

10523
4



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

ESTUDIOS
CUAUTITLÁN

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN C-1

Elaborado en
Estudios de Postgrado

**“DESARROLLO DE MÉTODOS DE
PRECONCENTRACIÓN EN LÍNEA, ANÁLISIS
Y SEPARACIÓN DE AGROQUÍMICOS POR
CROMATOGRFÍA CAPILAR MICELAR
ELECTROCINÉTICA”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO

P R E S E N T A :

FERNANDO JESÚS CELIS VIVAS

ASESOR: DRA. MA. GABRIELA VARGAS MARTÍNEZ

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO

2003

A



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

PAGINACIÓN DISCONTINUA



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLAN



DEPARTAMENTO DE
EXAMENES PROFESIONALES

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
P R E S E N T E

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

Desarrollo de Módulos de Programación en Java, JSP y
y Separación de Arquitecturas por Orientación de Datos y
Electrocinética.

que presenta el pasante: Fernando Jesús...
con número de cuenta: 233027-1 para obtener el título de:

Químico

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Mex. a 10 de enero de 2003



PRESIDENTE Dr. Guillermo...
VOCAL Dr....
SECRETARIO Dr....
PRIMER SUPLENTE Dr....
SEGUNDO SUPLENTE Dr....

[Handwritten signature]
[Handwritten signature]

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

B

A G R A D E C I M I E N T O S

A Dios

Gracias Señor, por haberme concedido cada día la oportunidad de vivir, por mi familia, mis amigos; por las dificultades, las tristezas y por los tiempos que me hicieron descubrir a mi lado tendiéndome la mano para levantarme, sostenerme y hacerme encontrar nuevamente el camino. Gracias por permitirme llegar a esta etapa de mi vida...

Mamá

A ti Mamá quiero agradecerle lo que has hecho por mí, habermé educado así ya que de otra manera la malicia y el vicio me hubieran hundido, y todo esto no hubiera sido posible, que Dios te bendiga y guarde siempre... Gracias Mamá.

Papá †

Por todo tu amor, porque dejaste en mi vida una gran enseñanza de que el esfuerzo y trabajo son sinónimos de Superación y aunque fue corto el tiempo que estuviste con nosotros quiero que sepas que Te Amamos!, y esperamos con ansiedad el día en que podamos volver a verte.

Carmen

A ti nonita linda quiero agradecerte por todas y cada una de los momentos mágicos que me hiciste vivir y en especial por la calidez de tu trato, la dulzura de tus palabras y tu disposición incondicional de estar ahí cuando más te necesite...

A mis hermanas

Luis, Marisol, Sergio y Antonín que en todo momento se preocuparon por mí y me ayudaron cuando más los necesitaba. Y ante todo por lo grato que ha resultado compartir este mundo con ustedes, sintiendo su cariño, confianza y compresión incondicional.

Faby

Gracias por tu tiempo dedicado y ayuda en la dirección y revisión de esta tesis.

M E R C E S A R I A

Por su apoyo brindado al proyecto IS-250 - E

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ÍNDICE

GLOSARIO DE ABREVIATURAS.....	3
RESUMEN.....	4
INTRODUCCIÓN.....	5
OBJETIVOS.....	7
Capítulo 1. GENERALIDADES DE LA ELECTROFORESIS CAPILAR	8
1.1. ELECTROFORESIS CAPILAR.....	8
1.2. VARIANTES DE LA ELECTROFORESIS CAPILAR.....	11
1.2.1. ELECTROFORESIS CAPILAR DE ZONA.....	11
1.2.2. ISOTACOFERIS CAPILAR.....	11
1.2.3. ELECTROFORESIS CAPILAR DE GELES.....	12
1.2.4. ELECTROFORESIS CAPILAR DE ENFOQUE ISOELÉCTRICO.....	12
1.2.6. CROMATOGRAFÍA CAPILAR MICELAR ELECTROCINÉTICA, (CCME).....	12
1.3. PRECONCENTRACIÓN EN LÍNEA POR CROMATOGRAFÍA CAPILAR MICELAR ELECTROCINÉTICA (PL-CCME).....	15
1.3.1. MODO NORMAL DE PRECONCENTRACIÓN EN LÍNEA.....	15
1.3.1.1. PRECONCENTRACIÓN EN LÍNEA CON MIGRACIÓN INVERSA DE MICELAS (PLMIM).....	16
1.3.1.2. MODO NORMAL DE PRECONCENTRACIÓN EN LÍNEA.....	17
1.4. EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA, (EFS).....	17
1.5. MÉTODOS DE FORTIFICACIÓN PARA HERBICIDAS.....	18
1.6. FACTORES QUE INFLUYEN EN LA REPRODUCIBILIDAD DE LOS PICOS.....	19
1.7. VENTAJAS Y DESVENTAJAS.....	20
Capítulo 2. INSTRUMENTACIÓN	21
2.1. SISTEMA DE ELECTROFORESIS CAPILAR.....	21
2.2. CAPILARES.....	22
2.3. DETECTORES.....	22
2.4. ELECTROLITO SOPORTE.....	23
Capítulo 3. GENERALIDADES SOBRE AGROQUÍMICOS	25
3.1. AGROQUÍMICOS.....	25
3.2. PROPIEDADES DE HERBICIDAS ANALIZADOS (AMÍDICO, UREICO, CARBÁMICOS Y DINITROFENÓLICOS).....	26

3.3. VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE SU USO.....	28
Capítulo 4. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....	30
4.1. MATERIAL Y REACTIVOS.....	30
4.2. ANÁLISIS Y SEPARACIÓN DE HERBICIDAS PRESENTES EN DOS MEZCLAS....	31
4.3. PLMIM – CCME DE LOS HERBICIDAS ESTUDIADOS.....	33
4.4. EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA, (EFS).....	34
4.5. COMBINACIÓN DE LA EFS CON LA PLMIM-CCME.....	34
4.6. ANÁLISIS DE UN AGROQUÍMICO DINITROFENÓLICO PRESENTE EN UNA FORMULACIÓN COMERCIAL.....	35
Capítulo 5. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	37
5.1. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE LA SEPARACIÓN DE HERBICIDAS CARBÁMICOS, UREICO Y AMÍDICO.....	38
5.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE LA SEPARACIÓN DE HERBICIDAS DINITROFENÓLICOS.....	49
5.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE LA PLMIM-CCME.....	58
5.3.1. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE LA PLMIM-CCME DE HERBICIDAS CARBÁMICOS, UREICO Y AMÍDICO.....	60
5.3.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE LA PLMIM-CCME DE HERBICIDAS DINITROFENÓLICOS.....	64
5.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE LA COMBINACIÓN DE LA EFS CON LA PLMIM-CCME.....	68
5.4.1. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE LA COMBINACIÓN DE EFS CON LA PLMIM-CCME DE HERBICIDAS CARBÁMICOS, UREICO Y AMÍDICO.....	68
5.4.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE LA COMBINACIÓN DE EFS CON LA PLMIM-CCME DE HERBICIDAS DINITROFENÓLICOS.....	71
5.5. COMPARACIÓN DE LOS LÍMITES DE DETECCIÓN OBTENIDOS A PARTIR DE LOS MÉTODOS DESARROLLADOS PARA CADA UNO DE LOS HERBICIDAS ESTUDIADOS.....	73
5.6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DEL ANÁLISIS DEL AGROQUÍMICO COMERCIAL.....	75
CONCLUSIONES.....	78
BIBLIOGRAFÍA.....	80

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

ABREVIATURA	SIGNIFICADO
Ac	Anticuerpo
AcDs	Acetato de Dinoseb
Ag	Antígeno
ACES	Ácido etanosulfónico-2-[(2-amino-2-oxoetil)amino]
BGS	Buffer de separación
Btn	Buturon
Cbm	Chlorbufam
CCME	Cromatografía Capilar Micelar Electrocinética
CG	Cromatografía de Gases
CHES	Ácido etano sulfónico (2-[N-ciclohexilamino])
CLAE	Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia
CMC	Concentración Micelar Crítica
CTAB	Bromuro de Cetiltrimetilamonio
Ctd	Carbetamida
Dbn	Dinobuton
Ds	Dinoseb
EC	Electroforesis Capilar
ECC	Electrocromatografía Capilar
ECEI	Electroforesis Capilar de Enfoque Isoeléctrico
ECG	Electroforesis Capilar en Gel
ECZ	Electroforesis Capilar de Zona
EDTA	Ácido Etilendiamino tetracético
EFS	Extracción en Fase Sólida
FEO	Flujo Electroosmótico
ITF	Isotacoforesis Capilar
IEC	Inmuno Electroforesis Capilar
kV	kilovolts
LD's	Límites de detección
M	Molaridad
MES	Ácido etanosulfónico-2-[N-morfolino]
ul	microlitos
µm	micrómetros
mM	milimolar
MNPL	Modo normal de preconcentración en línea
N	Platos teóricos (Eficiencia)
nm	nanómetros
PLMIM-CCME	Preconcentración en línea con migración inversa de micelas por cromatografía capilar micelar electrocinética
Ptc	Pentanochlor
Rs	Resolución
S	Muestra
SDS	Dodecil Sulfato de Sodio
Tris	Tris(hidroximetil)amino-metano

RESUMEN

El objetivo principal del presente trabajo fue el de desarrollar los métodos de preconcentración en línea, análisis y separación simultánea de tres derivados dinitrofenólicos (Acetato de dinoseb, Dinobuton y Dinoseb), dos carbámicos (Chlorbufam y Carbetamida), un ureico (Buturon) y un amídico (Pentanochlor) con acción herbicida mediante una variante de la electroforesis capilar llamada cromatografía capilar micelar electrocinética. Para el desarrollo de los métodos de análisis y separación simultánea se evaluó la influencia de diversas variables experimentales (tipo, concentración y pH de buffer, tipo y concentración de surfactante), en parámetros analíticos tales como la resolución, eficiencia de la separación y tiempos de análisis. Mientras que para la preconcentración en línea se evaluó la naturaleza de la matriz y tiempo de introducción de muestra.

Los métodos analíticos diseñados para el grupo de los herbicidas dinitrofenólicos, previa optimización de todas las variables analizadas, fueron aplicados para determinar cualitativamente la presencia de un herbicida (Dinobuton) presente en la formulación comercial (ACARELTE 40-EC), así como también fue aplicado a una muestra proveniente del extracto de tierras diatomeas las cuales previamente fueron fortificadas con el mismo producto comercial.

INTRODUCCIÓN.

Los plaguicidas son cualquier sustancia o mezcla de sustancias que se usan para controlar las plagas que atacan los cultivos o a los insectos que son vectores de enfermedades. Los herbicidas se utilizan extensamente para controlar hierbas no deseadas (malezas) de ciertos cultivos.

Los agroquímicos entre los cuales se encuentran insecticidas, herbicidas, fertilizantes, coadyuvantes y otras sustancias afines de uso en la agricultura, tienen determinado tiempo de vida media lo cual asegura su efectividad, sin embargo, debido a esto las frutas, verduras o semillas pueden estar contaminados con pequeñas cantidades de estas sustancias que son dañinas para la salud y los consumidores deben obtener productos libres de residuos tóxicos de cualquier tipo de plaguicida usado. Por otro lado, las personas con ocupaciones como trabajadores del campo, están expuestos a grandes dosis de plaguicidas ya que su exposición excede al de personas que solo llegan a consumir productos contaminados [1].

Cuando el uso de herbicidas en los cultivos es de forma indiscriminada y sin control se ocasiona daños al ambiente, por ejemplo, el deterioro de la flora y fauna silvestres, la contaminación de los suelos y mantos freáticos, así como de aguas continentales y costeras.

Todo lo anterior pone de manifiesto que la confirmación de la pureza de alimentos o ausencia de estos productos es de gran importancia para la industria alimenticia y para la población en general, por tanto, es necesario el desarrollo de métodos de separación, rápidos, eficientes y económicos para el análisis de los agroquímicos, tanto en las etapas de síntesis como en el control de calidad del producto final.

Existe una gran diversidad de métodos que han sido utilizados para llevar a cabo el análisis de agroquímicos tales como, la cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE), la cromatografía de gases (CG) [2-7], y recientemente la electroforesis capilar (EC) [8-11].

La Electroforesis Capilar así como sus variantes tales como: la Cromatografía Capilar Micelar Electrocinética (CCMC), Electroforesis Capilar de Zona (ECZ), Isotacoforesis Capilar (ITF), Electroforesis Capilar de Enfoque Isoeléctrico (ECEI),

Electroforesis Capilar en Geles (ECG), etc., resultan importantes por ser métodos muy utilizados en el área de química analítica, bioquímica, biomédica y farmacéutica ya que permiten analizar diferentes clases de compuestos como: isómeros ópticos de fármacos, péptidos, oligonucleótidos, catecolaminas, biopolímeros, fragmentos de ADN, ARN, etc., [12-15].

La separación por medio de electroforesis capilar tiene lugar si los analitos bajo la influencia de un campo eléctrico, se mueven hacia al ánodo o cátodo con diferentes velocidades, de tal forma que llegarán al detector a diferentes tiempos.

En este trabajo se propone como técnica analítica una variante de la Electroforesis Capilar, la Cromatografía Capilar Micelar Electrocinética mediante la cual se desarrollaran los métodos de preconcentración, análisis y separación de dos familias de herbicidas:

- a) *Cuatro herbicidas de los cuales dos son derivados de carbamatos*: N-fenilcarbamato de N'-etilpropanamida, Carbetamida; N-3-clorofenilcarbamato de sec-butino, Chlorbutam; *un derivado de urea* 3-(p-Clorofenil)-1-metil-1-sec-butino-urea, Buturon; y *por último un derivado de amida* N-(3-Cloro-4-metilfenil)-2-metil-pentanamida, Pentanochlor.
- b) *Tres herbicidas dinitrofenólicos*: 2, 4-Dinitro-6-sec-butilfenol, Dinoseb; acetato de 2-sec-butil-4,6-dinitrofenilo, Acetato de Dinoseb; carbonato de isopropil (2,4-dinitro-6-sec-butil-fenilo), Dinobuton

Además de las razones anteriores es una muy buena oportunidad para difundir información acerca de la utilidad de dicha técnica tanto a estudiantes de las carreras de Química, Ingeniería Química, Químico Farmacéutico Biólogo, y/o carreras a fines, así como a personas que realicen investigación en estas áreas.

Para lograr los objetivos planteados el presente trabajo se dividió en dos partes o secciones, la primera abarca los aspectos teóricos de mayor importancia tales como: fundamentos de la EC y sus variantes, instrumentación y generalidades sobre agroquímicos, mientras que la segunda se refiere a los aspectos experimentales para llegar a la resolución y eficiencias óptimas en la separación y preconcentración en línea de los métodos elaborados.

OBJETIVOS GENERALES:

- Desarrollar un método de separación simultánea para una mezcla de herbicidas carbámicos, uréico y amídico empleando como técnica la Cromatografía Capilar Micelar Electrocinética.
- Desarrollar un método de separación simultánea para una mezcla de herbicidas dinitrofenólicos empleando como técnica la Cromatografía Capilar Micelar Electrocinética.
- Desarrollar métodos de preconcentración en línea y fuera de línea de los herbicidas estudiados empleando como técnica la Cromatografía Capilar Micelar Electrocinética y la Extracción en Fase Sólida respectivamente.

OBJETIVOS PARTICULARES:

- Optimizar las condiciones de separación simultánea para cada grupo de herbicidas, tales como, tipo, concentración y pH del buffer así como del surfactante.
- Optimizar las condiciones de preconcentración en línea de los herbicidas estudiados, variando parámetros como tiempo de introducción de muestra y naturaleza de la matriz.
- Aplicar el método desarrollado a la determinación de un agroquímico dinitrofenólico de formulación comercial y adicionalmente a tierras diatomeas fortificadas con dicho producto.

Capítulo 1

GENERALIDADES.

El término electroforesis se emplea para describir la migración de una partícula cargada bajo la influencia de un campo eléctrico. Las separaciones electroforéticas se llevan a cabo habitualmente en dos modalidades que difieren notablemente: *electroforesis convencional* y *electroforesis capilar*. La primera es la metodología clásica que ha sido utilizada durante muchos años para separar especies complejas y de alto peso molecular realizándose en medios anticonvectivos* como soporte. La electroforesis capilar, es una versión instrumental de la electroforesis convencional que se realiza en capilares de sílice fundida de solo unas cuantas micras de diámetro interno.

1.1. ELECTROFORESIS CAPILAR.

La electroforesis está definida como un movimiento diferencial de especies cargadas (iones) por atracción o repulsión en un campo eléctrico. Recientemente se ha realizado en tubos capilares y ha aumentado el interés desde el punto de vista analítico ya que las ventajas principales que proporciona son: alta resolución y alta eficiencia de separación, corto tiempo de análisis, pequeñas cantidades de muestra y buffer son requeridos para realizar el análisis. El mecanismo de separación en la Electroforesis Capilar (EC), es el mismo de la electroforesis convencional ya que se asemeja a las técnicas electroanalíticas de separación en donde las variables electrofóricas son decisivas en el proceso separativo, no obstante existe diferencia fundamental, ya que no se produce electrólisis, pues los electrodos están suficientemente separados, por tanto, la migración de las especies electroactivas se ve atenuada por el denominado sistema electroforético y el paso de la corriente se corta antes de que estas lleguen al electrodo [16].

Las separaciones electroforéticas se originan por las diferentes movilidades de los solutos. La movilidad electroforética es proporcional a la carga del soluto e inversamente proporcional a las fuerzas de fricción, o retraso, que dependen de la forma y tamaño de las especies analito así como de la viscosidad del medio. Las

* Medios utilizados para facilitar la disipación de calor.

propiedades del disolvente tales como la fuerza iónica, pH y la constante dieléctrica, también son importantes porque influyen sobre la carga efectiva del soluto y en el caso de moléculas grandes, sobre su forma y tamaño hidrodinámico.

En la Fig. 1 se muestra como se da el proceso electroforético, donde las especies cargadas positivamente se mueven a lo largo del capilar con una velocidad que es mayor que la del flujo electroosmótico, FEO, puesto que su movimiento se ve acelerado por la atracción electroforética al electrodo negativo.

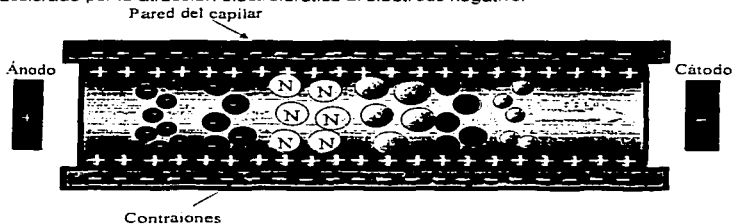


FIGURA 1. PROCESO DE SEPARACIÓN ELECTROFORÉTICA

Los solutos cargados negativamente se mueven más lentamente que el flujo electroosmótico a causa de que son repelidos por el electrodo negativo. De hecho, en la mayoría de los casos las especies negativas se mueven en la dirección opuesta al flujo electroosmótico, FEO, las especies no cargadas son transportadas como una sola al cátodo por la fuerza del FEO. La migración diferencial dentro de zonas discretas es debido a diferencias en las movilidades electroforéticas, las cuales a su vez están vinculadas a la relación masa/carga y a la conformación de los solutos.

El FEO [17], es el flujo del volumen del líquido que se origina cuando entra en contacto con una superficie sólida cargada por la imposición de un campo eléctrico, es decir, la superficie del sólido posee un exceso de cargas negativas resultado de la ionización de los grupos que presentan un equilibrio ácido-base a $\text{pH} \approx 6$ o por la adsorción de especies iónicas a la superficie. La Fig. 2 es una representación esquemática de lo que sucede en un capilar de sílice fundida, donde los grupos silanol (SiOH) que pueden existir en forma iónica (SiO^-), mediante un equilibrio ácido-base y al

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ser llenado el capilar con el electrolito soporte los contraiones se fijan en la superficie del capilar por fuerzas electrostáticas formando así la doble capa que mantiene el balance de carga y crea una diferencia de potencial entre la pared y los contraiones del electrolito soporte el cual se conoce como potencial zeta, el cual aumenta si el grosor de la capa aumenta y viceversa. Cuando el voltaje es aplicado y cruza el capilar los iones que forman la doble capa difusa son atraídos hacia el su respectivo electrodo transportando su atmósfera de solvatación, debido a las fuerzas de fricción entre las moléculas del disolvente este movimiento inmediatamente se extiende por el líquido entero y el perfil que resulta es casi plano y no parabólico como es el caso cuando se impulsa un líquido a través de un tubo por presión hidrostática (Fig. 2b y 2c). Otra característica importante del FEO estriba en que promueve el movimiento de todas las especies en solución, independientemente de su carga.

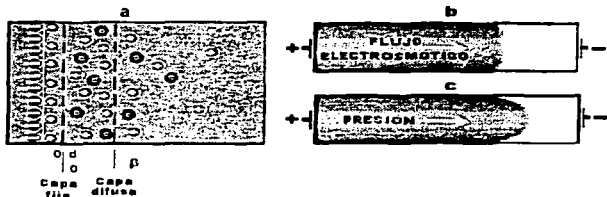


FIGURA 2. a) TEORÍA DE LA DOBLE CAPA. b) PERFIL DEL FEO EN EC, c) FLUJO PARABÓLICO EN CLAR.

Durante la separación [18], en los electrodos se producen iones hidróxido e hidrógeno molecular en el cátodo, mientras que en el ánodo se forma oxígeno molecular e iones hidronio, como se muestra en la figura 3.

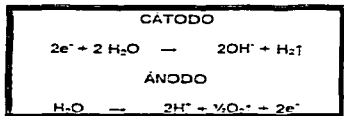


FIGURA 3. RECCIONES DE LOS ELECTRODOS

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Los iones hidróxido producidos en el cátodo incrementan la disociación del componente débilmente ácido, HA, del buffer de separación lo que provoca la formación de iones A⁻. En libre disolución, hay una resistencia de fricción mínima entre los iones y la disolución, y tiene lugar una rápida migración de los iones, este cambio de pH en el vial del ánodo y cátodo es minimizado por la presencia de un buffer con buena capacidad de amortiguamiento [19].

