

Development of a rapid method for the quantification of methamidophos and chlorpyrifos by Thin Layer Chromatography in soils using image processing

Elvis Gilmar Gonzales-Condori MSc.¹, Juan Carlos Reynoso-Espinoza Q.F.², Ricardo Yucra-Condori, MSc.³, J.

Kenedy Ramirez, MSc.⁴, Celia Choquenaira-Quispe MSc.⁴

¹Universidad Tecnológica del Perú, Perú, elvgonzales@gmail.com

²Universidad Privada Autónoma del Sur, Perú, jcrey_espinoza@hotmail.com

³Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa, Perú, hyucrac@unsa.edu.pe

⁴Universidad Católica de Santa María, Perú, qfcelia@gmail.com, juan.ramirezch@ucsm.edu.pe

Abstract— The objective of this research was to develop a rapid method to identify and quantify chlorpyrifos and methamidophos in soils by Thin Layer Chromatography. A mobile phase of chloroform: acetone (80:20) was used for methamidophos and for chlorpyrifos a mixture of chloroform: cyclohexane (60:40) was used as mobile phase. The developer consisted of a 0.12 M ethanolic solution of silver nitrate. The stains were processed using "Image J" software. The results show retention factors "R_f" of 0.19 and 0.82 for methamidophos and chlorpyrifos respectively. Both methods for the determination of chlorpyrifos and methamidophos are linear with coefficients of determination R² greater than 0.99, precise with RSD less than 15 % and accurate with %R close to 100 %. The analysis of agricultural soil samples of Garlic and Onion showed the presence of chlorpyrifos with concentrations of 0.067 and 0.047 mg/kg respectively. Also, methamidophos was found in alfalfa agricultural soils with a concentration of 0.011 mg/kg. With the results found, it is demonstrated that image processing with "Image J" for the analysis of stains on silica gel plates developed with silver nitrate in the analysis of organophosphates can be taken into account for demonstrative studies for educational purposes and routine tests in toxicology and environment.

Keywords— Soils, Chlorpyrifos, Methamidophos, Thin Layer Chromatography, Image Processing.

Digital Object Identifier (DOI):

<http://dx.doi.org/10.18687/LACCEI2022.1.1.781>

ISBN: 978-628-95207-0-5 ISSN: 2414-6390

Desarrollo de un método rápido para la cuantificación de metamidofos y clorpirifós por cromatografía en capa fina en suelos mediante procesamiento de imágenes

Elvis Gilmar Gonzales-Condori MSc.¹, Juan Carlos Reynoso-Espinoza Q.F.², Ricardo Yucra-Condori, MSc.³, J. Kenedy Ramirez, MSc.⁴, Celia Choquenaira-Quispe MSc.⁴

¹Universidad Tecnológica del Perú, Perú, elv.gonzalesc@gmail.com

²Universidad Privada Autónoma del Sur, Perú, jcrey_espinoza@hotmail.com

³Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa, Perú, hyucrac@unsa.edu.pe

⁴Universidad Católica de Santa María, Perú, qfcelia@gmail.com, juan.ramirezch@ucsm.edu.pe

Resumen— La presente investigación tuvo por objetivo desarrollar un método rápido para identificar y cuantificar clorpirifós y metamidofos en suelos por Cromatografía en Capa Fina. Se utilizó como fase móvil de cloroformo: acetona (80:20) para metamidofos y para clorpirifós se usó como fase móvil una mezcla de cloroformo: ciclohexano (60:40). El revelador consistió en una solución etanólica de nitrato de plata 0.12 M. Las manchas fueron procesadas utilizando el software “Image J”. Los resultados muestran factores de retención “Rf” de 0.19 y 0.82 para metamidofos y clorpirifós respectivamente. Ambos métodos para la determinación de clorpirifós y metamidofos son lineales con coeficientes de determinación R² mayores de 0.99, preciso con DER menores del 15 % y exactos con %R cercanos al 100 %. El análisis de muestras de suelos agrícolas de Ajo y Cebolla demostraron la presencia de clorpirifos con concentraciones de 0.067 y 0.047 mg/kg respectivamente. También, se encontró metamidofos en suelos agrícolas de alfalfa con una concentración de 0.011 mg/kg. Con los resultados encontrados se demuestra que el procesamiento de imágenes con “Image J” para el análisis de las manchas en placas de sílica gel reveladas con nitrato de plata en el análisis de organofosforados pueden ser tomadas en cuenta para realizar estudios demostrativos con fines educativos y ensayos de rutina en toxicología y medio ambiente.

Palabras clave— Suelos, Clorpirifós, Metamidofos, Cromatografía en Capa Fina, Tratamiento de Imágenes.

Abstract— The objective of this research was to develop a rapid method to identify and quantify chlorpyrifos and methamidophos in soils by Thin Layer Chromatography. A mobile phase of chloroform: acetone (80:20) was used for methamidophos and for chlorpyrifos a mixture of chloroform: cyclohexane (60:40) was used as mobile phase. The developer consisted of a 0.12 M ethanolic solution of silver nitrate. The stains were processed using “Image J” software. The results show retention factors “Rf” of 1.19 and 0.82 for methamidophos and chlorpyrifos respectively. Both methods for the determination of chlorpyrifos and methamidophos are linear with coefficients of determination R² greater than 0.99, precise with RSD less than 15 % and accurate with %R close to 100 %. The analysis of agricultural soil samples of Garlic and Onion showed the presence of chlorpyrifos with concentrations of 0.067 and 0.047 mg/kg respectively. Also,

methamidophos was found in alfalfa agricultural soils with a concentration of 0.011 mg/kg. With the results found, it is demonstrated that image processing with “Image J” for the analysis of stains on silica gel plates developed with silver nitrate in the analysis of organophosphates can be taken into account for demonstrative studies for educational purposes and routine tests in toxicology and environment.

