

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL



**FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

PROYECTO DE TITULACIÓN

PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE:

**“MAGÍSTER EN GESTIÓN INTEGRAL DE LABORATORIOS DE
QUÍMICA”**

TEMA:

Evaluación de pesticidas organofosforados en matrices de agua de agroecosistemas del Norte de la Amazonía Ecuatoriana para la determinación del riesgo ecológico

AUTOR:

DAYANNA CAROLINA ÑACATO CHICAIZA

Guayaquil - Ecuador

2022

Resumen

Se evaluó la contaminación causada por pesticidas organofosforados (OPPs) en matrices de agua tomadas en 10 sitios de muestreo en el Norte de la Amazonía ecuatoriana, en las provincias de Napo y Sucumbíos, en áreas aledañas a cultivos de maíz y palma aceitera, respectivamente. Para la identificación y cuantificación de OPPs, se implementó un método mediante el uso de cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS). El tratamiento de muestra se realizó mediante extracción en fase sólida (SPE) utilizando un volumen de muestra de 500 mL. El método fue validado para 12 pesticidas organofosforados a las condiciones del laboratorio. Los porcentajes de recuperación obtenidos para cada analito se encuentran en un rango entre 70 y 130%. Los residuos de pesticidas detectados fueron: clorpirifos (SH-1=0.017 µg/L; SH-3=0.0192 µg/L), profenofos (SH-1=0.0983 µg/L; SH-3=0.0738 µg/L), demeton-s-metil (SH-2= 0.0389 µg/L) y etión (SH-3=2.4855 µg/L). Las concentraciones detectadas de residuos de pesticidas en el agua natural de los sitios de muestreo están por debajo del valor del límite máximo de residuos (LMR) aceptado para el agua potable (0,1 µg/L) según la FAO/OMS, a excepción del etión. Se evaluó el riesgo ecológico para especies centinela como peces, invertebrados acuáticos y algas. La concentración de etión en el punto SH-3 representa un alto riesgo ecológico para invertebrados acuáticos cuyo HQ calculado fue 4438.38, seguido del clorpirifos con un valor de 9.19. Para el resto de pesticidas y especies centinelas, los valores de HQ fueron menores a 1, lo que indica que existe un bajo riesgo ecológico.

Palabras clave: Contaminación, pesticidas organofosforados, cromatografía de gases, espectrometría de masa, extracción en fase sólida, validación, riesgo ecológico.

Abstract

Contamination caused by organophosphorus pesticides (OPPs) was evaluated in water matrices taken from 10 sampling sites in the northern Ecuadorian Amazon, in the provinces of Napo and Sucumbíos, in areas surrounding corn and oil palm plantations, respectively. For the identification and quantification of OPPs, a method using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) was implemented. Sample treatment was performed by solid phase extraction (SPE) using a sample volume of 500 mL. The method was validated for 12 organophosphorus pesticides at laboratory conditions. The recovery percentages obtained for each analyte ranged from 70 to 130%. The pesticide residues detected were: chlorpyrifos (SH-1=0.017 µg/L; SH-3=0.0192 µg/L), profenofos (SH-1=0.0983 µg/L; SH-3=0.0738 µg/L), demeton-s-methyl (SH-2= 0.0389 µg/L) and ethion (SH-3=2.4855 µg/L). The detected concentrations of pesticide residues in the natural water of the sampling sites are below the accepted maximum residue limit (MRL) value for drinking water (0.1 µg/L) according to FAO/WHO, with the exception of ethion. The ecological risk to sentinel species such as fish, aquatic invertebrates and algae was assessed. The concentration of ethion at point SH-3 represents a high ecological risk for aquatic invertebrates whose calculated HQ was 4438.38, followed by chlorpyrifos with a value of 9.19. For the rest of the pesticides and sentinel species, the HQ values were less than 1, indicating a low ecological risk.

Keywords: Contamination, organophosphorus pesticides, gas chromatography, mass spectrometry, solid phase extraction, validation, ecological risk.

DEDICATORIA

A mi familia y amigos

AGRADECIMIENTO

A Dios, por brindarme la sabiduría y la perseverancia para cumplir con este programa de maestría.

A mi familia y amigos que me brindaron su apoyo incondicional.

Al Laboratorio Nacional de Referencia de Agua y al Laboratorio de Productos Naturales de la URAI, que me permitieron usar las instalaciones y equipos para el desarrollo experimental de la investigación.

A los docentes de la ESPOL por compartir su conocimiento.

DECLARACIÓN EXPRESA

La responsabilidad por los hechos y doctrinas expuestas en este Proyecto de Titulación, me corresponde exclusivamente y ha sido desarrollado respetando derechos intelectuales de terceros conforme las citas que constan en el documento, cuyas fuentes se incorporan en las referencias o bibliografías. Consecuentemente este trabajo es de mi total autoría. El patrimonio intelectual del mismo, corresponde exclusivamente a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL.

En virtud de esta declaración, me responsabilizo del contenido, veracidad y alcance del Trabajo de Titulación referido.

Dayanna Carolina Ñacato Chicaiza

TRIBUNAL DE GRADUACIÓN

PhD. Joel Vielma
PRESIDENTE

PhD. Joan Vera
TUTOR

MSc. Nadia Flores
DOCENTE EVALUADOR

ABREVIATURAS O SIGLAS

GC: Cromatografía de gases
MS: Espectrometría de masas
OPPs: Pesticidas Organofosforados
FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
OMS: Organización Mundial de la Salud
DL: Dosis Letal
OCLP: Pesticida Organoclorado
MTBE: Metil ter-butil éter
PTFE: Politetrafluoroetileno
LC: Cromatografía Líquida
HPTLC: Cromatografía en capa fina de alto rendimiento
FID: Detector de Ionización de Flama
TCD: Detector de Conductividad Térmica
AED: Detector de Emisión Atómica
FPD: Detector Fotométrico de Flama
ERE: Evaluación del Riesgo Ecológico
ESPAC: Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua
MAE: Ministerio del Ambiente de Ecuador
EI: Ionización por electrones
NIST: Instituto Nacional de Estándares y Tecnología
INIAP: Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias
LC₅₀: Concentración Letal 50
EC₅₀: Concentración Efectiva 50
LMR: Límite Máximo de Residuos
PNEC: Concentración Prevista sin efecto
MEC: Concentración Ambiental Medida
HQ: Coeficientes de Riesgo

TABLA DE CONTENIDO

CAPÍTULO 1	15
1. INTRODUCCIÓN	15
1.1 Antecedentes.....	16
1.2 Descripción del problema	17
1.3 Objetivos.....	19
1.3.1 Objetivo general	19
1.3.2 Objetivos específicos	19
1.4 Hipótesis.....	19
1.5 Alcance	20
CAPÍTULO 2	21
2. MARCO TEÓRICO.....	21
2.1 Agroecosistema	21
2.2 Agricultura en Ecuador	22
2.3 Expansión de la frontera agrícola	22
2.4 Contaminación del agua	22
2.5 Pesticidas	23
2.5.1 Clasificación	23
2.6 Pesticidas organofosforados (OPPs).....	24
2.6.1 Clasificación	25
2.6.2 Toxicidad.....	25
2.6.3 Propiedades fisicoquímicas.....	25
2.6.4 Degradación.....	26
2.6.5 Ejemplos de OPPs y su modo de acción	27
2.7 Métodos de extracción de pesticidas.....	30
2.7.1 Extracción líquido-líquido	30
2.7.2 Extracción líquido-sólido o Extracción en Fase Sólida (SPE)	31
2.8 Métodos analíticos para la determinación de OPPs	32
2.9 Cromatografía de gases	32
2.9.1 Columnas cromatográficas.....	34
2.9.2 Inyección de muestra	35
2.9.3 Detectores.....	35

2.10	Espectrometría de masas.....	36
2.11	Validación de métodos	37
2.11.1	Parámetros de calidad	37
2.11.2	Características de desempeño	38
2.12	Evaluación ambiental	40
2.13	Evaluación del riesgo ecológico	40
CAPÍTULO 3		42
3.	METODOLOGÍA.....	42
3.1	Área de estudio y muestreo	43
3.2	Métodos y materiales.....	45
3.3	Procedimiento.....	46
3.3.1	Toma de muestras	46
3.3.2	Preparación de la solución stock y estándares de calibración	46
3.3.3	Extracción SPE (fuera de línea):.....	47
3.3.4	Análisis GC-MS.....	47
3.4	Estudio de validación del método	48
3.4.1	Estudio del blanco. Selectividad.....	49
3.4.2	Linealidad.....	49
3.4.3	Estudio del efecto matriz	49
3.4.4	Límite de detección y límite de cuantificación	50
3.4.5	Precisión	50
3.4.6	Veracidad	50
3.4.7	Análisis de muestras	51
3.5	Tratamiento de datos.....	51
CAPÍTULO 4		52
4.	RESULTADOS	52
4.1	Identificación de los OPPs mediante la técnica de GC-MS	52
4.2	Estudio de validación del método	53
4.2.1	Blancos. Selectividad	53
4.2.2	Linealidad.....	55
4.2.3	Efecto matriz	60
4.2.4	Límites de detección y cuantificación.....	67
4.2.5	Precisión	68

4.2.6 Veracidad	78
4.3 Análisis de las muestras	82
4.4 Evaluación del riesgo ecológico.....	83
CAPÍTULO 5	87
5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	87
5.1 Conclusiones	87
5.2 Recomendaciones	88
6. Referencias	1
7. Apéndices y anexos	4

LISTADO DE FIGURAS

Figura 2.1. Agroecosistema	21
Figura 2.2. Estructura general de un sistema agrícola y su relación con los sistemas externos (según Briggs y Cortney 1985).....	21
Figura 2.3. Clasificación de los plaguicidas	24
Figura 2.4. Estructura general de los OPPs.....	25
Figura 2.5. Esquema de un cromatógrafo de gases	33
Figura 3.1. Sitios de muestreo a lo largo del río Napo en las provincias de Napo y Sucumbíos	44
Figura 4.1. Cromatograma del estándar mix de OPPs obtenido por GC-MS en modo SCAN.....	52
Figura 4.2. Comparación de blancos de muestra y estándares de OPPs. Las líneas de colores representan a: negra -> blanco de muestra (agua de río), rosa -> blanco de reactivo (gas de arrastre), azul -> blanco de muestra (agua desionizada), naranja -> estándar de OPPs en solvente, verde -> muestra fortificada.	54
Figura 4.3. Curvas de calibración de los estándares de OPPS	58
Figura 4.4. Gráfico de residuos para cada OPP de las curvas de calibración con estándar.....	60
Figura 4.5. Curvas de calibración de muestras fortificadas con OPPs	62
Figura 4.6. Gráfica de residuos de las muestras fortificadas con OPPs	65
Figura 4.7. Efecto matriz de los OPPs	67

LISTADO DE TABLAS

Tabla 2.1. Clasificación de los plaguicidas según su toxicidad, expresada en DL ₅₀ (mg/kg).....	23
Tabla 2.2. Propiedades fisicoquímicas de algunos OPPs del estándar mix Restek 32418.....	26
Tabla 2.3. Pesticidas organofosforados.....	27
Tabla 2.4. Polaridad de algunos solutos.....	34
Tabla 2.5. Tipos de detectores usados para determinar OPPs.....	36
Tabla 2.6. Parámetros de calidad de los métodos analíticos.....	37
Tabla 3.1. Localización geográfica de los puntos de muestreo.....	43
Tabla 3.2. Equipos e instrumentos de medida.....	45
Tabla 3.3. Reactivos químicos utilizados.....	45
Tabla 3.4. Concentración de los OPPs de la solución stock.....	47
Tabla 3.5. Condiciones cromatográficas.....	47
Tabla 3.6. Condiciones del MS.....	48
Tabla 3.7. Objetivos de validación del método.....	48
Tabla 3.8. Concentraciones de la curva de calibración en matriz por analito ...	49
Tabla 3.9. Concentraciones de OPPs para estudio de precisión.....	50
Tabla 4.1. Identificación y tiempo de retención de los analitos de estudio.....	53
Tabla 4.2. Resultados del análisis de blancos de todos los analitos del mix de OPPs.....	54
Tabla 4.3. Resultados obtenidos de las curvas de calibración estándar para los analitos de estudio.....	55
Tabla 4.4. Resultados obtenidos de las curvas de calibración en matriz fortificada.....	62
Tabla 4.5. Mediciones de blanco de reactivo fortificados a baja concentración de OPPs para LDI y LCI.....	67
Tabla 4.6. Límites de detección y cuantificación del instrumento y del método	68
Tabla 4.7. Estudio de precisión del método en matrices de agua fortificada a un nivel bajo de concentraciones.....	69
Tabla 4.8. Estudio de precisión del método en matrices de agua fortificada a un nivel medio de concentraciones.....	70
Tabla 4.9. Estudio de precisión del método en matrices de agua fortificada a un nivel alto de concentraciones.....	71
Tabla 4.10. Análisis de varianza para las muestras fortificadas con Demeton-S-metil a nivel de concentración bajo, medio y alto.....	72
Tabla 4.11. Análisis de varianza para las muestras fortificadas con Dimetoato a nivel de concentración bajo, medio y alto.....	72
Tabla 4.12. Análisis de varianza para las muestras fortificadas con Tolclofos metil a nivel de concentración bajo, medio y alto.....	73

Tabla 4.13. Análisis de varianza para las muestras fortificadas con Pirimifos metil a nivel de concentración bajo, medio y alto	73
Tabla 4.14. Análisis de varianza para las muestras fortificadas con Malatión a nivel de concentración bajo, medio y alto	74
Tabla 4.15. Análisis de varianza para las muestras fortificadas con Clorpirifos a nivel de concentración bajo, medio y alto	74
Tabla 4.16. Análisis de varianza para las muestras fortificadas con Metidatión a nivel de concentración bajo, medio y alto	75
Tabla 4.17. Análisis de varianza para las muestras fortificadas con Protiofos a nivel de concentración bajo, medio y alto	75
Tabla 4.18. Análisis de varianza para las muestras fortificadas con Profenofos a nivel de concentración bajo, medio y alto	76
Tabla 4.19. Análisis de varianza para las muestras fortificadas con Etión a nivel de concentración bajo, medio y alto.....	76
Tabla 4.20. Análisis de varianza para las muestras fortificadas con Azinfos metil a nivel de concentración bajo, medio y alto	77
Tabla 4.21. Análisis de varianza para las muestras fortificadas con Pirazofos a nivel de concentración bajo, medio y alto	77
Tabla 4.22. Estudio de veracidad para Demeton-S-metil a tres niveles de concentración.....	78
Tabla 4.23. Estudio de veracidad para Dimetoato a tres niveles de concentración	78
Tabla 4.24. Estudio de veracidad para Tolclofos a tres niveles de concentración	79
Tabla 4.25. Estudio de veracidad para Pirimifos a tres niveles de concentración	79
Tabla 4.26. Estudio de veracidad para Malatión a tres niveles de concentración	79
Tabla 4.27. Estudio de veracidad para Clorpirifos a tres niveles de concentración	80
Tabla 4.28. Estudio de veracidad para Metidatión a tres niveles de concentración	80
Tabla 4.29. Estudio de veracidad para Protiofos a tres niveles de concentración	80
Tabla 4.30. Estudio de veracidad para Profenofos a tres niveles de concentración	81
Tabla 4.31. Estudio de veracidad para Etión a tres niveles de concentración ..	81
Tabla 4.32. Estudio de veracidad para Azinfos metil a tres niveles de concentración.....	81
Tabla 4.33. Estudio de veracidad para Pirazofos a tres niveles de concentración	82
Tabla 4.34. Concentración de OPPs en las muestras tomadas en la provincia de Napo	82

Tabla 4.35. Concentración de OPPs en las muestras tomadas en la provincia de Sucumbíos.....	83
Tabla 4.36. Toxicidad aguda de especies centinela para evaluación del riesgo ecológico.....	84
Tabla 4.37. Riesgo ecológico para la muestra N2	84
Tabla 4.38. Riesgo ecológico para la muestra SH-1	84
Tabla 4.39. Riesgo ecológico para la muestra SH-2.....	84
Tabla 4.40. Riesgo ecológico para la muestra SH-3.....	85

CAPÍTULO 1

1. INTRODUCCIÓN

El uso de pesticidas sintéticos en actividades agrícolas es una de las principales fuentes de contaminación a nivel mundial [1]; afectando a los ecosistemas acuáticos y terrestres. En Ecuador, el proceso de extensión de la producción agrícola ha conllevado a un alto uso de agroquímicos, especialmente de insecticidas.

El presente estudio tiene como propósito elaborar un registro de la presencia de agroquímicos fosforados con la finalidad de mantener un control en el uso de pesticidas, así como generar información que permita conocer el impacto que genera su uso en el norte de la Amazonía ecuatoriana, donde los estudios son limitados. Dicha región tiene una gran importancia en el desarrollo socioeconómico del país, debido al potencial productivo y al acelerado asentamiento que experimentan los movimientos de población de otras regiones [2].

Para cumplir con el objetivo de la investigación se realizó una investigación de tipo mixta, que permitió la identificación y cuantificación de pesticidas organofosforados en fuentes de agua natural del norte de la Amazonía Ecuatoriana, empleando la técnica de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, y el tratamiento de muestras mediante extracción en fase sólida, dicha estrategia debido a su selectividad, sensibilidad y repetibilidad permitió el análisis de componentes trazas en muestras ambientales [3][4].

El método implementado se basó en el Método EPA 8141 B, sin embargo, para asegurar la confiabilidad de los resultados, el método fue validado a las condiciones del laboratorio, estableciéndose parámetros como linealidad, límites de detección, límites de cuantificación, precisión y veracidad.

Las muestras de agua natural fueron tomadas en los afluentes del río Napo de las provincias de Napo y Sucumbíos. Para la evaluación del riesgo ecológico, se determinaron los cocientes de riesgo por cada OPP hallado, en función de la especie centinela como peces, invertebrados acuáticos y algas.

A continuación, se presentarán los métodos y el desarrollo de la investigación.

1.1 Antecedentes

En Ecuador, el proceso de extensión de la producción agrícola ha conllevado un alto uso de agroquímicos, especialmente de insecticidas, para combatir las plagas que afectan a los cultivos. Sin embargo, el impacto que genera su uso frecuente, sobre la estructura y funcionamiento de estos ecosistemas agrícolas, no está suficientemente respaldada con investigaciones [5].

Asimismo, el estudio realizado por Deknock *et al.*, en el año 2019, titulado: “*Distribution of agricultural pesticides in the freshwater environment of the Guayas river basin (Ecuador)*”, indica que el incremento acelerado y la transición a actividades agrícolas en los países en desarrollo, suelen conducir al uso indebido y excesivo de plaguicidas. La investigación consistió en la evaluación de la contaminación por plaguicidas, en 181 sitios de muestreo de la cuenca del río Guayas, se concluyó que el 60 % presenta estos contaminantes, detectando un total de 26 plaguicidas. Los cultivos de banana y arroz fueron identificados como la fuente de contaminación más grande de pesticidas debido a las altas tasas de consumo de estos productos, y a las inadecuadas técnicas de aplicación de pesticidas [6].

Algunos de los estudios realizados en el país, indican problemas de contaminación de agua y sedimentos por pesticidas, asociados a actividades agrícolas. Según el INEC, 2016, en Ecuador entre 2014-2016 aproximadamente el 50% de los cultivos permanentes y el 75% de los cultivos transitorios utilizaron agroquímicos (fertilizantes y plaguicidas), de los cuales al menos el 25% de los plaguicidas utilizados están catalogados en un rango de moderado a peligroso.

Según el estudio “*Control of pesticides in Ecuador: An underrated problem?*”, realizado en el año 2020 por Mollocana, L. & Gonzales, F.; el uso de pesticidas en Ecuador ha incrementado con el objeto de satisfacer las necesidades alimentarias locales, así como la exportación al mercado internacional. A pesar, de los beneficios asociados al uso de estos agroquímicos, la exposición a ciertos plaguicidas ha creado un riesgo para la salud humana y ambiental, debido a que no existen políticas públicas suficientes, que permitan mitigar estos daños, o que creen conciencia desde los pequeños hasta los grandes productores agrícolas, con el apoyo de la ciencia y la tecnología [7].

En el año 2020, en la investigación “*Insecticides and agricultural pest control: The magnitude of its use in crops in some provinces of Ecuador*” realizado por Chirinos *et al.*, se indica un análisis del impacto del uso de insecticidas en cultivos de varias provincias de Ecuador, la información se recopiló a través de la aplicación de entrevistas a agricultores de cultivos de melón, sandía, frijol, papa, pimiento, y tomate, en las provincias Chimborazo, El Oro, Guayas, Loja y Santa

Elena. Según los resultados obtenidos, se evidenció mala práctica en el uso de los insecticidas, por ejemplo, más aspersiones de las necesarias, aumento en la dosificación, mezclas de compuestos, no utilización del equipo de protección personal, etc.

En el estudio “Assessment of Microplastic and Organophosphate Pesticides Contamination in Fiddler Crabs from a Ramsar Site in the Estuary of Guayas River, Ecuador,” llevado a cabo en el año 2021, por Villegas, L., Cabrera, M. & Capparelli, M. Se reporta que la concentración de OPPs en matrices de agua y sedimentos, determinados en el estuario del Río Guayas, superan los límites de la USEPA para la exposición crónica, indicando un riesgo ambiental [8]. Los pesticidas encontrados fueron malatión y etil paratión.

De acuerdo a una investigación realizada en el norte de la Amazonía ecuatoriana, titulada “Use of chemical fertilizers and pesticides in frontier areas: A case study in the Northern Ecuadorian Amazon”, realizada en el año 2021, por Vasco et al. Se indica que no se ha prestado suficiente atención a la contaminación ambiental, ni a los riesgos para la salud humana que genera el uso excesivo de fertilizantes y pesticidas sintéticos. En dicho estudio se reportó que la mitad de los agricultores de su muestra habían experimentado efectos negativos para la salud [1].

También, en esta región, se ha reportado el uso indiscriminado de plaguicidas para el control de plagas, como en el caso de la naranjilla, que es uno de los frutos amazónicos más demandados a nivel nacional [9].

Con lo expuesto anteriormente, se evidencia que el uso indiscriminado de pesticidas, conllevan graves problemas ambientales e incluso a la salud del hombre. Debido a ello, en el presente estudio se busca evaluar los pesticidas organofosforados en aguas naturales de agroecosistemas de la región amazónica, en donde los estudios aún son limitados.

1.2 Descripción del problema

En los últimos años, el aumento de la población ha ocasionado la necesidad de una alta demanda de alimentos, que implica el incremento en la producción de cultivos, lo que a su vez conlleva a un aumento en el uso de agroquímicos, entre ellos fertilizantes y pesticidas. De acuerdo a la FAO 2011, la acumulación de pesticidas en el ambiente es uno de los mayores problemas de contaminación asociados a las actividades agrícolas.

Si bien es cierto, los pesticidas han sido desarrollados, producidos y utilizados para mitigar el daño o la pérdida de cultivos por plagas [10], estos contaminantes

pueden llegar afectar a los ecosistemas acuáticos y terrestres, porque son altamente solubles en agua, y se unen fuertemente al suelo [11].

Según la OMS (2018) más de 1000 pesticidas se utilizan para evitar que las plagas destruyan los cultivos o alimentos. Sin embargo, dependiendo de la formulación y de su naturaleza, estos pueden presentar propiedades y efectos toxicológicos distintos [7]. Por ejemplo, los pesticidas organofosforados, que incluyen a todos los insecticidas que contienen fósforo en su estructura, son inestables, no persistentes, y son considerados los más tóxicos para los vertebrados [11]; causan interferencias en el sistema nervioso, ya que promueven la acumulación de acetilcolina, produciendo dificultades en la transmisión de los impulsos nerviosos [7].

Los principales problemas asociados al uso de plaguicidas involucran el mal uso al momento de su manipulación, dispersión y contaminación por agua y suelos fuera del área de cultivo, falta de especificidad, bioacumulación tisular y magnificación biológica a lo largo de la cadena alimentaria [7]. Estos contaminantes, ingresan a los ecosistemas a través de diferentes vías, ya sea por lixiviación, o escorrentía, puesto que el agua de lluvia, irrigación u otras fuentes, fluye, y en su camino va disolviendo los contaminantes presentes en el suelo.

La falta de regulación o aplicación de la ley, la educación, la falta de control del uso seguro de pesticidas, la poca disponibilidad de equipos de protección personal, la aplicación de productos que ya están eliminados y prohibidos en los países industrializados [12]. La manipulación inadecuada de pesticidas y la falta de conocimiento han causado la contaminación de diferentes fuentes como el suelo, el agua y la vegetación [2], afectando incluso a organismos no objetivos, como los seres humanos, porque estas sustancias están diseñadas para ser biológicamente activas.

El uso indiscriminado de pesticidas representa una amenaza potencial para los ecosistemas naturales, el suministro de agua, la producción de alimentos, y el ecoturismo [6]. Esto ocasiona la pérdida de la biodiversidad acuática, propiciando la extinción de especies de organismos microscópicos y macroscópicos en aguas continentales, y afectando las funciones y servicios de los ecosistemas [13].

Debido a los potenciales peligros asociados al uso de pesticidas, la sociedad se ha visto en la necesidad de mantener un control de los pesticidas, por tal motivo, la legislación ambiental mundial ha establecido límites máximos permitidos de residuos (LMR) de plaguicidas en aguas y alimentos cada vez más estrictos. Por ejemplo, la Unión Europea establece un límite máximo de 0,1 µg//L por

plaguicida individual y de 0,5 µg/L por plaguicida total en aguas destinadas al consumo humano (Directiva 2006/118/EC). Sin embargo, estos límites varían según la legislación de los distintos países [14].

La contaminación generada por estos pesticidas puede ser analizada a través de diferentes técnicas analíticas. Sin embargo, el análisis de pesticidas ha sido un reto para los científicos debido a que pertenecen a diferentes grupos de sustancias químicas, las cuales tienen un amplio rango de polaridad y características ácidas [15].

Por lo mencionado anteriormente, en el presente estudio se evaluarán los pesticidas organofosforados presentes en muestras de agua de agroecosistemas del Norte de la Amazonía Ecuatoriana, mediante la cuantificación de dichos contaminantes a través de la aplicación de la técnica analítica de cromatografía de gases-espectrometría de masas, con el fin de determinar el riesgo ecológico en esta área.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo general

Evaluar la contaminación y el riesgo ecológico causados por residuos de pesticidas organofosforados en ecosistemas acuáticos de agroecosistemas del Norte de la Amazonía Ecuatoriana.

1.3.2 Objetivos específicos

- Implementar una metodología analítica para la determinación de pesticidas organofosforados en matrices de agua de agroecosistemas del Norte de la Amazonía Ecuatoriana, usando cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.
- Estimar la concentración de pesticidas encontrados en cuerpos de agua en los agroecosistemas del Norte de la Amazonía Ecuatoriana.
- Determinar el riesgo ecológico causado por los pesticidas organofosforados detectados en las matrices de agua de los agroecosistemas del Norte de la Amazonía Ecuatoriana.

1.4 Hipótesis

Las actividades agrícolas que se realizan en el Norte de la Amazonía Ecuatoriana, principalmente los cultivos de maíz y palma contribuyen a la acumulación de residuos de pesticidas organofosforados en los cuerpos de agua de la cuenca alta del Napo y potencialmente causan un riesgo ecológico en los ecosistemas acuáticos.

1.5 Alcance

Este estudio se aplicará en muestras de agua natural de los agroecosistemas del norte de la Amazonía ecuatoriana, y se enfocará en la evaluación de las concentraciones de pesticidas organofosforados, tales como: demeton-s-metil, dimetoato, tolclofos-metil, pirimifos metil, malation, clorpirifos, metidation, protiofos, profenofos, etion, azinfos metil, y pirazofos. Para su desarrollo, se llevará a cabo la implementación de un método de análisis, mediante la técnica de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

Con la presente investigación se pretende concientizar a la población sobre el daño que genera el uso inadecuado e incontrolado de pesticidas organofosforados, tanto en la fauna, flora e incluso a la salud del hombre. Además, se fomentará la investigación en el país, sobre temas relacionados al impacto ambiental causado por actividades agrícolas, lo cual permitirá tomar medidas que permitan un manejo responsable sobre el uso de agroquímicos, y sobre el cuidado del ambiente.

CAPÍTULO 2

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Agroecosistema

Es un ecosistema que cuenta con al menos una población de utilidad agrícola (Figura 2.1). A diferencia de un ecosistema natural, está regulado por la intervención del hombre. Sin embargo, a pesar de que no son considerados como ecosistemas naturales, si se aplican todos los conceptos ecológicos, por ejemplo, flujos de energía, ciclaje de materiales, etc. [16]



Figura 2.1. Agroecosistema

Se puede definir como una unidad ecológica principal que contiene componentes abióticos y bióticos que son interdependientes e interactivos, y a través de los cuales se procesan los nutrientes y el flujo de energía. La principal unidad funcional del agroecosistema es la población del cultivo [17]. Los agroecosistemas son sistemas abiertos que reciben insumos del exterior, dando como resultado productos que pueden ingresar en sistemas externos como ciudades, aguas subterráneas, vegetación, etc., como se observa en la Figura 2.2.

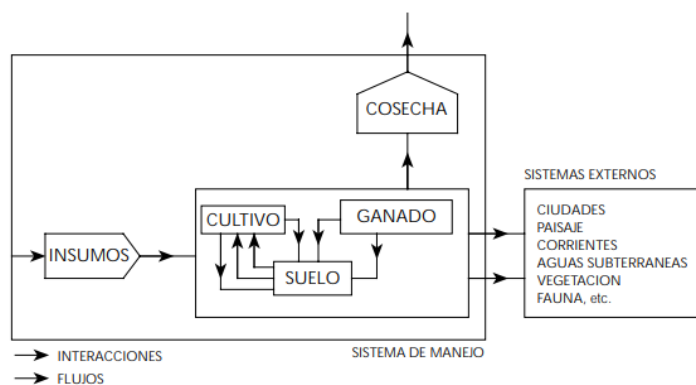


Figura 2.2. Estructura general de un sistema agrícola y su relación con los sistemas externos (según Briggs y Cortney 1985)

2.2 Agricultura en Ecuador

En Ecuador, la agricultura constituye una de las actividades que aporta a la economía del país. En el año 2017, el sector agropecuario representó alrededor del 8% del PIB nacional [18].

Según la ESPAC, entre los años 2014 y 2018, el uso del suelo está dado por montes y bosques (46,4%), pastos cultivados (19,3%), cultivos permanentes (11,6%), cultivos transitorio y barbecho (7%), pastos naturales (6%), otros usos (5,4%), páramos (3,1%) y para descanso (1%) [19].

Según el Geo portal del Agroecuatoriano, las áreas de cultivo corresponden a productos como cacao, maíz, arroz, palma aceitera, banano, caña de azúcar, plátano, café, papa, cebada, yuca, cebolla colorada, tomate de árbol, paja toquilla, y té, que se distribuyen en las diferentes provincias del Ecuador [20].

Ecuador cuenta con diversidad de condiciones geográficas que permiten el aprovechamiento de recursos naturales, por lo cual posee un sector agrícola que maneja un complejo espacio de relaciones sociales que constituyen un pilar importante para el desarrollo del país [21].

2.3 Expansión de la frontera agrícola

La expansión de la frontera agrícola, se debe principalmente al poco control de la explotación forestal (incluso en áreas protegidas), al proceso concentrador de la tenencia de la tierra especialmente en zonas de cultivos intensivos con acceso a riego [22], entre otras.

Asimismo, la aplicación de políticas públicas a través de reformas agrarias o de programas agrarios sostenibles, en parte han generado en muchos casos esta problemática, aumentando la tasa de deforestación en los países tropicales [23]. Según el MAE (2010), en Ecuador desde el 2000 hasta el 2010, se han perdido más de tres millones de hectáreas de bosques tropicales primarios, siendo la tasa de deforestación cerca de 0.65. Cabe señalar que la mayor parte de los bosques tropicales se localizan en la Amazonía [23].