1.2.VARIANTES DE LA ELECTROFORESIS CAPILAR.

La necesidad de separaciones optimizadas para una gran variedad de compuestos ha dado como resultado varias modalidades, de trabajo que se han desarrollado para expandir el número de aplicaciones de esta técnica con la gran ventaja de que se pueden realizar usando el mismo equipo [20-22].

1.2.1. Electroforesis Capilar de Zona (ECZ).

Es el modo más simple de la electroforesis capilar y el más usado, la separación tiene lugar cuando partículas cargadas bajo la influencia de un campo eléctrico se mueven con diferente velocidad, donde ésta puede ser modificada variando el pH, viscosidad y concentración del buffer, o bien cambiando el voltaje en el proceso de separación. La migración diferencial de los analitos ionizados dentro de zonas discretas es debido a diferencias en las movilidades electroforéticas, las cuales a su vez están vinculadas en la relación masa/carga y a la conformación de los solutos, mientras que las moléculas neutras son transportadas a lo largo del capilar como un solo analito por el FEO.

1.2.1. Isotacoforesis Capilar (ITF).

El término isotacoforesis significa electroforesis a velocidad uniforme, es decir, el tiempo de recorrido de los analitos en el capilar bajo condiciones isotacoforéticas es independiente de la velocidad, ya que las velocidades de migración de los solutos son idénticas en un gradiente de voltaje en las zonas consecutivas. En contraste con ECZ donde la difusión de la muestra ocurre debido a la dispersión de efectos, la isotacoforesis puede ser favorablemente usada como una técnica de preconcentración en muestras diluidas. El principal inconveniente es su electroferograma que puede ser

difícil de interpretar. La detección UV puede ser usada solamente si los iones absorben al UV, son precedidos y seguidos por compuestos que no absorben al UV o viceversa.

1.2.3. Electroforesis Capilar de Geles (ECG).

En esta modalidad los tubos capilares son llenados con un gel el cuál actúa como un tamiz molecular para producir una separación basada en el tamaño. La electroforesis capilar en gel (ECG) ha sido utilizada en la separación de macromoléculas tales como: proteínas y ácidos nucleicos porque contienen masa y proporciones de carga que no varía el tamaño. Los principios de separación de ECG es la misma que en el tubo de electroforesis gel, pero los geles usados en ECG pueden ser enlaces covalentes cruzados o soluciones lineales de polímeros.

1.2.4. Electroforesis Capilar de Enfoque Isoeléctrico (ECEI).

En la electroforesis capilar de enfoque isoelectrico (ECEI) los analitos anfotéricos como las proteínas pueden ser separados con base a su punto isoelectrico mediante un gradiente de pH entre el cátodo y ánodo el cual es generado por una mezcla de ácido y base o de anfólitos durante la aplicación de voltaje. En ECEI el recubrimiento del capilar es importante ya que en general el FEO debe ser eliminado en su totalidad a fin de evitar la adsorción de moléculas cargadas en la pared del capilar.

1.2.6. Cromatografía Capilar Micelar Electrocinética (CCME).

Un paso significativo en el desarrollo de la electroforesis capilar se realizó en 1984 por Terabe [23], quien desarrolló la denominada Cromatografía Capilar Micelar Electrocinética (CCME). Esta técnica es una modalidad de la EC en la que se puede separar especies neutras así como cargadas. Ésta consiste en la adición de un surfactante al electrolito soporte con un valor de concentración que exceda al de la concentración micelar crítica (CMC) para así llegar a la formación de micelas [24], que son conglomerados esféricos de moléculas del surfactante, donde sus cadenas hidrocarbonadas (colas) hidrófobas tienen a orientarse hacia el centro, mientras que los grupos de cabeza $-\text{CO}_2^-$ (u otros grupos hidrófilos) rodean la superficie proporcionando protección ya que originan un caparazón de carga negativa que repele partículas con carga similar (ver figura 4'), su estabilidad depende de estos grupos

polares ya que al estar en la superficie forman puentes de hidrógeno con el entorno acuoso.

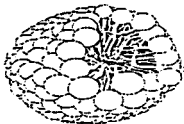


FIGURA 4. REPRESENTACIÓN DE UNA MICELA ESFÉRICA. LOS GRUPOS HIDRÓFILOS SON LAS ESFERAS, MIENTRAS QUE LOS GRUPOS HIDRÓFOBOS SON LOS TALLOS.*

Las micelas se pueden clasificar en dos tipos: a) micelas normales que son aquellas que en soluciones acuosas o polares, los extremos hidrófobos se dirigen al centro del agregado y b) micelas invertidas que son aquellas que en solventes no polares la cabeza de los grupos polares es orientada al interior del agregado [25].

Las soluciones micelares se emplean para solubilizar compuestos altamente hidrófobos y de ahí su importancia porque suministran un carácter de fase inversa en el mecanismo de separación el cual está basado en la partición diferencial de los solutos entre el interior hidrófobo de la micela y la fase acuosa de modo que la micela actúa como fase pseudoestacionaria en CCME (ver Fig. 5).

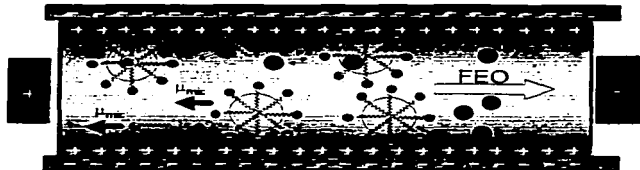


FIGURA 5 MECANISMO DE SEPARACIÓN BASADO EN LA PARTICIÓN DIFERENCIAL DE ANALITOS ENTRE LA FASE MICELAR Y FASE ACUOSA.

Cuando una molécula neutra es inyectada dentro del sistema la partición diferencial entre micela y agua de esta sustancia sucede. Un orden típico de elusión se

*La imagen fue tomada de la referencia [24]

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

muestra en la Fig. 6*, donde el pico del FEO representa una molécula neutra que no interacciona con las micelas y el último pico es la micela con un compuesto altamente hidrofóbico, mientras que los tres picos de en medio son analitos que interaccionan con diferente intensidad con las micelas.

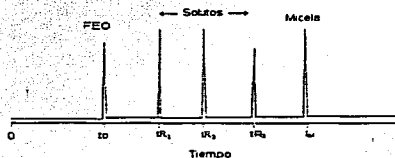


FIGURA 6. VENTANA DE ELUCIÓN OBTENIDA CON SOLUCIONES MICELARES.*

Las ventajas de esta técnica sobre la Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia, CLAE, son: la eficiencia de columna que va desde 60000 hasta 100000 platos teóricos** y la facilidad con la que se puede modificar la fase pseudoestacionaria ya que en CCME cambiar la composición micelar del buffer provoca un esfuerzo mínimo que influye en la eficiencia de separación, mientras que en CLAE la fase estacionaria sólo se puede alterar empleando una columna con otro tipo de relleno.

*Imagen tomada de la referencia [20]

** Equilibrios de distribución entre la fase estacionaria y fase móvil.

1.3. Preconcentración en Línea por Cromatografía Capilar Micelar Electrocinética (PL-CCME).

La CCME es una poderosa técnica que provee métodos de separación y análisis de analitos neutros así como cargados, en cortos tiempos con altas eficiencias y resoluciones, sin embargo su mayor inconveniente así como en las diferentes modalidades de la EC es la poca sensibilidad que presentan en soluciones de baja concentración debido al pequeño paso óptico que existe en el capilar para la detección UV de la diminuta cantidad de volumen de muestra que suele ser introducida que va desde 1 - 5 nl, lo cual limita su aplicación en el análisis de muestras muy diluidas. Diversas estrategias ha sido desarrolladas para resolver este problema tales como:

- Preparación de la muestra para realizar extracciones o derivaciones.
- Uso de poderosos detectores tales como fluorescencia inducida por láser.
- Uso de capilares equipados con celdas de burbuja o celdas zeta.

Los altos costos o la inversión de mucho tiempo son características deplorables, por ello se ha desarrollado metodologías basándose en los principios de la CCME [26-27], mediante las cuales se realiza preconcentración en línea, tal es el caso del *Modo Normal de Preconcentración en Línea* que tiene ventajas sobre las anteriores por su simplicidad y economía ya que no requiere modificación en la instrumentación.

1.3.1. Modo Normal de Preconcentración en Línea por CCME.

El mecanismo está basado en la diferencia de velocidades electroforéticas que hay entre la zona de muestra y la zona de buffer de separación a partir de que la intensidad del campo eléctrico en estas zonas es diferente; la primera presenta un campo eléctrico alto (zona de baja conductividad) mientras que la segunda un campo eléctrico bajo (zona de alta conductividad), por tanto los iones se mueven más rápido en la zona de muestra que en la zona del buffer y su velocidad se reduce cuando alcanzan la zona del buffer, así que los analitos son concentrados en el límite de las dos zonas. Existen dos variantes [28-30], mediante las cuales se realiza esta técnica: a) Preconcentración con migración inversa de micelas: se realiza bajo la supresión del FEO (pH ácido) usando surfactantes aniónicos y voltaje a polaridad inversa y b) Modo Normal de Preconcentración con FEO: se realiza en pH's alcalinos usando surfactantes catiónicos y voltaje a polaridad inversa .

1.3.1.1. Preconcentración en línea con migración inversa de micelas por Cromatografía capilar micelar electrocinética (PLMIM-CCME).

Al preparar una solución (S) de analitos neutros en una matriz de baja conductividad e introducirse al capilar por el extremo catódico mediante presión hidrodinámica en un capilar llenado previamente con el buffer de separación por un tiempo mucho más largo al normal, y aplicando voltaje a polaridad inversa la velocidad electroforética de las micelas aniónicas es dirigida hacia el detector esto es porque la velocidad electroforética de las micelas a pHs ácidos es muy grande en comparación con la del FEO debido a la protonación de los grupos silanol presentes en la superficie del capilar (ver Fig. 7).

Después de cierto tiempo como se muestra en la Fig. 7b las micelas provenientes del vial catódico entran al capilar (tonalidad de gris suave en la región S) debido a su movilidad intrínseca teniendo además una mayor velocidad debido al alto campo eléctrico en la zona de la muestra y cuando interactúan con los analitos los llevan hacia el ánodo concentrándolos en el límite de las dos zonas, (B₁, Fig. 7c), de acuerdo con su factor de retención $ka_x > ka_y > ka_z$; finalmente (Fig. 7d), la matriz es removida del capilar debido a la electroforesis de la zona BGS y los analitos concentrados en el límite B₁ se separan y detectan.

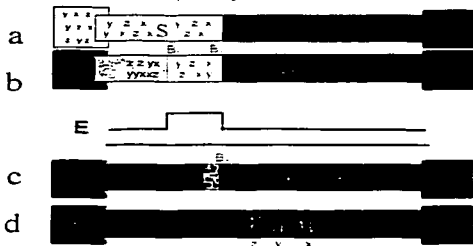


FIGURA 7. EVOLUCIÓN DE LA PLMIM POR CCME. a) Inicio. b) Micelas provenientes del vial catódico entran al capilar y llevan a los analitos al límite B₁; c) los analitos son concentrados en el límite B₁; d) Separación y detección de los analitos ocurre. Las regiones griseas indican la presencia de micelas.

1.3.1.2. Modo Normal de Preconstrucción en Línea (MNPL).

El Principio del MNPL es el mismo que PLMIM excepto por la presencia de FEO el cual es directamente proporcional al pH y éste aumenta conforme lo hace el pH. Por otra parte al exceder la CMC del surfactante catiónico se provoca la inversión del FEO lo cual se contrarresta invirtiendo la polaridad.

1.4. Extracción en fase sólida (EFS).

La extracción en fase sólida [31], es un método muy poderoso utilizado para la preparación rápida de muestras.

La extracción en fase sólida (EFS), es un proceso físico que en su principio se parece a la extracción líquido-líquido*, la diferencia estriba en que la extracción líquido-líquido emplea dos líquidos inmiscibles y la EFS emplea un sólido y un líquido. En la EFS el aislamiento del analito depende de su afinidad diferencial entre el solvente y el material sólido utilizado.

La EFS se utiliza para quitar de la muestra todas las impurezas que interfieren con la molécula que está siendo analizada y produce al mismo tiempo la recuperación del analito. En un principio esto se puede lograr mediante la elución selectiva de los analitos y la retención de los no analitos o por la elución de los no analitos y retención de los analitos.

En el primer caso, el análisis de la fracción eluida puede efectuarse inmediatamente, los analitos pueden concentrarse por evaporación del disolvente y resuspendiéndolos en un volumen menor de disolvente para un análisis posterior.

En el segundo caso, los analitos quedan adsorbidos en la columna de EFS y tienen que ser eluidos. Si se utiliza un gran volumen de muestra, los analitos pueden ser concentrados y algunas veces almacenados temporalmente en la columna. La preconcentración adicional puede efectuarse por evaporación del disolvente como en el caso anterior.

La preconcentración del analito antes de analizarlo baja los límites de detección sin concentrar las interferencias ya que son eliminadas o sus concentraciones son muy reducidas.

* La extracción líquido-líquido está definida como la transferencia de un soluto de una fase líquida a otra fase líquida.

1.5. MÉTODOS DE FORTIFICACIÓN PARA HERBICIDAS.

Los trabajos encontrados en la literatura sobre extracción de herbicidas dinitrofenólicos, carbámicos, uréicos y amídicos de muestras sólidas se aplican sobre diferentes tipos de matrices sólidas, tales como: plantas, suelos, arcillas* y tierras diatomeas**; estas últimas son fortificadas con los herbicidas de estudio y del mismo modo los métodos se aplican a muestras reales [32-33].

Existen diversos métodos de fortificación en diferentes matrices, sin embargo, no se mencionan los motivos del por qué se usan estas matrices para fortificar, sino que depende de cada problema en particular [34]. Por otro lado, no un hay método estándar que sigan los investigadores para preparar las muestras fortificadas, más bien cada investigador sigue su propio método de fortificación. En la literatura se encontraron métodos de fortificación en diferentes matrices como los propuestos en la Tabla 1.

TABLA 1. MÉTODOS DE FORTIFICACIÓN EN DIFERENTES MATRICES.

Matriz	Fortificación	Referencia
Tierras diatomeas	5 g de sólido + 25-500 μ l disolución con herbicidas en hoja de papel aluminio. Se deja de 30 a 60 min. para que se evapore el disolvente (acetónitrilo).	31
Suelo	5 grs de sólido + 50-250 μ l de disolución con herbicidas en una hoja de aluminio. Se deja reposar la muestra por 10 min. para que se evapore el disolvente (cloruro de metilano).	39
Arcillas	500 g de sólido + 200 ml de disolución con herbicidas en un matraz de bola. Se deja reposar la mezcla por 7 días y posteriormente se evapora el disolvente (etiléter) en rotavapor.	32

Las tierras diatomeas son consideradas por una gran diversidad de investigadores como estándares para realizar fortificación de agroquímicos en ellas, esto es por su poca o nula interferencia que provoca su uso a la hora de realizar el análisis. Por otra parte, existe una gran cantidad de artículos (ver referencias 22, 32-33, 40), donde se hace la determinación de herbicidas dinitrofenólicos en tierras diatomeas de ahí el interés de utilizarlas como matrices para la fortificación.

* Las arcillas son materia natural que tiene la composición química de un aluminosilicato, es decir, sílice, alumina y agua, por lo general, está mezclada con una cantidad definida de arena y otros minerales tales como hierro, y álcalis.

**Las tierras diatomeas son un sedimento poroso constituido por acumulación de caparzones silíceos de algas diatomeas. También se le denomina tripoli o harina fosil.

1.6. FACTORES QUE INFLUYEN EN LA REPRODUCIBILIDAD DE LOS PICOS.

La reproducibilidad de un método experimental [35], es importante para llevar a cabo un análisis de rutina con aplicación farmacéutica, ambiental, biomédica, etc. Existe una gran variedad de factores que afectan la reproducibilidad en la electroforesis capilar, por ejemplo, la composición de la matriz de la muestra y el volumen inyectado de la misma ya que las muestras con alto contenido de sales pueden causar calentamiento localizado en la zona de la muestra dando como resultado un pico ensanchado; esto puede eliminarse lavando el capilar con una solución de NaOH 0.1 M y posteriormente con H₂O deionizada después de cada corrida. Otro factor muy importante es la consistencia del FEO ya que si este se mantiene constante se obtendrá reproducibilidad en el tiempo de migración de cada analito, lo cual se logra lavando el capilar después de cada corrida. Las fluctuaciones de temperatura traen consigo la variación de viscosidad del buffer, ya que un aumento de temperatura ocasiona un declive en la viscosidad del buffer dentro del tubo provocando una variación del FEO y de los perfiles de velocidad ocasionando ensanchamiento en los picos, por tanto, para mantener el control de la temperatura se recomienda usar sistemas termostregulados.

La modulación del voltaje o de la velocidad del analito, puede mejorar la señal por el ruido existente de los detectores, la aplicación de un voltaje radial directamente a la pared del capilar. Este enfoque hace posible el mejoramiento de la velocidad y resolución en separaciones.

El flujo de electroosmótico es afectado por: la modificación química de la pared capilar, concentración y el pH del buffer, la adición de surfactantes (a concentraciones por debajo de la concentración micelar crítica), glicerol, etc., que puede actuar como a agentes de solubilización para solutos altamente hidrófobos, adición de disolventes orgánicos y de selectores quirales, principalmente ciclodextrinas.

1.7. VENTAJAS Y DESVENTAJAS.

La electroforesis capilar es una poderosa técnica analítica que se ha usado extensamente debido a su sencillez y a las variantes que ofrece para así obtener separaciones optimizadas para una gran variedad de compuestos. La utilización de capilares estrechos con un diámetro interno generalmente entre 10 a 200 μm para realizar electroforesis ha ampliado el campo de la aplicación de esta técnica ofreciendo las siguientes ventajas:

- La disipación del calor en un tubo capilar es buena y, por lo tanto, los declives de temperatura pueden llegar a ser muy pequeños, permitiendo aumentar el voltaje y así disminuir considerablemente el tiempo de análisis obtenido además de una resolución mayor.

Además ofrece ventajas adicionales sobre otras técnicas analíticas tales como CLAE, CG, como son:

- Un requerimiento mínimo de volumen de muestra y buffer (nI y μl respectivamente).
- La adición de selectores quirales al buffer de trabajo hace posible evitar el uso de columnas quirales de muy alto costo además de que las separaciones obtenidas son muy reproducibles porque el buffer con el selector quiral es renovado después de cada corrida.

En general la EC y sus variantes ofrecen altas eficiencias y cortos tiempos de análisis. Sin embargo el mayor inconveniente que presentan estas técnicas es la poca sensibilidad a bajas concentraciones lo cual puede ser resuelto mediante técnicas de preconcentración en línea por CCME, ECZ o bien ITF.

Capítulo 2

INSTRUMENTACIÓN

2.1 SISTEMA DE ELECTROFORESIS CAPILAR.

Un sistema de EC, consiste básicamente en las siguientes unidades, como se muestra en la Fig. 8^o.

- Electrodo (ánodo y cátodo).
- Depósito buffer (viales) donde se colocan los electrodos.
- Capilar (compartimiento de la separación).
- Sistema de enfriamiento del capilar (convección de aire forzado o líquido).
- Sistema de inyección y detector.

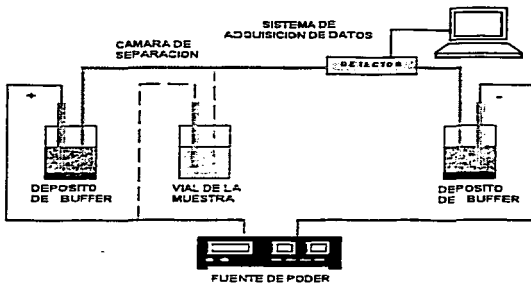


FIGURA 8. SISTEMA GENERAL DE ELECTROFORESIS*

El capilar de separación se llena con el electrolito y se coloca con dos depósitos que también contengan al electrolito; los electrodos son conectados a una fuente de poder, que genera hasta 30 kV y se sumerge en los depósitos por separado. La inyección de la muestra se realiza substituyendo un depósito de buffer por el contenedor de la muestra, un volumen de muestra definido es introducido al capilar ya sea por presión o por la aplicación de voltaje. Después se aplica determinada cantidad

* La imagen fue tomada de la referencia [37]

de voltaje para llevar a cabo la separación, donde las especies de la muestra migran con dirección y velocidad determinadas por su carga y masa, eventualmente pasan por un detector y la señal obtenida se le denomina electroferograma. En EC la fuente de poder es usada para aplicar hasta 30 kV y niveles de corriente de 100 a 300 μ A. La regulación del voltaje (\pm 0.1%) es requerida para mantener la alta reproducibilidad en el tiempo de migración. La fuente de poder debe tener la capacidad de cambiar la polaridad, es decir, que el ánodo sea ahora el electrodo a la salida del capilar, lo cual invertirá la dirección del FEO. Otra característica de la fuente de poder es la habilidad de realizar gradientes de potencial, corriente durante un análisis, lo que facilita utilizar primero en un análisis una rãmpa de voltaje para evitar calentamiento rápido, expansión térmica del buffer, expulsión de la muestra del capilar.

2.1.1. CAPILARES.

Los tubos capilares comúnmente usados son hechos de sílice fundida. Los capilares de sílice fundida abarcan las características requeridas tales como ser químicamente y eléctricamente inertes, transparentes al UV-VIS, flexibles y baratos. Otros materiales tales como cristal o teflón y recientemente polipropileno y nylon han sido utilizados para hacer capilares. Los tubos con un diámetro interno de 10-200 μ m y longitudes de 10-100 cm son utilizados. Los tubos capilares de sílice fundida están revestidos con una capa protectora de poliamida que le confiere maleabilidad. No es necesario usar medios anticonvectivos ya que la disipación de calor en el capilar es rápida de modo que el voltaje puede ser aumentado para reducir el tiempo de análisis y aumentar la resolución de los picos.

