



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA
PRESENCIA DE ATRAZINA EN LA
MINERALIZACIÓN DEL SUELO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERO QUÍMICO.

P R E S E N T A :

JUAN MANUEL GONZÁLEZ VILLEDA.

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. BLANCA LUCIA PRADO PANO

MÉXICO, D.F.

MAYO DEL 2009.





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.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA
INGENIERÍA QUÍMICA**

**EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA PRESENCIA
DE ATRAZINA EN LA MINERALIZACIÓN DEL
SUELO**

**TESIS LICENCIATURA
DE INGENIERÍA QUÍMICA**

**PRESENTA
JUAN MANUEL GONZÁLEZ VILLEDA**

**DIRECTORA DE TESIS
DRA. BLANCA LUCIA PRADO PANO**

MÉXICO, MAYO 2009.



Universidad Nacional Autónoma de México

Tesis de Licenciatura

**EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA
PRESENCIA DE ATRAZINA EN LA
MINERALIZACIÓN DEL SUELO**

AGRADECIMIENTOS

La realización de una Tesis de Licenciatura es una experiencia vital intensa, en la que se comparten momentos con un gran número de personas, que directa o indirectamente participan del trabajo realizado. Por lo tanto antes de nada quisiera mostrar mi agradecimiento de una manera general a todas las personas que han intervenido:

En primer lugar a la Dra. Blanca Lucia Prado Pano, directora de esta Tesis, por haberme dado la oportunidad de realizarla, y por encima de todo, por haberme mostrado en todo momento una gran confianza en su dirección. También me gustaría resaltar su exigencia y rigor durante la fase experimental y la redacción del trabajo.

A la Dra. Claudia Hidalgo, que me transmitió una gran dosis de formación, experiencia y rigor en sus conocimientos en el laboratorio y que fue codirectora, conjuntamente con la Dra. Blanca Lucia Prado, en la realización de este proyecto.

Al Colegio de Postgraduados por el soporte académico así como de infraestructura otorgados para la formación y el desarrollo de la presente investigación.

A CONACYT por el soporte económico que han permitido realizar esta tesis, y que contribuyen al fomento de la investigación científica de este país.

A todas las componentes del grupo de investigación en el que he realizado la tesis por la ayuda que me han prestado y lo mucho que me han aportado.

Finalmente, deseo agradecer especialmente a mi familia y hermanos, por supuesto, por el apoyo que me han dado en todo momento para que esta tesis haya llegado a su fin

ÍNDICE

PRÓLOGO

Antecedentes	1
Contenido del trabajo	3

Capítulo I: Fundamentos teóricos

Sinopsis del Capítulo I	5
1.0 Introducción	5
1.1 Plaguicidas	5
1.2 Transporte de solutos en la matriz suelo	7
1.3 Herbicidas: Atrazina	7
1.3.1 Nombres comerciales	8
1.3.2 La atrazina en el medio ambiente	8
1.3.3 Propiedades	9
1.3.4 Exposición y efectos tóxicos	10
1.4 Suelo	10
1.4.1. Definición	10
1.4.2. Clasificación de los suelos	11
1.4.2.1 Clasificación de los suelos a nivel mundial	11
1.4.2.2 Clasificación de los suelos en Estados Unidos	12
1.5 Andosoles	13
1.6 Vertisoles	14
1.7 Suelos en estudio del proyecto	14
1.7.1. Propiedades físicas y químicas de los suelos	15

Capítulo II: Efecto de la atrazina en la mineralización del suelo

Sinopsis del Capítulo II	18
2.0 Respiración del suelo	18
2.1 Métodos de determinación en la respiración del suelo	18
2.1.1 Principio Químico de Medición del CO ₂	21
2.2 Factores abióticos que afectan la respiración del suelo	21
2.2.1 Temperatura	21
2.2.2 Humedad del suelo	21
2.2.3 pH	22
2.2.4 Nutrientes	22
2.3 Retención de la atrazina en el suelo	22
2.4 Factores bióticos responsables en la respiración del suelo	23
2.5 Objetivo	23
2.6 Materiales y Métodos	24
2.6.1 Descripción del método	24
2.6.2 Establecimiento del experimento	24

2.6.3	2.6.3 Materiales	24
2.6.4	2.6.4 Preparación de Soluciones	26
2.7	2.7 Procedimiento Experimental General	27
2.7.1	2.7.1 Realización de las cámaras de respiración	27
2.7.2	2.7.2 Preparación del suelo	27
2.7.3	2.7.3 Tamizado y Humedad del Suelo	28
2.7.3.1	2.7.3.1 Adición de atrazina	29
2.7.3.2	2.7.3.2 Colocación del Alkali (NaOH)	29
2.7.3.3	2.7.3.3 Valoración del NaOH	30
2.8	2.8 Resultados y Discusión	31
2.8.1	2.8.1 Variación de la Normalidad de NaOH en un suelo andosol 80 cm. de profundidad	31
2.8.2	2.8.2 Variación de la Normalidad de NaOH en un suelo andosol 20 cm. de profundidad	32
2.8.3	2.8.3 Condiciones en la respiración del suelo	33
2.9	2.9 Conclusiones	34

Capítulo III: Validación de los Protocolos de la Técnica de Extracción de Atrazina en Fase Sólida

	Sinopsis del Capítulo III	36
3.0	¿Qué es la validación de un método?	36
3.1	¿Por qué es necesaria la validación de un método?	36
3.1.1	3.1.1 Importancia de las mediciones analíticas	36
3.1.2	3.1.2 El deber profesional del químico analítico	37
3.2	¿Cuándo deben validarse los métodos?	37
3.3	¿Quién lleva a cabo la validación del método?	37
3.4	Requisitos Analíticos	37
3.5	Parámetros de Validación	38
3.5.1	3.5.1 Exactitud	38
3.5.2	3.5.2 Precisión	38
3.5.3	3.5.3 Selectividad	38
3.5.4	3.5.4 Robustez	38
3.5.5	3.5.5 Recuperación	39
3.6	Clasificación de técnicas de separación analíticas	39
3.6.1	3.6.1 Extracción con Disolventes	39
3.7	Generalidades de la Extracción en Fase Sólida	40
3.7.1	3.7.1 Características	40
3.7.2	3.7.2 Adsorbentes en fase sólida	40
3.8	Fundamentos de las etapas en la Extracción en Fase Sólida	41
3.8.1	3.8.1. Activación	41
3.8.2	3.8.2. Acondicionamiento	41
3.8.3	3.8.3. Retención	42
3.8.4	3.8.4. Eliminar interferencias	42
3.8.5	3.8.5. Elución	43
3.9	Objetivo	43
3.10	Materiales y Métodos	44
3.10.1	3.10.1 Descripción de los Cartuchos de Extracción (C ₁₈)	44

3.10.2	Condiciones de la Extracción en Fase Solida	44
3.10.3	Condiciones de operación del HPLC	45
3.10.4	Requisitos Analíticos en la Extracción en Fase Sólida	45
3.11	Resultados	47
3.11.1	Selectividad	47
3.11.2	Exactitud	48
3.11.3	Precisión	48
3.11.4	Robustez	49
3.12	Discusión	51
3.13	Conclusiones	51

Capítulo IV: Identificación de grupos funcionales del suelo responsables de la retención de atrazina

	Sinopsis del Capítulo IV	53
4.0	Espectro Electromagnética	53
4.1	Técnicas espectroscópicas	54
4.2	Infrarrojo (IR)	55
4.2.1	Regiones Espectrales del Infrarrojo	55
4.3	Interpretación de Espectros	56
4.4	Vibraciones: Características de algunas de las funciones química-orgánicas	57
4.4.1	Aromáticos	57
4.4.2	El grupo Carbonilo	58
4.4.2.1	Cetonas	58
4.4.2.2	Aldehídos	59
4.4.2.3	Ésteres	61
4.4.2.4	Ácidos Carboxílicos	62
4.4.2.5	Amidas	62
4.5	Objetivo	63
4.6	Materiales y Métodos	64
4.6.1	Descripción del Espectroscopio Infrarrojo	64
4.6.2	Condiciones de la Espectroscopia IR	64
4.6.3	Materiales	65
4.6.4	Preparación de Soluciones	66
4.6.5	Tamizado y Humedad del Suelo	66
4.7	Procedimiento Experimental general	66
4.7.1	Preparación de la muestra	66
4.7.2	Procedimiento para operar el espectroscopio IR	68
4.8	Resultados y Discusión	69
4.9	Conclusiones	72
	Bibliografía	73

Anexos	78
Anexo A Valoración ácido-base	79
Anexo B Parámetros de Validación	82
Anexo C Protocolos de Validación	85
Protocolo A Preparación de Soluciones	85
Protocolo B Tamizado del suelo	88
Protocolo C Determinación de la humedad gravimétrica del suelo	89
Protocolo D Extracción en Fase Sólida de Atrazina en un suelo andosol	91
Protocolo E Cuantificación de atrazina	96
Protocolo F Preparación de Soluciones	100
Anexo D HPLC	102
Anexo E Fundamentos teóricos y la técnica de espectroscopia del infrarrojo	106

INDICE DE CUADROS

	Pagina
Cuadro 1.1 Procesos que afectan al transporte de plaguicidas en el suelo	6
Cuadro 1.2 Propiedades físicas y químicas de la atrazina	9
Cuadro 1.3 Clasificación de los suelos en Estados Unidos	13
Cuadro 1.4 Principales propiedades químicas del perfil de suelo	16
Cuadro 2.1 Metodos de determinación en la respiración del suelo	20
Cuadro 2.2 Contenido de humedad gravimetrica a conservar cada suelo	27
Cuadro 2.3 Preparación del suelo para cumplir las condiciones de humedad	28
Cuadro 2.4 Adición de atrazina en suelos andosol 20 y 80 cm.	29
Cuadro 2.5 Normalidad del NaOH en suelo andosol 80 cm. en la respiración	31
Cuadro 2.6 Normalidad del NaOH en suelo andosol 20 cm.	32
Cuadro 2.7 Peso de las camaras de respiración en la incubación	33
Cuadro 3.1 Propiedades del Cartucho C ₁₈	44
Cuadro 3.2 Humedad del suelo andosol	45
Cuadro 3.3 Estimación de metanol y agua en la preparación del suelo	45
Cuadro 3.4 Condiciones de la fase móvil	46
Cuadro 3.5 Porcentajes de recuperación para la atrazina	48
Cuadro 3.6 Resultados obtenidos del análisis de las muestras fortificadas con atrazina	49
Cuadro 4.1 Tipos de Espectroscopia	54
Cuadro 4.2 Variables de las técnicas espectroscópicas	55
Cuadro 4.3 Regiones Espectrales del IR	56
Cuadro 4.4 Resumen de las absorciones en los hidrocarburos aromáticos	58
Cuadro 4.5 Resumen de las absorciones en las cetonas	59
Cuadro 4.6 Resumen de absorciones en aldehídos	60
Cuadro 4.7 Resumen de las mas importantes absorciones en los esteres	61
Cuadro 4.8 Resumen de absorciones en los ácidos carboxílicos	62
Cuadro 4.9 Resumen de absorciones en las amidas	63
Cuadro 4.10 Disolventes utilizados en el espectroscopio	65
Cuadro 4.11 Preparación de los suelos andosol y vertisol	66
Cuadro 4.12 Adición de atrazina en suelos andosol y vertisol	67

INDICE DE FIGURAS

	Pag.
Figura A Procesos de eliminación de los agroquímicos	1
Figura 1.1 Factores y mecanismos que gobiernan el comportamiento del herbicida	6
Figura 1.2 Estructura química del herbicida	7
Figura 1.3 Tipos de suelo a nivel mundial	12
Figura 1.4 Localización del área de análisis	15
Figura 1.5 Descripción de las formaciones principales del perfil de suelo	15
Figura 2.1 Dibujo de los diversos tipos de organismos en un suelo fértil	18
Figura 2.2 Respiración del suelo (Incubación)	28
Figura 2.3 Vista de las muestras en la incubadora a 25 °C.	29
Figura 2.4 Montaje experimental: Valoración HCl-NaOH	30
Figura 2.5 Normalidad del NaOH en suelo andosol 80 cm.	31
Figura 2.6 Normalidad del NaOH en suelo andosol 20 cm.	32
Figura 2.7 Variación en peso de suelo andosol 20 y 80 cm. con y sin atrazina.	33
Figura 3.1 Etapas en la extracción en fase sólida	41
Figura 3.2 Fase de Acondicionamiento	41
Figura 3.3 Mecanismo de EFS (Retención)	42
Figura 3.4 Fase de eliminar interferencias	42
Figura 3.5 Fase de elución en la Extracción en Fase Sólida	43
Figura 3.6 Cartuchos Sep-Pak C ₁₈	44
Figura 3.7 Equipo de Filtración de Solventes en el HPLC	47
Figura 3.8 Cromatograma obtenido en una muestra en suelo blanco	47

Figura 3.9	Curvas de calibración para atrazina	50
Figura 3.10	Cromatograma de la muestra concentrada con 5mg/L y 1 mg/L de atrazina	51
Figura 4.1	Dominio de energías a diferentes longitudes	53
Figura 4.2	Frecuencias de vibración en el infrarrojo medio	56
Figura 4.3	Comparación entre el espectro (a) IR medio y (b) MIR del ciclohexano	57
Figura 4.4	Vibraciones de estiramiento del Tolueno	58
Figura 4.5	Espectro de 2-Butanona (Cetonas)	59
Figura 4.6	Vibración de estiramiento de cetonas	59
Figura 4.7	Espectro de 3-Butanona	59
Figura 4.8	Vibraciones del grupo carbonilo	60
Figura 4.9	Espectro del Butil-aldheído	60
Figura 4.10	Espectro del Benzaldheído	60
Figura 4.11	Espectro del Etil-acetato	61
Figura 4.12	Vibraciones del grupo carbonilo en esteres	61
Figura 4.13	Espectro del ácido butírico	62
Figura 4.14	Espectro de la acetanilida	63
Figura 4.15	Espectropio IR Nicolet Nexus 670	64
Figura 4.16	Señal del detector	69
Figura 4.17	Interferograma de la atrazina en su forma natural	70
Figura 4.18	Comparativo del interferograma del suelo andosol 20 cm- atrazina natural	70
Figura 4.19	Comparativo del Interferograma del suelo andosol 80 cm- atrazina natural	71
Figura 4.20	Comparativo del Interferograma del suelo vertisol 30 cm- atrazina natural	71
Figura 4.21	Comparativo del Interferograma del suelo vertisol 90 cm- atrazina natural	72



Antecedentes

La creciente necesidad de producir alimentos para una población cada vez más numerosa ha conducido a abrir al cultivo tierras anteriormente ocupadas por bosques, así como la utilización de agroquímicos que incrementen los rendimientos. Es por ello que en las últimas décadas el uso de plaguicidas y herbicidas se ha incrementado, no así, los estudios paralelos que permitan conocer los riesgos a la salud y al ambiente de uso de estos productos.

Por otro lado; la aplicación de agroquímicos al suelo es uno de los principales factores que influyen en la contaminación de mantos freáticos, otro problema de interés mundial para el cual existe una gran demanda de métodos que permitan estimar el impacto de estas aplicaciones.



Figura A Procesos de eliminación de los agroquímicos.

Una vez que los plaguicidas son aplicados al suelo, sufren transformaciones químicas y biológicas como se aprecia en la Figura A; que dependen de las condiciones ambientales y de las características del suelo: humedad, el pH, el contenido de materia orgánica y el tipo de arcilla principalmente. Sin dejar a un lado el efecto de los microorganismos que resultan de mayor importancia dependiendo la composición del suelo y ambiente.



Contenido del trabajo

Los diferentes experimentos se realizaron en un suelo andosol colectado en la cuenca de Valle de Bravo. La importancia de este sitio radica en que de este lugar se suministra gran parte del agua potable de la Ciudad de México. El Vertisol estudiado se obtuvo de un sitio localizado en el Bajío Guanajuatense, lugar que produce un porcentaje importante de las hortalizas que se consumen en el país.

Se estudiaron dos profundidades seleccionadas en base a dos parámetros: la estructura y el contenido de materia orgánica del suelo, el primero siendo determinante en el proceso de transporte de atrazina en suelo; mientras que el segundo es el parámetro que define la capacidad de retención del pesticida del suelo.

La primera profundidad estudiada corresponde al horizonte límite entre las actividades de laboreo y el suelo intacto, y la segunda al suelo completamente intacto, esto permite evaluar el efecto que las actividades agrícolas en la estructura del suelo. Así también, el contenido de materia orgánica entre ambas profundidades es contrastante en el caso del vertisol; mientras que en el caso del andosol la variación de este parámetro con la profundidad es mínima, sin embargo, en este suelo encontramos una mineralogía diferente entre ambas profundidades.

En el caso específico del análisis de la tasa de respiración del suelo, es sobre todo el contenido de carbono orgánico el parámetro que interesa. Toda esta parte introductoria se trata más a fondo en el Capítulo I.

En general este trabajo sobre la evaluación del efecto del pesticida en la mineralización del suelo considera las siguientes etapas:

- A. Experimento de incubación del suelo en condiciones de temperatura y humedad controladas, en suelo natural y suelo con atrazina adicionada (Capítulo II).
- B. Validación de la técnica de Extracción de atrazina del suelo mediante la técnica de extracción en fase sólida (Capítulo III).
- C. Determinación de grupos funcionales que participan en la retención de la atrazina en el suelo. Mediante espectroscopia infrarroja en la región media (MIR) se estudiarán interacciones de los grupos orgánicos con el pesticida (Capítulo IV).



Universidad Nacional Autónoma de México

CAPÍTULO I:

FUNDAMENTOS

TEÓRICOS

UNAM



SINOPSIS DEL CAPÍTULO I:

Este capítulo se basa en los conocimientos generales sobre los elementos del proyecto; definiendo el suelo, tipos de suelo y sus características, también estudiando la atrazina en sus propiedades físicas y químicas, así como su interacción con el entorno (ambiente). La importancia del capítulo radica en tener las bases suficientes para la comprensión de cada uno de los temas que componen el trabajo.

1. Introducción

En la actualidad, existen una gran cantidad de productos químicos orgánicos que son utilizados para control de plagas y de enfermedades que se manifiestan en las actividades agrícolas y ganaderas, los cuales, dependiendo del objetivo para el cual están destinados, pueden clasificarse en:

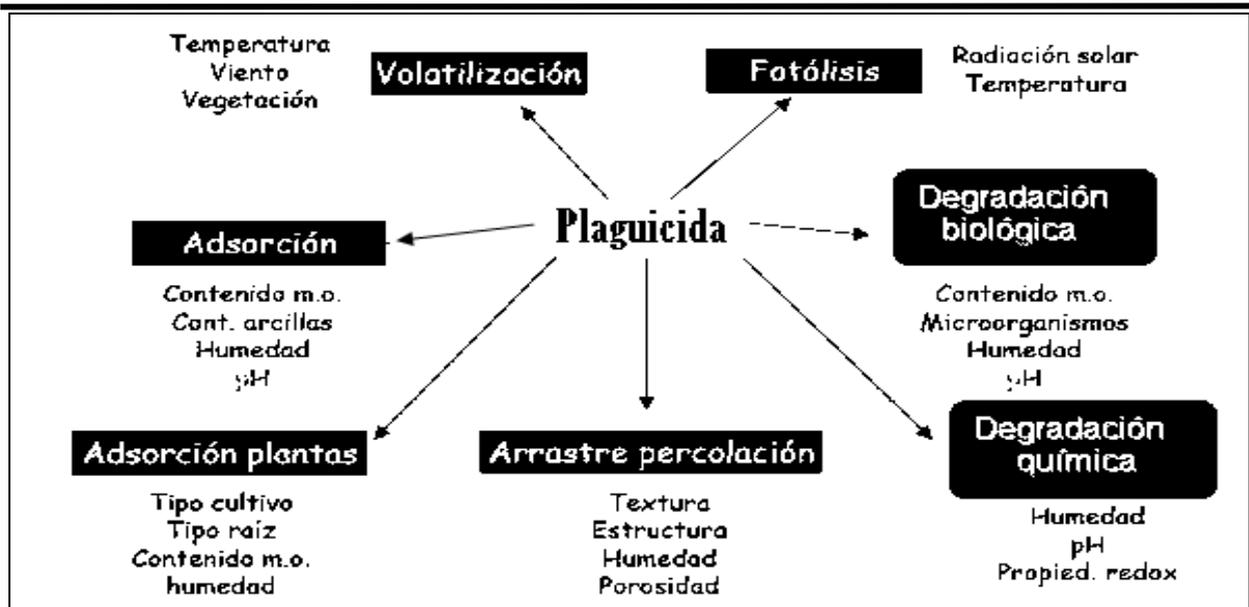
- Insecticidas. Utilizados para la destrucción de insectos.
- Fungicidas. Destrucción de hongos y prevención de enfermedades en los cultivos.
- Herbicidas. Eliminación de malas hierbas y plantas indeseables.
- Nematicidas. Eliminación de gusanos.
- Moluscicidas. Eliminación de caracoles.

Los plaguicidas son sustancias, por lo general de origen orgánico, que se emplean principalmente en la agricultura para el control de las plagas. Debido a que presentan diversos grados de toxicidad, existe especial interés en el impacto que provocan sobre la calidad ambiental y la salud humana, siendo la contaminación del agua subterránea uno de los efectos más nocivos que producen.

El agua subterránea constituye la principal fuente de agua potable, totalizando alrededor de un 90% del agua potable (Gerstl, 2000). La presencia de herbicidas en aguas subterráneas y acuíferos representa una situación frecuente, especialmente en aquellas regiones que han tenido o tienen un elevado grado de explotación agrícola debido a la intensificación de esta actividad y al reemplazo del sistema de labranza convencional por la siembra directa.

1.1 Plaguicidas

El comportamiento ambiental de una sustancia plaguicida en el ambiente edáfico y por ende su destino, está gobernado por los procesos de retención (adsorción, desorción y absorción), transformación (degradación biótica o abiótica y fotodescomposición) y transporte (volatilización, escurrimiento y lixiviación) (Cheng, 2001) como se aprecia en el Cuadro 1.1.



Cuadro 1.1 Procesos que afectan el destino de plaguicidas aplicados en el suelo

Estos procesos dependen de características fisicoquímicas del compuesto, de la actividad agrícola, de los componentes orgánicos e inorgánicos del suelo, de las propiedades del suelo y de la cantidad de herbicida aplicado, entre otros (Blume, 2004). Las propiedades del herbicida y los constituyentes del suelo con los cuales el herbicida entra en contacto (Figura 1.1); son de importancia en la determinación de los mecanismos de adsorción y por ende, de la bioactividad y movilidad del compuesto (Barriuso et al., 1996).

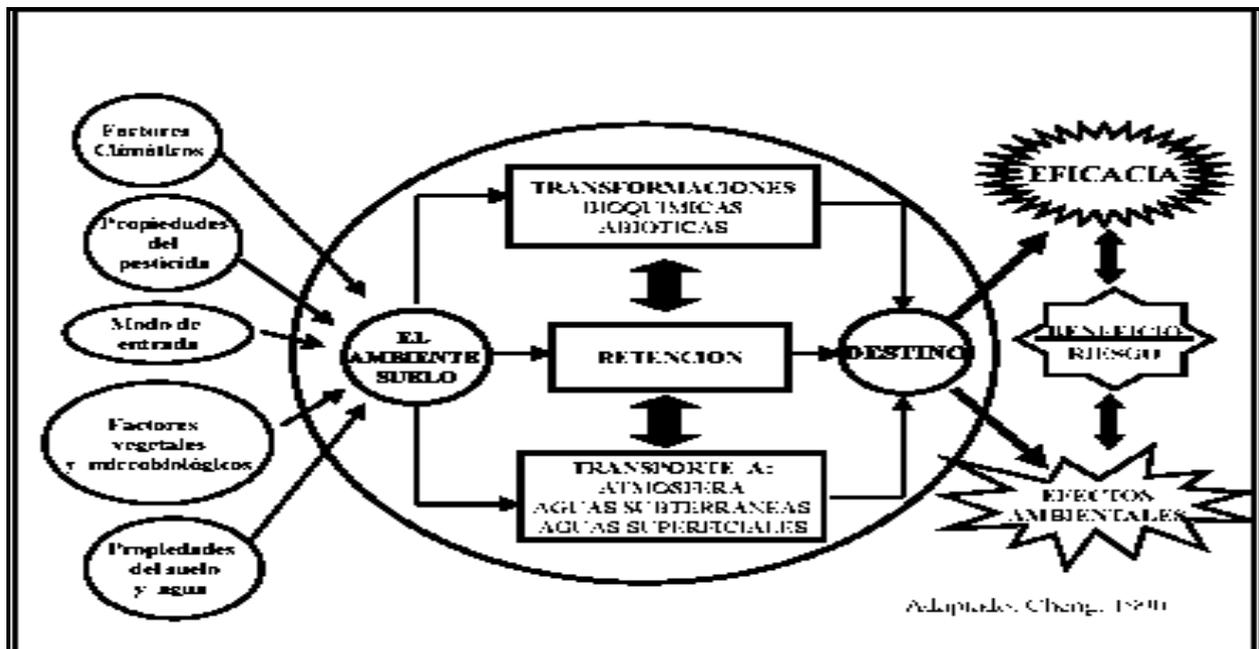


Figura 1.1. Factores y mecanismos que gobiernan el comportamiento y destino de los plaguicidas en el suelo.



Los organismos internacionales de gestión ambiental han comenzado a preocuparse por el riesgo de contaminación que pudiera correr el hombre y los animales debido al consumo de agua potable de origen superficial y subterráneo que pudiera estar contaminada con atrazina.

1.2 Transporte de Solutos en la matriz suelo

El transporte de solutos a través del suelo se produce por medio del flujo del agua y está fuertemente influenciado por la adsorción (Richter et al, 1996). La adsorción de un plaguicida por el suelo es el proceso que posee mayor influencia en su comportamiento y destino en el ambiente (Gerstl, 2000). Corresponde a la transferencia de una molécula de la fase líquida hacia la fase sólida. Este fenómeno obedece a las leyes de equilibrio entre la concentración en fase líquida y la concentración en fase sólida, sobre la superficie del material adsorbente. En tal sentido, la materia orgánica ha sido reportada como la propiedad más relevante para muchos herbicidas, como es el caso de Atrazina (Weber et al, 2004). En efecto, la distribución de la materia orgánica del suelo indica, por lo general, la zona en la cual los herbicidas son adsorbidos más fuertemente.

Por tal razón, éstos se adsorben con mayor fuerza a las capas superficiales del suelo. Los horizontes más profundos del suelo contienen menos materia orgánica y poblaciones microbianas, lo cual redundará por lo general en menor adsorción y degradación, y como consecuencia en mayor lixiviación (Jenks et al., 1998; Blume et al., 2004).

Por todo lo expuesto, se deduce que la comprensión de como las propiedades del suelo dentro de un perfil afectan la retención y por ende la degradación y movilidad de los herbicidas, es de gran importancia para mejorar la predicción de su comportamiento así como de la contaminación potencial del agua subterránea.

El grado de movilidad de un plaguicida en el suelo puede determinar su potencial como contaminante (Hance, 1980). Existen procedimientos para caracterizar la movilidad de un plaguicida en el suelo, entre otros, las isotermas de adsorción, el uso de columnas de suelo, experimentos de campo con medidas a diferentes profundidades y los estudios con lisímetros (Helling, 1971).

1.3 Herbicidas: Atrazina

Ingrediente activo

Trlazina

Formulación común

$C_8H_{14}ClN_5$

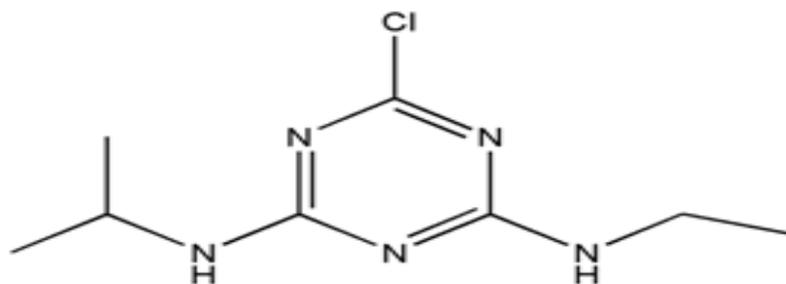


Figura 1.2 Estructura química de la Atrazina



1.3.1. Nombres comerciales

Atranex, Atrazine, Azinotox, Goliat, Rastra, Desyerbal, Gesaprim, Atrazina, Yerba, Novaprim, Atrazina, Calibre, Sanazina (Vera, 1998). Una familia importante de herbicidas son los compuestos triazínicos, dentro de la cual se encuentra la atrazina (2-cloro-4-etilamino-6-isopropilamino-s-triazina) como se observa en la Figura 1.2.

La atrazina es un herbicida orgánico nitrogenado derivado de la triazina. En su estado sólido puro es un polvo blanco, sin olor. Es moderadamente soluble en agua y se disuelve bien en compuestos orgánicos como la acetona, el cloroformo o el acetato de etilo.

Es un herbicida s-triazínico muy utilizado en todo el mundo para controlar selectivamente plantas en cultivos de maíz, sorgo, caña de azúcar y plantaciones forestales; también es usado para el control total de malas hierbas en áreas no agrícolas, tales como vías férreas y zonas industriales (Ashton et al, 1981).

Es una sustancia poco volátil, reactiva o inflamable (ATSDR, 2001). El compuesto grado técnico se comercializa en forma de suspensión, polvo o gránulos y tiene una pureza entre 92% y 99.9%. Las restricciones generadas en Europa por su uso han llegado a la prohibición.

Sin embargo, el herbicida es utilizado en EUA para controlar tanto pastos como especies de plantas de hoja ancha (Trochimowics, 2001). La Agencia de Protección al Ambiente de EUA (US EPA por sus siglas en inglés) estimó que de 31 a 35 millones de kilogramos de atrazina fueron empleados en cultivos agrícolas en los años 1987, 1993 y 1995 (IARC, 1999).

1.3.2 La atrazina en el medio ambiente

Movilidad

La atrazina se adsorbe más fácilmente en suelos humíferos o arcillosos que en suelos con un contenido bajo de arcilla o materia orgánica (Lambert, 2003).

Degradación

Casi todas las triazinas son muy estables en el suelo y desaparecen lentamente mediante degradación por la acción de los microorganismos presentes en el suelo. Aunque se ha notificado una degradación de 50 días en condiciones de laboratorio, en la práctica la atrazina persiste en el suelo durante más de cuatro meses. La tasa de degradación química de la atrazina depende en gran medida de la acidez del medio y de la presencia de sustancias catalíticas.



La atrazina puede hidrolizarse con bastante rapidez en medios ácidos o alcalinos, pero es muy resistente a la hidrólisis en medios neutros (pH 7). De esta forma en un medio neutro y a una temperatura de 25° C, se calcula que la degradación de la atrazina es de 60 días. En medios extremos, la atrazina se hidroliza por completo en un plazo de tres a cuatro días (Ruiz, 2001).

Utilidad

Como herbicida para combatir malezas anuales en campos de espárragos, bosques, pastizales, gramíneas, cultivos, maíz, etc.

- Uso agrícola: autorizado para el control o combate de malezas en los cultivos de caña de azúcar, maíz, piña y sorgo en Latinoamérica.
- Uso industrial: Plantas que generan compuestos sintéticos del herbicida.

1.3.3 Propiedades

La atrazina es un polvo incoloro. En su envase original, es estable durante varios años, con una ligera sensibilidad a la luz natural. Debe protegerse contra el calor, llamas y chispas. Es inestable en un medio ácido o alcalino. Sus propiedades se definen en el Cuadro 1.2.

Propiedad	Parámetro	Unidad	Valor	Conclusión
Punto de fusión		°C	175–176	
Presión de vapor		mPa	0.04	
Densidad		g/cm ³	1.187	
Degradación	DT ₅₀ suelo	días	0–150	Ligeramente degradable
Solubilidad	S _w	mg/L	30	Moderadamente soluble
Movilidad	Log K _{oc}		13	Sumamente móvil
Concentraciones admisibles	Seres humanos:			
	Contacto directo	mg/kg dm suelo	2 500	
	Consumo de hortalizas	mg/kg dm suelo	1	
	Consumo de agua potable	µg/L	3 ¹	

Cuadro 1.2 Propiedades físicas y químicas de la atrazina (Barriuso, 1996)

¹Es el valor promedio en USA (US EPA 1998).



1.3.4 Exposición y efectos tóxicos

La exposición humana a la atrazina puede darse tanto en el ambiente laboral y en actividades en general. En el primer caso, los trabajadores se exponen a este compuesto durante las actividades de producción, formulación y aplicación. Dicha exposición ocupacional se da principalmente por vía inhalatoria y dérmica.

En la población general la exposición se puede dar por el consumo de agua o alimentos contaminados y, particularmente en los niños, la exposición puede darse también a través del contacto con suelo o polvo contaminados. (ATSDR, 2001). Los efectos conocidos están relacionados a daños reproductivos y daños en el desarrollo fetal.

En parejas de agricultores expuestos a atrazina se ha observado un incremento en el riesgo de crecimiento intrauterino retardado (Savitz y col., 1997) y en poblaciones expuestas a través del agua de bebida, un aumento en el número de nacimientos prematuros (Hassink, 1994).

Además, la exposición a atrazina se ha asociado a un aumento en la incidencia de cáncer de estómago; sin embargo, la atrazina no ha sido clasificada hasta ahora como un compuesto cancerígeno para el humano y se ubica en el Grupo 3 de la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC por sus siglas en inglés).

Los organismos internacionales de gestión ambiental han comenzado a preocuparse por el riesgo que corre el hombre y los animales debido al consumo de agua potable de origen superficial y subterráneo contaminada con atrazina. La EPA ha establecido un límite de 0.003 miligramos de atrazina por litro (0.003 mg/L) de agua potable (RAP-AL, 1999).

