



VALIDATION OF A DETECTION METHOD OF PESTICIDES ORGANOCHLORINATED IN VINASSES, BY GAS CHROMATOGRAPHY

VALIDACIÓN PARCIAL DE UN MÉTODO DE DETECCIÓN DE PESTICIDAS ORGANOCLORADOS EN VINAZA, POR CROMATOGRAFÍA DE GASES

Received 10 23 2019
Accepted 12 23 2019
Published 12 30 2019

Vol. 36, No.5, pp. 210-222, Nov./Dic.2019
Revista Boliviana de Química

36(5), 210-222, Nov./Dec. 2019
Bolivian Journal of Chemistry
DOI: 10.34098/2078-3949.36.5.3



Full original article

Peer-reviewed

Adriana P. Chaile^{1,2,*}, Mercedes M. E. Ferreyra de Ruiz Holgado¹

¹Facultad de Ciencias Exactas y Tecnología, Departamento de Ingeniería de Procesos y Gestión Industrial, Cátedra de Química, Universidad Nacional de Tucumán, Av. Independencia 1800 (4000), phone: +54 381 436 4093, San Miguel de Tucumán, Tucumán, Argentina, eferreyra@herrera.unt.edu.ar

²Sociedad Aguas del Tucumán, Av Sarmiento 991 (4000), phone: +54 381 430 7515, San Miguel de Tucumán, Tucumán, Argentina, achaile@herrera.unt.edu.ar

Keywords: *Validation, Chromatography, Organochlorinated pesticides, Vinasses.*

Palabras clave: *Validación, Cromatografía, Organoclorados, Vinazas.*

ABSTRACT

The Argentinian alcohol industry generates about 10 L of vinegar / L of ethanol as waste. (COD = 70000 ppm). Recent studies in vinasses report the presence of organochlorine pesticides (OC) belonging to the "Dirty Dozen", a group of nine pesticide substances potentially dangerous to the environment and human health, namely DDT, dieldrin, aldrin, endrin, chlordane, heptachlor, mirex, hexachlorohexanes, and toxaphene, the list is gradually increasing with other pesticide substances.

Currently the effluent, after evaporation, is used as fertilizer and source of potassium in impoverished soils. The objective of the work was to validate a method that reliably quantifies the content of POs in vinasses in order to prevent their environmental recycling. The technique includes extraction, cleaning, concentration and chromatography. The validation consisted of establishing performance parameters from the injection of extracts, to the extrapolation of the results to samples of vinasse through recovery evaluations. The reference method was EPA 8080. Tests were planned to evaluate detection limits (LD) and quantification, linearity, precision, accuracy and recovery. The results obtained showed LD between 0.83 ppb (heptachlor) and 4.6 ppb (methoxychloro); appropriate linearity in the working range (average correlation factor of 0.995); Statistically acceptable accuracy and precision.



Recovery trials with added vinegar were between 75% for DDT and 120% for heptachlor epoxide A. The validated chromatographic method offers a good alternative to be applied in real samples, with reliable results, always accompanying with recovery test.

Corresponding author: achaile@herrera.unt.edu.ar

RESUMEN

La industria alcoholera argentina genera como residuo alrededor de 10 L de vinaza/L de etanol. (DQO=70000 ppm). Estudios recientes en vinazas reportan la presencia de plaguicidas organoclorados (OC) pertenecientes a la "Docena Sucia", un grupo de nueve sustancias plaguicidas potencialmente peligrosas para el medio ambiente y la salud humana, a saber, DDT, dieldrina, aldrina, endrina, clordano, heptacloro, mírex, hexaclorohexanos, y toxafeno, la lista se incrementa paulatinamente con otras sustancias plaguicidas de cuidado.

Actualmente el efluente, previa evaporación, se emplea como abono y fuente de potasio en suelos empobrecidos. El objetivo del trabajo fue validar un método que permita cuantificar, en forma confiable, el contenido de los OC en vinazas a fin de prevenir su reciclado medio ambiental. La técnica comprende extracción, limpieza, concentración y cromatografía. La validación consistió en establecer parámetros de desempeño desde la inyección de extractos, hasta la extrapolación de los resultados a muestras de vinaza mediante evaluaciones de recuperación. El método de referencia fue EPA 8080. Se planificaron ensayos para evaluar límites de detección (LD) y cuantificación, linealidad, precisión, exactitud y recuperación. Los resultados obtenidos mostraron LD entre 0.83 ppb (heptacloro) y 4.6 ppb (metoxicloro); linealidad apropiada en el rango de trabajo (factor de correlación promedio de 0,995); exactitud y precisión estadísticamente aceptables. Los ensayos de recuperación con vinaza adicionada resultaron entre el 75% para DDT y un 120 % para el epóxido A de heptacloro. El método cromatográfico validado ofrece una buena alternativa para ser aplicado en muestras reales, con resultados confiables, acompañando siempre con ensayo de recuperación.

INTRODUCCIÓN

En Argentina, mediante la Ley 26.093 del año 2006, sobre Régimen de Regulación y Promoción para la Producción y Uso Sustentables de Biocombustibles, se estableció que todo combustible líquido caracterizado como gasoil o diésel-oil o nafta que se comercialice dentro del territorio nacional, deberá ser mezclado con la especie de biocombustible denominada "biodiesel" o "bioetanol", respectivamente, en un porcentaje del 5 % del producto final, como mínimo [1]. A partir de abril de 2016, el porcentaje de bioetanol por litro de nafta en la Argentina subió al 12 % y el Gobierno Nacional estableció, por decreto 543/2016, que este volumen extra de bioetanol provendrá exclusivamente de las empresas del sector sucro-alcoholero del noroeste argentino; es decir, bioetanol producido a partir de la fermentación de azúcares de la caña, que mezclado con gasolina produce un biocombustible de alto poder energético y con una importante reducción de las emisiones contaminantes.

Durante la producción de etanol se genera un residuo llamado vinaza, altamente contaminante, no sólo por sus características químicas sino también por el elevado volumen que se genera en el proceso, de 10 a 13 L de vinaza por cada litro de etanol producido [2].

La vinaza es un residuo líquido de color marrón, olor a miel final y sabor a malta, presenta pH ácido, altos valores materia orgánica (DQO de 50000 a 90000 mg/L) y gran contenido de sólidos en suspensión. Sus características físico-químicas varían con la procedencia del sustrato de fermentación, impacta negativamente en el ambiente, especialmente, al recurso hídrico, ya que disminuye la luminosidad de las aguas, la actividad fotosintética, y afecta el contenido de oxígeno disuelto [3,4]. En la actualidad, numerosos grupos de investigación y técnicos del sector vuelcan su experiencia en lograr una solución económica y factible para la disposición final de vinazas. Uno de los tratamientos propuesto para vinazas comprende la evaporación y posterior uso como abono y fuente de potasio en suelos empobrecidos [5-7].

