



---

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**ANÁLISIS DE IONES Y HERBICIDAS TRIAZINICOS EN  
INFUSIÓN DE TÉ**

*T E S I S*

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICO DE ALIMENTOS**

**P R E S E N T A:**

**CRISTIAN FEDERICO GARCÍA**



**MÉXICO, D.F.**

**2015**



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.



---

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE: M. en C. MARÍA DEL ROSARIO COVARRUBIAS HERRERA**

**VOCAL: M. en C. LUCIA CORNEJO BARRERA**

**SECRETARIO: Dra. MARTHA PATRICIA GARCÍA CAMACHO**

**1er. SUPLENTE: Q.F.B. LUIS ORLANDO ABRAJAN VILLASEÑOR**

**2° SUPLENTE: M. en C. GEORGINA ARTEMISA DUARTE LISCI**

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

**LABORATORIO DE QUÍMICA ANALÍTICA, ANEXO 3D FACULTAD DE QUÍMICA  
(CIUDAD UNIVERSITARIA)**

**ASESOR DEL TEMA:**

Dra. Martha Patricia García Camacho \_\_\_\_\_

**SUPERVISOR TÉCNICO:**

M en C Norma Ruth López Santiago \_\_\_\_\_

**SUSTENTANTE:**

Cristian Federico García \_\_\_\_\_



ÍNDICE GENERAL

	Página
ÍNDICE GENERAL.....	I
ÍNDICE DE FIGURAS Y ECUACIONES.....	VI
ÍNDICE DE TABLAS.....	IX
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1.1. Introducción.....	2
1.2. Objetivos.....	5
<b>2. GENERALIDADES.....</b>	<b>6</b>
2.1. Breve historia del Té.....	7
2.2. Características de la planta de Té.....	7
2.2.1. Compuestos orgánicos de la planta de Té.....	8
2.2.2. Compuestos minerales de la planta de té.....	10
2.3. Procesos de Té negro y Té verde.....	12
2.3.1. Té negro.....	12
2.3.2. Té verde.....	14
2.4. Estadísticas de producción de Té.....	15
2.4.1. Producción mundial.....	15
2.4.2. Principales productores mundiales.....	16
2.5. Diferencia entre Té e infusiones.....	16
2.5.1. Características de la bebida de Té.....	17
2.5.2. Legislación.....	17
2.6. Potenciometría con electrodos selectivos.....	19
2.6.1. Potenciometría.....	19
2.6.2. Características de electrodos selectivos de iones.....	20
2.6.2.1. Calibración de electrodos selectivos de iones.....	21
2.6.2.2. Factores que afectan a los electrodos selectivos de iones.....	22
2.6.3. Tipos de electrodos.....	24
2.7. Cromatografía.....	24
2.7.1. Clasificación de cromatografía.....	25



2.7.2. Teoría general de cromatografía .....	25
2.7.2.1. Parámetros de cromatografía .....	26
2.8. Extracción en fase sólida (EFS).....	30
2.9. Iones.....	32
2.9.1. Características generales de los iones.....	32
2.9.2. Valor nutrimental.....	33
2.9.3. Técnicas y métodos de cuantificación de iones.....	36
2.10. Importancia del control de plaguicidas en el Té.....	39
2.10.1. Herbicidas triazínicos.....	40
2.10.2. Efectos de las triazinas en seres vivos.....	45
2.10.3. Legislación.....	45
2.11. Análisis de iones y pesticidas en diferentes tipos de infusiones herbales.....	46
<b>3. PARTE EXPERIMENTAL.....</b>	<b>49</b>
3.1. Determinación de iones.....	50
3.1.1. Reactivos.....	50
3.1.2. Equipos y materiales.....	50
3.1.3. Muestras.....	51
3.1.4. Disoluciones y muestras.....	53
3.1.4.1. Disolución estándar.....	53
3.1.4.2. Ajustador de fuerza iónica (ISA).....	53
3.1.4.3. Muestras: infusiones de Té negro y Té verde.....	54
3.1.5. Métodos.....	54
3.1.5.1. Estabilización y activación de electrodos.....	54
3.1.5.2. Validación de los métodos ISE.....	55
3.1.5.2.1. Método de estándar externo (E.E.), para los electrodos de Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> , Ca <sup>2+</sup> y Cl <sup>-</sup> .....	55
a) Respuesta del sistema y linealidad del sistema....	55
b) Exactitud y precisión (muestra sintética).....	56
c) Precisión del método (en presencia de matriz de Té negro y Té verde).....	56



3.1.5.2.2. Método de adición estándar (A.E), para los electrodos de Na <sup>+</sup> y Ca <sup>2+</sup> .....	57
a) Respuesta del sistema y linealidad del sistema...57	
b) Precisión (muestra sintética).....57	
c) Linealidad del método ISE por A.E. (en presencia de matriz de Té negro y Té verde).....57	
d) Precisión del método (en presencia de matriz de Té negro y té verde).....58	
3.1.5.3. Determinación de iones en la muestra.....58	
3.1.5.3.1. Estándar externo.....58	
3.1.5.3.2. Adición estándar.....58	
3.2. Análisis de triazinas en infusiones de Té.....59	
3.2.1. Reactivos y disolventes.....59	
3.2.2. Preparación de las disoluciones estándar de plaguicidas.....59	
3.2.3. Instrumentación y análisis cromatográfico.....60	
3.2.4. Otros accesorios utilizados.....60	
3.2.5. Extracción en fase sólida.....61	
3.2.6. Optimización del método de extracción de las triazinas.....62	
3.2.6.1. Extrapolación del factor de capacidad en agua k'w y simulación de los frentes de elución en agua pura.....62	
3.2.6.2. Obtención del frente de elución experimental de las triazinas en metanol (MeOH) .....63	
3.2.6.2.1. Cálculo de recobro.....63	
3.2.6.3. Obtención de frente de lavado o “clean up” .....64	
3.2.6.4. Optimización del volumen y el eluyente de las triazinas.....64	
3.2.6.5. Evaluación de la reproducibilidad con la secuencia de elución seleccionada sin evaporación.....65	
3.2.6.6. Evaluación de la reproducibilidad con la secuencia de elución seleccionada con evaporación.....65	
3.2.6.7. Evaluación de la linealidad con muestra de agua millipore fortificada con triazinas.....66	



3.2.7. Aplicación de la secuencia de elución optimizada en muestras fortificadas de infusión de Té negro y Té verde.....	66
3.2.8. Ensayos cualitativos para la eliminación de color en extracto.....	66
3.2.9. Evaluación de linealidad con la secuencia de elución N°.5 en infusión de Té negro.....	67
3.2.10. Reproducibilidad de la secuencia de elución N°.5.....	68
3.2.11. Protocolo de EFS para el análisis de triazinas en infusiones de Té.....	68
<b>4. RESULTADOS Y ANÁLISIS.....</b>	<b>69</b>
4.1. Validación de los métodos ISE.....	70
4.1.1. Validación del sistema y métodos de cuantificación por estándar externo (E.E.), con los electrodos de Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> ; Ca <sup>2+</sup> y Cl <sup>-</sup> .....	70
4.1.1.1. Respuesta del sistema y linealidad del sistema.....	70
4.1.1.2. Exactitud y precisión (muestra sintética).....	72
4.1.1.3. Validación de la precisión del método (en presencia de matriz de infusión de Té negro y Té verde (repetibilidad y reproducibilidad).....	76
4.1.2. Validación del sistema por el método de Adición Estándar (A.E), para los electrodos de Na <sup>+</sup> y Ca <sup>2+</sup> .....	77
4.1.2.1. Respuesta y linealidad del sistema.....	77
4.1.2.2. Exactitud y precisión (muestra sintética).....	78
4.1.2.3. Linealidad del método ISE por A.E. en presencia de matriz de Té negro y Té verde.....	81
4.1.2.4. Precisión del método (en presencia de matriz de Té negro y Té verde (repetibilidad y reproducibilidad)).....	83
4.1.3. Determinación de iones en las muestras.....	84
4.2. Análisis de triazinas en infusión de Té .....	98
4.2.1. Condiciones del análisis cromatográfico.....	98
4.2.2. Optimización del método de EFS para las triazinas.....	100
4.2.2.1. Extrapolación de k'w.....	100
4.2.2.2. Curvas teóricas de elución de los herbicidas en agua utilizando valores obtenidos de k'w.....	101



---

4.2.2.3. Obtención del frente de elución experimental de las triazinas en metanol.....	103
4.2.2.4. Optimización del eluente para “clean up” o lavado.....	104
4.2.2.5. Optimización del volumen de elución y el eluente de las triazinas.....	108
4.2.2.6. Evaluación de la reproducibilidad con la secuencia de elución seleccionada sin evaporación.....	112
4.2.2.7. Evaluación de la reproducibilidad con la secuencia de elución seleccionada con evaporación .....	112
4.2.2.8. Evaluación de la linealidad con muestras de agua millipore fortificada con triazinas.....	113
4.2.3. Aplicación de la secuencia de elución optimizada en muestras fortificadas de infusiones de Té negro y Té verde.....	114
4.2.4. Ensayos cualitativos para la eliminación de color en extracto...	119
4.2.4.1. Interferentes coloridos en la infusión de Té observados en los cromatogramas.....	121
4.2.5. Evaluación de linealidad con la secuencia de elución N°.5 en infusión de Té negro.....	126
4.2.6. Reproducibilidad de la secuencia de elución N°.5.....	127
4.2.7. Protocolo de EFS para el análisis de triazinas en infusiones de Té.....	128
4.2.8. Análisis de triazinas en infusiones de Té verde y Té negro.....	129
<b>5. CONCLUSIONES.....</b>	<b>130</b>
5.1 Análisis de iones.....	131
5.2 Análisis de herbicidas triazínicos.....	132
<b>6. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>134</b>
6.1 Libros y artículos.....	135
6.2 Páginas de internet.....	140
<b>7. Anexo.....</b>	<b>143</b>
7.1 Anexo I Deferencia Mínima Significativa.....	143
7.2 Anexo II Especificaciones e interferentes de los electrodos.....	145
<b>8. Recomendación.....</b>	<b>146</b>

---



ÍNDICE DE FIGURAS Y ECUACIONES

	Páginas
Figura 1. Arbusto de <i>Camellia sinensis</i> .....	8
Figura 2. Hojas de variedad de <i>Camellia sinensis</i> .....	8
A) Hoja variedad <i>Asamica</i> de la India	
B) Hoja variedad China	
Figura 3. Proceso de producción de Té.....	15
A) Té negro	
B) Té verde	
Figura 4. Evolución de la producción mundial de Té (1995-2005).....	15
Figura 5. Principales países productores de Té. Año 2005.....	16
Figura 6. Diagrama de celda electroquímica .....	20
Figura 7. Esquema de la separación cromatográfica.....	26
Figura 8. Pasos para realizar una extracción en fase sólida.....	32
Figura 9. Estructura general de las triazinas.....	40
Figura 10. Estructura de la Atrazina.....	41
Figura 11. Estructura de la Simazina.....	42
Figura 12. Estructura de la Propazina.....	44
Figura 13. Estructura de la Terbutilazina .....	44
Figura 14. Diagrama del método experimental para la Extracción en fase sólida (EFS).....	61
Figura 15. Curva de calibración para el método de estándar externo de Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> y Ca <sup>2+</sup> .....	71
Figura 16. Curva de calibración de cloruros por estándar externo. Intervalo de concentración de 10 a 240 mg L <sup>-1</sup> .....	72
Figura 17. Curva de calibración: Método de estándar externo: de Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> y Ca <sup>2+</sup> .....	73
Figura 18. Curva de calibración de cloruros por estándar externo.....	74
Figura 19. Curva de calibración para Na <sup>+</sup> y Ca <sup>2+</sup> por adición estándar.....	78
Figura 20. Curvas de calibración tipo, adiciones estándar, para Na <sup>+</sup> y Ca <sup>2+</sup> ....	80
Figura 21. Curva de calibración con matriz de Té negro para Na <sup>+</sup> y Ca <sup>2+</sup> por adición estándar.....	82



Figura 22. Curva de calibración con matriz de Té verde para Na <sup>+</sup> y Ca <sup>2+</sup> por adición estándar.....	82
Figura 23. Concentraciones en mg/g de sodio y calcio presentes en las bolsas listas para infundir.....	88
Figura 24. Concentraciones en mg/g de potasio encontradas en la muestras de Té verde y Té negro.....	90
Figura 25. Comparación de las concentraciones de los iones de sodio y potasio expresadas en mg/g, encontradas en la matriz de infusión de Té verde y Té negro.....	91
Figura 26. Comparación de las concentraciones, expresadas en mg/g, de los iones potasio y cloruro encontrados en la matriz de infusión de Té verde y Té negro. ....	92
Figura 27. Cromatograma de las triazinas: simazina, atrazina, propazina, terbutilazina.....	99
Figura 28. Curva de $\log k'w=f(\%MeOH)$ .....	100
Figura 29. Curvas de rompimiento para cada una de las triazinas.....	102
Figura 30. Porcentaje de triazinas recuperadas con metanol (MeOH).....	103
Figura 31. Porcentaje de recobro acumulado de triazinas eluidas.....	104
Figura 32. Recobro acumulado de la mezcla de lavado 70:30 H <sub>2</sub> O:MeOH....	107
Figura 33. Recobro acumulado de eluentes de 10:90 H <sub>2</sub> O:MeOH.....	109
Figura 34. Recobro acumulado de la mezcla de 20:80 H <sub>2</sub> O:MeOH.....	110
Figura 35. Curva de calibración de triazinas.....	114
Figura 36. Cromatograma de matriz de Té negro con la mezcla de triazinas con la secuencia de limpieza escogida .....	115
Figura 37. Cromatograma de matriz de Té verde con la mezcla de triazinas con la secuencia de limpieza escogida.....	117
Figura 38. Extractos de Té negro obtenidos con los primeros 4 ensayos.....	120
Figura 39. Extracto de Té verde y Té negro obtenidos con diferentes ensayos para disminuir la coloración.....	120
Figura 40. Cromatogramas de Té negro con la segunda secuencia de elución escogida .....	122



---

Figura 41. Cromatogramas de Té verde con la segunda secuencia de elución escogida.....	124
Figura 42. Curva de linealidad con la nueva secuencia de limpieza para la infusión de Té negro.....	126
	Página
Ecuación 1. De Nernst.....	19
Ecuación 2. Ecuación de igualdad de $\Delta G$ .....	21
Ecuación 3. Diferencial de potencial a través de la membrana.....	21
Ecuación 4. Coeficiente de selectividad.....	22
Ecuación 5. Nicolsky-Eisenman.....	22
Ecuación 6. Tiempo de retención.....	27
Ecuación 7. Volumen de retención.....	27
Ecuación 8. Volumen de retención utilizando tiempos de retención.....	28
Ecuación 9. Coeficiente de reparto.....	28
Ecuación 10. Factor de capacidad en términos de tiempo de retención.....	28
Ecuación 11. Factor de capacidad en términos de concentración.....	28
Ecuación 12. Factor de capacidad con el coeficiente de partición.....	29
Ecuación 13. Número de platos teóricos.....	29
Ecuación 14. Número de platos teóricos expresada por el tiempo de retención y anchura de la base.....	30
Ecuación 15. Resolución.....	30
Ecuación 16. Cálculo de concentración por adición estándar.....	59
Ecuación 17. Cálculo de recobro.....	63



Tabla 1. Distribución de catequinas.....	10
Tabla 2. Clasificación de las técnicas de cromatografía líquida.....	25
Tabla 3. Principales funciones de los minerales en el organismo y principales fuentes de consumo .....	34
Tabla 4. IDR de los minerales en estudio y posibles malestares por la deficiencia y exceso de los minerales.....	35
Tabla 5. Cuantificación de iones $\text{Na}^+$ y $\text{K}^+$ en plantas usadas para infundonar.....	47
Tabla 6. Cuantificación de iones $\text{Ca}^{+2}$ en plantas usadas para infundonar.....	47
Tabla 7. Porcentaje de recobro y límite de detección en 4 muestras herbales...	48
Tabla 8. Características de las muestras de Té.....	52
Tabla 9. Niveles de la concentración estándar y sus respectivos ISA.....	53
Tabla 10. Formula de disolución de ISA para cada electrodo.....	53
Tabla 11. Disoluciones usadas para los electrodos selectivos de iones.....	55
Tabla 12. Concentración de las disoluciones sintéticas para evaluar la precisión con cada electrodo.....	56
Tabla 13. Secuencia completa de elución.....	65
Tabla 14. Secuencia de limpieza y elución para la eliminación de coloración en los extractos EFS .....	67
Tabla 15. Criterios de aceptación para los parámetros de validación.....	70
Tabla 16. Parámetros de desempeño.....	71
Tabla 17. Parámetros de desempeño.....	73
Tabla 18. Promedio de concentraciones con sus C.V. de los iones potasio y cloruro en matriz de Té verde y Té negro por método estándar externo.....	76
Tabla 19. Parámetros de desempeño por adiciones estándar.....	77
Tabla 20. Parámetros de desempeño por adiciones estándar.....	79
Tabla 21. Parámetros de desempeño por adiciones estándar.....	81
Tabla 22. Promedios de concentración con sus C.V. de $\text{Na}^+$ y $\text{Ca}^{2+}$ en matriz de Té verde y Té negro por el método de adición estándar.....	83
Tabla 23. Contenido de $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ , $\text{Ca}^{2+}$ y $\text{Cl}^-$ en infusiones de diferentes marcas de Té verde.....	86



Tabla 24. Contenido de $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ , $\text{Ca}^{2+}$ y $\text{Cl}^-$ en infusiones de diferentes marcas de Té negro.....	87
Tabla 25. Análisis de paso 1 para Té negro.....	93
Tabla 26. Análisis de paso 1 para Té verde.....	93
Tabla 27. Comparaciones realizadas al aplicar el método DMS para muestras de Té verde.....	94
Tabla 28. Comparaciones realizadas al aplicar el método DMS para muestras de Té negro.....	95
Tabla 29. Valores de tiempo de retención y factor de capacidad.....	99
Tabla 30. Valores de selectividad y resolución.....	99
Tabla 31. Valores de $\text{Log } k'w$ .....	101
Tabla 32. Volumen de fuga utilizando los valores de $k'w$ obtenidos.....	102
Tabla 33. Recuperación de triazinas con aplicación de eluyente de limpieza 90:10 ( $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$ ) y metanol.....	105
Tabla 34. Por ciento de recobro con metanol después de aplicar la mezcla 90:10 $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$ .....	105
Tabla 35. Por ciento de recobro de la mezcla de lavado 65:35 en 10X1 mL $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$ .....	106
Tabla 36. Por ciento de la mezcla de lavado 70:30 en 10X1 mL $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$ y posterior elución con metanol puro.....	107
Tabla 37. Porcentaje de la mezcla de lavado 70:30 en 3X1 mL y porcentaje de la mezcla de elución 10:90 en 10X1 mL $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$ .....	109
Tabla 38. Porcentaje de la mezcla de lavado 70:30 en 3X1 mL $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$ y porcentaje de la mezcla de elución 10:90 en 7X1 mL $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$ .....	110
Tabla 39. Porcentajes de recobro de dos ensayos similares .....	111
Tabla 40. Reproducibilidad de la secuencia completa de elución.....	112
Tabla 41. Por ciento de recobro después de la evaporación de extractos provenientes de agua purificada.....	113
Tabla 42. Parámetros de linealidad.....	114
Tabla 43. Parámetros de linealidad de infusión de Té negro.....	126
Tabla 44. Porcentajes de recobro de infusión de Té negro aplicando la secuencia de elución No. 5.....	127



**CAPÍTULO 1  
INTRODUCCIÓN**



## 1.1. INTRODUCCIÓN

El consumo del Té en la actualidad, es una costumbre común en varios países alrededor del mundo debido a las múltiples propiedades de este arbusto, entre estas propiedades se encuentra la prevención de las enfermedades cardiovasculares y el cáncer (Bruneton, 1999). El alto consumo del Té ha otorgado considerable importancia a sus cultivos, los cuales han inspirado innumerables investigaciones, desde su sembrado hasta la elaboración de infusiones del Té. El Té con sus diferentes procesos negro o verde (fermentada o seca solamente), rojo o blanco; al igual que sus presentaciones en hoja, en bolsita de Té, instantánea, o en combinación con alguna otra planta, provienen de la planta *Camellia sinensis* (Banerjee, 1992).

El Té en México ha cobrado un importante nicho en el comercio de las bebidas. Esta aseveración es sustentada por Diego Compeán distribuidor de “Twinings” en México, ya que este mercado está creciendo cerca de un 20% por año (La Jornada, 2007). Por esta razón, es necesario conocer la calidad del producto a diferentes niveles, particularmente en la composición química y la presencia de contaminantes. Para lograr este objetivo es necesario contar con métodos analíticos precisos y exactos, que no sean laboriosos y complejos, como los que se proponen en el presente trabajo.

Sin embargo, en México, la normatividad mexicana para el Té representada en las Normas Oficiales Mexicanas (NOM's), tiene limitaciones debido a que los métodos analíticos indicados son en muchos casos laboriosos y complejos o inexistentes como es el caso de contaminantes como las triazinas, herbicidas que se aplican en los cultivos del Té.

El control de plaguicidas es muy importante de realizar, ya que en las plantaciones del Té, esto son aplicados para aumentar la productividad de Té, ya que protegen a las plantas contra las plagas y enfermedades. Los productos químicos fitosanitarios aplicados en los cultivos de Té logran impregnarse en los brotes del arbusto y mantenerse en el producto terminado. De esta manera, algunos residuos que quedan en las hojas de Té seco se pueden transferir a las infusiones de Té de los consumidores.



En el caso de la determinación de las sales minerales, ésta se basa en la medición de los iones presentes en la planta misma o en las infusiones. Los métodos para la medición de los iones en las bebidas se presentan en la NOM-086-SSA1 y la NOM-201-SSA1-2002; la primera indica el método para medir sodio y la segunda para el cloro residual. Por lo que se propone la medición de iones, en el caso del Té verde y Té negro, por el método potenciométrico, con electrodos selectivos (ISE por sus siglas en inglés) debido a que esta técnica es sencilla y no es necesario utilizar cantidades grandes de muestra para la cuantificación de los iones.

En la actualidad los organismos reguladores a nivel mundial demandan una garantía de calidad en los alimentos, para garantizar la seguridad de éstos. Por el importante auge que ha tenido la venta de Té en México, es conveniente contar con un método para la determinación de estos productos químicos. Por lo anterior, es necesaria la implementación de métodos que cumplan con las características de las nuevas tecnologías; que sean rápidos, eficientes, sensibles, y de alta precisión en el análisis de residuos de plaguicidas. Gran parte de los métodos tradicionales existentes para el análisis y control de los niveles de residuos de plaguicidas en los productos, implican tiempos largos y procesos de extracción laboriosos, aunado a que en muchos casos, estos procesos de extracción de las muestras requieren grandes cantidades de disolvente que puede ser perjudicial para los seres humanos y el medio ambiente.

En el presente trabajo, se propone determinar a los iones principales de las infusiones de Té comerciales y optimizar un método de aislamiento de las triazinas. El método está basado en la técnica de Extracción en Fase Sólida (EFS), la cual se adapta bien al manejo de muestras acuosas como lo son las infusiones considerando que necesita poco volumen de muestra y disolventes para que funcione adecuadamente la extracción y concentración de las trazas de los plaguicidas, para después poder ser detectados y cuantificados por técnicas de análisis altamente eficientes como la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC por sus siglas en inglés) con detector UV. Además de que este método logra la disminución de costos y tiempo de prueba, sin afectar la precisión en el método.



---

En base a lo anterior se realizó el siguiente trabajo, cuyos objetivos fueron los siguientes:

### 1.2. Objetivos

1. Optimizar y validar métodos de medición selectiva de sodio, potasio, calcio y cloruro en infusiones de *Camellia sinensis* (Té), para la aplicación en productos de diferentes marcas comercializadas en la ciudad de México y comparar las concentraciones medidas con las indicadas en la etiqueta de los productos.
2. Optimizar y validar métodos de extracción en fase sólida para la extracción de herbicidas triazínicos en infusiones de *Camellia sinensis* (Té).
3. Analizar por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC) con detectores UV a herbicidas estudiados presentes en los extractos de las infusiones de Té comerciales obtenidos.



**CAPÍTULO 2**  
**GENERALIDADES**



---

## 2. GENERALIDADES

### 2.1. Breve historia del Té

La historia del Té es controversial, debido a que en diferentes lugares del mundo se ha utilizado como bebida de curación desde tiempos ancestrales, sin embargo, la cultura China fue la primera en documentar esta tradición. El Té se ha utilizado como droga, comida, entre otros usos, por tribus de las montañas chinas desde tiempos inmemoriales, esta costumbre fue aceptada y transmitida entre los pobladores. Hoy día, el arbusto de Té se cree originario del suroeste de China, con exactitud, del centro del distrito de Yunnan (Hara, 2001)

En 1690, E. Kaempfer, médico alemán con doctorado en botánica viajó a Japón y observó el hábito de la bebida de Té entre los pobladores. El nombre original de este arbusto del cual se produce la bebida fue "Té". En 1753, el famoso botánico C. Linné da el nombre de *Camellia sinensis* cambiando el nombre original de *Té sinensis*. Al darse este cambio de nombre, se produjo una confusión entre los dos nombres de *Camellia sinensis* y el nombre original del Té, sin embargo, en 1958, J.R. Sealy, botánico Inglés, clasificó a todas las plantas en el género de *Camellia* como se conocen hoy día. En la actualidad el arbusto del Té es conocido como *Camellia sinensis*, y se tienen dos variedades: (var, abreviatura en biología de variedad) var. *sinensis* y var *assamica* (Hara, 2001).

### 2.2. Características de la planta de Té

La planta del Té en estado silvestre llega a alcanzar de 5 a 10 metros de altura, es muy ramificado, cada tallo en su extremo tiene una yema que se convierte en un brote joven cubierto de una ligera pelusa (yema terminal o pekoe). En el mismo tallo por debajo de la yema terminal se encuentran varias hojas que han llegado a la madurez, estas hojas tienen diferentes tamaños, figura 1. Las hojas pueden ser pequeñas (China) o más desarrolladas (var. *assamica* de la India) como se muestra en la figura 2. Las flores son solitarias o en grupo de dos. La planta de Té cuando es cultivada regularmente se mantiene a una altura de alrededor de 1.2 metros para facilitar la cosecha (Bruneton, 1999).



figura.1. Arbusto de *Camellia sinensis*.  
(NOARO, 2011)

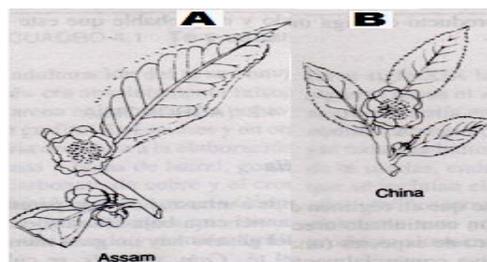


figura.2. Hojas de la variedad de *Camellia sinensis*  
A: hoja de var. *assamica de la India*;  
B: hoja var. *China var camellia*  
(Zhi Zheng Tea Shop, 2011)

### 2.2.1. Compuestos orgánicos de la planta de Té

Debido a que la planta del Té es muy fascinante, se ha dado un interés en el estudio e identificación de los compuestos de ésta. Alguno de estos constituyentes son los polifenoles, la cafeína, las vitaminas y los minerales ya que son de importancia médica (Banerjee, 1992). En general, se cree que los compuestos del Té, al interaccionar entre ellos, le den atributos de calidad al producto final del Té (Stagg y Millin, 1975).

- Cafeína (1,3,7-trimetilxantina) es un alcaloide purina constituye 2.5 a 5.5% del total de los componentes químicos del Té (base seca) y se produce junto con pequeñas cantidades de dimetilxantana, monometilxantana y la teofilina (Wood, et al., 1964).
- Vitaminas, el Té contiene una gran variedad de vitaminas que incluyen caroteno, riboflavina, ácido nicotínico, ácido pantoténico, ácido ascórbico y tiamina, aunque la mayoría de ellos se pierden durante el procesamiento de la hoja fresca a Té verde o Té negro (Banerjee, 1992).
- Los hidratos de carbono constituyen aproximadamente el 4 a 5% de los sólidos extraídos en infusión de Té. Aunque se concentran principalmente en las raíces, los carbohidratos no son comunes en las hojas. Desde el punto de vista nutricional, el contenido de hidratos de carbono no es significativo (Chakravarty, 1990; Banerjee, 1992).
- Los lípidos son un grupo interesante que muestra una marcada variación de su composición química. Las hojas jóvenes de Té, por ejemplo,



contienen más fosfatidil etanolamina y fosfatidil colina que las hojas maduras, pero diglicérido monogalactosil y glicérido digalactosil están presentes en concentraciones más altas en las hojas maduras (Roberts, 1974)

- Los fenoles son particularmente abundantes (hasta un 20%), la cantidad y tipo dependen principalmente de la variedad del arbusto, del clima, del terreno y de las prácticas del cultivo (Infante, 1997; Martínez, et al., 2002) la edad de la hoja (las hojas más jóvenes son los más ricos), y la temporada (el nivel es mayor en el verano que en primavera). Además de ácidos fenólicos y flavonoides, los componentes principales son compuestos de tipo flavonoides incluyendo, galato de epialocatequinas, epicatequina, el correspondiente 2,5-digalatos, epitequina (Bruneton, 1999)

Los polifenoles vegetales se distinguen por las siguientes cinco características generales (Isaza, 2007):

- a) solubilidad en agua.
- b) masa molecular de 500 y 3000 a 5000.
- c) estructura y carácter fenólicos (12 a 16 grupos fenólicos y 5 a 7 anillos aromáticos por cada 1000 unidades de masa molecular relativa).
- d) complejación intermolecular (astringencia).
- e) características estructurales como son dos motivos estructurales mayores, proantocianidinas o taninos condensados y taninos hidrolizables, más un tercer grupo minoritario, los florotaninos.

Entre los polifenoles más destacados para el Té negro y Té verde se encuentran los taninos y los flavonoides.

La palabra tanino es usada para referirse a una mezcla heterogénea de sustancias polifenólicas de origen vegetal, el peso molecular de estas moléculas está entre los 500 y los 3000. Los flavonoides desempeñan un papel importante en la biología vegetal; responden a la luz y controlan los niveles de las auxinas reguladoras del crecimiento y en la diferenciación de las plantas; también juegan un papel antifúngico y bacteriano, a su vez que confieren coloración a los productos que los contienen. Los flavonoides se ubican principalmente en las hojas y en el exterior de la planta, apareciendo sólo



rastros de ellos en la superficie del suelo. Uno de los flavonoides que se encuentran en el Té verde y Té negro son las catequinas, en la tabla 1 se presenta su distribución en porcentaje (Martínez, et al., 2002).

Tabla.1. Distribución de catequinas en el Té (Banerjee y Chaudhuri, 2000)

catequinas	Porcentaje
(+)galocatequinas	1.4
(-)epigalocatequinas	17.57
(-)epicaquinas	5.81
(-)epigalocatequinas galante	53.90
(-)epicatequinas gallate	12.52

Carotenoides y pigmentos. Los catorce compuestos carotenoides identificados en las hojas de Té se encuentran principalmente en las hojas maduras. Los pigmentos tienen propiedades médicas, particularmente en las enfermedades cardiovasculares, 125 a 250 mg de pigmentos de Té verde al día tienen un buen efecto en el ser humano (Banerjee y Chaudhuri, 2000).

### 2.2.2. Compuestos minerales de la planta de Té

Los minerales representan alrededor del 4 a 9% de la materia inorgánica del Té. Los minerales con mayor presencia en el Té son el flúor que se encuentran en las hojas que pueden prevenir la caries dental. El potasio por ser el ión con mayor presencia en las plantas podría tener un efecto complementario en las dietas que carecen de potasio (Banerjee y Chaudhuri, 2000).

Los nutrientes esenciales requeridos por los vegetales son elementos inorgánicos, en total son 19 elementos, de los cuales 16 son provistos por el suelo, llamados nutrientes minerales.

Para que un nutriente sea considerado esencial para el crecimiento del vegetal debe cumplir con tres criterios básicos (Arnon, 1988; Hewitt y Smith 1974):

- 1.- Que el elemento sea absolutamente requerido por la planta para completar un ciclo completo.
- 2.- No pueda ser reemplazado o sustituido por ningún otro elemento.
- 3.- El efecto en la planta debe ser directo.



El cloro desempeña funciones similares a las del potasio y como la mayoría del cloruro ( $\text{Cl}^-$ ) se aplica a los cultivos en forma de cloruro de potasio ( $\text{KCl}$ ) los efectos del  $\text{Cl}^-$  pueden estar enmascarados por el ión potasio ( $\text{K}^+$ ). En algunos cultivos como trigo, cebada, remolacha, coco y kiwi tienen un requerimiento específico del  $\text{Cl}^-$  que supera mucho a los niveles de un micronutriente (Von Uexkull, 1996).

El rol del cloruro en las plantas en las funciones bioquímicas esenciales como en la fotosíntesis (para la óptima evolución del oxígeno) y activación de enzimas (amilasa, esparaginasa sintetasa y ATPasa), en funciones osmóticas, en la actividad de estomas, en la tasa de multiplicación celular (la deficiencia de cloruro reduce el crecimiento de las hojas) (Xu, et al., 2000).

El calcio actúa modulando la acción de todas las hormonas vegetales, regulando la germinación de hojas y frutos.

El ión calcio libre, se reconoce actualmente como un regulador intracelular importante de numerosos procesos bioquímicos y fisiológicos. A continuación se presenta una descripción somera del mecanismo de acción del ión calcio:

1) La concentración citoplásmica de  $\text{Ca}^{2+}$  libre es baja (menos de un milimol) y está bajo control metabólico; 2) la concentración de calcio citoplasmática puede ser regulada por varias señales intra o extracelulares; 3) el calcio citoplasmático se une a proteínas receptoras (calmodulinas), que son activadas y capaces de modificar enzimas, otras actividades metabólicas como la mitosis, el crecimiento del ápice, la corriente citoplasmática, la germinación de las esporas inducida por los fitocromos, la formación de yemas en los musgos causada por la citoquinina. Se puede concluir que el calcio actúa como un segundo mensajero en bioregulación, vía calmodulina, regulada por calcio. (Hewitt y Smith, 1974)

El potasio es uno de los elementos esenciales en la nutrición de la planta y uno de los tres que se encuentra en pequeñas cantidades en los suelos, limitando el rendimiento de los cultivos. Es el catión celular más abundante. Se requieren altas concentraciones de potasio para la conformación activa de muchas enzimas que participan en el metabolismo. Concentraciones abundantes de  $\text{K}^+$  son necesarias para neutralizar los aniones solubles y macromoleculares del citoplasma, que tiene pocos cationes orgánicos. De esta manera el  $\text{K}^+$



contribuye bastante con el potencial osmótico. El transporte de potasio puede efectuarse por medio de una ATPasa de la membrana celular, activada. De tal manera que, las necesidades nutricionales de  $K^+$  se centran en cuatro roles bioquímicos y fisiológicos a saber (Hewitt y Smith, 1974):

- Activación enzimática,
- Procesos de transporte a través de membranas,
- Neutralización aniónica
- Potencial osmótico.

### 2.3. Proceso de Té negro y Té verde

A pesar de las variedades de Té comercial, todas son procedentes de la misma especie, *Camellia sinensis* (Banerjee y Chaudhuri, 2000), por lo tanto provienen de una planta en común. Para la producción del Té, desde la cosecha se realiza una selección de la hoja, al menos para los Té finos, esta forma de recolección a menudo se realiza de forma manual, sólo la yema apical (sin abrir) se recoge, por ser joven y flexible. También se realiza la cosecha mecánica como es el caso de la India y Corea; sin embargo, se reduce la calidad del Té (Bruneton, 1999). Por su fabricación el Té se clasifica en:

Té negro

Té verde

Té Oolong

Esta clasificación depende del grado de maceración de las células de las hojas durante el proceso de fabricación. (Banerjee y Chaudhuri, 2000).

#### 2.3.1. Té negro

Se conoce como Té negro o Té al producto obtenido mediante marchitado, enrulado, fermentado y secado de las yemas, hojas jóvenes, pecíolos y tallos tiernos (Audiencias ministro. República Argentina, 2010). La producción del Té negro se representa en la figura 3A. El primer paso es la cosecha de las hojas frescas, a continuación se realiza el paso de marchitado. En el marchitado se asegura una reducción en el nivel de humedad en las hojas; este proceso se



realiza con un chorro de aire caliente sobre la materia prima de 8 a 18 horas en una cámara especial. Durante este proceso, la humedad del Té se reduce entre 60% (duro marchitado) y 50% (suave marchitado), este paso sirve para dar suavidad a las hojas con el fin de obtener flexibilidad a éstas para el paso de enrollado. A pesar que el marchitado parezca un proceso físico, también implica procesos químicos, el más importante de estos procesos es la producción de compuestos polifenólicos, los cuales determinan el sabor del Té como las catequinas y el inicio de compuestos farmacológicos como son los taninos (Banerjee y Chaudhuri, 2000). A continuación las hojas marchitas son introducidas en máquinas que las comprimen y producen rollos de las hojas, permitiendo el rompimiento de las vacuolas de la hoja liberando a los polifenoles (catequinas) y a las enzimas (polifenol oxidasas) que se encuentran en la pared celular de las vacuolas, dando lugar a la producción de una capa homogénea de las enzimas. De esta manera se prepara la fermentación, que es el siguiente paso crucial en el procesamiento de Té (Banerjee y Chaudhuri, 2000; Takeo y Mahanta, 1972).

La fermentación, en realidad es un proceso de oxidación de los polifenoles por medio de las enzimas que fueron liberadas en el enrollamiento, este proceso dura de 45 minutos a 3 horas dependiendo de la calidad solicitada, esto se debe que a mayor tiempo la calidad y el costo del Té negro aumenta, con una atmósfera muy húmeda (90 a 95%) y una temperatura constante de 22 a 30°C. Independientemente de la duración, los productos terapéuticos y el color singular del Té negro se generan sobre todo en esta fase. Lo más importante es la oxidación de los flavonoides por parte de la polifenol oxidasa. Lo último en esta reacción, es la producción de teoflavinas y tearubiginas y su fracción con la configuración molecular característica. Estos componentes son responsables de la calidad y los atributos farmacológicos de Té (Banerjee y Chaudhuri, 2000). Finalmente se da el paso de secado, este paso tienen como finalidad detener la fermentación mediante la desactivación de las enzimas por medio de calor, dentro de este paso también se lleva a cabo una deshidratación del producto para su almacenamiento, al finalizar se realiza su clasificación por tamaño de partícula (entero o partido) (Banerjee y Chaudhuri, 2000; Audiencias Ministro , 2010).



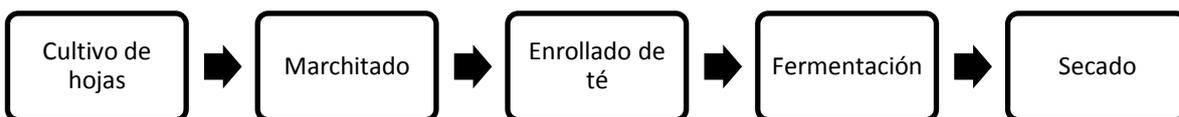
### 2.3.2. Té verde

La diferencia en proceso de Té verde con respecto al Té negro es evitar la fermentación (oxidación), por medio de las enzimas polifenol oxidasas. Esta desactivación de la enzima, se logra mediante el empleo de vapor de agua sobre las hojas cosechadas o por el método de paneo o “pan-firing” (nombre del método en español e inglés respectivamente), el cual consta de una cámara especial que tiene la capacidad de rotar y de aumentar la temperatura, esta cámara tiene el nombre de tambor (INTA, 2002; Banerjee y Chaudhuri, 2000).

La cocción con vapor es el primer paso en el proceso de Té verde, debido a que este paso asegura la desactivación de las enzimas polifenol oxidasas y otras enzimas, para que el color verde de las hojas se mantenga. La exposición al vapor de agua se lleva alrededor de 15 a 20 segundos dentro de la cámara giratoria (tambor), a continuación se realiza un enfriamiento de las hojas tratadas para que estén listas para el siguiente paso de enrollamiento. Antes de continuar con el proceso del Té verde se reduce el contenido de humedad alrededor de un 50%. El siguiente paso es mantener a las hojas a la exposición de la luz durante unos 10 minutos, a continuación se vuelve a meter al tambor alrededor de 20 minutos para que la hoja termine con 30% de humedad. El siguiente paso en el proceso, es volver a rotar las hojas dentro de la cámara y exponerlas al aire caliente durante 35 minutos, para terminar con una humedad en las hojas de un 4% (Banerjee y Chaudhuri, 2000). La siguiente etapa es la evaporación dentro del método de paneo o “pan-firing”, en este paso existen variantes, dependiendo del productor. Finalmente se da el paso de secado y tamaño de partícula, entero o partido, para la introducción al mercado (Takeo, 1992; Banerjee y Chaudhuri, 2000). Los pasos antes descritos se muestran en la figura 3B.



(A)



(B)

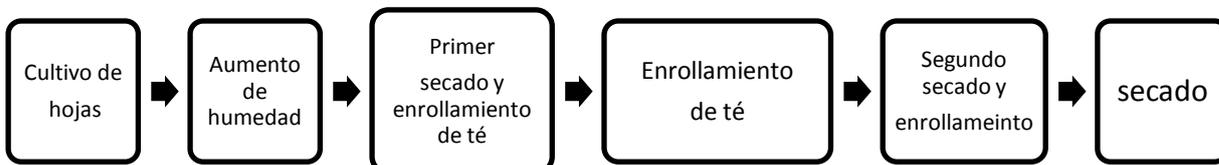


Figura.3. Proceso de producción de Té: A) Té negro B) Té verde

## 2.4. Estadísticas de producción de Té

### 2.4.1. Producción mundial

Entre 1995 y 2005, la producción mundial total de Té se ubicó entre 2.6 y 3.3 millones de toneladas al año, teniendo un incremento del 22.1 %. En el año 1995 se tuvo la menor producción con solo 2621082 toneladas y el máximo reportado fue en el 2004, con 3341827 toneladas. Sin embargo durante el año 2005 el registro de producción fue de 3200877 toneladas (4.2% menos al año anterior) la tendencia presenta parámetros positivos a lo largo del periodo. En la figura 4 se presenta una grafica de producción durante 11 años seguidos (Audiencias ministro. República Argentina, 2010).