La Administración de Seguridad y Salud Ocupacional de EE. UU. (OSHA, por sus siglas en inglés) ha establecido un límite de exposición de 5 miligramos de atrazina por metro cúbico (5 mg/m³) de aire en el trabajo durante una jornada de 8 horas diarias, 40 horas semanales. Los niveles máximos de atrazina que la EPA permite en alimentos varían entre 0.02 y 15 partes de atrazina por millón de partes de alimentos (0.02 -15 ppm). (ATSDR, 2000).

1.4 Suelo

1.4.1. Definición

Suelo es una capa que recubre la superficie terrestre, compuesta por trozos de rocas de distinto tamaño y minerales procedentes de la meteorización y la erosión de la roca madre (roca que forma la superficie terrestre), restos orgánicos (humus), aire y agua, que resulta de la descomposición de las rocas por los cambios bruscos de temperatura, por la acción del agua, del viento y de los seres vivos (Larsen, 2000).



1.4.2 Clasificación de los suelos

Con el objeto de lograr una interpretación mas clara, actualizada y homogéneo de los conceptos edafológicos, los especialistas en suelos han acordado tomar como referencia una Base Mundial de Suelos (Figura 1.3). No obstante, algunos países como Francia y los Estados Unidos, han desarrollado su propia clasificación.

1.4.2.1 Clasificación de suelos a nivel mundial

Los 30 grupos de suelos de referencia se integran en 10 conjuntos que son los que se presentan a continuación (RAP-AL, 2000).

1-Suelos orgánicos: **Histosoles**

2-Suelos minerales en los cuales su formación fue condicionada por la influencia humana (no limitado a ninguna región en particular): **Antrosoles**

3- Suelos minerales en los cuales su formación fue condicionada por su material parental

*Suelos desarrollados en material volcánico: **Andosoles**

*Suelos residuales desarrollados en arenas residuales y estratificadas: **Arenosoles**

*Suelos desarrollados en arcillas expandibles: **Vertisoles**

4- Suelos minerales cuya formación fue condicionada por la topografía/fisiografía del terreno:

*Suelos en tierras bajas (anegadas) con nivel topográfico: **Fluvisoles**

*Suelos en regiones elevadas sin nivel topográfico: **Leptosoles y Regosoles**

5- Suelos minerales en los cuales su formación está condicionada por su limitada edad (no se limita a alguna región en particular): **Cambisoles**

6- Suelos minerales los cuales su formación esta condicionada por el clima; trópicos húmedos o sub-húmedos: **Acrisoles, Alisoles y Lixisoles.**

7-Suelos minerales en los cuales su formación es condicionada por el clima; regiones áridas y semiáridas: **Solonchanz, Solonetz, Durisoles y Calcisoles.**

8-.Suelos minerales en los cuales su formación es condicionada por el clima; regiones de estepas y esteparias: **Kastanozems, Chernozems.**

9- Suelos minerales cuya formación es condicionada por el clima; regiones templadas sub-húmedas: **Podzoles, Planosoles, Luviosoles y Umbrisosoles.**

10- Suelos minerales cuya formación fue condicionada por el clima: **Crysoles.**

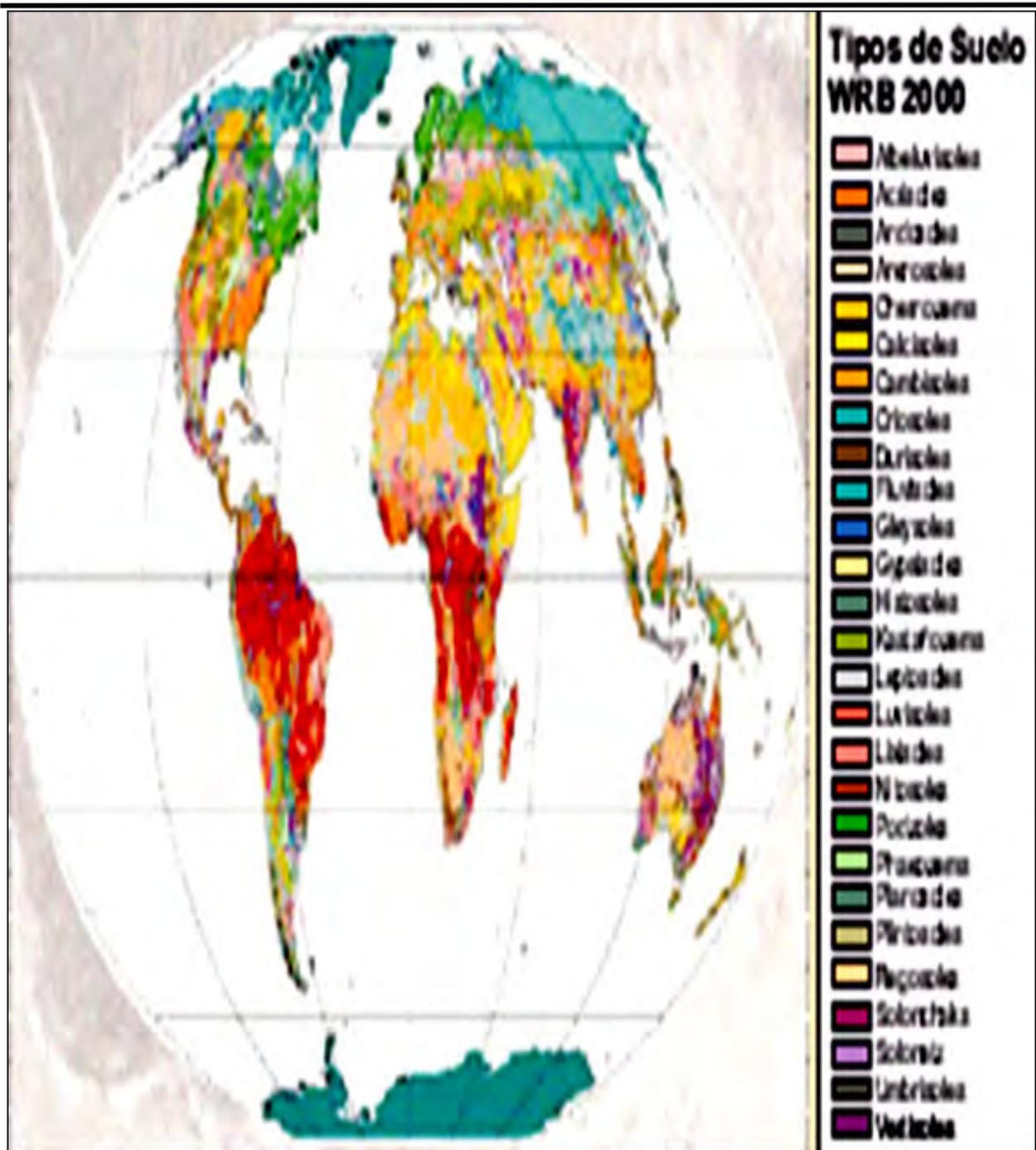


Figura 1.3 Tipos de suelo a nivel mundial. (RAP-AI, 2000)

1.4.2.2 Clasificación de suelos en Estados Unidos

A pesar de los esfuerzos que se han generado por estandarizar los tipos de suelo en todo el mundo, el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, reconoce varios órdenes de suelos, cuyos nombres se forman anteponiendo una partícula descriptiva a la terminación –sol-, el cual se presenta en el Cuadro 1.3.



ORDEN	CARACTERISTICAS
ENTISOL	Casi nula diferenciación de horizontes; distinciones no climáticas: aluviones, suelos helados, desierto de arena.
VERTISOL	Suelos ricos en arcilla; generalmente en zonas subhúmedas a áridas, con hidratación y expansión en húmedo y agrietados cuando secos.
INCEPTISOL	Suelos con débil desarrollo de horizontes; suelos de tundra, suelos volcánicos recientes, zonas recientemente deglaciadas.
ARIDISOL	Suelos secos (climas áridos); sales, yeso o acumulaciones de carbonatos frecuentes.
MOLLISOL	Suelos de zonas de pradera en climas templados; horizonte superficial blando; rico en materia orgánica, espeso y oscuro.
ALFISOL	Suelos con horizonte B arcilloso enriquecido por fluviación; suelos jóvenes, comúnmente bajo bosques de hoja caediza.
SPODOSOL	Suelos forestales húmedos; frecuentemente bajos coníferos. con un horizonte B enriquecido en hierro y/o en materia orgánica y comúnmente un horizonte A gris-ceniza, lixiviado.
ULTISOL	Suelos de zonas húmedas templadas a tropicales sobre antiguas superficies intensamente meteorizadas; suelos enriquecidos en arcilla.
OXISOL	Suelos tropicales y subtropicales, intensamente meteorizados formándose recientemente horizontes lateríticos y suelos bauxíticos.
HISTOSOL	Suelos orgánicos. depósitos orgánicos: turba, lignito sin distinciones climáticas.

Cuadro 1.3 Clasificación de los suelos en Estados Unidos (Shapir, 2000)

1.5 Andosoles

Son suelos de regiones con temperatura media anual superior a los 0°C, que no se han visto influidos profundamente por acciones humanas que generen horizontes antropogénicos. En superficie suele poseer un horizonte oscurecido por la materia orgánica que reúne los requisitos de Móllico o Úmbrico dependiendo del tipo de material original que sea básico o ácido. Cuando presenta propiedades de Ándico, podría tratarse de un horizonte Fúlvico o Melánico según su color.

Características. Las propiedades físicas de estos suelos están condicionadas por una textura fina, aunque su contenido en arcilla no suele pasar del 20 a 25 %, pobre en arenas y tanto más cuanto mayor es la evolución. La estructura es "particular" formada por agregados muy finos, de tamaño limo y arena fina, como consecuencia de la formación de los complejos órgano-metálicos que son el origen de este grupo de suelos. La parte interna del agregado presenta una renovación de la materia orgánica muy lenta, con un tiempo medio de residencia de alrededor de los 4000 años, la parte externa es de renovación más rápida, que facilita su mineralización paulatina.



La presencia de alófana y su riqueza en materia orgánica, que puede alcanzar valores del 20 % y mayores, les otorga una gran cantidad de cargas libres. La elevada retención de fosfatos es una de las características que definen al grupo. Su formación se produce de la descomposición del material orgánico caído sobre el suelo y que genera gran cantidad de compuestos orgánicos hidrosolubles y con fuerte poder complejante.

Estos compuestos siguen su curso y van evolucionando hacia ácidos fúlvicos y, una parte, puede dar lugar a la formación de ácidos húmicos poco polimerizados, dada la humedad permanente del suelo y la necesidad de una etapa de desecación para la maduración de tales compuestos.

Son suelos fértiles aunque su principal inconveniente se encuentra en la fuerte retención de fosfato que, en parte, influye con la transformación de la materia orgánica. Se muestran muy adaptados a los cultivos de café y de té, este último principalmente en las zonas asiáticas.

1.6. Vertisoles

El término vertisol deriva del vocablo latino "vertere" que significa verter o revolver, provocado por la presencia de arcillas hinchables. El material original lo constituyen sedimentos con una elevada proporción de arcillas esmectíticas, o productos de alteración de rocas que las generen. Se encuentran en depresiones de áreas llanas o suavemente onduladas. La vegetación cimácica suele ser de sabana, o de praderas naturales o con vegetación leñosa (De Guzmán, 2005).

Son suelos muy arcillosos y pesados en cualquier capa a menos de 50 cm de profundidad, son de textura fina y el color que presentan es gris oscuro o pardo. Son de ligera a moderadamente alcalinos, tienen una capacidad de intercambio catiónico de alta a muy alta y presentan altos contenidos de calcio, magnesio, y bajo a moderado de potasio. Dicha características les proporcionan una alta fertilidad, sin embargo su aprovechamiento en las actividades agropecuarias se ve limitado por el alto contenido de arcillas expandibles.

1.7 Suelos en estudio del proyecto

En el presente trabajo se estudió un andosol (20 y 80 cm) sustraídos de la cuenca de Valle de Bravo (Figura 1.4) ubicado al oeste del Estado de México. Con más precisión en el poblado "La Loma ", en este suelo en el que se realizó el análisis del efecto de la atrazina en la respiración del suelo, así también fue este suelo el utilizado en la validación del protocolo de extracción de atrazina. El segundo suelo estudiado en el proyecto un vertisol (30 y 90 cm) localizado en el Bajío en el Estado Guanajuato, sitio que provee una cantidad importante de hortalizas para la alimentación de los mexicanos, en el trabajo de tesis este suelo se utilizó en las pruebas de determinación del grupo funcional responsable de la retención de atrazina.

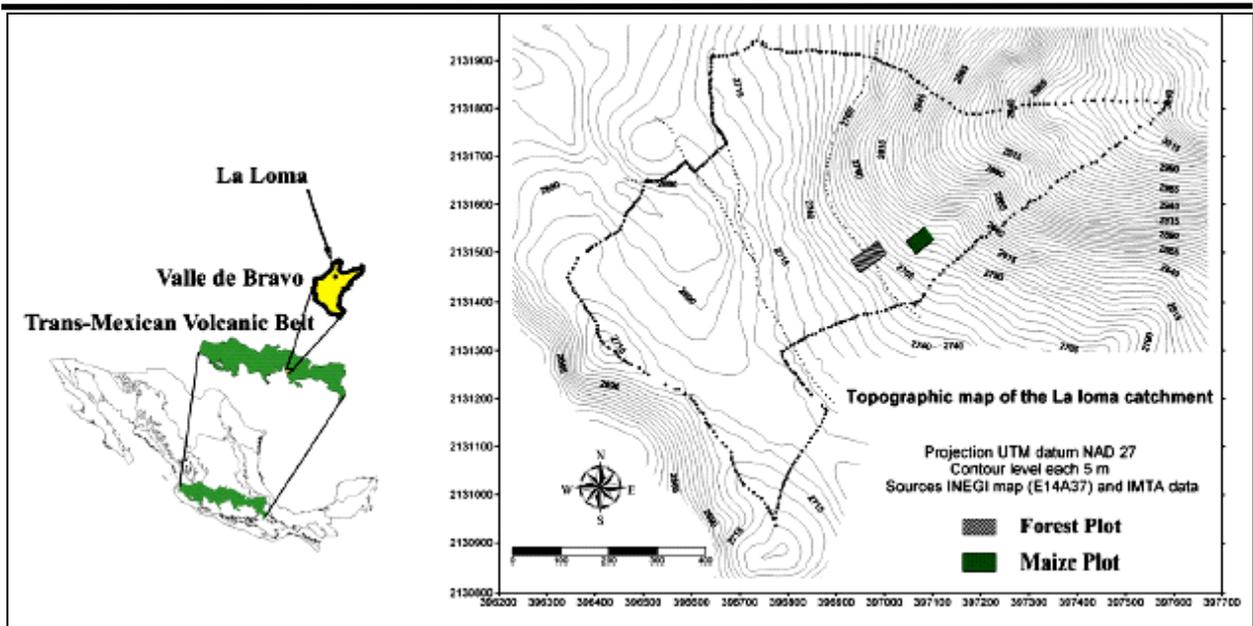


Figura 1.4 Localización del área de análisis (Prado et al, 2007)

1.7.1 Propiedades físicas y químicas de los suelos en estudio

La Figura 1.5 muestra el perfil del andosol estudiado de acuerdo con Prado et al, 2007.

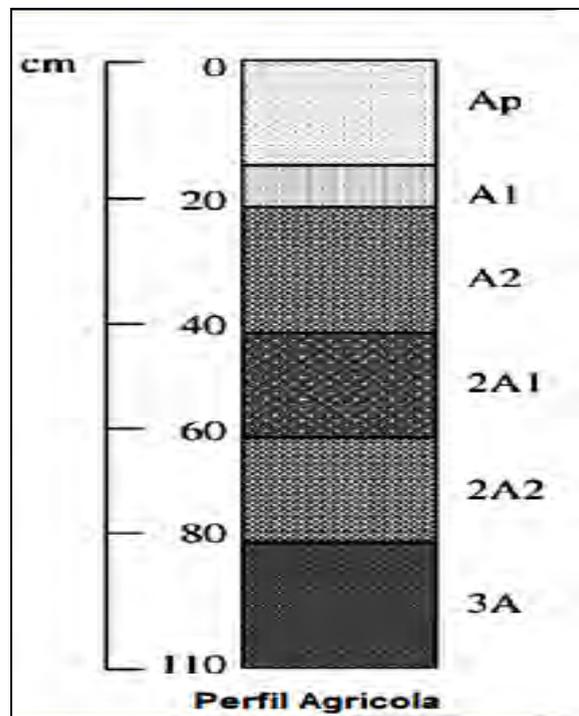


Figura 1.5 Descripción de la formaciones principales del perfil del suelo (Prado et al, 2007)

El cuadro 1.4 muestra características químicas de los suelo andosol en estudio.



En el caso específico del análisis de la tasa de respiración del suelo, es sobre todo el contenido de carbono orgánico el parámetro que interesa para definir el comportamiento del herbicida en el monolito, aunque consideramos sustratos en la materia orgánica que son factores.

Profundidad (cm)	SOC ^a (g kg ⁻¹)	pH			P _{ret} ^b (%)	CEC ^c (cmol _c kg ⁻¹)	EB ^d (cmol _c kg ⁻¹)				EA ^e (cmol _c kg ⁻¹)
		H ₂ O	NaF	KCl			Ca ²⁺	Mg ²⁺	K ⁺	Na ⁺	
Perfil Agrícola											
0-15	54	5.5	11.1	5.1	>90	22.3	7.8	0.5	0.4	0.3	0.08
15-20	53	6.1	11.2	5.8	>90	23.0	18.2	1.2	0.5	0.3	0.07
20-45	56	6.2	11.2	5.8	>90	20.0	19.3	1.6	0.1	0.1	0.05
45-65	53	6.3	11.2	5.9	>90	24.0	20.1	1.4	<10 ⁻⁴	0.1	0.05
65-85	47	6.3	11.4	5.9	>90	23.1	16.1	0.9	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴	0.05
85-110	51	6.5	11.4	6.0	>90	23.6	16.0	1.1	0.2	0.1	0.05

- ^a SOC = Carbono Orgánico
- ^b P_{ret} = Retención de Fosfatos
- ^c CEC = Capacidad de Intercambio catiónico
- ^d EB = Bases Intercambiables
- ^e EA = Acidez Intercambiable (Al³⁺ H⁺)

Cuadro 1.4 Principales propiedades químicas del perfil de suelo (Prado et al, 2007)

Basados en las propiedades de los suelos a evaluar, se logra definir las variables que marcaran la pauta en la retención y transformación del herbicida



CAPÍTULO II:

EFFECTO DE LA

ATRAZINA EN LA

MINERALIZACIÓN

DEL SUELO

UNAM



SINOPSIS DEL CAPÍTULO II:

Estudiando el tema principal de la tesis, el enfoque se dirige a definir como se lleva a cabo la respiración del suelo, así como los métodos para su determinación, explicando los factores (temperatura, humedad, microorganismos) que afectan el proceso. La importancia de evaluar la respiración del suelo en presencia de atrazina radica en evaluar el impacto que el herbicida provoca en el proceso.

2.0 Respiración del suelo

El suelo tiene funciones diversas y muy importantes para los ecosistemas y el medio ambiente del planeta. Es el sustento para la vida vegetal del cual las plantas obtienen soporte mecánico y los nutrientes; es el hábitat para una gran diversidad, tanto de microorganismos (algas, bacterias, arqueas, hongos, protozoarios, y virus) así como de macroorganismos (coleópteros, nematodos, ácaros, larvas y mamíferos pequeños); como aparece en la Figura 2.1.

Es también el lugar donde se lleva a cabo la mayor parte de los ciclos biogeoquímicos de los ecosistemas terrestres (mineralización de la materia orgánica, nitrificación, fijación del nitrógeno y oxidación del metano entre otros (Jenks, 1998).

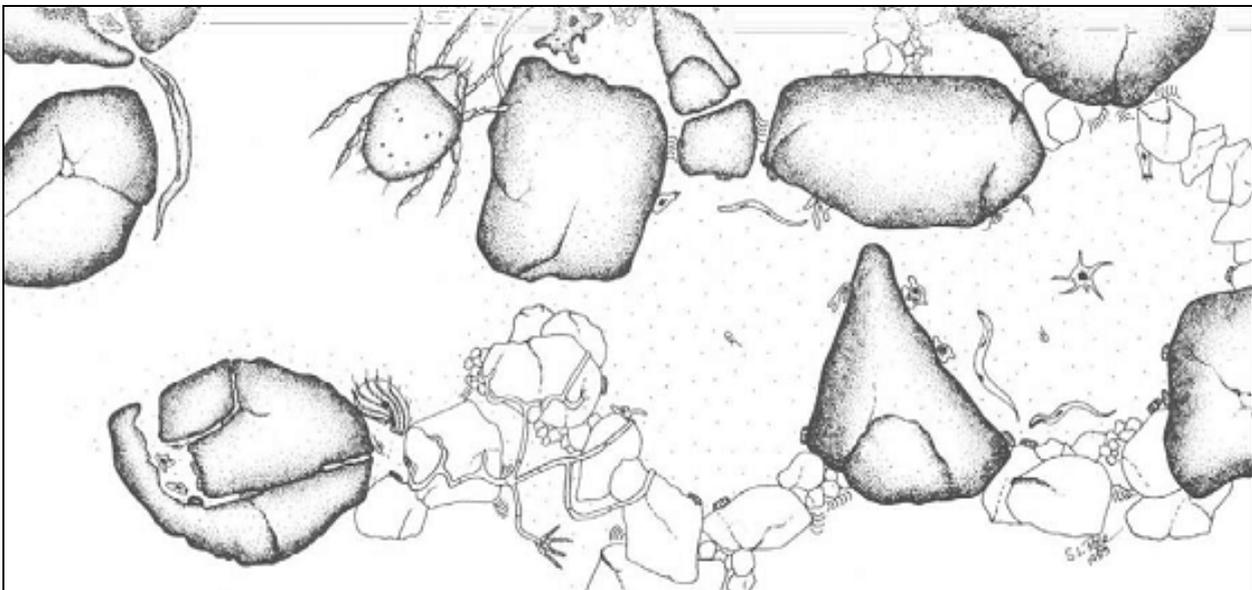


Figura 2.1 Dibujo esquemático de los diversos tipos de organismos en un suelo fértil (Jenks, 1998)

2.1 Métodos de determinación en la respiración del suelo

La agricultura convencional altera de forma severa la estructura del suelo. La vertedera y otros sistemas de volteo del suelo exponen reiteradamente capas más o menos profundas de suelo a la acción de la intemperie.



Los seres vivos allí presentes no pueden adaptarse a cambios tan repentinos en la cantidad de agua y oxígeno ni a la acción de los agentes mecánicos como el viento y la lluvia, y su presencia tiende a disminuir.

Los procesos de retención y de transformación son los que resumen las posibilidades del suelo de eliminar un agroquímico de su solución en forma definitiva (mineralización) o temporaria (estabilización) son los mecanismos que determinarán “la capacidad amortiguadora de un suelo”.

La mineralización, ambientalmente, es la vía óptima de disipación, dado que el compuesto es degradado completamente. La mineralización en el suelo puede ocurrir por vía metabólica o por vía cometabólica.

En el primer caso, la molécula del plaguicida es usada como sustrato, debido a la producción de enzimas específicas. En el segundo caso, la mineralización se logra por ataques cometabólicos secuenciales, donde el producto de un microorganismo puede ser sustrato de otros hasta la disipación (Bollag y Liu, 1992).

Dada la enorme variedad de seres vivos presentes y activos en el suelo, su estudio detallado desde el punto de vista taxonómico, es tarea imposible como herramienta rutinaria. Es por ello que se han desarrollado en las últimas décadas numerosos métodos de respiración del suelo (Cuadro 2.1) que permiten valorar de forma global la cantidad de vida activa del suelo.

Existen métodos químicos para evaluar los suelos tales como: contenido de materia orgánica (MO), azufre, elementos minerales, potencial de hidrógeno (pH) y potencial redox, entre otros.

Sin embargo, los métodos analíticos existentes sólo determinan una parte del complejo sistema químico del suelo y por lo general en forma aislada del componente biológico. Se requiere por lo tanto de un método analítico que integre respuestas biológicas con el entorno físico-químico.

La medición de la respiración del suelo, resulta en un método sencillo para evaluar indirectamente las características químicas del sustrato



Universidad Nacional Autónoma de México

MÉTODO	AÑO	AUTORES	VENTAJAS	DESVENTAJAS
Estimación de la respiración del suelo por medida directa del CO ₂			<ul style="list-style-type: none"> • fácil de realizar , ya que el aparato medidor de CO₂ nos realiza todo el método 	<ul style="list-style-type: none"> • debes tener el medidor de CO₂ • no sabemos la cantidad del suelo porque depende de la materia orgánica
Estimación automática del CO ₂ Desprendido. Aparato Wösthoff	1982 1995	Anderson Alef	<ul style="list-style-type: none"> • el aparato es capaz de medir 6 muestras a la vez • método fiable cuyo aparato es resistente y fácil 	<ul style="list-style-type: none"> • la célula de medida del aparato tiene que estar a una temperatura más o menos constante de 2 °C • caro al necesitar el aparato
Estimación de la respiración por medida Del O ₂ . Aparato Sapromat	1982 1995	Anderson Alef	<ul style="list-style-type: none"> • se puede medir hasta 12 muestras • se evitan condiciones de anaerobiosis 	<ul style="list-style-type: none"> • método caro de realizar • no tienen en cuenta los seres anaerobios
Método de absorción estática	1982 1995	Anderson Alef	<ul style="list-style-type: none"> •ha sido utilizado por muchos científicos • método sencillo • método versátil 	<ul style="list-style-type: none"> • la fiabilidad del método ha sido muy discutida ya que conduce a la infraestimación de CO₂ cuando este es elevado y también cuando es baja.
Método de absorción dinámica	1961	Witkamp y Van der Drift	<ul style="list-style-type: none"> • el suelo no esta modificado 	<ul style="list-style-type: none"> • puede haber diferencias de presión entre cámara y la fase gaseosa del suelo.
Método de cámara de respiración con flujo de aire	1982 1993	Anderson Alef	<ul style="list-style-type: none"> • la alteración del suelo es mínima • se usan 4 colectores siendo la muestra del suelo más representativa • no se arrastra CO₂ de los poros del suelo 	<ul style="list-style-type: none"> • hay que medir una muestra del aire ambiente en cada análisis de atmósfera de suelo
Estimación de la respiración en sistema de incubación con arrastre de aire	1969	Parr y Smith	<ul style="list-style-type: none"> •podemos valorar grandes cantidades de CO₂ desprendido sin sobreestimarlas gracias al arrastre de aire 	<ul style="list-style-type: none"> •es difícil que la cantidad de CO₂ que ha recogido de los botes de NaOH 4M las pueda recoger un frasco de NaOH 0.5M

Cuadro 2.1 Métodos de determinación en la respiración del suelo (Anderson, 1982)



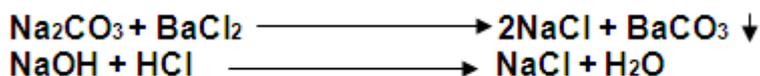
El método de respiración utilizado en el trabajo de tesis, consiste básicamente de una cámara de respiración conteniendo el sustrato. El CO₂ generado por el sustrato es atrapado en una solución alcalina y determinado químicamente mediante titulación con ácido.

2.1.1 Principio Químico de Medición del CO₂

El CO₂ liberado durante la respiración aeróbica en suelos puede ser adsorbido en solución alcalina y medida como un índice de la tasa de respiración. La reacción en la cual el CO₂ es adsorbido es:



La cantidad de CO₂ adsorbido es equivalente a la cantidad de NaOH consumido. Para determinar esto, se precipita el carbonato (CO₃²⁻) con BaCl₂ y se titula el remanente de NaOH con HCl estandarizado. Las reacciones son:



La cantidad de NaOH inicialmente presente, menos la cantidad remanente al final del período de incubación, se utiliza para computar la cantidad de CO₂ emitido por el suelo, que entra en la solución y reacciona con el NaOH.

2.2 Factores abióticos que afectan la respiración aeróbica del suelo

Los principales factores conocidos que afectan la respiración aeróbica del suelo son:

2.2.1 Temperatura

La temperatura es un factor crítico en el control del crecimiento microbiano. Un incremento de 10°C a partir de temperaturas sub-óptimas, puede duplicar la respiración y crecimiento de las bacterias. Muchas bacterias encontradas en el suelo crecen mejor entre 30 a 35°C (Thamdrup et al. 1998).

2.2.2 Humedad del suelo

Los suelos anegados tienen por lo general una menor tasa de respiración debido a que el agua ocupa los espacios porosos y el oxígeno atmosférico no puede penetrar rápidamente. Un exceso de agua por otro lado puede afectar el transporte y difusión de oxígeno hacia el interior de las partículas de suelo, creando condiciones anaeróbicas y reduciendo la respiración aeróbica (Colthup et al; 2000).



Sin embargo, la disminución de la humedad del suelo también afecta adversamente la actividad biológica y respiración de los suelos (Smith et al. 2003). La respiración de los suelos es comúnmente mayor del 60 al 80% de la capacidad de retención de humedad. A este contenido de humedad el suelo presenta un contenido de agua suficiente para la actividad microbiana, ya que algunos poros no están saturados de agua y el aire puede ingresar para proveer oxígeno.

2.2.3 pH

El pH del suelo varía entre 2 en suelos ácidos a 9 en suelos alcalinos. Sin embargo, la mayoría de los suelos tienen pH superior a 6,5. (Boyd, 1995) indica que el rango óptimo de pH para la descomposición bacteriana se encuentra entre pH 7 – 8.

Sin embargo, cada especie de microorganismos presenta un pH óptimo para su funcionamiento metabólico. Se han hecho estudios en la respiración de suelos para cultivo utilizando cámaras de respiración y encontraron una mayor respiración del suelo en rangos de pH entre 7.5 y 8.0 (Shapir, 2000).

2.2.4 Nutrientes

Los microorganismos deben tener una concentración adecuada de elementos minerales esenciales (Shapir, 2000). La mayoría de los elementos minerales necesarios están disponibles en el sustrato o suelo. Los principales nutrientes para las bacterias heterotróficas son carbón orgánico y nitrógeno.

Una deficiencia en una de estas dos fuentes de nutrientes puede limitar el metabolismo y por ende, la respiración. Los microorganismos contienen por lo general un 5 a 10% de nitrógeno en base al peso seco, el cual debe ser suministrado por la concentración de N existente en el suelo o el sustrato orgánico a descomponer (Richter, 2003).

2.3 Retención de la atrazina en el suelo

La retención de la atrazina es más eficiente en la presencia de residuos vegetales y carbono orgánico, lo cual favorece la volatilización, fotodegradación y son expuestos a procesos co-oxidativos que reducen a partes más simples el herbicida (Lambert, 2003).

La adsorción del herbicida está relacionada con la cantidad de carbono orgánico (Ying y Williams, 2000). Sin embargo la abundancia de este elemento en el suelo, puede disminuir la biodegradación de la atrazina, para lo cual es necesario adicionar fosfato inorgánico y de esta forma estimular la degradación (Strong et al 2000), se ha reportado que la atrazina se rige en función del tipo de suelo.



De manera general, la atrazina se adsorbe con mayor facilidad en suelos francos (Son aquellos que presentan la mezcla de los tres tipos de suelos básicos: poseen limo, arcilla y arena). En suelos con poca arcilla y bajo contenido de materia orgánica; la adsorción es reversible y la desorción depende de factores como pH, temperatura y humedad (Barriuso et al., 1996).

2.4 Factores bióticos responsables en la respiración del suelo

Los microorganismos respiran continuamente y la tasa de respiración es un índice confiable de la tasa de crecimiento. Los factores que afectan el crecimiento también influyen en la respiración en el mismo grado.

La cantidad de microorganismos que se encuentran en el subsuelo a menudo es 100 veces más pequeña que los encontrados en la capa superior del suelo, esto se demostró en suelos. La presencia de esta gama de microorganismos debe garantizar la degradación o eliminación de compuestos tóxicos presentes en el suelo mediante la acción de enzimas de origen vegetal y microbiano que son liberadas e inmovilizadas en el suelo (Weber, 1994).

A partir de la transformación de la molécula de atrazina en el suelo, la actividad microbiana es muy importante puesto que un grupo de microorganismos puede utilizar este compuesto como fuente de nitrógeno y energía aunque existe una relativa resistencia al ataque microbiano (Sorenson et al., 1994).

La cantidad de carbono y nitrógeno presente en el suelo influyen en la mineralización de la atrazina y su persistencia en el ambiente, esta en función de la flora microbiana nativa y cuando no existe degradación en un sitio, lo más probable es que los microorganismos no presentan las enzimas específicas que provocan la degradación biológica (Clay, 2000).

Por lo tanto, el patrón de degradación de la atrazina, al igual que el de muchos plaguicidas, no es igual en todos los tipos de suelos y todos los ambientes. La acción de microorganismos es tal vez el factor biótico más importante en la degradación de este herbicida (Benoit, 1996).



CAPÍTULO III:

**VALIDACIÓN DE
LOS PROTOCOLOS
DE LA TÉCNICA DE
EXTRACCIÓN DE
ATRAZINA EN
FASE SÓLIDA**



SINOPSIS DEL CAPÍTULO III:

La validación de los protocolos de la técnica de Extracción de atrazina en Fase sólida se sustenta en la estadística descriptiva. La aplicación de la técnica, requiere del manejo adecuado del HPLC (Cromatografía líquida de alta resolución). Para llegar a la validación del protocolo se realizó una serie de repeticiones de la técnica de extracción en fase sólida, las cuales se sujetaron a requisitos de estadística analítica (Exactitud, precisión, selectividad) garantizando que la metodología cumpla con las estipulaciones deseadas. Su importancia se debe a que es imprescindible que las técnicas en un laboratorio de investigación queden perfectamente diseñadas para que cualquier analista siguiendo la técnica de manera adecuada obtenga resultados favorables.