Estudios recientes en vinazas, informaron la presencia de plaguicidas organoclorados en muestras extraídas a la salida de las columnas de destilación [8], por lo que se sospecha que el ingreso de estos compuestos se produce en la etapa de cultivo de la caña de azúcar en suelos con contenido de agroquímicos. En la provincia de Tucumán, existen evidencias de la presencia de trazas de plaguicidas organoclorados (OCs) en el ambiente. En agua superficial y en sedimentos se encontraron restos de lindano, metoxicloro, heptacloro y, en algunas muestras, DDT y los isómeros correspondientes [9,10]; estos mismos compuestos fueron detectados en la leche materna [11].



Los OCs fueron ampliamente usados en la práctica agropecuaria y en salud pública, a nivel mundial, desde la década de los 50. Su estructura química corresponde a la de los hidrocarburos clorados; son insolubles en agua, no volátiles y altamente solubles en disolventes orgánicos. Estas características les confiere alta estabilidad física y química que favorecen la persistencia en el ambiente y lenta biodegradabilidad. A causa de su alta lipofilia tienden a acumularse principalmente en el tejido celular subcutáneo, en el componente graso de la leche materna y en la sangre. Fueron considerados como un gran adelanto, pero con el tiempo se evidenciaron efectos perjudiciales para el medio ambiente y la salud, razón por la cual, desde 1970, la mayoría de los países prohibieron o restringieron su uso. A pesar de ello, hoy todavía persisten en el ambiente y en tejidos humanos, formando parte de la carga corporal tóxica que pasa a las futuras generaciones [12], lo que permitiría deducir que su aplicación en la agricultura se prolongó más allá de la década de los setenta.

Estudios realizados en plantaciones de trigo [13] comprobaron que plaguicidas organoclorados presentes en el aire pueden ser absorbidos por las hojas, y los que se encuentran en el suelo pueden movilizarse por transporte activo dentro de las plantas permitiendo su acumulación en las semillas.

La normativa vigente en Tucumán, Resolución N° 30 de la Secretaría de Medioambiente, fija los niveles de calidad de efluentes industriales y cloacales para la descarga en cursos de agua superficial, acequias, lagos, lagunas o absorción en suelo, para plaguicidas organoclorados, en 0.050 mg/L. Sin embargo, no se realizan controles de la presencia de estos compuestos en vinaza, más aún, teniendo en cuenta que uno de los usos propuestos para el efluente es la fertirrigación de caña de azúcar y otros cultivos [14]. Así, es importante disponer de un método que permita cuantificarlos en el efluente, a fin de prevenir que los contaminantes persistentes sean reciclados al ambiente.

El objetivo del presente trabajo es validar un método cromatográfico para detección y cuantificación de plaguicidas organoclorados en vinazas, evaluando parámetros de desempeño desde la inyección de extractos y extrapolando los resultados a muestras de vinazas mediante ensayos de recuperación.

EXPERIMENTAL

Reactivos

Se usaron los plaguicidas clorados (OCs): lindano (γ -1,2,3,4,5,6 hexaclorociclohexano), heptacloro (Heptacl) (1,4,5,6,7,8,8-heptacloro-3a,5,7,7a-tetrahidro-4,7-metanoindeno), epóxido de heptacloro (HeptEpx) A y B (1,4,5,6,7,8,8-heptacloro-2,2-epoxi-3a,4,7,7a-tetrahidro-4,7-endometanoindeno), aldrín (1,2,3,4,10,10-hexacloro-1,4,4a,5,8,8a-hexahidro-1,4-endo-exo-5,8-dimetanonaftaleno), DDE (2,2'-bis(p-clorofenil)-1,1-dicloroetileno), DDD (2,2'-bis(p-clorofenil)-1,1-dicloroetano), DDT (1,1,1-tricloro-2,2-bis(p-clorofenil)etano), clordano (1,2,4,5,7,8,8-octacloro-3a,4,7,7a-tetrahidro-4,7-metanoindano) y metoxicloro (mtx) (1,1,1-tricloro-2,2-bis(p-methoxifenil)etano).

Los patrones utilizados de OCs, tanto para calibración como para ensayos de validación, fueron materiales de referencia con certificados (MRC), donde se indica la trazabilidad al NIST (National Institute of Standards and Technology), marca AccuStandard, provistos en soluciones individuales en ampollas de vidrio de 1 mL.

Se emplearon metanol y hexano, Merck, grado Lichrosolv, para cromatografía gaseosa; sulfato de sodio anhidro, Merck, con grado de pureza para análisis, activado durante 16 horas, a 650 °C, florisil, Sigma, activado a 650 °C, apto para usar en análisis de residuos de pesticidas.

Para las corridas cromatográficas se usó nitrógeno ultrapuro (99.9995 %) como gas de arrastre y como gas auxiliar para el detector de captura de electrones.

Equipos

Se usó un cromatógrafo de gases Hewlett Packard HP6890, equipado con inyector split/splitless, columna capilar J&W DB-5MS y HP1, ambas de 30 m, y detector de captura de electrones (ECD). Se trabajó con inyector en modo Pulsed Splitless a 250 °C con pulso de presión de 10 psi (0,35 min) para mejorar la resolución de los isómeros del heptacloro y permitir la inyección de 2 μ L de muestra, sin que el volumen de vapor supere el del liner. La inyección de muestras se llevó a cabo con inyector automático, HP7673 Automatic Sampler, configurado para efectuar 2 lavados de jeringa con metanol y 2 con hexano, pre-inyección y post-inyección, 3 enjuagues con muestra y 3 bombeos, eliminando posibles burbujas, antes de tomar el volumen de inyección deseado. Se midió con jeringas marca Hamilton, con aguja fija, de 10 μ L. Las condiciones de trabajo se indican en la tabla 1.



La determinación cualitativa y cuantitativa se realizó por medio del software HP ChemStation, revisión A.04.01, provisto con el equipo, que compara tiempos de retención y áreas de picos correspondientes, de patrones y muestras. La preparación de patrones para calibración y para ensayos de validación, se llevó a cabo con material volumétrico Clase A, cristalería especial para la determinación de residuos de plaguicidas, micropipetas automáticas marca Brand (2-10 μL ; 5-50 μL ; 20-200 μL y 100-1000 μL).