2.1.2. DETECTORES.

En todas las modalidades de EC los analitos separados se desplazan pasando por un punto común donde los detectores son semejantes en diseño y función a los de CLAE, sin embargo se encuentra una gran diferencia en los detectores porque en la EC cada ion migra a una velocidad determinada por su movilidad electroforética. Por tanto, las bandas del analito atraviesan el detector a diferentes velocidades, lo cual hace que las áreas de los picos sean ligeramente dependientes de los tiempos de retención. En cambio en CLAE todas las especies pasan a través del detector a la velocidad de la

fase móvil y las áreas de los picos son independientes de los tiempos de retención, normalmente esta dependencia del tiempo no tiene importancia práctica. Los detectores de fluorescencia y absorbancia [36], se han empleado ampliamente en la EC, aunque los últimos son los más comunes realizándose de dos formas:

- **Detección indirecta:** Se ha utilizado el método de detección indirecta de absorbancia para lograr la detección de especies, que por su pequeña absorptividad molar, resultan difíciles de detectar sin derivatización, esto se logra incorporando un cromóforo iónico al tampón de la electroforesis, lo cual hace que el detector reciba una señal constante debida a la presencia de esta sustancia. El analito desplaza algunos de estos iones como en la cromatografía de intercambio iónico, de modo que la señal detectada desciende cuando una banda del analito atraviesa el detector.
- **Detección directa:** El método de detección directa es el más común y se aplica cuando el analito por si solo absorbe luz, es decir, el analito es un compuesto cromóforo.

2.1.3. ELECTROLITO SOPORTE.

La presencia del buffer en el capilar es importante ya que además de amortiguar el medio hace posible que se lleve a cabo la conductividad eléctrica, a continuación se describe los parámetros [37], que determinan su eficiencia:

- **Naturaleza:** Los buffer más usados son: acetato, barbitona, borato, citrato, EDTA, formiato, fosfato, TRIS, donde el borato es utilizado para separar carbohidratos ya que forma complejos con dióles, y como el buffer es el disolvente de la muestra es inevitable que haya difusión de la misma.
- **Concentración:** A medida que la concentración del buffer aumenta, la proporción de corriente conducida por éste también, mientras que la conducción de corriente por parte de la muestra disminuye, con lo que se reduce su velocidad de migración. Una concentración alta de buffer provoca un aumento en la intensidad de corriente global y, consecuentemente, la producción de calor. La concentración baja del buffer reduce la corriente global y se traduce en una menor producción de calor, pero la difusión y la disminución de resolución resultantes son mayores. En otras

palabras al aumentar la concentración del buffer se disminuye el potencial zeta y FEO.

- *pH*: El pH influye notablemente en los compuestos ácidos y alcalinos, ya que si este aumenta el ácido se disocia, mientras que lo contrario ocurre con las bases, por lo que la velocidad de migración de los analitos dependen del pH. En los anfólitos se producen ambos efectos ya que son sustancias que puede aceptar y donar la misma partícula, en este caso un H⁺, por la que la dirección y la magnitud de la migración de los anfólitos también depende del pH.

Al seleccionar un Buffer debe de considerarse que la sensibilidad de FEO a valores de pH muy grandes, por lo que un Buffer para uso en EC debe poseer las siguientes características:

- Buena capacidad de amortiguación en el intervalo seleccionado.
- Baja absorbancia a la longitud de onda de detección.
- Baja movilidad, para minimizar la generación de corriente.

En la Tabla 2 se resume los buffers más empleados con sus respectivos intervalos de amortiguamiento y pka's [3B].

Tabla 2. Tipos de buffer más empleados en la EC.

Químicos	Intervalo de amortiguamiento	pka's	Biológicos	Intervalo de amortiguamiento	pka's
Citrato	2.08 – 5.74	3.05, 4.74, 5.40	MES	5.15 – 7.15	6.15
Acetato	3.75 – 5.76	4.75	ACES	5.90 – 7.90	6.90
Fosfato	1.14 – 3.14 / 6.20 – 8.20	2.12, 7.21, 12.32	MOPS	6.20 – 8.20	7.20
Borato	6.14 – 10.14	9.24	CHES	8.30 – 10.30	9.30
			TAPS	7.40 – 9.40	8.40
			EPPS	7.0 – 9.0	8.0
			TRICINA	7.15 – 9.15	8.15
			TRIS	7.30 – 9.30	8.30

Solventes orgánicos: El uso de un cosolvente orgánico en soluciones micelares (CCME), fue reportado por primera vez por Balchunas y Sepaniak [39], posteriormente Gorse [40], optimizó la separación de compuestos muy hidrófobos que eluyen uno muy cerca del otro. La presencia de un cosolvente orgánico disminuye el FEO y aumenta la ventana de elusión, modificándose el potencial zeta y la viscosidad del medio, ganando resolución en compuestos muy hidrófobos a expensas de tiempos más largos de análisis.

Capítulo 3

GENERALIDADES SOBRE AGROQUÍMICOS

3.1. AGROQUÍMICOS.

Los agroquímicos son cualquier sustancia o mezcla de sustancias químicas que se emplean para controlar plagas y enfermedades así como para aumentar la producción agrícola y mejorar la calidad de cosechas. Los agroquímicos más conocidos generalmente son los insecticidas que sirven para combatir insectos, funguicidas para evitar el desarrollo de hongos, herbicidas para impedir el crecimiento de malas hierbas, rodenticidas, aplicados contra ratas y roedores, fertilizantes, suministrados a la tierra para mejorar las propiedades físicas y químicas de los suelos o proporcionar los principales alimentos de las plantas [41].

Los agroquímicos con actividad plaguicida tales como insecticidas, funguicidas o herbicidas poseen mecanismos de acción similares, tal es el caso de los inhibidores de la respiración. Sin embargo la selectividad de los plaguicidas se debe en muchos casos a que actúan sobre procesos bioquímicos específicos de los organismos afectados, por lo que los mecanismos de acción de los distintos tipos de plaguicidas suelen tener características especiales que hace conveniente estudiarlos separadamente por lo que en este trabajo solamente se estudia a siete compuestos con actividad herbicida.

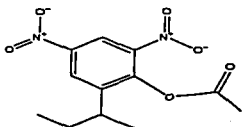
Los herbicidas presentan mecanismos de acción muy variados y algunos actúan por varias vías simultáneamente o en forma distinta según la concentración. En general, los herbicidas pueden interferir en el metabolismo energético, en la biosíntesis, en el desarrollo o en la reproducción, pueden alterar las membranas o paredes celulares, o ser citotóxicos.

Actualmente [42] existe una gran variedad de herbicidas en uso, con un amplio intervalo de propiedades fisicoquímicas las cuales determinan su comportamiento en soluciones y su actividad biológica. El tamaño molecular, ionización y volatilidad son propiedades claves, pero generalmente una o dos de estas tienen influencia dominante, por lo que los herbicidas pueden ser clasificados en diferentes tipos de acuerdo al grado de toxicidad, acción selectiva y estructura química del compuesto usado.

3.2. PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE HERBICIDAS ANALIZADOS.

En este trabajo de tesis se desarrollaron los métodos experimentales para la separación y análisis así como su preconcentración en línea de siete herbicidas de los cuales tres son dinitrofenólicos, dos carbámicos, un ureico y el último un amídico. A continuación se describe las propiedades fisicoquímicas más importantes de los herbicidas analizados [43].

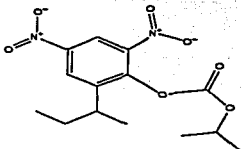
ACETATO DE DINOSEB



Acetato de 2-sec-butil-4, 6-dinitrofenilo, Aretit. $C_{12}H_{14}N_2O_6$. P. M. 282.25 g/mol. Aceite de color marrón muy viscoso con olor a vinagre, punto de fusión 26 - 27 °C; $\eta_D^{20} = 1.537$; su solubilidad en agua es de 1.6 g/l a 20°C; soluble en diclorometano, acetonitrilo, heptano, éter, y en todos los disolventes aromáticos, presión de

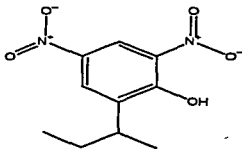
vapor 183 mPa a 60 °C, se hidroliza lentamente en agua.

DINOBTUNO



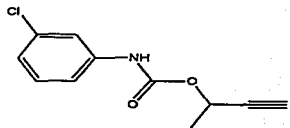
Carbonato de (2,4-dinitro-6-sec-butilfenil) isopropil; Acrex, Dessin, Dinofenil. $C_{14}H_{18}N_2O_7$; P. M. 326.31 g/mol. Polvo blanco, punto de fusión 59.3 - 60.3 °C, soluble en diclorometano, acetonitrilo y en todos los disolventes aromáticos. Se hidroliza lentamente en agua.

DINOSEB



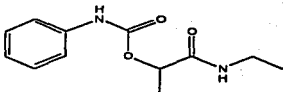
2-sec-Butil-4,6-dinitrofenol; 4,6-dinitro-2-(1-metilpropil) fenol; DNBP. $C_{10}H_{12}N_2O_5$. P. M. 240.22 g/mol. Cristales anaranjados con olor picante, punto de fusión 40.2 - 41.8 °C, su solubilidad en agua es de 100 mg/l a 25 °C, soluble en etanol al 95%, éter, heptano, acetonitrilo, y en la mayoría de disolventes orgánicos, presión de vapor de 6.7 mPa a 25 °C, $pK_a = 4.62$, en solución acuosa se comporta como ácido débil.

CHLORBUFAM



N-3-clorofenilcarbamato de sec-butino; Chlorbufame, $C_{11}H_{10}ClNO_2$, P. M. 223.7 g/mol. Cristales incoloros, punto de fusión 39 - 40 °C, presión de vapor 2.1 mPa a 20°C, su solubilidad a 20°C: 540mg/l de agua; 280 g / kg de acetona; 95 g/kg de etanol; 286 g/kg de metanol y en la mayoría de disolventes orgánicos. Se hidroliza lentamente en agua.

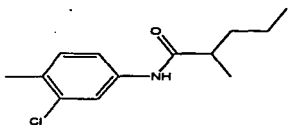
CARBETAMIDA



de disolventes orgánicos, se hidroliza lentamente en agua.

N-Fenilcarbamato de N-etilpropanamida; N-etil-2 - (fenilcarbomoiloxil) - propionamida. $C_{12}H_{15}N_2O_3$, P. M. 236.27 g/mol. Cristales incoloros, punto de fusión 119°C, su solubilidad a 20°C: 3.5 g/l de agua; soluble en acetona, acetonitrilo, diclorometano, dimetilformamida, etanol, metanol, y en la mayoría

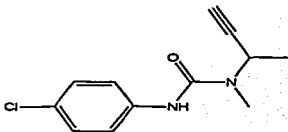
PENTANOCHLOR



N-(3-cloro-4-meilfenilo)-2-metilpentanamida.

$C_{13}H_{18}ClNO$, P. M. 239.74 g/mol. Cristales incoloros, punto de fusión 82 - 86 °C, su solubilidad a 20°C: 8 - 9 mg/l de agua; 460 g/kg de di-isobutilcetona, soluble en acetona, acetonitrilo, diclorometano, y en la mayoría de disolventes orgánicos, se hidroliza lentamente en agua.

BUTURON



3-(p-Clorofenil)-1-metil-1-sec-butino-urea; Eptapur. $C_{12}H_{13}ClN_2O$, P. M. 236.70 g/mol. Cristales, punto de fusión 147.8 - 148.9; soluble en diclorometano acetonitrilo y en la mayoría de disolventes orgánicos.

3.3. VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE SU USO.

El consumo de herbicidas es con la finalidad de mantener un control de malezas en cultivos de maíz, arroz, hortalizas, sorgo, caña, fruta cítrica, guisantes, etc., sin embargo, los herbicidas dinitrofenólicos [44], son altamente tóxicos para toda forma de vida; son venenos de contacto que tiene la habilidad de penetrar hasta el sitio de acción de la célula. La toxicidad resulta de su interferencia con la respiración a causa del desacoplamiento de la fosforilación oxidativa, es decir, se inhibe la síntesis de ATP, este proceso es común tanto para las plantas como para los mamíferos, por lo que no debe sorprender que todos los dinitrofenoles tengan un alto grado de toxicidad. Ya que el dinoseb y sus sales (acetato de dinoseb, dinobuton, etc.) son productos químicos altamente tóxicos para toda forma de vida el Catálogo Especial de Plaguicidas publicado por la CICOPLAFEST, los cita como plaguicidas cuya importación, fabricación, formulación, comercialización y uso esta prohibido en México [45]. Este tipo de plaguicidas se comercializan en países Europeos (España, Inglaterra, Alemania, etc.) y en el Caribe (exclusivamente Cuba).

Los herbicidas ureicos, carbámicos y amídicos [46], son utilizados en diversos cultivos tales como: cítricos, alfalfa, cebolla, etc., su acción se ejerce normalmente por la absorción a través de las raíces u hojas. La toxicidad resulta de su interferencia en la *reacción de Hill*, por lo que al interrumpirse el ciclo de la fotosíntesis, cesa la asimilación de bióxido de carbono, la formación de hidratos de carbono y en consecuencia la planta detiene su crecimiento, sobreviniendo la clorosis** para finalmente secarse y morir. Este tipo de plaguicidas se comercializan en diversos países tales como Canadá, U. S. A., y en la mayoría de los países Europeos. Su uso en México al igual que el de dinitrofenoles está prohibido.

La razón por la que se permite el uso de herbicidas dinitrofenólicos, carbámicos, ureicos y amídicos en esos países es porque su aplicación es estrictamente disciplinada y supervisada bajo las autoridades correspondientes .

* La reacción de la fase luminica o reacción de Hill se llama así por haber descubierto Hill que el NADP podia ser substituido por cualquier aceptor de hidrogeno, capaz de reducirse y ejemplos clásicos son que el NADP se sustituye por ferrocianuro potásico o por quinona.

** Amarillez de la hoja debido a la destrucción de la clorofila.

Cuando el plaguicida se aplica al cultivo, sufre varios procesos de difusión y transformación, como son la volatilización, absorción y degradación biológica o química, los cuales provocan serios daños al ambiente (aire, agua y suelo), así como a la flora y la fauna. Los daños ocasionados por el uso de agroquímicos, son irreversibles, se ha visto con frecuencia la contaminación de los mantos freáticos y el suelo, provocando la eliminación de organismos benéficos de los ecosistemas naturales, dando pauta al crecimiento de ciertas plagas, por lo que se genera dependencia en la utilización de estos productos. En cuanto a la salud del hombre, se han ocasionado intoxicaciones, en algunos casos la muerte por el uso inadecuado en la aplicación de estos agroquímicos.

Capítulo 4 METODOLOGÍA

4.1. MATERIAL Y REACTIVOS.

Todas las mediciones se llevaron a cabo con un equipo de electroforesis capilar P/ACE™ MDQ, Beckman Coulter (Fullerton, CA, USA), utilizando capilares de sílice fundida de 50 µm de diámetro interno, 51.3 cm de longitud total (40.8 cm long. efectiva).

Entre los reactivos utilizados están el Dodecil sulfato de sodio (SDS), Bromuro de cetil trimetil amonio (CTAB), de Sigma-Aldrich (México), acetato de dinoseb, buturon, carbetamida, chlorbufam, dinobuton, dinoseb, y pentanochlor de Riedel de Haen grado Pestanal (Munich Alemania), la formulación comercial Acarelle 40-EC con el principio activo dinobuton de Carmona y Sabido, S. L. (Badajoz, España), el ácido bórico, clorhídrico y cítrico así como el hidróxido de sodio, tetraborato de sodio, fosfato monosódico y acetonitrilo fueron adquiridos de J. T. Baker (Xalostoc, Estado de México, México), las tierras diatomeas fueron obtenidas de yacimientos localizados en el estado de Chiapas, México. Dichas tierras fueron proporcionadas por la sección de Química Orgánica (FES-C, UNAM).

4.2. ANÁLISIS Y SEPARACIÓN DE HERBICIDAS PRESENTES EN DOS MEZCLAS.

Con base a lo anteriormente descrito acerca de la EC, sus variantes y sobre las propiedades fisicoquímicas de los herbicidas estudiados (ver Fig. 8), la separación de estos en una mezcla se realizó utilizando una modalidad de la EC llamada CCME, la cual es especialmente útil en donde se puede separar analitos neutros, debido a la presencia de micelas en el buffer, aunque también es posible la separación de analitos cargados eléctricamente.

Los herbicidas estudiados son moléculas neutras en todo el intervalo de pH en solución acuosa exceptuando el Dinoseb que posee propiedades ácido-base con un valor de pKa de 4.62, por lo que solo puede existir en forma neutra a pH's menores de 4.62 y comportándose como anión a pH's mayores de 4.62. Debido a esto se seleccionó la técnica de CCME para llevar a cabo la separación de los herbicidas en estudio.

Los agroquímicos estudiados fueron agrupados en dos familias de acuerdo a las similitudes que presentan en los grupos funcionales, proponiéndose los siguiente:

- Grupo I: herbicidas carbámicos (Carbetamida, Ctd, y chlorbufam, Cbm), herbicida uréico (Buturon, Btn) y herbicida amídico (Pentanochlor, Ptc).
- Grupo II: herbicidas dinitrofenólicos (Acetato de dinoseb, AcDs, dinobuton, Dbn, y dinoseb, Ds).

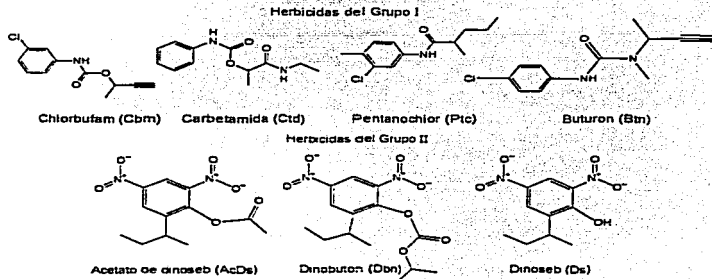


FIGURA 8. CLASIFICACION DE HERBICIDAS ANALIZADOS

Para determinar el efecto que ejerce el pH, concentración y naturaleza del buffer, así como la concentración y tipo de surfactante (SDS), sobre parámetros experimentales tales como: Resolución, R_s , Eficiencia (Número de platos teóricos), N , en el análisis de los dos grupos se realizó un diseño experimental tradicional de un factor a un tiempo para llegar así a las condiciones óptimas de análisis y separación de los analitos del Grupo I (Btr, Ctd, Cbm y Ptc) y del Grupo II (AcDs, Dbn y Ds)

Procedimiento.

El acondicionamiento del capilar se realizó cada inicio de día lavándolo a 20 psi. con NaOH 0.1 N durante 10 min., seguido de agua deionizada (10 min.) y finalmente con el buffer de corrida o separación (10 min.). Las soluciones de los herbicidas se introdujeron por el extremo anódico del capilar a 0.5 psi. durante 5 s. El voltaje aplicado en el proceso de separación fue de 30 kV a polaridad normal. El capilar fue lavado entre cada análisis con agua desionizada (3 min.), seguido de buffer de corrida (7 min.) para así asegurar la reproducibilidad en cada medición. Otras condiciones son descritas en las figuras.

Preparación de la muestra.

Los analitos (herbicidas) fueron disueltos en una solución de Acetonitrilo, AcN, al 35 % v/v, como se indica a continuación.

- Grupo I. Herbicidas carbámicos, uréico y amídico: Se pesó la cantidad de 3.5 mg de cada uno de los analitos excepto de Cbm del cual se pesó 4.2 mg; se disolvieron por separado en 1500 μ l de AcN de cada solución se tomó un volumen de 130 μ l, se mezclaron entre si y se llevaron a un volumen total de 1500 μ l con agua deionizada (Sol. A). La concentración final de cada herbicida fue de: 205.22 ppm. Btr; 209.79 ppm. Ctd; 243.53 ppm. Cbm y 209.79 ppm Ptc.
- Grupo II. Herbicidas dinitrofenólicos: Se pesó la cantidad de 6.8 mg de cada uno de los analitos y se disolvieron por separado en 1500 μ l de AcN, de cada solución se tomo un volumen de 175 μ l, se mezclaron entre si y se llevó a un volumen total de 1500 μ l con agua deionizada (Sol. B), la concentración final de cada herbicida fue de: Ds 532.68 ppm., Dbn 529.48 ppm. y AcDs 523.07 ppm.

4.3. PRECONCENTRACIÓN EN LÍNEA CON MIGRACIÓN INVERSA DE MICELAS MEDIANTE CROMATOLOGRAFÍA CAPILAR MICELAR ELECTROCRINÉTICA (PLMIM-CCME) DE LOS HERBICIDAS ESTUDIADOS.

La PLMIM-CCME de analitos neutros es un proceso totalmente cromatográfico ya que al realizarse bajo la supresión del FEO (pHs ácidos), con surfactantes aniónicos (principalmente SDS) y voltaje a polaridad inversa depende de la interacción analito-micela. Su objetivo es disminuir los *Límites de Detección*, LD's, por lo que la preconcentración de los herbicidas (Fig. 8) se realizó mediante esta técnica ya que todos los analitos a pH's ácidos son neutros.

Para determinar el efecto que ejerce la naturaleza de la matriz así como el tiempo de introducción de muestra en la PLMIM-CCME de los herbicidas se realizó un estudio en términos de altura y forma de picos, mediante un diseño experimental de un factor a un tiempo, evaluándose el tiempo de introducción de muestra y la naturaleza de la matriz, para llegar así a la obtención de las condiciones óptimas de PLMIM-CCME para los analitos del *Grupo I* y *Grupo II*. Los LD's bajo condiciones normales (mismas condiciones de PLMIM-CCME exceptuando el tiempo de introducción de muestra) y de PLMIM-CCME para cada grupo de herbicidas se determinaron mediante una curva de calibración, teniendo en cuenta la razón S/N = 3 (señal / ruido).

Procedimiento.

