



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA**

TESIS

**DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE LA DETERMINACIÓN DE
PICLORAM Y ÁCIDO 2,4-DICLOROFENOXIACÉTICO EN
MUESTRAS AMBIENTALES DE SUELOS POR CROMATOGRAFÍA DE
LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN (CLAR)**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA**

PRESENTA

YOLANDA GABRIELA LÓPEZ URRUTIA



CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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: **Profesor: Irma Cruz Gavilán García**

VOCAL: **Profesor: Norma Ruth López Santiago**

SECRETARIO: **Profesor: Silvia Citlalli Gama González**

1er. SUPLENTE: **Profesor: Joaquín Preza de la Vega**

2º SUPLENTE: **Profesor: Claudia Inés Rivera Cárdenas**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO DE BIOGEOQUÍMICA AMBIENTAL, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

ASESOR DEL TEMA:

NORMA RUTH LÓPEZ SANTIAGO

SUSTENTANTE:

YOLANDA GABRIELA LÓPEZ URRUTIA

Contenido

Listado de Tablas	v
Listado de Figuras	vi
Resumen.....	vii
Introducción	viii
Objetivos	x
I. Marco teórico.....	1
1. Generalidades de los plaguicidas	1
1.1 Definición	2
1.2 Clasificación.....	3
1.3 Ventajas y desventajas de su uso	5
2. Los herbicidas de estudio: ácido 2,4-diclorofenoxiacético y picloram.....	5
2.1 Modo de acción	7
2.2 Toxicidad.....	9
2.3 Efectos adversos al ambiente	11
2.4 Situación de los plaguicidas en México	15
3. Análisis de 2,4-D y picloram en muestras ambientales	17
3.1 Técnicas de análisis de los plaguicidas de estudio	18
4. Validación de métodos cromatográficos	22
II. Parte experimental	25
5. Reactivos, disolventes, materiales y equipos	25
5.1 Reactivos y disolventes	25
5.2 Materiales, accesorios y consumibles de equipos	25
5.3 Equipos.....	26
5.4 Preparación de disoluciones	27
6. Experimentación.....	28
6.1 Desarrollo del método	28

6.1.1	Obtención de los espectros de Uv-Vis de 2,4-D y picloram..	28
6.1.2	Optimización de la separación.....	28
6.1.3	Análisis de 2,4-D y picloram por CLAR	29
6.2	Validación del método analítico	29
6.2.1	Linealidad y sensibilidad analítica	29
6.2.2	Límite de cuantificación y límite de detección.....	31
6.2.3	Precisión y exactitud	31
6.3	Confirmación en matriz (intervalo de trabajo)	31
6.4	Aplicación a muestras ambientales	32
6.4.1	Muestreo	32
6.4.2	Preservación de muestras y preparación	33
6.4.3	Parámetros (pH y humedad)	33
6.4.4	Determinación de plaguicidas por CLAR	34
III.	Análisis de resultados y discusión.....	36
7.	Desarrollo del método	36
7.1	Espectros de Uv de 2,4-D y picloram.....	36
7.2	Optimización de la separación	37
8.	Validación del método analítico	41
8.1	Linealidad y sensibilidad analítica	42
8.2	Límites de detección y de cuantificación	43
8.2.1	Precisión y exactitud	44
8.3	Confirmación en matriz	46
8.4	Resumen de los parámetros de validación.....	49
9.	Aplicación a muestras ambiental.....	51
IV.	Conclusiones.....	54
V.	Bibliografía	55

Listado de Tablas

Tabla 1 Clasificación de la toxicidad de los plaguicidas en función de DL ₅₀ en ratas	4
Tabla 2. Color de etiqueta del plaguicida según la categoría toxicológica	4
Tabla 3. Límites máximos de residuos permitidos de 2,4-D y picloram en México	7
Tabla 4. Herbicidas comerciales más empleados de 2,4-D y picloram en México	8
Tabla 5. Cantidad letal de plaguicida en humano	10
Tabla 6. Datos ecotoxicológicos de 2,4-D y picloram	11
Tabla 7. Datos toxicológicos de 2,4-D y picloram	11
Tabla 8. Propiedades fisicoquímicas de 2,4-D y picloram	14
Tabla 9. Afinidad de los plaguicidas con los diferentes matrices ambientales en función de las características fisicoquímicas.....	15
Tabla 10. Evaluación de parámetros según el tipo de ensayo	23
Tabla 11. Resumen del plan de validación	30
Tabla 12. Preparación de los niveles de la curva de calibración.....	31
Tabla 13. Muestras analizadas.....	34
Tabla 14. Parámetros de retención de los analitos.....	38
Tabla 15. Clasificación de la afinidad del plaguicida por tejidos grasos animales según su valor de <i>log</i> K _{o/w}	40
Tabla 16. Estadística de regresión.....	43
Tabla 17. Límites detección y cuantificación	44
Tabla 18. Precisión y recobro en 2,4-D	45
Tabla 19. Precisión y recobro en Picloram.....	45
Tabla 20. Resultados de la confirmación en matriz	47
Tabla 21. Estadísticos de Cantidad adicionada vs Cantidad recuperada..	48
Tabla 22. Parámetros de Validación del método propuesto 2,4-D	50
Tabla 23. Parámetros de Validación del método propuesto picloram.....	50
Tabla 24. Resultados generales del análisis de las muestras de suelo de Molango de Escamilla, Hidalgo	52

Listado de Figuras

Figura 1. Estadístico del uso de herbicidas en México del 2010 al 2014 ..	2
Figura 2. Estructura química de los herbicidas 2,4-D y picloram	6
Figura 3. Etapas del proceso analítico para determinar plaguicidas en matrices ambientales.....	18
Figura 4. Procedimiento optimizado de extracción de 2,-D y picloram en suelo	32
Figura 5. Procedimiento de la preparación de las muestras de suelo	35
Figura 6. Espectros de ultravioleta-Vis de los herbicidas de estudio	36
Figura 7. Equilibrios ácido-base: a)2,4-D y b)picloram	37
Figura 8. Diagramas de abundancia relativa de los herbicidas de estudio	38
Figura 9. Curvas $\log k' = f(\% \text{ ACN})$	39
Figura 10. Cromatograma de la separación de picloram y 2,4-D, optimizada	41
Figura 11. Curva de calibración promedio de 2,4-D.....	42
Figura 12. Curva de calibración promedio de picloram.....	43
Figura 13. Curva Cantidad adicionada vs Cantidad recuperada , 2,4-D ..	48
Figura 14. Curva Cantidad adicionada vs Cantidad recuperada , picloram	49
Figura 15. Sitios de muestreo	51
Figura 16. Cromatogramas de la inyección de a) Muestra 635-15 y b) Muestra 635-16 adicionada con 2,4-D y picloram	53

Resumen

El uso de plaguicidas es una práctica común en la actividad agrícola, con la cual se busca evitar la pérdida de cultivos debido a la presencia de plagas, sin embargo, su uso desinhibido plantea riesgos para el medio ambiente ya que dependiendo de sus características fisicoquímicas son capaces de persistir tiempo después de su aplicación, adicionalmente su concentración puede llegar a incrementarse y alcanzar niveles nocivos. La determinación de plaguicidas en matrices ambientales como el suelo, ayuda a conocer el impacto real que tienen sobre el ambiente y la salud, ya que en las últimas décadas han tomado gran importancia sus efectos nocivos.

En este trabajo se desarrolló y validó una metodología que permitió llevar a cabo la determinación de 2,4-D y picloram en muestras de suelo de la comunidad de Molango, Hidalgo, en donde estos herbicidas son ampliamente utilizados. Los resultados de la validación muestran que el método propuesto es adecuado para los fines previstos ya que cumplen con los criterios de aceptación establecidos. El método de extracción sólido-líquido asistida por ultrasonido mostro ser un método eficiente, ya que los parámetros de desempeño obtenidos cumplen con los criterios de aceptación y durante el análisis cromatográfico no se detectaron interferencias provenientes de la matriz.

Al aplicar el método muestras ambientales no se encontró evidencia de la presencia de 2,4-D ni de picloram, sin embargo debe tomarse en cuenta que son compuestos tóxicos y que un inadecuado manejo y una exposición elevada a estos compuestos, puede generar efectos dañinos a la salud.

Introducción

La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, FAO (por sus siglas en inglés Food and Agriculture Organization of the United Nations) define al suelo como la capa delgada de material que se encuentra en la superficie de la Tierra, su principal función es la producción de alimentos, sin embargo la agricultura intensiva es de las principales causas de su contaminación y deterioro (INEGI, 2015).

La agricultura es una de las actividades humanas donde se descargan al medio ambiente productos químicos como los plaguicidas, los cuales llegan a afectar de manera negativa la supervivencia a largo plazo de los ecosistemas debido a que son compuestos capaces de persistir en el ambiente después de su aplicación, debido a sus características fisicoquímicas, adicionalmente su concentración puede llegar a incrementarse y alcanzar niveles nocivos (SAGARPA, 2012).

Por su propia naturaleza los plaguicidas actúan negativamente sobre la matriz en la que se aplican, alteran los procesos vitales, generan efectos tóxicos no solo a los organismos que se quiere afectar si no también los que están expuestos (Juan García, 2008).

En nuestro país el picloram y el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), son herbicidas comúnmente empleados para el control de plantas indeseables en cultivos de arroz, avena, caña de azúcar, cebada, maíz, sorgo, pastizales y potreros.

El método EPA 508 en EUA y la NOM-041-SSA1-1993 en México proponen metodologías para la determinación de plaguicidas mediante cromatografía de gases (CG) acoplado al detector de captura de electrones (Ramos García, 2004), sin embargo, ambos herbicidas no son volátiles y una etapa de derivatización debe llevarse a cabo para su

determinación por esta técnica. Una alternativa para superar esta limitación de detección es realizar el análisis por cromatografía líquida de alto rendimiento (CLAR), mediante detección UV (de Amarante et al, 2003) .

Para conocer la ruta ambiental que han seguido estos compuestos para llegar a provocar efectos a la salud, es importante desarrollar metodologías eficientes para llevar a cabo su detección en diferentes matrices ambientales como agua, suelo y sedimentos de estos compuestos a nivel de trazas.

Objetivos

OBJETIVO GENERAL

- Desarrollar y validar la metodología para determinar ácido 2,4-diclorofenoxiacético y picloram por CLAR en muestras ambientales de suelos.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Establecer las condiciones óptimas de composición de la fase móvil para llevar a cabo la separación cromatográfica.
- Optimizar las condiciones de extracción de los herbicidas de muestras de suelo.
- Validar el método analítico propuesto y obtener los parámetros de validación.
- Aplicar la metodología validada al análisis de muestras de suelo para la determinación de ácido 2,4-diclorofenoxiacético y picloram.

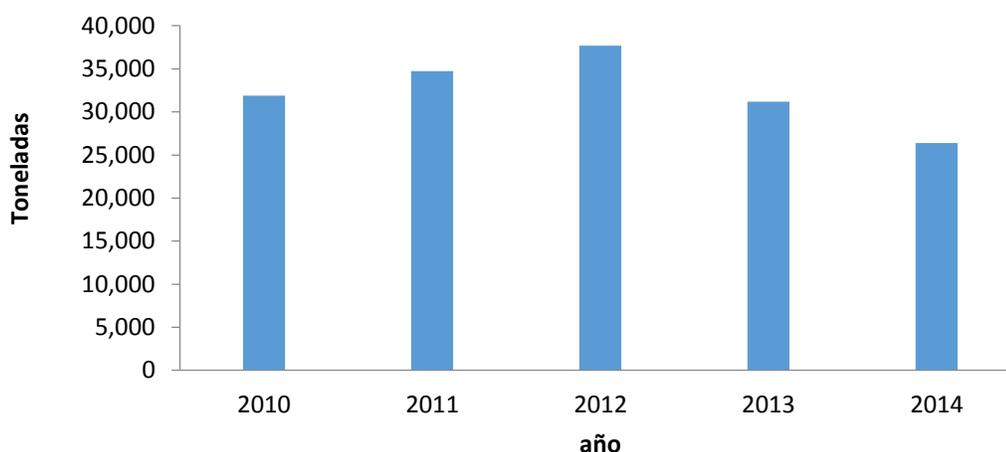
I. Marco teórico

1. Generalidades de los plaguicidas

El cultivo y cosecha de alimentos inicia en el periodo Neolítico, y desde siempre ha sido una actividad de gran importancia debido a que no solo es una de las principales fuentes de alimento para la sociedad, también impulsa la economía de la región donde se realiza; sin embargo, se ve constantemente afectada por organismos y plantas las cuales causan daños y pérdidas a las cosechas, situación que desde el origen de la agricultura hasta la actualidad ha sido de suma importancia debido a que se busca evitar la pérdida de la producción agrícola ya que de ella depende en gran medida la humanidad para poder sobrevivir (Asensio Ramos, 2012), uno de los recursos más importantes ha sido y sigue siendo la utilización de plaguicidas para la protección de los cultivos y ganados (Juan García, 2008).

El comienzo del uso de estos compuestos químicos inicio con la primera civilización mesopotámica (Sumerios) quienes emplearon compuestos de azufre para repeler insectos. Posteriormente a principios del siglo XIX se comenzaron a emplear como plaguicidas algunos derivados orgánicos obtenidos de procesos industriales, el desarrollo más importante de estos compuestos se dio con el descubrimiento dicloro-difenil-tricloroetano (DDT), considerado el primer plaguicida sintético, sintetizado en 1873 por Othmar Zeidler, en 1940 Paul Müller descubrió su efecto toxico y fue utilizado en la Segunda Guerra Mundial para combatir la malaria, tifus y otras enfermedades propagadas por mosquitos. Este descubrimiento abrió camino para producir compuestos con el fin de ser empleados como plaguicidas, desembocando hasta la actualidad una gran variedad amplia gama de plaguicidas (García Guzmán, 2008).

En México tan solo en el año 2014 se emplearon 32 406 toneladas de insecticidas, 26 392 toneladas de herbicidas y 40 016 toneladas de bactericidas (FAO, 2017), estas cifras han disminuido durante los últimos años, Figura 1. Otra medida propuesta es impulsar el sistema de control conocido como Manejo Integrado de Plagas (MIP) en el cual se emplea: control genético (uso y variedades de plantas y razas de animales resistentes a las plagas); control biológico (liberación de enemigos naturales de las plagas); control cultural (buenas prácticas agrícolas) y control químico (COFEPRIS, 2016). Sin embargo, en países menos desarrollados, el precio de estos productos es relativamente bajo comparado con los costos de la mano de obra aumenta el uso de herbicidas (García García, 2014).



Fuente: Elaboración propia a partir de información de FAO, 2017

Figura 1. Estadístico del uso de herbicidas en México del 2010 al 2014

1.1 Definición

Un plaguicida se puede definir como un compuesto o una mezcla de compuestos de síntesis química, biológica o productos naturales destinados a matar, repeler, atraer, regular o interrumpir la proliferación de una plaga o de organismos no deseados los cuales causan

enfermedades en humanos y animales, también la interferencia en la producción agropecuaria y forestal (Rentería, 2015).

1.2 Clasificación

La clasificación de plaguicidas se da por diversos criterios como:

A. Composición química

- Compuestos inorgánicos. Compuestos derivados de cobre, azufre, zinc y aluminio.
- Compuesto orgánicos. En este grupo encontramos los compuestos que se extraen de productos naturales como nicotina, piretrinas y cinerinas (Hernández & Beltrán, 1995), los más utilizados son los compuestos sintéticos como los organoclorados, organofosforados, carbamatos, piretroides, triazinas, fenoxi-ácidos, etc... (García Guzmán, 2008)

B. Tipo de organismo que controla

- Insecticida. Control de insectos
- Acaricida. Control de ácaros
- Fungicida. Control de hongos y levaduras
- Bactericida. Control de bacterias
- Herbicida. Control de hierba y maleza
- Nematicida. Control de gusanos que parasitan plantas

C. Toxicidad

La Organización Mundial de la Salud (OMS), clasifica la toxicidad de los plaguicidas principalmente con base en la dosis letal media (DL_{50}) en animales expresada en mg/kg. Normalmente los plaguicidas se encuentran dentro de la categoría de productos peligrosos, en las Tablas 1 y 2 se presenta la clasificación toxicológica y la etiqueta que la OMS da a los plaguicidas (OPS, 2016).

Tabla 1 Clasificación de la toxicidad de los plaguicidas en función de DL₅₀ en ratas

Clasificación Toxicológica de los Plaguicidas				
Clasificación de la OMS según los riesgos	Formulación líquida DL₅₀ aguda (mg/kg)		Formulación sólida DL₅₀ aguda (mg/Kg)	
	Oral	Dérmica	Oral	Dérmica
Clase I Productos Sumamente Peligrosos	>20	>40	>5	>10
Clase Ib Productos Muy Peligrosos	20 a 200	40 a 400	5 a 50	10 a 100
Clase II Moderadamente Peligrosos	200 a 2000	400 a 4000	50 a 500	100 a 1000
Clase III Productos Poco Peligrosos	2000 a 3000	>4000	500 a 2000	>1000
Clase IV Productos que Normalmente No Ofrecen Peligro	>3000		>2000	

Fuente: (COFEPRIS, 2016)

Tabla 2. Color de etiqueta del plaguicida según la categoría toxicológica

Banda de color de las etiquetas según la categoría toxicológica		
Color de la banda	Clasificación de la OMS según los riesgos	Clasificación del peligro
Rojo (PMS 199C)	Ia Producto sumamente peligroso	Muy tóxico
Rojo (PMS 199C)	Ib Producto muy peligroso	Tóxico
Amarillo (PMS Amarillo C)	II Producto moderadamente peligroso	Nocivo
Azul (PMS 293C)	III Producto poco peligrosos	Cuidado
Verde (PMS 347 C)	IV Producto que normalmente no ofrece peligro	Cuidado

Fuente: (OPS, 2016)

D. Persistencia

- Ligeramente persistentes: menos de cuatro semanas
- Poco persistentes: de cuatro a veintiséis semanas
- Moderadamente persistentes: de veintisiete a cincuenta y dos semanas
- Altamente persistentes: más de una años y menos de veinte
- Permanentes más de veinte años

E. Concentración

- Plaguicida técnico. Es aquél en que el ingrediente activo se encuentra a su máxima concentración y es utilizado exclusivamente como materia prima en la formulación de plaguicidas formulados.
- Plaguicida formulado. Es la mezcla de uno o más plaguicidas técnicos, con uno o más ingredientes inertes o diluyentes, cuyo objeto es dar estabilidad al ingrediente activo.