Tabla 1: Condiciones de trabajo- Cromatógrafo Gaseoso HP6890

Inyector	Split/Splitless	Columna	Capilar J&W DB-5MS
Temperatura	250 °C	Longitud Nominal	30 m
Modo inyección	Pulsed Splitless	Diámetro nominal	320 μm
Presión	18.7 psi	Espesor del film	0.25 mm
Pulso de presión	30 psi	Modo	flujo constante
Tiempo del pulso	0.35 min	Flujo inicial	2 mL/minuto
Flujo de purga	0.3 mL/min	Presión inicial	18.7 psi
Flujo total	3.7 mL/min	Velocidad	46 cm/seg
Detector	Captura de electrones	Horno	Temperatura programada
Temperatura	350 °C	T inicial	90 °C (1 min)
Purga de ánodo	6 mL/min	Rampa 1	30 °C/min-180 °C 180 °C =1 min
Flujo auxiliar	60 mL/min	Rampa 2	3 °C/min-200 °C 200 °C =3 min
Inyector Automático		Rampa 3	20 °C/min-290 °C
Jeringa	10 μL	T Final	290 °C=2 min
Vol Inyección	2 μL		

Procedimientos

Para la calibración del equipo de cromatografía gaseosa se preparó una solución intermedia de acuerdo a la concentración de cada patrón MRC usando hexano como solvente. Luego, las soluciones de calibración se prepararon en 3 concentraciones, por dilución con hexano de 0.875, 1.250 y 2.500 mL de solución intermedia. Los volúmenes medidos de las soluciones y concentraciones resultantes se presentan en la tabla 2. Se inyectaron 2 μL de cada patrón empleando inyector automático y luego de las corridas cromatográficas se procedió a la calibración usando ChemStation para la elaboración de las curvas individuales.

Tabla 2: Plaguicidas organoclorados. Preparación de patrones de calibración a partir de la solución intermedia.

Plaguicida	MRC C _{MRC} ($\mu\text{g/mL}$)	Solución intermedia V ₁ = 50 mL		Patrones de calibración V ₂ = 25 mL		
		V _{OC} (μL)	C _{OC} ($\mu\text{g/L}$)	Nivel 1 ($\mu\text{g/L}$)	Nivel 2 ($\mu\text{g/L}$)	Nivel 3 ($\mu\text{g/L}$)
Lindano	1000	25.0	500	17.5	25.0	50.0
Heptacl	1000	5.0	100	3.5	5.0	10.0
Aldrin	1000	5.0	100	3.5	5.0	10.0
HeptEpx A	100	50.0	100	3.5	5.0	10.0
HeptEpx B	1000	5.0	100	3.5	5.0	10.0
DDE	100	200.0	400	14.0	20.0	40.0
Clordano	1000	12.5	250	8.7	12.5	25.0
DDD	1000	25.0	500	17.5	25.0	50.0
DDT	2000	12.5	500	17.5	25.0	50.0
Mtx	1000	25.0	500	17.5	25.0	50.0

C= concentración; MRC: Material de Referencia Certificado; V₁=Volumen de solución intermedia; V₂=Volumen de solución de calibración; V_{PO}= Volumen de cada patrón de plaguicida necesario para preparar la solución intermedia.

Protocolo de Validación



Validación, según ISO 17025, es la confirmación, mediante examen y suministro de evidencia objetiva, de que se cumplen los requisitos particulares para un uso específico previsto.

Se planificaron ensayos de validación de acuerdo a la guía Métodos Analíticos Adecuados a su Propósito. Guía de Laboratorio para la Validación de Métodos y Temas Relacionados [15].

El método de referencia responde a la denominación EPA 8080 (1996) Organochlorine Pesticides and Polychlorinated Biphenyl by Gas Chromatography, por lo que se realizó una validación parcial, sin abarcar la determinación de incertidumbre de la medición. Se comprobaron los siguientes parámetros: Límite de detección (LD), Límite de cuantificación (LQ), Linealidad, Exactitud, Precisión y Recuperación.

Límite de Detección y Límite de Cuantificación

El límite de detección se define como la menor concentración del analito en una muestra que puede detectarse, pero no necesariamente cuantificarse bajo las condiciones establecidas de la prueba [15]. En el presente trabajo, el Límite de Detección se estimó mediante el análisis de 10 muestras de blancos de hexano fortificados con la mezcla de OC (MRC), a baja concentración, preparados independientemente, medidos una vez cada uno, en condiciones de repetitividad. Se calcularon valor medio y desviación estándar con una hoja de cálculos Excel. Se calculó LD teniendo en cuenta los grados de libertad asociados N , número de mediciones, con la ecuación 1.

$$LD = 2. t_{(N-1), S} \quad \text{Ecuación 1}$$

Siendo t el valor del estadígrafo de Student, para $(N-1)$ mediciones, con un 99% de nivel confianza y S la desviación estándar.

El límite de cuantificación (LQ) es la concentración más baja del analito que puede ser determinada con un nivel aceptable de precisión de repetitividad y veracidad [15]. Se calculó como la concentración del analito correspondiente a la desviación estándar (S) de 10 réplicas a nivel bajo de concentración, multiplicada por un factor, K . El valor por defecto para K es 10 [17].

Linealidad

Linealidad es el intervalo de trabajo o intervalo lineal, se define como la habilidad del método para obtener resultados de la prueba proporcionales a la concentración del analito [15].

Para determinar la linealidad se prepararon soluciones de patrones MRC en 4 niveles de concentración y se analizaron por triplicado. Para cada plaguicida se graficó área de cada pico (eje y) contra la concentración del analito (eje x). Se calcularon los coeficientes de regresión y los residuos, estos últimos expresados por la diferencia entre el valor verdadero de área de pico y el valor predicho por la ecuación de la recta, para cada valor de concentración, Se verificó distribución aleatoria de los residuos, mediante la gráfica de éstos en función de concentración. La existencia de tendencias sistemáticas indica no-linealidad.

Exactitud

La exactitud expresa la cercanía de un resultado al valor verdadero. Normalmente se expresa en términos de veracidad y precisión. La veracidad es el sesgo y se refiere a la cercanía de la media de un conjunto de resultados producidos por el método respecto del valor real. La precisión indica qué tan cercanos están los resultados entre sí, y por lo general se expresa mediante la desviación estándar o el CV% (coeficiente de variación porcentual), que describe la dispersión de los resultados [15].

Para la estimación del sesgo se realizaron 7 mediciones de una solución de material de referencia certificado (MRC) marca AccuStandard, trazable al sistema internacional, en condiciones de precisión intermedia (mismo equipo, diferente operador, diferente día, soluciones preparadas independientemente). Se calculó el valor medio de las mediciones y la desviación estándar. Luego, se determinó sesgo y coeficiente de variación porcentual (CV %). Se realizó una prueba de significancia con el modelo t de Student. El valor de t se calculó con la ecuación 2.