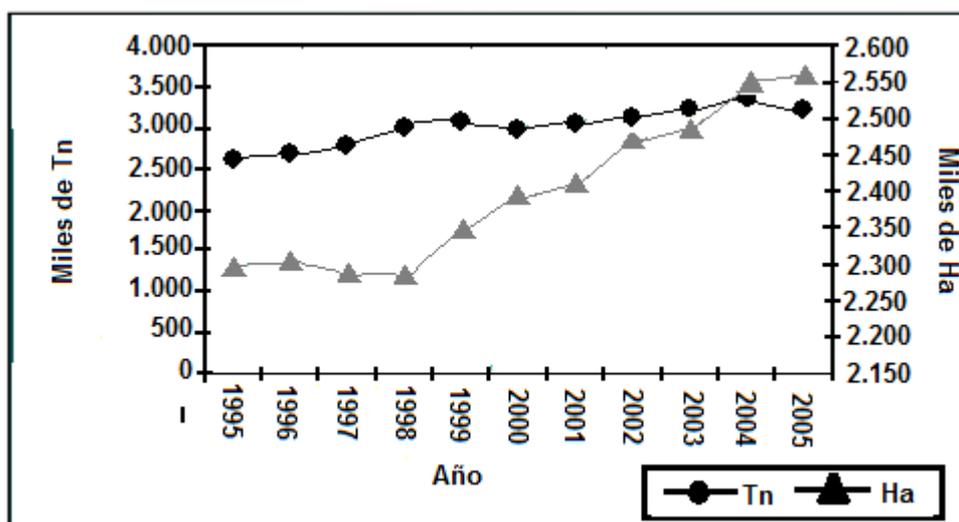


Figura.4. Evolución de la producción mundial de Té (1995-2005) (Audiencias ministro. República Argentina, 2010)



El cultivo del Té se realiza en todos los continentes. La variabilidad agrícola de cada zona productora, permite obtener materias primas que originan productos con características distintas.

### 2.4.2. Principales productores mundiales

Los países que son los principales productores a nivel mundial son China e India. Durante el 2005 aportaron el 48.5 % del total de la producción mundial (28.13% y 20.84% respectivamente), los países que los siguen son Sri Lanka y Kenia los cuales encabezan el listado a nivel mundial desde 1994. El representante de América Latina es Argentina con alrededor del 2% en el mercado, siendo el valor registrado en 2005. En la figura 5, se presenta la producción de los principales países productores de Té (Audiencias ministro. República Argentina, 2010).

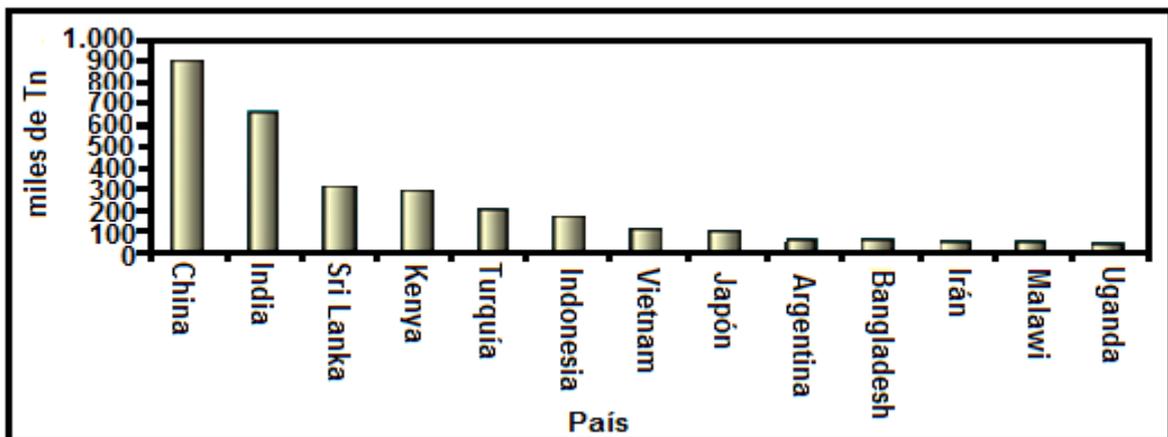


Figura.5. Principales países productores de Té. Año 2005 (Audiencias ministro. República Argentina, 2010)

### 2.5. Diferencia entre Té e infusión

En el caso de las infusiones en el libro de farmacia del Regminton (Gennaro, 1998) menciona dos definiciones: La primera, "Las infusiones son preparados líquidos que se elaboran por medio de la extracción de sustancias vegetales con agua caliente o fría" y la segunda, "Una infusión es una solución de los componentes fácilmente solubles de las plantas o frutos. Las infusiones frescas



se preparan macerando los productos vegetales por un lapso breve con agua fría o en ebullición”.

Para la definición de Té se toma de las leyes Argentinas del capítulo XV denominada productos estimulantes o fruitivos, de acuerdo al artículo 1181, en el que indica lo siguiente (Audiencias ministro. República Argentina, 2010): "Con la denominación genérica de Té, se entiende exclusivamente el producto obtenido por el procesamiento conveniente de las yemas, hojas jóvenes, pecíolos y tallos tiernos de la especie *Camellia sinensis L*".

El Té destinado a la preparación de infusiones podrá ser:

1. "Té o Té negro, que corresponde al producto obtenido mediante marchitado, enrulado, fermentado y secado de las yemas, hojas jóvenes, pecíolos y tallos tiernos".
2. "Té verde, que corresponde al producto obtenido por calentado, enrulado, secado de las yemas, hojas jóvenes, pecíolos y tallos tiernos sin que hayan experimentado ningún proceso de fermentación".

Se toma la legislación argentina debido a que en ésta se describe tanto al Té verde como al Té negro, ya que en el caso de la legislación Mexicana en la NMX-F-162-1982 solo se menciona al Té negro.

### **2.5.1. Características de la bebida de Té**

La infusión de Té verde es poco aromática, de sabor amargo y de color verdosa; a diferencia de la infusión del Té negro que es más aromática de sabor astringente y es de color rojizo. El extracto del Té se utiliza para dar sabor a las bebidas, helados y otros postres lácteos (Audiencias ministro. República Argentina, 2010).

### **2.5.2. Legislación**

Para la realización de las infusiones de este estudio se utilizaron cajas con bolsas con un contenido de 1 a 2 g de Té triturado, debido a que este tipo de producto se indica en la legislación Argentina; en el capítulo XV denominado productos estimulantes o fruitivos, en el artículo 1189, se describe la



presentación del producto final, a continuación se indica lo descrito en este artículo:

"Se entiende por Té en bolsitas (Té en saquitos o Té en saquitones), el Té contenido en un envase de papel apropiado para realizar la infusión, el que deberá reunir los siguientes requisitos:

a) El material de las bolsitas deberá ser inocuo para la salud, de estructura fibrosa y deberá presentar neutralidad de sabor.

Además deberá responder a las características tales que permitan filtrar en caliente y a ebullición.

Tendrá flexibilidad y resistencia mecánica y permitirá la difusión rápida y completa de la infusión, con retención de las partículas más pequeñas del Té.

Deberá estar libre de sustancias capaces de conferir mal olor o sabor a la infusión del Té.

b) Las bolsitas de papel, en todos sus tipos o variedades (bolsitas plegadas de 1 ó 2 cámaras, saquitos y saquitones), cargadas con el Té y mojadas, deberán ser resistentes a todas las manipulaciones a que sean sometidas.

Para obtener esta resistencia se autoriza el agregado de fibras artificiales y/o resinas sintéticas que cumplan con las exigencias especificadas dentro del presente Código.

En todos los casos el material de las bolsitas deberá ser oficialmente autorizado para su uso.

c) Cuando las bolsitas tengan hilo, éste deberá ser de algodón puro, crudo u otro material autorizado, sin colorear, fino y apto para estar en contacto con productos alimenticios.

Su largo será adecuado para los fines a que se destine.

d) El envasado y cierre de las bolsitas deberá practicarse mecánicamente así como también su empaquetado, de manera tal que se las preserve del efecto de la humedad y no se incorporen olores extraños al producto.

En el rótulo principal y en forma bien visible se deberá consignar la leyenda: En bolsitas, en saquitos o en saquitones, además del peso neto de cada unidad, número de éstas y año de elaboración (Audiencias ministro. República Argentina, 2010).



Se toma como referencia la legislación argentina debido a que en la legislación mexicana no hay normas que regulen este tipo de productos.

## 2.6. Potenciometría con electrodos selectivos de iones

### 2.6.1. Potenciometría

La potenciometría es una técnica electroanalítica utilizada para determinar la concentración de una especie electroquímica en disolución; esto es posible debido a que los potenciales de las celdas electroquímicas están relacionados con las actividades de los reactivos y los productos de la reacción, que a su vez están relacionados con las respectivas concentraciones molares, estas dos variables se pueden relacionar mediante la ecuación de Nernst, ecuación 1.

$$E = E^0 - \frac{0.059}{n} \log \frac{[C]^c [D]^d}{[A]^a [B]^b} \dots \dots (1)$$

$E^0$ = potencial estándar de electrodo, característica de cada semireacción.

$n$ = número de moles de electrones que aparecen en la semireacción para el proceso de electrodo.

Las letras que se encuentran dentro de corchetes representan las actividades, pero como se ha mencionado anteriormente con frecuencia se hace la aproximación de las actividades para que se igualen a las concentraciones molares.

Los métodos potenciométricos se basan en la medición del potencial de una celda electroquímica, la cual emplea un electrodo de referencia y un electrodo de trabajo. El electrodo de trabajo responde a los cambios de actividad del analito, y el electrodo de referencia que se encuentra en un compartimento separado generando un potencial de referencia constante como se muestra en la figura 6.

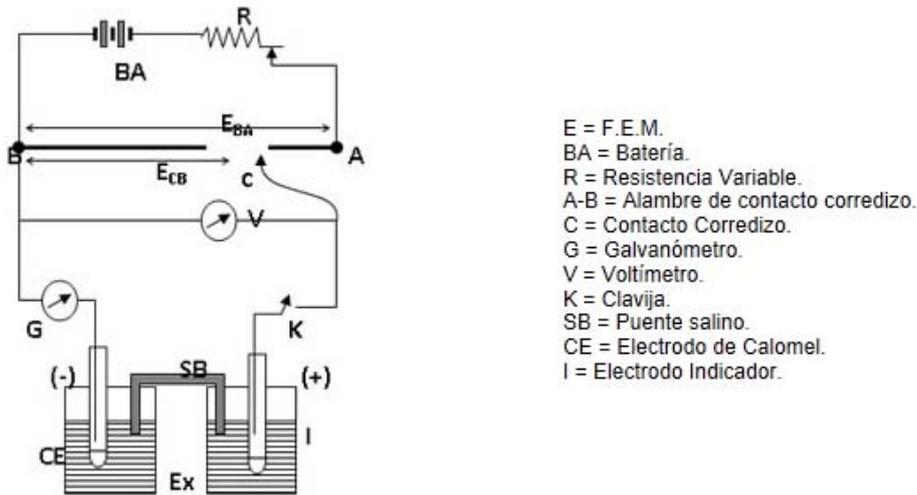


Figura.6. Diagrama de celda electroquímica con su diagrama eléctrico correspondiente. (QuimiNet.com, 2000)

La potenciometría es aplicada en los estudios de contaminantes de las aguas urbanas, la caracterización fisicoquímica de productos de consumo humano, titulaciones potenciométricas, entre otros. En la actualidad, las concentraciones iónicas de productos se miden mediante el uso de electrodos de membrana diseñados específicamente, conocidos como electrodos selectivos de iones (por sus siglas en inglés ISE) (Charlot, 1975; Skoog, et al., 1999)

### 2.6.2. Características de electrodos selectivos de iones

Los electrodos selectivos de iones son sensores electroquímicos que responden de manera lineal al logaritmo de la actividad de un ión en disolución. Una característica que los diferencia de los demás electrodos, es que no están basados en las reacciones de oxidación-reducción. Esta característica es debida a que los electrodos selectivos de iones poseen una membrana delgada, a través de la cual puede migrar sólo el ion al que está destinada, de esta manera los demás iones no pueden atravesarla. Este fenómeno se puede explicar de la siguiente manera. Debido a que la membrana se encuentra saturada de una disolución de un ligando unido al ion seleccionado, los demás iones no se pueden unir con facilidad al ligando de la membrana. Al colocar el electrodo dentro de una disolución problema donde se encuentra presente el ion seleccionado, se presenta una difusión de iones a través de la membrana, al



difundirse los iones A con actividad (A1) y (A2), esta difusión crea un exceso de carga positiva en uno de los lados de la membrana mientras que en la opuesta crea un exceso de carga negativa, este exceso de carga restringe el paso del ion seleccionado. Esta diferencia de potencial en el equilibrio (E), como resultado de la difusión del ión, se interpreta como la diferencia de concentraciones (en realidad, actividades) a ambos lados de la membrana (Charlot, 1975; Harris, 2001).

En el caso del estado estacionario, el descenso de la energía libre es compensado por el aumento de energía libre, esto se debe a la repulsión de cargas del mismo signo:

$$-RT \ln \left( \frac{A1}{A2} \right) = -nFE \dots (2)$$

En la ecuación 2 en el lado izquierdo de la igualdad el  $\Delta G$  se debe a la diferencia de la actividad, para el lado derecho el  $\Delta G$  se debe al desequilibrio de cargas (Harris, 2001).

Para la ecuación 2, donde F es la constante de Faraday y n es la carga del ión. Se convierten los logaritmos neperianos en decimales, y se despeja E, se obtiene la expresión de la diferencia de potencial a través de la membrana de la siguiente manera:

$$E = \left( \frac{Rt}{nF} \right) \ln \left( \frac{A1}{A2} \right) = \frac{0.05916}{n} \log \left( \frac{A1}{A2} \right) \text{ (voltios a } 25 \text{ }^\circ\text{C)} \dots (3)$$

La ecuación 3, representa la diferencia de potencial eléctrico de un electrodo selectivo de iones, el cual se aplica a cualquier ISE, inclusive el electrodo de vidrio de pH (Harris, 2001).

### 2.6.2.1. Calibración de electrodos selectivos de iones

Para empezar a trabajar con un electrodo selectivo de iones es necesario realizar una calibración a través de una curva, graficando los resultados del potencial obtenido contra el logaritmo de la actividad o la concentración. Lo



anterior, debido a que los electrodos selectivos de iones responden de forma lineal al logaritmo de la actividad del analito a lo largo de cuatro o seis órdenes de magnitud de actividad. Para la precisión, se realiza curvas de calibración, usando disoluciones con un rango de concentración del ión similar a la muestra. Para el caso de las disoluciones de calibración se utilizan sales con un catión común o anión común. Para que se realice el procedimiento de los electrodos selectivos de membrana se recomienda utilizar un ajustador de fuerza iónica mediante la adición de una sal inerte (García, et al., 2002; Thermo electron Corporation, 2003).

### 2.6.2.2. Factores que afectan a los electrodos selectivos de iones

Los electrodos selectivos de iones presentan limitaciones en su uso, estas limitaciones son factores como selectividad, tiempo de respuesta, temperatura de trabajo y materia orgánica, entre las más importantes.

Selectividad. Debido a que los electrodos selectivos de iones no logran responder exclusivamente a un solo ión. “Un electrodo usado para medir un ión A también responde a un ión X”. Para la solución de este problema, la potenciometría utiliza “el coeficiente de selectividad para expresar la respuesta relativa del electrodo a diferentes especies de la misma carga” (Harris, 2001).

$$k_{A,X} = \frac{\text{respuesta a X}}{\text{respuesta a A}} \dots (4)$$

La ecuación 4 representa la fórmula del coeficiente de selectividad. Este coeficiente de selectividad entre menor sea su valor, menor es la respuesta del interferente (Harris, 2001).

Para interferencia de iones de la misma carga que el ión primario, la respuesta del electrodo obedece a la ecuación de Nicolsky-Eisenman ecuación 5:

$$E = \text{constante} + \left( \frac{2.303RT}{z_A F} \right) \log [a_A + k_{A,B}^{pot} a_B^{z_A/z_B} + k_{A,C}^{pot} a_C^{z_A/z_C} \dots] \dots (5)$$



Donde:

$E$  = es la FEM observada experimentalmente de la celda (en voltios) cuando las únicas variables son las actividades en la disolución.

$R$  = es la constante de los gases.

$T$  = es la temperatura absoluta (en grados Kelvin).

$F$  = es la constante de Faraday y es igual a  $9.64867 \times 10^4 \text{ Cmol}^{-1}$ .

$a_A$  = es la actividad de los iones A.

$a_B$  y  $a_C$  = son las actividades de los iones que interfieren, B y C, respectivamente.

$K_{A,B}^{\text{pot}}$  = es el coeficiente de selectividad potenciométrico de iones B con respecto a los iones principales A.

$z_A$  = es el número de carga (número entero con signo y magnitud que corresponde a la carga absoluta del ión principal A).

$Z_B$  y  $Z_C$  = número de modificación correspondiente al cambio de iones de interferencia, de banda C, respectivamente. El signo de estas cantidades de carga es la misma que la de iones principales (Cosofret y Buck, 1992).

Tiempo de respuesta. Los electrodos tienen tiempo de respuesta que puede ser desde unos segundos hasta llegar a minutos dependiendo el tiempo necesario para que llegue al equilibrio la difusión de los iones presentes. Este parámetro puede ser afectado por la concentración del analito o la concentración de los interferentes (Cosofret y Buck, 1992).

Temperatura de respuesta. Los electrodos deben de calibrarse a la misma temperatura que se hacen las medidas porque al cambiar la temperatura, las respuestas de los electrodos cambian aumentando o disminuyendo el potencial. Por esta razón es necesario realizar las curvas de calibración en diferentes momentos de su uso (Cosofret y Buck, 1992; Thermo electron Corporation, 2003).

Contaminantes orgánicos. Los electrodos son sensibles a la contaminación con proteínas u otros solutos orgánicos que ocasionan respuestas falsas o que el tiempo de respuesta sea mayor al esperado. Se recomienda el reacondicionamiento del electrodo en el caso de que la disolución problema contenga demasiadas interferencias (Cosofret y Buck, 1992; Thermo electron Corporation, 2003).



### 2.6.3. Tipos de electrodos

El desarrollo de membranas de otras sustancias para la construcción de electrodos selectivos para varios iones, ha hecho que el electrodo de vidrio, sea solamente uno más de la amplia clase de electrodos de membrana selectiva de iones (Bermejo, 1974) (Harris, 2001).

La mayoría de los electrodos selectivos se puede clasificar en alguna de las siguientes clases (Harris, 2001; Bermejo, 1974; Cosofret y Buck, 1992):

- 1.- Membrana de vidrio para  $H^+$  y algunos cationes monovalentes.
- 2.- Electrodos de estado sólido, basados en cristales de sales inorgánicas.
  - A. En estado sólido homogéneo.
  - B. En estado sólido heterogéneo.
- 3.- Electrodos basados en líquidos, que usan una membrana hidrófoba saturada con un intercambiador líquido hidrófobo.
  - a) Ligandos cargados eléctricamente (cambiadores de iones) como componentes de la membrana (electrodos de membrana, electrodos de membrana con una matriz de PVC).
  - b) Ligandos eléctricamente neutros como componentes de la membrana.
- 4.- Electrodos compuestos, con un electrodo selectivo a una especie, separado por una membrana, que es capaz de separar esa especie de otras, o que genera la especie en una reacción química. Membranas de enzimas inmovilizadas (en contraste con los electrodos de los grupos anteriores, éstos pueden ser usados para la determinación de especies eléctricamente neutras).

### 2.7. Cromatografía

La cromatografía es una técnica ampliamente empleada en la separación, identificación y determinación de los componentes químicos de mezclas complejas. Ningún a otra técnica de separación es tan poderosa y con tantas aplicaciones (Skoog, et al., 1999).



### 2.7.1. Clasificación de la cromatografía de líquidos

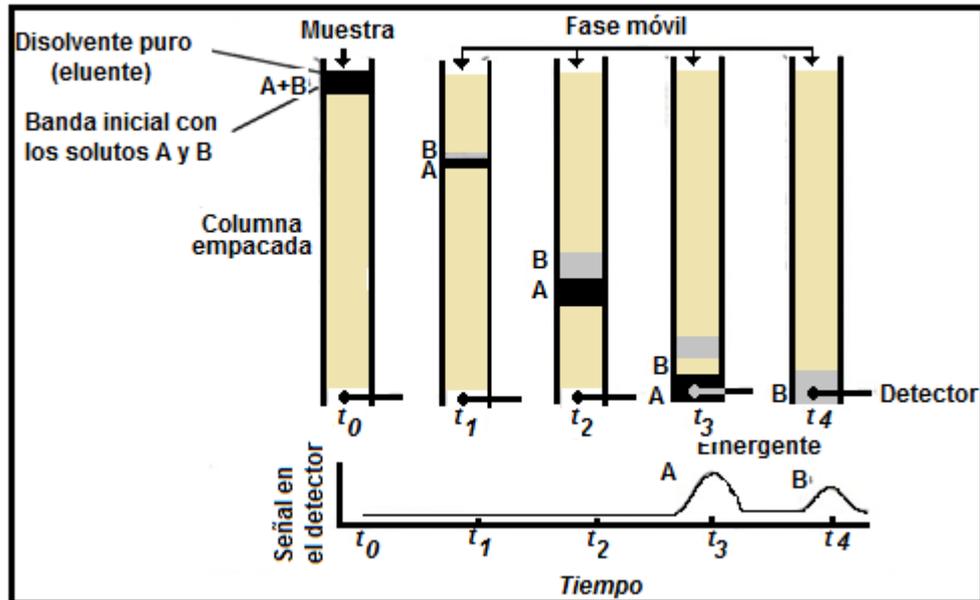
La cromatografía de líquidos se divide en varias categorías en función del mecanismo de interacción del soluto con la fase estacionaria, como se muestra en la tabla 2:

Tabla.2. Clasificación de las técnicas de cromatografía líquida (Bermejo, 1974).

Clasificación	Método específico	Fase estacionaria	Tipo de equilibrio
Cromatografía líquida (CL) (fase móvil líquida)	Líquido-líquido, o reparto	Líquido adsorbido sobre un sólido	Reparto entre líquidos inmiscibles
	Líquido fase unida	Especie orgánica unida a una especie sólida	Reparto entre líquidos y superficie unida
	Líquido sólido o adsorción	Sólido	Adsorción
	Intercambio iónico	Resina intercambio iónico	Intercambio iónico
	Exclusión por tamaño	Líquidos en intersticios	Reparto/ tamizado

### 2.7.2. Teoría general de cromatografía

En la figura 7 se muestra el proceso que se lleva a cabo en la cromatografía de adsorción, la cual representa a la cromatografía de líquidos clásica. Una disolución que contiene los solutos A y B que se depositan en la entrada de una columna empacada con partículas sólidas. A continuación se añade un disolvente por la entrada de la columna y la mezcla es eluida por la columna mediante un flujo continuo de disolvente. Si el soluto B se adsorbe más fuertemente que el soluto A en la partículas sólidas, entonces el primero en aparecer fuera de la columna es el soluto A. El soluto B desciende por la columna mas lentamente que el soluto A y emerge por la salida después del soluto A. De igual forma se muestra en la figura 7, la representación de un cromatograma, el cual representa la separación de los compuestos detectados. De ese modo se separa una mezcla en sus componentes, por un método por cromatografía de líquidos de alta resolución, HPLC por sus siglas en inglés (Harris, 2001).



**Figura.7.** Esquema de la separación cromatográfica. Se observa que el soluto B tiene mayor afinidad a la fase estacionaria permaneciendo mayor tiempo en la columna. (Skoog, et al., 1999)

### 2.7.2.1. Parámetros de cromatografía

En la cromatografía de adsorción el proceso de elución es muy importante debido que este proceso es fundamental en la separación de los analitos. Este proceso se lleva a cabo mediante la competencia del disolvente con las moléculas del soluto por ocupar los sitios activos de la fase estacionaria. La diferente capacidad de los distintos disolventes para eluir un soluto de un adsorbente es prácticamente independiente de la naturaleza del soluto. Se puede describir a la elución como el desplazamiento de un soluto de la fase estacionaria por un disolvente.

La cromatografía de adsorción sobre sílice pura es un ejemplo de cromatografía de fase normal, que se caracteriza por usar una fase estacionaria polar y un eluyente menos polar. Un disolvente más polar tiene fuerza eluyente mayor. La cromatografía de fase inversa, que es la más utilizada, se caracteriza porque la fase estacionaria es no polar o débilmente polar y el disolvente es más polar. Un disolvente menos polar tiene mayor fuerza eluyente. Una ventaja que presenta la cromatografía en fase inversa a la



cromatografía normal, es que es menos sensible a impurezas polares (como el agua) que puede haber en el eluyente (Harris, 2001).

Para entender el fenómeno de adsorción es necesario explicar los parámetros relacionados a este fenómeno como son el tiempo de retención ajustada, volumen de retención, coeficiente de reparto, factor de capacidad, factor de selectividad y resolución.

El tiempo de retención relativo  $t_r'$  de un soluto, es el tiempo de más que necesita en soluto para atravesar toda la columna, respecto a que emplea un disolvente no retenido, el tiempo de retención relativo se describe en la ecuación 6. Para conocer el tiempo de retención relativo es necesario conocer los parámetros de tiempo cero o tiempo muerto y el tiempo de retención. El tiempo de retención  $t_r$  de un componente, es el tiempo necesario para que este compuesto sea eluído a lo largo de la columna por la fase móvil hasta llegar al detector. El tiempo cero o muerto  $t_0$  es el tiempo en que las moléculas de la fase móvil tardan en atravesar la columna sin ser retenidas por la fase estacionaria mediante un caudal determinado (Harris, 2001; Skoog, et al., 1999)

$$t_r' = t_r - t_0 \dots (6)$$

El volumen de retención  $V_r$ , es el volumen de la fase móvil necesaria para la elución de un soluto determinado a través de la columna, representada matemáticamente con la expresión 7 (Harris, 2001).

$$V_r = V_0 + KV_E \dots (7)$$

$V_r$ : volumen de retención

$V_0$ : volumen de la fase móvil en el sistema (volumen muerto)

K: constante de reparto

$V_E$ : volumen efectivo en la fase estacionaria

Otra forma de expresar el volumen de retención es utilizando los tiempos de retención y tiempos muertos, se expresa de la siguiente manera ecuación.8:



$$V_r = V_0 \left( \frac{t_r}{t_0} \right) \dots (8)$$

El coeficiente de reparto es la expresión utilizada para definir la cualidad que tienen los componentes en repartirse entre la fase móvil y la fase estacionaria, este coeficiente se representa con la ecuación 9.

$$K = \frac{C_s}{C_M} \dots (9)$$

Donde  $C_s$  es la concentración molar analítica de un soluto en la fase estacionaria y  $C_M$  es la concentración analítica en la fase móvil. Si esta expresión fuera ideal se tendría una relación directa entre  $C_s$  y  $C_M$  (Skoog, et al., 1999).

El factor de capacidad  $k'$ , es un parámetro que se emplea para describir la velocidad de migración del soluto en la columna, como se maneja tiempos se puede expresar mediante tiempo de retención y tiempo cero, ecuación 10:

$$k' = \frac{t_r - t_0}{t_0} \dots (10)$$

Cuanto más tiempo retiene la columna a un componente, mayor es su factor de capacidad. Sin embargo, el analito al pasar por la columna se dispersa entre la fase estacionaria y la fase móvil, esto quiere decir que una concentración molar de soluto está en la fase estacionaria y una concentración molar de soluto está en la fase móvil, de tal forma que se puede expresar el factor de capacidad en términos de concentración, ecuación 11:

$$k_c = \frac{C_s V_s}{C_m V_m} \dots (11)$$

Donde  $C_s$  es la concentración del soluto en la fase estacionaria,  $V_s$  es el volumen de la fase estacionaria,  $C_m$  es la concentración del soluto en la fase móvil y  $V_m$  es el volumen de la fase móvil (Harris, 2001).



El factor de capacidad se puede relacionar con el coeficiente de reparto, esto se logra utilizando la ecuación 11. Debido a que al trabajar con las concentraciones de la fase móvil con las concentraciones de la fase estacionaria, se llegará a un equilibrio en el cual  $C_s/C_m$  se convierte en el coeficiente de reparto. Por consiguiente, se llega a la ecuación 12:

$$k' = K \frac{V_s}{V_m} \dots (12)$$

La relación de la retención relativa de dos solutos es proporcional al cociente de sus coeficientes de reparto. Este es el fundamento físico de la cromatografía. Debido a que relaciona el tiempo de retención con el coeficiente de reparto y los volúmenes de las fases móvil y estacionaria, como  $t_r = k' = K$ , de esta manera la retención relativa se expresa como (Harris, 2001):

$$\alpha = \frac{t'_2}{t'_1} = \frac{k'_2}{k'_1} = \frac{k_2}{k_1}$$

Para la eficiencia de separación en la cromatografía se encuentran dos factores fundamentales como lo son la diferencia de tiempo de elución de los respectivos picos: cuanto más distantes sean, mejor será la separación. El otro factor es la anchura de los picos: cuanto más anchos sean los picos, peor será la separación.

En mediciones cuantitativas de la eficiencia de la columna cromatográfica se emplean los términos: altura del plato (H) y número de platos teóricos (N), estos dos términos se encuentran relacionados mediante la ecuación 13 (Skoog, et al., 1999):

$$N = \frac{L}{H} \dots (13)$$

En donde L es la longitud del empaque de la columna.

También se puede expresar el número de platos teóricos en función del tiempo de retención del pico  $t_r$  y la anchura en la base w, ecuación 14 (Harris, 2001):



$$N = \frac{16t_r^2}{w^2} \dots (14)$$

La resolución  $R_s$  de una columna proporciona una medición cuantitativa de su capacidad para separar dos analitos. La resolución queda definida en la ecuación 15:

$$R_s = \frac{2\Delta Z}{W_A + W_B} \dots (15)$$

Donde  $\Delta Z$  representa la diferencia de la sustracción de los tiempos de retención del analito A y analito B,  $W_A$  y  $W_B$  representa lo ancho de la base de los picos del analito A y B. La resolución para una fase estacionaria dada se puede mejorar aumentando la longitud de la columna, incrementando así el número de platos. Sin embargo al aumentar el número de platos se aumenta el tiempo de elución de los solutos (Skoog, et al., 1999).

## 2.8. Extracción en fase sólida (EFS)

La EFS es una técnica simple pero muy potente para la extracción de compuestos y para limpieza de muestras, sin olvidar mencionar lo rápido y económico. La columna de EFS consiste en una fase estacionaria compuesta por un adsorbente, retenido entre dos discos porosos en un cartucho desechable. Con esta técnica es posible realizar preconcentraciones de la muestra, sin el temor de pérdidas ni de contaminaciones de la misma, debido a que los componentes de interés son retenidos en la fase sólida mientras los contaminantes son eluidos (Chafer, 2006).

Al trabajar con la extracción en fase sólida (EFS) en una única etapa de equilibrio, el proceso es muy parecido a la extracción líquido-líquido, la diferencia que se encuentra es que el líquido inmiscible es reemplazado por el adsorbente sólido (Hennion, 1999). Si los analitos quedan retenidos en la fase sólida, puede ser desorbidos mediante el lavado con un disolvente selectivo adecuado. En caso que los analitos quedaran en la fase líquida, se recupera



mediante evaporación del disolvente, separación cromatográfica o recristalización (Sigma-Aldrich Co., 2010; Hennion, 1999).

Para que en la EFS se obtenga provecho es necesario que el adsorbente se encuentre bien empacado en una columna (cartucho), para que se lleve a cabo un cauce homogéneo que permita una distribución de flujo apropiado (Sigma-Aldrich Co., 2010).

En la EFS los principales factores que se toman en cuenta es la selección del sólido adsorbente y de los disolventes seleccionados para ser utilizados en la elución. Se debe de considerar el perfil químico y la polaridad de la muestra y del disolvente en que se encuentra, para elegir el adsorbente sólido, el cual debe de tener una actividad y tamaño de partícula adecuado (Sigma-Aldrich Co., 2010; Pichon, 2000).

Los pasos para poder llevar a cabo la EFS son los siguientes:

1.-Activación: El primer paso es la activación en la que se utiliza un solvente orgánico para "humidificar" la fase (Guillem, 2012).

2.-Acondicionamiento: Antes de la aplicación de la muestra se tiene que preparar la fase, debido a que se busca obtener interacciones posibles. Este paso se consigue solvatando la fase con el mismo solvente de la matriz. El acondicionamiento permite "alinearse" la fase estacionaria lejos de la superficie de la sílice, permitiendo la interacción entre el analito y la fase estacionaria. Por ejemplo, se pasa un volumen de disolvente adecuado a través de la fase, seguido de un volumen de líquido similar a la matriz de la muestra (Guillem, 2012; Sigma-Aldrich Co., 2010).

3.-Retención: Al ser aplicada la muestra, las interacciones entre las moléculas de la muestra y la fase estacionaria controlan la retención en el adsorbente. Los componentes de interés son retenidos en la fase mientras que la matriz y parte de los contaminantes son eluidos. En la figura 8 se muestra un ejemplo. Una vez aplicada la muestra, el analito (■) y, quizás, otros componentes de la matriz (● y ▲), quedan retenidos en la fase debido a una o varias interacciones químicas (por ejemplo, de Van der Waals, o no-polares entre la cadena alifática del analito y la cadena alifática de una fase C18). Otros componentes de la matriz pueden pasar a través de la fase sin ser retenidos (Guillem, 2012; Sigma-Aldrich Co., 2010).

4.-Lavado: En este paso se trata de eliminar componentes de la matriz no deseados (contaminantes) que hayan quedado retenidos en la fase en el paso de retención. Se pueden utilizar mezclas hidroorgánicas adecuadas. En la figura 8 se muestra como los contaminantes (  $\Delta$  y  $O$  ) son eliminados quedando solo el analito de interés (Guillem, 2012; Sigma-Aldrich Co., 2010).

5.-Elución: La elución del o los analitos a estudiar se realiza mediante un eluyente adecuado. Debe elegirse un disolvente de elución capaz de romper sólo la interacción entre el analito y la fase, obteniendo así una elución selectiva del analito. Viendo la figura 8, se observa como el analito (  $\blacksquare$  ) es desorbido de la fase estacionaria, obteniendo al analito puro (Guillem, 2012; Sigma-Aldrich Co., 2010).

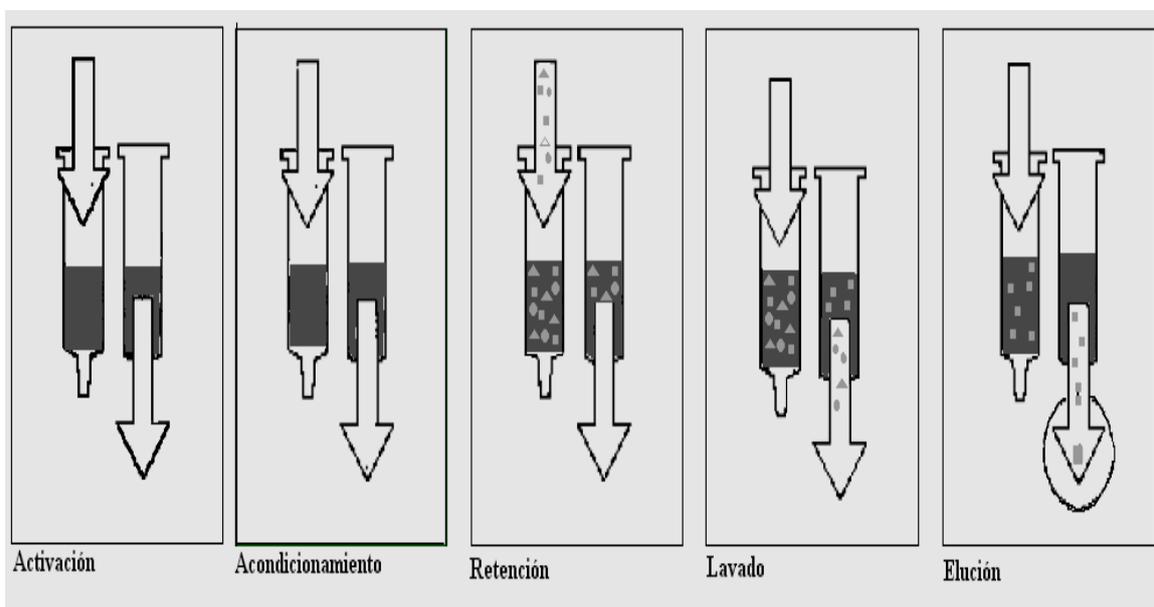


Figura.8. Pasos para realizar una extracción en fase sólida (Guillem, 2012).

## 2.9. Iones

### 2.9.1. Características generales de los iones

Los iones del sodio como el potasio están muy difundidos en la naturaleza. Los dos son blandos de color blanco argentino, que se vuelve gris al exponerse al aire. En la naturaleza no se encuentran en forma metálica, sino formando parte de una gran variedad de minerales (UNAM. Facultad de Química., 2007; Babor y Ibarz, 1977).



El calcio es una de los mas abundantes en la tierra sin embargo no se encuentra en forma natural, se encuentra en silicatos, carbonatos, fosfatos y sulfatos. Por su abundancia es el sexto elemento en la tierra (Choppin, et al., 1977).

El cloro es un gas de color amarillo verdoso, por ser muy activo químicamente, no se encuentra libre en la naturaleza, normalmente se encuentra mezclado, su compuesto más abundante es el NaCl, cloruro de sodio o sal común (Rinco y Rocha, 1976).

### **2.9.2. Valor nutrimental**

Los minerales son muy importantes para lograr un buen mantenimiento del cuerpo en perfecto estado de salud. Sin embargo el cuerpo humano no puede fabricarlos, debe utilizar las fuentes externas como son los alimentos para asegurar un adecuado suministro de ellos. La ausencia o el exceso de minerales en la alimentación pueden causar enfermedades, de modo que si se encuentran presentes en los alimentos es necesario conocer en que alimentos los podemos encontrar y el contenido de éstos.

En la tabla 3 se presenta un resumen de las principales funciones de los minerales así como de sus principales fuentes, en la tabla 4 se presenta un resumen del IDR de cada uno así como los principales problemas por su déficit y el exceso de éstos.



Tabla 3. Principales funciones de los minerales en el organismo y principales fuentes de consumo (Facultad de medicina, 2004).

Nombre del nutrimento	Principales funciones	Principales fuentes
Calcio	Interviene en la coagulación de la sangre, activación de varias enzimas, transmisión de impulsos nerviosos, contracción muscular, secreción de varias hormonas, capacidad de adhesión de unas células con otras, mantenimiento y funcionamiento de las membranas celulares, constituyente de huesos y dientes	Tortilla de maíz, charales, sardinas, quesos, leche, berro, epazote, hoja de chaya, verdolaga
Cloro	Equilibrio ácido-básico. Forma parte del jugo gástrico. Actúa como electrólito. Activador de algunas enzimas. Interviene en la contracción muscular y la transmisión nerviosa	Contenido en casi todos los Alimentos
Potasio	Balance electrolítico, regulación de la presión osmótica, transporte de nutrimentos	Carnes, vísceras, naranja, plátano, Mandarina
Sodio	Regula el volumen y la presión osmótica, la acidez y la carga eléctrica del fluido extracelular. Contracción muscular, conducción nerviosa, absorción activa	Casi todos los alimentos; Sal adicionada a los productos procesados



Tabla 4. IDR de los minerales en estudio Posibles malestares por la deficiencia y exceso de los minerales (Facultad de medicina, 2004).

Nombre del nutrimento	Ingesta Diaria Recomendación (IDR)	Deficiencias	Exceso
Calcio	Infantes 450 a 600 mg Niños y Púberes 800 a 1000 mg Adultos 800 mg Embarazadas y lactantes 1200 mg LS a partir de 1 año de edad 2500 mg	Tetania Osteomalacia Osteoporosis Alteraciones del sistema nervioso	Estreñimiento, anorexia, náusea, vómito, dolor abdominal. Calcificación de tejidos blandos, poliuria, polidipsia, cálculos renales, Hipertensión. síntomas de uremia, debilidad muscular, psicosis, delirio, estupor, coma
Cloruro		No se conoce deficiencia	Convulsiones En personas sensibles agrava o desencadena hipertensión
Potasio	Niños 800 mg Adultos 900 a 2700 mg	No se conoce deficiencia dietética, la pérdida excesiva produce deshidratación	Deshidratación acidosis y choque
Sodio	Niños 115 a 350 mg Púberes 600 a 1800 mg Adultos 1100 a 3300 mg	No se conoce deficiencia dietética Cuando hay pérdida excesiva se produce deshidratación	A largo plazo en individuos susceptibles puede desencadenar o agravar la hipertensión

El límite superior (LS) de los valores recomendados de estos micronutrientes, no se deben exceder con regularidad.



---

### 2.9.3. Técnicas y métodos de cuantificación de iones

La determinación de los elementos minerales en los alimentos se dificulta al tener elementos orgánicos presentes como carbono, hidrógeno, nitrógeno, oxígeno y azufre. Para la determinación de los minerales se suele agrupar a aquellos elementos, en su mayoría metálicos, que se presentan en cantidades minoritarias en los alimentos, y que suelen determinarse como elementos más que como compuestos específicos o grupos de compuestos (Szefer y Nriego, 2007).

