



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

**DETERMINACIÓN DE ATRAZINA EN AGUA RESIDUAL POR
MICROEXTRACCIÓN EN FASE SOLIDA-CROMATOGRAFÍA DE
GASES-ESPECTROMETRÍA DE MASAS (SPME-GC-MS).**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUIMICO**

PRESENTA

ALAN JOSUÉ GARCÍA LADD



CDMX

AÑO 2020



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: M. en C. Elba Rojas Escudero
VOCAL: DR. Eduardo Rodríguez de San Miguel Guerrero
SECRETARIO: DR. Luis Alejandro Díaz Flores
1er. SUPLENTE: M. en C. Felipe Lozano García
2do. SUPLENTE: M. en C. Tania Rojo Portillo

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO 102, DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA (ESTUDIOS DE POSGRADO), FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM)

ASESOR DEL TEMA:

Dr. Luis Alejandro Díaz Flores

SUSTENTANTE:

Alan Josué García Ladd

ABREVIATURAS

BID-SDME	Bubble-in-drop single drop microextraction/Microextracción en burbuja de gota pendiente
CPE	Cloud Point Extraction/Microextracción en punto de nube
CV	Coeficiente de variación
DAD	Diode array detection/Detector de arreglo de diodos
DE	Desviación estándar
DPX	Disposable Pipette Extraction/Extracción en pipeta desechable
ECD	Electron capture detector/Detector de captura de electrones
GC	Gas chromatography/Cromatografía de gases
HPLC	High performance liquid chromatography/Cromatografía de líquidos de alta eficiencia
$K_{o/w}$	Coeficiente de distribución octanol-agua
LC	Límite de cuantificación
LD	Límite de detección
MS	Mass spectrometry/Espectrometría de masas
PA	Poliacrilato
R	Coeficiente de correlación lineal
SCAN	Barrido total de iones
SDME	Single drop microextraction/Microextracción en gota única
SIM	Single ion monitoring/Monitoreo selectivo de iones
SPE	Solid Phase Extraction/Extracción en fase sólida
SPME	Solid phase microextraction/Microextracción en fase sólida
UAE	Ultrasound Assisted Extraction/Extracción asistida con ultrasonido
UV	Ultravioleta

ÍNDICE

ABREVIATURAS	i
ÍNDICE.....	ii
RESUMEN.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	2
2. MARCO TEÓRICO	4
2.1. Los herbicidas.....	4
2.1.1. Mecanismo de inhibición fitológica de los herbicidas	4
2.2. Herbicidas de triazina	5
2.3. Atrazina	5
2.3.1. Distribución de la atrazina en el ambiente	6
2.3.1.1. Lixiviación de la atrazina hacia el agua subterránea	7
2.3.2. Degradación de la atrazina en el ambiente.....	7
2.3.3. Mecanismo de la degradación hidrolítica.....	8
2.3.4. Degradación biológica y mineralógica	9
2.3.5. Productos de degradación hidrolítica, biológica y mineralógica de atrazina.....	10
2.3.6. Riesgos toxicológicos y ecotoxicológicos de la atrazina.	10
2.3.7. Legislación para el uso de atrazina.....	12
2.4. Cromatografía de gases (GC).....	13
2.4.1. Gas acarreador.....	14
2.4.2. Reguladores de flujo.....	14
2.4.3. Inyector.....	14
2.4.4. Columna y Horno.....	15

2.4.5.	Acoplamiento de cromatografía de gases a espectrometría de masas (GC-MS).	16
2.5.	Microextracción en fase sólida (SPME)	17
3.	OBJETIVO	19
3.1.	Objetivos particulares	19
4.	JUSTIFICACIÓN	19
5.	DESARROLLO EXPERIMENTAL	20
5.1.	Reactivos	20
5.2.	Materiales	20
5.3.	Aparatos	20
5.4.	Lavado de material de vidrio	21
5.5.	Condiciones cromatográficas	21
5.6.	Muestra de agua residual	22
5.7.	Identificación de la atrazina por GC-MS	22
5.8.	Temperatura del inyector para la identificación de la atrazina	22
5.9.	Diseño experimental factorial 2 ³ para la SPME de atrazina en agua	23
5.10.	Ajuste de pH, % NaCl y temperatura de extracción	23
5.11.	Optimización del porcentaje de NaCl	24
5.12.	Temperatura del medio de extracción	24
5.13.	Porcentaje de metanol	24
5.14.	Tiempo de extracción	24
5.15.	Condiciones seleccionadas para el análisis de atrazina en agua desionizada fortificada	25
5.16.	Análisis de atrazina en agua por SPME-GC-MS: Validación del método	25
5.16.1.	Límite de detección y límite de cuantificación	25

5.16.2.	Curva estándar de atrazina	25
5.16.3.	Gráfico de residuales.....	26
5.16.4.	Precisión	26
5.16.5.	Porcentaje de recobro	26
5.17.	Análisis de agua residual de la planta de tratamiento de Ciudad Universitaria, UNAM.....	26
5.17.1.	Blanco de reactivos	26
5.17.2.	Blanco de agua residual	27
5.17.3.	Comparación del análisis de atrazina en agua desionizada y agua residual	27
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	28
6.1.	Identificación de atrazina por cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS)	28
6.2.	Temperatura del inyector para la detección de la atrazina y temperatura de desorción para la SPME.....	30
6.3.	Diseño experimental 2 ³ y diagrama de Pareto.....	31
6.4.	Superficie de respuesta para la SPME de la atrazina	32
6.5.	Optimización del porcentaje de NaCl para la SPME	33
6.6.	Interacción del % de NaCl y temperatura de extracción.....	35
6.7.	Tiempo de extracción.....	36
6.8.	Porcentaje de metanol	37
6.9.	Condiciones seleccionadas para el análisis de atrazina en agua desionizada.....	38
6.10.	Análisis de atrazina en agua por SPME-GC-MS: Validación del método	38
6.10.1.	Límite de detección y límite de cuantificación	38

6.10.2.	Curva estándar de atrazina	39
6.10.3.	Gráfico de residuales.....	40
6.10.4.	Curva estándar con regresión ponderada.....	40
6.10.5.	Precisión	41
6.10.6.	Porcentaje de recobro	41
6.11.	Blanco de reactivos y agua residual.....	42
6.12.	Determinación de atrazina por SPME-GC-MS en muestras de agua residual fortificada	43
6.13.	Esquema analítico para la determinación de atrazina	45
6.14.	Discusión del método desarrollado	46
CONCLUSIONES		49
PERSPECTIVAS		51
BIBLIOGRAFÍA		52
7.	ANEXOS.....	55
7.1.	Cromatogramas	55
7.2.	Condiciones experimentales seleccionadas.....	61
7.3.	Curva estándar de atrazina.....	61
7.4.	Gráficos de residuales	62
7.5.	Curva estándar con regresión ponderada	64

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue el desarrollo, validación y aplicación de un método para la determinación de atrazina en agua residual utilizando microextracción en fase sólida-cromatografía de gases-espectrometría de masas (SPME-GC-MS).