El Precondicionamiento del capilar es el mismo que fue descrito anteriormente (ver sección 4.2). Los analitos (herbicidas) fueron preparados en matrices de baja conductividad y se introdujeron por el extremo catódico del capilar mediante presión hidrodinámica a 0,5 psi., y tiempos de introducción variable, y al término de introducción de muestra se aplicó voltaje a polaridad inversa. Del mismo modo el capilar fue lavado entre cada análisis con agua deionizada (3 min.), seguido de buffer de corrida (7 min.), para así asegurar la reproducibilidad en cada medición. Otras condiciones descritas en las figuras.

Preparación de muestras.

La preparación de las muestras consistió en hacer soluciones de concentraciones más diluidas a partir de la Sol. A y Sol. B (ver detalles de preparación de soluciones en la Tabla 5).

4.4. EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA (EFS).

La extracción en fase sólida se realizó utilizando cartuchos Sep-pak C₁₈ debido a la naturaleza hidrófoba de los analitos, el procedimiento que se siguió para realizar la EFS fue el siguiente:

- Precondicionamiento del cartucho (etapa de activación y enjuague): Primeramente se activo el cartucho con 5 ml de metanol (MeOH) a un flujo de 2 ml/min. seguido del enjuague a la misma velocidad de flujo (2 ml/min.), con 5 ml de agua deionizada.
- Extracción de analitos: En un cartucho precondicionado se eluyó a través de él la solución de interés cuyo volumen en todos los casos fue de 50 ml; a un flujo de 1 ml/min., seguida de 5 ml de agua deionizada a un flujo de 2 ml/min., finalmente se dejó secar y reposar durante 5 min.
- Recuperación de la muestra: La recuperación de la muestra se realizó utilizando como disolvente orgánico 1 ml de Acetonitrilo (ACN), a un flujo de 0.5 ml/min.
- Todas las soluciones del Grupo I y al Grupo II (tablas 10 y 12 respectivamente), llevaron el mismo tratamiento.

Preparación de muestras.

A partir de la Sol. A y Sol. B se prepararon dos soluciones (Sol. A1 y Sol. B1), de 10 ml diluidas a una razón de 1:10; a partir de ellas se prepararon soluciones de concentraciones más bajas, siendo A3, A4, A5 y A6 para los herbicidas del Grupo I y B2, B3, B4 y B5 para los herbicidas del Grupo II (ver detalles de preparación de soluciones en las Tablas 10 y 12 respectivamente).

4.5. COMBINACIÓN DE LA EFS CON LA PLMIM-CCME.

A los extractos provenientes de la EFS de las soluciones de los Herbicidas del Grupo I y Grupo II se les aplicó el método de PLMIM-CCME, (previa optimización de todas las variables analizadas), según sea el caso.

4.6. ANÁLISIS DE UN AGROQUÍMICO DINITROFENÓLICO PRESENTE EN UNA FORMULACIÓN COMERCIAL.

El método analítico de separación simultánea y preconcentración en línea de los herbicidas del Grupo II (previa optimización de todas las variables analizadas), fueron aplicados para determinar cualitativamente la presencia de un herbicida dinitrofenólico

(Dbn) presente al 40 % p/v, en una formulación de origen comercial de nombre ACARELTE 40-EC. También, el método de separación simultánea fue aplicado al extracto de tierras diatomeas fortificadas con dicho producto.

Preparación de muestra.

La preparación de la muestra se realizó de acuerdo a lo siguiente:

- a) Se preparó una solución de 25 ml con una concentración de 400 ppm. Del principio activo *Dinobuton* (Dbn), presente en la solución del producto comercial Acarelte 40-EC al 40 % p/v, disolviendo 25 mg de la solución Acarelte 40-EC (la razón por la cual se tomó unidades de masa y no de volumen es porque la solución es muy viscosa), en 8.75 ml AcN llevándola a un volumen total de 25 ml con agua deionizada la cual se etiquetó con el nombre ACA-40A.
- b) La solución que se empleó para la fortificación de las tierras diatomeas con el herbicida Acarelte 40-EC se preparó disolviendo 25 mg de la solución Acarelte 40-EC en 5 ml AcN, para obtener una concentración 2000 ppm. de Dbn, dicha solución se etiquetó con el nombre ACA-40B.
- c) A partir de la solución ACA-40A, se preparó una solución de 25 ml (ACA-40C) y una solución de 50 ml (ACA-40E), ambas a una concentración de 8 ppm.

Procedimiento de fortificación de tierras diatomeas.

- a) Se pesó 1 g de tierras diatomeas en un vaso de precipitado de 50 ml y se extendió en el fondo del mismo.
- b) Se vertió en el vaso de precipitado que contenía las tierras diatomeas la solución ACA-40B.
- c) Se tapó con un papel filtro y se dejó en reposo durante 20 min. para que se evaporara el exceso de disolvente.

Procedimiento de extracción del Dbn.

- a) Se puso una barra magnética al vaso que contenía las tierras diatomeas fortificadas, una vez concluido el tiempo de reposo.
- b) Se vertieron 10 ml de AcN y se agitó el contenido del vaso en un agitador magnético durante un período de 15 min.
- c) Se filtró el extracto en un matraz Kitazato,

- d) El extractante se trasvasó a un matraz volumétrico de 25 ml llevándolo al aforo con agua deionizada, esta solución se etiquetó con el nombre de ACA-40D.
- e) Para determinar el porcentaje de recuperación de la sol. ACA-40D se procedió a medirla al igual que la sol. ACA-40A en el equipo de Electroforesis Capilar, donde esta última es del valor de concentración esperada en la solución ACA-40D, suponiendo un 100% de recuperación en la extracción.
- f) Finalmente, se midió en el equipo de Electroforesis la solución ACA-40C con el método de PLMIM-CCME para el Grupo II (herbicidas dinitrofenólicos).

Procedimiento de la PLMIM-CCME combinada con el EFS para el análisis del agroquímico comercial.

- a) Este procedimiento se llevo a cabo conforme fue indicado anteriormente (sección 4.4 y 4.5), la muestra que fue eluida a través del cartucho C₁₈ fue ACA-40E; y el extracto obtenido (ACA-40F), que fue analizado con el método optimizado de la PLMIM-CCME para herbicidas del Grupo II.

Capítulo 5

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Los primeros experimentos se realizaron a un pH ligeramente alcalino con un valor de 8.5, utilizándose boratos como buffer a una concentración 20 mM, con la adición de 25 mM SDS, de esta forma se asegura que el FEO sea alto y se propicia la formación de micelas y cuando estas interactúan con los analitos la partición diferencial entre la fase pseudoestacionaria (micela) y la fase móvil (buffer), más el fenómeno electroforético lleva a cabo la separación de los solutos y por ende su detección. Estos experimentos se llevaron a cabo empleando un detector de arreglo de diodos se obtuvieron los espectros de absorción de los herbicidas estudiados y usando el equipo de EC se determinó la longitud máxima de onda de absorción, (λ_{max}). Fig. 9.

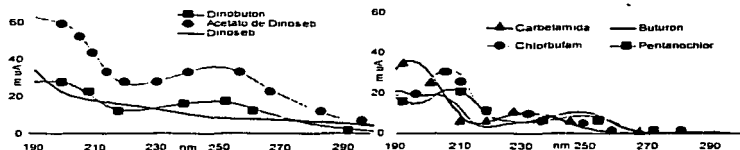


FIGURA 9. ESPECTROS DE ABSORCIÓN DE HERBICIDAS ESTUDIADOS

En los análisis subsecuentes la detección se llevó a cabo con un espectrofotómetro UV-Vis, a una longitud de λ fija de 214 nm ya que a un valor menor el electrolito soporte contribuye considerablemente a la absorción originando una línea base con mayor ruido (electroferogramas no mostrados), y a una λ mayor la absorción de los analitos decrece considerablemente.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

5.1. HERBICIDAS DEL GRUPO I (HERBICIDAS CARBÁMICOS, URÉICO Y AMÍDICO).

5.1.1. EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE SDS.

Siendo que los herbicidas del Grupo I son neutros en toda la escala de pH, el factor más importante es la concentración del surfactante SDS por lo que se evaluó el efecto que ejerce su concentración encontrándose lo siguiente, Fig. 10:

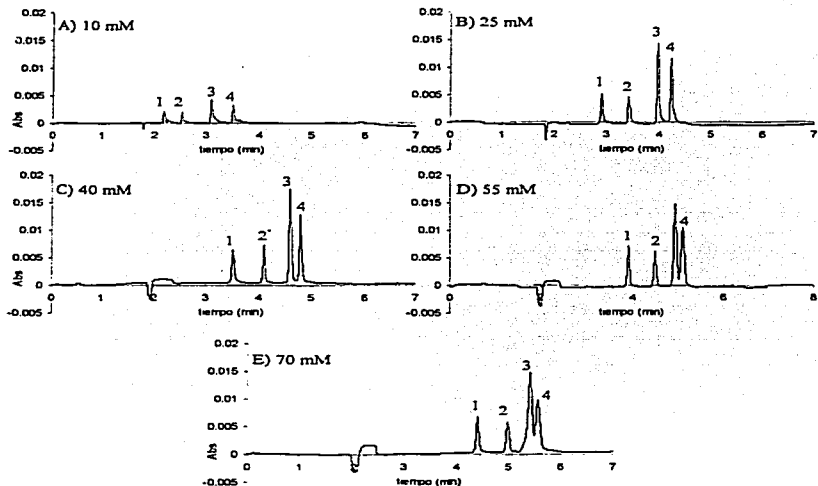


FIGURA 10. ELECTROFEROGRAMAS OBTENIDOS AL EVALUAR LA INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN DE SDS EN LA SEPARACIÓN DE LOS HERBICIDAS DEL GRUPO I. Condiciones: Capilar de sílice fundida de 50 μm D. i., long. total 52.7 cm, long. efectiva 41.8 cm, 25 mM de buffer de boratos; pH 8.5; más la adición de diferentes concentraciones de SDS; 30 kV voltaje aplicado a polaridad normal, 20 $^{\circ}\text{C}$. detección a 214 nm. Siendo Cid (1), Bin (2), Cbm (3), Ptc (4).

De acuerdo con la Fig. 10, se observa que efectivamente la concentración de SDS afecta significativamente la forma y altura de los picos así como el grado de separación de los analitos, encontrándose que existe una mejora considerable en la forma y altura de los picos a un valor de 40 mM de SDS. Por otro lado a valores de 25 y 40 mM de SDS, se aprecia un mayor grado de separación comparado con los demás experimentos realizados.

En los gráficos de la Fig. 11 se analiza el efecto de la resolución (R_s) y eficiencia (N) de los picos en función de la concentración de SDS, donde la resolución observada en esta figura esta referida a los analitos Ptc y Cbm los cuales presentan un R_s mucho menor comparado con Ctd y Btn.

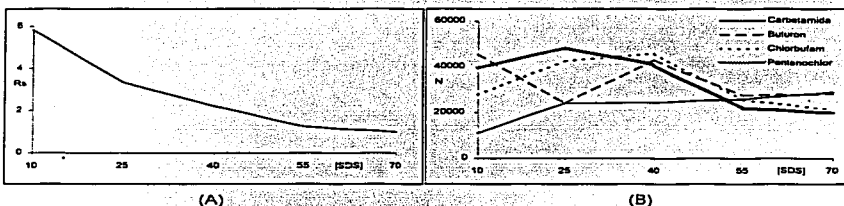


FIGURA 11. GRÁFICAS DEL ANÁLISIS DEL EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DEL SDS SOBRE LA RESOLUCIÓN Y EFICIENCIA DE LOS HERBICIDAS DEL GRUPO I. Mismas condiciones de la Fig. 10

En la Fig. 11-A podemos observar que la R_s para Ptc y Cbm disminuye a concentraciones mayores de SDS. Por otro parte, examinando la Fig. 11-B se observa que la eficiencia de los picos de Ptc, Cbm y Btn (40951, 45850 y 43107 respectivamente), es máxima a una concentración de 40 mM de SDS mientras que para Ctd su valor de eficiencia máximo se alcanza a una concentración de 25 mM de SDS y a partir de ese valor no existe un cambio significativo, por lo que el valor de 40 mM de SDS se considera como óptimo, además de que la resolución para Ptc y Cbm a ese valor de concentración es alta (2.21).

5.1.2. EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE ELECTROLITO SOPORTE.

Una vez optimizada la concentración de SDS (40 mM), se procedió a evaluar el efecto que ejerce la concentración del buffer (electrolito soporte), sobre la separación de los analitos, Fig. 12.

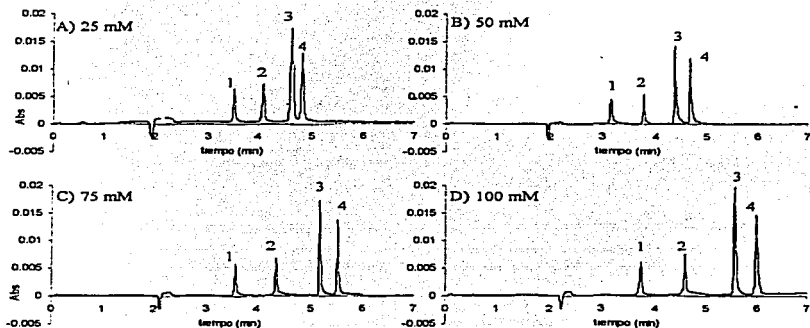


FIGURA 12. ELECTROFEROGRAMAS OBTENIDOS AL EVALUAR LA INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN DE ELECTROLITO SOPORTE EN LA SEPARACIÓN DE LOS HERBICIDAS DEL GRUPO I. Mismas condiciones de la Fig. 10 excepto que se fija la concentración de SDS a 40 mM, concentración de electrolito soporte. Siendo Cid (1), Bin (2), Cbm (3), Ptc (4).

Como se observa en la Fig. 12, a mayor concentración de buffer los picos son más altos y delgados, sin embargo, el tiempo de análisis se vuelve más extenso conforme se aumenta su valor.

En cuanto a la resolución y eficiencia de los picos, Fig. 13, tenemos que la R_s de Ptc y Cbm aumenta a concentraciones mayores de electrolito soporte (ver Fig. 13-A), encontrándose que la mayor R_s (5.71) fue a una concentración de 75 mM de buffer. Donde la R_s en esta figura esta referida a los analitos Ptc y Cbm.

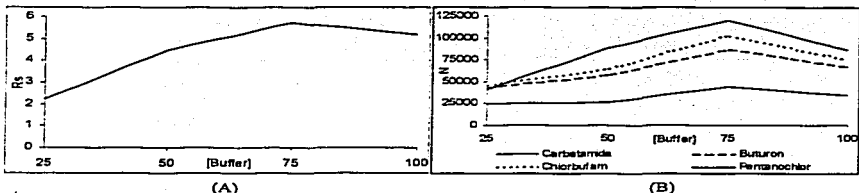


FIGURA 13. GRÁFICAS DEL ANÁLISIS DEL EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DEL ELECTROLITO SOPORTE SOBRE LA RESOLUCIÓN Y EFICIENCIA DE LOS HERBICIDAS DEL GRUPO II. Mismas condiciones de la Fig. 12

La misma tendencia se observa para la eficiencia de los picos (Fig. 13-B), en donde la mayor eficiencia para los cuatro analitos es a una concentración de 75 mM de buffer, lo cual se debe a la disminución de la velocidad de migración y difusión que experimentan los analitos al aumentar la fuerza iónica del buffer.

La concentración de electrolito soporte sobre la eficiencia de Ctd es un parámetro de muy poca influencia (ver Fig. 13-B), ya que su modificación no provoca un cambio significativo en la eficiencia obtenida del pico para este componente.

No se realizaron más experimentos a concentración mayor a 100 mM, ya que empieza a decrecer la resolución y eficiencia, debido al calor de Joule generado al aumentar la fuerza iónica del buffer.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

5.1.3. EFECTO DEL pH DEL BUFFER.

Una vez ya optimizadas las concentraciones de surfactante y buffer (40 mM y 75 mM respectivamente), obtenidas en los apartados anteriores se procedió a evaluar el efecto que ejerce el pH del buffer sobre la forma y altura de los picos así como en el tiempo de análisis en la separación. Los resultados de estos experimentos se muestran en la Fig. 14.

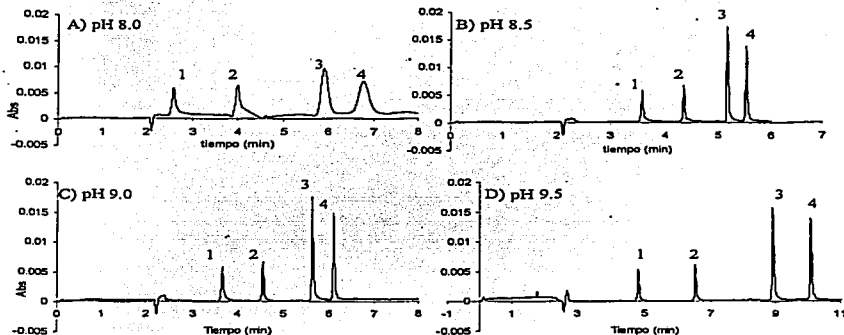


FIGURA 14. ELECTROFEROGRAMAS OBTENIDOS AL EVALUAR EL EFECTO DEL pH SOBRE EN LA SEPARACIÓN DE LOS HERBICIDAS DEL GRUPO I. Mismas condiciones de la Fig. 12, excepto que se fija la concentración de SDS y de electrolito soporte a 40 mM y 75 mM respectivamente, variándose el pH del buffer. Siendo Ctd (1), Btn (2), Cbm (3), Ptc (4).

El intervalo de pH's evaluados están en el rango básico, por lo que los experimentos se llevaron a cabo bajo la presencia de FEO alto, es decir, la detección de los analitos se realizó a polaridad normal, (ánodo al sitio de inyección). En la Fig. 14, se muestra la influencia que resulta de modificar el pH del buffer sobre la separación de los herbicidas del Grupo I, encontrándose que a valores de pH ≥ 8.5 se logra una mejora considerable en la altura y forma de los picos comparados con los obtenidos a pH 8.0; sin embargo, conforme se aumenta el pH el tiempo de análisis se incrementa en forma considerable (Fig. 14-D).

Como se muestra en los gráficos de la Fig. 15 la resolución y eficiencia de los picos, tenemos que la R_s de Ptc y Cbm aumenta a pH's ≥ 8.5 (ver Fig. 15-A), donde la R_s observada esta referida a los analitos Ptc y Cbm.

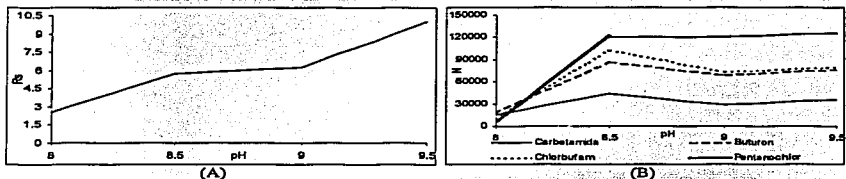
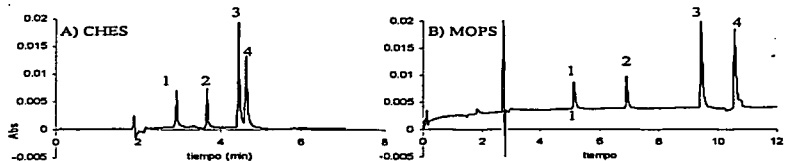


FIGURA 15. GRÁFICAS DEL ANÁLISIS DEL EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DEL ELECTROLITO SOPORTE SOBRE LA RESOLUCIÓN Y EFICIENCIA DE LOS HERBICIDAS DEL GRUPO II. Mismas condiciones de la Fig. 14

Mientras que en la Fig. 15-B se aprecia que la eficiencia llega a un valor máximo para todos los analitos a pH 8.5 y a pH's mayores ya no cambia en forma significativa. Mientras que en el gráfico de la Fig. 15-A la resolución aumenta a pH's mayores, por lo que se decide tomar como pH óptimo el valor de 8.5; y así no sacrificar en un mayor tiempo de análisis; obteniéndose a ese valor una R_s para Ptc y Cbm muy alta (5.71) lo cual indica que han sido satisfactoriamente separados.

5.1.4. EFECTO DE LA NATURALEZA DEL ELECTROLITO SOPORTE.

Para determinar la influencia que ejerce la naturaleza del electrolito soporte sobre la resolución y eficiencia de los picos en el análisis de los herbicidas del Grupo I, se realizó a una concentración de 75 mM de buffer el cual se modificó en cada análisis, Fig. 16.



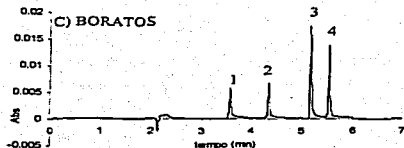


FIGURA 16. ELECTROFEROGRAMAS OBTENIDOS AL EVALUAR LA INFLUENCIA QUE EJERCE LA NATURALEZA DEL ELECTROLITO SOPORTE SOBRE LA SEPARACIÓN DE LOS HERBICIDAS DEL GRUPO I. Mismas condiciones de la Fig. 14, excepto que se fija el pH a 8.5; modificándose la naturaleza del buffer. Siendo Cid (1), Btn (2), Cbm (3), Ptc (4).

Analizando los electroferogramas de la Fig. 16, se encuentra que la altura y forma de los picos no cambia significativamente al modificar la naturaleza del electrolito soporte, sin embargo, el tiempo de análisis obtenido al emplear MOPS comparado con el CHES o Boratos es mucho más extenso.

El efecto que ejerce la naturaleza del buffer sobre la resolución y eficiencia de los picos se ilustra en los gráficos de la Fig. 17, donde la resolución esta referida a los analitos Ptc y Cbm.