Los métodos de determinación más comunes se basan en la titulación complejométrica con EDTA o algún otro quelante y por gravimetría (para cationes metálicos).

Hay variantes para elementos que contienen sodio y potasio que no se pueden titular con EDTA, este método es el método de cloroplatinato de Lindo-Gladding. Este método se basa en la insolubilidad del perclorato en alcohol y en otros disolventes orgánicos. Si la determinación es cuidadosa el método de cloroplatinato rinde resultados muy precisos pero en la actualidad tienden a sustituirse por métodos basados en el descubrimiento reciente de la insolubilidad del tetrafenilborato de potasio o en la fotometría de llama (Szefer y Nriego, 2007).

A continuación se describen los métodos utilizados para la determinación de los componentes inorgánicos en los alimentos presentes dentro de las normas: Para la cuantificación de los iones en estudio se tomaron las normas oficiales mexicanas (NOM) y de la "Association of Official Analytical Chemists" (AOAC). En la norma oficial Mexicana NOM-201-SSA1-2002, Productos y servicios. Agua y hielo para consumo humano. La determinación de cloro residual. Método colorimétrico con DFD. La cual se basa en la reacción del cloro libre disponible con el indicador N, N-Dietil-pfenildiamina formando un compuesto de coloración roja el cual es medido espectrométricamente a una longitud de onda de 515 nm (Secretaría de salud, 2002).

En el caso de la determinación de calcio, la Asociación Científica dedicada a la excelencia en los métodos de análisis (por sus siglas en inglés AOAC), propone la titulación con permanganato.



El calcio se precipita a pH 4 como oxalato (si hay fosfato presente se puede eliminar con ácido acético), posteriormente el oxalato se disuelve en ácido sulfúrico liberando ácido oxálico el cual se titula con una solución valorada de permanganato de potasio (James, 1999) .

Para el caso de las normas Mexicanas, para la determinación de calcio (Método NOM-187-SSA1/SCFI-2002), se propone la formación de complejo con EDTA (Secretaria de Salud., 2002).

Cuando se añade a una muestra conteniendo calcio (o magnesio), ácido etilendiaminotetracético (EDTA) o su sal, los iones se combinan con el EDTA. Se puede determinar calcio en forma directa, añadiendo NaOH para elevar el pH de la muestra entre 12 y 13 unidades, para que el magnesio precipite como hidróxido y no interfiera, se usa además, un indicador que se combine solamente con el calcio (azul de hidroxinaftol) (Secretaria de Salud., 2002).

En el análisis de calcio, la muestra es tratada con NaOH 4 N para obtener un pH de entre 12 y 13, lo que produce la precipitación del magnesio en forma de  $Mg(OH)_2$ . Enseguida se agrega el indicador azul de hidroxinaftol que forma un complejo de color rosa con el ión calcio y se procede a titular con solución de EDTA hasta la aparición de un complejo color púrpura (Secretaria de Salud., 2002).

En la determinación de sodio para alimentos y bebidas no alcohólicas, establecida en la NOM-086-SSA1-1994, se utiliza el método de espectrofotometría de absorción atómica con aditamento de flama. Para la determinación, la muestra se somete a una digestión con ácido nítrico concentrado para poder limpiar el analito y ser cuantificado, el método utiliza una lámpara de cátodo hueco de sodio, una flama de aire-acetileno como oxidante, la lectura se realiza a una longitud de onda de 589.6 nm. La restricción para la fotometría de flama o espectrofotometría de emisión de flama, solo puede cuantificar elementos que son capaces de emitir radiación visible (Secretaria de Salud., 1996).

Existen otros métodos utilizados para la determinación de los componentes inorgánicos en los alimentos los cuales serán descritos a continuación:



La determinación de cloruros es el método de Mohr. Este método se utiliza para determinar iones cloruro y bromuro de metales alcalinos, magnesio y amonio. La valoración se hace con solución patrón de nitrato de plata.

El método se basa en la formación de un precipitado ladrillo proveniente del cromato de plata formado a partir del precipitado de cloruro de plata, una vez que todo el  $\text{Cl}^-$  haya reaccionado con el nitrato de plata (Nielsen, 2003).

Se utilizan métodos espectrofotométricos para la determinación de minerales los cuales se tratarán de presentar brevemente a continuación.

Los métodos de espectrofotometría de absorción (por sus siglas en inglés, AAS) y de emisión atómica (por sus siglas en inglés, AES), utilizan flama para la atomización (Capar y Szefer, 2005; Ötles, 2005) por lo que se basan en la absorción y emisión por átomos o iones elementales.

En espectrometría de emisión atómica de llama (FAES) o fotometría de llama (FP), la muestra se convierte en vapor atómico mediante la aplicación de energía térmica (una llama) (Szefer y Nriego, 2007).

La espectrometría de emisión atómica con plasma de excitación inductiva acoplado (ICP-AES) tiene aplicación muy amplia en la determinación de la mayoría de los elementos (Szefer y Nriego, 2007).

La espectrometría de masas es una técnica moderna que puede ser utilizada para medir masas de iones con alta exactitud. La espectrometría de masas con la excitación del plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS) ofrece una mayor precisión que la ICP-AES (Szefer y Nriego, 2007).

Ambos ICP-AES y ICP-MS han encontrado muchas aplicaciones en muchos campos distintos, por ejemplo, en la determinación de elementos inorgánicos nutricionales y tóxicos en los alimentos.

Las dos técnicas electroquímicas importantes para el análisis elemental son la voltamperometría y la potenciometría con electrodo selectivo de iones. Ambos métodos se pueden utilizar sólo para muestras acuosas (Szefer y Nriego, 2007).

La voltamperometría de redisolución anódica (ASV) se caracteriza por tener equipos compactos y de costo bajos, y no requiere muestra preliminar para concentrarse.



Los electrodos selectivos de iones (por sus siglas en inglés, ISE) son muy útiles para la determinación de cationes y aniones principales en solución acuosa. Los electrodos selectivos de iones para diferentes analitos son fabricados y comercializados por muchas empresas (Szefer y Nriego, 2007). También se puede mencionar que los electrodos selectivos de iones tienen la ventaja de tener una respuesta lineal en un amplio intervalo de concentraciones, tener bajo tiempo de respuesta y su respuesta no se ve afectada por la turbidez o el color de la muestra (Harris, 2001).

## **2.10. Importancia del control de plaguicidas en el Té**

Aún cuando en la actualidad se mantiene un riguroso monitoreo de residuos de plaguicidas en las frutas y hortalizas en muchos países, en el control de los productos de Té, uno de los productos más consumidos en el mundo, es muy raro tener un seguimiento de residuos de plaguicidas. Debido a que los límites máximos permitidos (MRLs, por sus siglas en inglés) no se han asignado todavía a muchos de los residuos de plaguicidas en el Té, los países importadores son libres de mantener o establecer sus propios límites provisionales diferentes o incluso crear estrictos límites máximos de residuos para los plaguicidas en el Té de los países exportadores (Kumar, et al., 2004). En el caso de la Unión Europea, la directiva 42/2000/EC, regula hasta 108 pesticidas, los cuales, han sido limitados por los niveles máximos de residuos en el Té desde 1 de Julio de 2001 (Unión Europea, 2000). Otra directiva europea 91/414/CEE, dada por el consejo regulador de productos de protección en el año 2003, limita algunos tipos de plaguicidas a los niveles detectables de algunos alimentos. Debido a los crecientes desafíos de las agencias reguladoras de los Estados Unidos y otros países importantes en el consumo de Té, se ha vuelto más importante el análisis de niveles de trazas y el análisis de multi-residuos de contaminantes.

Los herbicidas son aplicados ampliamente en los cultivos de Té. Los herbicidas triazínicos son los más comúnmente utilizados para el control de maleza y “malas hierbas” que impiden el crecimiento normal de los cultivos (Klaassen y Watkins III, 1999). La mayoría de los trabajos donde se reporta la presencia de



triazinas en plantas o muestras ambientales tratan de mejorar la detección de estos plaguicidas porque sus residuos y metabolitos son dañinos al medio ambiente y organismos desde muy bajas concentraciones. Por ejemplo, en EU y la UE se trabaja con límites de cuantificación del orden de  $0.1 \text{ mgL}^{-1}$  o menores y en un trabajo (Zhiqiang, et al., 2007), logra un límite de cuantificación de  $0.053 \text{ mgL}^{-1}$  con la metodología propuesta. Las características generales de esta familia de plaguicidas se describen en la siguiente sección.

### 2.10.1. Herbicidas triazínicos

La estructura general de las triazinas está formada por 6 miembros formando un ciclo, en el cual se encuentran 3 átomos de nitrógeno y 3 átomos de carbono como se muestra en la figura 9. Las triazinas pueden ser simétricas con nitrógenos y carbonos alternados alrededor del ciclo, o ser asimétricas con átomos de nitrógenos adyacentes. No hay diferencia entre la toxicidad y la acción de las triazinas, por la diferencia de estructura (Kamrin, 1997).

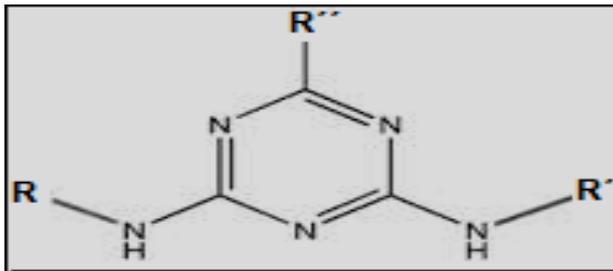


Figura 9. Estructura general de las triazinas (Kamrin, 1997).

A continuación se describirán las triazinas utilizadas en el presente trabajo:

#### Atrazina

La atrazina es el miembro más representativo de esta familia y también se le conoce con el nombre de “Atrex, Aktikon, Alazine, Atred, Atranex, Atrataf, Azinotox, Fármaco Atrazina, G-30027, Gesaprim, Primatol, Simazat y Zeapos” (Kamrin, 1997).



La atrazina es de ligera a moderadamente tóxica para los humanos y animales; ésta puede ser absorbida por vía oral, dérmica o por inhalación. Los síntomas de envenenamiento incluyen dolor abdominal, diarrea y vómito, irritación de los ojos e irritación de la piel (Stevens y Sumner, 1991; Krieger, et al., 1995).

En ratas se ha experimentado la ingestión de la atrazina y se ha encontrado que es absorbida por el tracto gastrointestinal. Cuando es administrada en dosis de 0.53 mg en ratas, el 20% fue excretado en las heces en 72 horas. El otro 80% fue absorbido a través del tracto gastrointestinal al flujo sanguíneo. En las siguientes 72 horas el 65% fue eliminada por la orina y el 15% se mantuvo en los tejidos del cuerpo, principalmente en el hígado, los riñones y los pulmones (Kamrin, 1997).

La atrazina presenta las propiedades físico-químicas siguientes (Kidd y James, 1991):

Nombre químico: 2-clor-4etilamina-6-isopropilamina-S-triazina.

Peso molecular: 215.69.

Solubilidad en el agua: 28 mg/L a 20°C.

Solubilidad en otros solventes: Cloroformo; diétil éter

Punto de fusión: 176°C.

Coefficiente de reparto (octanol/agua): 219.

En la figura 10 se presenta la estructura de la Atrazina.

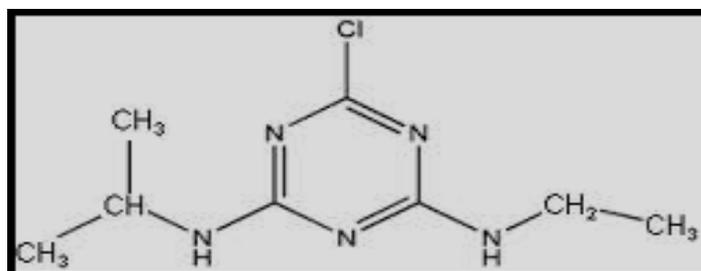


Figura.10. Estructura de la Atrazina

### Simazina

A la simazina se le conoce con diversos nombres como son los siguientes: “Caliber, cekusima, framed, Gesatop, Pricep, Tnazine y Totazine. También se



le puede encontrar con otros herbicidas como es el caso de amitrole, paraquat y atrazina” (Kamrin, 1997).

La simazina no irrita la piel ni ojos de conejos, pero en dosis altas si existe irritación. Se ha demostrado que la simazina en humanos, con la prueba de parche o epicutáneas, no produce irritación o sensibilidad. Sin embargo se han encontrado casos de personas que por el uso de la simazina han mostrado irritación en la piel. El principal problema con la simazina en su uso, es que en la mayoría de sus presentaciones no se encuentra sola. (Stevens y Sumner, 1991).

Estudios elaborados para determinar la forma en que actúa la simazina han demostrado que en ratas, cabras y ovejas del 60 al 70% de la dosis ingerida puede ser absorbida por el organismo (EPA, 2011), de lo absorbido el 5 al 10 % es distribuido de manera sistemática en los tejidos , el resto es eliminado por la orina en 24 horas (Kidd y James, 1991). La distribución del herbicida, se encontró en la sangre, hígado, riñón, grasa y huesos (EPA, 2011).

Las propiedades fisicoquímicas de la simazina se indican a continuación (Kidd y James, 1991):

Nombre químico: 6-clor-N2,N4-dietil-1,3,5-triazina-2,4-diamina.

Peso molecular: 201.7.

Solubilidad en el agua: 5 mg/L a 20°C.

Solubilidad en otros solventes: Cloroformo; dieltil éter, metanol.

Punto de fusión: 225-227°C.

Coefficiente de reparto (octanol/agua): 91.2.

Coefficiente de adsorción: 130 (Gosselin, et al., 1984).

En la figura.11 se presenta la estructura de la simazina.

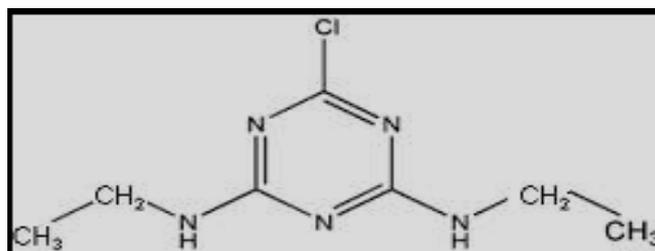


Figura.11. Estructura de la simazina (Kamrin, 1997).



## Propazina

La propazina es un herbicida usado para el control de maleza de hojas anchas, sus presentaciones disponibles en el mercado son en líquido, polvo para solubilizar y forma granulada, Se puede encontrar con los nombres de "G-30028, Gesamil, Milocep, Milogard, Milopro, Plantullin, Primatol, Propazin, Propinex y Prozinex" (Kamrin, 1997).

Entre los síntomas por exposición se encuentran mareo, letargo, debilidad muscular escurrimiento nasal, dificultad para respirar (Dreisbach, 1983). En contacto exterior se presentan irritación en la piel, ojos y tracto respiratorio superior (Stevens y Sumner, 1991).

La Propazina es absorbida y metabolizada en el cuerpo. En un promedio de 72 horas después de la administración, vía oral en ratas, el 66% fue excretado por la orina y el 23% fue excretado por las heces (Gosselin, et al., 1984). Estudios posteriores demostraron que del 15% que no fue excretado el 72% de las triazinas fueron agregadas al flujo sanguíneo a través del tracto gastrointestinal, después de 8 días, mostraron que la propazina metabolizada fue encontrada en pulmón, bazo, corazón, riñón y cerebro de las ratas (EPA, 2011).

Las propiedades fisicoquímicas de propazina se presentan a continuación (Kidd y James, 1991):

Nombre químico: 6-cloro-N<sub>2</sub>,N<sub>4</sub>-di-isopropil-1,3,5-triazina-2,4-dietilamina.

Peso molecular: 229.7.

Solubilidad en el agua: 5mg/L a 20°C.

Solubilidad en otros solventes: benceno, tolueno, dietil éter.

Punto de fusión: 212-214 °C.

Coefficiente de reparto(octanol/agua) log P: 2.34

Coefficiente de adsorción: 154

En la figura.12 se presenta la estructura de la propazina.

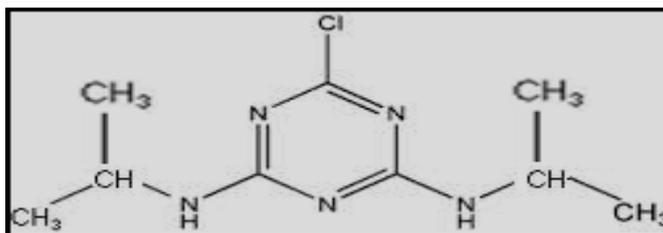


Figura.12. Estructura de la Propazina (Kamrin, 1997)

### Terbutilazina

La terbutilazina a nivel comercial se puede encontrar con los nombres: 2-(tert-Butilamino)-4-cloro-6-(etilamino)-s-triazina; S-Triazina, 2-(Tert-Butilamino)-4-Cloro-6-(Etilamino)-; 1,3,5-Triazina-2,4-Diamina, 6-Cloro-N-(1,1-Dimetiletíl)-N'-Etil-; Gardoprim; Caswell Number 125B; GS-13529; G13529; N-tert-butil-6-cloro-N'-etil-1,3,5-triazina-2,4-diildiamina (INSHT, 2011).

La terbutilazina puede absorberse por inhalación, a través de la piel y por ingestión. Los efectos de exposición son: irritación cutánea, irritación en los ojos, tiene leve capacidad alérgica. La toxicidad crónica y a largo plazo presenta genotoxicidad, neurotoxicidad, teratogenicidad, mutagenicidad y carcinitoxidad (Jimenez-Rojas, 2011).

Las propiedades fisicoquímicas de la terbutilazina se presentan a continuación (INSHT, 2011):

Nombre químico: N-tert-butil-6-cloro-N-etil-1,3,5-triazina-2,4-diamina.

Peso molecular: 229.7.

Solubilidad en el agua: 8.5 mg/L a 20°C.

Solubilidad en otros solventes: acetona, etanol, n-octanol, etilen glicol, tolueno.

Punto de fusión: 177-179 °C.

En la figura.13 se presenta la estructura de la terbutilazina.

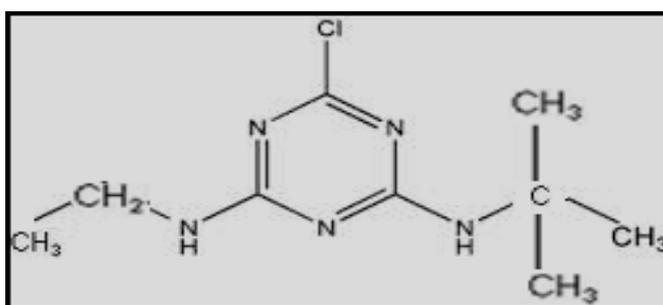


Figura.13. Estructura de la Terbutilazina (INSHT, 2011).



---

### 2.10.2. Efecto de las triazinas en las plantas y humanos

La acción de los compuestos triazínicos en las plantas, se presenta en la fotosíntesis, interviniendo en este proceso. Las triazinas intervienen en el fotosistema II de la fotosíntesis, bloqueando el transporte de electrones, los cuales son utilizados por la clorofila para producción de energía química, esta energía es utilizada en las células de la planta. Debido a que la planta no puede generar energía química sus funciones celulares no pueden llevarse a cabo. La efectividad de las triazinas depende de los rangos de la tasa de captación y distribución en las plantas (Altman, 1993; Stevens y Sumner, 1991). La acción de los compuestos triazínicos afectan a los procesos bioquímicos de las plantas por tal motivo se creería que no afecta a los animales o al ser humano sin embargo hay evidencias que los componentes de triazinas en los mamíferos producen alteraciones a corto plazo irritación en la piel y ojos, náuseas y vómito, diarrea, calambres y salivación, a largo plazo alteraciones como mutagenicidad, teratogenicidad y carcinogenicidad y alteraciones en el metabolismo de las vitaminas (INSHT, 2011; Kamrin, 1997).

### 2.10.3. Legislación

La ley de protección de calidad de los alimentos (por sus siglas en inglés FQPA), al estudiar la posible exposición de los alimentos por parte de pesticidas ordena a la Agencia de Protección Ambiental (EPA, por sus siglas en inglés) a estudiar la posible contaminación de los alimentos por parte de los residuos fitosanitarios. La EPA propone como primer fuente a estudiar al agua potable (ya sea agua subterránea o de superficie) debido a la posible exposición de estos productos a través del uso de pesticidas en cultivos, ya que por su uso cotidiano pueden llegar a los mantos acuíferos.

La EPA ha designado como nivel máximo de contaminación para la atrazina de  $0.003 \text{ mgL}^{-1}$ . En el caso de la propazina en el agua potable se han establecido en los siguientes niveles:  $2 \text{ mgL}^{-1}$  a corto plazo para adultos y de  $0.5 \text{ mgL}^{-1}$  para niños. Para la simazina se propuso de  $0.004 \text{ mgL}^{-1}$  (EPA, 2011).



En el caso de la legislación europea los niveles que se estipulan en la directiva 2000/60 son, para el caso de triazinas individuales deben de tener un nivel de concentración de  $0.1 \mu\text{gL}^{-1}$ , en caso de triazinas totales de  $0.5 \mu\text{gL}^{-1}$  (European Commission, 2011)

### **2.11. Análisis de iones y pesticidas en diferentes tipos de infusiones herbales**

El análisis cuantitativo de la cantidad de los minerales presentes en diversas plantas fue estudiado por Özcan, et al., 2008. Este estudio se limitó a la medición de minerales catiónicos de diferentes plantas. Dentro de esta lista se encuentran plantas con las que se elaboran tradicionalmente infusiones en México. En la tabla 5 y 6 muestran en la primer columna es la cantidad de minerales presentes en las plantas, en la segunda columna es la cantidad de minerales presentes en una infusión.

En general, el contenido de minerales de las plantas que se estudiaron, se encontraron valores similares a los registrados en la literatura. Las diferencias encontradas pueden deberse a los siguientes parámetros: las especies, lugares, propiedades del suelo, la fecha de la cosecha, lugar del cultivo y procesos analíticos. Las concentraciones se determinaron con espectrometría de emisión atómica con plasma acoplado por inducción.

Otro estudio relacionado con el contenido de iones presentes en las infusiones de diferentes plantas está documentado por Gallaher, et al, 32006. En este artículo describen el contenido mineral de 10 hierbas secas para infusionar y las infusiones producidos a partir de estas. Entre las hierbas estudiadas se encuentran tres tipos de diferentes de Té verde. De igual forma en el legajo utilizado para este trabajo se encuentra el artículo de Malon y Maj-Zurawska, 2005, en el cual se describen ensayos que denotan que no hay diferencias significativas entre los electrodos selectivos y otros métodos utilizados para la medición de iones.



Tabla 5. Cuantificación de iones Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup> en plantas usadas para infusionar

Planta		Ion			
Nombre científico	Nombre popular	Na <sup>+</sup>		K <sup>+</sup>	
		[ppm] En planta	[mg/100 mL] En infusión	[ppm] En planta	[mg/100 mL] En infusión
<i>Salvia fruticosa</i>	Salvia	886.02	3.00	10967.3	127.61
<i>Pimpinella anisum</i>	Anis	325.23	0.00	4411.9	75.57
<i>Rosmarinus officinalis</i>	Romero	43.82	0.05	11200.2	135.03
<i>Ocimum basilicum</i>	Albaca	65.24	0.15	11160.4	218.35
<i>Tilia cordata</i>	Tila	33.11	0.05	21389.5	109.10
<i>Mentha piperita</i>	Menta	916.23	0.09	18496.2	153.23
<i>Melissa officinalis</i>	Toronjil	1270.2	0.02	20704.7	135.03
<i>Matricaria chamomilla</i>	Manzanilla	2503.3	14.62	27497.8	203.23
<i>Foeniculum vulgare</i>	Hinojo	675.84	0.03	17500.4	120.69

Tabla 6. Cuantificación del ion Ca<sup>+2</sup> en plantas usadas para infusionar

Planta		Ion Ca <sup>+2</sup>	
Nombre científico	Nombre popular	[ppm] En planta	[mg/100 mL] En infusión
		<i>Salvia fruticosa</i>	Salvia
<i>Pimpinella anisum</i>	Anis	2478.7	13.32
<i>Rosmarinus officinalis</i>	Romero	224.1	25.17
<i>Ocimum basilicum</i>	Albaca	574.7	24.42
<i>Tilia cordata</i>	Tila	3001.2	11.47
<i>Mentha piperita</i>	Menta	4200.0	20.88
<i>Melissa officinalis</i>	Toronjil	10155.5	20.11
<i>Matricaria chamomilla</i>	Manzanilla	8186.5	6.11
<i>Foeniculum vulgare</i>	Hinojo	5118.2	18.42

En el caso de los límites máximos de residuos en herbicidas se realizó un estudio por parte de Lin, et al., 2006. Este estudio se realizó utilizando el método de cromatografía de gases con espectrometría de masas (GC-MS) para el análisis de la atrazina y metabolitos de la atrazina en tres diferentes



muestras herbales. En la tabla 7 se presenta el porcentaje de recobro y el límite de detección que se logró obtener.

Estas plantas se muestrearon después de 25 días de la aplicación de la triazinas. Para validar el método desarrollado, se realizó ensayos de campo en el cual se llevó a cabo tres repeticiones de cuatro muestras herbales.

El método desarrollado proporcionó suficiente sensibilidad para determinar la concentración de la atrazina y sus metabolitos clorados en la planta, obtenidos por absorción del suelo.

Tabla 7 Porcentaje de recobro y límite de detección en 4 muestras herbales

Muestras herbales	Porcentaje de recobro		
	Atrazina	Metabolitos	
		Dietilatrazina	Deisopropilatriazina
<i>Dactylis glomerata L.</i>	92.0	117.5	123.5
<i>Bromus inermis L.</i>	101.8	122.2	127.8
<i>Festuca arundinacea S.</i>	89.3	109.2	89.0
<i>Panicum virgatum L.</i>	79.1	103.3	82.1
Límite de detección ( $\mu\text{gkg}^{-1}$ )	0.6	1.3	0.3

El método propuesto GC-MS permitió el análisis de la atrazina y sus metabolitos desalcalinizados, adsorbidas por las muestras herbales. Los promedios del porcentaje de recobro fluctuaron alrededor de 79.1 y 127.8 con un límite de detección de  $0.6 \mu\text{gkg}^{-1}$  para la atrazina, para la dietilatrazina  $1.3 \mu\text{gkg}^{-1}$  y  $0.3 \mu\text{gkg}^{-1}$  para la deisopropilatriazina. Con el trabajo anterior se puede observar que los porcentajes de recobro tienden a tener una gran variación entre cada una de las moléculas estudiadas.

De igual forma se han estudiado residuos de plaguicidas en hojas de Té, estos resultados fueron presentados por (Zhiqiang, et al., 2007) donde se demuestran los niveles de límites de cuantificación son similares a los obtenidos en los resultados de este trabajo.



**CAPÍTULO 3**  
**PARTE EXPERIMENTAL**



### 3. PARTE EXPERIMENTAL

#### 3.1. Determinación de iones

##### 3.1.1. Reactivos

Para la preparación de los ajustadores de fuerza iónica se usaron los siguientes reactivos: nitrato de potasio reactivo analítico, R.A., Mallinckrodt (Estados Unidos de América, USA, por sus siglas en inglés), cloruro de sodio al 99% de pureza de Sigma-Aldrich (USA), cloruro de potasio R.A. de J.T. Baker (México), cloruro de amonio R.A. de J.T. Baker (México), hidróxido de amonio R.A. de J.T. Baker (México). Las disoluciones estándares se prepararon con cloruro de sodio al 99% de pureza Sigma-Aldrich (USA), cloruro de potasio y cloruro de calcio ambos de pureza de reactivo analítico de J.T. Baker (México). Para la preparación de las soluciones anteriores se utilizó agua desionizada de un sistema Millipore Simplicity (USA).

Reactivos comerciales para electrodos. Disolución de llenado para la cámara de los electrodos adquiridos a Thermo Orion: Para  $\text{Cl}^-$  900017, para  $\text{K}^+$  900065, para  $\text{Na}^+$  900012 y para  $\text{Ca}^{2+}$  900061. Disoluciones de almacenamiento de los electrodos adquiridos a Thermo Orion: para  $\text{Cl}^-$  841101, para  $\text{Na}^+$  841101, para  $\text{Ca}^{2+}$  se utilizó una disolución de 100  $\text{mgL}^{-1}$  de  $\text{CaCl}_2$ , para  $\text{K}^+$  se utilizó una disolución de 100  $\text{mgL}^{-1}$  de KCl. La descripción de las disoluciones usadas se presentan más adelante en la tabla 11.

##### 3.1.2. Equipos y materiales

- Electrodo combinado Orion Ross Sodio 84-11 (USA)
- Electrodo combinado Orion Cloruro 96-17 (USA)
- Electrodo combinado Orion Potasio 97-19 (USA)
- Electrodo combinado Orion Calcio 96-17 (USA)
- Balanza analítica OHAUS, Adventurer Pro ( USA) con capacidad de 110 g y una precisión de 0.0001 g
- Balanza analítica Mettler (Suecia) con capacidad de 160 g y una precisión de 0.001 g
- Desionizador y purificador de agua MILLIPORE Simplicity (USA).



- Micropipeta Eppendorf (Canadá) de 100-1000  $\mu$ L
- Parrilla de calentamiento y agitación DAIGGER (USA)
- Potenciómetro Thermo, ORION 4STAR pH\*ISE Benchtop (USA)
- Probeta P.K. (México) de 100 mL
- Matraces aforados PYREX (México) de 10, 25 y 250 mL
- Vasos de precipitado PYREX (México) de 10, 50, 100 y 250 mL
- Vasos de precipitado KIMAX (México) de 20 y 50 mL
- Pipeta graduada PYREX (México) 10 mL
- Pipeta graduada IVA (Argentina) 1 mL
- Propipeta BRAND (Alemania)
- Termómetro Brannan (Suecia) -10 a 106°C
- Agitadores magnéticos

### **3.1.3. Muestras**

Las muestras fueron adquiridas en diferentes supermercados de la Ciudad de México. Las muestras fueron diez cajas con sobres de Té negro y Té verde, para infusiones, una de Té verde y una de Té negro embotellados. De cada producto comercial se analizaron tres lotes diferentes. En la tabla 8 se muestran las características de las muestras utilizadas.



## PARTE EXPERIMENTAL



Tabla.8. Características de las muestras de Té

Muestra	Presentación	Ingredientes	Contenido de iones reportado
A	Caja con 25 bolsitas de 1g c/u	Té verde <i>Camellia sinensis</i>	Na <sup>+</sup> = 0 mg/1g K <sup>+</sup> = 23 mg/1g
B	Caja con 24 bolsitas de 1g c/u	Té verde y anís	Na <sup>+</sup> = 0mg/1g K <sup>+</sup> = 23mg/1g
C	Caja con 25 bolsitas de 1.4 g c/u	Té verde ( <i>Camellia sinensis</i> ) y saborizante artificial (contiene lecitina de soya)	Na <sup>+</sup> = NE K <sup>+</sup> = NE
D	Caja con 25 bolsitas de 1g c/u	70% <i>Camellia sinensis</i> y 30% <i>mentha piperita L.</i>	Na <sup>+</sup> = 0mg/1g K <sup>+</sup> = NE
E	Caja con 20 bolsitas de 2g c/u	Té verde <i>Camellia sinensis</i>	Na <sup>+</sup> = NE K <sup>+</sup> = NE
F	Caja con 25 sobres de 1.41 g c/u	Té negro <i>Camellia sinensis</i> Saborizante artificial bergamota	Na <sup>+</sup> = 0.039mg/1g K <sup>+</sup> = NE
G	Caja con 24 bolsitas de 1.5 g c/u	Té negro <i>Camellia sinensis</i>	Na <sup>+</sup> = 0 mg/1g K <sup>+</sup> = 23mg/1g
H	Caja con 25 bolsitas de 2 g c/u	Té negro	Na <sup>+</sup> = NE K <sup>+</sup> = NE
I	Caja con 30 bolsitas de 1 g c/u	Té negro	Na <sup>+</sup> = 0 mg/1g K <sup>+</sup> = NE
J	Caja con 20 bolsitas de 2 g c/u	Té negro <i>Camellia sinensis</i>	Na <sup>+</sup> = 0.1 mg/2g K <sup>+</sup> = NE
K	Envase con 600 mL	Agua Carbonatada, Fructosa, Ácido Cítrico, Saborizantes Naturales, Benzoato de Sodio, Extracto de Té Verde ( <i>Camellia sinensis</i> ), Sucralosa, Sorbato de Potasio, EDTA, Caramelo (Colorante Natural), Colorantes Artificiales (Amarillo 5 y Azul 1). *21,6 mg de polifenoles por envase	En una porción de 200 mL Na <sup>+</sup> = 19 mg K <sup>+</sup> = NE
L	Envase con 600 mL	Agua Carbonatada, Fructosa, Ácido Cítrico, Saborizantes Naturales, Benzoato de Sodio, Sucralosa, Caramelo, Extracto de Té Negro ( <i>Camellia sinensis</i> ), Sorbato de Potasio, EDTA. *11 mg de polifenoles por envase.	En una porción de 200 mL Na <sup>+</sup> = 19 mg K <sup>+</sup> = NE

NE: No Especificado.



Las muestras de A a E son representantes de Té verde de 5 marcas comerciales mientras que las muestras de F a J son representantes de Té negro de 5 marcas comerciales, estas muestras son bolsitas para infusión. Las muestras K muestra de Té verde y L muestra de Té negro, estas muestras en presentación listo para beber (embotellados).

3.1.4. Disoluciones y muestras

3.1.4.1. Disolución estándar

Se prepararon disoluciones madre de 1000 mgL<sup>-1</sup> de cada uno de los iones, a partir de las cuales se prepararon los distintos niveles de concentración de las disoluciones estándar, a excepción del Ca<sup>2+</sup> de la cual se preparó una disolución de 100 mgL<sup>-1</sup>, por adición de la alícuota correspondiente de disolución madre y el ajustador de fuerza iónica (ISA) correspondiente, según esta indicado en la tabla 9.

Tabla 9. Niveles de concentración de las disoluciones estándar y su respectivo ISA

Electrodo	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Cl <sup>-</sup>
% (v/v) de ISA	10%	2%	2%	2%
Disoluciones estándar (mg/L)	10 20 50 75 100	10 60 100 200 240	1 2.5 5 7.5 10	10 60 100 200 240

3.1.4.2. Ajustadores de fuerza iónica (ISA)

En la tabla 10 se presenta la composición de las disoluciones ISA para cada uno de los electrodos utilizados.

Tabla 10. Fórmula de disoluciones de ISA para cada electrodo

Disolución	Electrodo de Na <sup>+</sup>	Electrodo de K <sup>+</sup>	Electrodo de Ca <sup>2+</sup>	Electrodo de Cl <sup>-</sup>
ISA	4M NH <sub>4</sub> Cl 4M NH <sub>4</sub> OH	5M NaCl	5M KCl	3M NaNO <sub>3</sub>



Las disoluciones que se presentan en el cuadro anterior fueron disoluciones elaboradas en el laboratorio con compuestos de alta pureza los cuales fueron enlistados en la sección 3.1.1.

### **3.1.4.3. Muestras: infusiones de Té negro y Té verde**

La infusión se realizó sumergiendo 4 sobres de Té en 250 mL de agua desionizada a una temperatura entre los 93 y 95°C durante cinco minutos. Al término del tiempo se sacaron las bolsas del agua se dejaron escurrir y se esperó a que se enfriaran las infusiones a temperatura ambiente y se midió el volumen final de cada una.

### **3.1.5. Métodos**

#### **3.1.5.1. Estabilización y activación de electrodos**

Para la estabilización y activación de los electrodos se empleó el siguiente procedimiento general:

Se llenó la cámara del electrodo con disolución de llenado, y a continuación se dejó el electrodo sumergido en la disolución de almacenamiento. En la tabla 11, se presentan las disoluciones requeridas para el manejo de cada electrodo selectivo de iones (ISE por sus siglas en inglés). Los electrodos de sodio y cloruro presentan una respuesta óptima después de un lapso de activación de 24 a 48 horas, para el caso de potasio y calcio se activaron en 3 horas. Después del tiempo de activación en los electrodos se evaluó la respuesta de cada electrodo. Se realizaron mediciones a disoluciones de estándar de cada ión a concentraciones 10, 100 y 1000 mgL<sup>-1</sup>.



Tabla 11. Disoluciones usadas para los electrodos selectivos de iones

Disolución	Electrodo de Na <sup>+</sup>	Electrodo de K <sup>+</sup>	Electrodo de Ca <sup>2+</sup>	Electrodo de Cl <sup>-</sup>
Llenado	NH <sub>4</sub> Cl 2 M	NaCl 1 M	KNO <sub>3</sub> 3.5 M y KCl 1.32M NaCl<0.18M	KNO <sub>3</sub> > 0.01M, KCl 1.32%, NaCl<0.18M
Almacenamiento	NaCl 5 M, NH <sub>4</sub> OH 0.08 M, NH <sub>4</sub> Cl 0.08 M	K <sup>+</sup> 100 mgL <sup>-1</sup>	Ca <sup>2+</sup> 100 mgL <sup>-1</sup>	NaCl 5M, NH <sub>4</sub> OH 0.08 M, NH <sub>4</sub> Cl 0.08 M
Ajustador de fuerza iónica (ISA)	NH <sub>4</sub> OH 4 M NH <sub>4</sub> Cl 4 M	NaCl 5M	KCl 5 M	NaNO <sub>3</sub> 3 M
Estándar	NaCl 1000 mg/L	KCl 1000 mgL <sup>-1</sup>	CaCl <sub>2</sub> 1000 mgL <sup>-1</sup>	NaCl 1000 mgL <sup>-1</sup>
Enjuague	10 mL de ISA en 1 L de H <sub>2</sub> O destilada	Agua desionizada	Agua desionizada	Agua desionizada
Reacondicionamiento	NH <sub>4</sub> HF <sub>2</sub> 0.1 M	K <sup>+</sup> 100 mgL <sup>-1</sup>	Ca <sup>2+</sup> de 100 mgL <sup>-1</sup>	Cl <sup>-</sup> 100 mgL <sup>-1</sup>

Las disoluciones presentadas en la tabla 11 fueron elaboradas en el laboratorio con reactivos de alta pureza los cuales fueron enlistados en la sección 3.1.1, salvo las disoluciones de llenado, las cuales son comerciales y cuentan con las siguientes claves: para el electrodo de sodio 900010, potasio 900065, calcio 900061 y cloruro 90001. De igual manera la disolución de reacondicionamiento para el electrodo de sodio fue comercial con la clave 841113. Todas las anteriores disoluciones fueron de la marca Optimum Results™ desarrolladas por Thermo Scientific Orion.

### 3.1.5.2. Validación de los métodos ISE

#### 3.1.5.2.1. Método de estándar externo (E.E.) con electrodos de Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup> y Cl<sup>-</sup>

- a. **Respuesta del sistema y linealidad del sistema.** Para cada uno de los iones se preparó de manera independiente una curva de calibración. Para la creación de las curvas de calibración se prepararon cinco niveles de concentraciones, (ver tabla 9). De cada una de las



disoluciones se midió su potencial por triplicado, se trazaron las gráficas del logaritmo de la concentración contra su potencial de respuesta. De las gráficas se obtuvo la ordenada, la pendiente y el coeficiente de correlación.

- b. Exactitud y precisión del sistema (muestra sintética).** Para las mediciones por estándar externo primero se obtuvo una curva de calibración con las disoluciones utilizadas en la linealidad para obtener la ecuación de la gráfica, después se prepararon muestras sintéticas, las cuales fueron disoluciones de agua desionizada con el ión a medir a una concentración conocida. En la tabla 12 se muestran las concentraciones de las disoluciones sintéticas que se utilizaron para cada electrodo. Se midieron sus potenciales, y se obtuvo su concentración, con las concentraciones obtenidas se calculó el valor de la media, desviación estándar (DE) y su coeficiente de variación (CV). Se realizó por sextuplicado en un día para la evaluación de la repetibilidad. En el caso de la reproducibilidad se realizó por triplicado durante una semana.

Tabla 12. Concentraciones de disoluciones sintéticas para evaluar la precisión con cada electrodo.

Electrodo	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Ca <sup>++</sup>	Cl <sup>-</sup>
Concentración disolución sintética mgL <sup>-1</sup>	75	100	5	100

- c. Precisión del método (En presencia de matriz de Té negro y Té verde).** Se midió la concentración de cada ión (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup> y Cl<sup>-</sup>) presente en la infusión de Té negro e infusión de Té verde fortificadas. Esta medición se realizó de la siguiente manera. Se obtuvo una curva de calibración con las concentraciones mencionadas en la tabla 9. Las infusiones se prepararon como se describe en la sección 3.1.4.3. y se agregó la cantidad de ISA correspondiente, a continuación se midieron sus potenciales y se interpolaron las respuestas del potencial en la curva de calibración para conocer la concentración de la muestra. Para evaluar



la repetibilidad se realizaron mediciones por triplicado en un solo día, para evaluar la reproducibilidad se realizó en cuatro días diferentes, en los dos casos se calculó la media, la desviación estándar de cada concentración para obtener C.V., el cual no debe de rebasar el 3% según la guía de validación de métodos analíticos (García, et al., 2002).