En Ecuador la reforma agraria, contrarrestó el problema de la migración rural, haciendo más atractiva la agricultura. Sin embargo, hubo un crecimiento de la expansión agrícola [21]. De acuerdo al estudio realizado por Clark L. Gray et al, se sugiere que la emigración rural también ha conllevado a una expansión del área cultivada en las zonas rurales del país [24].

2.4 Contaminación del agua

Se refiere a la adición de materia extraña indeseable que deteriora la calidad de los cuerpos de agua. La materia extraña puede ser inerte, por ejemplo, compuestos de plomo, mercurio, etc., o puede ser materia viva como la de microorganismos. Según su uso, los principales contaminantes que presenta el agua son:

- a) *Domésticos*. Proviene de los hogares, de actividades como el uso de sanitarios, limpieza, cocción de alimentos. Pueden ser detergentes, insecticidas, jabones, grasas, materia orgánica, bacterias, y parásitos en materia fecal.
- b) *Industriales*. Ejemplos: colorantes, disolventes, ácidos, grasas, sales, pigmentos, metales y diversas sustancias químicas tóxicas para la fauna, flora y el humano.
- c) *Agrícolas*. Ejemplos: insecticidas, plaguicidas, sales inorgánicas, minerales, desechos de animales, fertilizantes, etc. [25]

2.5 Pesticidas

Según la FAO (1986), los plaguicidas se definen como sustancias o mezclas de sustancias cuyo objetivo es prevenir, destruir o controlar cualquier tipo de plaga, e incluso vectores de organismos causantes de enfermedades humanas o de los animales, especies no deseadas de plantas o animales, aquellas que causan daño o interfieren en la producción, elaboración, almacenamiento, transporte o comercialización de alimentos, artículos agrícolas de consumo, productos agrícolas, madera, forraje para animales, etc. [26]

Son el resultado de un proceso industrial de síntesis química, y se han convertido en la forma dominante del combate a las plagas después de la Segunda Guerra Mundial debido al desarrollo de la industria química y a las actividades agrícolas dependientes de estos insumos [27].

2.5.1 Clasificación

Los pesticidas se clasifican en función de algunas de sus características principales, tales como: toxicidad aguda, vida media (permanentes, persistentes, moderadamente persistentes, y no persistentes), estructura química y su utilidad [28].

La OMS estableció una clasificación basada en su peligrosidad o grado de toxicidad aguda, que se define como la capacidad del pesticida de producir un daño agudo a la salud a través de una o múltiples exposiciones, en un período de tiempo relativamente corto. En la tabla 2.1, se indica el grado de toxicidad correspondiente a cada clase de peligro, de acuerdo a esta definición.

Tabla 2.1. Clasificación de los plaguicidas según su toxicidad, expresada en DL_{50} (mg/kg)

Clase	Toxicidad
Clase IA	Extremadamente peligrosos
Clase IB	Altamente peligrosos
Clase II	Moderadamente peligrosos
Clase III	Ligeramente peligrosos

Además, de acuerdo a su estructura química, los pesticidas se clasifican en diversas familias, tales como: organoclorados, organofosforados, carbamatos, tiocarbamatos, piretroides, derivados bipiridilos, derivados del ácido fenoxiacético, derivados cloronitrofenólicos, derivados de triazinas, compuestos orgánicos del estaño, compuestos inorgánicos, compuestos de origen botánico [28]. En la Figura 2.3, se observa la clasificación de los pesticidas considerando su naturaleza química, el mecanismo de acción y de acuerdo al organismo que afectan.

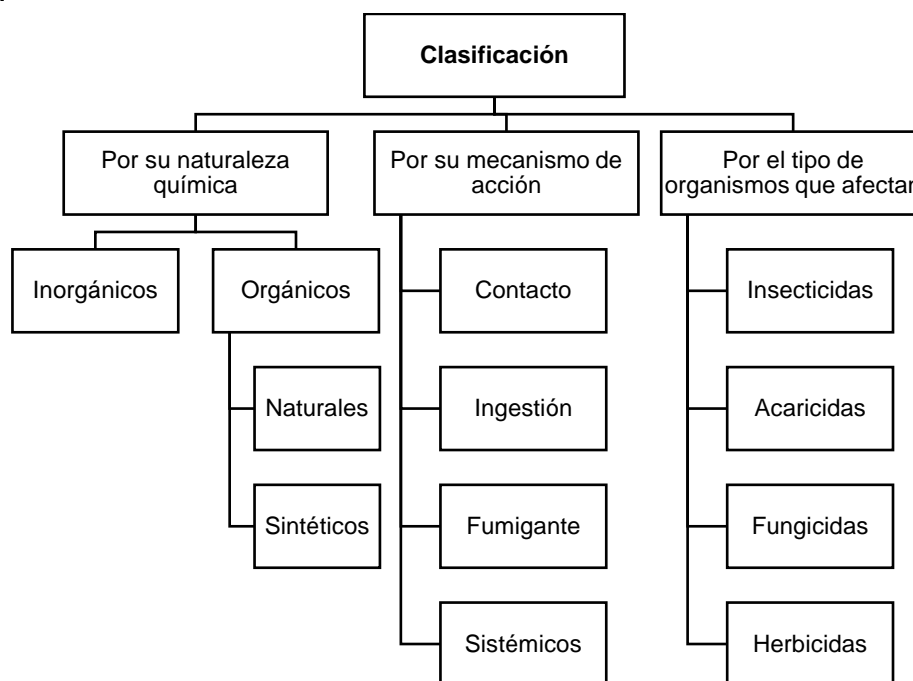


Figura 2.3. Clasificación de los plaguicidas

Dentro de la clasificación según la Figura 2.3, se puede observar a los insecticidas, que generalmente son pesticidas organofosforados, los cuales son objeto de estudio de la presente investigación, razón por la cual a continuación, se describe más a fondo sobre este tipo de contaminantes.

2.6 Pesticidas organofosforados (OPPs)

Los OPPs son compuestos químicos, sintéticos, derivados orgánicos de ácidos fosfóricos y tiofosfóricos. Generalmente son ésteres, amidas o derivados tiol de: ácido fosfórico, fosfónicos, fosforotiónicos o fosfonotiónicos [29]. Son ampliamente utilizados como insecticidas por lo tanto, frecuentemente provocan casos de envenenamiento [30].

En la figura 2.4 se muestra la estructura general de este tipo de compuestos, cuyo átomo central es el fósforo.

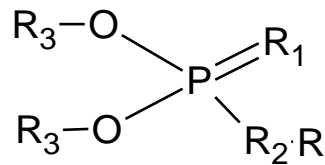


Figura 2.4. Estructura general de los OPPs

2.6.1 Clasificación

Las clases principales de OPPs son:

- Fosfatos [R1, R2] = O: clorfenvinfos, diclorvos, heptenofos.
- Tiofosfatos (fosforotioatos) [R2 = N, S, u O]: clorpirifos-metil, diazinón, fenitrotión, fentión, ometoato, oxidemetón-metilo, paratión, vamidotión
- Ditiofosfatos (fosforoditioatos) [R1, R2 = S]: azinfos-metilo, etión, dimetoato, disulfotón, formotión, malatión, forato, fosalona, metidatión, terbufos
- Fosfonatos [enlace P – C]: triclorfón
- Fosforamidas (contienen NH₂ como grupo R y O como R1, R2]: fenamifos, metamidofos, isofenfos [29].

2.6.2 Toxicidad

Los OPPs afectan el sistema nervioso de insectos plaga, actuando en la sinapsis colinérgica para inhibir la colinesterasa. La intoxicación aguda se debe principalmente a la colinesterasa y a la acumulación de acetilcolina [29].

Se caracterizan porque inhiben la acción de la acetilcolinesterasa, que se encarga de catalizar la hidrólisis de la acetilcolina, que rige las transmisiones de los impulsos nerviosos. Algunos OPPs, tienen toxicidad muy alta, incluso mayor que los pesticidas organoclorados (OCLP). Sin embargo, por su tiempo de vida corto en el ambiente y al no acumularse en las cadenas tróficas, son más aceptables que los OCLP [31].

2.6.3 Propiedades fisicoquímicas

Muchos de los OPPs son ligeramente solubles en agua, tienen un alto K_{ow} y una presión de vapor baja. Algunos son muy miscibles en agua (triclorfon, vamidotion, mevinfos, monocrofos, ometoato, oxidemeton-metil, fosfamidon). A excepción del diclorvos, muchos son relativamente poco volátiles y se degradan por hidrólisis, dando lugar a productos solubles en agua.

En la tabla 2.2, se identifican algunas principales propiedades fisicoquímicas de varios de los OPPs estudiados en la presente investigación:

Tabla 2.2. Propiedades fisicoquímicas de algunos OPPs del estándar mix Restek 32418

Nombre del pesticida	Solubilidad a 20 – 25 °C (mg/L)	Presión de vapor a 20 – 25°C (Pa)	Log K _{ow}	t _{1/2} (días)	K _{oc} (cm ³ /g)	GUS
Azinfos metil	28	1.8*10 ⁻⁴	2.7	52	1465	1.43
Clorpirifos	1.4	2.7*10 ⁻³	4.96	94	4981	2.57
Demeton-S-metil	22000	0.04	1.3	-	-	-
Diclorvos	18000	2.1	1.9	-	-	-
Dimetoato	23	1.1*10 ⁻³	0.7	7	20	-
Etión	2	2*10 ⁻⁴	5.07	150	10000	-
Malatión	145	5.3*10 ⁻³	2.75	1	1800	-
Metidation	200	2.5*10 ⁻⁴	2.2	4.5	163	1.17
Pirazofos	4.2	0.22*10 ⁻³	3.8	-	-	-
Pirimifos metil	9.9	2*10 ⁻³	4.2	10	1000	-

Esta tabla ha sido adaptada de: G. Taylor & Francis, *Chromatographic Analysis of the Environment*, Third Edit. Taylor & Francis Group, 2006.

Donde:

K_{ow} → Coeficiente de partición octanol-agua. Reportado como log(K_{ow}) o log(P_{ow}). Se define como la relación de las concentraciones en equilibrio de un compuesto en dos fases (agua y octanol)

S_w → Solubilidad en agua, es la máxima cantidad de una sustancia que puede disolverse en el agua, en equilibrio, a una determinada presión y temperatura.

K_b → Constante de la Ley de Henry

P_v → Presión de vapor, se refiere a la presión de un químico en la fase gaseosa, en equilibrio con el químico puro.

K_{oc} → Sorción del suelo (adsorción/movilidad). Proporciona información sobre la movilidad potencial de un químico en el suelo.

T_{0.5} → Vida media en el campo. Tiempo necesario para que la sustancia química se degrade a la mitad de su concentración inicial.

GUS → *Groundwater Ubiquity Score*. Índice de movilidad que relaciona la persistencia de los plaguicidas (vida media) y la sorción (K_{oc}) en el suelo. Se utiliza para calificar los plaguicidas según su potencial de desplazamiento hacia las aguas subterráneas [29].

2.6.4 Degradación

La vida media de los OPPs y sus productos biotransformadores es relativamente corta (de horas a días). Se biotransforman mediante enzimas oxidasas,

hidrolasas y transferasas, principalmente hepáticas. Se eliminan por la orina y en menor cantidad por heces y aire expelido [27].

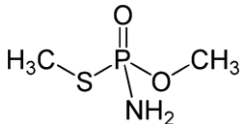
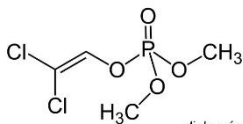
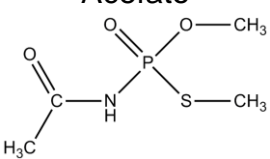
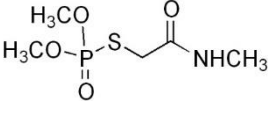
Pueden sufrir biodegradación o transformación química. Existen pocos datos toxicológicos y ecotoxicológicos disponibles sobre sus metabolitos.

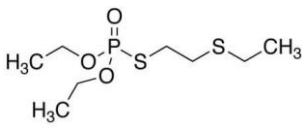
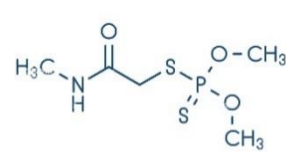
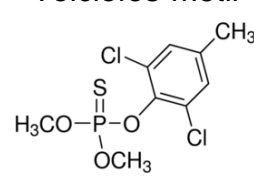
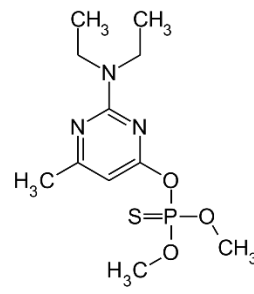
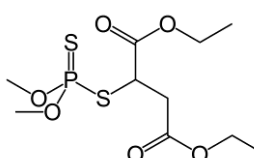
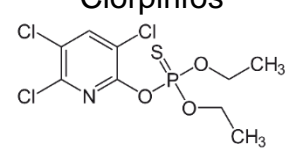
Las principales vías de degradación de los OPPs son: oxidación, desmetilación, hidrólisis e isomerización [29].

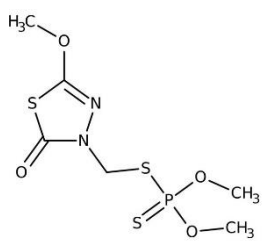
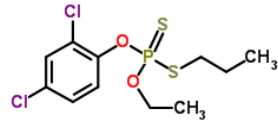
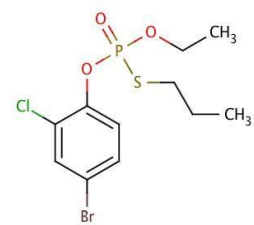
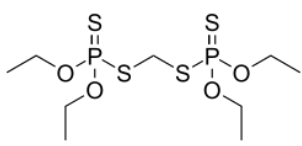
2.6.5 Ejemplos de OPPs y su modo de acción

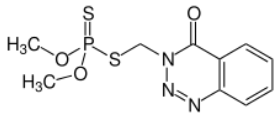
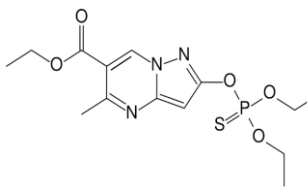
En la tabla 2.3, se citan el modo de acción, estabilidad, categoría toxicológica, y usos de algunos OPPs de este estudio:

Tabla 2.3. Pesticidas organofosforados

N°	Nombre y estructura química	Categoría según INIAP	Características y usos
1	<p>Metamidofos</p> 	Extremadamente tóxicos, IB	Estable a pH 3-8 [32]. Aplicado a cultivos de papa, arroz, maíz [33].
2	<p>Diclorvos</p> 	Extremadamente tóxicos, IB	Estabilidad: sufre reacción endotérmica entre 185 y 280 °C; se descompone violentamente a 315 °C. Lentamente se hidroliza en el agua y en medios ácidos y rápidamente se hidroliza por álcalis [32]. Aplicado a cultivos de arroz [33].
3	<p>Acefato</p> 	MODERADAMENTE TÓXICOS CATEGORÍA III	Estabilidad: relativamente estable a la hidrólisis [32]. Aplicado a cultivos de tomate riñón, papa, arroz [33].
4	<p>Ometoato</p> 	-	Estabilidad: se hidroliza en medio alcalino y relativamente despacio en medio ácido. Usos: control de ácaros e insectos en frutales, cereales,

			arroz, ornamentales y otros cultivos [32].
5	<p>Demeton-s-metil</p> 	-	<p>Estabilidad: se hidroliza en medios alcalinos; estable en ácidos.</p> <p>Usos: control de ácaros y homópteros en frutales, hortalizas, papa, remolacha, ornamentales y forestales [32].</p>
6	<p>Dimetoato</p> 	ALTAMENTE TÓXICOS CATEGORÍA II	<p>Estabilidad: pH 2-7; se hidroliza en medios alcalinos [32].</p> <p>Aplicado a rosa, tomate de árbol, papa, tomate riñón, mango, brócoli [33].</p>
7	<p>Tolclofos-metil</p> 	-	<p>Estabilidad: estable a la luz, humedad y calor. Se descompone en medios alcalinos y ácidos.</p> <p>Usos: control de enfermedades del suelo causadas por <i>Rhizoctonia</i>, <i>Corticium</i>, <i>Sclerotium</i> y <i>Typhula</i> en algodón, papa y café [32].</p>
8	<p>Pirimifos metil</p> 	MODERADAMENTE TÓXICOS CATEGORÍA III	<p>Estabilidad: se hidroliza en medios ácidos y alcalinos concentrados [32].</p> <p>Aplicado a cultivos de arroz, papa, tomate riñón [33].</p>
9	<p>Malatión</p> 	MODERADAMENTE TÓXICOS CATEGORÍA III	<p>Estabilidad: estable en medios acuosos y neutrales; se descompone en ácidos fuertes y álcalis [32].</p> <p>Aplicado a cultivos de mango, papa, mandarina, maíz [33].</p>
10	<p>Clorpirifos</p> 	ALTAMENTE TÓXICOS CATEGORÍA II	<p>Estabilidad: estable en medios neutros o ácidos, inestable en alcalinos. Su hidrólisis incrementa con el pH, con cobre</p>

			y otros metales que pueden formar quelatos [32]. Aplicado a brócoli, algodón, soya, papa, café, coco, arroz, maíz, tomate de árbol [33].
11	<p>Metidation</p> 	-	Estabilidad: se hidroliza rápidamente en medios alcalinos o muy ácidos; relativamente estable en neutros o ligeramente ácidos. Usos: control de ácaros e insectos chupadores y masticadores en algodón, cítricos, maíz, remolacha y papa [32].
12	<p>Protiofos</p> 	-	Estabilidad: estable en medios ácidos. Usos: control de larvas defoliadoras, Pseudococcus spp, trips, mosca blanca, minadores, etc., en caña de azúcar, maíz, ornamentales, cucurbitáceas, papa, arroz y hortalizas; en salud pública para moscas y mosquitos [32].
13	<p>Profenofos</p> 	ALTAMENTE TÓXICOS CATEGORÍA II	Estabilidad: estable en medios ligeramente ácidos o neutros, inestable en medios alcalinos [32]. Aplicado a cultivos de papa, arroz, maíz, espárrago, cebolla banca, ajo, cebolla [33].
14	<p>Etión</p> 	-	Estabilidad: estable a pH neutro. Usos: control de ácaros, escamas, áfidos, trips, larvas de lepidópteros y saltahojas en algodón, cítricos, cucurbitáceas, maíz, ornamentales y hortalizas [32].

15	<p style="text-align: center;">Azinfos metil</p> 	-	<p>Estabilidad: se hidroliza rápidamente en medios alcalinos y ácidos. Se fotodegrada en la superficie del suelo y más rápido en el agua. Se descompone sobre los 200 °C. Usos: control de insectos masticadores y chupadores (<i>Coleoptera</i>, <i>Diptera</i>, <i>Homoptera</i>, <i>Hemiptera</i> y <i>Lepidoptera</i>) en diversos cultivos [32].</p>
16	<p style="text-align: center;">Pirazofos</p> 	-	<p>Estabilidad: se hidroliza en medios ácidos y básicos. Usos: control de <i>Erysiphaceae</i> en cereales, cucurbitáceas, ornamentales y hortalizas [32].</p>

2.7 Métodos de extracción de pesticidas

2.7.1 Extracción líquido-líquido

Es una técnica que se basa en el principio de distribución de pesticidas entre una fase acuosa y un solvente orgánico no miscible en agua. La eficiencia de extracción depende de K_p , pH, fuerza iónica, relación (v:v) del solvente/fase acuosa, y del número de extracciones sucesivas. El solvente de extracción se elige de un amplio rango de sustancias con diferentes polaridades y densidades, el criterio de selección del solvente o mezclas de solventes puede ser: i) El coeficiente de distribución de las sustancias entre la fase acuosa y el solvente de extracción. ii) La selectividad del solvente o su amplio espectro de eficiencia.

La extracción puede realizarse en modo discontinuo en embudos de separación con agitación manual o mecánica y pequeños volúmenes de agua (de 100 mL a 1 L), o en modo continuo utilizando accesorios de instrumentos diseñados para grandes volúmenes de agua (hasta 20 L).

Desventajas:

- Presencia de impurezas en el disolvente de extracción.
- Riesgo de pérdidas o contaminación durante la evaporación y la transferencia.
- Uso de grandes volúmenes de disolvente
- Baja productividad

- Poca eficacia para la extracción de las sustancias más polares, especialmente los metabolitos [29].

2.7.2 Extracción líquido-sólido o Extracción en Fase Sólida (SPE)

A diferencia de la extracción líquido-líquido, esta técnica disminuye la cantidad de solventes utilizados. Existen tres tipos principales de métodos.

a) Extracción por cartucho líquido-sólido (cartuchos con una fase sólida con propiedades de adsorción).

Pueden ser fuera de línea y en línea. En las metodologías fuera de línea, las muestras se filtran a través de un sorbente empaquetado en un cartucho o columna. La jeringa suele ser fabricada de polipropileno, llena de 100 a 1000 mg de sorbente con un tamaño de partícula de 30 a 120 μ m, y equipada con fritas para contener el envase. Las principales fases de una secuencia analítica de SPE, son:

- Acondicionamiento: activación por el solvente (metanol o acetonitrilo – agua)
- Aplicación de la muestra
- Clean-up: lavado con una mezcla de agua-solvente orgánico
- Secado
- Desorción con el solvente (2 a 5 mL)

Cuando se extraen simultáneamente compuestos con polaridades muy diferentes, como los OPPs, la dificultad reside en los tres tipos de comportamientos observados durante su extracción (muy polar, moderadamente polar y apolar) [29].

Los principales sorbentes son la sílice ligada a C18 y C8, los copolímeros, y el negro de humo grafitizado (GCB). Se han desarrollado estireno-divinilbenceno altamente reticulado y resinas poliméricas modificadas químicamente con un grupo funcional (OASIS-HLB, superficie específica: 800 m²/g), que tienen volúmenes de ruptura superiores a los obtenidos con sus análogos no modificados. Otros sorbentes, como LiChrolut EN, Isolute ENV e HYSphere-1, tienen un mayor grado de reticulación y materiales de alta porosidad, lo que aumenta su área específica y permite mayores interacciones π - π entre los analitos y el sorbente. Los sorbentes de sílice N-Alkyl suelen ser adecuados para sustancias cuyo log K_{ow} (la mayoría de los compuestos organofosforados), cuyos volúmenes de ruptura son elevados. En el caso de las sustancias con un log K_{ow}, (por ejemplo, diclorvos, triclorfón, mevinfos, oxidemetón metilo) cuyos volúmenes de ruptura son bajos, las fases poliméricas permiten mayores volúmenes de percolación [29].

La recuperación de OPPs por SPE depende de las propiedades fisicoquímicas de los analitos, de la naturaleza del agua (pH, carga de materia orgánica, fuerza iónica, etc.), del volumen de muestra percolada, de la velocidad de percolación, del tipo y la masa de sorbente utilizado y del método de desorción (eluyente, tiempo de contacto, caudal) [29].

En las técnicas offline, el disolvente de desorción más utilizado para la SPE con sorbente C18 es el acetato de etilo, a veces asociado al isooctano. También se utiliza el MTBE. En el caso de las fases poliméricas, se utilizan el metanol, el acetonitrilo y la acetona [29].

b) Extracción en disco líquido-sólido:

Es una variación del cartucho de extracción donde el sorbente está incrustado en una red de politetrafluoroetileno (PTFE) o de fibra de vidrio. Los discos de fibra de vidrio son más gruesos y más rígidos que las membranas de PTFE, lo que permite mayores caudales [29].

c) Microextracción en fase sólida (SPME) sobre fibra impregnada con una capa de sorbente:

Se basa en la adsorción de compuestos orgánicos presentes en un pequeño volumen de agua (de 2 a 5 ml) en una fibra de sílice fundida recubierta con una microcapa de fase sólida (de 7 a 100 nm de espesor). La extracción puede describirse como un proceso de equilibrio en el que los analitos se dividen entre la fase acuosa y la fase sólida inmovilizada en la fibra, regido por la ley de Nernst [29].

2.8 Métodos analíticos para la determinación de OPPs

Las técnicas cromatográficas como GC, LC y HPTLC, son utilizadas generalmente para determinar OPPs en los extractos obtenidos a partir de muestras de agua, suelo, residuos y aire. El carácter hidrofóbico de la mayoría de los OPPs, su volatilidad y su estabilidad térmica permiten una fácil determinación por CG. Para los plaguicidas termolábiles y polares, la LC es el método más apropiado. La cromatografía en capa fina de alto rendimiento (HPTLC), aunque marginal, podría ser aplicada para mezclas complejas. Otras técnicas analíticas pueden ser los inmunoensayos y los biosensores [29].

2.9 Cromatografía de gases

Es un método de separación que utiliza una fase móvil gaseosa para hacer pasar un líquido volátil o un soluto gaseoso por una fase estacionaria que se encuentra dentro de una columna tubular abierta o sobre un soporte sólido [34].

La GC con detección selectiva (fotometría de llama, detección de nitrógeno-fósforo o de emisión atómica, etc.), se utiliza para analizar los productos químicos organofosforados en muestras ambientales, alimentos y bebidas [35].

Hay dos clases de cromatografía de gases: *cromatografía de gas-sólido* (de adsorción) y *cromatografía de gas-líquido* (de partición).

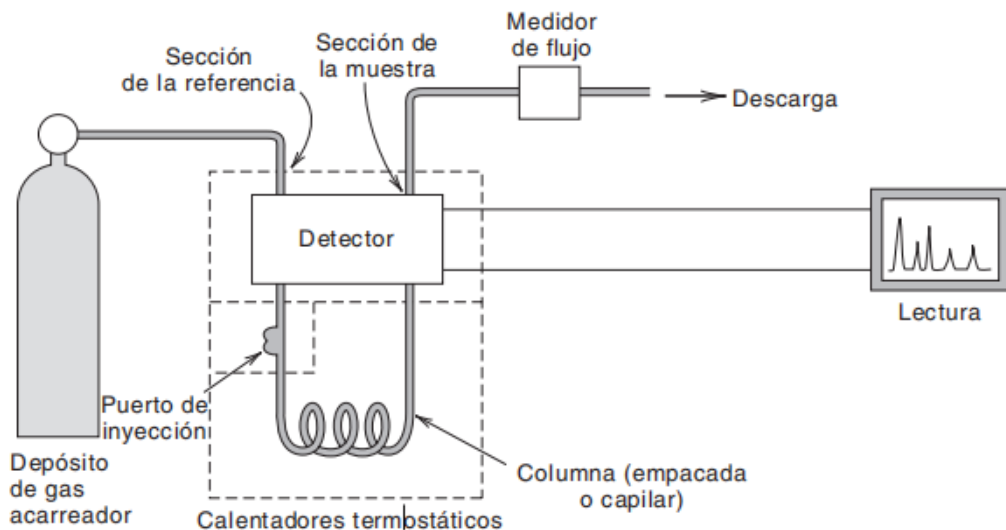


Figura 2.5. Esquema de un cromatógrafo de gases

En la figura 2.5, se puede observar el esquema de un cromatógrafo de gases, en donde la muestra se inyecta rápidamente con una microjeringa hipodérmica a través de un tapón septum de goma de silicona y pasa a la columna. El puerto de inyección de muestra, la columna y el detector se calientan a temperaturas a las que la muestra tenga una presión de vapor mínima de 10 torr, usualmente a unos 50°C por arriba del punto en el que ebulle el soluto con mayor alto punto de ebullición. El puerto de inyección y el detector se suelen mantener un poco más calientes que la columna para evaporar rápidamente la muestra líquida y evitar que ésta se condense en el detector. Para columnas empacadas se inyectan muestras líquidas de 0.1 a 10 μL , en tanto que para muestras gaseosas son necesarios de 1 a 10 mL.

La separación se efectúa a medida que los componentes del vapor se equilibran con el gas acarreador y la fase estacionaria. El gas acarreador es un gas químicamente inerte que debe encontrarse en forma pura, como argón, helio o nitrógeno.

La muestra se detecta automáticamente cuando sale de la columna (a un flujo constante) mediante diversos detectores cuya respuesta depende de la composición del vapor. El detector tiene una sección de referencia y una sección de muestreo. El gas acarreador pasa por la sección de referencia antes de entrar a la columna y sale de la columna por la sección de muestreo. La respuesta de

la sección de muestreo en relación con la señal en la sección de referencia se alimenta a un registrador donde se grafican los máximos cromatográficos en función del tiempo. Al medir el tiempo de retención (los minutos entre el momento de inyectar la muestra y el momento en que se registra el máximo cromatográfico) y comparar esta vez con el de un estándar de la sustancia pura se puede identificar el máximo. El área bajo el máximo es proporcional a la concentración, por lo que se puede determinar en forma cuantitativa la cantidad de sustancia [35].

2.9.1 Columnas cromatográficas

a) Columnas tubulares abiertas

Son fabricadas de sílice fundida (SiO_2) y recubiertas de poliimida (capaz de resistir $350\text{ }^\circ\text{C}$), como soporte y como protección contra la humedad atmosférica. Los diámetros interiores típicos son entre 0.1 y 0.53 mm, y las longitudes típicas, de 15 a 100 m. Son de mayor resolución, permiten mayor rapidez de análisis, y mayor sensibilidad que las columnas empaquetadas, aunque tienen menor capacidad de muestra. Las columnas no polares son las más indicadas para solutos no polares, mientras que las columnas de polaridad intermedia son las mejores para solutos de polaridad intermedia, y las muy polares, para solutos muy polares (tabla 2.4) [34].

Tabla 2.4. Polaridad de algunos solutos

No polares	De polaridad intermedia débil	Polaridad intermedia fuerte	Muy polares
Hidrocarburos saturados	Éteres	Alcoholes	Polihidroxicóholes
Hidrocarburos olefínicos	Cetonas	Ácidos carboxílicos	Aminoalcoholes
Hidrocarburos aromáticos	Aldehídos	Fenoles	Hidroxiácidos Ácidos polipróticos
Halocarburos	Ésteres	Aminas primarias y secundarias	Polifenoles
Mercaptanos	Aminas terciarias	Oximas	
Sulfuros	Nitrocompuestos (sin átomos -H)	Nitrocompuestos (con átomos -H)	
CS_2	Nitrilos (sin átomos)	Nitrilos (con átomos -H)	

Fuente: D. Harris, (2016). Análisis Químico cuantitativo

b) Columnas empaquetadas

Contienen un soporte sólido de partículas finas recubiertas de una fase estacionaria líquida no volátil, o el sólido mismo es la fase estacionaria. Son útiles para separaciones preparativas, en las que se precisa una gran cantidad de fase estacionaria, o para separar gases que no son muy retenidos [34].

2.9.2 Inyección de muestra

- a) *Inyección con división*: Se utiliza cuando los analitos de interés son >0.1% de la muestra.
- b) *Inyección sin división*: Se recomienda para el análisis de niveles traza de analitos (< 0.01% de la muestra) de alto punto de ebullición, disueltos en disolventes de bajo punto de ebullición.
- c) *En columna*: Utilizada para solutos estables térmicamente y para disolventes de alto punto de ebullición. Se caracteriza porque la disolución se inyecta directamente en la columna, sin pasar por un inyector caliente [34].

2.9.3 Detectores

Un detector ideal para cromatografía de gases debe cumplir con las siguientes características:

- Sensibilidad adecuada
- Buena estabilidad y reproductibilidad
- Respuesta lineal para los solutos que se extienda a varios órdenes de magnitud.
- Intervalo de temperaturas desde temperatura ambiente hasta al menos 400°C.
- Tiempo de respuesta corto independiente de la tasa de flujo.
- Alta confiabilidad y manejo sencillo.
- Respuesta semejante para todos los solutos o, una respuesta selectiva y altamente predecible para uno o más tipos de solutos.
- No debe destruir la muestra [36].

En la tabla 2.5, se enlistan los detectores más utilizados para la determinación de pesticidas organofosforados.