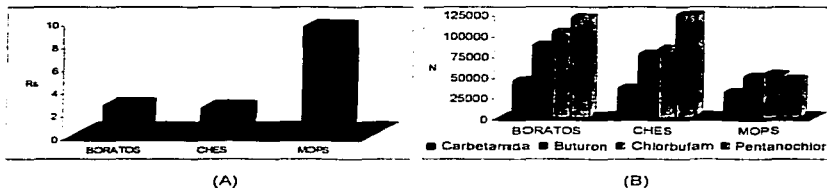


FIGURA 17. GRÁFICAS DEL ANÁLISIS DEL EFECTO DE LA NATURALEZA DEL ELECTROLITO SOPORTE SOBRE LA RESOLUCIÓN Y EFICIENCIA DE LOS PICOS DEL GRUPO I. Mismas condiciones de la Fig. 16

Observando la Fig. 17-A podemos inferir que la R_a para el Ptc y Cbm es mucho mayor cuando se usa buffer de MOPS que cuando se usa CHES o BORATOS, sin embargo, al examinar la Fig. 17-B, se encuentra que la eficiencia de todos los analitos

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

obtenida usando buffer de CHES o BORATOS son muy similares e incluso y ligeramente mayores usando buffer de BORATOS que usando buffer de CHES. Mientras tanto con el buffer de MOPS sucede todo lo contrario las eficiencias son de valores muy pequeños comparados con los obtenidos con buffer de CHES o BORATOS. De acuerdo con lo anterior se elige como naturaleza óptima del buffer al BORATOS además de que presenta buena capacidad de amortiguamiento en el intervalo de pH seleccionado, baja absorbancia a la longitud de onda de detección (214 nm), es económico y común.

5.1.5. EFECTO DE LA NATURALEZA DEL SURFACTANTE

Finalmente se evaluó la influencia que ejerce la naturaleza del surfactante sobre la separación, mediante mediciones con dos surfactantes de diferente polaridad, es decir, se empleo un surfactante aniónico (SDS) y un catiónico (CTAB), Fig. 18.

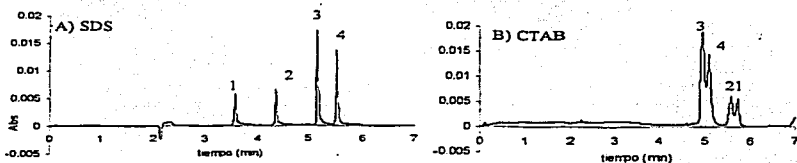


FIGURA 18. ELECTROFEROGRAMAS OBTENIDOS AL EVALUAR EL EFECTO QUE EJERCE LA NATURALEZA DEL SURFACTANTE SOBRE LA SEPARACIÓN DE LOS HERBICIDAS DEL GRUPO II. Mismas condiciones de la Fig. 16 excepto que se fija la naturaleza del electrolito soporte (buffer de boratos), se van la naturaleza del surfactante fijándose la concentración a 40 mM: A) 30 kV, polaridad normal; B) 30 kV polaridad inversa. Siendo Ctd (1), Btn (2), Cbm (3), Ptc (4).

Al modificar naturaleza del surfactante se encontró que la altura y forma son muy similares, sin embargo, al usar CTAB (Fig. 18-B) como fase pseudoestacionaria no se logró una total separación de los picos, además de que se cambia el orden de elución de los herbicidas lo cual se debe a las diferentes interacciones que exhibe el analito entre la micela y buffer.

El efecto que ejerce la naturaleza del surfactante sobre la resolución y eficiencia de los picos se aprecia con mayor claridad en la Fig. 19, donde la resolución esta referida a los analitos Ptc - Cbm y Ctd - Btn.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

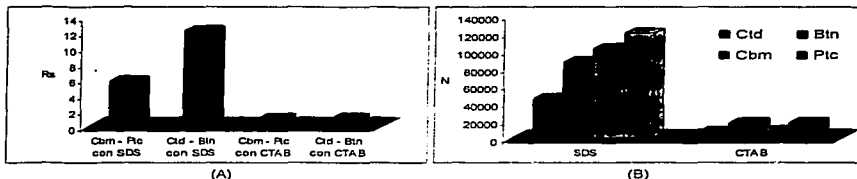


FIGURA 19. GRÁFICAS DEL ANÁLISIS DEL EFECTO QUE EJERCE LA NATURALEZA DEL SURFACTANTE SOBRE LA RESOLUCIÓN Y EFICIENCIA DE LOS PICOS DEL GRUPO 1. Mismas condiciones de la Fig. 18

Nótese que se modificó la polaridad del voltaje de normal a inversa, esto se debió por usar un surfactante (CTAB), el cual posee carga positiva, es decir, carga contraria a los grupos silanol, y al ocurrir la interacción entre ambos se compensa eléctricamente la mayor parte de las cargas negativas de los grupos silanol, por tanto, los contraiones del buffer no crean la doble capa sobre la superficie interna del capilar, esto trae como consecuencia que al aplicar la diferencia de potencial no exista o disminuya notablemente el FEO ya que no hay una capa de contraiones que se desplace en dirección al cátodo, esto solo sucedería si la concentración del CTAB estuviera por debajo de su CMC, (ver Fig. 20).

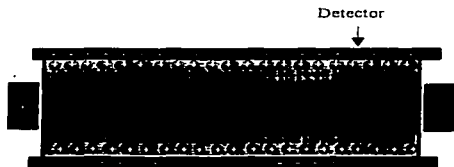


FIGURA 20. REPRESENTACIÓN DE LA SUPRESIÓN DEL FEO.

Sin embargo, al haber empleado el CTAB a una concentración por encima de su CMC, se forma una segunda capa de éste por interacción de las porciones hidrófobas entre las moléculas de surfactante adheridas directamente a la superficie del capilar, con las cadenas hidrofóbicas de las moléculas de la segunda capa. Esto trae como consecuencia

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

que las cargas positivas de las moléculas de la segunda capa del CTAB queden expuestas el entorno acuoso y por tanto favorezcan la formación de una capa de contralones provenientes del buffer que en este caso estará conformada por aniones, teniendo como resultado una inversión del FEO al momento de aplicar una diferencia de potencial, Fig. 21.

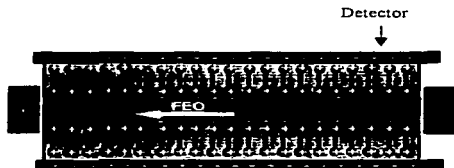


FIGURA 21. INVERSIÓN DEL FEO POR USAR UN SURFACTANTE CATIONICO

Dicha inversión deja de ser problema cambiando el sentido de la polaridad en el voltaje de separación, es decir, de ser normal a inversa (ver Fig. 22).

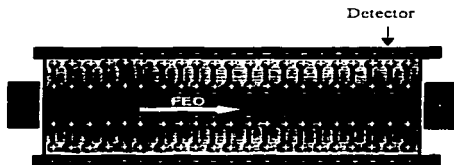


FIGURA 22. MOVILIZACIÓN DEL FEO INVERTIDO HACIA EL DETECTOR.

Observando la Fig. 19-A podemos apreciar que la R_s para el Ptc-Cbm y Ctd-Btn es mucho mayor cuando se emplea como fase pseudoestacionaria el SDS (surfactante aniónico) que cuando se usa CTAB (surfactante catiónico), con el uso de este último no se alcanzan a resolver o separar los analitos. Por otra parte, analizando la Fig. 19-B, se observa que las eficiencias obtenidas de todos los analitos usando SDS alcanza valores muy grandes en comparación con los que se obtienen usando CTAB como fase pseudoestacionaria.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

En base a los resultados obtenidos y análisis de los mismos se encontró que las condiciones óptimas para realizar la separación de los cuatro herbicidas del Grupo I (Btn, Cbm, Ctd y Ptc) mediante CCME son las que se resumen en la Tabla 3, así como los límites de detección, LD's, encontrados para cada uno de los analitos bajo dichas condiciones.

TABLA 3. CONDICIONES ÓPTIMAS PARA REALIZAR LA SEPARACIÓN DE HERBICIDAS DEL GRUPO I	
Tipo de Capilar	Capilar de Sílice fundida de 50 μ m D. I.
Longitud total del capilar	52.7 cm
Longitud efectiva del capilar	41.8 cm
Longitud de onda	214 nm
Voltaje aplicado	30 kV
Polaridad del voltaje aplicado	Normal
Temperatura de separación (°C)	20 °C
Naturaleza, concentración y pH del buffer	75 mM de buffer de boratos, pH 8.5
Naturaleza y concentración del surfactante	40 mM de SDS
Herbicidas del Grupo I	LD's (ppm.)
Buturon	7.62
Carbetamida	9.02
Chlorbufam	10.51
Pentanochlor	7.67

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

5.2. HERBICIDAS DEL GRUPO II (HERBICIDAS DINITROFENÓLICOS).

5.2.1. EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE SURFACTANTE .

Teniendo en cuenta que dos Herbicidas del Grupo II (AcDs y Dbn) son neutros en toda la escala de pH, y el otro (Ds), posee un pka de 4.62 se decidió utilizar la CCME como técnica analítica ya que por esta modalidad pueden ser separados analitos neutros y cargados, así que el factor más importante es la concentración del SDS por lo que se determinó el efecto que ejerce su concentración, encontrándose lo siguiente, Fig. 23.

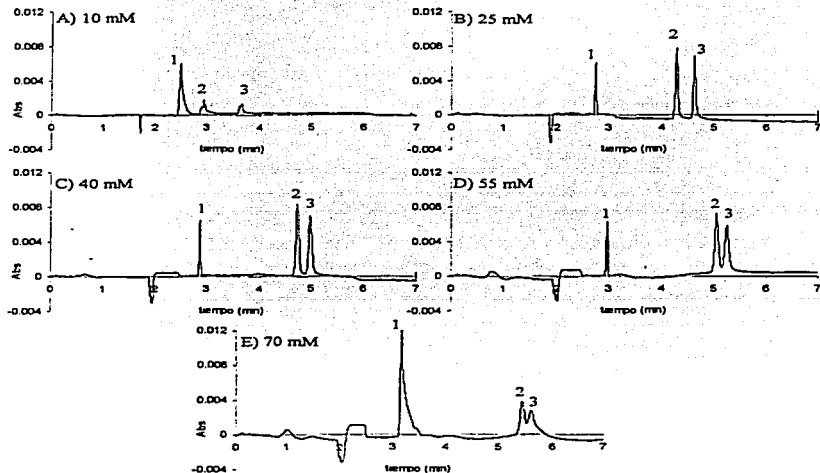


FIGURA 23. ELECTROFEROGRAMAS OBTENIDOS AL EVALUAR EL EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE SDS EN LA SEPARACIÓN DE LOS HERBICIDAS DEL GRUPO II. Condiciones: Capilar de sílice fundida de 50 μ m D. I., long. total 52.7 cm, long. efectiva 41.8 cm, 20 mM de buffer de boratos (pH 8.5); más la adición de diferentes concentraciones de SDS, 30 kV, polaridad normal, 20 °C, detección a 214 nm. Siendo Ds (1), AcDs (2), Dbn (3).

De acuerdo con la Fig. 23. se aprecia que ciertamente la concentración de SDS afecta representativamente la forma, altura de los picos así como la separación de los analitos, encontrándose que existe una mejora considerable en la forma y altura de los picos a un valor de 25 mM de SDS mientras que a un valor de 25 y 40 mM se aprecia que estos han sido mejor separados en cuanto a otras condiciones se refiere, además de que la línea base a concentraciones mayores o igual que 40 mM de SDS comienza exhibir demasiadas fluctuaciones, es decir, se incrementa el ruido.

En los gráficos de la Fig. 24 se analiza el efecto de la resolución (R_s) y eficiencia (N) de los picos en función de la concentración de SDS, donde la resolución observada en esta figura esta referida a los analitos AcDs y Dbn.

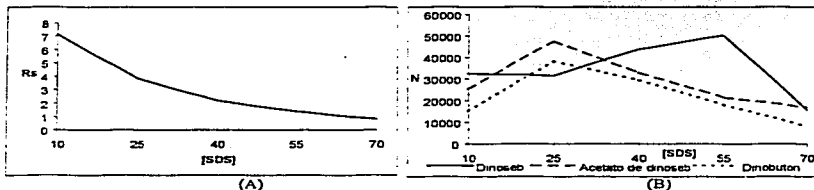


FIGURA 24. GRÁFICAS DEL ANÁLISIS DE LA VARIACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE SDS SOBRE LA RESOLUCIÓN Y EFICIENCIA DE LOS HERBICIDAS DEL GRUPO II. Mismas condiciones que en la Fig. 23.

En la Fig. 24-A podemos observar que la R_s entre AcDs y Dbn aumenta a concentraciones menores de SDS. Por otro lado, analizando la Fig. 24-B se aprecia con claridad que la eficiencia de los picos de Dbn y AcDs es máxima a una concentración de 25 mM de SDS (47770 y 38273 respectivamente), mientras que para Ds es a 55 mM de SDS (aprox. 50000). De acuerdo a lo anterior a una concentración de 25 mM de SDS se obtienen picos con una buena resolución (4.3) con una alta eficiencia para los 3 casos por lo que la consideramos como óptima. A una concentración de 25 mM de SDS aseguramos también un aumento en la solubilidad de los analitos y por ende un aumento en la absorbancia observada, ya que su solubilidad en el buffer de boratos es muy pequeña.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

5.2.2. EFECTO DEL pH DEL ELECTROLITO SOPORTE.

Una vez optimizada la concentración del SDS (25 mM), se procedió a evaluar la influencia del pH del electrolito soporte sobre la separación de los analitos encontrándose lo siguiente, Fig. 25.

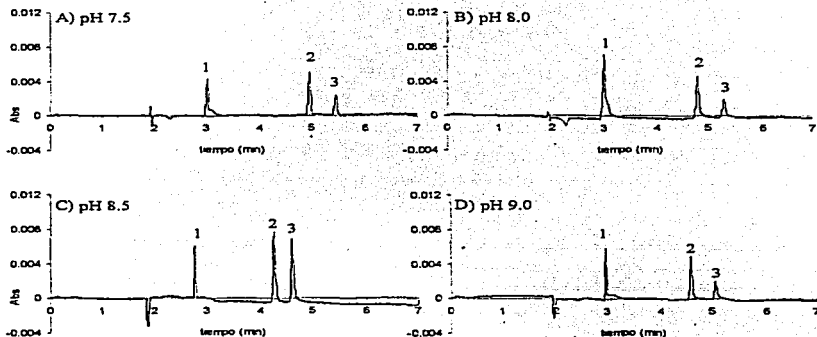


FIGURA 25. ELECTROFEROGRAMAS OBTENIDOS AL EVALUAR LA INFLUENCIA DEL pH EN LA SEPARACIÓN DE LOS HERBICIDAS DEL GRUPO II. Mismas que condiciones que la Fig. 20 excepto que la concentración de SDS se fijó a 25 mM y que se varió el pH del buffer. Siendo Ds (1), AcDs (2), Dbn (3).

Los pH's evaluados están en el rango básico, ya que para llevar a cabo la detección (a polaridad normal) de los analitos que viajan a contra corriente junto con la micela, es necesaria la presencia de un FEO alto. En la Fig. 25, se muestra que el efecto que ejerce el pH del buffer sobre la separación de los herbicidas del Grupo II es que a un pH de 8.5 se logra una mejora considerable en la altura y forma de los picos, es decir, los picos son más altos, delgados y más simétricos comparados con los obtenidos a otros valores de pH.

En cuanto a la resolución y eficiencia se refiere tenemos que el pH es un parámetro con muy poca influencia considerando que no existe un cambio significativo en la

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

resolución obtenida, en el intervalo de pH's evaluado (ver Fig. 26-A). Donde la Rs en esta figura esta referida a los analitos AcDs y Dbn.

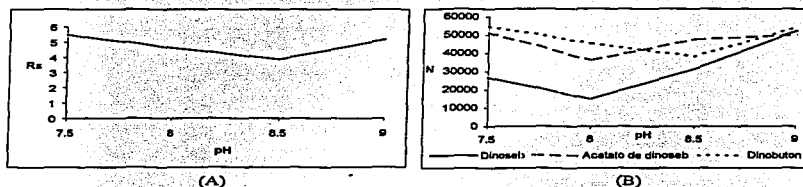
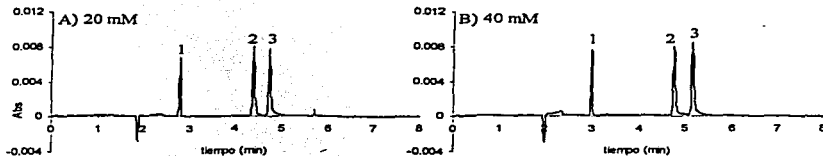


FIGURA 26. GRÁFICAS DE LA INFLUENCIA DEL pH SOBRE LA RESOLUCIÓN Y EFICIENCIA DE LOS HERBICIDAS DEL GRUPO II. Mismas condiciones de la Fig. 25.

Por otra parte, en la Fig. 26-B se aprecia existe un mínimo en la eficiencia a pH 8 mientras que a otros valores aumenta. De la Fig. 25-C se observa un máximo en la absorbancia de AcDs y Dbn a pH 8.5 comparado con otros valores de pH, lo cual nos beneficia en términos de la obtención de menores límites de detección de los analitos, por lo que lo seleccionamos como óptimo, a pesar de que a pH 9 se obtiene una mayor eficiencia pero con una menor absorbancia.

5.2.3. EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE ELECTROLITO SOPORTE.

Una vez optimizada la concentración del surfactante así como el pH del buffer (25 mM y 8.5 respectivamente), se procedió a evaluar el efecto que induce la concentración del electrolito soporte sobre la separación de los analitos, Fig. 27. encontrándose que:



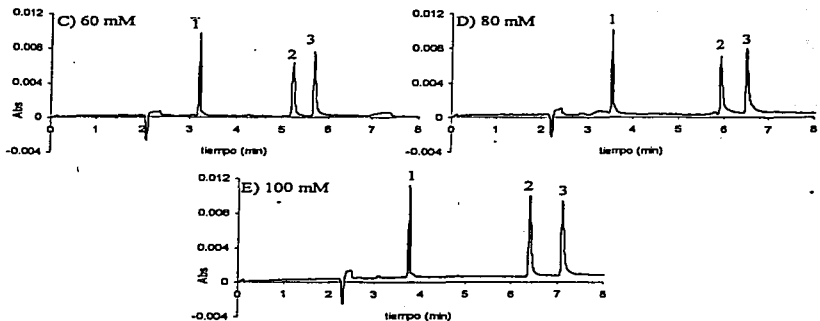


FIGURA 27. ELECTROFEROGRAMAS DE LA INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN DE ELECTROLITO SOPORTE EN LA SEPARACIÓN DE LOS HERBICIDAS DEL GRUPO II. Mismas condiciones de la Fig. 20 excepto que se fijaron la concentración de SDS y pH a 25 mM y 8.5 respectivamente, variándose la concentración de electrolito soporte. Siendo Ds (1), AcDs (2), Dbn (3).

En cuanto a la resolución de AcDs y Dbn se refiere esta aumenta a concentraciones mayores de electrolito soporte (Fig. 28-A), la misma tendencia se observa para la eficiencia de los tres analitos (Fig. 28-B), esto se debe en gran parte a que conforme la fuerza iónica

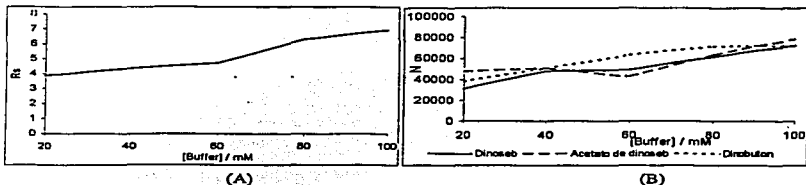


FIGURA 28. GRÁFICAS DEL ANÁLISIS DEL EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE ELECTROLITO SOPORTE SOBRE LA RESOLUCIÓN Y EFICIENCIA DE LOS HERBICIDAS DEL GRUPO II. Mismas condiciones de la Fig. 24

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

del buffer aumenta, la proporción de corriente conducida por éste crece y la participación de la muestra en dicha conducción de corriente disminuye, con lo que se reduce la velocidad de migración y por ende la difusión del analito por lo que la resolución y eficiencia aumentan, por lo tanto se decide tomar como concentración óptima del electrolito soporte el valor de 100 mM, no se realizaron experimentos a mayor concentración del electrolito soporte pues incrementa la intensidad global de corriente y consecuentemente la producción de calor, favoreciéndose la dispersión de los picos.

5.2.4. EFECTO DE LA NATURALEZA DEL ELECTROLITO SOPORTE.

Consecuentemente se determino la influencia que ejerce la naturaleza del electrolito soporte sobre la separación de los herbicidas, Fig. 29; obteniéndose lo siguiente:

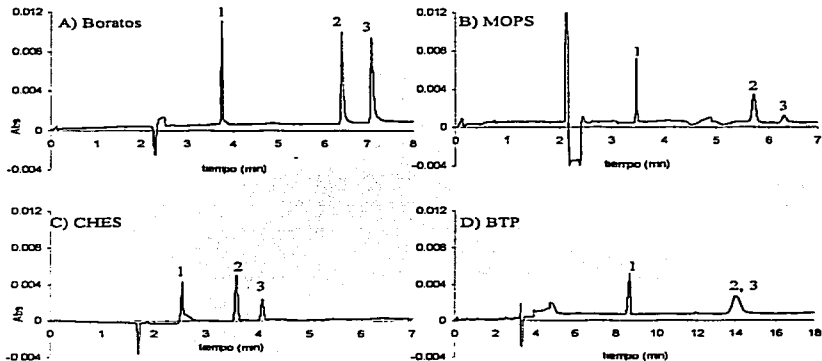


FIGURA 29. ELECTROFEROGRAMAS OBTENIDOS AL EVALUAR LA INFLUENCIA QUE EJERCE LA NATURALEZA DEL BUFFER EN LA SEPARACIÓN DE LOS HERBICIDAS DEL GRUPO II. Mismas condiciones de la Fig. 24 excepto que se fijó la concentración de electrolito soporte a 100 mM modificando la naturaleza del electrolito soporte (buffer). Siendo D_s (1), AcD_s (2), D_{bn} (3).

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Analizando los electroferogramas de la Fig. 29, se encuentra que la altura y forma de los picos cambia significativamente al modificar la naturaleza del electrolito soporte, observándose que los picos más altos, delgados y simétricos son los obtenidos al emplear Boratos como buffer, además de que al usar MOPS el AcDs y Dbn no son separados.