Precisión



Precisión es la proximidad de concordancia entre los resultados de pruebas independientes obtenidos bajo condiciones estipuladas [18]. Las medidas de precisión más comunes son en condiciones de repetitividad y de precisión intermedia. La repetitividad representa la variabilidad esperada cuando un método se ejecuta por un solo analista, en el mismo equipo, en un período corto de tiempo; mientras que condiciones de precisión intermedia, se refiere a mediciones realizadas con diferentes analistas, en períodos de tiempo prolongados, en un mismo laboratorio. Se realizaron 7 inyecciones de alícuotas de MRC, en 3 niveles de concentración, en condiciones de repetitividad y de precisión intermedia. Se calculó la desviación estándar y coeficiente de variación porcentual (CV %). Se consideraron aceptables valores menores al 10 %. No fue posible el cálculo bajo condiciones de reproducibilidad, ya que era necesario requerir ensayos de colaboración con otros laboratorios.

$$t_{cal} = \frac{|X_{crm} - X_{metodo}|}{\sqrt{\left(\frac{U_{crm}}{k}\right)^2 + \left(\frac{s_1}{\sqrt{n}}\right)^2}} \quad \text{Ecuación 2}$$

donde:

X_{crm} : concentración del MRC

U_{crm} : Incertidumbre expandida del MRC, declarada en el certificado.

k : coeficiente de cobertura del MRC, declarada en el certificado.

n : número de veces que se analizó el MRC

X_{metodo} : promedio de las n mediciones

s_1 : desviación estándar de las n mediciones

Si el valor de t calculado es menor que el valor de tablas se puede asegurar que no existe diferencia significativa entre las mediciones.

Recuperación

Los ensayos de recuperación se utilizaron para evaluar la eficiencia de extracción de la preparación de muestras, la metodología consistió en preparar muestras adicionadas con OCs en 2 niveles de concentración. Se trabajó con vinaza provista por el Departamento de Industria Azucarera de la Universidad Nacional de Tucumán, con un contenido de sólidos de 7.4 Brix, que significa 7.4 g de sólidos disueltos en 100 g de solución. A dos porciones de 500 mL de vinaza se adicionaron 375 μ L y 750 μ L de solución intermedia, respectivamente para lograr las concentraciones indicadas en la tabla 7. Se procedió a agitar para homogeneizar y se dejó reposar 48 hs. El procesamiento de las muestras de vinaza adicionada y vinaza original (blanco de muestra), se llevó a cabo por triplicado (extracción, limpieza y concentración). A partir de 100 mL de vinaza se procedió a la extracción de los OCs con 3 porciones de 10 mL de hexano en un matraz de separación. Se mezclaron los extractos, se limpiaron usando florisil, y se secaron pasando por una columna de sulfato de sodio anhidro. Los extractos se evaporaron en corriente de nitrógeno hasta sequedad y se ajustó el volumen a 1.5 mL, con hexano. Se transfirió 1 mL de cada extracto a vial con cierre hermético, apto para inyector automático, desde donde se inyectaron 2 μ L al cromatógrafo gaseoso.

Se calculó el porcentaje de recuperación con la fórmula:

$$\%R = \frac{C_f - C_0}{C_A} \times 100 \quad \text{Ecuación 3}$$

C_f : concentración de analito en la muestra fortificada

C_0 : concentración de analito en la muestra sin fortificar (Blanco de muestra)

C_A : es la concentración del analito adicionado en la muestra fortificada (teórica)

Para evaluar la recuperación, se llevó a cabo la prueba de significancia de Student, se calculó el valor de t , con la ecuación 4 y se comparó con el valor crítico de t , extraído de tablas, para $(n-1)$ grados de libertad y 95 % de confianza. Si el valor de t calculado es menor que el t crítico, se aceptan los valores de recuperación obtenidos ya que no existen diferencias significativas.



$$t_{\text{calc}} = \frac{(100 - \%R)}{DS \cdot \sqrt{n}} \quad \text{Ecuación 4}$$

Donde t_{calc} = t observado o calculado; R= Recuperación; DS= Desviación estándar de las lecturas del porcentaje de recuperación; n= N° de lecturas o valores observados.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Límite de Detección y Límite de Cuantificación

En la Tabla 3 se muestran resultados promedios de 10 inyecciones de una solución mezcla de patrones MRC, a baja concentración, medidos una vez, en condiciones de repetitividad.

Se calculó el valor de Desviación Estándar (S), el Coeficiente de Variación Porcentual, (CV%), el Límite de Detección y Límite de Cuantificación, para cada OC.

La desviación estándar calculada, asociada a las 10 mediciones, es igual a la corregida, dado que cada medición se realizó 1 vez (n=1 réplica).

Para el cálculo del LD se usó el factor 3, considerando que con el propósito de la validación, es suficiente proveer un valor aproximado del nivel en el cual la detección del analito se torna problemática. Esto se fundamenta en que el valor de t de Student de una cola, para infinitas mediciones ($\alpha=0.05$) es 1.63, multiplicado por 2 y redondeado por defecto a una cifra significativa, se aproxima al valor usado.

El LC, calculado como 10 veces el valor de la desviación estándar, se corresponde, aproximadamente, a una desviación estándar relativa del 10 %.

En cuanto a las muestras usadas para el cálculo de LD y LC, la bibliografía aconseja usar blancos, pero esto se aplica en métodos en los que se obtiene una señal medible para el mismo. En cromatografía, se busca detectar un pico por encima del ruido del instrumento, por lo que se aconseja usar muestras con nivel de concentración baja, por lo general, blancos fortificados.

Extrapolando los resultados a muestras de vinazas, de acuerdo al procedimiento de extracción indicado anteriormente (extracción líquido-líquido, 100 mL de vinaza y extractos de 1.5 mL), se podrían estimar los LD y LQ en vinazas. Esto sería las cantidades de PO en 100 mL de vinazas que luego del proceso de extracción, clean up y secado, se redissuelve en 1.5 mL de hexano, dando una concentración igual al LD del extracto. En la misma tabla se indican los resultados obtenidos por López-Avila et al [19], para Límite de Detección de estos compuestos en agua. Puede observarse que, excepto lindano y clordano, los valores de LD estimados en el presente estudio se encuentran por debajo de los informados en la referencia.

Además, teniendo en cuenta que el valor máximo permitido por la normativa vigente (Resol 30 SEMA) para Plaguicidas Organoclorados es de 50 $\mu\text{g/L}$, la suma de los valores de LD encontrados (0,35 $\mu\text{g/L}$) es más de cien veces menor, por lo que se considera que los Límites de Detección estimados son adecuados para el método.

Linealidad

En la Figura 1 se muestran las gráficas de área de pico en función de concentración, para cada plaguicida.