La atrazina se identificó por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS), obteniéndose el cromatograma por barrido total de iones (SCAN), así como su espectro de masas.

Una vez identificado el analito, se propuso un diseño experimental lineal factorial 2^3 para estudiar el efecto de algunas variables que afectan a la SPME de atrazina. Las variables estudiadas fueron: pH de la disolución, porcentaje de cloruro de sodio (% de NaCl) y la temperatura de la extracción.

El % de NaCl y la temperatura tuvieron el mayor impacto en la extracción del analito. Otras variables estudiadas fueron el tiempo de extracción y el porcentaje de metanol (% de MeOH) en la disolución.

El método desarrollado se validó evaluando la precisión, el límite de detección (LD), el límite de cuantificación (LC), la linealidad y la exactitud (% recobro).

El método se aplicó a una muestra de agua residual fortificada, demostrando un desempeño aceptable en términos de precisión y exactitud. El análisis de agua residual fortificada evidenció un efecto de matriz positivo, observándose un aumento en el área cromatográfica de la atrazina en comparación con una disolución estándar del analito.

Con base en los resultados experimentales, el método desarrollado representa una alternativa analítica rápida, sencilla, sensible y amigable con el ambiente para la determinación de atrazina en muestras acuosas complejas.

1. INTRODUCCIÓN

Hoy en día, la sobrepoblación humana ha provocado que la demanda de alimentos se incremente continuamente. En consecuencia, la industria agrícola se ha visto en la necesidad de utilizar múltiples sustancias químicas para mejorar la calidad, eficiencia y rendimiento de los agro-cultivos.

Los herbicidas son compuestos que se utilizan para mejorar la producción agrícola, mediante la inhibición y/o control del desarrollo de las malezas en los cultivos.

El uso de herbicidas implica una problemática mundial, ya que dichas sustancias pueden ser nocivas y representan un riesgo toxicológico y ecotoxicológico.

Las triazinas y sus derivados son los herbicidas más comunes y uno de los compuestos representativos es la atrazina.

En los últimos años, se ha demostrado que la exposición crónica o eventual a la atrazina puede provocar infertilidad y disrupción endócrina en algunos organismos vivos [2].

Por lo anterior, en algunos países de la Unión Europea (Alemania, Inglaterra y Holanda) está prohibido el uso de atrazina. En México, no existe normatividad que regule el uso de este herbicida, sin embargo, en el año 2007 se propuso un proyecto de norma oficial, en el que se establece un límite máximo permisible de atrazina de 2 µg/L en agua potable [1].

La determinación precisa de este herbicida en muestras acuosas complejas es importante y de interés ambiental, ya que la atrazina utilizada en agricultura puede distribuirse hacia las aguas superficiales y subterráneas. Se ha demostrado que la concentración de dicho herbicida en agua superficial y subterránea puede alcanzar concentraciones de 4-21 µg L⁻¹, respectivamente [2].

Normalmente, la determinación de atrazina se efectúa por cromatografía de gases o cromatografía de líquidos acopladas a espectrometría de masas (GC-MS o HPLC-MS). La Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (USEPA), publicó un método oficial para la determinación de atrazina utilizando cromatografía de gases como técnica de análisis (Método 619: Determinación de herbicidas de triazina en agua residual municipal o industrial).

El uso de técnicas analíticas acopladas combina la selectividad de la separación cromatográfica y la sensibilidad y especificidad de la espectrometría de masas, lo que resulta en una técnica eficaz y eficiente para determinar contaminantes de manera inequívoca.

Sin embargo, aunque una técnica analítica sea muy sofisticada, la preparación de la muestra sigue siendo un paso necesario e importante para la determinación confiable de cualquier analito. El tiempo de preparación de la muestra puede abarcar entre un 60 y 80 % del tiempo total del análisis. Por este motivo, existen técnicas de preparación de la muestra que simplifican los pasos de extracción, concentración y limpieza de manera semi-automática. Un ejemplo de estas técnicas es la microextracción en fase sólida (SPME), la cual utiliza como dispositivo de extracción una fibra de sílice fundida recubierta por una fase extractora. Los analitos de una muestra acuosa se distribuyen entre la muestra y la fase extractora mediante equilibrios de sorción. Esta técnica es considerada ecológica y selectiva, ya que no utiliza disolventes orgánicos.

La SPME seguida del análisis cromatográfico ha demostrado ser una propuesta analítica confiable para la determinación de atrazina a nivel de trazas y ultratrazas (ng/L y µg/L) en muestras acuosas.

En este proyecto, se propuso el desarrollo de un método rápido, sencillo, sensible y amigable con el ambiente para la determinación de atrazina en muestras acuosas complejas. La extracción de atrazina se realizó por SPME y el análisis se efectuó por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. El método desarrollado se validó para el análisis de atrazina a nivel de trazas y ultratrazas ($\mu\text{g L}^{-1}$ y ng L^{-1}) y se aplicó a una muestra de agua residual fortificada con atrazina.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Los herbicidas

Antes del siglo XX, erradicar las plantas parásitas de los cultivos implicaba un trabajo arduo, debido al crecimiento descontrolado de las malezas. El deshierbe de los cultivos se efectuaba por métodos físicos tradicionales, como la labranza o la remoción manual de las malezas.

La tolerancia, adaptabilidad y competitividad de las malezas para sobrevivir y desarrollarse en distintas condiciones ambientales, resulta en un grave problema para la industria agrícola, afectando la productividad y calidad de los cultivos.

En la actualidad, se han sintetizado compuestos químicos para evitar el desarrollo de las plantas parásitas, los cuales se denominan herbicidas.

Los herbicidas inhiben o eliminan las malezas en los cultivos y se han utilizado desde los años 1950. Algunos de los beneficios agrícolas derivados del uso de herbicidas son [3]:

1. Una menor inversión en la mano de obra para el deshierbe.
2. Un proceso de cosecha facilitado debido a la disminución del pasto u otras malezas que invaden el cultivo.
3. Una producción eficiente en los cultivos que incrementa su valor agregado.
4. El mejoramiento en la calidad edáfica por la disminución de la erosión del suelo [3].