Keywords-- Soils, Chlorpyrifos, Methamidophos, Thin Layer Chromatography, Image Processing.

I. INTRODUCCIÓN

Los plaguicidas son estructuras orgánicas que son aplicados para el control de plagas frente a las que resultan efectivas, sin embargo, al no ser selectivas pueden perjudicar a especies no objetivo [1], [2].

La determinación de los plaguicidas requiere preparación de la muestra como su homogeneización, extracción y limpieza y los métodos cromatográficos tradicionales empleados son la Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC), electroforesis capilar[3], cromatografía de gases y espectrometría de masas[4]. Estos métodos, si bien es cierto poseen una eficacia comprobada para el análisis de estos tóxicos en el medio ambiente, pero conllevan a ciertas limitaciones, como la complejidad, la larga preparación de las muestras y la necesidad de disponer de aparatos caros y de personas capacitadas para su manejo[3]. Por esto, una alternativa para la identificación de sustancia orgánicas es la Cromatografía En Capa Fina (CCF) y se caracteriza por ser un procedimiento sencillo que puede llevarse a cabo con éxito sin instrumentación sofisticada[5]. A esto se suma la aplicación de métodos de densitometría para el análisis de las manchas en las placas cromatográficas[6]. Sin embargo, esto también puede traer consigo costos adicionales, frente a esto, hoy en día se han desarrollado diversas alternativas para determinar diversos compuestos orgánicos por CCF mediante análisis o procesamiento de imágenes [7], [8]. Una alternativa que elimina costos adicionales es el software “Image J” que presenta aplicaciones en el tratamiento o procesamiento de imágenes en áreas de la salud[9]–[13] y fitoquímica[14], por

Digital Object Identifier (DOI):

<http://dx.doi.org/10.18687/LACCEI2022.1.1.781>

ISBN: 978-628-95207-0-5 ISSN: 2414-6390

ello en la presente investigación se buscó desarrollar un método rápido para la cuantificación de metamidofos y clorpirifós por cromatografía en capa fina en suelos mediante procesamiento de imágenes utilizando el software “Image J

I. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Reactivos y estándares

Todos los reactivos como acetonitrilo grado HPLC, acetona p.a., ciclohexano p.a., etanol absoluto, nitrato de plata y cloroformo fueron obtenidos de Merck. El agua ultrapura fue obtenida del purificador de agua Simplicity System Merck Millipore. Los estándares de clorpirifós (Dursban – Supelco) y metamidofos (Fluka) fueron obtenidos de Sigma Aldrich. Las estructuras químicas de ambos pesticidas se presentan en las Figuras 3 y 4.

B. Fase estacionaria

La fase estacionaria consistió en placas de sílica gel con indicador de fluorescencia F_{234} que fueron obtenidas de Merck. Se prepararon placas de 10 cm de altura (Figura 1) las cuales fueron marcadas divisiones de 1 cm de distancia de los extremos en la parte inferior (área de sembrado) y superior (límite de recorrido del solvente).

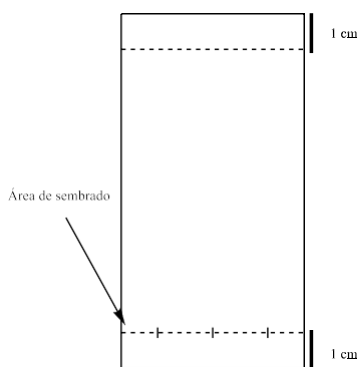


Fig. 1. Acondicionamiento de la fase estacionaria.

C. Fase móvil

La fase móvil para la identificación de clorpirifós consistió en una mezcla de cloroformo: ciclohexano (60:40) y para metamidofos una mezcla de cloroformo: acetona (80:20). Las fases móviles preparadas se llevaron a la cuba cromatográfica para la saturación del medio con la fase móvil 15 minutos antes de colocar las placas de sílica gel.

D. Sembrado en placas

El sembrado de los pesticidas se realizó utilizando una micro jeringa con la que se midieron cantidades adecuadas de las soluciones con clorpirifós y metamidofos. El sembrado fue por aplicación directa en un punto del área de sembrado

(Figura 1) y se esperó a que se evapore el solvente. Una vez secas se llevaron las placas a una cuba cromatográfica para poner en contacto con la fase móvil y se esperó hasta que el recorrido llegue a la línea límite (1 cm antes del final de la placa), dicho proceso demoró entre 20 a 25 minutos. Luego se retiraron las placas y se secaron a temperatura ambiente.

E. Revelado de placas y procesamiento de imágenes en “Image J”

Las placas se revelaron empleando una solución de $AgNO_3$ 0.12 M en etanol absoluto. El revelado fue por nebulización directa sobre la placa. Posteriormente, se secaron a temperatura ambiente. Una vez secas se llevó a una estufa a $130\text{ }^\circ\text{C}$ hasta el desarrollo de color.