3.0 ¿Qué es la validación de un método?

Es la evaluación estadística de los resultados obtenidos en la aplicación de técnicas analíticas, mediante pruebas convenientemente documentadas y demostrativas de un método suficientemente fiable a fin de producir el resultado previsto bajo condiciones definidas, como son: sistema analítico, intervalo de concentración, infraestructura y talento humano (CENAM, 2005).

En el presente trabajo se utilizaron los procedimientos de validación sugeridos por la metrología química del CENAM (Centro Nacional de Metrología) en México. La validación del método está ligada estrechamente con el desarrollo del método. De hecho, no es posible determinar donde termina el desarrollo del método y donde empieza la validación. El operador que realiza la validación debe ser técnicamente competente en el campo de trabajo bajo estudio y debe poseer suficiente conocimiento sobre el trabajo a realizar, con el fin de que sea capaz de tomar decisiones apropiadas a partir de las observaciones hechas mientras avanza el estudio como tiempos de ejecución en la extracción (Dell, 1990).

3.1 ¿Por qué es necesaria la validación de un método?

3.1.1 Importancia de las mediciones analíticas

Hay innumerables razones para realizar esas mediciones en diversas áreas de la industria y la investigación, por ejemplo: como apoyo a la investigación en salud; para verificar la calidad del agua para consumo humano; el análisis de la composición elemental de una aleación para confirmar su conveniencia en la fabricación de tanques de acero inoxidable (Dell, 1990). Así también, el costo de realizar estas mediciones es elevado y surgen costos adicionales de las decisiones tomadas en base a los resultados.



3.1.2 El deber profesional del químico analítico

El operador que realiza la validación debe ser técnicamente competente en el campo de trabajo bajo estudio y debe poseer suficiente conocimiento sobre el trabajo a realizar con el fin de que sea capaz de tomar decisiones apropiadas a partir de las observaciones hechas mientras avanza el estudio como tiempos de ejecución en la extracción (Dell, 1990).

En centros de investigación es responsabilidad del laboratorio y su personal tener una clara responsabilidad al saber que los datos serán utilizados para explicar procesos o reacciones en proyectos de investigación, así también, que serán la base de algún artículo científico de divulgación internacional (CENAM, 2005).

3.2 ¿Cuándo deben validarse los métodos?

Un método debe validarse cuando sea necesario verificar que sus parámetros de desempeño son adecuados para el uso en un problema analítico específico. Por ejemplo:

- § Cuando el control de calidad indica que un método ya establecido está cambiando con el tiempo.
- § Un método ya establecido revisado para incorporar mejoras o extenderlo para que su comprensión sea satisfactoria. Este caso corresponde al realizado en la presente tesis en la cual se validó y revisó un protocolo ya establecido.
- § Un método establecido usado en un laboratorio diferente o con diferentes analistas o con diferente instrumentación.

3.3 ¿Quién lleva a cabo la validación del método?

El laboratorio que utiliza un método es responsable de asegurar que el método esté validado adecuadamente y, si es necesario, de llevar a cabo trabajo adicional para complementar los datos ya existentes (Dell, 1990).

3.4 Requisitos Analíticos

Los requisitos de validación pueden ser especificados en guías dentro de un sector particular de mediciones concernientes al método y es recomendable que, si se tienen disponibles, sean seguidas. Esto asegurará que la terminología particular de validación junto con la estadística empleada se interpretará de una manera consistente dentro del sector concerniente. Se trata de responder a los siguientes cuestionamientos:

- ¿Qué clase de respuesta se requiere Cualitativa o Cuantitativa? Cuantitativa
- ¿El analito está dispersado o localizado? La atrazina está localizada



Si el analito esta presente en más de una forma ¿Esta interesado en el analito extraíble, libre o total? El interés radica en la atrazina total extraíble de la matriz.
¿Cuál es la naturaleza física, química y biológica de la matriz? Es un suelo andosol
¿Aplican las limitantes de recursos, personal, tiempo, dinero, equipo y reactivos?
¿Necesitan compararse los resultados con los otros laboratorios? No

3.5 Parámetros de Validación

3.5.1 Exactitud

Es la proximidad de concordancia entre el resultado de una medición y el valor de referencia aceptado. De manera similar se define como la cercanía de un resultado al valor verdadero (CENAM, 2005).

3.5.2 Precisión.

La precisión se determina por lo general en términos de la desviación estándar o la desviación estándar relativa. Tanto la reproducibilidad como la repetitividad dependen generalmente de la concentración del analito y deben determinarse a varias concentraciones y de ser pertinente, deberá establecerse la relación entre la precisión y la concentración del analito (Garfield, 1992).

3.5.3 Selectividad

Se define como la capacidad de un método para determinar exactamente y específicamente el analito de interés en presencia de otros componentes en una matriz de muestra bajo las condiciones de prueba establecidas (Dux, 1996).

La selectividad de un método se investiga mediante el estudio de su capacidad para medir el analito de interés en porciones de prueba a las cuales deliberadamente se han introducido interferencias específicas.

3.5.4 Robustez

Una medida de la efectividad del método analítico es qué tan buen desempeño se mantiene aun sin una implementación perfecta. En cualquier método habrá ciertas etapas las cuales, si no se llevan al cabo con suficiente cuidado, tendrán un efecto severo sobre el desempeño del método y pueden dar como resultado que definitivamente, el método no funcione.

La robustez por lo general se evalúa durante el desarrollo del método, comúnmente por el laboratorio que lo ha propuesto y antes de la colaboración con otros laboratorios. El CENAM describe una técnica establecida para pruebas de robustez.



Las pruebas de robustez se aplican normalmente para investigar su efecto sobre la precisión y la exactitud del método.

3.5.5 Recuperación

El porcentaje de recuperación (%R) entre las muestras fortificadas y sin fortificar se obtiene con la siguiente ecuación:

$$\%R = [(CF-CU)/CA] \times 100 \quad (1)$$

Donde CF es la concentración de analito medida en la muestra fortificada; CU es la concentración de analito medida en la muestra sin fortificar; CA es la concentración del analito adicionado (valor medido, no determinado por el método) en la muestra fortificada.

3.6 Clasificación de Técnicas de Separación Analíticas

Existen varias técnicas de separación analíticas basadas en operaciones unitarias que consisten en dividir una mezcla, en al menos dos partes de composición distinta. Las principales técnicas son las siguientes:

- 1) Precipitación
- 2) Filtración
- 3) Destilación
- 4) Diálisis
- 5) Extracción con disolventes*
 - a) Líquido-líquido y sólido-líquido
 - b) En fase sólida
- 6) Cromatografía
 - a) En capa fina y en papel
 - b) Cromatografía de líquidos en Alta Resolución (HPLC)
 - c) Cromatografía de gases
- 7) Extracción y cromatografía con fluidos supercríticos
- 8) Electroforesis capilar

*En el método de extracción de atrazina se utiliza la técnica de separación: Extracción con disolventes.

3.6.1 Extracción con Disolventes

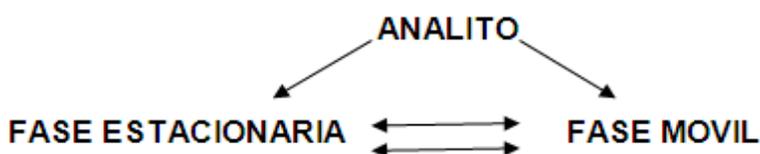
Proceso por el cual se transfiere uno o más solutos de una fase a otra, generalmente entre dos líquidos basado en una diferencia de afinidad de una especie entre la muestra y el disolvente extractante. Consiste en:



- 1) Separación de un analito de la matriz
- 2) Separación de varios analitos entre sí (empleando varios disolventes), normalmente se utiliza en cromatografía.

3.7 Generalidades de la Extracción en Fase Sólida

Se basa en la diferencia de afinidad que presenta el analito (o la matriz) por una fase sólida o por la propia muestra líquida (o el extracto obtenido). De esta forma, al hacer pasar la muestra a través de la fase sólida algunos compuestos quedarán retenidos en ella y otros pasarán inalterados (Calvet, 1980).



Si los analitos de interés han quedado retenidos podrán ser eluidos con un volumen de disolvente.

3.7.1 Características

1. La fase sólida contiene grupos activos ligados covalentemente.
2. Los componentes de la muestra se unen por interacciones débiles.
3. Altamente selectivo.
4. Permite concentrar componentes minoritarios.

3.7.2 Adsorbentes en fase sólida

Como materiales adsorbentes se puede utilizar carbón vegetal, gel de sílice, fluorisil, resinas poliméricas derivadas del poliestireno, alúmina, entre otros. Hay otro grupo de fases sólidas que utilizan fases ligadas, constituidas por un soporte de sílice con grupos silanoles en la superficie que forman enlaces covalentes con los compuestos orgánicos.

Los adsorbentes pueden presentar distintos tipos de grupos funcionales que son responsables de su acción con la muestra.

Los adsorbentes pueden ser:

- Apolares: alquil-sílicas (C_{18} , C_8 , C_4)
- Polares: gel de sílice (grupos silanol Si-O-H)
- Intercambiadores iónicos: ácidos o bases que interactúan con iones de carga opuesta.
- Exclusión molecular: materiales poliméricos de distinto tamaño de poro que permite la separación en función del tamaño particular.
- Afinidad: basados en reacciones de afinidad (antígeno-anticuerpo, enzima-substrato)



3.8 Fundamentos en las etapas de la Extracción en Fase Sólida

La Figura 3.1 es una representación esquemática de las diferentes etapas del proceso de extracción en fase sólida, las cuales son: acondicionamiento de la fase, retención del analito de interés, lavado y elución.

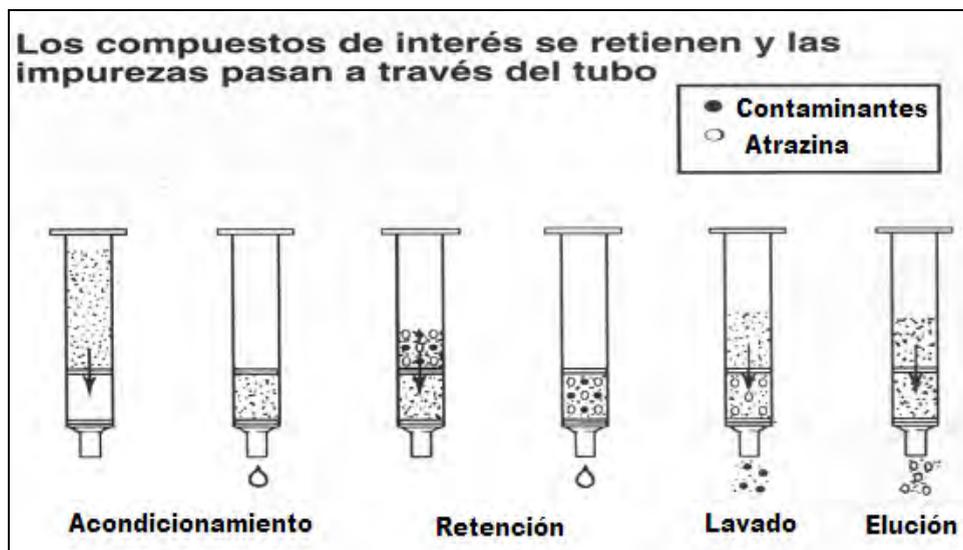


Figura 3.1 Etapas en la extracción en fase sólida

3.8.1. Activación. El primer paso es la activación de los sitios de la fase sólida en la que se utiliza un solvente orgánico ($\text{CH}_3\text{-OH}$) para "humedecer" la fase.

3.8.2. Acondicionamiento. La fase estacionaria de la Extracción en Fase Sólida se acondiciona con el mismo solvente de la matriz. El acondicionamiento permite "alinear" la fase estacionaria lejos de la superficie de la sílice, permitiendo la interacción entre el analito y la fase estacionaria (Figura 3.2). Cualquier solvente orgánico residual se elimina en esta etapa, asegurando que los componentes de interés sean retenidos en la parte superior de la columna.

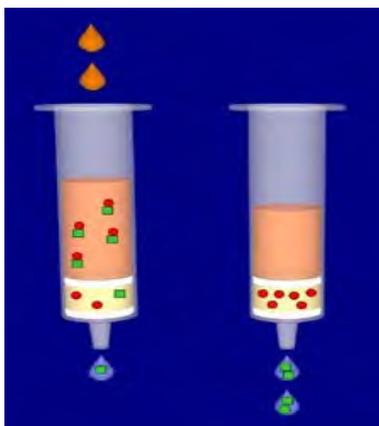


Figura 3.2 Fase de Acondicionamiento



3.8.3. Retención. Las interacciones entre las moléculas de la muestra y la fase estacionaria controlan la retención en el adsorbente de la Extracción en Fase Sólida. Para garantizar que las interacciones entre A=analitos y M=matriz las soluciones deben aplicarse en el adsorbente de EFS a una tasa aproximada de 3 mL/min. La Figura 3.3 muestra el equipo de extracción que se utiliza.

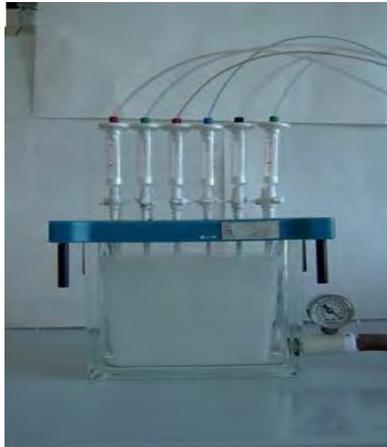


Figura 3.3 Mecanismo de EFS (Retención)

Los componentes de interés han de retenerse en el adsorbente de EFS mientras que la matriz y los contaminantes deben eluirse y descartarse. Durante estas etapas el adsorbente EFS ha de mantenerse húmedo siempre, puesto que el secado del mismo puede acarrear una pérdida de muestra (Pichón et al; 1995).

3.8.4. Eliminar interferencias. Usando un solvente de mayor afinidad los contaminantes pueden eliminarse del adsorbente de la Extracción en Fase Sólida hasta que únicamente los analitos de interés queden atrapados (Ashton et al; 1981). Con un lavado adecuado (Figura 3.4) se eliminan las impurezas.

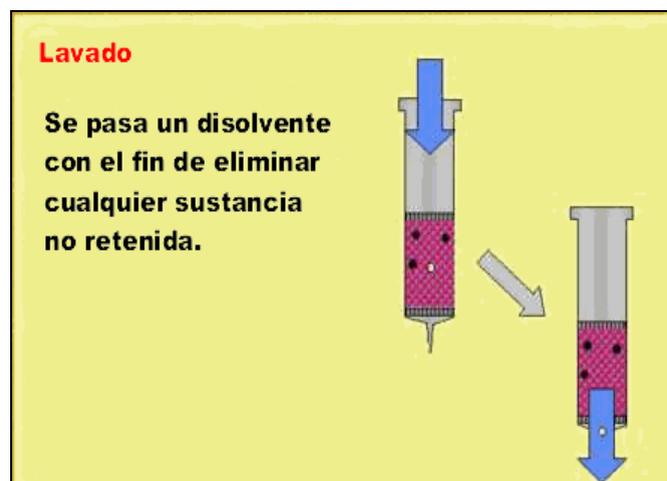


Figura 3.4 Fase de eliminar interferencias



3.8.5. Elución. La elución de los analitos se efectúa mediante un eluyente adecuado (Figura 3.5). El adsorbente de la Extracción en Fase Sólida y las interacciones analito-adsorbentes determinan el eluyente final de elución (Gilchrist, 1993).

Por ejemplo, con un adsorbente hidrofóbico como el utilizado (C_{18}), el solvente de elución es usualmente un solvente orgánico muy polar (como acetonitrilo, metanol o mezclas de estos eluyentes con agua). Tras la elución los analitos y el eluyente se colocan en un vial de 1.5 mL.

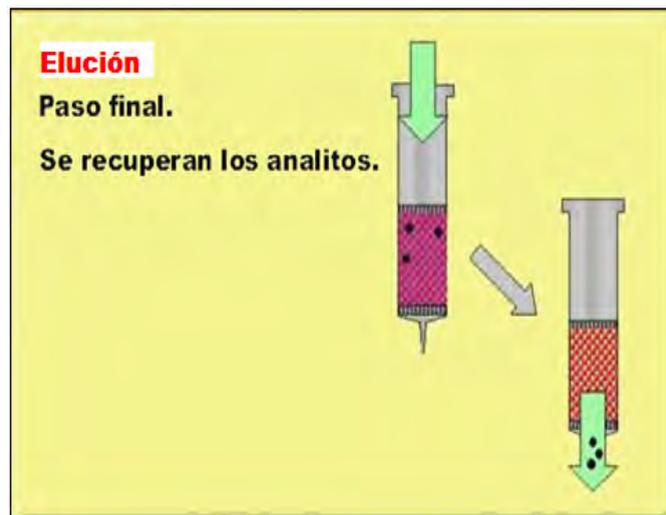


Figura 3.5 Fase de elución en la extracción en fase sólida.



CAPÍTULO IV:

IDENTIFICACIÓN DE

GRUPOS FUNCIONALES

DEL SUELO

RESPONSABLES DE LA

RETENCIÓN DE

ATRAZINA



SINOPSIS DEL CAPÍTULO IV:

Al realizar experimentos de transporte de atrazina en el suelo, así como de sorción en sistema batch, se ha comprobado que el andosol en estudio tiene la capacidad de retener el herbicida. En este capítulo se presentan los resultados obtenidos en los primeros intentos por lograr identificar los grupos funcionales del suelo responsables de la retención de atrazina. La herramienta utilizada fue la espectroscopia del infrarrojo.

En base a estudios hechos en el campo de la espectroscopia para la identificación de grupos funcionales en compuestos orgánicos, no existen datos en herbicidas como la atrazina, es por ello que resulta interesante identificar en la radiación del infrarrojo medio el interferograma que define a la atrazina en su estado puro y compararlo en muestras de suelo a dos concentraciones del herbicida para evaluar si es posible su identificación y el grupo funcional del suelo al cual se encuentra ligado.

4.0 Espectro electromagnético

El espectro electromagnético ha sido dividido arbitrariamente por los científicos, según un criterio instrumental. En la Figura 4.1 de mayor a menor energía se tiene:

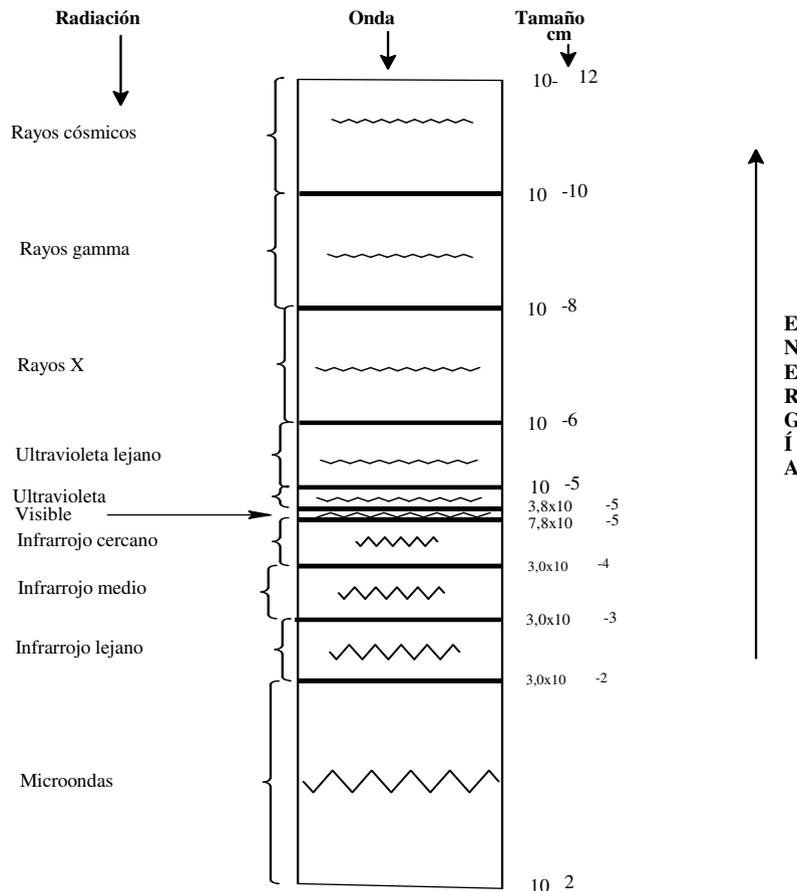


Figura 4.1 Dominio de energías a diferentes longitudes de onda



La energía puede presentarse como onda o bien, como corpúsculo o fotón. Un fotón puede manifestarse con diferentes energías lo que constituye el espectro electromagnético (Colthup et al, 1995).

4.1 Técnicas espectroscópicas

Son las técnicas mas utilizadas en el análisis de materiales, en el seguimiento de la degradación de compuestos orgánicos (Browning, 1971).

Su uso se ha extendido por la rapidez de análisis y el tipo de información que proporciona. En el Cuadro 4.1 se recogen los intervalos de longitud de onda y de frecuencia de las regiones del espectro que interesan con fines analíticos.

Tipo de espectroscopia	Intervalo habitual de longitud de onda ³	Intervalo habitual de número de onda, cm ⁻¹	Tipo de transición cuántica
Emisión de rayos gamma	0,005 - 1,4 Å	----	Nuclear
Absorción, emisión, fluorescencia y difracción de rayos X	0,1 - 100 Å	---	Electrones internos
Absorción ultravioleta de vacío	10 - 180 nm	1x10 ⁶ a 5x10 ⁴	Electrones de enlace
Absorción, emisión, fluorescencia ultravioleta visible	180 - 780 nm	5x10 ⁴ a 1,3x10 ⁴	Electrones de enlace
Absorción y dispersión Raman infrarroja	0,78 - 300 µm	1,3x10 ⁴ a 3,3x10 ¹	Rotación/Vibración de moléculas
Absorción de microondas	0,75 - 3,75 mm	13-27	Rotación de moléculas
Resonancia de espín electrónico	3 cm	0,33	Espín de los electrones en un campo magnético
Resonancia magnética nuclear	0,6 - 10 m	1,7x10 ⁻² a 1x10 ³	Espín de los núcleos en un campo magnético

Cuadro 4.1 Tipos de Espectroscopia. ³1 Å = 10⁻¹⁰ m 1nm=10⁻⁹ m= 10⁻⁸ nm m=10⁻⁷ cm 1 µm=10⁻⁶

Algunos de los términos que se utilizan y forman parte de los fundamentos y utilización de la espectroscopia, se muestran en el Cuadro 4.2.



VARIABLE	CONCEPTO
<i>Amplitud (A)</i>	De una onda sinusoidal, es la longitud del vector eléctrico en el máximo de onda.
<i>Tiempo (t)</i>	Son los segundos necesarios para el paso de sucesivos máximos o mínimos por un punto fijo del espacio se denomina el período (p) de la radiación
<i>Frecuencia (v)</i>	Es el número de oscilaciones del campo por segundo y es igual a (1/p).
<i>Longitud de onda (λ)</i>	Es la distancia lineal entre dos puntos equivalentes de ondas sucesivas.
<i>Velocidad de propagación (v),</i>	En metros por segundo, es la rapidez de un haz de radiación que viene determinada por la fuente y permanece invariable
<i>Número de onda v (cm⁻¹),</i>	Es el que se define como el inverso de la longitud de onda en cm, es otra posibilidad de describir la radiación electromagnética. (Un valor muy utilizado en espectroscopía infrarroja).

Cuadro 4.2 Variables de las técnicas espectroscópicas.

4.2. Infrarrojo (IR)

La región infrarroja del espectro incluye la radiación con números de onda comprendidos entre los 14300 y los 10 cm^{-1} , lo que corresponde a longitudes de onda de 0.78 a 1000 μm . La gran mayoría de las aplicaciones analíticas se ha restringido al uso de una parte de la región infrarrojo medio comprendida entre los 4000 y los 400 cm^{-1} (de 2.5 a 25 μm).

Los espectros infrarrojos obtenidos en el análisis se diferencian de las regiones ultravioleta y visible, por la gran cantidad de máximos y mínimos que se observan. Las graficas de estos espectros se presentan en varios formatos, como transmitancia frente a longitud de onda y absorbancia frente a número de onda o longitud de onda (Ortego et al, 1991).

4.2.1 Regiones Espectrales del Infrarrojo

Desde un punto de vista funcional se divide en tres zonas (Cuadro 4.3) que son:

- IR Lejano: Donde se producen las absorciones debidas a cambios rotacionales.
- IR Medio: MIR o solo IR, donde tiene lugar las vibraciones fundamentales.
- IR Cercano (Near Infrared, NIR), donde se producen absorciones debidas a sobretonos y combinaciones de las bandas fundamentales.



Región	Transición característica	Longitud de onda (nm)	Numero de onda (cm ⁻¹)
Infrarrojo Cercano (NIR)	Sobretonos y Combinaciones	700-2500	14300-4000
Infrarrojo Medio (IR)	Vibraciones Fundamentales	2500- 5 x 10 ⁴	4000-200
Infrarrojo Lejano	Rotacionales	5 x 10 ⁴ -10 ⁶	200-10
La más utilizada	Vibraciones	2.5 a 670	670 a 4000

Cuadro 4.3 Regiones Espectrales del IR

Las técnicas de espectroscopia infrarroja son ampliamente utilizadas en laboratorios de catálisis y preparación de materiales debido a que pocos métodos físicos pueden dar tanta información de manera sencilla. Esta técnica tiene una gran aplicación en la identificación de grupos funcionales. Su elevada selectividad hace posible la cuantificación de una sustancia en una mezcla compleja, no siendo necesaria una separación previa (Deschauer et al, 1990).

4.3 Interpretación de Espectros

En el espectro infrarrojo medio entre 4000 y 1300 cm⁻¹ (región de frecuencias de grupo) se observan una serie de bandas asignadas a vibraciones de solo dos átomos de la molécula. En este caso la banda de absorción se asocia a un grupo funcional y a la estructura molecular completa. Estas vibraciones derivan de grupos que contienen hidrogeno (C-H,O-H y N-H) o grupos con dobles o triples enlaces aislados (Mortland, 1986).

Entre 1300 y 400 cm⁻¹ (fingerprint región) la asignación a grupos funcionales es más difícil debido a la multiplicidad de bandas, pero es una zona de espectro muy útil para la identificación de compuestos específicos. La Figura 4.2 muestra las frecuencias de absorción de los grupos funcionales más comunes en el IR medio. ε, denominado absorptividad molar (L mol⁻¹ cm⁻¹).

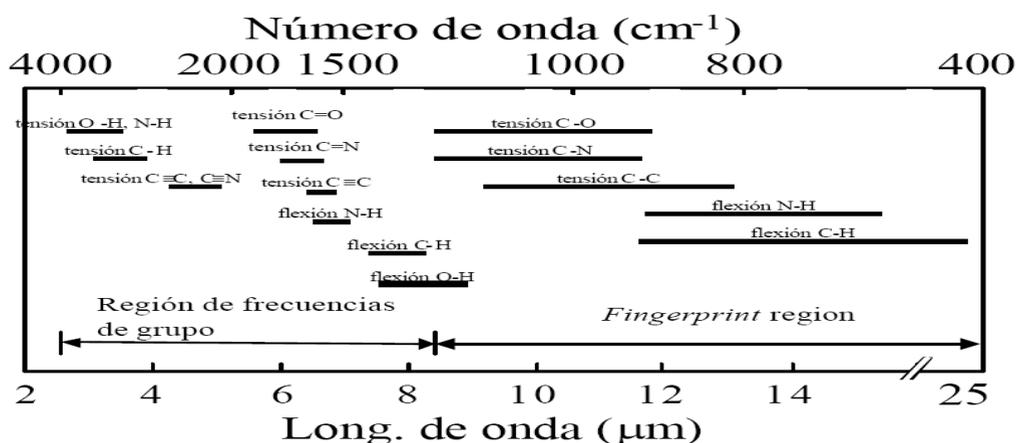


Figura 4.2 Frecuencias de vibración en el infrarrojo medio



Cuando las bandas tienen una menor intensidad (la absorptividad de la muestra es menor), por lo que se debe trabajar con caminos ópticos más largos, de 0.5 a 10 mm, frente a los 10-50 μm utilizados en el infrarrojo medio como se expresa en el comparativo de las Figuras 4.3.

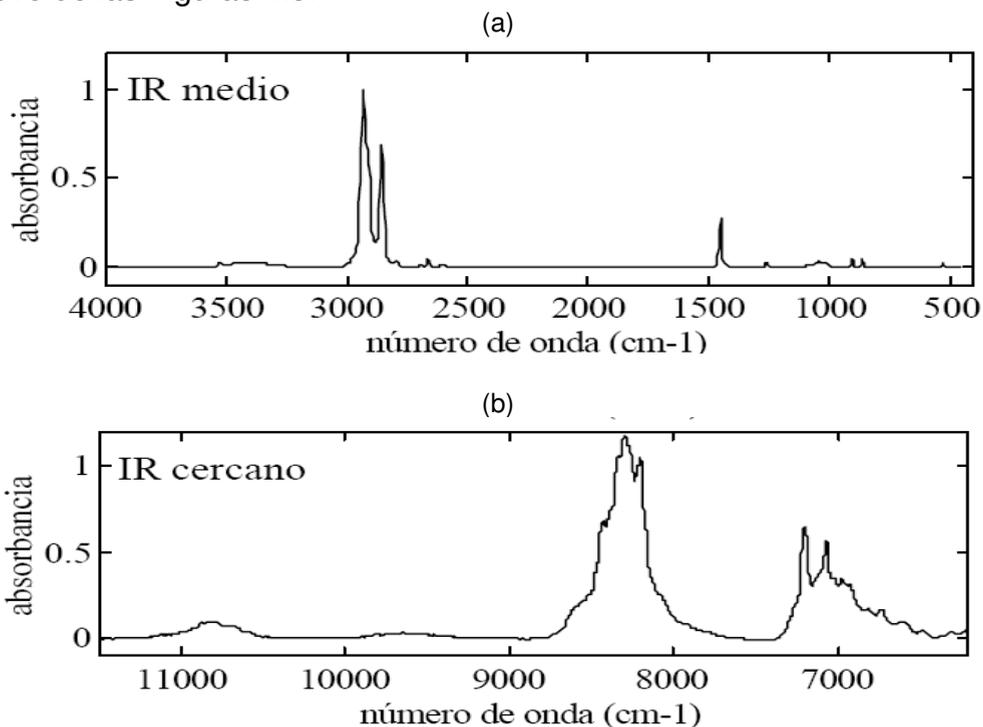


Figura 4.3 Comparación entre el espectro (a) IR medio y (b) NIR del ciclohexano

4.4 Vibraciones: Características de algunas de las funciones química-orgánicas

La literatura reporta que los principales componentes del suelo responsables de la retención de compuestos orgánicos como la atrazina son la materia orgánica y las arcillas. Después de los primeros experimentos de adsorción del herbicida en los suelos estudiados en el trabajo de investigación en que se inscribe esta tesis, se reporta que es sobre todo la materia orgánica del suelo.

En este contexto, el primer paso para la identificación de grupos funcionales y el tipo de enlace asociado a la retención de la atrazina en el suelo es identificar los grupos funcionales de la MO (materia orgánica) y las señales que estos dan en el IR medio. Aquí se mencionan algunos ejemplos.

4.4.1 Aromáticos

Vibraciones de estiramiento del enlace $\text{C}_{\text{sp}}\text{-H}$ aromático se manifiestan entre los 3100 y los 3000 cm^{-1} ; como se visualiza con el Tolueno en la Figura 4.4.

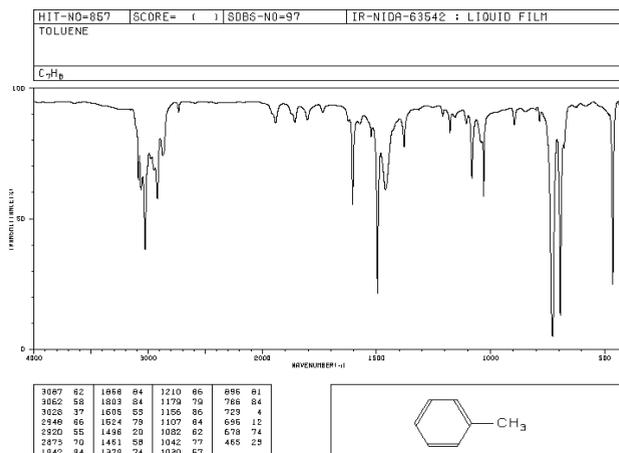


Figura 4.4 Vibraciones de estiramiento del Tolueno

Otra región importante está entre los 2000 y 1650 cm^{-1} , (5 y 6 μm) que es donde aparecen los sobretonos (peineta, por la forma) de las bandas de sustitución. Las vibraciones de estiramiento C-C del esqueleto anular aparecen entre 1600 y 1400 cm^{-1} . Las bandas más importantes e informativas de los compuestos aromáticos, se encuentran entre los 900 y 675 cm^{-1} (Kowalska, 1994).

Se puede identificar el tipo de sustitución en los anillos aromáticos observando la región de los 900 hasta 675 cm^{-1} . Como podrá notarse, es perfectamente posible distinguir el tipo de sustitución observando las diferencias que aparecen en la región entre los 830,0 cm^{-1} y los 690 cm^{-1} (12,0 y 14,5 μm) respectivamente. A continuación se presenta en el Cuadro 4.4 las absorciones más importantes en los hidrocarburos aromáticos.

VIBRACIÓN	ENLACE	μm	CM^{-1}	INTENSIDAD
Estiramiento	$\text{C}_{\text{sp}^2}\text{-H}$	3,3-3,25	3050-3070	Media
Balaceo de CH_3	C-CH_3	7,25-7,30	1370-1380	Media
Deformación del anillo	$\text{C}_{\text{sp}^2}\text{-H}$	13,5 y 14,0	740 y 715	Débil

Cuadro 4.4 Resumen de absorciones en los hidrocarburos aromáticos.