### 3.1.5.2.2. Método de adición estándar (A.E.) a electrodos de $\text{Na}^+$ y $\text{Ca}^{2+}$

- a) **Respuesta del sistema y linealidad del sistema.** Se realizaron disoluciones con un volumen de 10 mL a una concentración de  $10 \text{ mgL}^{-1}$  para cada ión, las cuales se denominarán muestras “sintéticas”. A éstas se les realizaron 3 adiciones de 0.1 mL de un estándar de  $1000 \text{ mgL}^{-1}$  del ión correspondiente, estas adiciones corresponden a un incremento en concentración de  $10 \text{ mgL}^{-1}$ . Se midió el potencial de cada disolución sintética antes y después de cada adición, para trazar la gráfica del logaritmo de concentración versus su respuesta y calcular la pendiente (m) y el coeficiente de correlación ( $r^2$ ).
- b) **Precisión (muestra sintética).** Para el caso de la repetibilidad se realizaron disoluciones con una concentración de  $10 \text{ mgL}^{-1}$  a un volumen de 10 mL para cada ión. Se realizaron 3 adiciones de 0.1 mL de un estándar de  $1000 \text{ mgL}^{-1}$  del ión correspondiente, estas adiciones corresponden a un incremento en concentración de  $10 \text{ mgL}^{-1}$ . Se midió el potencial de cada disolución sintética antes y después de cada adición, para trazar la gráfica del logaritmo de concentración versus su respuesta y calcular la pendiente (m) y el coeficiente de correlación ( $r^2$ ), se realizaron por sextuplicado los pasos descritos y se tomaron las mediciones de solo un día. En el caso de la reproducibilidad se repitieron los pasos antes descritos, pero se tomaron los datos producidos en cuatro días diferentes durante una semana.
- c) **Linealidad del método ISE por A.E. (En presencia de matriz de Té negro y Té verde).** Se prepararon curvas de calibración en presencia de cada matriz, se midió el potencial inicial y se agregaron 3 alícuotas de 0.1 mL de una disolución de  $1000 \text{ mgL}^{-1}$ , se midió el potencial antes y después



de cada adición, las muestras tuvieron agitación constante y se esperó a la toma de lectura hasta que se llegara al equilibrio de la muestra. Con los datos obtenidos se elaboraron las curvas de calibración con el logaritmo de la concentración contra su potencial de respuesta. Se calculó el coeficiente de variación para la pendiente, la ordenada al origen y el coeficiente de correlación de las curvas.

**d) Precisión del método (en presencia de matriz de Té negro y Té verde).**

Se midió la concentración de los iones ( $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$ ) presentes en las infusiones de Té negro y Té verde. Se midió el potencial inicial y se agregaron alícuotas de 0.1 mL de una disolución de  $1000 \text{ mgL}^{-1}$ , se midió el potencial antes y después de cada adición. Para evaluar la repetibilidad se realizaron mediciones por triplicado en un solo día, para evaluar la reproducibilidad se realizó en cuatro días diferentes, para los dos casos se calculó el promedio y desviación estándar de cada concentración para obtener C.V., el cual no debe de rebasar el 3% según la guía de validación de métodos analíticos (García, et al., 2002).

**3.1.5.3. Determinación de iones en la muestra**

**3.1.5.3.1. Estándar externo**

Se prepararon por triplicado alícuotas de las muestras a las cuales se les adicionó ISA, para el análisis de los iones  $\text{K}^+$  y  $\text{Cl}^-$ . Se registró el potencial a cada una de ellas con los diferentes electrodos. Se calculó la concentración de los iones en las muestras interpolado en la curva de calibración en un rango 10 a  $240 \text{ mg L}^{-1}$  para ambos iones.

**3.1.5.3.2. Adición estándar**

Se prepararon por triplicado alícuotas de las muestras a las cuales se les adicionó ISA, se tomó la potencial inicial de la muestra y se realizaron adiciones para incrementar en  $10 \text{ mgL}^{-1}$  la concentración de las muestras. Antes y después de la adiciones se registró el potencial y se calculó la



concentración de la muestra por medio de la ecuación.16 (Thermo electron Corporation., 2003).

$$C_M = \frac{P}{\left[ (1+P) * 10^{\frac{\Delta E}{m}} \right]^{-1}} * C_E \dots \dots \dots (16)$$

Donde:

C<sub>M</sub>= concentración de ión en la muestra (mgL<sup>-1</sup>)

C<sub>E</sub>= concentración de ión en el estándar (mgL<sup>-1</sup>)

ΔE= cambio de potencial en mV, entre la medición inicial y la medición final

m= pendiente

P= volumen de estándar entre volumen de muestra

Las concentraciones se reportaron con el intervalo de concentraciones correspondientes.

### 3.2. Análisis de triazinas en infusiones de Té

#### 3.2.1. Reactivos y disolventes

Todos los estándares simazina, atrazina, terbutilazina y propazina, provinieron de Chemservice, pureza ≥ 98%(Estados Unidos de América, EUA). Se utilizó metanol y acetonitrilo de J.T. Baker grado cromatográfico (EUA) y agua desionizada proveniente de un sistema Millipore Simplicity (EUA)

#### 3.2.2. Preparación de las disoluciones estándar de plaguicidas

La solución madre de las triazinas fue hecha a una concentración cercana a 500 mgL<sup>-1</sup> en metanol. Para llevar a cabo este paso se pesaron las siguientes cantidades de triazinas: simazina 29.4 mg, atrazina 21.5 mg, terbutilazina 21.5 mg y propazina 20 mg. Los miligramos de triazinas se llevaron a un volumen de 50 mL de metanol para tener una concentración de Simazina 588 mgL<sup>-1</sup>, Atrazina 430 mgL<sup>-1</sup>, Terbutilazina 430 mgL<sup>-1</sup> y Propazina 400 mgL<sup>-1</sup>. De la disolución anterior se tomó una alícuota de 25 mL y se aforó a 100 mL con metanol, para obtener un stock con la mezcla de triazinas cercana 100 mgL<sup>-1</sup>, utilizada para la preparación de las disoluciones de calibración. Todas las disoluciones fueron almacenadas en refrigeración a 4 °C.



De la disolución de  $100 \text{ mgL}^{-1}$ , se tomó  $0.1 \text{ mL}$  ( $100 \text{ }\mu\text{L}$ ) y se aforó a  $100 \text{ mL}$  con agua millipore (muestras “sintéticas”) o matriz de infusión de Té, para tener una concentración de  $100 \text{ }\mu\text{gL}^{-1}$ , la cual fue utilizada como muestra sintética o muestra adicionada para optimizar el procedimiento de la extracción.

### **3.2.3. Instrumentación y análisis cromatográfico**

El análisis de los herbicidas triazínicos se realizó en un cromatógrafo de líquidos de alta resolución modelo 9010, acoplado a un detector espectrofotométrico ultravioleta de arreglo de diodos, ambos de VARIAN Inc. (EUA)

El programa de análisis de datos fue el “software” Star Worstation Varian (4.5). Para efectuar el análisis cromatográfico se usó una columna analítica de  $150 \times 4.60 \text{ mm d.i. RES ELUT C}_{18}$ , tamaño de partícula  $5 \text{ }\mu\text{m}$ , una precolumna de guardia de acero inoxidable de  $13 \times 4.5 \text{ mm d.i.}$ , empacada con nucleosil  $\text{C}_{18}$  Phenomenex (EUA), tamaño de partícula  $10 \text{ }\mu\text{m}$ . La fase móvil fue de  $44:56 \text{ H}_2\text{O}:\text{MeOH}$ , a un flujo de  $1 \text{ mL/min}$ . El tiempo de corrida fue de  $18 \text{ min}$ . El volumen de inyección fue de  $20 \text{ }\mu\text{L}$ . La detección se realizó a  $220 \text{ nm}$  por espectrofotometría.

### **3.2.4. Otros accesorios utilizados**

Cartucho de extracción de  $6 \text{ mL}$  de capacidad y membranas, Varian, Inc. (EUA).

Sílice  $\text{LC}_{18}$  Supelco (EUA).

Micropipeta Eppendorf (Canadá) de volumen variable de  $100$  a  $1000 \text{ }\mu\text{L}$ .

Balanza analítica Mettler (Suecia) con capacidad de  $160 \text{ g}$  y una precisión de  $0.001 \text{ g}$ .

Sonicador modelo 1510 Branson (EUA)

### 3.2.5. Extracción en fase sólida

Para efectuar la extracción en fase sólida (EFS) se utilizó 500 mg sílice C18 (SUPELCO), la cual se activó días antes para su uso. La activación se realizó pasándole metanol a una proporción de 1 mL de metanol por 1 g de sílice. Este paso fue para eliminar los contaminantes que puede tener la sílice.

Para empacar los cartuchos de extracción primero se colocó dentro del cartucho una membrana para evitar que se saliera la sílice C18. Después, se pesó 500 mg de sílice C18 y se empacó en el cartucho, encima de la sílice C18 se colocó otra membrana para compactarla. A continuación se aplicó al cartucho un mililitro de metanol para eliminar cualquier contaminación cruzada, acto seguido se pasaron 3 mililitros de agua para hidratar la sílice con igual disolvente que la muestra. Posteriormente, se hizo pasar un volumen conocido de la disolución estándar o la muestra por el adsorbente. De esta manera, los analitos (triazinas), quedaron retenidos en la sílice C18. En seguida se pasó a través del cartucho el eluyente (mezclas hidroorgánicas y metanol), para limpiar interferencias y/o recuperar las triazinas que se encontraban en la sílice C<sub>18</sub>. Finalmente se recolectó el eluato en un vial recolector. Los pasos anteriores se esquematizan en la figura 14, la cual representa el procedimiento general a seguir en los ensayos que se describirán a continuación.

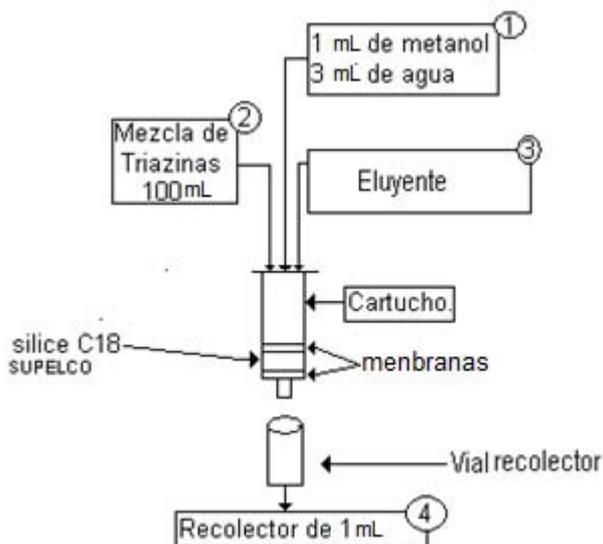


Figura 14. Diagrama del método experimental para la EFS. 1. Acondicionamiento; 2. Aplicación de la muestra; 3. Aplicación de la secuencia de elución; 4. Obtención del extracto



### 3.2.6. Optimización del método de extracción de las triazinas

La optimización de la extracción en fase sólida consistió en la evaluación de los siguientes puntos:

- Estimación del factor de capacidad en agua pura  $k'w$  por extrapolación y simulación de los frentes de elución teóricos en agua pura con un “software” especializado (Dra. García, 2004)
- Obtención del frente de elución experimental de las triazinas en metanol (MeOH)
- Optimización del eluyente de lavado o “clean-up” (mezclas 90:10; 65:35 y 70:30 H<sub>2</sub>O:MeOH)
- Optimización del volumen y el eluyente de las triazinas (mezclas 10:90 y 20:80 H<sub>2</sub>O:MeOH)
- Evaluación de la reproducibilidad con la secuencia de elución seleccionada sin evaporación del extracto
- Evaluación de la reproducibilidad con la secuencia completa de elución con evaporación
- Evaluación de la linealidad con muestras de agua millipore fortificadas con triazinas

#### 3.2.6.1. Extrapolación del factor de capacidad en agua $k'w$ y simulación de los frentes de elución en agua pura

Se calculó el factor de capacidad para cada plaguicida con diferentes mezclas en la fase móvil H<sub>2</sub>O:MeOH, partiendo de un 80% de MeOH hasta un 55% de MeOH. Se realizó la gráfica respectiva de Log  $k'$  vs. % de MeOH; de esta gráfica se obtuvieron los parámetros de la pendiente, ordenada al origen y coeficiente de correlación. Con el parámetro de ordenada al origen se obtuvo el log  $k'w$ .

Para la simulación de los frentes de elución teóricos de los herbicidas triazínicos en agua pura se realizaron con la ayuda del simulador de frente de elución y de recobro (SFER) (García, 2004), el cual nos permitió predecir los frentes de elución de las triazinas partiendo de los valores de las constantes ( $k'$



, N y Vo). En efecto, para obtener los frentes fue necesario conocer los parámetros del factor de retención en agua ( $k'w$ ), descrito anteriormente, el número de platos teóricos y el volumen muerto del cartucho o columna.

### 3.2.6.2. Obtención del frente de elución experimental de las triazinas en metanol (MeOH)

Para el paso de preconcentración de la muestra sintética, se tomó de la disolución “stock” de triazinas, la cual tenía una concentración de  $100 \text{ mgL}^{-1}$ , una alícuota de 0.1 mL y se aforó con agua millipore a 100 mL para tener una muestra sintética con concentración final de  $0.1 \text{ mgL}^{-1}$ .

Se aplicó al cartucho de EFS la muestra sintética antes descrita con el fin de que las triazinas fueran retenidas en la sílice  $C_{18}$  sin que fugaran. A continuación se aplicó en el cartucho cinco mililitros de metanol y se recolectó mililitro por mililitro (5X1) en viales separados. Este ensayo se realizó una segunda vez para confirmar los datos obtenidos.

Los resultados obtenidos en este ensayo ayudaron a establecer el volumen de metanol necesario para eluir por completo a las triazinas y el recobro global obtenido del análisis de las fracciones indicó si existió fuga o no de las triazinas al aplicar la muestra acordada.

#### 3.2.6.2.1. Cálculo de recobro

Para calcular el recobro de las triazinas obtenido en las extracciones, se comparó el área del pico de la inyección directa correspondiente a la cantidad de estándar esperada disuelta en metanol contra el área del pico de la inyección del extracto obtenido de la EFS, como se muestra en la ecuación 17.

$$C_M = \frac{C_E}{A_E} A_M \dots (17)$$

Donde:

$C_M$ = Concentración de la muestra

$A_M$ =Área de la muestra

$C_E$ = Concentración del estándar

$A_E$ =Área del estándar



---

### **3.2.6.3. Obtención de frente de lavado o “clean up”**

Para establecer el volumen necesario para la elución de interferencias sin la fuga de las triazinas se propusieron diferentes mezclas de fuerza eluente débil para el lavado, las cuales se aplicaron al cartucho de extracción después de haber recibido la muestra. En primer lugar se probó aplicar 3 mL, de una mezcla de 90:10 H<sub>2</sub>O:MeOH, después se probaron las mezclas de 65:35 y 30:70 H<sub>2</sub>O:MeOH en 10 X1 mL hasta encontrar el volumen de lavado óptimo. Este paso se realizó considerando que en una muestra real de infusión, el lavado servirá como removedor de interferencias más polares que las triazinas. Se realizaron duplicados de los ensayos para corroborar los resultados, en caso de que fueran similares se realizó un triplicado para obtener el coeficiente de variación y evaluar así la reproducibilidad.

### **3.2.6.4. Optimización del volumen y el eluente de las triazinas**

Al seleccionar la mezcla de lavado, el siguiente paso fue encontrar el volumen y el eluente óptimo para desorber a las triazinas del cartucho de EFS. El primer eluente propuesto fue de 10:90 H<sub>2</sub>O:MeOH en 10 X 1 mL, una segunda mezcla de eluente consistió de 20:80 H<sub>2</sub>O:MeOH aplicada en 10 X 1 mL hasta encontrar el volumen óptimo para el eluente. Este paso se realizó considerando que en una muestra real de infusión, la mezcla de agua y metanol así como el volumen de esta, sea suficiente para eluir por completo a las triazinas aplicadas al cartucho sin arrastrar demasiados interferencias orgánicos que se encuentren en el cartucho.

Se realizaron duplicados de los ensayos (evaluando recobros) para corroborar los resultados, en caso de que los resultados fueran similares se realizó un triplicado para obtener el coeficiente de variación y evaluar así la reproducibilidad.



### 3.2.6.5. Evaluación de la reproducibilidad con la secuencia de elución seleccionada sin evaporación

Al tener seleccionada la secuencia completa de elución, tabla 13, se trabajó por triplicado las extracciones para comparar sus recobros y así obtener la reproducibilidad de estos ensayos con el coeficiente de variación.

Tabla 13. Secuencia completa de elución.

H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O:MeOH	H <sub>2</sub> O:MeOH
5 mL	70:30 (3 mL)	20:80 (3 mL)

### 3.2.6.6. Evaluación de la reproducibilidad con la secuencia de elución seleccionada con evaporación

Una vez que se estableció la secuencia completa de elución y se verificó la reproducibilidad en la extracción, el siguiente paso fue la evaporación del extracto obtenido con la triazinas, ya que es necesaria su concentración para la obtención de mejores límites de detección.

La evaporación se realizó al eluyente de 20:80 H<sub>2</sub>O:MeOH de 3 mL recolectado en el vial, el volumen recolectado se evaporó en baño maría hasta 0.3 mL, a continuación, se reconstituyó a 1 mL con metanol, el cual se llevó a análisis por HPLC, para calcular el recobro de las triazinas. Se realizaron por triplicado ensayos aplicando la secuencia de elución completa con evaporación, con muestras sintéticas, para poder obtener la reproducibilidad de estos ensayos.

Para comparar los recobros obtenidos con el extracto se realizó un control, el cual fue realizado con la disolución “stock” de las triazinas de 100 mgL<sup>-1</sup> de la cual se tomó una alícuota de 0.1 mL y se llevó a 2 mL de la mezcla de eluyente seleccionada, la cual fue de 20:80 H<sub>2</sub>O:MeOH, sin realizar los pasos anteriores mencionados como es la extracción, evaporación y reconstitución.



### **3.2.6.7. Evaluación de la linealidad con muestras de agua millipore fortificada con triazinas**

Para evaluar la linealidad del método se prepararon muestras sintéticas con agua millipore, estas muestras se realizaron sin la aplicación de las soluciones de la secuencia de elución y sin extracción, con 6 diferentes concentraciones, teniendo en cuenta que dentro de estos diferentes puntos se encuentra la concentración de las triazinas con que se trabajó tanto en muestras sintéticas como en muestras en la infusión del Té adicionadas, las concentraciones comprenden de 0.5, 1, 5, 10, 15 y 20 mgL<sup>-1</sup>. Se obtuvieron las gráficas correspondientes de áreas del pico=f(concentración de las triazinas) y sus respectivas ecuaciones ajustadas y coeficientes de correlación lineal.

### **3.2.7. Aplicación de la secuencia de elución optimizada en muestras fortificadas de infusión de Té negro y Té verde**

La matriz de infusión de Té se preparó con 1 sobre de Té (negro o verde) sumergiendo en 250 mL de agua desionizada, a una temperatura entre los 93 a 95 °C durante 5 minutos. Al término del tiempo se sacó la bolsa del agua, se dejó escurrir y se esperó a que se enfriara la infusión a temperatura ambiente y se midió el volumen final. Se tomó una alícuota de 0.1 mL del “stock” de las triazinas, que tenía una concentración de 100 mgL<sup>-1</sup>, esta alícuota se llevó a un aforo de 100 mL con la matriz de Té para tener una concentración aproximada de 0.1 mgL<sup>-1</sup>, a continuación se realizó la extracción con el cartucho de EFS, al tener adsorbidos los analitos se procedió a utilizar la secuencia de elución que se presenta en la tabla 13.

### **3.2.8. Ensayos cualitativos para la eliminación de color en extracto**

Se realizaron ensayos con infusión de Té negro y Té verde, a las cuales se aplicaron la secuencia de elución descrita en la tabla 13. Sin embargo, debido a que se observó una coloración muy intensa y de igual forma en los cromatogramas se observaron interferencias en los tiempos de los tipos de



elución de la triazinas en el extracto final, se trató de eliminar esta coloración con nuevas condiciones de elución que se describen en la tabla 14. Se seleccionó la que aportó el extracto más claro y menos pérdida de los analitos en estudio (secuencia 5).

Tabla 14. Secuencia de limpieza y elución probadas para la eliminación de coloración en los extractos de EFS.

Ensayo	Eluente de Limpieza 1	Eluente de Limpieza 2	Eluente de Limpieza 3	Elución de los compuestos
1	5 mL H <sub>2</sub> O	3 mL 70:30 H <sub>2</sub> O:MeOH		3 mL de 20:80 H <sub>2</sub> O:MeOH
2	15 mL H <sub>2</sub> O	3 mL 70:30 H <sub>2</sub> O:MeOH		3 mL de 20:80 H <sub>2</sub> O:MeOH
3	15 mL H <sub>2</sub> O	3 mL 70:30 H <sub>2</sub> O: ACN		3 mL de 20:80 H <sub>2</sub> O:MeOH
4	15 mL H <sub>2</sub> O	3 mL 60:40 H <sub>2</sub> O:MeOH		3 mL de 20:80 H <sub>2</sub> O:MeOH
5	23 mL H <sub>2</sub> O	9 mL 70:30 H <sub>2</sub> O:MeOH	3 mL 70:30 H <sub>2</sub> O:ACN	3 mL 20:80 H <sub>2</sub> O:MeOH
6	23 mL H <sub>2</sub> O	9 mL 70:30 H <sub>2</sub> O:MeOH	5 mL 70:30 H <sub>2</sub> O:ACN	3 mL 20:80 H <sub>2</sub> O:MeOH
7	23 mL H <sub>2</sub> O	9 mL 70:30 H <sub>2</sub> O:MeOH	3 mL 60:40 H <sub>2</sub> O:ACN	3 mL 20:80 H <sub>2</sub> O:MeOH
8	23 mL H <sub>2</sub> O	4 mL 80:20 H <sub>2</sub> O:ACN	3 mL 70:30 H <sub>2</sub> O:ACN	3 mL 20:80 H <sub>2</sub> O:ACN

Para los ensayos 2, 3, 4 solo se utilizó el Té negro por ser la infusión con mayor cantidad de interferencias

### 3.2.9. Evaluación de linealidad con la secuencia de elución No. 5 en infusión de Té negro

Para evaluar la linealidad del método se prepararon muestras de infusión de Té negro con 3 diferentes concentraciones, teniendo en cuenta que dentro de estos diferentes valores el punto central fue igual al que se utilizó para preparar la solución de referencia en el método, las concentraciones fueron de 1, 3 y 5 mgL<sup>-1</sup>. Se obtuvieron las gráficas correspondientes de áreas del pico=f(concentración de las triazinas) y sus respectivas ecuaciones ajustadas y coeficientes de correlación lineal.



---

### **3.2.10. Reproducibilidad de la secuencia de elución No. 5**

Al tener seleccionada la secuencia completa de elución No 5, se trabajó por triplicado las extracciones con estas condiciones para comparar sus recobros y así obtener la reproducibilidad de estos ensayos con el coeficiente de variación.

### **3.2.11. Protocolo de EFS para el análisis de triazinas en infusiones de Té**

Con el resultado de los ensayos desarrollados se planteó un protocolo, el cual fue creado con el uso de diferentes volúmenes y concentraciones de mezclas hidroorgánicas así como volúmenes de agua pura, para la eliminación de contaminante que se encuentran en la infusiones estudiadas, por último, se estudió los volúmenes de H<sub>2</sub>O y MeOH para realizar una mezcla que sirviera como eluente de los analitos adsorbidos en la sílice C<sub>18</sub>, de igual forma se buscó el volumen adecuado de esta mezcla que sirviera de eluente sin desperdiciar materia prima. Este protocolo fue aplicado para el análisis de las infusiones de Té de marcas comerciales que se pueden encontrar en las tiendas de conveniencia de la Ciudad de México.



**CAPÍTULO 4**  
**RESULTADOS Y ANÁLISIS**



#### 4. RESULTADOS Y ANÁLISIS

##### 4.1. Validación de los métodos ISE

Para la validación de cada uno de los métodos ISE se evaluaron los siguientes parámetros:

- Respuesta del sistema (valor de la pendiente de curva de calibración)
- Linealidad (coeficiente de correlación  $r^2$ )
- Exactitud y precisión en muestra sintética (la exactitud como recobro y la precisión como repetibilidad y reproducibilidad)
- Precisión del método en presencia de matriz de Té negro y Té verde (repetibilidad y reproducibilidad)

Se siguieron las recomendaciones y criterios de aceptación de La guía de validación de métodos analíticos (García, et al., 2002), a excepción del valor de la respuesta del sistema que se tomó, la indicada por el fabricante (Thermo electron Corporation, 2003), los cuales se muestran en la Tabla 15.

Tabla 15. Criterios de aceptación para los parámetros de validación

Parámetro	Respuesta del sistema Pendiente	Linealidad	Exactitud	Precisión (C.V.)
Na <sup>+</sup> y K <sup>+</sup>	54 < m < 60 (mV)	$r^2 \leq 0.9800$	97 a 103%	$\leq 3\%$
Cl <sup>-</sup>	-60 < m < -54 (mV)			
Ca <sup>2+</sup>	25 < m < 30 (mV)			

##### 4.1.1. Validación del sistema y métodos de cuantificación por estándar externo (E.E.), con los electrodos de Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup> y Cl<sup>-</sup>

###### 4.1.1.1. Respuesta del sistema y linealidad del sistema

En la tabla 16 se muestran los parámetros de desempeño obtenidos para la respuesta y linealidad del sistema en la validación de métodos por estándar externo para cada uno de los iones.



Tabla 16. Parámetros de desempeño

Parámetro	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Cl <sup>-</sup>
Intervalo de concentraciones (mgL <sup>-1</sup> )	10 a 100	10 a 240	1 a 10	10 a 240
Pendiente (m)	55.386	60.26	26.26	-55.66
Ordenada al origen (b)	-246.82	-241.57	-92.23	299.24
Coefficiente de correlación (r <sup>2</sup> )	0.991	0.998	0.996	0.997

En la figura 15 se presentan las curvas de calibración tipo, obtenidas para evaluar la linealidad de los sistemas ISE por estándar externo con los electrodos de Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> y Ca<sup>2+</sup>. En la Figura 16 se presenta la curva de calibración para el electrodo de Cl<sup>-</sup>. Se graficó el potencial en mV en función del logaritmo de la concentración.

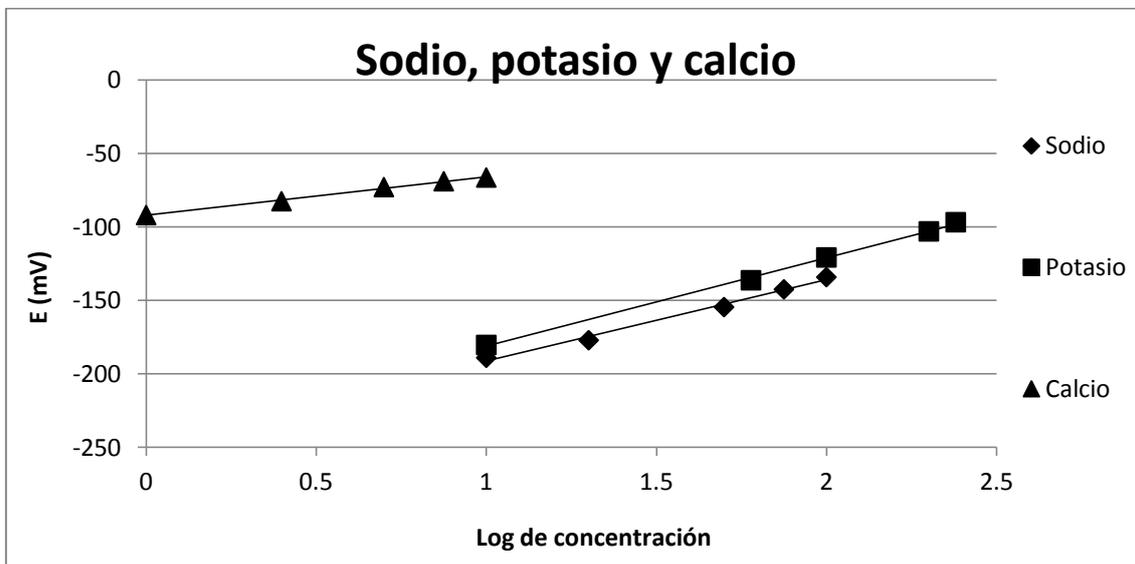


Figura.15 Curvas de calibración por el método de estándar externo de Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> y Ca<sup>2+</sup>: intervalo de concentración de 10 a 100 mgL<sup>-1</sup> para sodio, de 10 a 240 mgL<sup>-1</sup> para potasio y para calcio sus concentraciones fueron de 1 a 10 mgL<sup>-1</sup>

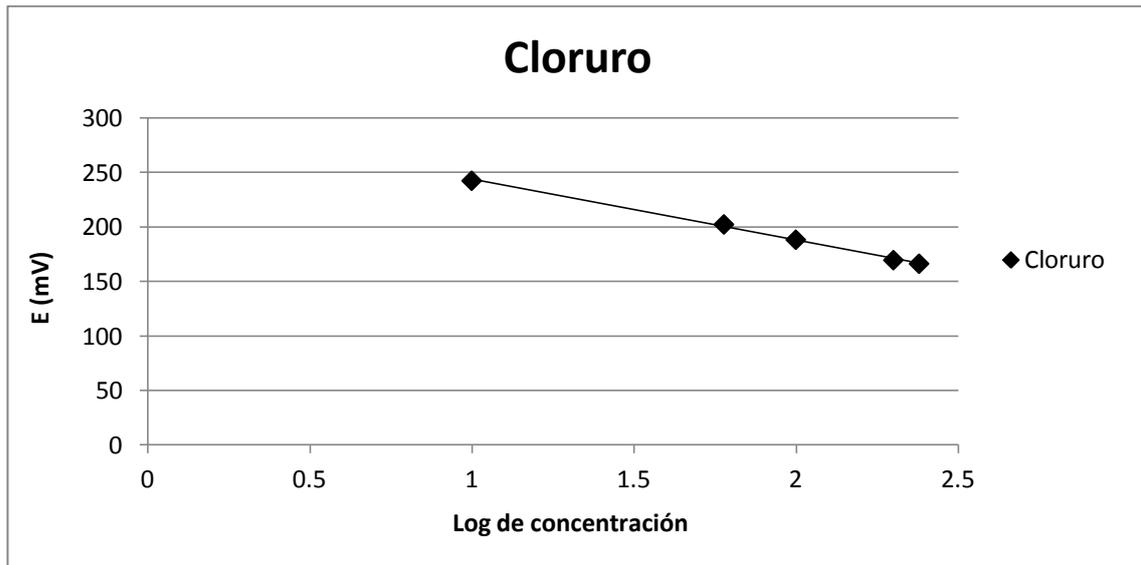


Figura 16. Curva de calibración de cloruros por estándar externo. Intervalo de concentración de 10 a 240 mgL<sup>-1</sup>

Los parámetros que se obtuvieron de la respuesta del sistema de la tabla 16 mostraron un funcionamiento óptimo del sistema debido a que las pendientes obtenidas para Na<sup>+</sup> (55.4), K<sup>+</sup> (60.3) y Cl<sup>-</sup> (-55.7) se encuentran dentro de los rangos establecidos por el fabricante para su óptimo funcionamiento, estos criterios de aceptación se encuentran entre los 54 a 60 mV (en valor absoluto), para iones monovalentes (Thermo electron Corporation, 2003).

Con respecto a la linealidad, se puede observar que los valores obtenidos para los intervalos de concentraciones en estudio tienen un coeficiente de correlación por arriba del 0.98, esta proporción es tomada como referencia de los criterios de aceptación de la guía de validación de los métodos analíticos (García, et al., 2002).

#### 4.1.1.2. Exactitud y precisión del sistema (muestra sintética)

En la tabla 17 se muestran los parámetros de desempeño obtenidos en la validación de los métodos para la exactitud y precisión por estándar externo para cada uno de los iones, entre paréntesis se indica el coeficiente de variación (CV).



Tabla 17. Parámetros de desempeño

Parámetro		Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Cl <sup>-</sup>
Intervalo de concentraciones (mg L <sup>-1</sup> )		10 a 100	10 a 240	1 a 10	10 a 240
Pendiente (m) (C.V)		55.62 (0.58)	60.26 (0.38)	26.15 (1.35)	-55.16 (0.47)
Ordenada al origen* (b) (C.V.)		-247.58 (0.28)	-243.42 (-1.33)	-93.79 (0.94)	299.11 (0.19)
Coeficiente de correlación* (r <sup>2</sup> )		0.991	0.997	0.994	0.997
Precisión de recobro (%)	Repetibilidad (CV)	100.08 (0.94)	98.84 (1.12)	99.52 (1.39)	100.36 (1.07)
	Reproducibilidad (CV)	99.95 (0.30)	98.99 (1.20)	99.32 (0.57)	101.94 (1.55)

\*Al 95% de confianza

En la figura 17 se presentan las curvas de calibración tipo, obtenidas para valorar la linealidad de los sistemas ISE en la evaluación de la exactitud y precisión por estándar externo con los electrodos de Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> y Ca<sup>2+</sup>. En la figura 18 se presenta la curva de calibración para valorar la linealidad el electrodo de Cl<sup>-</sup> en la evaluación de precisión y exactitud. Sé graficó el potencial en mV en función del logaritmo de la concentración.

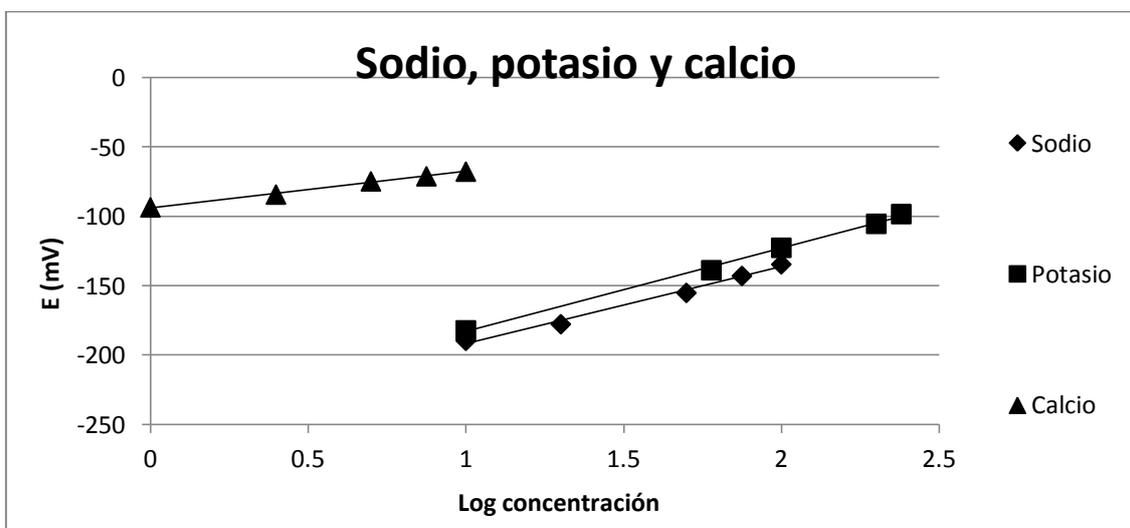


Figura.17 Curva de calibración: Método de estándar externo: de Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> y Ca<sup>2+</sup> intervalo de concentración de 10 a 100 mgL<sup>-1</sup> para sodio y de 10 a 100 mgL<sup>-1</sup> para potasio para calcio su concentraciones fueron de 1 a 10 mgL<sup>-1</sup>

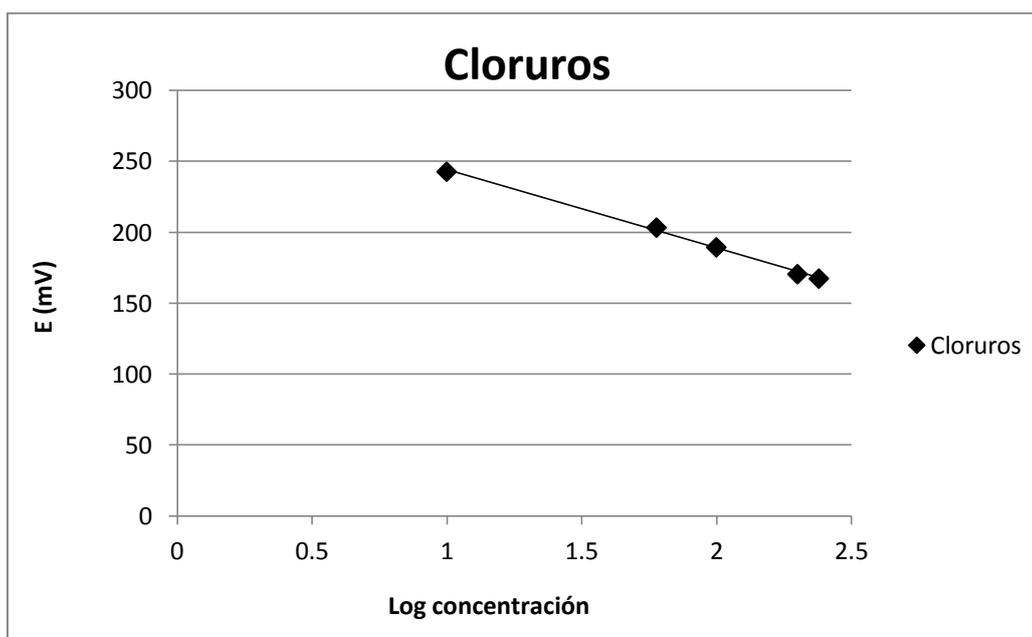


Figura 18. Curva de calibración de cloruros por estándar externo. Intervalo de concentración de 10 a 240 mg L<sup>-1</sup>

De los resultados presentados en la tabla 17 se desprende que la respuesta del sistema para todos los casos fueron óptimas, ya que el valor medio absoluto de las pendientes obtenidas para iones monovalentes Na<sup>+</sup> (55.62), K<sup>+</sup> (60.26) y Cl<sup>-</sup> (-55.16) se encontraron dentro de los criterios de aceptación establecidos por el fabricante entre 54 a 60 mV (en valor absoluto), para iones monovalentes (Thermo electron Corporation, 2003), así mismo para Ca<sup>2+</sup> (26.15), el valor se encontró dentro de lo marcado para iones divalentes 24 a 26 mV (Thermo electron Corporation, 2003), lo cual permitió asegurar que el sistema operó dentro de los criterios preestablecidos, que permitieron garantizar la confiabilidad de los resultados.

En lo que respecta a la linealidad en los intervalos de concentraciones de estudio se puede ver que los valores de r<sup>2</sup>, para todos los sistemas se encontraron por arriba del criterio de aceptación de 0.98 (García, et al., 2002), siendo 0.991 para el electrodo de Na<sup>+</sup>, el valor más bajo obtenido, por lo que se puede asegurar que los sistemas respondieron de forma lineal en el intervalo de concentraciones de estudio.

Para evaluar la exactitud y la precisión se fijó la concentración de acuerdo con los siguientes puntos:



- a) Para el caso del  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Cl}^-$ , se tomó como base las concentraciones de iones que se encuentran reportadas en la literatura. En los artículos de Gallaher, et al., 2006 y Özcan, et al., 2008 en los cuales se trabajó con diferentes tipos de infusiones.
- b) En el caso de los iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ , se tomó como base las concentraciones que se encontraron reportadas en las tablas nutrimentales de los productos comerciales, de los productos que los presentaron, en caso de los productos que no los presentaron se tomó como referencia la bibliografía antes mencionada.

Los porcentajes de recobro obtenidos para cada uno de los iones se encontraron entre 98 -102 %, en la tabla 17 se muestran los valores que se encontraron perfectamente dentro del intervalo del criterio de aceptación establecido para la exactitud de un método fisicoquímico, 97 a 103 %, de acuerdo con la guía de validación de métodos analíticos (García, et al., 2002). Por lo que se puede decir la exactitud fue buena para este método, dando la posibilidad de trabajar con la infusión de Té, en las mismas condiciones que para disoluciones sintéticas.

La precisión se evaluó para todos los sistemas a dos niveles: repetibilidad y reproducibilidad. En ambas evaluaciones y para todos los casos se tuvieron coeficientes de variación (CV), que cumplieron satisfactoriamente con los criterios de aceptación, es decir,  $\text{CV} \leq 3\%$ , como se observa en las Tablas 15 y 17; por lo que se pudo afirmar que la precisión de este método es óptima para poder trabajar con la infusión de Té al igual que con las condiciones de disoluciones sintéticas.

Los resultados presentados permiten asegurar que el método de estándar externo en el intervalo de concentraciones validado, tuvo una buena linealidad, repetibilidad y exactitud, ya que todo los parámetros se encontraron dentro de los criterios de aceptación, como se muestra en la tabla 16 y 17, basada de en la guía de validación (García, et al., 2002). Lo cual permitió trabajar con matriz de Té por el método estándar externo y obtener resultados confiables.



**4.1.1.3. Validación de la precisión del método (en presencia de matriz de infusión de Té negro y Té verde (repetibilidad y reproducibilidad))**

Para la validación del método en el caso de estándar externo se evaluó la repetibilidad y reproducibilidad, en presencia de la matriz de infusión de Té negro e infusión de Té verde. Estos datos se muestran en la tabla 18.

Tabla 18. Promedio de concentraciones con sus C.V. de los iones potasio y cloruro en matriz de Té verde y negro por método estándar externo

Ión	Té negro		Té verde	
	Repetibilidad	Reproducibilidad	Repetibilidad	Reproducibilidad
K <sup>+</sup> mg L <sup>-1</sup>	45.04	45.97	129.95	130.10
(C.V. %)	(1.26)	(1.49)	(0.91)	(1.09)
Cl <sup>-</sup> mg L <sup>-1</sup>	25.53	25.34	26.40	25.91
(C.V. %)	(1.04)	(1.92)	(1.04)	(1.33)

En los resultados mostrados en la tabla 18, se puede observar que la repetibilidad y la reproducibilidad de los iones K<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup> fueron aceptables, ya que satisfizo los criterios de aceptación, para el cual su C.V. fue menor a 3 %, como marca la guía de validación de métodos analíticos (García, et al., 2002).