Tabla 2.5. Tipos de detectores usados para determinar OPPs

Detector	Grupo funcional	Sensibilidad (pg/s)
Fotometría de llama (FPD)	P S	0.5 a 0.9
Captura de electrones (ECD)	Cl, Br, compuestos que capturan electrones	5 a 20 0.1 (lindano)
Nitrógeno-Fósforo (NPD)	N P	0.2 a 0.4 0.1 a 0.2
Emisión Atómica (AED)	S P Cl C H Br	1.7 1.5 39 0.5 2.2 79

Fuente: G. Taylor & Francis, *Chromatographic Analysis of the Environment*, Third Edit. Taylor & Francis Group, 2006.

2.10 Espectrometría de masas

Es uno de los detectores más potentes y costosos para cromatografía de gases, es extremadamente sensible, y proporciona información cualitativa y cuantitativa [34].

Es un detector selectivo de plaguicidas cuando se combina con separaciones cromatográficas como GC o LC, permite diferenciar isómeros y permite la elucidación estructural basada en la comprensión del espectro de masas, especialmente de las vías de fragmentación, permitiendo una confirmación inequívoca, que implica una gran ventaja en el análisis de múltiples residuos [37], además permite la determinación cuantitativa de bajos niveles de contaminantes en mezclas complejas [38], y la detección e identificación simultánea de compuestos coeluyentes, en la que se seleccionan iones específicos o sus transiciones en un experimento de monitorización de reacciones múltiples (MRM) [39].

Modo de escaneo y modo SIM

Para el análisis de GC/MS se puede utilizar el modo de escaneo o el modo SIM, la elección depende del objetivo del análisis. Si identifica los componentes de la muestra mediante un espectro de masas, el modo de escaneo es necesario, mientras que el modo SIM es adecuado para el análisis cuantitativo de componentes traza, cuando se conocen los espectros de masas de dichos componentes [40].

Para aumentar la sensibilidad, se suele utilizar el modo de monitorización de iones seleccionados (GC SIM/MS) debido a su capacidad de identificación. En este modo se seleccionan los tres iones más intensos en el espectro de masas del analito; uno se utiliza para la cuantificación, mientras que los otros dos para la calificación. Aunque se pueden seleccionar más de dos iones para la cualificación, esto puede interferir con la sensibilidad del método [3].

La GC-MS ejecutada en modo de barrido completo, implica que todas las masas que eluyen de la GC son ionizadas y detectadas por la MS. La identificación de los analitos en este modo puede lograrse comparando la EI-MS del analito con las bibliotecas estándar de MS (NIST 20), que contiene unos 350.000 espectros de masas de compuestos estándar [3].

2.11 Validación de métodos

Un método analítico es una serie de procedimientos que van desde la preparación de la muestra hasta la emisión del informe final. La validación de métodos es el proceso de verificación de la idoneidad [41]. Según la ISO/IEC 17025, la validación de un método se define como la confirmación, a través del examen y aportación de evidencias objetivas, de que se cumplen los requisitos particulares para un uso específico previsto.

Un método debe ser validado cuando es necesario demostrar que sus características de desempeño son adecuadas para el uso previsto, aplica para métodos no normalizados, métodos diseñados/desarrollados por el laboratorio, métodos normalizados usados fuera de su ámbito de aplicación, ampliaciones o modificaciones de métodos normalizados.

2.11.1 Parámetros de calidad

Son los criterios cuantitativos que se utilizan para decidir si un método es adecuado o no para resolver un determinado problema analítico. En la tabla 2.6, se muestran los parámetros de calidad de los métodos analíticos.

Tabla 2.6. Parámetros de calidad de los métodos analíticos

Característica	Parámetro de calidad
Precisión	Desviación estándar absoluta, desviación estándar relativa, coeficiente de variación, varianza
Exactitud	Error absoluto, error relativo, porcentaje de recuperación
Sensibilidad	Pendiente de recta de calibrado
Selectividad	Coeficiente de selectividad

Robustez	Desviación estándar absoluta, desviación estándar relativa, coeficiente de variación, varianza
-----------------	--

Fuente: Sierra, I. & otros (2010). Análisis instrumental

2.11.2 Características de desempeño

2.11.2.1 Límite de detección (LD)

Es la concentración más baja del analito que puede ser detectada por el método a un nivel de confianza especificado [42].

$$LD = B + 3 S_B$$

Donde:

B → Promedio de las mediciones

S_B → Desviación estándar del blanco

2.11.2.2 Límite de cuantificación (LC)

Es la concentración mínima de analito que pueden cuantificarse con una exactitud y precisión aceptable. Puede considerarse como el límite inferior del intervalo lineal o rango. El cálculo se realiza a partir de la señal mínima cuantificable que es la señal media del blanco analítico [43].

$$LC = B + 10 S_B$$

2.11.2.3 Linealidad

Es la capacidad de un método para dar respuestas relacionadas linealmente con la concentración del analito dentro de un determinado intervalo o rango de concentraciones.

2.11.2.4 Intervalo de trabajo

Es el intervalo en el cual el método proporciona resultados con una incertidumbre aceptable. El extremo inferior del intervalo de trabajo está determinado por el límite de cuantificación (LOQ). El extremo superior del intervalo de trabajo está definido por las concentraciones a las cuales se observan anomalías significativas en la sensibilidad analítica [42].

2.11.2.5 Sensibilidad analítica

Es la variación de la respuesta del instrumento que corresponde a una variación de la magnitud medida (por ejemplo, una concentración de analito) [42].

2.11.2.6 Exactitud de medición

Expresa la proximidad de un único resultado a un valor de referencia. La exactitud se estudia como dos componentes: veracidad y precisión [42].

2.11.2.7 Veracidad de medición

Es una expresión de la proximidad de la media de un número infinito de resultados (producidos con el método) a un valor de referencia, se expresa cuantitativamente en términos de sesgo [42].

2.11.2.8 Precisión

Se puede definir como el grado de concordancia entre los resultados obtenidos cuando un método se aplica, repetidamente y desde el principio, sobre distintas partes representativas de una misma muestra. Mide el error aleatorio de un método, y puede estimarse de la siguiente manera:

a) Repetibilidad

Es el grado de concordancia entre los resultados obtenidos cuando el método es aplicado a la misma muestra repetidas veces por un único analista en corto tiempo.

b) Precisión intermedia

Es el grado de concordancia entre los resultados obtenidos cuando el método es aplicado a la misma muestra repetidas veces por un único analista en distintos días.

c) Reproducibilidad

Es el grado de concordancia entre los resultados obtenidos cuando el método es aplicado a la misma muestra repetidas veces por diferentes analistas, distintos laboratorios y en días diferentes [43].

Los parámetros de calidad para evaluar la precisión, se indican en la tabla 2.6. Se definen con las siguientes fórmulas:

$$sd = \sqrt{\sum (x_i - \bar{x})^2 / (n - 1)} \quad RSD = \frac{sd}{\bar{x}} \quad CV(\%) = \frac{sd}{\bar{x}} \times 100$$

Donde:

sd → Desviación estándar absoluta

RSD → Desviación estándar relativa

CV → Coeficiente de variación

\bar{x} → Valor promedio de las mediciones

$n - 1$ → grados de libertad

2.11.2.9 Incertidumbre de medida

La incertidumbre es un intervalo asociado con un resultado de medida que expresa el intervalo de valores que razonablemente pueden atribuirse a la cantidad que se está midiendo. Una estimación de la incertidumbre debe tener en cuenta todos los efectos reconocidos que operan en el resultado [42].

2.11.2.10 Robustez

Es una medida de su capacidad para permanecer no afectado por pequeñas variaciones premeditadas de los parámetros del método, proporciona una indicación de la fiabilidad del método durante su uso normal [42].

2.12 Evaluación ambiental

La evaluación de Impacto Ambiental (EIA) es uno de los principales instrumentos de gestión ambiental. Es un proceso de análisis, más o menos largo y complejo, encaminado a que los agentes implicados en los proyectos vinculados a ella, formen un juicio previo, lo más objetivo posible, sobre los posibles efectos ambientales y sobre la posibilidad de evitarlos, reducirlos a niveles aceptables o compensarlos [44].

2.13 Evaluación del riesgo ecológico

La evaluación del riesgo ecológico (ERE), es la determinación de la probabilidad de que las actividades antropogénicas, produzcan efectos adversos en los animales, plantas y el ambiente. En los últimos años, la ERE se ha convertido en una herramienta útil para el desarrollo de programas de protección como apoyo para la toma de decisiones en el manejo ambiental, ayuda a identificar los valores ambientales de interés, los riesgos más importantes y los vacíos de información [45].

El riesgo ecológico se evalúa a partir de la relación entre la exposición y los efectos. Los efectos se estiman a partir de datos encontrados en la literatura, de información generada en el laboratorio u obtenida en el campo, mientras que para la exposición se calculan las cantidades de compuestos tóxicos que se liberan al ambiente usando modelos para estimar su destino y su concentración en los diferentes compartimientos ambientales [45].

De acuerdo a la U.S.E.P.A., el proceso de una ERE puede dividirse en tres fases (USEPA 1998):

- I. Formulación del problema, en la cual se define el propósito particular de la evaluación y se diseña un plan de acción.
- II. Análisis, el núcleo del ERE.

- III. Caracterización del riesgo, fase en la cual se integran los resultados y se determina una medida del riesgo [45].

CAPÍTULO 3

3. METODOLOGÍA

El presente estudio se centra en la detección y cuantificación de pesticidas organofosforados tales como: demeton-s-metil, dimetoato, tolclofos metil, pirimifos metil, malatión, clorpirifos, metidatión, protiofos, profenofos, etión, azinfos metil, y pirazofos, en matrices de agua natural de los agroecosistemas del Norte de la Amazonía ecuatoriana, debido a ello constituye una investigación mixta de tipo cuantitativa y cualitativa.

La metodología se basa en artículos científicos y en el método EPA 8141B, el cual proporciona procedimientos analíticos para la determinación de compuestos organofosforados por cromatografía de gases y extracción en fase sólida. La técnica utilizada para el análisis de los analitos de interés, corresponde a la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS).

La cromatografía de gases constituye una de las técnicas más utilizadas que en conjunto con detectores específicos permite la separación, identificación y cuantificación de moléculas complejas como los OPPs. Esta técnica acoplada a la espectrometría de masas, es utilizada para la detección precisa de OPPs debido a su selectividad y repetibilidad [3].

Además, la extracción en fase sólida (SPE) proporciona un buen factor de enriquecimiento, que a su vez favorece los bajos valores del límite de detección en el análisis de trazas de pesticidas en matrices de agua [4].

Según la Norma de Calidad Ambiental y de Descarga de Efluentes: Recurso Agua – Libro VI Anexo 1 de Ecuador, el límite máximo permisible de pesticidas organofosforados totales en aguas dulces, frías o cálidas, en aguas marinas y de estuario, para la preservación de la flora y fauna es de 10 µg/L [46].

Por lo mencionado anteriormente, y debido a la volatilidad, estabilidad térmica y a que la mayoría de OPPs tienen carácter hidrofóbico, la GC-MS es la técnica adecuada para la determinación y detección de los analitos de estudio.

3.1 Área de estudio y muestreo

Este estudio se centra en el norte de la Amazonía ecuatoriana que se ha caracterizado por ser una de las áreas con más biodiversidad del planeta [47]. Sin embargo, también presenta una alta tasa de deforestación debido a la expansión de la frontera agrícola [1].

Para la toma de muestras, se realizó un muestreo no probabilístico de criterio técnico, basado en las zonas aledañas a cultivos de maíz y palma aceitera, en las provincias de Napo y Sucumbíos, respectivamente.

Las muestras fueron colectadas en 10 puntos a lo largo de los afluentes del río Napo (Figura 3.1), el cual es uno de los principales tributarios del río Amazonas, y constituye el río más grande del Ecuador [48]. Por cada sitio se tomaron dos muestras.

Las coordenadas de los sitios de muestreo para cada provincia se indican en la tabla 3.1.

Tabla 3.1. Localización geográfica de los puntos de muestreo

Provincia	Código de la muestra	UTM X	UTM Y
Napo	N-1	224405	9887295
	N-2	230851	9892654
	N-3	212941	9878992
	N-4	211656	9881921
	N-5	188189	9882211
Sucumbíos	SH-1	298699.06	9978014.49
	SH-2	346832	9966533
	SH-3	320523	9967741
	SH-4	330693	9983897
	SH-5	328088	9983439

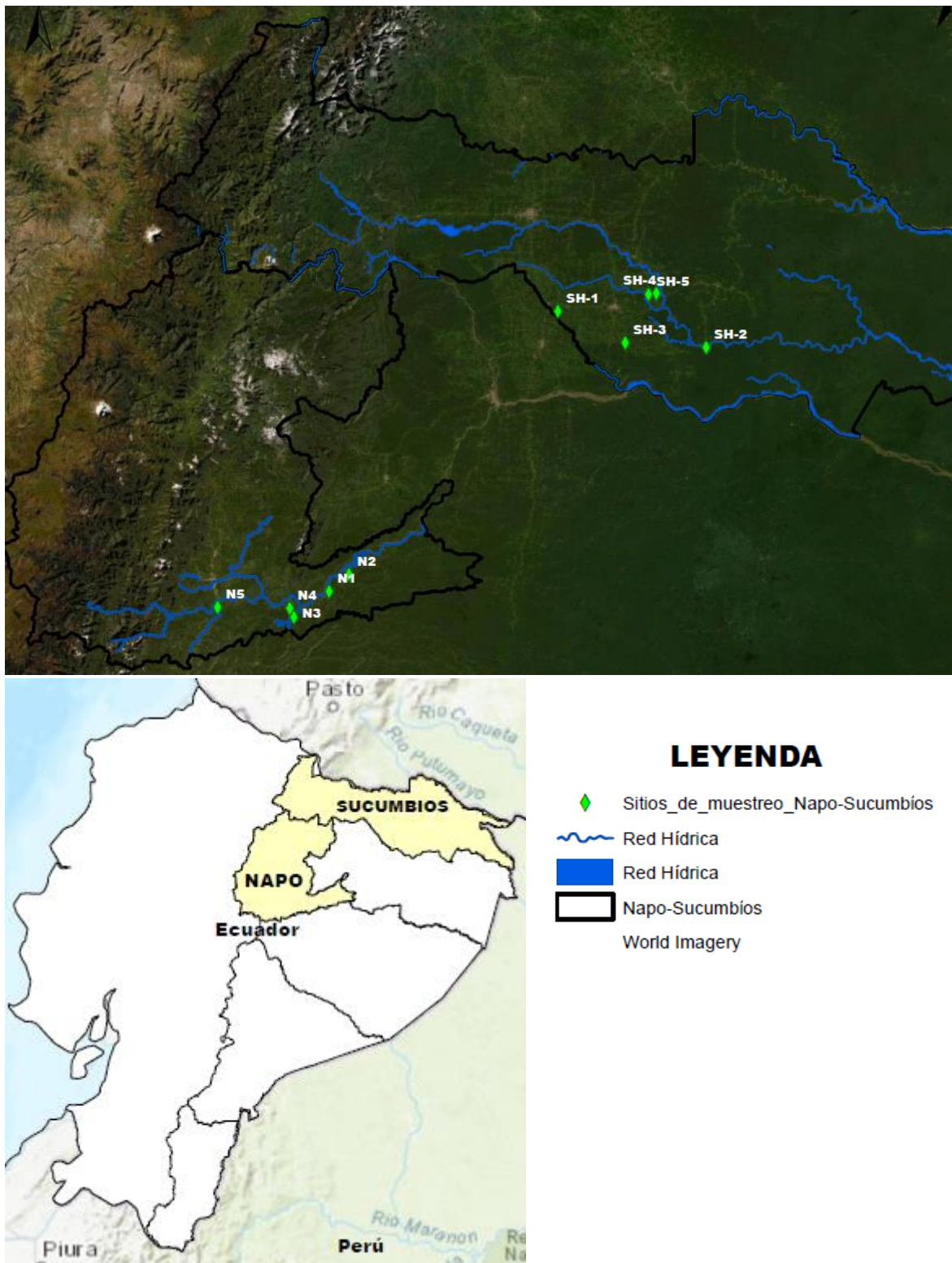


Figura 3.1. Sitios de muestreo a lo largo del río Napo en las provincias de Napo y Sucumbíos

3.2 Métodos y materiales

El método de referencia se basa en el estudio realizado por Cruzeiro et al. y el EPA 8141B: “*Organophosphorus Compounds By Gas Chromatography*”.

Los instrumentos utilizados para la preparación de disoluciones, estándares y medición de las muestras fueron de alta calidad.

Los materiales de vidrio empleados fueron matraces volumétricos, pipetas, y probetas. Para el control de las disoluciones preparadas de pesticidas se utilizó una balanza analítica calibrada de capacidad 220 g. Para la extracción en fase sólida se utilizaron los cartuchos Oasis HLB 6 cm³ de 200 mg.

Durante la ejecución de los ensayos se controló la temperatura y la humedad relativa de acuerdo a los rangos permitidos por el equipo (GC-MS). En la tabla 3.2, se detallan los equipos utilizados en los ensayos.

Tabla 3.2. Equipos e instrumentos de medida

Nombre	Marca	Modelo	Error
Cromatógrafo de gases- Espectrómetro de Masas	Shimadzu	GCMS-QP2020 NX	-
Columna capilar	Shimadzu	SH-I-5MS	-
Equipo de extracción en fase sólida (SPE)	Supelco	-	-
Micropipeta 10-100 µL,	Fischer Scientific	Finnpipette F2	0.14 µL
Micropipeta 20-200 µL	Fischer Scientific	Finnpipette F2	1.16 µL
Micropipeta 100-1000 µL	Fischer Scientific	Finnpipette F2	6.3 µL
Sistema de purificación de agua	Thermo Scientific	Smart2pure3UV	-
Balanza analítica	Ohaus	AX224/E	0.3 mg
Estufa	ESCO	OFA-54-9	-0.6°C
Termohigrómetro	Thomas Scientific / Proinstra	1235D33	-

Se utilizó un estándar de mezcla de pesticidas organofosforados de pureza ≥ 94 %. Los reactivos utilizados fueron de buena calidad y se detallan en la tabla 3.3. El gas utilizado fue Helio de clase 5.0.

Tabla 3.3. Reactivos químicos utilizados

Nombre	Grado/Clase	Marca	Pureza (%)
Acetato de etilo	HPLC	Pharmco-Aaper	99.98
Metanol	HPLC	Sigma	≥ 99.9
n-Hexano	HPLC	Merck	≥ 97.0
Acetona	ACS	Fisher	99.6
Agua desionizada	Tipo I	-	-

<p>Mezcla de pesticidas organofosforados (metamidofos 99%, diclorvos 98%, acefato 99%, ometoato 98%, demeton-s-metil 94%, dimetoato 98%, tolclofos metil 98%, pirimifos metil 99%, malatión 99%, clorpirifos 98%, metidatión 99%, protiofos 97%, profenofos 98%, etiión 99%, azinfos metil 97%, pirazofos 98%)</p>	<p>Estándar</p>	<p>Restek European OPP Mix # 32418</p>	<p>≥ 94</p>
--	-----------------	--	-------------

3.3 Procedimiento

3.3.1 Toma de muestras

Para la limpieza del material de vidrio se siguió el procedimiento de la “*Guía para la toma de muestras de residuos de plaguicidas: Agua, sedimento y suelo*”, del Instituto de Investigaciones Agropecuarias de Chile [49]. Se utilizaron botellas de vidrio ámbar de 500 mL, lavadas previamente con agua tipo I, secadas en la estufa a 105°C, y posteriormente enjuagadas con el solvente. En el lugar de muestreo se tomó la muestra en el punto medio de la corriente principal, y de velocidad máxima, se introdujo la botella tapada a una profundidad intermedia entre la superficie y el fondo del cauce, una vez alcanzada la profundidad deseada se retiró la tapa y se llenó con el agua natural.

Siguiendo la metodología de Cruzeiro et al. [50], se colectó 500 mL de muestra de agua de río en cada punto de muestreo, no fue necesario el ajuste del pH, ya que los valores oscilaban entre 7 a 7.6 (el método recomienda ajustar el pH en un intervalo de 5 a 8). Se almacenó a 4 °C [51] en una hielera de poliestireno hasta trasladarlas al Laboratorio Nacional de Referencia del Agua (LNRA). Las muestras se filtraron a través de una membrana de fibra de vidrio de 0.7 µm de poro, y se almacenaron a -20 °C hasta su análisis.

3.3.2 Preparación de la solución stock y estándares de calibración

Se preparó 100 mL de una solución stock a partir del estándar *European Mix OPP #32418*, utilizando hexano grado HPLC como solvente. Las concentraciones para cada estándar se detallan en la tabla 3.4.

Tabla 3.4. Concentración de los OPPs de la solución stock

Pesticida organofosforado	Concentración (µg/L)
Demeton-s-metil	2006.0
Dimetoato	2010.0
Tolclofos-metil	1000.0
Pirimifos-metil	1010.0
Malatión	1989.0
Clorpirifos	1010.0
Metidatión	2020.0
Protiofos	1989.0
Profenofos	2018.0
Etión	2010.0
Azinfos metil	4003.0
Pirazofos	5000.0

Las disoluciones de los estándares de calibración se prepararon a partir de la solución stock (tabla 3.4) con el mismo solvente.

3.3.3 Extracción SPE (fuera de línea):

Se acondicionaron los cartuchos Oasis HLB con 5 mL de Acetato de etilo, 5 mL de metanol, y 5 mL de agua desionizada, aplicando una velocidad de flujo de 1-2 mL/min. Posteriormente, se cargó 500 mL de muestra en el cartucho SPE a una velocidad de flujo constante de 5 mL/min. Los cartuchos se secaron aplicando vacío durante 1 h, y posteriormente se eluyó con 6 mL de acetato de etilo a 1 mL/min. El extracto se concentró completamente bajo una corriente suave de nitrógeno, y se reconstituyó con 500 µL de hexano grado HPLC [50].

3.3.4 Análisis GC-MS

Los ensayos de validación y las muestras se determinaron bajo las condiciones cromatográficas que se muestran en las tablas 3.5 y 3.6.

Tabla 3.5. Condiciones cromatográficas

Columna	Columna capilar, SH-I-5MS (30 m, 0.25 mm ID, 0.25 µm df)
Inyección	Splitless, 3 µL
Temperatura de inyección	250 °C
Gas de arrastre	Helio, 1.69 mL/min
Velocidad lineal	47.5 cm/s
Temperatura del horno	65 °C (2 min), 180 °C a 20°C/min, hasta 280°C a 5°C/min (3 min) Tiempo total de corrida: 30.75 min

Tabla 3.6. Condiciones del MS

Temperatura de la fuente de iones	240 °C
Temperatura de la interfase	280 °C
Energía de los electrones	70 eV
Tipo de barrido	SIM y Scan
Ionización	Impacto de electrones
Tiempo de corte del solvente	6 min
Detector	Multiplicador de electrones con lente saturado de bajo ruido
Analizador de masa	Cuadrupolo de meta con pre-barras

3.4 Estudio de validación del método

Para la implementación y validación del método para determinación de OPPs en matrices de agua se establecieron los siguientes parámetros: linealidad, estudio de blancos, selectividad, límite de detección, límite de cuantificación, precisión (repetibilidad, precisión intermedia) y veracidad. Los objetivos de validación se muestran en la tabla 3.7.

Tabla 3.7. Objetivos de validación del método

Parámetro	Objetivos de validación
Linealidad	Coficiente de determinación: $r^2 \geq 0.99$
Selectividad	Ausencia de señal en los tiempos de retención de los analitos
Límite de detección	% RSD: $\leq 22 \%$
Límite de cuantificación	Se evalúa % recuperación 70%-130%
Precisión (repetibilidad y precisión intermedia)	% CV de repetibilidad: $\leq 16 \%$ % CV de precisión intermedia: $\leq 22 \%$
Veracidad	% Recuperación: 70%-130%

A continuación, se detallan las características de desempeño para el método:

3.4.1 Estudio del blanco. Selectividad

Los blancos se inyectaron en el GC-MS a las condiciones indicadas en la tabla 3.5 y 3.6.

- *Blanco reactivo (solvente):* Se inyectó el solvente hexano.
- *Blanco reactivo (gas de arrastre):* Se realizó la corrida sólo del gas de arrastre para verificar si hay señal en el tiempo de retención de alguno de los analitos.
- *Muestra blanco matriz:* Se realizó la extracción SPE a una matriz de agua natural tomada en una zona donde se presume no hay actividad agrícola.
- *Muestra blanco:* Se realizó la extracción SPE al agua desionizada tipo I.

3.4.2 Linealidad

Se analizaron tres curvas de calibración de forma independiente, diluyendo la solución stock del estándar mix de OPPs a 5 niveles de concentración para cada analito, en un rango de 0.020-0.080 µg/mL (tolclofos-metil, pirimifos-metil y clorpirifos); 0.040-0.160 µg/mL (demeton-S-metil, malatión, metidatión, protiofos y etión); 0.060-0.222 µg/mL (dimetoato, profenofos); 0.080-0.320 µg/mL (azinfos metil) y 0.1-0.5 µg/mL (pirazofos).

3.4.3 Estudio del efecto matriz

Se fortificaron las muestras de agua natural real con la solución stock del estándar mix de OPPs, a las mismas concentraciones utilizadas en la curva de calibración (tabla 3.8). El ensayo se realizó por triplicado.

Tabla 3.8. Concentraciones de la curva de calibración en matriz por analito

OPP	Std 1 (µg/L)	Std 2 (µg/L)	Std 3 (µg/L)	Std 4 (µg/L)	Std 5 (µg/L)
Demeton-s-metil	0.040	0.060	0.080	0.120	0.160
Dimetoato	0.060	0.080	0.121	0.161	0.221
Tolclofos-metil	0.020	0.030	0.040	0.060	0.080
Pirimifos metil	0.020	0.030	0.040	0.061	0.081
Malatión	0.040	0.060	0.080	0.119	0.159
Clorpirifos	0.020	0.030	0.040	0.061	0.081
Metidatión	0.040	0.061	0.081	0.121	0.162
Protiofos	0.040	0.060	0.080	0.119	0.159
Profenofos	0.061	0.081	0.121	0.161	0.222

Etión	0.040	0.060	0.080	0.121	0.161
Azinfos metil	0.080	0.120	0.160	0.240	0.320
Pirazofos	0.100	0.150	0.200	0.300	0.400

3.4.4 Límite de detección y límite de cuantificación

Los valores LOD y LOQ del método se determinaron de acuerdo a los lineamientos de la ICH, basado en la desviación estándar de la respuesta y la pendiente de la curva de calibración.

$$LD = \frac{3.3 \sigma}{S}; \quad LC = \frac{10 \sigma}{S}$$

Donde:

σ → Desviación estándar del intercepto

S → Pendiente de la curva de calibración

3.4.5 Precisión

Se fortificaron muestras de agua natural a tres niveles de concentración: bajo, medio y alto, de acuerdo a la tabla 3.9. Para evaluar la repetibilidad se ejecutó todo el proceso de extracción hasta la reconstitución, 4 veces el mismo día. Para el estudio de precisión intermedia se realizó el ensayo en 3 días diferentes.

Tabla 3.9. Concentraciones de OPPs para estudio de precisión

Pesticida organofosforado	Rango bajo C (ug/L)	Rango medio C (ug/L)	Rango alto C (ug/L)
Demeton-s-metil	0.060	0.090	0.140
Dimetoato	0.060	0.090	0.141
Tolclofos-metil	0.030	0.045	0.070
Pirimifos metil	0.030	0.045	0.071
Malatión	0.060	0.090	0.139
Clorpirifos	0.030	0.045	0.071
Metidatión	0.061	0.091	0.141
Protiofos	0.060	0.090	0.139
Profenofos	0.061	0.091	0.141
Etión	0.060	0.090	0.141
Azinfos metil	0.120	0.180	0.280
Pirazofos	0.150	0.225	0.350

3.4.6 Veracidad

Se fortificó una muestra de agua natural real a 3 niveles de concentración (bajo, medio y alto), de acuerdo a la tabla 3.9. Se realizaron 12

determinaciones, y se evaluó el porcentaje de recuperación en un rango entre 70% y 130%.

3.4.7 Análisis de muestras

Las muestras colectadas en los puntos de muestreo fueron tratadas de acuerdo a la metodología explicada anteriormente, y se inyectó un blanco control cada 5 muestras, para evidenciar si hay problemas de contaminación en el sistema cromatográfico.

3.5 Tratamiento de datos

Se utilizó el software *LabSolutions* para la obtención de los cromatogramas y para el tratamiento de los mismos.

Se utilizó el Software NIST MS Search 2.4 y la librería incluida en el equipo para confirmar la identidad de los analitos en el cromatograma.

El análisis estadístico se realizó en Microsoft Excel, y se utilizaron estadísticas descriptivas tales como medidas de tendencia central (media), y medidas de dispersión (desviación estándar, varianza, coeficiente de variación).

CAPÍTULO 4

4. RESULTADOS

4.1 Identificación de los OPPs mediante la técnica de GC-MS

Para la identificación y cuantificación de los analitos se utilizó un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas Shimadzu, GCMS-QP2020 NX. La separación de los analitos se llevó a cabo utilizando una columna cromatográfica SH-I-5MS (30 m, 0.25 mm ID, 0.25 μ m df). Los tiempos de retención de cada analito fueron determinados mediante el análisis del estándar mix de OPPs a una concentración de 700 μ g/L (en referencia al tolclofos-metil) en el modo SCAN (barrido completo) como se muestra en la tabla 4.1. Se pudo confirmar la identidad de cada analito de acuerdo al certificado de análisis y mediante la comparación del cromatograma obtenido con la biblioteca estándar del equipo, obteniéndose un porcentaje de similitud mayor al 90% para todos los analitos. En la figura 4.1, se muestran los 16 analitos que componen el mix de OPPs y que fueron separados utilizando las condiciones cromatográficas indicadas en la tabla 3.5

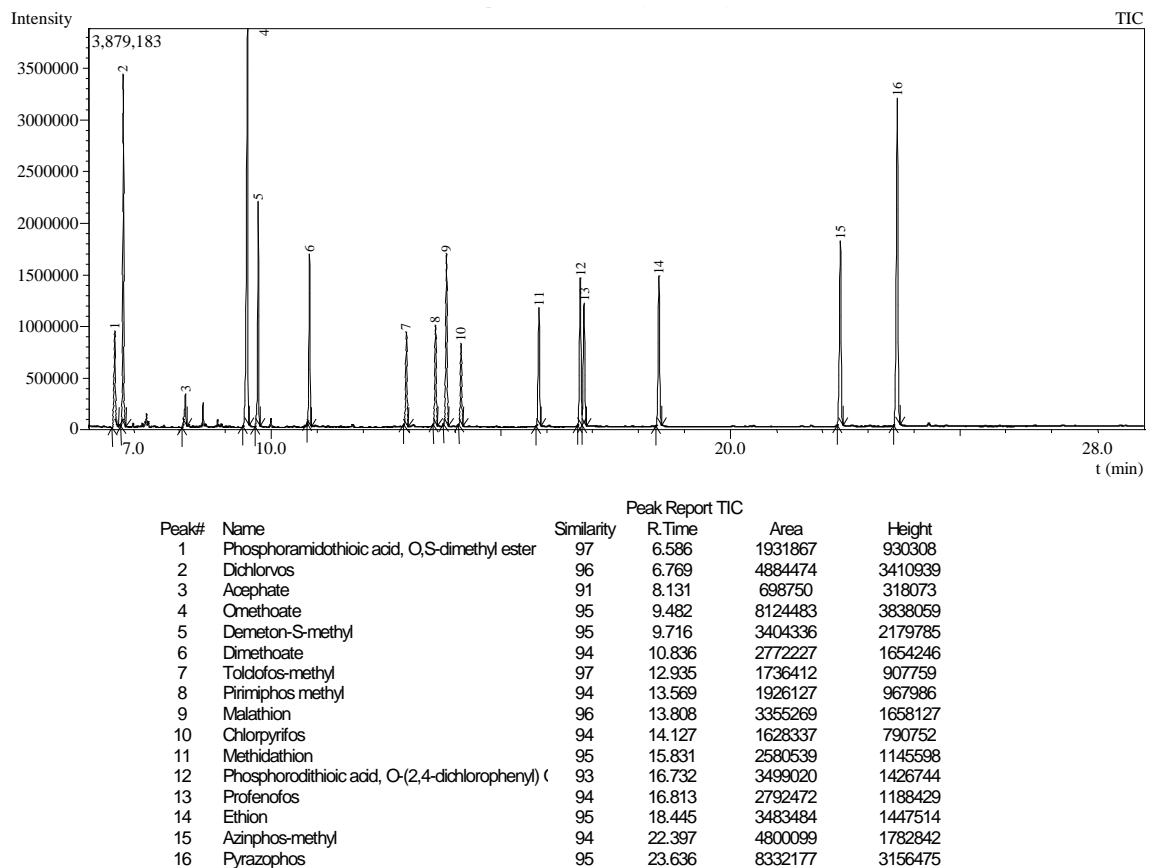


Figura 4.1. Cromatograma del estándar mix de OPPs obtenido por GC-MS en modo SCAN

Debido a que los pesticidas organofosforados se encuentran en niveles traza en las matrices de agua, fue necesario aumentar la sensibilidad de la lectura, para

lo cual se utilizó el modo de monitorización de iones seleccionados (SIM) mediante el cual se seleccionaron tres iones de mayor intensidad en el espectro de masas, de acuerdo a la tabla 4.1.