F. Formulación

Se refiere a su presentación comercial, los plaguicidas se pueden clasificar en polvos, líquidos, gases y comprimidos. Esta clasificación es útil en prácticas de aplicación y en prevención de riesgos, pues del tipo de formulación dependen, en gran medida, su capacidad para persistir en el ambiente (Caseley, 1996).

1.3 Ventajas y desventajas de su uso

Cuando el cultivo o el ganado se ven afectados por enfermedades y plagas que dañan la producción y calidad de los productos alimenticios, los plaguicidas permiten disminuir los efectos de estos factores. Sin embargo, su uso incorrecto y desmesurado puede causar daños al hombre, flora, fauna, contaminar suelos, mantos acuíferos y las plagas se hacen más resistentes (Juan García, 2008).

2. Los herbicidas de estudio: ácido 2,4-diclorofenoxiacético y picloram

El picloram y el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), Figura 2, son herbicidas empleados para el control de plantas indeseables (de hoja ancha o arbustiva) en cultivos de arroz, avena, caña de azúcar, cebada, maíz, sorgo, pastizales y potreros (Meng, 2006).

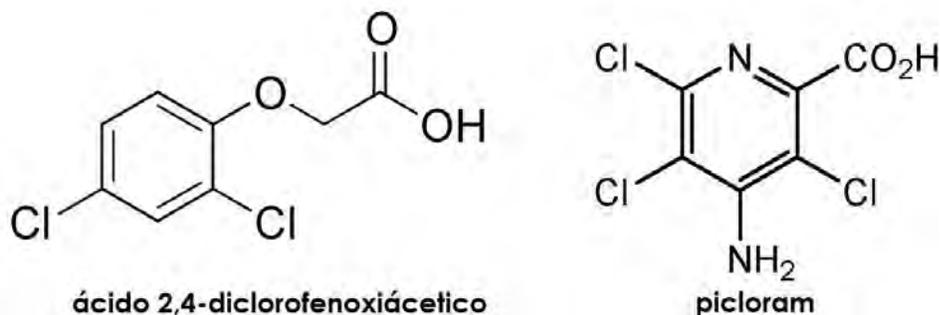


Figura 2. Estructura química de los herbicidas 2,4-D y picloram

El 2,4-D es uno de los plaguicidas sintético más antiguos, fue descubierto durante la segunda guerra mundial y reconocido por ser un componente del controversial Agente naranja utilizado en la guerra de Vietnam (Ramos García, 2004), es uno de los herbicidas más comercializados en México y en otros países como E.U.A, ya que es recomendado para la agricultura, plantaciones forestales e incluso para jardines domésticos, sin embargo se busca prohibir su venta debido a que lo consideran tóxico, pero Dow Agro Sciences, es el mayor defensor y productor de este plaguicida (Tu M. et al, 2001). En México por lo general es aplicado en cultivos de arroz, avena, centeno, cebada, maíz, sorgo, trigo, caña de azúcar, potreros, césped y prados, teniéndose claro que los alimentos no deben contener una cantidad mayor de residuos de plaguicidas a los límites máximos de residuos, LMR o LMRE, mg/kg (COFEPRIS, 2016), Tabla 3.

El picloram es un herbicida descubierto e introducido al mercado en 1963 por Dow Chemical (Rangel Morales, 2016), este herbicida actúa como regulador del crecimiento de planta de hoja ancha, en México es aplicado a suelos dedicados al cultivo de caña de azúcar, maíz, sorgo, pastizales, potreros y alrededores de carreteras, aeropuertos, instalaciones industriales y públicas donde la vegetación no es deseada (COFEPRIS, 2016).

Tabla 3. Límites máximos de residuos permitidos de 2,4-D y picloram en México

Cultivo	LMR (mg/kg)	
	2,4-D	Picloram
Arroz	0.1	-
Avena	0.5	-
Cebada	0.5	-
Maíz	0.5	0.20
Sorgo	0.5	0.20
Trigo	0.5	-
Caña de azúcar	2	0.05
Pastizales	1000	80
Potreros	1000	80

Fuente: Anexo 3 del Catálogo de plaguicidas COFEPRIS, 2016

El 2,4-D es un fenoxi-ácido mientras que el picloram es un compuesto piridínico, en su forma acuosa son muy volátiles y corrosivos (Rangel Morales, 2016).

Comercialmente se venden en diferentes formulaciones sólidas y líquidas en las que se encuentran solo o en mezcla con otros plaguicidas. En la Tabla 4 se muestran los principales productos comerciales en México (COFEPRIS, 2016).

2.1 Modo de acción

Tanto el 2,4-D como el picloram actúan de manera sistémica como una auxina imitadora (hormonas que actúan como reguladoras del crecimiento vegetal), además de ser selectivos, son absorbidos vía foliar, edáfica (a través de las raíces) y por superficies de corte; esto produce en las malezas epinastías (crecimiento más fuerte en la superficie superior que en la inferior de una planta), lo que provoca que una parte de la planta, como una hoja, se curve hacia abajo).

Tabla 4. Herbicidas comerciales más empleados de 2,4-D y picloram en México

Categoría toxicológica	Empresa	Nombre Comercial	Ingrediente Activo	Uso
III	Agricultura Nacional de Jalisco, S.A. DE C.V.	Machetazo 2000 / Chapoleo-A 480 SC / Arrasador / 2,4-D Amina	2,4-D	Control de maleza en cultivos arroz
III	Agronova, S.A. DE C.V.	Novamina super/ Superamina / Amina 720	2,4-D	Control de maleza en cultivos de arroz, de caña de azúcar, cebada, maíz, sorgo y trigo
III	Dow Agrosciences de México, S.A. de C.V.	Esteron 47-M Y/O-Formula40	2,4-D	Control de maleza en cultivos de caña de azúcar, cebada, maíz y sorgo
III	Polaquimia, S.A. de C.V.	Herbipol 334-E	2,4-D	Control de maleza en cultivos de maíz y sorgo
III	Similia Defesivos Agrícolas, S.A. de C.V.	Rainbow 2,4-D técnico	2,4-D	Control de maleza en cultivos de maíz, sorgo y trigo
IV	Dupont México, S.A. de C.V.	Navajo / Sherif	2,4-D	Control de maleza e cultivos de arroz, avena, cebada, maíz y pastizales
IV	Agroquímicos Versa, S.A. de C.V.	Picloram Técnico	Picloram	Control de maleza en cultivos de berenjenas, brócoli, col, coliflor, chile, jitomate y papa
IV	Dow Agrosciences de México, S.A. de C.V.	Tordon ácido	Picloram	Uso exclusivo para plantas formuladoras de plaguicidas agrícolas
IV	Dow Agrosciences de México, S.A. de C.V.	Tordon 22 K	Picloram	Uso exclusivo para plantas formuladoras de plaguicidas agrícolas
IV	Insumos y Agroquímicos Stockton, S.A. de C.V.	Picloton TECH 95% / Piclostock-TECH 95% / Piramstock TECH 95%	Picloram	Aplicado en cultivos de jitomate, papa, chile, berenjena, brócoli y coliflor
III	Monsanto Comercial, S.A. de C.V.	Mon 1001 / Mon 48340 / Agrisol-picloram-D / Defensa / ArtistT	Picloram + 2,4-D	Control de maleza en pastizales
III	Dow Agrosciences de México, S.A. de C.V.	Tordon RTU	Picloram + 2,4-D	Control de maleza en cultivos de arroz, de caña de azúcar, cebada. Maíz, sorgo y trigo
III	Dow Agrosciences de México, S.A. de C.V.	Esteron-50 D / Gannon / Verdum / Vivax 50	Picloram + 2,4-D	Control de maleza en cultivos de caña de azúcar, maíz, pastizales y potreros
IV	Dow Agrosciences de México, S.A. de C.V.	Flash	Picloram + 2,4-D	Uso exclusivo para plantas formuladoras de plaguicidas agrícolas

Fuente: Anexo 2 del Catálogo de plaguicidas 2016 de COFEPRIS (COFEPRIS, 2016)

f

El modo exacto de acción de estos herbicidas no está definido completamente, se cree que estimulan la síntesis de ARN, ADN y proteínas conduciendo a una división celular y crecimiento descontrolado, y en última instancia la destrucción del tejido vascular; se transportan de manera eficiente en el interior de la planta y la resistencia a su metabolización mejora las posibilidades y eficiencia de acción. La muerte de la planta ocurre típicamente de tres a cinco semanas siguientes a la aplicación (Sembro, 2014).

2.2 Toxicidad

Todos los plaguicidas poseen un alto grado de toxicidad y en ocasiones dañan a organismos que no son el objetivo debido a que estos pueden poseer sistemas fisiológicos o bioquímicos similares a los organismos a los que está dirigido.

La toxicología depende de distintos factores, tales como la estructura molecular del principio activo (estructura-actividad), sus propiedades fisicoquímicas: como la capacidad de adsorción, su mecanismo de acción, concentración y periodo de exposición, en el caso de los humanos la ingesta se da por vía oral, dérmica e inhalación (COFEPRIS, 2016).

En la actualidad existen evaluaciones que miden la toxicidad de los plaguicidas, entre las que encontramos; la medición de la dosis mínima, capaz de matar al 50% de los animales expuestos a plaguicidas, que brinda información de la peligrosidad del producto cuando hay exposición al mismo, Tabla 1. También existen pruebas que evalúan los efectos que causa la exposición crónica a estos compuestos como: su potencial carcinógeno, daños al sistema nervioso central, efectos sobre el desarrollo del organismo, efectos teratogénicos (defectos congénitos durante el desarrollo prenatal), después del nacimiento y efectos en la reproducción (Ramos García, 2004).

La población más expuesta a desarrollar estos efectos es la que está directamente relacionada a su fabricación y aplicación. Los síntomas generales por una exposición aguda son sensación de hormigueo, entumecimiento, calambres, dolor de cabeza, vértigo, temblor, náuseas, visión borrosa, dificultad respiratoria y cardíaca (Ramos García, 2004). En la Tabla 5 se representan los valores de la cantidad de plaguicida que puede ser letal para un humano adulto de talla media según su clasificación de DL₅₀ del producto.

Tabla 5. Cantidad letal de plaguicida en humano

DL₅₀ mg/kg	Cantidad Letal
5	Unas cuantas gotas
50	Una cucharadita
500	30 g o dos cucharaditas
5000	380 g
15000	960 g

Fuente: COFEPRIS, 2016 y Secretaría de Salud, 2010

En las Tablas 6 y 7 se muestra información ecotoxicológica y toxicológica respectivamente del 2,4-D y el picloram (Grupo Argos, 2017). Los términos toxicológicos referidos en ellas se definen como: El nivel sin efecto observable (NOEL), es la dosis de concentración más alta en la que un grupo de organismos de la misma especie y cepa son expuestos, la cual no causa alteraciones morfológicas, capacidad funcional y desarrollo del organismo (Repetto M. et al, 2003). La vida media o DT₅₀ de un plaguicida es el tiempo requerido en días para convertir el 50% de éste en otras sustancias, en cualquier matriz ambiental (REP-AL, 2016).

Tabla 6. Datos ecotoxicológicos de 2,4-D y picloram

Ecotoxicidad	2,4-D	Picloram
Aves	DL ₅₀ oral, codorniz >500 mg/kg Producto Ligeramente tóxico para aves	DL ₅₀ oral, codornices > 2000 mg/kg Producto prácticamente no tóxico para aves
Peces	CL ₅₀ >100 mg/L Producto prácticamente no tóxico en peces	CL ₅₀ en Peces : >130 mg/L Producto no tóxico para peces
Abejas	DL ₅₀ oral (48 h) > 100 µg/abeja. Producto prácticamente no toxico en abejas	DL ₅₀ en abejas > 100 µg/abeja, producto prácticamente no tóxico en abejas
Persistencia en suelo	En el suelo la actividad microbiana actúa degradándolo a través de distintos procesos descarboxilación, hidroxilación, ruptura de cadenas de ácidos. La vida media en el suelo es menor a 7 días	Degradado por la luz, más rápidamente en la superficie del suelo o en agua clara móvil. Degradado lentamente por microorganismos del suelo, con una vida media de 30-90 días

Tabla 7. Datos toxicológicos de 2,4-D y picloram

Toxicidad	2, 4-D	Picloram
Toxicidad aguda – Oral:	DL ₅₀ en ratas 200 y 2000 mg/kg peso corporal	DL ₅₀ en ratas > 5000 mg/kg peso corporal
Toxicidad aguda – Dermal:	DL ₅₀ en ratas >4000 mg/Kg Peso corporal	DL ₅₀ en ratas > 5000 mg/kg peso corporal
Toxicidad aguda – Inhalatoria:	CL ₅₀ en ratas 5.72 mg/L	CL ₅₀ en ratas > 3.23 mg/L
Irritación dermal:	Producto no irritante.	El índice de irritación primaria dérmica obtenido por administración dermal (Patch Test) de 0,00 (sobre un máximo de 8), es un producto no irritante
Irritación ocular:	Producto Moderadamente Irritante	El índice de irritación ocular en fondo de saco conjuntival en conejos , fue 6.00 (sobre un máximo de 110), producto mínimamente irritante
Sensibilización:	No sensibilizante	Débilmente sensibilizante
Toxicidad crónica:	NOEL (2 años) para ratas: 5 mg/Kg diario.	NOEL (2 años) para ratas: 20 mg/kg diario.
Mutagénesis:	No presenta actividad mutagénica.	No presenta actividad mutagénica

2.3 Efectos adversos al ambiente

El uso de plaguicidas causa efectos adversos sobre las diferentes formas de vida y sobre los ecosistemas, estos se pueden clasificar como primarios, cuando afectan directamente a la especie y los secundarios cuando se afecta su hábitat. La aplicación constante a los cultivos provoca

remanentes que contaminan suelos, cuerpos de agua, aire y biota, llegando a afectar cadenas tróficas y como consecuencia la salud humana. Para entender el comportamiento de los plaguicidas en el ambiente se deben de tomar en cuenta diversos factores tales como, procesos de transporte, geografía del lugar donde se aplicó, propiedades fisicoquímicas y tiempo de vida media de estos compuestos (Campos Segura & González Forero, 2011).

La movilidad de un plaguicida en suelos es un punto importante de estudio ya que brinda información sobre su potencial de contaminación. Las características fisicoquímicas cuantificables de estos compuestos como la solubilidad, presión de vapor, la constante de Henry, el coeficiente de carbono orgánico (K_{oc}), el coeficiente de partición octanol-agua ($K_{o/w}$) y pH ayudan a predecir que tan probable es encontrar el contaminante en la matriz analizada. Las vías por las cuales los plaguicidas se moviliza en el ambiente influyen en su destino se describen a continuación (Jáquez Matas Sandra Viviana et al, 2013):

- **Difusión.** Es el movimiento de las moléculas debido a un gradiente de concentración, este movimiento es al azar pero trae como consecuencia el flujo de materiales desde las zonas más concentradas a las menos concentradas. Para medir la difusión de un compuesto en el suelo hay que considerar la interacción conjunta de parámetros tales como la porosidad, los procesos de adsorción, la naturaleza del compuesto, entre otros.
- **Lixiviación.** Es el parámetro más importante de la evaluación del movimiento de una sustancia en el suelo. Está ligada a la dinámica del agua, a la estructura del suelo y a factores propios del plaguicida. Los compuestos aplicados al suelo tienden a desplazarse con el agua y lixiviar a través del perfil, alcanzando las capas más profundas y el acuífero, que en consecuencia resulta contaminado.

- **Evaporación.** La tasa de pérdida de un plaguicida por volatilización depende de su presión de vapor, solubilidad en agua y peso molecular, esto es cuantificable mediante la constante de Henry, un valor alto de la Constante de Henry indica que un plaguicida tiene un potencial elevado para volatilizarse.
- **Persistencia.** Si la vida media y la persistencia de un plaguicida son mayores a la frecuencia con la que se aplican, los plaguicidas tienden a acumularse tanto en los suelos como en la biota. La estabilidad química de los plaguicidas en el ambiente y por tanto su vida media, está relacionada con la eficiencia de los procesos de degradación natural como biodegradación, fotodegradación e hidrólisis química. Sin embargo, la degradación parcial de plaguicidas puede conducir a la formación de metabolitos con gran impacto ambiental, la detección y cuantificación de dichos metabolitos permite establecer el efecto ambiental de muchas de estas sustancias. La descomposición de los plaguicidas en el ambiente depende de varios factores incluidos la temperatura, el pH del suelo, los microorganismos presentes en el suelo, clima, exposición del plaguicida a la luz, agua y oxígeno, así como el tipo de suelo.
- **Solubilidad en agua.** La solubilidad en agua de un plaguicida es una medida que determina la máxima concentración que se disuelve en un litro de agua, por lo general tiene valores entre 1 a 100 000 mg/L y los plaguicidas muy solubles en agua se adsorben con baja afinidad a los suelos y por lo tanto, son fácilmente transportados del lugar de la aplicación por una fuerte lluvia, riego o escurrimiento, hasta los cuerpos de agua superficial.
- **Coefficiente de adsorción de carbono orgánico (K_{oc}).** Este valor también se le conoce como coeficiente de adsorción suelo/agua, es una medida de la tendencia de un compuesto orgánico a ser retenido por

suelos o sedimentos. Un K_{oc} elevado indica que el plaguicida orgánico se fija con firmeza en la materia orgánica del suelo, por lo que poca cantidad del compuesto se mueve a las aguas superficiales o a los acuíferos.

