00550

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

Concentración y Análisis de Herbicidas Ácidos por Cromatografía de Partición Centrífuga

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS QUÍMICAS

PRESENTA

Q. Alex Arias Martínez

Ciencias Químicas

Tutor: Dra. Evangelina Camacho Frías

2005

m345145

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

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.

Jurado Asignado:

Presidente	Dr. Manuel Jiménez Estrada
Vocal	Dra. Luz Elena Vera Ávila
Secretario	Dr. Alberto Rojas Hernández
1er. Suplente	Dra. Araceli Patricia Peña Álvarez
2o. Suplente	Dra. Martha Patricia García Camacho

Sitio donde se desarrolló el tema:

Facultad de Química
División de Estudios de Posgrado
Departamento de Química Analítica
Laboratorio 101

Asesor

Dra. Evangelina Camacho Frías

Sustentante

Q. Alex Arias Martínez

Agradecimientos

A CONACYT por la beca otorgada durante el periodo de Maestría.

A la Facultad de Química, División de Estudios de Posgrado, Departamento de Química Analítica, Laboratorio 101.

A Dra. Evangelina Camacho Frías y Dra. Luz Elena Vera Ávila

CONTENIDO

RESUMEN 1
INTRODUCCIÓN 2
ANTECEDENTES 4
Cromatografía de Partición Centrifuga 19
Cromatografía a Contracorriente de Goteo 19
Cromatografía a Contracorriente de Rotación Locular 20
Cromatografía a Contracorriente de Alta Velocidad 20
Cromatografía de Partición Centrífuga de Alta Eficiencia. 21
CPC y CLAE. 26
Resolución Cromatográfica 28
Eficiencia 29
Resolución 29
OBJETIVOS 33
PARTE EXPERIMENTAL 34
Material y equipo 34
Preparación de la muestra problema. 36
Análisis por CPC. 37
Análisis por CLAE 38
RESULTADOS Y DISCUSIÓN. 39
CONCLUSIONES 61
BIBLIOGRAFIA 63

Resumen

Los herbicidas ácidos tipo clorofenoxi son de los más utilizados a nivel mundial para el control de la maleza. El gran consumo de éstos, aunado a su persistencia, movilidad y toxicidad, ha hecho que sean un riesgo para la salud ambiental, ya que contaminan suelos, aguas, aire y pueden presentar toxicidad a organismos para los cuales no fueron diseñados y resistencia de la plaga para la que se crearon. Por ello es muy importante mantener un monitoreo constante y un estricto control de estos herbicidas en agua y mas aún en aquella que se utiliza para consumo humano.

La Cromatografía de Partición Centrífuga (CPC) es una técnica de separación con fines preparativos en la cual se pueden procesar volúmenes grandes de muestras sin llegar a saturar la columna. En este trabajo se demostró la aplicabilidad de la Cromatografía de Partición Centrífuga (CPC) como un método eficaz para la extracción, concentración y purificación de los herbicidas tipo clorofenoxi a partir de muestras acuosas. En el sistema bifásico desarrollado se utilizó como Fase Móvil (FM) la muestra acuosa y como Fase Estacionaria (FE) un disolvente orgánico capaz de retener fuertemente a los herbicidas en su forma molecular, Asimismo, aprovechando las propiedades ácido - base de estos compuestos se logró su elución de la columna con un simple cambio de pH en la FM. Los herbicidas ácidos tipo clorofenoxi estudiados fueron ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético (2,4,5-T), ácido 4-cloro-o-toluiloxiacético (MCPA), ácido 4-cloro-o-toluiloxipropiónico (MCPP) y ácido 2,4,5-triclorofenoxipropiónico (Silvex). Las condiciones de trabajo en CPC fueron: Sistema Bifásico liquido - liquido Acetato de Etilo : Agua, 20:80 % v/v, ω = 1400 rpm; Modo de elución descendente, Flujo = 4 mL/min. Combinando la alta capacidad de preconcentración de muestra por CPC con el análisis por Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia (CLAE) se alcanzaron limites de cuantificación absolutos de 2.6 μg para 2,4-D, 3.10 μg para MCPA, 9.11 μg para 2,4,5-T, 8.28 para MCPP y 5.66 para Silvex. Estos limites de cuantificación fueron independientes del volumen de muestra procesado (al menos hasta 1 L de muestra), lo que indica que el método desarrollado permite analizar con precisión y exactitud concentraciones inferiores a la decena de partes por billón (ng/mL) de estos herbicidas en matrices acuosas.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad, los herbicidas son muy utilizados, principalmente en las zonas de cultivo y pastoreo para eliminar o controlar el crecimiento de maleza y mala hierba y así aumentar la productividad de dichas zonas. Sin embargo, este beneficio conlleva a problemas de contaminación de suelos y de aguas y esto se ve reflejado en efectos tóxicos, tanto en animales como en humanos.

Entre los herbicidas más empleados se encuentra la familia de los herbicidas fenoxiácidos, siendo el más representativo el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). En general, la estabilidad y persistencia en el medio ambiente de estos compuestos, así como su penetración en las plantas depende mucho de la forma química en que se presenten, que puede ser en forma de ésteres alquílicos, ácidos carboxílicos libres o en forma de sales alcalinas (como sales de potasio o de dimetilamina).

Para detectar la presencia de los herbicidas en aguas, se han empleado diferentes técnicas de análisis, como son la cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE) y la cromatografía de gases. Debido a que las muestras de agua generalmente contienen una gran cantidad de compuestos que interfieren en la cuantificación, es necesario purificar las muestras antes de analizar los solutos de interés. Otras veces las concentraciones de los compuestos de interés son muy bajas y es necesario hacer una concentración de los solutos antes de cuantificar. Las técnicas de prepurificación y preconcentración más utilizadas son la extracción líquido - líquido y la extracción en fase sólida (EFS). Sin embargo, la extracción líquido – líquido presenta la desventaja de emplear grandes cantidades de disolventes y/o los tiempos de análisis son muy largos. Con

la EFS se resuelven estos problemas, pero algunas veces no se tiene la selectividad suficiente para separar los interferentes de los compuestos de interés y es necesario emplear soportes específicos para dichos compuestos de interés, lo que eleva mucho el costo de los análisis.

La cromatografía de partición centrífuga (CPC) es una técnica que se dio a conocer en los 80's en donde no se requiere de soporte sólido, ya que tanto la fase estacionaria como la móvil son dos líquidos inmiscibles entre sí, uno de ellos permanece "fijo" por medio de una fuerza centrífuga constante, mientras que la otra fase lo atraviesa. Esta técnica sigue el principio de las extracciones sucesivas líquido-líquido, con la ventaja de que se puede utilizar cualquier mezcla de disolventes (a condición de formar dos fases). La separación de los solutos por esta técnica depende entonces de su coeficiente de reparto en el sistema bifásico utilizado y éste se puede modificar cambiando la composición del sistema bifásico. Gracias a esto y a su gran capacidad de muestra, la CPC se aplica en la separación de mezclas complejas en escala preparativa con tiempos de procesamiento relativamente cortos.

Aprovechando las características de la cromatografía de partición centrífuga, en este trabajo se presenta un método novedoso de prepurificación y concentración de cinco herbicidas ácidos (ácido 2,4-diclorofenoxiacético, ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético, ácido 4-cloro-o-toluiloxiacético (MCPA), ácido 4-cloro-o-toluiloxipropiónico y ácido 2,4,5-triclorofenoxipropiónico) en muestras de agua y cuantificación por cromatografía de líquidos de alta eficiencia.

ANTECEDENTES

PLAGUICIDAS

Según la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos de Norteamérica (EPA), el término "Plaguicida" se utiliza para designar a una sustancia o mezcla de sustancias utilizadas para prevenir, destruir, repeler o disminuir cualquier tipo de plaga. Los plaguicidas se pueden dividir según su modo de acción en herbicidas, insecticidas y fungicidas.

En la actualidad, se considera que anualmente se consumen a nivel mundial alrededor de 2.5 millones de toneladas de aproximadamente 55,000 plaguicidas diferentes y de éstos, el 80% se usan en países desarrollados como Canadá y E. U. A.[1]. En la Tabla I se presenta una clasificación general de los plaguicidas más usados[2].

Tabla I. Principales tipos de plaguicidas existentes en el mercado mundial

Fungicidas

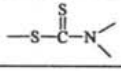
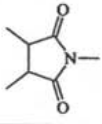
Familia	Solubilidad en agua (mg/L)	Ejemplo	Estructura base
Ditiocarbamatos	10^{-1} - 10^{5}	Mancozeb, maneb, metiram, zineb.	
Imidazoles	1 - 10^{4}	Carbendazim, imazalil, tiabendazol	
Ftalimidas	1	Procomidona, captan, captafol, folpet.	
Triazoles	10 - 10^{3}	Miclobutanil, propiconazol	

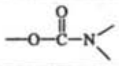
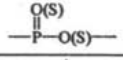
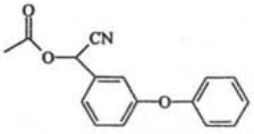
Tabla I. Principales tipos de plaguicidas existentes en el mercado mundial (continuación)

Herbicidas

Familia	Solubilidad en agua (mg/L)	Ejemplo	Estructura base
Acetamidas	$10^2 - 10^4$	Alaclorv, dicormid, metolaclor.	
Sulfonilureas	$10^2 - 10^4$	Clorosulfuron, etilclorimuron	
Clorofenoxis	$10 - 10^4$	2,4-D, 2,4,5-T, MCPA, Silvex.,MCPP	
Dinitroanilinas	$10^{-1} - 1$	Pendimetalina, trifluralina.	
Imidazolinonas	$10 - 10^4$	Imazaquin, imazapir, imazetapirir.	
Fenilfenoxis	$10^{-1} - 10^4$	Fomesafen, bifenoxi, -butil-fluazifop	
Tiocarbamato	$1 - 10^4$	Vernolato, asulam, butilato	
Fenilureas	$1 - 10^5$	Linuron, diuron, tidazuron	
Triazinas	$10-10^4$	Atrazina, ametrina, Simazina, prometon	

Tabla 1. Principales tipos de plaguicidas existentes en el mercado mundial (continuación)

Insecticidas

Familia	Solubilidad en agua (mg/L)	Ejemplo	Estructura base
Carbamatos	10 - 10^5	Carbofuran, aldicarb, propoxur, oxamil.	
Organoclorados	10^{-3} – 1	Metoxicloro, DDE, lindano, endosulfan	Insecticidas que contengan cloro.
Oganofosforados.	10^{-1} - 10^6	Diazinon, cloropirifosfoacetato	
Piretroides	10^{-3} – 10^{-1}	Permetrina, ciflutrina, fenvalerato, bifentrina.	Similar a 

El gran consumo de plaguicidas, aunado a su persistencia, movilidad y toxicidad, ha hecho que éstos sean un riesgo para la salud ambiental, ya que contaminan suelos, aguas, aire y pueden presentar toxicidad a organismos para los cuales no fueron diseñados y resistencia de la plaga para la que se crearon.

El tiempo de permanencia de estos compuestos varía dependiendo del tipo de plaguicida[3], como se muestra en la figura 1. Cabe señalar que estos valores son aproximados, ya que la velocidad de descomposición y desaparición de estos compuestos depende de las características propias de la matriz en la cual se encuentran.

Puesto que en este trabajo sólo se trabajó con herbicidas, a continuación se dará una breve descripción de los mismos.

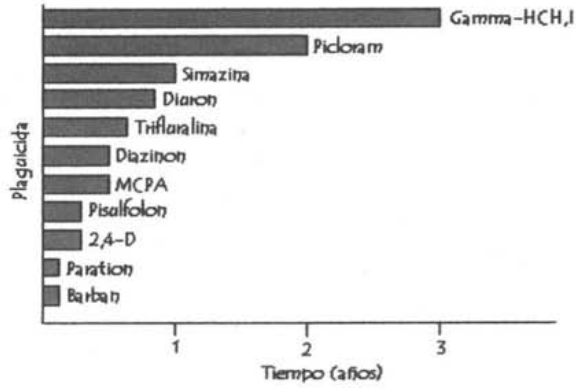


Figura 1. Tiempo de permanencia de algunos herbicidas utilizados actualmente

HERBICIDAS.

Existen varios compuestos químicos con propiedades fitotóxicas que se utilizan en el control de hierbas y malezas en plantíos, zonas de cultivos y pastoreo. La búsqueda activa de compuestos fitotóxicos durante las últimas décadas, ha conducido a un constante incremento de estos compuestos.

Existen varias clasificaciones de los herbicidas, sin embargo, lo más común es dividirlos en inorgánicos y orgánicos. Estos últimos también se pueden agrupar por afinidad química[2], como se muestra en la Tabla I.

Otra forma de clasificar a los herbicidas es de acuerdo al carácter fisiológico[4] que presentan:

- Preplantío. Se utilizan durante la preparación de la tierra antes de sembrar.
- Postplantío. Se usan después de la cosecha para eliminar la hierba que quedó.

- Preemergentes. Son no selectivos y son los de mayor aplicación. Se emplean para "limpiar" los terrenos para prevenir crecimiento de plaga.
- Post-emergentes. Son selectivos y se emplean cuando el cultivo tiene hierba no deseada. En esta categoría están las sulfonilureas, imidazolinonas y los ácidos fenóxicos.

Contaminación de aguas por herbicidas.

Debido al uso cada vez más frecuente de herbicidas, tanto suelos como aguas superficiales y subterráneas se contaminan muy fácilmente y los principios activos, o sus productos de degradación, pueden permanecer de uno a cinco meses en esos medios[5].

Cuando los herbicidas se encuentran en el medio ambiente (sea suelo o agua), los ecosistemas se encargan de integrar éstos en sus diferentes procesos. Por ejemplo, los ríos se unen directamente con los esteros, costas y mar abierto, donde los contaminantes pueden transportarse por la corriente, teniendo un contacto permanente con la atmósfera, por lo que los contaminantes también pueden ser transportados por volatilización. Así, los contaminantes pueden ser transportados a los mantos acuíferos, ya sea por la contaminación de los ríos, que son la vía más directa o por filtración natural en el momento de la aplicación de los herbicidas; también puede ser por lluvia después de la volatilización de éstos[6]. Este proceso se representa en la figura 2.

En la naturaleza los herbicidas pueden presentar diferentes transformaciones debido a hidrólisis, biodegradación, oxidación, fotólisis, biotransformación, reacción de metabolitos con organismos vivos, etc[6]. En la figura 3 se esquematizan algunos de estos procesos.