2.1.1. Mecanismo de inhibición fitológica de los herbicidas

La actividad química y el impacto ambiental de un herbicida dependen de las condiciones climáticas, la interacción con la planta parásita, el metabolismo de la planta, el tipo de suelo, la época pluvial, la humedad relativa ambiental y la humedad del suelo [5].

Los herbicidas actúan por diferentes mecanismos y la selectividad de estos depende de la actividad química-biológica sobre la planta parásita blanco, de tal manera que el efecto puede retardar o inhibir el crecimiento de una planta por la alteración de los procesos de división celular, fotosíntesis o respiración celular [5].

Para que un herbicida lleve a cabo su acción fitotóxica, es necesario que el compuesto sea absorbido y distribuido en la planta parasita [6].

2.2. Herbicidas de triazina

Los primeros herbicidas sintéticos carecían de selectividad fitológica, por lo que afectaban las cosechas y la productividad de los cultivos. Con el avance de la ciencia, se descubrió que las triazinas y sus derivados eran un grupo de herbicidas selectivos en la agricultura.

Las triazinas son compuestos heterocíclicos cuya fórmula mínima consiste en un anillo aromático con tres átomos de carbono y tres de nitrógeno (C_3N_3). Este grupo de compuestos orgánicos tiene múltiples aplicaciones en la industria farmacéutica y agrícola. El uso de estos herbicidas se ha preferido debido al potente efecto inhibitorio de la maleza, así como el aumento en el crecimiento y producción en masa en algunos cultivos [3].

2.3. Atrazina

El nombre IUPAC de la atrazina es 6-cloro-2-N-etil-4-N-isopropil-1,3,5-triazina-2,4-diamina (*Figura 1*). Es una base débil con un pKa de 1.68 y su solubilidad en agua es 33 mg L⁻¹ (pH 7 y 22 °C); su presión de vapor a 25 °C es 2.89x10⁻⁷ mm Hg y su constante de la Ley de Henry de 2.48x10⁻⁹ atm m³ mol⁻¹ (volatilidad muy baja). El coeficiente de distribución octanol/agua ($K_{o/w}$) es 2.68 (25 °C), tiene una constante de disociación baja ($K_d = 0.2 - 12.6$) y su coeficiente de adsorción en carbono orgánico es bajo (K_{oc} : 40 a 394) [7].

La atrazina comenzó a utilizarse como herbicida en 1958 y su uso se ha intensificado con el tiempo debido a su gran selectividad fitológica. Tanto en México como en Estados Unidos, la atrazina se utiliza comúnmente para el cultivo de maíz, piña, plátano, naranja, caña de azúcar, trigo, sorgo, chícharo y tomate [4].

La aplicación de este compuesto puede ser antes o después de la germinación de las plántulas en los cultivos [2].

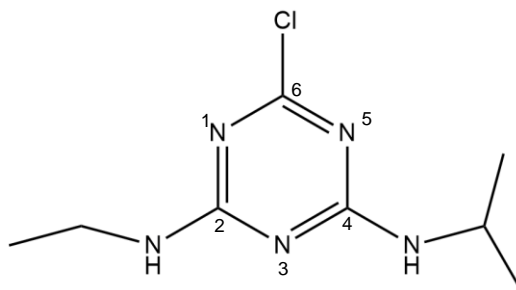


Figura 1. Molécula de atrazina

2.3.1. Distribución de la atrazina en el ambiente

El uso de herbicidas representa un problema ambiental, ya que estas sustancias se pueden distribuir hacia el agua, el suelo y el aire, generando un riesgo toxicológico y ecotoxicológico [4].

Una vez en el suelo, la movilidad de la atrazina y sus metabolitos dependerá de las propiedades edáficas como la baja afinidad a los componentes del suelo, la volatilidad, la presión de vapor, la solubilidad en agua, así como su adsorción y mineralización.

Algunos factores como el contenido de arcillas, materia orgánica y el pH de los suelos, favorecen los procesos adsorción y mineralización, los cuales inducen la degradación natural de la atrazina.

Algunos estudios han demostrado que los fertilizantes nitrogenados son inhibidores de la mineralización de la atrazina en los suelos, disminuyendo así su degradación [2]. Por lo tanto, la atrazina puede acumularse en el suelo y puede lixiviar a los acuíferos (superficiales o subterráneos) mediante la lluvia o escorrentías.

La distribución de atrazina en un sistema de agua y suelo dependerá del tipo y el nivel de hidratación del suelo, así como la estabilidad química del herbicida. La conductividad hidráulica y la capacidad de retención de agua en el suelo influyen en la velocidad de transporte de la atrazina. Por lo tanto, la velocidad de transporte en los suelos arenosos es mayor en comparación con los suelos arcillosos, donde la filtración es más lenta.

2.3.1.1. *Lixiviación de la atrazina hacia el agua subterránea*

El transporte de atrazina en el suelo ocurre por filtración lenta o rápida (matriz del suelo, macroporos o grietas). Como resultado, la atrazina lixivía hacia las aguas subterráneas mediante flujos variables e irregulares, provocando que dicho transporte sea independiente de la absorción.

Por otro lado, la materia orgánica del suelo normalmente disminuye la movilidad de la atrazina, sin embargo, el tipo de materia orgánica pueden inducir la formación de complejos de atrazina (de baja adsorción) que favorecen su migración hacia el agua subterránea.

La temperatura es otro factor que afecta el transporte de atrazina a través del subsuelo. Algunos estudios realizados por González-Pradas y colaboradores, determinaron que la adsorción de la atrazina en suelos arcillosos disminuye cuando la temperatura aumenta entre 15 y 35 °C, incrementando su migración hacia el agua subterránea [2].

2.3.2. Degradación de la atrazina en el ambiente

La degradación de la atrazina en el ambiente ocurre principalmente por vía biológica, debido a la actividad microbiana en el agua y en el suelo.

Los microorganismos utilizan a la atrazina como fuente de carbono y nitrógeno cuando la biodisponibilidad de otras fuentes de carbono y nitrógeno disminuye en el suelo. Por lo anterior, el tiempo de vida de la atrazina aumenta en los suelos con mayor contenido de nutrientes [2].

La segunda vía de degradación es la química, la cual ocurre por un mecanismo hidrolítico o fotolítico.