El procesamiento de imágenes se realizó en el software “Image J” el cual consiste en escanear la placa revelada y procesarla mediante ajuste de color con el comando “Brightness/contrast”, seguido de “Plot/Lanes” para obtener picos que fueron integrados a la línea base facilitando la lectura de las áreas. Las áreas procesadas con la herramienta “Wand (Tracing tool)” resultan en un valor numérico (área en píxeles) que es directamente proporcional al tamaño de la mancha.

F. Extracción de clorpirifós y metamidofos de suelos

La extracción de pesticidas de suelo se realizó según un estudio previo [15]–[17] con ligeras modificaciones. El procedimiento consistió preparar una jeringa de 20 mL con dos discos de papel filtro, 2 g de Na_2SO_4 anhidro, 5 g de suelo y 10 mL de acetato de etilo como solvente extractor (Figura 1). Posteriormente, se aplicó ultrasonido durante 15 minutos utilizando un baño de ultrasonido Branson a 40 kHz. Luego, se filtró el solvente con los pesticidas en estudio y se volvió a repetir el proceso con 5 mL de solvente. El filtrado se evaporó utilizando $N_2(g)$ hasta sequedad. Finalmente, se reconstituyó con 0.1 mL de acetonitrilo su posterior sembrado en placas de sílica gel.

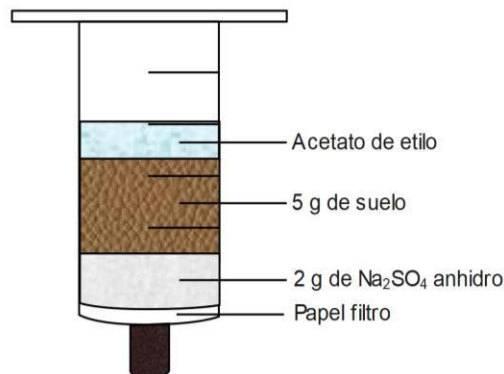


Fig. 2. Sistema de extracción

G. Proceso de validación

Para la validación del método se tomaron en cuenta la evaluación de parámetros como linealidad, sensibilidad, precisión y exactitud [18], [19]. Las fórmulas empleadas en el cálculo de estos parámetros se presentan en la Tabla I.

La linealidad del método consistió en sembrar en placas 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2.0, 2.4, 2.8 y 3.2 µg de estándar de clorpirifós. Por otro lado, también se sembró 0.2, 0.3, 0.6, 1.2, 1.8 y 3.6 µg de estándar de metamidofos. Los estándares fueron disueltos en acetonitrilo grado HPLC. Una vez sembrados se procedió revelar las placas y calcular sus factores de retención (R_f) y procesar las manchas en “Image J” una vez obtenidas las áreas en píxeles se procedió a calcular el coeficiente de determinación R².

La sensibilidad del método se determinó mediante el cálculo de los límites de detección (LD) y cuantificación (LC) empleando las fórmulas de la Tabla I, donde “Yb1” corresponde al intercepto “a” de la ecuación de la recta que relaciona la cantidad de organofosforado en mg y el promedio del área en píxeles obtenidas del software “Image J”, “Sb1” al intercepto “a” de la ecuación de la recta que relaciona la cantidad de organofosforado en mg y la desviación estándar del área en píxeles obtenidas del software “Image J”, y “n” corresponde al número de soluciones de calibración que fueron ocho para clorpirifós y seis para metamidofos.

La precisión del método se realizó la extracción de cada organofosforado de suelos agrícolas contaminados con clorpirifós y metamidofos. Se realizaron 8 extracciones de cada suelo contaminado y los solventes fueron recolectados en un tubo donde se evaporó a sequedad utilizando N₂ (g) y se reconstituyó con 0.1 mL de acetonitrilo. Posteriormente, se sembraron en placas de sílica gel y se procedió al revelado de las placas. Una vez reveladas se procesaron en el software “Image J” para obtener el área de la mancha en píxeles. Se realizaron cinco repeticiones. Se calculó la desviación estándar relativa “DER” utilizando la fórmula de la Tabla 1. Los cálculos se realizaron con las áreas.

Finalmente, la exactitud del método se determinó mediante el cálculo del porcentaje de recuperación “%R”. El procedimiento consistió en analizar muestras suelos agrícolas donde se evidenció la aplicación de los organofosforados en estudio. Estas muestras fueron analizadas de acuerdo a los procedimientos descritos anteriormente. Una vez calculadas las áreas en píxeles de las muestras “Área_M” se procedió a enriquecer dichas muestras con 0.2 mg de clorpirifós y 0.4 mg de metamidofos y se procedió con su extracción y revelado dando origen al área enriquecida “Área_E”. Paralelamente, se añadió 0.2 mg de clorpirifós y 0.4 mg de metamidofos a suelos sin residuos de los organofosforados en estudio para conocer el área de la adición estándar “Área_{AE}”. Finalmente, se

procedió a calcular el %R de acuerdo a la con la fórmula presentada en la Tabla 1.