4.4.2 El grupo Carbonilo

Las cetonas, aldehídos, ácidos carboxílicos, anhídridos y amidas, muestran una fuerte absorción del estiramiento del grupo carbonilo C=O entre 1870 y 1660 cm^{-1} . Dentro de este rango, la posición de las bandas de los grupos carbonilos, están determinados, entre otros, por factores ambientales tales como; conjugación y entorno del carbonilo.

4.4.2.1 Cetonas

La vibración de estiramiento del grupo carbonilo aparece entre 1725 y 1705 cm^{-1} , para las cetonas saturadas como aparece en la Figura 4.5 con el 2-Butanona.



Universidad Nacional Autónoma de México

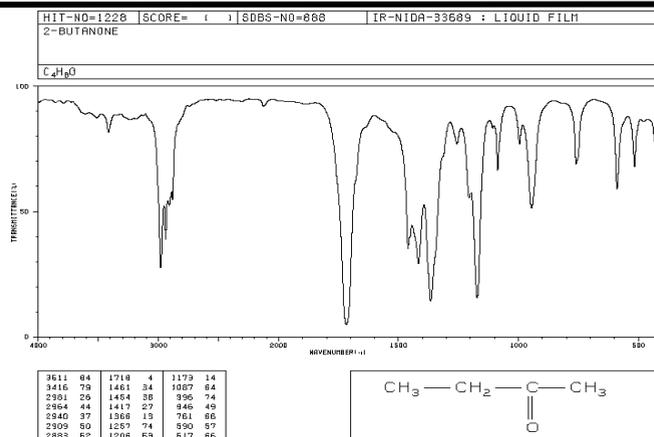


Figura 4.5 Espectro del 2-Butanona (Cetonas)

En aquellas cetonas $\alpha\beta$ no saturadas (Figura 4.6), baja hasta 1665 cm^{-1} . La conjugación en estos compuestos hace que este enlace carbonilo se estabilice y baje su energía de estiramiento. Un ejemplo en la Figura 4.7 con el 3-Butanona (Browning, 1971).

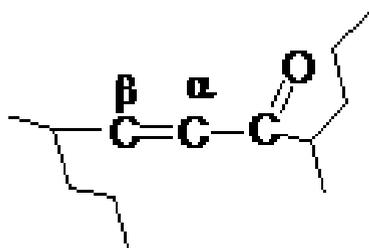


Figura 4.6 Vibración de estiramiento de cetonas

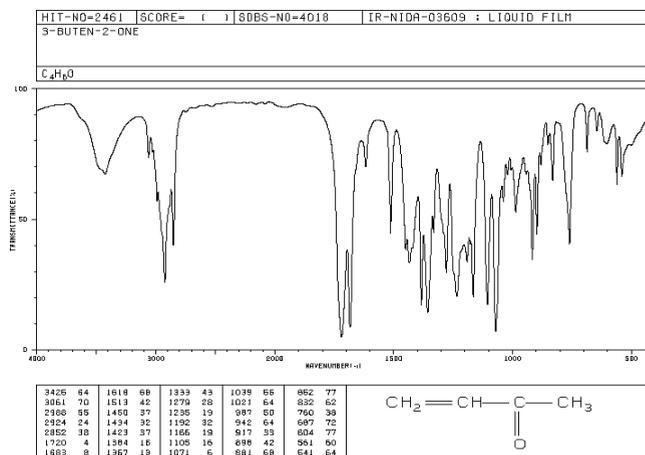


Figura 4.7 Espectro del 3-Butanona

El Cuadro 4.5 muestra un resumen de las más importantes absorciones en las cetonas.

VIBRACIÓN	ENLACE	μm	CM^{-1}	INTENSIDAD
Estiramiento	>C=O	5,80-5,86	1725-1705	Fuerte
Estiramiento en α,β no saturadas	>C=O	5,93-6,00	1685-1665	Fuerte

Cuadro 4.5 Resumen de las absorciones en las cetonas

4.4.2.2 Aldehídos

Las vibraciones de estiramiento del grupo carbonilo en los aldehídos (Figura 4.8) aparecen entre 1740 y 1680 cm^{-1} . Donde se aprecia en la Figura 4.9 con el Butilaldehído.

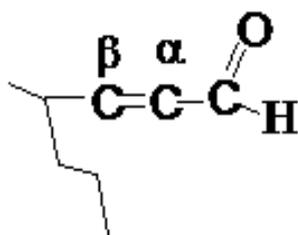


Figura 4.8 Vibraciones del grupo carbonilo

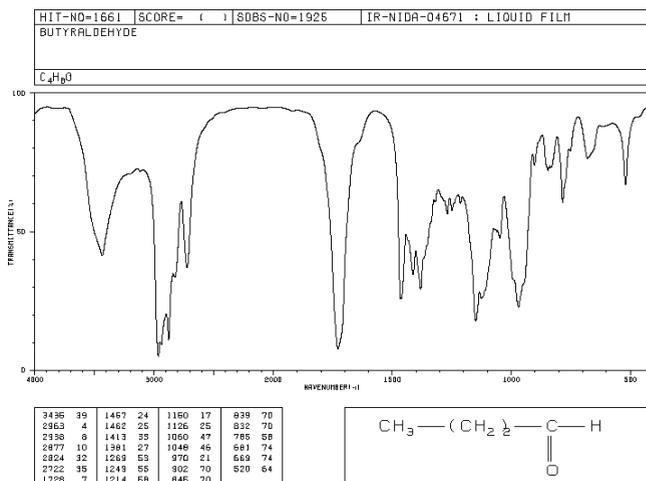


Figura 4.9 Espectro del Butil-aldehído

Las vibraciones de estiramiento del grupo $C_{sp^2}-H$, de los aldehídos aparecen en forma de dos bandas: Una de ellas entre $2900-2820\text{ cm}^{-1}$ y la otra entre $2775-2700\text{ cm}^{-1}$. Estas bandas generalmente están escondidas por las bandas de vibración correspondientes al estiramiento $C_{sp^3}-H$ de los alcanos como en la Figura 4.10, con el espectro del Benzaldehído.

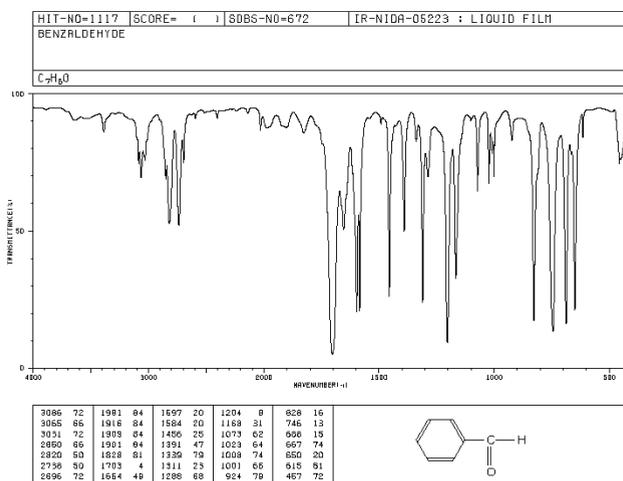


Figura 4.10 Espectro del Benzaldehído

Un resumen de las absorciones más importantes en los aldehídos se muestra en el Cuadro 4.6.

VIBRACIÓN	ENLACE	μm	CM^{-1}	INTENSIDAD
Estiramiento	$>C=O$	5,74-5,95	1740-1680	Fuerte
Estiramiento	$C_{sp^2}-H$	3,45-3,54 y 3,60-3,70	2900-2820 y 2775-2700	Media Media

Cuadro 4.6 Resumen de absorciones en aldehídos



4.4.2.3 Ésteres

En este grupo funcional, el estiramiento del grupo carbonilo, aparece según sea saturado entre 1750 y 1735 cm^{-1} . Un ejemplo es la Figura 4.11.

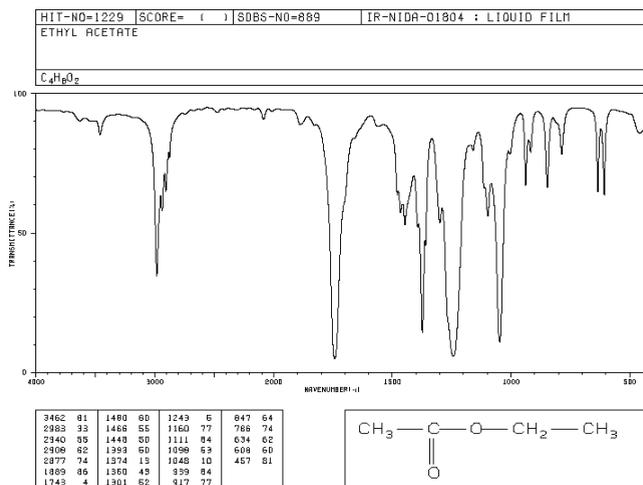


Figura 4.11 Espectro del Etil-acetato

En los ésteres $\alpha\beta$ no saturados y arílicos, está entre 1730 y 1717 cm^{-1} y se visualiza en la Figura 4.12.



Figura 4.12 Vibraciones del grupo carbonilo en ésteres

El Cuadro 4.7 nos muestra un resumen de las absorciones importantes en los ésteres.

VIBRACIÓN	ENLACE	μm	CM^{-1}	INTENSIDAD
Estiramiento	O-H	4,16 hasta 2,94	2400 hasta 3400	Media a fuerte
Estiramiento	>C=O	5,71-5,76	1750-1735	Media
Estiramiento en $\alpha\beta$ -no saturados	>C=O	5,78-5,82	1730-1717	Media
Estiramiento en ésteres arílicos	>C=O	5,78-5,82	1730-1717	Media

Cuadro 4.7 Resumen de las más importantes absorciones en los ésteres



4.4.2.4 Ácidos Carboxílicos

El estiramiento del enlace C=O en ácidos orgánicos saturados, se manifiesta entre los 1725 y 1700 cm^{-1} . Es una banda muy ancha y característica del ácido butírico (Figura 4.13).

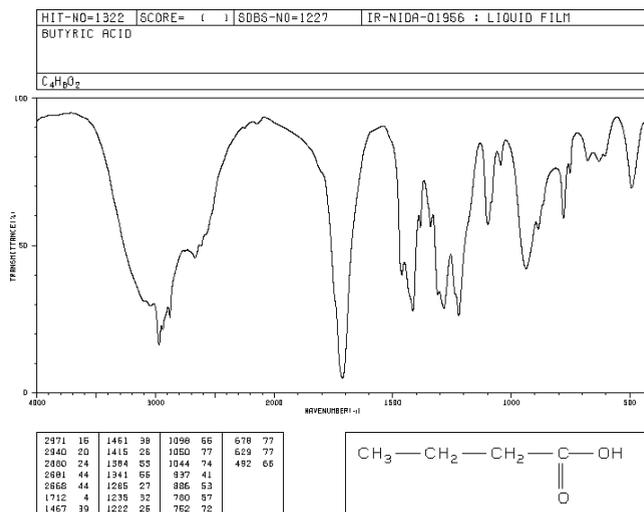


Figura 4.13 Espectro del ácido butírico

En los ácidos α,β no saturados, entre 1715 y 1690 cm^{-1} . En los arílicos entre 1700 y 1660 cm^{-1} . En el Cuadro 4.8 se aprecia las absorciones más importantes en los Ácidos Carboxílicos.

VIBRACIÓN	ENLACE	μm	CM^{-1}	Intensidad
Estiramiento	>C=O	5,80-5,90	1725-1700	Fuerte
Estiramiento	$\alpha\beta$ -no saturados	5,83-5,91	1715-1690	Fuerte
Estiramiento	Arílicos	5,90-6,02	1700-1660	Fuerte
Estiramiento	O-H	3,70-2,86	2700-3500	Fuerte

Cuadro 4.8 Resumen de absorciones en los ácidos carboxílicos

4.4.2.5 Amidas

Las vibraciones de estiramiento del carbonilo C=O en amidas primarias, secundarias se manifiestan entre los 1700 y los 1630 cm^{-1} (Colthup, 1991). El estiramiento N-H en las amidas primarias aparece en dos bandas. Una en 3500 cm^{-1} y en 3400 cm^{-1} . Un ejemplo en la Figura 4.14 (Acetanilida).

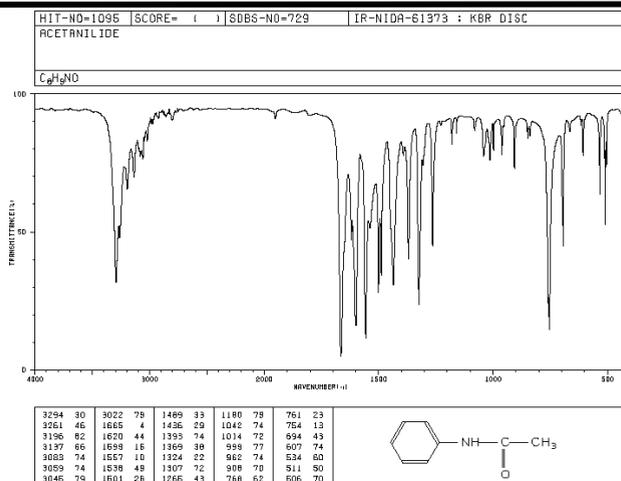


Figura 4.14 Espectro de la acetanilida (Amidas)

En el Cuadro 4.9 se presenta un resumen de las absorciones más importantes en las Amidas.

VIBRACIÓN	ENLACE	μm	CM ⁻¹	Intensidad
Estiramiento primaria	>C=O	5,92	1690	Fuerte
Estiramiento secundaria	>C=O	5,88-5,99	1700-1670	Fuerte
Estiramiento dos bandas	N-H primarias	2,86 y otra 2,94	3500 y otra 3400	Media y Media
Estiramiento una banda	N-H secundarias	3,01-3,18	3320-3140	Media
Deformación	N-H primarias	6,17-6,30	1620-1590	Fuerte
Deformación	N-H secundarias	6,45-6,62	1550- 1510	Fuerte

Cuadro 4.9 Resumen de absorciones en las amidas

En el anexo E se presentan fundamentos teóricos complementarios sobre la herramienta utilizada.



PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La importancia de evaluar los procesos que sufre el suelo en presencia de este plaguicida es de competencia tanto ambiental como de salud humana, esto último debido a los efectos adversos que provoca la atrazina en la salud humana.

Uno de los procesos más importantes que sucede en el suelo corresponde a la emisión de CO₂ o respiración del suelo, el cual está siendo objeto de numerosos estudios debido, entre otros, a su importancia en el ciclo global del C y a la creciente preocupación por el aumento de la concentración de CO₂ en la atmósfera.

Con el objeto de comprender el destino de los pesticidas aplicados en dos tipos de suelo: un Andosol y un Vertisol, el Laboratorio de Fertilidad de Suelos del Colegio de Postgraduados participa en un proyecto financiado por el CONACYT denominado "Estudio del proceso de transferencia de los pesticidas en los suelos volcánicos: determinación de los parámetros efectivos del transporte". Algunos de los resultados obtenidos a la fecha ponen en evidencia el efecto de la estructura del suelo en el movimiento de atrazina; de acuerdo a estos resultados preliminares el proceso de flujo preferencial acelera el transporte del pesticida hacia el acuífero. Por otra parte, se ha encontrado que ambos suelos han mostrado capacidad para retener al pesticida, siendo el andosol el suelo que muestra una mayor capacidad de retención.

En el desarrollo del proyecto, han participado investigadores de varias disciplinas; edafólogos, ingenieros agrónomos, hidrólogos, químicos, especialistas en tratamiento de imágenes; así como varias instituciones: el Colegio de Postgraduados, el Instituto Francés de Investigación para el Desarrollo (IRD), la Universidad de Auckland y el Instituto AgResearch de Nueva Zelanda, los cuales han evaluado la sorción, desorción, transporte, degradación y el riesgo de contaminación del acuífero por atrazina.

Esta tesis forma parte de este proyecto, donde responde al cuestionamiento sobre el efecto que tiene la atrazina en la respiración del suelo, se valida el procedimiento de extracción de atrazina en suelo y se realizan mediciones en espectrometría de infrarrojo para reforzar la hipótesis sobre el grupo funcional que participa en la retención del pesticida en el suelo. Todo es complementando trabajos que se han realizado en el proyecto por varios investigadores, estudiantes de maestría y de doctorado.



OBJETIVOS

CAPÍTULO II

Evaluar el efecto de la atrazina en la tasa de respiración del suelo (mineralización) en un andosol en dos profundidades, de perfil de suelo (20 y 80 cm.) bajo condiciones de operación controladas de temperatura y humedad.

CAPITULO III

Validación de los protocolos de extracción de atrazina en suelo, mediante la técnica de extracción en fases

CAPITULO IV

Identificar la atrazina en suelos andosol y vertisol mediante espectroscopia infrarroja en la región media (MIR) así como los grupos funcionales con los que se asocia: definición de parámetros experimentales (cantidad de suelo, mezcla de suelo + KBr, cantidad de atrazina en el suelo y la definición de espectros).



MATERIALES Y MÉTODOS (CAPÍTULO II)

2.6 Materiales y Métodos

2.6.1 Descripción del Método

El experimento se basa en la incubación del suelo en condiciones de temperatura y humedad controladas, en suelo natural y suelo con atrazina adicionada. Se realizó en frascos de vidrio con cierre herméticos de 1 L de capacidad. En el interior se colocaron 25.0 g de suelo en peso seco con una humedad conocida. Este método ha sido utilizado por un gran número de investigadores (Anderson. 1982), y se basa en la absorción (por difusión) sobre álcali del CO₂ desprendido por un suelo sin alterar cubierto por una cámara hermética, determinando a continuación, después de un tiempo determinado de medida, la concentración de CO₂ que ha reaccionado con el álcali.

2.6.2 Establecimiento del experimento

La mineralización fue evaluada mediante la medida del CO₂ recolectado en pequeños vasos de plástico que contenían 20 ml. de NaOH 0.5 N dispuestos en el interior del frasco hermético. Los frascos de vidrio se colocaron en una incubadora (Laboratorio de Fertilidad con control automático de temperatura) a 25 ± 2 °C. A cada tiempo establecido (3, 7, 14, 21, 30, 45 y 60 días) se cambió la solución de NaOH y se determinó el CO₂. Se realizaron mediciones del CO₂ producido cada lapso durante 60 días (9 semanas) tomando alícuotas de 5 ml. del NaOH, por triplicado.

2.6.3 Materiales

Suelos a evaluar

Andosol de la cuenca de Valle de Bravo

Profundidades: 20 y 80 cm.

Materiales

- ∇ Pipeta volumétrica de 5 mL
- ∇ Bureta de 50 mL
- ∇ Cucharon
- ∇ Recipientes de Vidrio de 1 L. (15 cm. de diámetro y 30 cm. de altura)
- ∇ Frascos ámbar de 100 mL



- ∇ Pipetas Pasteur de 2 mL
- ∇ Matraces Erlenmeyer de 25 ml y 50 ml
- ∇ Matraces aforados de 100 y 50 ml.
- ∇ Vasos de precipitados de 100 ml.
- ∇ Papel Parafilm
- ∇ Pinzas de Sujeción
- ∇ Teflón
- ∇ Tijeras
- ∇ Vasos de p.p.de plástico de 50 ml,
- ∇ Espátula

Reactivos y disoluciones.

- ∇ HCl 0.5 N
- ∇ NaOH 0.5 N
- ∇ BaCl₂ 0.75 N
- ∇ Solución madre de atrazina (100 mg/L)
- ∇ Indicadores: Fenolftaleína, Azul de Bromotimol
- ∇ Ftalato Acido de Potasio (KHC₈H₄O₄)
- ∇ THAM (C₄H₁₁NO₃)

Equipos

- ∇ Balanza Analítica
- ∇ Estufa
- ∇ Incubadora



2.6.4 Preparación de Soluciones

NaOH 0.5 N. Se pesan 9.9978 g de NaOH perlas, las cuales se colocan en un vaso de precipitados de 250 mL. Agregar 150 ml.de agua destilada, después agitar continuamente. Al disolverse las perlas de NaOH el contenido se vacía en un matraz aforado de 500 mL y se afora con agua destilada. Colocarlo en un frasco de 1 L ya etiquetado.

Nota: La sustancia es corrosiva, afecta principalmente los ojos, la piel y el tracto respiratorio. Absorbe rápidamente dióxido de carbono y agua del aire.

Estandarización del NaOH .Se pesan 0.5075 g. de Ftalato Acido de Potasio ($\text{KHC}_8\text{H}_4\text{O}_4$) y se disuelven en 35 mL de agua destilada libre de CO_2 . Titular el NaOH usando fenolftaleína como indicador hasta el vire de incoloro a rosa. Esta operación realizarla por triplicado. El gasto aproximado es de 5.2 mL.

HCl 0.5 N. Se agregan 21 mL de HCl (36 % pureza) $\rho=1.185$ g/ml, en un matraz aforado de 500 mL y se afora con agua destilada. Colocarlo en un recipiente de vidrio de 1 L.

Estandarización de HCl. Pesar 2.4 g.de THAM (Tris hidroximetil amino metano) $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$, previamente secado en estufa de aire forzado por 1 hora a una temperatura de 105°C . Disolverlo en 50 m con agua libre de CO_2 en un matraz aforado. Tomar 3 alícuotas de 10 mL. Titular el HCl usando 4 gotas del indicador azul de bromotimol hasta el vire de azul a amarillo. El gasto aproximado es de 8 mL.

BaCl₂ 0.75 N. Pesar 7.8102 g de BaCl₂, disolverlo en 100 mL de agua destilada. Agitar continuamente para su dilución. Colocarlo en un frasco ámbar de 100 mL previamente etiquetado.

Nota: Usar guantes y gafas ajustadas de seguridad para su manejo.

Solución Madre de Atrazina (100 mg/L). Realizar los cálculos para determinar la cantidad de atrazina a pesar, considerar la pureza de la sustancia la cual esta indicada en el frasco contenedor. Se recomienda preparar una solución de 100 ppm como solución madre por lo que se pesa en una balanza analítica 0.01019 g de atrazina 98.1% pureza, colocarlo en un cucharón; utilizando una piseta, se lava el cucharón con $\text{CH}_3\text{-OH}$ lentamente y se vierte directamente en el matraz volumétrico de 100 mL.

Aforar a 100 mL con $\text{CH}_3\text{-OH}$ y se agita la solución par disolver en su totalidad el soluto. Se coloca la solución en frascos ámbar, y se cierra por completo. Se conservan los frascos a una temperatura de -5.0°C en el congelador.



2.7 Procedimiento Experimental General

2.7.1 Preparación del suelo

La medición de la tasa de respiración del suelo se realizó en dos profundidades del suelo de la Cuenca de Valle de Bravo, 20 y 80 cm. de profundidad.

2.7.2 Tamizado y Humedad del Suelo

Se homogeneizó el suelo para garantizar que sus propiedades sean uniformes. Tamizar el suelo colectado en la región de estudio, en un tamiz malla 10 (2 mm). Al pasar por el tamiz, el suelo se colocó en un recipiente. Evite derramar muestras de suelo. Para determinar la humedad del suelo se pesaron los botes de Aluminio, por muestra de suelo. En cada bote de aluminio se pesaron 5 g. de cada muestra de suelo. Se registró el peso del bote vacío y con suelo húmedo (S_H). Se colocaron los botes en la estufa a una temperatura de 105°C por 24 horas. Transcurridas las 24 horas, pesar los botes y registrar el peso. Realizar los cálculos para determinar la humedad de cada suelo.

$$\%H_{aps} = \frac{S_H - S_S}{S_S} * 100$$

Donde:

$\%H_{aps}$ = Porcentaje de humedad en base en peso seco.

S_H = Suelo húmedo (g)

S_S = Suelo seco (g)

La medición de la tasa de respiración del suelo con y sin atrazina, es un experimento complementario de los experimentos de transporte de atrazina en columnas de suelo, realizado por otros estudiantes. Con el objeto de poder usar los resultados generados en los experimentos de esta tesis, fue necesario fijar algunos parámetros experimentales de forma similar a los observados en los experimentos de transporte, tal es el caso de la concentración de atrazina a utilizar y el contenido de humedad del suelo. De esta forma, fue necesario ajustar el contenido de humedad a nivel deseado correspondiente a cada suelo andosol en las dos profundidades como se aprecia en el Cuadro 2.2.

Suelo	Profundidad (cm)	Humedad (g/g)
Andosol	20	0.8
Andosol	80	1.2

Cuadro 2.2 Contenido de humedad gravimétrica a conservar en cada suelo

Debido a que la humedad natural del suelo era inferior al nivel deseado (Cuadro 2.3), fue necesario agregar agua. Para el experimento se requirieron 25 g de suelo en base seca (P_{ss}). Para estimar la cantidad de suelo húmedo a pesar para obtener el peso requerido se utilizó la siguiente ecuación:



$$P_h = P_{ss} (1 + \theta)$$

SUELO	Humedad	Humedad θ	P_h	P_h	H ₂ O (mL)	H ₂ O (mL)	Agregar
	$\theta_{av.}$	a conservar	Real	Ideal	Real	Ideal	H ₂ O (mL)
ANDOSOL 80 cm.	0.810	1.2	45.25	55	20.25	30	9.75
ANDOSOL 20 cm.	0.580	0.8	39.5	45	14.5	20	5.5

Cuadro 2.3 Preparación del suelo para cumplir las condiciones de humedad.

2.7.3 Realización de las cámaras de respiración.

Se prepararon 12 cámaras de respiración con frascos de vidrio, los cuales tienen un diámetro de 15 cm y 30 cm de altura. Los cuales se pesaron sin tapa y se etiquetaron para su identificación, 6 cámaras de respiración son para suelos andosoles con profundidad de 20 cm, y los restantes para la profundidad de 80 cm. En cada cámara de respiración se colocaron 25 g de suelo (en base seca) tamizado a 2 mm y de contenido de agua gravimétrico conocido, colocado en un frasco de vidrio con cierre hermético como se aprecia en la Figura 2.2. Cada unidad experimental tuvo tres repeticiones

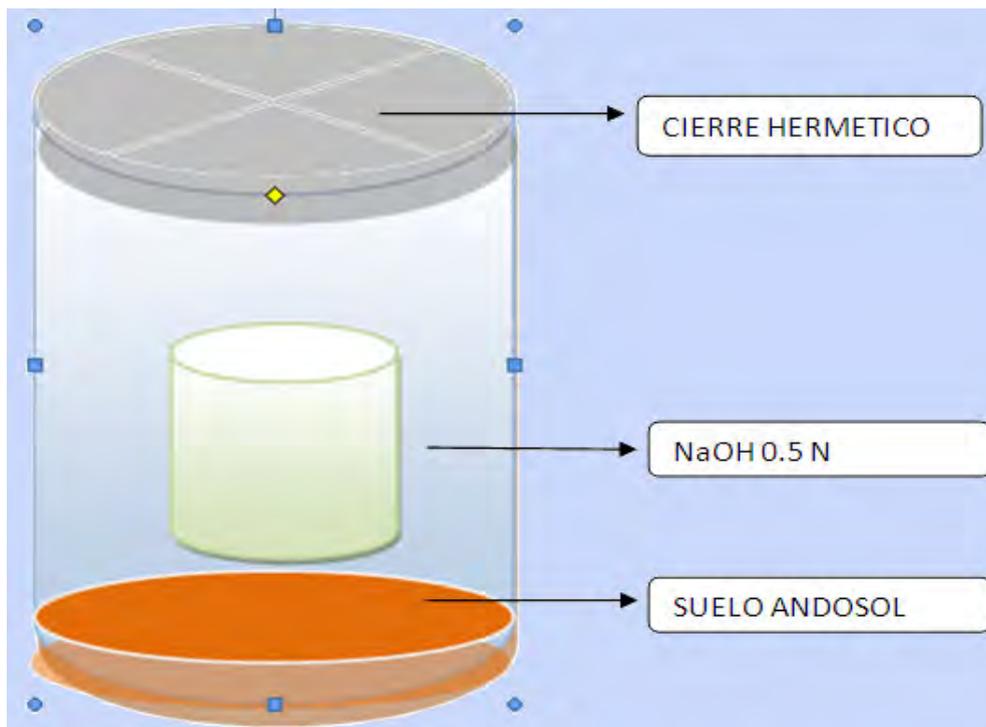


Figura 2.2 Respiración del suelo (Incubación)



2.7.3.1 Adición de atrazina

A las cámaras de respiración con atrazina, se les agregó 1 mL de la solución madre de atrazina (a 3 de los frascos de cada suelo, 6 en total) para tener un comparativo de los suelos con atrazina y sin ella. Como se presenta en el cuadro 2.4.

SUELO	No. FRASCO	ETIQUETA	Pesar	Pesar (g)	Peso Real (g)	Agregar	Peso Real (g)	Peso Total (g)
			Frasco (g)	$P_{h\text{ REAL}}$	P_h	H_2O (g)	H_2O	Frasco
ANDOSOL- 80 cm.	1	A-80 (1)	419.85	45.25	45.30	9.75	9.76	474.91
	2	A-80 (2)	419.84	45.25	45.30	9.75	9.75	474.89
	3	A-80 (3)	419.11	45.25	45.30	9.75	9.78	474.19
ANDOSOL- 20 cm-	1	A-20 (1)	419.06	39.50	39.64	5.50	5.51	464.21
	2	A-20 (2)	420.73	39.50	39.50	5.50	5.53	465.76
	3	A-20 (3)	421.14	39.50	39.55	5.50	5.50	466.19
ANDOSOL- c/ atrazina 80 cm.	1	A-80 1A	419.59	45.25	45.30	8.75	8.80	473.69
	2	A-80 2A	419.67	45.25	45.30	8.75	8.78	473.75
	3	A-80 3A	421.96	45.25	45.30	8.75	8.80	476.06
ANDOSOL- c/ atrazina 20 cm-	1	A-20 1A	419.94	39.50	39.59	4.50	4.76	464.29
	2	A-20 2A	419.38	39.50	39.61	4.50	4.70	463.69
	3	A-20 3A	421.20	39.50	39.73	4.50	4.60	465.53

Cuadro 2.4 Adición de atrazina en suelos andosol en profundidad de 20 y 80 cm.

2.7.3.2 Colocación de la solución de hidróxido de sodio (NaOH)

Dentro de estas cámaras de respiración se colocó un vaso de plástico con 20 mL de NaOH 0.5 N mediante unas pinzas de sujeción; éste se instala en el suelo a una profundidad de 2 cm. Esta solución atrapa el dióxido del carbono producto de la respiración del suelo.

Después de colocar el NaOH, los frascos se cerraron herméticamente utilizando teflón y parafilm para evitar que el CO₂ se escapara. Se colocó en la incubadora a 25 °C ± 2 °C como se observa en la Figura 2.3.



Figura 2.3 Vista de las muestras en la incubadora



2.7.3.3 Valoración del NaOH

En cada uno de los periodos de incubación establecidos, se retira la solución de NaOH, se valora y se reemplaza por una solución recién preparada y valorada. El procedimiento consistió en destapar los frascos y con unas pinzas de sujeción se retira cuidadosamente el vaso de plástico que contiene el NaOH. Pesar el frasco sin el NaOH, inmediatamente colocar en el frasco por medio de las pinzas un vaso de plástico con 20 mL de NaOH 0.5 N preparado recientemente. Cerrar el frasco con papel parafilm y colocar en la incubadora a 25 ° C nuevamente.

La solución de NaOH extraída del frasco se valora para conocer el cambio en la concentración durante el tiempo de incubación. Del NaOH retirado del frasco se toman 3 alícuotas utilizando una pipeta volumétrica de 5 mL; y se colocan en matraces erlenmeyer de 25 mL. Se adicionan 5 gotas de BaCl₂ 0.75 N y 1 gota de fenolftaleína. La valoración se hace con HCl 0.5 N estandarizado hasta el vire de rosa a incoloro.

El montaje experimental aparece en la Figura 2.4.

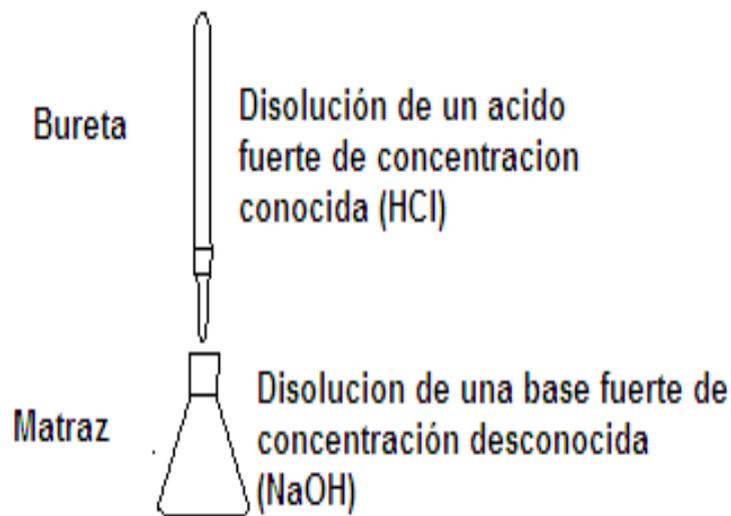


Figura 2.4 Montaje Experimental: Valoración (HCl-NaOH)

El procedimiento mencionado se realiza para cada suelo con y sin atrazina en los tiempos 0, 3, 7, 14, 21, 30, 45 y 60 días. El CO₂ producto de la respiración del suelo y/o mineralización de la atrazina, se calculó con base en el cambio de concentración del NaOH.

Nota: La tasa de respiración se ve influenciada por la humedad y la temperatura del suelo (Anderson, 1982), por lo tanto en nuestro estudio era importante asegurarse de que no existían cambios relevantes de ninguno de estos factores durante cada uno de los períodos de muestreo mediante la evaluación de la temperatura en la incubadora y la humedad del suelo controlado con el peso del frasco en cada uno de los tiempos.