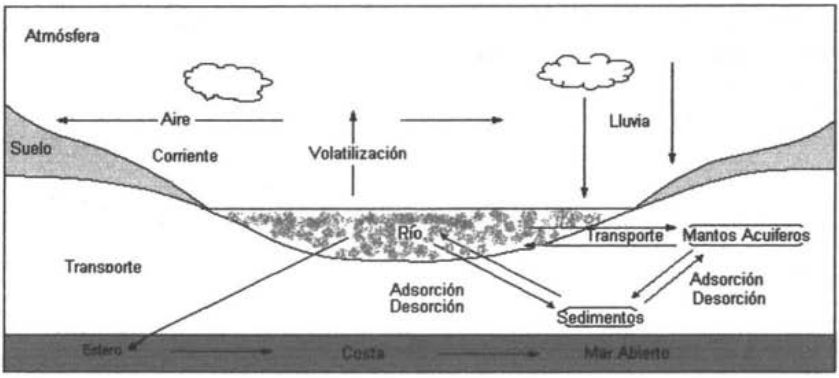


Figura 2. Intercambio de los herbicidas en los diferentes ecosistemas

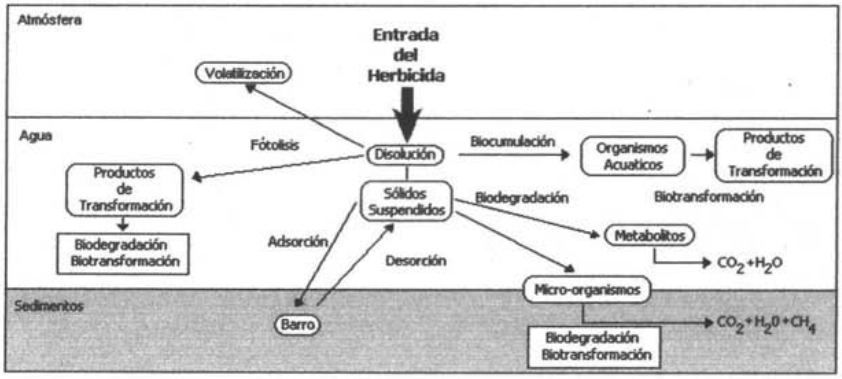


Figura 3. Procesos de transformación de los herbicidas

La contaminación también se puede presentar en organismos vivos, tanto vegetales como animales, ya que éstos están en contacto directo con el herbicida en el momento de su aplicación[6]:

- El principio activo se acumula en el organismo, pudiendo provocar un efecto tóxico o causar la muerte. Este proceso se denomina bioconcentración o bioacumulación.

- Por el proceso de biomagnificación, los compuestos se trasmiten a otros organismos a través de la cadena alimenticia y se acumulan en diferentes organismos, particularmente en los consumidores finales de la cadena alimenticia.
- Por el proceso de biotransformación, los organismos degradan estos compuestos y los excretan. Se sabe que este proceso ocurre en algunos animales acuáticos y hongos.
- Finalmente, los compuestos degradados se descomponen significativamente a productos tales como CO_2, CH_4 y H_2O. Este proceso se conoce como biodegradación y generalmente los microorganismos son los que la llevan a cabo.

Herbicidas fenoxiácidos.

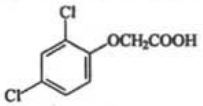
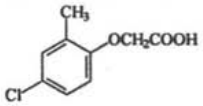
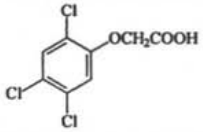
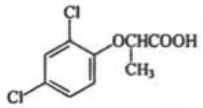
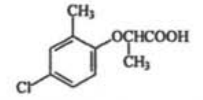
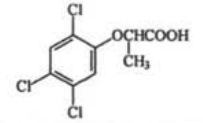
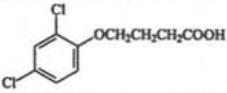
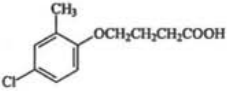
Los herbicidas fenoxiácidos se usan ampliamente en agricultura y en el ámbito forestal desde 1940. También se usan para limpiar áreas deportivas, caminos de trenes de alta velocidad, cementerios y para el control de algas en aguas y drenajes de desechos[7]. En la Tabla II se presentan algunos de los herbicidas de este tipo que existen en el mercado[8].

En E. U. A. y en Europa, la mayoría de los herbicidas usados son de tipo fenoxiácido, por ejemplo en Suecia, el 65 % de los herbicidas aplicados son ácidos clorofenóxicos[5].

Estos inhibidores de crecimiento sintéticos son de tipo selectivo y de traslocación, acumulándose en raíces y partes de crecimiento. A bajas concentraciones pueden incrementar las cosechas, pero en mayores

cantidades actúan como inhibidores del crecimiento, ocasionando efectos dañinos[9].

Tabla II. Propiedades de algunos herbicidas fenoxiácidos

Herbicida	Estructura	pKa[(b)]	Solubilidad en agua (mg/L)	Log Pw/o[(c)]	LD_{50} [(d)] mg/Kg
2,4-diclorofenoxi acético (2,4-D)		2.6	900	2.65	300 – 1,000
4-cloro-2-metilfenoxi acético (MCPA)		3.7	825	3.25	700
2,4,5-triclorofenoxi acético (2,4,5-T)		2.8	278	3.13	300
2,4-diclorofenoxi-propanoico (2,4-DP)		3.5	710	3.43	800
4-cloro-2-metilfenoxi propanoico (MCPP)		3.11	620	3.63	3.63
2,4,5-triclorofenoxi propanoico (Silvex)		3.0	140	3.8	650
2,4-diclorofenoxi butanoico (2,4-DB)		4.8	46	3.53	(a)
4-cloro-2-metilfenoxi butanoico (MCPB)		4.8	44	3,47	(a)

(a) No se encontró el valor para estos compuestos, (b) pKa= -Logaritmo de la constante de disociación de un ácido, (c) P w/o= Coeficiente de reparto agua/octano y (d) LD_{50}= Dosis letal al 50% de la muestra poblacional.

Actualmente, no se conocen bien las bases moleculares y el modo de acción de los ácidos clorofenóxicos, pero se cree que el protón del ácido impide la fosforilación oxidativa y modifica la estructura de las membranas tilacoidales[10], impidiendo el crecimiento de la planta.

Por otro lado, la estabilidad y persistencia de los ácidos clorofenóxicos en el medio ambiente, así como su penetración en las plantas, depende mucho de su formulación. Generalmente se presentan como ésteres alquílicos o ácidos carboxílicos libres. Los ésteres emulsificados en aceite se utilizan comúnmente por su alta actividad herbicida, por su poder de penetración y por su baja presión de vapor. Sin embargo, su baja volatilidad puede causar un daño sensible a las semillas y sembradíos cercanos, especialmente en climas cálidos[11].

En su forma básica, debido a su gran solubilidad en agua, estos compuestos pueden llegar a los mantos acuíferos a través de las aguas superficiales, o bien por infiltración natural[5].

Con respecto a su toxicidad, ninguno de los herbicidas ácidos se consideran contaminantes muy tóxicos, aunque algunos tienen efectos mutagénicos, teratogénicos o carcinogénicos.

El nivel de toxicidad de estos herbicidas depende de su estructura, por ejemplo, el LD_{50} oral es de 375 mg/Kg de peso en ratas para el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y de 150 para su éster butírico[12]. Así, de acuerdo a la clasificación según su riesgo de toxicidad recomendada por Who[13], el 2,4-D es de riesgo moderado y su éster es de alto riesgo.

En el ser humano, diversos estudios[14] demostraron que la prolongada exposición al 2,4-D, disminuye la fertilidad en los hombres, sobre todo si éste se combina con el ácido 4-amino-3,5,6-

tricloropicolinico (piclolam), como ocurre en varias formulaciones comerciales.

Debido a esto, las leyes de E. U. A. y de la Unión Europea, imponen un máximo de niveles residuales de herbicidas totales de 100 a 500 ng/L en agua para consumo humano; 1-5 μg/L en agua potable pretratada y de 50-100 μg/l en agua de río[5]. En México, las normas oficiales mexicanas, sólo hacen referencia al 2,4-D y establecen que el límite máximo permisible para este compuesto es de 50 mg/L en agua para uso y consumo humano[15, 16]. Como se observa, este valor es mucho más grande, que el permisible en Europa y E. U. A.

Los bajos niveles permisibles de herbicidas, aunado a que actualmente se usan más de 900 sustancias activas en diferentes formulaciones, sin contar con la formación de metabolitos, hace que su control en agua sea un área bastante compleja. Es por eso que se han desarrollado diversos métodos analíticos, cada vez más sensibles y específicos. A continuación se mostrará un breve resumen de las principales técnicas aplicadas a la preconcentración y análisis de herbicidas ácidos en agua, que existen actualmente.

Análisis de herbicidas ácidos.

El análisis de residuos de herbicidas involucra diferentes pasos, como son la extracción, limpieza o eliminación de interferencias, cuantificación del principio activo y confirmación de su identidad, usando para ello diferentes técnicas.

En un principio, la cuantificación de principios activos se hacía por colorimetría y espectrofotometría, pero éstos son poco sensibles y en muchas ocasiones con ellos no se puede distinguir entre el principio activo y sus metabolitos o productos de hidrólisis[17].

Actualmente, la extracción, separación y cuantificación de estos compuestos se hace casi siempre usando las técnicas cromatográficas[18], ya que éstas permiten analizar compuestos orgánicos e inorgánicos presentes en bajas concentraciones y/o en matrices complejas.

Algunas veces, se puede hacer la cuantificación directamente. Sin embargo, la presencia de compuestos mono- oli- o poliméricos pueden reducir la eficiencia de la separación de cualquier método cromatográfico, causando cambios en los valores de retención y en la forma de los picos, siendo necesario establecer un paso de pre-purificación[8].

Para la pre-purificación y pre-concentración de los solutos de Interés en muestras acuosas, las técnicas más utilizadas son la extracción líquido-líquido y la extracción sólido-líquido, o extracción en fase sólida (EFS).

La extracción liquido – liquido de los ácidos clorofenóxicos se basa principalmente en el valor de pH de la disolución acuosa, ya que a valores de pH superiores al pKa los solutos se encuentran en forma disociada, siendo muy solubles en la fase acuosa, pero a valores de pH inferiores al pKa, estos compuestos se encuentran en su forma molecular, siendo entonces poco solubles en agua y más solubles en disolventes orgánicos, tales como éter dietílico y diclorometano, que se han usado para su extracción[18].

La EFS se desarrolló como un método alternativo a la extracción líquido-líquido. Los primeros cartuchos y columnas para este propósito fueron de sílice y aparecieron comercialmente en los años 70's. Posteriormente se desarrollaron otras fases adsorbentes para diversos analitos siendo las más comunes la fase inversa y la de intercambio iónico. Sin embargo estos soportes presentan baja selectividad y retienen

cantidades apreciables de ácidos húmicos y fúlvicos, presentes en aguas ambientales. Esto puede conducir a una disminución significativa en la retención de los compuestos de interés, particularmente en el caso de compuestos polares como los ácidos clorofenóxicos. Adicionalmente, la materia orgánica retenida coeluye con los analitos, produciendo serias interferencias durante el análisis cromatográfico e impidiendo su cuantificación a bajos niveles de concentración[19, 20, 21]. Como se mencionó, el problema es más notorio cuando los solutos de interés son muy polares[22], como es el caso del 2,4-D. Se han reportado trabajos en donde se combinan los dos tipos de soportes para alcanzar una mayor sensibilidad en la determinación de los herbicidas. Primero la muestra se percola a través de una precolumna empacada con una fase reversa de alta capacidad de retención (p.ej. fase polimérica estireno divinilbenceno). En una segunda etapa, los solutos con propiedades, ácido-base (como los ácidos clorofenoxi) son ionizados por el paso de una solución a pH adecuado, lo cual provoca su desorción de la fase reversa y su consecuente transferencia a la segunda precolumna empacada con un intercambiador iónico, donde quedan retenidos. De esta manera la muestra es preconcentrada en la primera columna y limpiada por transferencia selectiva de los solutos ioniozados a la segunda precolumna, antes de su determinación por CLAE.[23].

Con el objeto de aumentar la selectividad de la EFS, recientemente se han desarrollado adsorbentes que emplean mecanismos de reconocimiento molecular, en donde el soporte se diseña especialmente para un soluto específico (o familia de solutos). Tal es el caso de las columnas de inmunoafinidad[24]. Sin embargo, en estudios hechos para el 2,4-D, se encontró que al pH en que predomina la forma molecular (pH

menor a 4), el inmunoadsorbente se empieza a degradar, perdiendo su capacidad de retención selectiva del soluto[25].

Para la pre-purificación y concentración de los herbicidas ácidos en muestras acuosas, también se ha reportado lo siguiente:

- Un tratamiento químico para la degradación de compuestos húmicos (por ejemplo con sulfito de sodio)[26].
- Extracción subsecuente con un adsorbente polar como sílice o fluorisil para eliminar las interferencias que se coextrajeron con los analitos de interés en la primera extracción[27, 28, 29].

Como puede observarse, estas técnicas de pre-purificación presentan ventajas y desventajas:

La extracción líquido – líquido es fácil de hacer y no es necesaria instrumentación compleja sin embargo, su eficiencia es baja en comparación con la EFS. Además, la extracción líquido – líquido produce cantidades considerables de desechos tóxicos, y es un proceso lento. La EFS es una técnica más rápida, sencilla y eficiente que requiere menor cantidad de disolvente que la extracción líquido – líquido[18]. Sin embargo, en muchos casos es necesario disponer de cartuchos especiales para un tipo de solutos, lo que aumenta el costo del análisis, además, en el caso de soportes con inmunoadsorbentes, es necesario producir el anticuerpo específico al analito, y generalmente su estabilidad es muy pobre, sobre todo cuando se utilizan disolventes orgánicos, lo que aumenta todavía más su costo.[30], [31].

Técnicas de separación y cuantificación

Para el análisis de herbicidas en general, la técnica más utilizada es la cromatografía de gases debido a su versatilidad y gran sensibilidad. Los detectores más empleados para este tipo de compuestos son: captura de electrones (ECD), nitrógeno-fósforo (NPD) y fotométrico de llama (FPD). Por otro lado, la espectrometría de masas (EM) es la técnica de detección más valiosa en CG, ya que proporciona información sobre la estructura molecular de los compuestos y es también altamente sensible y selectiva cuando se detecta un ión en particular (modo SIM). Sin embargo, en el caso de los ácidos clorofenóxicos, es necesario hacer una derivatización para poderlos analizar por esta técnica[32].

Los derivados más comunes de los ácidos clorofenóxicos para su análisis por CG son sus correspondientes ésteres metílicos, obtenidos por reacción con diazometano[33]. Para la esterificación, también se ha usado el metanol-BF_3[34], trimetilsilil-diazometano-metanol[35,36] e hidróxido de tetrabutilamonio (TBAH) con ioduro de metilo[37]. En algunos casos, se usa BCl_3 - 2-cloroetanol para producir el éster 2-cloroetílico, que proporciona una mejor respuesta en el detector ECD[38].

La cromatografía de líquidos de alta eficiencia normalmente es más utilizada para los ácidos clorofenóxicos, ya que no requiere de derivatización. Las columnas de separación más empleadas son las de fase inversa, principalmente la C_{18}. En este caso, los detectores más empleados son de, Ultravioleta-visible[39] y Espectrometría de masas[40, 41]. Sin embargo, este último es mucho menos empleado que en CG, ya que presenta más problemas de acoplamiento al sistema cromatográfico, aunque comercialmente existen varias opciones[42].

En general, los detectores utilizados en CLAE son menos sensibles que los utilizados en CG, por lo que muchas veces es necesario preconcentrar los solutos de interés de la muestra acuosa antes de su cuantificación. En CG, el principal problema es la necesidad de formar el derivado volátil para su cuantificación, pudiendo ocasionar problemas de reproducibilidad del método. Además, al requerir de un paso adicional, como es la derivatización, aumenta el tiempo de análisis.