TABLA I
FÓRMULAS PARA EL CÁLCULO DE LOS PARÁMETROS DE VALIDACIÓN DE MÉTODO PARA CUANTIFICAR CLORPIRIFÓS Y METAMIDOFOS POR CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA

| Parámetro | Fórmula | Especificación | Fuente |
|--------------|---|----------------------|---------------|
| Linealidad | $b = \frac{\sum X_i Y_i - \frac{\sum X_i \sum Y_i}{n}}{\sum X_i^2 - \frac{(\sum X)^2}{n}}$ $a = \frac{\sum Y_i - b \sum X_i}{n}$ $R^2 = \frac{\left(\frac{\sum X_i Y_i - \frac{\sum X_i \sum Y_i}{n}}{\sqrt{\left(\sum X_i^2 - \frac{(\sum X)^2}{n} \right) \left(\sum Y_i^2 - \frac{(\sum Y)^2}{n} \right)}} \right)^2}{1}$ | R ² >0.99 | [18] |
| Sensibilidad | $LD = \frac{Yb1 + 3(Sb1)}{b} \frac{1}{\sqrt{n}}$ $LC = \frac{Yb1 + 10(Sb1)}{b} \frac{1}{\sqrt{n}}$ | - | [18]- [20] |
| Precisión | $DER = \frac{s}{\bar{x}} \times 100$ | DER<15 % | [21] |
| Exactitud | $\%R = \frac{(\bar{Área}_E - \bar{Área}_M)}{\bar{Área}_{AE}} \times 100$ | 90<%R<110 | [18], [19] |

H. Cálculo de la concentración de clorpirifós y metamidofos en muestras se suelos agrícolas.

Para el cálculo de la concentración de cada clorpirifós y metamidofos, en primer lugar, se calculó la cantidad de mg de cada organofosforado en suelos agrícolas con historial de uso de estos dos pesticidas. El análisis se realizó de acuerdo a lo explicado en el ensayo de precisión. Los µg de cada organofosforado se calcularon a partir de la ecuación de la recta obtenida en el ensayo de linealidad. La ecuación se presenta a continuación:

$$y = a + bx \tag{1}$$

Donde, “x” corresponde a los mg de cada organofosforado, “y” es el área en píxeles obtenido del software “Image J”, “a” corresponde al intercepto con el eje x y “b” a la pendiente de la recta que fueron calculado por el método de los mínimos cuadrados con las fórmulas de la Tabla 1. Finalmente, se utilizó la siguiente fórmula para calcular la concentración en mg/kg de cada organofosforado, donde “M” es el peso de la muestra en gramos que fueron 40 g ya que se realizaron 8 extracciones de 5 g de muestra de suelo agrícola.

$$\text{Concentración (mg / kg)} = \frac{\bar{Área}_{(píxeles)} - a}{b \times M} \tag{2}$$

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Figura 3, se observa el resultado del análisis por Cromatografía en Capa Fina del estándar de clorpirifós mostrando una mancha de color anaranjado opaco en presencia de AgNO_3 con un R_f de 0.82 con una fase móvil de cloroformo:ciclohexano (60:40).

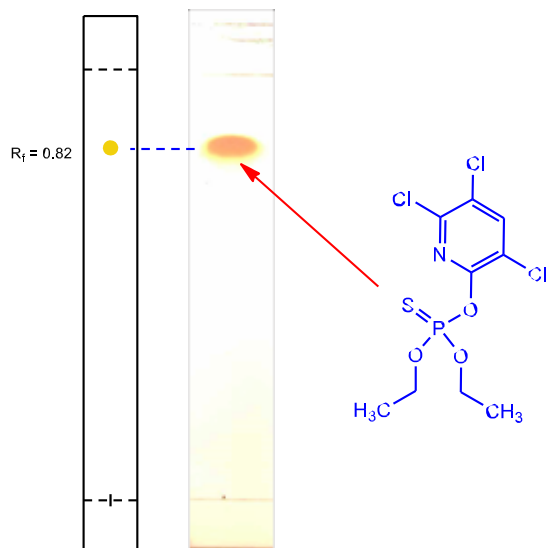


Fig. 3. Análisis de clorpirifós por Cromatografía en Capa Fina. Fase móvil: cloroformo: ciclohexano (60:40).

Por otro lado, en la Figura 4, se observa el resultado del análisis por Cromatografía en Capa Fina del estándar de clorpirifós mostrando una mancha de color amarillo en presencia de AgNO_3 con un R_f de 0.19 con una fase móvil de cloroformo: acetona (80:20).

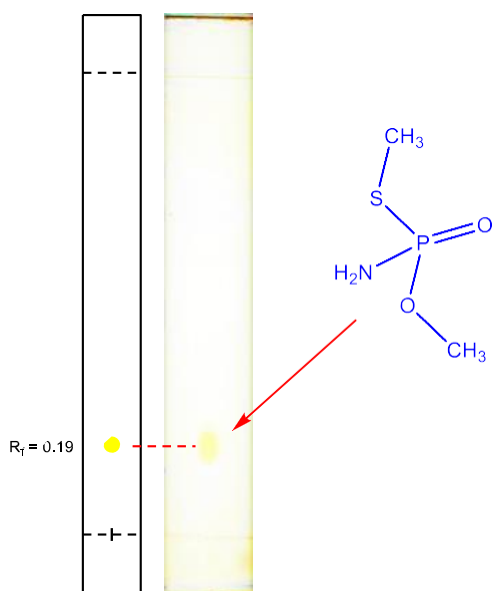


Fig. 4. Análisis de metamidofos por Cromatografía en Capa Fina. Fase móvil: cloroformo: acetona (80:20).