- **Coefficiente de Partición Octanol/Agua ($K_{o/w}$)**. $K_{o/w}$ es una medida de cómo una sustancia química puede distribuirse entre dos disolventes inmiscibles, agua (es un disolvente polar) y octanol (es un disolvente relativamente no polar, que representa a las grasas). El $K_{o/w}$ proporciona un valor de la polaridad de un plaguicida, que es frecuentemente utilizado en modelos para determinar cómo un plaguicida puede distribuirse en el tejido de grasa animal. Los plaguicidas con una vida media y un $K_{o/w}$ alto se acumulan en el tejido graso y a lo largo de la cadena alimenticia.

En la Tabla 8 se presentan las propiedades fisicoquímicas de los herbicidas de estudio (Rangel Morales, 2016).

Tabla 8. Propiedades fisicoquímicas de 2,4-D y picloram

Propiedades fisicoquímicas	2,4-D	Picloram
Peso molecular	221.04 g/mol	241.5 g/mol
Punto de fusión	135-142°C	218.5°C
Densidad	1.42 g/mL a 25°C	1.16g/mL
Solubilidad	900 mg/L a 25°C	430 mg/L a 25°C
Presión de vapor a 25°C	5.5×10^{-7} a 25°C	8.2×10^{-5} a 35°C
Constante de Henry	1.81×10^{-12} atm.m ³ /mol se clasifica como no volátil	4.55×10^{-10} atm.m ³ /mol se clasifica como no volátil
Índice de Lixiviación	2.69	4.79
Coefficiente de adsorción (K_{oc})	20	35
Coefficiente de partición octanol/agua ($K_{o/w}$)	1.48×10^{-1}	1.20×10^{-2}

La afinidad de 2,4-D y picloram por diferentes matrices ambientales, se relaciona con las características fisicoquímicas de estos plaguicidas, por ejemplo el valor de K_{oc} de la Tabla 8, de 20 para 2,4-D y 35 para picloram, de acuerdo a la Tabla 9 ambos plaguicidas tienen afinidad por el

suelo ya que tiene un valor de $K_{oc} > 5$, el valor de $\log K_{o/w}$ es < 1 por lo que estos plaguicidas no se fijan con firmeza a la materia orgánica ni tienden a bioacumularse en la grasa corporal de animales; sin embargo debido a esta disponibilidad y su alta solubilidad 2,4-D y picloram pueden transportarse a aguas superficiales, acuíferos, y aire. Es así como en base a algunos parámetros fisicoquímicos, se puede tener una idea de la persistencia de estos plaguicidas en el ambiente.

Tabla 9. Afinidad de los plaguicidas con los diferentes matrices ambientales en función de las características fisicoquímicas

Afinidad	Agua S en g/L	Suelo $\log K_{oc}$	Biota animal $\log K_{o/w}$	Biota Plantas $\log K_{o/w}$
Alta	> 1	> 5	> 5	> 8
Media alta	$1 \cdot 10^{-2}$	5-4	5-3.5	8-7
Media	$10^{-2} \cdot 10^{-3}$	4-2	3.5-3	7-5
Media baja	$10^{-3} \cdot 10^{-5}$	2-1	3-1	> 4
Baja	$< 10^{-5}$	< 1	< 1	< 4

2.4 Situación de los plaguicidas en México

Durante el 2000 al 2005 en México se observó un incremento en el volumen de la producción y aplicación de herbicidas y defoliantes (García Gutiérrez & Guadalupe, 2012).

Una solución a esto es la implementación regulación en la distribución y utilización de los plaguicidas. En México la regulación y control sanitario de plaguicidas es atribución de las diferentes dependencias (CICOPLAFEST, 2009):

CICOPLAFEST (Comisión Intersecretarial para el Control del Proceso y Uso de Plaguicidas y Sustancias Tóxicas). Está facultada para regular la exploración, elaboración, fabricación, formulación, mezclado, acondicionamiento, envasado, manipulación, transporte, distribución, aplicación, almacenamiento, comercialización, tenencia, uso y disposición final de los plaguicidas, fertilizantes y sustancias tóxicas.

COFEPRIS (Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios): Encargada de autorizar el registro y expide certificados de libre venta para la exportación de plaguicidas y nutrientes vegetales, así como otorgar permisos de importación de plaguicidas, nutrientes vegetales y sustancias tóxicas o peligrosas, previo análisis, evaluación y dictamen de la información técnica, toxicológica y de seguridad correspondiente.

SEMARNAT (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales): Quien emite opinión técnica respecto de la protección del ambiente en los casos que establece el Reglamento, previo análisis y evaluación de la información técnica y ecotoxicológica, y autoriza la importación y exportación de plaguicidas, nutrientes vegetales y sustancias tóxicas o peligrosas.

México tiene compromisos internacionales que involucran a la CICOPLAFEST, EPA (Environmental Protection Agency), FDA (Food and drug Administration), el Foro Intergubernamental de Seguridad Química del Protocolo de Montreal, entre otros (SEGOB, 2017).

En materia de normas oficiales mexicanas, respecto al proceso, embalaje, etiquetado, uso y aplicación, de plaguicidas la Secretaría de Salud (SSA) y la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) se encargan de vigilar ya hacer cumplir estas normas:

- NOM-232-SSA1-2009. Plaguicidas: que establece los requisitos del envase, embalaje y etiquetado de productos grado técnico y para uso agrícola, forestal, pecuario, jardinería, urbano, industrial y doméstico.

En materia de detección y efectos tóxicos al ambiente la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) regula las siguientes normas (COFEPRIS, 2016):

- NOM-052-SEMARNAT-2005, Que establece las características, el procedimiento de identificación, clasificación y los listados de los residuos peligrosos.
- NOM-053-SEMARNAT-1993, Que establece el procedimiento para llevar a cabo la prueba de extracción para determinar los constituyentes que hacen a un residuo peligroso por su toxicidad al ambiente.

A pesar de la gran cantidad de plaguicidas que se emplean constantemente, en México se tiene poca información de su comportamiento y toxicidad. El Instituto Nacional de Ecología (INE) indica que sería importante realizar investigaciones a nivel de laboratorio y campo con las condiciones ambientales que prevalecen en México, con el fin de entender e identificar los parámetros ambientales que afectan de forma precisa el transporte y comportamiento de los plaguicidas en el ambiente a lo largo de su ciclo de vida (Organización Panamericana de la Salud , 2005)

3. Análisis de 2,4-D y picloram en muestras ambientales

Para el análisis de residuos de plaguicidas en el medioambiente son necesarios métodos sensibles, selectivos, precisos, automáticos y aplicables a un gran número de compuestos en una matriz compleja. Este análisis requiere de varias etapas que se esquematizan en el diagrama de la Figura 3. Un proceso ideal es aquel que el número de etapas son mínimas, siempre que sea posible, para disminuir las posibilidades de error, costo y tiempo empleado.

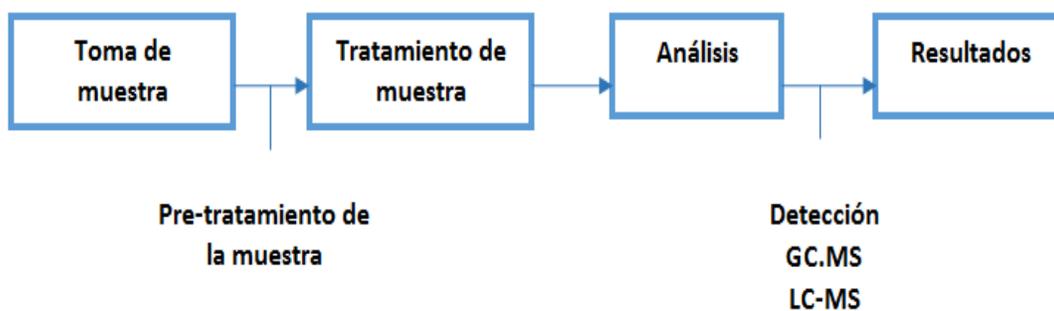


Figura 3. Etapas del proceso analítico para determinar plaguicidas en matrices ambientales

3.1 Técnicas de análisis de los plaguicidas de estudio

En nuestro país en cuanto a métodos oficiales para análisis de plaguicidas se refiere, la NOM-041-SSA1-1993 propone una metodología para la determinación de estos compuestos, en ella se describe un método para la determinación de un pequeño grupo de 10 plaguicidas de la familia química de los organoclorados, usando la extracción líquido-líquido como técnica de extracción y cromatografía de gases con detector de captura de electrones para el análisis de los extractos. En los Estados Unidos de Norteamérica, la EPA toma en cuenta dentro de los métodos oficiales para la determinación de plaguicidas, los métodos EPA 508 y EPA 508.1 los cuales contemplan el análisis de hasta 45 analitos y ambos métodos al igual que la NOM-041-SSA1-1993 realizan el análisis por CG con detección de captura de electrones sin embargo, en el método EPA 508 propone como método de extracción la extracción líquido-líquido, mientras que el método EPA 508.1 propone la extracción en fase sólida (Ramos García, 2004).

Dada la diversidad química de los plaguicidas, la determinación de los mismos dependerá de su propia naturaleza, de la matriz en la que se encuentren inmersos y el nivel de concentración en que se encuentren; así queda de manifiesto que no hay un procedimiento general para su

análisis, para cada caso particular se deber contar con un procedimiento específico. En general el análisis de plaguicidas consta de dos etapas: una preparativa (para limpiar y concentrar) y otra determinativa, generalmente técnicas cromatográficas.

a. Etapa preparativa

Un paso esencial en el proceso de análisis de plaguicidas previo al análisis mediante cromatografía, es la extracción de los analitos de interés y para ello es indispensable seleccionar un método apropiado. Entre las técnicas que usualmente se emplean, encontramos la extracción líquido-líquido, en fase sólida y la microextracción en fase sólida (Robles, 2014).

- **Extracción Líquido-Líquido (ELL).** Es una técnica de separación basada en un proceso de transferencia de una o varias sustancias de una fase líquida a otra también líquida inmiscible con la primera, este método depende de la composición de las fases utilizadas que se compone de una fase acuosa y una orgánica. La fase acuosa suele ser la que contiene a los analitos a extraer; la fase orgánica denominada extractante, son disolventes orgánicos los cuales deben ser poco miscibles en agua y no reaccionar con ella, punto de ebullición bajo, presión de vapor y viscosidad moderados, buena estabilidad química y no deben formar emulsiones. Otro aspecto que tiene gran importancia en el proceso extractivo es el pH de la fase acuosa, ya que en muchos casos depende de este que los analitos a separar se encuentren en la forma adecuada y se transfieran a la fase orgánica (Jáquez Matas Sandra Viviana et al, 2013). Algunas de las principales desventajas de esta técnica de separación son el tiempo empleado, el empleo de volúmenes grandes de disolventes y algunos de ellos son tóxicos, por lo que se recomienda agregar un paso de evaporación-concentración,

el cual debe realizarse con mucha precaución, para evitar la contaminación de la muestra o pérdida de los analitos volátiles.

- **Extracción sólido-líquido.** Utilizada generalmente para extraer plaguicidas en muestras sólidas, las cuales son puestas en contacto con un disolvente o mezcla de disolventes adecuados. Posteriormente, la mezcla se somete a procesos de calentamiento, ultrasonidos, agitación, etc., a las condiciones más óptimas, con la finalidad de romper las interacciones de plaguicida-matriz permitiendo la extracción cuantitativa del analito de interés y sin la presencia de interferentes.
- **Extracción en fase sólida (EFS).** Este procedimiento consiste en hacer pasar la muestra de fase líquida o gaseosa a través de un cartucho relleno con un adsorbente sólido, de forma que los analitos quedarán retenidos en él y podrán ser eluidos posteriormente con un disolvente apropiado. En este proceso se busca la eliminación de interferencias reteniendo los analitos de interés en la fase sólida, pasando otras especies constituyentes de la muestra que pueden actuar como interferentes, pero también se podría dar el caso contrario: retener los interferentes y no los analitos. Los factores que influyen en la eficiencia del proceso de EFS son la capacidad del adsorbente y la retención de los analitos en él, existe una amplia gama de adsorbentes como las sílices enlazadas químicamente con cadenas alquílicas (C-18, C-8) o grupos polares (-CN, -NH₂), polímeros porosos (estireno-divinilbenceno), Florisil (silicato de magnesio activado), entre otros. Las interacciones analito-adsorbente están basadas en enlaces hidrógeno, interacciones polares o no polares, intercambio aniónico o catiónico, y exclusión por tamaño. En comparación con la ELL la EFS es más selectiva, reproducible, con un gasto bajo de disolventes, pero debido a que hay que filtrar la muestra previamente a su paso por el

cartucho, se puede tener una pérdida considerable de analito (Robles, 2014).

- **Microextracción en fase sólida (MEFS).** La MEFS es un método de extracción en el cual tanto la cantidad de muestra consumida como el extracto producido son pequeñas. El equipo básico empleado en MEFS es simple. Consta de una fibra de sílica fundida, recubierta de un polímero adsorbente (fase estacionaria) en el cual los analitos son adsorbidos. Para protección, ésta es montada dentro de un tubo de acero inoxidable, que semeja el mecanismo de una jeringa. Durante el proceso de extracción, la fibra es expuesta en la matriz acuosa, donde ocurre el equilibrio de los analitos entre la fase acuosa y la fase estacionaria (FAO, 1993).
- **Extracción sólido-líquido asistida por ultrasonido.** La extracción asistida por ultrasonido es una alternativa de bajo costo, sencilla y eficiente en comparación con las técnicas convencionales de extracción sólido-líquido (ESL). Las principales ventajas del ultrasonido en la ESL incluyen el aumento del rendimiento de la extracción, tiempo y asegura que no se dañe la estructura de los extractos. A diferencia de otros equipos que asisten la extracción el ultrasonido es un equipo barato y que se puede emplear con una amplia gama de disolvente (García S. et al, 2010).

b. Etapa determinativa

La técnica más empleada para el análisis de plaguicidas es la cromatografía tanto de gases como de líquidos. Es importante señalar que en los laboratorios donde se aplican métodos para el análisis de plaguicidas tienen la responsabilidad realizar la validación del método utilizado. Existen métodos reportados que sugieren la determinación 2,4-D y picloram por CG, sin embargo ambos herbicidas no son volátiles y una

etapa de derivatización debe llevarse a cabo, para evitar este paso se realizó la detección directa de estos herbicidas por CLAR en fase reversa con detección ultravioleta.

Para llevar a cabo la separación cromatográfica hay que tomar en cuenta factores que la afectan como las características espectroscópicas del analito, tiempo de retención, pH y composición de la fase móvil.

4. Validación de métodos cromatográficos

La validación de un método se puede interpretar como el proceso que demuestra mediante evidencia consistente que el método analítico empleado cumple con los requisitos previstos para el uso y aplicación de este (EMA, 2017).

El desarrollo de pruebas e investigación en cuestiones importantes que afectan a la sociedad como sanidad, alimentación, construcción, ambiente, etc..., se apoya, de alguna manera, en el trabajo analítico por lo que es importante llevar a cabo de manera correcta estas mediciones en dichas pruebas. El validar un método no solo brinda beneficio a quien lo aplica, ya que al ser confiable, cualquier decisión basada en él, puede ser tomada con confianza, sino también a quien desarrolla dicho método, ya que proporciona un conocimiento claro sobre los detalles prácticos del proceso (Morillas P. et al, 2016).

Diferentes organismos europeos y de Estados Unidos relacionados con las buenas prácticas de laboratorio como la FDA (Administración de Alimentos y Drogas), la Pharmacopeia Convention de los Estados Unidos, la Asociación de Salud Pública Americana, la IPAC (Unión Internacional de Química Pura y Aplicada) y Eurachem/CITAC (A focus for analytical chemistry in Europe /Co-Operation International Traceability in Analytical Chemistry) entre otros (García García, 2014), han sido la base de diversos protocolos de validación de métodos, los cuales son detallados de

recomendaciones. Sin embargo, a pesar de tener estas referencias no existen un procedimientos específicos para llevar a cabo la validación, ya que el alcance de esta depende del método analítico empleado (Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos, 2001; Magnusson, 2014)

El procedimiento de los ensayos varía de acuerdo a las determinaciones que se quieren evaluar. Considerando esto, es lógico que diferentes métodos requieran diferentes esquemas de validación en la Tabla 10 se muestran los parámetros que deben ser determinados según el tipo de ensayo empleado (García García, 2014).