MATERIALES Y MÉTODOS (CAPÍTULO III)

3.10.1 Descripción de los Cartuchos de Extracción (C₁₈)

La operación de la Extracción en fase sólida se lleva a cabo en cartuchos Sep-Pak Tipo C₁₈, 300 mg, con un diámetro de 4.6 mm y una longitud de 15 cm. (Figura 3.6). El cartucho presenta un contenido en carbono del 12 % y la fase de enlace se basa en sílica fuertemente hidrofóbica.

Este tipo de cartuchos se utiliza para adsorber analitos con hidrofobicidad débil en soluciones acuosas, sus aplicaciones incluyen drogas y sus metabolitos en suero, residuos orgánicos ambientales en muestras de agua y principalmente en la fase reversa como cartucho de elución en la extracción para realizar la lectura en el HPLC. El Cuadro 3.1 muestra las características de los cartuchos C₁₈.

Adsorbente	Estructura Química	Enlace	Bloqueo	Esférica	Tam. Part. [µm]	Tam. Poro [Å]
C ₁₈	-O-Si-(CH ₂) ₁₇ CH ₃	mono	sí	sí	55-105	120

Cuadro 3.1 Propiedades del cartucho C₁₈



Figura 3.6 Cartuchos C₁₈

3.10.2 Condiciones de la Extracción en Fase Sólida

El compuesto de interés (atrazina: pureza 98.1%) se preparó a partir de la solución madre de atrazina (100 mg/L) por dilución con metanol calidad HPLC (*Anexo C, Protocolo A: Preparación de Soluciones*), y las soluciones estándar se prepararon por dilución de la solución de trabajo de acuerdo con los requerimientos específicos (Protocolo A). En la validación se utilizó el Andosol a 20 cm de profundidad, la preparación del suelo para su utilización consistió en tamizado a malla 10 (2 mm) y la determinación de la humedad gravimétrica del suelo (*Anexo C, Protocolo C*), los resultados aparecen en el Cuadro 3.2.



Suelo	Bote(g)	Bote +suelo (g)	Bote +Suelo (g)	Bote + Suelo (g)	Humedad θ_1	Humedad θ_2	Humedad $\theta_{av.}$
ANDOSOL	31.06	36.06	34.19	34.18	0.597444	0.60256	0.600
20 cm-	32.12	37.12	35.25	35.24	0.597444	0.60256	0.600

Cuadro 3.2 Humedad del suelo andosol

Como se señala en el protocolo C, es necesario preparar una mezcla de relación 70:30 (Metanol-Agua), para lo cual es necesario considerar el agua contenida en el suelo, de aquí la importancia de estimar este parámetro antes de realizar el experimento. Considerando lo anterior, se realizaron 40 muestras de suelo de las cuales: 10 muestras del suelo tuvieron una concentración de 1 mg/L de la solución madre de atrazina (1mL), 10 muestras con una concentración de 5 mg/L de la solución (5 mL) y 20 muestras de suelo en blanco (Cuadro 3.3). A todas las muestras de suelo se aplicó la técnica de extracción en fase sólida (Protocolo C) mediante cartuchos C₁₈.

Se requiere pesar 50 g de suelo en peso seco (P_{ss}), pero el suelo contiene agua, es decir presenta humedad (θ); se necesita calcular el peso húmedo (P_h) para cuantificar la cantidad real de suelo a pesar. Este se obtiene mediante la ecuación:

$$P_h = P_{ss} (1 + \theta)$$

Donde:

P_h = Peso húmedo del suelo

P_{ss} = Peso en suelo seco

θ = Factor del grado de humedad del suelo en estudio

A partir de esto, se calcula el contenido de metanol y agua que corresponde a las diferentes concentraciones cumpliendo la relación (70:30) contemplando que se realiza en peso la medición, se considera la densidad del metanol que es de 0.792 g/mL.

Suelo	Peso húmedo P_h	Contenido de H ₂ O (mL)	Agregar CH ₃ -OH (mL)	Peso Metanol CH ₃ -OH (g).	Concentración Solución Madre (mL)
Andosol 20 cm	80	30	70	55.440	0
	80	30	69	54.648	1
	80	30	65	51.480	5

Cuadro 3,3 Estimación de metanol y agua en la preparación del suelo

3.10.3 Condiciones de operación del HPLC

El sistema cromatográfico consistió en un equipo para Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC), constituido por: Un módulo "Waters 2695 Alliance", compuesto de:



- § Bomba cuaternaria apta para gradiente.
- § Inyector automático termostatable.
- § Horno de columna.

El sistema cromatográfico consistió en un equipo para Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC), constituido por: Bomba Cuaternaria LC 250 Waters®, Un Detector ultravioleta "Waters 2487 Dual I Absorbance Detector a una longitud de onda de 190 a 700 nm, UV/VIS, Interfase serie 900 Pe Waters® y Software Empower® Versión 1.0, 2004. Columna analítica Simmetry C₁₈ con un diámetro de 4.6 mm y una longitud de 15 cm. El volumen de inyección fue de 10 µL, y la fase móvil metanol-agua (Cuadro 3.4).

Tiempo (min.)	Flujo (ml/min)	% Metanol	% Agua
1.0	1.0	60	40
1.5	1.0	60	40
3.0	1.0	60	40
4.0	1.0	60	40
5.0	1.0	60	40
7.0	1.0	60	40

Cuadro 3.4. Condiciones de la fase móvil

Corrida isocrática fase inversa con las siguientes condiciones:

Fase móvil: CH₃--OH= **60: 40**.

Tasa de flujo: **1 mL/min**

Volumen de inyección: **10 µL**

Absorción: **220 nm**

Tiempo de retención de la atrazina **5.0 min**

Eficiencia de recuperación: **91%**

3.10.4 Requisitos Analíticos en la Extracción en Fase Sólida

A continuación se explica el procedimiento experimental seguido para la evaluación del método con base en los parámetros: selectividad, exactitud, precisión y robustez.

Selectividad. Muestras de 50.0 g de suelo en peso seco contaminadas y no contaminadas con atrazina, se procesaron de acuerdo con el protocolo de extracción y limpieza (Anexo C, Protocolo D) y sus extractos se inyectaron en el sistema cromatográfico.

Exactitud. Para evaluar la exactitud del método se usó el porcentaje de recuperación; este se evaluó a dos concentraciones diferentes de los compuestos dentro del rango de la curva de calibración usada. Se tomaron 50.0 g de suelo en peso seco, se adicionó la solución madre de atrazina a dos concentraciones distintas (1 y 5 mg/L); se dejó en reposo durante 12 horas, luego se hizo el proceso de extracción, limpieza y análisis cromatográfico.



Precisión. Muestras de suelo (50.0 g en peso seco) se fortificaron con la solución madre de atrazina, a dos concentraciones distintas; enseguida, se hizo el proceso de extracción y limpieza; posteriormente los extractos se inyectaron en el sistema cromatográfico. El número de repeticiones fue por triplicado. Este parámetro se evaluó en base a los coeficientes de variación en las dos concentraciones.

Robustez: Las variables que pueden tener un efecto en la extracción, se consideró: el sistema cromatográfico de alta resolución (HPLC) a través de curvas de calibración hechas con soluciones estándar (Anexo C, Protocolo A), además de la evaluación del cromatograma en los tiempos de retención en las dos concentraciones de atrazina, así como el equipo de filtración en la preparación de solventes del HPLC (Figura 3.7) que son un factor que se debe tener en cuenta.



Figura 3.7 Equipo de Filtración de solventes en el HPLC



MATERIALES Y MÉTODOS (CAPÍTULO IV)

4.6.1 Descripción del Espectroscopio Infrarrojo

El espectroscopio infrarrojo utilizado es un equipo con la capacidad de análisis de sólidos (orgánicos, inorgánicos y biológicos) en una variedad de formas que incluyen fibras, partículas, residuos, capas y monolitos salidos. El equipo es un Nicolet Nexus 670 FT-IR con las siguientes características:

- El límite de detección para análisis de rutina es -0.1 wt%, bajo condiciones lineales
- Se requieren solo unos miligramos de material para el análisis. Las muestras pueden estar en estado líquido, sólido o formas gaseosas. La mayoría de los accesorios son para muestras sólidas
- Resolución espectral de 0.125 cm^{-1}
- Alineamiento dinámico continuo
- Doble detector de acceso manual

El equipo está completamente optimizado y controlado para su utilización. Los espectros cambian de rango de manera fácil como se pueden remover los accesorios ópticos y colocarlos de nuevo en su posición habitual. El software OMNIC se actualiza automáticamente en rangos, sensibilidad y parámetros. Se identifica en la Figura 4.15.

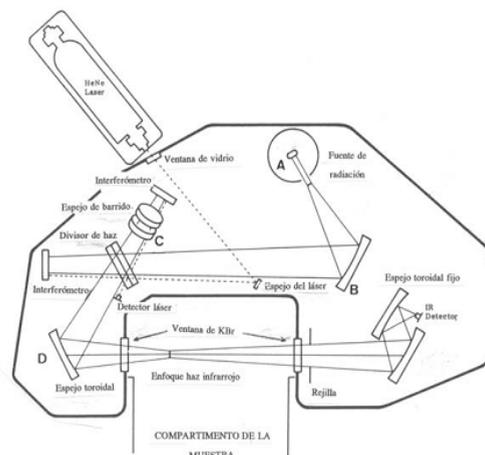


Fig. 4.15 Espectroscopio IR Nicolet Nexus 670

4.6.2 Condiciones de uso de la Espectroscopia IR

Región de mayor uso: $4000\text{-}400 \text{ cm}^{-1}$

- Aplicaciones principales en análisis cualitativo

Tipos de Instrumentos

- Con transformada de Fourier
- Fuente: Nerst, Globar, Arco de Hg, Láser.
- Disolventes (Ejemplos en el Cuadro 4.10)



DISOLVENTE	Región útil cm^{-1}	Región no útil cm^{-1}
CHCl_3	600-820	1175-1250
C_2Cl_4	750-950	
C_6H_6 benceno	600-750	3000-3100
CH_2Cl_2	600-820	1200-1300
ACETONA	1100-1850	2800-3000
DMSO	900-1100	
TOLUENO	600-750	2800-3200

Cuadro 4.10 Disolventes utilizados en el espectroscopio

Cubetas: cristales de Bromuro o Cloruro de sodio.

- Separador de longitudes de onda: monocromador de red de difracción.
- Detector: Termopares; bolómetros; neumáticos o Golay

4.6.3 Materiales

Suelos a evaluar

Se utilizaron los mismos suelos descritos en el Capítulo I:

Andosol de la cuenca del Valle de Bravo (Profundidades de 20 y 80 cm)

Vertisol de la región del Bajío Guanajuatense (Profundidades de 30 y 90 cm)

- ∇ Cucharón
- ∇ Papel Albanene
- ∇ Frascos ámbar de 100 mL
- ∇ Matraces aforados de 100 mL
- ∇ Vasos de precipitados de 10 y 50 mL
- ∇ Espátulas
- ∇ Mortero de Ágata
- ∇ Portamuestras
- ∇ Pinceles

Reactivos y disoluciones.

- ∇ Solución madre de atrazina (100 mg/L)
- ∇ KBr
- ∇ Atrazina 98.1% Pureza

Equipos

- ∇ Balanza Analítica
- ∇ Estufa
- ∇ Incubadora
- ∇ Desecador
- ∇ Espectroscopio Infrarrojo



4.6.4 Preparación de Soluciones

Solución 100 mg/L Atrazina. La solución de atrazina se preparó conforme a lo señalado en el Protocolo A (Preparación de Soluciones) para la aplicación en los suelos a evaluar en concentraciones de 3 mg/L.

4.6.5 Tamizado y Humedad del Suelo

La operación de tamizado del suelo se realizó de acuerdo a los lineamientos del Protocolo B y la determinación de la humedad gravimétrica del suelo se efectuó en base al Protocolo C.

4.7 Procedimiento Experimental general

En un primero tiempo se utilizaron las muestras de suelo con atrazina una vez concluido el experimento de respiración del suelo, sin embargo, debido al proceso de degradación microbiana del herbicida ocurrido durante el tiempo de incubación, la cantidad de atrazina presente en el suelo no fue suficiente para ponerla en evidencia con el equipo de IR. Debido a lo anterior, se analizaron muestras de suelo enriquecidas con dos concentraciones mayores de atrazina.

4.7.1 Preparación de la muestra

1. Pesar 10 g. de cada suelo en base seco (P_{ss}). Para determinar la cantidad de suelo húmedo a pesar equivalente a los 10 gramos de suelo seco, se utiliza la siguiente ecuación:

$$P_h = P_{ss} (1 + \theta)$$

Ajustar el contenido de agua en los suelos como se aprecia en el Cuadro 4.11

SUELO	Humedad $\theta_{av.}$	P_h Real
ANDOSOL 80 cm.	0.810 0.810	18.1
ANDOSOL 20 cm-	0.580 0.580	15.8
VERTISOL AB	0.090 0.090	10.9
VERTISOL B2	0.190 0.190	11.9

Cuadro 4.11 Preparación de los suelos andosol y vertisol.

Esta operación se realiza por triplicado para cada tipo de suelo y profundidad, de tal forma que se tiene en total 12 muestras de suelo a analizar.



2. Enriquecimiento de las muestras de suelo con atrazina. La adición de la solución madre de atrazina se llevó a cabo con una pipeta volumétrica y se efectúa de la manera como aparece en el Cuadro 4.12.

Suelo	Sol. Atrazina 1 ml	Sol. Atrazina 3 ml	s/ Atrazina
Andosol 20 cm	x	x	x
Andosol 80 cm	x	x	x
Vertisol AB(30 cm)	x	x	x
Vertisol B2 (90 cm)	x	x	x

Cuadro 4.12 Adición de atrazina en suelos andosol y vertisol.

3. Secar las muestras de suelo a temperatura ambiente en un periodo de tres días,
Nota: Las muestras se guardan en un espacio donde exista el menor contacto con algún agente externo, lo recomendable es cubrir las con algún plástico para evitar su contaminación.
4. Moler homogéneamente con ayuda del mortero las muestras de suelo en partículas finas para su lectura en el infrarrojo. Cuidar de no derramar ninguna partícula.
Nota: Es importante que el tamaño de partícula sea menor a la longitud de onda de la radiación; de no ser así, se pierde parte de la radiación por dispersión
5. Pesar 0.05 g de suelo de cada muestra en un vaso de precipitados de 10 mL.
6. Se pesan 0,45 g de KBr finamente triturado (tamaño de partícula menor de dos micras) en un vaso de precipitados de 10 mL
7. Mezclar la muestra de suelo y el KBr en el mortero de Ágata. Aplicar la operación de molienda que se realiza para cada muestra en un periodo uniforme de 5 minutos hasta dejar partículas finas.
8. Esta mezcla en dos fases se conforma en una delgada pastilla que se coloca mediante una espátula en un portamuestras con la precaución de cubrir la superficie descrita y sin derramar la muestra.
Nota: El KBr es higroscópico y es difícil preparar una pastilla sin humedad, lo anterior complica el análisis en la región espectral del O-H y N-H, así como la reproducibilidad.
9. Colocar cada pastilla de suelo en el portamuestras para colocarlo en el equipo para obtener el interferograma.
Nota: Es importante limpiar la superficie del portamuestras entre las diferentes muestras para evitar contaminación de una a otra.
10. Se prepara una muestra de KBr en otro portamuestras que sirve como blanco de fondo para el equipo del infrarrojo utilizado, que se necesita cada 30 minutos.
Nota: El blanco de fondo se coloca en el desecador para evitar su humedecimiento y solo se retira de ahí hasta que lo requiera el equipo.



4.7.2 Procedimiento para operar el espectroscopio IR

- 1.-Colocar el aditamento que se va a utilizar, de acuerdo con la muestra:
 - a) ATR (c/cristal de ZnSe) para muestras líquidas.
 - b) Reflectancia difusa para muestras sólidas.
 - 2.-Colocar la fuente que se va a utilizar.
 - 3.-Colocar el divisor de haz que corresponde a la fuente.
 - 4.-Encender el instrumento (Power-ON).
 - 5.-El equipo para su buen funcionamiento se deja calentar por 30 minutos.
 - 6.-Encender el CPU
 - 7.-Se abre el software del espectroscopio infrarrojo OMNIC.
 - 8.-Dar O.K.(Corresponde al reconocimiento del aditamento para sólidos o líquidos).
 - 9.-Ingresar al Menú Bench y revisar que los parámetros se modifiquen así:
 - a) Resolución:
 - Para Análisis Cualitativo: 4
 - Para Análisis Cuantitativo: Aumentar la resolución que define mejor las bandas
 - b) No. de barridos:
 - 64 para sólidos
 - 32 para líquidos
 - c) Fuente: IR (Infrarrojo)
 - d) Rango de trabajo ;
 - Medio : 4000 a 400 cm^{-1}
 - e) Accesorios : NRTS
- Dar O.K. para trabajar con las siguientes condiciones requeridas.
- 10.-Aparece en la pantalla el interferograma (Figura 4.16).

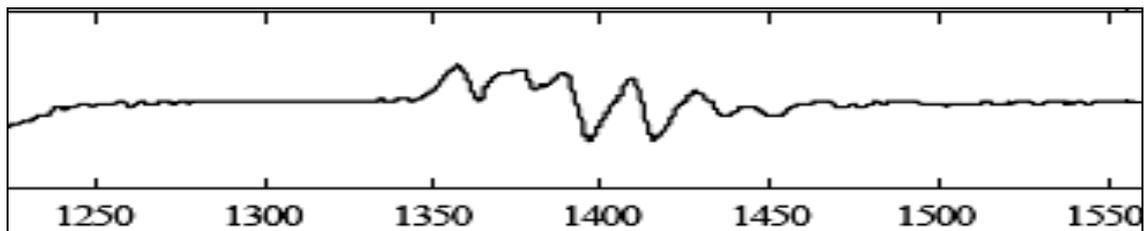


Figura 4.16 Señal del detector

11.-Colocar el aditamento para muestras sólidas, una cavidad llena con KBr (blanco) y con la otra con la muestra (Cuidando de distribuir el polvo cubriendo totalmente la superficie).

12.-Usar la muestra de suelo bien molida,

Nota: Hay un efecto por el tamaño de la partícula, por lo que se recomienda usar muestras bien molidas. En el caso de no moler las muestras adecuadamente, los espectros pueden presentar un alto ruido de fondo y/o una línea base con una pendiente alta. Lo que genera un alto coeficiente de absorción.

13. Abrir la ventana de Collect, te diriges al submenú de Collect Background (blanco) y dar O.K.

Nota Colectar el blanco de fondo aproximadamente cada 30 minutos (povos, líquidos), se recomienda no usar el mismo background todo el día. Para análisis cuantitativo usar un blanco con mayor frecuencia.

14. Insertar la muestra y colocarla en el portamuestras cuidadosamente.

Nota: El blanco de fondo se coloca porque corrige los efectos del ambiente como H_2O y CO_2 .

15. Abrir la ventana en Collect, seguir al submenú Collect Sample (muestra) y dar O.K.

16. Insertar la pastilla (muestra) de suelo en el portamuestras con precaución. El interferograma se forma en 2 minutos.

Nota: Se colocara las muestras de suelos posible hasta que el equipo hayan transcurridos los 30 minutos para colocar la pastilla del blanco de fondo nuevamente.

17. Guardar cada muestra en el software para su estudio.

18. Apagar la fuente (IR) para evitar su deterioro.



RESULTADOS Y DISCUSIÓN (CAPÍTULO II)

2.8.1 Variación de la normalidad del NaOH en un suelo andosol de 80 cm. de profundidad

El cuadro 2.5 muestra la Normalidad promedio del NaOH en cada uno de los tiempos experimentales del suelo andosol 80 cm. con y sin atrazina, así como la variación de la Normalidad del NaOH de un tiempo a otro para evaluar la respiración del suelo.

TIEMPO (Días)	N ₁ NaOH Sin Atrazina	N ₁ NaOH Con Atrazina	ΔN NaOH Sin atrazina	ΔN NaOH Con atrazina
3	0.4626	0.4529	*****	*****
7	0.4860	0.4870	0.0234	0.0342
14	0.5025	0.4883	0.0166	0.0012
21	0.5030	0.4997	0.0005	0.0114
30	0.5063	0.5085	0.0033	0.0088
45	0.5073	0.5106	0.0010	0.0021
60	0.5082	0.5138	0.0009	0.0031

Cuadro 2.5 Normalidad del NaOH en suelo andosol 80 cm en la respiración del suelo
N₁=Normalidad ; ΔN=Variación de la Normalidad

Como se ve en la siguiente gráfica (Figura 2.5), el cambio de concentración del NaOH fue más importante en las cámaras con atrazina comparados con el suelo sin el herbicida, al evaluar la tasa de respiración del suelo en 60 días.

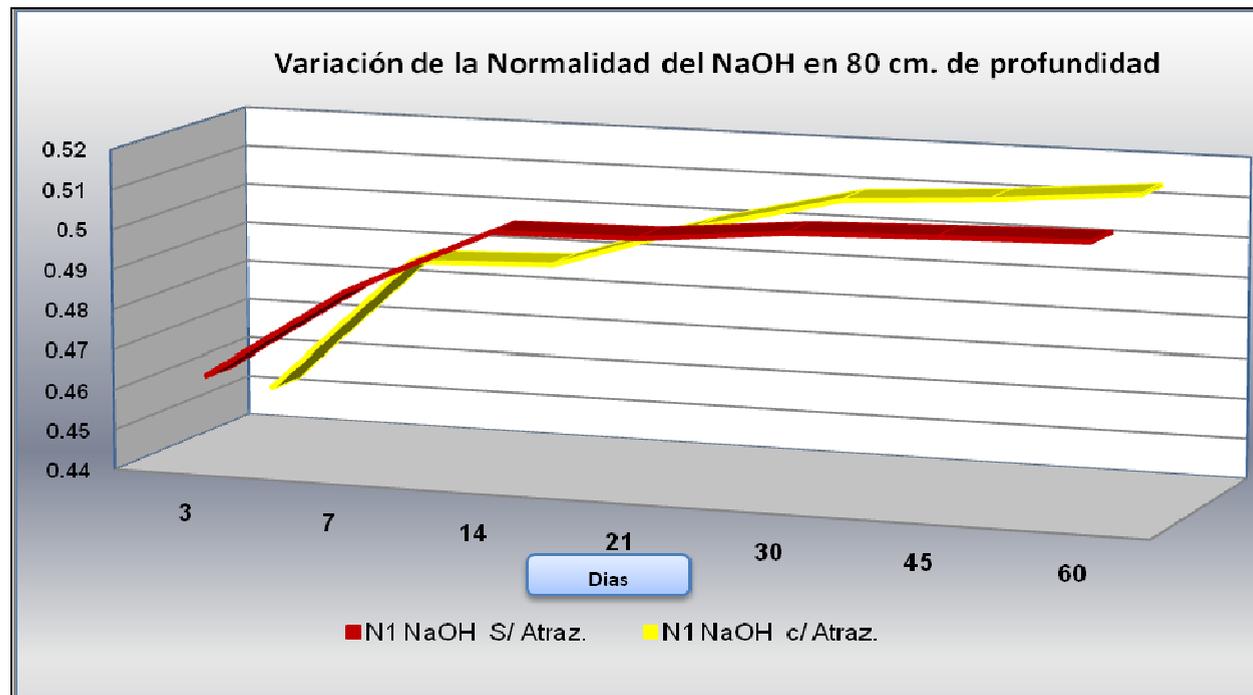


Figura 2.5 Normalidad del NaOH en suelo andosol 80 cm. s/Atraz.=Sin Atrazina,c/Atraz.=Con Atrazina



2.8.2 Variación de la Normalidad de NaOH en un suelo andosol 20 cm. en la incubación

En el caso del andosol en profundidad de 20 cm. definido en el Cuadro 2.6; las dos primeras columnas nos muestra los valores de las normalidades del NaOH en los diferentes tiempos en suelo con y sin atrazina. Para evaluar la respiración en las dos columnas restantes se observó la variación en la Normalidad del NaOH de un tiempo a otro en los suelos expuestos al herbicida y sin él.

TIEMPO (Días)	N ₁ NaOH Sin atrazina	N ₁ NaOH Con atrazina	ΔN NaOH Sin Atrazina	ΔN NaOH Con Atrazina
3	0.4744	0.4669	*****	*****
7	0.4827	0.4849	0.0083	0.0180
14	0.4982	0.4850	0.0155	0.0001
21	0.5008	0.5030	0.0026	0.0180
30	0.5063	0.5085	0.0055	0.0055
45	0.5073	0.5106	0.0010	0.0021
60	0.5093	0.5127	0.0020	0.0020

Cuadro 2.6 Normalidad del NaOH en suelo andosol 20 cm. N₁=Normalidad ; ΔN=Variación de la Normalidad

Estos cambios en la Normalidad del NaOH se observan mejor en la Figura 2.6; donde en suelos andosol con atrazina reflejan que la normalidad aumentó de forma importante comparado con suelos sin atrazina.

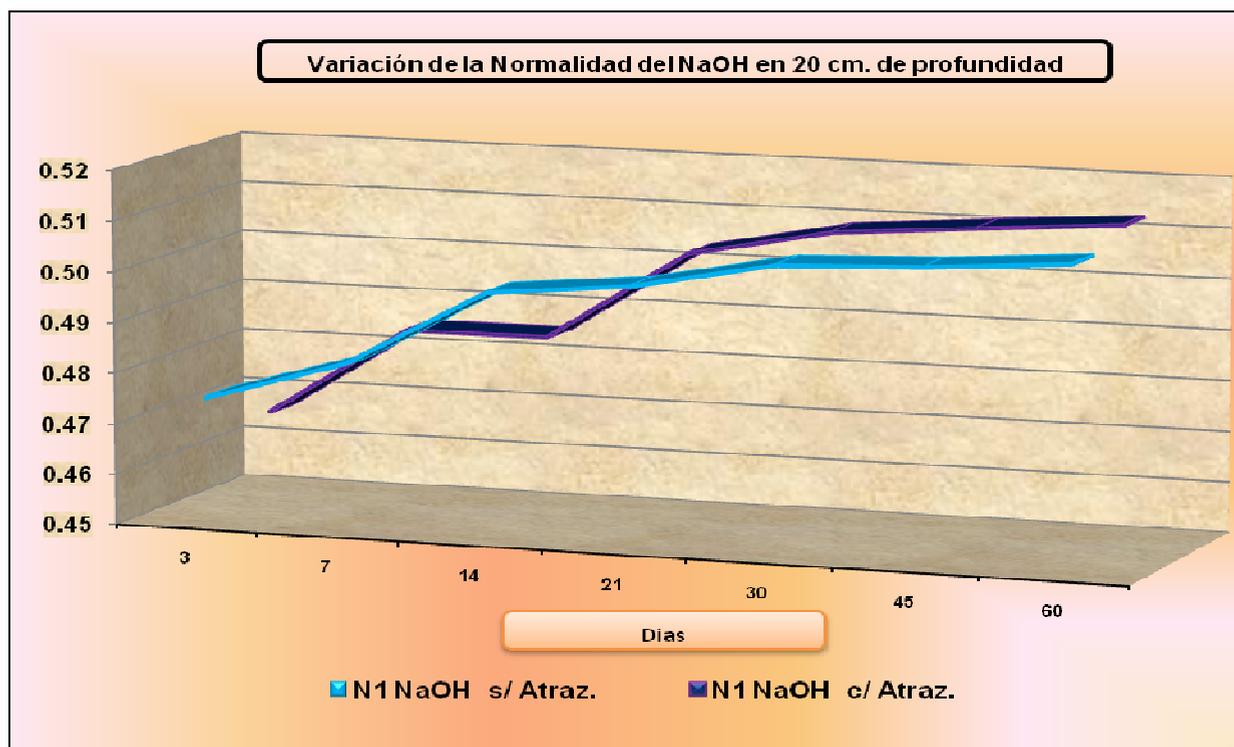


Figura 2.6 Normalidad del NaOH en suelo andosol 20 cm. s/Atraz.=Sin Atrazina, c/Atraz=Con atrazina



2.8.3 Condiciones en la respiración del suelo

En cada periodo de incubación se pesaron las cámaras para evaluar si se mantuvieron los pesos, es decir, si había variación en el contenido de humedad de los suelos. En caso de ser necesario, se agregó agua hasta lograr el nivel de humedad deseado. Cabe mencionar que la pérdida de humedad durante los periodos de incubación fue inevitable debido a que no era posible destapar las cámaras de respiración para ajustar el parámetro, entre periodos de incubación. El cuadro 2.7 muestra la pérdida de humedad en los diferentes tiempos de incubación. De forma grafica puede observarse en la Figura 2.7.

		TIEMPO					
SUELO	FRASCO	7	14	21	30	45	60
		17-Mar	24-Mar	31-Mar	09-Abr	24-Abr	09-May
ANDOSOL 20 cm-	A-20 (1)	462.0	461.6	461.1	460.3	459.4	459.0
	A-20 (2)	465.0	464.6	464.2	463.8	463.3	462.7
	A-20 (3)	465.8	465.6	465.3	464.6	464.0	463.4
	A-20 1A	463.4	463.1	462.9	462.4	461.7	461.2
	A-20 2A	462.7	462.3	462.0	461.6	461.0	460.5
	A-20 3A	464.5	464.1	463.8	463.1	462.5	462.0
ANDOSOL 80 cm.	A-80 (1)	473.7	473.5	472.4	472.0	471.4	470.7
	A-80 (2)	474.4	474.1	473.7	473.3	472.7	472.2
	A-80 (3)	473.2	472.9	472.6	472.0	471.5	470.7
	A-80 1A	475.0	474.6	474.2	473.7	473.1	472.6
	A-80 2A	472.9	472.4	472.0	471.7	471.5	471.2
	A-80 3A	475.8	475.2	475.0	474.8	474.2	473.4

NOTA El peso esta expresado en gramos

Cuadro 2.7 Peso de las cámaras de respiración en la incubación

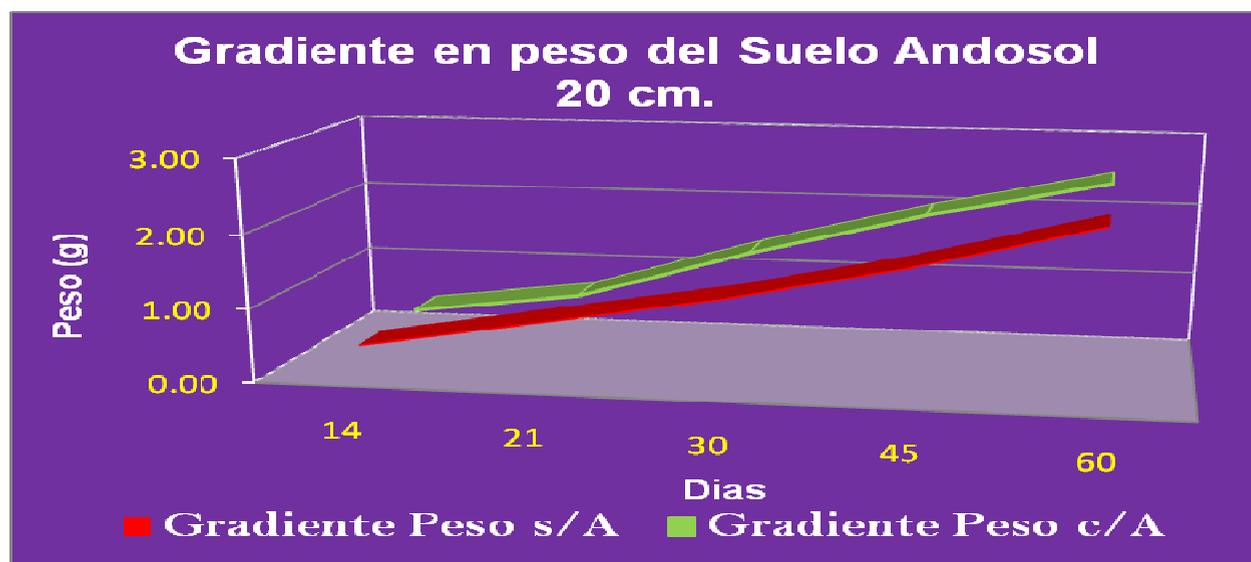


Figura 2.7 Variación en peso del suelo Andosol 20 cm. s/A= Sin atrazina; c/A=Con Atrazina

En el parámetro de la temperatura se mantuvo constante (25°C) en la evaluación de la respiración del suelo.



RESULTADOS Y DISCUSIÓN (CAPÍTULO III)

3.11.1 Selectividad.

Se hicieron inyecciones de soluciones obtenidas a partir de extractos de la matriz blanco (suelo). No se encontraron sustancias que interfirieran con los tiempos de retención del compuesto atrazina, siendo un método selectivo, debido a que no se observan inferencias en los cromatogramas.

En la Figura 3.8 se presenta un cromatograma obtenido a partir de un suelo sin adición de atrazina.