La inspección visual de las gráficas permite observar el comportamiento lineal del método, avalado por los valores de coeficientes de correlación (R) que se encontraron entre 0.99994 y 0.99830.

Algunas guías técnicas [20] sostienen que, para una curva de calibración o trabajo, es recomendable que el coeficiente de correlación obtenido sea mayor o igual a 0.999, para el caso de trazas se admite un valor igual o mayor que 0.99.

En la Figura 1 se observa, además, para cada plaguicida, la ecuación de la recta que correlaciona los datos de área y concentración. Con ésta se calcularon las áreas para cada concentración y los residuos, es decir la diferencia entre el valor de área medido y el calculado con la ecuación de la recta.

Se graficaron los residuos en función de concentración, para cada PO.

Se observó distribución aleatoria alrededor del eje de las abscisas, confirmando la linealidad, en el rango de trabajo. En la Figura 2 se muestran ejemplos de la distribución de los residuos, para lindano, heptacloro epóxido A, DDE y metoxicloro.

Tabla 3: Resultados de ensayos para cálculo de límite de detección y límite de cuantificación (n=10)



	Solución patrón (µg/L)	Valor Medio (µg/L)	Desviación Estándar (µg/L)	CV%	LD extracto (µg/L)	LQ extracto (µg/L)	LD en vinaza (µg/L)	LQ en vinaza (µg/L)	LD Referencia [19] (µg/L)
Lindano	17.50	16.9	0.94	2.9	2.82	9.40	0.042	0.14	0,02
Heptacl	3.50	3.2	0.27	11.8	0.82	2.73	0.012	0.04	0,04
Aldrin	3.50	3.5	0.29	5.6	1.18	2.93	0.018	0.06	0,03
HeptEpx A	3.50	3.4	0.28	2.3	0.83	2.77	0.012	0.04	0,03
HeptEpx B	3.50	3.3	0.21	6.9	0.62	2.07	0.009	0.03	0,03
DDE	14.00	13.7	1.17	2.0	3.52	11.72	0.053	0.18	0,06
Clordano	8.75	8.6	1.52	2.0	4.55	15.18	0.068	0.23	0,04
DDD	17.50	16.8	0.64	4.1	1.92	6.41	0.029	0.09	0,05
DDT	17.50	16.9	0.83	3.5	2.48	8.27	0.037	0.12	0,08
Mtx	17.50	16.9	1.55	3.5	4.64	15.46	0.070	0.23	0,09

Exactitud y Precisión

Se usó, para cada OC, un MRC marca AccuStandard, cuyo certificado provisto por el fabricante, indica una incertidumbre expandida U igual al 1% del valor nominal, con un factor de cobertura, k, igual a 2. En la Tabla 4, se observa el sesgo obtenido para cada plaguicida. En este caso se midió el sesgo del instrumento, ya que se trabajó con un MRC en hexano, con inyecciones directas.

En la prueba de significancia, el cálculo de t resultó menor que el t crítico, obtenido de tablas para $\alpha = 0,01$ y 6 grados de libertad, igual a 3,143. Se consideró que los valores obtenidos por el método para concentración de cada OC no son significativamente diferentes a la del MRC, es decir el sesgo es aceptable.

Tabla 4: Comprobación de sesgo, en 3 rangos de concentraciones (µg/L) y prueba de significancia

	MRC	Sesgo	t	MRC	Sesgo	t	MRC	Sesgo	t
Lindano	17.50±0.18	0.51	1.42	37.50±0.38	2.70	2.07	250±2	8.63	2.53
Heptacl	3.50±0.03	0.31	3.03	7.50±0.07	0.49	2.09	50±1	4.20	2.76
Aldrin	3.50±0.03	0.20	1.33	7.50±0.07	0.57	2.83	50±1	4.80	2.92
HeptEpx A	3.50±0.03	0.08	0.78	7.50±0.07	0.72	2.99	50±1	4.30	2.44
HeptEpx B	3.50 ±0.03	0.24	3.03	7.50±0.07	0.44	2.73	50±1	1.40	1.15
DDE	14.00±0.15	0.28	0.62	30.00±0.30	1.40	1.34	200±2	7.25	1.71
Clordano	8.75±0.08	0.18	0.31	18.75±0.20	0.73	1.10	125±1	3.35	0.99
DDD	17.50±0.18	0.72	2.82	37.50±0.38	3.09	2.79	250±2	10.31	2.51
DDT	17.50±0.18	0.61	1.91	37.50±0.38	3.55	2.55	250±2	6.20	1.41
Mtx	17.50±0.18	0.62	1.06	37.50±0.38	2.26	1.58	250±2	8.40	2.27

MRC: Material de Referencia Certificado

t: estadígrafo calculado para el Test de Student, con la Ecuación 2.

Los valores de desviación estándar porcentual, llamado también coeficiente de variación, para los ensayos de repetitividad y precisión intermedia, permitieron inferir que el método es exacto en todo el rango lineal, dado que fueron siempre menores al 10% (Tabla 5 y Tabla 6).

Tabla 5: Desviación estándar y Coeficiente de Variación Porcentual para comprobación de precisión de repetitividad (n=7), en 3 niveles de concentración (µg/L).



	Concentración baja			Concentración media			Concentración alta		
	VM ₁	DS ₁	CV ₁ %	VM ₂	DS ₂	CV ₂ %	VM ₃	DS ₃	CV ₃ %
Lindano	16.99	0.94	5.5	34.80	3.46	9.9	241.37	8.50	3.5
Heptacl	3.10	0.18	5.8	7.12	0.65	9.1	54.10	4.50	8.3
Aldrin	3.54	0.21	5.9	7.80	0.38	4.9	55.35	2.20	4.0
HeptEpx A	3.32	0.28	8.3	7.75	0.40	5.2	52.48	3.55	6.8
HeptEpx B	3.30	0.10	3.0	8.00	0.51	6.4	54.30	4.20	7.7
DDE	13.83	0.54	3.9	28.85	4.20	14.6	195.35	10.20	5.2
Clordano	8.61	0.42	4.9	18.22	1.65	9.1	127.20	7.65	6.0
DDD	16.85	0.56	3.3	39.75	2.08	5.2	258.60	10.50	4.1
DDT	17.38	0.92	5.3	38.90	1.80	4.6	260.15	9.60	3.7
Mtx	17.16	1.43	8.3	34.80	1.65	4.7	243.50	8.12	3.3

VM: Valor Medio; DS: Desviación estándar; CV%: Coeficiente de variación porcentual

Tabla 6: Cálculo de precisión en condiciones de precisión intermedia (n=10), medida en tres rangos de concentración (µg/L)