Respecto a la validación del método por Cromatografía En Capa Fina en la Figura 5 se muestran las placas de sílica gel procesadas en “Image J” con concentraciones ascendentes de clorpirifós y metamidofos.

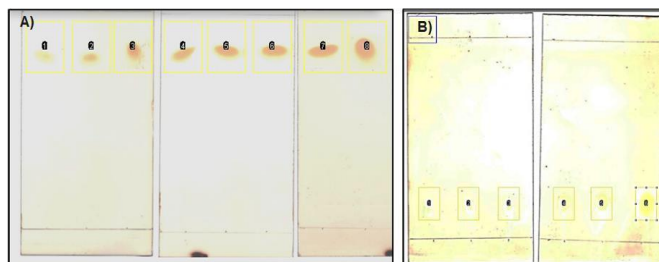


Fig. 5. Cálculo de las Áreas en píxeles por “Image J” en el ensayo de linealidad para la cuantificación de A) clorpirifós y B) metamidofos por cromatografía en capa fina

En la Tabla I se observa las áreas en píxeles calculadas por procesamiento de imágenes en el software “Image J” correspondientes a 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2.0, 2.4, 2.8 y 3.2 mg de clorpirifós sembradas en las placas de sílica gel.

TABLA II
ÁREAS EN PÍXELES PARA LA DETERMINACIÓN DE LA LINEALIDAD DEL MÉTODO POR CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA PARA LA CUANTIFICACIÓN DE MCLORPIRIFOS EN SUELOS

| Clorpirifós (mg) | Área 1 (Píxeles) | Área 2 (Píxeles) | \bar{x} | S |
|------------------|------------------|------------------|-----------|---------|
| 0.4 | 2320.846 | 2401.120 | 2360.983 | 56.762 |
| 0.8 | 4727.054 | 4803.296 | 4765.175 | 53.912 |
| 1.2 | 7408.832 | 7528.330 | 7468.581 | 84.497 |
| 1.6 | 9304.844 | 9084.176 | 9194.510 | 156.036 |
| 2 | 11859.480 | 11907.012 | 11883.246 | 33.611 |
| 2.4 | 13559.399 | 12667.679 | 13113.539 | 630.542 |
| 2.8 | 15976.836 | 16234.526 | 16105.681 | 182.215 |
| 3.2 | 17472.232 | 17542.261 | 17507.246 | 49.518 |

También, en la Tabla II se observa las áreas en píxeles calculadas por procesamiento de imágenes en el software “Image J” correspondientes a 0.2, 0.3, 0.6, 1.2, 1.8 y 3.6 mg de metamidofos sembradas en las placas de sílica gel.

TABLA III
ÁREAS EN PÍXELES PARA LA DETERMINACIÓN DE LA LINEALIDAD DEL MÉTODO POR CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA PARA LA CUANTIFICACIÓN DE METAMIDOFOS EN SUELOS

| Metamidofos (mg) | Área 1 (Píxeles) | Área 2 (Píxeles) | \bar{x} | S |
|------------------|------------------|------------------|-----------|----------|
| 0.2 | 2325.959 | 2406.409 | 2366.184 | 56.887 |
| 0.3 | 3564.148 | 3621.634 | 3592.891 | 40.649 |
| 0.6 | 12383.480 | 12583.213 | 12483.347 | 141.233 |
| 1.2 | 26849.439 | 26212.693 | 26531.066 | 450.247 |
| 1.8 | 37428.887 | 37578.902 | 37503.894 | 106.077 |
| 3.6 | 73197.996 | 68384.202 | 70791.099 | 3403.867 |

Para evaluar la linealidad del método para cuantificar ambos organofosforados se elaboró los gráficos de calibración de la Figura 6 donde se observa que los coeficientes de determinación R^2 para clorpirifós y metamidofos son de

0.9947 y 0.9945. Al ser estos valores R^2 mayores de 0.99[18] se define al presente método como lineal.

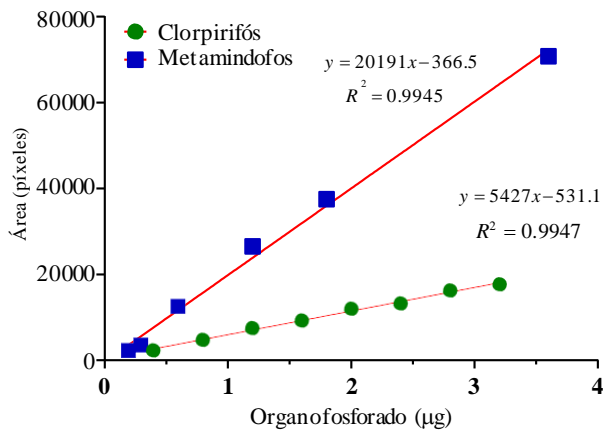


Fig. 6. Gráfico de calibración correspondiente a mg de clorpirifós versus Área (Píxeles).

La sensibilidad del método se calculó hallando la ecuación de la recta entre la cantidad de cada organofosforado versus la desviación estándar de las Tablas II y III. Utilizando las fórmulas de la Tabla I se logró calcular que los límites de detección y cuantificación para clorpirifós son de 0.0626 y 0.1384 mg respectivamente y 0.004 y 0.093 mg respectivamente para metamidofos.

