acoplado a un detector de fósforo y nitrógeno para la determinación de plaguicidas organofosforados extraídos en suelos.
- Desarrollar las condiciones voltamétricas para la identificación y cuantificación de Diazinon extraído de muestras de suelos.
- Comparar los niveles de Diazinon en suelos contra los niveles de Normas Internacionales existentes.

Para el logro de estos objetivos se propone la implementación de la técnica de extracción en columnas pequeñas asistida por ultrasonido (SAESC) y su verificación por cromatografía de gases, posteriormente la caracterización electroquímica del Diazinon y su análisis en matriz fortificada previa selección del método electroquímico óptimo.

La metodología desarrollada, una vez validada (en cuanto a sensibilidad, LD y precisión), se aplica al análisis de Diazinon en suelos de una finca de piña.

Se presenta en esta tesis el marco teórico, producto de la revisión bibliográfica disponible; también se describe la metodología utilizada y la parte experimental.

Posteriormente se presentan los resultados y finalmente las conclusiones y recomendaciones de acuerdo con los resultados obtenidos.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. PLAGUICIDAS

Es difícil precisar con exactitud la época en que los productos químicos comenzaron a ser aplicados en la agricultura. Se sabe, sin embargo, que los chinos ya usaban el óxido de etileno para acelerar la maduración de las frutas. Los griegos trataban las uvas con cenizas debido a su alcalinidad, antes de transformarlas en uvas pasas y los indios de América del Norte usaban peces muertos para fertilizar la tierra. Es muy probable que el tratamiento de las cosechas por adición de sustancias ajenas se remonte a muchos siglos atrás en la historia. En épocas más recientes, y específicamente en el siglo XIX, se inició la aplicación programada de productos químicos en la agricultura. Se descubrió o se redescubrió la utilidad del azufre, del azufre con cal (polisulfuros de calcio) y de la mezcla de Bordeaux (sulfatos básicos de cobre). A excepción del formaldehído, los compuestos usados eran de naturaleza inorgánica (T. Tuzimski, 2018).

Los primeros compuestos orgánicos fueron generalmente sustancias derivadas o mezclas de sustancias químicas muy poco refinadas. Los extractos de tejidos vegetales molidos resultaban útiles para el control de insectos. Estos extractos se usaban en la agricultura antes de que el químico conociera la estructura o lograra sintetizar la molécula responsable de la actividad biológica (T. Tuzimski, 2018).

Aunque se conocían ya algunas sustancias orgánicas sintéticas, la gran revolución en el uso de los productos orgánicos en la agricultura coincide aproximadamente con el inicio de la Segunda Guerra Mundial. Los descubrimientos más importantes fueron el DDT (Müller – 1939), el 2,4 – D (patente de Jones – 1945), el hexacloruro de benceno (desarrollo de la ICI y francés – aproximadamente 1940) y los ésteres de fosfatos orgánicos (Schräder – iniciados en los años 30 y anunciados en los 40). Estos nuevos

productos químicos eran notablemente más potentes que sus predecesores en cuanto a su actividad biológica, y desplazaron con rapidez a casi todas las sustancias que se habían venido empleando hasta entonces (M. Moreno 2001).

Según el Codex Alimentarius, se entiende por plaguicida: cualquier sustancia destinada a prevenir, destruir, atraer, repeler o combatir cualquier plaga, incluidas especies indeseadas de plantas o animales, durante la producción y/o almacenamiento, transporte, distribución y elaboración de alimentos, productos agrícolas o alimentos para animales, o que pueda administrarse a los animales para combatir ectoparásitos. Los plaguicidas pueden clasificarse de diferentes formas, en figura 1 se puede observar la clasificación cronológica.

Plaguicidas de Primera Generación

- Inorgánicos (Arsénico, etc.)
- Orgánicos vegetales (Nicotina, Piretrinas naturales, Rotenona)
- Orgánicos minerales (Aceites minerales)

Plaguicidas de Segunda Generación

- Orgánicos sintéticos:
 - Clorados (HCH, DDT, Heptacloro, etc.)
 - Fosforados (Malatión, Paratión, Monocrotofós, etc.)
 - Carbamatos (Carbaril, Carbofuram, etc.)
 - Piretroides (Deltametrina, Permetrina, Cipermetrina, etc.)

Plaguicidas de Tercera Generación

- Microbianos
- Feromonas

Plaguicidas de Cuarta Generación

- Hormonas juveniles (Diflubenzuron, Metoprene, etc.)

Plaguicidas de Quinta Generación

- Antihormonas:
 - Vegetal (Precocenos)
 - Microorganismos (Avermectin)

Figura 1. Clasificación cronológica de los plaguicidas

De los plaguicidas citados anteriormente los más usados son los organoclorados, organofosforados, carbamatos y piretroides.

Los plaguicidas organoclorados conforman un grupo de plaguicidas artificiales desarrollados principalmente para controlar las poblaciones de insectos plaga. Su origen se remonta a la fabricación del DDT (diclorodifeniltricloroetano). De ahí en adelante y por muchas décadas, dicho clorado fue un arma importante en el control del mosquito *Anopheles* transmisor de la malaria. Su acción, como casi todos los insecticidas, es a nivel del sistema nervioso, generando alteraciones de la transmisión del impulso nervioso (M. Moreno 2001).

Los plaguicidas organoclorados son, en esencia, hidrocarburos con alto contenido de átomos de cloro y fueron los insecticidas más criticados por los grupos ecologistas. El DDT es un símbolo de veneno químico, debido a su difícil degradación y su gran acumulación en el tejido animal, característica ésta que comparte con los demás integrantes del grupo.

Existen casos de resistencia de insectos a plaguicidas organoclorados, principalmente al DDT, dado el gran uso que se ha hecho del mismo. Aldrín, Clordano, Dieldrín, Endrín, Heptacloro, HCH (hexaclorociclohexano), Lindano y Toxafeno son organoclorados integrantes de la llamada “docena sucia” que engloba a aquellos plaguicidas que más problemas ambientales han generado (L. Mercado et al 2013).

Actualmente los plaguicidas organoclorados están prohibidos en casi todo el mundo y para casi todos los usos, debido a sus problemas de acumulación, a su alta estabilidad química, su gran estabilidad a la luz y su difícil degradación biológica. En

algunos casos inclusive, se ha comprobado que son carcinogénicos y mutagénicos (L. Mercado et al 2013).

La segunda guerra mundial trajo aparejada una gran revolución de la industria química. En dicho marco aparecieron los plaguicidas organofosforados como desarrollo exclusivamente militar (gases neurotóxicos) y luego de la guerra, con un amplio uso agrícola.

Así aparecieron en la década de los 50 el Paratión y el Malatión, plaguicidas organofosforados que se consolidaron como insecticidas principalmente agrícolas y su uso se incrementó enormemente con la prohibición del uso de los plaguicidas organoclorados. Entre 1960 y 1970, los plaguicidas organofosforados y subsecuentemente los carbamatos fueron introducidos en el Mercado mundial a gran escala, estos inhibidores de colinesterasa, con una descomposición mucho más rápida que la de los plaguicidas organoclorados, fueron clasificados como menos dañinos al ambiente; pero son, en general, mucho más tóxicos. Diversos Envenenamientos con inhibidores de colinesterasa han sido documentados a lo largo del tiempo, en accidentes tanto intencionales como ocupacionales y se han registrado tanto en niños como en adultos (T Colborn, 1997).

En América Central, hay datos desde 1970, y los estudios son consistentes en demostrar que el uso extensivo de este tipo de sustancias puede causar intoxicaciones agudas graves, así como crónicas, producto de las condiciones inadecuadas de uso con elevadas exposiciones ocupacionales y ambientales aunado a la falta de legislación. Para la década de los 80 estos estudios demuestran que la mayoría de los envenenamientos

fueron de tipo ocupacional y más de un 80% causado por plaguicidas organofosforados, carbamatos y Paraquat. (C. Wesseling 2005).

2.1.1. DIAZINON – CARACTERISTICAS FISICOQUIMICAS

El Diazinon es un insecticida organofosforado inhibidor de la enzima Acetilcolinesterasa (AChE). Es muy soluble en compuestos poco polares. Se descompone fácilmente si se encuentra expuesto a la luz (2-4 meses) sin embargo en suelos puede estar biológicamente disponible hasta por seis meses y hasta 184 días en aguas subterráneas a un pH de 7,4 (E. Ronald 2000).

En Panamá este plaguicida es aplicado comúnmente en las plantaciones de Piña para contrarrestar la cochinilla harinosa (*Dysmicoccus brevipis*) y el Talador de la fruta (*Tecla echion*). El Diazinon puede alcanzar el suelo por varias vías (Figura 2).



Figura 2. Vías más usuales de movimiento de plaguicidas en el medioambiente.

El Diazinon es relativamente tóxico con un LD_{50} = 224mg/kg de masa corporal en mamíferos, sin embargo, su producto de oxidación, el Diazoxon, tiene una capacidad de inhibición de AChE mucho mayor.

Se señala su estructura en la figura 3, el Diazinon posee grupos funcionales como el anillo de pirimidina y el enlace azufre – fósforo que son susceptibles a modificaciones que permiten su detección mediante técnicas electroquímicas. Algunas de sus características fisicoquímicas, señaladas en la tabla 1 dejan en evidencia que es una molécula muy lábil.(S. Karanth 2014)

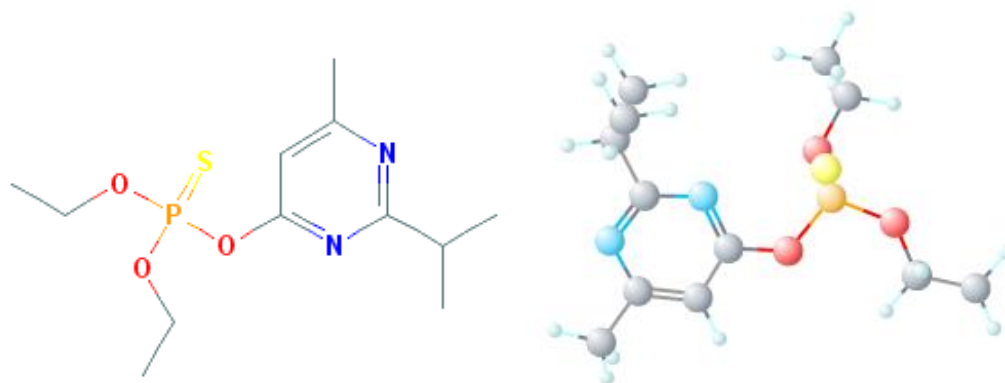


Figura 3. Estructura química del Diazinon

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas del Diazinon

PROPIEDAD	PARÁMETRO	UNIDAD	VALOR	CONCLUSIÓN
<i>Presión de vapor</i>		mPa	0,097	
<i>Densidad</i>		g/cm ³	1,11	
<i>Degradación</i>	DT ₅₀ suelo	Semanas	1,2–5	Bastante degradable
<i>Solubilidad</i>	S _w	mg/l	40	Fácilmente soluble
<i>Movilidad</i>	Log K _{oc}		1,92	Moderadamente móvil
<i>IDA</i>		mg/kg/día	0,002	
<i>Concentraciones admisibles</i>	Seres humanos:			
	Contacto directo	mg/kg	1 000	
	Consumo de hortalizas	mg/kg	0,3	
	Consumo de agua potable	µg/l	40	

El Diazinon puede mantenerse biológicamente disponible en suelos por 6 meses o más a bajas temperaturas, baja humedad, elevada alcalinidad y con pocos degradadores microbianos (C. Menzie 1972).

2.1.2. TOXICOLOGIA DEL DIAZINON

Entre organismos acuáticos, los camarones son las especies más sensibles al Diazinon, con LC_{50} menores a 5 $\mu\text{g/L}$. El Diazinon es considerablemente potente en el envenenamiento de aves, siendo los patos y los pavos las aves más sensibles con un LC_{50} de 2 mg/kg de masa corporal (E. Ronald 2000).

Los mamíferos son más resistentes al Diazinon encontrándose que para ratas hembras la dosis letal es de 224 mg/kg de peso corporal. La intoxicación crónica sugiere que una ingesta diaria entre 5 y 20 mg de Diazinon/ kg de peso puede ser fatal en perros y 9 mg/kg de ingesta de Diazinon en la dieta durante la gestación puede causar muerte del embrión en ratones (G. Glavan, 2018).

El Diazinon es rápidamente metabolizado y excretado en mamíferos. La vida media estimada de Diazinon fue de 6 a 12 horas en ratas y perros. La mayor parte de los metabolitos del Diazinon se excretan en la orina como ácido dietilfosfórico y como ácido dietil fosfotioico en perros y como hidroxidiazinon y dehidroxidiazinon en ovejas (M. Colovic 2010).

La inhibición de la acetilcolinesterasa ocurre a diferentes niveles en distintos mamíferos. El diazoxon (Figura 4), principal metabolito del Diazinon, es originado probablemente por una desulfuración oxidativa por ataque del radical OH al grupo tionofosfato a través de un mecanismo oxidativo actuando directamente en el Diazinon.

Otros metabolitos que han sido identificados son 2-(2-hidroxi-2-propil)-4-metil-6-hidroxipirimidine, ácido dietil-fosfotioico y ácido dietilfosfórico. Todos los mamíferos pueden hidrolizar el diazoxon rápidamente, sin embargo, las aves no tienen esa capacidad hidrolítica lo que los hace más sensibles a este plaguicida (Badi M, 2015).

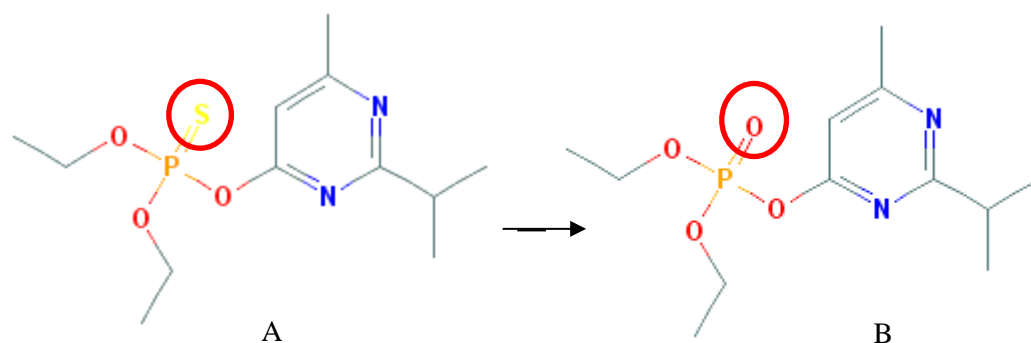


Figura 4. Cambios entre Estructura química del Diazinon (A) y la estructura química del Diazoxon (B)

El modo de acción del Diazinon, similar al de otros plaguicidas organofosforados, está basado en la inhibición de la actividad de la acetilcolinesterasa a través de una unión covalente a los residuos de Serina, por lo que este no es un mecanismo de acción específico. (Abu-Quare and Abou-Donia 2002).

La mayor parte del Diazinon aplicado en el suelo se pierde por degradación química y biológica a los dos meses aproximadamente de la aplicación. Aun cuando el Diazinon tiene una estructura base similar a otros plaguicidas organofosforados, hay muy poca información sobre Diazinon y sus metabolitos, su toxicidad y/o genotoxicidad en humanos (G. Erdogdu 2002).

2. 2. TECNICAS ELECTROANALITICAS

Se han utilizado diversas técnicas analíticas para el análisis de plaguicidas, entre los cuales se encuentran la fluorometría, electroforesis capilar, espectrofotometría, espectroscopia de masas y principalmente cromatografía líquida o de gases. Estas técnicas son muy eficientes, pero se limitan a un gran espacio de laboratorio, consumen mucho tiempo y tienen elevados costos. Durante muchos años se ha implementado dispositivos para medir plaguicidas por técnicas electroquímicas y actualmente han ganado interés por su sensibilidad y economía (M. Pravda, 2011).

Debido a que muchos de los compuestos orgánicos utilizados como plaguicidas contienen grupos electroactivos, tanto en oxidación como en reducción, las técnicas voltamperométricas están abriendo nuevos caminos para la determinación de la creciente variedad de plaguicidas. Estas técnicas pueden resultar competitivas con respecto a las técnicas clásicas, incluso más adecuadas en algunos casos, por su sensibilidad, precisión y posibilidad de simplificar la metodología analítica o reduciendo el “clean-up”, lo que conduce a métodos más rápidos. Así mismo requieren una instrumentación más sencilla y por consiguiente un menor costo (J Castro, 2001).

Por ello el desarrollo de nuevas metodologías juega un papel muy importante para la detección de bajos niveles de concentraciones de residuos de contaminantes, las técnicas electroanalíticas representan una alternativa barata, sencilla y rápida para el análisis de plaguicidas, asegurando que el uso de estos químicos que protegen a los cultivos, no produzcan daños al ambiente ni a la población.

Los métodos electroquímicos para detectar contaminantes pueden ser clasificados como aquellos basados en técnicas potenciométricas, amperométricas, voltamétricas y

conductimétricas. Se hará especial énfasis en detallar las principales técnicas voltamétricas ya que han sido utilizadas ampliamente en esta investigación (Guziejewski, D. 2012)

2. 2.1. VOLTAMETRIA

Las técnicas voltamétricas son las técnicas más útiles en las ciencias analíticas, especialmente en estudios en medios acuosos o en el estado sólido de especies electroactivas. Como la mayoría de los compuestos químicos y bioquímicos son reducibles u oxidables, suele utilizarse técnicas electroquímicas. También pueden ser utilizados para estudiar la cinética y termodinámica de los electrones y de los procesos de transferencias de iones, para investigar fenómenos de adsorción sobre la superficie del electrodo y también para estudiar los mecanismos de reacción en química orgánica y bioquímica.