Para el caso de los iones Ca<sup>2+</sup> y Na<sup>+</sup>, no se muestran sus resultados en la tabla 18, debido a que las lecturas estuvieron fuera del intervalo de las concentraciones de las curvas de calibración validado por medio de disoluciones sintéticas, por ser muy bajas las lecturas no podrían ser interpoladas en las curvas de calibración. Por los motivos expuestos fue mejor trabajar con estas infusiones por adición estándar.

Finalmente, se puede decir que el método de estándar externo, fue adecuado para las determinaciones en presencia de matriz de infusión de Té negro y Té verde de los iones con concentraciones que se encontraron dentro del rango de las curvas de calibración validadas como es el caso de K<sup>+</sup> de 10 a 100 mgL<sup>-1</sup> y de Cl<sup>-</sup> 10 a 240 mgL<sup>-1</sup>, en el caso de los C.V. los valores de las concentraciones presentaron una variabilidad adecuada ya que se encontraron por debajo de



los criterios de aceptación de la guía de validación de métodos analíticos (García, et al., 2002). En el caso de los iones  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Na}^+$  que presentaron valores de concentración menores a los intervalos de las concentraciones de las curvas de calibración validadas, será mejor utilizar la técnica de adiciones estándar, demostrando que la técnica por adición estándar es la más favorable para los iones con bajas concentraciones (Flores, 2008).

#### 4.1.2 Validación del sistema por el método de Adición Estándar (A.E.), para los electrodos de $\text{Na}^+$ y $\text{Ca}^{2+}$

##### 4.1.2.1. Respuesta y linealidad del sistema

El método de las adiciones estándar solo fue realizado para los iones de sodio y calcio debido a que las concentraciones de estos iones presentes en las muestras fueron muy pequeñas y fue necesario utilizar este método para obtener una buena medición.

En la tabla 19 se muestran los parámetros de desempeño para la validación de la respuesta y linealidad por el método de adición estándar para los iones de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$ .

Tabla 19. Parámetros de desempeño por adiciones estándar.

Parámetro de regresión	$\text{Na}^+$	$\text{Ca}^{2+}$
Pendiente (m)	55.12	26.538
Ordenada al origen (b)	-255.16	-94.82
Coefficiente de correlación ( $r^2$ )	0.9997	0.9996

En la figura 19 se presentan las curvas de calibración tipo, se graficó el potencial en mV en función del logaritmo de la concentración de las alícuotas adicionadas del estándar. En el caso de  $\text{Na}^+$  se tuvo una concentración inicial de  $10 \text{ mgL}^{-1}$  y se hicieron 5 adiciones para terminar con una concentración de  $60 \text{ mgL}^{-1}$ . En el caso de  $\text{Ca}^{2+}$  se tuvo una concentración inicial de  $5 \text{ mgL}^{-1}$  y se



realizaron 5 adiciones para terminar con una concentración de 55 mgL<sup>-1</sup>. Se fue agregando alícuotas correspondientes aún incremento de 10 mgL<sup>-1</sup>.

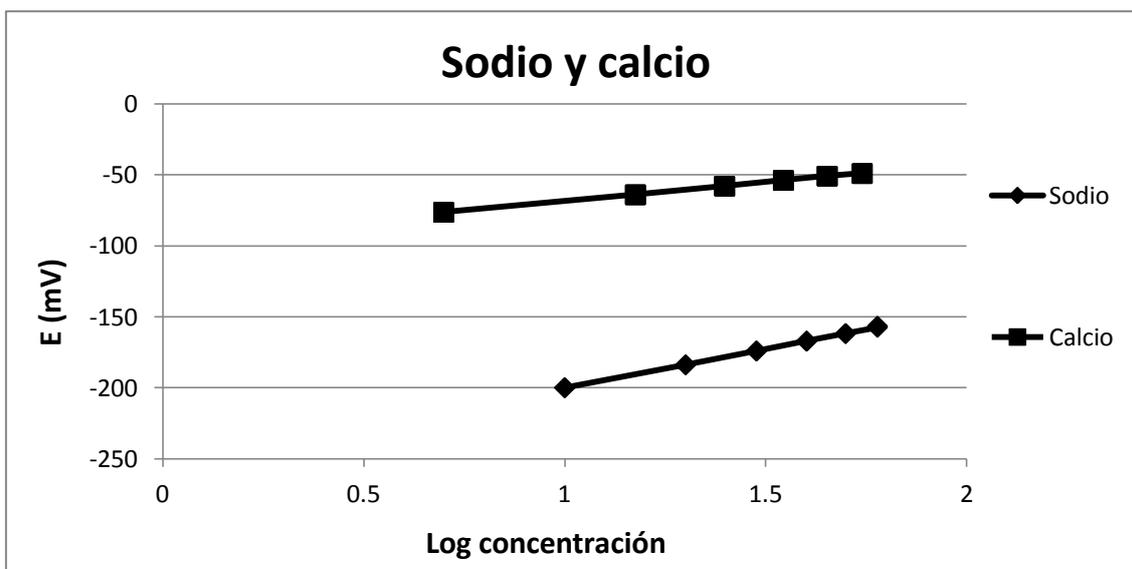


Figura 19 curva de calibración para Na<sup>+</sup> y Ca<sup>2+</sup> por adición estándar.

En la tabla 19 se presentan las lecturas obtenidas de la respuesta del sistema. Estos resultados mostraron un funcionamiento óptimo del sistema debido a que las pendientes obtenidas para Na<sup>+</sup> (55.12) y Ca<sup>2+</sup> (26.53) se encuentran dentro de los rangos establecidos por el fabricante para su óptimo funcionamiento, estos criterios de aceptación se encuentran entre los 54 a 60 mV (en valor absoluto), para el ión sodio, para el caso del ion calcio sus rangos de aceptación son de 25 a 30 mV (Thermo electron Corporation, 2003).

Con respecto a la linealidad, se puede observar que los valores obtenidos para los intervalos de concentraciones en estudio tienen un coeficiente de correlación por arriba del 0.98, esta proporción es tomada como referencia de los criterios de aceptación de la guía de validación de los métodos analíticos (García, et al., 2002).

#### 4.1.2.2. Exactitud y precisión (muestra sintética)

Después de haber obtenido una buena respuesta y linealidad del sistema se procedió a validar la exactitud y precisión por el método de adición estándar.



En la tabla 20 se muestran los parámetros de desempeño obtenidos de la validación del método por adición estándar para la valoración de la exactitud y precisión con los iones de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$ .

Tabla 20. Parámetros de desempeño por adiciones estándar.

Parámetro de regresión		$\text{Na}^+$	$\text{Ca}^{2+}$
Pendiente* (m) (C.V.)		56.72 (0.92)	26.92 (4.22)
Ordenada al origen* (b) (C.V.)		-256.99 (0.32)	-94.77 (0.57)
Coeficiente de correlación* ( $r^2$ )		0.999	0.999
Precisión de Recobro (%)	Repetibilidad (CV)	98.42 (0.38)	96.67 (1.70)
	Reproducibilidad (CV)	101.05 (1.44)	98.79 (1.65)

En la figura 20 se presentan las curvas de calibración tipo, estas gráficas se obtuvieron para valorar la linealidad de los sistemas ISE. Se graficó el potencial en mV en función del logaritmo de la concentración de las adiciones de la solución estándar. En el caso de  $\text{Na}^+$  se tuvo una concentración inicial de  $10 \text{ mgL}^{-1}$  y se hicieron 5 adiciones para terminar con una concentración de  $60 \text{ mgL}^{-1}$ . En el caso de  $\text{Ca}^{2+}$  se tuvo una concentración inicial de  $5 \text{ mgL}^{-1}$  y se realizaron 5 adiciones para terminar con una concentración de  $55 \text{ mgL}^{-1}$ . Se fue agregando alícuotas correspondientes a un incremento de  $10 \text{ mgL}^{-1}$ .

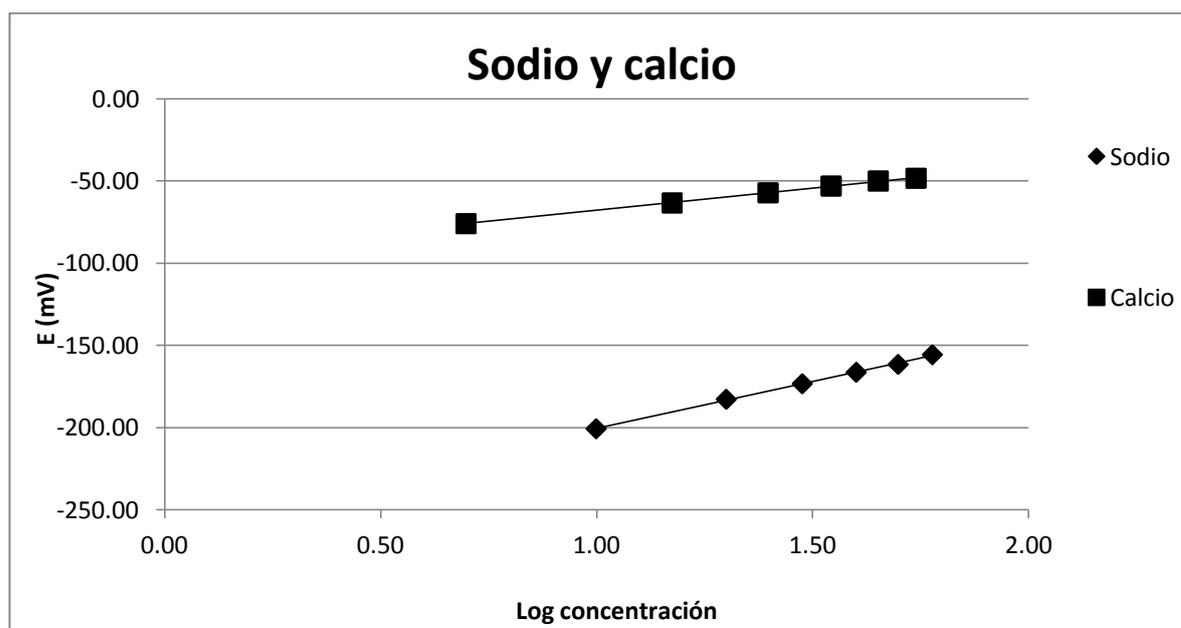


Figura.20. Curvas de calibración tipo, adiciones estándar, para Na<sup>+</sup> y Ca<sup>2+</sup>

En la tabla 20 se aprecia que la respuesta de cada sistema por el método de adiciones estándar, fue buena, ya que el valor medio absoluto de las pendientes obtenidas para el electrodo de sodio (59.43), se encontraron dentro del intervalo aceptable para un ión monovalente (54 a 60), así mismo para el ión Ca<sup>2+</sup> (26.92), se encontraron dentro de los criterios de aceptación establecidos por el fabricante (24 a 30), (Thermo electron Corporation, 2003). Lo anterior aseguró que el sistema operó en buenas condiciones, basándose en criterios preestablecidos, garantizando la confiabilidad de los resultados.

Para la evaluación de la linealidad del sistema se presentan valores de r<sup>2</sup>, en los intervalos de concentración de estudio; todos los sistemas se encontraron por arriba del criterio de aceptación de 0.98 (García, et al., 2002) como se muestra en la tabla 20.

Los porcentajes de recobro que se presentan en la tabla 20, para Na<sup>+</sup> (101 %) y para Ca<sup>2+</sup> (98 %), son aceptables ya que se encontraron dentro del criterio de aceptación establecido para la exactitud de un método fisicoquímico, 97 a 103 %, establecido en la guía de validación de métodos analíticos (García, et al., 2002). Por lo que se puede decir que la exactitud fue aceptable en este método de adición estándar para poder trabajar con matriz de Té.



En el caso de la precisión, esta se evaluó a dos niveles: repetibilidad y reproducibilidad, tanto para el electrodo de  $\text{Na}^+$ , como para el de  $\text{Ca}^{2+}$ . Para ambos electrodos, las dos evaluaciones fueron óptimas, debido a que sus C.V. se encontraron dentro de los criterios de aceptación, es decir  $\text{C.V.} \leq 3\%$ , tabla 20, por lo que la precisión fue buena en este método para poder trabajar con matriz de Té en las condiciones establecidas con disoluciones sintéticas.

#### 4.1.2.3. Linealidad del método ISE por A.E. en presencia de matriz de Té negro y Té verde

En la tabla 21 se presentan los parámetros de desempeño obtenidos para la linealidad y respuesta del sistema en la validación del método por adición estándar en presencia de matriz de Té negro y Té verde para cada uno de los iones.

Tabla 21. Parámetros de desempeño por adiciones estándar.

Parámetro de regresión	$\text{Na}^+$		$\text{Ca}^{2+}$	
	Negro	Verde	Negro	Verde
Tipo de Té				
Pendiente (m)	55.304	55.365	24.075	24.061
Ordenada al origen (b)	-255.23	-254.74	-93.054	-93.409
Coefficiente de correlación ( $r^2$ )	0.9996	0.9997	0.999	0.9991

En las figuras 21 y 22 se presentan las curvas de calibración tipo. Estas gráficas se realizaron midiendo el potencial inicial de una muestra con un volumen de 10 mL matriz de infusión de Té negro o Té verde, a continuación se agregaron 3 alícuotas de 0.1 mL de una disolución de  $1000 \text{ mgL}^{-1}$ , se midió el potencial antes y después de cada adición, estas muestras tuvieron agitación constante hasta que alcanzaron el equilibrio. Se graficó el potencial en mV en función del logaritmo de la concentración.

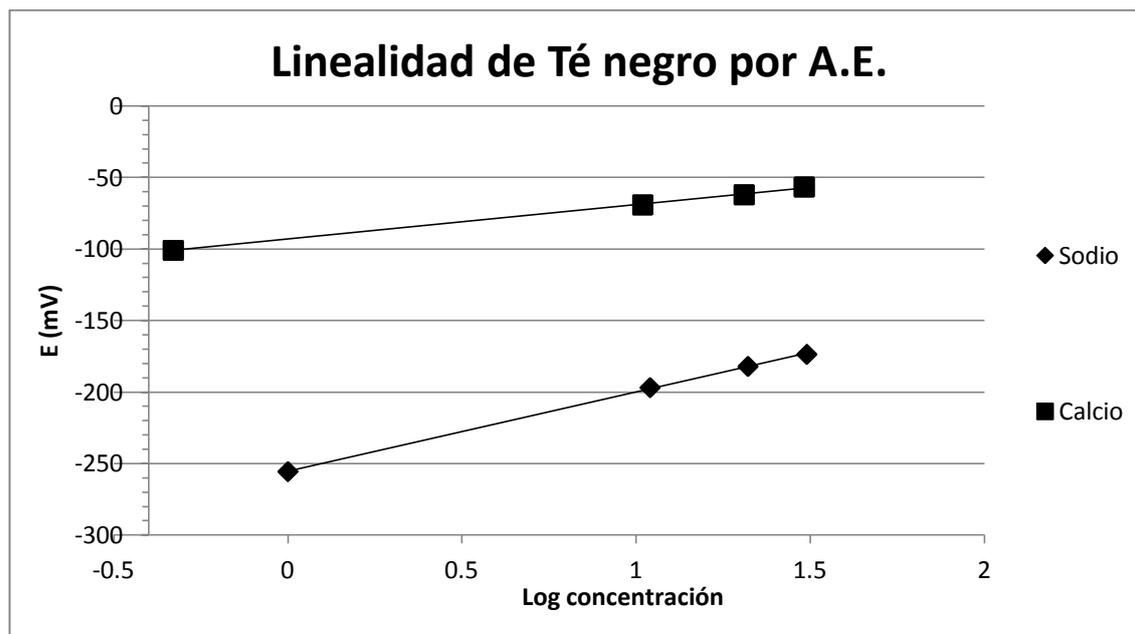


Figura 21 curva de calibración con matriz de Té negro para Na<sup>+</sup> y Ca<sup>2+</sup> por adición estándar.

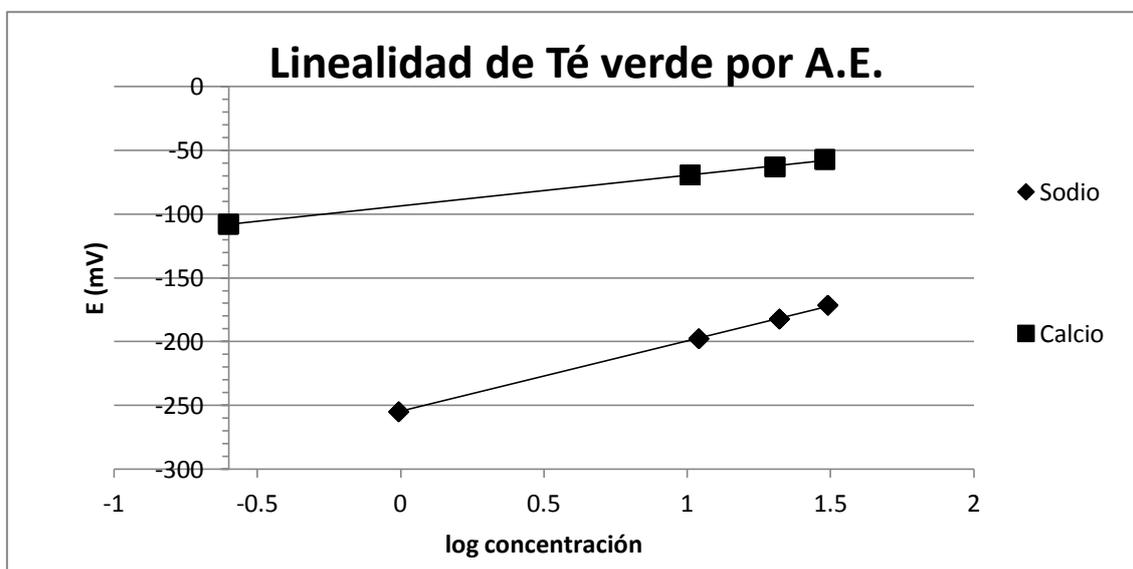


Figura 22 curva de calibración con matriz de Té verde para Na<sup>+</sup> y Ca<sup>2+</sup> por adición estándar.

En la tabla 21 se muestran los parámetros de desempeño para la linealidad en presencia de matriz de Té negro y Té verde, estos parámetros muestran que la respuesta de cada sistema por el método de adición estándar, fue buena, debido a que el valor absoluto de las pendientes obtenidas para el electrodo de Na<sup>+</sup> para la matriz de Té negro fue de 55.3 y para la matriz de Té verde fue de 55.3, estas pendientes se encontraron dentro de los parámetros de aceptación



para un ion monovalente (54 a 60), en el caso del ion  $\text{Ca}^{+2}$  las pendientes con matriz de Té negro fueron de 24.07 y en presencia de Té verde 24.06, también se encontraron dentro de los parámetros de aceptación establecidos por el fabricante (24 a 30), (Thermo electron Corporation, 2003). Por los resultados antes mencionados se aseguró que el sistema operó en buenas condiciones en presencia de matriz de Té verde y Té negro, con base a los criterios preestablecidos por el fabricante, garantizando la confiabilidad de los resultados.

La linealidad del sistema se evaluó con el coeficiente de correlación, en el caso de la matriz de Té negro se presentó para  $\text{Na}^+$  de 0.99 y para  $\text{Ca}^{+2}$  de 0.99; en el caso de la matriz de Té verde los  $r^2$  para  $\text{Na}^+$  de 0.99 y para  $\text{Ca}^{+2}$  de 0.99, en los intervalos de concentración de estudio; todos los sistemas se encontraron por arriba del criterio de aceptación de 0.98 (García, et al., 2002).

**4.1.2.4. Precisión del método (en presencia de matriz de Té negro y Té verde (repetibilidad y reproducibilidad))**

Para la validación del método en el caso de adición estándar se evaluó con dos parámetros como fue la repetibilidad y la reproducibilidad, en presencia de la matriz de infusión de Té negro e infusión de Té verde. En la tabla 22 se presentan las concentraciones de cada ion con su respectivo C.V.

Tabla 22. Promedios de concentración con sus C.V. de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  en matriz de Té verde y Té negro por el método de adición estándar.

Ión	Té negro		Té verde	
	Repetibilidad	Reproducibilidad	Repetibilidad	Reproducibilidad
$\text{Na}^+$ mgL <sup>-</sup>	0.92	0.89	0.962	0.96
(C.V. %)	(1.16)	(0.63)	(0.245)	(1.43)
$\text{Ca}^{2+}$ mgL <sup>-</sup>	1.61	1.63	0.72	0.72
(C.V. %)	(1.55)	(1.48)	(1.61)	(1.09)

Con los datos presentados en la tabla 22 se demuestra que los parámetros para la precisión (repetibilidad y reproducibilidad) del método de adición



estándar para los dos iones ( $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$ ) en presencia de matriz de Té negro fueron óptimos. En el caso del ión  $\text{Na}^+$  los porcentajes de C.V. para la repetibilidad fue de 1.16 y en la reproducibilidad fue de 0.63. Para el caso del ión  $\text{Ca}^{2+}$  los porcentajes del C.V. fueron para la repetibilidad de 1.55 y para la reproducibilidad de 1.48, estos parámetros mencionados están dentro de los criterios de aceptación, es decir C.V.  $\leq 3\%$ , basados en la guía de validación para métodos analíticos (García, et al., 2002).

De igual manera en los resultados presentados en la tabla 22 se puede observar que la repetibilidad como la reproducibilidad de los iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  en presencia de la matriz de Té verde fueron aceptables. En el caso del ión  $\text{Na}^+$  el porcentaje del C.V. para la repetibilidad fue de 0.24 y su reproducibilidad fue de 1.43; para el caso del ión  $\text{Ca}^{2+}$  el C.V. de la repetibilidad fue de 1.61 y de la reproducibilidad fue de 1.09. Estos porcentajes de C.V. cumplió los criterios de aceptación, debido a que los C.V. estuvieron por debajo de  $3\%$ , como se estipula en la guía de validación de métodos analíticos (García, et al., 2002).

Finalmente, con los datos mostrados en la tabla 22 se demuestra que las concentraciones de los dos iones dentro de la matriz de Té negro como de Té verde estuvieron por debajo de las curvas de calibración para el método de estándar externo como se menciona en la sección 4.1.1.3. Por lo tanto, se puede afirmar que el mejor método para la medición de los iones de  $\text{Na}^+$  en matrices de infusiones de Té negro y Té verde fue el método de adición estándar. En el caso del ión  $\text{Ca}^{2+}$  se pudo justificar el uso del método de adición estándar, debido a que las concentraciones de ión calcio en la matriz de ambos Té fluctúan en los límites de concentración de la curva de calibración para el método de estándar externo. Por tal motivo se utilizó el método de adición estándar para asegurar una buena medición de las concentraciones del ión  $\text{Ca}^{2+}$ .

### 4.1.3. Determinación de iones en las muestras

En las tablas 23 y 24 se presentan las concentraciones promedio de 5 diferentes marcas de Té verde y Té negro para infusionar y una marca lista



para beber de cada uno de los dos tipos de Té las cuales son la muestra K (Té verde-limón) y muestra L (Té negro-durazno). Se reportaron para estándar externo, tres lecturas para cada una de las tres mediciones mediante los sistemas ISE, esto se realizó en tres diferentes lotes de cada uno de los cinco productos de Té durante tres días diferentes con cada uno de los dos tipos de Té. En el caso de adición estándar se realizaron tres lecturas para cada una de las tres adiciones por cada medición con cada uno de los 3 lotes diferentes de cada una de los 5 productos de Té durante tres días diferentes, bajo cada sistema ISE para cada tipo de Té. En los cuadros se reportan dos tipos de concentraciones, en  $\text{mgL}^{-1}$  y en  $\text{m}\mu\text{g}^{-1}$ .



## ANÁLISIS DE RESULTADOS



Tabla 23. Contenido de Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup> y Cl<sup>-</sup> en muestras de Té verde

Muestra	A		B		C		D		E		K
	mgL <sup>-1</sup>	mgg <sup>-1</sup>	mgL <sup>-1</sup>								
Na <sup>+</sup> Promedio en extracto	0.90	0.04	1.01	0.05	1.42	0.05	0.99	0.05	1.25	0.03	95.5 5
C.V.	14.65	11.42	4.39	7.57	16.01	17.22	7.64	6.13	0.66	12.25	1.33
K <sup>+</sup> Promedio en extracto	176.34	7.38	179.92	8.33	38.91	1.29	73.48	3.78	196.2 5	5.28	26.7 4
C.V.	5.59	4.59	1.40	11.93	0.20	2.99	25.13	26.50	2.98	17.13	0.37
Ca <sup>2+</sup> Promedio en extracto	0.74	0.03	0.60	0.03	0.61	0.02	0.63	0.03	0.64	0.02	2.14
C.V.	6.47	4.89	5.34	15.80	5.19	8.87	1.64	2.91	1.63	12.43	9.17
Cl <sup>-</sup> Promedio en extracto	24.49	1.05	33.49	1.53	33.19	1.10	27.27	1.40	26.10	0.71	30.2 1
C.V.	1.57	4.68	19.75	9.37	7.43	4.79	5.89	6.95	12.80	28.85	1.29

Se reporta el valor promedio de 3 lotes para cada muestra o producto de Té.

Tabla 24. Contenido de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Cl}^-$  en muestras de Té negro

Muestra	F		G		H		I		J		L
	$\text{mgL}^{-1}$	$\text{mgg}^{-1}$	$\text{mgL}^{-1}$								
$\text{Na}^+$ Promedio en extracto	1.02	0.04	0.85	0.04	0.26	0.01	0.95	0.03	0.78	0.02	95.23
C.V.	5.63	18.01	0.70	6.41	26.04	24.54	7.13	11.28	11.33	8.33	1.35
$\text{K}^+$ Promedio en extracto	53.67	2.03	36.86	1.66	35.91	0.81	54.69	1.75	53.55	1.20	27.06
C.V.	3.06	24.30	4.38	5.92	2.74	1.45	2.16	7.25	4.16	0.92	0.33
$\text{Ca}^{2+}$ Promedio en extracto	1.49	0.06	0.98	0.04	1.03	0.02	1.59	0.05	1.51	0.03	1.99
C.V.	12.91	12.46	8.15	14.71	11.22	11.54	3.87	11.28	4.13	1.39	2.46
$\text{Cl}^-$ Promedio en extracto	28.65	0.96	20.00	0.89	20.72	0.48	34.84	1.14	36.31	0.82	30.90
C.V.	1.70	35.58	8.92	4.80	4.38	5.51	3.35	8.35	3.57	1.48	0.86

Se reporta el valor promedio de 3 lotes para cada muestra o producto de Té.

En las figuras 23, 24, 25 y 26 se presentan los diagramas de columna con las que se representan en forma gráfica los datos presentados en las tablas 23 y 24.

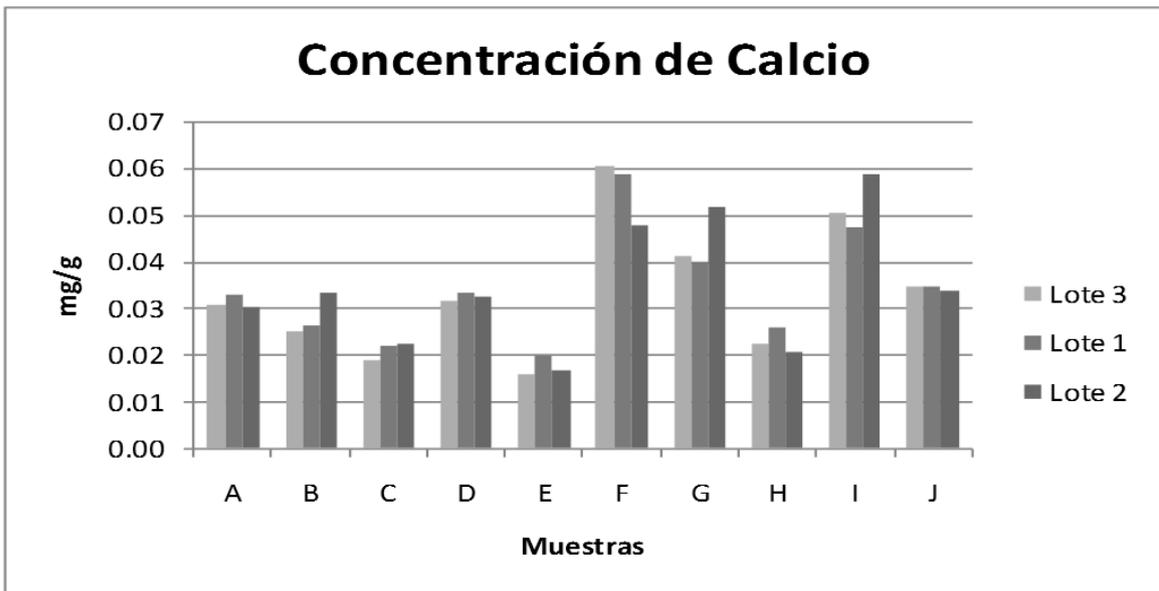
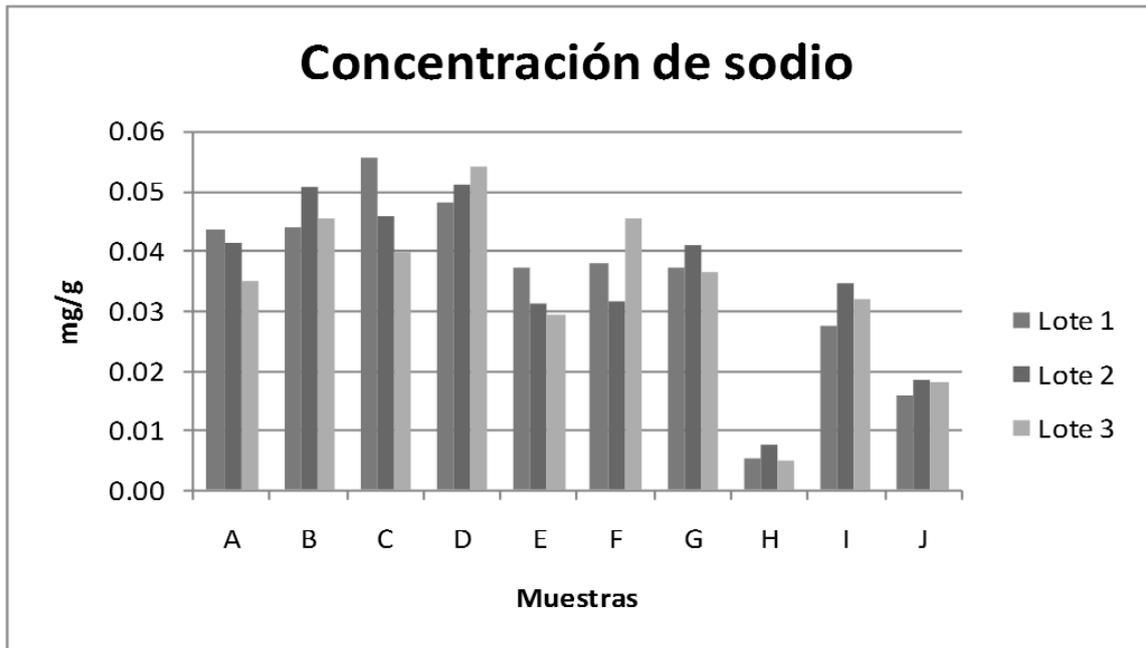


Figura 23 Concentraciones en mg/g de sodio y calcio presentes en las bolsas listas para infundir. Las muestras de A a E son representantes de Té verde mientras que las muestras de F a J son representantes de Té negro.

En las figuras 23 se muestran las concentraciones de sodio y de calcio presentes en la matriz de infusión de las muestras de Té en presentación de saquitos. Se puede observar que las concentraciones de ambos iones son bajas con respecto a los iones de potasio y cloruro que se presentan más adelante en la figura 24.



El sodio se encuentra en cantidades menores en las plantas debido a que este ión se puede decir que en sentido estricto no es un elemento esencial para las plantas, sin embargo se ha demostrado que este ión da beneficioso para las plantas. Por otro lado, la cantidad absorbida de este ión es muy diferente según la especie de la planta. Hay casos especiales en la que el sodio puede reemplazar al potasio en la regulación de la presión osmótica y turgencia de las células, este efecto es máximo cuando el suministro de potasio es deficiente, sin embargo, como se puede ver en la figura 24 el potasio es suficiente. (Russell y Wild, 1973).

En el caso del ion calcio su presencia fue baja. Se pudo deber a tres factores, el primero se debe que en los procesos del Té para su comercialización tiene que tener ciertas características como es el caso de utilizar hojas jóvenes, dado que la redistribución del calcio desde las hojas viejas a las hojas jóvenes no es buena hay una afectación significativa en la cantidad de calcio (Russell y Wild, 1973). Por otro lado, en caso de utilizar hojas viejas, en Té de menor calidad, en el paso del proceso llamado tamaño de partícula se mezclan hojas con tallos, esto hace también que disminuya la cantidad de ión debido a que se ha demostrado que el calcio se acumula especialmente en la hoja donde se deposita irreversiblemente y al mezclarlos con los tallos pierde calcio (Russell y Wild, 1973). El tercer factor que pudo influir es la presencia elevada de potasio KCl, debido a que se ha encontrado que a mayor concentración de potasio hay una disminución en la concentración del ión calcio (Buckman, 1996). Se observa también que la concentración de  $Ca^{2+}$  es mayor en las muestras de Té negro que en las muestras de Té verde. Por el contrario, la concentración del sodio parece estar más alta en las muestras de Té verde.

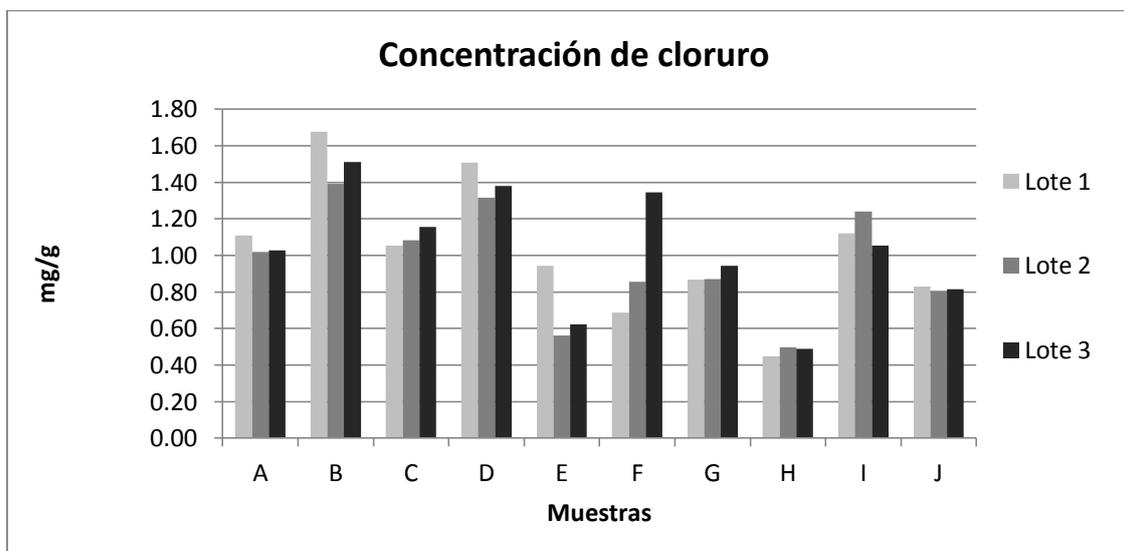
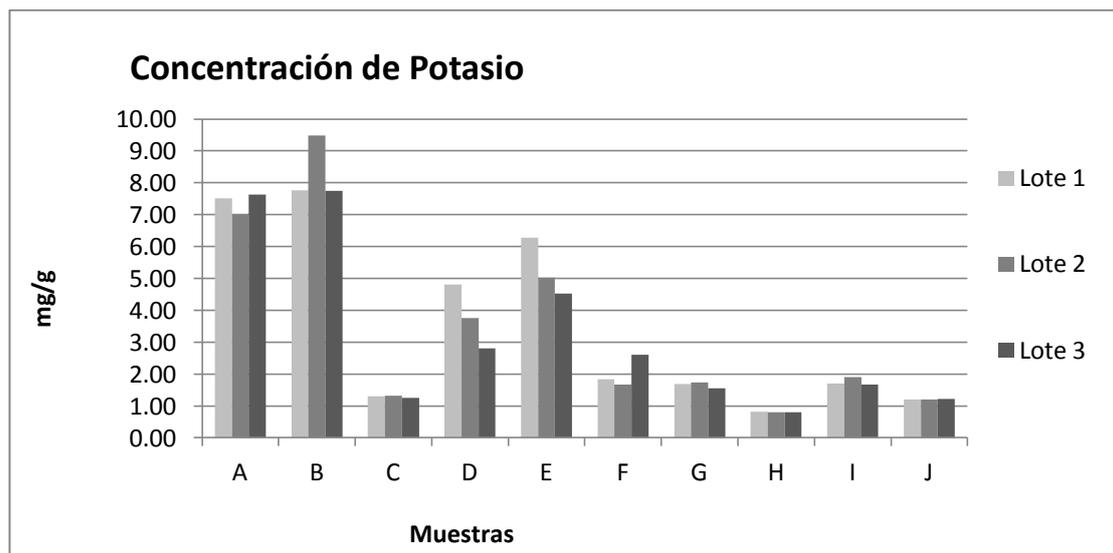


Figura 24 Concentraciones en mg/g de potasio y cloruro encontradas en las muestras de Té verde y Té negro. Las muestras de A a E son representantes de Té verde mientras que las muestras de Té negro son de la letra F a J.

En la figura 24 se presentan las concentraciones de los iones potasio y cloruro de las muestras de Té para infusión. Se puede observar que las concentraciones son mayores con respecto a las concentraciones de los otros dos iones en estudio.

En el caso del potasio por ser catalogado como un macronutriente (Arnon, 1988) las concentraciones están dentro de los parámetros esperados debido a que la cantidad de potasio originalmente en reservas es muy grande en la mayor parte de los suelos minerales, en efecto, la cantidad total de este



elemento es mayor que la de cualquier otro elemento nutritivo. La mayor parte de este elemento está sujeto rígidamente como parte de los minerales primarios o está fijado en formas que son, en el mejor de los casos, moderadamente asimilables por las plantas. También se ha observado que las plantas tienden a apoderarse del potasio soluble en cantidad superior a sus necesidades, al haber grandes cantidades presentes de éste. Esta tendencia se denomina consumo de flujo, ya que el exceso de potasio absorbido al parecer no aumenta la cosecha en ningún caso (Buckman, 1996). Se ha encontrado que el potasio en fertilizantes está presente como ión asociado generalmente al cloruro.

En el caso del cloruro a pesar de que es catalogado como un micronutriente (Arnon, 1988) sus concentraciones fueron altas debido a que el cloro recientemente se ha descubierto como esencial para el crecimiento de las plantas, por esta razón se ha empezado a utilizar en mayores cantidades por los agricultores (Buckman, 1996).

Por último, se puede mencionar que la mayor parte del cloro de los suelos está en la forma sencilla de cloruros solubles como el cloruro de potasio (Russell y Wild, 1973).

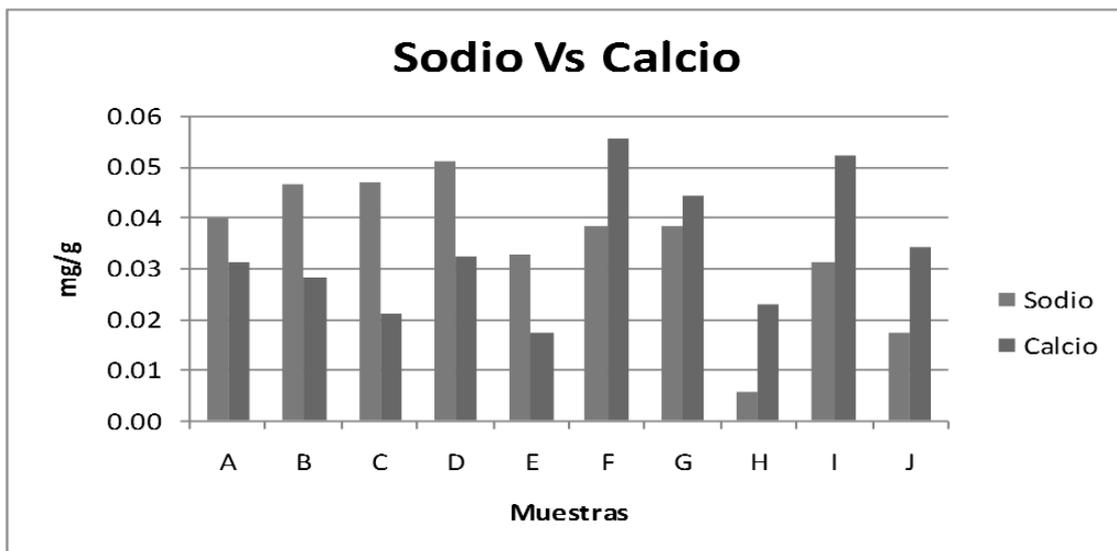


Figura 25 Comparación de las concentraciones de los iones de sodio y calcio expresadas en mg/g, encontradas en la matriz de infusión de Té verde y Té negro. Las muestras de la A a E son de Té verde y las muestras de F a J son de Té negro

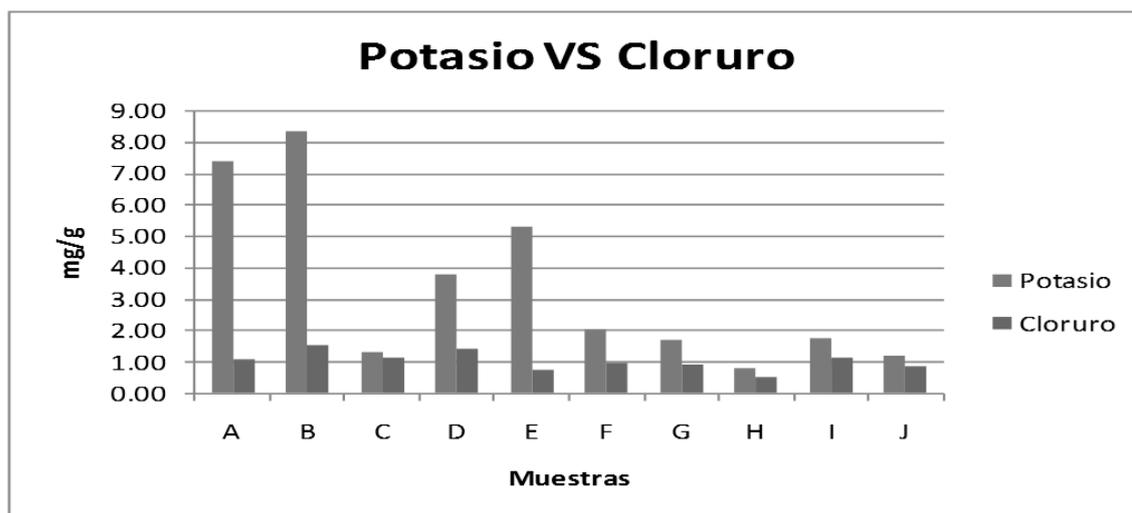


Figura 26 Comparación de las concentraciones, expresadas en mg/g, de los iones potasio y cloruro encontradas en la matriz de infusión de Té verde y Té negro. Las muestras A a E son de Té verde, las muestras de F a J son de Té negro

En las figuras 25 y 26 se presentan las comparaciones de las concentraciones de los iones presentes en las muestras. En la figura 25 se presentan las comparaciones de los iones de sodio contra calcio, en esta gráfica de barras se puede observar que las muestras de Té verde tienen mayor cantidad de sodio con respecto a las concentraciones de calcio, por otro lado, se puede observar que las concentraciones de sodio en el Té negro son menores con respecto a las concentraciones de calcio.