El efecto que ejerce la naturaleza del buffer sobre la resolución para el AcDs y Dbn lo podemos observar en la Fig. 30-A, en la que se muestra que la R_s es mucho mayor cuando se usa buffer de Boratos que cuando se usa CHES o MOPS, mientras que al usar BTP la resolución para el AcDs y Dbn se abate.

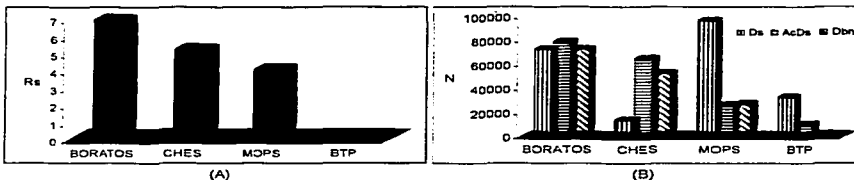


FIGURA 30. GRÁFICAS DEL ANÁLISIS DEL EFECTO QUE EJERCE LA NATURALEZA DEL ELECTROLITO SOPORTE SOBRE LA RESOLUCIÓN Y EFICIENCIA DE LOS PICOS DEL GRUPO II. Mismas condiciones de la Fig. 29

Por otra parte, examinando la Fig. 30-B, se observa que la eficiencia de todos los analitos obtenida usando buffer BORATOS son muy similares entre ellas, lo cual no ocurre al usar CHES o MOPS ya que al usar CHES se observa una disminución en la eficiencia para Ds, comparada con la obtenida al usar buffer de Boratos o MOPS; con el buffer MOPS sucede lo mismo para AcDs y Dbn obteniéndose eficiencias de valores pequeños comparados con los obtenidos al usar CHES o MOPS. Mientras tanto con el buffer de BTP la eficiencia para todos los analitos es mínima en comparación con los demás buffer.

Todo lo anterior pone de manifiesto que la naturaleza óptima del buffer para este sistema es BORATOS, además de que presenta buena capacidad de amortiguamiento en el intervalo de pH seleccionado, baja absorbancia a la longitud de onda de detección (214 nm).

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

5.2.5. EFECTO DE LA NATURALEZA DEL SURFACTANTE.

Finalmente se determino el efecto que ejerce la naturaleza del surfactante sobre la altura, forma y separación de los analitos, encontrándose lo siguiente, Fig. 31.

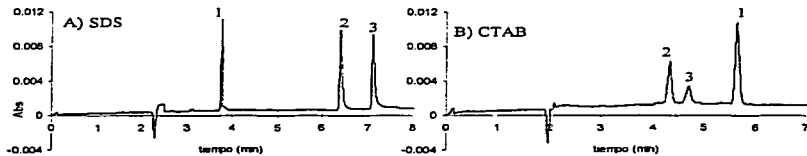


FIGURA 31. ELECTROFEROGRAMAS OBTENIDOS AL EVALUAR LA INFLUENCIA QUE EJERCE LA NATURALEZA DEL SURFACTANTE SOBRE LA SEPARACIÓN DE LOS HERBICIDAS DEL GRUPO II. Mismas condiciones de la excepción que se fijó la naturaleza del electrolito soporte (buffer de boratos), se vario la naturaleza del surfactante fijándose la concentración a 25 mM, A) voltaje aplicado 30 kV a polaridad normal; B) voltaje aplicado -30 kV a polaridad inversa. Siendo Ds (1), AcDs (2), Dbn (3).

La causa por la que se cambio el sentido de la polaridad al realizar la detección cuando se empleo el CTAB es para movilizar el FEO invertido hacia el detector (ver Fig. 21).

Para decidir la naturaleza surfactante (fase pseudoestacionaria) más adecuada para llevar a cabo la optimización del método fue la *forma y altura de los picos* obtenidos durante cada análisis ya que como lo muestra la Fig. 31-B los picos logrados al emplear CTAB son de menor altura y más ensanchados en comparación con los obtenidos al usar SDS (ver Fig. 31-A), cabe señalar que cambia el orden de elución de los analitos a causa de las diferentes interacciones que muestra el analito entre micela y buffer.

Observando la Fig. 32-A podemos apreciar que la R_s para el AcDs y Dbn es mucho mayor cuando se emplea como fase pseudoestacionaria el SDS (surfactante aniónico) que cuando se usa CTAB (surfactante catiónico), aunque en los dos casos han sido separados satisfactoriamente, sin embargo (ver Fig. 31), al analizar la Fig. 32-B, se observa que las eficiencias obtenidas de todos los analitos usando SDS alcanza valores muy grandes en comparación con los que se obtienen usando CTAB como fase pseudoestacionaria.

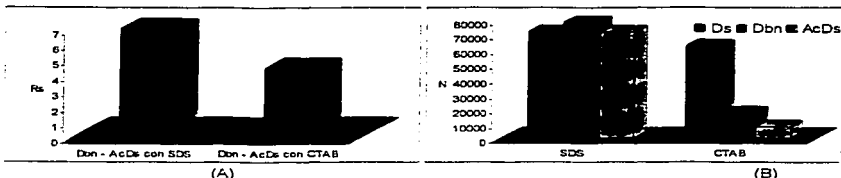


FIGURA 32. GRÁFICAS DEL ANÁLISIS DEL EFECTO QUE EJERCE LA NATURALEZA DEL SURFACTANTE SOBRE LA RESOLUCIÓN Y EFICIENCIA DE LOS PICOS DEL GRUPO II. Mismas condiciones de la Fig. 31

Al usar CTAB se cambia el orden de elución de los analitos (Fig. 32-B), lo cual se debe a la diferentes interacciones que se presentan entre analito y micela.

En base a todos los resultados obtenidos y análisis las condiciones óptimas para realizar la separación de los tres herbicidas dinitrofenólicos (AcDs, Dbn y Ds) mediante CCME se resumen en la Tabla 4, así como los LD's encontrados para cada uno de los analitos bajo dichas condiciones.

TABLA 4. CONDICIONES ÓPTIMAS PARA REALIZAR LA SEPARACIÓN DE HERBICIDAS DEL GRUPO II	
Tipo de Capilar	Capilar de Silíce fundida de 50 μm D. I.
Longitud total del capilar	52.7 cm
Longitud efectiva del capilar	41.8 cm
Longitud de onda	214 nm
Voltaje aplicado	30 kV
Polaridad del voltaje aplicado	Normal
Temperatura de separación ($^{\circ}\text{C}$)	20 $^{\circ}\text{C}$
Naturaleza, concentración y pH del buffer	100 mM de buffer de boratos, pH 8.5
Naturaleza y concentración del surfactante	25 mM de SDS
Herbicidas del Grupo II	LD's (ppm.)
Acetato de Dinoseb	10.49
Dinobuton	14.00
Dinoseb	11.90

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

5.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE LA PLMIM-CCME

Con el fin de disminuir los *LD's* se planteo la realización de una preconcentración o "stacking" en línea (dentro del capilar), para lo cual se disminuyo el pH de trabajo a fin de suprimir el FEO y así poder realizar el procedimiento conocido como *Electrostacking o Preconcentración en línea con migración inversa de micelas mediante Cromatografía capilar micelar electrocinética*, PLMIM-CCME.

La velocidad del FEO a valores de $\text{pH} \leq 5$ comienza a decrecer a causa de que la mayoría de los grupos silanol de la pared interna del capilar comienzan a protonarse trayendo consigo la desaparición de la doble capa disminuyendo el potencial zeta, así que cuando la diferencia de potencial es aplicada el FEO ha sido suprimido casi en su totalidad en el interior del capilar.

La preconcentración en línea de los analitos se realizó debido a la migración (al ánodo) de las micelas de SDS bajo la supresión del FEO (pH ácido). Para lo anterior se utilizo un surfactante aniónico (SDS) y voltaje a polaridad inversa para la separación, esto es porque los analitos son neutros y su movillización será debida al acarreamiento por las micelas.

Al haber agregado un surfactante (SDS) al buffer por encima de su CMC es con la finalidad de formar micelas para solubilizar de una forma diferencial los analitos hidrófobos (neutros). Las micelas del SDS son aniónicas, es decir, poseen carga negativa propiedad que les confiere movilidad electroforética hacia el electrodo positivo (ánodo). La movilidad de las micelas se modificará dependiendo de la partición diferencial de los analitos entre la fase micelar y el buffer.

Todas las mediciones se realizaron a un pH 2.85 usando buffer de fosfatos para el Grupo I y citratos para el Grupo II, a este pH todos los analitos son neutros. El mecanismo de la PLMIM-CCME, fue descrito con sumo detalle anteriormente (ver sección 1.3.1.1.). La explicación por la cual no se realizó las preconcentraciones en línea en presencia de FEO (pH's alcalinos) y polaridad normal es la siguiente:

Dado que las micelas del SDS a pesar de poseer carga negativa son arrastradas hacia el cátodo (electrodo negativo) por el FEO, por lo que se impide que estas entren a la región de muestra, las escasas micelas que lo logran tienden a dispersarse a sus correspondientes monómeros a causa de la enorme dilución que experimentarían en esa

zona (ver referencia 26). Por otra parte, se pensaría en cambiar la naturaleza del surfactante (de SDS a CTAB) y mantener el pH a valores alcalinos sin embargo los resultados obtenidos (descritos anteriormente) al hacerlo no son satisfactorios por la escasa resolución y eficiencia de los picos, así que estas vías no son adecuadas por las grandes desventajas que presentan.

No se evaluó la influencia de la concentración de SDS y de electrolito soporte ya que como se mencionó anteriormente al estar suprimido el FEO no puede ser afectado por la concentración de buffer o de SDS. Para determinar la eficiencia de la PLMIM-CCME de los analitos se hizo mediante la altura y forma de los picos obtenidos para cada uno de ellos en cada análisis y empleando el mismo criterio citado en la literatura [28].

Los sistemas que se utilizaron para determinar los LD's, se prepararon como lo indica la Tabla 5.

TABLA 5. PREPARACIÓN DE SISTEMAS PARA DETERMINAR LOS LD'S

n	Vol. Sol. A* (μ l)	Vol. de H ₂ O (μ l)	Vol. Total (μ l)	Buturon ppm.	Carbetamida ppm.	Chlorbutam ppm.	Pentanochlor ppm.
1	150	1350	1500	20.62	20.97	24.35	20.97
2	60	1440	1500	8.24	8.39	9.74	8.39
3	30	1470	1500	4.12	4.19	4.87	4.19
4	20	1480	1500	2.74	2.79	3.24	2.79
5	15	1485	1500	2.06	2.09	2.43	2.09
6	6	1494	1500	0.82	0.83	0.97	0.83
7	3	1497	1500	0.41	0.41	0.48	0.41
8	1.5	1498.5	1500	0.20	0.21	0.24	0.21

n	Vol. Sol. B* (μ l)	Vol. de H ₂ O (μ l)	Vol. Total (μ l)	Acetato de dinoseb ppm.	Dinobuton ppm.	Dinoseb ppm.
1	150	1350	1500	52.30	52.94	53.26
2	60	1440	1500	20.92	21.17	21.3
3	30	1470	1500	10.46	10.58	10.65
4	20	1480	1500	6.97	7.05	7.10
5	15	1485	1500	5.23	5.29	5.32
6	6	1494	1500	2.09	2.11	2.13
7	3	1497	1500	1.04	1.05	1.06

* Ver detalles de preparación de soluciones en la sección 4. 2.

5.3.1. PLMIM-CCME DE LOS HERBICIDAS DEL GRUPO I (HERBICIDAS CARBÁMICOS, UREICO Y AMÍDICO).

Al evaluar el efecto del tiempo de inyección o longitud de muestra introducida en el capilar (plug), sobre altura y forma de los picos se realizó inyectando la muestra durante tiempos mucho más extensos al usado (5 s) obteniéndose lo siguiente, Fig. 33.

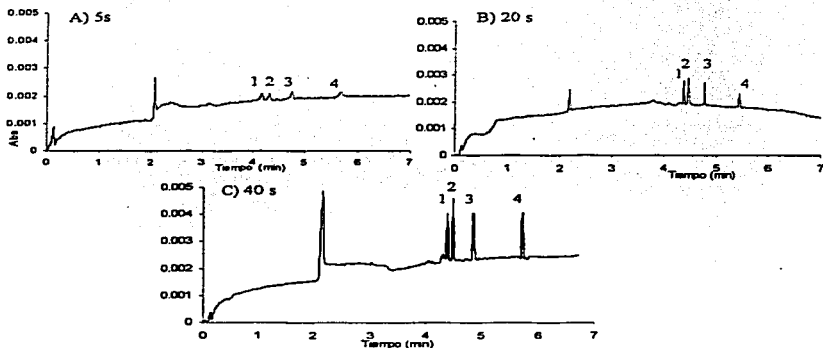


FIGURA 33. EFECTO DEL TIEMPO DE INYECCIÓN O LONGITUD DE LA MUESTRA INTRODUCIDA EN EL CAPILAR. Condiciones: Capilar de sílice fundida de 50 μm D. i., long. total 52.7 cm, long. efectiva 41.8 cm, ~ 30 kV voltaje aplicado a polaridad inversa, 20 $^{\circ}\text{C}$, detección a 214 nm, composición del buffer: 50 mM de Fosfatos; pH 2.85; más la adición de 50 mM de SDS; matriz de agua, con diferentes tiempos de introducción de muestra. Siendo (1) Ptc 2.78 ppm; (2) Cbm 3.24 ppm; (3) Bln 2.74 ppm; (4) Ctd 2.79 ppm.

En la Fig. 33-C podemos observar que la altura de los picos aumenta a tiempos mayores de inyección de muestra, donde la altura máxima de los picos se alcanza a un tiempo de 40 s por lo que este se escoge como óptimo ya que los picos son muy eficientes y más simétricos comparados con los otros picos obtenidos a diferentes tiempos de inyección. No se pudo realizar mediciones con tiempos mucho más extensos ya que al crear un medio discontinuo (buffer-muestra) tan grande en el interior del capilar no se logra

cerrar el circuito por la alta resistencia que se ejerce sobre la conducción de electricidad (electroferogramas no mostrados), y por ende se observa una caída en el valor de la corriente.

Con base a lo anterior se toma como tiempo de inyección 40 s como óptimo para así evaluar la influencia de la composición de la matriz en la cual se disolvieron los herbicidas obteniéndose lo siguiente, Fig. 34:

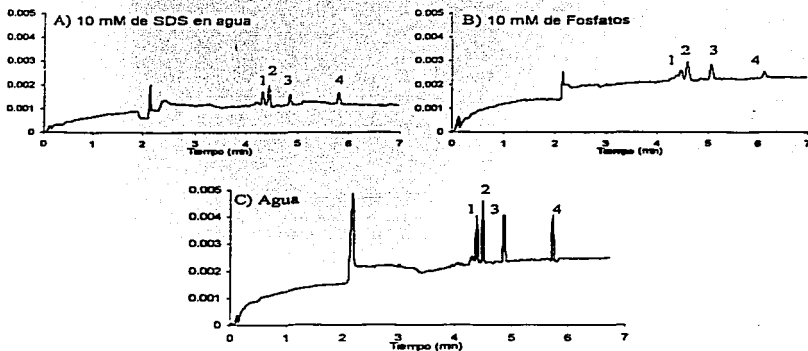


FIGURA. 34 COMPARACIÓN DE ALTURA Y FORMA DE LOS PICOS ENTRE DIFERENTES MATRICES EN LAS QUE SE DISOLVIERON LOS HERBICIDAS DEL GRUPO I. Mismas condiciones que la Fig. 26; excepto que fijo el tiempo de introducción de muestra a 40 s y se varió la naturaleza de la matriz. Siendo (1) Ptc 2.79 ppm; (2) Cbm 3.24 ppm; (3) Btn 2.74 ppm; (4) Ctd 2.79 ppm.

De acuerdo con la Fig. 34-A y Fig. 34-B se observa que la presencia de micelas o de buffer diluido en la solución muestra-matriz no contribuye en la eficiencia de la PLMIM sino que disminuye la absorbancia (altura) y eficiencia de los analitos en comparación con la que solo es agua (Fig. 34-C), por lo que se escoge esta última como óptima.

La Fig. 35 representa el electroferograma optimizado de la PLMIM-CCME de los herbicidas del Grupo I (Btn, Ctd, Cbm y Ptc).

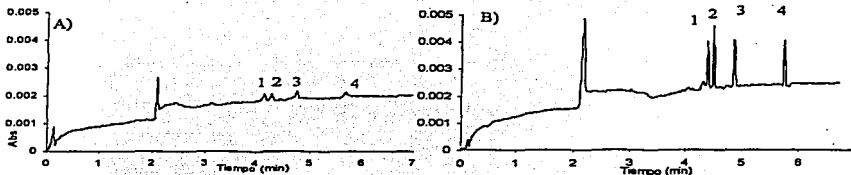


FIGURA 35. ELECTROFEROGRAMA OPTIMIZADO DE LOS HERBICIDAS DEL GRUPO I. Mismas condiciones de la Fig. 26. Excepto matriz que fue de agua y el tiempo de introducción de la muestra: 5 s (A), 40 s (B) siendo (1) Ptc 2.79 ppm; (2) Cbm 3.24 ppm; (3) Btn 2.74 ppm; (4) Cld 2.79 ppm.

En base a los resultados obtenidos y análisis de los mismos se encontró que las condiciones óptimas para realizar la preconcentración en línea de los cuatro herbicidas del Grupo I (Btn, Cbm, Cld y Ptc), se resumen en la Tabla 6.

TABLA 6. CONDICIONES ÓPTIMAS PARA REALIZAR LA PLMIM-CCME DE HERBICIDAS DEL GRUPO I

Tipo de Capilar	Capilar de Sílice fundida de 50 μm D. I.
Longitud total del capilar	52.7 cm
Longitud efectiva del capilar	41.8 cm
Longitud de onda	214 nm
Voltaje aplicado	- 30 kV
Polaridad del voltaje aplicado	Inversa
Temperatura de detección ($^{\circ}\text{C}$)	20 $^{\circ}\text{C}$
Introducción de muestra	40 s a 0.5 psi.
Naturaleza, concentración y pH del buffer	50 mM de buffer de fosfatos, pH 2.85
Naturaleza y concentración del surfactante	50 mM de SDS

Se realizaron dos mediciones más (electroferogramas no mostrados), para así poder determinar los LD's con y sin PLMIM-CCME bajo las mismas condiciones (ver Tabla 6), exceptuando el tiempo de introducción de la muestra que fue de 40 s y 5 s respectivamente, lo cual se logró mediante una curva de calibración de altura del pico vs. concentración del analito, midiéndose cada muestra por triplicado, y teniendo en cuenta la razón $S / N = 3$ (señal / ruido = 3). Los resultados obtenidos al realizar el análisis se muestran en la Tabla 7.

TABLA 7. LÍMITES DE DETECCIÓN DE HERBICIDAS DEL GRUPO I (S/N= 3).

	Carbetamida	Buturon	Chlorbufam	Pentachlor
5 s de Inyección	3.34	2.93	3.26	3.45
SE _{H1}	2.70 ppm.	2.60 ppm.	3.22 ppm.	
Límite de detección				
Ecuación Lineal	$y = 24.026x + 328.75$	$y = 28.85x + 410.56$	$y = 36.62x + 326.56$	$y = 31.04x + 399.12$
Valor de r	0.999869	0.998205	0.998205	0.995588
Valor de r ²	0.999739	0.998414	0.998417	0.991195
40 s de Inyección				
SE _{H2}	87.57	77.67	87.58	51.47
Límite de detección	0.103 ppm.	0.09816 ppm.	0.12 ppm.	0.1491 ppm.
Ecuación Lineal	$y = 225.36x + 436.76$	$y = 86.49x + 1506.51$	$y = 416.76x + 919.98$	$y = 407.2x + 805.20$
Valor de r	0.997738	0.998215	0.982225	0.994817
Valor de r ²	0.995482	0.998431	0.984766	0.989662

Al determinar la eficiencia de la PLMIM-CCME se siguió el mismo criterio que ha sido utilizado por los investigadores que se dedican a realizar preconcentraciones en línea mediante esta técnica (ver referencias 26 - 30), por lo que la eficiencia electrostacking fue

determinada mediante la razón $\frac{H_{stack}}{H}$; la cual indica:

$$SE_{H1} = \frac{H_{stack}}{H} = \frac{\text{altura del pico obtenida a pH ácido}}{\text{altura del pico obtenida a pH alcalino}}$$

$$SE_{H2} = \frac{H_{stack}}{H} = \frac{\text{altura del pico obtenida con PLMIM-CCME}}{\text{altura del pico obtenida a pH alcalino}}$$

El conocer la eficiencia del electrostacking nos indica cuantos ordenes de magnitud disminuye el límite de detección que por lo general va desde uno hasta dos.

5.3.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE LA PLMIM-CCME DE LOS HERBICIDAS DEL GRUPO II (HERBICIDAS DINITROFENÓLICOS).

Al aplicar el mismo tratamiento a los herbicidas Grupo II se encontró que al evaluar el efecto del tiempo de inyección o longitud de la muestra introducida en el interior del capilar (plug), sobre la altura y forma de los picos se obtuvo los siguientes electroferogramas, Fig. 36:

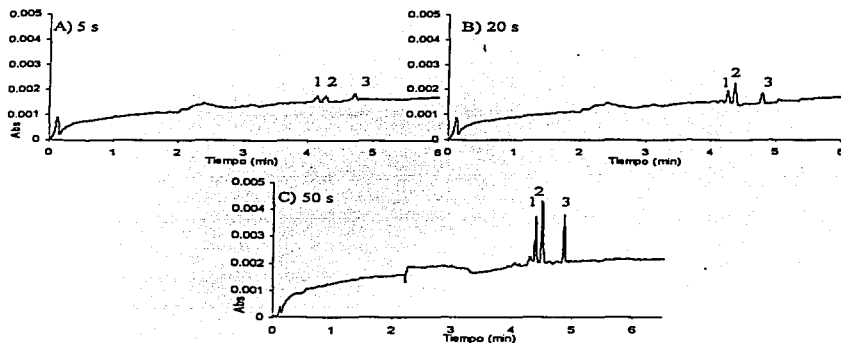


FIGURA 36. EFECTO DEL TIEMPO DE INYECCIÓN O LONGITUD DE LA MUESTRA INTRODUCIDA EN EL CAPILAR. Condiciones: Capilar de sílice fundida de 50 μm D. i., long. total 52.7 cm, long. efectiva 41.8 cm, -30 kV voltaje aplicado, polaridad inversa, 20 $^{\circ}\text{C}$, detección a 214 nm, composición del buffer: 75 mM de Citratos; pH 2.85 más la adición de 50 mM de SDS; matriz de agua, tiempo de inyección; siendo (1) Dbn 7.05 ppm; (2) Ds 7.10 ppm; (3) AcDs 6.97 ppm.