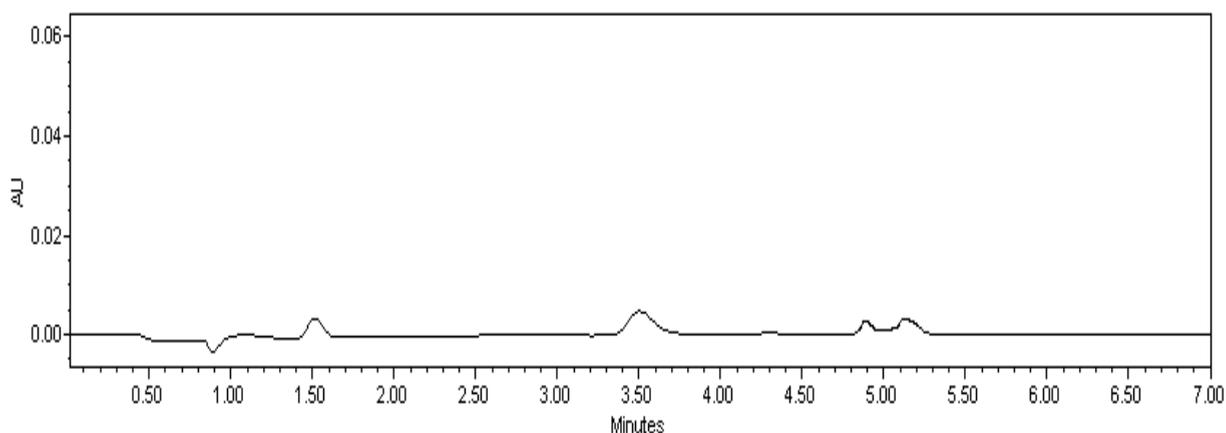


Figura 3.8 Cromatograma obtenido en suelo blanco donde demuestra no hay compuestos.

3.11.2 Exactitud (porcentajes de recuperación). El Cuadro 3.5 contiene valores del porcentaje de recuperación de atrazina y sus dos concentraciones distintas dentro del rango de la curva de calibración usada. Los porcentajes de recuperación para estos compuestos estuvieron entre el 89% al 98% para las concentraciones evaluadas, con coeficientes de variación entre 1.8% al 4.18 %.

Este porcentaje de recuperación es bajo y se debió a las propiedades del suelo de adsorber de forma irreversible al herbicida.

Sin embargo, se puede decir que el método de extracción y limpieza resultó adecuado para la determinación de los compuestos en el suelo andosol en profundidad de 20 cm., ya que se pudo extraer cantidades de los compuestos superiores a los límites de detección y cuantificación.

Parte del compuesto puede estar ligado a los componentes del suelo, por lo tanto con esta metodología solo puede determinarse la fracción “extraíble”, y que esta varía según sea el tipo de suelo. (Barriuso et al, 1992).



Repeticiones	ATRAZINA	
	1 mg/L	5 mg/L
1	98.64	89.13
2	98.90	86.23
3	95.89	94.87
4	95.10	94.16
5	93.74	92.28
6	96.40	86.51
7	96.74	95.57
8	98.63	86.41
9	97.79	89.32
10	95.40	94.48
S	1.74	3.80
X	96.72	90.90
C.V. (%)	1.80	4.18
n	10.00	10.00

Cuadro 3.5 Porcentajes de recuperación para la atrazina, a partir de muestras de suelo tratadas con este herbicida a dos concentraciones.

3.11.3 Precisión. Los coeficientes de variación que se obtuvieron al procesar muestras de suelo fortificadas con los compuestos a dos concentraciones, resultaron entre 1.57% y el 5.21% (Cuadro 3.6). Valores relativamente bajos si se tiene en cuenta que la matriz suelo tiene un alto grado de complejidad.

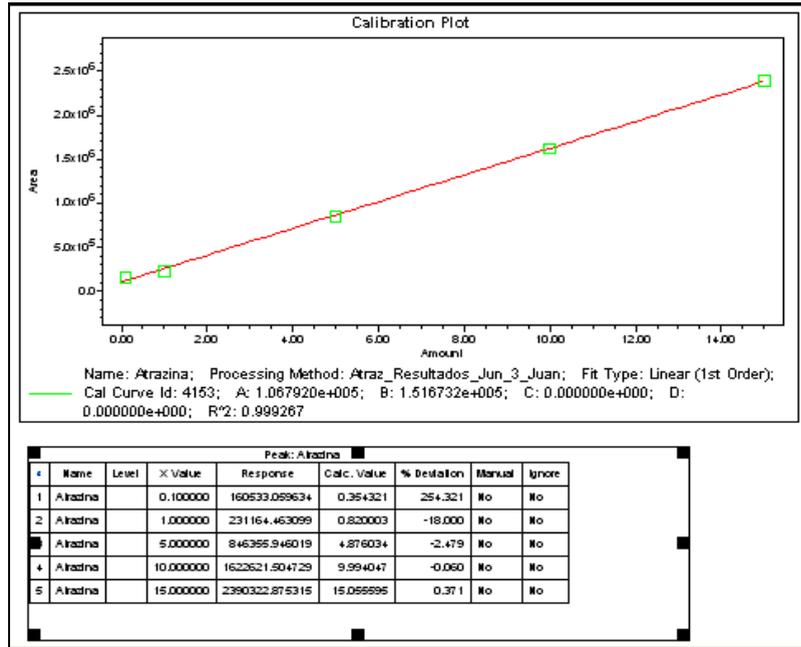
REPETICIONES	ATRAZINA	
	1 mg/L	5 mg/L
1	570869.90	2670847.98
2	559718.98	2593012.45
3	549026.34	2815309.53
4	549301.09	2893001.07
5	549202.87	2737549.64
6	549003.22	2604191.99
7	549169.14	2926396.87
8	537507.64	2499732.65
9	549662.18	2648658.07
10	549424.52	2837685.37
S	8651.70	141916.17
X	551288.59	2722638.56
C.V. (%)	1.57	5.21
n	10.00	10.00

Cuadro 3.6. Resultados obtenidos del análisis de las muestras fortificadas con atrazina.

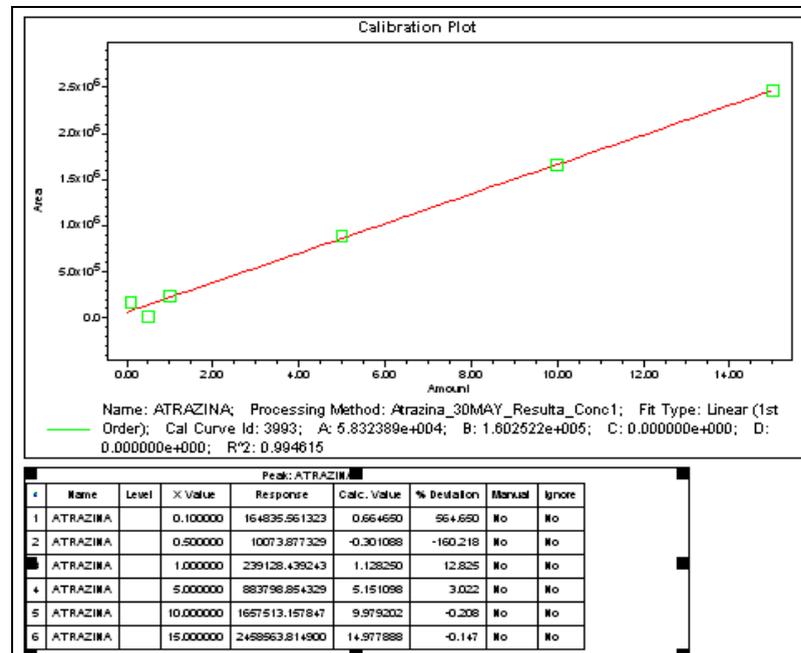


3.11.4 Robustez. En las Figuras 3.9 se observan las curvas de calibración obtenidas con estándares y con adición directa al compuesto atrazina a las muestras de suelo blanco. Los valores fueron similares generando un esquema de certeza, lo cual es bueno ya que el suelo andosol es una matriz compleja.

(I)



(II)



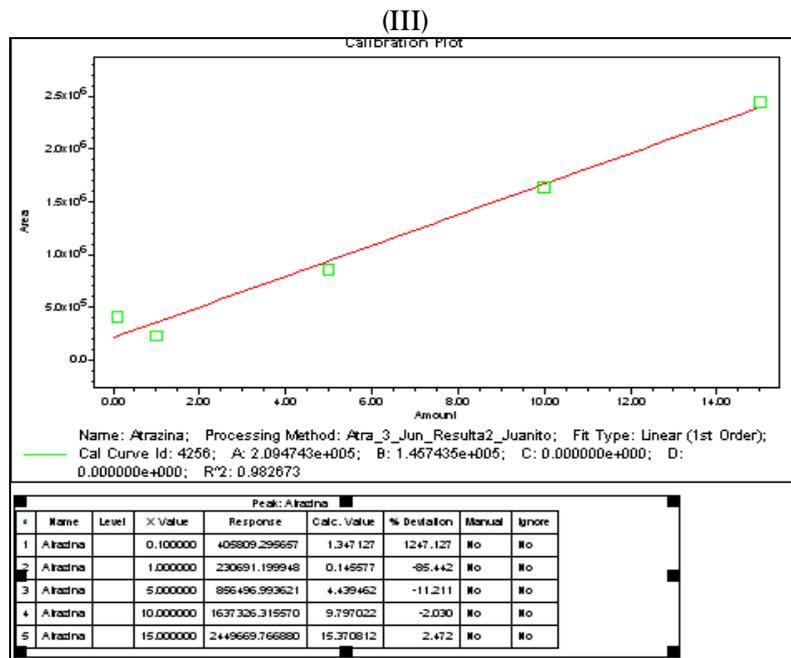


Figura 3.9 Curvas de calibración para atrazina. I) R= 0.998207, II) R=0.994615, III) R=0.982673.

Los cromatogramas que presentó el compuesto de interés (atrazina) en el tiempo de retención fue el esperado en las dos concentraciones (Ver Figuras 3.10 a y 3.10 b).

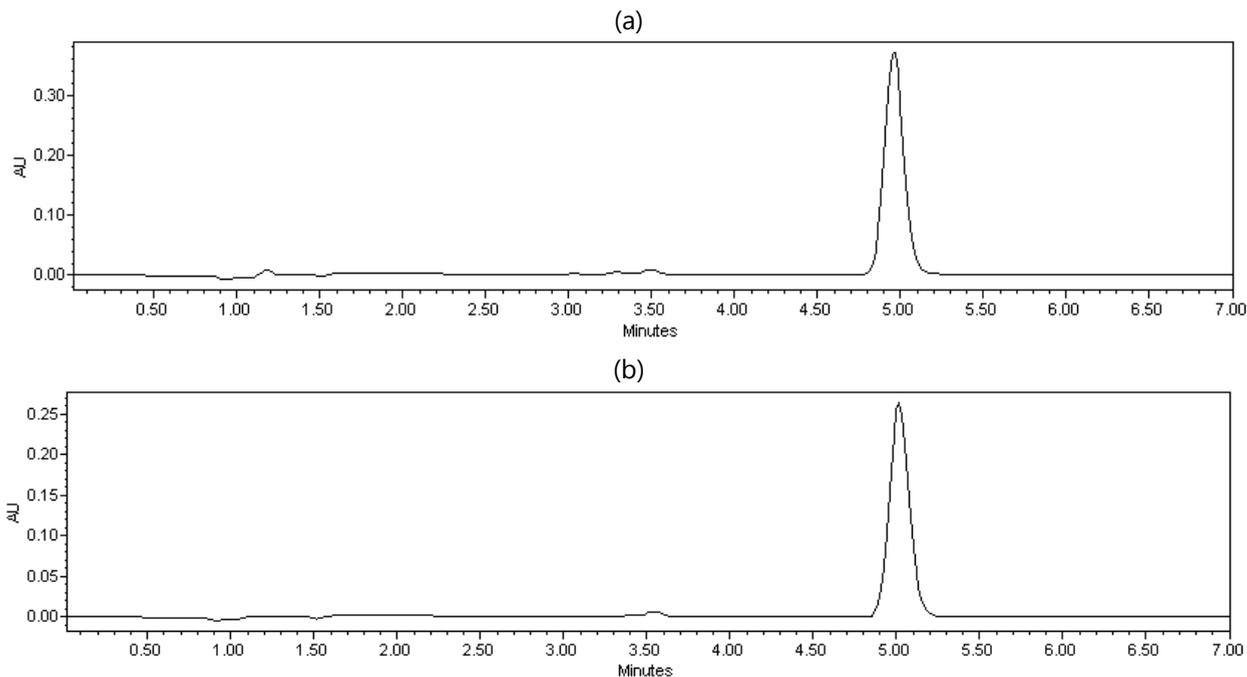


Figura 3.10 (a) Cromatograma de la muestra concentrada con 5mg/L de atrazina (b) Cromatograma de la muestra concentrada con 1 mg/L de atrazina.



3.12 Discusión

La determinación de humedad y composición de la solución de extracción mediante el pesaje son los parámetros más sensibles de la metodología, por lo que fue necesario seleccionar adecuadamente la balanza a utilizar en la validación del protocolo. Ello requirió que la precisión de los equipos con los cuales se cuantificaron los pesos de cada elemento en la validación fuera confiable.

Con base a los requisitos analíticos se evaluaron los parámetros en la validación del protocolo, identificando las condiciones adecuadas para cada etapa del proceso: acondicionamiento del cartucho, extracción y cuantificación de atrazina, donde se fue puliendo cada detalle garantizando la confiabilidad del método, de tal forma que cualquier persona con conocimientos en el área, al revisar y ejecutar el protocolo comprenda la metodología garantizando que la eficiencia sea un hecho si se cumplen los lineamientos que señala el protocolo.



RESULTADOS Y DISCUSIÓN (CAPÍTULO IV)

Se generó el interferograma para la atrazina natural, lo que nos permite identificar las bandas representativas de este herbicida y tomarlas como el patrón de referencia para identificarla en suelos andosol y vertisol (Figura 4.17).

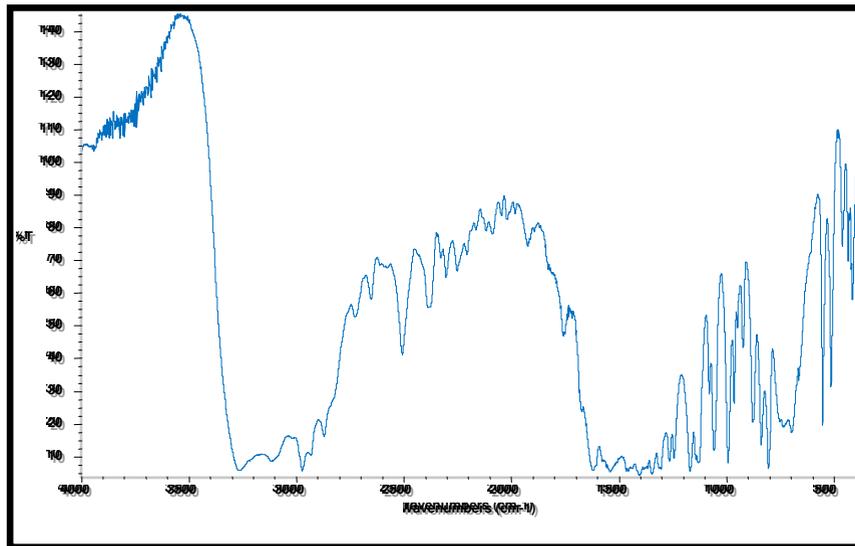


Figura 4.17 Interferograma de la atrazina en su forma natural

Al analizar la muestra de suelo con el herbicida se observó que las bandas se apreciaban mejor cuando la concentración de la atrazina es mayor (3mg/L); las bandas en la concentración menor resultaban demasiadas gruesas para la identificación de los puntos de interés.

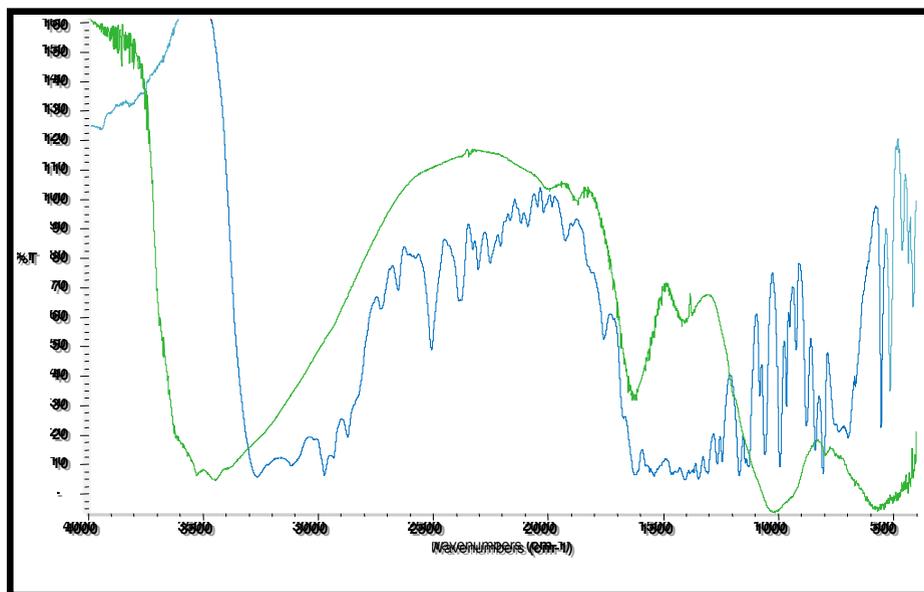


Figura 4.18 Comparativo del interferograma del suelo andosol 20 cm (3 mg/L de la solución madre de atrazina), con el de atrazina en su forma natural.



En las Figuras 4.18 a la 4.21 se muestran los interferogramas del suelo con la concentración más alta de atrazina utilizada sobre los cuales se empalma el interferograma de la atrazina en su forma natural.

Y esto se refleja en los dos tipos de suelo empleados en sus distintos horizontes, no se localiza una banda común que coincida con el interferograma de la atrazina natural.

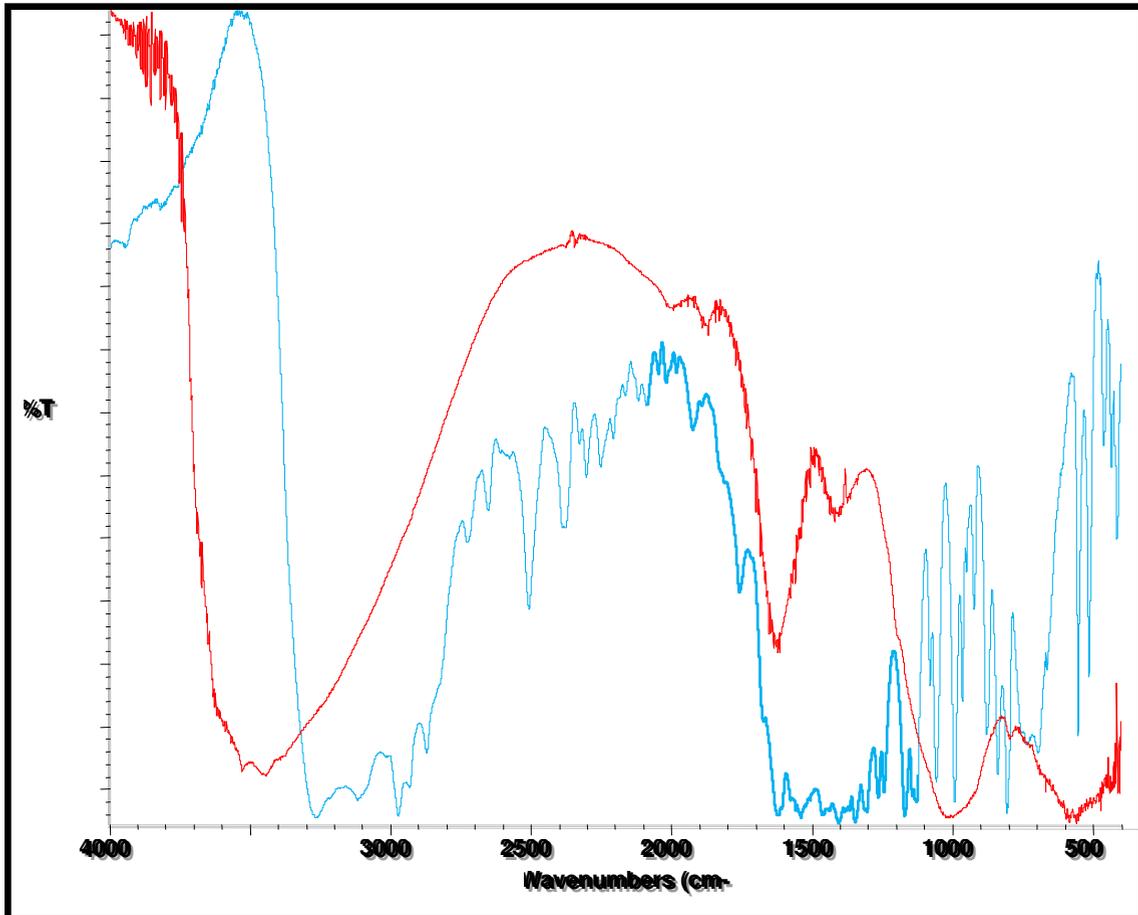


Figura 4.19 Comparativo del interferograma del suelo andosol 80 cm. (3 mg/L. de la solución madre de atrazina), con el de atrazina en su forma natural

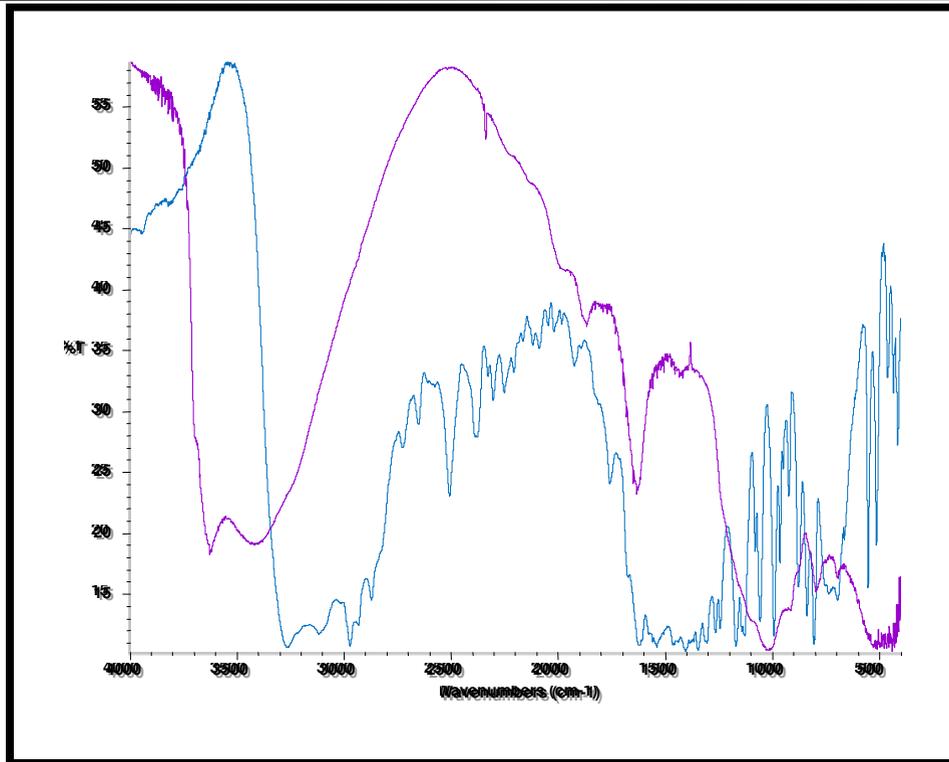


Figura 4.20 Comparativo del interferograma del suelo vertisol 30 cm. (3 mg/L. de la solución madre de atrazina), con el de atrazina en su forma natural

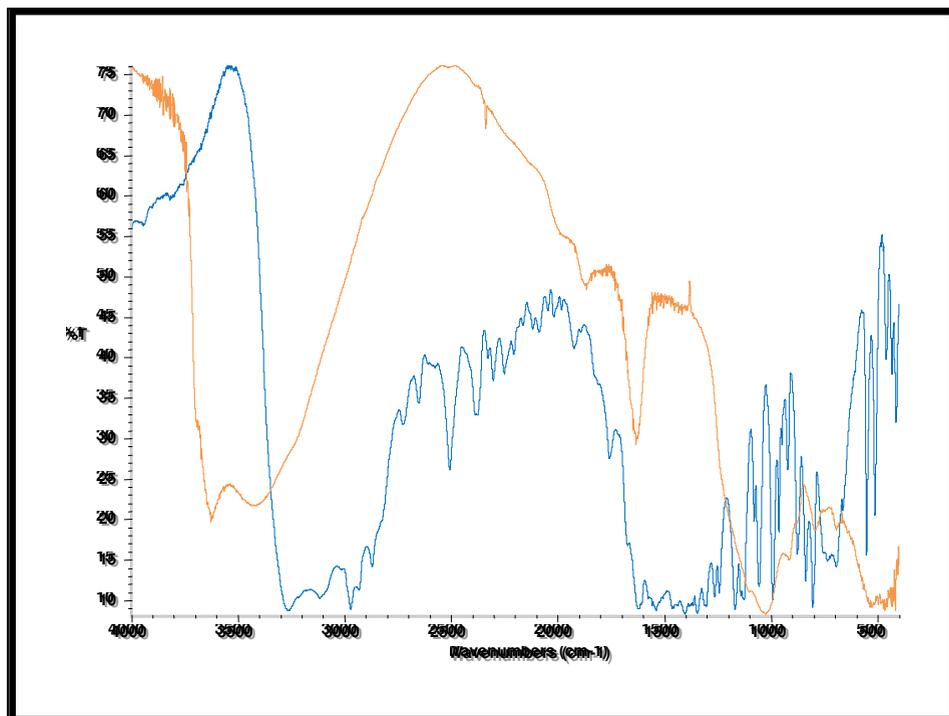


Figura 4.21 Comparativo del interferograma del suelo vertisol 90 cm. (3 mg/L. de la solución madre de atrazina), con el de atrazina en su forma natural



CONCLUSIONES

CAPÍTULO II

La respiración del suelo depende de varios factores: contenido y tipo de materia orgánica, contenido y tipo de arcilla, pH, y en el caso de este proyecto, la cantidad de atrazina aplicada.

Al evaluar la tasa de respiración del suelo en presencia de atrazina, se observó que la tasa de respiración es mayor comparada con el suelo sin atrazina, esto puede deberse a que los microorganismos responsables de la mineralización del suelo, utilizan la atrazina como fuente de carbono.

Los factores que se controlaron fueron la humedad y la temperatura. En el caso de la temperatura esta no varió durante el tiempo experimental (25°C) debido al buen funcionamiento de las incubadoras. En el caso de la humedad ésta fue controlada agregando agua en los casos en que fue necesario para lograr mantener el mismo nivel de agua del suelo durante todo el tiempo experimental. En los diferentes periodos en que se pesaron los frascos para evaluar este parámetro, se observó una mayor pérdida de humedad de los suelos con atrazina que se atribuye a la mayor tasa de respiración encontrada en estos suelos.

Al evaluar los suelos andosol con atrazina se demostró que el herbicida favorece la tasa de respiración del suelo aumentando la producción de CO₂.

Un análisis complementario de este estudio sería, evaluar los metabolitos de la atrazina generados en el proceso de mineralización, los cuales también implican un riesgo de contaminación del agua y de salud.

CAPÍTULO III

Después del trabajo de investigación desarrollado se encontró que se cumplen satisfactoriamente los parámetros de validación: selectividad, exactitud, precisión y robustez. Después de revisar cada etapa minuciosamente se escribieron los protocolos de los diferentes procesos a desarrollar, acatando los lineamientos requeridos. Los protocolos realizados son base esencial para sus futuras aplicaciones y se encuentran en el anexo C.



CAPÍTULO IV

Existen estudios mínimos en la identificación de atrazina en el Infrarrojo, debido a lo cual fue necesario definir los diferentes parámetros experimentales, así como los interferogramas del herbicida.

En el trabajo no se logró el objetivo de identificar los grupos funcionales de la materia orgánica del suelo asociados con el herbicida, sin embargo se obtuvo el interferograma de la atrazina en forma natural, que servirá como base para la identificación del herbicida mezclado con el suelo en la búsqueda de los grupos funcionales en investigaciones futuras.

De igual forma, se definió que la relación de 3 mg/l de atrazina en 10 gramos de suelo base seca, es la mínima a utilizar para la identificación del herbicida en el suelo mediante la técnica de IR.

Los factores que se identificaron como los más sensibles en el proceso de identificación de los grupos funcionales fueron la concentración del herbicida en el suelo, la retención de atrazina en estos suelos y la humedad presente en la preparación de las pastillas para su lectura en el espectroscopio IR.



Universidad Nacional Autónoma de México

ANEXOS

UNAM

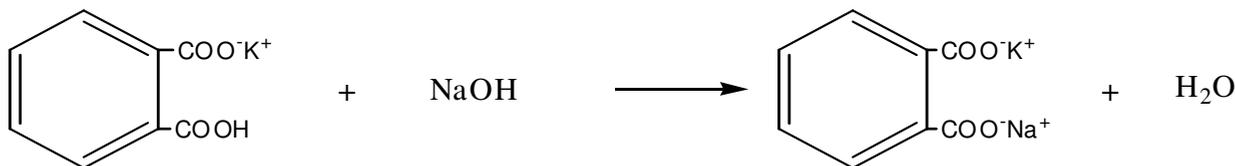


ANEXO A

Valoración ácido-base

Es el conjunto de operaciones realizadas en el laboratorio, tiene como finalidad el conocimiento de la concentración de una disolución de un ácido o una base (de concentración desconocida) con la ayuda de una disolución de una base o un ácido (de concentración conocida) o de un patrón primario, con ayuda de un indicador ácido-base.

El ftalato ácido de potasio es una de las sustancias patrón primario más utilizadas, la valoración de una disolución utilizando un patrón primario se realiza cuando el protón ácido de esta sustancia permite su reacción cuantitativa con sustancias que tengan propiedades básicas, como el hidróxido sódico



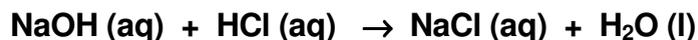
A través de un patrón primario se estandariza la base para conocer la concentración real de la base, el cual se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$N_{\text{NaOH}} = \frac{m * 1000}{V_{\text{gastado}} * P_{\text{equivalente}}}$$

N_{NaOH}	Normalidad de la sustancia a estandarizar
m	Masa del patrón primario expresada en g.
V_{gastado}	Volumen gastado de la base en mL.
$P_{\text{equivalente}}$	Peso equivalente en equivalente / litro

Valoración de un ácido fuerte con base fuerte

En una disolución una base fuerte (p. ej. NaOH). Si a esta le vamos añadiendo una disolución de un ácido fuerte (p. ej. HCl) de concentración conocida, se ira produciendo la reacción conocida como reacción de neutralización.



Se considera que una titulación de neutralización termina cuando el número de equivalentes del ácido es igual al número de equivalentes de la base, momento en el cual se alcanza el punto de equivalencia de la reacción.



Los métodos para la determinación de los puntos de equivalencia son el empleo de indicadores coloreados o el uso de un peachímetro para controlar el pH de la solución en función del volumen del titulante agregado como se muestra en la Figura A.1; que al llegar al punto de equivalencia toda la base se ha consumido prácticamente. Para evaluar la primera derivada, se promedia cada par de volúmenes, y se calcula el valor de $\Delta\text{pH}/\Delta V$, donde ΔpH es el cambio de pH entre dos lecturas consecutivas y ΔV es el cambio de volumen entre dos adiciones consecutivas. La evaluación de la segunda derivada es similar. El punto final, se corresponde en la primera derivada con el máximo de la curva obtenida, (Figura A.1), y en la segunda derivada el punto final se corresponde con el volumen de agente valorante en el que la curva se hace cero.

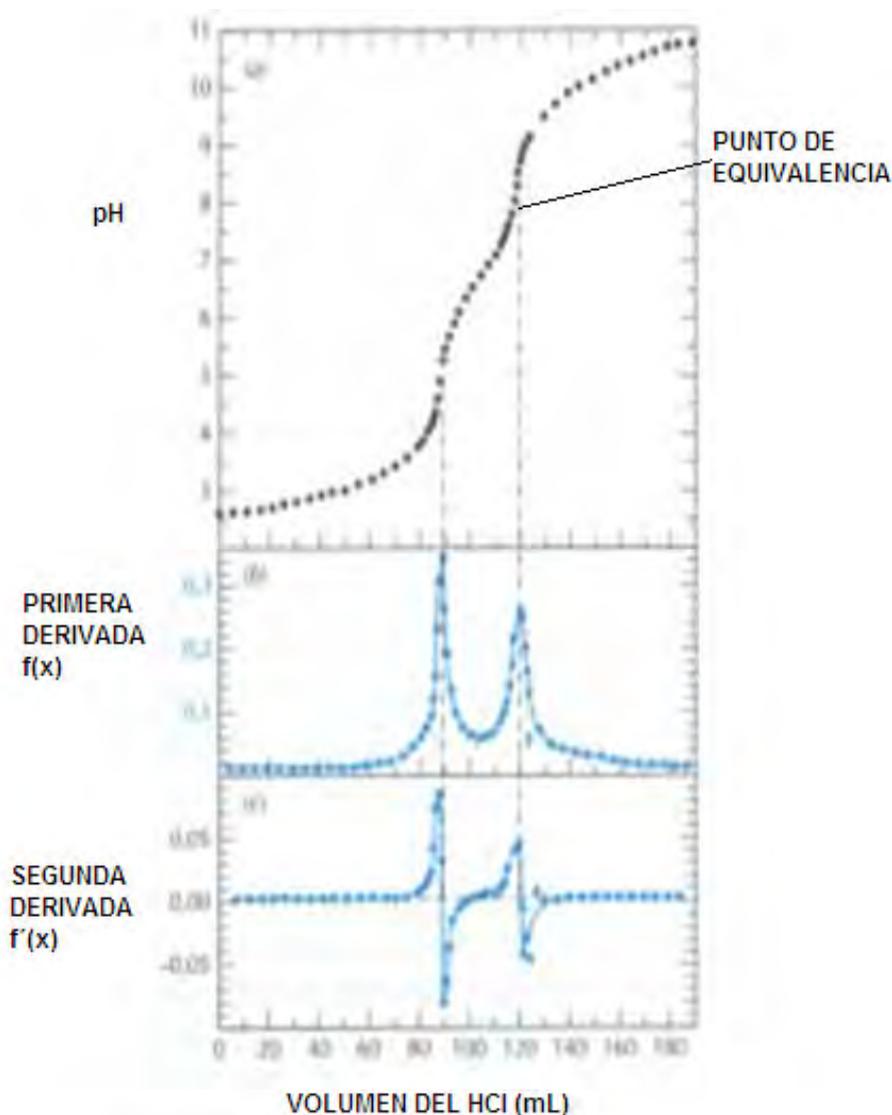


Figura A.1 Grafica que representa el pH de la solución en función del volumen del ácido, además el cálculo de la primera y segunda derivada en función de la variación diferencial del pH con respecto al volumen añadido de HCl.*Se realizó experimentalmente con el uso de un peachímetro.