En la figura 26 se presentan las diferencias presentes en las concentraciones de los iones potasio y cloruros. En estos diagramas de columnas se puede observar que en general la concentración de potasio es mayor con respecto al ión cloruro, también se puede observar que las concentraciones del ión potasio en las muestras de Té verde es mayor con respecto a las concentraciones del mismo ión presentes en las muestras de Té negro.

Con las gráficas de las figuras 23, 24, 25 y 26, se observa una gran variación en las concentraciones de los iones estudiados en las muestras, por lo tanto, para poder demostrar estadísticamente en que muestras hay diferencias significativas, se propuso realizar el método de diferencia mínima significativa (DMS), debido a que este método es fácil de aplicar y es usualmente empleado para comparar una pareja de media aritmética de ensayos realizados, sin



embargo se puede utilizar para comparaciones de más de dos medias aritméticas en ensayos elaborados (Mendoza y Bautista, 2002; Miller y Miller, 2002).

Esta prueba consta de dos etapas, en la primera se prueba que exista un valor significativo del cociente del valor F: en caso de que F no sea significativo el análisis se termina; en caso de que sea significativo se sigue con la etapa 2. En esta segunda etapa se encuentran los valores de DMS para poder ser comparados con las diferencias de las medias aritméticas de las concentraciones de las muestras.

Tabla 25 Análisis de paso 1  
para Té negro

ión	F crítica	F tablas	Análisis	DMS
Na <sup>+</sup>	43.21	3.47	Con DMS	0.0052
Ca <sup>2+</sup>	20.22	3.47	Con DMS	0.0072
K <sup>+</sup>	13.08	3.47	Con DMS	0.3277
Cl <sup>-</sup>	6.871	3.47	Con DMS	0.2265

Tabla 26 Análisis de paso 1  
para Té verde

ión	F crítica	F tablas	Análisis	DMS
Na <sup>+</sup>	6.36	3.47	Con DMS	0.0070
Ca <sup>2+</sup>	21.27	3.47	Con DMS	0.0035
K <sup>+</sup>	40.80	3.47	Con DMS	1.0790
Cl <sup>-</sup>	19.98	3.47	Con DMS	0.7830

En las tablas 25 y 26 se puede observar que entre las  $F_{crítica}$  y las  $F_{tablas}$  existe una diferencia significativa por tal motivo es necesaria pasar a la segunda etapa en la cual se utiliza el valor de DMS que se presenta en las tablas 25 y 26 para poder hacer la comparación con las medias aritméticas de las concentraciones de las muestras.

A continuación se presentan las comparaciones realizadas al aplicar el método DMS.



Tabla 27. Comparaciones realizadas al aplicar el método DMS para muestras de Té verde

Sodio					
Muestras	A	B	C	D	E
MDS=0.01	0.04	0.05	0.05	0.05	0.03
A	0.00	-0.01	-0.01	-0.01	0.01
B	0.01	0.00	0.00	0.00	0.01
C	0.01	0.00	0.00	0.00	0.01
D	0.01	0.00	0.00	0.00	0.02
E	-0.01	-0.01	-0.01	-0.02	0.00

Calcio					
Muestras	A	B	C	D	E
MDS=0.00	0.03	0.03	0.02	0.03	0.02
A	0.00	0.00	0.01	0.00	0.01
B	0.00	0.00	0.01	0.00	0.01
C	-0.01	-0.01	0.00	-0.01	0.00
D	0.00	0.00	0.01	0.00	0.02
E	-0.01	-0.01	0.00	-0.02	0.00

Potasio					
Muestras	A	B	C	D	E
MDS=1.08	7.38	8.33	1.29	3.78	5.28
A	0.00	-0.95	6.09	3.59	2.10
B	0.95	0.00	7.04	4.55	3.05
C	-6.09	-7.04	0.00	-2.50	-3.99
D	-3.59	-4.55	2.50	0.00	-1.49
E	-2.10	-3.05	3.99	1.49	0.00

Cloruros					
Muestras	A	B	C	D	E
MDS=0.78	1.05	1.53	1.10	1.40	0.71
A	0.00	-0.48	-0.05	-0.35	0.34
B	0.48	0.00	0.43	0.13	0.82
C	0.05	-0.43	0.00	-0.30	0.39
D	0.35	-0.13	0.30	0.00	0.69
E	-0.34	-0.82	-0.39	-0.69	0.00



Tabla 28. Comparaciones realizadas al aplicar el método DMS para muestras de Té negro

Sodio					
Muestras	F	G	H	I	J
MDS=0.01	0.04	0.04	0.01	0.03	0.02
F	0.00	0.00	0.03	0.01	0.02
G	0.00	0.00	0.03	0.01	0.02
H	-0.03	-0.03	0.00	-0.03	-0.01
I	-0.01	-0.01	0.03	0.00	0.01
J	-0.02	-0.02	0.01	-0.01	0.00
Calcio					
Muestras	F	G	H	I	J
DMS=0.01	0.06	0.04	0.02	0.05	0.03
F	0.00	0.01	0.03	0.00	0.02
G	-0.01	0.00	0.02	-0.01	0.01
H	-0.03	-0.02	0.00	-0.03	-0.01
I	0.00	0.01	0.03	0.00	0.02
J	-0.02	-0.01	0.01	-0.02	0.00
Potasio					
Muestras	F	G	H	I	J
DMS=0.33	2.03	1.66	0.81	1.75	1.20
F	0.00	0.37	1.23	0.28	0.83
G	-0.37	0.00	0.85	-0.09	0.46
H	-1.23	-0.85	0.00	-0.95	-0.40
I	-0.28	0.09	0.95	0.00	0.55
J	-0.83	-0.46	0.40	-0.55	0.00
Cloruros					
Muestras	F	G	H	I	J
DMS=0.23	0.96	0.89	0.48	1.14	0.82
F	0.00	0.07	0.48	-0.18	0.15
G	-0.07	0.00	0.42	-0.24	0.08
H	-0.48	-0.42	0.00	-0.66	-0.34
I	0.18	0.24	0.66	0.00	0.32
J	-0.15	-0.08	0.34	-0.32	0.00

En tabla 27 se presentan las comparaciones DMS entre muestras de Té verde, las casillas que se encuentran sombreadas son las muestras en las que se encontraron diferencias.

Para el ión sodio en las muestras de Té verde solo se presenta DMS entre las muestras D y E, en el caso de las otras cuatro muestras no se encontraron



diferencias. En el caso de calcio se presentan DMS en la muestra A con las muestras C y E; en el caso de la muestra B presenta DMS con las muestras C y E; para la muestra C presenta diferencia con las dos muestras ya mencionadas y con la muestra D; la muestra D solo presenta diferencia con la muestra E. Para el ión potasio presentan MDS entre la muestra A con las muestras C, D y E; para la muestra B con las muestras C, D y E; en el caso de la muestra C presenta DMS con todas las muestras. Para el caso de cloruros solo se presentaron DMS entre las muestras B y E.

En la tabla 28 se presentan las comparaciones de DMS entre las muestras de Té negro. De igual forma que en la tabla anterior las casillas sombreadas son las muestras entre las que se presentan DMS. En los ensayos para el ión sodio se muestran diferencias significativas entre la muestra F con las muestras H y J; en el caso de la muestra G se presentan diferencias significativas entre la muestra H y la muestra J; para la muestra H hay diferencia significativa entre las muestras F, G e I. En el caso de la muestra I solo tiene diferencia significativa con la muestra H. Para el ión calcio las diferencias significativas son: en el caso de la muestra F tienen DMS con la muestra H y muestra J; para el caso de la muestra G solo se presenta DMS con la muestra H; en la muestra H se presenta diferencia significativa con las muestras F, G e I; para la muestra I hay diferencia significativa con las muestras H y J. En el ión potasio se presentan diferencias significativas entre la muestra F y las muestras G, H y J; en el caso de la muestra G hay diferencias significativas con las muestras F, H y J; En la muestra H se presentan DMS con todas las demás muestras; con la muestra I hubo DMS con la muestra H y J; la muestra J presenta DMS con todas las otras marcas. Para el caso de los cloruros hay diferencias significativas entre la muestra F con la muestra H; en la muestra G con las muestras H e I; la muestra H tiene diferencia con todas las demás muestras; con la muestra I hay diferencias con las muestras G, H y J; la muestra J presenta DMS con las muestras H e I.

Al hacer el análisis de las comparaciones se puede mencionar que hay muchas diferencias mínimas significativas presentes entre las muestras de Té, en cada uno de los iones. Estas diferencias en la concentración de iones pueden deberse a diferentes variables, a continuación se mencionara algunas de estas variables.



Entre las variables que se pueden mencionar, es la gran cantidad de variedades comerciales de Té que existen, estas variedades dependen de la biodiversidad botánica de la planta. Debido a que la planta de Té tiene variedades genéticas como las que se mencionaron en generalidades var. *sinensis* y var. *assamica* las cuales son morfológicamente y anatómicamente distintas, junto con varios híbridos con características superpuestas. Debido a estas variedades botánicas se ha estudiado que la absorción de minerales por parte de las plantas es diferente según sea la especie (Rusell y Wild, 1973).

Una de las características que tiene la planta de *Camellia sinensis* es ser una planta perene, esto quiere decir que todo el año puede ser cultivada, debido a que la única parte de la planta cultivada es la hoja por tal motivo el crecimiento de la planta se manipula y se mantiene como un arbusto en un estado de crecimiento vegetativo continuo por la poda periódica. Por esta razón, la edad de la parte de la planta que se ha cosechado es importante debido que cuanto más jóvenes sean las hojas, este tipo de Té tendrá un mayor costo en el mercado. Otro fenómeno que se puede observar por la edad de las hojas es que la redistribución del calcio desde las hojas viejas a las hojas jóvenes no es buena por tal motivo hay una afectación significativa en la cantidad de calcio en el Té (Rusell y Wild, 1973). Por otro lado, el grado de poda determina el potencial de la cosecha del Té, por tal motivo el crecimiento de la planta y la absorción de nutrientes están relacionados directamente y que la absorción continuada de nutrientes solamente se produce si aumenta el tamaño de la planta, este fenómeno se puede explicar debido a que hay países en los que se prefiere cortar las hojas a mano, se deja crecer la planta un poco más alto que en los países que se cultiva con máquinas (Banerjee y Chaudhuri, 2000)

Hay otros fenómenos que explican las variantes de la cantidad de iones presentes en la infusión de Té como es la variedad de lugares en las que se cultivan *Camellia sinensis*, la temporada del año en el que se cultiva, si las plantas son de riego o de temporal, debido a que se ha observado que, con frecuencia, pérdidas de minerales y de algunos otros elementos desde las hojas por lavado con agua de lluvia y ello, especialmente, en la madurez. Otro fenómeno es la competencia o falta que puede existir de los minerales en la



tierra de cultivo este fenómeno puede hacer que un mineral remplace a otro mineral cuando el subministro del primer mineral es deficiente. Para finalizar, la presentación del Té para su uso es en forma seca, debido a esto las concentraciones en la materia seca en la planta puede variar en un intervalo muy amplio (Rusell y Wild, 1973; Reichle, 1981; Buckman, 1996).

En el caso de las bebidas listas para tomar no se observan diferencias grandes en los C.V. mostrados en las tablas 23 y 24, por lo tanto, se puede decir que las concentraciones de iones entre los lotes no son tan variables como en las presentaciones de Té para infusión. Esto se puede deber que solo se utilizan concentrados de *C. sinensis* y no la planta en si. Se puede observar que las concentraciones de iones son muy parecidas entre los lotes debido a que son estandarizadas por los conservadores con los que se producen. Entre estos conservadores se encuentran el benzoato de sodio y el sorbato de potasio.

## **4.2. Análisis de triazinas en infusiones de Té**

### **4.2.1. Condiciones del análisis cromatográfico**

Las condiciones cromatográficas para obtener la mejor separación analítica de las triazinas se dedujeron del estudio que se describe posteriormente de evaluación del factor de retención  $k'$  a diferentes composiciones de fase móvil, el cual también sirvió para estimar el valor del factor de retención en agua  $k'_w$  usado para simular los frentes teóricos de Extracción en Fase Sólida. En el cromatograma que se presenta en la figura 27 se puede observar que la fase móvil isocrática de composición 44:56 H<sub>2</sub>O:MeOH permitió una buena separación de las cuatro triazinas con una buena resolución y selectividad.

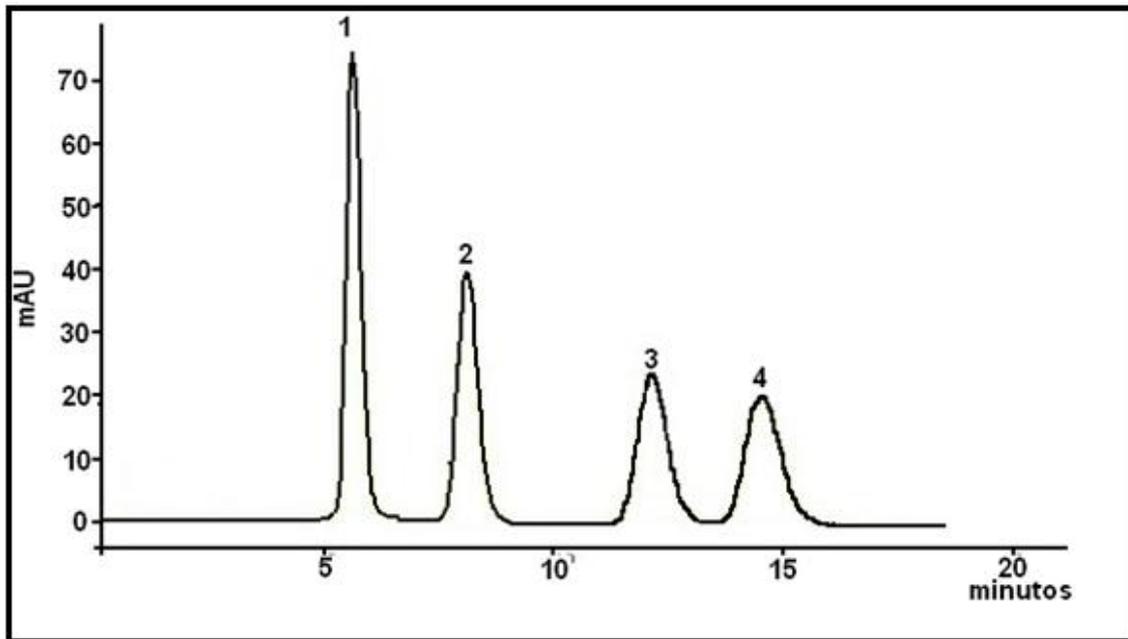


Figura 27. Cromatograma obtenido por inyección directa de 20  $\mu\text{L}$  de la mezcla de plaguicidas a  $10 \text{ mgL}^{-1}$  y detección espectrofotométrica UV a  $\lambda=220 \text{ nm}$ . Características de la columna de 150 X 4.60 mm d.i. RES ELUT C18, con tamaño de partícula de 5  $\mu\text{m}$ , con una fase móvil de 44:56  $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$  a un flujo de  $1 \text{ mLmin}^{-1}$ .Tiempo de corrida de 18 min. Identificación de los picos: 1) simazina; 2) atrazina; 3) propazina y 4) terbutilazina.

Tabla 29. Valores de tiempo de retención y factor de capacidad

Triazinas		$t_r$	$k'$
1	Simazina	5.66	2.31
2	Atrazina	8.12	3.75
3	Propazina	12.17	6.12
4	Terbutilazina	14.57	7.52

Tabla 30. Valores de selectividad y resolución

Picos	$\alpha$	R
1 y 2	1.62	4.55
2 y 3	1.63	4.99
3 y 4	1.23	2.47

En la tabla 29 se puede observar que los valores de  $t_r$  y  $k'$  fueron aumentando conforme disminuía la polaridad de las triazinas (a mayores valores de  $k'$ ) con tiempos de retención lo suficientemente diferentes, lo que indica que son



retenidas en la columna sin una sobre-posición de los picos de las triazinas como se muestra en la figura 27.

En la tabla 30 se presentan los parámetros de la selectividad ( $\alpha$ ) y la resolución (R) para las parejas de triazinas. Para  $\alpha$  se mostró que los valores son mayores a uno. Para R se mostró que las triazinas presentan una buena separación entre sus picos de elución, ya que se encontraron por arriba del valor óptimo reportado en la literatura de  $R=1.5$ , mostrando una separación completa entre sus picos de elución.

Con los valores de la tabla 29 y tabla 30 se comprobó que las condiciones de análisis, para las triazinas fueron las óptimas para su estudio.

#### 4.2.2. Optimización del método de EFS para las triazinas

##### 4.2.2.1. Extrapolación de $k'w$

Se obtuvo el factor de retención en agua  $k'w$  de la extrapolación lineal al 0% de metanol con las curvas de  $\log k'$  en función al porcentaje de metanol en la fase móvil mostradas en la figura 28.

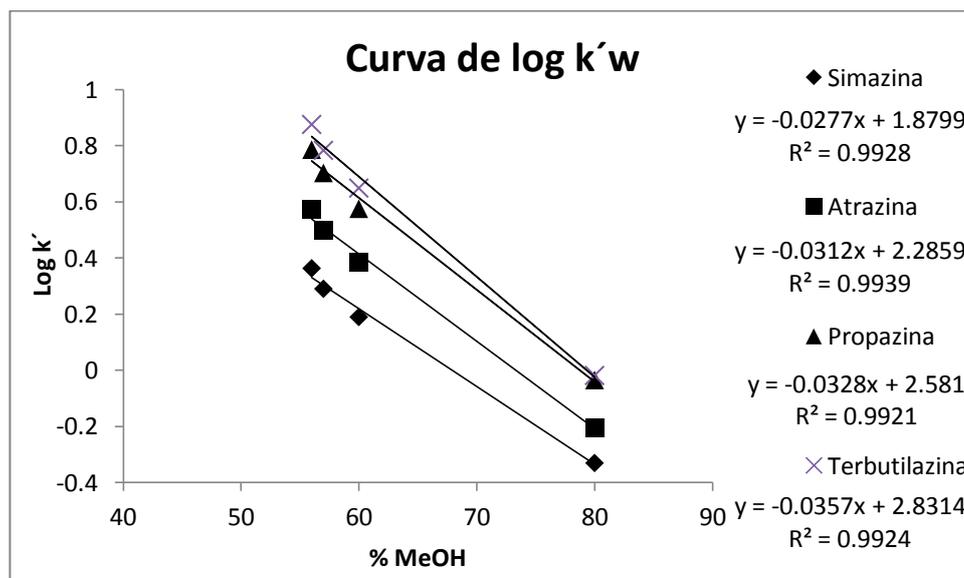


Figura 28. Curva de  $\log k'w=f(\%MeOH)$  en la fase móvil (mezcla de  $H_2O:MeOH$ ). Columna  $C_{18}$  150 X 4.6 mm d.i., flujo 1 mL/min, volumen de inyección 20  $\mu L$ , de una disolución de  $10\text{ mgL}^{-1}$  de plaguicidas, detección UV a 220 nm.



En la figura 28 se muestra el orden de elución de las triazinas: simazina, atrazina, propazina y terbutilazina, observando que se podrían separar en una mezcla con una fase móvil isocrática con composición de metanol menor a 60 % de metanol. Las curvas son paralelas entre sí porque se trata de compuestos de la misma familia, cuya estructura tiene un componente central (anillo triazínico) en el cual van cambiando los sustituyentes según el compuesto.

Tabla 31. Valores de Log  $k'w$  y Log P

Triazina	Log $k'w$ extrapolado	Log P reportado
Simazina	1.87	1.96
Atrazina	2.28	2.21
Propazina	2.58	2.91
Terbutilazina	2.83	3.02

Los valores de log  $k'w$  que se presentan en la tabla 31, mostraron que entre mayor fue la retención del compuesto en la columna, los valores de log  $k'w$  fueron aumentando, estos datos se pudieron comparar con los datos reportados de los log P (Noble, 1993) donde P es el coeficiente de reparto. Debido a que se ha encontrado una relación lineal entre log  $k'w$  y log P medido con una fase móvil metanol-agua y sílice C<sub>18</sub> para distintos compuestos orgánicos, por lo que el log de  $k'w$  fue encontrada equivalente al log de P (Braumann, 1986). Por esta razón, en la extracción en fase-sólida, al considerarse equivalentes el valor de P y  $k'w$  se puede utilizar indistintamente cualquiera de estos parámetros para realizar la predicciones necesarias.

#### 4.2.2.2. Curvas teóricas de elución de los herbicidas en agua utilizando valores obtenidos de $k'w$

En la figura 29 se presentan los gráficos teóricos de las curvas de rompimiento en agua de las triazinas para predecir su volumen de fuga en un cartucho de extracción que contiene 500 mg de sílice C<sub>18</sub> y una eficiencia de 20, similar a las condiciones de experimentación. Estos perímetros fueron obtenidos con la ayuda del programa SFER (García y Rojo, 2004)

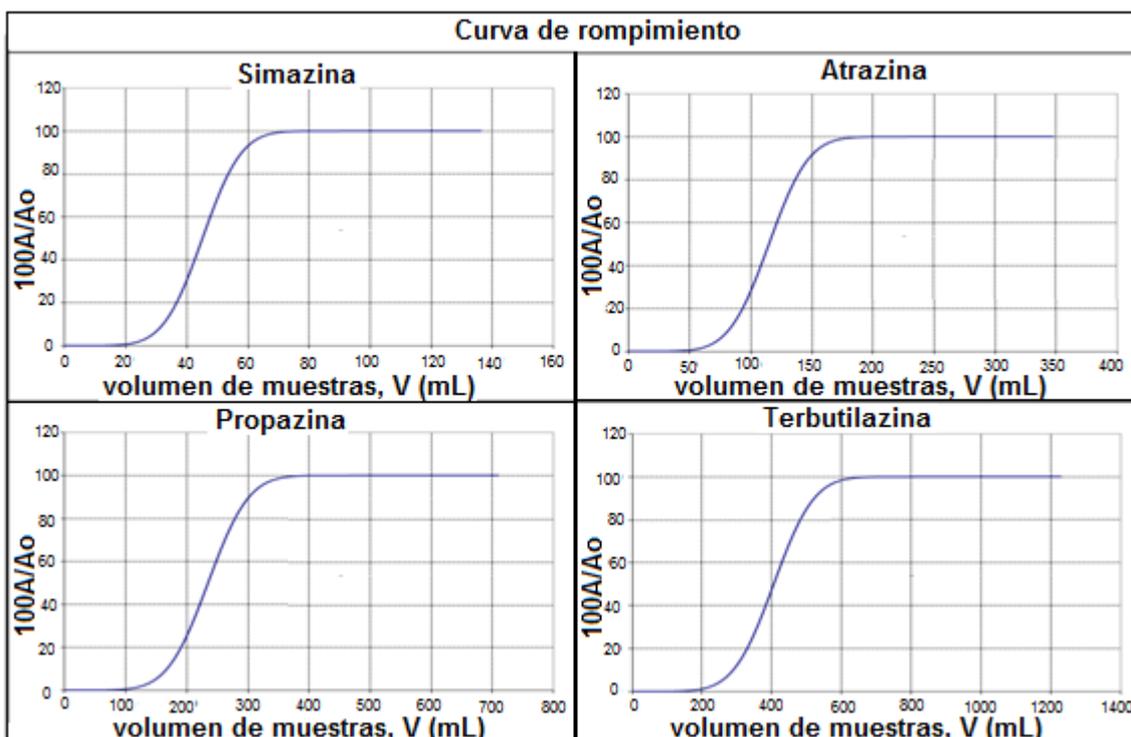


Figura 29 Curvas de rompimiento para cada una de las triazinas

Tabla 32. Volúmenes de fuga obtenidos del programa SFER utilizando los valores de  $k'w$  obtenidos

Volumen de fuga	
Triazinas	Volumen mL
Simazina	23
Atrazina	56
Propazina	114
Terbutilazina	197

De los frentes de elución presentados en la figura 29 se deducen los valores del volumen de fuga  $V_f$  de los compuestos, los cuales se presentan en la tabla 32. El  $V_f$  representa el volumen límite de muestra acuosa que se puede utilizar para evitar la elución de los analitos del cartucho de extracción a causa del agua de la muestra. Para el caso de la simazina, que es la triazina que presenta mayor polaridad del grupo de triazinas con las que se trabajaron, se observa que tiende a ser eluida por el agua con mayor facilidad, con un volumen menor, por lo que su volumen se tomó como referencia para evitar fugas de los analitos al momento de la aplicación de la muestra de infusión de Té al sistema de extracción. Cabe destacar que los valores estimados de  $k'w$  se obtuvieron de



una extrapolación lineal, sin embargo, las curvas tienen una forma exponencial cuando se acercan al 0 % de agua en la fase móvil. Por esta razón, es muy probable que los valores de los volúmenes de fuga fueran subestimados y que los valores reales sean mayores de aproximadamente 3 o 4 veces. Lo anterior no representa ningún problema porque de todas maneras, el estudio teórico nos proporcionó aproximaciones útiles que evitaron la realización de experimentos por ensayo y error.

#### 4.2.2.3. Obtención del frente de elución experimental de las triazinas en metanol

Para obtener los frentes de elución de las triazinas en metanol, primero se aplicaron 100 mL de muestra de agua millipore, fortificada a  $100 \mu\text{gL}^{-1}$ , a un cartucho de extracción empacado con 500 mg de adsorbente, después se aplicó al cartucho 3 X 1 mL de metanol, recolectándose las fracciones para analizarlas por cromatografía de líquidos. En la figura 30 y la figura 31 se presentan las gráficas de recobro y recobro acumulado en función del volumen de metanol aplicado al cartucho de EFS para los ensayos que sirvieron para conocer el volumen de metanol necesario para la desorción de las triazinas del cartucho de extracción.

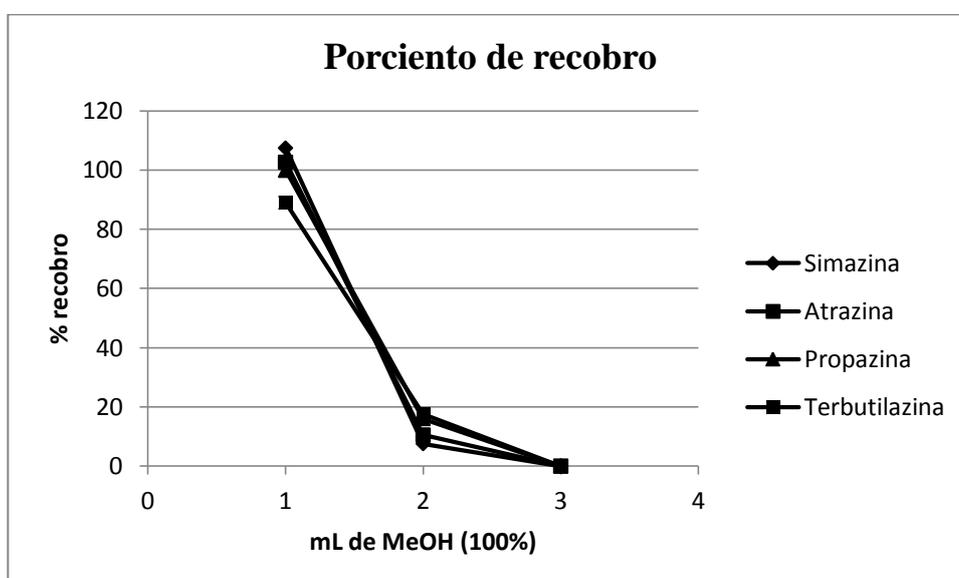


Figura 30. Porcentaje de triazinas recuperado con tres fracciones de 1 mL de metanol (MeOH)

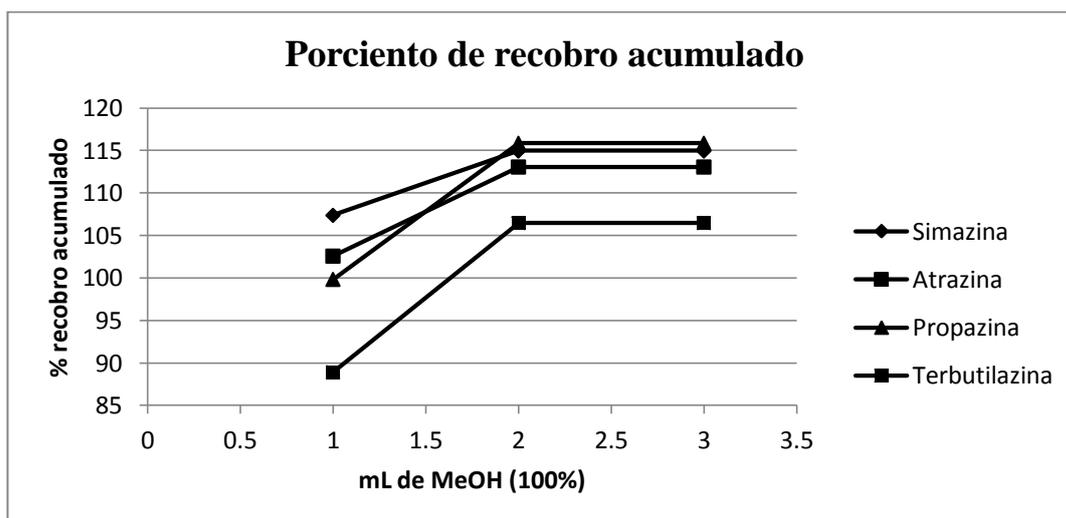


Figura 31. Porcentaje de recobro acumulado de triazinas eluidas por metanol.

En la figura 30 se puede observar que en dos mililitros se logró obtener el total de recobro de las triazinas. Con la figura 31, en la cual se muestra el porcentaje de recobro acumulado se puede corroborar que con dos mililitros se obtuvo el 100 % de recobro.

Al analizar estas figuras se puede observar que la elución de las triazinas se dio completa en dos mililitros de metanol con recobros cuantitativos cercanos al 100 %, de igual forma no se debe perder de vista que la simazina y la atrazina, las cuales son los analitos más polares, no se fugaron al aplicar un volumen de 100 mL en este ensayo.

#### 4.2.2.4. Optimización del eluente para “clean up” o lavado

Con el fin de optimizar una secuencia de elución en donde se incluyeran eluentes de lavado que eliminaran interferencias más polares que las triazinas en estudio, se probaron diferentes eluentes de fuerza débil, esperando que estos eluentes no desorbieran a las triazinas. Después de aplicar un volumen de 100 mL de agua millipore, fortificada a  $100 \mu\text{gL}^{-1}$ , en el cartucho de EFS se recuperaron los analitos con 3 mL de metanol puro. En la tabla 33 se muestran los resultados obtenidos de análisis al aplicar el eluente de limpieza (90:10  $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$ ) y los porcentajes de recuperación de las triazinas con la aplicación posterior de 3 mL del eluente MeOH puro al cartucho de extracción.



Tabla 33. Recuperación de triazinas en metanol con aplicación previa de eluente de limpieza 90:10(H<sub>2</sub>O:MeOH) y metanol

Triazina	Mezcla 90:10 (H <sub>2</sub> O:MeOH) mL			Por ciento de recuperación 3 mL (100% MeOH)
	1	2	3	
Simazina	X	X	X	102
Atrazina	X	X	X	95
Propazina	X	X	X	89
Terbutilazina	X	X	X	86

X no detectadas

Como se puede ver en la tabla 33 con la mezcla de limpieza de 90:10 H<sub>2</sub>O:MeOH, no se fugaron las triazinas, ya que en ninguno de los tres mililitros de este eluente se encontró rastros de ellas.

En el caso de los porcentajes de recuperación con el metanol puro aplicado subsecuentemente, se observó que los recobros fueron cercanos al cien por ciento para simazina y atrazina. La propazina y la terbutilazina tuvieron recobros un pocos más bajos. En la tabla 34 se muestran los porcentajes de recuperación obtenidos de dos extracciones diferentes que se efectuaron con metanol puro con el paso previo de limpieza con la mezcla 90:10 H<sub>2</sub>O:MeOH. Estos ensayos se realizaron pasando a través de un cartucho de EFS una muestra sintética con un volumen de 100 mL fortificando a 0.1 mgL<sup>-1</sup> con la mezcla de estándares que contenía a todas las triazinas.

Tabla 34. Recobro con metanol después de aplicar la mezcla 90:10 H<sub>2</sub>O:MeOH

Triazina	Porcentaje de recuperación (%)	
	(90:10 H <sub>2</sub> O:MeOH 3 mL)	(90:10 H <sub>2</sub> O:MeOH 3 mL)
	100% MeOH	100% MeOH
Simazina	89	87
Atrazina	85	87
Propazina	87	93
Terbutilazina	85	87



En la tabla 34 se mostró que en este caso se obtuvo similitud con los datos de recobro obtenidos anteriormente. Sin embargo, ahora los valores de los recobros fueron similares para todas las triazinas. Estas diferencias se pueden deber a los errores de cuantificación, los cuales serán valorados posteriormente con un estudio de reproducibilidad. Los recobros fueron considerados cuantitativos ya que fueron superiores al 87 %.

Posteriormente, se realizó un nuevo ensayo, utilizando el mismo volumen (100 mL) con la misma concentración ( $100 \mu\text{gL}^{-1}$ ), para probar otro lavado de fuerza eluente mayor, considerando que en la infusión de Té existirían muchas interferencias, especialmente de pigmentos provenientes de la planta. En la tabla 35 se muestran los porcentajes de recobro obtenidos al utilizar una mezcla de lavado con mayor porcentaje de fase orgánica (metanol al 35 % en vez del 10 %). Entonces, se probaron 10 mL con el eluente de limpieza de 65:35  $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$  más la aplicación posterior de metanol puro para recuperar la totalidad de las triazinas. La tabla 35 presenta los porcentajes de recuperación de cada una de las fracciones del eluente de lavado 65:35  $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$ ; también se presenta el total de recuperación (mezcla de lavado + metanol), mostrando que la triazina que fugó del cartucho de extracción en mayor proporción fue la simazina (hasta 20 %). La atrazina, no tuvo una fuga significativa con este eluente de lavado < 8 %.

Tabla 35. Porcentaje de recobro de la mezcla de lavado 65:35 en 10X1 mL  $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$

Triazina	Mezcla 65:35 $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$ (mL)										Total de recobro (%) de lavados	Porcentaje de recobro Lavado+MeOH (Recobro total)
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
Simazina	x	0.7	0.7	1	2	2	3	2	4	4	20	94
Atrazina	x	0.8	1	0.7	1	1	1	0.9	0.7	0.9	8	95
Propazina	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	88
Terbutilazina	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	78

X no detectadas



Debido a la pérdida considerable de la simazina con el eluente de lavado anterior se probó otro eluente de fuerza un poco más débil, para evitar la fuga de las triazinas. Entonces se probó 10 x 1 mL de la mezcla 70:30 H<sub>2</sub>O:MeOH y la posterior desorción de los analitos con MeOH puro. La tabla 36 presenta los recobros obtenidos en cada una de las fracciones

Tabla 36. Por ciento de la mezcla de lavado 70:30 en 10X1 mL H<sub>2</sub>O:MeOH y posterior elución con metanol puro

Triazina	RECOBRO% Mezcla 70:30 H <sub>2</sub> O:MEOH mL										Total de recobro (%) de lavados	100% MeOH+lavados Recobro total
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
Simazina	x	x	x	x	x	0.9	0.7	1.0	0.9	1.7	5.2	102
Atrazina	x	x	x	x	x	x	x	x	x	1.2	1.2	96
Propazina	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	101
Terbutilazina	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	103

En la figura 32 se muestra el recobro acumulado en función del volumen aplicado de 70:30 H<sub>2</sub>O:MeOH, lo que representa el frente de elución con la nueva mezcla de lavado aplicado al cartucho de extracción.

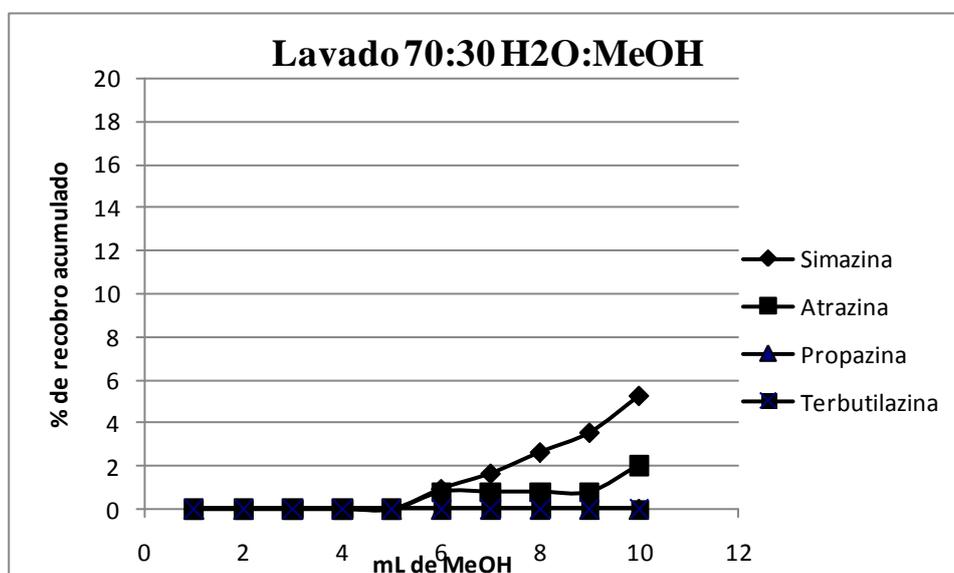


Figura 32. Recobro acumulado con la mezcla de lavado 70:30 H<sub>2</sub>O:MeOH



En la tabla 36 y la figura 32 se observó que en el caso de la simazina y atrazina si hubo una ligera pérdida aunque los porcentos de recobro fueron tan bajos que podrían no tomarse en cuenta; de hecho sus frentes de elución apenas comienzan a levantarse en el sexto y décimo mililitro respectivamente. Entonces se decidió que se usaran tan solo 5 mL no habría pérdida de ningún compuesto. En el caso de las dos últimas triazinas (propazina y terbutilazina) no se observó fuga con la nueva mezcla de lavado.

En la tabla 36 se puede observar que los porcentajes de recobro para todas las triazinas con metanol puro fueron aceptables, debido a que fueron cercanas al 100 por ciento demostrando que la fuga en los frentes de lavado fue mínima y que la nueva mezcla de lavado (70:30 H<sub>2</sub>O:MeOH) fue apropiada para ser utilizada en el procedimiento de extracción de la muestra real. Como se pudo deducir de la tabla 36, con la mezcla de 70:30 en 10X1 mL H<sub>2</sub>O:MeOH, el volumen seleccionado se consideró de 9 mL, aunque se tuviera una ligera pérdida de la simazina y esperando que con la muestra de infusión permitiera eliminar un mayor número de interferentes.

#### **4.2.2.5. Optimización del volumen de elución y el eluente de las triazinas**

Como ya se tenía seleccionada la mezcla de lavado más apropiada para utilizar con las infusiones, ahora el siguiente paso fue seleccionar un disolvente de elución de los compuestos de interés que proporcionara un buen recobro, así como conocer el volumen mínimo para llevar a cabo esta recuperación de las triazinas para minimizar la dilución del extracto. Aunque ya se había probado la eficiencia del metanol puro para desorber a la triazinas, se probaron ahora mezclas hidroorgánicas agua metanol con la intención de simplificar mejor la matriz al eluir a la triazinas, dejando en el adsorbente atrapados los compuestos interferentes de menor polaridad. En la tabla 37 se presentan los resultados de un ensayo fortificado a 100 µgL<sup>-1</sup> con un volumen de 100 mL de agua millipore con la mezcla de estándares que contenían a todas las triazinas. Los resultados fueron obtenidos al probar 10 mL del eluente 10:90 agua:metanol, después de aplicarle al cartucho 3 mL de la mezcla de lavado 70:30 agua:metanol.