En lo que respecta a la cromatografía de partición centrífuga (CPC), no se encontró en la literatura ningún trabajo reportado del uso de esta técnica en el análisis de los ácidos clorofenóxicos.

Cromatografía de Partición Centrifuga.

Las extracciones sucesivas líquido - líquido se conocen desde hace mucho tiempo y han sido ampliamente estudiadas principalmente por L. Craig[43].

Con el desarrollo de nuevos equipos (principios de los años 70's), el proceso de Craig dio origen a la Cromatografía a Contracorriente, la cual fue desarrollada por Y. Ito y K. Nunogaki[44] en Japón.

Posteriormente, se diseñaron varios aparatos utilizando este principio y desafortunadamente cada uno de ellos llevó a una técnica diferente, pero todas ellas basadas en extracciones sucesivas líquido - líquido. Posiblemente esta multiplicidad de nombres impidió que este tipo de cromatografía se desarrollara rápidamente.

A continuación se da una breve descripción de las principales técnicas que surgieron.

Cromatografía a Contracorriente de Goteo

La Cromatografía a Contracorriente de Goteo (CCCG) fue una de las primeras técnicas en donde se usó el concepto de contracorriente y fue introducida por L. Rikakai[45] a fines de los años 70's. El equipo está formado por una serie de tubos de vidrio verticales unidos en los extremos por pequeños tubos capilares de teflón. El proceso de separación consiste en bombear los solutos disueltos en la fase móvil (FM), la cual atraviesa en forma de gotas una fase estacionaria (FE) que se encuentra en los tubos de vidrio y por afinidad de los solutos ya sea por la FE o por la FM, se logra la separación.

Por esta técnica, los tiempos de análisis son muy largos debido a que los flujos que se utilizan son muy pequeños, ya que de otra manera la FM desplazaría a la FE en lugar de atravesarla, impidiendo así la separación.

Esta técnica no tuvo mucho auge debido precisamente a los tiempos de análisis tan largos.

Cromatografía a Contracorriente de Rotación Locular

La Cromatografía a Contracorriente de Rotación Locular (CCCRL) tampoco tuvo mucho auge debido a que el aparato que se utilizaba era muy complejo. En este caso, se siguió usando el mismo principio de extracciones sucesivas líquido - líquido, pero como en CCCG se tenían problemas de retención de la FE, se decidió introducir una fuerza centrifuga. Así, el aparato se formó con una serie de cilindros colocados sobre un eje en posición horizontal, el cual se hacía girar al mismo tiempo que los cilindros que contenían a la FE[45]. Desafortunadamente, en este sistema no se generaba una fuerza centrífuga muy grande, lo que provocaba que no se pudiera trabajar con flujos muy grandes (mayores de 1 mL/min) y que los tiempos de análisis siguieran siendo muy largos[46].

Cromatografía a Contracorriente de Alta Velocidad

La Cromatografía a Contracorriente, fue desarrollada en la década de los 80's por Y. Ito y colaboradores en E. U. A. En este caso, la FE es retenida en la columna por un campo centrífugo variable, generado por tres ejes de rotación, los cuales se comportan como un sistema planetario. La columna está formada por un tubo de teflón enrollado en uno de los ejes formando una bobina y es en ella donde se encuentra la FE. La fuerza centrífuga variable generada es la que permite que la FE permanezca "fija" en la columna, mientras que la FM la atraviesa a gran velocidad (flujos

altos, hasta 20 mL/min). De esta manera, los tiempos de análisis son más cortos y las separaciones más eficientes. Esto es posible porque en este caso se pueden usar velocidades de rotación elevadas (hasta 1500 rpm). Por estas características, esta técnica se conoce actualmente como Cromatografía a Contracorriente de Alta Velocidad (CCCAV)[47].

Cromatografía de Partición Centrífuga de Alta Eficiencia.

K. Nunogaki desarrolló en Japón la Cromatografía de Partición Centrífuga de Alta Eficiencia (CPCAE). Esta se basa en la formación de un campo centrífugo constante producido por un mecanismo de rotación de un solo eje[48].

En este caso, el aparato está formado por una columna de 31 x 47 x 50 cm, con un peso aproximado de 43 Kg, en el interior se tiene un rotor (que es la columna misma), que está formado por seis pares de discos de teflón y acero inoxidable, en donde se encuentran grabados a ambos lados canales conectados entre sí por conductos. Cada disco contiene 178 canales, dando un total de 2136. Estos miden 15 x 2.5 x 2.1 mm y los conductos 15 x 1 x 1 mm, dando como resultado un volumen interno de ≈ 79 μL por canal, es decir, el correspondiente al 85 % de un volumen total de 230 mL.

Los discos se encuentran sobre un eje que gira sobre sí mismo (figura 4). La FE es retenida en la columna por la fuerza centrífuga constante generada al hacer girar el rotor, mientras que la FM la atraviesa.

Los conductos contienen únicamente FM, mientras que en cada canal hay FM y FE, pudiendo ajustarse la relación de ambas dentro de la columna.

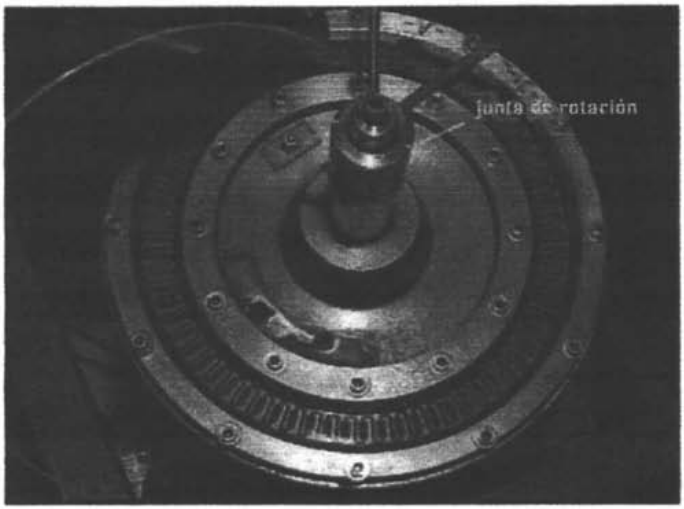


Figura 4. Discos de la columna unidos en el eje de rotación.

La FM que se encuentra en el interior de la columna es remplazada por FM nueva que se introduce al sistema de manera continua, realizándose de esta forma la separación cromatográfica. La figura 5 representa un esquema de una columna de este tipo.

La CPC presenta un gran número de ventajas con respecto a otras técnicas cromatográficas, principalmente al compararla con las que utilizan una FE sólida. La ausencia de un soporte estacionario permite que se tenga un mayor volumen de FE, lo que permite que la capacidad de muestra sea grande, reflejándose esto en la posibilidad de separar grandes cantidades de soluto en un solo análisis (de miligramos hasta gramos). Por otro lado, permite aislar compuestos inestables o altamente degradables al entrar en contacto con el soporte sólido.

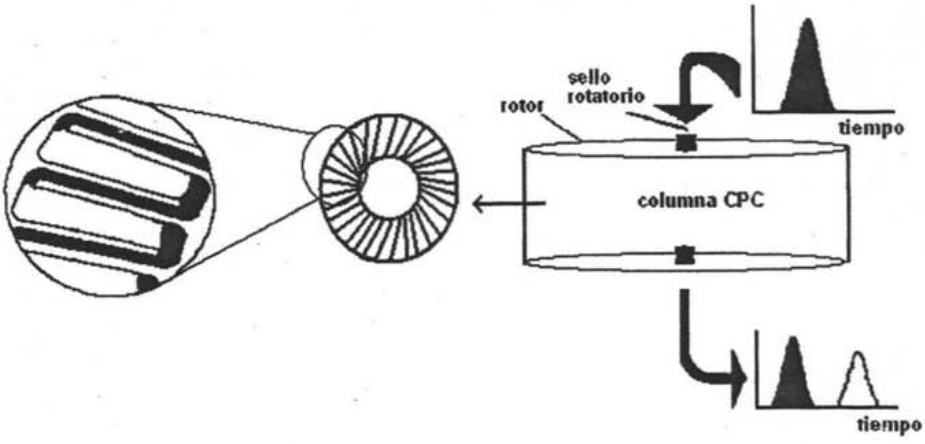


Figura 5. Esquema de la columna para Cromatografía de Partición Centrífuga.

Otra de las ventajas que presenta la CPC con respecto a otras técnicas cromatográficas es la de eliminar costos por reemplazos periódicos de la columna, ya que es más económico utilizar un sistema de disolventes, sobre todo cuando se analizan grandes cantidades de muestra.

Además, la CPC permite tener una recuperación casi total de la muestra, aún cuando no haya separación, ya que cualquiera de las dos fases líquidas puede usarse como FM o FE, aún en un mismo análisis, por tal motivo se puede vaciar la columna en su totalidad.

Estas características hacen que la CPC se use más en separaciones preparativas, sin descartar el interés analítico.

Equipo

En CPC se utiliza el mismo equipo que se emplea en CLAE, es decir, un sistema de bombas que permiten introducir la FE y la FM. Puesto que las dos fases son líquidas, se necesitan por lo menos dos vías de introducción. Por otro lado, cuando se analizan grandes cantidades de muestra, ésta se introduce al sistema por medio de una tercer vía; cuando se

analizan pequeñas cantidades, la introducción de la muestra se puede hacer por medio de un inyector de válvula tipo "Rheodyne". Los detectores pueden ser UV-Visible, Fluorescencia, etc., dependiendo de las características físicas de la muestra. Sin embargo, cuando se trabaja con cantidades importantes, estos detectores se saturan, siendo necesario colectar fracciones de eluyente para su posterior detección fuera de línea.

Al igual que en CLAE, el flujo de trabajo va a depender de la presión generada durante al análisis, pero en el caso de la CPC, esta presión también dependerá de la velocidad de rotación (ω) de la columna, con la que se controla la fuerza centrifuga (0-2000 rpm). En general, se trabaja con flujos comprendidos entre 1 y 10 mL/min. En la figura 6 se muestra un esquema del equipo cromatográfico utilizado.

La FM y la FE pasan a la columna por medio de dos sellos rotatorios que se encuentran, uno en la parte superior y el otro en la parte inferior del rotor y es a través de ellos que la columna se une directamente al inyector y al detector.

En CPC, cualquiera de las dos fases puede ser usada como FE, por ejemplo, si ésta es la fase más densa y la FM la más ligera, la elución se hace en "Modo Ascendente", lo que quiere decir que la FM atraviesa a la FE de la parte inferior del canal hacia la parte superior. También se puede utilizar al revés y entonces se trabajará en "Modo Descendente", es decir la FM es la más densa y va atravesar a la FE (más ligera) de la parte superior del canal, a la parte inferior pasando a la parte superior de otro canal, así hasta salir del sistema cromatográfico (figura 7).

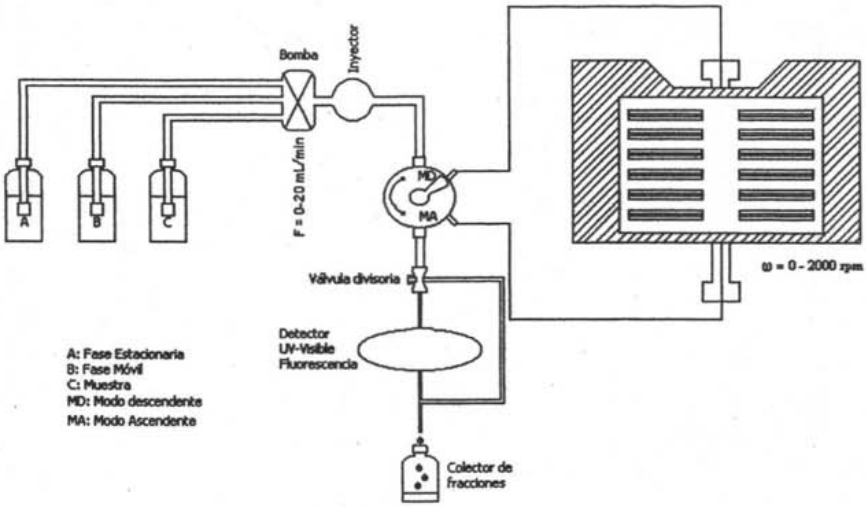


Figura 6. Equipo empleado en CPC.

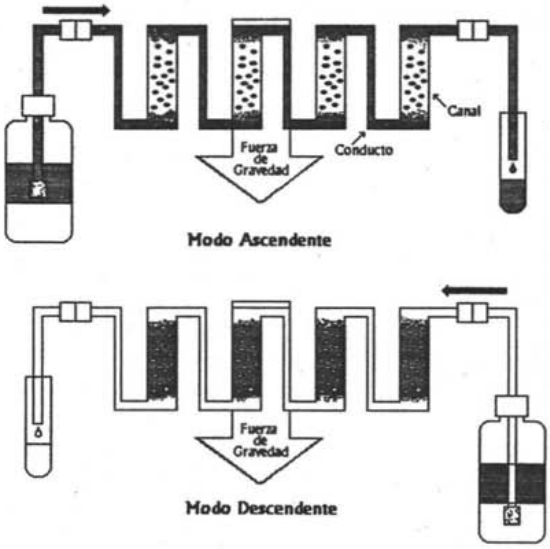


Figura 7. Modos de elución ascendente y descendente en CPC.

Modos de elución.

Al igual que en CLAE, en la cromatografía de partición centrífuga se puede eluir en fase normal (cuando la fase más polar es la FE y la fase menos polar la FM), en fase inversa (cuando la fase más polar es la FM y la fase menos polar la FE). Además, por CPC también se puede hacer el análisis en modo dual de elución. En este caso se comienza el análisis, por ejemplo en fase normal y después de un tiempo, la fase móvil se cambia a fase estacionaria para trabajar en fase inversa. En la figura 8 se explica mejor este modo de elución.

CPC y CLAE.

La CPC y CLAE son técnicas similares en varios aspectos: mismo principio (reparto de solutos) y mismo equipo de trabajo (bombas, inyectores, detectores), Sin embargo, existen grandes diferencias entre ellas, algunas de las cuales se enumeran a continuación[6].

Tomando como base la cromatografía en fase inversa con fases enlazadas, en CLAE se tiene una fase estacionaria formada por una cadena lineal orgánica unida a un soporte de sílice, en donde la FE propiamente dicha solo ocupa del 5 al 7% del volumen total de la columna y no tiene cambios significativos con la variación de la composición de la FM[48]. Este porcentaje es poco, pero a cambio, se tiene un sistema cromatográfico muy eficiente.

En CPC, la sílice es "reemplazada" por un campo gravitacional que permite utilizar un disolvente orgánico (n-hexano por ejemplo) como FE y éste ocupa entre el 50 y 80 % del volumen total de la columna (figura 9).