Si consideramos que por cada OH^- añadido conocemos cuantos H_3O^+ se han consumido (a través de la estequiometría de la reacción), y además el número de H_3O^+ añadidos en el punto de equivalencia puede ser conocido porque conocemos la normalidad de la disolución ácida y el volumen añadido hasta llegar al punto de equivalencia (V_{eq}), tendremos los datos suficientes para calcular la normalidad inicial de la base. Despejando la Normalidad de la Base que se desconoce

$$N_{\text{NaOH}} = \frac{N_2 * V_2 \text{ HCl}}{V_1 \text{ NaOH}}$$

$N_1 \text{ NaOH}$	Normalidad de la sustancia que se desconoce
$N_2 \text{ HCl}$	Normalidad del ácido conocida
$V_2 \text{ HCl}$	Volumen gastado del ácido en ml.
$V_1 \text{ NaOH}$	Volumen de la alícuota en el matraz en ml.

Conociendo el cambio en la Normalidad del NaOH conoceremos la tasa de respiración. Al llevar a cabo esta evaluación en suelo con herbicida y sin él; al compararlos observaremos el efecto que tiene la atrazina en la mineralización.



ANEXO B

Parámetros de Validación

Selectividad

Confirmación de la identidad y selectividad/especificidad - Referencia Rápida			
Qué hacer	Cuántas veces	Calcule / determine	Comentarios
Analice muestras y materiales de referencia mediante un método candidato y otros métodos independientes	1	Use los resultados de las técnicas confirmatorias para asegurar la capacidad del método para confirmar la identidad del analito y la capacidad para medirlo libre de otras interferencias.	Decidir que tanta evidencia de soporte se requiere razonablemente para dar suficiente confiabilidad.
Analice muestras que contengan varias interferencias sospechadas en presencia del analito de interés	1	Examine el efecto de las interferencias -¿La presencia de las interferencias incrementa o inhibe la detección o cuantificación del mensurando?	Si la detección o cuantificación se inhibe por las interferencias, se requerirá un desarrollo complementario del método.

Selectividad (CENAM. 2003)

Precisión

Precisión de Repetibilidad y Precisión de Reproducibilidad- Referencia Rápida			
Analizar	Repeticiones (independiente)	Qué calcular a partir de los datos	Comentarios
Patrones, materiales de referencia o blanco de muestra fortificados a varias concentraciones en el intervalo de trabajo.			
a) Mismo analista, equipo y laboratorio, en un período de tiempo corto	10	Determinar la desviación estándar (s) a cada concentración	Determina la desviación estándar de repetibilidad a cada concentración.
b) Diferente analista y equipo, mismo laboratorio, período de tiempo prolongado	10	Determinar la desviación estándar (s) a cada concentración	Determina la desviación estándar de reproducibilidad dentro del laboratorio a cada concentración
c) Diferentes analistas, equipos y laboratorios, en período de tiempo prolongado	10	Determinar la desviación estándar (s) a cada concentración	Determina la desviación estándar de reproducibilidad entre laboratorios a cada concentración
			Requiere de un estudio de colaboración

Precisión (CENAM, 2003)



Exactitud

Exactitud y Veracidad - Referencia Rápida			
Analizar	No. de veces	Cálculos	Comentarios
a) El blanco reactivo y el material de referencia usando el método candidato	10	Al valor medio del analito en el material de referencia, restarle el valor medio del blanco. Comparar con el valor verdadero o verdadero aceptado, del material de referencia Da una medida del sesgo del método.	Sujeto a la incertidumbre de que el blanco es un blanco verdadero y de la caracterización del material de referencia.
b) El blanco reactivo y el material de referencia/material de prueba usando el método candidato y un método independiente. (preferentemente un método primario).	10	Al valor medio del analito en el material de referencia/material de prueba, restarle el valor medio del blanco. Comparar con mediciones similares realizadas con un método independiente / método primario. Da una medida del sesgo del método relativo al método independiente/primario.	El método independiente puede tener sesgos por sí mismo, de aquí, no se tiene una medida absoluta de la exactitud. El método primario idealmente no tiene sesgo por lo que es una mejor medida de la exactitud.

Exactitud (CENAM, 2003)

Robustez

Pruebas de Robustez – Referencia Rápida			
Analizar	No. de veces	Calcular	Comentarios
Identificar las variables que pueden tener un efecto significativo en el desempeño del método. Establecer experimentos (analizando materiales de referencia, muestras de composición conocida o materiales de referencia certificados) para observar el efecto sobre la exactitud y la precisión de variables que se van cambiando sistemáticamente	Analizar una vez cada serie de condiciones experimentales	Determinar el efecto de cada cambio de condiciones sobre la media Clasificar las variables en orden de mayor a menor efecto sobre el desempeño del método.	Diseñar el control de calidad para controlar las variables críticas. Concentrarse en estas variables para mejorar el método.

Robustez (CENAM, 2003)



ANEXO C: PROTOCOLOS

	PROTOCOLO A PREPARACIÓN DE SOLUCIONES	FECHA DE EMISIÓN: 01-04-08
		REVISIÓN : 3
		FECHA DE REVISION: 02-04-08
EDAFOLOGIA	LABORATORIO DE FERTILIDAD DE SUELOS	PAGINA 1 DE 3

1. OBJETIVO

Definir en la técnica de extracción de atrazina en fase sólida el procedimiento para la preparación de todas las sustancias utilizadas en la metodología.

2. CAMPO DE APLICACIÓN Y ALCANCE

El método es aplicable en la extracción y determinación de atrazina para su cuantificación en el HPLC. Tener un protocolo de preparación de soluciones garantiza que los reactivos para la extracción sean confiables y evitar que se generen incertidumbre en los resultados.

3. FUNDAMENTO

- Formar un protocolo de preparación de soluciones permite estandarizar su preparación y eliminar incertidumbres.
- Evitar la contaminación de los reactivos

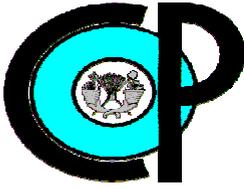
4. TERMINOLOGÍA

HPLC: Cromatografía Líquida de Alta Resolución

5. MATERIALES

- 5.1.1 Probeta de 250 y 500 mL
- 5.1.2 Matraz aforado de 10 mL
- 5.1.3 Espátula
- 5.1.4 Pissetas
- 5.1.5 Pipetas Pasteur de 3 mL
- 5.1.6 Pipeta Volumétrica de 1 y 3 mL
- 5.1.7 Viales de 2 mL
- 5.1.8 Jeringas
- 5.1.9 Acrodiscos (Filtros).
- 5.1.10 Frascos de vidrio ámbar con tapadera de teflón de 20 y 50 mL
- 5.1.11 Embudos de Filtración



	PROCOLO A PREPARACIÓN DE SOLUCIONES	FECHA DE EMISIÓN: 01-04-08
		REVISIÓN : 3
		FECHA DE REVISION: 02-04-08
EDAFOLOGIA	LABORATORIO DE FERTILIDAD DE SUELOS	PAGINA 2 DE 3

5.2 REACTIVOS

- 5.2.1 Acetonitrilo grado HPLC
- 5.2.3 Metanol grado HPLC (CH₃-OH)
- 5.2.4 Agua desionizada (Calidad MilliQ-Water)*
- 5.2.5 Atrazina Pureza 98.1 %.

***NOTA:** El H₂O a utilizar en la preparación de soluciones es en su totalidad Calidad MilliQ-Water.

5.3 EQUIPOS

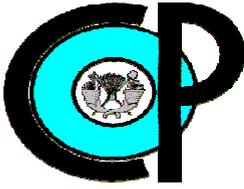
- 5.3.2 Refrigerador para almacenar estándares.
- 5.3.4 Campana con extractor para orgánicos
- 5.3.5 Balanza analítica.
- 5.3.6 Agitador Vortex Automático
- 5.3.7 Sonicador
- 5.3.9 Bomba de vacío.
- 5.3.10 Equipo Purificador de Agua Calidad MilliQ-Water

6.0 PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

6.1 PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN MADRE DE ATRAZINA

- a) Realizar los cálculos para determinar la cantidad de atrazina a pesar, considerar la pureza de la sustancia la cual esta indicada en el frasco contenedor. Se recomienda preparar una solución de concentración 100 ppm. como solución madre.
- b) Pesar en una balanza analítica 0.01019 g de atrazina 98.1% pureza, utilizar un cucharón. Al pesar la atrazina tener precaución para ser lo mas exacto posible
- c) Utilizando una piseta, se lava el cucharón con CH₃-OH lentamente y se vierte directamente en e matraz volumétrico de 100 mL. Al lavar el cucharón con metanol, es importante evitar que se derrame la atrazina
- d) Aforar a 100 ml con CH₃-OH. Se agita la solución par disolver en su totalidad el reactivo.
- e) Se coloca la solución en frascos ámbar, y se cierra por completo. Etiquetar los frascos donde se vació la solución, indicando su concentración, fecha de preparación y de caducidad, nombre del analista que lo prepara.
- f) Se conservan los frascos a una temperatura de -5.0°C en el congelador.



	PROTOCOLO A PREPARACIÓN DE SOLUCIONES	FECHA DE EMISIÓN: 01-04-08
		REVISIÓN : 3
		FECHA DE REVISION: 02-04-08
EDAFOLOGIA	LABORATORIO DE FERTILIDAD DE SUELOS	PAGINA 3 DE 3

6.2 PREPARACION DE ESTANDARES PARA EL HPLC

A partir de la Solución Madre que contiene una concentración de 100 mg/L se preparan los estándares partiendo de la siguiente fórmula:

$$C_1 V_1 = C_2 V_2$$

Donde:

C_1 =Concentración del estándar a preparar (mg/L)

V_1 =Volumen de solución de concentración C_1 a preparar.

C_2 =Concentración de la solución madre (mg/L).

V_2 =Volumen de la solución madre a agregar (mL).

- Calcular el volumen de la solución madre a utilizar, colocarlo en un matraz aforado de volumen V_1 , y completar el volumen con CH_3-OH (Estándares desde 10, 5, 1, 0.5, 0,1, 0,05 y 0.025 mg/L). Los estándares menores a 0,1 mg/L deben ser preparados justo antes de su utilización, o bien, con 24 horas máximo de anticipación y conservados en congelación hasta antes de su uso.
- Utilizando una jeringa de 1.0 mL las soluciones se hacen pasar por el acrodisco con el objetivo de eliminar impurezas y conservar la vida útil de la columna del HPLC.
- Vaciar el contenido de la jeringa después de hacerla pasar por el acrodisco en un vial de 2 mL para su lectura en el HPLC.
- Preparar un vial con CH_3-OH siguiendo los incisos anteriores como base del HPLC.

6.3 PREPARACION DE LOS SOLVENTES PREVIO A UTILIZARSE EN EL HPLC

- Enjuagar el equipo de filtración haciendo pasar 40 mL del CH_3-OH .
- Proceder a la filtración (Matraz + Embudo de Filtración) del solvente orgánico mediante una bomba de succión, ir filtrando el volumen de 400 mL que es la capacidad del equipo de filtración. Para los solventes orgánicos se utiliza el mismo filtro. En el caso del H_2O se requiere el colocar un nuevo filtro.
- Colocar los frascos con solventes retirando la tapa en el sonicador por 5 minutos que previamente se llena con H_2O . Las ondas que emite el sonicador son dañinas, no es recomendable su uso en mujeres embarazadas
- Se seguirá el mismo procedimiento para todos los solventes, orgánicos e inorgánicos. Al tener estos solventes filtrados se toman 210 mL de Acetonitrilo en una probeta de 300 ml. Se colocan en un matraz de 1000 mL. Para cumplir la relación se agregan 90 mL. de agua que se mezclan con la solución de Acetonitrilo. Para cumplir la relación de Acetonitrilo-Agua (70-30).



	PROCOLO B TAMIZADO DEL SUELO	FECHA DE EMISIÓN: 01-04-08
		REVISIÓN : 3
		FECHA DE REVISION: 02-04-08
EDAFOLOGIA	LABORATORIO DE FERTILIDAD DE SUELOS	PAGINA 1 DE 1

1. OBJETIVO

Establecer el procedimiento para la operación unitaria del tamizado

2. CAMPO DE APLICACIÓN Y ALCANCE

La homogeneización de materiales sólidos garantiza que sus propiedades físicas y químicas no se vean alteradas en su estudio. La fracción que retiene el tamiz dependerá de la textura que se desea obtener.

3. FUNDAMENTO

El tamiz consiste es una superficie con perforaciones uniformes por donde pasa parte del material y el resto es retenido. La operación de tamizado se lleva a cabo con la vibración del tamiz para permitir que el material más fino traspase la malla.

Del tamiz se obtienen dos fracciones: los gruesos y los finos, la nomenclatura para la malla 100 por ejemplo, + 100 indica los gruesos y -100 indica los finos. Si de un producto se requieren N fracciones (clasificaciones), se requerirán N-1 tamices.

4. MATERIALES

4.1.1 Tamiz Malla 10 (2 mm.)

4.1.2 Contenedor

4.2 REACTIVOS

4.2.1 Muestra de Suelo

5. TAMIZADO DE LA MUESTRA

- Homogenizar el suelo para garantizar que sus propiedades sean uniformes.
- Tamizar el suelo colectado en la región de estudio, en un tamiz malla 10 (2 mm.) Se utiliza la malla 10 principalmente en muestras de suelo.
- Al pasar por el tamiz, el suelo se coloca en un recipiente. Evitar derramar muestras del suelo. No se derrama el suelo ya que existen una gama de compuestos que para su análisis resultan importantes.



	PROTOCOLO C DETERMINACIÓN DE LA HUMEDAD GRAVIMÉTRICA DEL SUELO	FECHA DE EMISIÓN: 01-04-08
		REVISIÓN : 3
		FECHA DE REVISION: 02-04-08
EDAFOLOGIA	LABORATORIO DE FERTILIDAD DE SUELOS	PAGINA 1 DE 2

1. OBJETIVO

Establecer el procedimiento para la determinación de la humedad gravimétrica del suelo.

2. CAMPO DE APLICACIÓN Y ALCANCE

El contenido de humedad del suelo es determinante de diversos procesos físicos, químicos y biológicos. Antes de realizar un análisis, es necesario conocer el contenido de humedad del suelo.

El método es aplicable para todos los análisis que requieran la información del contenido de humedad gravimétrica del suelo.

3. FUNDAMENTO

La humedad del suelo es la cantidad de agua por volumen de suelo que hay en un terreno, su medición exacta se realiza gravimétricamente, pesando una muestra de suelo antes y después del secado. Para suelos salinos o muy áridos, se emplea experimentalmente métodos analíticos sofisticados que permitan medir la humedad del suelo sin que le afecten las características del mismo.

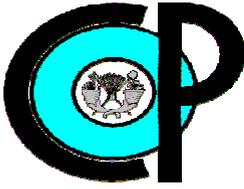
4. MATERIALES

- 4.1.1 Botes de Aluminio
- 4.1.2 Espátulas
- 4.1.3 Pinzas de crisol

4.2 REACTIVOS

- 4.2.1 Muestra de Suelo



	PROTOCOLO C DETERMINACIÓN DE LA HUMEDAD GRAVIMETRICA DEL SUELO	FECHA DE EMISIÓN: 01-04-08
		REVISIÓN : 3
		FECHA DE REVISION: 02-04-08
EDAFOLOGIA	LABORATORIO DE FERTILIDAD DE SUELOS	PAGINA 2 DE 2

4.3 EQUIPOS

4.3.1 Estufa

4.3.2 Balanza Analítica

5. HUMEDAD DEL SUELO

- Se pesan los botes de Aluminio, considerando tres por muestra de suelo
- En cada bote de aluminio se pesan 5 g. de cada muestra de suelo. Registra el peso del bote vacío y con suelo húmedo (S_H).
- Colocar los botes en la estufa a una temperatura de 105°C por 24 horas. La estufa debe de estar a temperatura constante ($T=105^\circ\text{C}$),
- Transcurridas las 24 horas, pesar los botes y registrar el peso. Realizar los cálculos para determinar la humedad de cada suelo, utilizando la ecuación siguiente:

$$\%H_{aps} = \frac{S_H - S_s}{S_s} * 100$$

Donde:

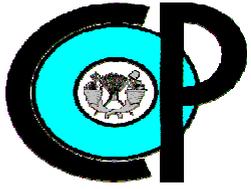
$\%H_{aps}$ = Porcentaje de humedad en base en peso seco.

S_H = Suelo húmedo (g)

S_s = Suelo seco (g)

Nota: El andosol es un suelo con alta capacidad de retención de humedad, por lo que se recomienda conservarlo en la estufa por lo menos 48 horas, o el tiempo que sea necesaria hasta alcanzar un peso constante



	PROTOCOLO D EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA (EFS) DE ATRAZINA EN SUELO ANDOSOL	FECHA DE EMISIÓN: 01-04-08
		REVISIÓN: 3
		FECHA DE REVISION: 02-04-08
EDAFOLOGIA	LABORATORIO DE FERTILIDAD DE SUELOS	PAGINA 1 DE 5

1. OBJETIVO

Establecer el Protocolo de extracción de atrazina en suelos mediante la técnica de extracción en fase sólida (EFS)

2. CAMPO DE APLICACIÓN Y ALCANCE

El método es aplicable a muestras de suelo y agua.

La extracción de atrazina del suelo es necesaria para cuantificarla e identificar su retención en el suelo.

3. FUNDAMENTO

- La fase sólida contiene grupos activos ligados covalentemente.
- Componentes de la muestra se unen por interacciones débiles.

4. TERMINOLOGÍA

HPLC: Cromatografía Líquida de Alta Resolución
N.: Normalidad (Nº equivalentes/ Litro de solución)
C₁₈: Cartuchos de Extracción en Fase Sólida

5. MATERIALES

- 5.1.1 Matraces Erlenmeyer de 250 mL.
- 5.1.2 Matraz aforado de 100 mL.
- 5.1.3 Envases de vidrio ámbar de 150 mL.
- 5.1.4 Vaso de precipitados de 100 y 250 mL.
- 5.1.5 Espátulas
- 5.1.6 Pissetas
- 5.1.7 Pipetas Pasteur de 3 mL.
- 5.1.8 Pipeta Volumétrica de 2 mL.
- 5.1.9 Probeta de 10, 50, 100 y 500 mL.
- 5.1.10 Parafilm



	PROTOCOLO D EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA (EFS) DE ATRAZINA EN SUELO ANDOSOL	FECHA DE EMISIÓN: 01-04-08
		REVISIÓN: 3
		FECHA DE REVISION: 02-04-08
EDAFOLOGIA	LABORATORIO DE FERTILIDAD DE SUELOS	PAGINA 2 DE 5

- 5.1.11 Viales de 2 mL.
- 5.1.12 Jeringas
- 5.1.13 Acrodiscos (Filtros).
- 5.1.14 Envases de vidrio ámbar de 50 mL.
- 5.1.15 Cartuchos de Extracción en Fase Sólida (C18 E)
- 5.1.16 Embudos de Filtración
- 5.1.17 Filtros
- 5.1.18 Caja de vacío
- 5.1.19 Gradilla
- 5.1.20 Tubos de vidrio

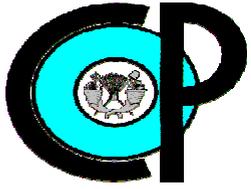
5.2 REACTIVOS

- 5.2.1 Acetonitrilo grado HPLC
- 5.2.2 Acetonitrilo-Agua (70:30)
- 5.2.3 Metanol grado HPLC (CH₃-OH)
- 5.2.4 Agua desionizada (Calidad MilliQ-Water)*
- 5.2.5 Atrazina Pureza 98.1 %.
- 5.2.6 Nitrógeno N₂

5.3 EQUIPOS

- 5.3.1 HPLC
- 5.3.2 Refrigerador para almacenar estándares.
- 5.3.3 Refrigerador para almacenar muestras.
- 5.3.4 Campana con extractor para orgánicos
- 5.3.5 Balanza analítica.
- 5.3.6 Agitador Rotatorio.
- 5.3.7 Sonicador
- 5.3.8 Detector UV
- 5.3.9 Bomba de vacío.
- 5.3.10 Equipo Purificador de Agua Calidad MilliQ-Water



	PROTOCOLO D EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA (EFS) DE ATRAZINA EN SUELO ANDOSOL	FECHA DE EMISIÓN: 01-04-08
		REVISIÓN: 3
		FECHA DE REVISION: 02-04-08
EDAFOLOGIA	LABORATORIO DE FERTILIDAD DE SUELOS	PAGINA 3 DE 5

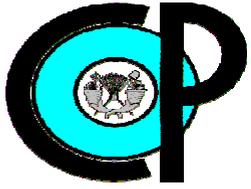
5.4 DIAGRAMA DE BLOQUES



6.0 EXTRACCIÓN DE ATRAZINA DEL SUELO

1. Pesar los matraces Erlenmeyer de 250 mL. con tapadera de rosca; es importante contar con esta información en caso de ser necesaria, si se tiene incertidumbre al pesar la muestra del suelo durante el proceso.
2. En un Matraz Erlenmeyer de 250 mL. con tapadera de rosca; coloque 50 g de cada muestra de suelo en peso seco. Conociendo la humedad del suelo, efectuar los cálculos para determinar la cantidad de agua que lleva y si es necesario, completar el volumen a 30 mL (para cumplir la relación 30:70 en H₂O-CH₃OH).
3. Adicionar 70 mL. de metanol (cumpliendo la relación 70: 30). En caso de que el contenido de H₂O en el suelo sea mayor a 30 mL; hacer los cálculos para determinar el volumen de CH₃-OH a agregar para cumplir la relación 70: 30. La densidad del H₂O es de 1.000 g/mL, la densidad del CH₃-OH es de 0.792 g/mL.
4. Agregar el volumen de solución madre necesario para lograr la concentración de atrazina deseada (mg/L) para enriquecer el suelo en atrazina.
5. Cerrar los matraces, colocarlos en un agitador orbital durante 1 hora a 230 rpm
6. Dejar en reposo al menos una hora, o hasta que se tenga una separación clara entre el decantado y el sobrenadante



	PROTOCOLO D EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA (EFS) DE ATRAZINA EN SUELO ANDOSOL	FECHA DE EMISIÓN: 01-04-08
		REVISIÓN: 3
		FECHA DE REVISION: 02-04-08
EDAFOLOGIA	LABORATORIO DE FERTILIDAD DE SUELOS	PAGINA 4 DE 5

7.0 ACONDICIONAMIENTO DE LA COLUMNA DE EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA

1. Coloque los cartuchos en las posiciones respectivas de la caja de vacío. Añada aproximadamente 2 mL. de metanol a cada columna, y con la ayuda de la bomba haga pasar el metanol, de modo que el goteo de paso sea lento. Hágalo dos veces sin permitir que el cartucho se seque.
2. Haga pasar un total de 4 mL de agua con calidad HPLC MilliQ-Water en el mismo cartucho cuidando de que sea también muy lentamente. No permita que el cartucho quede seco. Si esto ocurre, deberá empezar el acondicionamiento de nuevo.

8.0 LIMPIEZA DEL FILTRADO POR EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA (EFS)

1. Con el uso de una pipeta Pasteur extraer 5 g. del sobrenadante obtenido en el *Protocolo D N° 6.0: Extracción de atrazina del suelo en el Paso N° 6*; cuidando de no remover el suelo, se almacena en un frasco ámbar de vidrio de 50 mL. el cual ha sido previamente pesado, etiquetando con el N°1.
2. Del mismo frasco, extraer una segunda muestra de 5 g. de sobrenadante y se coloca en el frasco etiquetado con el N° 2.
3. Adicionar H₂O en una proporción H₂O:sobrenadante 9:1 en el frasco N° 1 y 2 que contiene el sobrenadante; es decir, 5 g. de sobrenadante, adicione 45 g. de H₂O.
4. Agitar el frasco manualmente durante unos instantes.
5. Se conectan los capilares a los cartuchos y se colocan en cada frasco con la solución con sobrenadante. Se debe etiquetar cada cartucho con la misma etiqueta del frasco que contiene la solución con sobrenadante. Se abre la válvula del cartucho (Figura D.1).
6. Se acciona la bomba de succión para que el sobrenadante fluya por el capilar y la atrazina quede atrapada en el cartucho de extracción en fase sólida previamente acondicionados (*Ver protocolo D N°7: Acondicionamiento de la columna de extracción en fase sólida Paso 2*). La presión de succión de la bomba esta entre 5 a 10 Kpa. de modo que se provoque un goteo lento al hacer pasar la solución con sobrenadante por la columna de extracción en fase sólida
7. Cuando termine por pasar en su totalidad la solución con sobrenadante por el capilar, se colocan 2 mL de H₂O en el frasco afín de enjuagarlo y extraer por completo los residuos contenidos de sobrenadante y de los capilares.



	PROCOLO D EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA (EFS) DE ATRAZINA EN SUELO ANDOSOL	FECHA DE EMISIÓN: 01-04-08
		REVISIÓN: 3
		FECHA DE REVISION: 02-04-08
EDAFOLOGIA	LABORATORIO DE FERTILIDAD DE SUELOS	PAGINA 5 DE 5

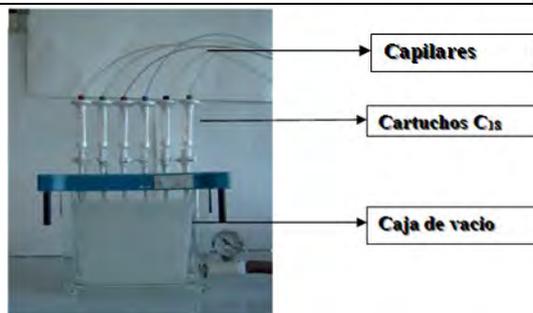


Figura D.1 Componentes de la Extracción en Fase Sólida

- Al terminar de pasar el H_2O con residuos de sobrenadante por el capilar, se apaga la bomba de succión. Se retiran los capilares de los cartuchos de extracción en fase solida. Nota: Si no se puede continuar con el análisis, los cartuchos deben cubrirse con parafilm y guardarse en el congelador.
- Se prepara la caja de vacío colocando en la gradilla los tubos de centrifugadora que servirán a colectar por gravedad el lavado que se realiza en los cartuchos de extracción en fase solida.
- Lavar los cartuchos de extracción en fase solida utilizando 2 mL. de metanol y colectar el producto del lavado en tubos de centrifugadora colocados dentro de la caja de vacío. El lavado debe hacerse muy lentamente, de modo que utilice la bomba solamente para provocar el inicio del goteo pues es conveniente el goteo por gravedad. El herbicida atrazina es altamente soluble en metanol, el plaguicida retenido en los cartuchos de extracción en fase solida y serán lixiviado en el CH_3-OH .
- Colocar en un agitador Vortex automático los tubos de centrifugadora donde se colectó el CH_3-OH con la atrazina. Agitar de 15 a 20 segundos. Mediante una pipeta Pasteur se transfieren 2 mL a viales los cuales han sido etiquetados y pesados previamente.
- Evaporar con N_2 el CH_3-OH de lavado contenido en los viales. Asegurarse de dejar un volumen ≤ 0.5 mL. de CH_3-OH . La evaporación se realiza en aproximadamente 15 minutos.
- Si es necesario, ajustar el contenido de CH_3-OH en el vial a 0.5 ml. mediante una pipeta Pasteur.
- Adicionar al vial 0.5 mL. H_2O de modo que en el vial haya una solución con un volumen total de 1.0 mL (50:50 $CH_3-OH:H_2O$) Utilizar la balanza de precisión de 4 dígitos para garantizar precisión.
- La muestra esta lista para leerse en el HPLC.



	PROTOCOLO E CUANTIFICACIÓN DE ATRAZINA	FECHA DE EMISIÓN: 01-04-08
		REVISIÓN: 3
		FECHA DE REVISION: 02-04-08
EDAFOLOGIA	LABORATORIO DE FERTILIDAD DE SUELOS	PAGINA 1 DE 4

LECTURA EN EL HPLC

1.0 OBJETIVO

Identificar y cuantificar la atrazina con la técnica del HPLC.

2.0 CAMPO DE APLICACIÓN Y ALCANCE

La cromatografía líquida de alta resolución, es una técnica muy eficiente que permite identificar y cuantificar un elemento determinado en concentraciones muy bajas (ppb).

Se utiliza cada vez más en el análisis de las muestras de alimento para separar y para detectar los aditivos y contaminantes. Este método separa las mezclas complejas en compuestos individuales, que son identificados y cuantificados por los detectores. Su gran ventaja es la disminución del tiempo de análisis, aun incluso en mezclas muy complejas (productos biológicos).

3.0 FUNDAMENTO

El compuesto pasa por la columna cromatográfica (fase estacionaria) mediante el bombeo de líquido (fase móvil) a alta presión. Una vez separados los diferentes constituyentes de la muestra, son identificados en un detector ultravioleta (UV).

4.0 TERMINOLOGÍA

HPLC: Cromatografía Líquida de Alta Resolución

UV : Ultravioleta

5.0 MATERIALES

5.1 REACTIVOS

5.1.1 Acetonitrilo grado HPLC

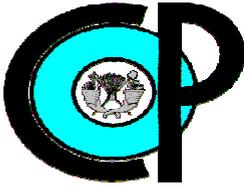
5.1.2 Acetonitrilo-Agua (70:30)

5.1.3 Metanol grado HPLC (CH₃-OH)

5.1.4 Agua desionizada (Calidad MilliQ-Water)

5.1.5 Atrazina Pureza 98.1 %



	PROTOCOLO E CUANTIFICACIÓN DE ATRAZINA	FECHA DE EMISIÓN: 01-04-08
		REVISIÓN: 3
		FECHA DE REVISION: 02-04-08
EDAFOLOGIA	LABORATORIO DE FERTILIDAD DE SUELOS	PAGINA 2 DE 4

5.2 EQUIPOS

- 5.2.1 HPLC (Cromatografía Líquido de Alta Resolución)
- 5.2.2 Agitador Vortex Automático
- 5.2.3 Sonicador
- 5.2.4 Detector UV

6.0 DESGASIFICACIÓN DE SOLVENTES HPLC

1. Todos los solventes a utilizar en el HPLC (metanol, agua, acetonitrilo y agua-acetonitrilo deben ser desgasificados para evitar problemas de sobrepresión en el cromatografo (Protocolo A: Preparación de Solventes). Los frascos conteniendo el solvente se colocan dentro del sonicador, el cual se llena previamente con agua hasta la altura de los frascos.
2. Se enciende el equipo y se acciona en la función de Desgasificación durante un periodo de 5 minutos, al terminar la operar el equipo se retiran los frascos y se colocan en el equipo HPLC. Se enlazaran con capilares del HPLC como aparecen en el Cuadro C.1.

Capilar	Solvente
A y B	Agua
C	Metanol
D	Acetonitrilo

Cuadro C.1 Capilares correspondientes a solventes HPLC

7.0 ANALISIS DE MUESTRAS POR HPLC

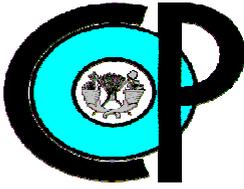
1. **Encender el HPLC.** La ventana de diagnostico debe dar OK en todo. En la parte superior aparecerá un mensaje indicando la operación que esta realizando. Revisa Needle & Syringe, carousel and solvent manager. Cuando aparezca idle se procede a continuar con la purga en seco o en húmedo. **Nota:** Solo hasta que se hayan terminado de hacer las purgas y el acondicionamiento de la columna se encenderá el CPU, monitor y el detector.
2. **La purga en seco.** Se hace cuando se va cambiar disolventes, es decir cuando se va a cuantificar otro analito y se va a usar otra fase móvil.



	PROTOCOLO E CUANTIFICACIÓN DE ATRAZINA	FECHA DE EMISIÓN: 01-04-08
		REVISIÓN: 3
		FECHA DE REVISION: 02-04-08
EDAFOLOGIA	LABORATORIO DE FERTILIDAD DE SUELOS	PAGINA 3 DE 4

- a) Presionar Menu Status, en Direct Función aparecen 7 opciones, donde oprimes Dry Prime y O.K. Presionar la tecla A: Open A, Open B, Open C, Open D, de acuerdo a la línea que se quiera purgar. Al presionar queda marcada en gris.
 - b) Abrir la válvula de drenado media vuelta, girar en sentido contrario a las manecillas del reloj. Drenar 3 mL aproximadamente.
 - c) Cerrar las válvulas de purga girándola en el sentido de las manecillas del reloj, Nota: No apretar la válvula al tope, realizarlo suavemente, además de verificar que no haya fugas.
 - d) Presionar Continué y se realizara durante 60 segundos la purga en seco de la línea A. Realizar estos pasos para las líneas B, C y D.
- 3. Purga en Húmedo.** Primero se debe purgar las líneas de agua (A y B) y después las del solvente orgánico, metanol (C) y finalmente Acetonitrilo (D), como se indica a continuación
- a) Agitar previamente los frascos. Presionar Menu Status. Por default la pantalla siempre mostrara 100% en la Línea A y las demás estarán en cero. Oprimir Direct Function, dar Wet Prime y O.K. Dar 7 ml/ min por 3 minutos y OK. Cuando termine de purgar A, aparece Idle en la pantalla,
 - b) Para purgar las demás líneas repetir los pasos anteriores.
- 4. Acondicionamiento de la columna.** Ir a Next Page, para iniciar el flujo de la fase móvil:
- a) Aumentar flujo de la fase móvil de 0.1 a 1.0 mL/min. Si $\Delta\text{Psi} < 50$ puede ir aumentando el flujo. Nota: Evitar golpes de presión (aumentar o disminuir los caudales poco a poco) o presiones muy altas. Controlar siempre las miscibilidades de los líquidos que se utilizan. Dejar este flujo al menos 15 minutos para tener estabilidad en el sistema antes de inyectar las muestras, **Nota:** Antes de inyectar a menú status. Presionar Diag. El valor de C/D ratio debe ser menor a 1,4. El valor oscila entre 1.45, el cual disminuirá al aumentar la temperatura de la columna, baja a 1.22.
- 5. Habilitar el degasificador.**
- a) Con la flechas ir a degasser y dar enter. Seguir con ON y enter. Esperar 10 minutos. Indicar la composición final de la fase móvil que se va a trabajar en el análisis. **Nota:** Para atrazina 40 de agua (Línea A) Y 60 de Metanol (Línea C); las demás serán cero y enter,
 - b) En Direct Función dar purge inyector OK. Aparece un recuadro que refiere loop volumes, dar 6 y enter. Al terminar aparecerá purge finished y después Idle.