	MRC ₁	DS	CV%	MRC ₂	DS	CV%	MRC ₃	DS	CV%
Lindano	17.50±0.18	0.94	5.5	37.50±0.38	3.46	9.9	250±2	8.50	3.5
Heptacl	3.50±0.03	0.27	8.6	7.50±0.07	0.62	7.8	50±1	4.02	7.4
Aldrin	3.50±0.03	0.39	10.7	7.50±0.07	0.53	6.6	50±1	4.36	8.0
HeptEpx A	3.50±0.03	0.28	8.1	7.50±0.07	0.64	7.8	50±1	4.68	8.6
HeptEpx B	3.50 ±0.03	0.21	6.4	7.50±0.07	0.42	5.9	50±1	3.20	6.6
DDE	14.00±0.15	1.17	8.5	30.00±0.30	2.77	9.7	200±2	11.03	5.7
Clordano	8.75±0.08	1.52	17.7	18.75±0.20	1.76	9.8	125±1	8.96	7.0
DDD	17.50±0.18	0.64	3.8	37.50±0.38	2.93	7.2	250±2	10.51	4.0
DDT	17.50±0.18	0.83	4.9	37.50±0.38	3.70	9.0	250±2	11.35	4.7
Mtx	17.50±0.18	1.55	9.2	37.50±0.38	3.81	10.8	250±2	9.35	3.9

MRC: Material de Referencia Certificado; DS: Desviación estándar; CV%: Coeficiente de variación porcentual

Recuperación

En la figura 3 puede observarse el cromatograma correspondiente a la vinaza a la que se adicionó la mezcla de plaguicidas para obtener la muestra de mayor concentración. Se observa deriva en la línea de base al final del cromatograma, debido a las características de la matriz multicomponente, por lo que se realizó integración manual, siguiendo la línea de base.

En la tabla 7, se presentan los resultados de los ensayos de recuperación, los valores medios de concentración de las muestras A y B, fortificadas con diferentes cantidades de solución mezcla de plaguicidas, y del blanco de muestra.

El blanco de muestra corresponde a vinaza real, sin el agregado de plaguicidas, procesada como indica el método. Nótese que las vinazas fueron fortificadas con PO de manera que los extractos contengan concentraciones intermedias en el rango de las curvas de calibración, equivalentes a 25 y 50 µg/L, para lindano, DDD, DDT y metoxicloro; 5 y 10 µg/L para aldrín, heptacloro y sus epóxidos; 20 y 40 µg/L para DDE y 12.5 y 25 µg/L para clordano.