Tabla 10. Evaluación de parámetros según el tipo de ensayo

Parámetros de desempeño	Tipo de ensayo				
	A	B	C	D	E
Sensibilidad analítica	✓	✓	✓	✓	
Límite de detección	✓	✓			
Límite de cuantificación	✓	✓	✓	✓	✓
Linealidad e intervalo de trabajo	✓	✓	✓	✓	✓
Veracidad	✓	✓	✓	✓	✓
Precisión y repetibilidad	✓	✓	✓	✓	✓

(García García, 2014). A. Espectrofotométrico, B. Cromatográfico, C. Potenciométrico, D. Volumétrico y E. Gravimétrico

Parámetros a validar en un método cromatográfico

Un método cromatográfico puede ser tanto cualitativo como cuantitativo. A continuación se describen los parámetros de desempeño que comúnmente se obtienen para un método cromatográfico cuantitativo según la *Guía de adecuación al uso de los métodos Analíticos Eurachem* 2016:

- **Intervalo de trabajo e intervalo lineal.** Para cualquier método cuantitativo es necesario determinar el intervalo de concentraciones del analito o los valores de la propiedad relacionada, sobre los cuales el método puede aplicarse. Dentro del intervalo de trabajo existe el

intervalo lineal, en el cual la señal de respuesta tendrá una relación lineal con la concentración del analito.

- **Sensibilidad analítica.** Es la variación de la respuesta del instrumento que corresponde a una variación de la magnitud medida.
- **Límite de detección.** La concentración más baja del analito que puede ser detectada por el método a un nivel de confianza especificado.
- **Límite de cuantificación.** Es la concentración más baja del analito que puede ser determinada con un nivel aceptable de precisión y veracidad. Este parámetro marca la habilidad del proceso de medición para cuantificar adecuadamente de analito
- **Precisión** es una medida de cuan cerca están los resultados entre sí. Por lo general, se expresa mediante parámetros estadísticos que describen la propagación de los resultados, típicamente la desviación estándar (desviación estándar relativa), calculada a partir de los resultados obtenidos mediante la realización de mediciones repetidas en un material adecuado en condiciones específicas. “repetibilidad de medición” y “reproducibilidad de medición” representan las dos medidas de precisión que se pueden obtener.
- **Veracidad.** Es una expresión de la proximidad de la media de un número infinito de resultados (producidos con el método) a un valor de referencia. Puesto que no es posible realizar un número infinito de mediciones, no se puede medir la veracidad. Sin embargo, podemos realizar una evaluación práctica de la veracidad. Por lo general, esta evaluación se expresa cuantitativamente en términos de la recuperación relativa (recobro en este trabajo).

II. Parte experimental

5. Reactivos, disolventes, materiales y equipos

5.1 Reactivos y disolventes

Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), Chem Service, pureza del 99.5%

Picloram, Chem Service, pureza del 98.6%

Ácido acético glacial, J.T Baker, pureza del 99.7%

Ácido sulfúrico, Meyer, concentrado

Agua nanopura (Tipo I)

Acetonitrilo (ACN), J.T. Baker, grado cromatográfico

Metanol (MeOH), Honeywell, grado cromatográfico

NaOH, J.T Baker, concentrada

5.2 Materiales, accesorios y consumibles de equipos

Micropipetas Pippet-Lite XLS de capacidad variable (20-200 μL , 100 - 1000 μL , 500-5000 μL)

Viales de vidrio, Supelco con tapa (4, 8, 12, 20 y 28 mL)

Probetas (100 y 1000 mL)

Pipetas volumétricas (2, 10 y 25 mL)

Vasos de precipitados (10, 25 y 100 mL)

Matraces volumétricos (5, 10, 25 y 250 mL)

Matraces Erlenmeyer de 250 mL

Barras magnéticas de distintos tamaños

Columna Hypersil Gold C₁₈ de 150 x 4.6 mm

Microjeringa Hamilton (100 μL)

Celdas de vidrio para ultravioleta, Varian

Espátula de acero inoxidable

Varilla de vidrio

Canastillas de aluminio

Pinzas para crisol

Desecador con sílica gel

Tubos de centrífuga de vidrio Kimax de 50 mL

Jeringas de plástico de 60 mL

Swinnex

Membranas de nylon de 0.22 μm

5.3 Equipos

Agitador orbital

Balanza Semianalítica Sartorius

Balanza analítica Sartorius modelo 1416MP8

Baño ultrasónico Branson

Centrifuga Damon/IEC Division

Controlador Water Automated Gradient Controller, modelo 680

Detector de Ultravioleta-Visible, SpectraFocus de Thermo Separation Products

Espectrofotómetro UV-VIS CARY3E, Varian

Mufla

Parrilla de agitación

Potenciómetro Beckman

Refrigerador General Electric

Sistema de agua Nanopure modelo D4741

Sistema de bombeo Waters 410

5.4 Preparación de disoluciones

Disolución de ácido acético (AcOH) (\approx pH 4.88). Se preparó la disolución de ácido acético de concentración 0.01 M y se ajustó el pH con NaOH hasta obtener un pH \approx de 4.88.

Preparación de la fase móvil (ACN: dis AcOH, 40:60). Para preparar 300 mL de la fase se mezclan 180 mL de ACN con 120 mL de la dis. AcOH.

Para el método analítico propuesto se utilizaron varias disoluciones, las cuales fueron preparadas a partir de disoluciones los estándares de 2,4-D y picloram, preparadas en MeOH grado cromatográfico. Las disoluciones se almacenaron en viales y se mantuvieron en refrigeración (4 °C).

Stock de 2,4-D 100 mg/L. Se disolvieron 0.00251 g de 2,4-D en 10 mL de MeOH, para después llevar al aforo en un matraz volumétrico de 25 mL con el mismo disolvente. Esta disolución se conserva en refrigeración.

Stock de picloram 100 mg/L. Se disolvieron 0.00252 g de picloram en 10 mL de MeOH, para después llevar al aforo en un matraz volumétrico de 25 mL con el mismo disolvente. Esta disolución se conserva en refrigeración.

Stock de 228 mg/L de 2,4-D y picloram. Se disolvieron 0.00572 g de 2,4-D y 0.00576g de picloram en 10 mL de MeOH, para después llevar al aforo en un matraz volumétrico de 25 mL con MeOH. Esta disolución se conserva en refrigeración.

Stock de 242 mg/L de 2,4-D y picloram. Se disolvieron 0.00605 g de 2,4-D y 0.00607 g de picloram en 10 mL de MeOH, para después llevar al aforo en un matraz volumétrico de 25 mL con MeOH. Esta disolución se conserva en refrigeración.

6. Experimentación

6.1 Desarrollo del método

6.1.1 Obtención de los espectros de Uv-Vis de 2,4-D y picloram

Se realizó un barrido entre 200 y 800 nm para obtener el espectro de absorción de cada herbicida, esto se realizó con una disolución estándar de 20 mg/L de cada uno.

6.1.2 Optimización de la separación

Los análisis cromatográficos se llevaron a cabo con la columna Hypersil Gold C₁₈ de 150x4.6 mm y un sistema de bombeo Waters 410 con un controlador Water Automated Gradient Controller acoplados a un detector Ultravioleta-Visible, Spectra Focus Thermo separation Products, a una longitud de onda de 280 nm para 2,4-D y de 254 nm para picloram, con un loop de capacidad de 20 μ L.

Para poder determinar el tiempo de retención (tr) y la composición de la fase móvil adecuada para tener una buena separación de los analitos, fue necesario trazar la curva del logaritmo del factor de retención k' en función del porcentaje del disolvente orgánico en este caso ACN. Esto se realizó partiendo de una composición 50:50 (ACN: dis. AcOH) con la cual se acondiciono por una hora a flujo 1.5 mL/min para obtener una línea base estable, posteriormente se inyectaron 20 μ L de la disolución de cada uno de los analitos en concentración de 20 mg/L, configurando el detector

a su respectiva longitud de onda y con un tiempo de corrida de 20 min. Una vez distinguidas las señales se varió la composición de la fase móvil 35:65, 40:60, 45:55, y 55:45 (ACN: dis AcOH), y se repitió el procedimiento descrito con cada una.

6.1.3 Análisis de 2,4-D y picloram por CLAR

El análisis final para todos los análisis cromatográficos subsecuentes se llevaron a cabo con la columna Hypersil Gold C₁₈ de 150x4.6mm y un sistema de bombeo Waters 410 con un controlador Water Automated Gradient Controller acoplados a un detector Ultravioleta-Visible, Spectra Focus Thermo separation Products, a una longitud de onda de 280 nm para 2,4-D y de 254 nm para picloram, con un loop de capacidad de 20 µL. Fase móvil ACN:dis. AcOH, 40:60 a flujo de 1.5 mL/min.

6.2 Validación del método analítico

Se obtuvieron los siguientes parámetros de validación: linealidad, sensibilidad analítica, límite de detección (LDD) y límite de cuantificación (LDC), precisión (repetibilidad y reproducibilidad) y veracidad (como recobro), y se hizo la confirmación en matriz. En la Tabla 11 se resume el plan de validación y los criterios de aceptación correspondientes.

6.2.1 Linealidad y sensibilidad analítica

Se prepararon ocho niveles de concentración en un intervalo de 2.5-9.5 mg/L de 2,4-D y picloram a partir del stock de 100 mg/L, de acuerdo a lo indicado en la Tabla 12, se prepararon curvas independientes.

Tabla 11. Resumen del plan de validación

Parámetro	Analizar	Obtener	Criterio
Intervalo lineal	Preparar disoluciones para una curva de calibración a partir de un estándar. Se incluye un blanco y 5-8 niveles de concentración. Realizar el ensayo por triplicado. Leer el blanco. Leer las disoluciones estándar. Realizar el ajuste de la curva por mínimos cuadrado de la respuesta del equipo en función de la concentración del analito	Coefficiente de regresión (r^2)	$r^2 \geq 0.98$
Sensibilidad Analítica		Pendiente= m	El intervalo de confianza de la pendiente no debe incluir al cero
Límite de detección (LDD) y de cuantificación (LDC)	Se prepararon y midieron 6 disoluciones independientes del nivel concentración más bajo de la curva de calibración	$LDD = \frac{3s}{m}$ $LDC = \frac{6s}{m}$ <p>s es la desviación estándar de la medición instrumental del analito m es el valor de la pendiente obtenida por la curva de calibración</p>	LDC debe ser menor la concentración más baja del intervalo lineal y el LDD más bajo que el LDC
Veracidad como % Recobro	Se prepararon y analizaron 6 disoluciones independientes del nivel de concentración al punto medio de la curva de calibración	$\%R = \left(\frac{C_{obtenida}}{C_{esperada}} \right) * 100$	98-102% con una DER $\leq 2\%$
Repetibilidad	Se prepararon y analizaron 6 disoluciones independientes del nivel de concentración al punto medio de la curva de calibración		
Reproducibilidad	Se prepararon y analizaron 6 disoluciones independientes del nivel de concentración al punto medio de la curva de calibración. En periodos de tiempo diferentes	Desviación estándar relativa	DER $\leq 2\%$
Confirmación En matriz	Aplicar el procedimiento de extracción a una muestra de suelo adicionada, a 3 niveles de concentración. Por triplicado obtener la repetibilidad, el recobro y la curva $Concentración recuperada = f(cantidad adicionada)$.	Coefficiente de regresión (r^2) y la pendiente DER y recobro	$r^2 > 0.98$ El Intervalo de confianza de la pendiente debe incluir la unidad Recobro $100 \pm 20\%$ con una DER $\leq 20\%$ Repetibilidad DER $\leq 20\%$

Tabla 12. Preparación de los niveles de la curva de calibración

<i>Concentración de analito (mg/L)</i>	<i>Alícuota del Stock de 100 mg/L (µL)</i>
2.5	250
3.5	350
4.5	450
5.5	550
6.5	650
7.5	750
8.5	850
9.5	950

6.2.2 Límite de cuantificación y límite de detección

En este caso se realizó la medición de seis disoluciones preparadas de forma independiente del valor de concentración más bajo del intervalo de trabajo que corresponde a 2.5 mg/L.

6.2.3 Precisión y veracidad

Para evaluar la repetibilidad y veracidad (como recobro) del método se analizaron, seis disoluciones independientes de concentración 5.5 mg/L. Para evaluar la reproducibilidad se repitió este procedimiento en un periodo de tiempo diferente.

6.3 Optimización y validación del método de extracción

6.3.1 Extracción sólido-líquido asistida por ultrasonido

Se tomó como base la secuencia de extracción propuesta por Eduardo de Gerónimo y colaboradores (de Gerónimo et al, 2015), con ajustes en el volumen de extractantes y la cantidad de suelo. Sin embargo, se mantuvieron los tiempos de agitación, de extracción asistida por ultrasonido y las condiciones de centrifugación.

El procediendo para la extracción de los herbicidas, 2,4-D y picloram para su análisis cromatográfico se muestra en la Figura 4.

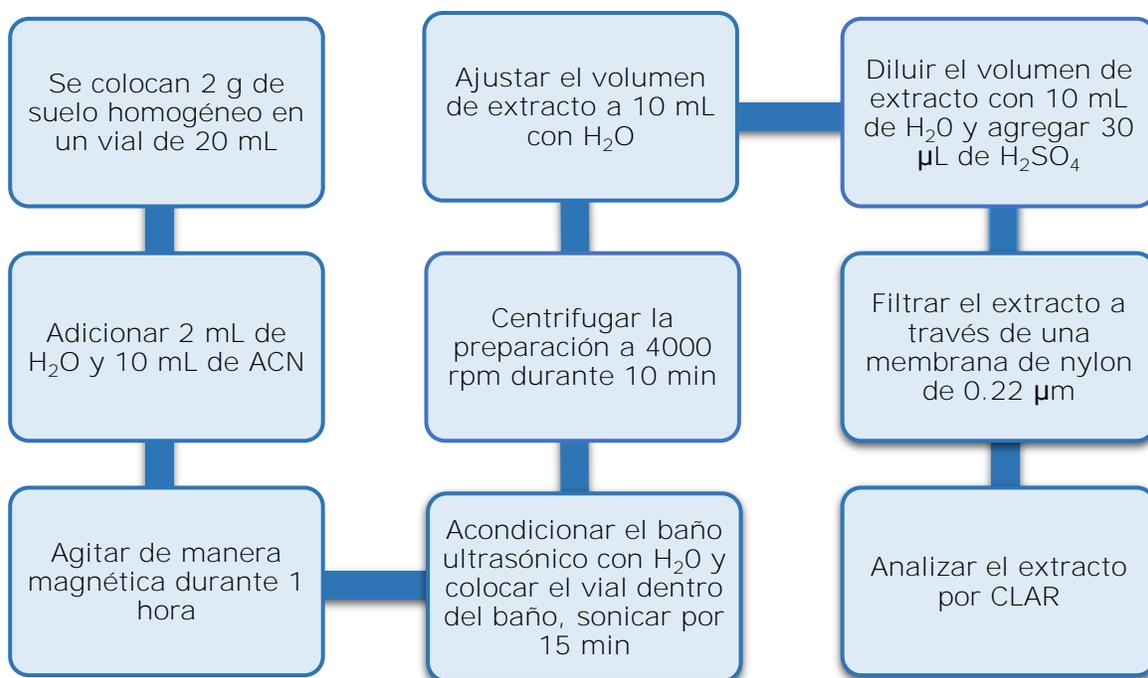


Figura 4. Procedimiento optimizado de extracción de 2,-D y picloram en suelo

6.3.2 Confirmación en matriz

Para confirmar el método en la matriz, se aplicó el procedimiento descrito anteriormente a una muestra de suelo adicionada, a 3 niveles de concentración: 15, 33 y 57 mg plaguicida/por kg de suelo.

Estas pruebas se hicieron por triplicado de forma independiente. Los extractos finales fueron analizados en CLAR como se describe en 6.1.3.

Se obtuvieron la repetibilidad, el recobro y la curva $Concentración\ recuperada = f(cantidad\ adicionada)$.

6.4 Aplicación a muestras ambientales

6.4.1 Muestreo

El muestreo se realizó en el mes de octubre del 2016 en Molango de Escamilla, Hidalgo, el cual presenta un clima semi-cálido en época de

verano y semi-frío en invierno ambos con lluvias regulares por lo que la flora es muy densa en la región y en su mayoría el suelo es aprovechado para su uso agrícola, principalmente para sembrar maíz.

Los trabajos de campo se llevaron a cabo en las localidades de Tlanchinol, Lolotla, Molango, Xochicuatlan, Ixtlahuaco, Naopa y Chiconcuac en donde se obtuvieron doce muestras donde se sospecha que se podría detectar 2,4-D y picloram.

6.4.2 Preservación de muestras y preparación

En el laboratorio las muestras identificadas con claves, se envasaron para evitar la contaminación exterior así como cualquier alteración y se mantuvieron en refrigeración (4 °C) para evitar la pérdida de los analito.

6.4.3 Parámetros (pH y humedad)

pH. Fueron medido de acuerdo a lo descrito en el método EPA 9045D Soil and waste. Para realizar la medición se pesaron 20 g de muestra a la cual se agregaron 20 mL de agua, se colocaron en agitador orbital por 5 min y se dejó sedimentar por una hora para realizar la medición con el electrodo por duplicado.

Humedad. Este procedimiento está basado en lo propuesto en la NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004. Se pesó la canastilla de aluminio donde se colocaron posteriormente ~ 2g de la muestra de suelo y se registró el peso a continuación se colocaron en el horno de calentamiento y se dejaron secar a 105°C. Durante su periodo de enfriamiento se colocaron en un desecador y finalmente se pesó la canastilla con la muestra y se registró el peso, este procedimiento se realizó por duplicado para cada muestra. Así para las doce muestras. El porcentaje de humedad se calculó de la siguiente manera:

$$\%Humedad\ de\ la\ muestra\ (\%H) = \frac{A - B}{A} \times (100)$$

Donde

A= Peso de la muestra con humedad de campo (g)

B=Peso de la muestra seca (g)

6.4.4 Determinación de plaguicidas por CLAR

Para la extracción y análisis se agruparon en lotes de 12 muestras, cuando fue posible se analizaron de forma duplicada y adicionada tal como se indica en la Tabla 13., cada lote llevo como control de calidad un blanco y un blanco adicionado. En el caso del blanco el procedimiento de extracción se aplicó pero sin muestra de suelo al igual que al blanco fortificado, a este último fue agregada una alícuota de 500 µL del estándar de la mezcla de los analitos a 242 mg/L. La extracción se realizó como se describe en 6.3 y los análisis por CLAR bajo las condiciones cromatografías ya establecidas. En la Figura 5 se ilustra el procedimiento experimental.