Las técnicas voltamétricas requieren una celda, y tres electrodos: el electrodo de trabajo en donde ocurre la reacción electroquímica, el electrodo de referencia, caracterizado por un potencial constante de reacción en el tiempo y el electrodo auxiliar que balancea la carga total de las reacciones que ocurren en el sistema (Gulaboski & Pereira, 2008). Cuando un potencial E es aplicado al electrodo de trabajo que está en contacto con la solución de interés, ocurrirá una oxidación o una reducción. Consecuentemente, un cambio en su concentración ocurre en la superficie del electrodo, causando una transferencia de masa a través de dicho electrodo. Una corriente entonces fluye a través del electrodo.

Un barrido de potencial en el tiempo, y el registro de los datos de corriente generan una curva conocida como voltamograma, el cual es equivalente a la corriente como una función del potencial aplicado. La aplicación de los métodos voltamétricos para fines analíticos se debe al hecho de que la corriente que se genera en el electrodo de trabajo es directamente proporcional a la concentración del analito. (Wang, 2008).

Existen varias técnicas voltamétricas, cada una caracterizada por la naturaleza del potencial aplicado a la transferencia electrónica de la reacción y por la forma de la curva de corriente versus potencial aplicado. Es por esto por lo que los voltamogramas son sencillos y prácticos para utilizar en análisis cuantitativos.

Concerniente al electroanálisis de plaguicidas, la mayoría de los cuales son compuestos orgánicos con grupos funcionales electroactivos, la técnica de voltametría cíclica, voltametría de pulso, voltametría de onda cuadrada y polarografía de pulso diferencial son las más utilizadas.

2.2.2. VOLTAMETRIA CICLICA

Entre los métodos Voltamétricos, la técnica de Voltametría Cíclica (VC) es la más utilizada para un análisis inicial del comportamiento de óxido-reducción del compuesto de interés. La técnica de VC ofrece una forma de ubicar rápidamente los potenciales redox de la molécula estudiada.

Esta técnica consiste en la aplicación de un barrido de potencial lineal sobre el electrodo de trabajo desde un potencial inicial (E_i) hasta un potencial final (E_f), al llegar a E_f el barrido es revertido y el potencial regresa a E_i . Durante este experimento, la corriente resultante del potencial aplicado a una velocidad específica es registrada

generando un voltamograma cíclico (I.R. Miller 1979). Este se caracteriza por tener puntos de interés: los potenciales catódicos y anódicos que se corresponden con las corrientes catódicas y anódicas. Los valores de estos parámetros y la relación entre ellos proveen las bases para clasificar un voltamograma cíclico como un sistema reversible, irreversible o cuasi-irreversible (figura 5).

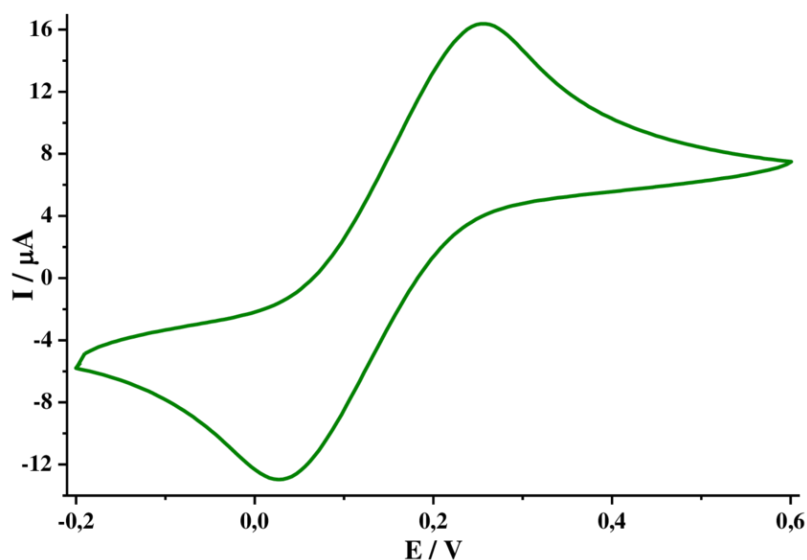


Figura 5. Ejemplo de un voltamograma cíclico

Para análisis de plaguicidas, la forma del voltamograma cíclico puede proveer información sobre el tipo de reacción sobre el electrodo de trabajo, el número de electrones involucrados en la reacción electroquímica y otros procesos adicionales que pueden ocurrir como la adsorción o reacciones químicas acopladas.

2. 2.3. VOLTAMETRIA DE PULSO

Estas técnicas fueron introducidas por Barker y Jenkin en 1952 para resolver un problema crucial: la disminución de los límites de detección de las medidas voltamétricas. En estas técnicas, el principio básico es el mismo: una secuencia de pulsos

de potencial se aplica al electrodo de trabajo, luego el potencial es aumentado y la indeseable corriente capacitiva decae en el tiempo con un valor despreciable mientras que la corriente farádica decae más lentamente para la misma reacción y por lo tanto es más significativa (Wang, 2008). Existen varias técnicas de voltametría de pulso que se clasifican de acuerdo con el pulso, a la forma de la onda y a la corriente. Los parámetros instrumentales más importantes en estas técnicas son la amplitud del pulso (altura del pulso), el ancho del pulso (duración) y el periodo de registro (figura 6).

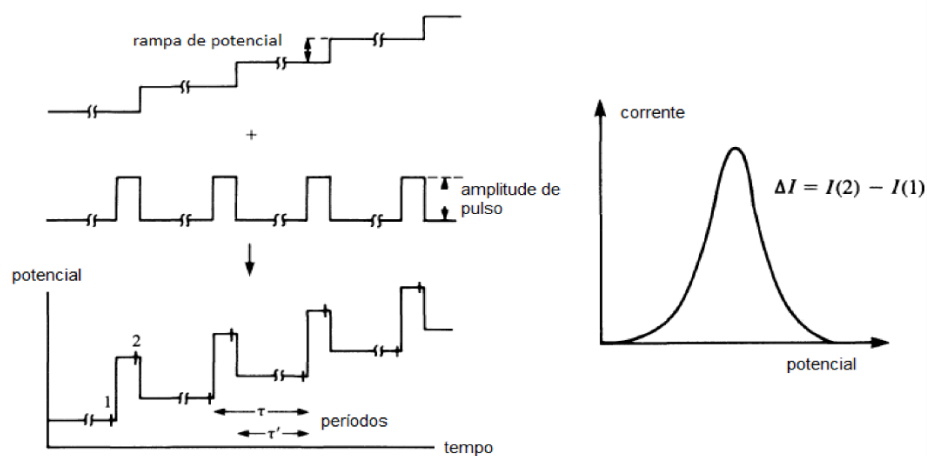


Figura 6. Ejemplo de un Voltamograma de pulso

La respuesta del electrodo consiste en picos de corriente en donde la altura es directamente proporcional a la concentración del analito. Gracias al buen desempeño de estas técnicas, puede utilizarse tanto anódicamente como catódicamente o incluso adsorptivamente. Las técnicas de voltametría de onda cuadrada, voltametría de pulso diferencial y la polarografía de pulso diferencial son las técnicas más utilizadas en el electroanálisis de moléculas de plaguicidas.

2.2.4. VOLTAMETRIA DE ONDA CUADRADA (SWV)

En esta técnica se aplica un pulso de potencial de ondas cuadradas simétricas escalonadas sobre el electrodo de trabajo. Durante cada ciclo de onda cuadrada, la corriente es medida dos veces: al final del pulso que da inicio a la corriente oxidativa y luego al final del pulso que da inicio a la corriente reductora (**fig 7**). La diferencia entre las dos medidas se grafica contra los potenciales escalonados y el voltamograma en forma de pico es proporcional a la concentración del analito (Gulaboski & Pereira, 2008).

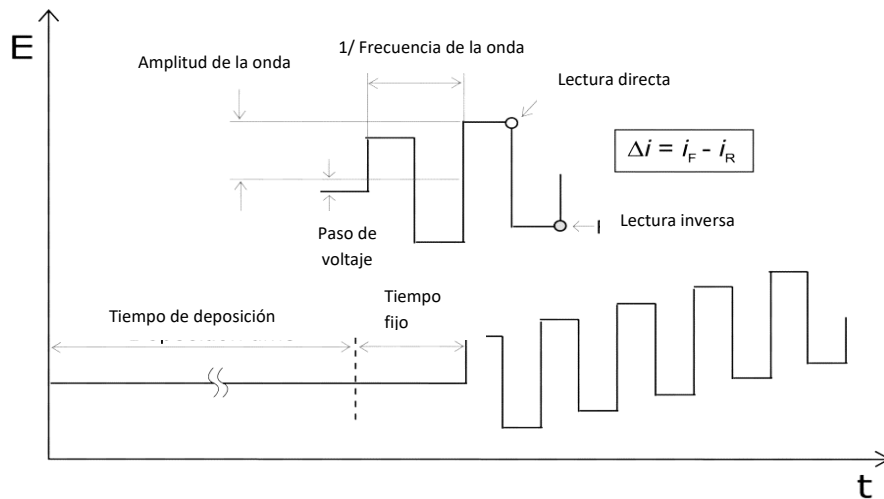


Figura 7. Ejemplo de Voltamograma de onda cuadrada

2.2.5. VOLTAMETRIA DE PULSO DIFERENCIAL (DPV)

Entre los métodos voltamétricos, esta es de las técnicas más utilizadas para medir plaguicidas a niveles de trazas (Wang, 2008).

Consiste en pequeños pulsos de potencial de magnitud constante superimpuestos sobre una onda escalonada. La corriente se mide dos veces: justo antes de la aplicación del pulso y luego durante la vida del pulso mientras la corriente capacitiva ha decaído.

La señal del electrodo es la diferencia entre ambas corrientes medidas para cada pulso individual y consiste en picos cuyas alturas son directamente proporcionales a la concentración del analito correspondiente (figura 8). Esta técnica presenta la ventaja de tener muy buena resolución entre dos especies con potenciales redox similares ya que picos separados por apenas 50 mV pueden ser medidos correctamente. (Wang, 2008).

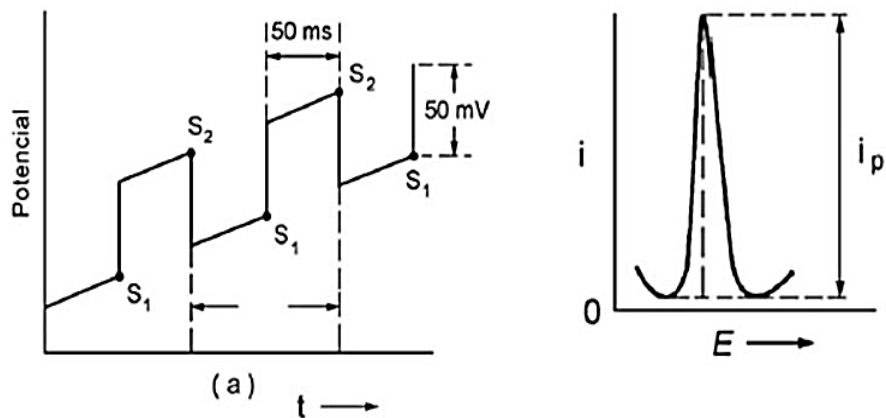


Figura 7. Ejemplo de voltamograma de pulso diferencial

2.2.6. POLAROGRAFIA DE PULSO DIFERENCIAL

En esta técnica se aplican los mismos principios de la voltimetría de pulso diferencial pero se utiliza un electrodo de gota de mercurio ya sea colgante o estático. Aunque el mercurio es elevadamente tóxico, y tiene a utilizarse cada vez menos, se

mantiene vigente como una técnica de análisis válida para plaguicidas por dos razones importantes:

- Varios grupos funcionales (carbonilo, nitro, disulfuro, azo, quinona) presentes en las estructuras moleculares de los plaguicidas pueden reducirse sobre el electrodo de mercurio en amplios rangos de potenciales catódicos.
- Muchos compuestos orgánicos e inorgánicos tienden a absorberse sobre el electrodo de mercurio, lo que es favorable en una pre-concentración previa a la cuantificación.

2.3. ELECTRODOS

La parte más esencial del estudio analítico es el desarrollo de metodologías novedosas, robustas, económicas, rápidas y hasta cierto punto portátiles. Las medidas electroanalíticas se realizan a través de sensores (electrodos) que pueden detectar las variaciones de corriente de una sustancia en función del potencial aplicado y las variantes que puedan generarse de estas combinaciones (M. Li, 2012). Usualmente se requieren tres electrodos para estas medidas:

- a. Electrodo de trabajo: es el electrodo principal en donde ocurre la reacción electroquímica de interés.
- b. Electrodo de referencia: electrodo con un potencial conocido que se mantiene constante.
- c. Electrodo auxiliar: completa el circuito electrónico y proporciona cargas en caso de sea necesario.

El desarrollo de las técnicas electroanalíticas ha desembocado en la implementación de los electrodos serigrafiados. Un electrodo serigrafiado posee los tres electrodos mencionados insertos dentro de una superficie que puede ser de PVC, policarbonato, cerámica o incluso papel. Los electrodos serigrafiados han aportado grandemente en el desarrollo de metodologías analíticas ya que han permitido la miniaturización de los sistemas de análisis, abaratando costos y haciendo más prácticas las técnicas electroanalíticas (A. Lourenco, 2014). Estos electrodos son ampliamente utilizados en diagnósticos clínicos, biosensores y en el monitoreo ambiental. En la figura 9 se observa la estructura general de un electrodo serigrafiado.

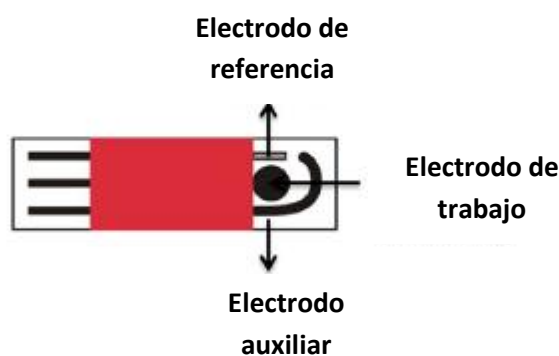


Figura 8. Estructura general de un electrodo serigrafiado

El electrodo de trabajo puede estar constituido por una gran variedad de materiales de acuerdo con la necesidad del analista, por ejemplo, el carbón y el bismuto se han utilizado desde hace tres décadas ya que tienen una pequeña corriente de fondo, una amplia ventana de potenciales y además son inertes por lo que no interfieren en las reacciones estudiadas (A. Abdulmahdi, 2017).

Adicionalmente se pueden hacer modificaciones superficiales en el electrodo de trabajo para aumentar su capacidad de lectura, o hacerlo más específico hacia un analito de especial interés, nanopartículas de oro, grafeno y nanotubos de carbono, entre otros, han sido ampliamente utilizados (T Rebis, 2018). En el caso particular de los nanotubos de carbono, estos son capaces de aumentar la sensibilidad del electrodo y sobre ellos se pueden inmovilizar otras sustancias tales como enzimas y así convertir al electrodo en un biosensor específico con potencial de uso en la detección de diversas enfermedades (V. Songa, 2016).

III. METODOLOGÍA

3.1. MUESTREO

Es bien conocida la importancia que tiene la toma de muestra para inferir un resultado analítico, las actividades de muestreo y análisis tienen como finalidad determinar la extensión y naturaleza de la contaminación; asimismo, el muestreo provee las bases para adquirir la información técnica necesaria para desarrollar, proyectar, analizar y seleccionar las medidas a tomar (J. Welsch, 2019).

El objetivo principal de cualquier muestreo es coleccionar muestras representativas del medio que se está investigando (EPA 1992). Más específicamente, el propósito del muestreo en un sitio contaminado es adquirir información que ayude a determinar la presencia e identidad de los contaminantes presentes y el grado en el que estos podrían entrar en el ambiente circundante. Este muestreo ha sido diseñado para cumplir con los siguientes objetivos:

- Determinar la presencia y concentración de contaminantes específicos.
- Determinar la concentración de contaminantes y su distribución espacial en los diferentes estratos del terreno.

El tipo de muestreo que se utilizó fue aleatorio estratificado, donde la población en estudio se subdividió en estratos o subgrupos que tienen cierta homogeneidad en el terreno y en cada estrato se realiza un muestreo aleatorio simple. La división del terreno se realizó en base a los horizontes del suelo (Figura 10: loma, media loma y bajo). Esto garantiza que los puntos de muestreo se encuentren repartidos más uniformemente en toda la zona, en función al tamaño del estrato y permite además conocer de forma independiente las características particulares de cada estrato (EPA 1992).

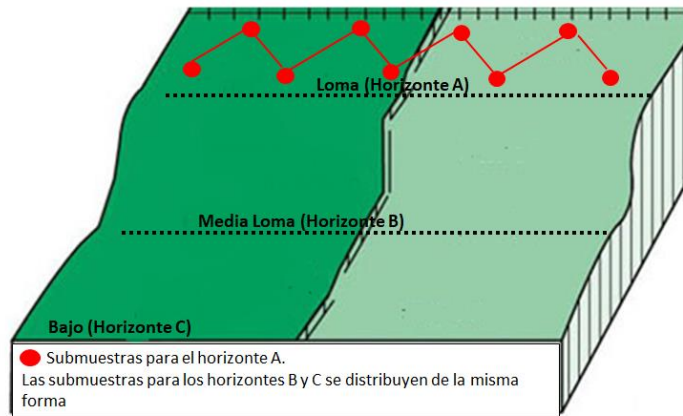


Figura 10. Distribución de submuestras en el terreno de muestreo

Existen dos porciones de suelo que son importantes para un muestreo ambiental:

- la capa superficial (0-20 cm), que refleja la deposición de contaminantes transportados por aire o depositados recientemente.
- la capa sub-superficial (40-60 cm), en donde pueden encontrarse contaminantes depositados por derrames de líquidos o por entierros y que pueden encontrarse a profundidades considerables (EPA, 1992).