La degradación hidrolítica ocurre en mayor proporción y se incrementa a disminuir el pH del suelo (pH ácido). Con base en algunos estudios, la degradación puede ocurrir en 244 días y se reduce a 173 días en presencia de algunos ácidos húmicos. Esta vía de degradación es considerada un modo para evitar el riesgo de contaminación por atrazina en aguas superficiales, ya que los productos de degradación no son fitotóxicos. Los

productos de la hidrólisis de atrazina son: hidroxiatrazina (producto mayoritario), desetilhidroxiatrazina y desisopropilhidroxiatrazina [2].

2.3.3. Mecanismo de la degradación hidrolítica

La degradación hidrolítica produce compuestos hidroxilados que conservan el anillo triazínico. La hidrólisis comienza con la deshalogenación en el carbono 6, seguida de dos reacciones de N-desalquilación en los carbonos 2 y 4, produciendo el ácido cianúrico. La *Figura 2* muestra los 3 compuestos intermediarios, así como el producto final de la hidrólisis de la atrazina.

En algunos estudios de laboratorio (25 °C), se determinó que la atrazina es estable en un intervalo de pH entre 5 y 9, disminuyendo ligeramente su concentración después de 30 días. En dichos estudios, se comprobó que la atrazina presentó una cinética de reacción de primer orden, produciendo hidroxiatrazina como producto final [7].

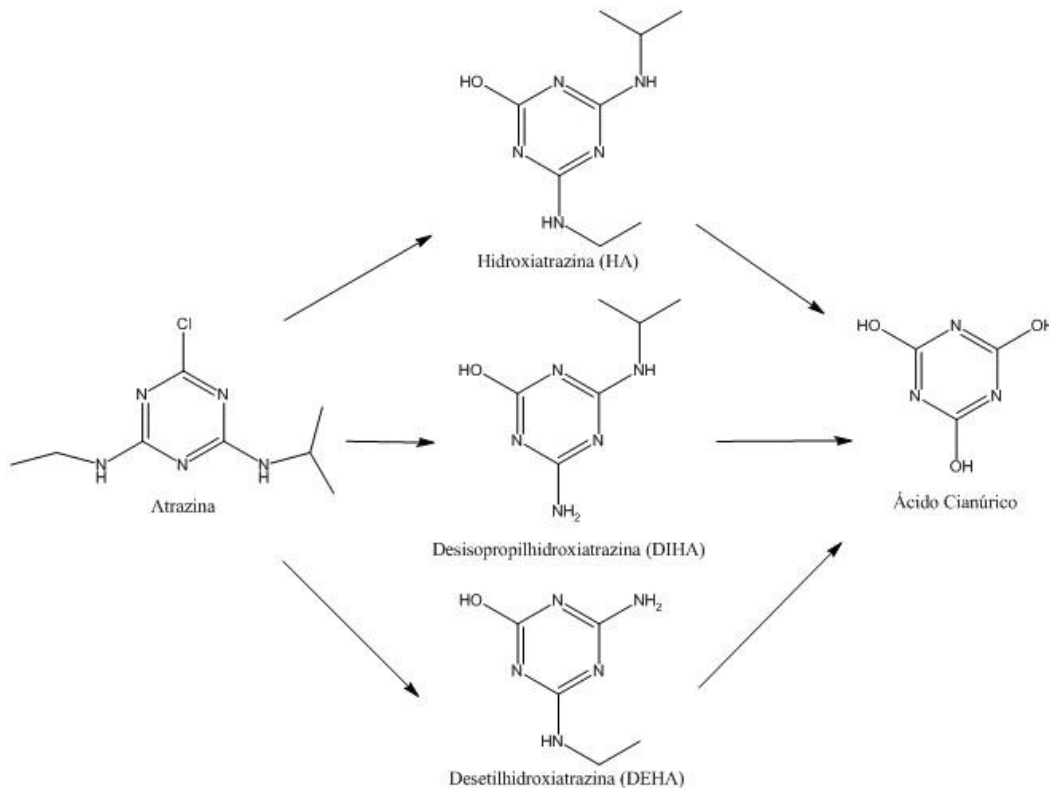


Figura 2. Degradación hidrolítica de la atrazina Hidroxiatrazina (HA) Desisopropilhidroxiatrazina (DIHA) Desetilhidroxiatrazina (DEHA).

2.3.4. Degradación biológica y mineralógica

En los años 1990, se aislaron por primera vez microorganismos que utilizaban a la atrazina como fuente de carbono y nitrógeno. El metabolismo de atrazina se lleva a cabo por reacciones de N-desalquilación y desaminación, las cuales no alteran la estructura del anillo de triazina. Tiempo después, se descubrieron bacterias capaces de mineralizar este compuesto.

Desde el año 2009, se han descubierto varios microorganismos que son capaces de degradar a la atrazina; un género de estos microorganismos es la *Pseudomona sp.*

Por otra parte, la mineralización de la atrazina ocurre mediante dos procesos hidrolíticos, donde primero se forma el ácido cianúrico y después dicho producto se hidroliza, formando el compuesto de Biuret, urea, amoníaco y dióxido de carbono. Este proceso ocurre por actividad enzimática [4].

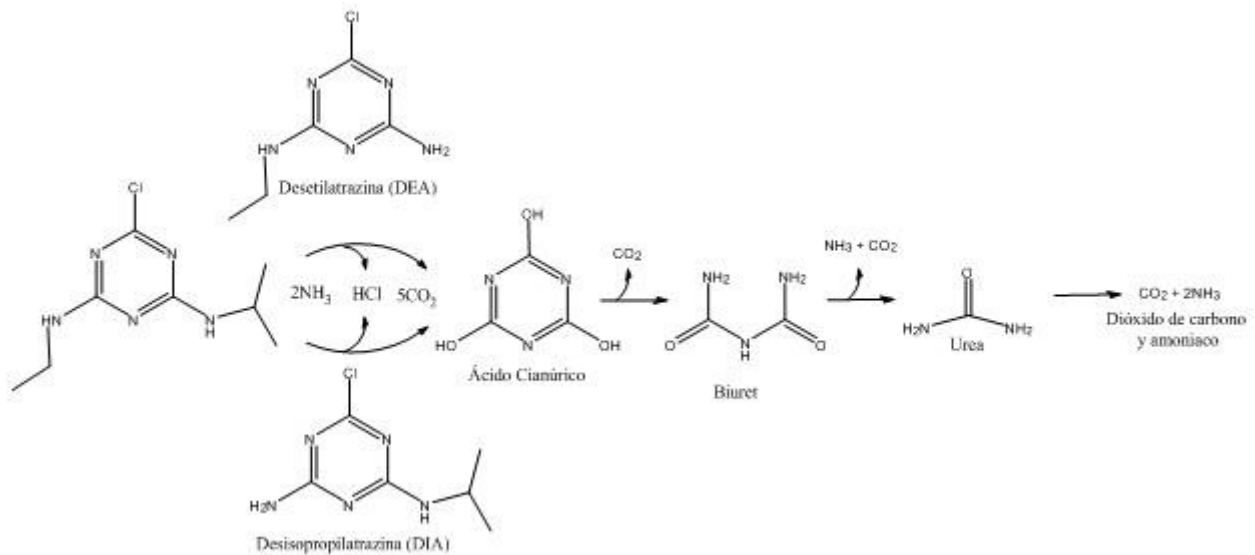


Figura 3. Degradación biológica y mineralógica de atrazina [2].