Tabla 13. Muestras analizadas

<i>N.</i>	<i>Muestra</i>	<i>Duplicada</i>	<i>Adicionada</i>
1	628-16	x	x
2	629-16	x	x
3	630-16	x	x
4	631-16	x	x
5	632-16	x	x
6	633-16	x	x
7	634-16	x	x
8	635-16		x
9	636-16	x	
10	637-16		x
11	638-16	x	x
12	639-16	x	x



Figura 5. Procedimiento de la preparación de las muestras de suelo

III. Análisis de resultados y discusión

El presente apartado analiza los resultados del proceso de validación, criterios de aceptación los cuales hacen referencia a que tan óptimo es el método empleado y también al determinar características fisicoquímicas cuantificables de los plaguicidas como el coeficiente de partición nos da información del comportamiento de los plaguicidas en el ambiente.

7. Desarrollo del método

7.1 Espectros de Uv de 2,4-D y picloram

Los espectros de los herbicidas se obtuvieron con el espectrofotómetro UV-VIS Varian, modelo CARY3E, en los cuales se confirmó la longitud de onda para efectuar la cuantificación por CLAR del 2,4-D a 280nm y para picloram a 254 nm, Figura 6, en ambos casos al **monitorear a esta λ** se obtienen líneas base más estable, debido al cut-off de la fase móvil.

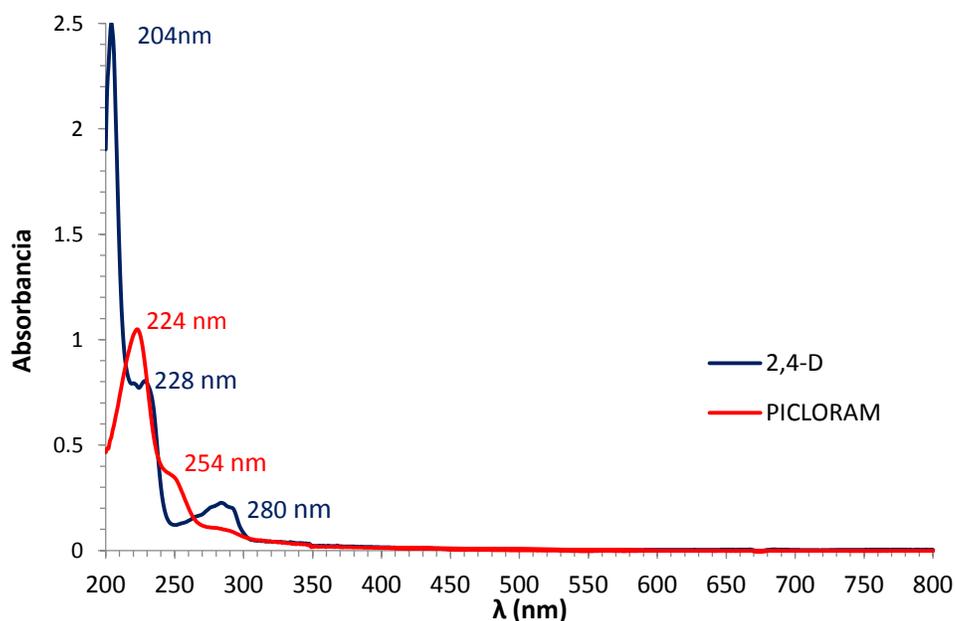
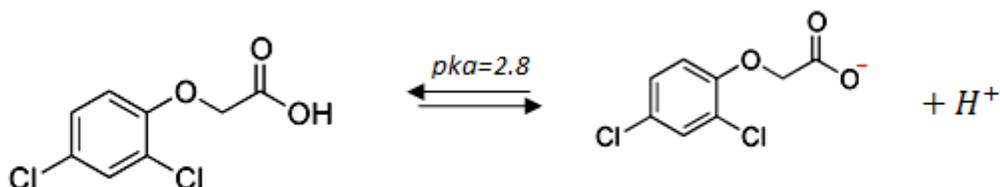


Figura 6. Espectros de ultravioleta-Vis de los herbicidas de estudio

7.2 Optimización de la separación

Para este paso del desarrollo analítico fue importante tomar en cuenta la polaridad de los analitos. Cuando se trabaja en fase reversa entre más no polar sea una analito mayor será su retención. En el caso de 2,4-D y picloram, ambas son especies polares con propiedades ácido-base, Figura 7, por lo que es importante asegurar que cada analito se encontrara en una sola forma durante el proceso de separación cromatográfico: molecular (FM) o iónica (FI). Para conocer el pH que nos asegurara que los plaguicidas se encontraban en su forma iónica se trazaron los diagramas de abundancia relativa de estos compuestos, Figura 8; en ellos se observa que para esto se debe trabar con un pH ácido de 4 o mayor donde las especies se encuentran en su forma iónica. Para asegura esto uno de los componentes de la fase móvil es una disolución acuosa de ácido acético de pH de ≈ 4.88 .

a. 2,4-D



b. Picloram

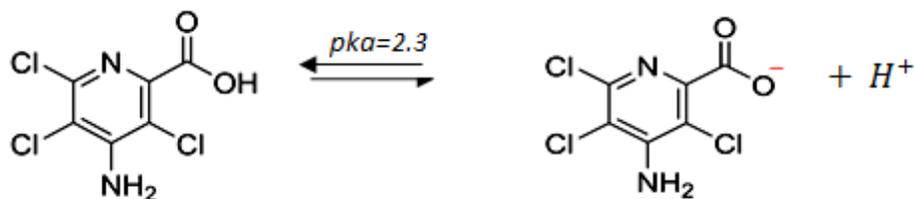


Figura 7. Equilibrios ácido-base: a)2,4-D y b)picloram

A partir de la experimentación descrita en 6.1.2, se obtuvieron los parámetros de retención Tabla 14. El factor de retención en cada caso se calculó con la siguiente ecuación:

$$k' = \frac{t_r - t_m}{t_m}$$

Donde:

k' es el factor de retención

t_m es el tiempo muerto

t_r es el tiempo de retención del analito

Con los resultados obtenidos se trazó la curva $\log k' = f(\% \text{ ACN})$, Figura 9.

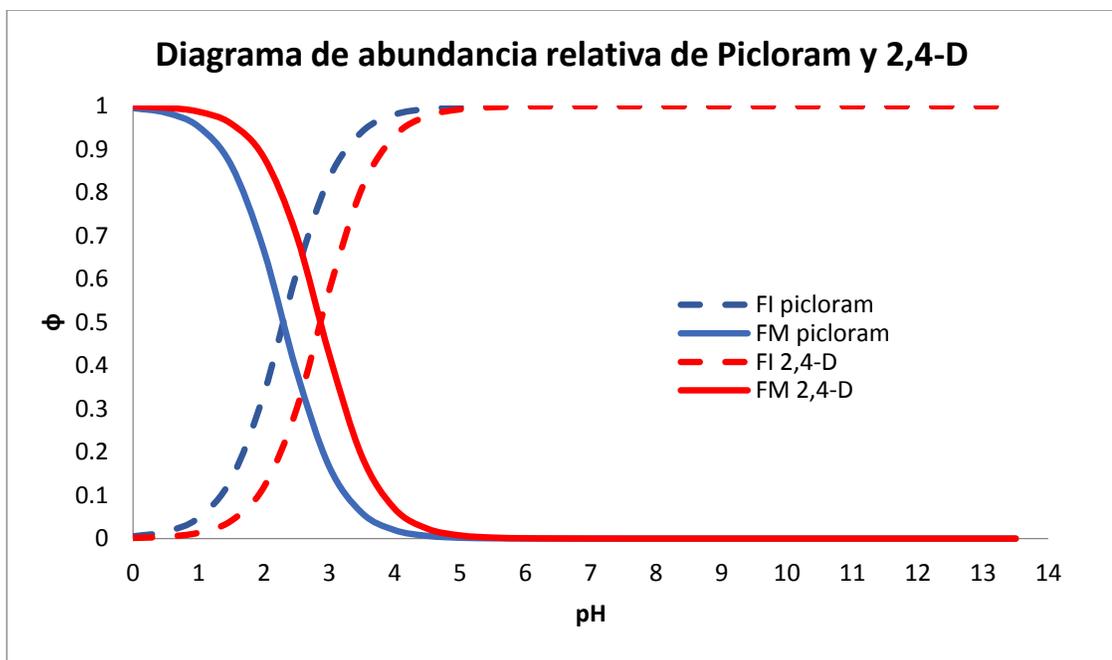


Figura 8. Diagramas de abundancia relativa de los herbicidas de estudio

Tabla 14. Parámetros de retención de los analitos

%ACN	t_m	2,4-D			Picloram		
		tr	k'	$\log k'$	tr	k'	$\log k'$
35	1.2	8.413	6.01	0.78	1.978	0.65	-0.19
40	1.2	6.171	4.14	0.62	1.754	0.46	-0.34
45	1.2	3.722	2.10	0.32	1.575	0.31	-0.51
50	1.2	2.803	1.34	0.13	1.523	0.27	-0.57
55	1.2	2.083	0.74	-0.13	1.473	0.23	-0.64

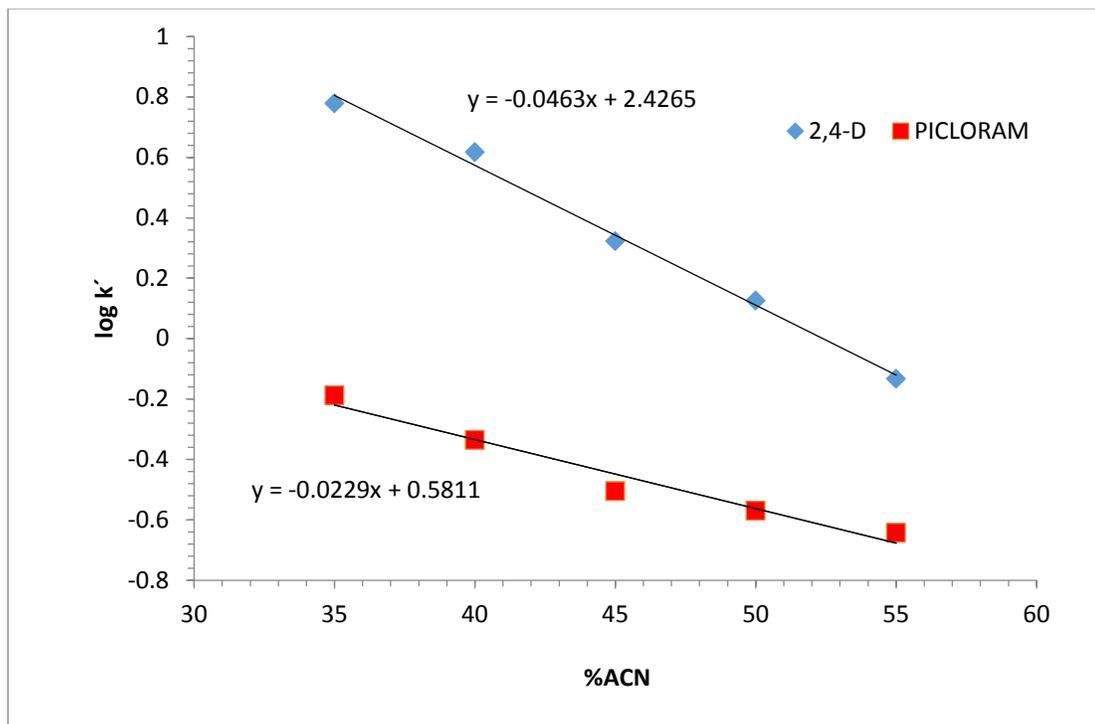


Figura 9. Curvas $\log k' = f(\% \text{ ACN})$

Con base en lo mostrado en la Tabla 14, se seleccionó la proporción de la fase móvil en ACN: dis. AcOH, 40:60 v/v debido a que con esta proporción el tiempo de retención de cada analito es satisfactorio ya que no se encuentra tan cercano al tiempo muerto, ni el análisis es tan prolongado en comparación a otras proporciones. Cabe resaltar que en caso de picloram dada su alta polaridad, hay muy poca retención y es el primer analito en eluir.

Adicionalmente por medio de esta experimentación se obtuvieron los valores de de K_w . El factor de retención en agua, K_w , de una sustancia está relacionado con su capacidad de adsorción o su potencial para bioconcentrarse en tejidos grasos. Un valor bajo de K_w indica la probable movilidad y transporte de ese material por su buena solubilidad, y fácil metabolización y biodegradación, es decir, hay que esperar una escasa bioacumulación. Por el contrario, un valor alto de K_w indica posible

adsorción en tejidos grasos, suelo y sedimentos. Por tanto, es probable la bioconcentración o bioacumulación. Su escasa movilidad favorece la toxicidad de estas sustancias.

Dichos valores se obtuvieron del cálculo de la ordenada al origen del gráfico de $\log k' = f(\% \text{ ACN})$, Figura 9 trazada a partir de los datos experimentales de la Tabla 14 de cada plaguicida. En el caso de picloram se obtuvo un valor de $\log K_w$ de 0.58 y 2,4-D de 2.42. De acuerdo con la Tabla 15 (Miliarium, 2008), que muestra los valores de $K_{o/w}$ (equiparables con K_w), el picloram es un compuesto con un potencial de acumulación muy bajo en los tejidos grasos, y el 2,4-D es de baja potencialidad.

Tabla 15. Clasificación de la afinidad del plaguicida por tejidos grasos animales según su valor de $\log K_{o/w}$

Valor de $\log K_{o/w}$	Afinidad por los tejidos grasos animales
> de 5	Muy alta
3,5 a 5	Alta
3 a 3,5	Media
1 a 3	Baja
< de 1	Muy baja

A la composición seleccionada los tiempos de retención para los analitos son 1.75 min para picloram y 6.17 min para 2,4-D, como se muestra el cromatograma de la Figura 10, lo cual facilitó la validación del método, ya que para los análisis posteriores se manejaron tiempos de corrida de máximo 10 min.

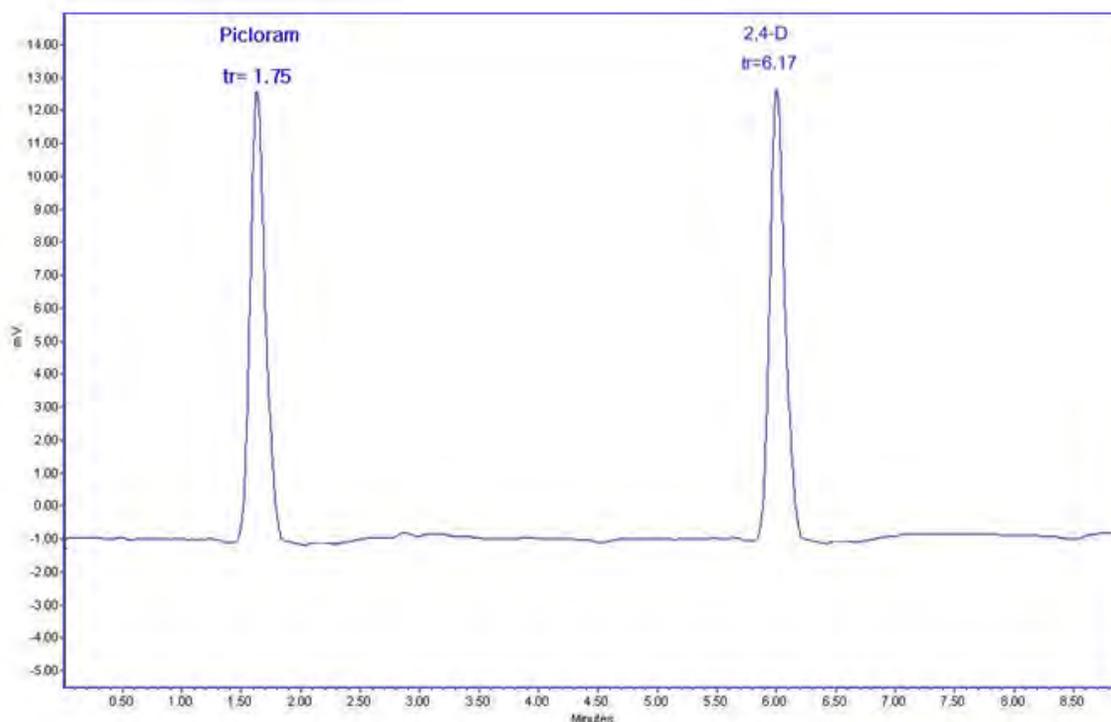


Figura 10. Cromatograma de la separación de picloram y 2,4-D, optimizada

8. Validación del método analítico

Para validar el método se obtuvieron los siguientes parámetros de desempeño: intervalo lineal, precisión (repetibilidad y reproducibilidad), veracidad (como recobro), límite de detección (LDD) y límite de cuantificación (LDC) y se realizó la confirmación en matriz. Los cuales se discuten a continuación. Se tomaron como referencia el documento de *Eurachem La Adecuación al Uso de los Métodos Analíticos* (Magnusson, 2014) y la *Guía de validación de métodos analíticos editada por el Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos* (Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos, 2001).