El muestreo superficial busca determinar la concentración de contaminantes depositados recientemente en el suelo y que no tienden a migrar verticalmente bajo la superficie. El segundo caso generalmente se realiza para estudios de clasificación de suelos de acuerdo con sus perfiles verticales, es decir, requiere excavación; también se emplea para determinar la migración de un contaminante, especialmente cuando estos son solubles y pueden migrar a través del suelo. (EPA, 1992).

Para el caso que atañe, el muestreo (figura 12) se realizó de manera superficial de acuerdo con el protocolo de muestreo de la EPA 8041A. Las muestras fueron tomadas en la Finca Verba Odrec S.A. ubicada en el Espino de la Chorrera (figura 11) finca de propiedad privada que colabora en los proyectos de investigación de plaguicidas del MIDA.

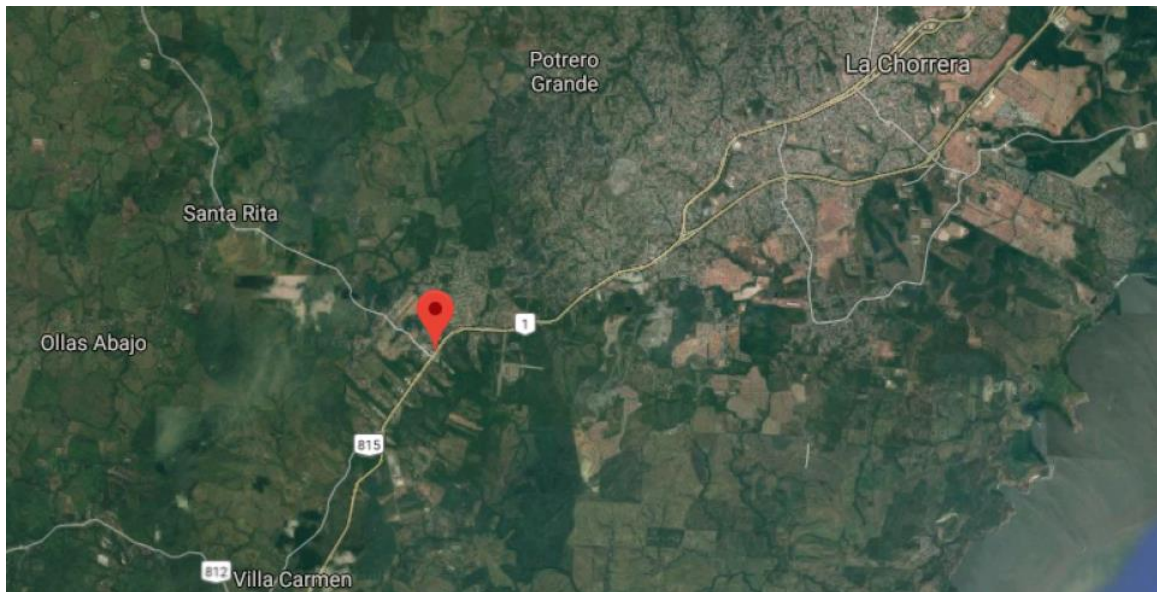


Figura 11. Ubicación geográfica del Espino de la Chorrera, finca Verba Odrec.

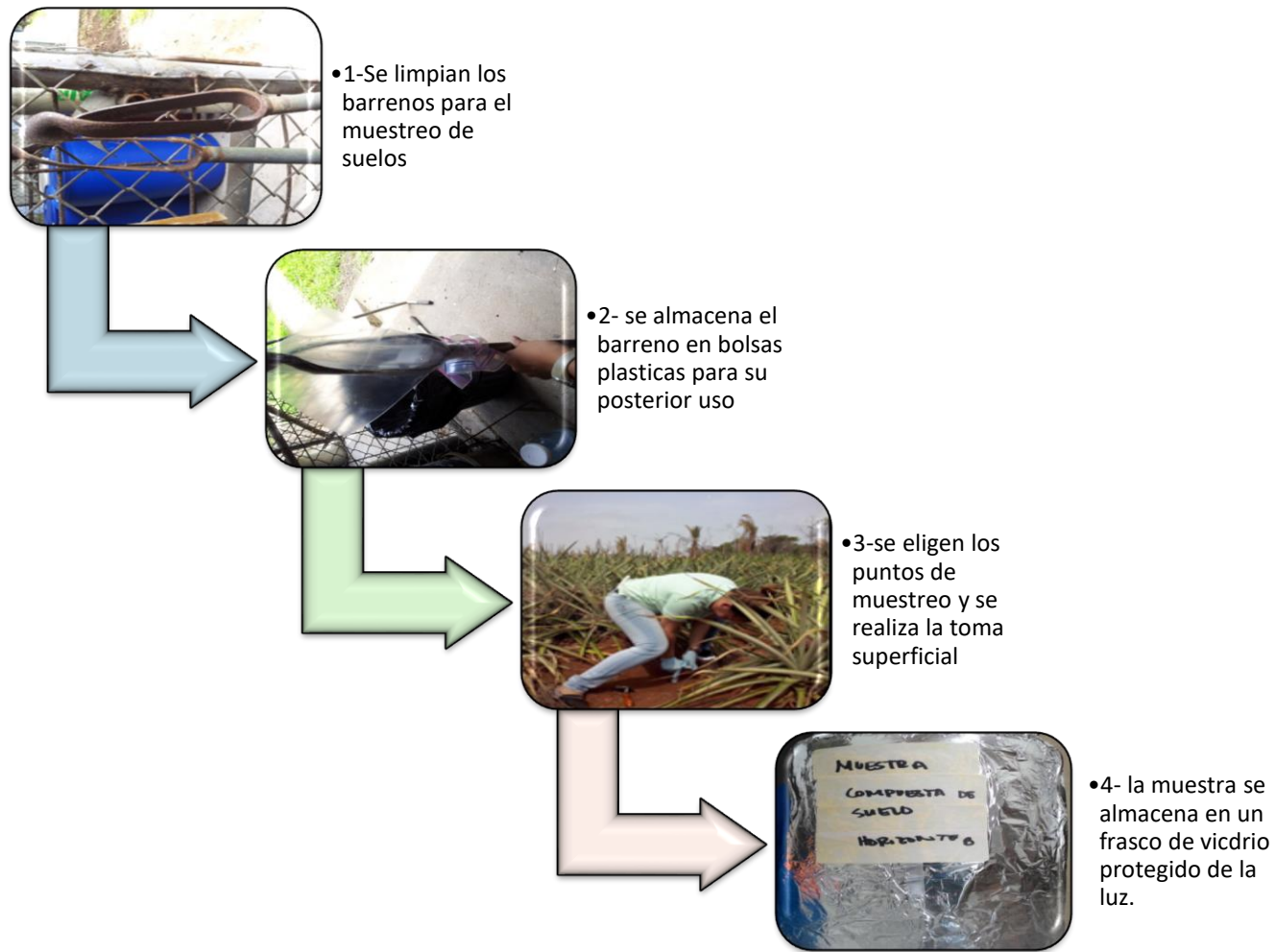


Figura 12. Toma de muestra de suelos

3.2. EXTRACCIÓN DE PLAGUICIDAS EN SUELOS

Cuando un plaguicida es aplicado, parte de él es aprovechado por la planta para la función deseada, y otra parte logra llegar al suelo donde está sujeto a diversos procesos que son los responsables de la transformación o acumulación de este en el ambiente. Las técnicas convencionales para la extracción de plaguicidas de esta matriz suelen ser: la agitación continua en solvente, o la técnica de soxhlet; técnicas más novedosas como la extracción con fluido supercrítico (SFE, por sus siglas en inglés) y extracción asistida por microonda, han tenido gran auge en estos últimos años dando resultados aceptables, sin embargo, el uso de SFE implica la optimización de las condiciones de presión y temperatura para la extracción por lo que se hace difícil la implementación como técnica de rutina para la extracción de plaguicidas (J. Castro, 2001).

Por otra parte, la extracción asistida por microondas involucra una inversión elevada en equipamiento, lo que no siempre es factible para los laboratorios de análisis de países en desarrollo. Otra técnica que ha sido ampliamente utilizada es la extracción en fase sólida (SPE, por sus siglas en inglés), a esta técnica se le ha añadido un elemento para acelerar el proceso de extracción, utilizando ultrasonido y ha tenido buenos resultados presentando varias ventajas, entre ellas: el sistema es miniaturizado, reduciendo de esta manera los desechos de solventes, el uso de ultrasonido permite una mayor interacción entre la muestra de suelo y el disolvente utilizado por lo que la extracción se lleva a cabo rápida y cuantitativamente, lo que resulta en elevados porcentajes de recuperación del analito de interés.

La técnica utilizada para la extracción de plaguicidas de suelo es conocida como extracción en pequeñas columnas asistida por ultrasonido (figura 13) (SAESC, por sus siglas en inglés) y la misma se describe a continuación:

3.2.1 Reactivos y disolventes

1. Estándares de referencia de plaguicidas*
2. Estándar interno: trifenil fosfato (TPP)*
3. Acetato de Etilo
4. Sulfato de sodio anhidro
5. Mezcla de plaguicidas OP a 2,5 y 10 ppm
6. TPP: 0,200 mL de TPP a 1000 ppm en 2mL de acetato de etilo

3.2.2. Materiales y equipos

- | | |
|---|---------------------------------------|
| 1. Baño ultrasónico | 6. Llaves de paso de PTFE con tapa |
| 2. Balanza | 7. Tubos graduados de vidrio de 15 mL |
| 3. Micropipeta | 8. Tubos cónicos abiertos |
| 4. Cartuchos de polipropileno de 20 mL | 9. Vórtex |
| 5. Papel filtro Whatman 1 o Fritas de polietileno | 10. Manifold |
| | 11. Espátulas |

**El estudio electroquímico se realizó con este procedimiento, utilizando solamente el estándar de referencia de Diazinón.*

3.2.3 Procedimiento

1. Tamizar por una malla de 2mm y secar el suelo a temperatura ambiente por una noche.
2. Colocar en un cartucho de 20 mL de polipropileno dos papeles filtros Whatman 1 o una frita de polietileno y agregar 2 gramos de sulfato de sodio anhidro.
3. Pesar en el cartucho de polipropileno 5 gramos de suelo. Para muestras enriquecidas, agregar la mezcla aparte y luego trasvasar al cartucho. **

**Para la fortificación se procedió de la siguiente manera:

- Pese 5 g de suelo blanco en tubos cónicos abiertos. Realice este procedimiento por triplicado.
 - Añada a cada blanco de suelo suficiente mezcla de plaguicidas OP para obtener 0,5 mg/L.
 - Homogenice en el Vórtex
 - Espere 5 minutos para que se evapore la mayor parte del solvente
 - Traspase a los cartuchos de extracción y siga el procedimiento indicado anteriormente desde el punto 4.
4. Coloque la llave de teflón al cartucho con el suelo, ciérrela y agregue 5 mL de acetato de Etilo.
 5. Colocar el en baño ultrasónico por 15 minutos a una temperatura no superior a 30°C.
 6. Ubicar tubos cónicos graduados en el manifold y luego de la extracción ubicar los cartuchos en el manifold correspondiente, abrir la llave de paso y dejar pasar el disolvente al tubo cónico.

7. Repetir desde el punto 4, y adicionar 1 mL de Acetato de Etilo al cartucho para lavar luego de la segunda extracción.
8. Concentrar el disolvente de elución bajo una corriente de nitrógeno a menos de 2 mL, y luego afore a 2 mL con acetato de Etilo.
9. Prepare los viales como se indica en la tabla 1

Tabla 2. Mezcla de plaguicidas para preparar la curva de calibración

	N1 (0,1 mg/L)	N2 (0,25 mg/L)	N3 (0,5 mg/L)	N4 (1 mg/L)	N5 (2 mg/L)
Mezcla	60 µL	150 µL	300 µL	150 µL	300 µL
Solvente	350 µL	260 µL	110 µL	260 µL	110 µL
EI	90 µL	90 µL	90 µL	90 µL	90 µL

Procesamiento de muestra y extracción de Plaguicidas



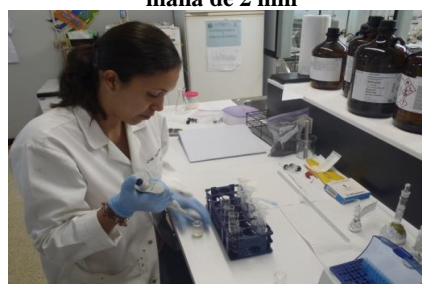
1. Se saca la muestra de su envase, ya sea bolsa plástica o botella de vidrio



2. Se procede a realizar el tamizado del suelo en una malla de 2 mm



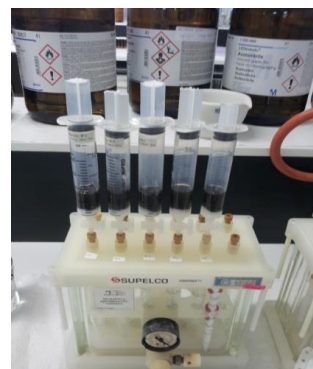
3. Se pesa el sulfato de sodio y el suelo en los cartuchos para la extracción.



4. Enriquecimiento de muestra



6. Muestras en el baño ultrasónico, se asegura la temperatura menor a 30°C



8. Extracción del solvente con los analitos en el manifold.



10. almacenamiento del concentrado en viales.

Figura 13. Técnica de extracción SAESC

3.3. ANÁLISIS POR CROMATOGRAFÍA DE GASES

El análisis de plaguicidas se realiza comúnmente mediante técnicas cromatográficas como cromatografía de gases y/o cromatografía líquida. En el caso de la cromatografía de gases los detectores más útiles son el de captura electrónica, nitrógeno – fósforo y el acoplamiento a los detectores de masas de última generación. Para el desarrollo de esta investigación se utilizó un cromatógrafo de gases Agilent 6890 (figura 14) con detector de Nitrógeno y Fósforo y se establecieron los siguientes parámetros para el análisis:



Figura 14. Cromatógrafo de gases Agilent 6890

Horno

Temperatura inicial: 85 °C

Temperatura máxima 300 °C

Tiempo de equilibrio: 3.00 min

Tiempo de corrida: 45.75 min

Rampa de calentamiento:

#	Velocidad	T. final	Tiempo final
1	4.00	140	0.00
2	5.00	280	4.00

Inyector:

Modo: pulsed splitless

Temperatura inicial: 267 °C

Presión: 9.16 psi

Flujo: 44.9 mL/min

Gas de arrastre: Helio

Columna:

Tipo: capilar HP-5, 5% de fenil metil siloxano

Largo: 30.0 m

Diámetro: 320 nm

Espesor del relleno: 0.25 um

Temperatura máxima: 325 °C

Detector:

Tipo: Nitrogeno y fósforo

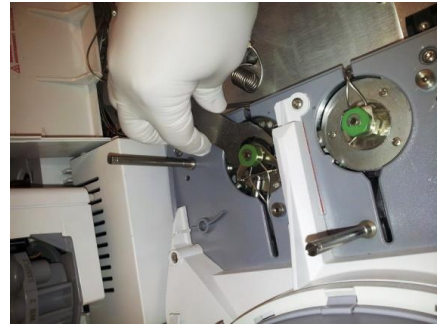
Temperatura: 300 °C

Gas de Makeup: Nitrógeno

Estos parámetros fueron establecidos después de realizar un riguroso mantenimiento del cromatógrafo de gases, ver figura 15.



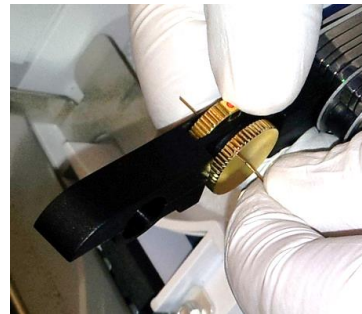
1. Cambio de liner y férulas



2. Puerto de inyección



3. Liner usado, se observa que su continuo uso ha depositado suciedad en él.



4. Corte de Precolumna para eliminar impurezas y obtener una buena línea base.



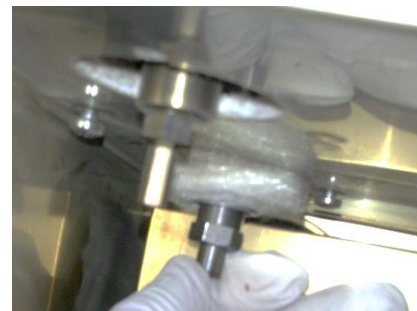
5. la Precolumna debe introducirse en el liner hasta 5 mm.



6. Parte de la precolumna cromatográfica que toca el puerto de inyección.



7. Como quedará dentro del puerto la columna junto al disco de oro.



8. Lista la limpieza, se procede a colocar todo en su lugar y a cerrar el sistema.

Figura 15. Mantenimiento preventivo de cromatógrafo de gases con detector NPD

3.4. ESTUDIO ELECTROQUÍMICO

Los ensayos y lecturas de muestra se realizaron en un potenciostato modelo PSTAT mini de Metrohm (figura 16), se utilizó voltametría cíclica para identificar el comportamiento electroquímico de Diazinon y voltametría de pulso diferencial para la identificación del Diazinon en las muestras, cada lectura se realizó en presencia de un buffer fosfato 0,1 M pH= 6 en una celda de 50 mL, las curvas de calibración de cuatro puntos se realizaron por el método de adición de estándar y corresponden a las siguientes concentraciones: 0,35 0,45 0,55 0,65 mg/L respectivamente.



Figura 16. Potenciostato PSTAT mini - Metrohm

Preparación de buffer de fosfato 0.1M, pH=6

- a) **Solución A:** Pese 1,3799 g de NaH_2PO_4 y afore a 10 mL con agua destilada
- b) **Solución B:** Pese 0,7098 de Na_2HPO_4 y afore a 5 mL con agua destilada

- c) **Solución C:** Mezcle 6,15 mL de la solución A y 3,85 mL de la solución B. Esta solución es estable durante una (1) semana.
- d) Mida 1 mL de la solución C y afore hasta 100 mL en un volumétrico. Mida el pH y ajuste de ser necesario. Esta solución es estable durante una (1) semana.