Los resultados de la evaluación de la precisión del método se presentan en la Tabla IV. Se observa que para la determinación de clorpirifós el método presenta una desviación estándar relativa “DER” de 9.67 % y 12.54 % para la determinación de metamidofos. Al ser estos valores menores al 15 % se podría decir que el método resulta ser preciso para el análisis de ambos organofosforados.

TABLA IV

ÁREAS EN PÍXELES PARA LA DETERMINACIÓN DE LA PRECISIÓN DEL MÉTODO POR CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA PARA LA CUANTIFICACIÓN DE METAMIDOFOS EN SUELOS

| Repetición | Área (Píxeles) | |
|------------|----------------|-------------|
| | Clorpirifós | Metamidofos |
| 1 | 11861.610 | 12021.213 |
| 2 | 13331.104 | 10923.423 |
| 3 | 12055.388 | 14300.567 |
| 4 | 14347.359 | 11254.493 |
| 5 | 11374.933 | 14023.413 |
| \bar{x} | 12594.079 | 12504.622 |
| S | 1217.60141 | 1567.549 |
| DER (%) | 9.67 | 12.54 |

Haciendo uso de las ecuaciones de la recta de la Figura 6 y adaptándolas a la “ecuación 2” se identificó y cuantificó clorpirifós y metamidofos en suelos agrícolas del distrito de Vitor, Arequipa, Perú.

Entonces, la “ecuación 3” fue utilizada para cuantificar clorpirifós en muestras de suelos agrícolas de cultivo de ajo y cebolla.

$$\text{Clorpirifós (mg / kg)} = \frac{\text{Área}_{(\text{píxeles})} + 531.1}{5427 \times 40} \quad (3)$$

Asimismo, la “ecuación 4” se utilizó para cuantificar metamidofos en muestras de suelos agrícolas de cultivo de alfalfa.

$$\text{Metamidofos (mg / kg)} = \frac{\text{Área}_{(\text{píxeles})} + 366.5}{20191 \times 40} \quad (4)$$

A continuación, en la Figura 7 se observa que suelo agrícola para cultivo de Ajo analizado con la metodología propuesta presenta clorpirifós y se nota una mancha a un R_f de 0.82 y luego del procesamiento de imágenes en el software “Image J” da un área de 13951.98 píxeles que corresponde a una concentración de 0.067 mg/kg.

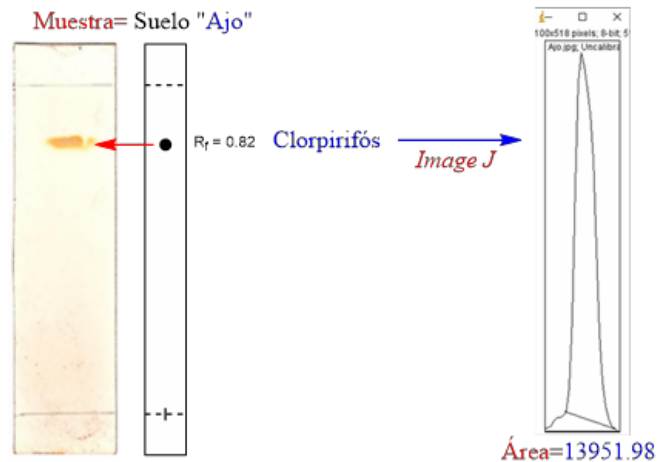


Fig. 7. Área en píxeles de clorpirifós presente en una muestra de suelo agrícola para cultivo de Ajo del distrito de Vitor, Arequipa, Perú.

En la Figura 8 se observa que suelo agrícola para cultivo de Cebolla analizado con la metodología propuesta presenta clorpirifós con una mancha a un R_f de 0.82 y luego del procesamiento de imágenes en el software “Image J” da un área de 9773.12 píxeles que corresponde a una concentración de 0.047 mg/kg.

En la Figura 9 se observa que suelo agrícola para cultivo de alfalfa analizado con la metodología propuesta presenta metamidofos con una mancha a un R_f de 0.19 y luego del procesamiento de imágenes en el software “Image J” da un área de 8640.64 píxeles que corresponde a una concentración de 0.011 mg/kg.

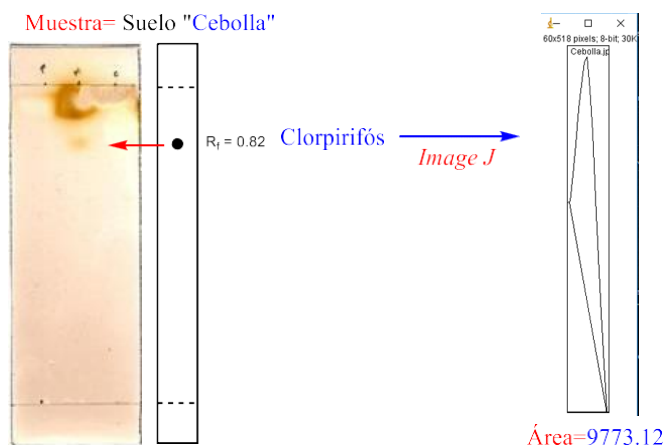


Fig. 8. Área en pixeles de clorpirifós presente en una muestra de suelo agrícola para cultivo de cebolla del distrito de Vitor, Arequipa, Perú.