8.1 Linealidad y sensibilidad analítica

A continuación se muestran los resultados de la evaluación de la linealidad y sensibilidad, para obtener estos parámetros se trazaron las curvas (de unidades de área vs concentración) para 2,4-D y picloram con un intervalo de concentraciones de 2.5 a 9.5 mg/L para ambos plaguicidas, Figuras 11 y 12 respectivamente, en las cuales se observa un comportamiento lineal de la respuesta analítica en función de la concentración.

Mediante un análisis de regresión lineal por el método de mínimos cuadrados, efectuado en Excel, se obtuvieron los parámetros de regresión mostrados en la Tabla 16, donde el coeficiente de regresión obtenido en 2,4-D de 0.992 y 0.993 para picloram cumplen con el criterio de aceptación para el intervalo de lineal de que este valor sea ≥ 0.99

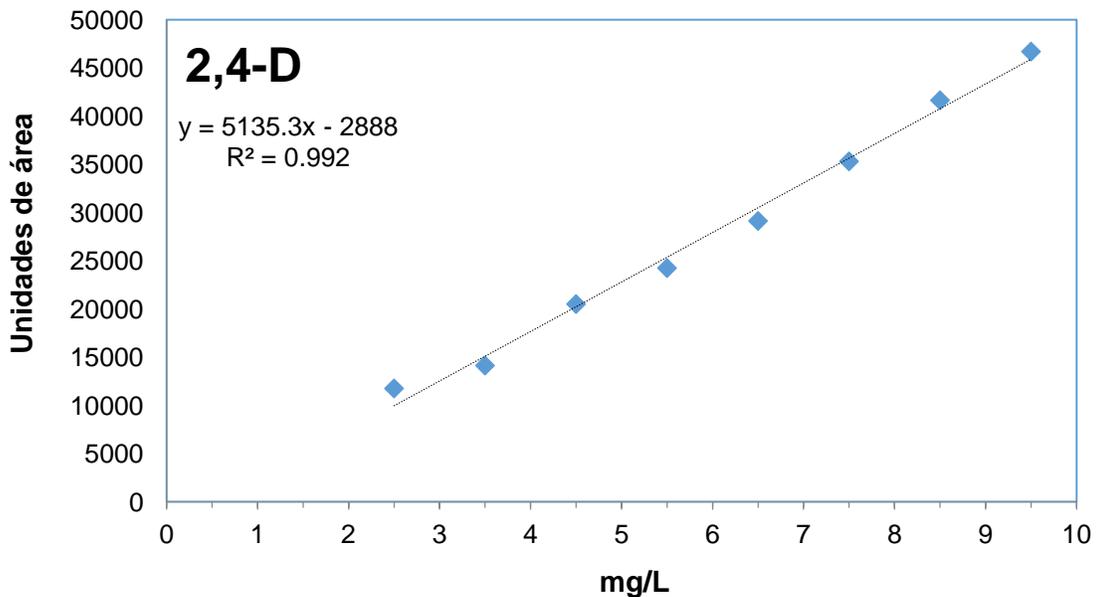


Figura 11. Curva de calibración promedio de 2,4-D

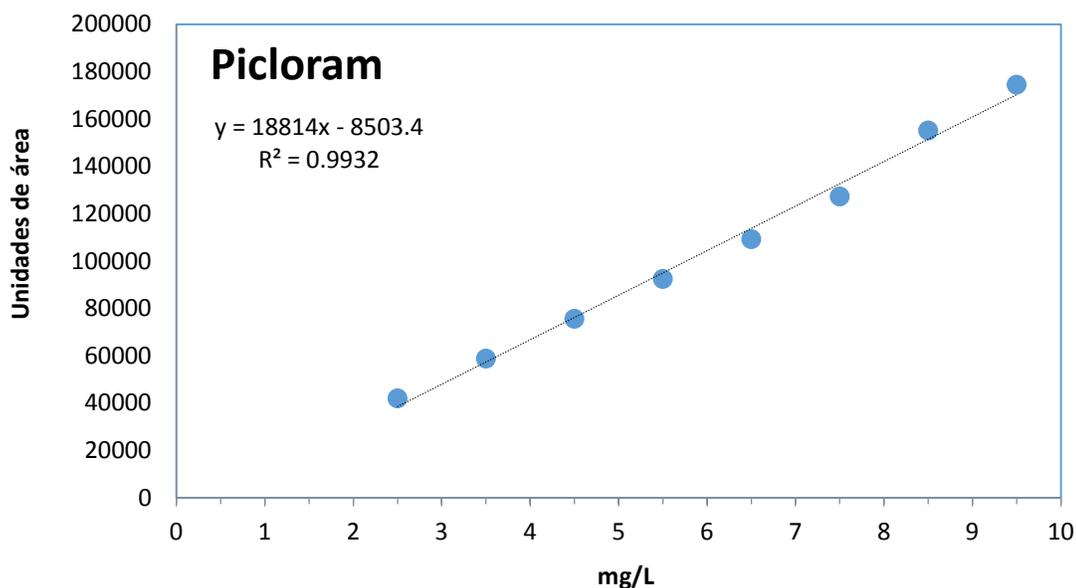


Figura 12. Curva de calibración promedio de picloram

Tabla 16. Estadística de regresión

Parámetro	2,4-D		Picloram		Criterio de aceptación*
Intervalo lineal (mg/L)	2.5-9.5		2.5-9.6		
Centro de gravedad	6		6		
	Cuentas de área				
	27924		104383		
Coefficiente de correlación r	0.9960		0.9966		≥ 0.99
Coefficiente de determinación r^2	0.9920		0.9932		≥ 0.98
Intervalos de confianza al 95 %	Inferior	Superior	Inferior	Superior	
Sensibilidad analítica (m, en mg/L)	4676	5595	17260	20369	No debe incluir al cero
Ordenada al origen	-5839	63	-18488	1481	Debe incluir al cero

* *Criterios de* (Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos, 2001)

8.2 Límites de detección y de cuantificación

Para calcularlos se analizaron una serie de seis disoluciones de la concentración conocida 2.5 mg/L (que corresponde al valor de concentración más bajo establecido en el intervalo lineal). Los límites de detección y cuantificación se muestran en la Tabla 17.

Tabla 17. Límites detección y cuantificación

<i>N.</i>	<i>mg/L</i>	<i>2,4-D</i>	<i>Picloram</i>
1	2.5	10662	42295
2	2.5	10886	40671
3	2.5	10537	41152
4	2.5	10872	42223
5	2.5	10695	41062
6	2.5	10601	40283
Media (mg/L)		10708.8	41281.0
s		142.5	818.3
DER		1.3	2.0
LDD (mg/L)		0.08	0.16
LDC (mg/L)		0.17	0.33

Como criterios de aceptación se estableció que LDC debe ser menor la concentración más baja del intervalo lineal y el LDD más bajo que el LDC. Como se puede apreciar ambos límites cumplen con los criterios establecidos, y permite cuantificación de los analitos a niveles de trazas.

8.3 Precisión y veracidad

La repetibilidad y la veracidad (como recobro), fueron evaluados a partir de los resultados del análisis de 6 disoluciones estándar de 2,4-D y picloram a 5.5 mg/L. A partir de ellos se calculó la desviación estándar relativa y el porcentaje de recobro. Para evaluar la precisión intermedia se efectuaron los mismos análisis en día separados. En la Tabla 18 se muestran los resultados para 2,4-D y en la 19 para picloram. Los criterios de aceptación establecidos son:

- Recobro 98-102% con una DER ≤ 2 %
- Repetibilidad DER ≤ 2 %
- Repetibilidad intermedia DER ≤ 2 %

Tabla 18. Precisión y recobro en 2,4-D

N.	mg/L	Día 1		Día 2
		mg/L	Recobro (%)	mg/L
1	5.5	5.6	102.2	5.6
2	5.5	5.5	99.6	5.6
3	5.5	5.7	102.9	5.6
4	5.5	5.6	101.6	5.5
5	5.5	5.6	101.6	5.5
6	5.5	5.6	101.6	5.5
Media(mg/L)		5.6	101.6	5.6
s		0.06	1.11	0.1
DER (%)		1.1	1.1	1.0
Repetibilidad intermedia (Estadísticos de los dos días)				
Media (mg/L)		5.6		
s		0.06		
DER (%)		1.1		

En el caso de 2,4-D se obtuvo un recobro cercano al 100% en ambos días de análisis y una DER intermedia $\leq 2\%$ de 1.1% podemos decir que la metodología empleada para la detección de este analito es exacta y repetible al cumplir con los criterios de aceptación referidos.

Tabla 19. Precisión y recobro en Picloram

N.	Concentración	Día 1		Día 2
		mg/L	Recobro (%)	mg/L
1	5.5	5.5	100.2	5.6
2	5.5	5.5	100.8	5.6
3	5.5	5.4	98.4	5.4
4	5.5	5.6	101.6	5.5
5	5.5	5.6	102.0	5.5
6	5.5	5.5	99.6	5.4
Media (mg/L)		5.52	100.43	5.50
s		0.07	1.31	0.09
DER (%)		1.31	1.31	1.58
Reproducibilidad intermedia (Estadísticos de los dos días)				
Media (mg/L)		5.51		
s		0.08		
DER		1.40		

Tanto el picloram como el 2,4-D cumplen con los criterios de aceptación con un recobro de 100.43% y una DER intermedia $\leq 2 \%$ de 1.40%, así que se puede decir que el método es reproducible y exacto.

8.4 Optimización y validación del método de extracción

8.4.1.1 Extracción sólido-líquido asistida por ultrasonido

Para realizar este procedimiento se fortificó una muestra de suelo con una disolución de una mezcla de 2,4-D y picloram, para quedar en 15, 33 y 57 mg de cada plaguicida por kg de suelo, respectivamente, a las cuales se les aplicó el método de extracción descrito en la sección experimental. A partir de esta experimentación se calculó la repetibilidad como DER y la veracidad como recobro a los tres niveles de concentración.

En cada análisis se buscaron que las señales cromatográficas correspondieran a los tiempos de retención de 2,4-D y picloram, se integraron las señales y con base en estos valores se determinaron las concentraciones correspondientes con la finalidad de obtener el porcentaje de recobro y así determinar que tanto afecta este procedimiento de extracción para determinación y cuantificación de los analitos. En la Tabla 20 indica la repetibilidad y el recobro. Los criterios de aceptación establecidos son:

- Recobro $100 \pm 20 \%$ con una DER $\leq 20 \%$
- Repetibilidad DER $\leq 20 \%$

Como se trata de muestras ambientales esto suelen ser un poco más en comparación con los criterios de validación de la separación cromatográfica.

Tabla 20. Resultados de la confirmación en matriz

Réplica	Nivel de concentración (mg/kg)	2,4-D		Picloram	
		mg/kg	Recobro (%)	mg/kg	Recobro (%)
1	15	17.5	116.9	16.6	110.5
2	15	14.7	97.9	15.5	103.5
3	15	16.2	107.9	19.3	128.7
	Media (mg/kg)	16.1	107.6	17.1	114.2
	s	1.4	9.5	2.0	13.0
	DER	8.8	8.8	11.4	11.4
1	33	33.4	96.0	38.7	117.2
2	33	31.6	105.7	36.1	109.3
3	33	36.3	110.5	39.7	120.2
	Media (mg/kg)	33.8	104.1	38.1	115.5
	s	2.4	7.4	1.9	5.7
	DER	7.0	7.1	4.9	4.9
1	57	54.5	95.6	53.3	93.5
2	57	54.7	96.0	55.7	97.7
3	57	60.2	105.7	58.2	102.2
	Media (mg/kg)	56.5	99.1	55.7	97.8
	s	3.3	5.7	2.5	4.3
	DER	5.8	5.8	4.4	4.4

Con valores de recobro obtenidos a tres niveles diferentes de concentración cercanos al 100% y una DER <20% para ambos analitos presentados en la Tabla 20, demuestra que el método de extracción empleado no genera interferencias y cumple con los criterios de aceptación. En el caso de picloram se obtuvieron recobros poco más altos que 2,4-D, debido a que como se discutió anteriormente el picloram tiene menor capacidad de adsorción que el 2,4-D.

La precisión de la extracción fue evaluada con base en los resultados del recobro obtenidos del análisis de las muestras fortificadas con tres niveles de concentración cada uno preparado y analizados por triplicado, donde la DER para cada nivel de concentración de ambos herbicidas como puede observarse en la Tabla 20 es menor al 20% lo que indica un grado de

precisión aceptable para la detección y cuantificación del 2,4-D y picloram aplicando el método de extracción ya mencionado.

8.4.1.2 Confirmación en matriz

Adicionalmente se trazó la curva *Cantidad adicionada vs Cantidad recuperada* Figuras 14 y 15. En la Tabla 21 se presentan los estadísticos de *Cantidad adicionada vs Cantidad recuperada*, los criterios de aceptación establecidos fueron:

- $r^2 > 0.98$
- El Intervalo de confianza de la pendiente debe incluir la unidad

Tabla 21. Estadísticos de Cantidad adicionada vs Cantidad recuperada

Parámetro	2,4-D		Picloram	
Intervalo de concentraciones (mg/kg)	15-57		15-57	
Coefficiente de correlación r	0.9999		0.9912	
Coefficiente de determinación r²	0.9999		0.9825	
Pendiente	1.0		0.91	
Intervalos de confianza al 95 %	Inferior	Superior	Inferior	Superior
Pendiente	0.83	1.09	-0.6	2.5

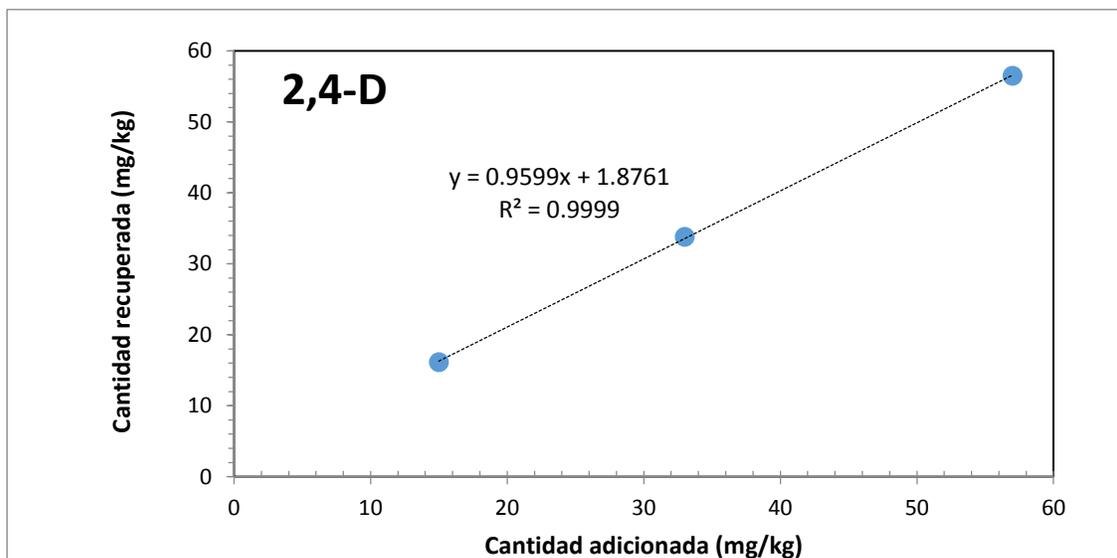


Figura 13. Curva Cantidad adicionada vs Cantidad recuperada, 2,4-D

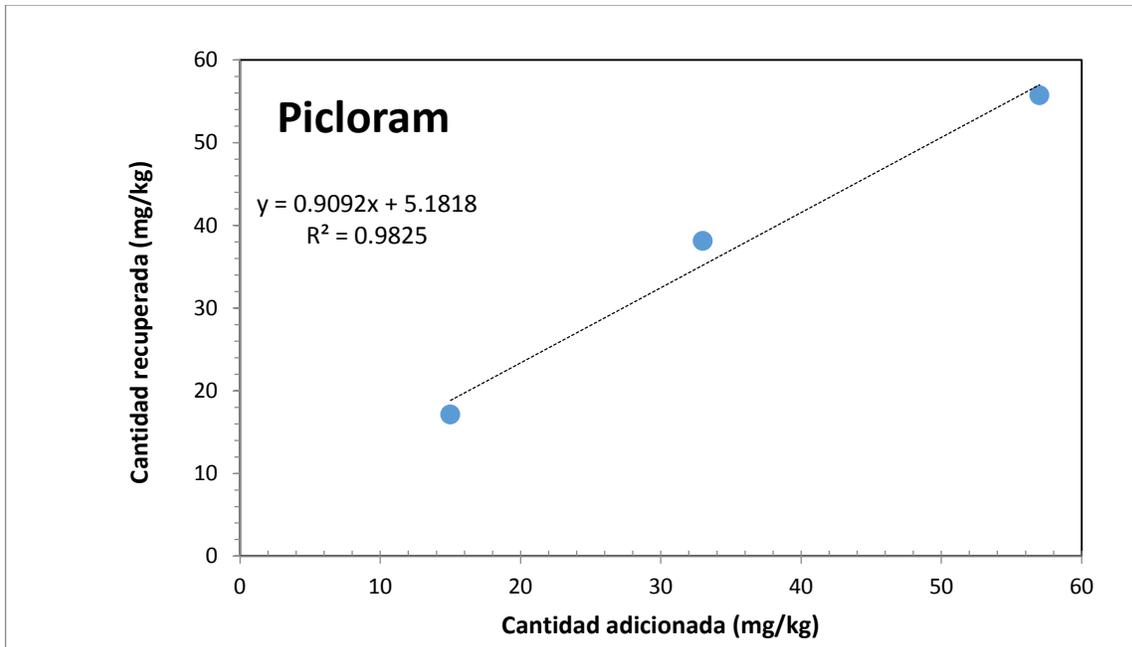


Figura 14. Curva *Cantidad adicionada vs Cantidad recuperada*, picloram

Con base en estos resultados el método de extracción empleado es sensible para la detección de 2,4-D y picloram cuya concentración se encuentre entre 15 y 57 mg/kg, el criterio de aceptación cumple para ambos casos al ser >0.98 siendo 0.9999 para 2,4-D y 0.9825 para picloram.