Preparación de la celda para realizar las lecturas

- a) Coloque en un vaso de 50 mL de capacidad: 49,9 mL de buffer fosfato 0,1 M pH=6 y 100 uL del extracto de la muestra.

Preparación del patrón de Diazinon

- a. **Solución madre de Diazinon:** Pese una gota de Diazinon con la ayuda de una pipeta Pasteur de vidrio. Afore a 50 mL con Acetato de Etilo. Calcule su concentración en ppm (mg/L) de acuerdo con la fórmula:

$$ppm \text{ Diazinon} = \frac{\text{mg de Diazinon Pesados}}{0.05 \text{ L}}$$

- b. **Solución de Trabajo:** Al conocer la concentración de la solución madre calcule el volumen necesario para preparar 5,0 mL de una solución de 50 mg/L de Diazinon en Acetato de Etilo.

$$Volumen \text{ necesario} = \frac{(5 \text{ mL})(50 \text{ mg/L})}{\text{mg/L Diazinon}}$$

Lectura de la muestra y de la curva de calibración por adición de estándar

- a) Coloque el buffer fosfato en la celda que es la mezcla de buffer y 100 uL de la muestra.

Proceda a realizar la primera lectura. (Las adiciones de estándares son sucesivas)

- b) Adicione a la celda 350 uL de la solución de 50 ppm y realice la lectura.
- c) Añada 100 uL más de la solución de 50 ppm a la celda y realice la lectura.
- d) Añada 100 uL más de la solución de 50 ppm a la celda y realice la lectura
- e) Añada 100 uL más de la solución de 50 ppm a la celda y realice la lectura.

3.5 VALIDACIÓN DEL MÉTODO

3.5.1. Cromatografía de gases

Se evaluaron parámetros estadísticos en las curvas de calibración para cada plaguicida estudiado tales como coeficiente de correlación (r), límite de detección al 90% (LD 90 %), límite de cuantificación al 90 % (LQ (90 %)), y el coeficiente de variación de la curva, CV.

3.5.2. Estudio Electroquímico

Una vez estudiado el comportamiento electroquímico del Diazinon, y la técnica voltamétrica más eficiente para su cuantificación, se evaluaron parámetros estadísticos sobre la curva de calibración en matriz para establecer límite de detección al 90% (LD 90 %), límite de cuantificación al 90 % (LQ (90 %)), y el coeficiente de variación del método CV.

Todos los resultados obtenidos fueron sometidos a pruebas estadísticas utilizando la hoja de cálculo excel RLIN (Leone, 2006).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. ESTUDIO CROMATOGRÁFICO

4.1.1. Estabilidad del Analito

Se realizaron inyecciones semanales de tres plaguicidas, entre ellos el Diazinon (gráfico 1), para evaluar la pérdida de señal en el tiempo como indicativo de la estabilidad de estos.

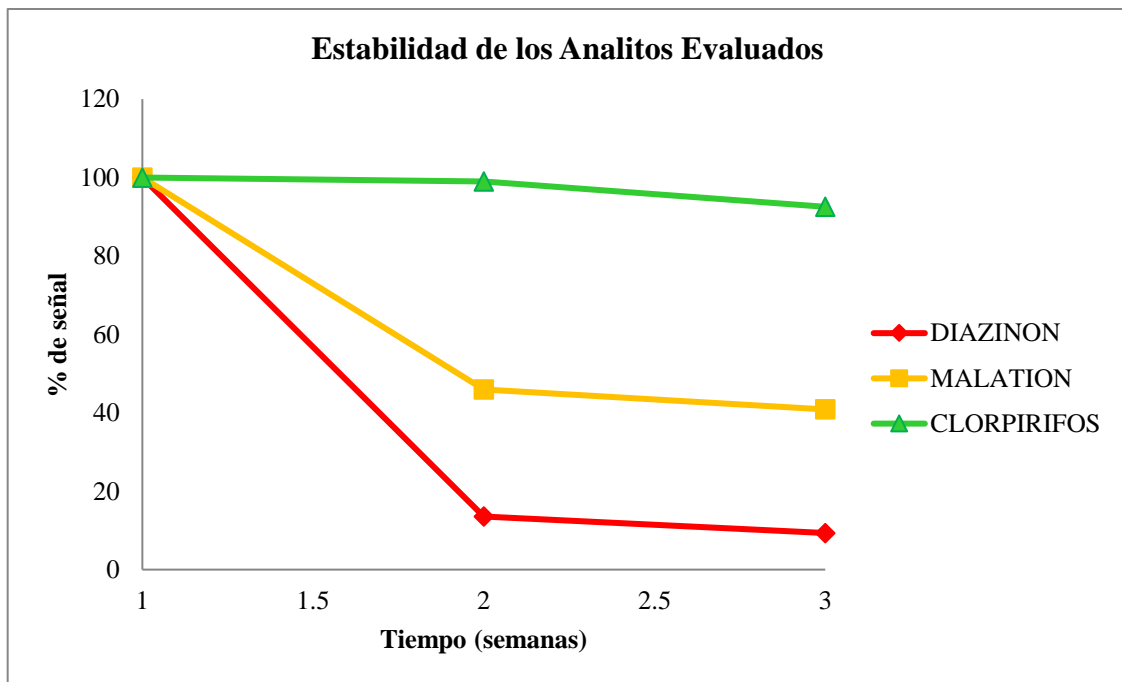


Gráfico 1. Estabilidad de los analitos en el tiempo

Tabla 3. Estabilidad de los Analitos evaluados			
Tiempo Semana	% de Señal detectado (promedio de lecturas semanales)		
	Diazinon	Malatión	Clorpirifos
1	100	100	100
2	13.5518	45.95757	99.00859
3	9.334813	40.85436	92.53139

El estudio de la estabilidad confirma lo reportado en la literatura, el Diazinon es una sustancia muy lábil por lo que su análisis debe ser realizado con prontitud. En la tabla 3 se puede comparar con el Clorpirifos que dentro de su estructura tiene átomos halogenados, lo que le da mucha estabilidad, el diazinon suele descomponerse fácilmente en sus metabolitos.

El estudio cromatográfico se realizó en la modalidad de multiresiduos, por lo tanto se presentan resultados de varios residuos de plaguicidas, en este caso cinco (5): Cadusafos, Terbufos, Diazinon, Malation, Clorpirifos. Se presentan en la tabla 4 los tiempos de retención de los plaguicidas estudiados.

Tabla 4. Tiempo de retención de los plaguicidas estudiados	
Plaguicida	Tiempo de retención (min)
Cadusafos	22.987
Terbufos	25.623
Diazinon	27.763
Malation	29.969
Clorpirifos	34.281

4.1.2. Especificidad

Se inyectó un blanco de matriz (figura 17), y el punto 1 de la curva de calibración (figura 18) por duplicado, se evaluó que las señales en el blanco no representarían un 30 % de la señal cromatográfica del analito en el punto 1 de la curva (0,1 mg/L). La selectividad se evalúa en función de la resolución de los picos, y debe ser mayor a 1,2.

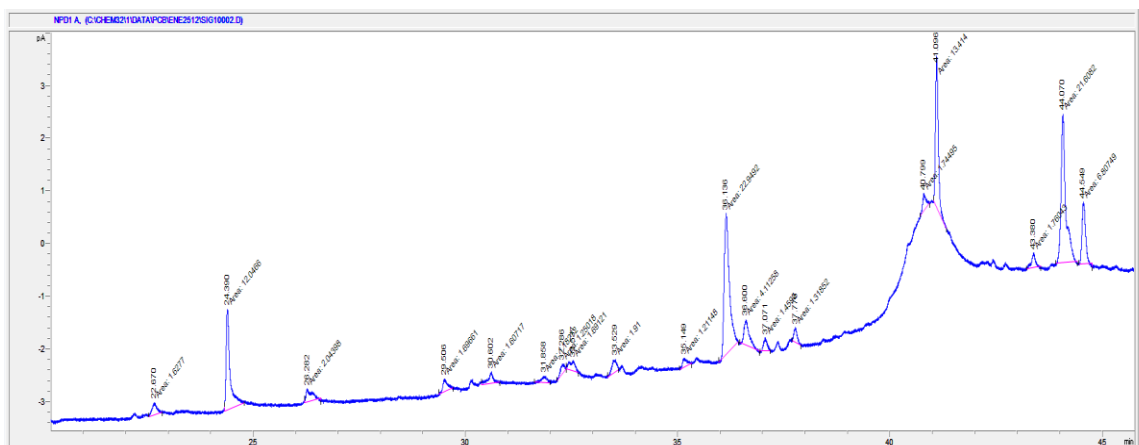


Figura 17. Cromatograma de blanco de suelo

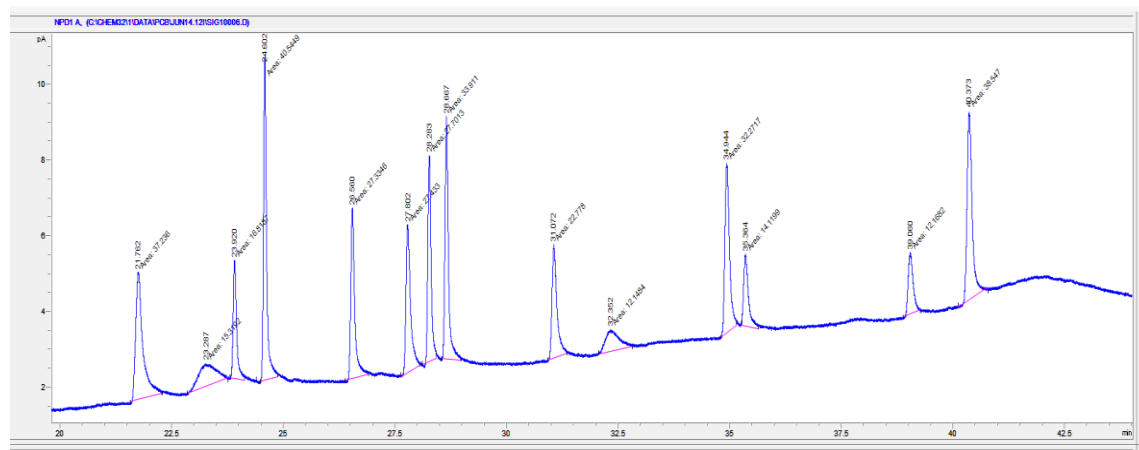


Figura 18. Cromatograma de Cadusafos, Terbufos, Diazinon, Malatión y Clorpirifos a una concentración de 0,1 mg/L.

En la tabla 5 se recogen los resultados de especificidad para los cinco plaguicidas estudiados. Se dice que el sistema es específico cuando la señal del blanco no supera el 30% de la señal del nivel más bajo de la curva de calibración. El gráfico 2 muestra que las lecturas (Absolutas) del blanco no superan el 30 % de la señal debida al primer punto de la curva de calibración.

Tabla 5. Especificidad de los analitos estudiados								
Analito		Area Blanco E1	Area Blanco E2	Prom Blanco	Area N1 E1	Area N1 E2	Prom N1	30 % señal N1
1	Cadusafos	1.6277	2.01765	1.822675	38.45675	37.23595	37.84635	11.353905
2	Terbufos	12.04657	14.69157	13.36907	40.639	40.54491	40.591955	12.1775865
3	Diazinon	2.04398	3.47844	2.76121	27.37478	27.43304	27.40391	8.221173
4	Malation	1.69661	2.46786	2.082235	32.04696	33.91097	32.978965	9.8936895
5	Clorpirifos	1.91	1.15085	1.530425	15.37007	12.14836	13.759215	4.1277645

Especificidad de los analitos estudiados

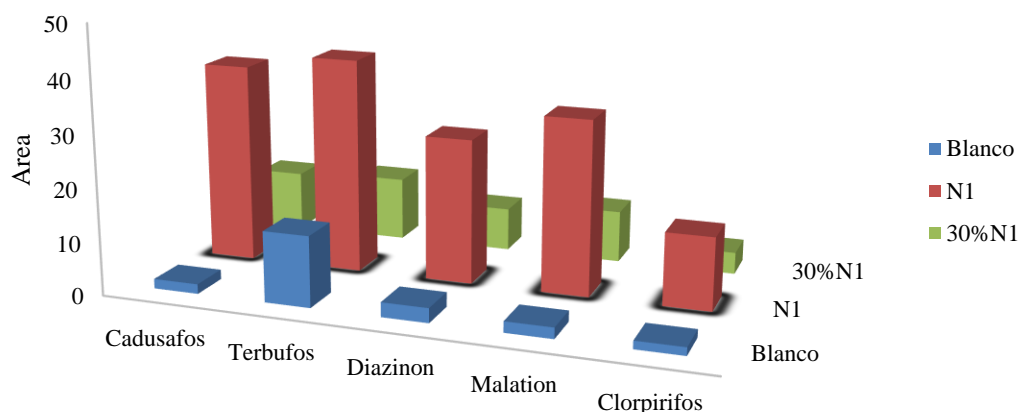


Gráfico 2. Especificidad de los analitos estudiados.

4.1.3. Curva de Calibración, límite de detección y límite de cuantificación

Se realizaron curvas de calibración de cinco niveles de clabrado (0,1; 0,25; 0,5; 1 y 2 mg/L respectivamente), cada una por triplicado para poder evaluar el límite de detección y el límite de cuantificación para cada plaguicida estudiado. Se presentan a continuación los cromatogramas de los niveles de calibrados para los analitos estudiados (figura 19 y 20).

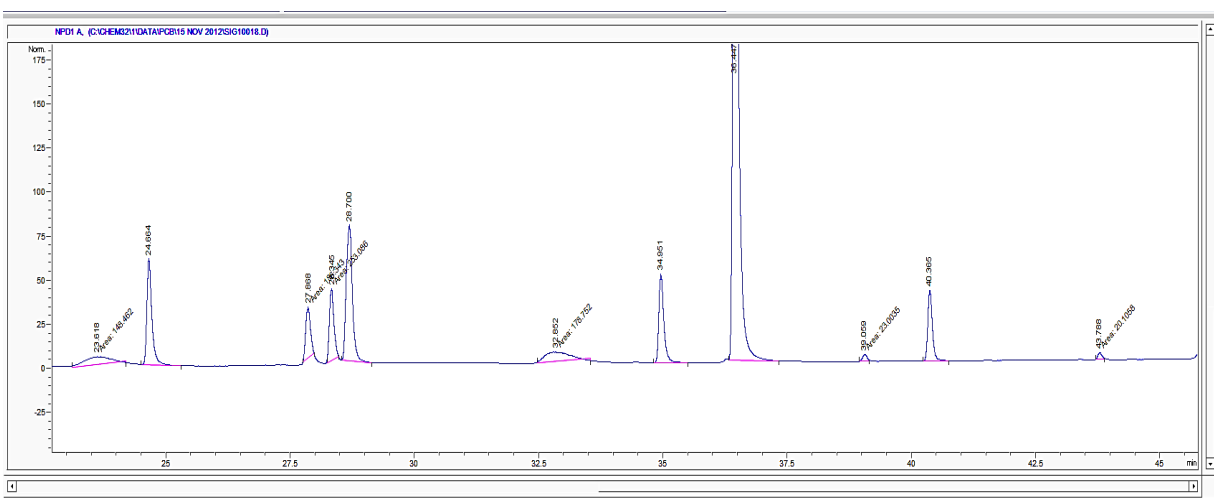


Figura 19. Cromatograma de nivel 1 de la curva de calibración, (0,1 mg/L)

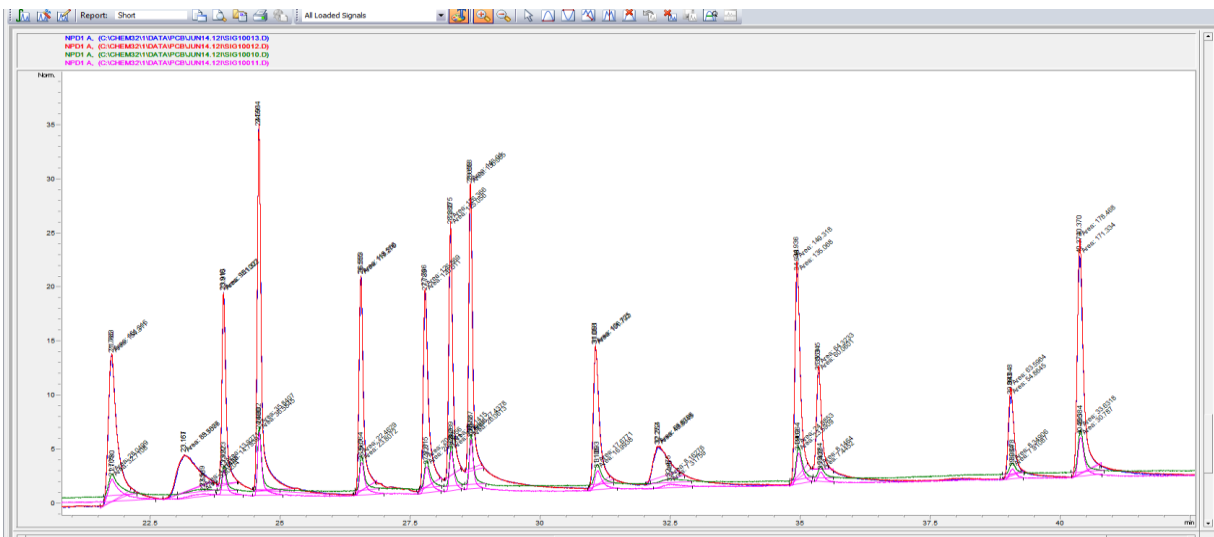


Figura 20. Cromatogramas superpuestos para los niveles 1, 3 y 5 de la curva de calibración de los plaguicidas estudiados (0,1 mg/L, 0,5mg/L y 2 mg/L respectivamente).