En las Fig. 36 (A-C) se aprecia que la altura de los picos aumenta a tiempos mayores de inyección de muestra, evaluándose este parámetro hasta 50 s donde la altura máxima de los picos es alcanzada, fijándose este como óptimo ya que los picos son más eficientes (más altos y delgados), y más simétricos comparados con otros picos a diferentes tiempos de introducción de muestra.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Al igual que en la PLMIM-CCME del Grupo I no se pudo realizar mediciones con tiempos mucho más extensos por el medio discontinuo tan grande en el interior del capilar lo cual provoca una caída repentina en el valor de la corriente.

Con base a lo anterior se toma como tiempo óptimo de introducción de muestra el valor de 50 s para así evaluar la influencia de la composición de la matriz en la cual se disolvieron los herbicidas obteniéndose los siguientes resultados, Fig. 37.

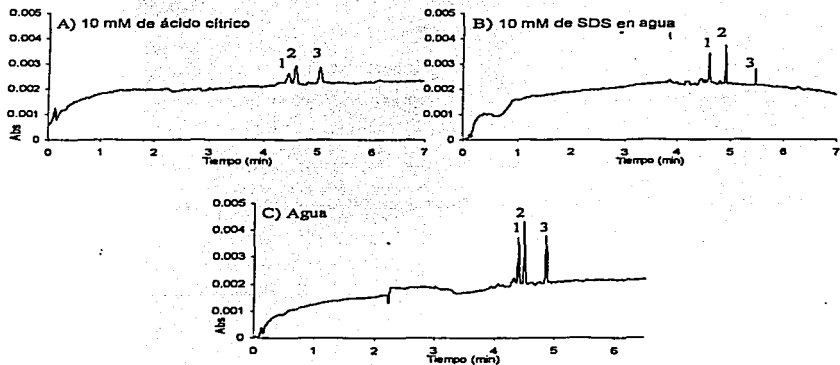


FIGURA 37. COMPARACIÓN DE ALTURA Y FORMA DE LOS PICOS ENTRE DIFERENTES MATRICES EN LAS QUE SE DISOLVIERON LOS HERBICIDAS DEL GRUPO II: Mismas condiciones de la Fig. 30 excepto que se varío la naturaleza de la matriz, tiempo de inyección a 0.5 psi, 50 s, siendo (1) Dbn 7.05 ppm; (2) Ds 7.10 ppm; (3) AcDs 6.97 ppm.

De acuerdo con la Fig. 37 (A-B) la presencia de micelas o de buffer diluido en la solución muestra-matriz no contribuyen en forma benéfica para realizar la preconcentración de los analitos sino lo contrario lo contrario disminuye su absorbancia (altura) y eficiencia en comparación con la que solo es agua (Fig. 37-C), por lo que se escoge la dilución de la muestra en agua como óptima.

La Fig. 38 representa el electroferograma optimizado de la preconcentración en línea por CCME de los tres herbicidas dinitrofenólicos (Ds, Dbn y AcDs).

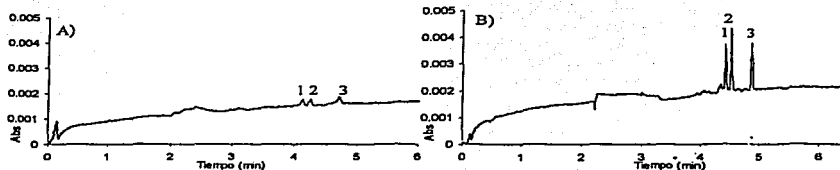


FIGURA 38. ELECTROFEROGRAMA OPTIMIZADO DE LOS HERBICIDAS DEL GRUPO II. Mismas condiciones de la Fig. 34; excepto que la matriz es solamente agua, introducción de la muestra a 0.5 psi. durante A) 5 s; B) 50 s; siendo (1) Dbn 7.05 ppm; (2) Ds 7.10 ppm; (3) AcDs 6.97 ppm.

En base a los resultados obtenidos y análisis de los mismos se encontró que las condiciones óptimas para realizar la preconcentración en línea de los cuatro herbicidas del Grupo I (Bln, Cbm, Ctd y Ptc), se resumen en la Tabla 8.

TABLA 8. CONDICIONES ÓPTIMAS PARA REALIZAR LA PLMIM-CCME DE HERBICIDAS DEL GRUPO II

Tipo de Capilar	Capilar de Sílice fundida de 50 μm D. I.
Longitud total del capilar	52.7 cm
Longitud efectiva del capilar	41.8 cm
Longitud de onda	214 nm
Voltaje aplicado	-30 kV
Polaridad del voltaje aplicado	Inversa
Temperatura de detección ($^{\circ}\text{C}$)	20 $^{\circ}\text{C}$
Introducción de muestra	50 s a 0.5 psi.
Naturaleza, concentración y pH del buffer	75 mM de buffer de citratos, pH 2.85
Naturaleza y concentración del surfactante	50 mM de SDS

Se realizaron dos mediciones más (electroferogramas no mostrados), para así poder determinar los LD's con y sin PLMIM-CCME bajo las mismas condiciones (ver Tabla 8), exceptuando el tiempo de introducción de la muestra que fue de 50 s y 5 s respectivamente lo cual se logró mediante una curva de calibración de altura del pico vs. concentración del analito, midiéndose cada muestra por triplicado, y teniendo en cuenta la razón S / N = 3 (señal / ruido = 3). Los resultados obtenidos al realizar el análisis se muestran en la Tabla 9.

TABLA 9. LÍMITES DE DETECCIÓN DE HERBICIDAS DEL GRUPO II ($S/N = 3$).

	Acetato de Dinoseb	Dinobuton	Dinoseb
5 s de inyección			
SE _{H1}	1.74	2.15	2.05
Límite de detección	6.00 ppm.	6.50 ppm.	6.80 ppm.
Ecuación Lineal	$y = 20.88x + 288.60$	$y = 20.86x + 326.64$	$y = 25.04x + 448.28$
Valor de r	0.999902	0.998260	0.971158
Valor de r ²	0.999804	0.996535	0.943148
50 s de inyección			
SE _{H2}	12.83	19.15	19.50
Límite de detección	0.817 ppm.	0.731 ppm.	0.610 ppm.
Ecuación Lineal	$y = 42.41x + 1475.328$	$y = 142.85x + 795.57$	$y = 251.9x + 786.15$
Valor de r	0.998574	0.998728	0.971648
Valor de r ²	0.997150	0.997459	0.944097

Del mismo modo que se determino la eficiencia de la PLMIM-CCME para los Herbicidas del Grupo I, fue determinada para los Herbicidas del Grupo II, por lo que la eficiencia electrostacking fue determinada mediante la razón $\frac{H_{stack}}{H}$; la cual indica:

$$SE_{H1} = \frac{H_{stack}}{H} = \frac{\text{altura del pico obtenida a pH ácido}}{\text{altura del pico obtenida a pH alcalino}}$$

$$SE_{H2} = \frac{H_{stack}}{H} = \frac{\text{altura del pico obtenida con PLMIM-CCME}}{\text{altura del pico obtenida a pH alcalino}}$$

5.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE LA COMBINACIÓN DE LA EFS y PLMIM-CCME DE LOS HERBICIDAS ESTUDIADOS

El llevar a cabo una extracción en fase sólida (EFS) previa a la preconcentración en línea es con el fin de disminuir aún más los valores de los *LD*'s obtenidos al realizar solamente la PLMIM-CCME para los herbicidas del Grupo I y Grupo II.

La EFS fue optimizada en función de la cantidad de muestra eluida a través del cartucho *C*₁₈, probándose soluciones de diferente volumen (5, 10, 25 y 50 ml) pero con la misma concentración de herbicidas, y una vez obtenido el extracto se aplicó el método óptimo de PLMIM-CCME (electroferogramas no mostrados), según se tratará de soluciones de herbicidas del Grupo I ó Grupo II; encontrándose que el volumen óptimo fue de 50 ml para los dos casos, (ver metodología en el apartado 4.4.).

5.4.1. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE LA COMBINACIÓN DE LA EFS y PLMIM-CCME DE LOS HERBICIDAS DEL GRUPO I (HERBICIDAS CARBÁMICOS, UREÍCO Y AMÍDICO).

Una vez hecha la EFS de herbicidas presentes en la *Sol.* A2 y recuperación de los mismos (extracto) se procedió a analizarla con el método PLMIM-CCME optimizado para el Grupo I, tomándose el mismo criterio que se usó al evaluar la eficiencia de la PLMIM-CCME obteniéndose lo siguiente, Fig. 36.

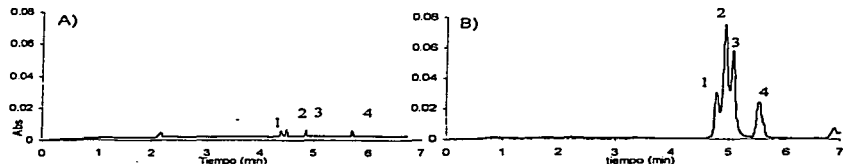


FIGURA 39. PLMIM-CCME APLICANDO LA EFS. Condiciones: Capilar de sílice fundida de 50 μ m D. i., long. total 52.7 cm, long. efectiva 41.8 cm, -30 kV voltaje aplicado a polaridad Inversa, 20 $^{\circ}$ C, detección a 214 nm, composición del buffer: 50 mM de Fosfatos; pH 2.85; más la adición de 50 mM de SDS; introducción de la muestra a 0.5 psi, 40 s; A) Sin EFS; B) Con EFS; siendo (1) Ptc 5.11 ppm; (2) Cbm 5.93 ppm; (3) Bln 5.01 ppm; (4) Cid 5.11 ppm.

Analizando los electroferogramas de la Fig. 39-A y Fig. 39-B se observa que la absorbancia de los analitos aumenta más de 10 veces, lo cual refleja que estos han sido concentrados más de 10 veces en comparación cuando solamente se efectúa la PLMIM-

CCME que cuando se realiza una previa EFS a la PLMIM-CCME, esto se debe a que los analitos presentes en una solución de gran volumen (50 ml), al ser eluida a través de la columna de EFS estos son retenidos y concentrados en ella y más aún cuando son recuperados con un menor volumen de disolvente (1 ml de AcN) para su posterior PLMIM-CCME, en el equipo de Electroforesis Capilar.

En la Fig. 39-A los picos de los analitos tienen aproximadamente la misma altura, sin embargo esto no sucede en la Fig. 39-B lo cual se debe al aislamiento diferencial de los analitos, es decir, la afinidad entre el disolvente y el material sólido utilizado (columna tipo C₁₈) no es igual para cada uno de los herbicidas. Por otra parte, la resolución de los analitos decrece mucho al realizar una EFS previa a la PLMIM-CCME (ver Fig. 39-B) debido a que están más concentrados, lo cual se remedia al utilizar soluciones más diluidas al realizar la EFS y al aplicar el método óptimo de preconcentración en línea al extracto resultante con lo cual se observarían picos más pequeños y resueltos, lo cual puede verificarse en la Fig. 40. En la cual se empleó una solución de herbicidas del Grupo I a una concentración de aproximadamente 0.20 ppm. (ver tabla 6), para cada uno de ellos, por lo que este hecho deja de ser importante.

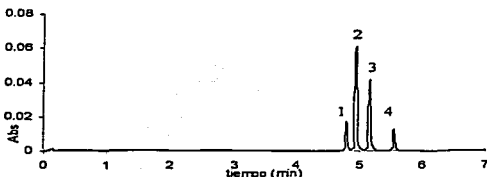


FIGURA 40. PLMIM-CCME APLICANDO LA EFS. Mismas Condiciones de la Fig. 36. Siendo (1) Ptc 0.21 ppm; (2) Cbm 0.24 ppm.; (3) Bln 0.20 ppm.; (4) Ctd 0.21 ppm.

Se realizaron una serie de experimentos (electroferogramas no mostrados) bajo condiciones de PLMIM-CCME previa EFS de los analitos con la finalidad determinar los LD's para cada uno de ellos con una curva de calibración (altura del pico vs. concentración), los sistemas que se utilizaron para determinar los LD's, bajo estas condiciones se prepararon como lo indica la Tabla 10.

TABLA 10. PREPARACIÓN DE SISTEMAS A EMPLEAR PARA LA DETERMINACIÓN DE LD'S MEDIANTE LA COMBINACIÓN DE LA EFS CON LA PLMIM-CCME

n	Vol. Sol. A1* (μ l)	Vol. Total de aforo (ml)	Buturon ppm.	Carbetamida ppm.	Chlorbufam ppm.	Pentachlor ppm.
A2	365,0	50	5,01	5,11	5,93	5,11
A3	35,0	50	0,48	0,49	0,57	0,48
A4	15,0	50	0,20	0,21	0,24	0,21
A5	5,0	50	0,067	0,068	0,081	0,068
A6	3,0	50	0,040	0,040	0,048	0,040

*Ver detalles de preparación soluciones en la sección 4.4.

Una vez hecha las mediciones y análisis de los resultados se logro la determinación de los LD's bajo condiciones de PLMIM-CCME precediendo una EFS, en la Tabla 11, se muestran los resultados.

TABLA 11. LÍMITES DE DETECCIÓN DE HERBICIDAS DEL GRUPO I, MEDIANTE LA COMBINACIÓN DE LA EFS CON LA PLMIM-CCME ($S/N=3$).

	Carbetamida	Buturon	Chlorbufam	Pentachlor
EFS-PLMIM-CCME	991,20	1465,38	2919,44	842,85
SE _{LD}	9,1 ppb.	5,2 ppb.	3,6 ppb.	9,1 ppb.
Ecuación Lineal	$y = 4708,3x - 490,97$	$y = 11411,5x + 350,3$	$y = 14734x + 0,33$	$y = 5818x + 363,9$
Valor de r	0,998841	0,999717	0,999802	0,999840
Valor de r ²	0,997683	0,999435	0,999205	0,999281

$$\text{Siendo } SE_{H3} = \frac{H_{EFS-PLMIM-CCME}}{H}$$

Donde: SE_{LD} es la eficiencia de la PLMIM-CCME combinada con la EFS en términos de la altura del pico

H_{EFS-PLMIM-CCME} es la altura del pico obtenida en la PLMIM-CCME con una previa EFS

H es la altura del pico obtenida medio alcalino

5.4.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE LA COMBINACIÓN DE LA EFS Y PLMIM-CCME DE LOS HERBICIDAS DEL GRUPO II (HERBICIDAS DINITROFENÓLICOS).

Al aplicar el mismo tratamiento de EFS a los herbicidas Grupo II (Sol. B2), se procedió a preconcentrar la muestra recuperada (extracto) con el método optimizado de PLMIM-CCME del Grupo II, tomándose el mismo criterio que se usó en la PLMIM-CCME previa EFS a las muestras del Grupo I, obteniéndose lo siguiente, Fig. 41.

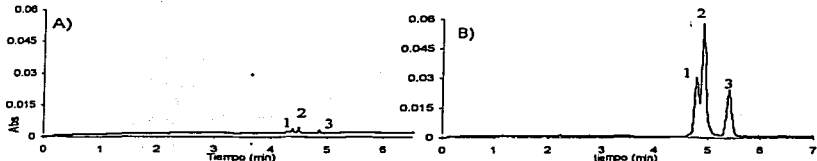


FIGURA 41. PLMIM-CCME CON UNA PREVIA EFS. Condiciones: Capilar de sílice fundida de 50 μm D. I., long. total 52.7 cm, long. efectiva 41.8 cm, -30 kV voltaje aplicado a polaridad Inversa, 20 $^{\circ}\text{C}$, detección a 214 nm, composición del buffer: 75 mM de Citratos; pH 2.85; más la adición de 50 mM de SDS; introducción de la muestra a 0.5 μs . 50 s; A) Sin EFS; B) Con EFS; siendo (1) Dbn 5.29 ppm; (2) Ds 5.32 ppm; (3) AcDs 5.23 ppm.

Examinando los electroferogramas de la Fig. 41-A y Fig. 41-B se observa que la absorbancia de los analitos aumenta alrededor de 10 veces en comparación cuando solamente se efectúa la PLMIM-CCME que cuando se realiza una previa EFS a la PLMIM-CCME, lo cual se debe a que al eluir dicha solución a través de la columna C_{18} para realizar la EFS estos son adsorbidos y concentrados en ella y más aún cuando son recuperados con un menor volumen de disolvente (1ml de AcN) para su posterior PLMIM-CCME, sin ser concentrados más por evaporación de disolvente ya que el AcDs y Dbn son volátiles. La diferencia en la absorción que exhibe cada herbicida (Fig. 41-B) se debe a la afinidad diferencial entre el disolvente y la columna C_{18} que presenta cada uno de ellos, lo cual indica que es más a fin el Ds hacia la superficie de la columna que el Dbn o AcDs. Por otra parte, se observa que la resolución de los analitos se empobrece al realizar una EFS previa a la PLMIM-CCME (ver Fig. 41-B) debido a que estos han sido concentrados, sin embargo esto no se vería al aplicar la EFS seguida de la PLMIM-CCME en soluciones más diluidas y así observar picos más pequeños y por ende resueltos, lo cual puede verificarse en la Fig.

42. En la cual se utilizó una solución de herbicidas del Grupo II a una concentración de 0.15 ppm. (ver tabla 12), para cada uno de ellos, por tanto este hecho deja de ser relevante.

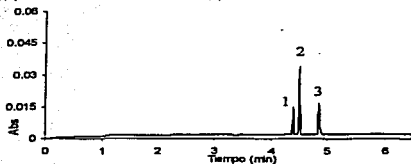


FIGURA 42. PLMIM-CCME CON UNA PREVIA EFS. Mismas Condiciones de la Fig. 41. Siendo (1) Dbn 0.16 ppm; (2) Ds 0.16 ppm; (3) Acds 0.16 ppm.

Se efectuaron una serie de experimentos más (electroferogramas no mostrados) bajo las condiciones óptimas de la PLMIM-CCME encontradas para el Grupo II, precediendo a la realización de una EFS, esto fue con la finalidad de disminuir aún más los LD's logrados bajo condiciones de preconcentración en línea y siendo determinados mediante una curva de calibración (altura del pico vs. concentración), los sistemas que se emplearon se prepararon como lo indica la Tabla 12.

TABLA 12. PREPARACIÓN DE SISTEMAS A EMPLEAR PARA LA DETERMINACIÓN DE LD'S MEDIANTE LA COMBINACIÓN DE LA EFS CON LA PLMIM-CCME

n	Vol. Sol. B1 (μ l)	Vol. Total de aforo (ml)	Acetato de dinoseb ppm.	Dinobuton ppm.	Dinoseb ppm.
B2	145.0	50	5.01	5.07	5.11
B3	14.5	50	0.50	0.50	0.51
B4	5.0	50	0.16	0.16	0.16
B5	3.0	50	0.10	0.10	0.10

Una vez hecha las mediciones y análisis de los resultados obtenidos se llevo a la determinación de los LD's, los cuales se presentan en la Tabla 13.

TABLA 13. LÍMITES DE DETECCIÓN DE HERBICIDAS DEL GRUPO II ($S/N = 3$)

	Acetato de Dinoseb	Dinobuton	Dinoseb
EFS-PLMIM-CCME			
SE _{H3}	129.02	189.44	183.64
Límite de detección	81.3 ppb.	73.90 ppb.	64.81 ppb.
Ecuación Lineal	$y = 4701.1x + 86.24$	$y = 5990.44x + 74.77$	$y = 11334.33x + 483.64$
Valor de r	0.999996	0.999987	0.998388
Valor de r ²	0.999992	0.999975	0.992789

Siendo $SE_{H3} = \frac{H_{EFS-PLMIM-CCME}}{H} = \frac{\text{altura del pico obtenida al combinar la EFS con la PLMIM-CCME}}{\text{altura del pico obtenida en medio alcalino}}$

5.5. COMPARACIÓN DE LOS LÍMITES DE DETECCIÓN OBTENIDOS A PARTIR DE LOS MÉTODOS DESARROLLADOS PARA CADA UNO DE LOS HERBICIDAS ESTUDIADOS.

En esta sección se muestra los resultados de la determinación de los LD 's de los Herbicidas del Grupo I (Btn, Ctd, Cbm y Ptc) y Grupo II (AcDs, Dbn y Ds), los cuales fueron obtenidos utilizando los métodos evaluados (ver secciones 5.1 a la 5.4).

Inicialmente se trabajó a un pH ligeramente alcalino, pH 8.5 (sección 5.1 y 5.2), por lo que la presencia de FEO juega un papel importante en el análisis y separación de los analitos (ver condiciones de análisis en la Tabla 3 y 4); sin embargo, se obtuvieron resultados poco satisfactorios en lo que se refiere a los LD 's, así que se decidió desarrollar métodos de preconcentración en línea para lo cual se disminuyó el pH de trabajo a fin de suprimir el FEO y así poder realizar el procedimiento conocido como PLMIM-CCME o "electrostacking" (sección 5.3.1 y 5.3.2.), el cual resultó ser más eficiente que los desarrollados a un pH alto.

Los resultados obtenidos indican que las condiciones de análisis en medio ácido, pH 2.85 (sin preconcentración en línea), en comparación con las del medio alcalino (pH 8.5) son más eficientes ya que los valores de los LD 's son ≈ 3 veces más pequeños que los alcanzados al realizar el análisis a pH 8.5.