8.5 Resumen de los parámetros de validación

A partir de la experimentación realizada se obtuvieron los parámetros de validación presentados en las Tablas 22 y 23 para 2,4-D y picloram, respectivamente.

Tabla 22. Parámetros de Validación del método propuesto 2,4-D

Parámetro	Sistema	Confirmación en matriz	
λ (nm)		280	
IL (mg /L)	2.5-9.5	IL (mg /kg)	15-57
Sensibilidad analítica	5135		
r^2	0.9920		
LD (mg/L)	0.08	LD (mg/kg)	0.004
LC (mg /L)	0.17	LC (mg /kg)	0.009
% Recobro (5.5 mg/L)	101.6	% Recobro (15 mg/kg)	104.1
Rep. DER (%) (5.5 mg/L)	1.0	Rep. DER (%) (15 mg/kg)	7
Reprod. DER (%)	1.1		

Tabla 23. Parámetros de Validación del método propuesto picloram

Parámetro	Sistema	Confirmación en matriz	
λ (nm)		254	
IL (mg /L)	2.5-9.5	IL (mg /kg)	15-57
Sensibilidad analítica	18814		
r^2	0.9932		
LD (mg/L)	0.16	LD (mg/kg)	0.002
LC (mg /L)	0.33	LC (mg /kg)	0.004
% Recobro	100.4	% Recobro (15 mg/kg)	115.5
Rep. DER (%)	1.3	Rep. DER (%) (15 mg/kg)	4.9
Reprod. DER (%)	1.4		

De manera general con los parámetros de desempeño obtenidos de acuerdo a lo descrito en la sección experimental para 2,4-D y picloram mostrados en las tablas anteriores, se concluye que el método empleado para la detección y cuantificación de estos plaguicidas es confiable debido a que tienen valores que cumplen con los criterios de aceptación.

8.6 Aplicación a muestras ambientales

Las muestras se colectaron en la región de Molango, los puntos de recolección se presentan en el mapa de la Figura 16.

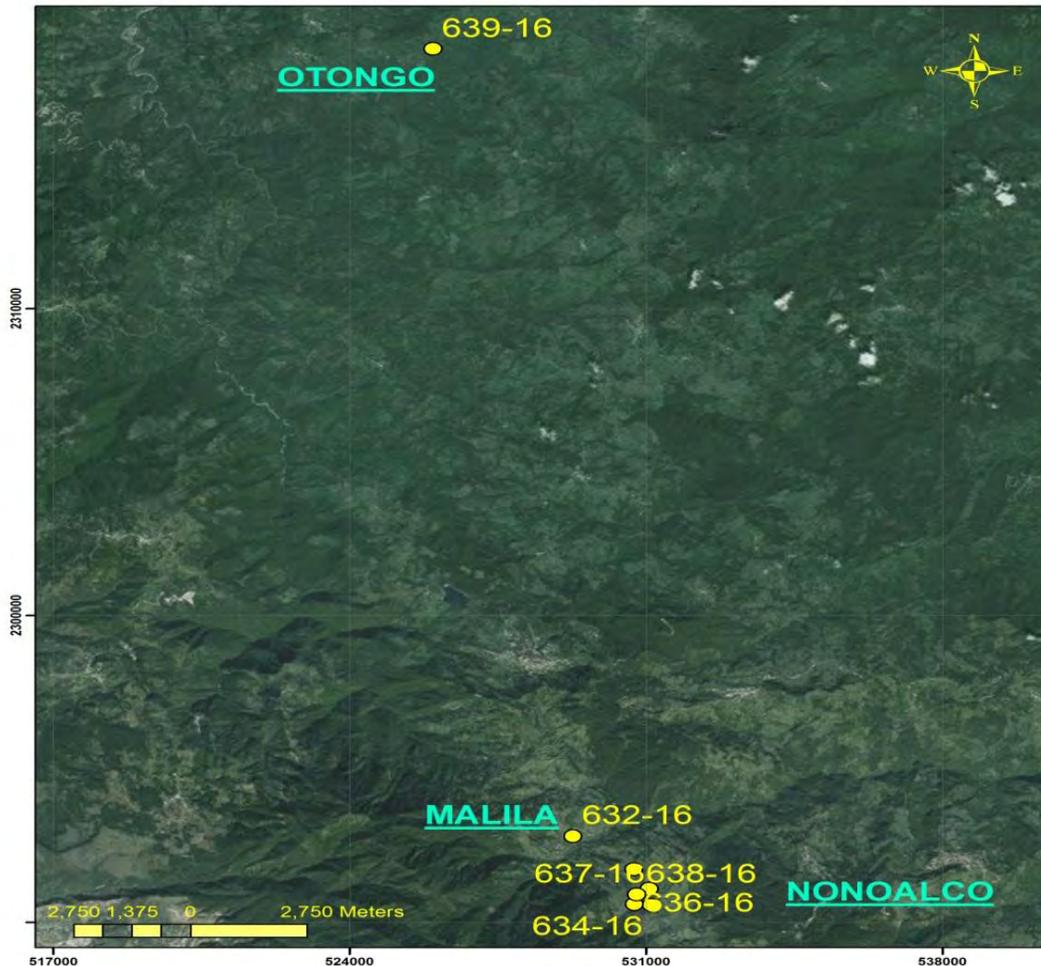


Figura 15. Sitios de muestreo

En la Tabla 24 se presentan los resultados de la aplicación del método propuesto a las muestras, como se puede observar en las muestra analizadas no hay la presencia de 2,4-D y picloram esto se puede atribuir a que cuando se llevó a cabo el muestreo ya habían pasado meses de la aplicación del 2,4-D y Picloram, debido a que la aplicación de estos herbicidas es recomendada en los meses donde apenas la planta de la

cosecha ha comenzado a crecer, evitando el tiempo de floración, de acuerdo con la conversaciones con los pobladores estas se aplican en abril-mayo, y las muestras fueron colectadas en octubre.

Tabla 24. Resultados generales del análisis de las muestras de suelo de Molango de Escamilla, Hidalgo

LABQA	pH	Humedad [%]	2,4-D mg/kg	Picloram mg/kg
628-16	7.04	26.93	ND	ND
629-16	7.19	24.28	ND	ND
630-16	7.92	14.47	ND	ND
631-16	8.03	28.75	ND	ND
632-16	7.92	32.64	ND	ND
633-16	8.07	35.19	ND	ND
634-16	7.56	16.91	ND	ND
635-16	8.17	25.62	ND	ND
636-16	8.29	25.89	ND	ND
637-16	7.96	26.64	ND	ND
638-16	7.74	26.41	ND	ND
639-16	8.29	18.08	ND	ND

En la Figura 17 se muestran cromatogramas del extracto de la muestra 635-16, sin adicionada con el cual al no presentar ninguna señal indica que el método empleado es confiable ya que no presenta la señal de algún interferente y adicionada con los plaguicidas y el cromatograma de las muestra adicionada sólo muestra las señales de 2,4-D y picloram.

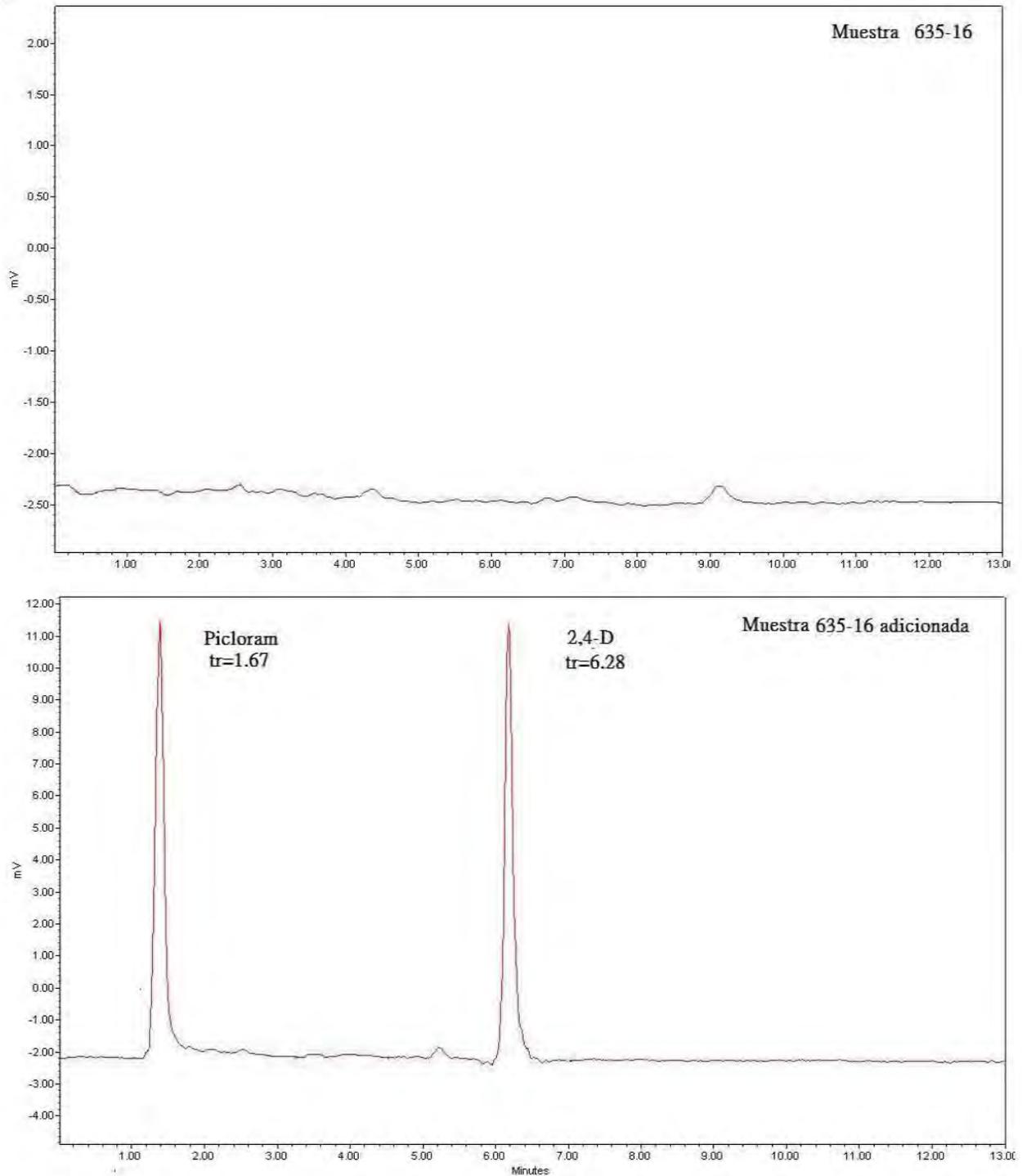


Figura 16. Cromatogramas de la inyección de a) Muestra 635-15 y b) Muestra 635-16 adicionada con 2,4-D y picloram

IV. Conclusiones

Las conclusiones obtenidas a partir de los resultados son las siguientes:

- El método desarrollado y validado permite la detección y cuantificación simultánea de ácido 2,4-diclorofenoxiacético y picloram en muestras ambientales de suelos por CLAR con detección Ultravioleta.
- El método de extracción sólido-líquido asistida por ultrasonido aplicado para la detección y cuantificación de 2,4-D y picloram en muestras de suelo es un método confiable debido a que los resultados obtenidos de la evaluación de los parámetros de desempeño cumplen con los criterios de aceptación y se concluye que no hay interferencias provenientes de la matriz.
- Los parámetros de desempeño obtenidos demuestran que el método cumple con el propósito al presentar valores que cumplen con los criterios de aceptación establecidos.
- El método validado es adecuado para el alcance propuesto.
- Se obtuvo experimentalmente el valor de $\log K_w$ de 0.58 para picloram y de 2.42 para 2,4-D, lo cual nos indica que el picloram es un herbicida con un potencial de acumulación muy bajo en los tejidos grasos y materia orgánica del suelo, mientras que el 2,4-D presenta baja potencialidad de acumulación.
- En las muestras analizadas no se detectaron ni cuantificaron los herbicidas de estudio.

V. Bibliografía

Asensio Ramos, M. (2012). *Nuevos procedimientos de extracción y determinación de plaguicidas en muestras ambientales*. Universidad de Laguna.

Campos Segura, R., & González Forero, R. (2011). Movilidad en suelos de residuos de plaguicidas (malatión). *Épsilon* , 159-153.

Caseley, J. (1996). *FAO*. Recuperado el 26 de Abril de 2017, de <http://www.fao.org/docrep/T1147S/t1147s0e.htm>

CICOPLAFEST. (2009). Recuperado el 20 de Abril de 2017, de <http://www.meteorastudio.com/bsl/docspdf/capacitacion/CICOPLAFEST.pdf>

COFEPRIS. (2016). *Catálogo de Plaguicidas*.

Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos. (2001). *Guía de validación de métodos analíticos*. D.F.: Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos.

de Amarante et al. (2003). Determination of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and its major transformation product in soil samples by liquid chromatographic analysis. *Talanta* , **60**, 115-121.

de Gerónimo et al. (Septiembre de 2015). A simple and rapid analytical methodology based on liquid chromatography-tandem mass spectrometry for monitoring pesticide residues in soils from Argentina. *Analytical Methods* , 9504-9512.

EMA. (2017). *QCnet*. (I. Reyes Ramírez, Ed.) Recuperado el 27 de Abril de 2017, de <http://www.qcnet.com/Portals/75/Validaci%C3%B3n%20y%20verificaci%C3%B3n%20de%20metodos%20de%20examen%20cuantitativos.pdf>

EPA. (1995). *Method 508 determination of chlorinated pesticides in water by gas chromatography with an electron capture detector*. Ohio, EUA.

Esquivel Soto, E. E., & Leal Guadarrama, L. I. (2004). *IBt*. Obtenido de http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/cromatografia_de_fase_reversa.pdf

FAO. (2017). Recuperado el 17 de Abril de 2017, de <http://www.fao.org/faostat/en/#data/RP>

FAO. (1993). *fao.org*. Recuperado el 21 de Abril de 2017, de www.fao.org/input/download/standards/378/cxg_040s.pdf

García García, L. (2014). *Desarrollo y validación de una metodología para la determinación y cuantificación simultánea de 2,4-D y 2,4-DCP por medio de CLAR-UV-DAD con aplicación en experimentos de sorción en suelos*. Tesis de Licenciatura, UNAM, Instituto de Geología, México, D.F.

García Gutiérrez, C., & Guadalupe, R. M. (2012). Problemática y riesgo ambiental por el uso de plaguicidas en Sinaloa. *Ra Ximhai*, **8** (3), 1-10.

García Guzmán, I. C. (2008). *Residuos de insecticidas organofosforados en el organismo humano*. Universidad de Sonora, División de Ciencias e Ingeniería. Hermosillo: Universidad de Sonora.

García S. et al. (2010). *Método Optimizado de Extracción por Ultrasonidos para la Determinación de PSHs Seleccionados en un Suelo Contaminado con Fuel de Tipo II*. Madrid, España: CIEMAT.

Grupo Argos. (2017). *Grupo Argos*. Recuperado el 2017, de <http://www.grupoargos.com/recursos/descargas/MSDS-PICLORAM-AGROS.pdf>

Hernández, F., & Beltrán, J. (1995). *Análisis de residuos de plaguicidas en agua*. Avance de Investigación, Universidad Jaime I, Departamento de Ciencias Experimentales, Castellón, España.

INEGI. (2 de Diciembre de 2015). *inegi.org*. Recuperado el 15 de Mayo de 2017, de <http://www.inegi.org.mx/saladeprensa/aproposito/2015/suelo0.pdf>

Jáquez Matas Sandra Viviana et al. (2013). *Comportamiento de plaguicidas persistentes en el medio ambiente*. Instituto Politécnico Nacional, Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Durango. Durango: Repositorio Digital IPN.

Juan García, A. (2008). *Análisis de contaminantes orgánicos en alimentos por técnicas cromatográficas*. Valencia: Universidad de Valencia.

Magnusson, B. Ö. (2014). *The Fitness for Purpose of Analytical Methods. A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*.

Meng, C.-K. (2006). *Determination of Chlorinated Acid Herbicides in Soil by LC/MS/MS*. Wilmington, USA.

Miliarium. (2008). *Miliarium.com*. Recuperado el 11 de 04 de 2017, de <http://www.miliarium.com/Prontuario/Tablas/Quimica/AfinidadOrganicos.asp>

Morillas P. et al. (2016). *Guía Eurachem: La adecuación al uso de los métodos analíticos – Una Guía los métodos analíticos y temas relacionados*. EuroLab.