Tabla 37. Porcentaje de la mezcla de lavado 70:30 H<sub>2</sub>O:MeOH en 3X1 mL y subsecuentemente porcentaje de la mezcla de elución 10:90 en 10X1 mL H<sub>2</sub>O:MeOH

Triazinas	% recobro mezcla 70:30 H <sub>2</sub> O:MeOH			% recobro de Mezcla de elución 10:90 H <sub>2</sub> O:MeOH										Recobro total
	1	2	3	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Simazina	x	x	x	61	27	1	x	x	x	x	x	x	x	89
Atrazina	x	x	x	53	31	2	x	x	x	x	x	x	x	86
Propazina	x	x	x	47	35	2	x	x	x	x	x	x	x	84
Terbutilazina	x	x	X	44	36	3	1	x	x	x	x	x	x	84

X no detectadas

En la figura 33 se muestra el recobro acumulado de las triazinas en función de los mL de la mezcla 10:90 H<sub>2</sub>O:MeOH cuando previamente se le aplicó al cartucho de extracción el eluente de lavado 70:30 H<sub>2</sub>O:MeOH.

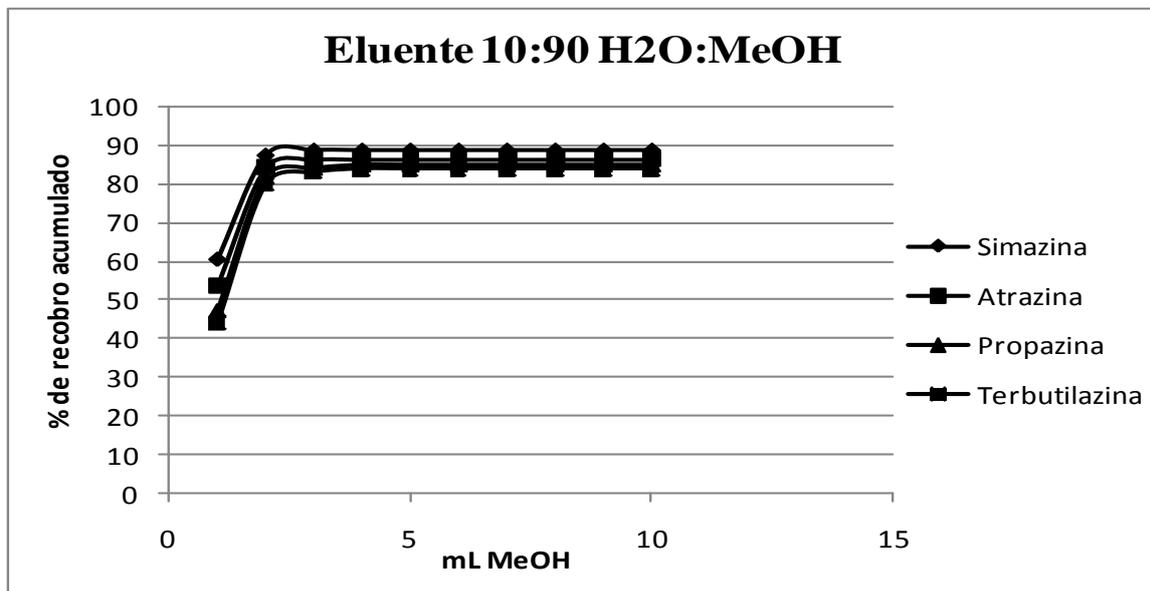


Figura 33. Recobro acumulado del eluente de 10:90 H<sub>2</sub>O:MeOH

En la tabla 37 se confirma que la mezcla de lavado que se escogió no causó fuga de ninguna de las triazinas. Para el caso de la mezcla de elución en la tabla 37 y en la figura 33 se muestra que la mayoría de la triazinas con las que se estuvo trabajando se desorbieron en tres mililitros del eluente; en el mililitro tres se observa que todavía hubo un porcentaje de triazinas que eluyen pero es muy bajo, mostrando así que el volumen mínimo de este eluente es de tres mililitros.



Posteriormente se realizó un ensayo fortificando a 0.1 mgL<sup>-1</sup> con un volumen de 100 mL, con el cual se probó un eluente de fuerza más débil que el anterior para las triazinas: este ensayo constó de 7 mL de la mezcla 20:80 agua:metanol. Los recobros obtenidos para cada fracción se presentan en la tabla 38, después de la aplicación de 3 mL del eluente de lavado 70:30 H<sub>2</sub>O:MeOH.

Tabla 38. Porcentaje recobro de la mezcla de lavado 70:30 en 3X1 mL H<sub>2</sub>O:MeOH y porcentaje recobro de la mezcla de elución 20:80 en 7X1 mL H<sub>2</sub>O:MeOH

Triazinas	% recobro mezcla 70:30 H <sub>2</sub> O:MeOH			% recobro de Mezcla de elución 20:80 H <sub>2</sub> O:MeOH							Recobro total
	1	2	3	1	2	3	4	5	6	7	
Simazina	x	x	x	88	16	2	x	x	x	x	106
Atrazina	x	x	x	66	30	2	x	x	x	x	98
Propazina	x	x	x	43	47	2	x	x	x	x	92
Terbutilazina	x	x	x	37	54	3	x	x	x	x	94

En la figura 34 se muestran los recobros acumulados respectivamente en función del volumen aplicado de la mezcla de 20:80 H<sub>2</sub>O:MeOH, que también fue probada para la recuperación de las triazinas después de la aplicación del eluente de lavado 70:30 H<sub>2</sub>O:MeOH

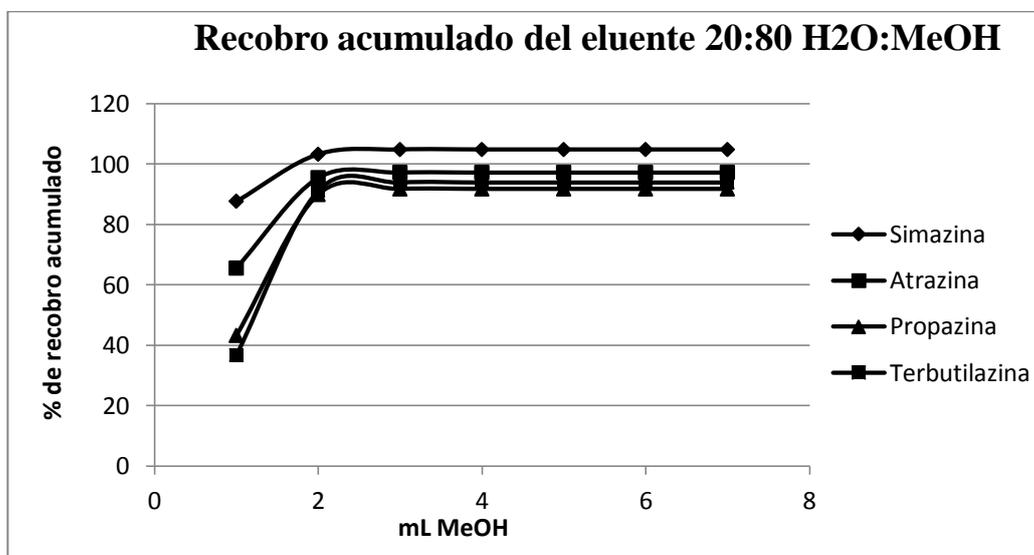


Figura 34. Porcentaje de recobro acumulado de la mezcla de elución 20:80 H<sub>2</sub>O:MeOH



En la tabla 38 se presentan el porcentaje acumulado del recobro de la mezcla de lavado de 70:30 en 3X1 mL H<sub>2</sub>O:MeOH sin observar ninguna fuga de las triazinas en estudio. En el caso de la nueva mezcla de elución 20:80 H<sub>2</sub>O:MeOH se observó que hasta los 3 mL se lograron desorber por completo las triazinas, obteniendo un porcentaje de recobro cercano al 100 %.

En la figura 34 se observa que la mayor cantidad de triazinas fueron eluidas en los 3 primeros mililitros, llegando a la meseta del frente de elución, lo que indica que la cantidad de triazina eluida es completa. Para verificar que se obtuvieran recobros similares en diferentes ensayos, se realizaron dos ensayos similares en los cuales se colocaron 500 mg de sílice dentro del cartucho de EFS, a este cartucho cual se le aplicó una disolución con un volumen de 100 mL a una concentración de 0.1 mgL<sup>-1</sup>; enseguida se le aplicó 3 mL de la solución 70:30 H<sub>2</sub>O:MeOH usado como lavado, después se aplicó 3 mL del eluyente 20:80 H<sub>2</sub>O:MeOH. Los recobros totales se muestran en la tabla 39 en donde se puede corroborar que los valores fueron similares y cercanos al ciento por ciento. Esta mezcla se utilizó en los experimentos subsecuentes por sus buenos resultados obtenidos.

Tabla 39. Porcentajes de recobro de dos ensayos similares

Triazina	total de recobro	total de recobro
Simazina	105	100
Atrazina	97	101
Propazina	92	98
Terbutilazina	94	100

Con la tabla 39 se comprobó un buen recobro por lo tanto se propuso como secuencia de elución: el primer lavado con 5 mL de agua, el segundo lavado con 3 mL de la mezcla 70:30 H<sub>2</sub>O:MeOH y 3 mL de la mezcla de 20:80 H<sub>2</sub>O:MeOH como eluyente de los compuestos de interés.

Para el lavado de 70:30 H<sub>2</sub>O:MeOH, se decidió solo aplicar 3 mL, aunque se podría aplicar hasta 9 mL, al momento de trabajar con las matrices de infusión de Té se ajustaría esta condición.



#### 4.2.2.6. Evaluación de la reproducibilidad con la secuencia de elución seleccionada sin evaporación

En la tabla 40 se muestran los porcentos de recobro de los tres experimentos que se efectuaron para evaluar la reproducibilidad obtenida con la secuencia de elución seleccionada.

Tabla 40. Reproducibilidad de la secuencia completa de elución. La secuencia consta de: el primer lavado con 5 mL de agua, el segundo lavado con 3 mL de la mezcla 70:30 H<sub>2</sub>O:MeOH y 3 mL de la mezcla de 20:80 H<sub>2</sub>O:MeOH usado como eluente de las triazinas

Triazina	Ensayos			Reproducibilidad.		
	R%			Promedio R%	D.E.	C.V %.
Simazina	100	93	99	96	4	3
Atrazina	101	94	99	96	3	3
Propazina	98	96	98	97	1	1
Terbutilazina	100	101	102	102	1	1

Se observa que el coeficiente de variación es de 3 %, para los dos primeros compuestos y que están en el límite para ser aceptado dentro de una buena reproducibilidad, en cambio, para los dos últimos sus coeficientes de variación son muy buenos ya que son del uno por ciento, esto quiere decir que tienen poca dispersión entre ellos.

#### 4.2.2.7. Evaluación de la reproducibilidad de la secuencia completa de elución con evaporación

En esta sección se evaluó si existían pérdidas al evaporar un extracto con las triazinas, considerando que la evaporación permite concentrar para mejorar los límites de detección de los herbicidas, la evaporación fue realizada como se explica en la sección 3.2.6.6. En la tabla 41 se muestran los porcentajes de recobro de la secuencia de elución completa con evaporación para una muestra de agua millipore fortificada con 0.1 mgL<sup>-1</sup> concentrada en el cartucho de EFS.



Tabla 41. Porcentaje de recobro después de la evaporación de extractos provenientes de agua purificada fortificada con las triazinas

Triazinas	Porcentaje de recobro			C.V %.
	Réplicas			
	1	2	3	
Simazina	78	73	74	3
Atrazina	82	76	75	5
Propazina	74	72	71	2
Terbutilazina	78	81	74	4

En la tabla 41 se muestra que los porcentajes de recobro al evaporar el extracto son un poco más bajos que sin evaporación, ya que se tiene una pérdida aproximada de un veinte por ciento de las triazinas. Sin embargo, esta pérdida se compensa si se gana un factor de concentración de 10 (evaporando 3 mL de extracto hasta 0.3 mL en baño maría). En la tabla 41, también se puede observar que los porcentajes del C.V. para este ensayo se encuentran en los límites de aceptación por la guía de validación de métodos analíticos (García, et al., 2002).

#### 4.2.2.8. Evaluación de la linealidad con muestras de agua millipore fortificada con triazinas

La linealidad del sistema cromatográfico se evaluó con la respuesta del detector en función de la concentración de los analitos, la elaboración de estas muestras sintéticas se explica en la sección 3.2.6.7. De estas soluciones sintéticas se obtuvieron las gráficas de área del pico=f (concentración de triazinas), a las concentraciones de 0.5, 1 , 5, 10, 15 y 20 mgL<sup>-1</sup> y éstas son mostradas en la figura 35 y sus respectivas ecuaciones ajustadas y coeficientes de correlación lineal son presentadas en la tabla 42.

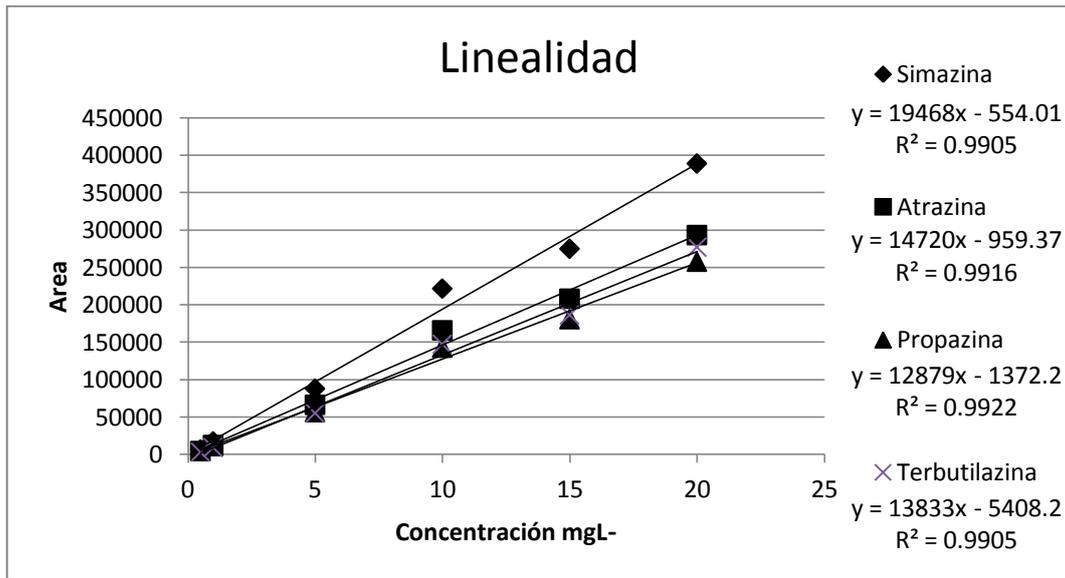


Figura 35 Curva de calibración de triazinas

Tabla 42. Parámetros de linealidad

Herbicida	m	b	R <sup>2</sup>
Simazina	19468	554.0	0.9905
Atrazina	14720	959.3	0.9916
Propazina	12879	1372.2	0.9922
Terbutilazina	13833	5408.2	0.9905

Y=mx+b; b= ordenada al origen, m= pendiente, R<sup>2</sup>= coeficiente de correlación

Estos resultados mostraron una buena linealidad, ya que el coeficiente de correlación es mayor a 0.99 cumpliendo el criterio de aceptación por la guía de evaluación de métodos analíticos de r<sup>2</sup> ≥ 0.98 (García, et al., 2002).

#### 4.2.3. Aplicación de la secuencia de elución optimizada en muestras fortificadas de infusión de Té negro y Té verde

Al tener la secuencia completa de elución tabla 13 para muestras sintéticas aplicadas a un cartucho de EFS con 500 mg de C<sub>18</sub>, a continuación se probó con muestras adicionadas (matriz de infusión de Té negro y Té verde) con las condiciones establecidas en la sección 3.2.7. En la figura 36 se presentan los cromatogramas del extracto proveniente de la infusión de Té negro con la secuencia completa de elución.

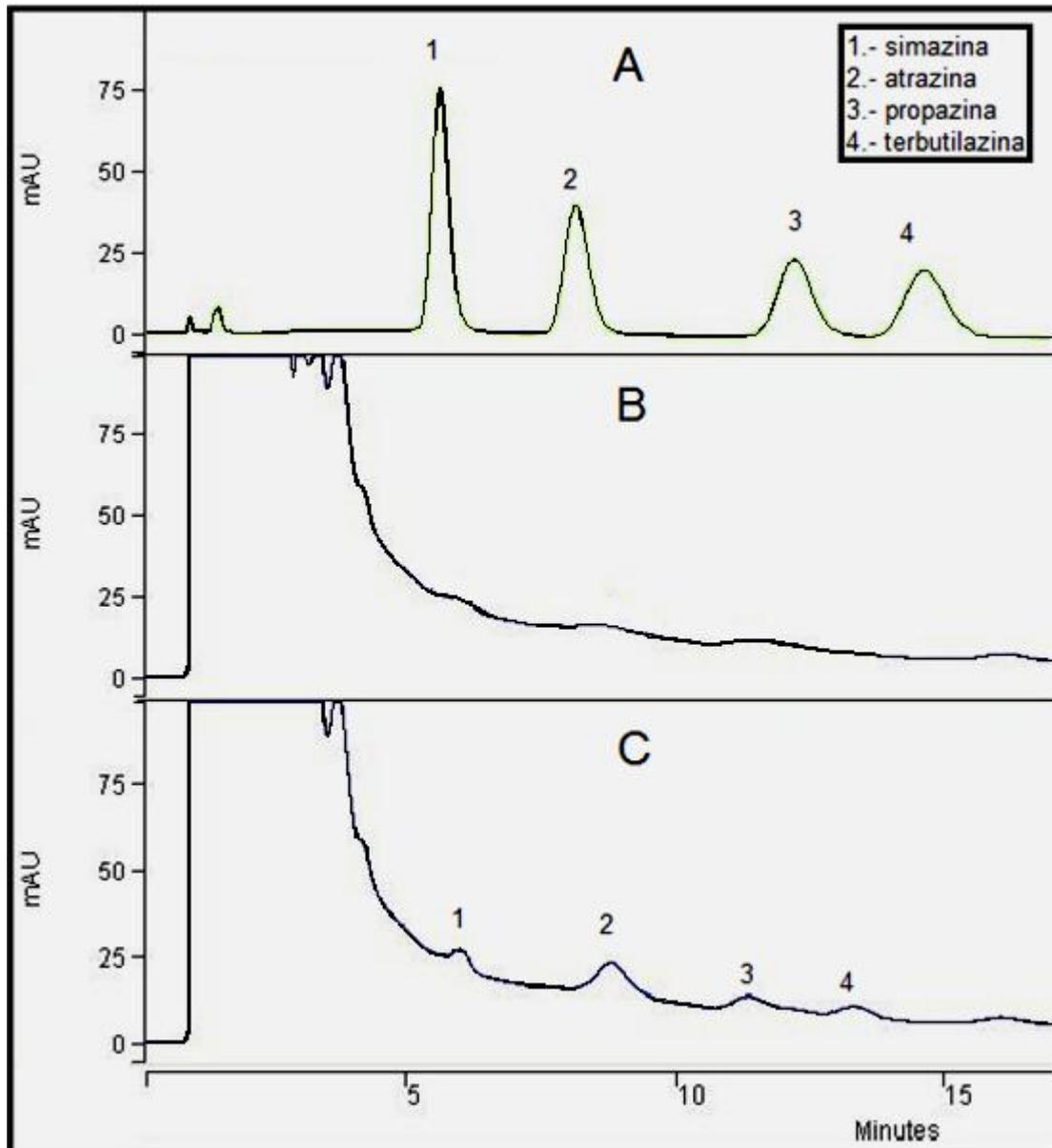


Figura 36. Cromatogramas de estándar de “stock” de triazinas (A), extracto de matriz de Té negro sin adición de triazinas (B) y extracto de Té negro con adición de triazinas (C). En la figura A se presenta un cromatograma con estándares a una concentración de  $10 \text{ mgL}^{-1}$ . En la figura B cromatograma de un extracto de Té negro sin adición de triazinas. Figura C cromatograma de una extracto de matriz de Té negro con adición de triazinas a una concentración de  $6.6 \text{ mgL}^{-1}$ . En el extracto de la figura b y C se aplicó la secuencia de limpieza escogida la cual consta de dos lavados y un eluyente: el primer lavado con 5 mL de agua, el segundo lavado con 3 mL de mezcla 70:30  $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$  y 3 mL de la mezcla de 20:80  $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$  usado como eluyente de las triazinas. Se obtuvo por inyección directa de  $20 \mu\text{L}$  con detección espectrofotométrica UV a  $\lambda=220 \text{ nm}$ . Características de la columna de  $150 \times 4.60 \text{ mm d.i. RES ELUT C}_{18}$  con tamaño de partícula de  $5 \mu\text{m}$ , con una fase móvil de 44:56  $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$  a un flujo de  $1 \text{ ml min}^{-1}$ .



En la figura 36 A se presenta el cromatograma de estándar de triazinas. Para este estándar se midió 0.3 mL del “stock” de triazinas la cual estuvo a una concentración de  $100 \text{ mgL}^{-1}$  se aforo a 3 mL, en un vial rotulado, de la disolución que fue utilizada como eluente 20:80  $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$  para poder tener una concentración final de  $10 \text{ mgL}^{-1}$ . Este cromatograma fue utilizado como comparativo para los tiempos de retención de las triazinas. En la figura 36 B se presenta el cromatograma del extracto de la matriz de Té negro sin adición de triazinas, esta extracción se realizó con la secuencia de limpieza seleccionada (tabla 13); se puede observar que en los tiempos de retención no se logra observar picos que estén relacionados con las triazinas. Se realizó otra extracción de matriz de Té negro con adición de triazinas. Para esta extracción se pasó a través de un cartucho de EFS con 500 mg de sílice  $\text{C}_{18}$  un volumen de matriz de Té negro de 100 mL, este volumen estaba adicionado con una alícuota de 0.1 mL de la disolución “stock” de las triazinas la cual tenía una concentración de  $100 \text{ mgL}^{-1}$ , al final se obtuvo un extracto con un volumen de 3 mL de la solución de elución 20:80  $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$ , para obtener una concentración final del extracto de  $3.3 \text{ mgL}^{-1}$ . No se presentó el cromatograma de esta extracción debido a que no se logró observar los picos de elución de estos analitos, por tal motivo se tomó la decisión de aumentar la concentración de las triazinas para intentar visualizar estos analitos. En la figura C se presenta el cromatograma de extracción de matriz de Té negro con adición de triazinas a una concentración mayor. Este extracto se realizó con los mismos pasos anteriormente descritos con la diferencia que el extracto final de 3 mL con una concentración de  $3.3 \text{ mgL}^{-1}$  se realizó una evaporación hasta 0.3 mL y se reconstituyó con 1.5 mL para obtener una concentración de  $6.6 \text{ mgL}^{-1}$ . En el cromatograma se puede observar que los interferentes se encontraron muy evidentes cuando los picos de elución de triazinas eran de una concentración de  $6.6 \text{ mgL}^{-1}$ , la cual apenas si se pueden observar. De igual forma se puede ver que la mayoría de las interferencias presentes en la matriz de Té negro tienden a eluir en los primeros minutos.



En la figura 37 se presentan cromatogramas del extracto proveniente de la infusión de Té verde con la secuencia completa de elución escogida.

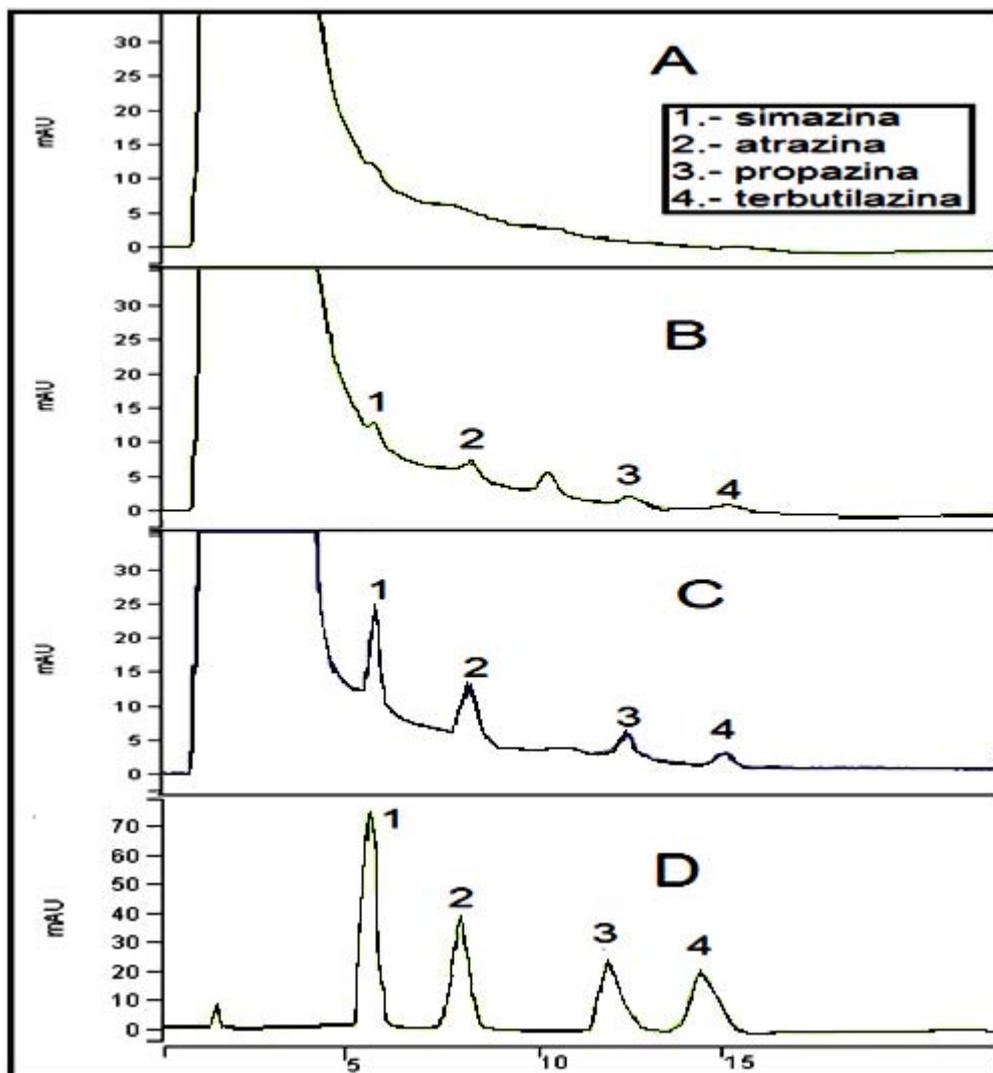


Figura 37. Cromatogramas obtenidos de la extracción de matriz de Té verde con la secuencia de elución completa la cual consta con dos lavados y un eluyente: el primer lavado con 5 mL de agua, el segundo lavado con 3mL de la mezcla 70:30 H<sub>2</sub>O:MeOH y 3 mL de la mezcla de 20:80 H<sub>2</sub>O:MeOH usado como eluyente de las triazinas. Figura A. Cromatograma de extracción de matriz de Té verde sin adición de “stock” de triazinas. Figura B. Cromatograma de extracción de Té verde con adición de “stock” de triazinas a una concentración de 3.3 mgL<sup>-1</sup>. Figura C. Cromatograma de extracción de stock de triazinas a una concentración de 6.6 mgL<sup>-1</sup>. Figura D cromatograma de estándar de triazina a una concentración de 10 mgL<sup>-1</sup> como referente de tiempo de retención de las triazinas. Obtenida por inyección directa de 20 µL con detección espectrofotométrica UV a λ=220 nm. Características de la columna de 150 X 4.60 mm d.i. RES ELUT C<sub>18</sub>, tamaño de partícula de 5 µm, una fase móvil de 44:56 H<sub>2</sub>O:MeOH a un flujo de 1 mlmin<sup>-1</sup>.



En la figura 37 A se presenta una cromatograma de extracción de matriz de Té verde aplicando la secuencia de elución escogida (tabla 13), sin la adición de triazinas, se puede observar que no se encuentran picos de elución de las triazinas en los tiempos de retención característicos de estos analitos. En la figura 37 B se presenta el cromatograma del extracto de matriz de Té verde con adición de triazinas. Este extracto se obtuvo pasando un volumen de 100 mL de matriz de Té en un cartucho de EFS con 500 mg de sílice, a este volumen se le agregó una alícuota de 0.1 mL del “stock” de triazinas con una concentración de  $100 \text{ mgL}^{-1}$ , al quedar adsorbidas las triazinas en la sílice se utilizó la secuencia de limpieza y al final se realizó la desorción de las triazinas con 3 mL de la solución 20:80  $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$ , para obtener un extracto con una concentración final de  $3.3 \text{ mgL}^{-1}$ . En la figura 37 C se muestra el cromatograma obtenido del extracto de matriz de Té verde con adición de triazina. Se realizó los mismos pasos anteriormente explicados, pero con la diferencia que la extracción final se evaporó a 0.3 mL y se reconstituyó a 1.5 mL para obtener una concentración final de  $6.6 \text{ mgL}^{-1}$ ; esta reconstitución se elaboró con un vial rotulado. En la figura 37 D se presenta el cromatograma de estándar de triazinas. Para este estándar se midió 0.3 mL del “stock” de triazinas la cual estuvo a una concentración de  $100 \text{ mgL}^{-1}$ , se aforó a 3 mL, en un vial rotulado, de la disolución que fue utilizada como eluente 20:80  $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$  para poder tener una concentración final de  $10 \text{ mgL}^{-1}$ . Este cromatograma fue utilizado como comparativo para los tiempos de retención de las triazinas. Con los cromatogramas presentados en la figura 37 se puede observar que los interferentes de la matriz de Té verde no obstaculizan para realizar un análisis cualitativo; sin embargo para un análisis cuantitativo en la concentración de  $3.3 \text{ mgL}^{-1}$  los interferentes obstaculizan la integración de la curva. También se puede observar que al aumentar las concentraciones se puede trabajar mejor con los picos de elución.

Tanto los extractos de matriz de Té negro, figura 36, como de matriz de Té verde, figura 37, se puede observar que al aumentar las concentraciones de los analitos se puede trabajar mejor, sin embargo, la iniciativa de este trabajo fue realizar un análisis cuantitativo como cualitativo en concentraciones bajas de



triazinas que se encuentren dentro de los límites de cuantificación. Por este motivo fue necesario efectuar más ensayos aumentando lavados, realizando nuevas mezclas hidroorgánicas necesarios para eliminar la mayor cantidad de interferentes. Por conocimiento empírico se llegó a la conjetura que entre mayor coloración en las infusiones se encuentran mayor cantidad de interferentes en la matriz, por tal razón el siguiente paso fue la eliminación de coloración en los extractos de infusión de Té negro y Té verde, tomando en cuenta que el Té negro contenía una mayor cantidad de interferentes se preponderó con respecto al Té verde. Para estos ensayos no se realizó evaluación de los porcentajes de recobro, debido a que había más interés para la eliminación de los interferentes y después de lograr una mejor secuencia de limpieza si se realizó la evaluación de los porcentajes de recobro de esta nueva secuencia.

#### **4.2.4. Ensayos cualitativos para la eliminación de color en el extracto**

Debido a que con la secuencia de limpieza seleccionada no se lograron eliminar los interferentes de la matriz de Té negro y Té verde que causaban coloración, se procedió a realizar ensayos tratando de eliminar la coloración de las matrices. Para los siguientes experimentos se conservaron los pasos de limpieza establecidos previamente. Los cambios consistieron en que para el eluyente de limpieza 1 (agua) se aumentó el volumen de 5 mL a 15 mL y hasta 23 mL (figura 29), intentando eliminar la mayor cantidad de interferentes polares. Para el eluyente de limpieza 2 con mezcla 70:30 H<sub>2</sub>O:MeOH, se aumentó el volumen de 3 mL a 9 mL. También se trabajó con diferentes proporciones de H<sub>2</sub>O:MeOH (80:20 y 60:40); para la primera se trabajó con un volumen de 4 mL y para la segunda se trabajó con un volumen de 3 mL. Para eliminar mejor la coloración de los extractos, también se introdujo una mezcla hidroorgánica de 70:30 H<sub>2</sub>O:ACN (agua:acetoneitrilo) con un volumen de 3 mL. Finalmente, en el paso de elución se mantuvo tanto el volumen de 3 mL con las concentraciones de la mezcla de 20:80 H<sub>2</sub>O:MeOH.



En la figura 38 se presentan fotografías de los extractos obtenidos por medio de la aplicación de los ensayos con matriz de Té negro descritos en la tabla 14 de sección de la metodología.

Número de ensayo	1	2	3	4
Color de extracto final				

Figura 38 Extractos de Té negro obtenidos con los primeros 4 ensayos

En la figura 38 se muestra que las secuencias probadas disminuyen en orden el color de los extractos finales de Té negro, la coloración fue siendo muy intensa, principalmente en los extractos correspondientes a los ensayos 1 a 3. En el caso del extracto 4 se logró una disminución muy importante en la coloración, pero se demostró en ensayos posteriores que la coloración de los extractos de estas infusiones podía disminuir más. Por lo tanto, se realizaron los experimentos siguientes, para tratar de disminuir la coloración de los extractos.

Entonces, en la figura 39 se presentan los resultados obtenidos con los ensayos 5 a 8, detallados y presentados en la tabla 14 de la metodología. Se presentan las fotografías de los experimentos complementarios para eliminación de coloración de los extractos.

Ensayo	5	6	7	8
Color de extracto final (Té verde)				
Color de extracto final (Té negro)				

Figura 39 Extractos de Té verde y negro obtenidos con diferentes ensayos para disminuir la coloración



En la figura 39 se puede observar que para las dos matrices, el ensayo 6 fue el que eliminó mejor la coloración en los extractos finales; sin embargo, proporcionó muy bajos recobros para los analitos. En cambio el ensayo 5, aunque ligeramente más oscuro mostró un buen recobro de las triazinas, por lo que debido a esta observación se decidió trabajar con esta secuencia de limpieza.

Para el ensayo 5, la secuencia de limpieza cambió de 5 mL a 23 mL el volumen de agua que se utilizó en el primer paso de lavado, esta decisión se tomó sin riesgo de perder a las triazinas, con la ayuda de los frentes de elución simulados con el SFER (García y Rojo, 2004), los cuales indicaron que teóricamente el volumen de fuga para la simazina es de 23 mL o más, la simazina se tomó como referencia debido a que esta triazina por su polaridad es la primera en desorberse. Por lo tanto, este volumen se aplicó con seguridad en los siguientes ensayos, ya que se sabía que aunque es un volumen grande, no se fugarían las triazinas y con el agua se eliminarían la mayor cantidad de interferentes polares de la matriz. En la mezcla de limpieza 2 se aumentó de 3 mL la mezcla 70:30 H<sub>2</sub>O:MeOH empleados anteriormente a 9 mL, en base a los frentes de elución obtenidos para las triazinas con este eluyente (ver tabla 32). Enseguida se agregó una nueva mezcla de limpieza 3, el cual constó de la aplicación de la mezcla hidroorgánica de H<sub>2</sub>O:ACN con diferentes volúmenes y diferentes concentraciones de agua y acetonitrilo, basándose que en otro trabajo se demostró que el acetonitrilo funciona muy bien para la eliminación de los interferentes coloridos del Té. Por último, en el paso de elución de los analitos (No. 4), se mantuvo igual que en los ensayos previos. Para estos ensayos 5 a 8, se trabajó con los dos tipos de matriz, con el Té verde y Té negro.

#### **4.2.4.1. Interferentes coloridos en la infusión de Té observados en los cromatogramas**

La secuencia de elución escogida fue el ensayo 5, debido a que resultó ser la más apropiada. En esta secuencia se aumentó 23 mL de agua en el primer lavado, para el segundo lavado se aumentaron 9 mL de la mezcla 70:30



H<sub>2</sub>O:MeOH y se agregó un segundo lavado con una mezcla hidroorganica 70:30 H<sub>2</sub>O:ACN con un volumen de 3 mL y se conservó los 3 mL del eluente 20:80 H<sub>2</sub>O:MeOH.

En las figuras 40 y 41 se presentan los cromatogramas de las extracciones de muestra de la matriz de Té negro y Té verde y de muestras adicionadas con triazinas de ambas matrices, obtenidos con la secuencia de limpieza 5. También se muestra un cromatograma de disolución estándar a una concentración de 10 mgL<sup>-1</sup>, como comparativo de los tiempos de retención.

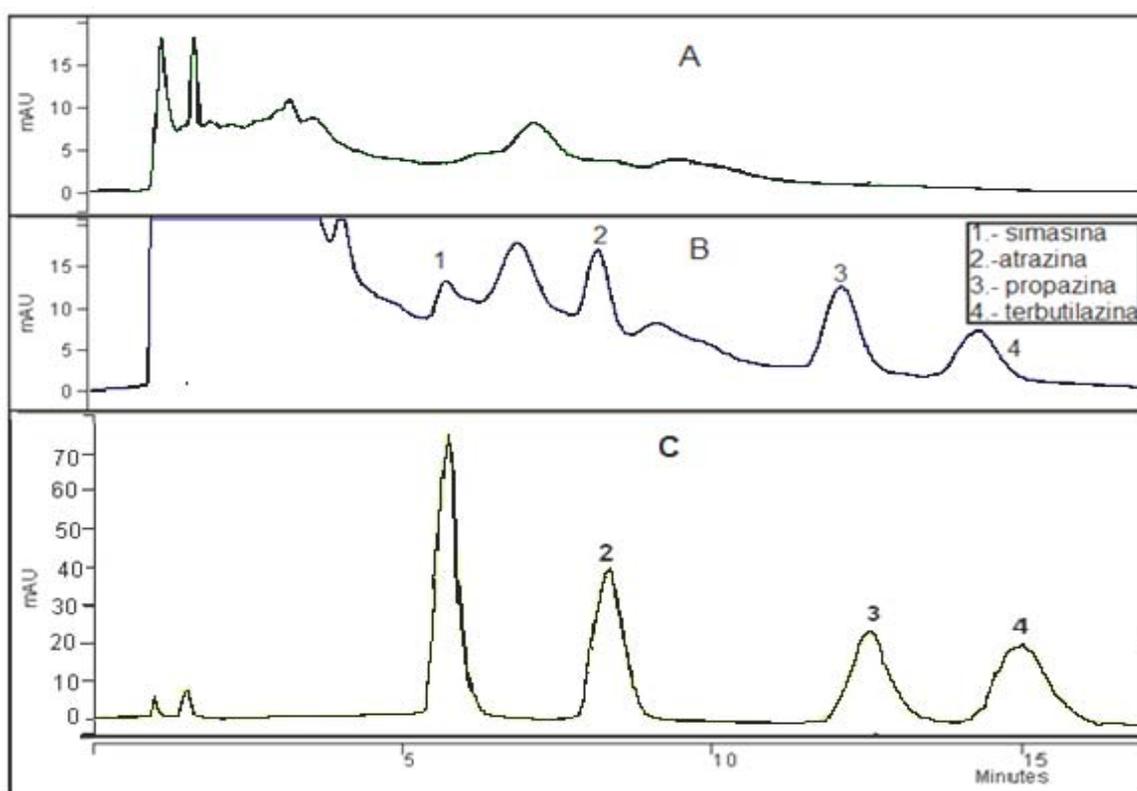


Figura 40. Cromatogramas de extractos de Té negro, obtenida con la secuencia de elución escogida y cromatograma de disolución estándar como comparativo de los tiempos de retención de las triazinas. En la figura A se presenta un cromatograma de extracto de Té negro sin adición de triazinas. Figura B cromatograma de extracto de Té negro con adición de triazinas a una concentración de 3.3 mgL<sup>-1</sup>. Figura C cromatograma de estándar a una concentración de 10 mgL<sup>-1</sup>. Secuencia de elución escogida constó de tres lavados y un eluente: el primer lavado de 23 mL H<sub>2</sub>O, el segundo lavado de 9 mL de 70:30 H<sub>2</sub>O:MeOH, el tercer lavado de 3 mL de 70:30 H<sub>2</sub>O:ACN y por último 3 ml de 20:80 H<sub>2</sub>O:MeOH usado como eluente. Con una detección espectrofotométrica UV a  $\lambda = 220$  nm. Características de la columna de 150 X 4.60 mm d.i. RES ELUT C<sub>18</sub>, con tamaño de partícula de 5  $\mu$ m, con una fase móvil de 44:56 H<sub>2</sub>O:MeOH a un flujo de 1 mLmin<sup>-1</sup>



En la figura 40 A se presenta el cromatograma de la extracción de matriz de Té negro sin adición de triazinas, se puede observar que no hay presencia de triazinas a las concentraciones estudiadas, esta confirmación se puede comprobar por qué no hay presencia de picos de elución en los tiempos de retención característicos de las triazinas examinadas.

En la figura 40 B se presenta un cromatograma de extracto de matriz de Té negro a una concentración de  $3.3 \text{ mgL}^{-1}$ . Este extracto se consiguió pasando un volumen de 100 mL de matriz de Té negro, adicionada con una alícuota de 0.1 mL de un "stock" de triazinas con una concentración de  $100 \text{ mgL}^{-1}$ , a través de un cartucho de EFS con 500 mg de sílice, al pasar a través del cartucho de EFS se absorbieron las triazinas para posteriormente ser eluidas con 3 mL de la solución 20:80  $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$  para tener una concentración final en el extracto de  $3.3 \text{ mgL}^{-1}$ .