Las curvas de calibración se elaboraron a partir de áreas relativas promedio obtenidas de los cromatogramas para cada concentración establecida, estos resultados se recopilan en la tabla 6.

Tabla 6. Áreas relativas promedio de los plaguicidas estudiados					
CONCENTRACIÓN	CADUSAFOS	TERBUFOS	DIAZINON	MALATION	CLORPIRIFOS
0.10	2.04095563	0.20665529	0.250853242	0.03276451	0.22116041
0.25	2.76791809	1.26791809	2.401023891	0.2387372	1.09215017
0.50	4.82935154	3.41296928	5.597269625	2.16723549	2.97610922
1.0	7.03071672	7.50853242	8.696245734	3.39249147	4.74914676
2.0	19.3515358	16.4675768	21.62116041	9.57849829	12.940273

A continuación, se presentan los gráficos obtenidos para las curvas de calibración de los cinco plaguicidas estudiados, estos resultados fueron obtenidos a través del procesamiento de los datos con el programa RLIN (Leone 2006).

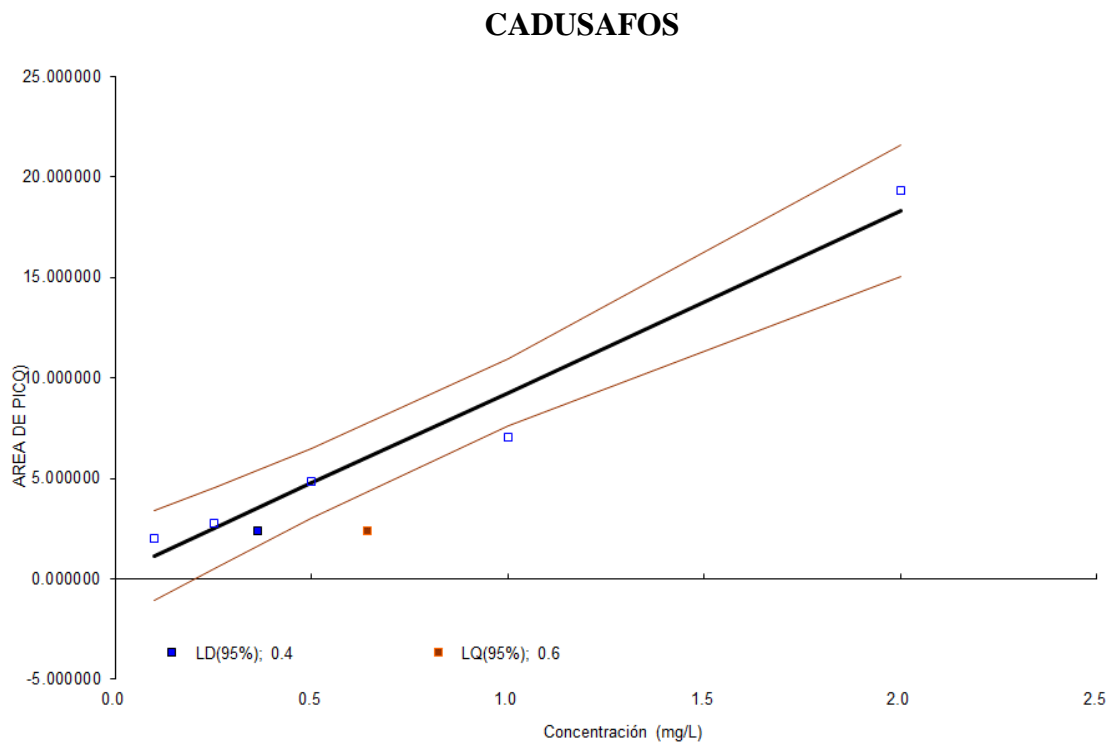


Gráfico 3. Curva de calibración para Cadusafos en matriz de suelo arcilloso

Tabla 7. Parámetros estadísticos para la cuantificación de Cadusafos en matriz de suelo arcilloso

C.V. (m)	Límite de Detección
11,01 %	0,4 mg/L
s (m)	Límite de Cuantificación
± 0,9951	0,6 mg/L

TERBUFOS

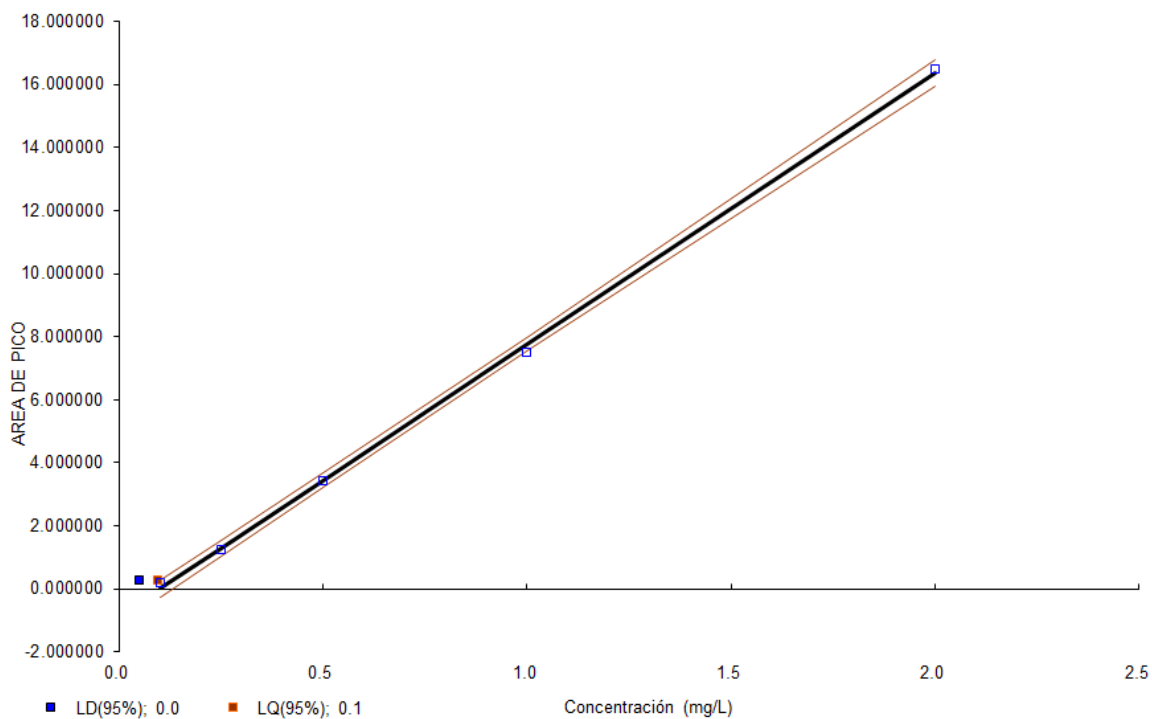


Gráfico 4. Curva de calibración para Terbufos en matriz de suelo arcilloso

Tabla 8. Parámetros estadísticos para la cuantificación de Terbufos en matriz de suelo arcilloso.

C.V. (m)	Límite de Detección
1,47 %	0,05 mg/L
s (m)	Límite de Cuantificación
± 0,1264	0,1 mg/L

DIAZINON

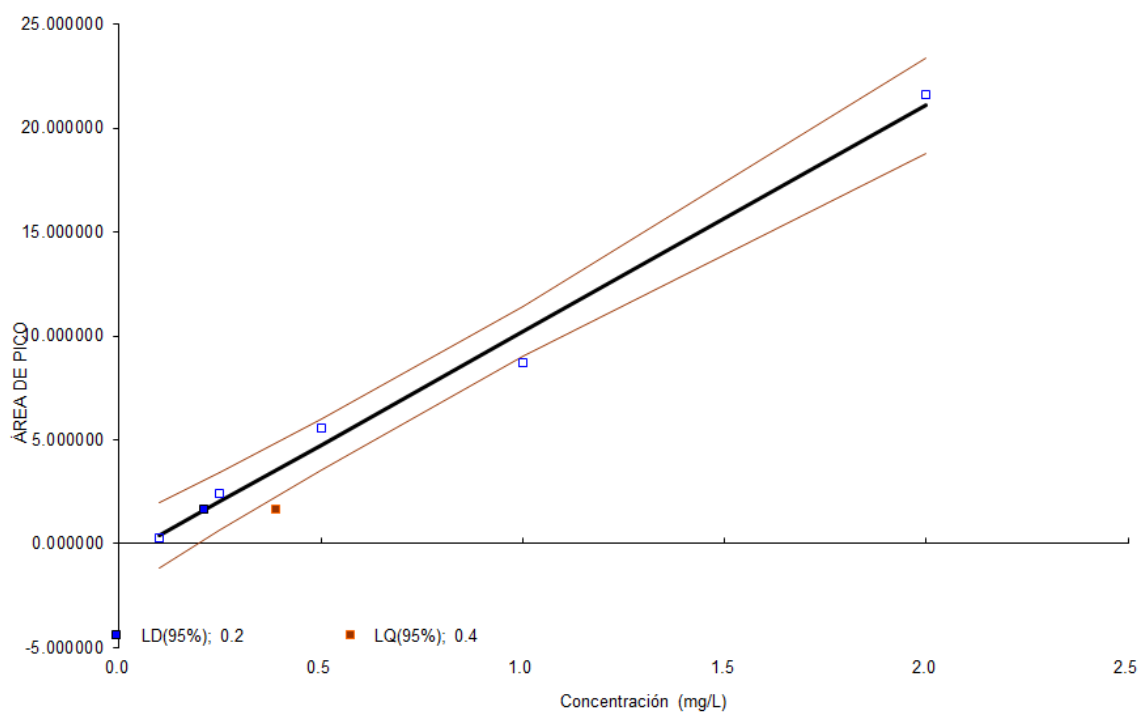


Gráfico 5. Curva de calibración para el Diazinon en matriz de suelo arcilloso

Tabla 9. Parámetros estadísticos para la cuantificación de Diazinon en matriz de suelo arcilloso

C.V. (m)	Límite de Detección
6,38 %	0,2 mg/L
s (m)	Límite de Cuantificación
± 0,6942	0,4 mg/L

MALATION

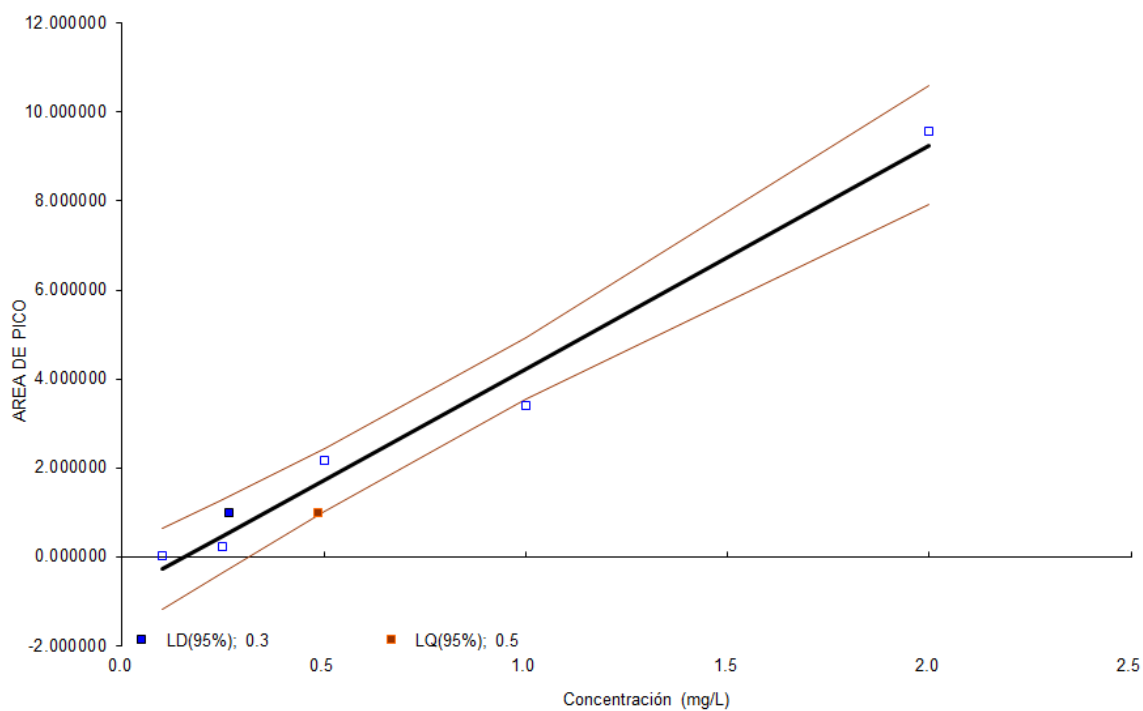


Gráfico 6. Curva de calibración para el Malatión en matriz de suelo arcilloso

Tabla 10. Parámetros estadísticos para la cuantificación de Malatión en matriz de suelo arcilloso.

C.V. (m)	Límite de Detección
8.08 %	0,3 mg/L
s (m)	Límite de Cuantificación
± 0,4055	0,5 mg/L

CLORPIRIFOS

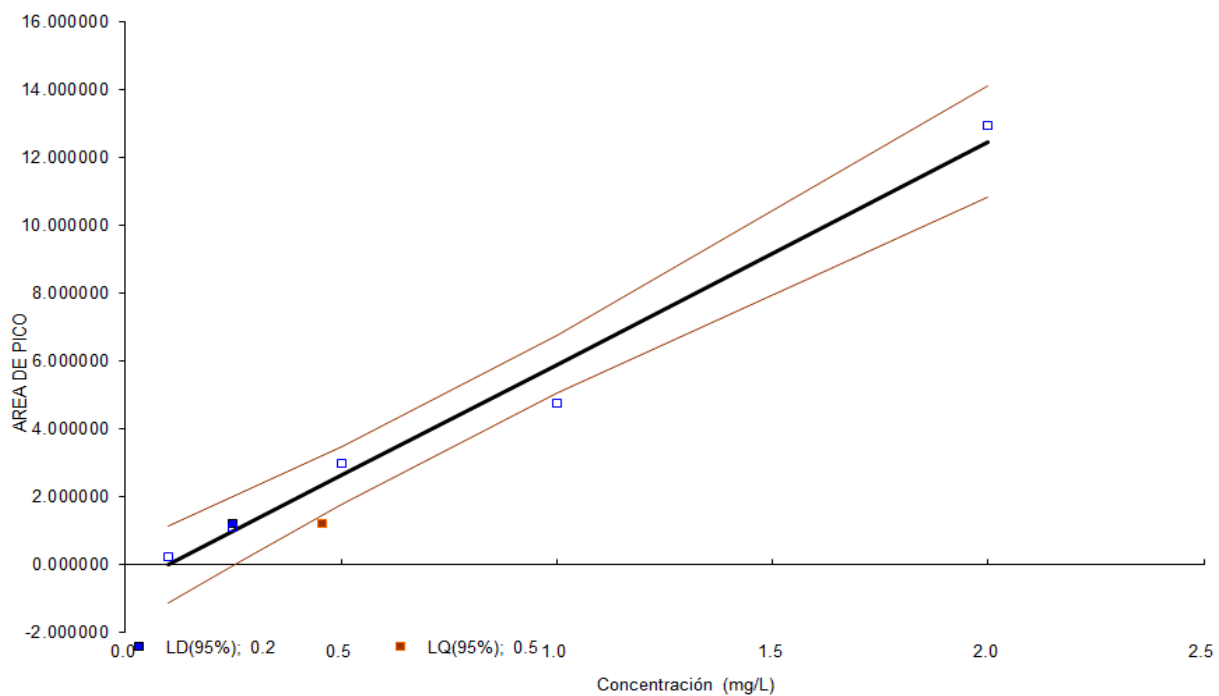


Gráfico 7. Curva de calibración para el Clorpirifos en matriz de suelo arcilloso

Tabla 11. Parámetros estadísticos para la cuantificación de Clorpirifos en matriz de suelo arcilloso.

C.V. (m)	Límite de Detección
7,56 %	0,2 mg/L
s (m)	Límite de Cuantificación
± 0.4967	0,5 mg/L

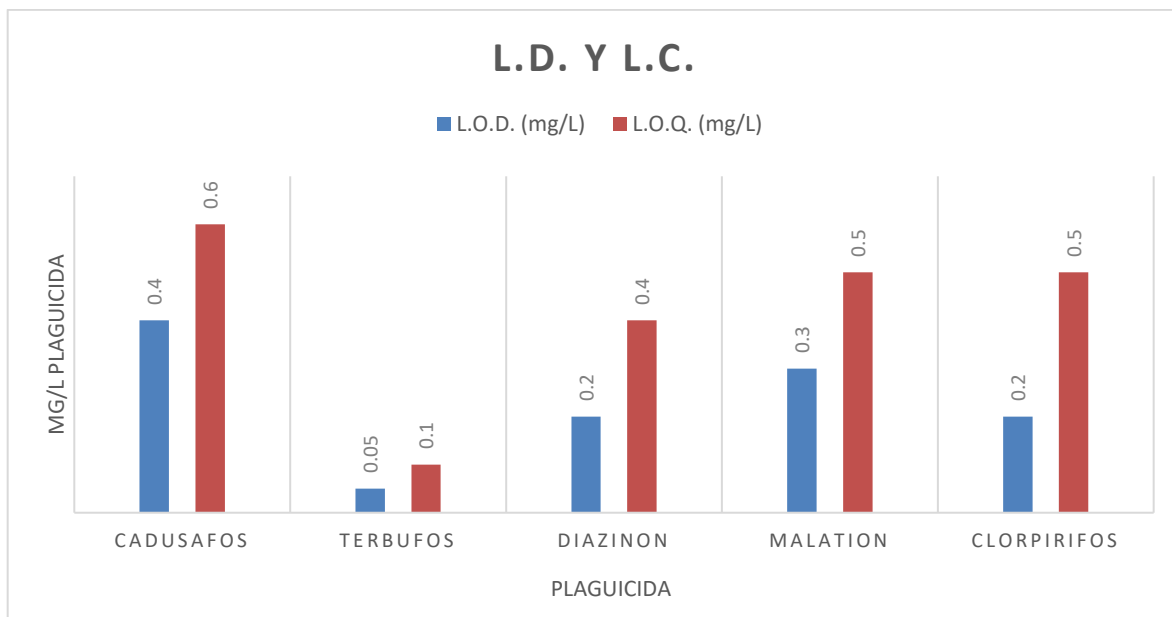


Gráfico 8. Comparativo de los límites de detección (L.D.) y cuantificación (L.C.) para los plaguicidas estudiados

Los límites de cuantificación de los plaguicidas estudiados son aceptables, lo que nos indica una buena linealidad con coeficientes de variación alrededor del 30 %.