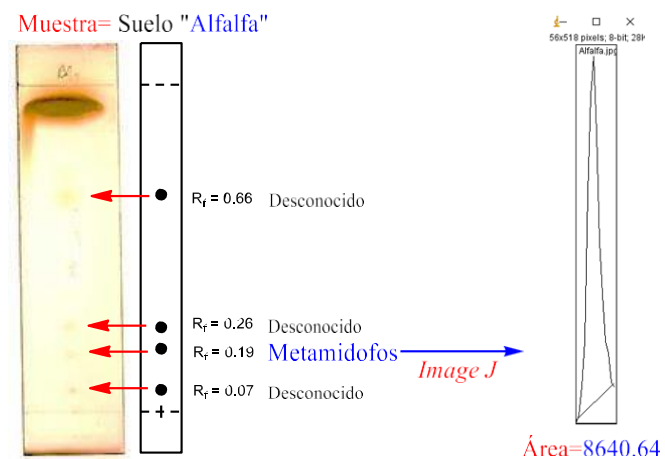


Fig. 9. Área en pixeles de metamidofos presente en una muestra de suelo agrícola para cultivo de alfalfa del distrito de Vitor, Arequipa, Perú.

Finalmente, se evaluó la exactitud del método mediante el cálculo del porcentaje de recuperación. En la Tabla V se presentan los resultados. Los porcentajes de recuperación “%R” para clorpirifós y metamidofos son de 99.87 y 93.61 respectivamente. Con estos resultados se corrobora la exactitud del método ya que ambos valores de %R están entre 90 y 110 % [18].

TABLA V

DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN (%R) PARA EVALUAR LA EXACTITUD DEL MÉTODO POR CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA PARA LA CUANTIFICACIÓN DE CLORPIRIFÓS Y METAMIDOFOS EN SUELOS

| Muestra de suelo | Muestra Área (Píxeles) A_M | Adición estándar Área (Píxeles) A_E | | Muestra enriquecida Área (Píxeles) A_E | %R |
|------------------|------------------------------|---------------------------------------|----------------------|--|-------|
| | | Clorpirifós (0.4 mg) | Metamidofos (0.2 mg) | | |
| Ajo | 13951.98 | 2360.983 | - | 16309.173 | 99.84 |
| Alfalfa | 8640.64 | - | 2325.959 | 10817.982 | 93.61 |

IV. CONCLUSIÓN

Se logró desarrollar un método simple para la identificación y cuantificación de clorpirifós y metamidofos por Cromatografía en Capa Fina mediante procesamiento de imágenes utilizando el software “Image J” esto seguido de un proceso de extracción de cada organofosforado de suelos mediante un proceso rápido asistido por ultrasonido a 40 kHz. Los pesticidas muestran factores de retención R_f de 0.19 para metamidofos utilizando como fase móvil cloroformo: acetona (80:20) y un R_f de 0.82 para clorpirifós con una fase móvil de cloroformo: ciclohexano (60:40). Ambos métodos cumplen con los parámetros de linealidad, precisión y exactitud, y cuentan con una sensibilidad aceptable para las muestras de suelo estudiadas. Se logró identificar y cuantificar clorpirifós en muestras de suelos agrícolas de ajo y cebolla encontrando concentraciones de 0.067 y 0.047 mg/kg respectivamente. Asimismo, se encontró presencia de metamidofos en suelos agrícolas de alfalfa con una concentración de 0.011 mg/kg. El método desarrollado resulta ser simple y muestra resultados que pueden ser aprovechados para realizar estudios con fines educativos y podrían extenderse a más organofosforados.

AGRADECIMIENTO

Los autores expresas su agradecimiento al PROCENCIA por financiar esta investigación mediante el contrato N° 144-2020.

REFERENCES

- [1] L. G. Costa y M. Aschner, «Toxicology of Pesticides», en *Reference Module in Biomedical Sciences*, Elsevier, 2014. doi: 10.1016/B978-0-12-801238-3.00208-7.
- [2] S. Ganesan, M. J. Dickson, y A. F. Keating, «Pesticides», en *Encyclopedia of Reproduction (Second Edition)*, M. K. Skinner, Ed. Oxford: Academic Press, 2018, pp. 724-730. doi: 10.1016/B978-0-12-801238-3.64412-4.
- [3] T. Tuzimski, «Herbicides and Pesticides», en *Encyclopedia of Analytical Science (Third Edition)*, P. Worsfold, C. Poole, A. Townshend, y M. Miró, Eds. Oxford: Academic Press, 2019, pp. 391-398. doi: 10.1016/B978-0-12-409547-2.14395-1.
- [4] Y. Picó, «Pesticides and Herbicides: Residue Determination», en *Encyclopedia of Food and Health*, B. Caballero, P. M. Finglas, y F. Toldrá, Eds. Oxford: Academic Press, 2016, pp. 311-318. doi: 10.1016/B978-0-12-384947-2.00537-7.
- [5] E. Reich y V. Maire-Widmer, «Thin-Layer Chromatography | Instrumentation», en *Encyclopedia of Analytical Science (Third Edition)*, P. Worsfold, C. Poole, A. Townshend, y M. Miró, Eds. Oxford: Academic Press, 2019, pp. 50-58. doi: 10.1016/B978-0-12-409547-2.00538-2.
- [6] T. Tozar, M. Boni, I. R. Andrei, M. L. Pascu, y A. Staicu, «High performance thin layer chromatography-densitometry method based on picosecond laser-induced fluorescence for the analysis of thioridazine and its photoproducts», *Journal of Chromatography A*, vol. 1655, p. 462488, oct. 2021, doi: 10.1016/j.chroma.2021.462488.
- [7] M. E. Sowers, R. Ambrose, E. Bethea, C. Harmon, y D. Jenkins, «Quantitative thin layer chromatography for the determination of medroxyprogesterone acetate using a smartphone and open-source image analysis», *Journal of Chromatography A*, vol. 1669, p. 462942, abr. 2022, doi: 10.1016/j.chroma.2022.462942.
- [8] T. R. Machado y A. Fonseca, «A new alternative method for quantitative analysis by thin layer chromatography using a lab-made multi-track device and image-based chromatograms», *Microchemical*