Los microorganismos pueden metabolizar diferentes tipos de moléculas dependiendo de la disponibilidad de algunos sustratos específicos en su entorno. Los genes involucrados en la degradación de atrazina se localizan en distintas regiones de los plásmidos bacterianos, donde el ADN es poco estable. Si el microorganismo se desarrolla en un medio libre de atrazina, el fragmento genético puede perderse y el microorganismo queda inhabilitado para metabolizar la atrazina [4].

En la vía principal de degradación de la atrazina, la estructura del anillo triazínico no se modifica debido a su alta estabilidad, por ello, dicha estructura permanece en los productos de degradación de esta vía metabólica [7].

La expresión de los genes de degradación es inducida por el ácido cianúrico e inhibida por la fuente preferente de nitrógeno [2], por lo tanto, la degradación de la atrazina se condiciona por la biodisponibilidad de algunos nutrientes.

2.3.5. Productos de degradación hidrolítica, biológica y mineralógica de atrazina

Los productos de degradación de la atrazina (*Figura 4*) son la desetilatrastina (DEA), hidroxiatrazina (HA), desisopropilatrastina (DIA), diaminocloroatrastina (DAC), 2-dialquilhidroxiatrazina, desetilhidroxiatrazina (DEHA) y desisopropilhidroxiatrazina (DIHA) [7].

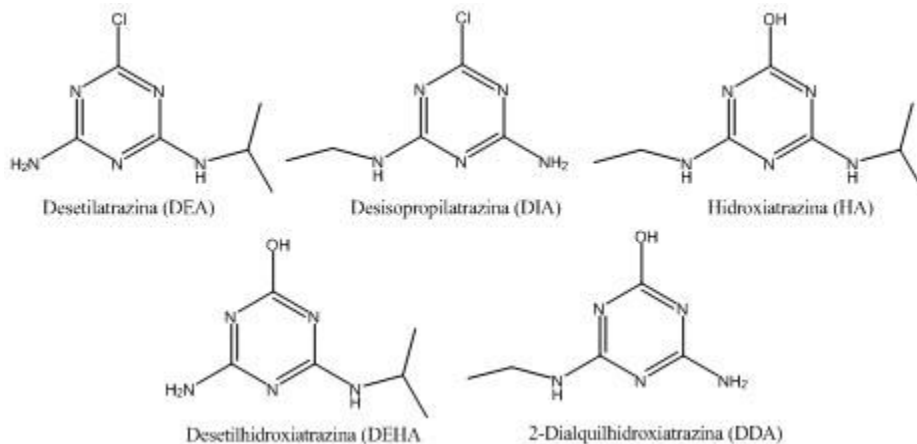


Figura 4. Principales productos de la degradación atrazina.

2.3.6. Riesgos toxicológicos y ecotoxicológicos de la atrazina.

Algunas investigaciones han demostrado que la actividad química de los herbicidas puede afectar procesos genéticos o enzimáticos en algunos seres vivos. Por lo anterior, dichos compuestos puede ser promutagénicos y cancerígenos en los seres vivos, incluyendo al ser humano [4].

Los efectos por exposición crónica o eventual a la atrazina pueden incluir desde la irritación cutánea y de las mucosas, así como infertilidad, desórdenes hormonales y malformaciones en bebés.

En ese mismo contexto, la atrazina puede afectar la fauna silvestre, ocasionando hermafroditismo en algunos organismos como las ranas [2].

El riesgo ecotoxicológico por contaminación con atrazina y sus derivados (desetilhidroxiatrazina y desisopropilhidroxiatrazina), radica principalmente en el desequilibrio en la cadena trófica, ya que reducen la población de fitoplancton y zooplancton, afectando las especies que se alimentan de estos microorganismos. En consecuencia, el impacto sobre estas poblaciones, puede causar la disminución significativa de algunas especies de peces [8].

Desde el año 2003, la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (USEPA), realiza un programa de monitoreo en cuencas hidrológicas con riesgo de contaminación por atrazina. Durante este programa, se garantizó que una concentración promedio de atrazina de 10 ppb durante 60 días, no provoca cambios en la estructura, función y productividad de la biodiversidad de plantas acuáticas [8].

En ese mismo año, la USEPA presentó un reporte al Panel Asesor Científico de la Ley Federal de Insecticidas, Fungicidas y Rodenticidas (FIFRA-SAP), sobre la evaluación del cáncer de próstata en los trabajadores expuestos a la atrazina. En dicho reporte, se declaró que el aumento observado en los índices del antígeno prostático específico (APE) en análisis clínicos, podría ser causado por la exposición a este herbicida [8]. Los resultados descritos se basaron en estudios previos del SAP sobre la influencia hormonal de la atrazina en ratas y su posible efecto neoplásico en las glándulas mamarias.

En el año 2011, el SAP concluyó que la actividad cancerígena de la atrazina sobre los seres humanos era improbable, a pesar de las publicaciones sobre el riesgo por exposición, su relación con el cáncer y los Estudios de Salud Agrícola (AHS). El SAP declaró que la totalidad de las pruebas realizadas no respaldan una teoría que correlacione algunos tipos de cáncer humano con la exposición a la atrazina [8].

En el año 2012, Andreotti y colaboradores estudiaron la posible variación genética del metabolismo de los lípidos y el riesgo de contraer cáncer de próstata por exposición a la atrazina y algunos plaguicidas. En la investigación, se obtuvo una correlación positiva y

significativa entre el riesgo de presentar cáncer de próstata y la exposición a la atrazina [8].