4.1.4. Recuperaciones

Los ensayos de recuperación se realizaron de acuerdo con la metodología planteada en el capítulo anterior. Se utilizó un suelo arcilloso blanco, libre de residuos de plaguicidas al cual se le añadió volumen suficiente de la mezcla de plaguicidas de manera que el extracto final tuviera una concentración de 1 mg/L de cada uno de los plaguicidas estudiados.

Tabla 12. Recuperaciones para una concentración de 1 mg/L para cada plaguicida estudiado, ensayo 1.

Ensayo 1	Analito	Área analito en matriz	Área Rel.	Área analito en solvente	Área Rel.	% Rec.Abs	% Rec. Rel.
1	Cadusafos	57920	2.609	46471	3.743	124.6	69.7
2	Terbufos	68502	3.085	40038	3.225	171.1	95.7
3	Diazinon	55142	2.483	39460	3.179	139.7	78.1
4	Malation	51207	2.306	31083	2.504	164.7	92.1
5	Clorpirifos	41607	1.874	26391	2.126	157.7	88.1
6	TPP (EI)	22204	1.0	12414	1.0	178.9	100.0

Tabla 13. Recuperaciones para una concentración de 1 mg/L para cada plaguicida estudiado, ensayo 2.

Ensayo 2	Analito	Área analito en matriz	Área Rel.	Área analito en solvente	Área Rel.	% Rec.Abs	% Rec. Rel.
1	Cadusafos	67484	2.463	57719	3.397	116.9	72.5
2	Terbufos	69780	2.547	53917	3.173	129.4	80.3
3	Diazinon	58457	2.134	50639	2.980	115.4	71.6
4	Malation	52407	1.913	43493	2.559	120.5	74.7
5	Clorpirifos	38882	1.419	39817	2.343	97.7	60.6
6	TPP (EI)	27395	1.000	16993	1.000	161.2	100.0

Tabla 14. Recuperaciones para una concentración de 1 mg/L para cada plaguicida estudiado, ensayo 3.

Ensayo 3	Analito	Área analito en matriz	Área Rel.	Área analito en solvente	Área Rel.	% Rec.Abs	% Rec. Rel.
1	Cadusafos	68495	2.606	57773	4.103	118.6	63.5
2	Terbufos	67189	2.556	46340	3.291	145.0	77.7
3	Diazinon	66732	2.539	46087	3.273	144.8	77.6
4	Malation	63906	2.431	40647	2.887	157.2	84.2
5	Clorpirifos	41613	1.583	31830	2.261	130.7	70.0
6	TPP (EI)	26283	1.000	14080	1.000	186.7	100.0

Tabla 15. Coeficientes de variación y desviación estándar promedio para los ensayos de recuperación.

Analito	Rec. Abs	σ	%CV	Rec. Rel	σ	%CV
	prom	Rec. abs	Rec Abs.	Prom	Rec rel	Rec. Rel
Cadusafos	120	4.1	3	69	4.61	7
Terbufos	149	21.1	14	85	9.72	11
Diazinon	133	15.7	12	76	3.61	5
Malation	147	23.7	16	84	8.69	10
Clorpirifos	129	30.1	23	73	14.01	19
TPP	176	13.0	7	100	0.00	0

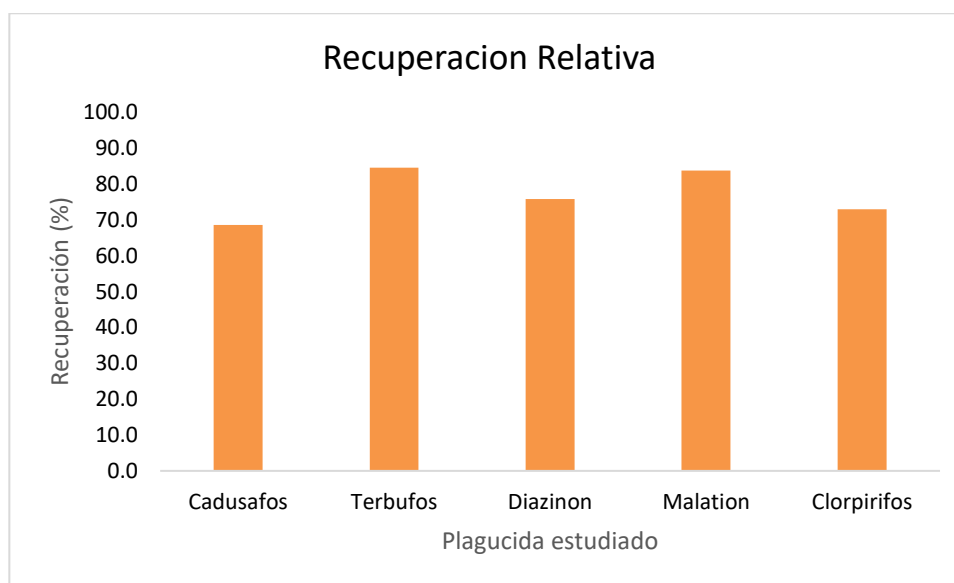


Gráfico 9. Recuperación relativa para los plaguicidas estudiados

En el estudio de recuperación de los analitos los resultados estuvieron arriba del 70 % demostrando la efectividad de la metodología de extracción.

4.2 ESTUDIO ELECTROQUÍMICO

En esta sección se presentan los resultados del estudio electroquímico del plaguicida Diazinon y la evaluación de parámetros electroquímicos que permiten la identificación y cuantificación de dicho plaguicida.

4.2.1. Parámetros para cuantificación del Diazinon

Para establecer los puntos de oxidación y/o reducción de la molécula de Diazinon se llevó a cabo una serie de experimentos en los que se analizó el mejor buffer para realizar las medidas, el mejor electrodo y la mejor velocidad de barrido. Una vez definidas estas variables se puede proceder a la búsqueda de la técnica electroanalítica más adecuada para la cuantificación de la molécula de interés. En los gráficos 10 al 16 se pueden observar las intensidades de corriente para los electrodos de oro, y carbono a diferentes pH y soluciones amortiguadoras estudiadas.

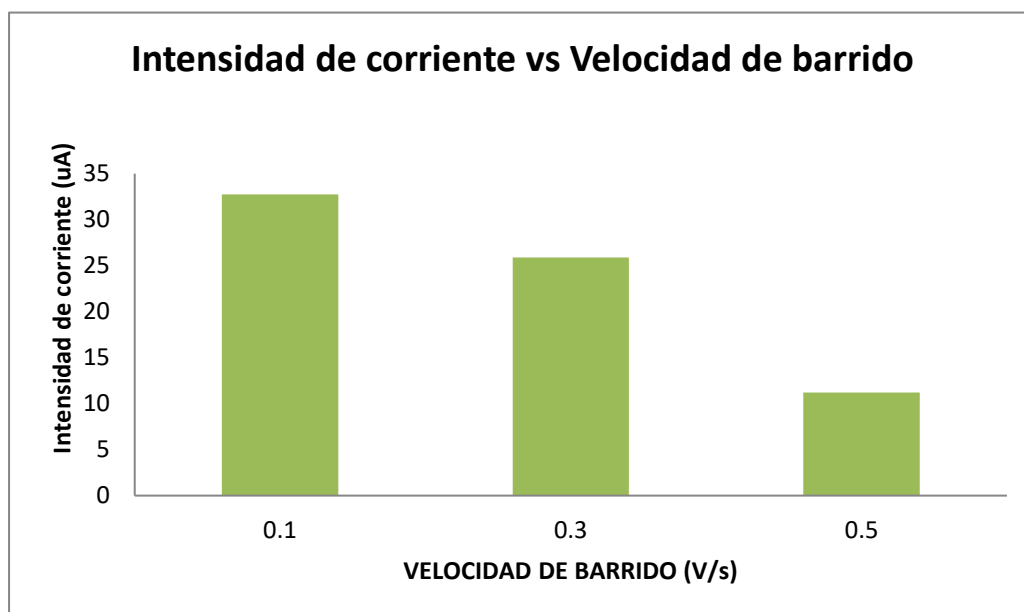


Gráfico 10. Intensidad de corriente para electrodo de oro a pH 6 en buffer Britton- Robinson.

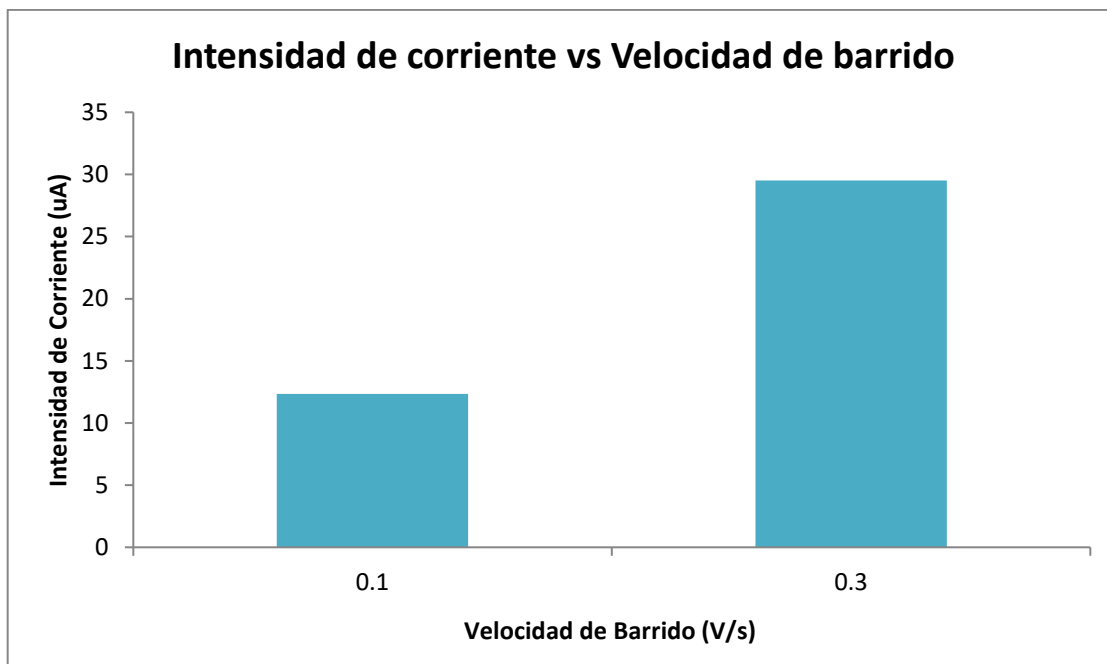


Gráfico 11. Intensidad de corriente para electrodo de oro a pH 6 en buffer Citrato

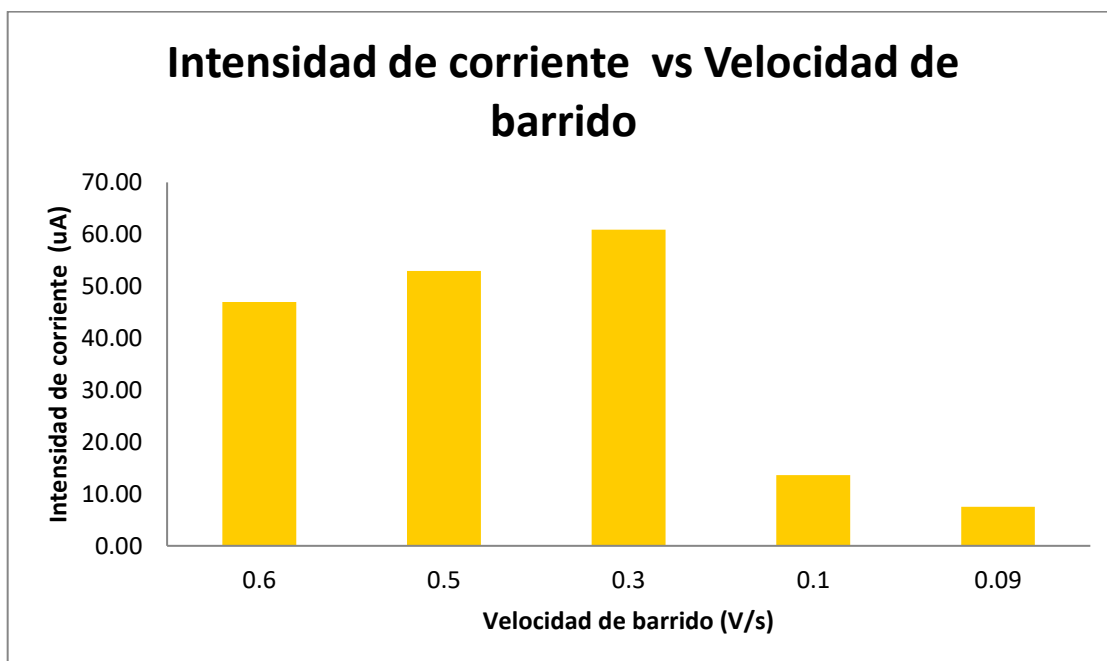


Gráfico 12. Intensidad de corriente para electrodo de oro a pH 9 en buffer Britton-Robinson.

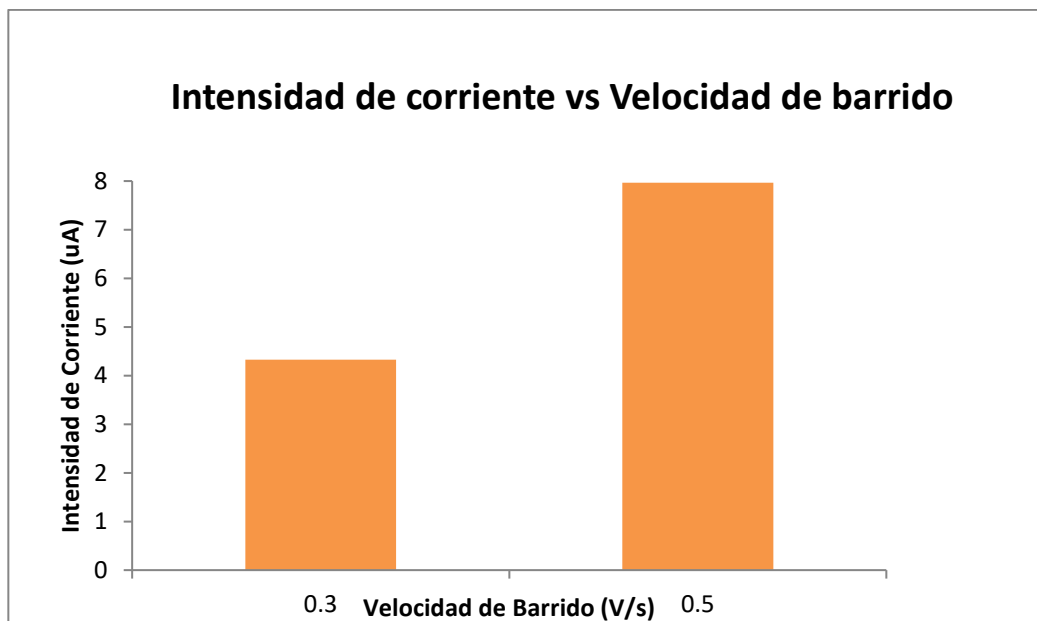


Gráfico 13. Intensidad de corriente para electrodo de Carbono a pH 6 en buffer Britton-Robinson.