- Journal*, vol. 147, pp. 127-132, jun. 2019, doi: 10.1016/j.microc.2019.03.017.
- [9] X. N. Tang, A. E. Berman, R. A. Swanson, y M. A. Yenari, «Digitally quantifying cerebral hemorrhage using Photoshop® and Image J», *Journal of Neuroscience Methods*, vol. 190, n.º 2, pp. 240-243, jul. 2010, doi: 10.1016/j.jneumeth.2010.05.004.
- [10] C. Harris *et al.*, «Optimising the measurement of bruises in children across conventional and cross polarized images using segmentation analysis techniques in Image J, Photoshop and circle diameter measurements», *Journal of Forensic and Legal Medicine*, vol. 54, pp. 114-120, feb. 2018, doi: 10.1016/j.jflm.2017.12.020.
- [11] M. Elsayed, T. M. El-Sherry, y M. Abdelgawad, «Development of computer-assisted sperm analysis plugin for analyzing sperm motion in microfluidic environments using Image-J», *Theriogenology*, vol. 84, n.º 8, pp. 1367-1377, nov. 2015, doi: 10.1016/j.theriogenology.2015.07.021.
- [12] W. J. Jeffcoate, A. J. Musgrove, y N. B. Lincoln, «Using image J to document healing in ulcers of the foot in diabetes», *International Wound Journal*, vol. 14, n.º 6, pp. 1137-1139, 2017, doi: 10.1111/iwj.12769.
- [13] E. Y. Rha, J. M. Kim, y G. Yoo, «Volume Measurement of Various Tissues Using the Image J Software», *J Craniofac Surg*, vol. 26, n.º 6, pp. e505-506, sep. 2015, doi: 10.1097/SCS.0000000000002022.
- [14] Z. Akar y N. A. Bumaz, «A new colorimetric method for CUPRAC assay with using of TLC plate», *LWT*, vol. 112, p. 108212, sep. 2019, doi: 10.1016/j.lwt.2019.05.110.
- [15] E. G. Gonzales-Condori, S. A. Ramírez-Revilla, y J. A. Villanueva-Salas, «Role of Eisenia foetida in the degradation of profenofos in presence of native bacterial communities», *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, vol. 19, n.º Sup. 1, Art. n.º Sup. 1, jun. 2020, doi: 10.24275/rmiq/IA1505.
- [16] E. G. Gonzales-Condori, C. Choquenaira-Quispe, y S. A. Ramírez-Revilla, «Study of the degradation of chlorpyrifos in contaminated soils in the presence of the red california earthworm Eisenia foetida», *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, vol. 36, n.º 1, Art. n.º 1, ene. 2020, doi: 10.20937/RICA.2020.36.53201.
- [17] E. G. Gonzales-Condori, «A simple and fast ultrasound-assisted extraction procedure for the determination of chlorpyrifos and profenofos in soils by High Performance Liquid Chromatography», *Proceedings of the LACCEI international Multi-conference for Engineering, Education and Technology*, n.º 589, ago. 2021, doi: 10.18687/LACCEI2021.1.1.589.
- [18] O. Quattrocchi, S. Abelaira, y R. Felipe Laba, *Introducción a la HPLC, Aplicación y Práctica*. 1992.
- [19] E. G. Gonzales-Condori, R. Alvarez-Gonzales, y S. A. Ramírez-Revilla, «Ultrasound-assisted extraction for the determination of α -linolenic and linoleic acid in vegetable oils by high performance liquid chromatography», *Eclética Química Journal*, vol. 46, n.º 2, Art. n.º 2, abr. 2021, doi: 10.26850/1678-4618eqj.v46.2.2021.p57-66.
- [20] B. G. H. Flores, K. N. Zevillanos, J. A. V. Salas, y E. G. G. Condori, «Biodegradación Aeróbica De Aroclor 1221, 1242 Y 1254 Por Pseudomona aeruginosa», n.º 17, ago. 2021, doi: 10.18687/LACCEI2021.1.1.17.
- [21] B. Zhou *et al.*, «Determination of four omega-3 polyunsaturated fatty acids by UPLC-MS/MS in plasma of hyperlipidemic and normolipidemic subjects», *Journal of Chromatography B*, vol. 1126-1127, p. 121762, sep. 2019, doi: 10.1016/j.jchromb.2019.121762.