Para poder demostrar las mejoras que se lograron obtener con la nueva secuencia de elución se comparó la figura 40 B (cromatograma del ensayo 5) con la figura 36 B (cromatograma del ensayo 1). Se puede observar que en la figura 36 B los interferentes obstaculizan por completo los picos de elución de todas las triazinas, en comparación con la figura 40 B donde los interferentes han sido eliminados lo suficiente para poder ver los picos de elución de las triazinas a una concentración de  $3.3 \text{ mgL}^{-1}$ . En el caso de la simazina y propazina, entre estas dos triazinas se encontró el pico de elución de un contaminante que interfiere con los picos de elución de ambas triazinas, sin embargo se tiene una buena perspectiva de los picos de elución de estas triazinas. En el caso de las dos últimas triazinas se puede observar que los interferentes se lograron eliminar en casi su totalidad permitiendo de esta manera una buena perspectiva de los picos de elución de cada una de las triazinas. Con la anterior exposición de conjeturas se puede comprobar que la nueva secuencia de elución fue óptima para la matriz de Té negro, eliminando la mayor cantidad de interferentes.

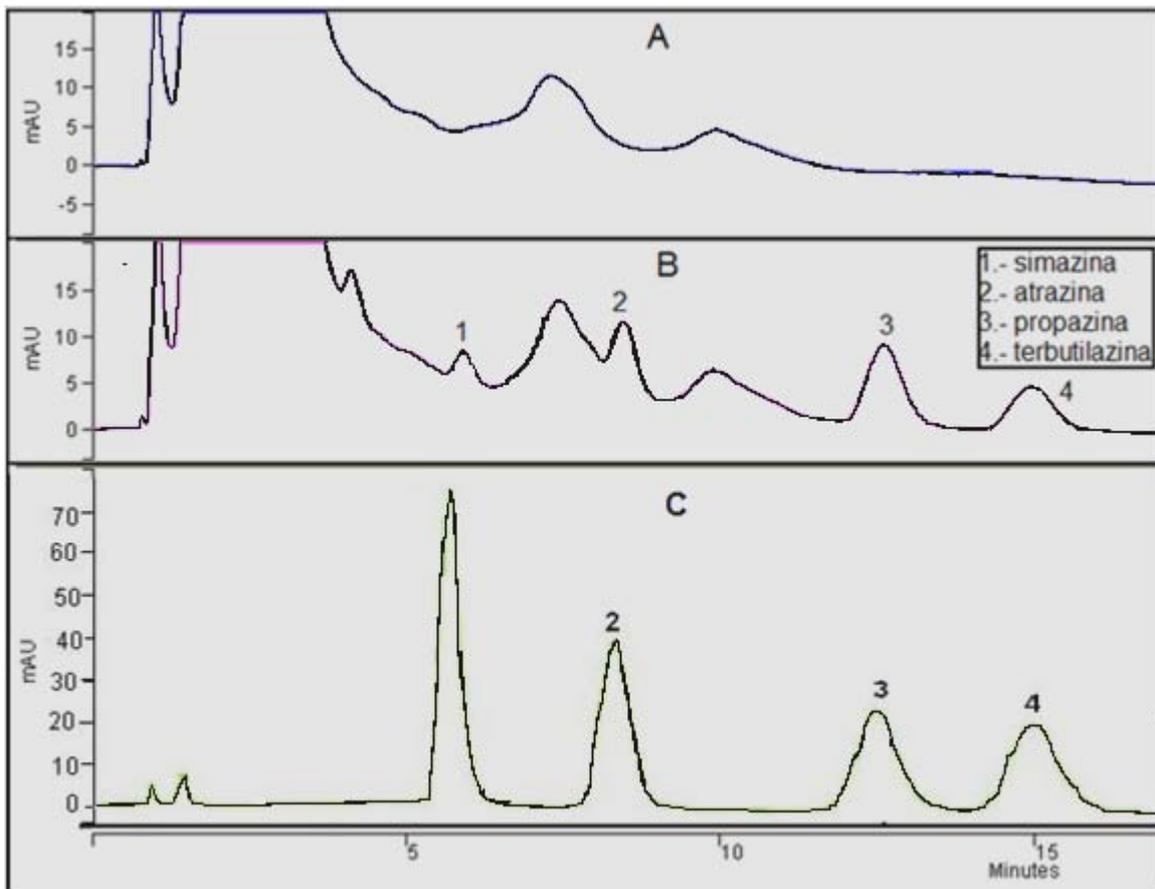


Figura 41. Cromatogramas de extractos de Té verde, obtenida con la secuencia de elución escogida y cromatograma de disolución estándar como comparativo de los tiempos de retención de las triazinas. En la figura A se presenta un cromatograma de extracto de Té verde sin adición de triazinas. Figura B cromatograma de extracto de Té verde con adición de triazinas a una concentración de  $3.3 \text{ mgL}^{-1}$ . Figura C cromatograma de estándar a una concentración de  $10 \text{ mgL}^{-1}$ . Secuencia de elución escogida constó de tres lavados y un eluyente: el primer lavado de 23 mL  $\text{H}_2\text{O}$ , el segundo lavado de 9 mL de 70:30  $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$ , el tercer lavado de 3 mL de 70:30  $\text{H}_2\text{O}:\text{ACN}$  y por último 3 ml de 20:80  $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$  usado como eluyente. Con una detección espectrofotométrica UV a  $\lambda = 220 \text{ nm}$ . Características de la columna de 150 X 4.60 mm d.i. RES ELUT  $\text{C}_{18}$ , con tamaño de partícula de  $5 \mu\text{m}$ , con una fase móvil de 44:56  $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$  a un flujo de  $1 \text{ mLmin}^{-1}$

En la figura 41 A se presenta el cromatograma de la extracción de matriz de Té verde sin adición de triazinas, se puede apreciar que no se encontró triazinas a las concentraciones estudiadas, esta afirmación se puede comprobar porque no hay presencia de picos de elución en los tiempos de retención característicos de las triazinas investigadas.



En la figura 41 B se presenta un cromatograma de extracto de matriz de Té verde a una concentración de  $3.3 \text{ mgL}^{-1}$ . Este extracto se obtuvo pasando un volumen de 100 mL de matriz de Té verde adicionada con una alícuota de 0.1 mL de un “stock” de triazinas con una concentración de  $100 \text{ mgL}^{-1}$ , a través de un cartucho de EFS con 500 mg de sílice, al pasar a través del cartucho de EFS se absorbieron las triazinas para posteriormente ser eluidas con 3 mL de la solución 20:80  $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$  para tener una concentración final en el extracto de  $3.3 \text{ mgL}^{-1}$ .

En la figura 40 C se presenta un cromatograma de estándares de triazinas a una concentración de  $10 \text{ mgL}^{-1}$ . Esta concentración de estándar se alcanzó de forma directa con el “stock” de triazinas, la cual tenía una concentración de  $100 \text{ mgL}^{-1}$ , de este “stock” se tomó un alícuota de 0.1 mL, esta alícuota se llevó a un volumen de 1 mL en un vial rotulado para así obtener una concentración final de  $10 \text{ mgL}^{-1}$ . Con éste cromatograma se logró comparar los tiempos de retención de las triazinas y asegurarse que los picos de elución presentes en los cromatogramas fueran de los analitos estudiados y no confundirse con picos de elución de interferentes.

Para poder demostrar las mejoras que se lograron obtener con la nueva secuencia de elución se comparó la figura 40 B cromatograma del ensayo 5 con la figura 37 B cromatograma del ensayo 1. Se puede observar que en la figura 37 B los interferentes a los 5 min se encuentran cerca de los 15 mUA comparado con la figura 41 B donde los interferentes a los 5 min se encuentran por debajo de los 10 mUA. Esta mejora favorece al pico de elución de la simazina debido a que la simazina eluye cerca de los 5 min.

En el caso de la propazina en la figura 37 B, aunque se puede observar el pico de elución los interferentes obstaculizan la visualización del pico de elución de la atrazina, en el caso de la figura 41 B si bien hay un pico de elución de un contaminante que obstaculiza al pico de elución de la atrazina tiene una mejor definición del pico de elución de éste analito. En el caso de los dos últimos analitos (propazian y terbutilazina) en la figura 37 B se logran observar los picos de elución sin embargo son obstaculizados por interferentes de la matriz de Té verde en comparación con la figura 41 B se puede observar que casi se elimina



por completo los interferentes de la matriz dando una mejor resolución del pico de la propazina y terbutilazina. Con la explicación anterior se pudo demostrar que la nueva secuencia de elución tiene una mejor limpieza de interferentes con respecto a la primera secuencia de elución que se propuso.

4.2.5. Evaluación de linealidad con la secuencia de elución No. 5 en infusión de Té negro

En la tabla 43 se muestran los parámetros de desempeño para la validación de métodos con la secuencia de limpieza No. 5 para la extracción de la triazinas en infusión de Té negro.

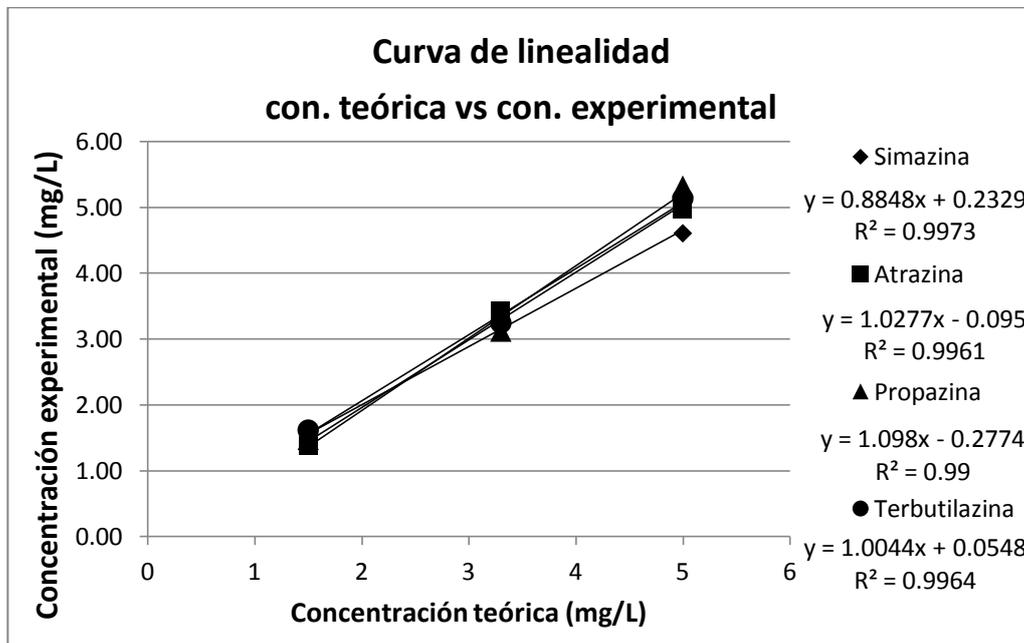


Figura 42. Curva de linealidad con la nueva secuencia de limpieza para la infusión de Té negro

Tabla 43. Parámetros de linealidad de infusión de Té negro.

Herbicida	m	b	R <sup>2</sup>
Simazina	0.8848	0.2329	0.9973
Atrazina	1.0277	0.095	0.9961
Propazina	1.098	0.2774	0.99
terbutilazina	1.0044	0.0548	0.9964

En la figura 42 se presentan las curvas de linealidad para cada una de las triazinas en infusión de Té negro. Presentando una buena linealidad.



En la tabla 43 se presenta los parámetros para las triazinas con la secuencia de elución No. 5, demostrando que el coeficiente de correlación lineal ( $r$ ) presenta valores por encima de 0.98, este valor es utilizado como criterio de aceptación por la guía de validación de métodos analíticos (García, et al., 2002).

#### 4.2.6. Reproducibilidad de la secuencia de elución No. 5

En la tabla 44 se presentan los porcentajes de recobro y los coeficientes de variación para cada una de las triazinas trabajadas, utilizando, la secuencia de elución No. 5.

Tabla 44. Porcentajes de recobro de infusión de Té negro aplicando la secuencia de elución No. 5

Triazinas	Porcentaje de recobro			C.V. (%)
	Réplicas			
	1	2	3	
Simazina	32	32	33	2
Atrazina	114	109	116	3
Propazina	120	100	114	9
Terbutilazina	124	113	118	5

Se puede observar que los recobros en el caso de la simazina son bajos debido a que esta triazina es la que presenta la mayor polaridad de entre las triazinas que se trabajó, este recobro bajo se pudo deber que por el eluyente de limpieza tuvo mayor fuerza y por tal se haya fugado. Esto solo afectó a la simazina porque en el caso de la otras triazinas se puede observar que la secuencia de limpieza utilizada fue favorable ya que se eliminaron las impurezas que no dejaban integrar los picos de las triazinas, y al mismo tiempo proporcionó buenos porcentajes de recobro. En el caso del coeficiente de variación, se puede apreciar que solo en el caso de la propazina sus datos se encuentran relativamente altos, aunque pueden aceptarse dado que la infusión de Té se considera como una muestra compleja. La simazina, la atrazina y la terbutilazina si presentaron valores de CV que se encuentran dentro de los criterios de aceptación de la guía de validación de métodos analíticos (García, et al., 2002).



### 4.2.7. Protocolo de EFS para el análisis de triazinas en infusiones de Té

Con la información presentada anteriormente se propone el protocolo siguiente para la extracción de triazinas en infusiones de Té: Se realiza una infusión de Té con un sobre comercial en 250 mL de agua purificada, la cual se calienta de 93 a 95 °C y se deja enfriar. Enseguida se toma una alícuota de 100 mL la cual se trata con el método de EFS con las siguientes etapas y materiales:

Para efectuar la extracción en fase sólida (EFS) se utiliza sílice C<sub>18</sub> (SUPELCO), la cual se activa días antes. La activación se realiza pasando metanol a una proporción de 1 mL de metanol por 1 g de sílice. Este paso es para eliminar las contaminantes que puede tener la sílice.

Para empacar los cartuchos de extracción primero se coloca dentro del cartucho una membrana ("frit") para evitar que se saliera la sílice C<sub>18</sub>.

Después, se pesan 500 mg de sílice C<sub>18</sub> y se empaca en el cartucho, encima de la sílice C<sub>18</sub> se coloca otra membrana ("frit") para compactarla. A continuación se aplica al cartucho un mililitro de metanol para eliminar cualquier contaminación cruzada, acto seguido se pasan 3 mililitros de agua para que este hidratada la sílice. Posteriormente, se hace pasar 100 mL de la muestra por el cartucho. De esta manera, las triazinas, quedan adsorbidas en la sílice C<sub>18</sub>. En seguida se pasa a través del cartucho 1) 23 mL de agua millipore, para la eliminación de contaminantes polares que contienen las infusiones de Té, 2) 9 mL de la mezcla de 70:30 H<sub>2</sub>O:MeOH como limpieza de impurezas, 3) 3 mL de la mezcla hidroorgánica de 70:30 H<sub>2</sub>O:ACN, estas mezclas funcionan como lavados de interferentes polares, 4) aplicación de 3 mL de una mezcla de 20:80 H<sub>2</sub>O:MeOH para la elución de las triazinas. Se recolecta el eluato en un vial.

Con la elución recolectada en un vial, este vial se encuentre rotulado para cada nivel de volumen utilizado, se evapora hasta 0.3 mL, el paso final funciona para poder mejorar el límite de cuantificación de las triazinas extraídas. Finalmente el eluato reconstituido es cuantificado por HPLC-UV.

La cantidad de triazinas que se pueden detectar por medio de este método en infusión de Té es de mínimo 0.3 mgL<sup>-1</sup>. Esta concentración se logró determinar experimentalmente. También se corroboró este límite basándose en el trabajo



realizado por (Flores, 2008). En este trabajo se desarrollaron ensayos para determinar la concentración de límite de detección de diferentes herbicidas dentro de los cuales se encuentran los cuatro herbicidas con los que se trabajó en la presente investigación. Para los primeros dos herbicidas (simazina y propazina) la concentración que estableció fue de  $0.35 \text{ mgL}^{-1}$ , en caso de los dos últimos herbicidas (propazina y terbutilazina) la concentración que se manejó fue de  $1 \text{ mgL}^{-1}$ .

#### 4.2.8. Análisis de triazinas en infusiones de Té verde y Té negro

Con la optimización y validación del método de extracción en fase sólida en infusiones de *Camellia sinensis*, en la presentación de Té negro y Té verde, se pudo determinar por HPLC los límites de detección para la simazina y propazina a una concentración de  $0.3 \text{ mgL}^{-1}$ , en caso de la propazina y terbutilazina la concentración que se manejó fue de  $1 \text{ mgL}^{-1}$ . Si bien se obtuvo una buena adecuación y validación para el método de extracción en fase sólida a las concentraciones trabajadas con muestras adicionadas se podría trabajar en mejorar o aumentar lavados para evitar la pérdida de la triazina más polar (simazina) también se podría mejorar los niveles en cuestión de límites de detección debido a que los límites de detección para los países que tienen legislación con respecto a estos analitos son menores así se podría obtener mejores controles en los productos de consumo humano.



**CAPÍTULO VI  
CONCLUSIONES**



## 5. CONCLUSIONES

La presente investigación, estuvo centrada en productos comerciales de Té, de los cuales se desarrollaron dos vertientes, la primera fue cuantificar la cantidad de iones presentes en las muestras por el método de ISE y la segunda fue optimizar un protocolo de Extracción en Fase Sólida y Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución con detección espectrofotométrica UV para el análisis de las triazinas estudiadas en infusiones de Té.

### 5.1. Análisis de iones

Se adaptó el método ISE para usarse en muestras de *C. sinensis* específicamente de Té verde y Té negro; en el desarrollo de este método se demostró una respuesta lineal dentro de un amplio intervalo de concentraciones sin verse afectada por el color o turbidez de las muestras, además de haber obtenido buenos parámetros de precisión y exactitud, dentro de este método se mantuvieron las ventajas ya observadas con anterioridad como es el emplear volúmenes bajos de muestra así como su mínima preparación de muestra, equipos de bajo costo y de fácil operación, aunado a un tiempo de respuesta corto.

Las medidas encontradas para sodio fueron muy bajas en cada una de las muestras, por lo que se puede concluir que los productos comerciales de Té por su bajo contenido del ion pueden ser etiquetados como "muy bajos en sodio" o "libres de sodio", esta conclusión es apoyada por la NOM-086-SSA1-1994, debido a esta razón se pueden incluir en una dieta baja en sodio. También se pueden recomendar estos productos, por sus bajos contenidos de sodio, para personas con problemas de hipertensión o diabetes. Debido a que las concentraciones presentes de sodio están por debajo de las concentraciones recomendadas en la NOM-015-SSA2-1994 la cual está enfocada para la prevención, tratamiento y control de la diabetes mellitus en la atención primaria y de la NOM-030-SSA2-1999 la cual está dirigida para la prevención, tratamiento y control de la hipertensión arterial.



Para el caso de los cloruros se encontró en los intervalos de de 6.12 a 8.37 mg para Té verde, para Té negro 5 a 9 mg. Para calcio se encontró entre 0.15 a 0.18 mg en el caso de Té verde, en caso de Té negro se encontró entre 0.25 a 0.39 mg; estas proporciones de calcio encontradas, aunque no se presenta en las etiquetas se puede comparar con artículos relacionados con las infusiones, los datos encontrados para Té verde y negro son similares y congruentes con los datos obtenidos por (Ünver, et al., 2008). Para el ion potasio las cantidades encontradas fueron de 9.72 a 49.05 mg para el Té verde, en el caso de Té negro fue de 8.97 a 13.67 mg; aunque estas cantidades se encuentran por debajo de las porciones presentadas en las etiquetas son congruentes debido a que Banerjee y Chaudhuri (2000) encontraron que el potasio por ser el ion con mayor presencia en las plantas podría tener un efecto complementario en las dietas que carecen de potasio. En el caso de las bebidas listas para beber se encontró que el contenido del ión  $\text{Na}^+$  es muy elevando con referencia a las infusiones de Té, sin embargo, se pudo comprobar que sus concentraciones son bajas tomando como referencia los parámetros presentados en la tabla 4 (IDR).

### 5.2. Análisis de herbicidas triazínicos

Por otra parte, se logró adaptar el método de EFS para la extracción de herbicidas en infusiones de *C. sinensis*. Lo anterior se apoyó en el valor de  $k'$  para predecir  $V_f$  mediante el programa simulador de frente de elución y recobro (SFER).

Se logró conocer las mezclas óptimas para el lavado y eluyente, obteniendo la secuencia de limpieza utilizada en la extracción de las triazinas en la muestra de Té.

Se alcanzaron buenos recobros para cada uno de las triazinas, cercanas al 100 %, y de igual forma sus C.V. (precisión) fueron aceptables en la secuencia de limpieza con y sin evaporación, esta última variable fue útil para aumentar la capacidad de cuantificación del método.



## CONCLUSIONES

---



Se logró concertar un protocolo de EFS- CLAR-UV para el análisis de residuos triazínicos en muestras comerciales de infusiones de Té que proporcionó extractos limpios para detectar a las triazinas a concentraciones trazas ( $0.3 \text{ mgL}^{-1}$ ).



**CAPÍTULO VII  
BIBLIOGRAFÍA**

**6. BIBLIOGRAFÍA****6.1. Libros y artículos**

1. Altman, J., 1993. *Pesticide Interactions in Crop Production*. Boca Raton Florida. USA: CRC Press. Pag. 363-363.
2. Arnon, D. I., 1988. *Trace elements*. London. England: Academic Press. Pag. 45-49.
3. Babor, J. A. y Ibarz, J., 1977. *Química general moderna..* México: Epoca S.A 41-43.
4. Banerjee, B., 1992. *Botanical classification of tea*. London. England: K.C. Willson and M.N. Clifford. Pag. 25-51.
5. Banerjee, B. y Chaudhuri, T. C., 2000. *Therapeutic effects of tea*. India : Science Publishers. Pag. 76-77, 81-83.
6. Bermejo, M. F., 1990. *Tratado de Química Analítica: general, cuantitativa e instrumental*. Madrid. España: Paraninfo S.A. Pag. 65-67, 70-73.
7. Braumann, T., 1986. Determination of hydrophobic parameters by reversed-phase liquid chromatography: theory, experimental techniques, and application in studies on quantitative structure-activity relationships.. *Journal Chromatography A*, Issue 373, pp. 191-225.
8. Bruneton, J., 1999. *Pharmacognosy: Phytochemistry, Medicinal Plants*. segunda edición ed. New York. USA: Intercept Limited. Pag. 76-78, 80.
9. Buckman, H. O., 1996. *Naturaleza y propiedades de los suelos: Textos de eafología para enseñanza..* Barselona. España: Montaner y Simon. Pag. 35-37, 45-48.
10. Capar, S. G. & Szefer, P., 2005. *Determination and speciation of trace elements in food*. Boca ratón, Florida USA: CRC Press. Pag. 67-69, 70-73.
11. Chafer, C., 2006. *Acoplamiento microextracción en fase sólida cromatografica..* Valencia: España: Universidad de Valencia.
12. Chakravarty, I., 1990. *Nutritional value of tea*. Calcuta. Kulkata: Tea Research Association. Pag. 45-47, 50, 54.



13. Charlot, G., 1975. *Curso de química analítica general. Métodos electroquímicos y absorciométricos cromatográficos.* Barcelona: España: Toray-masson,S.A. Pag. 23-26, 45-47.
14. Choppin, G. R., Jaffe, B. & Jackson, L., 1977. *Química.* México: Publicaciones cultural S.A. Pag. 67-70, 80-83.
15. Cosofret, V. V. & Buck, R. P., 1992. *Pharmaceutical applications of membrane sensors.* New York. U.S.A: CRC Press. Pag. 80-85.
16. García, M. P. & Rojo, F., 2004. *SFER (Simulador de frente de elución y de recobro) software en excel para calcular los parametros de extracción en fase sólida de compuestos organicos en muestras acuosas.* Usado internamente: Facultad de Química.
17. Dreisbach, R. H., 1983. *Handbook of poisoning: prevention, diagnosis and tretment.* Los altos California: Lange medical publication. Pag. 54-57, 60.
18. Flores, C. A. M., 2008. *Determinación de iones Cl-, F-, K+ y Na+ en bebidas comerciales de tipo hidratantes y dietéticos.* México D.F. Tesis Química de alimentos: Facultad de Química.
19. Gallaher, R. N., Gallaher, K., Marshall, A. J. & Marshall, A. C., 2006. Mineral analysis of ten types of commercially available tea. *Journal of Food Composition and Analysis*, pp. S53-S57.
20. García, M. A., Alcántara A., Cortés M., Herrera J. L., Rodríguez R & Soberón E., 2002. *Guía de validación de métodos analíticos.* México: Colegio Nacional de Químicos Farmaceuticos Biológicos México A.C.
21. Gennaro, A. R., 1998. *Remington. Farmacia.* 19 ed. México: D.F. Ed. Médica Panamericana.Pag. 78-80.
22. Gosselin, R. E., Smith, R. P. & Hodge, H. C., 1984. *Clinical toxicology of commercial products.* Baltimore. USA: Williams and Wilkins. Pag. 61-63.
23. Hara, Y., 2001. *Green Tea: Health Benefits and Applications.* New York. USA: Taylor & Francis. Pag. 36-39.
24. Harris, D. C., 2001. *Análisis químico cuantitativo.* México. D.F.: Reerté S.A. Pag. 367-393, 693-721, 803-805.
25. Hennion, M. C., 1999. Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling. *Journal of Chromatography A*, 856(1-2), pp. 3-54.



26. Hewitt, E. J. & Smith, T. A., 1974. *Plant Mineral Nutrition*. London. England: Universities Press London. Pag. 34-38.
27. Huang, S. P. & Huang, S. D., 2006. Dynamic hollow fiber protected liquid phase microextraction and. *Journal of Chromatography A*, Issue 1135, p. 6–11.
28. Infante, R., 1997. Polifenoles del vino y oxidabilidad de las lipoproteínas. ¿Blanco o Tinto?. *Clin. Invest. Arterioclerosis*, 16(9), pp. 19-22.
29. Isaza, M. J., 2007. Taninos o Polifenoles Vegetales. *Scientia et Technica*, 13(33), pp. 13-18.
30. Kamrin, M. A., 1997. *Pesticide Profiles: Toxicity, Environmental Impact, and Fate*. New York: CRC Press. Pag. 50-52, 55-57.
31. Kidd, H. & James, D. R., 1991. *The agrochemicals Handbook*.. Cambridge: Royal society of chemistry information services. Pag. 34-36, 40-43.
32. Klaassen, C. D. & Watkins III, J. B., 1999. *Manual de Toxicología*.. México. D.F.: McGraw-Hill Interamericana. Pag. 640-643.
33. Krieger, R. y otros, 1995. *Handbook of Pesticide toxicology*. Orlando, Florida. USA: Academic Press. Pag. 68-70, 73-75.
34. Kumar, V., Tewary, D. K. & Shanker, A., 2004. *Leaching of pesticides in herbal decoction*.. s.l.:Chemical Health and Safety. Pag 25-28.
35. Lin, C. H., Lerch, R. N., Garrett, H. E. & George, M. F., 2006. Improved GC-MS/MS Method for Determination of Atrazine and Its Chlorinated Metabolites in Forage Plants—Laboratory and Field Experiments. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, p. 1753–1773.
36. Malon, A. & Maj-Zurawska, M., 2005. The new methods of determination of Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup>. *Sensors and Actuators B Chemical*, Issue 108, p. 828–831.
37. Martínez, F. S., Gonzáles, G. J., Culebras, J. M. & Tuñón, M., 2002. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria*, 17(6), pp. 271-278.
38. Miller, J. N. & Miller, J. C., 2002. *Estadística y quimiometría para química analítica*. Madrid: Prentice Hall. Pag. 21-41, 77-78.



39. Nielsen, S., 2003. *Food Analysis Laboratory Manual*.. Nueva York. USA: Kluwer Academic/Plenum Publishers. Pag. 12-15, 17-19.
40. Noble, A., 1993. Partition coefficients (n-octanol-water) for pesticides. *Journal of chromatography*, Volumen 642, pp. 3-14.
41. Ötles, S., 2005. *Methods of analysis of food components and additives*. Boca Ratón. Florida USA: CRC Press. Pag. 45-48, 50-54.
42. Özcan, M., Ünver, A., Uçar, T. & Arslan, D., 2008. Mineral content of some herbs and herbal teas by infusion and decoction. *Food Chemistry*, pp. 1120-1127.
43. Pichon, V., 2000. Solid-phase extraction for multiresidue analysis of organic contaminants in water.. *Journal of Chromatography A*, 885(1-2), pp. 195-215.
44. Reichle, D. E., 1981. *Dynamic properties of forest ecosystems*. Cambridge. USA: Cambridge University Press. Pag. 67-69, 80-83.
45. Rinco, A. & Rocha, A., 1976. *ABC de química*.. México. D.F.: Herrero S.A. Pag. 23-26, 30.
46. Roberts, G. R., 1974. Polar lipid composition of the leaves and seeds from the tea plant (*Camellia sinensis* L). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 25(5), pp. 473-475.
47. Rusell, E. J. & Wild, A., 1973. *Las condiciones del suelo y el desarrollo de las plantas según Rusell*. española ed. Madrid. España: Mundi-Prensa. Pag. 34-37, 56, 67.
48. Secretaria de Salud., 1996. **NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-086-SSA1-1994, BIENES Y SERVICIOS. ALIMENTOS Y BEBIDAS NO ALCOHOLICAS CON MODIFICACIONES EN SU COMPOSICION. ESPECIFICACIONES NUTRIMENTALES**.. México: Comité consultivo nacional de normalización de regulación y fomento sanitario.
49. Secretaria de Salud., 2002. **NORMA Oficial Mexicana NOM-187-SSA1/SCFI-2002, Productos y servicios. Masa, tortillas, tostadas y harinas preparadas para su elaboración y establecimientos donde se procesan. Especificaciones sanitarias. Información comercial. Métodos de prueba**..



- México: Comité consultivo nacional de normalización de regulación y fomento sanitario..
50. Secretaría de salud, 2001. *NORMA Oficial Mexicana NOM-030-SSA2-1999, Para la prevención, tratamiento y control de la hipertensión arterial..* México: Secretaría de salud.
51. Secretaría de salud, 2001. *NORMA OFICIAL MEXICANA, NOM-015-SSA2-1994, "PARA LA PREVENCIÓN, TRATAMIENTO Y CONTROL DE LA DIABETES MELLITUS EN LA ATENCIÓN PRIMARIA"..* México: Secretaría de Salud.
52. Secretaria de salud, 2002. *Norma oficial mexicana NOM-201-SSA1-2002, Productos y servicios. Aguay hielo para consumo humano, envasados y a granel. Especificaciones sanitarias..* México: Comité consultivo nacional de normalización de regulación y fomento sanitario..
53. Skoog, D. A., West, D. M. & Holler, F. J., 1999. *Química analítica..* Sexta ed. México. D.F.: Mc Graw-Hill. Pag. 328-340, 490-507.
54. Stagg, G. V. & Millin, D. J., 1975. The nutritional and therapeutic value of tea. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 26(10), pp. 1439-1459.
55. Stevens, J. T. & Sumner, D. D., 1991. *Herbicides. In Handbook of pesticide toxicology..* New York. USA: Academic Press. Pag. 56-59, 70-73.
56. Szefer, P. & Nriego, J. O., 2007. *Mineral components in foods..* Londres. England: CRC Press. Pag. 24-28, 30.
57. Takeo, T., 1992. *Green and semi-fermented tea.* London. England: Chapman and Hall. Pag. 45-49, 50-53, 60.
58. Takeo, T. & Mahanta, P. K., 1972. Comparison of black tea aroma of orthodox and CTC teas, and black teas of different varieties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, Issue 23, pp. 227-232.
59. Thermo Electron Corporation, 2003. *Orion 86-11 ROSS Sodium Electrodes Combination Electrode. Sodium Electrode Instruction Manual.* USA: Thermo Electron Corporation.
60. Thermo Electron Corporation, 2003. *Orion 94-17 ionplus. Chloride Electrode Instruction Manual.* USA: Thermo Electron Corporation.



61. Thermo Electron Corporation, 2003. *Orion 97-17 ionplus. Orion Potassium Electrodes Instruction Manual*. USA: Thermo Electron Corporation.
62. Thermo Electron Corporation, 2003. *Orion Calcium Electrode Instruction Manual*. USA: Thermo Electron Corporation.
63. Unión Europea, 2000. *DIRECTIVA 2000/42/CE*, s.l.: La comisión de las comunidades europeas.
64. Ünver, A., Ucar, T., Arslan, D. & Özcan, M. M., 2008. Mineral content of some herbs and herbal teas. *Food Chemistry*, p. 1120–1127.
65. Von Uexkull, H. R., 1996. El cloro en la nutrición de la Palma aceitera.. *Informaciones Agronómicas* , Issue 24, pp. 4-6.
66. Wood, D. J. y otros, 1964. The chemical basis of quality in tea. I.—analyses of freshly plucked shoots. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 15(1), pp. 8-14.
67. Xu, G., Magen, H., Trachitzky, J. & Kafkafi, U., 2000. Advances in chloride nutrition of plants.. *Advances in Agronomy*, Issue 68, pp. 98-150.
68. Zhiqiang, H., Yongjun, L., Bo, C. & Shouzhuo, Y., 2007. Simultaneous determination of 102 pesticide residues in Chinese. *Journal of Chromatography B*, p. 154–162.

## 6.2. Páginas de Internet

1. Audiencias ministro. República Argentina, 2010. *Ministerio de salud presidencia da la nación*. [En línea] Available at: <http://www.msal.gov.ar/> [Último acceso: 14 Julio 2011].
2. Corporación Universitaria Lasallista, 2011. *Corporación Universitaria Lasallista* Corporación Universitaria Lasallista. [En línea] Available at: <http://www.lasallista.edu.co/fxcul/media/pdf/RevistaLimpia/Vol3n2/88-97.pdf> [Último acceso: 17 Julio 2011].



## BIBLIOGRAFÍA



3. Desarrollo de Medios, S.A. de C.V.; Arturo Cruz Bárcenas, 2007. *La Jornada*. [En línea] Available at: <http://www.jornada.unam.mx/2007/11/15/index.php?section=gastronomia&article=a10n1gas> [Último acceso: 4 Abril 2011].
4. EPA, 2011. *EPA. United states environmental protection agency*. [En línea] Available at: <http://www.epa.gov/> [Último acceso: 17 Julio 2011].
5. European Commission, 2011. *Gateway to the European Union..* [En línea] Available at: <http://europa.eu/> [Último acceso: 17 Julio 2011. ].
6. Facultad de medicina, 2004. *Facultad de medicina UNAM..* [En línea] Available at: [www.facmed.unam.mx](http://www.facmed.unam.mx) [Último acceso: 15 Julio 2011].
7. Guillem, P., 2012. *Scharlab*. [En línea] Available at: <http://www.scharlab.com/> [Último acceso: 15 Julio 2011].
8. INSHT, 2011. *Ministerio de empleo y seguridad social. Instituto nacional de seguridad e higiene en el trabajo..* [En línea] Available at: <http://www.insht.es/portal/site/Insht/> [Último acceso: 14 Julio 2011].
9. INTA, 2002. *Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria*. [En línea] [Último acceso: 14 Julio 2011].
10. Jimenez-Rojas, V., 2011. *Universidad nacional Heredia*. [En línea] Available at: <http://plaguicidasdecentroamerica.info/> [Último acceso: 14 Julio 2011].
11. Mendoza, H. & Bautista, G., 2002. *Diseño Experimental. Universidad Nacional de Colombia*. [En línea] Available at: <http://www.virtual.unal.edu.co/cursos/ciencias/2000352/> [Último acceso: 25 04 2013].
12. QuimiNet.com, 2000. *QuimiNet.com. Información y negocios segundo a segundo*. [En línea] Available at: <http://www.quiminet.com/articulos/las-bases-de-la-potenciometria-28370.htm> [Último acceso: 23 Agosto 2011].
13. Sigma-Aldrich Co., 2010. *Sigma-Aldrich*. [En línea] Available at: <http://www.sigmaaldrich.com/mexico.html> [Último acceso: 14 Julio 2011].
14. UNAM. Facultad de Química., 2007. *Facultad de química. Universidad Nacional Autonoma de México*. [En línea] Available at: [www.quimica.unam.mx](http://www.quimica.unam.mx) [Último acceso: 18 Julio 2011].



15. Universidad de Oviedo, 2011. *Universidad de Oviedo. La Universidad de Asturias*. [En línea] Available at: <http://www.uniovi.es/> [Último acceso: 17 Julio 2011].



### Anexo I. Diferencia Mínima Significativa

Es uno de los métodos de comparación múltiple. Es utilizado para comparar parejas de medidas de un tratamiento, sin embargo puede ser utilizado para la comparación de más de dos medidas de tratamiento. Fisher recomendó que para que la tasa de error juiciosa por comparación sea aproximadamente igual a  $\alpha$  se deben realizar dos etapas:

**Etapa I:** Es probar  $H_0 : \mu_1 = \mu_2 = \dots = \mu_t$  por la prueba  $F$  de tamaño  $\alpha$ , si el valor  $F$  no es significativo se termina el análisis. Si el valor  $F$  es significativo, entonces sigue la etapa II.

**Etapa II:** Se prueba cada comparación simple  $H_0 : \mu_i = \mu_{i'}$  por una prueba  $t$  al nivel de significancia del  $\alpha$  y con los grados de libertad ( $g.l$ ) del  $CM_{EE}$  (en un DCA  $g.l = r(t - 1)$ , en un bloque  $g.l = (r - 1)(t - 1)$ ).

Esta prueba determina el valor mínimo necesario para considerar diferentes dos tratamientos y lo utiliza para comparar los diferentes pares de medias que se deseen evaluar. Los pares de medias que se comparan son los que han sido planeados antes de ejecutar el experimento, por ello es una prueba para comparaciones planeadas. Supongamos que después de haber rechazado la hipótesis global, con base en una prueba  $F$  de análisis de varianza, se desea probar  $H_0 : \mu_i = \mu_{i'}$ , para  $i \neq i'$ . Esto puede hacerse empleando la estadística  $t$ .

$$t_o = \frac{\bar{y}_i - \bar{y}_{i'}}{S_{\bar{y}_i - \bar{y}_{i'}}}$$

Y se rechaza la hipótesis nula  $H_0 : \mu_i = \mu_{i'}$  si



$$|\bar{y}_i - \bar{y}_r| \geq t_{\alpha/2} \sqrt{CM_{EE} \sum_{i=1}^t \frac{c_i^2}{r_i}}$$

En forma general para probar cualquier

$C = \sum_i c_i \mu_i$  ( $i = 1, 2, \dots, t$ ) se plantea la hipótesis nula  $H_0: C = 0$  y se rechaza  $H_0$  si

$$\left| \sum c_i \hat{\mu}_i \right| \geq t_{\alpha/2, \text{gl. del error } S_{\text{contraste}}} \Leftrightarrow$$

$$\left| \sum c_i \hat{\mu}_i \right| \geq t_{\alpha/2, \text{gl. del error}} \sqrt{CM_{\text{error}} \sum_{i=1}^t \frac{c_i^2}{r_i}}$$

Donde:

$t_{\alpha/2, S_{\text{contraste}}}$  = diferencia mínima significativa (DMS),

$t_{\alpha/2}$  = Percentil  $100(1 - \frac{\alpha}{2})$  de la distribución *t-student* con grados de libertad dados por los grados de libertad del error experimental y  $S_{\text{contraste}}$  = Desviación estándar del contraste que para el caso de la diferencia de dos medias muestrales es dado por:

$$S_{\bar{y}_i - \bar{y}_r} = \sqrt{2 \frac{CME}{r}}$$

Como vemos la DMS depende del percentil  $t$  de la distribución t-Student, el cuadrado medio del error experimental ( $CM_{EE}$ ) y el número de réplicas  $r$ . Si  $r$  es grande entonces la DMS será pequeña y permitirá detectar diferencias significativas pequeñas, por otro lado si el  $CM_{EE}$  aumenta para un  $r$  fijo entonces la DMS es grande y se tiende a no detectar diferencias significativas.



## Anexo II. Especificaciones e interferentes de los electrodos

Electrodo	Especificaciones										
	Rangos			Resistencia del electrodo (megaohms)	Reproducibilidad	Tamaño de muestra					
	Límite inferior de detección	pH	Temperatura °C								
Sodio	0.02 mgL <sup>-</sup>	6 a 12	0 a 80	< 300	± 2 %	3 mL					
Potasio	0.04 mgL <sup>-</sup>	2.5 a 11	0 a 40	< 50	± 2 %	-----					
Calcio	0.02 mgL <sup>-</sup>	2.5 a 11	0 a 40	0.1 a 4	± 4 %	5 mL					
Cloruro	1.8 mgL <sup>-</sup>	2 a 12	10 a 100	< 1	± 2 %	3 mL					
ión	Interferentes										
Na	Li <sup>+</sup>	Rb <sup>+</sup>	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Ag <sup>+</sup>	Tl <sup>+</sup>						
K	Cs <sup>+</sup>	NH <sub>4</sub>	Tl	H <sup>+</sup>	Ag <sup>+</sup>	Tris <sup>+</sup>	Li <sup>+</sup>				
Ca	Pb <sup>+2</sup>	H <sup>+</sup>	Hg <sup>+2</sup>	Sr <sup>+2</sup>	Fe <sup>+2</sup>	Cu <sup>+2</sup>	Ni <sup>+2</sup>	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Ba <sup>+2</sup>	Zn <sup>+2</sup>	Mg <sup>+2</sup>
Cl	OH <sup>-</sup>	Br <sup>-</sup>	I <sup>-</sup>	S <sup>+2</sup>	CN <sup>-</sup>	NH <sub>3</sub>	S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2+</sup>				



---

Recomendación

Debido que el consumo en México de infusiones es una tradición y en los últimos años va en aumento, sería útil realizar una investigación de la composición de los micronutrientes de estas infusiones de las variedades más populares en el consumo nacional. Esto nos serviría para realizar un perfil nutricional completo de infusiones de hierbas, para crear una base de datos Nacional.