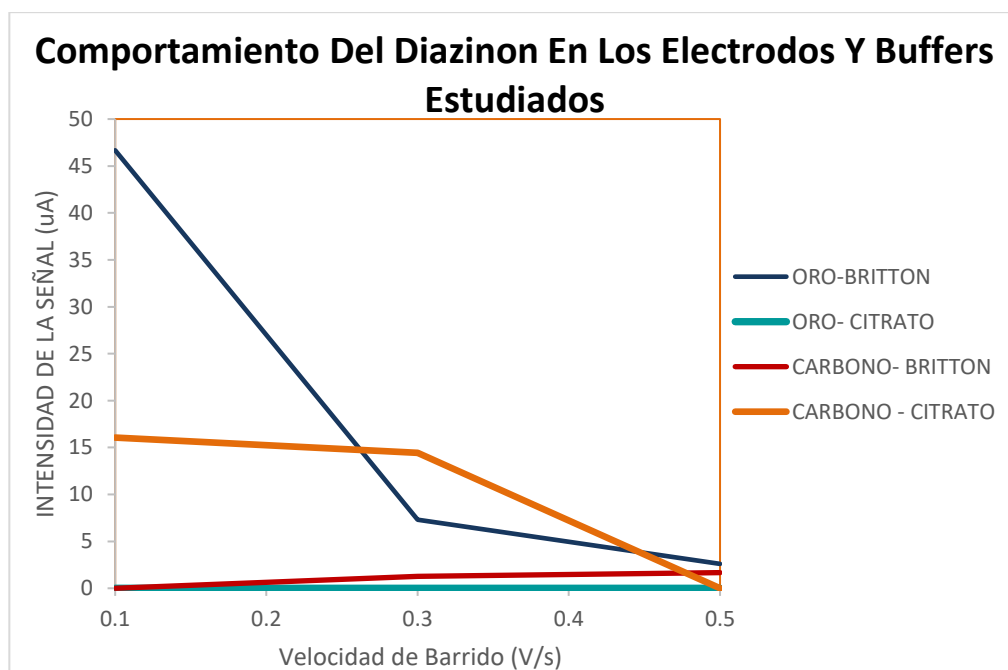


Gráfico 14. Comportamiento de los electrodos de Oro y Carbono

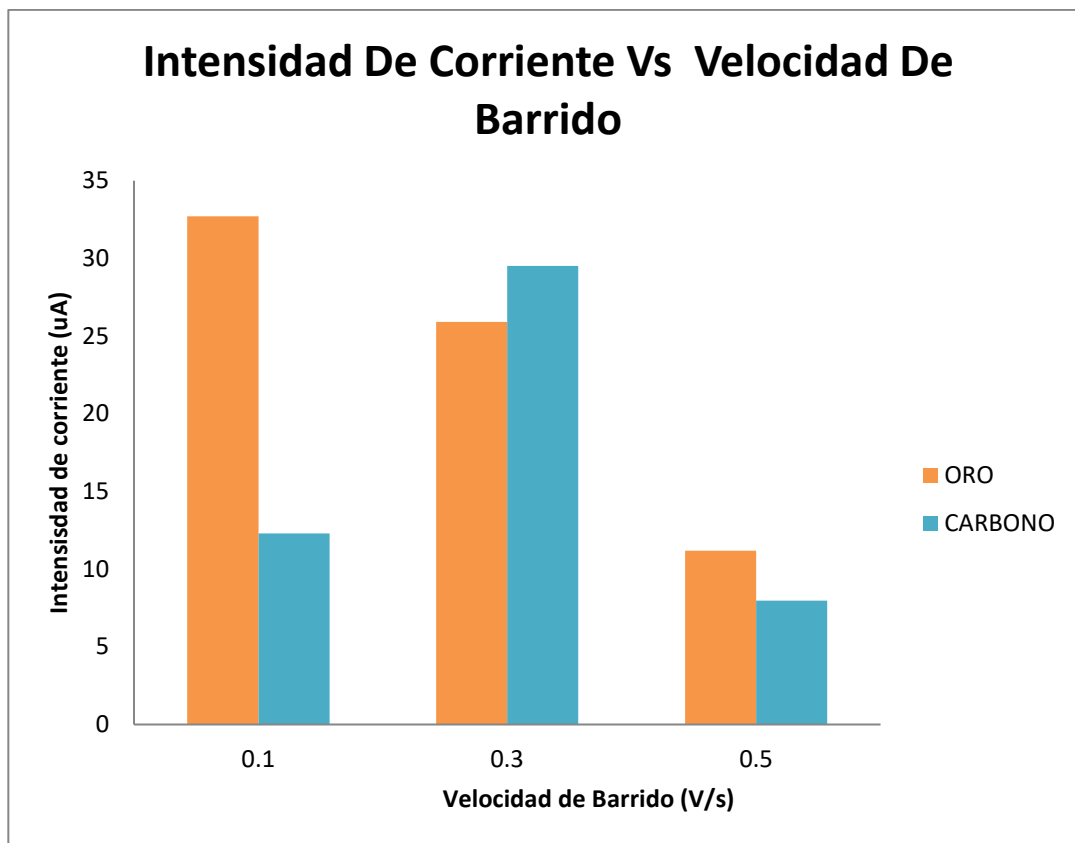


Gráfico 15. Comparativo de las señales obtenidas para los electrodos evaluados a las distintas velocidades estudiadas.

El electrodo con mayor intensidad de corriente promedio en las diferentes velocidades estudiadas fue el electrodo de oro, el electrodo de carbono no presenta lecturas estables, por lo que la descripción y cuantificación del analito se realizó en el electrodo de oro de acuerdo con los parámetros señalados en la tabla 16.

Tabla 16. Condiciones para voltametría cíclica

Electrodo: oro	
Buffer: britton robinson	
Pretreatment:	
Econd (v): 0.00	T cond (s): 0.0
Edep (v): 0.00	Tdep(s): 0.0
	Tequil (s):0.00
Measurment:	
E begin (v): 0.0	Srate:0.1
E vtx1 (v): 1.5	N scan (s): 1.0
E vtx2 (v): -1.5	
E step: (v): 0.01	T puls (ms): 10.0

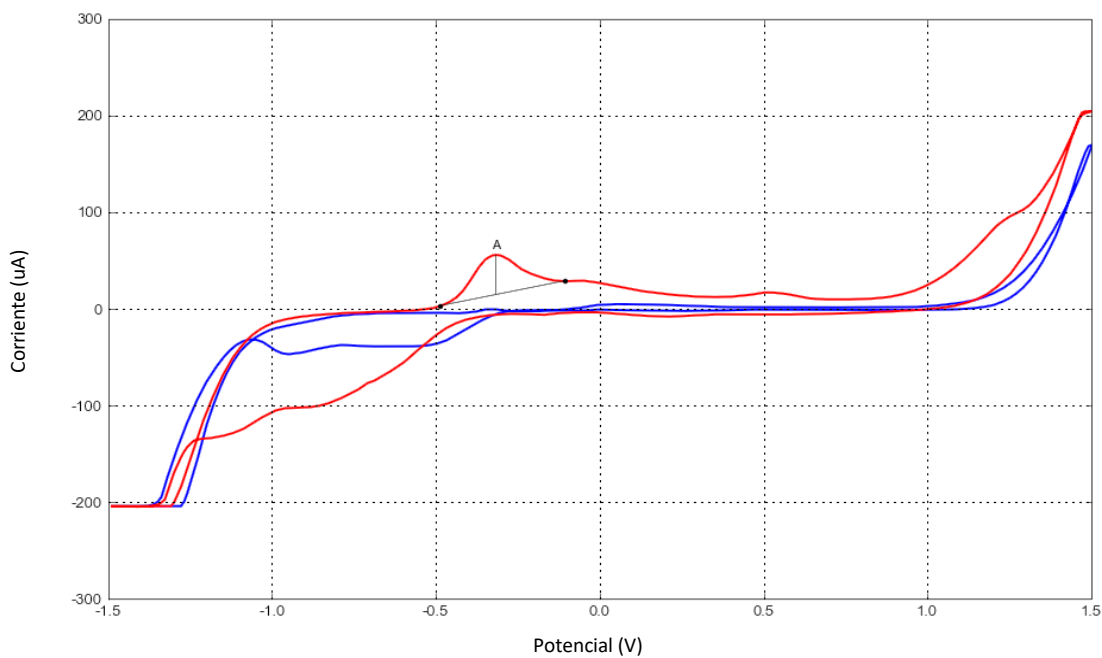


Figura 21. Voltamograma cíclico para Diazinon en electrodo de oro. Rojo: señal observada para Diazinon. Azul: señal de fondo

La Figura 21 representa el voltamograma cíclico para la respuesta de Diazinon en un electrodo de oro, como se observa, no aparece ningún otro pico significativo para la velocidad de barrido y electrodo utilizados, se observa una oxidación irreversible del analito.

4.2.2. Cuantificación electroquímica del Diazinon

Para la cuantificación del Diazinon se realizaron varios ensayos mediante voltametría de pulso diferencial de acuerdo con las condiciones establecidas en la tabla 17.

Tabla 17. condiciones de análisis por voltametría de pulso diferencial

Econd (V): 0.00	T Cond (S): 120.0
Edep (V): 0.00	Tdep(S): 0.25
	Tequil (S):0.00
Measurment:	
E Begin (V):-1.0	Srate:0.02
E End (V): 1.0	
E Step (V): 0.005	
E Pulso (V)	T Puls (Ms): 10.0
Buffer: Britton Robinson, pH:6	
Electrodo: Carbono	

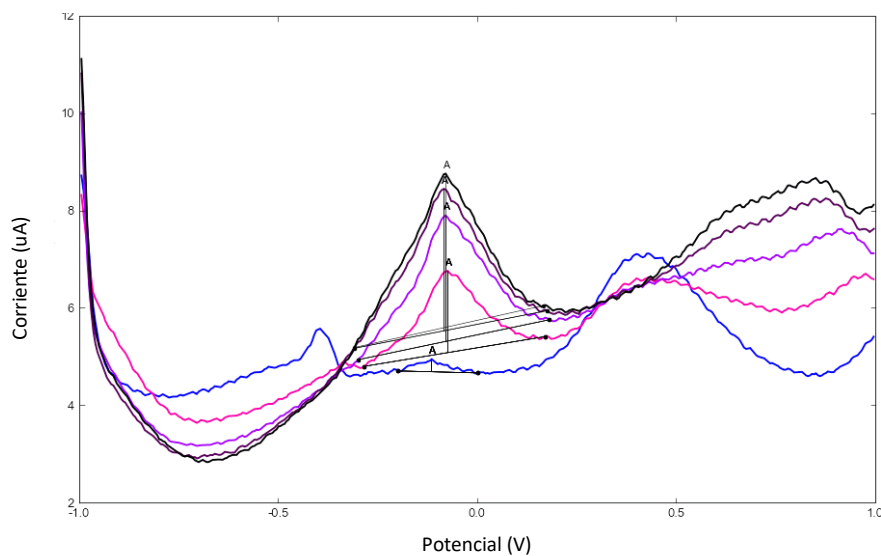


Figura 22. Curva de calibración de adiciones sucesivas de 100 uL de Diazinon en matriz de suelo arcilloso

En la figura 22 se puede observar la señal obtenida para la curva de calibración con adiciones sucesivas de 100 uL del patrón de Diazinon. Para estas condiciones de análisis en un electrodo serigrafiado de oro, el gráfico de la curva de calibración correspondiente se puede observar en el gráfico 16.

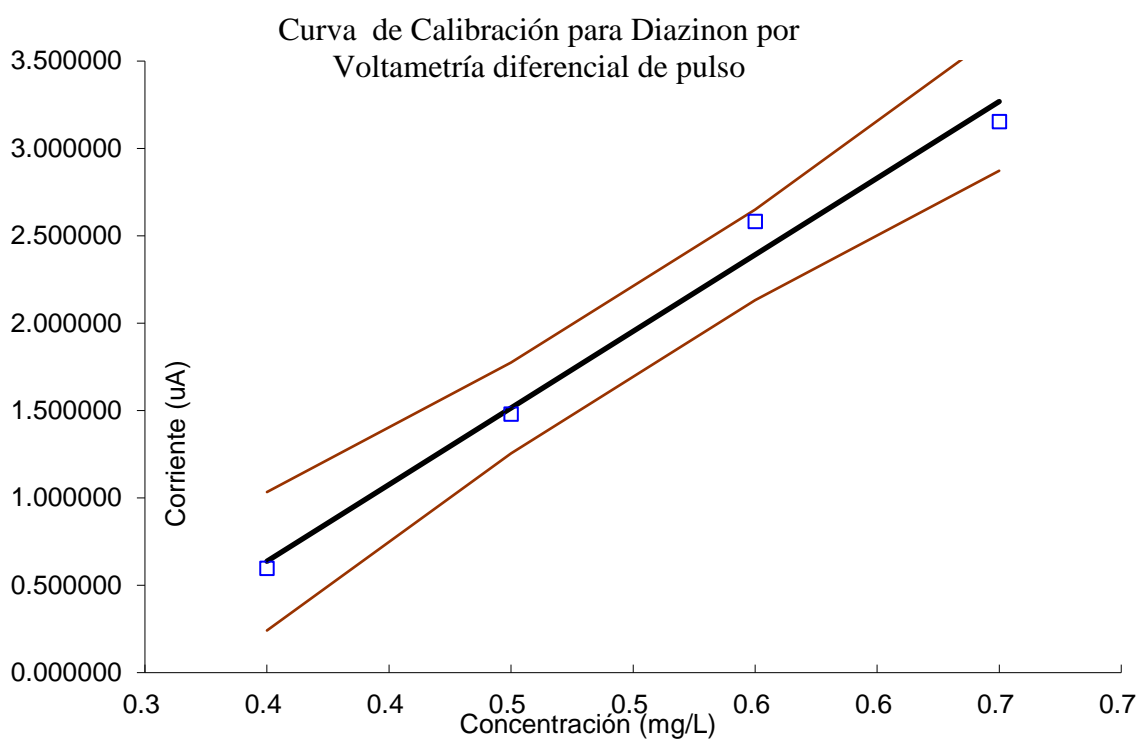


Gráfico 16. Curva de calibración para el Diazinon. Gráfico elaborado con el programa RLIN (Leone O. 2006)

Tabla 18. Límite de detección* y cuantificación* del método electroquímico**

Coefficiente de variación	Límite de Detección
8,26%	0,2 mg/L
	Límite de Cuantificación
	0,3 mg/L

**Límites calculados en matriz.*

*** Valores calculados a partir del programa RLIN*

4.2.3. Estudio de recuperación

Los experimentos de recuperación se realizaron preparando una muestra de suelo blanco a la cual se le añadió suficiente Diazinon para que el extracto final tuviera una concentración de 0,5 mg/L, este procedimiento se realizó por triplicado en 3 ensayos diferentes, se presentan los datos promediados y agrupados por ensayo, los resultados se muestran en la tabla 19.

Tabla 19. Ensayos de recuperación de Diazinon para una concentración de 0,5 mg/L en matriz de suelo

Diazinon	% Recuperación ensayo 1	% Recuperación ensayo 2	% Recuperación ensayo 3	% Recuperación Promedio	Desviación Estándar de la Recuperación	% CV de la Recuperación
	55	78	66	66	9.4	14.2

Las recuperaciones obtenidas se aproximan al 70 %, un valor esperado para experimentos de este tipo en donde se trabaja a niveles de trazas de acuerdo con las dispersiones de Horwitz estimadas para análisis de trazas en matrices complejas.

4.2.4. Análisis de muestras reales

En la tabla 20 se muestran los resultados obtenidos de muestras reales de suelo arcilloso muestreadas mediante la técnica de muestreo aleatorio estratificado. A este suelo muestreado le fue aplicado Diazinon como parte del cuidado del cultivo de piña.

Las muestras de suelo se trataron según el procedimiento descrito en el apartado 3.2. Puede observarse que solo es cuantificable la muestra del horizonte C que corresponde a la parte más baja del terreno muestreado.

Tabla 20. Niveles de Diazinon encontrados en muestras reales

<i>M</i>	<i>Horizonte muestreado</i>	<i>mg/L Diazinon</i>	<i>ng Diazinon/kg de Suelo</i>
<i>1</i>	<i>C</i>	<i>0.32</i>	<i>65.0</i>
<i>2</i>	<i>C</i>	<i><L.D.</i>	<i><L.C.</i>
<i>3</i>	<i>C</i>	<i><L.D.</i>	<i><L.C.</i>
<i>4</i>	<i>B</i>	<i><L.D.</i>	<i><L.D.</i>
<i>5</i>	<i>A</i>	<i><L.D.</i>	<i><L.D.</i>
<i>6</i>	<i>A</i>	<i><L.D.</i>	<i><L.D.</i>
<i>7</i>	<i>A</i>	<i><L.D.</i>	<i><L.D.</i>

<L.D.: menor al límite de detección. <L.C.: menor al límite de cuantificación

4.3. DISCUSION DE LOS RESULTADOS

La metodología de extracción implementada en esta investigación es además de novedosa, rápida y verde, ya que en su aplicación se reduce el tiempo de análisis contra técnicas clásicas de hasta un 92 % y el consumo de solventes en un 98 %; el material que requiere para su implementación es simple y puede llevarse a cabo en cualquier laboratorio básico de química, lo que hace más accesible la posibilidad de análisis de residuos de plaguicidas en áreas de acceso y/o capacidades limitadas en cuanto a equipamiento.

Se demuestra en el ensayo cromatográfico que el Diazinon es una molécula muy lábil la cual debe ser analizada con prontitud. Se propone que la cuantificación a través de la metodología presentada se realice al menos dentro de los tres (3) primeros días luego de la recolección de la muestra.

El método cromatográfico es específico ya que las señales de los plaguicidas superan la señal de blanco de suelo por lo que la cuantificación puede realizarse con la confianza de que no es un falso positivo. El método cromatográfico también es capaz de resolver los picos adecuadamente, de manera que la separación es eficiente y no hay solapamiento en las señales de los analitos.

El análisis estadístico demuestra que el método es capaz de detectar los plaguicidas estudiados en un análisis simultáneo (multiresiduo) en concentraciones tan bajas como 0,2 mg/L. La cuantificación requiere que la presencia de los analitos se encuentre en una concentración mínima de 0,5 mg/L, esto debido al efecto matriz que sufren estos compuestos en una matriz tan compleja como lo es el suelo.

Las recuperaciones obtenidas corresponden a los valores esperados para este tipo de análisis y se aproximan al 70 %, valor adecuado para los análisis a nivel de trazas.

En las voltametrías cíclicas realizadas para la identificación de Diazinon se observa un pico definido a -0,4 V en el barrido de oxidación no reversible por lo que se establece dicho punto como el punto de identificación del compuesto Diazinon bajo las condiciones de solvente y pH utilizadas.

Las curvas de calibración por adición de estándar presentan buena correlación, se realiza una curva para cada muestra ya que los electrodos son desechables y bajo las condiciones de laboratorio disponible, las lecturas entre curva y analito de electrodos diferentes tendrían diferencias estadísticamente significativas, por lo que se decidió realizar una lectura de curva junto a cada muestra todo con el mismo electrodo y respetando los límites de lectura de cada electrodo (6 lecturas).

Los límites de detección y cuantificación han sido calculados a partir de la repetibilidad de la señal del blanco (o matriz de la muestra) comparado con la señal producida por el estándar de Diazinon, se obtuvo que para Diazinon, el método desarrollado es capaz de detectar 0,2 mg/L y de cuantificar Diazinon en cantidades de hasta 0,3 mg/L.