Tabla 4.1. Identificación y tiempo de retención de los analitos de estudio

N° pico	Pesticida organofosforado	t retención (min)	m/z	iones de referencia
1	Metamidofos	6.586	6.587	95.00-141.00
2	Diclorvos	6.769	6.77	79.00-185.00
3	Acefato	8.131	8.13	42.00-94.00
4	Omtoato	9.482	9.483	156.00-79.00
5	Demeton-s-metil	9.716	9.717	60.00-109.00
6	Dimetoato	10.836	10.837	93.00-125.00
7	Tolclofos-metil	12.935	12.933	267.00-125.00
8	Pirimifos metil	13.569	13.57	276.00-305.00
9	Malatión	13.808	13.807	127.00-93.00
10	Clorpirifos	14.127	14.127	199.00-197.00
11	Metidatión	15.831	15.83	145.00-93.00
12	Protiofos	16.732	16.73	113.00-43.00
13	Profenofos	16.813	16.813	43.00-139.00
14	Etión	18.445	18.443	97.00-153.00
15	Azinfos metil	22.397	22.397	160.00-132.00
16	Pirazofos	23.636	23.637	232.00-265.00

Una vez definidas las condiciones óptimas, se procedió con el estudio de validación del método y análisis de las muestras de agua natural.

4.2 Estudio de validación del método

Para la validación del método se consideraron los lineamientos de la Eurachem y la ICH Q2(R1), para los siguientes parámetros:

4.2.1 Blancos. Selectividad

Se realizó la inyección del blanco de reactivo (solvente y gas de arrastre), blanco de muestra sin presencia de OPPs (agua desionizada) y blanco de muestra matriz (agua natural), con el fin de identificar la presencia de interferencias en los tiempos de retención de cada analito. Se puede evidenciar en la figura 4.2 y tabla 4.2, que no hay picos en los tiempos de retención de los analitos de estudio seleccionados: demeton-s-metil, dimetoato, tolclofos-metil, pirimifos metil, malatión, clorpirifos, metidatión, protiofos, profenofos, etión, azinfos metil, pirazofos, por lo tanto, el método es selectivo.

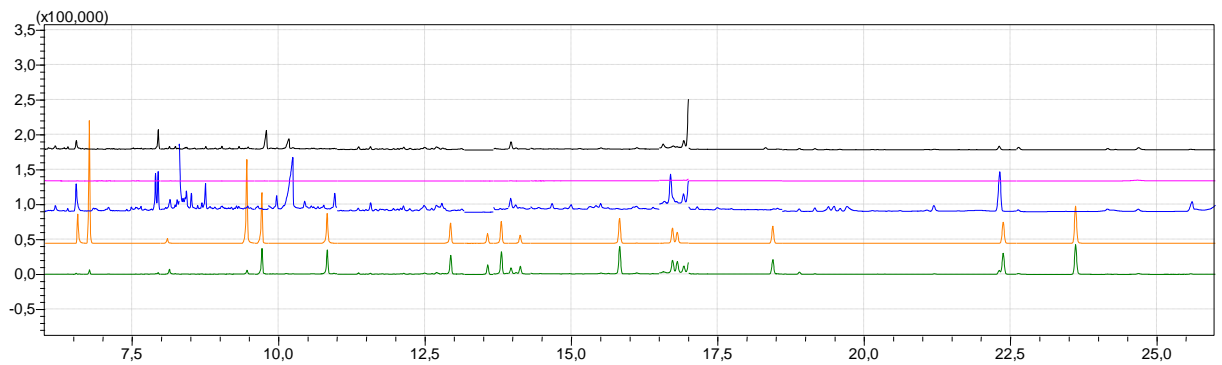


Figura 4.2. Comparación de blancos de muestra y estándares de OPPs. Las líneas de colores representan a: negra -> blanco de muestra (agua de río), rosa -> blanco de reactivo (gas de arrastre), azul -> blanco de muestra (agua desionizada), naranja -> estándar de OPPs en solvente, verde -> muestra fortificada.

Tabla 4.2. Resultados del análisis de blancos de todos los analitos del mix de OPPs

Pesticida organofosforado	t retención (min)	Blanco solvente	Blanco gas de arrastre	Blanco de muestra (agua desionizada)	Blanco de muestra (agua natural)
Metamidofos	6.586	ND	La relación del ion de referencia no coincide	La relación del ion de referencia no coincide	La relación del ion de referencia no coincide
Diclorvos	6.769	ND	ND	La relación del ion de referencia no coincide	La relación del ion de referencia no coincide
Acefato	8.131	ND	La relación del ion de referencia no coincide	La relación del ion de referencia no coincide	La relación del ion de referencia no coincide
Ometoato	9.482	ND	ND	La relación del ion de referencia no coincide	La relación del ion de referencia no coincide
Demeton-s-metil	9.716	ND	ND	La relación del ion de referencia no coincide	La relación del ion de referencia no coincide
Dimetoato	10.836	ND	ND	La relación del ion de referencia no coincide	ND
Tolclofos-metil	12.935	ND	ND	La relación del ion de referencia no coincide	ND
Pirimifos metil	13.569	ND	ND	ND	ND
Malatión	13.808	ND	ND	La relación del ion de referencia no coincide	ND

Clorpirifos	14.127	ND	ND	La relación del ion de referencia no coincide	La relación del ion de referencia no coincide
Metidati3n	15.831	ND	ND	La relaci3n del ion de referencia no coincide	La relaci3n del ion de referencia no coincide
Protiofos	16.732	ND	ND	ND	ND
Profenofos	16.813	ND	ND	La relaci3n del ion de referencia no coincide	La relaci3n del ion de referencia no coincide
Eti3n	18.445	ND	ND	ND	ND
Azinfos metil	22.397	ND	ND	La relaci3n del ion de referencia no coincide	La relaci3n del ion de referencia no coincide
Pirazofos	23.636	ND	ND	ND	ND

4.2.2 Linealidad

Se evalu3 con preparando tres curvas de calibraci3n con el est3ndar mix de pesticidas organofosforados, obteni3ndose un comportamiento lineal con un coeficiente de determinaci3n r^2 mayor a 0.99 para la mayori3 de analitos de estudio, como se observa en la tabla 4.3. Por lo tanto, se cumple con el objetivo de validaci3n propuesto.

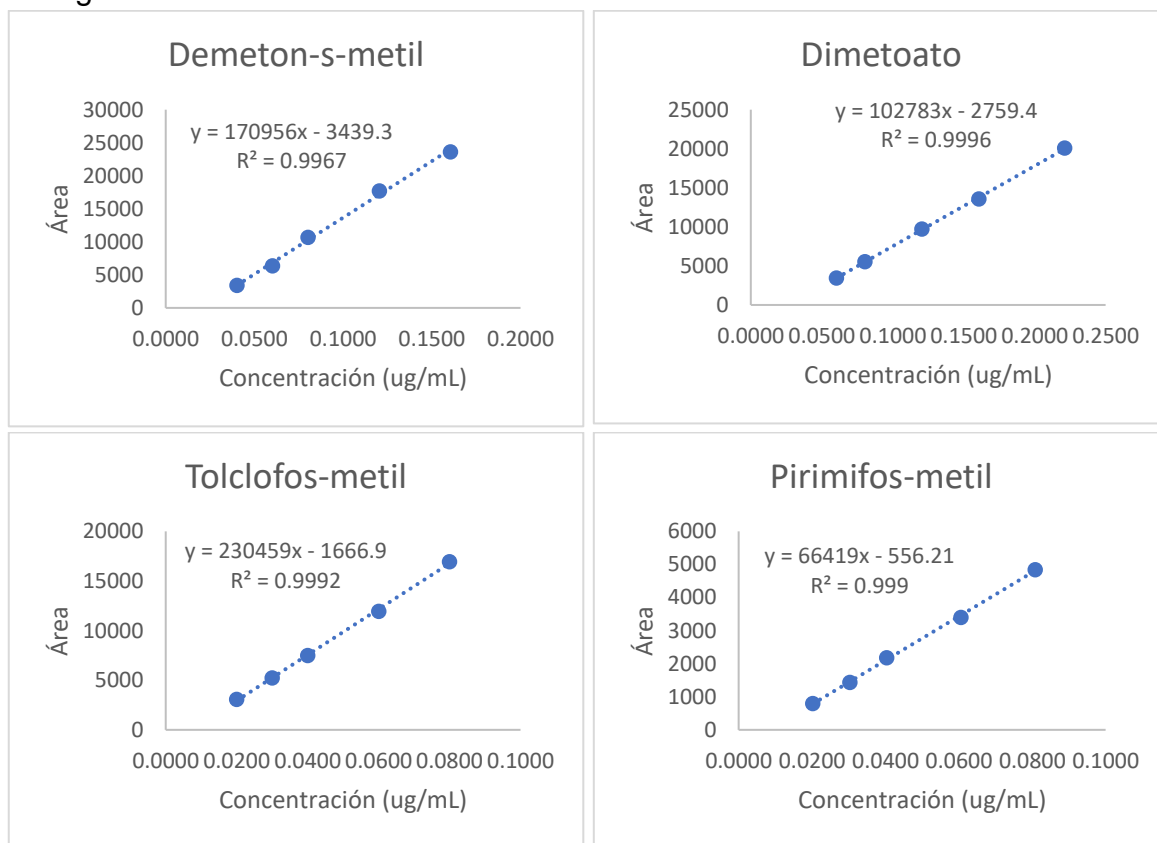
Tabla 4.3. Resultados obtenidos de las curvas de calibraci3n est3ndar para los analitos de estudio

OPPs	Estadisticos	Curva 1	Curva 2	Curva 3
Demeton-s-metil	Pendiente	170956.10	188033.74	163567.92
	Intercepto	-3439.34	-4215.80	-3582.79
	r^2	0.997	0.998	0.993
	Sa	581.31	541.37	794.90
	Sb	5705.14	5313.17	7801.39
	Sc	551.24	513.37	753.78
Dimetoato	Pendiente	102783.17	124888.42	105551.61
	Intercepto	-2759.43	-4724.45	-4066.36
	r^2	1.000	0.996	0.993
	Sa	164.92	615.39	708.76
	Sb	1169.72	4364.88	5027.16
	Sc	150.91	563.14	648.59
Tolclofos-metil	Pendiente	230458.62	224851.72	178928.45
	Intercepto	-1666.90	-2125.38	-1286.51
	r^2	0.999	0.997	0.995
	Sa	190.98	380.99	378.28

	Sb	3759.95	7500.75	7447.41
	Sc	181.10	361.28	358.71
Pirimifos metil	Pendiente	66418.57	56352.00	42953.23
	Intercepto	-556.21	-560.91	-330.21
	r ²	0.999	0.995	0.995
	Sa	61.39	113.79	94.56
	Sb	1196.56	2218.13	1843.13
	Sc	58.21	107.91	89.66
Malatión	Pendiente	53404.93	46030.32	36639.88
	Intercepto	-1241.43	-1165.70	-934.13
	r ²	0.995	0.991	0.992
	Sa	209.59	258.96	190.95
	Sb	2074.60	2563.21	1890.09
	Sc	198.75	245.56	181.08
Clorpirifos	Pendiente	63213.55	55552.24	46433.94
	Intercepto	-633.30	-624.96	-465.12
	r ²	0.998	0.993	0.993
	Sa	84.06	138.75	112.52
	Sb	1638.54	2704.66	2193.31
	Sc	79.71	131.58	106.70
Metidatión	Pendiente	103673.18	95859.08	74679.07
	Intercepto	-2102.11	-2392.03	-1602.38
	r ²	0.995	0.991	0.992
	Sa	455.41	540.95	397.24
	Sb	4438.60	5272.27	3871.65
	Sc	431.86	512.97	376.70
Protiofos	Pendiente	46719.02	39684.21	31172.31
	Intercepto	-1039.31	-1032.27	-691.88
	r ²	0.992	0.990	0.992
	Sa	246.02	237.23	164.34
	Sb	2435.20	2348.16	1626.63
	Sc	233.30	224.96	155.84
Profenofos	Pendiente	38425.53	36755.13	29067.28
	Intercepto	-1252.53	-1433.40	-996.10
	r ²	0.997	0.993	0.994
	Sa	178.25	251.96	191.66
	Sb	1259.30	1780.01	1354.04
	Sc	163.12	230.56	175.39
Etión	Pendiente	73221.82	59823.30	47678.42
	Intercepto	-1767.69	-1523.86	-1016.15
	r ²	0.994	0.992	0.993
	Sa	324.05	315.61	231.36
	Sb	3173.99	3091.30	2266.11
	Sc	307.29	299.28	219.39
Azinfos metil	Pendiente	38701.79	35489.76	26700.02

	Intercepto	-2272.87	-2185.41	-1313.89
	r ²	0.994	0.992	0.992
	Sa	362.39	374.16	276.88
	Sb	1782.29	1840.19	1361.73
	Sc	343.64	354.81	262.56
Pirazofos	Pendiente	87444.14	66525.34	49852.76
	Intercepto	-6705.55	-5056.63	-3393.53
	r ²	0.993	0.991	0.993
	Sa	1083.89	910.33	599.93
	Sb	4267.82	3584.44	2362.20
	Sc	1027.83	863.25	568.89

A continuación, se indican las curvas de calibración para los diferentes pesticidas organofosforados.



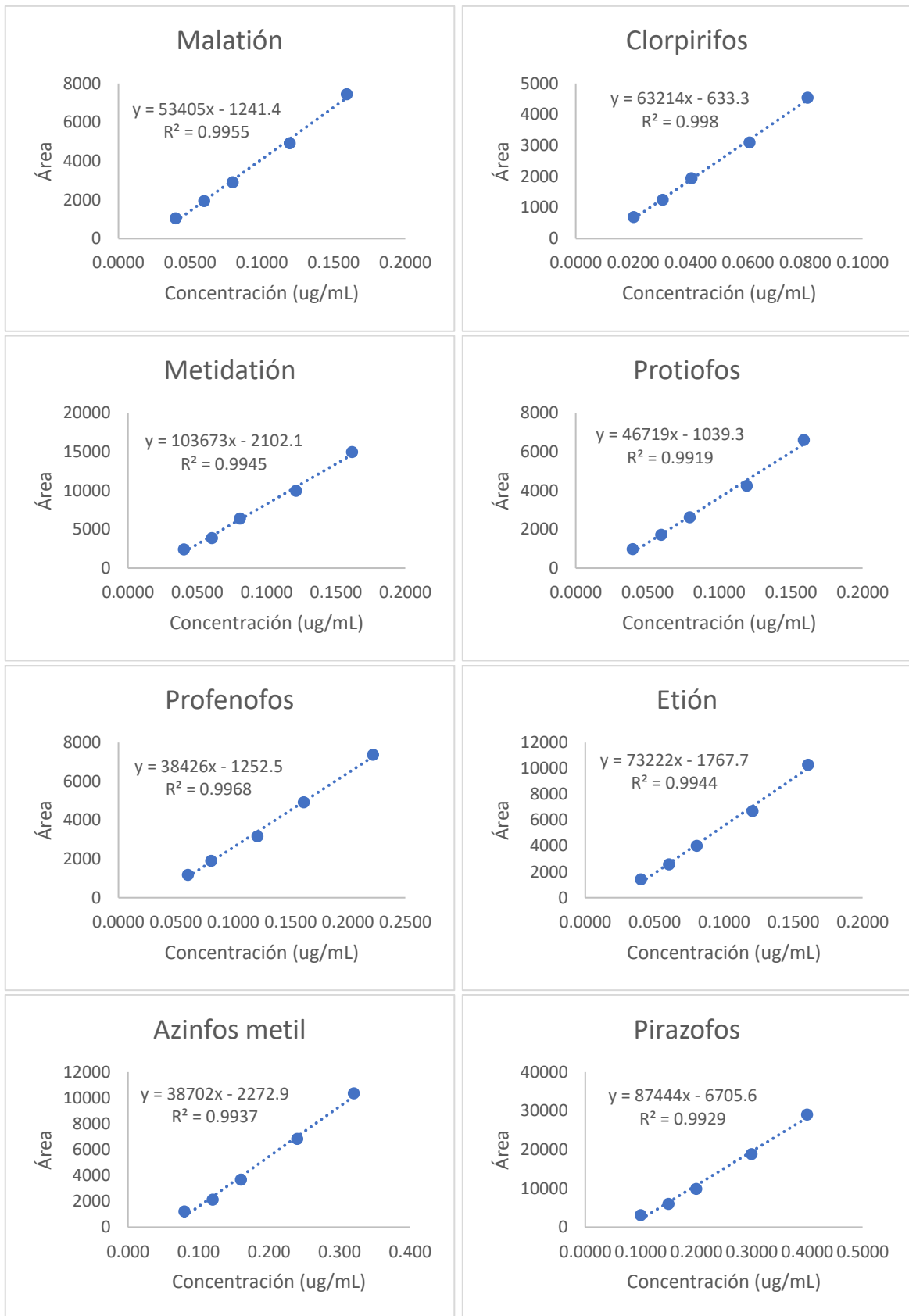
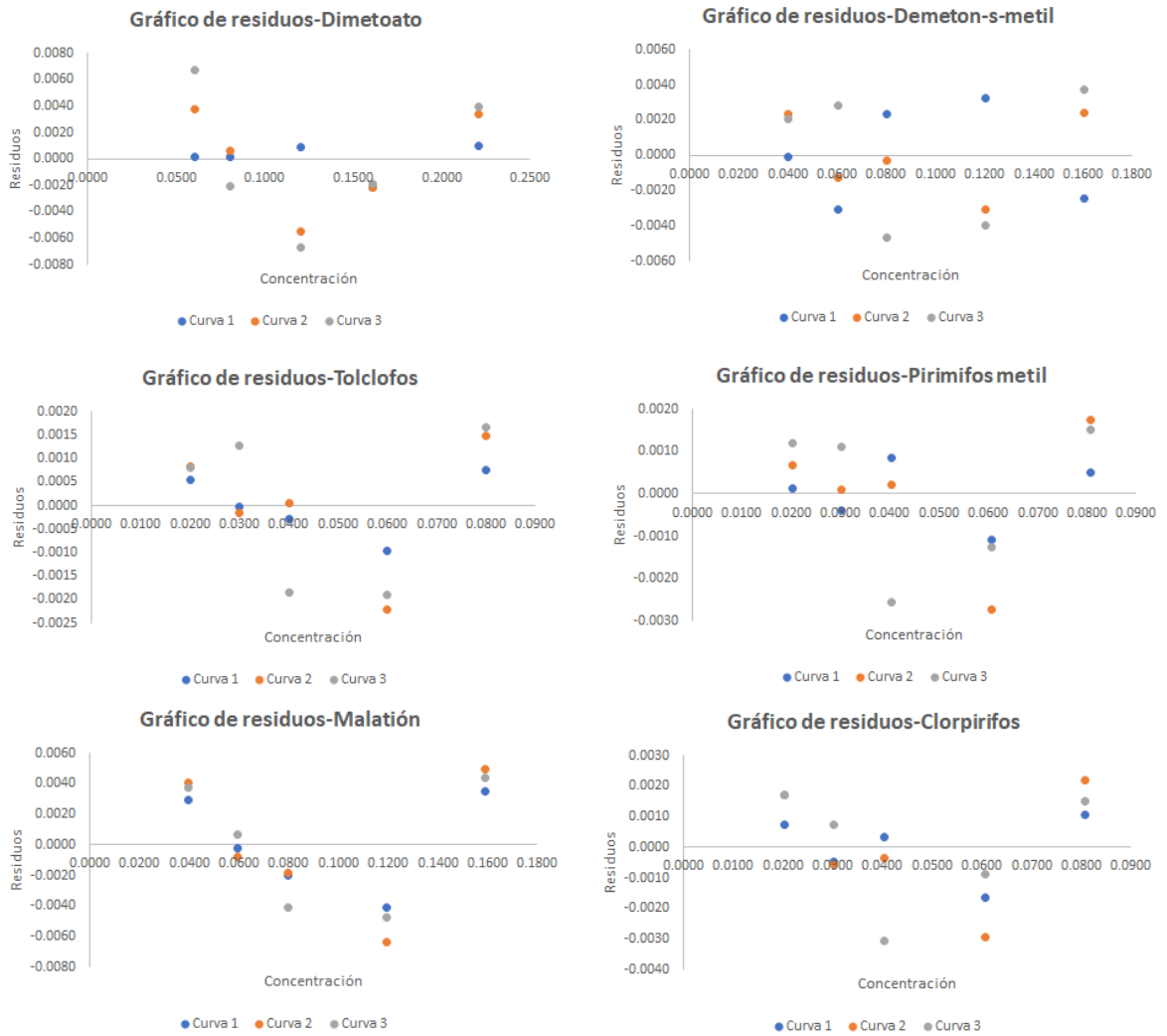


Figura 4.3. Curvas de calibración de los estándares de OPPS

Uno de los criterios para el análisis de la regresión lineal es a través del gráfico de residuos versus los valores ajustados, el cual debe mostrar aleatoriedad, es decir la dispersión horizontal no debe tener ninguna tendencia [52], este criterio se cumple para los analitos de estudio como se muestra en la figura 4.4



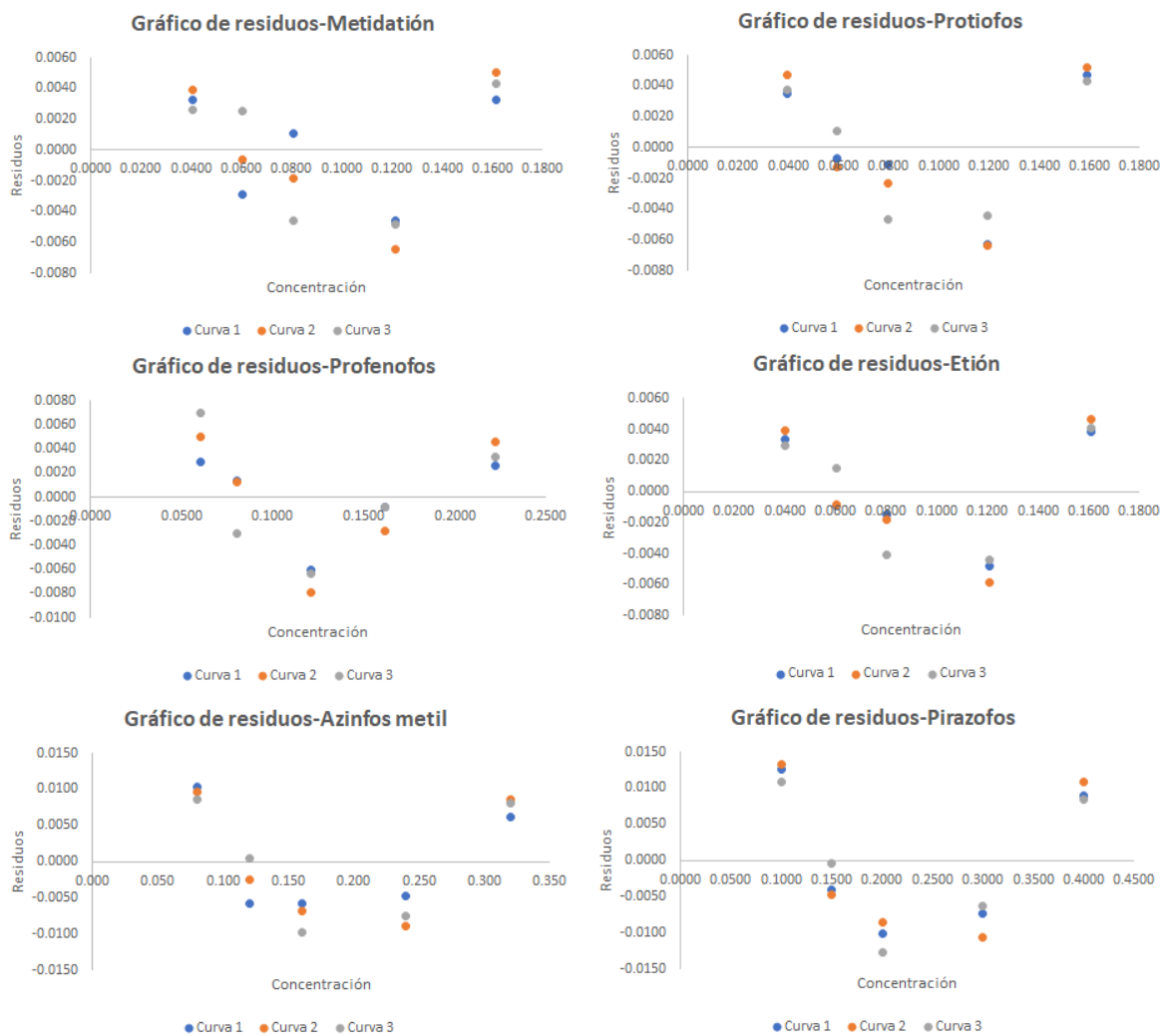
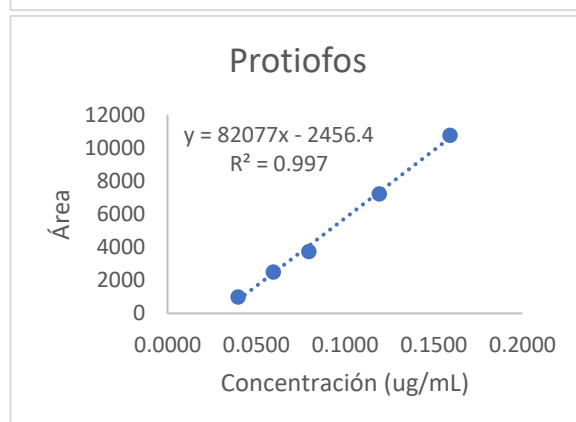
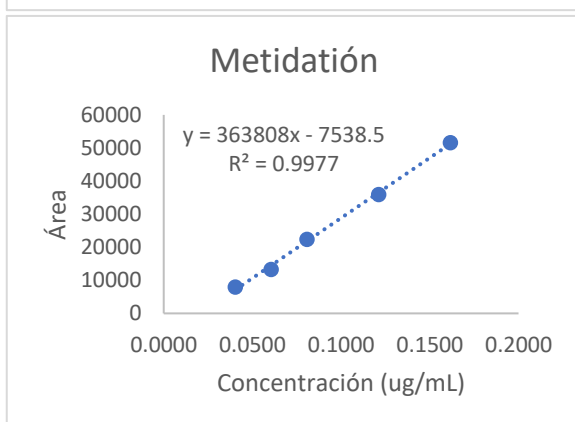
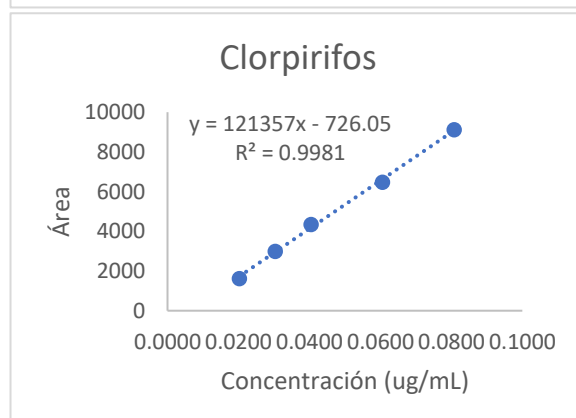
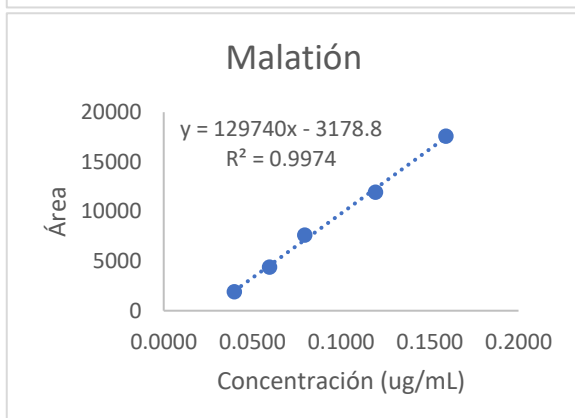
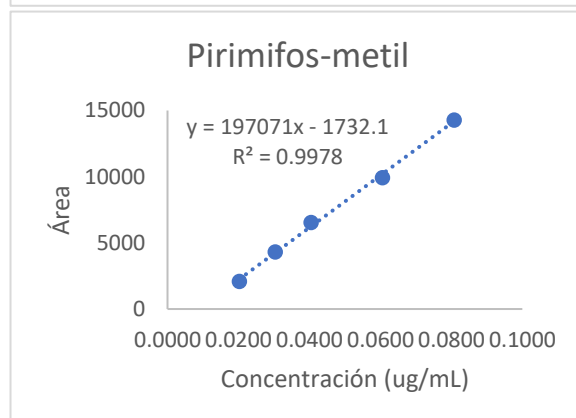
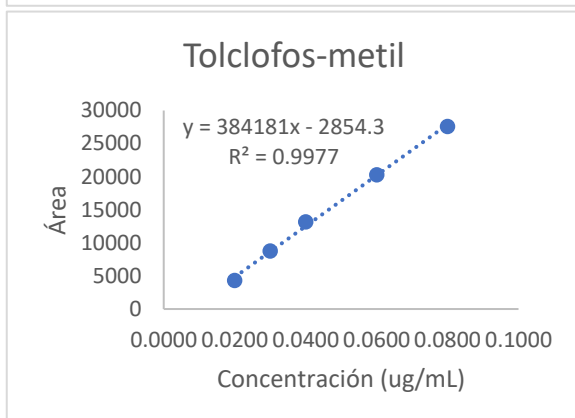
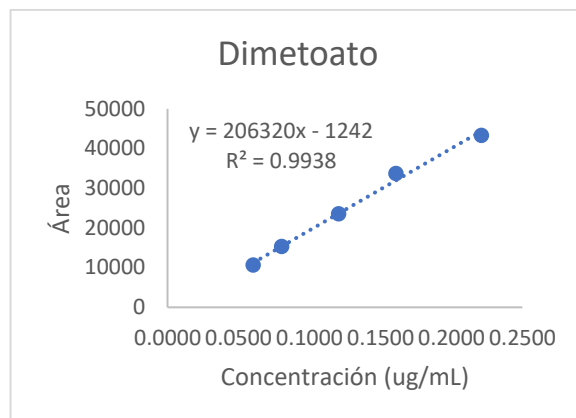
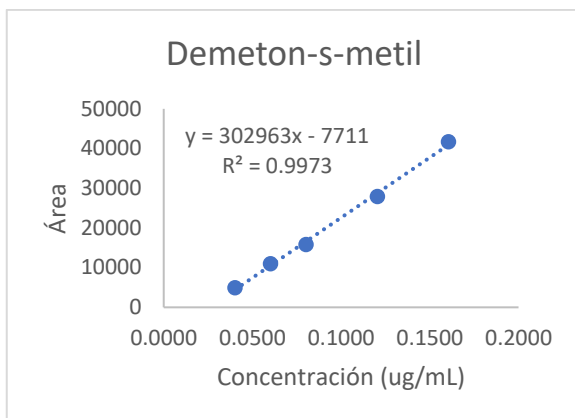


Figura 4.4. Gráfico de residuos para cada OPP de las curvas de calibración con estándar

4.2.3 Efecto matriz

Para determinar si algún componente de la matriz de agua natural, o si el tratamiento de la muestra puede causar interferencias en el análisis de los OPPs, se prepararon tres curvas de calibración con muestras fortificadas a las concentraciones indicadas en la tabla 3.8. A continuación, se indican las curvas de calibración obtenidas para cada pesticida.