	PROTOCOLO E CUANTIFICACIÓN DE ATRAZINA	FECHA DE EMISIÓN: 01-04-08
		REVISIÓN: 3
		FECHA DE REVISION: 02-04-08
EDAFOLOGIA	LABORATORIO DE FERTILIDAD DE SUELOS	PAGINA 4 DE 4

6. Encender el Detector U.V.

- a) Encender el detector con el botón derecho del equipo. Iniciar el diagnóstico con lo cual se escucharán 3 veces un beep. La pantalla muestra Start Up diagnostics. Deberá indicar OK en todo. Esto ocurre en 5 minutos y al terminar la inicialización, se muestra una ventana la cual indica que canal se está usando. Deje calentar la lámpara 30 minutos antes de inyectar muestras
- b) Al concluir este periodo, ubíquese con las flechas en el cuadro que indica el valor de la longitud de onda y cámbielo a 230 nm y dar enter.
- c) Presione la tecla DIAG. Aparece otra ventana, seleccione el N° 2 "Sample & Ref. Energy". Dar enter y anotar en la bitácora los valores de energía de Sample y de Referencia. Presione Home para regresar a la pantalla.

7. Encender CPU y monitor. Abrir proyecto

- a) En el escritorio de Windows, dar doble click en el Programa Empower. Como resultado se desplegará el recuadro Empower Login. Llenar el recuadro: **User name:** system y **Password:** Manager y dar enter.
- b) Se despliega el cuadro Select User Type and Interface. Dar Click en Quick Start Interface y dar O.K. Entonces el programa le pide seleccionar proyecto y sistema, para ello se ha creado el proyecto atrazina, por lo que se selecciona en Projects, Atrazina y el Cromatographic System es 2695_2487. Es decir el módulo del HPLC y del detector. Dar Click en OK.

8. Crear muestras (Run Samples y Method Set Sample)

- a) Se despliega la hoja principal de introducción de datos del proyecto. En la cual enlistará al inicio los estándares del HPLC (en forma ascendente) y entonces colocará los datos de cada una de las muestras que utilizó en la Extracción en Fase Sólida (Viales).
- b) Se requiere de un método de valoración de las muestras, el cual ya fue elaborado para la atrazina, el cual se coloca en cada una de las muestras a identificar. **Nota:** En el caso de los estándares se definirá su función como standards inyectors, como base para cuantificar la atrazina.

9. Colocar viales en el Carrusel del HPLC. Nota: Inicialmente se lava la columna con un disolvente adecuado, en el caso de columnas C₁₈, metanol. Y posteriormente se pasa de forma paulatina a la fase móvil de trabajo.

10. Analizar datos. Nota: Al finalizar, se lava la columna con un disolvente. En caso de haber utilizado un tampón o alguna solución agresiva o precipitable, hay que lavar enseguida todas las partes del sistema que hayan entrado en contacto.

11. Reporte de Resultados



	PROTOCOLO F LIMPIEZA DE MATERIAL PARA ANÁLISIS EN EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA	FECHA DE EMISIÓN: 01-04-08
		REVISIÓN : 3
		FECHA DE REVISION: 02-06-08
EDAFOLOGIA	LABORATORIO DE FERTILIDAD DE SUELOS	PAGINA 1 DE 2

1. OBJETIVO

Establecer el procedimiento para la limpieza del material en uso en la extracción en fase sólida.

2.0 FUNDAMENTO

El material que se utiliza en análisis de pesticidas debe ser perfectamente lavado para eliminar cualquier contaminación positiva, es decir, si el material de vidrio tiene residuos del analito, la concentración de éste aumentara y se reportara un valor de contaminante que no corresponde a la realidad. Considerando el HPLC muy sensible por lo que cualquier impureza modifica el cromatograma.

El material utilizado en análisis de residuos se divide en dos tipos: material común y material calibrado. El primero comprende vasos de precipitados, probetas, frascos, viales, tapones de vidrio, plástico o de teflón, espátulas, matraces Erlenmeyer, tubos de ensaye y buretas. El material calibrado involucra: matraces aforados, pipetas volumétricas, balanza analítica.

3.0 MATERIALES

3.1.1 Pissetas

3.1.3 Recipiente para coleccionar residuos de lavado con metanol

3.1.4 Bandeja de plástico para almacenar los residuos de lavado.

3.1.5 Cubeta para colocar residuos de suelo.

3.2 REACTIVOS

3.2.1 Metanol grado HPLC

3.2.2 H₂O Destilada

3.2.3 H₂O Potable

3.2.4 Extrán al 2%.



	PROCOLO F LIMPIEZA DE MATERIAL PARA ANÁLISIS EN EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA	FECHA DE EMISIÓN: 01-04-08
		REVISIÓN : 3
		FECHA DE REVISION: 02-06-08
EDAFOLOGIA	LABORATORIO DE FERTILIDAD DE SUELOS	PAGINA 2 DE 2

4.0 LAVAR

- Eliminar residuos del material volumétrico. Es recomendable lavar el material lo más rápido posible, debido a que los compuestos se adhieren fuertemente si no se lava al terminar la experimentación.
- Sumergir el material volumétrico en una solución de detergente (al 10% en agua destilada).
- De preferencia no usar cepillo, pueden rayar el material y producir contaminación posterior. Sí es necesario utilizarlos, procurar que sean curvados para limpiar bien fondos de matraces y tubos.
- Enjuagar primero con agua corriente para eliminar totalmente el detergente y luego con agua destilada.
- Colocar el material en un escurridor de plástico. Ya escurrido lleve el material a una campana extractora.
- Enjague el material con metanol dos veces por dentro y por fuera. Los residuos del solvente orgánico se colectaran en un recipiente apropiado. No tirar nada al drenaje. Estos desechos se colocaran en un garrafón de 20 L. Se deberá etiquetar con una leyenda que diga "Residuos de Metanol".

5.0 ESCURRIR

- Para comprobar que el material este bien limpio, observar que no se formen gotas en las paredes donde se escurre, si esto sucede indica que el material se encuentra sucio en la zona donde se encuentran las gotas.
- El material debe colocarse invirtiéndolo sobre papel secante.

6.0 GUARDAR

- El material se deberá envolver en papel aluminio. La boca de los matraces, pipetas y probetas se cubrirán con una capa de aluminio. Las pipetas Pasteur se envolverán completamente en el papel aluminio. al igual que los viales
- Proceder a guardar el material en sus gavetas.



ANEXO D

HPLC (Cromatografía Líquida de Alta Resolución)

Cromatografía

La cromatografía es un método de separación de los componentes químicos de mezclas complejas, permite cuantificar e identificar cada uno de los componentes de la mezcla. La separación de los componentes de la mezcla se produce a partir de las diferencias de afinidad a la que son transportados a través de una fase fija o estacionaria por una fase móvil gaseosa o líquida.

Clasificación de los métodos cromatográficos

Los métodos cromatográficos son de dos tipos:

Cromatografía plana

La cromatografía plana es un tipo de cromatografía líquida en la que la fase estacionaria es una superficie plana. Podemos encontrar cromatografía en capa fina (TLC) y en papel (CP).

Cromatografía en Columna

La fase estacionaria está dentro de una columna de diámetro estrecho, empaquetada con un sólido inerte finamente dividido, por la que desciende la fase móvil por capilaridad.

¿Qué es la Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)?

Es una técnica cromatográfica usada para separar componentes usando una variedad de interacciones químicas entre el analito y la columna cromatográfica (Hurle et al; 1980).

Componentes del HPLC

En el cuadro D.1 se definen los componentes del HPLC:

CONCEPTO	DEFINICIÓN
<i>Columna Cromatográfica</i>	Receptora de la fase estacionaria regularmente, la cual está hecha según el tipo de compuestos a analizar, si es líquido; si es gas, la columna es un serpentín que gasifica la muestra e identifica los componentes en estado gas.
<i>Detector</i>	Están en función de la técnica a aplicar y de la precisión de la variable a medir. Pueden ser de ionización de llama, conductividad térmica, absorbancia, fluorescencia, conductividad, etc.
<i>Cromatogramas</i>	Respuesta de un detector a la presencia de un analito, representa su señal en función del tiempo como una serie de picos.

Cuadro D.1 Componentes de la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).



Sistema básico del HPLC

Se inyecta la muestra en el sistema (Figura D.2) y al llegar esta, arrastrada por la fase móvil, a la columna, se inicia el proceso de separación de las sustancias que interactúan con esta, quedando más retenidas unas que otras según el grado de interacción.

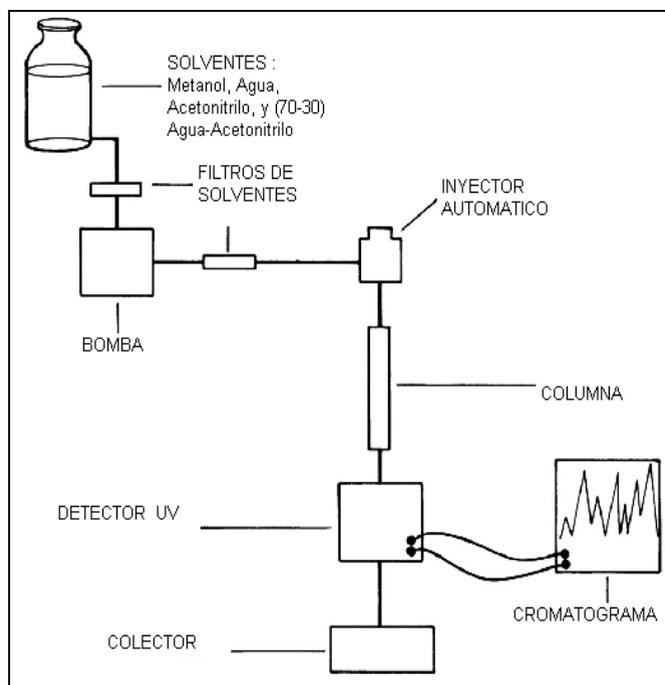


Figura. D.2 Diagrama básico de un sistema de HPLC

La posición de los picos sobre el eje tiempo se usa para identificar los componentes de la muestra donde las áreas bajo los picos proporcionan una medida cuantitativa cada especie como se muestra en la Figura D.3.

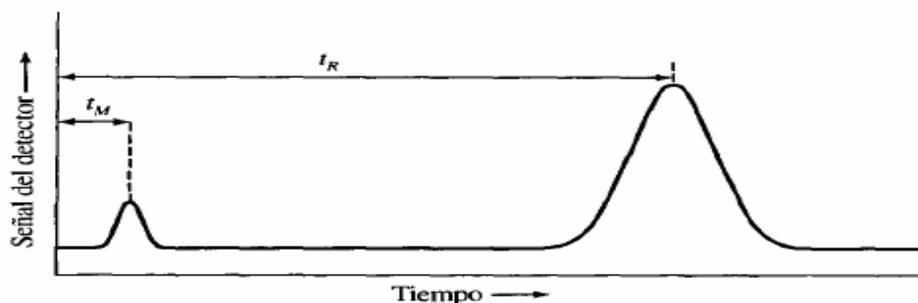


Figura D.3 Cromatograma de una mezcla de dos componentes. El pico representa una especie que no se retiene en la columna, y de esta forma alcanza el detector después del inicio de la elución.



Métodos de Filtración de Solventes en HPLC

Hay 3 métodos comunes que se utilizan hoy para la filtración previa de los Solventes en HPLC.

Filtro a la Entrada del Solvente
Filtración al Vacío
Filtración en Línea

Métodos de Desgasificación de Solventes en HPLC

Existen cuatro métodos comunes usados para desgasificar solventes en HPLC previos a su uso:

Sonificación
Burbujear Helio
Desgasificación Electrónica en la Línea del Flujo

Tipos de eluciones en HPLC:

Elución isocrática: un solo disolvente de composición constante.
Elución con gradiente: consiste en un cambio gradual de la composición de la fase móvil durante la separación. Se mezclan proporciones cada vez mayores de un segundo o tercer solvente con mayor fuerza de elusión.

Columnas y Fases Estacionarias.

Fuentes de daño de una columna de HPLC: Obstrucción por partículas pequeñas en los solventes o fases móviles, o por materiales no eluidos en las muestras y la variación de las características de retención por incremento de materiales no eluidos

Bombas

Los requisitos más importantes que debe reunir una bomba o sistema de bombeo son: Producir presiones estables hasta 6000 psi; generar intervalos de caudales de flujo (0,1 a 10 ml/min); y el control y la reproducibilidad del flujo de solvente

Detectores

La eficiencia de un detector cromatográfico depende de la relación entre la cantidad física medida y la composición del efluente, así como también de las características de la señal de transferida. Los detectores más utilizados en HPLC son:

Detector UV. Hay básicamente tres tipos: de Onda Fija, Variable y de arreglo de Diodos.
Detectores Electroquímicos. Pueden ser clasificados en tres tipos: Amperometrico, Conductimetrico.



ANEXO E

Fundamentos teóricos y la técnica de espectroscopia del infrarrojo

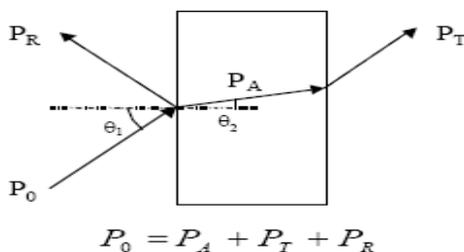
1. Espectroscopia

El estudio de la interacción entre los diferentes tipos de radiación y la materia se llama espectroscopia, y el gráfico que describe la intensidad de esta interacción se llama espectro. De aquellos gráficos puede obtenerse una enorme cantidad de información sobre la estructura de la materia.

La molécula, al absorber la radiación infrarroja, cambia su estado de energía vibracional y rotacional. En el caso del estudio del espectro infrarrojo (IR) de muestras solidas y liquidas se tienen en cuenta los cambios entre estados de energía vibracional.

2. Tipos de medidas en el infrarrojo

Cuando la radiación incide en la muestra, esta puede sufrir diferentes fenómenos: absorción, transmisión y reflexión (Figura E.1). La intensidad de luz transmitida a través de la muestra (P_T) es menor que la intensidad incidente (P_0). Una parte de esta intensidad incidente se ha reflejado (P_R) mientras que otra parte ha sido absorbida por la sustancia (P_A).



$$P_0 = P_A + P_T + P_R$$

Figura E.1 Fenómenos de absorción, transmisión y reflexión de la radiación

La medida más común en el infrarrojo es la que se basa en la absorción (o la intensidad transmitida), aunque también se han desarrollado espectroscopias basadas en el fenómeno de la reflexión como son la reflectancia total atenuada y la reflectancia difusa.

Absorción/ Transmitancia

La transmitancia T , se calcula como la fracción de radiación (P_T/P_0) transmitida a través de la muestra. La intensidad de absorción de la luz, absorbancia (A) se calcula:

$$A = -\log T = \log \frac{P_0}{P_T}$$

La representación de la transmitancia o la absorbancia como una función de la longitud de onda, λ , o del numero de onda, ν , es lo que conforma el espectro de la muestra.



La relación que existe entre la concentración y la absorbancia esta descrita por la ley de Lambert-Beer: “La absorción de la radiación de la muestra es proporcional a la longitud de camino óptico (anchura de la celda, l), en cm, a la concentración de la solución (mol/L) y a una constante proporcional especifica de cada muestra”

$$A = \epsilon c l$$

Reflectancia total atenuada (attenuated total reflectance, ATR)

El principio de esta medida se basa en el fenómeno de la reflexión total interna y la transmisión de la luz a través de un cristal con un elevado índice de refracción. La radiación penetra (unos μm) mas allá de la superficie del cristal donde se produce la reflexión total, en forma de onda evanescente. Si el lado exterior del cristal se coloca un material adsorbente (muestra), la luz que viaja a través del cristal se verá atenuada y se puede registrar el espectro de la muestra, se observa mejor en la Figura E.2.

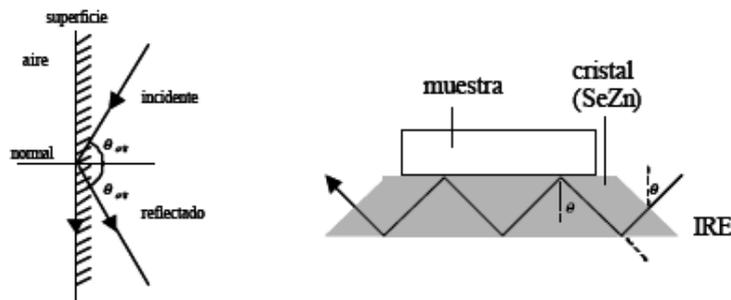


Figura E.2 Reflexión total interna y elemento de reflexión interna (IRE) utilizado en el sistema ATR

Esta técnica sirve para el análisis de sólidos y líquidos, especialmente, en las regiones de infrarrojo medio y de infrarrojo cercano.

Reflectancia Difusa

Otra medida que se basa en el fenómeno de la reflexión es la reflectancia difusa. Donde se entiende mejor en la Figura E.3.

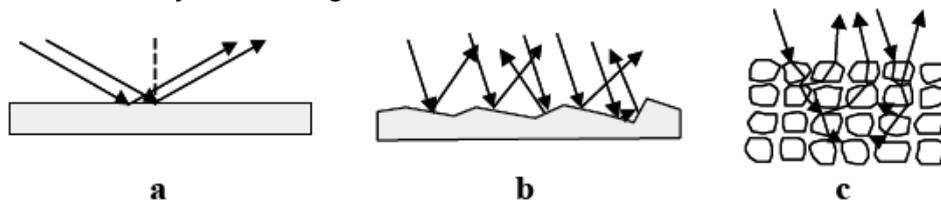


Figura E.3 (a) Reflexión en un material especular (b) Irregular (c) Fenómeno de Reflectancia Difusa.

La presencia de agua en el espectro provoca la aparición de bandas características, y además afecta a la totalidad del espectro debido a la variación que se introduce en el índice de refracción del medio.



3 El espectroscopio IR.

Un espectroscopio infrarrojo clásico y ampliamente difundido, son los de “doble as”. El diagrama de un instrumento IR clásico puede verse en la Figura E.4.

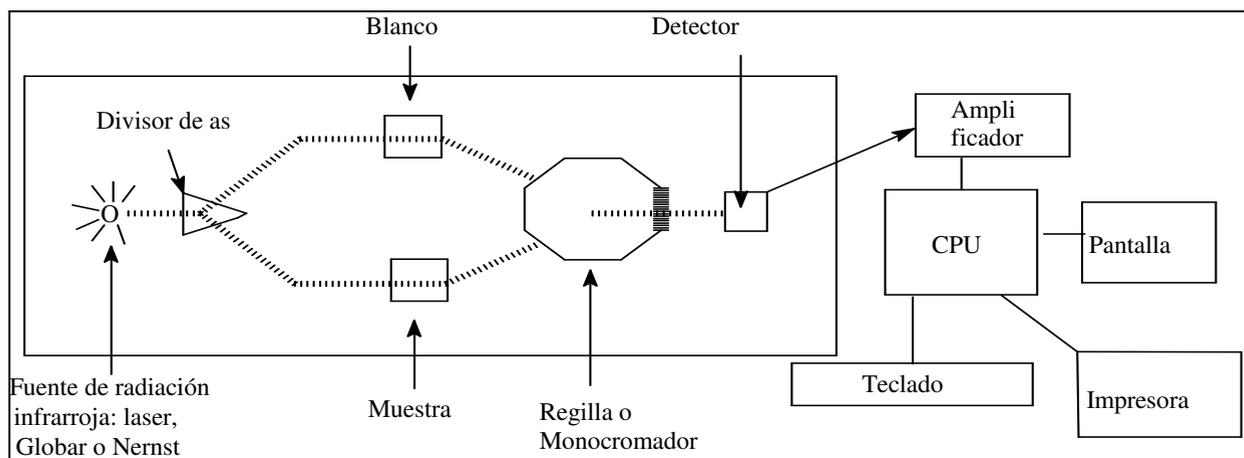


Figura E.4 Esquema simplificado de las partes principales de un espectrofotómetro IR

Ellos están configurados con los siguientes componentes:

La fuente de radiación IR puede contener un láser (He-Ne) en los equipos modernos, o una cerámica contaminada con óxidos de Zirconio, Torio y Cesio, conocida como filamento de Nernst. El Nernst en cambio, muestra un espectro de energía o frecuencia que va desde 7100 cm^{-1} hasta los 550 cm^{-1} . Para los espectroscopistas orgánicos necesitan el rango que va desde los 4000 cm^{-1} hasta los 650 cm^{-1} aproximadamente.

El porta-muestra, puede ser según el propósito, para aceptar gases, líquidos y sólidos. De los líquidos pueden ser obtenidos los espectros en ya sea compuestos puros o en soluciones diluidas de aquellos.

La rejilla o monocromador es un espejo reticulado que equivale a un prisma capaz de descomponer el espectro de la radiación en sus diferentes longitudes de onda. Este dispositivo permite seleccionar y examinar la energía radiante de diferentes longitudes de onda que ha pasado por la muestra.

El detector. Mide la energía radiante residual que emerge de la muestra y la compara con aquella que proviene de la celda llamada blanco (que no contiene sustancia problema, solo contiene el solvente en el caso de una muestra en solución, o bien, bromuro o cloruro de sodio como blanco para las muestras sólidas).

El graficador o impresora traduce a un gráfico las diferencias encontradas por el detector, colocando en la abscisa el rango de longitudes de onda barrido por el instrumento y en la ordenada la intensidad de la absorción del as emergente de la muestra problema.



Universidad Nacional Autónoma de México

BIBLIOGRAFÍA

UNAM



- 1) Adler J-D. 1980. A review of the coordinated research effort on the comparison of test systems for the detection of mutagenic effects, sponsored by the EEC. *Mutat. Res.* 74: 77-93.
- 2) Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). 2001. Toxicological profile for atrazine. Public Health Service. U.S. Department of Health and Human Services. Atlanta, GE, USA.
- 3) Anderson, J.P.E. 1982. Soil respiration. In *Methods of soil analysis, Part 2-Chemical and microbiological properties* (eds. A.L. Page, R.H. Miller, and D.R. Keeney). Second Edition, Capitulo 41. 831-871. American Society of Agronomy and Soil Science Society of America, Madison, WI, USA.
- 4) Asare D.K.; T.W. Sammis., D. Smeal., H. Zhang and D.O.Sitze, 2001. Modeling an irrigation management strategy for minimizing the leaching of atrazine. *Agr. Water Manage.* 48:225-238.
- 5) Ashton, F.M & S. A. Craff. 1981. Mode of action of herbicides. 2nd edition. John Wiley & Sons. pp: 328-329.
- 6) ATSDR (Agency for Toxic Substances & Disease Registry). Department of Health and Human Services <http://www.atsdr.com.mx>.
- 7) Avilés Marín S. La respiración del suelo como indicador de la mineralización de las reservas orgánicas edáficas activas en suelos calcáreos. Tesis 2002. Colegio de Postgraduados.
- 8) Barriuso, E. and S. Houot, 1996. Rapid mineralization of the s-triazine ring of atrazine in soils in relation to soil management. *Soil Biol. Biochem.* 28:1341-1348
- 9) Benoit, P.; E. Barriuso and G. Soulas, 1999. Degradation of 2,4 D; and 2,4 dichlorophenol and 4-chlorophenol in soil after sorption on humified and nonhumified organic matter. *J. Environ. Qual.*, 28:1127-1135.
- 10) Bollag y Liu, 1992. Properties of Herbicides. Science Society of America. 341-350
- 11) Blume E, M Bischoff, TB Moorman, R Turco. 2004. Degradation and Binding of Atrazine in Surface and Subsurface Soils. *J. Agric. Food Chem.*, 52:7382-7388.
- 12) Browing, D.R. 1971. "Espectroscopia" Edit. Toray-Masson S.A. Barcelona España.
- 13) Buman y Ros, 1983. Degradation of atrazine. *Biochemistry.* 235-236
- 14) Calvet, R., 1980. Adsorption-desorption phenomena. Interactions between herbicides and the soil. Hance, R. J., Ed. European Weed Research Society. Academic Press.
- 15) Carter, A., 2000. Herbicide movement, in soils: Principles, pathways, and processes. *Weed Research*, 40:113-122.
- 16) CENAM. Métodos analíticos adecuados a su propósito. Guía de Laboratorio para la Validación de Métodos y Temas Relacionados Segunda Edición 2003
- 17) Cheng, H.H. 2001. Pesticides in the soil environment-An Overview. Chapter 1: 1-5. In: *Pesticides in the soil Environment: Processes, Impacts, and Modeling*. Ed. Cheng, H.H. SSSA, Inc. Madison, USA, 530p.
- 18) Clay, S.A.; R.H. Dowdy., J.A. Lamb., J.L. Anderson., B. Lowery., R.E. Knighton and D.E. Clay, 2000. Herbicide movement and dissipation at four Midwestern sites. *J. Environ. Sci. Health*, B35 (3), 259-278.
- 19) Colthup, N, P, Daly, L.H. Wiberley S. E. 1995. *Introduction to Infrared and Raman Spectroscopy*. Second Edition. Academic Press}
- 20) Christensen B. T. Physical Fractionation of soil and organic matter in primary particle size and density separates. *Adv. Soil. Sci.* 20. 1-89.
- 21) De Guzman, N.P., Hendley, P., Gustafson, D.I. van Wesenbeeck, I. Klein, A.J. Fuhrman, J.D., Travis, K. Simmons, N.D., Teskey, W.E., and Durham, R.B. 2005. The acetochlor registration partnership state ground water monitoring program. *Journal of Environmental Quality* 34:793-803.



- 22) Dell, D., "Views on method validation", *Methodol. Surv. Biochem. Anal.*, 1990, Vol. 20, pp. 9-22. detection. *Journal of Chromatography* 442: 147-155
- 23) Deschauer H. and Kogel-Knabner. Sorption behavior of a new acidic herbicide in soils. *Chemosphere*, 21, 1397-1399.
- 24) Dux, J. P., "Handbook of Quality Assurance for the Analytical Chemistry Laboratory", Van Nostrand Reinhold, New York, 1996.
- 25) EAL (European Accreditation of Laboratories), Oct. 1996. Validation of test methods General principles and concepts (sic)", Committee paper EAL/GA(96)58
- 26) Fernández Pérez A. 2003. Generación de una guía de validación para análisis químico de suelos y plantas. Aplicación a la validación de dos metodologías para análisis de carbono orgánico. Tesis 2003. Colegio de Postgraduados.
- 27) Garfield, F. M., "Quality Assurance Principles for Analytical Laboratories", Association of Official Analytical Chemists", Arlington VA, 1992.
- 28) Gerstl, Z. 2000. An update on the Koc concept in regard to regional scale management. *Crop Protection*, 19:643-648.
- 29) Gilchrist, G.F. 1993. Atrazine interactions with clay minerals: kinetics and equilibria of sorption. *J. Agric. Food Chem.* 41: 1748-1755.
- 30) Hang, S.; E. Barriuso and S. Houot, 2003. Behavior of ¹⁴C atrazine in Topsoils of the Argentinean Semi-arid Pampa under Different Cropping Managements. *J. Environ. Qual.*, 32: 2216-2222.
- 31) Hassink, J. Effects of soil texture and grassland management on soil organic C and N and rates of C and N mineralization. *Soil Biol, Biochem.* 26: 1221-1231.
- 32) Helling, C.S. 1991. Pesticide mobility in soils I. Parameters of thin layer chromatography. *Sci. Soc. Amer. Proc.* 35: 733-737
- 33) Hidalgo, C., Etchevers, J., Martinez, B., 1986. Determinación de la densidad aparente en suelos de Ando. *Terra* 4, 3-9.
- 34) Hurlle, K. & A. Walker 1980. Persistence and its prediction. En: Interactions between herbicides and the soil. R. J. Hance, Ed. European Weed Research Society. Academic Press, London. pp:84-86. of s-triazines and their degradation products using ultraviolet photometric and amperometric.
- 35) Hutson, J.L., and Wagenet, R.J. 1992 LEACHM. Leaching Estimation and Chemistry Model: A process based model of water and solute movement, transformations, plant uptake and chemical reactions in the unsaturated zone. Version 3. Dep. of Agronomy, Cornell University, Ithaca, New York.
- 36) Jenks, B.; F. Roeth and A. Martin, 1998. Influence of surface and subsurface soil properties on atrazine sorption and degradation. *Weed Sci.* 46:132-138.
- 37) Jenks, B.F., Roeth, F.W., Martin, A.R., and McAllister, D.L. 1998. Influence of surface and subsurface soil properties on atrazine sorption and degradation. *Weed Science*, 46:132-138.
- 38) Kowalska M. Guler and Cocke D. Interactions of clay minerals with organic pollutants. 1994. *Science of the total Environment*, 121, 223-224.
- 39) Larsen, L.; S. Sorensen and J. Aamand, 2000. Mecoprop, isoproturon, and atrazine in and above a sandy aquifer: Vertical Distribution of mineralization potential. *Environ. Sci. Technol.* 34:2426-2430.
- 40) Lambert, R.J.W., 2003. A model for the thermal inactivation of micro-organisms. *J. Appl. Microbiol.*, 95:500-507.
- 41) Mills et al 1989. Models of pesticides. Dep. Of Agronomy. New York, USA. 32-33
- 42) Mortland M. M. Mechanism of adsorption of nonhumic organic species by clays. 1986. Soil Science Society of America, Madison, Wisconsin.



- 43) Ortego J.D. and Cocke. Interactions of montmorillonite with compounds organics. Adsorptive and catalytic properties. *Chemosphere*, 22. 769-798.
- 44) Pichon, V., L. Cher, S. & M. C. Hennson. 1995. Comparison of sorbents for the solid-phase extraction of the highly polar degradation products of atrazine. Pages 711: 257-267.
- 45) Pouchet, C. J. (1981). *The Aldrich library of Infrared Spectra*. Third Edition Aldrich. USA.
- 46) Prado, B.; Duwing, C; Hidalgo; Etchevers J. 2007. Characterization, functioning and classification of two volcanic soil profiles under different land uses in Central Mexico. *Geoderma* 301-304.
- 47) Red de acción sobre plaguicidas y alternativas de América Latina (RAP-AL) <http://www.rap-al.com.mx>
- 48) Richter, O., Diekkrüger, B., and Nörtersheuser, P. 1996. Environmental fate modelling of pesticides. From the laboratory to the field scale. Editor KRAUS, H.J. VCH, Federal Republic of Germany, 281p.
- 49) Ruiz Nájera R.. Tesis 2001. Efecto de niveles de bono verde sobre la degradación de la atrazina en suelo agrícola no esterilizado y esterilizado. Colegio de Postgraduados
- 50) Shapir, N.; S. Goux., R. Mandelbaum and L. Pussemier, 2000. The potential of soil to mineralize atrazine as predicted by MCH-PCR followed by nested PCR. *Can. J. Microbiol.* 46:425-432.
- 51) Smith, D.; S. Alvey and D. Crowley, 2005. Cooperative catabolic pathways within an atrazine-degrading enrichment culture isolated from soil. *FEMS Microbiology Ecology*. 53:493-495.
- 52) Sonoy y Schawn, 1995. *Properties of soils*. Society Academic Press. 210,220.
- 53) Sorenson et al, 1994. Mecanismos de herbicidas. Academic Press 45-62.
- 54) Strong et al, 2000. Interacción de herbicidas y suelos. *Dep. Agrícola, Quim.* 123
- 55) Thamdrup et al, 1998. Fenómenos de adsorción y desorción. *Environ Sci.* 321
- 56) Toride, N., F.J. Leij, and M.Th. van Genuchten. 1999. The CXTFIT code for estimating transport parameters from laboratory or field tracer experiments, Version 2.1. Research report No.137, U.S. Salinity Laboratory, USDA, ARS.
- 57) Trochimowics, 2001. Transformación de los pesticidas. *Weed Science*. 120-121.
- 58) Vera, P.; K. Stulik & M. Prihoda. 1988. High-performance liquid chromatography
- 59) Walker, A., E.G. Cotterill, and S.J. Welch. 1989. Adsorption and degradation of chlorsulfuron and metsulfuron methyl in soils from different depths. *Weed Research*, 29:281-287.
- 60) Weber, J.B. 1994. Properties and behavior of pesticides in soil. Chapter 2:15-41. In: *Mechanisms of pesticide movement into groundwater*. Ed. Honeycutt, R.C., and Schabacker, D.J. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, 189p.
- 61) Ying y Williams, 2000. Movimiento de plaguicidas en suelos Agrícolas. *Environ Sci.* 654-672.