Las recuperaciones obtenidas están dentro de los límites aceptados para el análisis de plaguicidas, de acuerdo con Horwitz, quien sustenta que la dispersión en los resultados de análisis de trazas es mayor que en el análisis de macrocomponentes y propone que se acepten recuperaciones alrededor del 70 % para plaguicidas y otros componentes traza, lo que permite utilizar este método para cuantificar muestras reales ya que el método de extracción es robusto; se atribuye la diferencia entre los recuperados a la sensibilidad que tiene el Diazinon para oxidarse con la luz, lo que obliga a analizarlo rápidamente.

En la cuantificación de muestras reales se puede observar que la concentración final obtenida se correlaciona con el horizonte muestreado de donde proviene dicha muestra. El horizonte A, corresponde a una muestra tomada en el punto más empinado del terreno de muestreo, el horizonte B, corresponde a una muestra tomada en el punto medio del terreno y el horizonte C corresponde a una muestra tomada en la parte más baja de terreno muestreado, lo que sustenta investigaciones realizadas anteriormente en donde se establece la rápida movilidad del Diazinon por escorrentía.

En los análisis realizados se encontraron niveles de Diazinon de 65,8 ug/kg de suelo lo que obedece a la distribución de este contaminante según los horizontes del terreno muestreado, ya que la muestra #1 corresponde a la parte más baja del terreno muestreado, lo que se explica debido a la posible lixiviación del plaguicida hacia la parte baja del terreno producto de las lluvias. Adicionalmente se sugiere que los niveles no se han detectado en los otros horizontes muestreados ya que la degradación es más rápida en estas áreas debido a la mayor radiación que recibe el compuesto en la parte superior del terreno muestreado.

Ambos métodos, tanto el cromatográfico como el voltamétrico, presentan recuperaciones adecuadas, por otra parte, los límites de cuantificación son bastante similares, aunque la técnica voltamétrica presenta un L.C. ligeramente menor, esto representa una gran ventaja en el uso de la electroquímica como método de cuantificación. Sin embargo, el método cromatográfico tiene la ventaja de que permite una detección multiresiduo simultánea de hasta 20 analitos diferentes.

Por otra parte, el análisis multiresiduo a través de técnicas electroquímicas es un poco más complejo ya que requiere el uso de otras tecnologías en el sensor que realiza la detección que permitan el aumento en la especificidad de este.

Se ha realizado una búsqueda sobre las regulaciones nacionales que se establecen en cuanto a los niveles de Diazinon en suelos; en la norma Panameña de suelos mediante decreto ejecutivo No. 2 (De 14 de enero de 2009) "Por el cual se establece la Norma Ambiental de Calidad de Suelos para diversos usos" establece en su artículo 4 que : Los titulares de las actividades relacionadas con el suelo, están obligados a remitir a la Autoridad Nacional del Ambiente (ANAM), en un plazo no superior a dos (2) años a partir de la promulgación de este Decreto Ejecutivo, un Informe Preliminar de Situación del Suelo que incluye los análisis químicos de pH y materia orgánica, y el análisis microbiológico de la actividad de la deshidrogenasa.

Según su uso, los suelos deberán ser caracterizados de acuerdo con el anexo b de este documento, que establece además los niveles permitidos de residuos para distintas sustancias, como se observa, el Diazinon no es una sustancia considerada dentro de la norma de calidad de suelos de la República de Panamá por lo que no se sugieren unos niveles límites en cuanto a su presencia en esta matriz. La FAO y la norma panameña para alimentos también establecen niveles máximos de residuos de Diazinon en distintos alimentos, sin embargo, no se incluye el suelo como posible matriz de análisis. Se ha encontrado que investigaciones realizadas por J.T. SMITH, et al. (1998) reportan niveles de Diazinon en suelo entre 0,35 mg/L y 0,45 mg/L y J. Raga (2011) reportan niveles de hasta 1 ug/g de suelo de Diazinon. Los niveles encontrados en el terreno muestreado son inferiores a los reportados en la literatura.

5.1. CONCLUSIONES

- Se ha implementado la técnica SAESC para extracción de plaguicidas en suelos, la cual es robusta y presenta muchas ventajas sobre las técnicas de extracción clásicas tanto en tiempo como en cantidad de reactivos.
- Se ha realizado un estudio cromatográfico para evaluar la técnica de extracción implementada, lo que ha permitido que el departamento de Sanidad Vegetal del MIDA obtenga una metodología confiable para el análisis de suelos, y así complementar la oferta de servicios a los productores nacionales.
- Se ha implementado un método electroquímico para la determinación de Diazinon en muestras de suelo en los Laboratorios del Departamento de Química Analítica de la Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y Tecnología de la Universidad de Panamá.
- Se ha realizado una caracterización preliminar del Diazinon a través de la técnica de Voltametría Cíclica y se obtienen los primeros análisis de Diazinon en suelos panameños mediante técnicas electroanalíticas.
- Los niveles de Diazinon encontrados son bajos, aunque la norma panameña no establece un límite máximo de residuo de Diazinon en suelos, por lo que no se puede establecer si el nivel es o no es peligroso. Niveles bajos de Diazinon pueden deberse a la rápida descomposición por efecto de la luz solar.
- Es difícil establecer si estos niveles son adecuados o no según alguna norma ya que internacionalmente no se considera, solo se evalúa la presencia de esta sustancia en alimentos y aguas.

- Parece interesante resaltar que debería considerarse la evaluación de los niveles de plaguicidas en suelo con movilidad y estabilidad demostrada, ya que esto podría ser una fuente adicional de contaminación de acuíferos y de fuentes de agua para potabilizar. Aun cuando el Diazinon pueda degradarse fácilmente, bajo ciertas circunstancias puede ser muy estable y significar esto un riesgo a la salud de la población.

5.2. RECOMENDACIONES

- Se recomienda ensayar extracciones con diferentes solventes y evaluar las recuperaciones obtenidas con el objetivo de mejorar el rendimiento del análisis.
- La tendencia actual es el análisis cromatográfico con detectores de masas, se recomienda el análisis multiresiduo de plaguicidas utilizando estos detectores de última generación.
- Se recomienda que se realicen estudios con el objetivo de alargar la vida útil del electrodo de análisis modificándose la superficie lo que podría también aumentar la sensibilidad del método.
- Existe la posibilidad de diseñar biosensores sobre las superficies modificadas de los electrodos serigrafados con el objetivo de hacerlos más específicos y sensibles.
- El estudio de la interacción electroquímica entre varios plaguicidas es de mucho interés porque permitiría el desarrollo de una metodología multiresiduo. Se recomienda evaluar estas interacciones y estudiar la selectividad del método electroquímico implementado.
- Se recomienda las mejoras a los espacios de laboratorios en donde se llevan a cabo investigaciones finales de grado de manera que factores como temperatura o humedad no interfieran en los resultados obtenidos.

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdulmahdi Chlahawi, B. Baby Narakathu, S. Emamian, B. Bazuin, M. Atashbar. (2018). Development of printed and flexible dry ECG electrodes. *Sensing and Bio-Sensing Research*, 20, 9-15. doi:10.1016/j.sbsr.2018.05.001
- Abu-Qare, y M. Abou-Donia, (2002). Sarin: health effects, metabolism, and methods of analysis. *Food and Chemical Toxicology*, 40(10), 1327-1333.
- Lourenço, F. Sánchez, R. Magalhães, D. Costa, W. Ribeiro, K. Bichinho, Giancarlo R. Salazar-Banda, y M. Araújo. (2014). Electrochemical oxidation and electroanalytical determination of xylitol at a boron-doped diamond electrode, *Talanta*, 119, 509-516.
- EPA. (1992). Preparation of Soil Sampling Protocols: Sampling Techniques and Strategies. (EPA/600/R-92-128). Recuperado de: https://cfpub.epa.gov/si/si_public_record_report.cfm?Lab=ORD&dirEntryId=35818
- Matsumura F., Mallory Boush G., Misato T.,(Eds). (1972). Effects of pesticides on fish and wildlife, *Environmental Toxicology of Pesticides*, Academic Press, 487-500.
- Sánchez-Brunete, A. Rodríguez, y J. Tadeo. (2003). Multiresidue analysis of carbamate pesticides in soil by sonication-assisted extraction in small columns and liquid chromatography. *Journal of chromatography A*, 1007, (1-2), 85-91.
- Sánchez-Brunete, R. Pérez, E. Miguel, y J. Tadeo. (1998). Multiresidue herbicide analysis in soil samples by means of extraction in small columns and gas chromatography with nitrogen-phosphorus and mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A*, 823(1-2), 17-24.
- Guziejewski, S. Skrzypek, W. (2015). Square wave adsorptive stripping voltammetric determination of diazinon in its insecticidal formulations. *Environmental monitoring and assessment*, 184(11), 6575-6582. doi:10.1007/s10661-011-2442-7
- Eisler R. (2000). Diazinon. *Handbook of chemical risk assessment*. Vol 2, 960-970. New York. Lewis Publishers.
- Turiel, A. Martín-Esteban, y J. Tadeo.(2006). Multiresidue analysis of quinolones and fluoroquinolones in soil by ultrasonic-assisted extraction in small columns and HPLC-UV. *Analytica Chimica Acta*, 562(1), 30-35.
- Cynthia G. Zoski (Ed). (2007). Edwards, A. Bergren J. Porter M. *Chemically Modified Electrodes*, *Handbook of Electrochemistry*, Elsevier, 295-327.

- Erdođdu, G. (2003). A sensitive voltametric method for the determination of Diazinon Insecticide. *Journal of Analytical Chemistry*, 58(6), 569–572. doi:10.1023/a:1024120320359
- Glavan, M. Kos, J. Božič, D. Drobne, J. Sabotič, A. Jemec Kokalj. (2018). Different response of acetylcholinesterases in salt- and detergent-soluble fractions of honeybee haemolymph, head and thorax after exposure to diazinon. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 205, 8-14.
- Howard Mark, Jerry Workman. (2018). Chapter 72 - Limitations in Analytical Accuracy: Part 1—Horwitz’s Trumpet. En *Chemometrics in Spectroscopy (Second Edition)*(491-495). USA: Academic Press.
- Rathore, Hamir. (2009). *Methods of and Problems in Analyzing Pesticide Residues in the Environment*. Doi:10.1201/9781420082470.ch2.
- Miller, M. Werber. (1979). Cyclic voltammetry of two Fe-ferredoxins from Halobacterium of the Dead sea. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*, 100(1-2), 103-110.
- Castro, C. Sánchez-Brunete, J. Tadeo. (2001). Multiresidue analysis of insecticides in soil by gas chromatography with electron–capture detection and confirmation by gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 918(2), 371-380.
- Espinosa J. (1984). Plaguicidas. *Revista Miscelánea*, 3, 10-20.
- Garcia J. (1999). Análisis preliminar del uso de plaguicidas en la Cuenca del Río Tempisque. *Revista Acta Académica, Universidad Autónoma de Centro América*, 25, 51-62.
- J. Koryta, J. Dvorak, L. Kavan. (1993). *Principles of electrochemistry* . Inglaterra: Wiley.
- J. Molieri. (1995). Plaguicidas, Salud y Desarrollo Sostenible en Centroamérica. Los Desafíos de la Salud Ambiental. En *Cuadernos de la Representación Ops/Oms En Panamá* (3, 1-76) Panamá: OPS/OMS.
- J. Rodríguez, Y. Lamoth. (1994). Contaminación de Alimentos de Origen Agrícola con Residuos de Plaguicidas en Panamá. En *Congreso Latinoamericano de Química (XXI, 1-10)* Panamá: Panamá.

- J. Smith, R. Chapman, C. Framptom. (1998). Soil degradation of diazinon and its effect on the emergence of apple leaf curling midge. Ecology and entomology group, Lincoln University, 1, 148-151.
- Jozef Uhrovčík. (2014). Strategy for determination of LOD and LOQ values – Some basic aspects. Talanta, 119, 178-180.
- J. Welsch, C. Songling, H. Buckley, N. Lehto, E. Eirian Jones, B. (2019). Case, How many samples? Soil variability affects confidence in the use of common agroecosystem soil indicators. Ecological Indicators, 102, 401-409.
- El-Gendy, E. Mosallam, N. Ahmed, N. Aly. (2018). Determination of glyphosate residues in Egyptian soil samples, Analytical Biochemistry, 557, 1-6.
- Mercado, S. Freille, J. Vaca-Pereira, M. Cuellar, L. Flores, E. Mutch, N. Olea, J. Arrebola. (2013). Serum concentrations of p,p'- dichlorodiphenyltrichloroethane (p,p'-DDE) in a sample of agricultural workers from Bolivia, Chemosphere, 91(10), 1381-1385.
- Arienzo, M. Sánchez-Camazano, M. Sánchez-Martín, T. Crisanto. (1994). Influence of exogenous organic matter in the mobility of diazinon in soils. Chemosphere, 29,1245- 1252.
- M. Badii, S. Varela. (2015). Insecticidas Organofosforados: Efectos sobre la Salud y el Ambiente. Cultura Científica y Tecnológica, 0(28). Recuperado de <http://revistas.uacj.mx/ojs/index.php/culcyt/article/view/375>.
- M. Čolović, D. Krstić, S. Petrović, A. Leskovac, G. Joksić, J. Savić, M. Laden Franko, P. Trebše, V. Vasić. (2010). Toxic effects of diazinon and its photodegradation products, Toxicology Letters, 193(1), 9-18.
- M. Li, L. Yuan-Ting , L. Da-Wei, L.Yi-Tao. (2012). Recent developments and applications of screen-printed electrodes in environmental assays—A review. Analytica Chimica Acta, 734, 31-44.
- M. Moreno Frías, A. Garrido Frenich, J. Martínez Vidal, M. Mateu Sánchez, F. Olea, N. Olea. (2001). Analyses of lindane, vinclozolin, aldrin, p,p'-DDE, o,p'-DDT and p,p'-DDT in human serum using gas chromatography with electron capture detection and tandem mass spectrometry, Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, 760(1), 1-15.
- M. Pravda. (2011). Analytical Methods, Electrochemical Analysis. En Encyclopedia of Dairy Sciences (1, 193-197) USA: Academic Press.

- Naciones Unidas. (2015). Objetivos de Desarrollo Sostenible 2030. 20-11-2018, de Naciones Unidas Sitio web: <https://www.un.org/sustainabledevelopment/es/objetivos-de-desarrollo-sostenible>.
- OPS-OMS. (2003). Educación en inocuidad de alimentos: Glosario de términos. . 20-11-2018, de OPS/OMS Sitio web: https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=10433:educacion-inocuidad-alimentos-glosario-terminos-inocuidad-dealimentos&Itemid=41278&lang=es.
- R. Gulaboski, E. Ferreira, C. Pereira, M. Cordeiro, A. Garrau, V. Lippolis, A. Silva. (2008). Coupling of Cyclic Voltammetry and Electrochemical Impedance Spectroscopy for Probing the Thermodynamics of Facilitated Ion Transfer Reactions Exhibiting Chemical Kinetic Hindrances, *J. Phys. Chem. C* 112,153-161.
- S. Karanth. (2014). Diazinon. En *Encyclopedia of Toxicology* (1, 55-56) USA: Academic Press.
- S.T, Narendran & S.N, Meyyanathan & Karri, Veera Venkata Satyanarayana Reddy. (2019). Experimental design in pesticide extraction methods: A review. *Food Chemistry*. 289. Doi:10.1016/j.foodchem.2019.03.045.
- S. Strekopytov, W. Brownscombe, C. Lapinee, D. Sykes, J. Spratt, T. Jeffries, C. Jones. (2017). Arsenic and mercury in bird feathers: Identification and quantification of inorganic pesticide residues in natural history collections using multiple analytical and imaging techniques, *Microchemical Journal*, 130, 301-309.
- T. Colborn, D. Dumanoski, J. Peterson Myers. (1997). *Nuestro Futuro Robado*. New York: Penguin Books.
- T. Lazarević-Pašti, A. Bondžić, I. Pašti, S. Mentus, V. Vasić. (2013). Electrochemical oxidation of diazinon in aqueous solutions via electrogenerated halogens Diazinon fate and implications for its detection, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 692, 40-45.
- T. Rębiś, A. Sobczak, M. Wierzchowski, A. Frankiewicz, A. Teżyk, G. Milczarek. (2018). An approach for electrochemical functionalization of carbon nanotubes/1-amino-9,10- anthraquinone electrode with catechol derivatives for the development of NADH sensors, *Electrochimica Acta*. 260,703-715. doi: 10.1016/j.electacta.2017.12.022
- Tuzimski, T., & Rejczak, T. (2016). Application of HPLC-DAD after SPE/QuEChERS with ZrO₂-based sorbent in d-SPE clean-up step for pesticide analysis in edible oils. *Food chemistry*, 190, 71–79. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.05.072>.

- V. Songa, J. Okonkwo. (2016). Recent approaches to improving selectivity and sensitivity of enzyme-based biosensors for organophosphorus pesticides: A review, *Talanta*, 155, 289-304.
- Volke T., Velasco J., De la Rosa D. (2005). Suelos contaminados por metales y metaloides. Instituto Nacional de Ecología. Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales. México. 1, 144 .
- W. Mengqiang, L. Zhang, D. Wang, C. Xiao, S. Zhang. (2008). Cathodic deposition and characterization of tin oxide coatings on graphite for electrochemical supercapacitors, *Journal of Power Sources*, 175(1), 669-674.
- W. Smyth, M. Smyth.(1987) *Electrochemical Analysis of Organic Pollutants*. Pure & Applied Chemistry,59(2), 245-256.
- X. Luo, S. Chen, B. Mai, Y. Zeng, G. Sheng, J. Fu. (2005). Distribution of organochlorine pesticides (OCPs) in surface sediments in Pearl River Delta and its adjacent coastal areas of South China Sea. *Huaj Kexue Xuebao*. 25 (9), 1272–1279.