Por otro lado, Garcia-Perez y colaboradores estudiaron la correlación entre la leucemia infantil y la exposición a la atrazina. El estudio demostró que los residentes de una población cercana a una productora de atrazina (2.5 km) presentó mayor incidencia en leucemia infantil [8].

Diversos estudios han demostrado que la atrazina produce cambios en el material genético o la actividad enzimática de plantas y/o animales, provocando mutaciones. La actividad promutagénica y genotóxica de este compuesto se ha comprobado mediante pruebas *in-vitro* con extractos vegetales o en cultivos tisulares de plantas [4].

2.3.7. Legislación para el uso de atrazina

Debido a la contaminación de recursos hídricos superficiales y subterráneos por el uso de atrazina, la Organización Mundial de la Salud (WHO), la USEPA y los países de la Unión Europea, han establecido límites permitidos de esta sustancia en el agua para consumo humano [11].

En el año 1977, la USEPA promulgó una ley donde estableció que una concentración máxima de atrazina de 3 ppb en el agua potable, no representaba un riesgo a la salud de las personas [9].

Algunos países como Dinamarca y Suecia han prohibido el uso de atrazina con base en las evidencias científicas sobre los efectos nocivos, así como el impacto ecológico. En países como Holanda, Reino Unido, EUA y Australia, el uso de la atrazina está restringido o prohibido [10].

En México, la NOM-127-SSA-1994 establece los límites de calidad y los procesos para la potabilización del agua. En este documento se regulan los herbicidas con mayor riesgo toxicológico, bioacumulación y/o movilidad, sin embargo, la atrazina no se encuentra en la lista de regulación.

Desde el año 2007, existe un proyecto de norma (NOM-XXXX, Agua para uso y consumo humano. Límites máximos permisibles de la calidad del agua, control y vigilancia de los sistemas de abastecimiento), en el cual se establecen los límites para algunos herbicidas

incluyendo la atrazina, sin embargo, el documento permanece como un anteproyecto de norma [1]. Al igual que México, otros países como Brasil, Argentina y Chile, no regulan el uso de la atrazina.

Determinación de atrazina y sus metabolitos en matrices ambientales

La tendencia clásica para el análisis de triazinas involucra extracciones líquidas exhaustivas con grandes volúmenes de disolventes orgánicos y los extractos resultantes deben limpiarse para disminuir el número de interferencias que puedan afectar el análisis. Posteriormente, la detección de las triazinas se efectúa por técnicas cromatográficas como la cromatografía de gases y la cromatografía de líquidos con fase reversa.

Las principales técnicas de análisis para la determinación de triazinas son cromatografía de líquidos (HPLC) y cromatografía de gases (GC). En HPLC, los detectores más utilizados son los de ultravioleta-visible (UV-VIS) y de arreglo de diodos (DAD). Con el avance tecnológico, se ha podido hacer el acoplamiento de la cromatografía de gases o líquidos con espectrómetros de masas (HPLC-MS y GC-MS), siendo estas técnicas las más utilizadas para el análisis de triazinas debido a su selectividad y sensibilidad [3].

2.4. Cromatografía de gases (GC).

La cromatografía de gases es una técnica analítica para separar los componentes de una muestra en fase de vapor. En esta técnica, los analitos son transportados por la fase móvil (gas acarreador) hacia una columna que contiene la fase estacionaria, donde los componentes se separan con base en su presión de vapor y solubilidad en la fase estacionaria [12].

Un cromatógrafo de gases está conformado por seis partes generales: fase móvil, regulador de flujo, inyector, horno (columna), detector y sistema de registro.

2.4.1. Gas acarreador

El gas acarreador es un gas inerte de alta pureza (99.995 %) que transporta a los analitos a través de la columna y provee una matriz adecuada para la detección de los componentes.

Los gases que se utilizan como fase móvil son: hidrógeno, helio, argón o nitrógeno.

2.4.2. Reguladores de flujo

La presión de los gases se controla mediante reguladores de flujo y manómetros instalados a la salida de los tanques y en la entrada del cromatógrafo. La presión del gas a la entrada del cromatógrafo varía de 10 a 150 psi dependiendo del tipo de cromatógrafo. El flujo de gas debe ser continuo y controlado para el adecuado funcionamiento del inyector, la columna y el detector que se utilice.

2.4.3. Inyector

El inyector es el dispositivo por donde se introduce la muestra, utilizando una microjeringa o un automuestreador. La muestra se vaporiza por vía térmica y los componentes se transfieren hacia la columna por la presurización y flujo del gas acarreador.

Las muestras que se analizan por cromatografía de gases deben ser volátiles y termoestables, sin embargo, la temperatura del inyector debe ajustarse para inducir la vaporización instantánea de la muestra sin provocar su descomposición.

El inyector con división y sin división de flujo (Split/Splitless) es el más utilizado en cromatografía de gases. En el modo Split, la muestra vaporizada se divide en dos fracciones, donde la fracción menor entra a la columna y la fracción mayor es expulsada por la válvula de purga (Split).

La fracción de la muestra que entra a la columna, se calcula mediante la relación de split (cociente del flujo del split entre el flujo de la columna). Dicho cálculo indica la fracción de la muestra que entra a la columna, dependiendo de los flujos de gas en el inyector. Este modo de inyección se utiliza para muestras concentradas.

En el modo Splitless, la válvula de purga se cierra (por un tiempo determinado, “tiempo de splitless”) y la muestra se inyecta. En consecuencia, una mayor fracción de la muestra entra a la columna. Después del tiempo de splitless, la válvula de purga se abre para eliminar los residuos de la muestra que quedan en el inyector. Este modo de inyección se utiliza para muestras diluidas o poco concentradas.

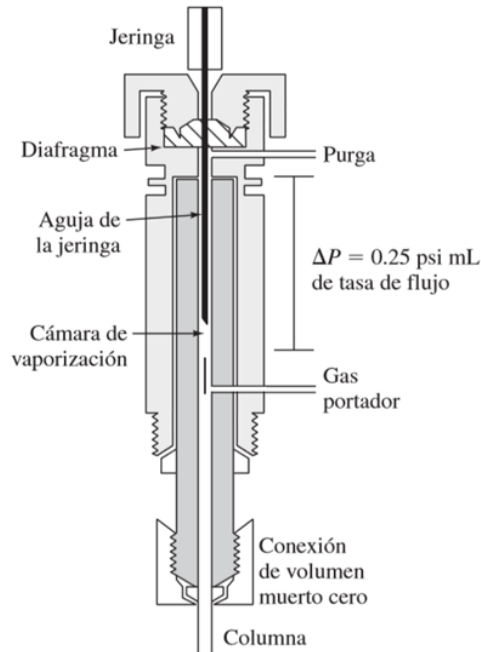


Figura 5. Sistema de inyección [12].