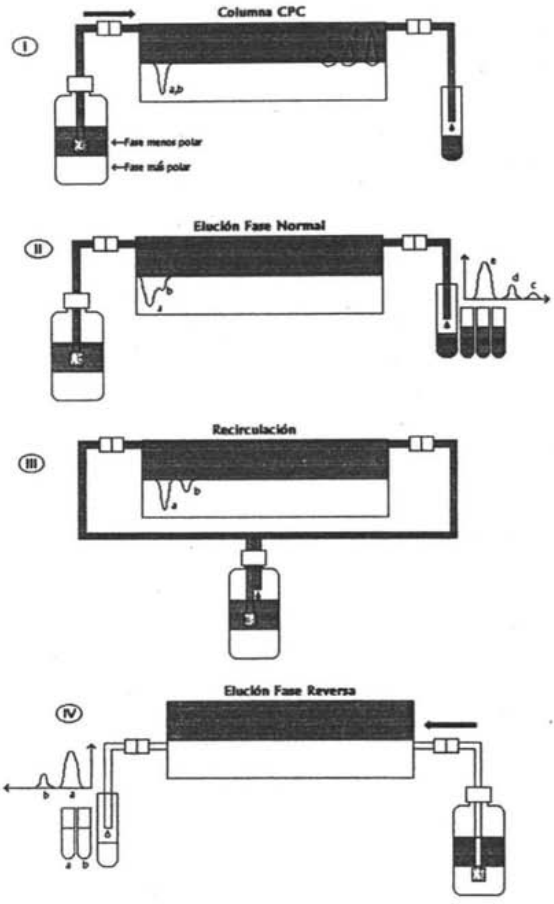


Figura 8. Modo Dual de elución. Si se tiene una muestra que contiene 5 componentes a, b, c, d y e, donde la afinidad de estos compuestos hacia la fase no polar incrementa de a hacia e, los componentes menos polares c, d y e eluyen a distintos tiempos cuando se usa como FM la menos polar, es decir, se trabaja en fase normal. En este caso los componentes a y b, quedan retenidos en la FE (I y II). Se sigue pasando la fase móvil apolar para que los componentes a y b migren lentamente (III). Después de un tiempo, la dirección del flujo se invierte y ahora la FM es la más polar y la FE es la menos polar. De esta manera eluyen los compuestos a y b separados (IV).

Estas diferencias en el porcentaje de FE tienen como consecuencia:

- Los coeficientes de reparto utilizados para la purificación de una muestra por CPC son cercanos a la unidad, mientras que para CLAE son generalmente mayores de 15.
- La capacidad de una columna CPC es mucho más importante que para una columna CLAE del mismo volumen total. Es posible entonces analizar grandes cantidades de muestra por CPC sin saturar la columna.

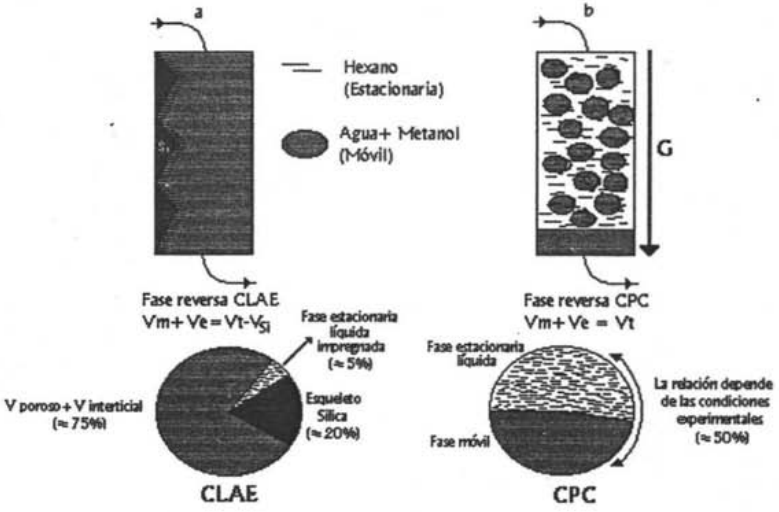


Figura 9. Fases estacionarias utilizadas (a) CLAE y (b) CPC

Resolución Cromatográfica

La ecuación fundamental de la cromatografía de reparto es:

$$V_r = V_m + K \times V_E$$

Donde V_r es el volumen de retención del soluto, V_M y V_E son respectivamente los volúmenes de fase móvil y estacionaria dentro de la columna, y K es la constante de reparto.

En CLAE, los volúmenes de FM y FE dentro de la columna no se conocen, mientras que en CPC sí es posible conocerlos, por lo que es posible calcular la constante de reparto de un compuesto dado, si se conoce el volumen de retención.

Eficiencia

En cromatografía, la eficiencia se representa por el número de platos teóricos (N), que se calcula a partir de la siguiente ecuación:

$$N = 16\left(\frac{t_r}{w_b}\right)^2$$

donde tr es el tiempo de retención y wb es el ancho a la base del pico.

En CPC se puede aplicar la misma ecuación, aunque por esta técnica no se tiene una columna real, sino una serie de canales conectados entre sí y parece ser que a lo más hay un plato teórico por canal[50]. En la mayoría de los casos, se necesitan varios canales para formar un plato teórico.

Resolución

Para dos compuestos vecinos 1 y 2, la resolución (Rs) está en función del factor de selectividad (α), del número de platos teóricos (N) y del factor de retención (k'), siendo este último función de la constante de reparto K y de los volúmenes de FE y FM dentro de la columna V_E y V_M.

$$R_s = \frac{1}{4}\sqrt{N}\left(\frac{\alpha - 1}{\alpha}\right)\left(\frac{k'_2}{k'_2 + 1}\right)$$

El factor de selectividad es la relación de los coeficientes de reparto de dos solutos vecinos. En CLAE, K se reemplaza por el factor de retención k'.

$$\alpha = \frac{k'_2}{k'_1} = \frac{K_2}{K_1}$$

y

$$k' = \frac{t_r - t_0}{t_0} = K\frac{V_E}{V_M}$$

donde t_r es el tiempo de retención del soluto estudiado y t_0 es el tiempo de elución de un soluto no retenido en la columna cromatográfica.

Es posible entonces calcular la resolución a partir de la ecuación anterior:

$$R_s = \frac{1}{4}\sqrt{N}\left(\frac{\alpha - 1}{\alpha}\right)\left(\frac{K}{K_2 + \frac{V_M}{V_E}}\right)$$

El valor de la relación de V_M/V_E es grande para CLAE (entre 13 y 20) y no es importante en CPC (entre 0.25 a 1 para un volumen de FE entre 50 y 80% del volumen total de la columna). Esto significa que con el mismo factor de separación y constantes de reparto idénticas, la resolución es mucho más grande en CPC que en CLAE para un número de platos teóricos dado, es decir, el número de platos teóricos necesarios para tener una resolución determinada es menor en CPC que en CLAE.

La figura 10 muestra que para α=1.2, K= 1 y N=1000, la resolución es de 0.1 en CLAE ($V_E \approx 7\%$ del volumen total) y 1 en CPC ($V_E \approx 65\%$ del volumen total). Entonces, para obtener una resolución de 1.5 se necesitan 190,000 platos teóricos en CLAE, mientras que 2,200 son suficientes en CPC.

Vemos así que el volumen de fase estacionaria en la columna CPC hace variar fuertemente la resolución, por lo que esta variable debe estar perfectamente controlada durante la optimización de las condiciones experimentales.

Por esta técnica, la resolución y la eficiencia aumentan con la velocidad de rotación y disminuyen muy poco con el flujo[49]. En general, los parámetros que influyen sobre la resolución y la eficiencia se pueden agrupar en tres bloques[50] (figura 11):

- Parámetros de uso: flujo, velocidad de rotación y modo de elución.
- Parámetros del instrumento: forma de las celdas y conductos, material con que están hechos.
- Parámetros del sistema bifásico: Propiedades fisicoquímicas de cada una de las fases, tales como densidad (ρ), viscosidad (η) y tensión superficial (γ).

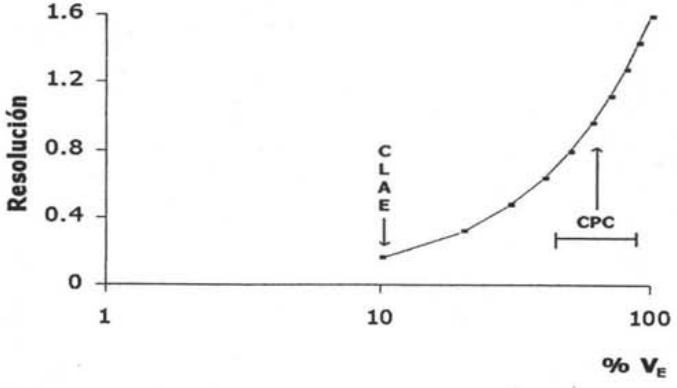


Figura 10. Resolución en función del porcentaje de fase estacionaria para CLAE y para CPC. $\alpha = 1.2$, $N = 1000$, $K = 1$.

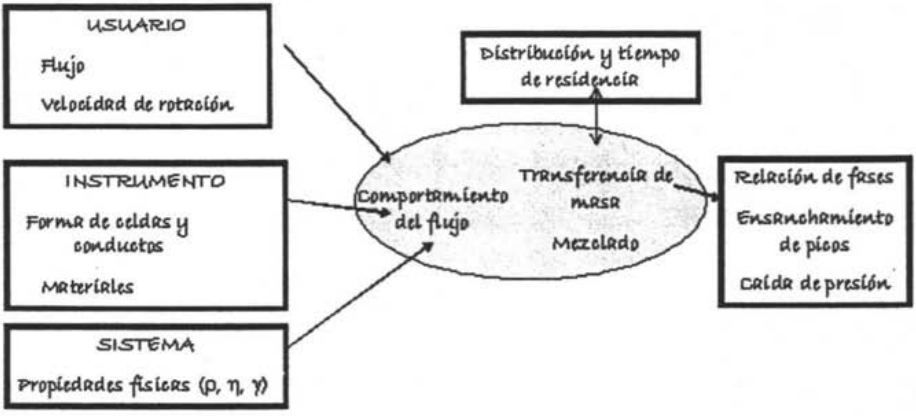


Figura 11. Relación entre los diferentes parámetros con la resolución en CPC.

El conjunto de todos estos parámetros hace que el régimen del flujo establecido sea en forma de película, película y capa oscilante, capa oscilante y atomización y es con este último caso cuando se tiene la mayor eficiencia del sistema cromatográfico (figura 12).

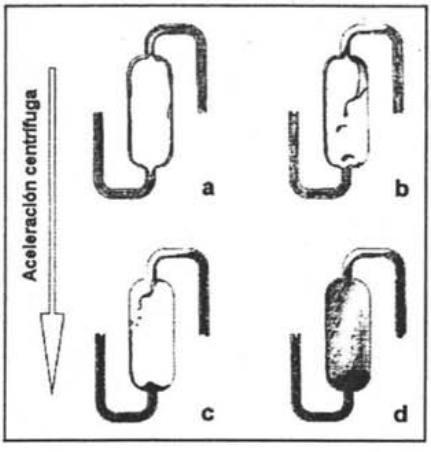


Figura 12. Régimen del flujo en CPC según los parámetros de trabajo. (a) película, (b) película y capa oscilante, (c) capa oscilante (d) atomización.

Objetivos

Objetivo general

Desarrollar un método alternativo para la extracción, preconcentración y purificación de herbicidas ácidos tipo clorofenoxi en aguas naturales empleando la Cromatografía de Partición Centrífuga.

Objetivos particulares

Encontrar un sistema bifásico en CPC que permita concentrar a los herbicidas en los primeros mL de fase estacionaria (fase orgánica) y después, por cambios de pH en la fase móvil (fase acuosa), lograr la elución selectiva de los solutos gracias a las propiedades ácido - base que éstos presentan.

Combinar la extracción por CPC y el análisis por Cromatografía de Líquidos de Alta eficiencia (CLAE) para implementar un método que permita cuantificar con precisión y exactitud los herbicidas clorofenoxi al nivel de trazas en aguas naturales.

PARTE EXPERIMENTAL

Material y equipo

Todos los disolventes utilizados fueron grado cromatográfico o grado reactivo de Prolabo (Francia) y J. T. Baker (E. U. A).

El agua fue destilada y filtrada sobre soporte Milli Q.

El ácido perclórico fue de Sigma-Aldrich (E. U. A.), el fosfato ácido de sodio y la disolución de amonio fueron de J. T. Baker (E. U. A).

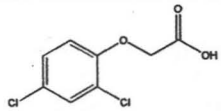
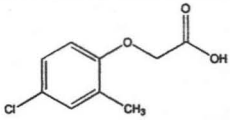
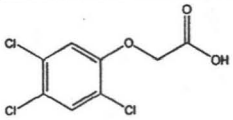
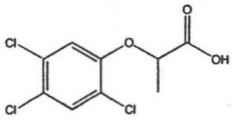
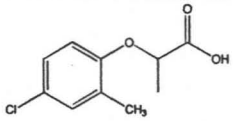
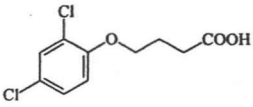
Todos los estándares usados fueron de *Chem. Service* (E. U. A.). Estos fueron: ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético (2,4,5-T), ácido 4-cloro-o-toluiloxiacético (MCPA), ácido 4-cloro-o-toluiloxipropiónico (MCPP), ácido 2,4,5-triclorofenoxipropiónico (Silvex) y ácido 2,4-fenoxibutanóico (2,4-DB) con una pureza del 99.95 %. Sus estructuras se presentan en la Tabla III. Se prepararon soluciones concentradas (1000 mg/mL) de cada soluto en acetonitrilo, las cuales se almacenaron a – 20°C . A partir de éstas se prepararon las soluciones de trabajo (solutos solos o en mezcla), diluyendo alícuotas apropiadas en mezclas agua-acetonitrilo. Estas últimas soluciones se mantuvieron en refrigeración a 4°C entre usos sucesivos y se renovaron periódicamente (aproximadamente cada 2 semanas).

El ácido perclórico y el amoniaco fueron grado analítico de J. T. Baker (E. U. A.). Para la cromatografía en capa fina (CCF), se usaron

cromatofolios de gel de sílice 60 F_{254} con un espesor de capa de 0.2 mm, de Merck (Alemania).

Para la evaporación de las muestras se usó un rotavapor Marca Büchi (Alemania), con un baño de agua a 25 °C de temperatura.

Tabla III. Estructura de los compuestos estudiados.

Nombre	Estructura	pKa[8, 17]
2,4-D		2.6[(20)] , 3.3[(51)]
MCPA		3.7[(52)]
2,4,5-T		2.8
Silvex		3.0
MCPP		3.11
2,4-DB		4.8

Para la concentración y purificación se utilizó un Cromatógrafo de Partición Centrífuga de Sanki Engineering, LTD (Kyoto, Japón), con un

volumen total de 230 mL. El aparato se acopló a un cromatógrafo Varian modelo 5000 e inyector de válvula Rheodyne.

Para el análisis por CLAE se utilizó una bomba Gilson modelo 305, inyector de válvula Rheodyne 7125 con bucle de 20 μL. El detector UV-Vis fue Shimadzu modelo SPD-10AV a una longitud de onda de 230 nm. La columna fue Hypersil ODS de 150 x 4.6 mm, tamaño de partícula de 5 μm.

Las muestras analizadas se obtuvieron de dos pozos diferentes del Ejido Los Cocos, en la costa de Chiapas. También se analizó una muestra obtenida de un manantial que provee de agua potable al municipio de Villa de Ayala, Morelos.