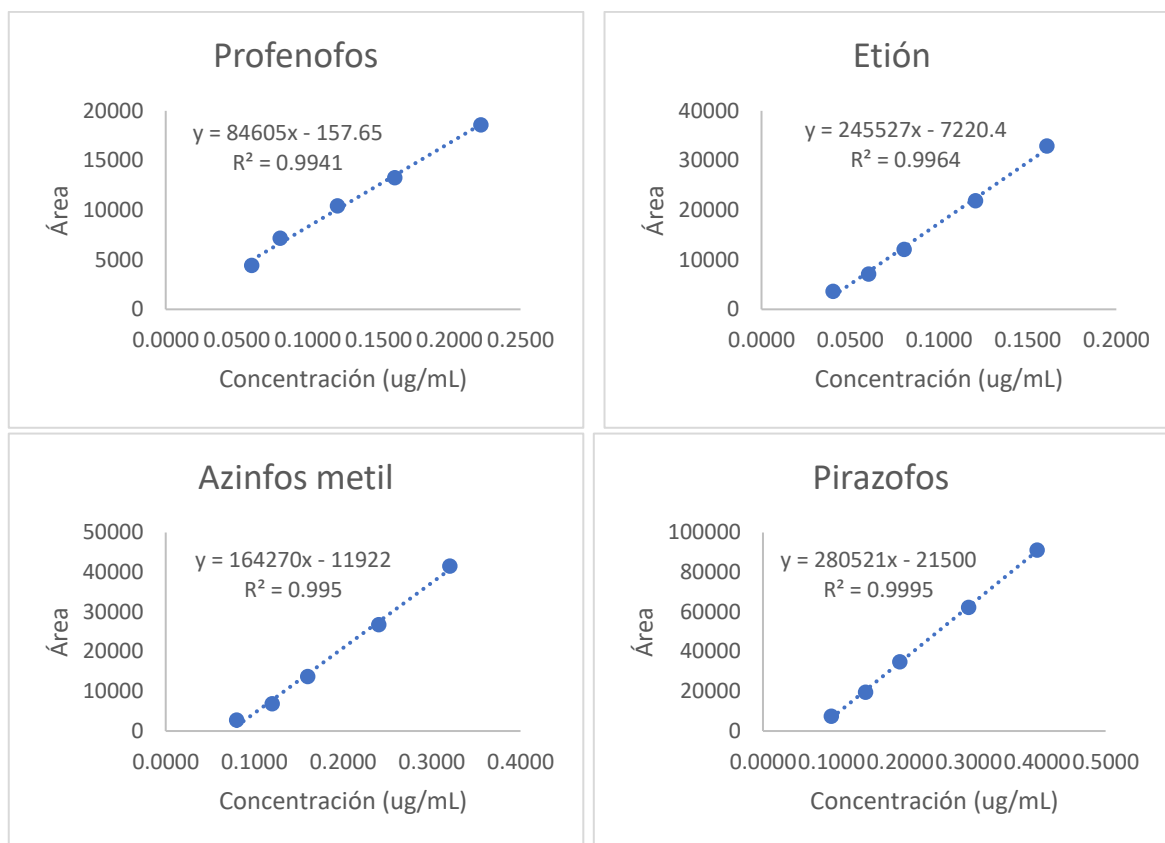


Figura 4.5. Curvas de calibración de muestras fortificadas con OPPs

Las curvas mostraron comportamiento lineal y un coeficiente de determinación mayor a 0.99. En la tabla 4.4 se indican los estadísticos calculados para la evaluación de la linealidad para cada analito.

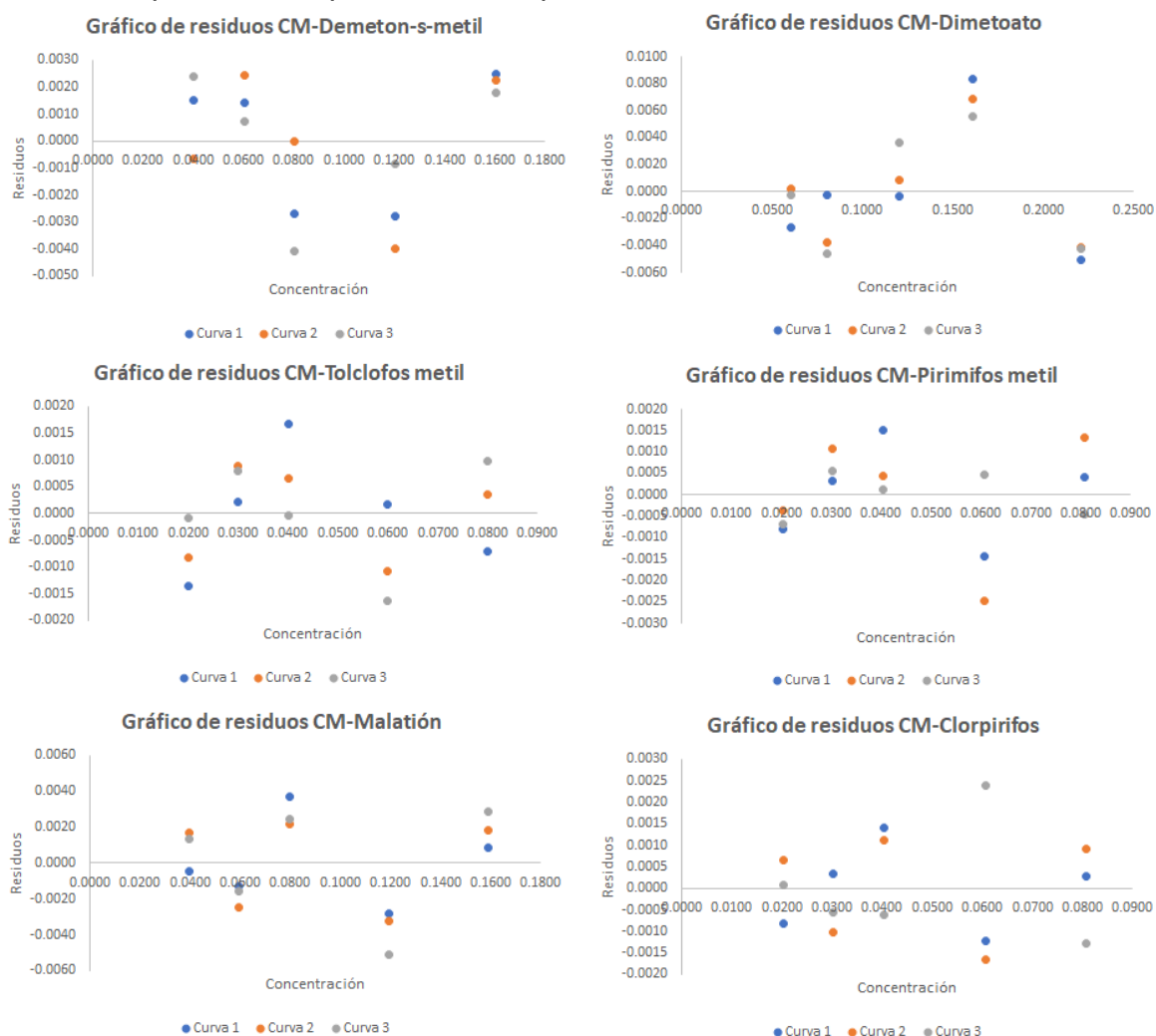
Tabla 4.4. Resultados obtenidos de las curvas de calibración en matriz fortificada

Pesticida	Estadísticos	Curva matriz 1	Curva matriz 2	Curva matriz 3
Demeton-s-metil	Pendiente	302962.66	280244.18	503813.99
	Intercepto	-7710.98	-4134.61	-13509.94
	r ²	0.997	0.997	0.997
	Sa	930.86	892.78	1587.69
	Sb	9135.75	8761.96	15582.03
	Sc	882.71	846.60	1505.56
Dimetoato	Pendiente	206320.34	195569.97	371535.77
	Intercepto	-1242.05	1257.68	-5521.96
	r ²	0.994	0.995	0.995
	Sa	1321.79	1096.05	2145.49
	Sb	9375.29	7774.13	15217.64
	Sc	1209.57	1002.99	1963.32
Tolclofos-metil	Pendiente	384181.03	505409.48	851168.10
	Intercepto	-2854.33	-2654.84	-6484.73

	r ²	0.998	0.999	0.998
	Sa	535.74	550.77	1066.13
	Sb	10547.31	10843.25	20989.35
	Sc	508.03	522.28	1010.98
Pirimifos metil	Pendiente	197070.67	211446.74	309224.99
	Intercepto	-1732.10	-1147.22	-2665.79
	r ²	0.998	0.996	0.999
	Sa	272.56	392.82	206.89
	Sb	5312.94	7656.98	4032.88
	Sc	258.46	372.50	196.19
Malatión	Pendiente	129739.86	182046.51	197419.86
	Intercepto	-3178.82	-3635.16	-2496.73
	r ²	0.997	0.997	0.995
	Sa	387.38	581.91	799.37
	Sb	3834.39	5759.81	7912.32
	Sc	367.35	551.81	758.02
Clorpirifos	Pendiente	121357.12	114988.90	174011.61
	Intercepto	-726.05	2.22	-911.38
	r ²	0.998	0.997	0.997
	Sa	154.79	176.50	299.45
	Sb	3017.23	3440.35	5836.98
	Sc	146.78	167.37	283.96
Metidatión	Pendiente	363808.47	386343.89	667191.02
	Intercepto	-7538.48	-4965.47	-15881.19
	r ²	0.998	0.997	0.998
	Sa	1043.54	1295.58	1933.31
	Sb	10170.65	12627.07	18842.59
	Sc	989.56	1228.56	1833.31
Protiofos	Pendiente	82077.29	110932.54	179993.41
	Intercepto	-2456.38	-1997.86	-4571.52
	r ²	0.997	0.994	0.995
	Sa	260.70	506.96	746.89
	Sb	2580.50	5018.01	7392.83
	Sc	247.22	480.74	708.25
Profenofos	Pendiente	84604.58	83667.86	153578.71
	Intercepto	-157.65	1076.73	-1067.40
	r ²	0.994	0.996	0.994
	Sa	534.69	457.66	954.80
	Sb	3777.47	3233.24	6745.41
	Sc	489.29	418.80	873.73
Etión	Pendiente	245526.68	242490.56	476584.75
	Intercepto	-7220.40	-4575.08	-14533.03
	r ²	0.996	0.998	0.997
	Sa	866.91	601.07	1607.50
	Sb	8491.21	5887.36	15745.09

	Sc	822.07	569.98	1524.35
Azinfos metil	Pendiente	164269.69	176394.43	313428.08
	Intercepto	-11922.49	-10933.52	-21885.82
	r ²	0.995	0.996	0.996
	Sa	1361.47	1337.91	2243.11
	Sb	6695.98	6580.06	11032.01
	Sc	1291.05	1268.70	2127.08
Pirazofos	Pendiente	280521.21	259428.97	503073.62
	Intercepto	-21500.08	-11414.86	-35982.73
	r ²	0.999	0.998	0.999
	Sa	956.88	1538.25	1905.93
	Sb	3767.71	6056.86	7504.60
	Sc	907.39	1458.68	1807.35

Al igual que las curvas de regresión de los estándares, se realizó un análisis de residuales (figura 4.6), observándose que los puntos no siguen ninguna tendencia, por lo tanto, presentan comportamiento lineal.



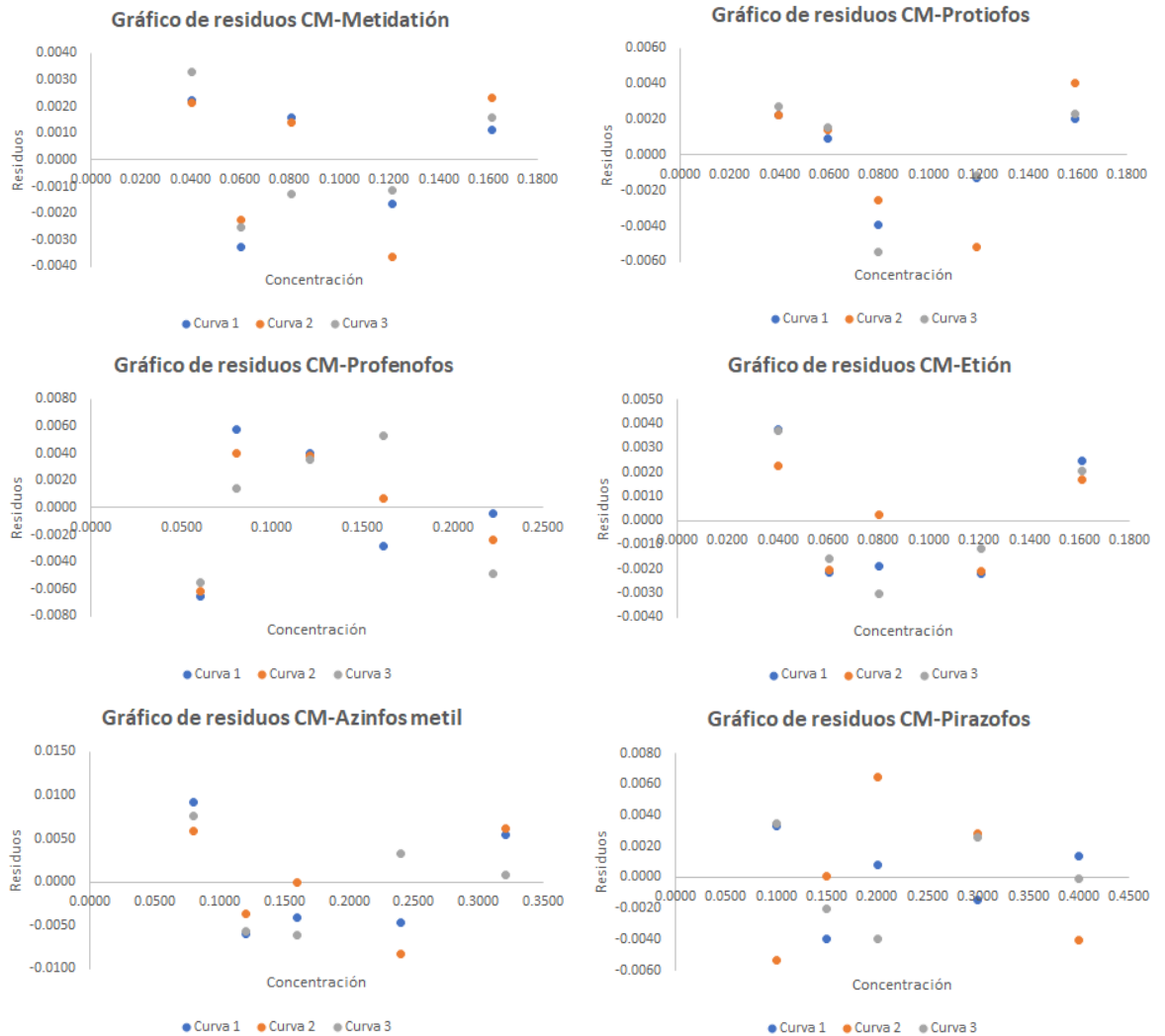
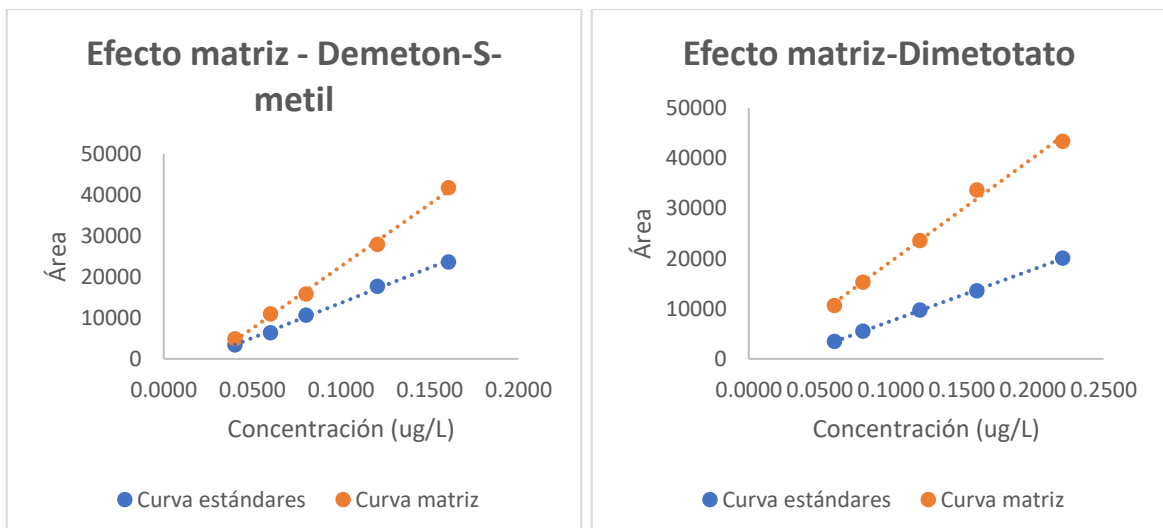
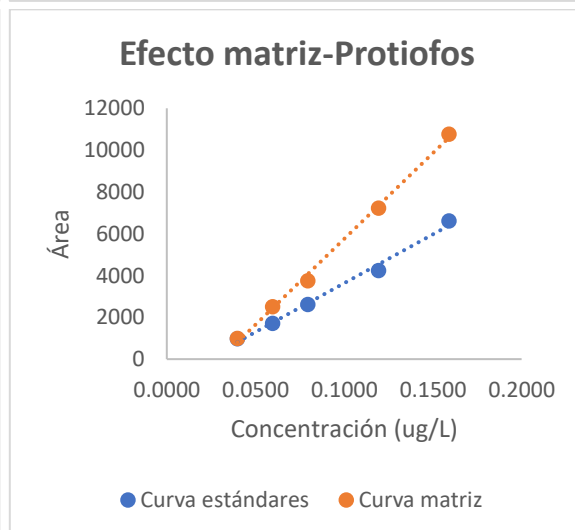
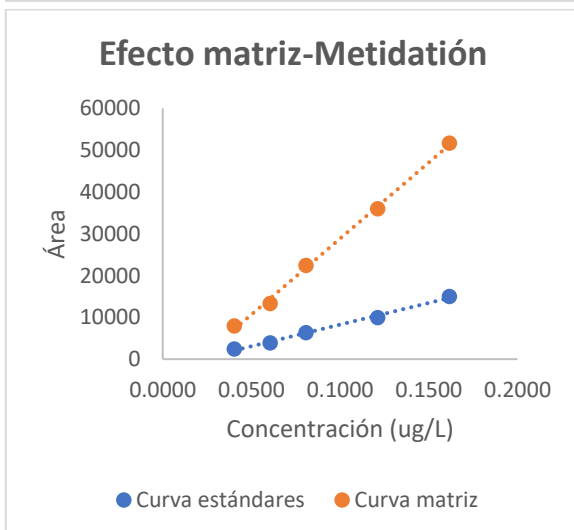
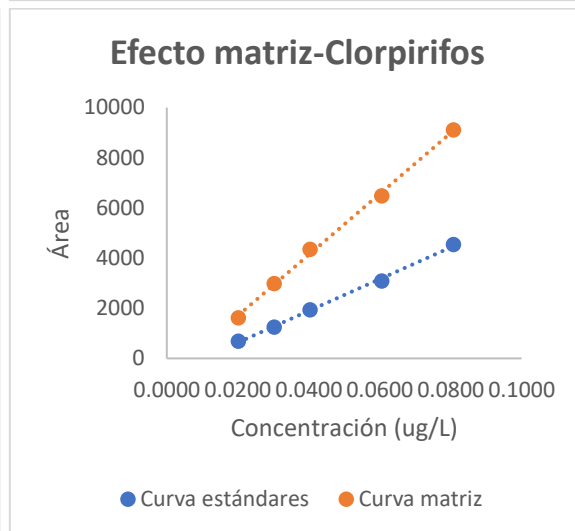
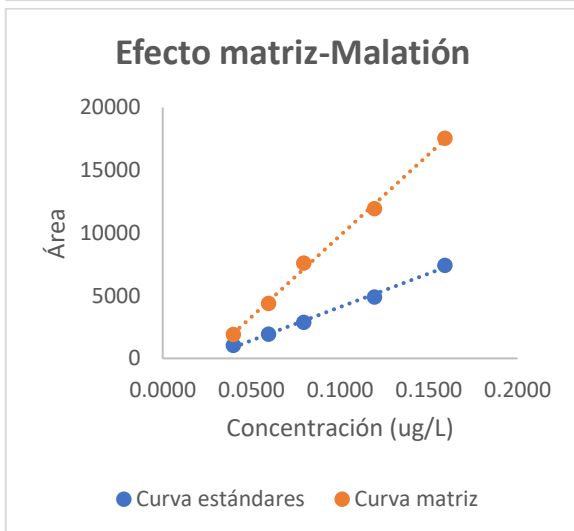
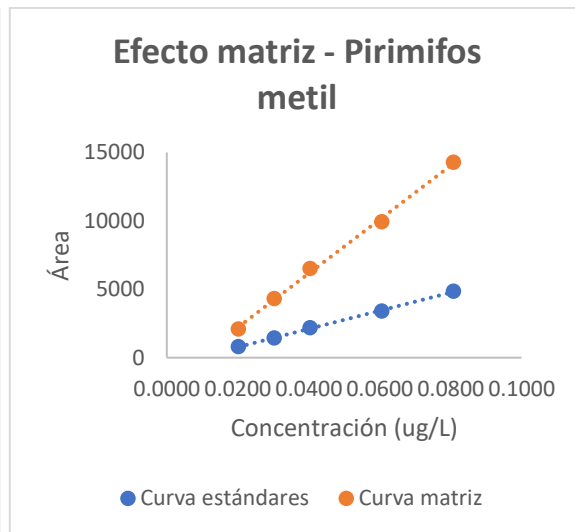
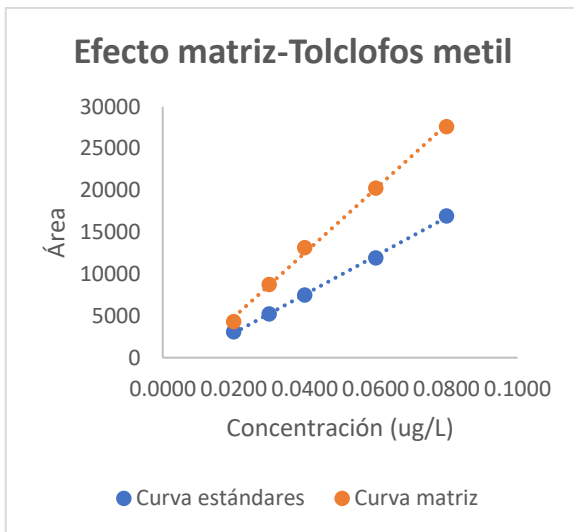


Figura 4.6. Gráfica de residuos de las muestras fortificadas con OPPs

Las curvas en matriz se compararon con las curvas de calibraci3n de los est3ndares, y se determin3 que los analitos de estudio presentan efecto matriz, como se observa en la figura 4.7.





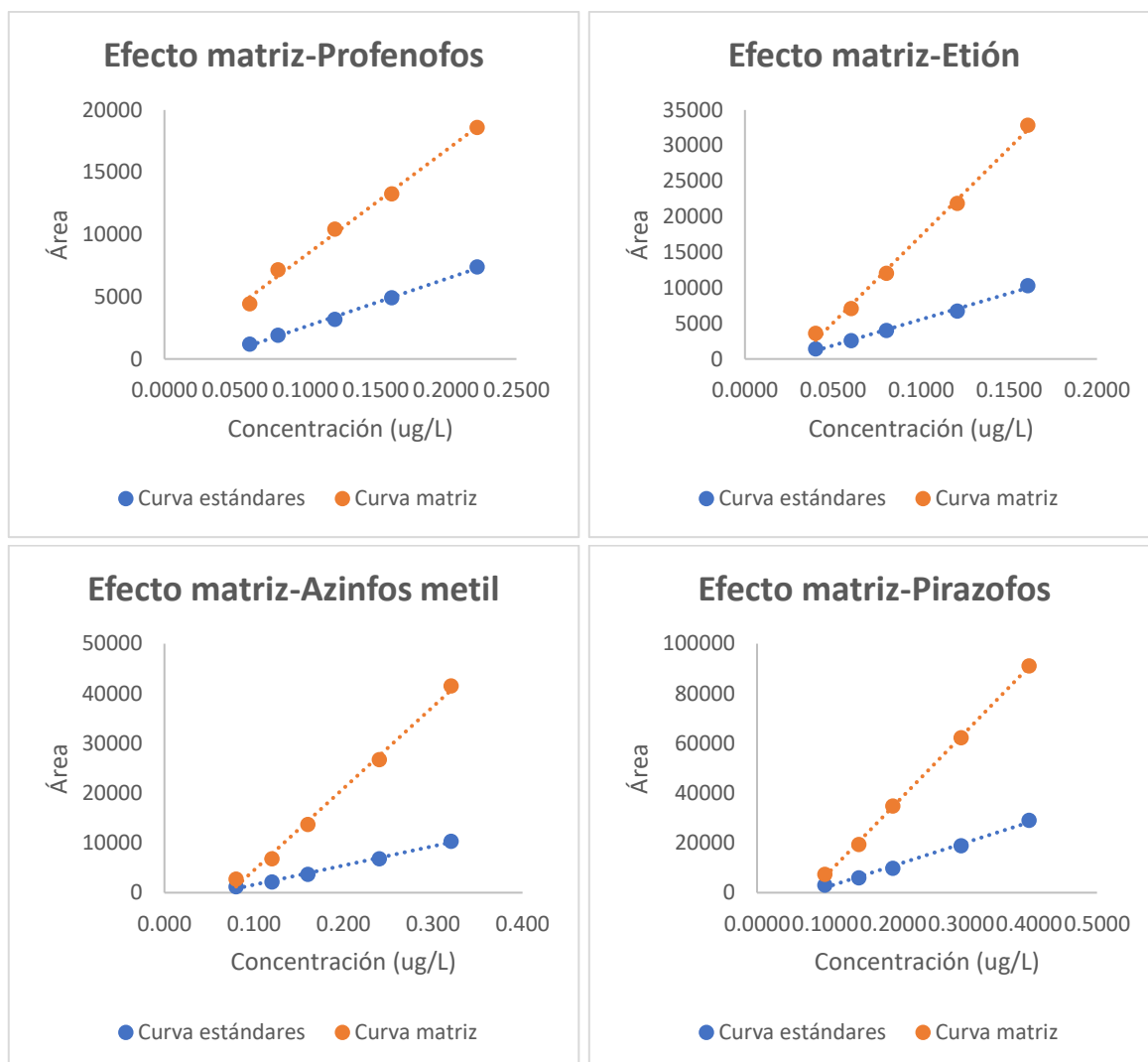


Figura 4.7. Efecto matriz de los OPPs

4.2.4 Límites de detección y cuantificación

Se determinó el límite de detección y cuantificación del instrumento, de acuerdo a los lineamientos de la Eurachem, mediante el análisis de 10 blancos de reactivos fortificados con una baja concentración del estándar mix de OPPs y se evaluó que el porcentaje de recuperación se encuentre en un rango de 70 a 130% (tabla 4.5).

Tabla 4.5. Mediciones de blanco de reactivo fortificados a baja concentración de OPPs para LDI y LCI

Pesticida organofosforado	C teórica (ug/mL)	CR1 (ug/mL)	CR2 (ug/mL)	CR3 (ug/mL)	CR4 (ug/mL)	CR5 (ug/mL)	CR6 (ug/mL)	CR7 (ug/mL)	CR8 (ug/mL)	CR9 (ug/mL)	CR10 (ug/mL)	% Rec
Demeton-s-metil	0.0080	0.0068	0.0068	0.0057	0.0056	0.0063	0.0065	0.0062	0.0060	0.0046	0.0052	74.35

Dimetoato	0.0080	0.0076	0.0075	0.0071	0.0082	0.0070	0.0069	0.0069	0.0054	0.0059	0.0057	84.79
Tolclofos-metil	0.0040	0.0039	0.0038	0.0035	0.0041	0.0033	0.0033	0.0031	0.0031	0.0030	0.0029	85.05
Pirimifos metil	0.0040	0.0035	0.0034	0.0033	0.0039	0.0028	0.0026	0.0029	0.0026	0.0028	0.0026	75.10
Malatión	0.0080	0.0083	0.0074	0.0077	0.0085	0.0067	0.0065	0.0071	0.0067	0.0064	0.0059	89.54
Clorpirifos	0.0040	0.0036	0.0029	0.0030	0.0033	0.0033	0.0030	0.0028	0.0025	0.0025	0.0023	71.83
Metidatión	0.0081	0.0078	0.0074	0.0075	0.0078	0.0069	0.0069	0.0064	0.0060	0.0059	0.0058	84.70
Protiofos	0.0080	0.0085	0.0072	0.0070	0.0068	0.0063	0.0070	0.0065	0.0063	0.0063	0.0064	85.80
Profenofos	0.0121	0.0120	0.0123	0.0124	0.0132	0.0130	0.0137	0.0118	0.0109	0.0102	0.0115	99.89
Etión	0.0080	0.0083	0.0076	0.0074	0.0082	0.0075	0.0073	0.0060	0.0058	0.0063	0.0069	88.41
Azinfos metil	0.0160	0.0120	0.0125	0.0120	0.0112	0.0129	0.0132	0.0137	0.0124	0.0122	0.0125	77.78
Pirazofos	0.0200	0.0165	0.0177	0.0182	0.0203	0.0183	0.0174	0.0170	0.0154	0.0148	0.0151	85.36

Los límites de detección y cuantificación del método se determinaron, de acuerdo a la ICH Q2(R1) como se explicó en el capítulo 3. En la tabla 4.6 se indican los valores obtenidos.

Tabla 4.6. Límites de detección y cuantificación del instrumento y del método

Pesticida organofosforado	LDI (µg/mL)	LCI (µg/mL)	LDM (µg/mL)	LCM (µg/mL)
Demeton-s-metil	0.008	0.013	0.010	0.027
Dimetoato	0.010	0.016	0.016	0.047
Tolclofos-metil	0.005	0.007	0.005	0.012
Pirimifos metil	0.004	0.008	0.004	0.013
Malatión	0.010	0.016	0.011	0.034
Clorpirifos	0.004	0.007	0.005	0.015
Metidatión	0.009	0.015	0.010	0.030
Protiofos	0.009	0.014	0.013	0.040
Profenofos	0.015	0.023	0.015	0.045
Etión	0.010	0.016	0.010	0.031
Azinfos metil	0.015	0.019	0.025	0.077
Pirazofos	0.022	0.034	0.014	0.044

4.2.5 Precisión

Se evaluó la repetibilidad y la precisión intermedia mediante la fortificación de muestras a tres niveles de concentración que cubren el rango de trabajo según la tabla 3.9, durante tres días.

Para el parámetro de repetibilidad se determinó la desviación estándar, y el coeficiente de variación, como se indica en las tablas 4.7, 4.8, 4.9.