2.4.4. Columna y Horno.

Las columnas para cromatografía de gases se clasifican en empacadas y capilares. Las columnas capilares están fabricadas de sílice fundida o vidrio y su longitud varía desde 5-100 m. Los diámetros internos son de 0.2 - 0.6 mm y tienen un grosor de fase estacionaria de 0.2 - 40 μm . La fase estacionaria puede recubrir la pared interna de la columna (WCOT) o puede estar funcionalizada en un soporte dentro de la columna (SCOT). Existen otro tipo de columnas cuya fase estacionaria es un material poroso (PLOT).

La columna se encuentra dentro del horno, el cual tiene un control de temperatura. Durante el análisis, la temperatura de la columna es importante, ya que influye en la separación de los componentes y la elución de los analitos. El horno puede programarse para efectuar un análisis en modo isotérmico o con programa de temperatura. El análisis

en modo isotérmico se elige cuando los componentes de la muestra tienen puntos de ebullición similares. Por otro lado, el análisis con programa de temperatura se elige cuando los puntos de ebullición de los componentes son diferentes. El programa de temperatura puede efectuarse de manera lineal o por segmentos.

2.4.5. Acoplamiento de cromatografía de gases a espectrometría de masas (GC-MS).

Existen múltiples detectores para un cromatógrafo de gases, sin embargo, el acoplamiento con un espectrómetro de masas provee de una técnica analítica híbrida selectiva y específica.

En un sistema acoplado (GC-MS), la muestra es vaporizada en el inyector, separada en la columna y transferida al espectrómetro de masas mediante una línea de transferencia a alta temperatura.

La espectrometría de masas es una técnica microanalítica donde las moléculas se ionizan por métodos químicos, eléctricos o de radiación. La ionización de las moléculas induce su fragmentación y los iones fragmento producidos se dirigen (mediante campos electromagnéticos) hacia el analizador másico, donde se separan con base en una relación de masa y carga (m/z). Posteriormente, los iones son detectados y la señal se traduce a una corriente eléctrica. La tabulación de las m/z detectadas originan al espectro de masas [13].

Los métodos de ionización más comunes para la cromatografía de gases-espectrometría de masas son la electroionización y la ionización química.

En la electroionización (EI), los analitos se someten a una descarga de electrones de alta energía, la cual se produce por un filamento caliente de tungsteno o renio. Los iones fragmento formados se propulsan hacia el analizador másico, donde se separan con base en la m/z .

En los espectros obtenidos por EI, la fragmentación es crítica y exhaustiva, por lo que la abundancia relativa del ión molecular puede ser baja o nula.

Los principales modos de trabajo en espectrometría de masas son el barrido total de iones (SCAN) y el monitoreo selectivo de iones (SIM). En el modo SCAN, se selecciona un intervalo de m/z para la detección. El espectro de masas se obtiene a partir del

cromatograma iónico total (TIC), en el que se determina el tiempo de retención del analito. Por otra parte, en el monitoreo selectivo de iones (SIM), el barrido se especifica para algunos iones característicos del analito, obteniendo un análisis más sensible [13]. Por su gran especificidad y selectividad, la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) es una de las mejores herramientas para el análisis de contaminantes orgánicos a nivel de trazas ($\mu\text{g L}^{-1}$) [3]. La *Figura 6* muestra un esquema general de un cromatógrafo de gases acoplado a espectrometría de masas (GC-MS).

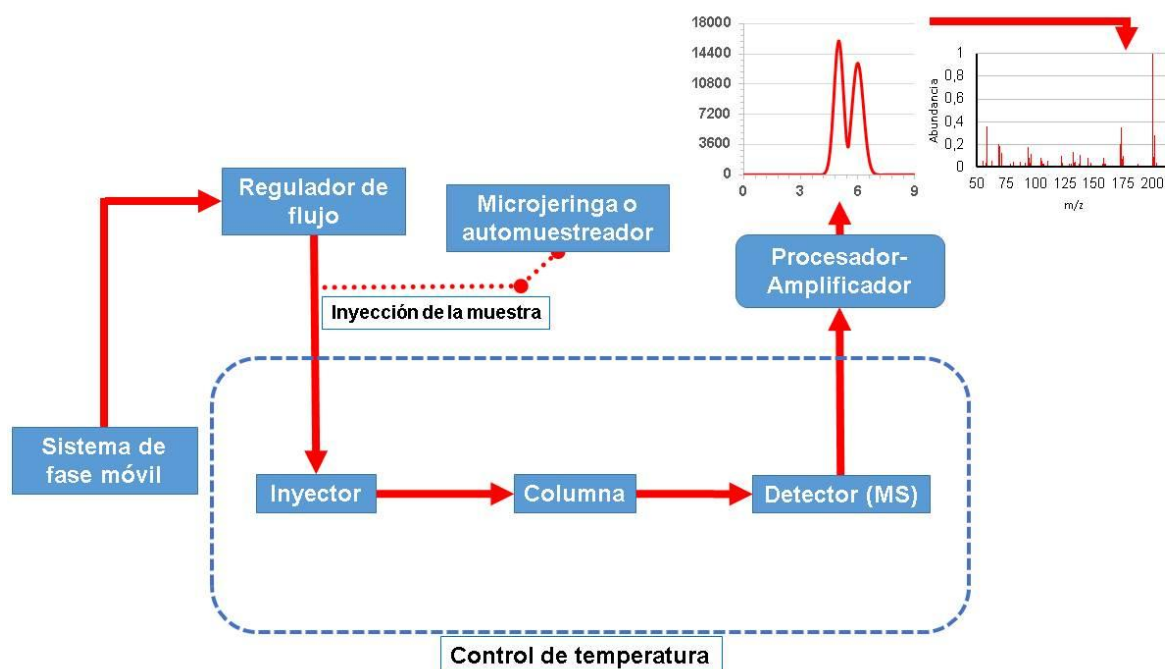


Figura 6. Cromatógrafo de gases acoplado a espectrómetro de masas

2.5. Microextracción en fase sólida (SPME)

El análisis de muestras ambientales representa un reto analítico debido a múltiples factores como el muestreo, la extracción, la purificación, la concentración y la detección. Por tal motivo, el desarrollo tecnológico de la preparación de muestra se han enfocado a resolver los problemas metodológicos.