Preparación de la muestra problema.

El agua a analizar se filtró con membranas de nylon de 0.45 μm de diámetro de poro.

Para valores de pH debajo de 2.5, éste se ajustó con ácido perclórico. Los valores pH de 3 a 7 se obtuvieron usando solución tampón de fosfatos 0.01 M. Valores superiores de pH se ajustaron añadiendo amoniaco al agua.

Análisis por CCF

Se prepararon mezclas de disolvente orgánico (n-Heptano, n-Butanol y acetato de etilo) - agua (1:1 v/v) y en la mezcla se disolvió una cantidad de 2,4-D, se agitó la mezcla, se separaron las fases y se hizo una placa cromatográfica a cada una de ellas, se observaron bajo luz ultravioleta para así determinar en qué fase permanecía el compuesto. Esto se hizo con los tres disolventes orgánicos y a dos valores de pH de agua diferentes: 1 y 10.

De estas pruebas se determinó que el sistema bifásico utilizado seria el AcOEt - H_2O .

Análisis por CPC

Para determinar la relación de FE - FM en la columna de CPC , con el rotor apagado se llenó la columna con diferentes relaciones de volúmenes AcOEt – Agua (10:90, 15:85, 20:80, 25:75 y 30:70 v/v). Posteriormente, se encendió el rotor a 1400 rpm y el flujo de agua se ajustó a 4 mL/min en modo descendente. Se colectó el eluyente durante 30 minutos (240 mL) y se midió el volumen de fase estacionaria que salió de la columna. Esto se hizo para cada una de las relaciones estudiadas.

La relación de fases seleccionada fue AcOEt – Agua 20:80 % v/v.

La concentración de las muestras problemas se realizo de la siguiente manera:

Con el rotor apagado, la columna se llenó con 80% de agua destilada y 20 % de acetato de etilo (volumen de FE 46 mL) a un flujo de 5 mL/min, después de eluir 180 mL que es el volumen total de la muestra, se colectaron 100 mL de la mezcla en una probeta para verificar que la relación de fases fuera la misma. Después, se paró el flujo y se encendió el rotor a una velocidad (ω) de 1400 rpm. El agua destilada se sustituyó por un volumen determinado de muestra problema que se envió al sistema cromatográfico a través de la bomba a un flujo de 4 mL/min. Una vez pasado todo el volumen de muestra, se paró el flujo y se cambió el reservorio a agua Milli Q ajustada a pH de 9 con Amoniaco, y restableciéndose el flujo a 4 mL/min. Se dejó que eluyeran 180 mL (volumen muerto) y posteriormente se colectaron fracciones para después analizarlas por CLAE.

Análisis por CLAE.

En la determinación de las condiciones para el análisis por CLAE se utilizó una fase móvil de Acetonitrilo : Agua para las cuales se hicieron varias pruebas a diferentes valores de pH y diferentes % de Acetonitrilo. De estas pruebas se selecciono finalmente una elución isocrática usando como fase móvil Acetonitrilo – disolución amortiguadora de fosfatos 0.01 M (pH 3.6) 25:75(v/v)a un flujo de 1 mL/min, con una columna Hypersil ODS (150 x 4.6 mm d.i.); tamaño de partícula 5 μm, inyección 25 μL detección por UV a 230 nm.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Determinación de las condiciones de análisis por CLAE

Para determinar las condiciones de separación por CLAE de los herbicidas estudiados, se eligió inicialmente un pH de 2.0, ya que a este valor todos los solutos se encuentran en forma molecular. Primero se inyectó una disolución de cada uno de los solutos a concentración de 10 mg/L, utilizando como fase móvil mezclas de Acetonitrilo – Agua en diferentes proporciones. Los resultados se presentan en la figura 13, en donde se observa que a porcentajes superiores a 40 % de acetonitrilo, casi todos los solutos se juntan y sólo se distinguen los seis solutos a partir de 25 % de disolvente orgánico. Sin embargo, los primeros solutos (2,4-D / MCPA y 2,4,5-T / MCPP) no logran resolverse aún con la fase móvil que contiene 20% de disolvente orgánico. Dado que los tiempos de retención a ese porcentaje de Acetonitrilo son elevados, ya no se ensayaron % menores para intentar la separación. Por esta razón, el siguiente paso consistió en variar el pH de la fase móvil para cambiar la selectividad.

En este caso se utilizó una mezcla de Acetonitrilo – Agua 25:75 a diferentes valores de pH, ajustado con disolución amortiguadora de fosfatos 0.01 M. El estudio se hizo en un intervalo de pH de 2.0 a 5.0, ya que los valores de pKa de los solutos están entre estos valores. El resultado se muestra en la figura 14. Se observa que a partir de pH 3.0 se empiezan a separar los primeros compuestos, obteniéndose los mejores resultados a pH de 3.5. Sin embargo, el Silvex y el 2,4-DB no se separaron aún a pH de 5. Estos dos compuestos se analizaron a valores de pH más altos, pero en

ningún momento se logró la separación. Es por eso que se decidió descartar al 2,4-DB en los siguientes estudios porque es menos utilizado que el Silvex.

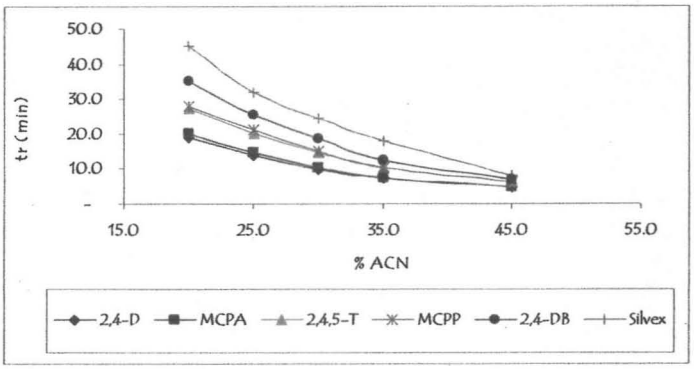


Figura 13. Variación del tiempo de retención de los solutos en función del porcentaje de acetonitrilo en la fase móvil (mezcla Acetonitrilo – Agua pH 2.0 ajustado con $HClO_4$). Columna: Hypersil ODS (150 x 4.6 mm d.i.); tamaño de partícula 5 μm . Flujo 1 mL/min; detección UV a 230 nm. Concentración de cada soluto 10 mg/L, V de inyección 25 μL.

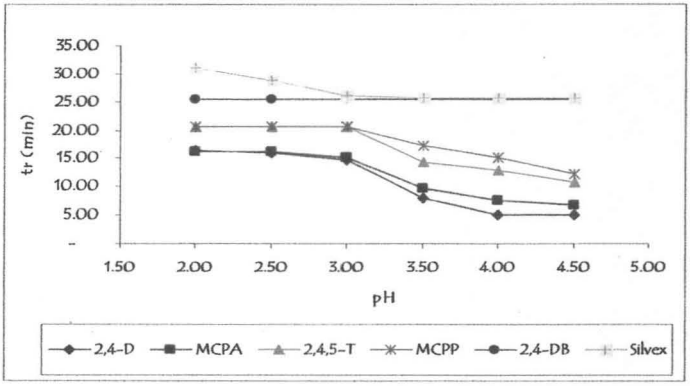


Figura 14. Variación del tiempo de retención de los solutos en función del pH de la fase acuosa. FM mezcla Acetonitrilo – solución amortiguadora de fosfatos 0.01 M ajustada a diferentes valores de pH (25:75). Las demás condiciones cromatográficas fueron las mismas que en el caso anterior.

Con estos resultados, se decidió que la fase móvil utilizada en los análisis por CLAE fuera Acetonitrilo - disolución amortiguadora de fosfatos 0.01 a pH 3.5 (25:75) en modo de elución isocrática. En la figura 15 se presenta el cromatograma obtenido.

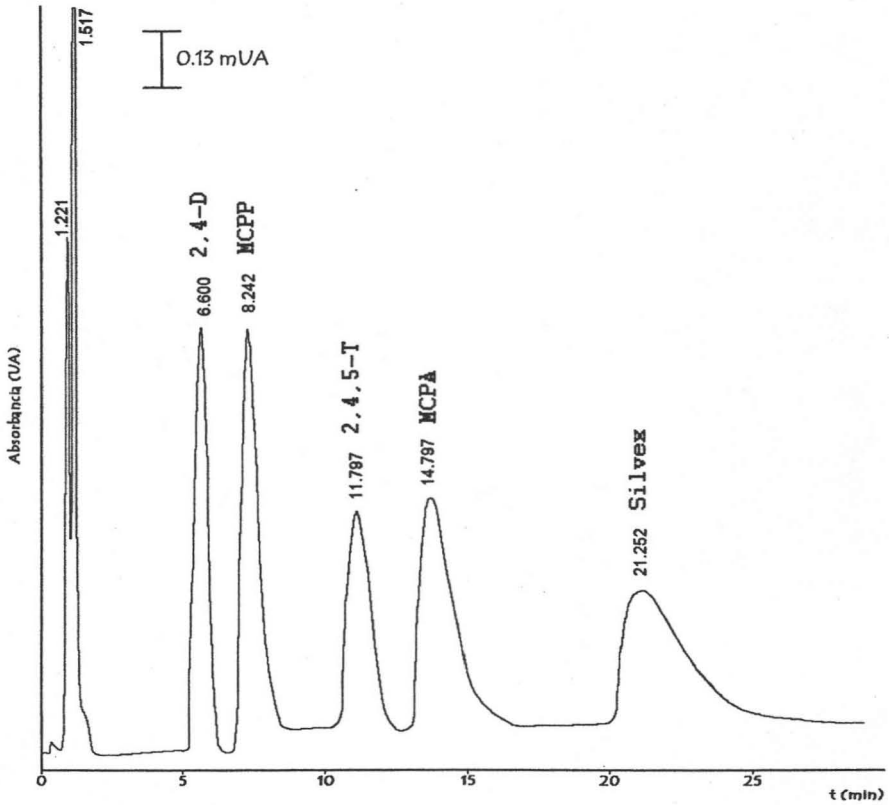


Figura 15. Cromatograma de los herbicidas ácidos. FM: Acetonitrilo – disolución amortiguadora de fosfatos 0.01 a pH 3.5 (25:75). Detección UV a 230 nm. Columna Hypersil ODS (150 x 4.6 mm, d.i.) tamaño de partícula de 5 μm. Flujo 1 mL/min. Concentración de cada uno de los solutos 10 mg/L.

Elección del sistema bifásico en CPC.

El ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) es el compuesto que más problemas de retención presenta por ser el más polar, por lo que las condiciones de extracción se establecieron con base en el comportamiento de este compuesto.

Como se dijo anteriormente, en cromatografía de partición centrífuga se necesitan dos fases líquidas inmiscibles entre sí, una de las cuales es usada como fase estacionaria y la otra como fase móvil. En nuestro caso, puesto que la finalidad era concentrar los herbicidas ácidos presentes en el agua, se necesitaba usar a ésta como FM. La fase estacionaria entonces tendría que ser un disolvente inmiscible con el agua, en el cual se concentrarían los compuestos de interés y después, aprovechando sus propiedades ácido-base por simple cambio de pH, permitir que únicamente dichos compuestos concentrados pasen nuevamente a la fase acuosa. Los disolventes orgánicos que se probaron fueron n-Heptano, n-Butanol y acetato de etilo.

Las placas cromatográficas mostraron que para n- Heptano el herbicida solamente se encontraba en la fase acuosa, para acetato de etilo y n-butanol se obtienen los mejores resultados, es decir, a pH ácido el 2,4-D permanecía en la fase orgánica y a pH básico en la fase acuosa. Puesto que cromatográficamente el sistema AcOEt – Agua es mucho más estable que el sistema n-BuOH – agua y como los resultados eran similares en ambos casos, se decidió trabajar con el primer sistema bifásico.

El siguiente paso fue determinar la relación de FE - FM en la columna de CPC. Como lo que se deseaba era que los solutos se

concentraran, se necesitaba la menor cantidad posible de fase estacionaria. En CPC, la relación de fases se puede ajustar, pero la mínima cantidad de FE (en este caso acetato de etilo) que se puede utilizar depende de las características fisicoquímicas del sistema bifásico utilizado. Los resultados obtenidos mostraron que con relaciones de fases Acetato de etilo – Agua 10:90 y 15:85 se forma una emulsión que hace inestable el sistema bifásico y a partir de la relación FE- FM 20:80 el sistema cromatográfico es estable. Puesto que esta relación fue la de menor cantidad de FE, es la que se utilizó en los siguientes experimentos.

Influencia del pH.

Para determinar la influencia del pH, en todos los experimentos se trabajó con 200 mL de agua destilada conteniendo 100 μg de estándar de 2,4-D o de 2,4-DB y ajustada a diferentes valores de pH. Se escogieron estos solutos por ser el más polar y el menos polar respectivamente, aunque como se dijo anteriormente, el 2,4-DB se descartó finalmente por los problemas presentados en el análisis por CLAE.

En este caso se deseaba saber a partir de qué valor de pH los solutos pasan a la fase orgánica y a qué valor permanecen en la fase móvil (agua). El sistema cromatográfico se estabilizó como se describió anteriormente. Posteriormente, a través de la bomba se pasaron los 200 mL de muestra a un flujo de 4 mL/min en modo descendente y después 100 mL más de agua destilada ajustada al mismo pH de la muestra, esto con el fin de desalojar la matriz de la muestra sin afectar apreciablemente al reparto de los solutos entre las fases. Una vez pasado este volumen, se paró el flujo de FM y se invirtió el sentido de elución a modo ascendente, de manera de que ahora la fase móvil fuera el AcOEt. Se hizo pasar AcOEt nuevo a 4

mL/min y se colectaron 50 mL de eluyente. Se evaporó el AcOEt y el residuo se redisolvió en 1 mL de Acetonitrilo; esta nueva disolución se inyectó en CLAE para observar la respuesta del detector UV-Vis. Los resultados se muestran en la figura 16. En esta figura se puede ver que cuando la fase acuosa está a pH de dos o inferior, los solutos se encuentran preferentemente en la fase de acetato de etilo. A valores de pH comprendidos entre 2 y 8 se tiene una distribución de los solutos entre las dos fases, permaneciendo una mayor proporción del 2,4-DB en la fase orgánica; a pH superiores a 9 los dos solutos se encuentran preferentemente en la fase acuosa.

Para ver un poco más detalladamente la retención del 2,4-D en la fase de acetato de etilo, se procedió a hacer lo mismo, pero ahora colectando fracciones de 1 mL de AcOEt y a valores de pH de fase acuosa de 1.5 y 4.0. Los resultados se muestran en la figura 17.

Se observa que a pH de 1.5 prácticamente todo el soluto se encuentra en los primeros dos mililitros colectados. A pH de 4, esto se presenta en los primeros cuatro mililitros. En ambos casos, después de 6 mL el analito eluyó completamente. Esto significa que la concentración por CPC del analito se lleva a cabo en los primeros canales de la columna, es decir, la transferencia de una fase a otra es muy rápida.