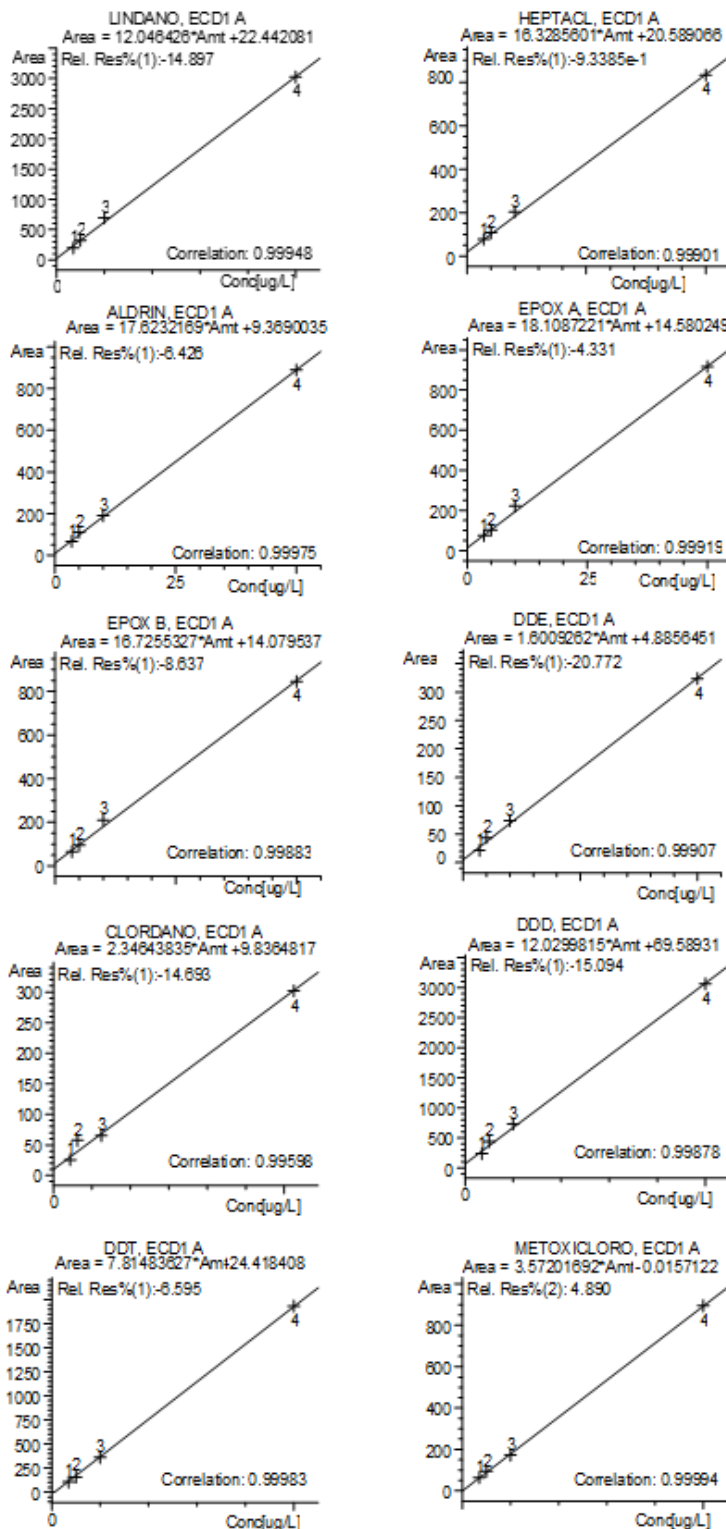


Figura 1: Linealidad para cada OC con factor de correlación

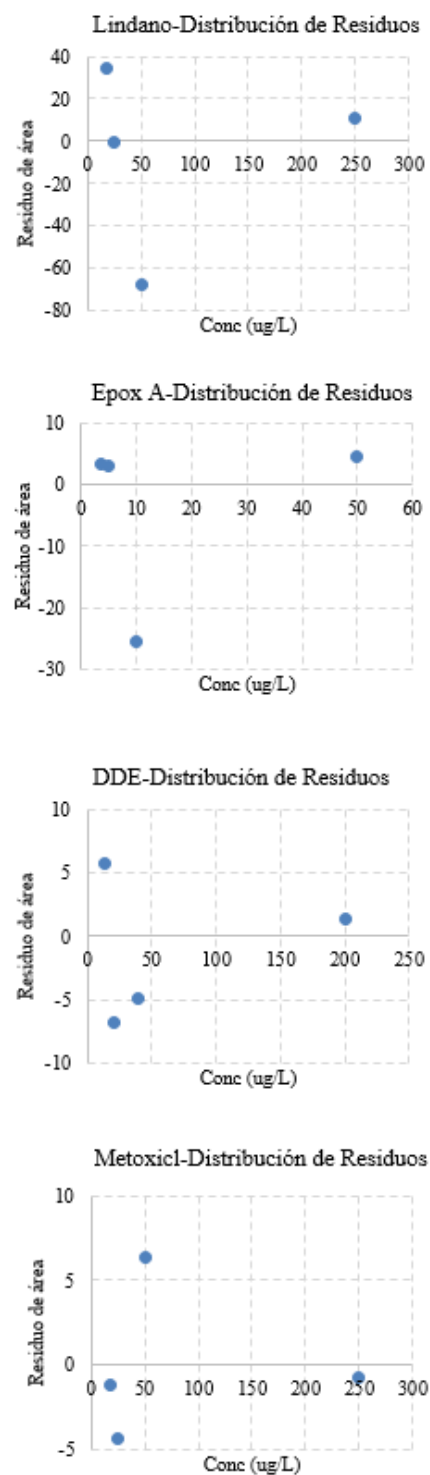


Figura 2. Distribución de residuos

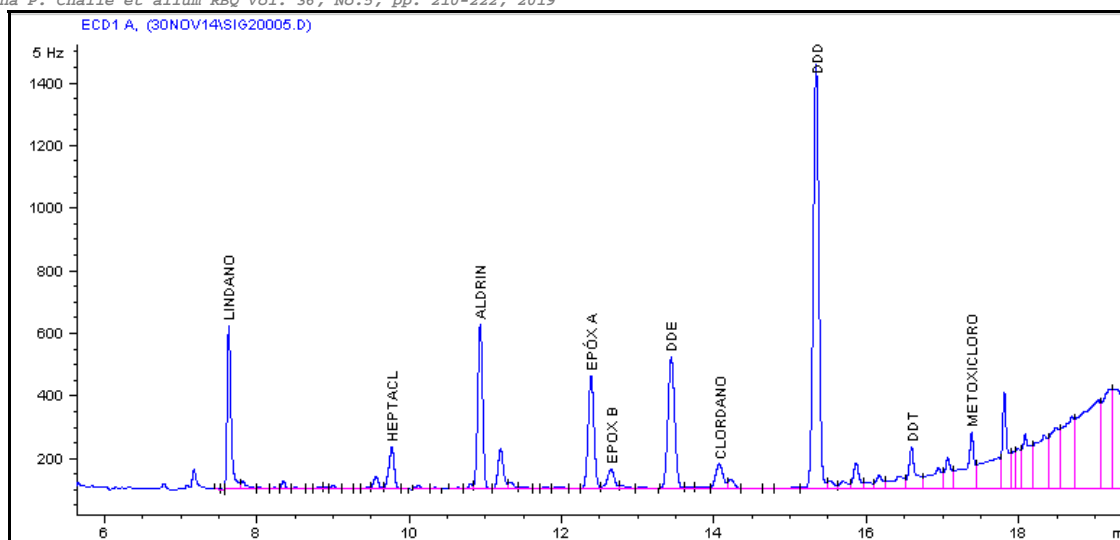


Figura 3: Cromatograma de muestra de vinaza adicionada con OCs, correspondiente a la muestra b, de mayor concentración.

Tabla 7: Ensayos de recuperación, con vinazas adicionadas en dos concentraciones

	M _A (µg/L)	M _B (µg/L)	V _M A (µg/L)	V _M B (µg/L)	Blanco de M (µg/L)	Prom Rec % A	Prom Rec % B
Lindano	0.37	0.75	0.393	0.681	0.08	83.3	80.2
Heptacl	0.07	0.15	0.068	0.129	0.01	77.6	79.1
Aldrin	0.07	0.15	0.060	0.128	ND	80.3	85.3
Hept Epx A	0.07	0.15	0.076	0.180	ND	101.6	120.0
Hept Epx B	0.07	0.15	0.064	0.171	ND	98.1	114.3
DDE	0.30	0.60	0.233	0.490	ND	102.8	81.7
Clordano	0.19	0.37	0.160	0.310	ND	82.8	82.7
DDD	0.37	0.75	0.325	0.600	ND	97.3	80.0
DDT	0.37	0.75	0.398	0.560	ND	105.9	74.7
Mtx	0.37	0.75	0.404	0.850	ND	107.8	113.3

M_A y M_B = concentración teórica de OCs en la Muestra A y B de vinaza, respectivamente.
 V_MA y V_MB = Valor medio de concentración medida en la Muestra A y B, respectivamente.
 Blanco de M = Blanco de muestra, concentración de OCs en la vinaza original
 Prom Rec % A = Promedio de Recuperación Porcentual en la Muestra A
 Prom Rec % B = Promedio de Recuperación Porcentual en la Muestra B

Para cada muestra, se calculó el valor promedio de recuperación % y la desviación estándar porcentual, cuyo valor resultó menor al 10%, excepto para Heptacloro, con un 13%. Se llevó a cabo la prueba de significancia con el cálculo del estadígrafo t, resultando menor que el t crítico (4.303) para n-1 grados de libertad y 95 % de confianza (p=0.05). Esto significa que los valores de recuperación obtenidos a las dos concentraciones no son estadísticamente diferentes de los valores teóricos.

Los valores promedios de Recuperación estuvieron entre 77% (para Heptacloro) y 108% (Metoxicloro) en el caso de concentraciones bajas; y entre 79% (Heptacloro) y 120 % (Heptacloro Epóxido A) para la concentración más elevada

CONCLUSIONES



Se validó un método cromatográfico para la determinación de plaguicidas organoclorados pertenecientes a la Docena Sucia, en muestras de vinazas, evaluando los parámetros Límite de Detección, Límite de Cuantificación, Linealidad, Exactitud y Precisión, en el sistema cromatográfico considerando los extractos, sin incluir etapas de pretratamiento de muestras, y se extrapolaron estos resultados con ensayos de recuperación.

Los límites de detección y límite de cuantificación calculados en los extractos son apropiados y se encuentran dentro de los criterios de aceptación, ya que una muestra de vinaza debería tener contenidos de OC casi 100 veces menor que el límite máximo permitido para que el extracto presente concentraciones de plaguicidas igual a los LD.