El coeficiente de variación del método se estableció considerando la ecuación de Horwitz y la concentración del analito (trazas de pesticidas), estableciéndose como objetivos de validación un valor de 22% para precisión intermedia y 16% para repetibilidad.

Tabla 4.7. Estudio de precisión del método en matrices de agua fortificada a un nivel bajo de concentraciones

	Nombre del pesticida	Demeton -s-metil	Dimetoat o	Tolclofos -metil	Pirimifo s metil	Malatió n	Clorpirifo s	Metidatió n	Protiofo s	Profenofo s	Etión	Azinfo s metil	Pirazofo s
	C teórica (ug/L)	0.060	0.060	0.030	0.030	0.060	0.030	0.061	0.060	0.061	0.060	0.120	0.150
Día 1	CR1 (ug/L)	0.061	0.068	0.034	0.033	0.063	0.034	0.062	0.065	0.060	0.066	0.122	0.164
	CR2 (ug/L)	0.074	0.075	0.036	0.034	0.067	0.034	0.069	0.067	0.064	0.070	0.130	0.176
	CR3 (ug/L)	0.064	0.072	0.034	0.036	0.069	0.038	0.071	0.072	0.071	0.070	0.137	0.177
	CR4 (ug/L)	0.066	0.072	0.036	0.038	0.073	0.037	0.073	0.075	0.072	0.076	0.140	0.173
	Promedio	0.07	0.07	0.04	0.04	0.07	0.04	0.07	0.07	0.07	0.07	0.13	0.17
	%Rec	110.05	119.17	116.80	115.72	114.40	118.14	113.42	116.66	110.38	117.1	110.3	114.88
	desvest	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0.01	0.01
	%CV	8.17	4.22	4.06	6.54	5.93	5.02	6.68	6.25	8.74	5.84	5.97	3.49
Día 2	CR5 (ug/L)	0.062	0.067	0.034	0.035	0.066	0.039	0.067	0.071	0.066	0.072	0.136	0.177
	CR6 (ug/L)	0.065	0.077	0.036	0.038	0.073	0.038	0.071	0.073	0.071	0.068	0.135	0.188
	CR7 (ug/L)	0.055	0.080	0.029	0.030	0.059	0.030	0.062	0.064	0.063	0.071	0.142	0.177
	CR8 (ug/L)	0.054	0.080	0.028	0.028	0.060	0.029	0.063	0.066	0.062	0.070	0.149	0.175
	Promedio	0.06	0.08	0.03	0.03	0.06	0.03	0.07	0.07	0.07	0.07	0.14	0.18
	%Rec	98.30	125.95	105.60	108.35	108.16	111.78	108.79	115.12	108.34	116.3	117.1	119.57
	desvest	0.01	0.01	0.00	0.00	0.01	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01
	%CV	8.71	8.31	11.69	13.22	10.35	14.84	6.31	6.29	5.97	2.37	4.69	3.31
Día 3	CR9 (ug/L)	0.052	0.066	0.026	0.027	0.055	0.024	0.054	0.057	0.051	0.059	0.119	0.161
	CR10 (ug/L)	0.062	0.068	0.030	0.032	0.064	0.033	0.063	0.064	0.058	0.069	0.121	0.167
	CR11 (ug/L)	0.061	0.069	0.032	0.031	0.062	0.033	0.064	0.062	0.058	0.069	0.130	0.167
	CR12 (ug/L)	0.065	0.074	0.032	0.032	0.063	0.034	0.063	0.063	0.057	0.067	0.125	0.165
	Promedio	0.06	0.07	0.03	0.03	0.06	0.03	0.06	0.06	0.06	0.07	0.12	0.17
	%Rec	100.01	114.99	100.48	101.01	102.10	102.63	100.90	102.82	92.74	109.2	103.1	110.14
	desvest	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	%CV	9.17	4.82	8.69	7.66	6.76	14.80	7.39	5.22	6.18	7.25	4.01	1.86

Tabla 4.8. Estudio de precisión del método en matrices de agua fortificada a un nivel medio de concentraciones

	Nombre del pesticida	Demeton-s-metil	Dimetoato	Tolclofos-metil	Pirimifos metil	Malatión	Clorpirifos	Metidatión	Protiofos	Profenofos	Etión	Azinfos metil	Pirazofos
	C teórica (ug/L)	0.090	0.090	0.045	0.045	0.090	0.045	0.091	0.090	0.091	0.090	0.180	0.225
Día 1	CR1 (ug/L)	0.058	0.067	0.032	0.034	0.068	0.035	0.073	0.077	0.070	0.076	0.167	0.211
	CR2 (ug/L)	0.062	0.079	0.038	0.041	0.081	0.041	0.083	0.088	0.084	0.087	0.183	0.237
	CR3 (ug/L)	0.080	0.092	0.043	0.045	0.0953	0.048	0.098	0.100	0.090	0.098	0.201	0.253
	CR4 (ug/L)	0.079	0.097	0.046	0.050	0.0964	0.045	0.104	0.111	0.098	0.103	0.237	0.301
	Promedio	0.07	0.08	0.04	0.04	0.09	0.04	0.09	0.09	0.09	0.09	0.20	0.25
	%Rec	77.42	92.62	88.75	92.98	95.29	93.23	98.44	105.01	94.21	100.79	109.33	111.40
	desvest	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.03	0.04
	%CV	15.80	16.07	15.10	16.09	15.53	13.94	15.97	15.59	13.94	12.91	15.35	15.06
Día 2	CR5 (ug/L)	0.071	0.109	0.044	0.043	0.083	0.045	0.086	0.084	0.095	0.088	0.191	0.264
	CR6 (ug/L)	0.071	0.115	0.047	0.045	0.084	0.046	0.085	0.084	0.099	0.091	0.204	0.270
	CR7 (ug/L)	0.073	0.114	0.047	0.044	0.087	0.049	0.090	0.083	0.101	0.092	0.206	0.261
	CR8 (ug/L)	0.074	0.119	0.047	0.046	0.087	0.051	0.087	0.086	0.109	0.098	0.216	0.245
	Promedio	0.07	0.11	0.05	0.04	0.09	0.05	0.09	0.08	0.10	0.09	0.20	0.26
	%Rec	79.84	126.02	102.46	97.68	95.09	104.76	95.68	93.98	111.22	101.86	113.28	115.52
	desvest	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0.01	0.01
	%CV	2.17	3.64	2.81	2.64	2.57	5.99	2.79	1.83	5.83	4.50	4.97	3.99
Día 3	CR9 (ug/L)	0.058	0.087	0.034	0.033	0.066	0.033	0.065	0.063	0.066	0.065	0.145	0.189
	CR10 (ug/L)	0.063	0.095	0.035	0.035	0.070	0.037	0.070	0.066	0.071	0.069	0.151	0.202
	CR11 (ug/L)	0.054	0.083	0.032	0.034	0.067	0.035	0.066	0.065	0.069	0.068	0.148	0.201
	CR12 (ug/L)	0.056	0.079	0.031	0.035	0.071	0.034	0.067	0.064	0.068	0.070	0.151	0.196
	Promedio	0.06	0.09	0.03	0.03	0.07	0.03	0.07	0.06	0.07	0.07	0.15	0.20
	%Rec	63.94	94.94	73.53	75.21	76.45	76.88	73.76	72.21	75.24	75.03	82.67	87.60
	desvest	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01
	%CV	6.99	8.19	5.73	3.40	3.48	3.81	2.84	2.10	3.21	2.97	2.06	2.93

Tabla 4.9. Estudio de precisión del método en matrices de agua fortificada a un nivel alto de concentraciones

	Nombre del pesticida	Demeto n-s- metil	Dimetoa to	Tolclofo s-metil	Pirimifo s metil	Malatió n	Clorpirif os	Metidati ón	Protiof os	Profenof os	Etión	Azinfo s metil	Pirazof os
	C teórica (ug/L)	0.140	0.141	0.070	0.071	0.139	0.071	0.141	0.139	0.141	0.141	0.280	0.350
Día 1	CR1 (ug/L)	0.117	0.177	0.075	0.071	0.147	0.073	0.143	0.134	0.157	0.157	0.326	0.427
	CR2 (ug/L)	0.124	0.168	0.076	0.072	0.149	0.076	0.146	0.132	0.153	0.157	0.339	0.400
	CR3 (ug/L)	0.137	0.167	0.069	0.071	0.157	0.081	0.156	0.145	0.166	0.171	0.350	0.399
	CR4 (ug/L)	0.136	0.180	0.073	0.074	0.146	0.082	0.157	0.142	0.165	0.172	0.350	0.416
	Promedio	0.13	0.17	0.07	0.07	0.15	0.08	0.15	0.14	0.16	0.16	0.34	0.41
	%Rec	91.28	123.00	104.60	101.69	107.60	110.43	106.55	99.14	113.35	116.5	121.8	117.27
	desvest	0.01	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
	%CV	7.44	3.63	4.25	1.87	3.29	5.55	4.74	4.35	4.03	5.12	3.31	3.37
Día 2	CR5 (ug/L)	0.111	0.174	0.068	0.062	0.125	0.069	0.125	0.118	0.138	0.129	0.294	0.390
	CR6 (ug/L)	0.105	0.167	0.067	0.064	0.124	0.073	0.125	0.121	0.141	0.140	0.300	0.400
	CR7 (ug/L)	0.112	0.174	0.067	0.065	0.130	0.072	0.129	0.128	0.153	0.151	0.298	0.351
	CR8 (ug/L)	0.111	0.160	0.066	0.060	0.126	0.076	0.130	0.126	0.147	0.147	0.309	0.389
	Promedio	0.11	0.17	0.07	0.06	0.13	0.07	0.13	0.12	0.14	0.14	0.30	0.38
	%Rec	78.25	119.96	95.92	88.81	90.64	102.51	90.06	88.48	102.41	100.9	107.1	109.31
	desvest	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01	0.01	0.02
	%CV	2.74	3.91	0.92	3.69	1.97	4.01	2.02	3.71	4.44	6.61	2.10	5.60
Día 3	CR9 (ug/L)	0.117	0.156	0.065	0.063	0.117	0.055	0.102	0.115	0.116	0.121	0.241	0.335
	CR10 (ug/L)	0.117	0.154	0.063	0.061	0.114	0.062	0.108	0.107	0.115	0.115	0.237	0.333
	CR11 (ug/L)	0.116	0.151	0.063	0.061	0.114	0.062	0.102	0.113	0.114	0.113	0.229	0.312
	CR12 (ug/L)	0.115	0.151	0.062	0.061	0.113	0.061	0.105	0.107	0.112	0.113	0.230	0.308
	Promedio	0.12	0.15	0.06	0.06	0.11	0.06	0.10	0.11	0.11	0.12	0.23	0.32
	%Rec	82.79	108.68	90.62	86.94	82.29	84.76	73.93	79.38	80.83	82.28	83.57	92.00
	desvest	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01
	%CV	0.78	1.42	1.71	1.63	1.53	5.36	2.71	3.54	1.21	3.15	2.48	4.39

Tabla 4.10. Análisis de varianza para las muestras fortificadas con Demeton-S-metil a nivel de concentración bajo, medio y alto

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	F tab
Tratamiento (día) SCF	2	0.000117	0.000058	2.030	4.256
Error (repeticiones) SCE	9	0.000259	0.000029		
Total	11	0.000376	0.000034		

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	F tab
Tratamiento (día) SCF	2	0.000478	0.000239	5.101	4.256
Error (repeticiones) SCE	9	0.000422	0.000047		
Total	11	0.000901	0.000082		

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	F tab
Tratamiento (día) SCF	2	0.000690	0.000345	10.282	4.256
Error (repeticiones) SCE	9	0.000302	0.000034		
Total	11	0.000993	0.000090		

Sr	0.005364	Desviación estándar por repetibilidad
SR	0.006015	Desviación estándar por precisión intermedia
SL2	0.000007	Varianza debido al factor de variabilidad

Sr	0.006848	Desviación estándar por repetibilidad
SR	0.009746	Desviación estándar por precisión intermedia
SL2	0.000048	Varianza debido al factor de variabilidad

Sr	0.005794	Desviación estándar por repetibilidad
SR	0.010559	Desviación estándar por precisión intermedia
SL2	0.000078	Varianza debido al factor de variabilidad

Parámetro	Precisión	CV%
CVr	0.00536	8.67
CVSR	0.00602	9.72

Parámetro	Precisión	CV%
CVr	0.00685	10.29
CVSR	0.00975	14.64

Parámetro	Precisión	CV%
CVr	0.00579	4.91
CVSR	0.01056	8.94

Tabla 4.11. Análisis de varianza para las muestras fortificadas con Dimetoato a nivel de concentración bajo, medio y alto

a) Nivel bajo

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	F tab
Tratamiento (día) SCF	2	0.000089	0.000045	2.221	4.256
Error (repeticiones) SCE	9	0.000181	0.000020		
Total	11	0.000270	0.000025		

Sr	0.004479	Desviación estándar por repetibilidad
SR	0.005117	Desviación estándar por precisión intermedia
SL2	0.000006	Varianza debido al factor de variabilidad

Parámetro	Precisión	CV%
CVr	0.00448	6.19
CVSR	0.00512	7.07

b) Nivel medio

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	F tab
Tratamiento (día) SCF	2	0.002277	0.001139	13.778	4.256
Error (repeticiones) SCE	9	0.000744	0.000083		
Total	11	0.003021	0.000275		

Sr	0.009091	Desviación estándar por repetibilidad
SR	0.018618	Desviación estándar por precisión intermedia
SL2	0.000264	Varianza debido al factor de variabilidad

Parámetro	Precisión	CV%
CVr	0.00909	9.62
CVSR	0.01862	19.69

c) Nivel alto

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	F tab
Tratamiento (día) SCF	2	0.000901	0.000450	15.412	4.256
Error (repeticiones) SCE	9	0.000263	0.000029		
Total	11	0.001164	0.000106		

Sr	0.005406	Desviación estándar por repetibilidad
SR	0.011599	Desviación estándar por precisión intermedia
SL2	0.000105	Varianza debido al factor de variabilidad

Parámetro	Precisión	CV%
CVr	0.00541	3.28
CVSR	0.01160	7.03

Tabla 4.12. Análisis de varianza para las muestras fortificadas con Tolclofos metil a nivel de concentración bajo, medio y alto

a) Nivel bajo

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	F tab
Tratamiento (día) SCF	2	0.000050	0.000025	3.331	4.256
Error (repeticiones) SCE	9	0.000068	0.000008		
Total	11	0.000118	0.000011		

Sr	0.002745	Desviación estándar por repetibilidad
SR	0.003453	Desviación estándar por precisión intermedia
SL2	0.000004	Varianza debido al factor de variabilidad

Parámetro	Precisión	CV%
CVr	0.00274	8.50
CVSR	0.00345	10.69

b) Nivel medio

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	F tab
Tratamiento (día) SCF	2	0.000339	0.000170	12.230	4.256
Error (repeticiones) SCE	9	0.000125	0.000014		
Total	11	0.000464	0.000042		

Sr	0.003725	Desviación estándar por repetibilidad
SR	0.007269	Desviación estándar por precisión intermedia
SL2	0.000039	Varianza debido al factor de variabilidad

Parámetro	Precisión	CV%
CVr	0.00373	9.38
CVSR	0.00727	18.30

c) Nivel alto

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	F tab
Tratamiento (día) SCF	2	0.000195	0.000098	25.999	4.256
Error (repeticiones) SCE	9	0.000034	0.000004		
Total	11	0.000229	0.000021		

Sr	0.001937	Desviación estándar por repetibilidad
SR	0.005216	Desviación estándar por precisión intermedia
SL2	0.000023	Varianza debido al factor de variabilidad

Parámetro	Precisión	CV%
CVr	0.00194	2.85
CVSR	0.00522	7.68

Tabla 4.13. Análisis de varianza para las muestras fortificadas con Pirimifos metil a nivel de concentración bajo, medio y alto

a) Nivel bajo

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	F tab
Tratamiento (día) SCF	2	0.000040	0.000020	2.015	4.256
Error (repeticiones) SCE	9	0.000089	0.000010		
Total	11	0.000128	0.000012		

Sr	0.003140	Desviación estándar por repetibilidad
SR	0.003516	Desviación estándar por precisión intermedia
SL2	0.000003	Varianza debido al factor de variabilidad

Parámetro	Precisión	CV%
CVr	0.00314	9.56
CVSR	0.00352	10.71

b) Nivel medio

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	F tab
Tratamiento (día) SCF	2	0.000232	0.000116	7.113	4.256
Error (repeticiones) SCE	9	0.000147	0.000016		
Total	11	0.000379	0.000034		

Sr	0.004040	Desviación estándar por repetibilidad
SR	0.006423	Desviación estándar por precisión intermedia
SL2	0.000025	Varianza debido al factor de variabilidad

Parámetro	Precisión	CV%
CVr	0.00404	10.03
CVSR	0.00642	15.95

c) Nivel alto

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	F tab
Tratamiento (día) SCF	2	0.000258	0.000129	47.199	4.256
Error (repeticiones) SCE	9	0.000025	0.000003		
Total	11	0.000282	0.000026		

Sr	0.001653	Desviación estándar por repetibilidad
SR	0.005855	Desviación estándar por precisión intermedia
SL2	0.000032	Varianza debido al factor de variabilidad

Parámetro	Precisión	CV%
CVr	0.00165	2.53
CVSR	0.00586	8.96

Tabla 4.14. Análisis de varianza para las muestras fortificadas con Malatión a nivel de concentración bajo, medio y alto

a) Nivel bajo

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	F tab
Tratamiento (día) SCF	2	0.000108	0.000054	2.076	4.256
Error (repeticiones) SCE	9	0.000234	0.000026		
Total	11	0.000342	0.000031		

Sr	0.005098	Desviación estándar por repetibilidad
SR	0.005743	Desviación estándar por precisión intermedia
SL2	0.000007	Varianza debido al factor de variabilidad

Parámetro	Precisión	CV%
CVr	0.00510	7.89
CVSR	0.00574	8.89

b) Nivel medio

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	F tab
Tratamiento (día) SCF	2	0.000750	0.000375	6.054	0.000
Error (repeticiones) SCE	9	0.000558	0.000062		
Total	11	0.001308	0.000119		

Sr	0.007872	Desviación estándar por repetibilidad
SR	0.011844	Desviación estándar por precisión intermedia
SL2	0.000078	Varianza debido al factor de variabilidad

Parámetro	Precisión	CV%
CVr	0.00787	9.89
CVSR	0.01184	14.88

c) Nivel alto

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	F tab
Tratamiento (día) SCF	2	0.002578	0.001289	115.418	0.000
Error (repeticiones) SCE	9	0.000101	0.000011		
Total	11	0.002679	0.000244		

Sr	0.003342	Desviación estándar por repetibilidad
SR	0.018183	Desviación estándar por precisión intermedia
SL2	0.000319	Varianza debido al factor de variabilidad

Parámetro	Precisión	CV%
CVr	0.00334	2.57
CVSR	0.01818	13.97

Tabla 4.15. Análisis de varianza para las muestras fortificadas con Clorpirifos a nivel de concentración bajo, medio y alto

a) Nivel bajo

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	F tab
Tratamiento (día) SCF	2	0.000045	0.000022	1.349	4.256
Error (repeticiones) SCE	9	0.000149	0.000017		
Total	11	0.000194	0.000018		

Sr	0.004068	Desviación estándar por repetibilidad
SR	0.004242	Desviación estándar por precisión intermedia
SL2	0.000001	Varianza debido al factor de variabilidad

Parámetro	Precisión	CV%
CVr	0.00407	12.11
CVSR	0.00424	12.63

b) Nivel medio

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	F tab
Tratamiento (día) SCF	2	0.000324	0.000162	10.858	4.256
Error (repeticiones) SCE	9	0.000134	0.000015		
Total	11	0.000459	0.000042		

Sr	0.003864	Desviación estándar por repetibilidad
SR	0.007192	Desviación estándar por precisión intermedia
SL2	0.000037	Varianza debido al factor de variabilidad

Parámetro	Precisión	CV%
CVr	0.00386	9.28
CVSR	0.00719	17.27

c) Nivel alto

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	F tab
Tratamiento (día) SCF	2	0.000691	0.000345	27.562	4.256
Error (repeticiones) SCE	9	0.000113	0.000013		
Total	11	0.000804	0.000073		

Sr	0.003540	Desviación estándar por repetibilidad
SR	0.009785	Desviación estándar por precisión intermedia
SL2	0.000083	Varianza debido al factor de variabilidad

Parámetro	Precisión	CV%
CVr	0.00354	5.05
CVSR	0.00979	13.95

Tabla 4.16. Análisis de varianza para las muestras fortificadas con Metidati6n a nivel de concentraci6n bajo, medio y alto

a) Nivel bajo

Fuente de variaci6n	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	F tab
Tratamiento (día) SCF	2	0.000118	0.000059	3.001	4.256
Error (repeticiones) SCE	9	0.000177	0.000020		
Total	11	0.000294	0.000027		

Sr	0.004429	Desviaci6n estandar por repetibilidad
SR	0.005424	Desviaci6n estandar por precisi6n intermedia
SL2	0.000010	Varianza debido al factor de variabilidad

Parámetro	Precisi6n	CV%
CVr	0.00443	6.79
CVSR	0.00542	8.31

b) Nivel medio

Fuente de variaci6n	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	F tab
Tratamiento (día) SCF	2	0.001208	0.000604	8.481	4.256
Error (repeticiones) SCE	9	0.000641	0.000071		
Total	11	0.001849	0.000168		

Sr	0.008440	Desviaci6n estandar por repetibilidad
SR	0.014299	Desviaci6n estandar por precisi6n intermedia
SL2	0.000133	Varianza debido al factor de variabilidad

Parámetro	Precisi6n	CV%
CVr	0.00844	10.40
CVSR	0.01430	17.62

c) Nivel alto

Fuente de variaci6n	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	F tab
Tratamiento (día) SCF	2	0.004254	0.002127	97.266	4.256
Error (repeticiones) SCE	9	0.000197	0.000022		
Total	11	0.004451	0.000405		

Sr	0.004676	Desviaci6n estandar por repetibilidad
SR	0.023412	Desviaci6n estandar por precisi6n intermedia
SL2	0.000526	Varianza debido al factor de variabilidad

Parámetro	Precisi6n	CV%
CVr	0.00468	3.67
CVSR	0.02341	18.36

Tabla 4.17. Análisis de varianza para las muestras fortificadas con Protiofos a nivel de concentraci6n bajo, medio y alto

a) Nivel bajo

Fuente de variaci6n	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	F tab
Tratamiento (día) SCF	2	0.000164	0.000082	5.134	4.256
Error (repeticiones) SCE	9	0.000144	0.000016		
Total	11	0.000307	0.000028		

Sr	0.003995	Desviaci6n estandar por repetibilidad
SR	0.005696	Desviaci6n estandar por precisi6n intermedia
SL2	0.000016	Varianza debido al factor de variabilidad

Parámetro	Precisi6n	CV%
CVr	0.00399	6.00
CVSR	0.00570	8.56

b) Nivel medio

Fuente de variaci6n	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	F tab
Tratamiento (día) SCF	2	0.001785	0.000892	12.233	4.256
Error (repeticiones) SCE	9	0.000657	0.000073		
Total	11	0.002441	0.000222		

Sr	0.008541	Desviaci6n estandar por repetibilidad
SR	0.016667	Desviaci6n estandar por precisi6n intermedia
SL2	0.000205	Varianza debido al factor de variabilidad

Parámetro	Precisi6n	CV%
CVr	0.00854	10.56
CVSR	0.01667	20.60

c) Nivel alto

Fuente de variaci6n	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	F tab
Tratamiento (día) SCF	2	0.001517	0.000759	31.530	4.256
Error (repeticiones) SCE	9	0.000217	0.000024		
Total	11	0.001734	0.000158		

Sr	0.004905	Desviaci6n estandar por repetibilidad
SR	0.014412	Desviaci6n estandar por precisi6n intermedia
SL2	0.000184	Varianza debido al factor de variabilidad

Parámetro	Precisi6n	CV%
CVr	0.00491	3.96
CVSR	0.01441	11.63

Tabla 4.18. Análisis de varianza para las muestras fortificadas con Profenofos a nivel de concentración bajo, medio y alto

a) Nivel bajo

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	F tab
Tratamiento (día) SCF	2	0.000273	0.000136	6.662	4.256
Error (repeticiones) SCE	9	0.000184	0.000020		
Total	11	0.000457	0.000042		

Sr	0.004525	Desviación estándar por repetibilidad
SR	0.007033	Desviación estándar por precisión intermedia
SL2	0.000029	Varianza debido al factor de variabilidad

Parámetro	Precisión	CV%
CVr	0.00453	7.20
CVSR	0.00703	11.19

b) Nivel medio

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	F tab
Tratamiento (día) SCF	2	0.002138	0.001069	17.647	4.256
Error (repeticiones) SCE	9	0.000545	0.000061		
Total	11	0.002683	0.000244		

Sr	0.007783	Desviación estándar por repetibilidad
SR	0.017681	Desviación estándar por precisión intermedia
SL2	0.000252	Varianza debido al factor de variabilidad

Parámetro	Precisión	CV%
CVr	0.00778	9.16
CVSR	0.01768	20.81

c) Nivel alto

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	F tab
Tratamiento (día) SCF	2	0.004372	0.002186	77.470	4.256
Error (repeticiones) SCE	9	0.000254	0.000028		
Total	11	0.004626	0.000421		

Sr	0.005312	Desviación estándar por repetibilidad
SR	0.023825	Desviación estándar por precisión intermedia
SL2	0.000539	Varianza debido al factor de variabilidad

Parámetro	Precisión	CV%
CVr	0.00531	3.80
CVSR	0.02383	17.06

Tabla 4.19. Análisis de varianza para las muestras fortificadas con Etión a nivel de concentración bajo, medio y alto

a) Nivel bajo

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	F tab
Tratamiento (día) SCF	2	0.000055	0.000027	1.930	4.256
Error (repeticiones) SCE	9	0.000128	0.000014		
Total	11	0.000182	0.000017		

Sr	0.003766	Desviación estándar por repetibilidad
SR	0.004181	Desviación estándar por precisión intermedia
SL2	0.000003	Varianza debido al factor de variabilidad

Parámetro	Precisión	CV%
CVr	0.00377	5.47
CVSR	0.00418	6.07

b) Nivel medio

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	F tab
Tratamiento (día) SCF	2	0.001511	0.000755	14.179	4.256
Error (repeticiones) SCE	9	0.000479	0.000053		
Total	11	0.001990	0.000181		

Sr	0.007298	Desviación estándar por repetibilidad
SR	0.015125	Desviación estándar por precisión intermedia
SL2	0.000176	Varianza debido al factor de variabilidad

Parámetro	Precisión	CV%
CVr	0.00730	8.72
CVSR	0.01513	18.07

c) Nivel alto

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	F tab
Tratamiento (día) SCF	2	0.004643	0.002321	40.568	4.256
Error (repeticiones) SCE	9	0.000515	0.000057		
Total	11	0.005158	0.000469		

Sr	0.007565	Desviación estándar por repetibilidad
SR	0.024966	Desviación estándar por precisión intermedia
SL2	0.000566	Varianza debido al factor de variabilidad

Parámetro	Precisión	CV%
CVr	0.00756	5.38
CVSR	0.02497	17.77

Tabla 4.20. Análisis de varianza para las muestras fortificadas con Azinfos metil a nivel de concentración bajo, medio y alto

a) Nivel bajo

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	F tab
Tratamiento (día) SCF	2	0.000566	0.000283	6.497	4.256
Error (repeticiones) SCE	9	0.000392	0.000044		
Total	11	0.000957	0.000087		

Sr	0.006598	Desviación estándar por repetibilidad
SR	0.010166	Desviación estándar por precisión intermedia
SL2	0.000060	Varianza debido al factor de variabilidad

Parámetro	Precisión	CV%
CVr	0.00660	4.99
CVSR	0.01017	7.69

b) Nivel medio

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	F tab
Tratamiento (día) SCF	2	0.007199	0.003599	10.525	4.256
Error (repeticiones) SCE	9	0.003078	0.000342		
Total	11	0.010276	0.000934		

Sr	0.018492	Desviación estándar por repetibilidad
SR	0.034004	Desviación estándar por precisión intermedia
SL2	0.000814	Varianza debido al factor de variabilidad

Parámetro	Precisión	CV%
CVr	0.01849	10.09
CVSR	0.03400	18.55

c) Nivel alto

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	F tab
Tratamiento (día) SCF	2	0.023374	0.011687	174.631	4.256
Error (repeticiones) SCE	9	0.000602	0.000067		
Total	11	0.023976	0.002180		

Sr	0.008181	Desviación estándar por repetibilidad
SR	0.054515	Desviación estándar por precisión intermedia
SL2	0.002905	Varianza debido al factor de variabilidad

Parámetro	Precisión	CV%
CVr	0.00818	2.80
CVSR	0.05452	18.68

Tabla 4.21. Análisis de varianza para las muestras fortificadas con Pirazofos a nivel de concentración bajo, medio y alto

a) Nivel bajo

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	F tab
Tratamiento (día) SCF	2	0.000400	0.000200	7.424	4.256
Error (repeticiones) SCE	9	0.000242	0.000027		
Total	11	0.000643	0.000058		

Sr	0.005191	Desviación estándar por repetibilidad
SR	0.008379	Desviación estándar por precisión intermedia
SL2	0.000043	Varianza debido al factor de variabilidad

Parámetro	Precisión	CV%
CVr	0.00519	3.01
CVSR	0.00838	4.86

b) Nivel medio

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	F tab
Tratamiento (día) SCF	2	0.009201	0.004600	8.819	4.256
Error (repeticiones) SCE	9	0.004695	0.000522		
Total	11	0.013896	0.001263		

Sr	0.022840	Desviación estándar por repetibilidad
SR	0.039260	Desviación estándar por precisión intermedia
SL2	0.001020	Varianza debido al factor de variabilidad

Parámetro	Precisión	CV%
CVr	0.02284	9.68
CVSR	0.03926	16.64

c) Nivel alto

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	F tab
Tratamiento (día) SCF	2	0.016363	0.008182	28.889	4.256
Error (repeticiones) SCE	9	0.002549	0.000283		
Total	11	0.018912	0.001719		

Sr	0.016829	Desviación estándar por repetibilidad
SR	0.047516	Desviación estándar por precisión intermedia
SL2	0.001975	Varianza debido al factor de variabilidad

Parámetro	Precisión	CV%
CVr	0.01683	4.53
CVSR	0.04752	12.78

4.2.6 Veracidad

La veracidad del método se evaluó a través del porcentaje de recuperación de los pesticidas organofosforados fortificados en muestras de agua natural. El rango definido se basa en los lineamientos de la NPS (National Pesticide Survey) y la EPA (Environmental Protection Agency) que establecen porcentajes de recuperación de los analitos fortificados en un rango entre 70 y 130%, para el análisis de contaminantes en muestras ambientales fortificadas a niveles de concentración traza del orden de ppb ($\mu\text{g/L}$) [53].