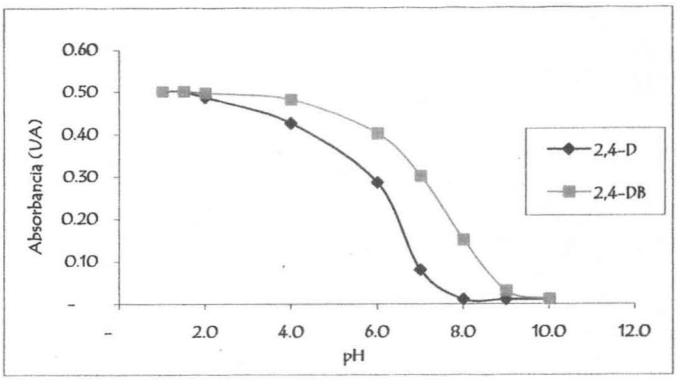


Figura 16. Absorbancia obtenida de las fracciones de AcOEt colectadas de la CPC después de pasar 200 mL de agua conteniendo 100 μg de 2,4-D y 2,4-DB a diferentes valores de pH. λ= 230 nm.

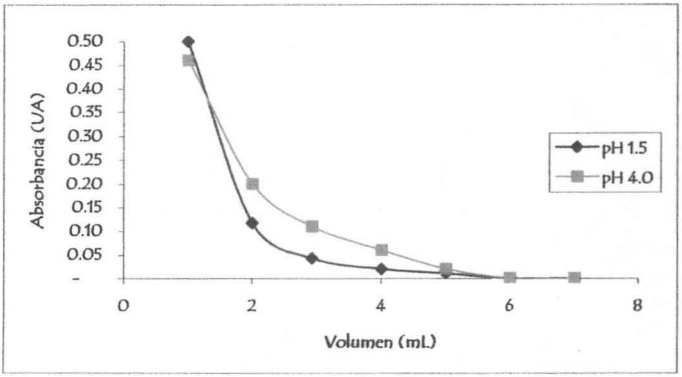


Figura 17. Absorbancia en función del volumen de AcOEt colectado del análisis por CPC. Concentración de 100 μg de 2,4-D en 200 mL de agua destilada.

Tomando en cuenta estos resultados, se decidió que la concentración de los solutos se iba a hacer a pH de 1.5, es decir la muestra problema se debería acidificar a ese valor de pH con ácido perclórico. Por otro lado, la elución debería hacerse a pH de 9, valor que se obtendría con disolución de hidróxido de amonio.

Así, en un principio se pensó hacer un gradiente de pH, de 1.5 a 9 para tratar de separar a los solutos desde la elución por CPC. Se hicieron diferentes gradientes de pH, colectando fracciones después del volumen muerto y cada fracción se analizó por CLAE. Sin embargo, en ningún caso se obtuvo la separación de los solutos en CPC, como lo muestra la figura 18. En el cromatograma se observa que efectivamente, los cinco solutos estudiados se concentraron, saturando incluso el detector, sin embargo, no fue posible su separación por CPC. Es por eso que se decidió que por esta técnica únicamente se haría la concentración y la separación y cuantificación se haría por CLAE. Así, el análisis por CPC quedó de la siguiente manera: Concentración de muestra de agua filtrada sobre membranas de nylon de 0.45 μm de tamaño de poro y ajustada a pH de 1.5 con ácido perclórico. Sistema bifásico acetato de etilo – agua 20:80, Modo de elución descendente, velocidad de rotación de 1400 rpm, flujo 4 mL/min. Una vez introducida la muestra al sistema se pasa agua limpia ajustada a pH de 9 con hidróxido de amonio y se continúa la elución en las mismas condiciones cromatográficas. Después del volumen muerto (180 mL), se colectan 12 mL de eluyente, para analizarlos posteriormente por CLAE.

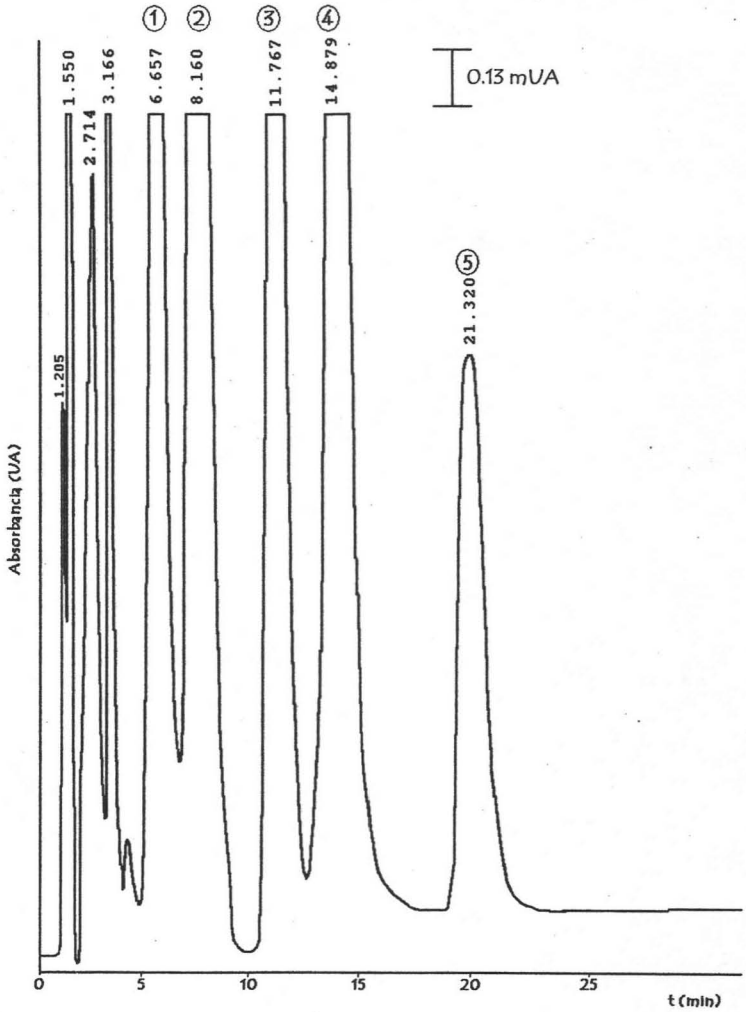


Figura 18. Análisis por CLAE de la fracción 5, obtenida de la elución por CPC al concentrar 200 mL de agua conteniendo 100 microgramos de cada herbicida acidificada con ácido perclórico a pH 1.5.
Condiciones CLAE descritas anteriormente.
Condiciones CPC: Gradiente de elución. Cambio lineal de pH de 1.5 a pH 9 en un tiempo de 43 minutos. ω = 1400 rpm; Modo de elución descendente, Flujo = 4 mL/min. Colección de fracciones cada 2 mL después del volumen muerto. Solutos (1) 2,4-D, (2)MCPP, (3) 2,4,5-T, (4) MCPA y (5) Silvex.

Límite de cuantificación del método.

El siguiente paso consistió en determinar cúal sería el efecto del volumen en la concentración, para lo cual se inyectaron muestras en CPC con la misma cantidad de soluto (100 ug de 2,4-D) a diferentes volúmenes de agua (100 mL, 500 mL y 1000 mL). Después de introducir la muestra se invirtió el sentido de elución de modo descendente a ascendente, se colectaron los primeros mL de la FE (AcOEt) se evaporaron y redisolvieron en la FM Acetonitrilo-Agua y se analizaron por CLAE.

Los resultados obtenidos de esta prueba se muestran en la figura 19

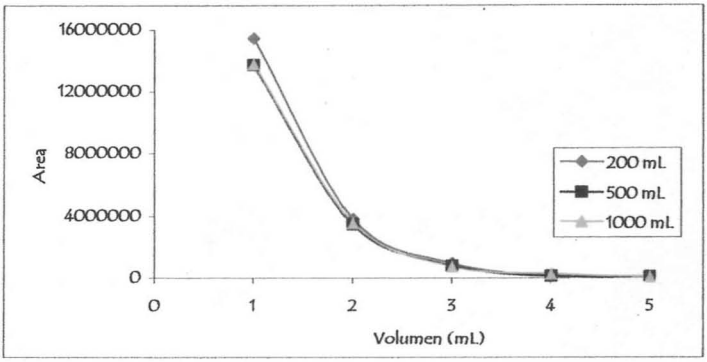


Figura 19. Área en función del volumen colectado de AcOEt del análisis de CPC a diferentes volúmenes de muestra concentrada

En la figura 19 se puede observar que en los primeros 3 mL colectados de AcOEt (que son los primeros mL de fase estacionaria dentro de la columna CPC) se tiene retenido al soluto en cuestión en cualquiera de los tres volúmenes concentrados, lo que nos indica que el volumen a concentrar no es un factor que intervenga en la elución de los solutos dentro de la columna CPC, por lo cual se puede tener la misma cantidad de soluto tanto en 10 mL como en 1L y ésta se concentrará en los primeros

mL de la FE. Al tener alrededor de 46 mL de fase estacionaria la probabilidad de saturación por soluto concentrado es nula, además de que este método está enfocado para la concentración de herbicidas presentes en muestras acuosas a niveles de trazas.

Tomando en cuenta el efecto del volumen en la concentración se procedió a hacer las curvas de calibración para cada uno de los solutos, para ello se prepararon soluciones a diferentes concentraciones de los solutos, se concentraron en CPC y se analizaron por CLAE en las condiciones anteriormente descritas. El volumen que se concentró fue de 100 mL. Los resultados obtenidos para cada uno de los solutos se presentan en la figura 20. En este caso se observa que para los cinco solutos se tiene un comportamiento lineal con un valor de r^2 superior a 0.99, teniendo los mejores resultados con el 2,4-D.

Usando estas curvas de calibración, para cada uno de los solutos se calculó el límite de cuantificación tomándolo como cinco veces el error típico de la curva. Los resultados se presentan en la Tabla IV. El menor valor se obtiene para el 2,4-D y el mayor valor es para el 2,4,5-T. Cabe señalar que estos valores se dan en microgramos y que el volumen es el inicial que se toma para concentrar. Así, por ejemplo, si se toma un mililitro de muestra inicial, el límite de detección para el 2,4-D sería de 2.60 μg/mL, si se toman 100 mL, entonces sería de 26 ng/mL. De esta manera, el límite de detección siempre va a depender del volumen de muestra que se analice.

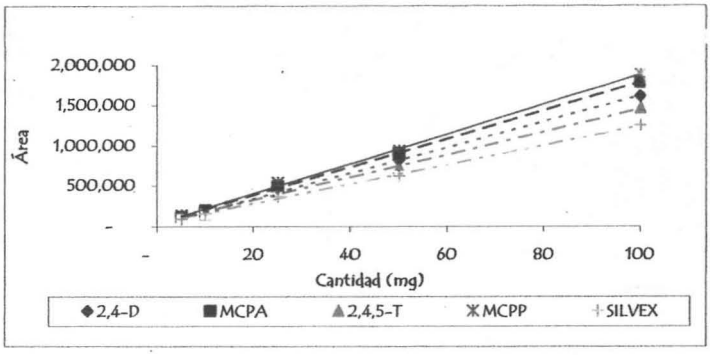


Figura 20. Curva de calibración obtenida por CLAE para los cinco analitos estudiados. Condiciones cromatográficas descritas anteriormente.
2,4-D: a = (intercepto) 12,764,b = (pendiente) 16,008, r^2 (coeficiente de correlación lineal) = 0.9998
MCPA: a = 31,548; b = 17,534; r^2 = 0.9995
2,4,5-T: a = 39,990; b = 14,089; r^2 = 0.997
MCPP: a = 30,515; b = 18,492; r^2 = 0.998
Silvex: a = 33,115; b = 12,091; r^2 = 0.999

Tabla IV. Límite de cuantificación de los solutos estudiados, obtenido a partir de su respectiva curva de calibración.

Soluto	LC (μg)
2,4-D	2.60
MCPA	3.10
2,4,5-T	9.11
MCPP	8.28
SILVEX	5.66

Repetibilidad y recobro del método.

Una vez obtenidas las curvas de calibración, se procedió a determinar la repetibilidad del método. Para ello, se preparó una disolución acuosa conteniendo 1 μg/mL de cada uno de los solutos. De esta disolución se tomaron 100 mL para concentrarse y analizarse siguiendo el procedimiento

antes descrito, se realizaron 5 réplicas del método completo con la misma muestra En la Tabla V se anotan los resultados de recobro obtenido para cada uno de los solutos, así como el coeficiente de variación. Se observa que para el 2,4-D, MCPA y 2,4,5-T se tiene un pequeño error aleatorio por defecto, mientras que para el MCPP y silvex, el error es por exceso. Por otro lado en todos los casos se tiene un coeficiente de variación menor al 5%, salvo en el caso del silvex cuya variación es ligeramente superior al 5 %. Esto puede deberse a que el silvex es el compuesto más retenido en CLAE y su pico cromatográfico es más ancho que el de los otros solutos, lo que conduce a una mayor imprecisión en la integración.

Tabla V. Exactitud (cantidad recuperada) y precisión (% C.V.) del método en el análisis repetido de una muestra dopada con 5 ácidos clorofenoxi a 1 μg / mL.

Herbicida	Cantidad (μg)					Prom. (μg)	%C.V.
	Rep. 1	Rep. 2	Rep. 3	Rep. 4	Rep. 5		
2,4-D	99.71	94.70	96.79	100.45	101.91	98.7	2.96
MCPA	98.17	97.39	100.12	99.30	99.18	98.8	1.08
2,4,5-T	100.79	95.47	102.51	97.41	99.14	99.1	2.79
MCPP	104.29	103.68	104.79	102.51	103.78	103.8	0.82
Silvex	107.49	103.67	101.88	108.56	95.37	103.4	5.08

El siguiente paso consistió en preparar cinco disoluciones diferentes de 100 mL cada una conteniendo 100 microgramos de cada soluto y analizarla de la misma manera que en el caso anterior. Los resultados se presentan en la Tabla VI y en la figura 21. Se observa un comportamiento similar que en el caso anterior, los tres primeros solutos tienen un error por

defecto y los dos últimos por exceso. En este caso, se obtuvo una variación menor al 5 % para todos los solutos.

Tabla VI. Exactitud (cantidad recuperada) y precisión (% C.V.) del método en el análisis repetido de 5 muestras independientes dopadas con 5 ácidos clorofenoxi a 1 μg / mL.

Herbicida	Cantidad (μg)					Prom.	%C.V.
	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4	Muestra 5		
2,4-D	97.31	98.71	96.37	95.21	97.64	97.0	1.37
MCPA	99.60	97.03	97.53	96.37	97.60	97.6	1.24
2,4,5-T	96.11	99.01	98.76	96.26	98.44	97.7	1.45
MCPP	103.81	102.60	104.57	102.55	106.66	104.0	1.63
Silvex	106.55	103.39	104.35	102.46	104.64	104.3	1.47

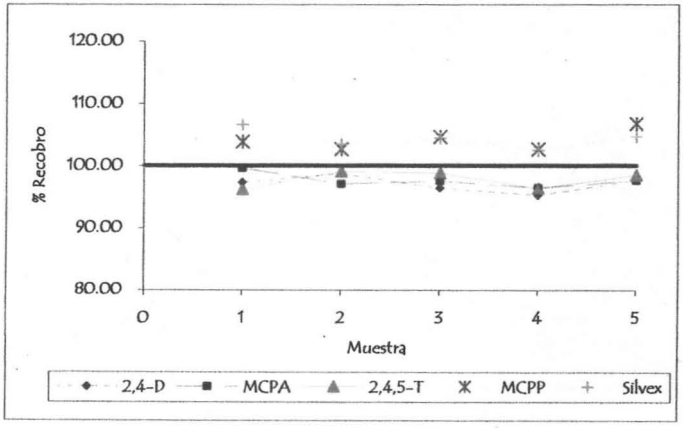


Figura 21. Variación y % de Recobro de cinco disoluciones diferentes (100 mL de agua conteniendo 100 microgramos de cada soluto).