Se ha demostrado linealidad en el rango de trabajo para cada plaguicida y las desviaciones de repetitividad y reproducibilidad fueron siempre menores que el 10%. El sesgo fue aceptable en todos los casos, ya que se demostró estadísticamente que no existen diferencias significativas entre el valor medido por el método y el valor del material de referencia certificado.

El método constituye una herramienta sencilla de aplicación en muestras de efluentes de características diferentes que involucre distintos pretratamientos dependiendo de la naturaleza de las mismas, siempre que se acompañe con ensayos de recuperación con una muestra de control, fijando como límite de aceptación entre 80% y 120 %

De esta manera se presenta una buena alternativa para ser aplicada en controles de vinazas que serán destinadas a distintos usos, con o sin tratamiento previo, y conocer el destino final de los residuos de plaguicidas organoclorados, prestando especial atención en evitar que sean reciclados al ambiente.

REFERENCIAS

1. MAIZAR, **2016**, Disertación de Claudio A. Molina. Cámara de Senadores de la Nación Comisión de Minería, Energía y Combustibles. C.A.B.A., Argentina, 4 de octubre de 2016 Biocombustibles en Argentina Pasado, Presente y Futuro.
2. De la Cruz, S.R. **2002**. Aplicaciones del Análisis Complejo de procesos en el estudio de alternativas de integración de un Complejo Agroindustrial Azucarero con una planta de alcohol. Tesis de la Universidad Central de Las Villas, Santa Clara, Cuba.
3. Bermúdez, R., Hoyos, J, Rodríguez, S. **2000**. Evaluación de la disminución de la carga contaminante de la vinaza de destilería por ensayo anaeróbico, *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 16, 103-107.
4. Korndorfer, G. **2009**. Impacto Ambiental del Uso de la Vinaza en la Agricultura y su Influencia en las Características Químicas y Físicas del Suelo, *Tecnicaña. Memorias Seminario internacional de Fertilización y Nutrición de la Caña de Azúcar, Colombia*. 115-122
5. Penatti, C.P., De Araújo, J.V., Donzelli, J.L., De Souza, A.S., Forti, J.A., Ribeiro, R. **2005**. Vinasse: A liquid fertiliser, *Proc. XXV Cong. Int. Soc. Sugar Cane Technol.*, 1, 403-411.
6. García, O.A., Rojas, C.A. **2006**. Posibilidades de Uso de la Vinaza en la Agricultura de Acuerdo con su Modo de Acción en los Suelos. *Tecnicaña*, 10 (17), 3-13. http://www.tecnica.org/pdf/2006/tec_v10_no17_2006_p3-13.pdf. Acces Date: 14/03/2019
7. Chanfón Curbelo, J.M., Lorenzo Acosta, Y. **2014**. Alternativas de Tratamiento de las Vinazas de Destilería. Experiencias Nacionales e Internacionales, *Revista Centro Azúcar*, 41 (2), 56-67. <http://centrozucar.uclv.edu.cu/media/articulos/PDF/2014/2/6.pdf>. Acces Date: 16/03/2019
8. Chaile, A.P., Ferreyra de Ruiz Holgado, M.M.E. **2014**. Detection Of Pesticides In Multicomponent Mixtures, Alcohol Bioindustry Residues, *Biocell* 38 (2), A1-A124.
9. Tracanna, B.C., Martínez De Marco, S.N., Amoroso, M.J., Romero, N., Chaile P., Mangeaud, A. **2006**. Physico-chemical and biological variability in the Dr. C. Gelsi reservoir (NW Argentine): A Temporal and spatial approach, *Limnética*, 25 (3), 787-808.
10. Chaile, A.P., Romero, N., Ferreyra, M.M.E. Dinámica del Comportamiento de Plaguicidas Organoclorados en agua de embalse, EAE Editorial Academia Española, **2016**, Riga, Letonia, 145.
11. Romero, N., Chaile, A.P., du Plessis, M. Plaguicidas Organoclorados en Leche Materna. Niveles de Contaminantes Persistentes en Humanos. Tucumán. EAE Editorial Academia Española, **2012**, Riga, Letonia, 90.
12. Del Puerto Rodríguez, A.M, Suárez Tamayo, S., Palacio Estrada, D. **2014**. Efectos de los plaguicidas sobre el ambiente y la salud. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*, 52(3),372-387. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S156-30032014000300010&lng=es&tng=es. Access date: 15/10/2018
13. Waliszewski, S., Infanzón, R. **2011**. Diferencias en Concentración de Plaguicidas Organoclorados Persistentes en Suelo, Paja y Granos de Trigo. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 19 (1),5-11. www.revistascca.unam.mx/rica/index.php/rica/article/view/25177/23669. Access date: 15/10/2018.
14. González, J.A., Buedo, S.E., Prado, F. **2019**. La Fertirrigación con Vinaza de Caña de Azúcar Limita la Tasa Fotosintética de Soja. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*. <https://botanicaargentina.org.ar/la-fertirrigacion-con-vinaza-de-cana-de-azucar-limita-la-tasa-fotosintetica-de-soja-glycine-max-leguminosae>. Access date: 07/07/2019
15. CENAM, **2005**. Métodos Analíticos Adecuados a su Propósito-Guía de Laboratorio para la Validación de Métodos y Temas Relacionados. Centro Nacional de Metrología, Publicación Técnica CNM-MRD-PT-030, México, 69.
16. Eurolab España, **2016**. Guía Eurachem: La adecuación al uso de los métodos analíticos-Una Guía de laboratorio para la validación de métodos y temas relacionados. <http://www.eurachem.org>. Access date: 15/05/2018
17. CENAM, **2008**. Guía técnica sobre trazabilidad e incertidumbre en las mediciones analíticas que emplean las técnicas de cromatografía de gases (CG) y cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR). Centro Nacional de Metrología, México, 70.



18. JCGM, **2008**. Vocabulario Internacional de Metrología-Conceptos Fundamentales y Generales y Términos Asociados (VIM). Traducida al español por el Comité Conjunto para las Guías en Metrología, versión previa ISO/IEC Guide 99:2007, ISO Geneva, 88.
19. Lopez-Avila, V., Schoen, S., Milanes, J. **2004**, Single-Laboratory Evaluation of Method 8080 -Organochlorine Pesticides And PCBs (Polychlorinated Biphenyls), U.S. Environmental Protection Agency, Washington, D.C., EPA/600/4-87/022.
20. Instituto de Salud Pública, **2010**. Validación de Métodos y Determinación de la Incertidumbre de la Medición: Aspectos Generales sobre la Validación de Métodos. Guía Técnica N° 1, Chile, 70.