Tabla 4.22. Estudio de veracidad para Demeton-S-metil a tres niveles de concentración

C fortificada (ug/L)	Repetición	C (ug/L)	% Rec
0.060	1	0.061	101.85
	2	0.074	122.57
	3	0.064	105.76
	4	0.066	110.02
	5	0.062	102.81
	6	0.065	108.08
	7	0.055	92.12
	8	0.054	90.18
	9	0.052	87.17
	10	0.062	103.39
	11	0.061	100.77
	12	0.065	108.71
Promedio			102.79
S			9.71
% CV			9.45
n			12.00
tc			0.99
Grados de libertad			11.00
Nivel de confianza			0.95
t _{tabla}			2.20

C fortificada (ug/L)	Repetición	C (ug/L)	% Rec
0.090	1	0.058	64.70
	2	0.062	69.20
	3	0.080	88.15
	4	0.079	87.65
	5	0.071	78.50
	6	0.071	78.23
	7	0.073	80.95
	8	0.074	81.67
	9	0.058	64.26
	10	0.063	70.02
	11	0.054	59.66
	12	0.056	61.81
Promedio			73.73
S			10.02
% CV			13.59
n			12.00
tc			9.08
Grados de libertad			11.00
Nivel de confianza			0.95
t _{tabla}			2.20

C fortificada (ug/L)	Repetición	C (ug/L)	% Rec
0.140	1	0.117	83.18
	2	0.124	88.18
	3	0.137	97.24
	4	0.136	96.53
	5	0.111	78.72
	6	0.105	75.12
	7	0.112	79.90
	8	0.111	79.26
	9	0.117	83.50
	10	0.117	83.19
	11	0.116	82.26
	12	0.115	82.23
Promedio			84.11
S			6.77
% CV			8.04
n			12.00
tc			8.14
Grados de libertad			11.00
Nivel de confianza			0.95
t _{tabla}			2.20

Tabla 4.23. Estudio de veracidad para Dimetoato a tres niveles de concentración

C fortificada (ug/L)	Repetición	C (ug/L)	% Rec
0.060	1	0.068	112.79
	2	0.075	125.01
	3	0.072	118.82
	4	0.072	120.05
	5	0.067	110.58
	6	0.077	128.16
	7	0.080	132.01
	8	0.080	133.07
	9	0.066	110.11
	10	0.068	112.16
	11	0.069	114.92
	12	0.074	122.76
Promedio			120.04
S			8.21
% CV			6.84
n			12.00
tc			8.45
Grados de libertad			11.00
Nivel de confianza			0.95
t _{tabla}			2.20

C fortificada (ug/L)	Repetición	C (ug/L)	% Rec
0.090	1	0.067	74.07
	2	0.079	87.52
	3	0.092	101.66
	4	0.097	107.22
	5	0.109	120.19
	6	0.115	126.76
	7	0.114	125.79
	8	0.119	131.35
	9	0.087	96.20
	10	0.095	105.19
	11	0.083	91.22
	12	0.079	87.14
Promedio			104.53
S			18.32
% CV			17.53
n			12.00
tc			0.86
Grados de libertad			11.00
Nivel de confianza			0.95
t _{tabla}			2.20

C fortificada (ug/L)	Repetición	C (ug/L)	% Rec
0.141	1	0.177	125.96
	2	0.168	119.64
	3	0.167	118.74
	4	0.180	127.65
	5	0.174	123.45
	6	0.167	118.81
	7	0.174	123.77
	8	0.160	113.81
	9	0.156	110.55
	10	0.154	109.35
	11	0.151	107.55
	12	0.151	107.28
Promedio			117.21
S			7.31
% CV			6.24
n			12.00
tc			8.16
Grados de libertad			11.00
Nivel de confianza			0.95
t _{tabla}			2.20

Tabla 4.24. Estudio de veracidad para Tolclofos a tres niveles de concentración

C fortificada (ug/L)	Repetición	C (ug/L)	% Rec	C fortificada (ug/L)	Repetición	C (ug/L)	% Rec	C fortificada (ug/L)	Repetición	C (ug/L)	% Rec
0.030	1	0.034	111.95	0.045	1	0.032	72.19	0.070	1	0.075	106.77
	2	0.036	121.02		2	0.038	84.40		2	0.076	108.84
	3	0.034	113.51		3	0.043	95.52		3	0.069	98.55
	4	0.036	120.72		4	0.046	102.88		4	0.073	104.23
	5	0.034	112.48		5	0.044	98.15		5	0.068	96.68
	6	0.036	119.50		6	0.047	104.09		6	0.067	95.90
	7	0.029	95.55		7	0.047	103.84		7	0.067	96.43
	8	0.028	94.85		8	0.047	103.78		8	0.066	94.69
	9	0.026	88.01		9	0.034	75.18		9	0.065	92.78
	10	0.030	101.04		10	0.035	78.71		10	0.063	90.65
	11	0.032	105.39		11	0.032	70.43		11	0.063	89.77
	12	0.032	107.47		12	0.031	69.78		12	0.062	89.27
Promedio			107.62	Promedio			88.25	Promedio			97.05
S			10.92	S			14.44	S			6.52
% CV			10.14	% CV			16.36	% CV			6.72
n			12.00	n			12.00	n			12.00
tc			2.42	tc			2.82	tc			1.57
Grados de libertad			11.00	Grados de libertad			11.00	Grados de libertad			11.00
Nivel de confianza			0.95	Nivel de confianza			0.95	Nivel de confianza			0.95
t_{tabla}			2.20	t_{tabla}			2.20	t_{tabla}			2.20

Tabla 4.25. Estudio de veracidad para Pirimifos a tres niveles de concentración

C fortificada (ug/L)	Repetición	C (ug/L)	% Rec	C fortificada (ug/L)	Repetición	C (ug/L)	% Rec	C fortificada (ug/L)	Repetición	C (ug/L)	% Rec
0.030	1	0.033	108.12	0.045	1	0.034	74.03	0.071	1	0.071	100.70
	2	0.034	111.94		2	0.041	89.39		2	0.072	101.56
	3	0.036	117.21		3	0.045	99.49		3	0.071	100.09
	4	0.038	125.60		4	0.050	109.01		4	0.074	104.40
	5	0.035	116.50		5	0.043	94.29		5	0.062	87.40
	6	0.038	123.86		6	0.045	97.97		6	0.064	90.26
	7	0.030	100.27		7	0.044	97.91		7	0.065	92.53
	8	0.028	92.76		8	0.046	100.57		8	0.060	85.03
	9	0.027	89.48		9	0.033	71.98		9	0.063	89.00
	10	0.032	105.97		10	0.035	77.70		10	0.061	86.63
	11	0.031	103.79		11	0.034	74.40		11	0.061	85.80
	12	0.032	104.78		12	0.035	76.77		12	0.061	86.34
Promedio			108.36	Promedio			88.63	Promedio			92.48
S			11.28	S			12.91	S			7.17
% CV			10.41	% CV			14.57	% CV			7.75
n			12.00	n			12.00	n			12.00
tc			2.57	tc			3.05	tc			3.64
Grados de libertad			11.00	Grados de libertad			11.00	Grados de libertad			11.00
Nivel de confianza			0.95	Nivel de confianza			0.95	Nivel de confianza			0.95
t_{tabla}			2.20	t_{tabla}			2.20	t_{tabla}			2.20

Tabla 4.26. Estudio de veracidad para Malatión a tres niveles de concentración

C fortificada (ug/L)	Repetición	C (ug/L)	% Rec	C fortificada (ug/L)	Repetición	C (ug/L)	% Rec	C fortificada (ug/L)	Repetición	C (ug/L)	% Rec
0.060	1	0.063	106.27	0.090	1	0.068	76.42	0.139	1	0.147	105.85
	2	0.067	112.95		2	0.081	90.59		2	0.149	107.20
	3	0.069	115.73		3	0.095	106.47		3	0.157	112.67
	4	0.073	122.67		4	0.096	107.69		4	0.146	104.67
	5	0.066	110.08		5	0.083	92.38		5	0.125	89.99
	6	0.073	123.16		6	0.084	93.67		6	0.124	89.06
	7	0.059	98.28		7	0.087	97.11		7	0.130	93.19
	8	0.060	101.12		8	0.087	97.20		8	0.126	90.30
	9	0.055	91.99		9	0.066	73.39		9	0.117	84.16
	10	0.064	107.17		10	0.070	78.35		10	0.114	81.95
	11	0.062	103.52		11	0.067	75.09		11	0.114	81.61
	12	0.063	105.71		12	0.071	78.98		12	0.113	81.46
Promedio			108.22	Promedio			88.94	Promedio			93.51
S			9.34	S			12.18	S			11.21
% CV			8.63	% CV			13.70	% CV			11.99
n			12.00	n			12.00	n			12.00
tc			3.05	tc			3.14	tc			2.01
Grados de libertad			11.00	Grados de libertad			11.00	Grados de libertad			11.00
Nivel de confianza			0.95	Nivel de confianza			0.95	Nivel de confianza			0.95
t_{tabla}			2.20	t_{tabla}			2.20	t_{tabla}			2.20

Tabla 4.27. Estudio de veracidad para Clorpirifos a tres niveles de concentración

C fortificada (ug/L)	Repetición	C (ug/L)	% Rec
0.030	1	0.034	113.51
	2	0.034	112.67
	3	0.038	124.45
	4	0.037	121.94
	5	0.039	127.48
	6	0.038	124.73
	7	0.030	97.78
	8	0.029	97.12
	9	0.024	79.91
	10	0.033	110.47
	11	0.033	108.80
	12	0.034	111.36
Promedio		110.85	
S		13.85	
% CV		12.49	
n		12.00	
tc		2.71	
Grados de libertad		11.00	
Nivel de confianza		0.95	
t _{tabla}		2.20	

C fortificada (ug/L)	Repetición	C (ug/L)	% Rec
0.045	1	0.035	76.67
	2	0.041	89.84
	3	0.048	106.52
	4	0.045	99.90
	5	0.045	99.17
	6	0.046	100.32
	7	0.049	106.88
	8	0.051	112.68
	9	0.033	73.67
	10	0.037	80.35
	11	0.035	78.06
	12	0.034	75.46
Promedio		91.63	
S		14.21	
% CV		15.51	
n		12.00	
tc		2.04	
Grados de libertad		11.00	
Nivel de confianza		0.95	
t _{tabla}		2.20	

C fortificada (ug/L)	Repetición	C (ug/L)	% Rec
0.071	1	0.073	103.25
	2	0.076	107.53
	3	0.081	114.40
	4	0.082	116.53
	5	0.069	97.57
	6	0.073	103.06
	7	0.072	101.83
	8	0.076	107.57
	9	0.055	78.11
	10	0.062	88.12
	11	0.062	87.14
	12	0.061	85.67
Promedio		99.23	
S		12.09	
% CV		12.18	
n		12.00	
tc		0.22	
Grados de libertad		11.00	
Nivel de confianza		0.95	
t _{tabla}		2.20	

Tabla 4.28. Estudio de veracidad para Metidati3n a tres niveles de concentraci3n

C fortificada (ug/L)	Repetición	C (ug/L)	% Rec
0.061	1	0.062	102.85
	2	0.069	113.57
	3	0.071	116.84
	4	0.073	120.41
	5	0.067	111.08
	6	0.071	117.35
	7	0.062	101.99
	8	0.063	104.73
	9	0.054	89.72
	10	0.063	104.21
	11	0.064	104.96
	12	0.063	104.72
Promedio		107.70	
S		8.53	
% CV		7.92	
n		12.00	
tc		3.13	
Grados de libertad		11.00	
Nivel de confianza		0.95	
t _{tabla}		2.20	

C fortificada (ug/L)	Repetición	C (ug/L)	% Rec
0.091	1	0.073	80.07
	2	0.083	91.11
	3	0.098	108.11
	4	0.104	114.46
	5	0.086	94.28
	6	0.085	93.13
	7	0.090	99.26
	8	0.087	96.04
	9	0.065	71.97
	10	0.070	76.64
	11	0.066	72.49
	12	0.067	73.96
Promedio		89.29	
S		14.26	
% CV		15.97	
n		12.00	
tc		2.60	
Grados de libertad		11.00	
Nivel de confianza		0.95	
t _{tabla}		2.20	

C fortificada (ug/L)	Repetición	C (ug/L)	% Rec
0.141	1	0.143	101.42
	2	0.146	103.02
	3	0.156	110.57
	4	0.157	111.18
	5	0.125	88.60
	6	0.125	88.40
	7	0.129	91.41
	8	0.130	91.85
	9	0.102	72.44
	10	0.108	76.70
	11	0.102	72.48
	12	0.105	74.13
Promedio		90.18	
S		14.23	
% CV		15.77	
n		12.00	
tc		2.39	
Grados de libertad		11.00	
Nivel de confianza		0.95	
t _{tabla}		2.20	

Tabla 4.29. Estudio de veracidad para Protiofos a tres niveles de concentraci3n

C fortificada (ug/L)	Repetición	C (ug/L)	% Rec
0.060	1	0.065	108.99
	2	0.067	112.33
	3	0.072	120.43
	4	0.075	124.90
	5	0.071	119.09
	6	0.073	123.09
	7	0.064	107.32
	8	0.066	110.98
	9	0.057	94.93
	10	0.064	106.66
	11	0.062	104.13
	12	0.063	105.57
Promedio		111.53	
S		8.86	
% CV		7.94	
n		12.00	
tc		4.51	
Grados de libertad		11.00	
Nivel de confianza		0.95	
t _{tabla}		2.20	

C fortificada (ug/L)	Repetición	C (ug/L)	% Rec
0.090	1	0.077	86.01
	2	0.088	98.32
	3	0.100	112.01
	4	0.111	123.69
	5	0.084	93.93
	6	0.084	93.47
	7	0.083	92.19
	8	0.086	96.31
	9	0.063	70.16
	10	0.066	73.66
	11	0.065	72.99
	12	0.064	72.04
Promedio		90.40	
S		16.64	
% CV		18.41	
n		12.00	
tc		2.00	
Grados de libertad		11.00	
Nivel de confianza		0.95	
t _{tabla}		2.20	

C fortificada (ug/L)	Repetición	C (ug/L)	% Rec
0.139	1	0.134	96.15
	2	0.132	94.87
	3	0.145	103.83
	4	0.142	101.71
	5	0.118	84.60
	6	0.121	86.98
	7	0.128	91.60
	8	0.126	90.76
	9	0.115	82.36
	10	0.107	76.81
	11	0.113	81.19
	12	0.107	77.15
Promedio		89.00	
S		9.02	
% CV		10.13	
n		12.00	
tc		4.23	
Grados de libertad		11.00	
Nivel de confianza		0.95	
t _{tabla}		2.20	

Tabla 4.30. Estudio de veracidad para Profenofos a tres niveles de concentración

C fortificada (ug/L)	Repetición	C (ug/L)	% Rec	C fortificada (ug/L)	Repetición	C (ug/L)	% Rec	C fortificada (ug/L)	Repetición	C (ug/L)	% Rec
0.061	1	0.060	98.88	0.091	1	0.070	77.13	0.141	1	0.157	110.86
	2	0.064	106.01		2	0.084	92.15		2	0.153	108.17
	3	0.071	117.33		3	0.090	99.40		3	0.166	117.26
	4	0.072	119.28		4	0.098	108.16		4	0.165	117.12
	5	0.066	109.77		5	0.095	104.85		5	0.138	97.80
	6	0.071	116.82		6	0.099	108.72		6	0.141	99.91
	7	0.063	104.48		7	0.101	111.19		7	0.153	108.11
	8	0.062	102.29		8	0.109	120.12		8	0.147	103.80
	9	0.051	84.24		9	0.066	72.26		9	0.116	81.81
	10	0.058	96.25		10	0.071	78.00		10	0.115	81.40
	11	0.058	96.08		11	0.069	76.06		11	0.114	80.48
	12	0.057	94.39		12	0.068	74.62		12	0.112	79.63
Promedio			103.82	Promedio			93.55	Promedio			98.86
S			10.65	S			17.20	S			14.52
% CV			10.26	% CV			18.38	% CV			14.68
n			12.00	n			12.00	n			12.00
t_c			1.24	t_c			1.30	t_c			0.27
Grados de libertad			11.00	Grados de libertad			11.00	Grados de libertad			11.00
Nivel de confianza			0.95	Nivel de confianza			0.95	Nivel de confianza			0.95
t_{tabla}			2.20	t_{tabla}			2.20	t_{tabla}			2.20

Tabla 4.31. Estudio de veracidad para Etión a tres niveles de concentración

C fortificada (ug/L)	Repetición	C (ug/L)	% Rec	C fortificada (ug/L)	Repetición	C (ug/L)	% Rec	C fortificada (ug/L)	Repetición	C (ug/L)	% Rec
0.060	1	0.066	109.73	0.090	1	0.076	84.57	0.141	1	0.157	111.27
	2	0.070	115.60		2	0.087	96.46		2	0.157	111.37
	3	0.070	116.70		3	0.098	108.33		3	0.171	121.39
	4	0.076	126.24		4	0.103	113.80		4	0.172	121.91
	5	0.072	118.72		5	0.088	96.99		5	0.129	92.02
	6	0.068	112.41		6	0.091	100.59		6	0.140	99.73
	7	0.071	117.62		7	0.092	101.84		7	0.151	107.20
	8	0.070	116.38		8	0.098	108.01		8	0.147	104.53
	9	0.059	97.46		9	0.065	71.95		9	0.121	86.03
	10	0.069	114.04		10	0.069	76.47		10	0.115	82.00
	11	0.069	113.88		11	0.068	74.85		11	0.113	80.51
	12	0.067	111.39		12	0.070	76.84		12	0.113	80.60
Promedio			114.18	Promedio			92.56	Promedio			99.88
S			6.75	S			14.87	S			15.39
% CV			5.91	% CV			16.07	% CV			15.41
n			12.00	n			12.00	n			12.00
t_c			7.27	t_c			1.73	t_c			0.03
Grados de libertad			11.00	Grados de libertad			11.00	Grados de libertad			11.00
Nivel de confianza			0.95	Nivel de confianza			0.95	Nivel de confianza			0.95
t_{tabla}			2.20	t_{tabla}			2.20	t_{tabla}			2.20

Tabla 4.32. Estudio de veracidad para Azinfos metil a tres niveles de concentración

C fortificada (ug/L)	Repetición	C (ug/L)	% Rec	C fortificada (ug/L)	Repetición	C (ug/L)	% Rec	C fortificada (ug/L)	Repetición	C (ug/L)	% Rec
0.120	1	0.122	101.77	0.180	1	0.167	92.63	0.280	1	0.326	116.43
	2	0.130	108.54		2	0.183	101.43		2	0.339	120.98
	3	0.137	114.02		3	0.201	111.59		3	0.350	125.05
	4	0.140	116.65		4	0.237	131.65		4	0.350	124.74
	5	0.136	113.14		5	0.191	106.09		5	0.294	105.07
	6	0.135	112.62		6	0.204	113.09		6	0.300	106.90
	7	0.142	118.14		7	0.206	114.13		7	0.298	106.30
	8	0.149	124.42		8	0.216	119.82		8	0.309	110.31
	9	0.119	99.12		9	0.145	80.46		9	0.241	86.03
	10	0.121	100.53		10	0.151	84.10		10	0.237	84.51
	11	0.130	108.32		11	0.148	82.19		11	0.229	81.71
	12	0.125	104.34		12	0.151	83.91		12	0.230	82.01
Promedio			110.13	Promedio			101.76	Promedio			104.17
S			7.77	S			16.97	S			16.66
% CV			7.05	% CV			16.67	% CV			15.99
n			12.00	n			12.00	n			12.00
t_c			4.52	t_c			0.36	t_c			0.87
Grados de libertad			11.00	Grados de libertad			11.00	Grados de libertad			11.00
Nivel de confianza			0.95	Nivel de confianza			0.95	Nivel de confianza			0.95
t_{tabla}			2.20	t_{tabla}			2.20	t_{tabla}			2.20

Tabla 4.33. Estudio de veracidad para Pirazofos a tres niveles de concentración

C fortificada (ug/L)	Repetición	C (ug/L)	% Rec	C fortificada (ug/L)	Repetición	C (ug/L)	% Rec	C fortificada (ug/L)	Repetición	C (ug/L)	% Rec
0.150	1	0.164	109.05	0.225	1	0.211	93.80	0.350	1	0.427	122.05
	2	0.176	117.03		2	0.237	105.51		2	0.400	114.17
	3	0.177	117.94		3	0.253	112.56		3	0.399	113.88
	4	0.173	115.50		4	0.301	133.72		4	0.416	118.98
	5	0.177	118.17		5	0.264	117.37		5	0.390	111.41
	6	0.188	125.45		6	0.270	119.86		6	0.400	114.33
	7	0.177	117.71		7	0.261	115.78		7	0.351	100.40
	8	0.175	116.94		8	0.245	109.09		8	0.389	111.10
	9	0.161	107.34		9	0.189	84.09		9	0.335	95.68
	10	0.167	111.66		10	0.202	89.65		10	0.333	95.25
	11	0.167	111.66		11	0.201	89.38		11	0.312	89.10
	12	0.165	109.90		12	0.196	87.28		12	0.308	87.95
Promedio			114.86	Promedio			104.84	Promedio			106.19
S			5.10	S			15.80	S			11.85
% CV			4.44	% CV			15.07	% CV			11.16
n			12.00	n			12.00	n			12.00
tc			10.11	tc			1.06	tc			1.81
Grados de libertad			11.00	Grados de libertad			11.00	Grados de libertad			11.00
Nivel de confianza			0.95	Nivel de confianza			0.95	Nivel de confianza			0.95
t_{tabla}			2.20	t_{tabla}			2.20	t_{tabla}			2.20

Se realizó la prueba t de student para comparar el porcentaje de recuperación de los analitos con respecto a un valor de referencia del 100%, la hipótesis nula planteada fue $H: \mu_0 = \bar{x}$. Se aceptó esta hipótesis en el nivel bajo de concentración para profenofos y demeton-s-metil, en el nivel medio para dimetoato, clorpirifos, protiofos, profenofos, etión, azinfos metil, y pirazofos; mientras que en el nivel alto para tolclofos metil, malatión, clorpirifos, profenofos, etión, azinfos metil, pirazofos, es decir que no hay diferencia significativa entre el valor verdadero y la media muestral a un nivel de confianza del 95%, para estos analitos. Sin embargo, cabe señalar que el porcentaje de recuperación de todos los analitos cumplen con el criterio establecido para veracidad.

4.3 Análisis de las muestras

Las muestras fueron tomadas por duplicado en cada sitio de muestreo, como medida de calidad. A continuación, se indican los resultados obtenidos para cada pesticida organofosforado.

Tabla 4.34. Concentración de OPPs en las muestras tomadas en la provincia de Napo

Nombres del pesticida\Muestra	C (µg/L)									
	N1-M1	N1-M2	N2-M1	N2-M2	N3-M1	N3-M2	N4-M1	N4-M2	N5-M1	N5-M2
Demeton-s-metil	< LCM	< LCM	< LCM	< LCM	ND	< LCM	< LCM	< LCM	ND	ND
Dimetoato	< LDI	< LDI	ND	< LDI	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Tolclofos-metil	ND	ND	ND	ND	< LCM	ND	ND	ND	ND	ND
Pirimifos metil	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Malatión	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Clorpirifos	ND	ND	< LDM	ND	< LCM	< LCM	ND	ND	ND	ND

Metidati3n	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Protiofos	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Profenofos	< LDI	< LDI	0.1316	< LDI	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Eti3n	ND	ND	ND	ND	< LCM	ND	ND	ND	ND	ND
Azinfos metil	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Pirazofos	ND	ND	ND	ND	< LCM	ND	ND	ND	ND	ND

Tabla 4.35. Concentraci3n de OPPs en las muestras tomadas en la provincia de Sucumbi3s

Nombres del pesticida \ Muestra	C ($\mu\text{g/L}$)									
	SH1- M1	SH1- M2	SH2- M1	SH2- M2	SH3- M1	SH3- M2	SH4- M1	SH4- M2	SH5- M1	SH5- M2
Demeton-s-metil	ND	ND	0.0440	0.0338	ND	ND	< LCM	< LCM	< LCM	< LCM
Dimetoato	ND	ND	ND	< LDI	< LCM	< LCM	< LDI	< LDI	< LDI	< LDI
Tolclofos-metil	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Pirimifos metil	ND	ND	< LCM	< LCM	< LCM	< LCM	ND	ND	ND	ND
Malati3n	ND	ND	ND	ND	< LCM	< LCM	ND	ND	ND	ND
Clorpirifos	0.0186	0.0154	< LCM	< LCM	0.0209	0.0174	< LCM	< LCM	ND	ND
Metidati3n	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Protiofos	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Profenofos	0.1066	0.0900	ND	ND	0.0791	0.0685	ND	ND	ND	ND
Eti3n	ND	ND	ND	ND	2.5337	2.4373	ND	ND	ND	ND
Azinfos metil	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Pirazofos	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Seg3n las tablas 4.32 y 4.35, los pesticidas organofosforados detectados en las matrices de agua de la provincia de Napo y Sucumbi3s son demeton-s-metil, dimetoato, tolclofos metil, pirimifos, clorpirifos, profenofos, eti3n y pirazofos. Sin embargo, no todos se pudieron cuantificar debido a que se determinaron valores menores al LCM a pesar de usar un factor de concentraci3n de 1000. Las condiciones de tratamiento y an3lisis de la muestra pudieron afectar la separaci3n y recuperaci3n de todos los OPPs debido a las propiedades que presentan estos analitos como la fotodegradaci3n.

4.4 Evaluaci3n del riesgo ecol3gico

El riesgo ecol3gico se determin3 mediante el c3lculo de los cocientes de riesgo (HQ) para especies como algas, invertebrados acu3ticos y peces. Este valor se determin3 para cada combinaci3n de pesticida-especie centinela, para lo cual se dividi3 la concentraci3n ambiental medida (MEC) y la concentraci3n prevista sin efecto (PNEC) o valor de referencia que se obtiene al dividir el valor de toxicidad de la especie seleccionada por un factor de evaluaci3n de 100. Los datos de

toxicidad aguda (LC₅₀ y EC₅₀) se obtuvieron de la base de datos *Pesticide Properties DataBase* (PPDB), como se observa en la tabla 4.36.

Tabla 4.36. Toxicidad aguda de especies centinela para evaluación del riesgo ecológico

Especie	Toxicidad aguda (mg/L)				
		Demeton-s-metil	Profenofos	Clorpirifos	Etión
Peces	LC ₅₀ 96 h	6.4	0.08	0.025	0.5
Invertebrados acuáticos	EC ₅₀ 48 h	0.023	0.5	0.0001	0.000056
Algas	EC ₅₀ 72 h	22.1	-	0.48	-

Cuando el riesgo ecológico adquiere valores inferiores a 1 se considera como bajo o insignificante, valores entre 1-10 como moderado, mientras que valores mayores a 10 representan un riesgo alto.

En las tablas 4.37 a 4.40, se muestran los resultados obtenidos en las muestras tomadas en el norte de la Amazonía ecuatoriana.

Tabla 4.37. Riesgo ecológico para la muestra N2

Muestra	Especie	HQ-Profenofos
N2	Peces	0.165
	Invertebrados acuáticos	0.026
	Algas	-

Tabla 4.38. Riesgo ecológico para la muestra SH-1

Muestra	Especie	HQ-Profenofos	HQ-Clorpirifos	Total
SH-1	Peces	0.123	0.068	0.191
	Invertebrados acuáticos	0.020	17.015	17.035
	Algas	-	0.004	0.004

Tabla 4.39. Riesgo ecológico para la muestra SH-2

Muestra	Especie	HQ-Demeton-s-metil
SH-2	Peces	0.001
	Invertebrados acuáticos	0.169
	Algas	0.00018

Tabla 4.40. Riesgo ecológico para la muestra SH-3

Muestra	Especie	HQ-Profenofos	HQ-Clorpirifos	HQ-Etión	Total
SH-3	Peces	0.092	0.077	0.497	0.666
	Invertebrados acuáticos	0.015	19.190	4438.388	4457.592
	Algas	-	0.004	-	0.004

En uno de los puntos de la provincia de Napo, se evidencia que con el método desarrollado se pudo cuantificar profenofos. Según el INIAP, este pesticida comercialmente llamado Curacron 500 Ec, es utilizado para combatir la plaga *Spodoptera frugiperda* en los cultivos de maíz. La Organización Mundial de la Salud clasifica a este compuesto como moderadamente peligroso (Clase II) [54]. El cociente de riesgo determinado fue menor a 1, por lo tanto, en el punto N2 el riesgo ecológico es bajo. Sin embargo, es necesario tener precaución, ya que este OPP es agudamente tóxico para los peces y los macroinvertebrados [55]. Además, tiene toxicidad para el desarrollo y reproducción, y es genotóxico para organismos acuáticos y terrestres no objetivos como ratones, peces, insectos y lombrices de tierra [54].

Otro de los pesticidas encontrados fue el clorpirifos, el cual es ampliamente utilizado en el tratamiento de plagas en varios cultivos, como por ejemplo maíz. Está clasificado como altamente tóxico (categoría II) según el INIAP. El cociente de riesgo determinado en las muestras de las provincias de Napo y Sucumbíos, no sobrepasa el límite permitido para peces y algas en los puntos SH-1 y SH-3. Sin embargo, el cociente de riesgo obtenido supera a 10 en invertebrados acuáticos, por lo tanto, se evidencia un riesgo ecológico alto para estas especies. Cabe señalar, que este insecticida presenta toxicidad aguda y crónica para dichas especies, provocando descoordinación motora, retraso en la maduración, problemas en el crecimiento, reproducción, etc [56].

De acuerdo a la tabla 4.39, se puede indicar que en el punto SH-2 se encontró el pesticida demeton-s-metil, el cual es un plaguicida que se utiliza para el control de plagas en cultivos de frutas, hortalizas, papa, forestales, etc. Según Agrocalidad, en la provincia de Sucumbíos los LMR detectados en muestras de naranjilla fue de 82.25 ppb, siendo el nivel permitido de 10 ppb. Según los criterios de calidad de agua (US EPA) para demeton, el LMR es de 6 µg/L. En el caso de las muestras de agua del presente estudio, los valores no superan los máximos permitidos. Asimismo, los cocientes de riesgo determinados, indican que el riesgo ecológico es bajo, ya que los valores determinados no superan a 1.

En el punto SH-3 (tabla 4.35), se indica la presencia del pesticida etión, el cual es un insecticida utilizado en el control de plagas de los cultivos de maíz. La naturaleza hidrofóbica de este compuesto juega un rol importante en la absorción en el suelo y sedimentos, reduciendo la escorrentía en aguas naturales, sin embargo, en un estudio realizado por Sharom et al, demuestran que el etión es persistente en aguas naturales, sufriendo poca biodegradación [57]. Según la OMS, se considera moderadamente peligroso (clasificación II). El riesgo ecológico para invertebrados acuáticos es alto, obteniéndose un valor superior a 10. El etión al ser un insecticida organofosforado, causa efectos en los crustáceos acuáticos como la alteración generalizada de los procesos fisiológicos y cambios histopatológicos en diferentes órganos [58].

Los niveles de pesticidas organofosforados encontrados en las matrices de agua natural de las muestras tomadas de los afluentes de río Napo, cumplen con la normativa ambiental ecuatoriana. Según la Norma de Calidad Ambiental y de Descarga de Efluentes: Recurso Agua – Libro VI Anexo 1, de Ecuador, el límite máximo permisible de plaguicidas organofosforados totales en aguas dulces, frías o cálidas, en aguas marinas y de estuario, para la preservación de la flora y fauna es de 10 µg/L. Las concentraciones detectadas de residuos de pesticidas en el agua natural de los sitios de muestreo están por debajo del valor del límite máximo de residuos (LMR) aceptado para el agua potable (0,1 µg/L) según la FAO/OMS, a excepción del etión y profenofos.