Con estos resultados se puede concluir que el método desarrollado es repetible y que para todos los compuestos se tiene un porcentaje de recuperación entre 95 y 105 %.

Análisis de muestras reales

Una vez desarrollado el método, se procedió a analizar muestras acuosas reales. En primer lugar se analizó agua obtenida de un manantial que provee de agua potable al municipio de Villa de Ayala, Morelos. Se colectó un litro de muestra en un frasco ámbar y se mantuvo en refrigeración hasta su análisis. Se tomaron 200 mL de muestra y se filtraron en un equipo Milli Q, provisto con membranas de nylon de 0.45 micrómetros. De aquí se tomaron 100 mL, mismos que se acidificaron a pH 1.5 con ácido perclórico y se siguió el método de concentración por CPC y cuantificación por CLAE. Como no se observó la presencia de ninguno de los herbicidas estudiados, se concentraron 500 mL de muestra en las condiciones ya descritas. Aún así, el resultado fue el mismo, como se muestra en la figura 22.

Para confirmar que los componentes presentes en el agua de manantial no interfieren con el proceso de concentración y cuantificación de los herbicidas, se tomaron 100 mL de muestra, a los que previamente se les añadieron 50 microgramos de cada uno de los solutos, y se concentraron y cuantificaron en las condiciones ya descritas. El cromatograma obtenido se muestra en la figura 23 y en la Tabla VII se reportan los porcentajes de recobro para cada uno de los compuestos. Estos resultados demuestran que se tiene el mismo comportamiento con

agua destilada que con el agua de manantial, por lo que se puede decir que en esta muestra no hay presencia de estos herbicidas.

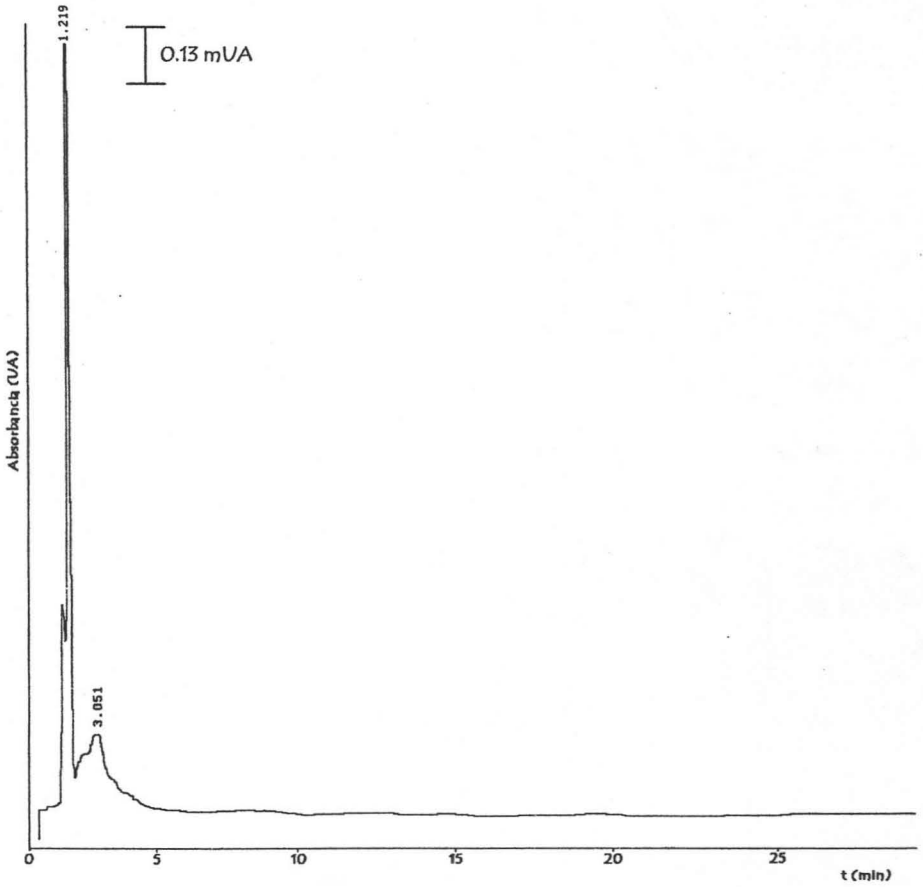


Figura 22. Cromatograma de una muestra de Agua de manantial (500 mL) concentrada por CPC y analizada por CLAE.

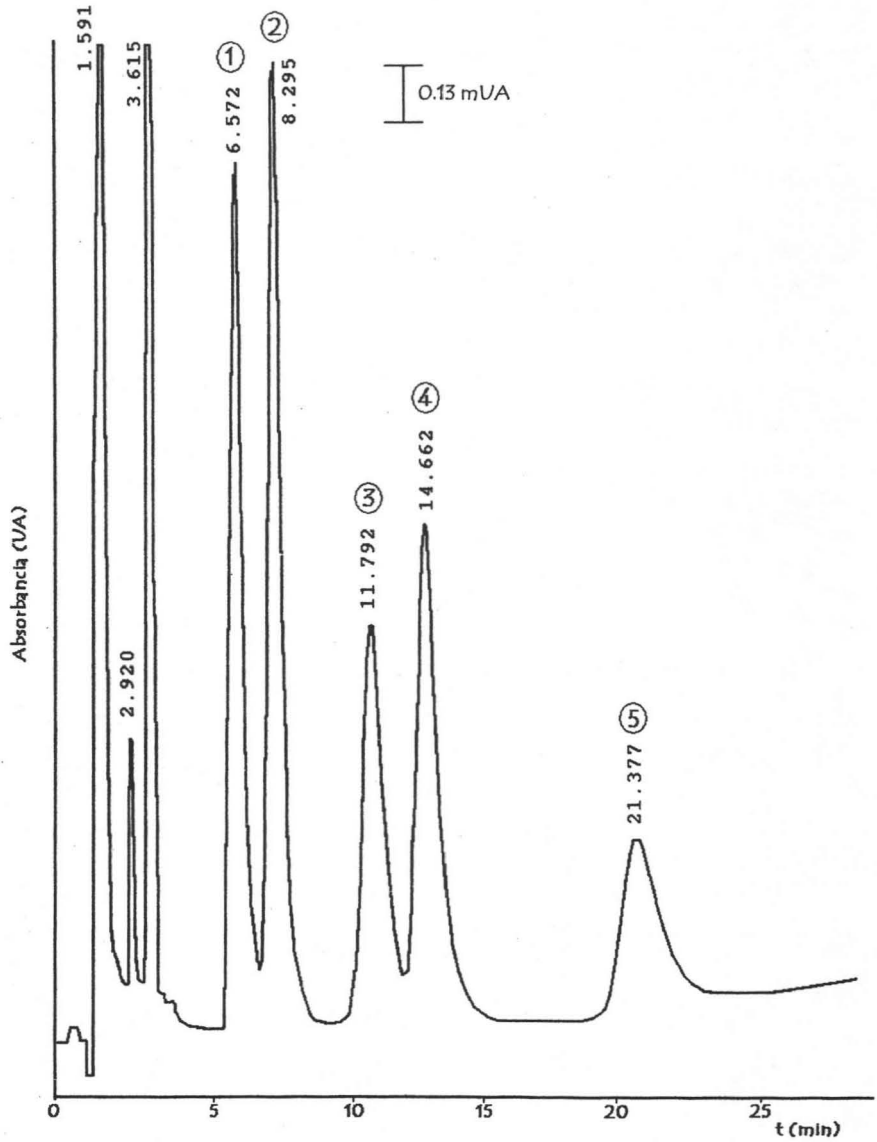


Figura 23. Análisis de 100 mL de agua de manantial dopada con 50 microgramos de cada ácido clorofenoxi. Solutos (1) 2,4-D, (2)MCPP, (3) 2,4,5-T, (4) MCPA y (5) Silvex.

Tabla VII. Porcentaje de recobro de los analitos añadidos a 100 mL de agua de manantial.

Analito	% Recobro
2,4-D	97.64
MCPA	97.60
2,4,5-T	98.44
MCPP	106.66
Silvex	104.64

La segunda muestra analizada fue agua de un pozo para consumo humano del Ejido de Los Cocos, del municipio de Tonalá, Chiapas. Esta es una zona ganadera y se sabe que con frecuencia utilizan herbicidas conteniendo 2,4-D. Se colectaron 3 Litros de muestra en frascos ámbar, mismos que se guardaron en refrigeración. Antes de analizarlas, se filtraron con membranas de nylon de 0.45 μm. El análisis se hizo con 100 mL de muestra ajustada a pH 1.5 con ácido perclórico. En la figura 24 se muestra el cromatograma obtenido. En este caso tampoco se observa la presencia de ninguno de los herbicidas estudiados.

Finalmente, se analizó agua de un pozo del rancho "El Jobo", ubicado a 4 Km del Ejido de los Cocos, del municipio de Tonalá, Chiapas. El agua de ese pozo está destinada para el consumo animal. En este caso también se tomaron 3 litros de muestra y se guardaron en frasco ámbar en refrigeración. Antes de su análisis, se filtró por membrana de nylon de 0.45 μm y se siguió el mismo procedimiento que en el caso anterior. En las figuras 25 y 26 se muestran los cromatogramas obtenidos antes y después de la concentración de 100 mL de muestra

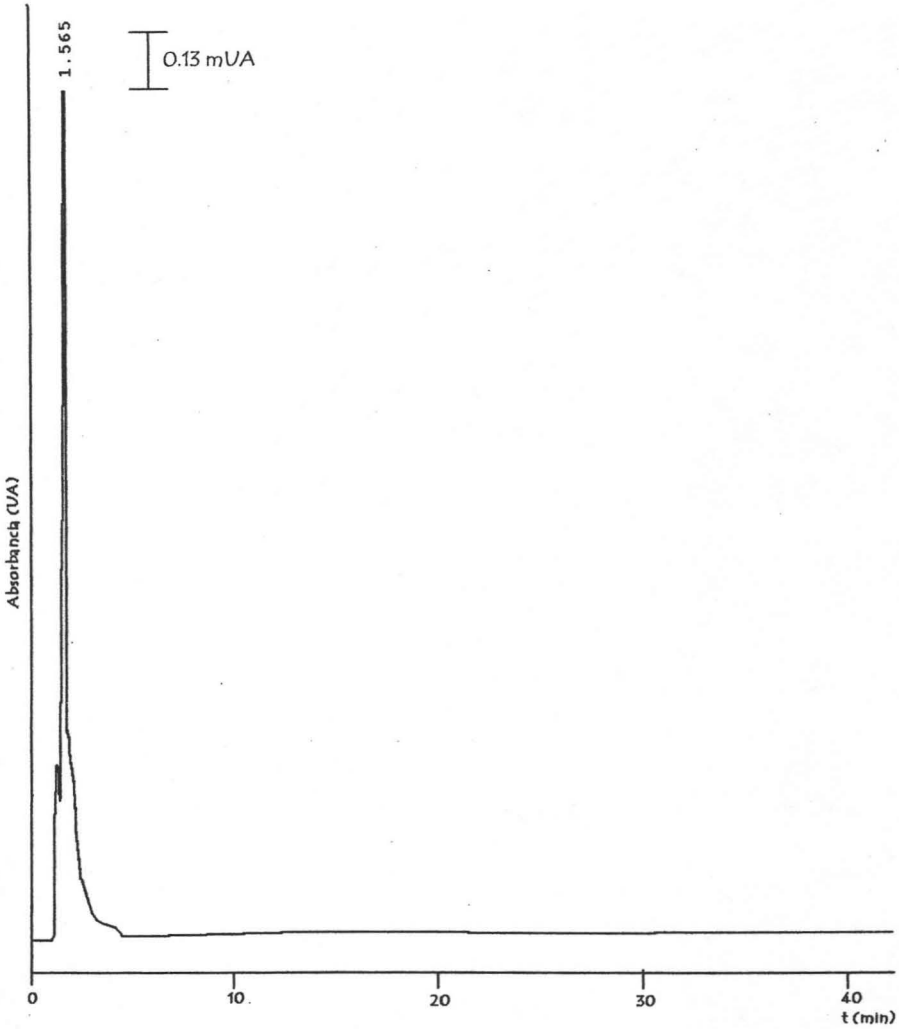


Figura 24. Cromatograma de una muestra (100 mL) de Agua de pozo para consumo humano del Ejido de Los Cocos, municipio de Tonalá, Chiapas, concentrada por CPC y analizada por CLAE.

Antes de concentrar se observan varios picos en la zona en donde eluyen los analitos estudiados, por lo que en un inicio se creyó que esta

muestra sí contenía al 2,4-D. Sin embargo, como se muestra en la figura 26, no se observa la presencia de ninguno de estos compuestos en la muestra. Sin embargo, a los 31 minutos eluye un compuesto que no se había visto en las muestras anteriormente analizadas.

Como ya se mencionó, las muestras provienen de una zona ganadera, y el herbicida que más utilizan en este rancho en específico, es el "Tordón 101", que es una mezcla de 2,4-D y picloram (ácido-4-amino 3,5,6-tricloropicolínico). Este compuesto es menos volátil que el 2,4-D y su persistencia es mayor[53]. Posiblemente el compuesto encontrado después de la concentración de la muestra sea el picloram. Desafortunadamente, no se contaba con el estándar de este herbicida para poder comprobarlo y de ser así, cuantificarlo, pero es muy probable que se trate de este compuesto.

Podemos concluir que se desarrolló un método efectivo para la concentración por cromatografía de partición centrífuga de herbicidas ácidos y cuantificación por cromatografía de líquidos de alta eficiencia.