OPS. (2016). Recuperado el 20 de Abril de 2017, de <http://publicaciones.ops.org.ar/publicaciones/publicaciones%20virtuales/proyectoPlaguicidas/pdfs/anexoB.pdf>

Organización Panamericana de la Salud . (01 de Enero de 2005). *BVSDE*. Recuperado el 23 de Abril de 2017, de <http://www.bvsde.paho.org/tutorial/ambientales/anexo4.html>

Quattrocchi, O. A., de Andrizzi, S. A., & Laba, R. F. (1992). Introducción a la HPLC, aplicación y práctica. .

Ramos García, O. G. (2004). *Determinación de plaguicidas organoclorados en agua potable de Cd. Victoria, Tamps. y su potencial riesgo a la salud.* Facultad de Medicina. Nuevo León: Universidad de Nuevo León.

Rangel Morales, A. I. (2016). *Análisis del comportamiento ambiental de los herbicidas de mayor uso en la subcuenca del río Tecolutla, Veracruz.* México D.F: IPN.

Rentería, C. (2015). **COFEPRIS**. Recuperado el 17 de Abril de 2017, de <http://www.cofepris.gob.mx/AZ/Paginas/Plaguicidas%20y%20Fertilizantes/PlaguicidasYFertilizantes.aspx>

REP-AL. (2016). Recuperado el Mayo de 2017, de http://www.rap-al.org/index.php?seccion=4&f=efectos_medio.php

Repetto M. et al. (2003). *Glosario de términos usados en toxicología.* Asociación española de toxicología.

Robles, M. J. (2014). *Desarrollo de metodologías analíticas mediante cromatografía/espectrometría de masas para el control de contaminantes orgánicos prioritarios y emergentes en aguas emergentes residuales y superficiales.* Jaén, España: Universidad de Jaén.

RUA. (Octubre de 2008). *rua.ua.es*. (V. Gomis Yagües, Ed.) Recuperado el 24 de Abril de 2017, de <https://rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/8248/4/T4cromatliquid.pdf>

SAGARPA. (2012). *sagarpa.gob*. Recuperado el 21 de Mayo de 2017, de <http://www.sagarpa.gob.mx/desarrolloRural/Documents/El%20suelo%20y%20la%20produccion%20agropecuaria.pdf>

SEGOB. (2017). *Orden Jurídico Nacional*. Recuperado el 23 de Abril de 2017, de <http://ordenjuridico.gob.mx/Federal/PE/APF/CI/CICOPLAFEST.pdf>

SEMARNAT. (2006). *Norma Oficial Mexicana NOM-052-SEMARNAT-2005, Que establece las características, el procedimiento de identificación, clasificación y los listados de los residuos peligrosos*. Secretaría de medio ambiente y recursos naturales. dof.gob.

SEMARNAT. (1993). *Norma Oficial Mexicana NOM-053-SEMARNAT-1993, que establece el procedimiento para llevar a cabo la prueba de extracción para determinar los constituyentes que hacen a un residuo peligroso por su toxicidad al ambiente*. Secretaría de medio ambiente y recursos naturales. dof.gob.

Sembro. (2014). *Folleto técnico ficloram*.

Skoog, D. A., Holler, F. J., & Crouch, S. R. (2008). *Principios de análisis instrumental*. (Sexta edición ed.). México, D.F.: Cengage Learning.

SSA. (1994). *Norma Oficial Mexicana NOM-041-SSA1-1993, Bienes y servicios. Agua purificada envasada*. dof.gob.

SSA. (2010). *Norma Oficial Mexicana NOM-232-SSA1-2009, Plaguicidas: que establece los requisitos del envase, embalaje y etiquetado de productos grado técnico y para uso agrícola, forestal, pecuario, jardinería, urbano, industrial y doméstico*. Secretaría de salud pública. gob.mx.

Tu M. et al. (2001). *Weed Control Methods Handbook: Tools and Techniques for Use in Natural Areas*. Oregon, Estados Unidos : The Nature Conservancy.

Anexo I. CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA

La cromatografía es un método, usado principalmente para la separación de los componentes de una muestra, en la cual los componentes se distribuyen en dos fases una estacionaria y una móvil. La fase estacionaria es la fase que permanece inmóvil durante el procedimiento puede ser un sólido, un líquido retenido sobre un sólido o un gel. La fase móvil es la que se desplaza a lo largo del sistema, esta puede ser líquida o gaseosa (Quattrocchi, de Andrizzi, & Laba, 1992). Los métodos cromatográficos se clasifican en función de la naturaleza de la fase móvil y la fase estacionaria.

La cromatografía en columna en la cual la fase estacionaria está contenida dentro de un tubo y se hace pasar la fase móvil a través de este por presión; la cromatografía en plano, la fase estacionaria se trata de una placa plana o en los poros de un papel, donde la fase móvil se desplaza a través de la fase estacionaria por acción capilar o por efecto de la gravedad. Por otro lado la clasificación se da en función de los equilibrios involucrados en la transferencia de los solutos entre las fases, en las que se encuentra cromatografía de gases (CG), cromatografía de líquidos (CL) y cromatografía de fluidos supercríticos (Skoog, Holler, & Crouch, 2008).

La cromatografía de líquidos es una de las técnicas analíticas de separación más utilizadas debido a que es una técnica muy sensible, de fácil adaptación, determinación cuantitativa exacta, automatizada, por su capacidad de separar especies no volátiles o termolábiles y que puede ser aplicado a una amplia cantidad de sustancias que son de interés industrial y científico.

En la CL existen diferentes tipos de mecanismo de separación como los equilibrios de reparto líquido-líquido, líquido-sólido o de adsorción, de intercambio de iones, exclusión de tamaño y afinidad. Para aplicarlas se

debe tomar en cuenta solubilidad, peso molecular y si la especie es iónica o no, en la Figura A1 se muestran las características que son requeridas para cada procedimiento (Skoog, Holler, & Crouch, 2008).

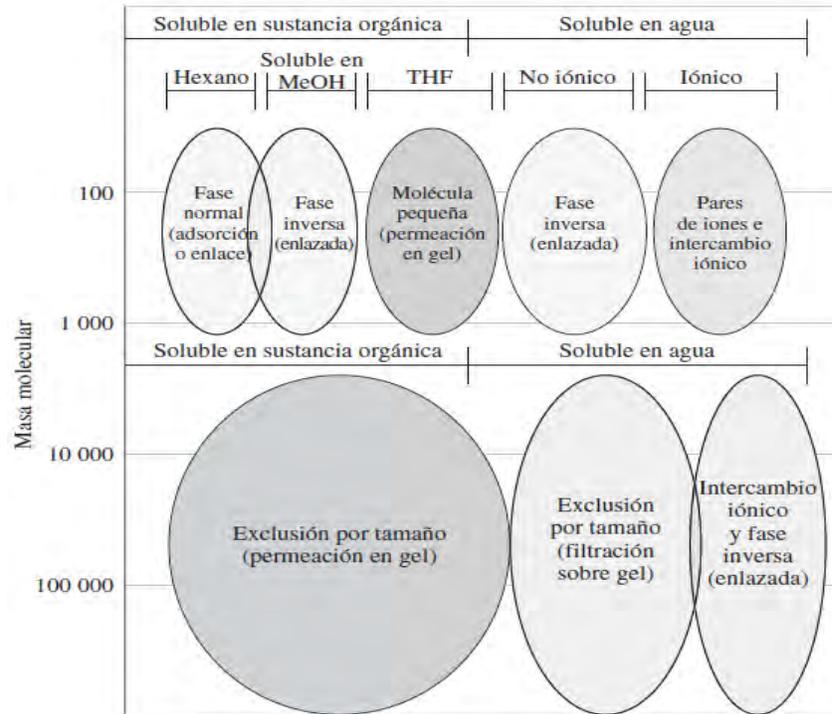


Figura A1. Tipos de cromatografía de líquidos

Tomada de: (Skoog, Holler, & Crouch, 2008)

Parámetros cromatográficos

Una separación cromatográfica está caracterizada por diferentes parámetros los cuales describen los procesos moleculares que tienen lugar durante la separación.

- **Tiempo de retención (t_r),** es el tiempo que transcurre desde la inyección de la muestra hasta su detección, es un parámetro característico de cada analito, para una separación particular.

- **Tiempo muerto (tm)**, tiempo que tarda una especie que no es retenida por la fase estacionaria y representa el espacio vacío de la columna y la tubería desde el inyector hasta el detector.
- **Tiempo de retención ajustado (tr´)**, es la diferencia entre el tiempo que tarda un soluto en atravesar la columna y el que emplea un disolvente no retenido, representado como:

$$t'_r = t_r - t_m$$

- **Coefficiente de distribución**, este parámetro refleja la distribución de la cantidad de analito entre la fase móvil y la fase estacionaria. Cuando $K=1$, el soluto se encuentra distribuido en la misma proporción en las dos fases, es descrito de la siguiente manera donde C_E es la concentración del analito en la fase estacionaria y C_m en la fase móvil (Esquivel Soto & Leal Guadarrama, 2004).

$$K = \frac{C_E}{C_M}$$

- **Factor de capacidad (k´)**, conocido también como factor de retención, es el tiempo que pasa el soluto en la fase estacionaria y en la fase móvil. El factor de capacidad en cromatografía de líquidos depende de la composición de la fase móvil y estacionaria, a valores de k' muy pequeños la elución ocurre rápidamente y es difícil determinar con exactitud el tiempo de retención del soluto y a valores de k' muy grandes el tiempo de elución incrementa provocando un ensanchamiento del pico del cromatograma. Idealmente, el valor de factor de capacidad debe de ser de 2 a 10.

$$k' = \frac{t_r'}{t_0}$$

- **Factor de selectividad (α)**, es una medida de que tan bien dos solutos son separados por la fase estacionaria, está dada por la siguiente ecuación:

$$\alpha = \frac{k'_B}{k'_A}$$

Donde k'_A y k'_B son los factores de capacidad de cada soluto. El valor de α deber >1 para poder decir que los solutos si se separan.

- **Eficiencia**, una columna cromatográfica está compuesta por numerosas capas estrechas denominadas platos teóricos (N) en los cuales se establece un equilibrio del soluto entre la fase móvil y la fase estacionaria, debido a que estos equilibrios ocurren aleatoriamente, se obtiene una dispersión de los tiempos de retención en la columna alrededor de un valor medio, originándose un pico gaussiano, el cual debido a la transferencia del soluto a través de la columna este pico se ensancha, sin embargo en cualquier análisis se buscan obtener picos estrechos y simétricos. La calidad de la columna empleada para llevar a cabo la separación es determinada por la eficiencia, para lo cual es necesario determinar el número de platos teóricos y la altura equivalente del plato teórico (H) de la siguiente manera:

$$N = 16 \left[\frac{t_r}{w} \right]^2 = 5.54 \left[\frac{t_r}{w_{1/2}} \right]^2$$

Donde w y $w_{1/2}$ la anchura a la mitad del pico

$$H = \frac{L}{N}$$

Donde L es la longitud de la columna y N e número de platos teóricos

La eficiencia de la columna aumenta cuanto mayor es el N y menos es la H.

- Resolución, (R_s) es una medida cuantitativa de la capacidad de la columna para separar dos solutos, visualmente en el cromatograma

se puede interpretar como la distancia de los picos, se determina con la siguiente ecuación:

$$R_s = \frac{2(t_{rB} - t_{rA})}{(w_{1/2B} + w_{1/2A})}$$

Donde los tiempos de retención y el ancho a mitad de la base se encuentran en unidades de tiempo.

Una resolución aceptable presenta un valor mayor de 1 en mezclas sencillas, mientras que con un valor de 2 presenta una separación de 100%, Figura A2.

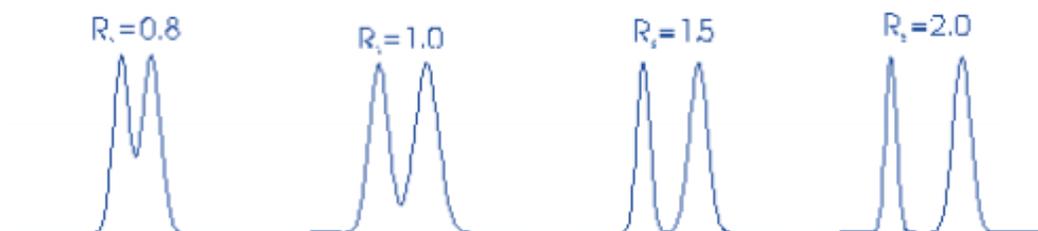
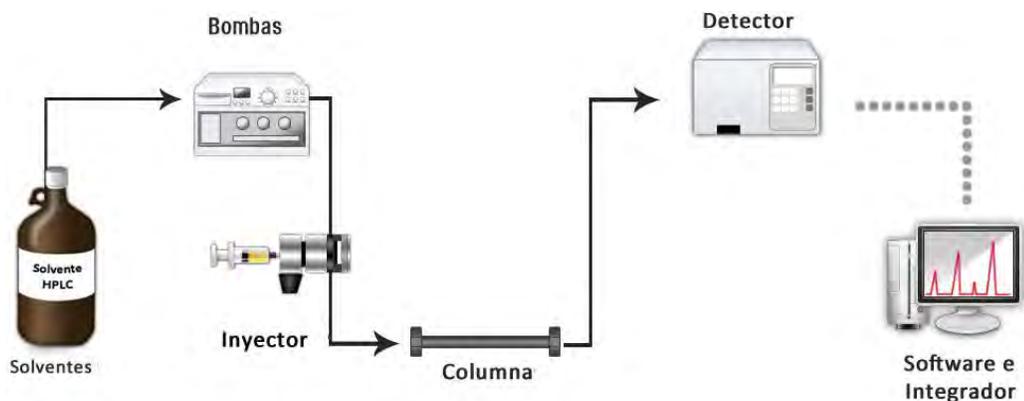


Figura A2. Picos cromatográficos a diferentes valores de resolución

Instrumentación de cromatografía de líquidos de alta resolución

Actualmente en los instrumentos de cromatografía de líquidos de alta eficiencia se emplean columnas de diámetro de un diámetro muy pequeño, rellenas con materiales con una tamaño de partícula entre 3 y 10 μm , con el fin de tener una mayor eficiencia, esto ha generado que los cromatógrafo de líquidos sean más sofisticados y mucho más caros, en la Figura A3 se muestran los componentes de un cromatógrafo de líquidos.



FiguraA3. Esquema de un cromatógrafo de líquidos de alta resolución

- **Reservorio de la fase móvil,** es el recipiente que contiene a la fase móvil, el cual se ubica dentro de "la caja negra" de un equipo integrado o externamente en un equipo modular, y generalmente a unos centímetros arriba de a bomba para que la fuerza de gravedad dirija el solvente hacia esta. Puede ser un recipiente de vidrio o de acero inoxidable, con tapa para evitar el ingreso de partículas ambientales al sistema. Al extremo de la manguera de salida del disolvente se conecta un filtro de acero conocido como desgasificador de 2 a 10 μm de porosidad con el fin de eliminar gases disueltos y polvo en el disolvente, los cuales podrían causar un flujo inestable e interferencias en el detector.
- **Uniones,** estas permiten conectar las tuberías y con ellas los distintos componentes del cromatógrafo. Estas deben ser inertes a la fase móvil y muestras y cerrar herméticamente.
- **Sistema de bombeo,** se encarga de suministrar un flujo constante y libre de pulsos del disolvente, estas deben de generar presiones por encima de 400 kg/cm², un intervalo de caudal de 0.1 a 10 mL/min y estas deben de ser de materiales resistentes a la corrosión. Para un cromatógrafo de líquidos se utilizan tres tipos de bombas, pero el más utilizado son las bombas recíprocas con la cual el disolvente es impelido por el movimiento alternando de un pistón accionado por un

motor el cual controla la entrada y salida del disolvente. Los equipos de bombeo están equipados con una computadora que aumenta o disminuye la velocidad del motor de la bomba, el cual permite condicionarlo con el flujo deseado para llevar a cabo el análisis.

- **Sistema de inyección,** este componente del cromatógrafo está relacionada con la eficiencia del sistema cromatográfico, ya que una mala inyección puede dar lugar a ensanchamientos de la banda cromatográfica. El método de inyección más utilizado consiste en inyectar la muestra en un bucle o loop, el cual es de frente tamaño para inyectar volúmenes desde 5 a 500 μL , la introducción de la muestra consiste en dos etapas la primera es cargar la muestra en el bucle con ayuda de una jeringa de vidrio y mediante un giro de la válvula se hace pasar la muestra hacia la columna.
- **Columnas,** son de acero inoxidable, son rectas y tienen una longitud de 5 a 30 cm con un diámetro uniforme que va de los 4 a 10 mm y usualmente están rellenas de sílice, alúmina o de resinas con un tamaño de partícula de 10 a 3 μm .
- **Detectores,** parte del cromatógrafo que permite ubicar en tiempo y espacio al soluto, un detector debe tener las siguientes características:
 - i. Amplio rango de respuesta
 - ii. Poseer una respuesta lineal
 - iii. No contribuir al ensanchamiento del pico
 - iv. Responder a todos los solutos
 - v. Tener la sensibilidad apropiada
 - vi. No verse afectado por cambios de temperatura
 - vii. Buena relación señal-ruido
 - viii. No destruir la muestra
 - ix. Tener un tiempo de respuesta rápido

En cromatografía de líquidos se clasifican en detectores generales con los cuales se mide un cambio de alguna propiedad física de la fase móvil más el soluto, un ejemplo es el detector de índice de refracción. Los detectores selectivos son sensibles a una propiedad de soluto, por ejemplo el detector UV o el de fluorescencia (RUA, 2008).

La selección del detector depende de la muestra y la sensibilidad requerida por el análisis, entre los detectores más comunes se encuentran:

- UV-Visible
- Fluorescencia
- Dispersión de luz
- Masas
- Electroquímicos