Al efectuar la preconcentración en línea en medio ácido la sensibilidad de la detección para los Herbicidas del Grupo I puede ser aumentada ≈ 90 veces en comparación con la obtenida a pH alcalino, mientras que para los del Grupo II esta se alcanza a aumentar ≈ 20 veces.

A pesar de la mejora de los resultados obtenidos al aplicar la PLMIM-CCME se planteó la realización de una EFS previa a la PLMIM-CCME con el fin de disminuir aún más los valores de los LD 's.

Cuando se realizó la EFS previa a la PLMIM-CCME se consiguió disminuir los LD 's ≈ 1000 veces para los Herbicidas del Grupo I, mientras que para los del Grupo II ≈ 200 veces.

Todo lo anterior puede ser verificado en las Tablas 14 y 15 en las que se presenta los LD 's y factores de concentración (S_{H1} , S_{H2} y S_{H3}), de los herbicidas estudiados, los cuales fueron obtenidos a partir de todos los métodos desarrollados.

TABLA 14. COMPARACIÓN DE TODOS LOS LÍMITES DE DETECCIÓN DE LOS HERBICIDAS DEL GRUPO I

HERBICIDAS DEL GRUPO I	LD'S BAJO CONDICIONES	LD'S A pH 2.85	LD'S A pH 2.85		LD'S A pH 2.85 CON LA		SE ₁₀
	NORMALES A pH 8.5 (PPM.)	SIN PLMIM-CCME (PPM)	SE _{H1}	CON PLMIM-CCME (PPM.)	SE ₁₀	COMBINACIÓN DE EFS Y PLMIM- CCME (PPB.)	
Butoron	7.62	2.60	2.93	0.0981	77.67	5.20	1465.38
Carbetamida	9.02	2.70	3.34	0.103	87.57	9.10	991.20
Chlorbutam	10.51	3.22	3.26	0.120	87.58	3.60	2919.44
Pentanochlor	7.67	2.22	3.45	0.149	51.47	9.10	842.85

TABLA 15. COMPARACIÓN DE TODOS LOS LÍMITES DE DETECCIÓN DE LOS HERBICIDAS DEL GRUPO II

HERBICIDAS DEL GRUPO II	LD'S BAJO CONDICIONES	LD'S A pH 2.85	LD'S A pH 2.85		LD'S A pH 2.85 CON LA		SE ₁₀
	NORMALES A pH 8.5 (PPM.)	SIN PLMIM-CCME (PPM)	SE _{H1}	CON PLMIM-CCME (PPM.)	SE ₁₀	COMBINACIÓN DE EFS Y PLMIM- CCME (PPB.)	
Acetato de dinoseb	10.49	6.00	1.74	0.817	12.83	81.30	129.02
Dinobuton	14.00	6.50	2.15	0.731	19.15	73.90	189.44
Dinoseb	11.90	5.80	2.05	0.610	19.50	64.80	183.64

5.6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DEL ANÁLISIS DEL AGROQUÍMICO COMERCIAL

Uno de los posibles problemas que puede surgir, resultado de fortificar una muestra y tomar de la misma varias submuestras, es que la composición del analito (Dbn en este caso) no sea la misma en todas las submuestras, es decir, no haya homogeneidad en la composición, para evitar esto toda la muestra fortificada fue sometida al proceso de extracción para así tener una confiabilidad mayor en los valores obtenidos. Una vez hecha la fortificación de las tierras diatómeas con el producto comercial ACARELTE 40-EC y la subsecuente extracción y recuperación del herbicida Dbn presente en el mismo (ver sección 4.6), se procedió a analizar la muestra con el método de separación simultánea optimizado (ver Tabla 4), para herbicidas dinitrofenólicos con la finalidad de: a) determinar la presencia de Dbn en forma cualitativa y b) determinar el porcentaje de recuperación, los resultados para el análisis de las muestras ACA-40A y ACA-40B (ver sección 4.6.), se representan en la Fig. 43-A y Fig. 43-B.

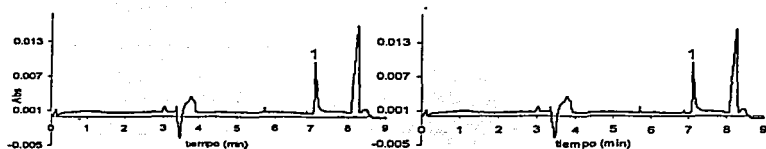


FIGURA 43. ELECTROFEROGRAMAS DEL ANÁLISIS DEL AGROQUÍMICO COMERCIAL. Condiciones: Capilar de sílice fundida de 50 μm D. i., long. total 52.7 cm, long. efectiva 41.8 cm, 30 kV voltaje aplicado a polaridad normal, 20 $^{\circ}\text{C}$, detección a 214 nm, composición del buffer: 100 mM Boratos; pH 8.5; más la adición de 25 mM de SDS; introducción de la muestra a 0.5 psi. 5 s; donde A) ACA-40A; B) ACA-40D; siendo (1) Dbn; (2) otros componentes de la fórmula.

Se realizó una medición del blanco de tierras diatómeas con la finalidad de verificar que la naturaleza de dichas tierras no puedan interferir en la detección de nuestro analito de interés, encontrándose que efectivamente pueden ser utilizadas como soportes ya que los resultados indican (electroferogramas no mostrados) que no presentan compuestos que obstruyan la realización del experimento en las condiciones deseadas.

Analizando los electroferogramas de la Fig. 43-A y Fig. 43-B se observa que la absorbancia de los analitos en ambos gráficos es muy similar así que para poder

determinar el porcentaje de recuperación de la muestra ACA-40D, fue hecho mediante la curva de calibración que se realizó para determinar los LD's a pH 8.5 para el Grupo II (herbicidas dinitrofenólicos), se hace notar que esta no es la forma correcta de hacerlo, sin embargo se realizó así ya que no se cuenta con los reactivos necesarios para poder constituir la matriz del producto comercial (placebo).

De acuerdo con lo anterior se obtuvo un porcentaje del 96.2 de recuperación del analito, lo cual indica que la pequeña cantidad no encontrada puede deberse a que se volatilizo durante el proceso de fortificación de las tierras diatomeas y extracción, ya que como se menciona anteriormente el Dbn es un compuesto ligeramente volátil. Al realizar la preconcentración en línea de la muestra ACA-40C mediante la técnica de PLMIM-CCME optimizada para el Grupo II (herbicidas dinitrofenólicos), se obtuvo lo siguiente (Fig. 44).

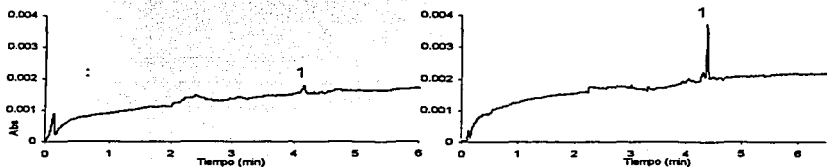


FIGURA 44. ELECTROFEROGRAMAS DEL ANÁLISIS DEL AGROQUÍMICO SIN Y CON PLMIM-CCME. Condiciones: Capilar de sílice fundida de 50 μ m D. I., long. total 52.7 cm, long. efectiva 41.8 cm, -30 kV voltaje aplicado, polaridad inversa, 20 $^{\circ}$ C, detección a 214 nm, composición del buffer: 75 mM de Citrato; pH 2.65 más la adición de 50 mM de SDS; introducción de muestra a 0.5 psi. (A) 5 s; (B) 50 s. A) Sin PLMIM-CCME; B) Con PLMIM-CCME; Siendo (1) Dbn 8.0 ppm.

Al analizar las Fig. 44-A y Fig. 44-B se observa que al aplicar el método de PLMIM-CCME optimizado para el Grupo II (herbicidas dinitrofenólicos), a la muestra ACA-40C el Dbn presente en la solución se preconcentra sin que el perfil del electroferograma se modifique mucho (ver Fig. 38-B), por lo que el método diseñado para la PLMIM-CCME para herbicidas dinitrofenólicos resulto ser eficiente al aplicarlo a una muestra real.

Al llevar a cabo el análisis mediante la PLMIM-CCME del extracto (solución ACA-F), obtenido de la EFS (ver sección 4.6), se obtuvo lo siguiente:

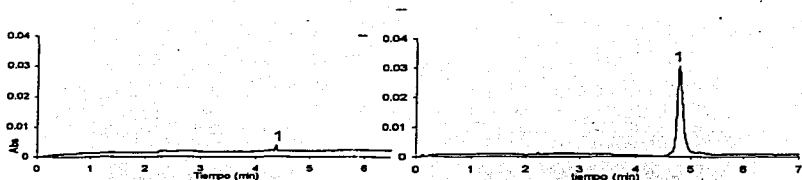


FIGURA 45. PLMIM-CCME DEL AGROQUÍMICO COMERCIAL CON UNA PREVIA EFS. Condiciones: Capilar de sílice fundida de 50 μm D. I., long. total 52.7 cm, long. efectiva 41.8 cm, -30 kV voltaje aplicado a polaridad inversa, 20 $^{\circ}\text{C}$, detección a 214 nm, composición del buffer: 75 mM de Citratos; pH 2.85; más la adición de 50 mM de SDS; Introducción de la muestra a 0.5 psi, 50 s; A) Sin EFS ; B) Con EFS; siendo (1) Dbn 8 ppm

Examinando los electroferogramas de la Fig. 45-A y Fig. 45-B se observa que la absorbancia de los analitos aumenta alrededor de 9.85 veces cuando se realiza una previa EFS a la PLMIM-CCME que cuando solamente se realiza la PLMIM-CCME, lo cual se debe a que el Dbn presente en una solución de gran volumen (50 ml), al ser eluida a través de la columna C_{18} este es retenido y concentrado en ella y más aún cuando fue recuperado con un menor volumen de disolvente (1ml de AcN) para su posterior PLMIM-CCME en el equipo de Electroforesis Capilar sin ser concentrado más por evaporación de disolvente ya que el Dbn es volátil.

_ CONCLUSIONES

Se logró exitosamente desarrollar los métodos de separación simultánea tanto para los Grupo I (*carbámicos, ureicos y amídicos*) como para los del Grupo II (*dinitrofenólicos*) empleando la técnica CCME.

De acuerdo con los resultados obtenidos y al análisis de los mismos al evaluar el efecto que ejerce el pH, concentración y naturaleza del buffer, concentración y tipo de surfactante en la separación simultánea y naturaleza de la matriz así como tiempo de introducción de muestra en la preconcentración en línea los Herbicidas del Grupo I (*Btn, Ctd, Cbm y Ptc*) y del Grupo II (*AcDs, Dbn y Ds*) sobre la Eficiencia (Número de platos teóricos), *N*, Resolución, *Rs*, y tiempo de análisis se puede concluir que:

- ✓ Debido a la partición diferencial que existe entre la fase pseudoestacionaria (micelas cargadas negativamente) y buffer por cada uno de los herbicidas estudiados estos se lograron separar satisfactoriamente por medio de la CCME, alcanzándose un valor máximo de resolución para los Herbicidas del Grupo I de 5.71 y eficiencias de hasta 120,000 platos teóricos, mientras que para los Herbicidas del Grupo II de se lograron valores de resolución de 7.1 y 80,000 platos teóricos.
- ✓ Así mismo se consiguió preconcentrar en línea (dentro del capilar) todos los herbicidas estudiados, para lo cual se disminuyo el pH de trabajo a fin de suprimir el FEO y así poder realizar la PLMIM-CCME (electrostaking), disminuyéndose de este modo los *LD's* para los Herbicidas del Grupo I \approx 90 veces en comparación con los obtenidos en un medio ligeramente alcalino (pH 8.5), mientras que para los Herbicidas del Grupo II los valores de los *LD's* son disminuidos \approx 20 veces cuando se realiza un electrostaking que cuando estos son determinados a un pH de 8.5 .
- ✓ El realizar una EFS previa a la PLMIM-CCME es una muy buena opción para disminuir \approx 1000 veces los *LD's* para los Herbicidas del Grupo I en comparación con los obtenidos a un pH de 8.5, mientras que los alcanzados para los del Grupo II estos fueron \approx 200 veces menor que los conseguidos a pH alto.

- ✓ Se demostró que los métodos desarrollados son eficientes al ser aplicados a una muestra real (producto comercial ACA-40EC) y que también puede ser utilizado para analizar extractos provenientes de tierras diatomeas fortificadas con dicho producto.
- ✓ Finalmente se concluye que al combinar el alto poder de resolución, altas eficiencias y el uso de surfactantes como fases pseudoestacionarias hacen de la Cromatografía capilar micelar electrocinética una técnica muy poderosa y competitiva al realizar estudios de preconcentración en línea, análisis y separación de una gran variedad de compuestos neutros así como cargados. Otro aspecto importante por resaltar es que la PLMIM-CCME es un método fácil, rápido y eficaz para disminuir los LD's, aunque esto depende de la naturaleza de los compuestos que se quieran preconcentrar y de la fase pseudoestacionaria.

TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

- [1] Hans-Jürgen Stan. Pesticide residue analysis in foodstuffs applying capillary gas chromatography with mass spectrometric detection State-of-the-art use of modified DFG-multimethod S19 and automated data evaluation. *Journal of Chromatography A* 892, 347 (2000).
- [2] N. Oi, H Kitahara, R. Kira, Enantiomer separation of pyrethroid insecticides by high-performance liquid chromatography with chiral stationary phases; *Journal of Chromatography* 515, 441 (1990)
- [3] B. Blessington, N. Crabb, Proposed primary reference methods for the determination of some commercially important chiral arloxypropionate herbicides in both free acid and ester forms; *Journal of Chromatography* 483, 349 (1989)
- [4] B. C. Hamper, D. R. Dukesherer, K. Moedritzer, Analytical and preparative separation of the enantiomer of pyrazole phenyl ether herbicides on three chiral stationaty phases; *Journal of Chromatography A* 666, 479 (1994)
- [5] H. R. Buser, M. D. Muller, *Environmental Science & Technology* 29, 2023 (1995)
- [6] H. R. Buser, M. D. Muller, *Environmental Science & Technology* 27, 1211 (1993)
- [7] B. Blessington, N. Crabb, S. Karkee, A. Northage, Chromatographic approaches to the quality drugs and herbicides; *Journal of Chromatography*. 469, 183 (1989)
- [8] Blaschke, G., Chromatografic resolution of chiral drugs on polyamides and cellulose triacetate, *Journal of Liquid Chromatography* 9, 341 (1986).
- [9] Kobor, F. And Schomburg, G., 6-tert-butylidimethylsilyl-2,3-dimetyl- α -cyclodextrin, β -cyclodextrin, and γ -cyclodextrin, dissolved in polysiloxanes, as chiral selectors for gas chromatografy – influence of selector concentration and polyxilosane matrix polarity on enantioselectivity, *HRC-J. High Resolution Chromatography* 16, 693 (1993).
- [10] Terabe, S., Shibata, H. And Miyashita, Y., Chiral separation by electrokinetic chromatography with bile salt micelles, *Journal of Chromatography*, 480, 403 (1989).
- [11] Schmitt, Ph. Garrison, A. W. Freitag, D. Kettrup, A. Aplication of cyclodextrin-modified micellar electrokinetic chromatography to the separations of selected neutral pesticides and their enantiomers. *Journal of Chromatography A* 792 (1997).
- [12] Belder, D. And Shomburg, G., Chiral separations of basic and acidic compounds in modified capillaries using cyclodextrin-modified capillary zone electrophoresis, *Journal of Chromatography A*, 666, 351 (1994).

- [13] Fanali, S., Chiral separations by capillary electrophoresis, *Electrophoresis* 15, 753 (1994).
- [14] Altria, Kevin. *Analysis of Pharmaceuticals by Capillary Electrophoresis*. Glaxo Wellcome. Vol. II. Germany. 1998.
- [15] Heiger, David N. Herold, Marzell. 1st. Edition. 1996. *Applications of the HP Capillary Electrophoresis System*. Vol. I. Germany: Hewlett Packard Company.
- [16] Skoog, Douglas A. Holler, James H. Nieman, Timothy A. 5th. Ed. 2001. *Principios de Análisis Instrumental*. España: Mc Graw Hill.
- [17] Foret Frantisek, Bocek T., Krivánková L., 1993 "Capillary Zone Electrophoresis".Ed. VCH, Alemania, Pp. 7-35, 135-186.
- [18] Smith, I., Feinberg, J. 1st. Ed. 1979. *Cromatografía Sobre Papel y Capa Fina. Electroforesis*. España: Editorial Alambra, Pp. 131-143.
- [19] Bryan, Williams L. & Wilson, Keith. 1a. Edición. 1981. *Principios y Técnicas de Bioquímica Experimental*. España: Ediciones Omega.
- [20] Brown, Phyllis R., Weston, Andrea. 1st. Ed. 1997. *HPLC and CE Principles and Practice*. United States of America: Academic Press. P. p. 134 – 211.
- [21] Heiger, David N. 3rd Ed. 1997. *High Performance Capillary Electrophoresis*. France: Hewlett Packard.
- [22] Mezinger, F., Freitag, D., Kettrup, A., Analysis of agrochemicals by capillary electrophoresis, *Journal of Chromatography A* 891, 45 (2000).
- [23] Terabe, S., Otsuka, K., Ichikawa, A., Ando, T. Electrophoretic separations with micellar solutions and open tubular capillaries. *Analytical Chemistry* 56, 111 (1984).
- [24] Atkins, P. W. 3rd Edición. 1991. *Fisicoquímica*. U. S. A. : Addison-Wesley Iberoamericana. Pp. 738 - 739.
- [25]Castellan, Gilbert W. 2nd. Edición 1986. *Fisicoquímica*. México: Addison-Wesley Iberoamericana. Pp. 465 - 469.
- [26] Quirino, J., Terabe, S., Otsuka, K. On-line sample concentration in micellar electrokinetic chromatography using cationic surfactants. *Journal of Chromatography A* 916, 123, (2001).

- [27] Quirino, J., Terabe, S., Bocek, P. Sweeping of neutral analytes in electrokinetic chromatography with high-salt-containing matrixes. *Analytical Chemistry* 72, 1934 (2000).
- [28] Quirino, J., Terabe, S. On-line concentration of neutral analytes for micellar electrokinetic chromatography. 5. Field-Enhanced Sample Injection with reverse Migrating Micelles. *Analytical Chemistry* 70, 1893 (1998).
- [29] Quirino, J., Terabe, S. On-line concentration of neutral analytes for micellar electrokinetic chromatography. I. Normal stacking mode. *Journal of Chromatography A* 781, 119, (1997).
- [30] Quirino, J., Terabe, S. On-line concentration of neutral analytes for micellar electrokinetic chromatography. 3. Stacking with Reverse Migrating Micelles. *Analytical Chemistry* 70, 149 (1998).
- [31] Rodríguez, Raúl. 1997. Desarrollo de un procedimiento de limpieza por extracción en fase sólida. Ensayos para forsemida sulfametoxazol, trimetoprim y ácido salicílico por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución en orina. Tesis de Licenciatura. F. E. C. Cuautitlán Izcalli, Edo. de México.
- [32] Hernandez, Felix, Beltran Joaquim, López Francisco J. Use of solid-phase microextraction for the quantitative determination of herbicides in soil and water wamples. *Analytical Chemistry* 72, 2313 (2000).
- [33] Rouchaud, J., Neus, O., Callens, D., Bulcke, R. Soil metabolism of the herbicide rimsulfuron under laboratory and field conditions. *J. Agric. Food Chem.* 45, 3283 (1997).
- [34] Nonato, Fernando. 2002. *Estudio del Funcionamiento de una celda de extracción en flujo para contaminantes orgánicos*. Tesis de Maestría. Facultad de Química. Ciudad Universitaria.
- [35] Schaeper, James P., Sepaniak, Michael J. Parameters affecting reproducibility in capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 21, 1421, 2000.
- [36] Swinney, Kelly., Bornhop, Darryl J. Detection in electrophoresis capillary. *Electrophoresis* 21, 1239, 2000.

- [37] Castillo, Miriam A. 2001. *Desarrollo de un programa en ambiente multimedia sobre electroforesis capilar*. Tesis de Licenciatura. F. E. S. Cuautitlán Izcalli, Edo. de México.
- [38] Harris, Daniel. C.n *Análisis químico cuantitativo*. México: Grupo Editorial Iberoamericana. Pp. 805 - 814.
- [39] Balchumas, A. T. & Sepaniak, M. J., Extension of elution range in micellar electrokinetic capillary chromatography, *Anal. Chem.* 59, 1466, 1987.
- [40] Gorse, J., Balchumas, A. T., Swalle, D. F., & Sepaniak, M. J. Effects of organic mobile phase modifiers in micellar electrokinetic capillary chromatography, *J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Común.* 11, 554, 1988.
- [41] Espinoza, M., Zamoro, M. A., Salinas, F. Use of a stopped-flow pneumatic mixing module to analyze dinitrophenol pesticides. Simultaneous determination of dinoseb and dinobuton. *J. Agric. Food Chem.* 47, 1976, 1999.
- [42] Gevao, B., Semple, K. T., Jones, K. C. Bound pesticide residues in soils: a review. *Environmental Pollution.* 108, 3, 2000
- [43] Worthing, Charles R., Hance, Raymond J. 9a. Ed. 1991. *A World Compendium the Pesticide Manual*. England: British Crop Protection Council. Pp. 111, 125, 138, 305-306, 660.
- [44] Kremlin, R. 2ª. Ed. 1995. *Plaguicidas Modernos y su Acción Bioquímica*. México: Limusa. Pp. 79, 165, 225.
- [45] Catalogo especial de plaguicidas. 1994. México: Comisión Intersecretarial para el Control del Proceso y uso de Plaguicidas, Fertilizantes y Sustancias Tóxicas. Pp. 14, 15, 18, 42.
- [46] Barberá Claudio 4ª. Ed. 1989. *Plaguicidas Agrícolas*. España: Omega. Pp. 391-393, 445-447.