CAPÍTULO 5

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

- Se implementó una metodología analítica para la determinación de OPPs en matrices de agua de los agroecosistemas de Norte de la Amazonia Ecuatoriana, mediante la utilización de la cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas, que permitió la separación, identificación y cuantificación de los analitos de estudio.
- Se establecieron las condiciones cromatográficas adecuadas para lograr una buena resolución de los picos cromatográficos de los 16 analitos del estándar mix de pesticidas utilizado.
- El método fue validado de acuerdo a los lineamientos de la Eurachem y la ICH Q2(R1), para parámetros como: linealidad, estudio de blancos, selectividad, efecto matriz, límite de detección, límite de cuantificación, precisión (repetibilidad, precisión intermedia) y veracidad. Se cumplieron con los objetivos de validación establecidos, obteniéndose para linealidad coeficientes de determinación mayores a 0.99 para todos los analitos de estudio, los límites de detección del método oscilan entre 0.004 hasta 0.025 $\mu\text{g/mL}$, mientras que los límites de cuantificación del método oscilan entre 0.027 hasta 0.077 $\mu\text{g/mL}$, dependiendo del OPP. En el estudio de precisión se obtuvieron coeficientes de variación de repetibilidad ente 2.53 – 10.56%, y de precisión intermedia entre 6.07-20.81%, cumpliendo con los objetivos de validación $\%CV_r \leq 16\%$, y $\%CVR \leq 22\%$. Los porcentajes de recuperación obtenidos para cada analito se encuentran en un rango entre 70 y 130%.
- Se estimó la concentración de los pesticidas organofosforados en las muestras tomadas en los tributarios del río Amazonas en las provincias de Napo y Sucumbíos. Se detectó la presencia de OPPs tales como: clorpirifos (SH-1=0.017 $\mu\text{g/L}$; SH-3=0.0192 $\mu\text{g/L}$), profenofos (SH-1=0.0983 $\mu\text{g/L}$; SH-3=0.0738 $\mu\text{g/L}$), demeton-s-metil (SH-2= 0.0389 $\mu\text{g/L}$) y etión (SH-3=2.4855 $\mu\text{g/L}$), cuya concentración total no supera los límites establecidos por la normativa ambiental ecuatoriana.
- Se determinó el riesgo ecológico causado por pesticidas como demeton-s-metil, profenofos, clorpirifos y etión, para especies como peces, invertebrados acuáticos y algas. De los cuales el que presenta un alto riesgo ecológico para invertebrados acuáticos es el etión, cuyo HQ calculado fue 4438.38, seguido del clorpirifos cuyo HQ fue de 19.19. Para el resto de pesticidas y especies centinelas, los valores de HQ fueron

menores a 1, lo que indica que existe un bajo riesgo ecológico en los puntos N2, SH-1, SH-2 y SH-3.

5.2 Recomendaciones

- Se recomienda ampliar el alcance de la validación del método, para otro tipo de matrices tales como suelos o sedimentos.
- Se recomienda probar con un volumen de muestra menor con el fin de disminuir el tiempo de tratamiento de la muestra durante la extracción SPE.
- Utilizar un factor de concentración mayor, para lograr que los analitos cuya concentración es menor al LCM, puedan ser cuantificados.
- Realizar más investigación en otras provincias de la Amazonía ecuatoriana y en diferentes áreas de cultivo, para evaluar el riesgo ecológico que puede causar el uso indiscriminado de agroquímicos tales como los pesticidas organofosforados.
- Promover campañas de concientización a la población sobre los efectos negativos que causa el uso inadecuado de OPPs en la fauna, flora y a la salud del hombre, a través de la divulgación de los resultados de los estudios de investigación realizados en este campo de aplicación.

6. Referencias

- [1] C. Vasco, B. Torres, E. Jácome, A. Torres, D. Eche, and C. Velasco, "Use of chemical fertilizers and pesticides in frontier areas: A case study in the Northern Ecuadorian Amazon" *Land use policy*, vol. 107, no. August, p. 105490, 2021, doi: 10.1016/j.landusepol.2021.105490.
- [2] W. Aktar, D. Sengupta, and A. Chowdhury, "Impact of pesticides use in agriculture: Their benefits and hazards," *Interdiscip. Toxicol.*, vol. 2, no. 1, pp. 1–12, 2009, doi: 10.2478/v10102-009-0001-7.
- [3] T. O. Ajiboye, P. O. Oladoye, C. A. Olanrewaju, and G. O. Akinsola, "Organophosphorus pesticides: Impacts, detection and removal strategies," *Environ. Nanotechnology, Monit. Manag.*, vol. 17, no. December 2021, p. 100655, 2022, doi: 10.1016/j.enmm.2022.100655.
- [4] J. da Silva Sousa, H. O. do Nascimento, H. de Oliveira Gomes, and R. F. do Nascimento, "Pesticide residues in groundwater and surface water: recent advances in solid-phase extraction and solid-phase microextraction sample preparation methods for multiclass analysis by gas chromatography-mass spectrometry," *Microchem. J.*, vol. 168, no. May, 2021, doi: 10.1016/j.microc.2021.106359.
- [5] D. T. Chirinos *et al.*, "Insecticides and agricultural pest control: The magnitude of its use in crops in some provinces of Ecuador," *Cienc. Tecnol. Agropecu.*, vol. 21, no. 1, 2020, doi: 10.21930/RCTA.VOL21_NUM1_ART1276.
- [6] A. Deknock *et al.*, "Distribution of agricultural pesticides in the freshwater environment of the Guayas river basin (Ecuador)," *Sci. Total Environ.*, vol. 646, pp. 996–1008, 2019, doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.07.185.
- [7] E. C. Mollocana Lara and F. A. Gonzales-Zubiate, "Control of pesticides in Ecuador: An underrated problem?," *Rev. Bionatura*, vol. 5, no. 3, pp. 1257–1263, 2020, doi: 10.21931/RB/2020.05.03.17.
- [8] L. Villegas, M. Cabrera, and M. V. Capparelli, "Assessment of Microplastic and Organophosphate Pesticides Contamination in Fiddler Crabs from a Ramsar Site in the Estuary of Guayas River, Ecuador," *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 107, no. 1, pp. 20–28, 2021, doi: 10.1007/s00128-021-03238-z.
- [9] R. A. Torres-Navarrete, J. C. Vargas-burgos, E. Danielly, and Y. Arteaga-crespo, "Influence of socioeconomic variables in the naranjilla (*Solanum quitoense* Lam .) production in the rural community of Wamani in the Ecuadorian Amazon," vol. 67, pp. 65–72, 2018.
- [10] L. Schiesari, A. Waichman, T. Brock, C. Adams, and B. Grillitsch, "Pesticide use and biodiversity conservation in the Amazonian agricultural frontier," *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.*, vol. 368, no. 1619, 2013, doi: 10.1098/rstb.2012.0378.
- [11] M. Doble and A. Kumar, "Biodegradation of pesticides," in *Biotreatment of Industrial Effluents*, 2015, pp. 78–84. doi: 10.2134/asaspecpub8.c8.
- [12] H. P. Hutter *et al.*, "Health symptoms related to pesticide use in farmers and laborers of ecological and conventional banana plantations in Ecuador," *Int. J. Environ. Res. Public Health*, vol. 18, no. 3, pp. 1–12, 2021, doi: 10.3390/ijerph18031126.
- [13] L. M. Schuijt, F. Peng, S. J. P. Van Den Berg, M. M. L. Dingemans, and P. J. Van Den Brink, "Science of the Total Environment (Eco) toxicological tests for assessing impacts of chemical stress to aquatic ecosystems: Facts , challenges , and future," *Sci. Total Environ.*, vol. 795, p. 148776, 2021, doi:

- 10.1016/j.scitotenv.2021.148776.
- [14] C. Aparicio, Virginia; De Gerónimo, Eduardo; Hernández, Keren; Pérez, Débora; Portocarrero, Rocío; Vidal, *Los plaguicidas agregados al suelo y su destino en el ambiente*.
- [15] *Nano and Bio-Based Technologies for Wastewater Treatment*.
- [16] R. Hart, "Conceptos básicos sobre Agroecosistemas." Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, Turrialba, 1985.
- [17] M. Altieri, C. Nicholls, M. G. De Molina, R. Ugas, and P. Midas, *AGROECOLOGÍA*, vol. 7, no. 2. 1999. [Online]. Available: <http://www.leisa-al.org/web/images/stories/revistapdf/vol22n2.pdf#page=30>
- [18] "Panorama Agroeconómico: Ecuador 200," 2020. [Online]. Available: <https://online.fliphtml5.com/ijia/fchc/#p=1>
- [19] M. Sánchez, T. Vayas, F. Mayorga, and C. Freire, "Sector agrícola del Ecuador," *Panor. Gen.*, p. 4, 2020, [Online]. Available: <https://blogs.cedia.org.ec/obest/wp-content/uploads/sites/7/2020/06/Diagnóstico-sector-agrícola-Ecuador.pdf>
- [20] Ministerio de Agricultura/Gobierno de la República del Ecuador, "Geo Portal del Agroecuadoriano," 2017. <http://geoportal.agricultura.gob.ec/index.php/mapas-interactivos/2-uncategorised/37-mapa-cultivos>
- [21] M. del P. V. Vera and M. C. T. Toral, "Economía ecuatoriana: de la producción agrícola al servicio," *Rev. Espac.*, vol. 39, no. 32, p. 30, 2018, [Online]. Available: <https://www.revistaespacios.com/a18v39n32/a18v39n32p30.pdf>
- [22] J. P. Cevallos, *La Política Agropecuaria Ecuatoriana*, no. 44. 2015. [Online]. Available: <http://extwprlegs1.fao.org/docs/pdf/ecu183434.pdf>
- [23] O. Viteri-Salazar and L. Toledo, "The expansion of the agricultural frontier in the northern Amazon region of Ecuador, 2000–2011: Process, causes, and impact," *Land use policy*, vol. 99, no. August, p. 104986, 2020, doi: 10.1016/j.landusepol.2020.104986.
- [24] C. L. Gray and R. E. Bilsborrow, "Consequences of out-migration for land use in rural Ecuador," *Land use policy*, vol. 36, pp. 182–191, 2014, doi: 10.1016/j.landusepol.2013.07.006.
- [25] J. Solis, Luz; López, *Principios básicos de contaminación ambiental*. Toluca, 2003.
- [26] M. Calva, Laura Georgina; Torres, "Plaguicidas organoclorados," no. December 1998.
- [27] M. Á. Karam *et al.*, "Plaguicidas y salud de la población," *Red Rev. Cient. Am. Lat. el caribe, españa y Port.*, vol. 11, no. REDALYC.ORG, pp. 246–254, 2004, [Online]. Available: <http://cienciaergosum.uaemex.mx/index.php/ergosum/article/view/3748/2800>
- [28] E. Pita Lezma and A. Gonzales, "Plaguicidas: clasificación, uso, toxicología y medición de la exposición," 2001.
- [29] G. Taylor & Francis, *Chromatographic Analysis of the Environment*, Third Edit. Taylor & Francis Group, 2006.
- [30] M. Sakata, "II.7.2 Organophosphorus pesticides," pp. 534–544, 2005, [Online]. Available: <http://eknygos.lsmuni.lt/springer/124/535-544.pdf>
- [31] F. Alfayate, José; González, María; Orosco, Carmen; Pérez, Antonio; Rodríguez, *Contaminación ambiental. Una visión desde la química*. Madrid: Parainfo, 2002.

- [32] C. R. Universidad Nacional, "MANUAL DE PLAGUICIDAS DE CENTROAMÉRICA."
<http://www.plaguicidasdecentroamerica.una.ac.cr/index.php/base-de-datos-menu/451-pirazofos>
- [33] O. Valarezo and X. Muñoz, "Insecticidas de uso Agrícola en el Ecuador," *INiAP*, pp. 3–6, 2011, [Online]. Available: https://repositorio.iniap.gob.ec/bitstream/41000/1253/1/INIAP_boletín_divulgativo_401.pdf
- [34] D. Harris, *Análisis Químico cuantitativo*, Tercera. Barcelona: Reverté, 2016.
- [35] C. Gary D., *Química Analítica*. México, D.F.: McGraw Hill, 2009.
- [36] D. A. Skoog, F. J. Holler, and M. R., Stanley, *Principios de análisis instrumental*, Sexta. México, D.F.: Cengage Learning, 2008.
- [37] A. Schwarzenberg *et al.*, "Identification tree based on fragmentation rules for structure elucidation of organophosphorus esters by electrospray mass spectrometry," *Mass Spectrom.*, 2013.
- [38] G. H. De Alwis, L. L. Needham, and D. B. Barr, "Measurement of human urinary organophosphate pesticide metabolites by automated solid-phase extraction, post extraction derivatization, and gas chromatography–tandem mass spectrometry," *Chromatogr. B*, p. B 843, 34–41, 2006.
- [39] M. Lagarrigue, A. Bossee, A. Begos, A. Varenne, P. Gareil, and B. Bellier, "Separation and identification of isomeric acidic degradation products of organophosphorus chemical warfare agents by capillary electrophoresis-ion trap mass spectrometry," *Chromatogr. A*, pp. 1137, 110–118, 2006.
- [40] Shimadzu, "Basics of Gas Chromatograph-Mass Spectrometry." https://www.shimadzu.com/an/service-support/technical-support/gas-chromatograph-mass-spectrometry/required_tools/scan_and_sim.html
- [41] *Guidance document on residue analytical methods*. 1999.
- [42] Eurachem, *La Adecuación al Uso de los Métodos Analíticos. Una Guía de Laboratorio para Validación de Métodos y Temas Relacionados*. 2014.
- [43] I. Sierra Alonso, S. Gómez Ruiz, D. Pérez Quintanilla, and S. Morante Zarcero, *Análisis Instrumental*. Netbiblo, 2010.
- [44] D. Gómez Orea and T. Gómez Villarino, *Evaluación del impacto ambiental*, Tercera. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa, 2013.
- [45] P. R. Romero and A. M. Cantú, "8 Fundamentos de la evaluación del riesgo ecológico."
- [46] "Norma de Calidad Ambiental y de descarga de efluentes : Recurso Agua," *TULAS Texto unificado Legis. Secund. del Minist. del Ambient.*, pp. 8–9, 2011.
- [47] N. Myers, R. A. Mittermeier, C. G. Mittermeier, G. A. Da Fonseca, and J. Kent, "Biodiversity hotspots for conservation priorities," 2000.
- [48] E. Armijos, "Estudio hidrofísico de las cuencas de los ríos Napo, Pastaza y Santiago," 2002.
- [49] Instituto de Investigaciones Agropecuarias de Chile, "Guía para la toma de muestras de residuos de plaguicidas: Agua, sedimento y suelo," p. 1, 2006.
- [50] C. Cruzeiro, M. Â. Pardal, E. Rocha, and M. J. Rocha, "Occurrence and seasonal loads of pesticides in surface water and suspended particulate matter from a wetland of worldwide interest—the Ria Formosa Lagoon, Portugal," *Environ. Monit. Assess.*, vol. 187, no. 11, 2015, doi: 10.1007/s10661-015-4824-8.
- [51] US EPA, "SW-846 Test Method 8141B," no. February, pp. 1–44, 2007,

- [Online]. Available: <https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-12/documents/8141b.pdf>
- [52] F. Carmona, "Modelos lineales," 2003.
- [53] USEPA, "Appendix B to part 136. Definition and procedure for the determination of the method detection limit," vol. 49, 1984.
- [54] M. Kushwaha, S. Verma, and S. Chatterjee, "Profenofos, an Acetylcholinesterase-Inhibiting Organophosphorus Pesticide: A Short Review of Its Usage, Toxicity, and Biodegradation," *J. Environ. Qual.*, vol. 45, no. 5, pp. 1478–1489, 2016, doi: 10.2134/jeq2016.03.0100.
- [55] N. Akerblom, "Agricultural pesticide toxicity to aquatic organisms - a literature review," *Dep. Environ. Assess. Swedish Univ. Agric. Sci.*, vol. 16, pp. 1–31, 2004.
- [56] M. Watts, "Clorpirifos: Un posible COP a nivel global," pp. 1–46, 2012.
- [57] L. J. R. Foster, B. H. Kwan, and T. Vancov, "Microbial degradation of the organophosphate pesticide, Ethion," *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 240, no. 1, pp. 49–53, 2004, doi: 10.1016/j.femsle.2004.09.010.
- [58] M. M. A. Desouky, H. Abdel-Gawad, and B. Hegazi, "Distribution, fate and histopathological effects of ethion insecticide on selected organs of the crayfish, *Procambarus clarkii*," *Food Chem. Toxicol.*, vol. 52, pp. 42–52, 2013, doi: 10.1016/j.fct.2012.10.029.

7. Apéndices y anexos

ANEXO A. Espectros de masas de los analitos de estudio

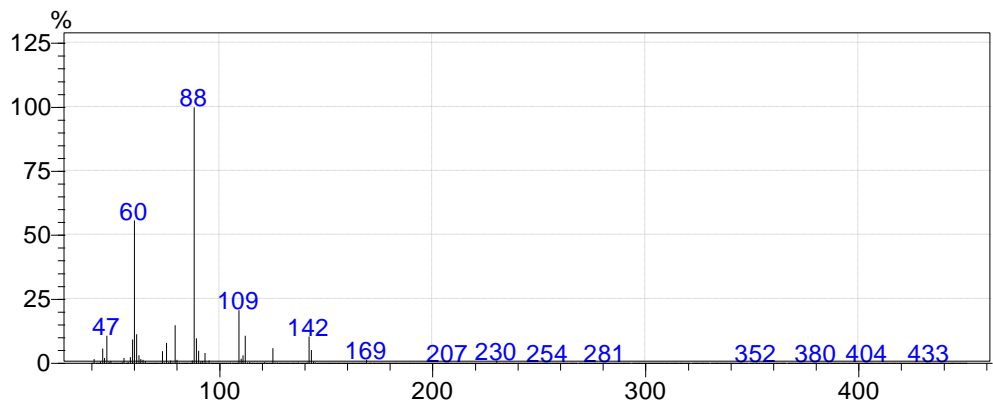


Fig.A 1. Espectro de masas del Demeton-S-metil

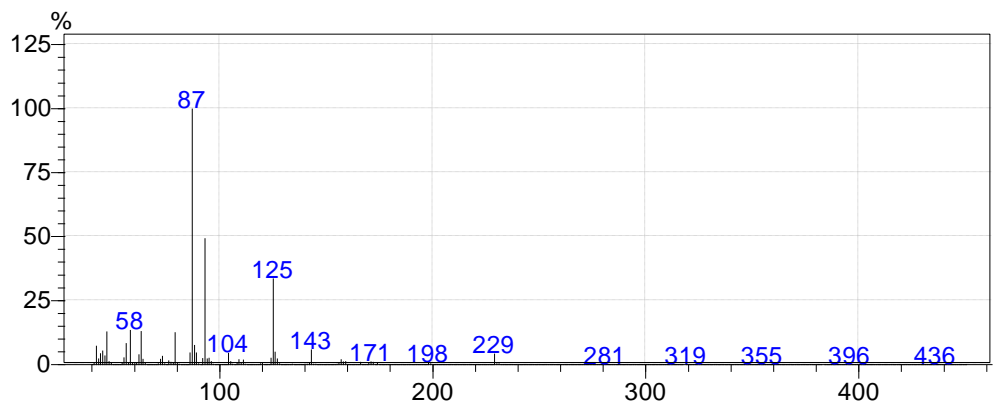


Fig.A 2. Espectro de masas del dimetoato

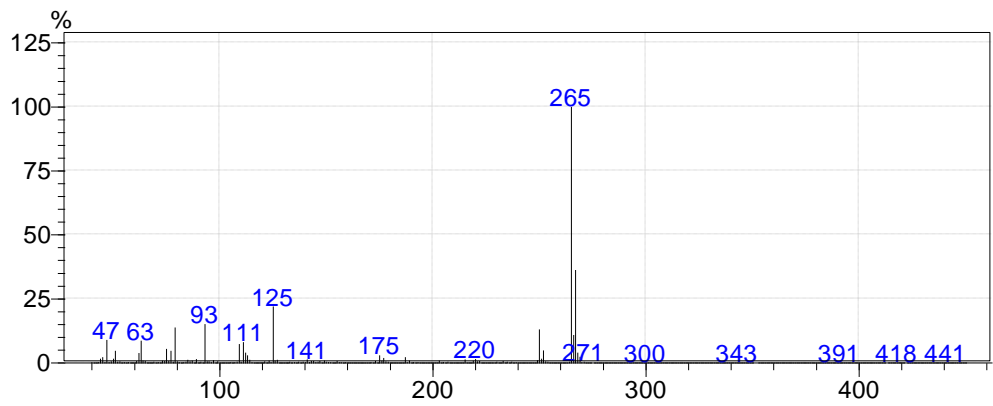


Fig.A 3. Espectro de masas del tolclofos metil

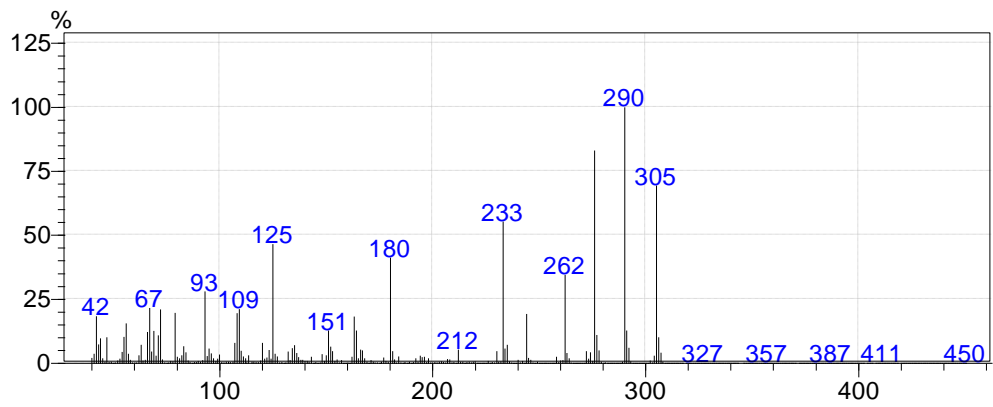


Fig.A 4. Espectro de masas del pirimifos metil

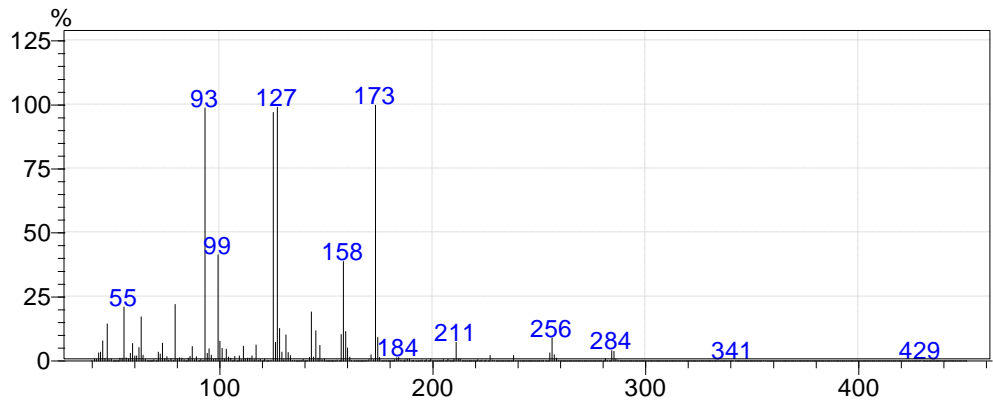


Fig.A 5. Espectro de masas del malati3n

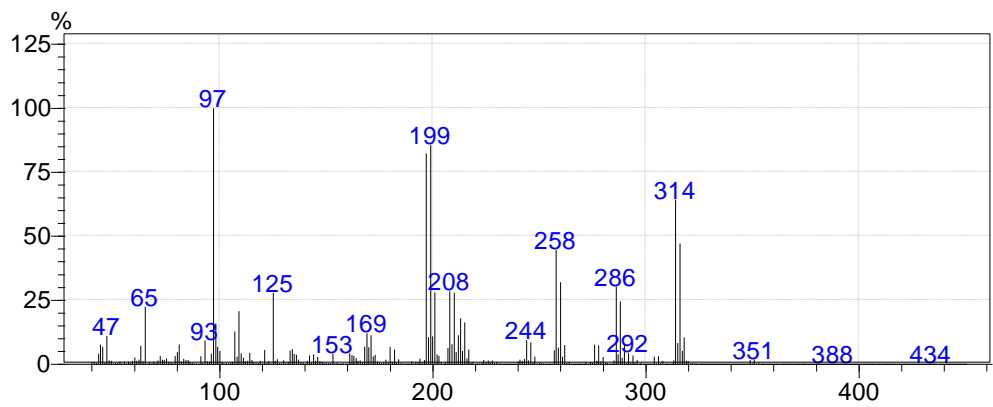


Fig.A 6. Espectro de masas del clorpirifos

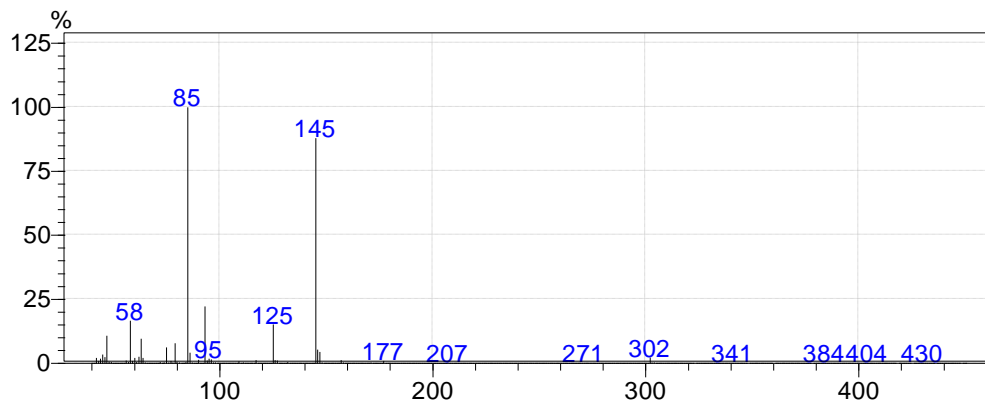


Fig.A 7. Espectro de masas del metidación

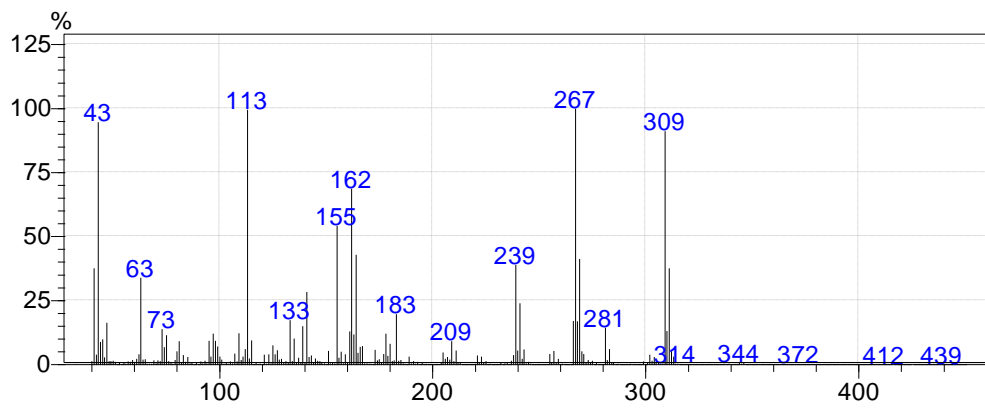


Fig.A 8. Espectro de masas del protiofos

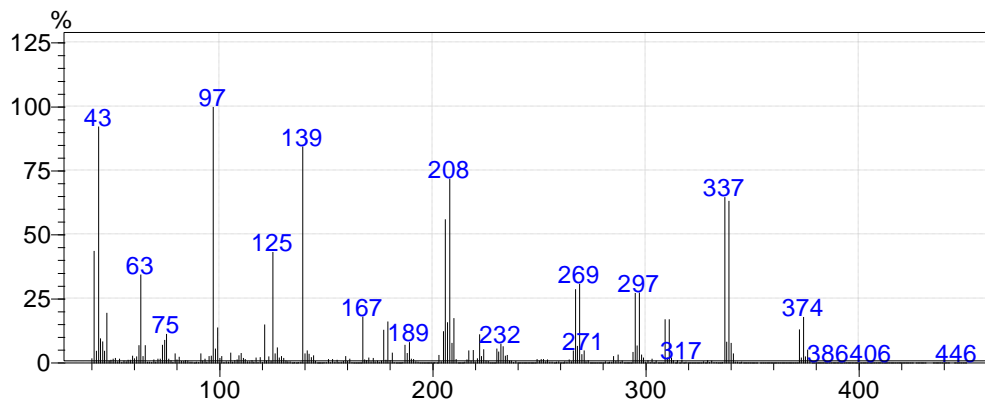


Fig.A 9. Espectro de masas del profenofos

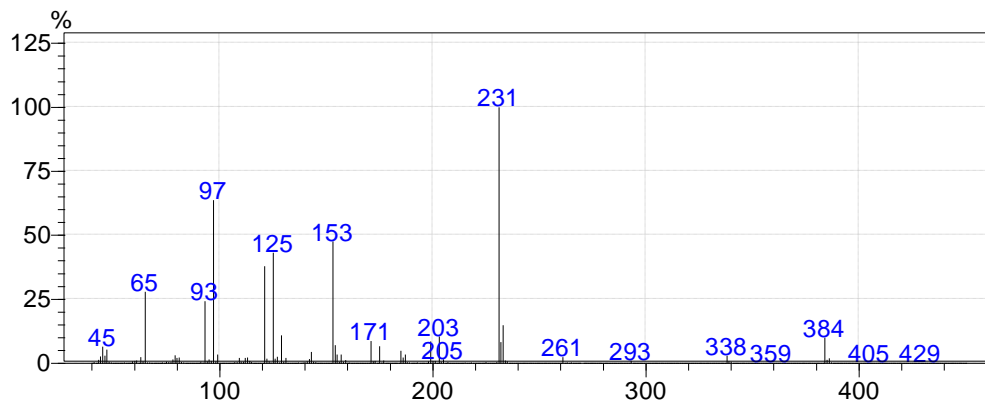


Fig.A 10. Espectro de masas del etión

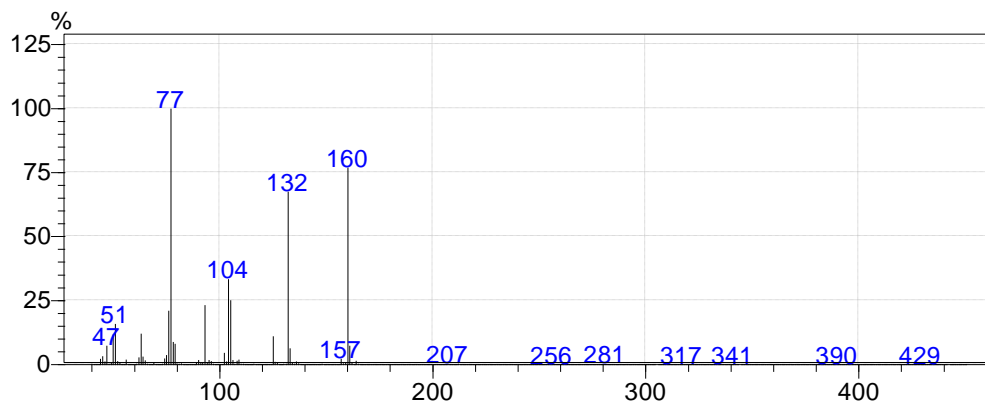


Fig.A 11. Espectro de masas del azinfos metil

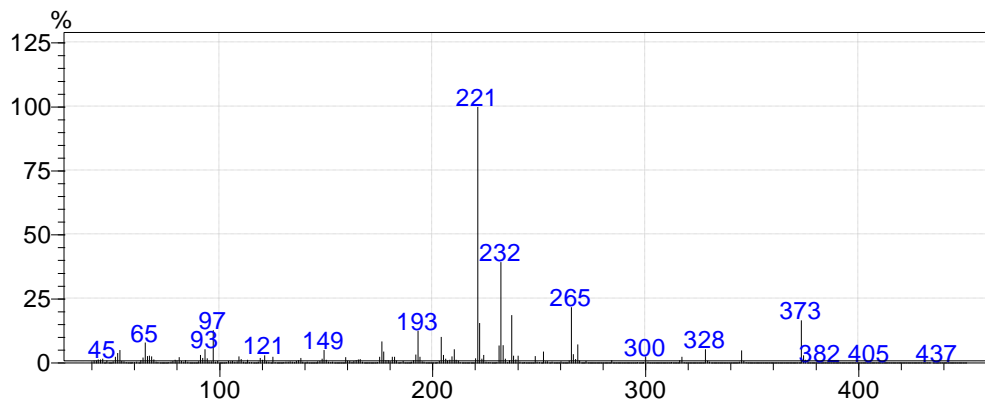


Fig.A 12. Pirazofos