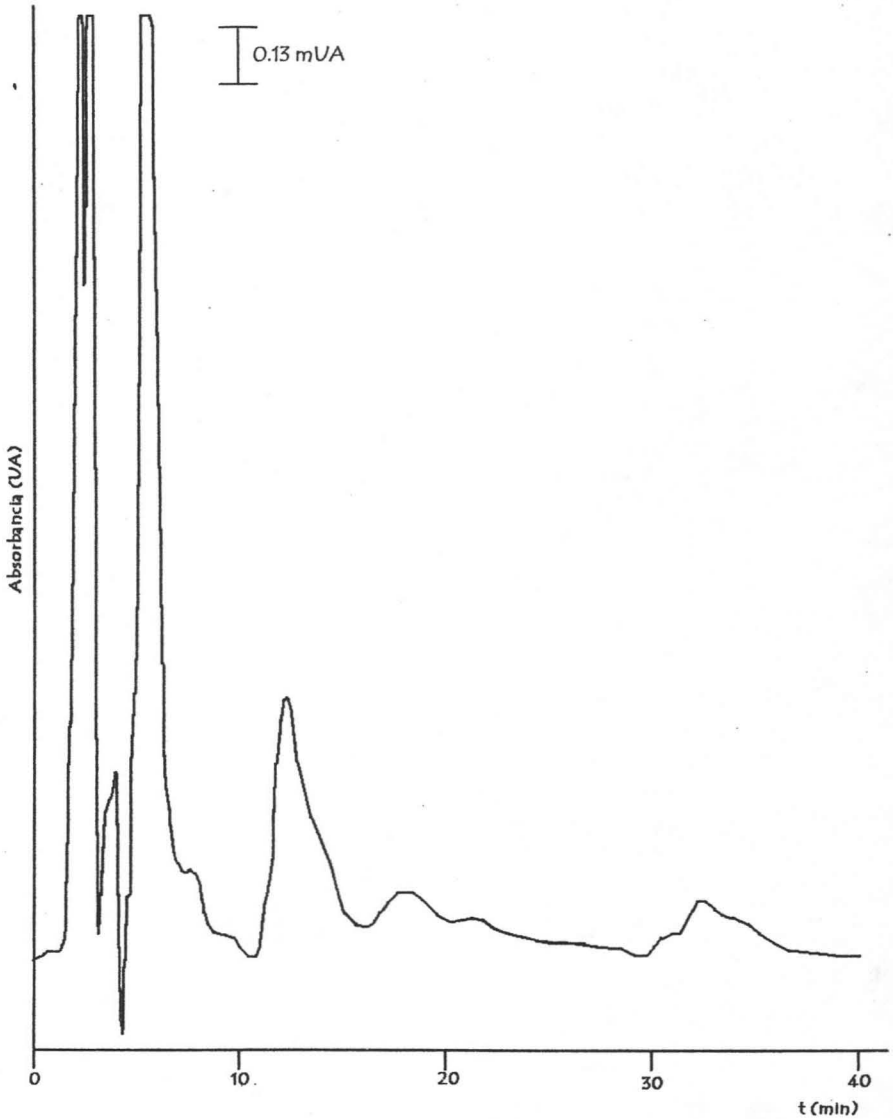


Figura 25. Cromatograma de una muestra (100 mL) de Agua de pozo para consumo animal del Rancho "El Jobo" del municipio de Tonalá, Chiapas, antes de concentrarse por CPC.

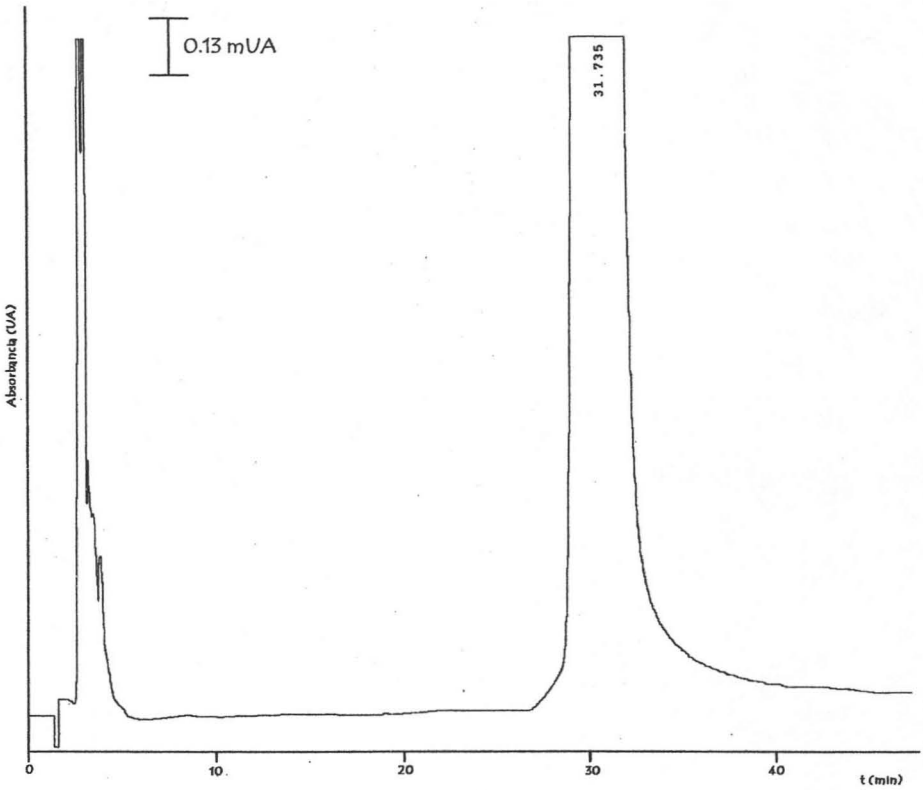


Figura 26. Cromatograma de una muestra (100mL) de Agua de pozo para consumo animal del Rancho "El Jobo" del municipio de Tonalá, Chiapas, concentrada por CPC y analizada por CLAE.

CONCLUSIONES

Se desarrollo un método simple y efectivo para la concentración del ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético (2,4,5-T), ácido 4-cloro-o-toluiloxiacético (MCPA), ácido 4-cloro-o-toluiloxipropiónico (MCPP) y ácido 2,4,5-triclorofenoxipropiónico (Silvex) por Cromatografía de partición centrífuga (CPC), utilizando un sistema bifásico Acetato de etilo - Agua. Aprovechando las propiedades ácido-base de los herbicidas, su concentración en acetato de etilo se hizo a pH ácido (forma molecular) y su elución a pH básico (forma iónica). El modo de elución fue descendente, velocidad de rotación 1400 rpm y flujo de 4 mL/min.

La cuantificación de los herbicidas se hizo por cromatografía de líquidos de alta eficiencia en fase inversa usando como fase móvil Acetonitrilo - disolución amortiguadora de fosfatos 0.01 M (pH 3.6) 25:75 (v/v) a un flujo de 1 mL/min.

Para cada uno de los analitos estudiados se obtuvo la curva de calibración concentrando 100 mL de una muestra acuosa dopada con diferentes cantidades de compuesto. En todos los casos el coeficiente de correlación lineal fue superior a 0.99. El límite de cuantificación absoluto más pequeño se obtuvo para el 2,4-D (2.60 microgramos) y el más alto para el 2,4,5-T (9.11 microgramos). La concentración correspondiente a dichos límites depende del volumen de muestra analizada, que puede variar desde algunos mililitros hasta un litro. Por lo tanto el método de preconcentración (por CPC) y análisis (por CLAE) permite cuantificar los ácidos clorofenoxis hasta concentraciones inferiores a la decena de ppb (ng/mL).

Los porcentajes de recobro determinados estuvieron en el intervalo de 95 – 105 % para todos los analitos, con coeficientes de variación < 5%. Estos valores demuestran la exactitud y buena precisión del método desarrollado.

El método se aplicó en el análisis de tres muestras de agua diferentes, agua de manantial del municipio de Villa de Ayala, Morelos, agua de pozo para consumo humano del Ejido de Los Cocos, del municipio de Tonalá, Chiapas y agua de pozo del rancho "El Jobo", del municipio de Tonalá, Chiapas. En ninguno de los casos se detectó la presencia de alguno de los herbicidas estudiados.

Sin embargo, en la muestra del rancho "El Jobo" se encontró un compuesto que puede ser el ácido-4-amino 3,5,6-tricloropicolínico (picloram). Será necesario contar con el estándar para confirmar esto y de ser así, cuantificarlo.

El método desarrollado representa una alternativa original para el análisis de herbicidas clorofenoxis en muestras acuosas. En efecto es la primera vez que se utiliza la cromatografía de partición centrífuga para concentrar este tipo de compuestos. Este método puede aun ser optimizado en trabajos posteriores mediante un estudio más profundo del efecto de algunos parámetros de la CPC, como son el volumen de fase estacionaria y la velocidad de flujo durante las etapas de concentraci{on y elución de la muestra.

BIBLIOGRAFÍA

1. Archer, D. W. and Shogren, J. F. *Ecological Economics*, 38 (2001): 227-250.
2. Lehotay, S. J. *J. Chromatogr. A*, 785 (1997): 289-312.
3. Contaminación de suelos, http://edafologia.ugr.es/Conta/tema13/persist,htm (2004)
4. Ashton, F. M. and Crafts, A. S. *Mode Action of Herbicides*, 1a. Ed, John Wiley & Sons, (1973) p. 10-23, 266-285.
5. . Laganà, A.; Bacaloni, A.; De Leva, I.; Faberi, A.; Fago, G. and Marino, A. *Analytica Chimica Acta*, 462 (2002) 187-198.
6. Petit, V.; Cabridenc, R.;Swannell, R. P. J.and Sokhi, R. S. *Environment International*, 21 (1995), 167-176.
7. Zona, R.; Solar, S. and Gehringer, P. *Water Research*, 36 (2002) 1369-1374.
8. Wells, M. J. M: and Yu, L. *J. Chromatogr. A*, 885 (*2000*) 237-250.
9. Rózanski, L. *Transformations of Herbicides in Living Organisms and in the Environment*, Agra-Enviro Lab, Poznan, (1998).
10. T. Cserháti, E. Forgács, Z. and Mikšik. D. I. *J. Chromatogr. B*, 753 (2001) 87-92.
11. Rosales-Conrado, N.; León-González, M. E.; Pérez-Arribas, L. V.and Polo-Díez, L. M. *Analytica Chimica Acta* 470 (2002): 147-154.
12. Tomlin, C. D. S. *The Pesticide Manual, British Crop Protection Council*, London, 1997.
13. Copplestone, J. F. *Bull. Who* 66 (1998) 545-551.
14. Oakes, D. J.; Webster, w. S. Brown-Woodman, P. D. C. and Ritchie, H. E. *Reproductive Toxicology* 5436 (2002) 1-9.

15. *Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-1994.* Salud ambiental, agua para uso y consumo humano-límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización, Mayo, 1994.

16. *Norma Oficial Mexicana NOM-179-SSA1-1998.* Vigilancia y evaluación del control de calidad de agua para uso y consumo humano. Sept., 2001

17. Tadeo, J. L.,Sánchez-Brunete, C.; García-Valcarcel, A. I.; Martínez, L. and Pérez, R.A. *J. Chromatogr. A,* 754 (1996) 347.

18. Cserhati , T. and Forgacs, E. *J. Chromatogr. B,* 717 (1998) 157– 178.

19. Masque, N.; Galia, M.; Marce, R. M. and Borrull, F. *Analyst,* 122 (1997) 425.

20. Crescenzi, C.; Di Corcia, A.; Passariello, G.; Samperi, R. and Carou, M.I.T. *J. Chromatogr. A* 733 (1996) 41.

21. Jauregui, O. and Galceran, M. T. *Anal. Chim. Acta* ,340 (1997) 191

22. Thurman, E.M. and Mills, M.S. *Solid-Phase Extraction — Principles and Practice,* Wiley–Interscience, New York, 1986.

23. Vera-Avila, L. E.; Padilla, P. C.; Hernández, Maira, G. And Meraz, J. L. L. *J. Chromatogr. A.* 731 (1996) 115-122.

24. Hennion, M.-C. and Barcelo, D. *Anal. Chim Acta,* 362 (1998) 3-34

25. Meulenberg, E. P.; and Stoks, P. G. *Anal. Chim. Acta,* 311 (1995) 407

26. Masque, N.; Marce, R. M. and Borrull, F. *J. Chromatogr. A* 793 (1998) 25125

27. Pichon, V.; Cau, C., Dit Coumes, L. Chen, and Hennion, M.C. *Int. J Environ. Anal. Chem.* 65 (1996) 11.

28. Sancho-Llopis, V.; Hernández-Hernández, F.; Hogendoorn, E. A. and van Zoonen P. *Anal. Chim. Acta* 283 (1993) 287.

29. Wang, W.K. and Huang, S. D. *J Chromatogr.* 483 (1989) 121.

30. Hage, D.S. *J. Chromatogr. B*, 715 (1998) 3.

31. Weller, M.G. *Fresenius J. Anal. Chem.*, 366 (2000) 635.

32. Tadeo, J. L.; Sánchez-Brunete, C., Pérez, R. A. and Fernández, M. D. *J. Chromatogr. A*, 882 (2000) 175-191

33. Richman, S, J.;Karthikeyan, S.; Bennet, D, A,; Chung, A. C. and Lee, S. M. *J. Agric. Food Chem.*, 44 (1996), 2924.

34. Williams, K. J.; James, C. R.; Thorpe, S. A. and Reynolds, S. L. *Pest. Sci.* 50 (1997) 135

35. Sánchez-Brunete, C.; Tadeo, J. L. *Quim. Anal.* 15 (1996) 53.

36. Johnson, P. D.; Rimmer, D. A.; Brown, R. H. *J. Chromatogr. A*, 765 (1997) 3.

37. Hopper, M. L. *J. Agric. Food Cham.*35 (1987) 265.

38. Ting, K. C. and Kho, P. K. *J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int.*, 81 (1998) 93.

39. Miles, C. J., Zhou, M. J. *J. Agric. Food Chem.*, 38 (1990) 142.

40. Schüssler, W. *Chromatographia*, 29 (1990) 24.

41. Kim, I, S.; Sasinos, F. I.; Stephens, R. D.; Wang, J. and Brown, M. A. *Anal. Chem.*, 63 (1991) 819.

42. Liu, C. H., Mattern, C. G.; Yu, X.; Rosen, R. T.; and Rosen, J. D. *J. Agric. Food Chem.* 39 (1991) 718.

43. Craig, L C. *Comprehensive Biochemistry.* Florkin M. and Stotz E. H. Ed. Vol 4, Elsevier, Amsterdam (1962), p. 1-131.

44. Varcacel, M. *"Técnicas Analíticas de Separación"*.Ed. Réverté, España, (1990),pp. 333-378.

45. Hostettman., K. *"Advances in Chromatography"*. Vol.221. Marcel Dekker Inc. New York (1993), pp. 165-185.

46. Knight, M. *"Advances in Chromatography"*. Vol. 31.Marcel Dekker Inc. New York (1987), pp. 253-268.

47. Conway, W. D. and Petrask, R. J. Ed. *"Modern Countercurrent Chromatography"* in ACS Symposium Series, Vol. 593, USA, (1995), pp. 1-13.

48. Foucault, A. P. *"Centrifugal Partition Chromatography"*. Chromatographic Science Series, Vol. 68, Marcel Dekker, Inc. New York (1995), pp. 1-53

49. Murayama, W. Kobayashi, T.; Kosuge, Y.; Yano, H.; Nunogaki, Y.; and Nunogaki, K. *J. Chromatogr.*, 239: 643 (1982).

50. Marchal, L.; Legrand, J.; and Foucault, A. *AiChe Journal*, 48 (8): 1692-1704 (2002).

51. Loconto, P. R. *J. Liq. Chromatogr.* 14 (1991) 1297.

52. Herbicide Handbook, 7th Edition (1994). Weed Science Society of America, Champaign, IL.

53. Bolen, Kenneth R. *Neb Guide Cooperative Extension*, Institute of Agriculture and Natural Resources, University of Nebraska Lincoln. G87-834-A (1989).