La microextracción en fase solida (SPME) es una técnica miniaturizada de preparación de muestra que utiliza una fibra de sílice fundida recubierta de una fase extractora

polimérica. La SPME es una técnica libre de disolventes y conjunta la extracción, el aislamiento, la limpieza y la concentración del analito en una sola etapa.

La SPME es una técnica no exhaustiva, donde sólo una fracción del analito es extraída y es proporcional a una concentración.

Una ventaja importante de las extracciones no exhaustivas es que permiten el monitoreo de cambios químicos, equilibrios de distribución y especiación en las muestras. En este tipo de técnicas, la caracterización del sistema es más precisa en comparación con técnicas exhaustivas, ya que la muestra conserva sus propiedades. Otras ventajas de la SPME son la selectividad de la extracción, la disminución del tiempo de preparación de muestra y una menor operación manual (técnica semiautomática).

La SPME fue diseñada para ser compatible con cromatografía de gases y cromatografía de líquidos (GC), ya que la desorción de los analitos puede efectuarse por vía térmica o líquida, directamente el sistema de introducción de muestra.

La tecnología de la SPME ha permitido desarrollar múltiples dispositivos, los cuales se muestran en la *Figura 7* [14].

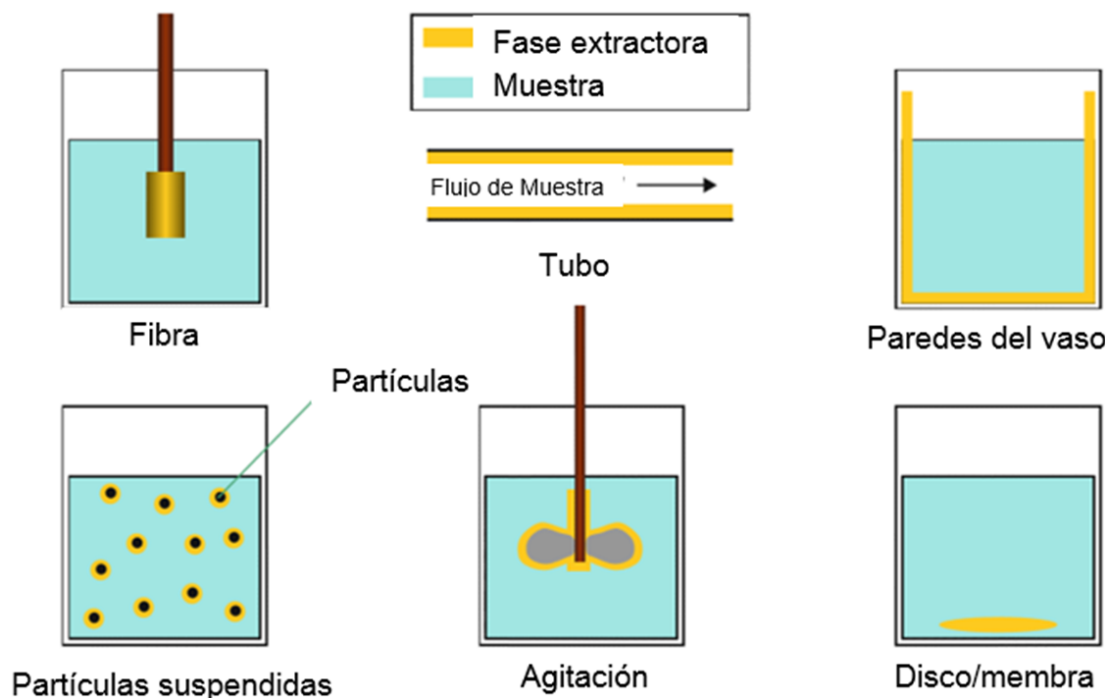


Figura 7. Dispositivos basados en la SPME [14].

3. OBJETIVO

Desarrollar y optimizar un método por microextracción en fase sólida-cromatografía de gases-espectrometría de masas (SPME-GC-MS) para la determinación de atrazina en agua residual.

3.1. Objetivos particulares

1. Validar el método desarrollado para el análisis de atrazina a nivel de trazas ($\mu\text{g L}^{-1}$) en agua residual.
2. Aplicar el método validado a muestras de agua residual obtenidas de la planta de tratamiento de agua de Ciudad Universitaria, UNAM, México.

4. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad, existe la necesidad de determinar atrazina en muestras acuosas ambientales debido a sus potenciales efectos nocivos sobre los organismos acuáticos y los seres vivos.

En respuesta a dicha demanda, en este proyecto se propuso el desarrollo de un método analítico rápido, sencillo, sensible y ecológico para la determinación de atrazina en muestras acuosas complejas.

5. DESARROLLO EXPERIMENTAL

5.1. Reactivos

- Estándar de atrazina grado analítico, SIGMA-ALDRICH: #49085, Lot. LRAB7719 (Estados Unidos)
- Cloruro de sodio (90 %), J.T.BAKER (Estados Unidos)
- Ácido clorhídrico (37 %), J.T.BAKER (Estados Unidos)
- Metanol anhidro (99.5 %), J.T.BAKER (Estados Unidos)
- Agua Tipo 1 (Milli-Q)

5.2. Materiales

- Matraces volumétricos Tipo A, PYREX: 10, 50, 100 mL
- Vasos de precipitados, PYREX: 10, 50, 100, 500 mL
- Cristalizador, PYREX: 70 x 45 mm
- Micropipetas de volumen variable, DRAGONLAB y HAMILTON: 0.1 – 1.0, 0.2 – 2.0, 2 – 10 mL (China y Estados Unidos)
- Viales de vidrio con tapón horadado y septa de PTFE (teflón): 15 mL
- Dispositivo manual para SPME (Holder), SUPELCO (Estados Unidos)
- Fibras de poliacrilato para SPME (PA) de 85 μm , SUPELCO (Estados Unidos)
- Microjeringa, THERMO: 10 μL (Australia)

5.3. Aparatos

- Parrillas de agitación magnética SCIOLOGEX MS-H-S y Barnstead|Thermolyne SUPER-NUOVA
- Balanza analítica, OHAUS, Analytical Plus (Estados Unidos)

5.4. Lavado de material de vidrio

El material de vidrio se lavó con agua del grifo y jabón neutro. Posteriormente, se realizó un enjuague con agua desionizada y previo al uso se lavó con metanol anhidro.

5.5. Condiciones cromatográficas

<i>Cromatógrafo de gases-espectrómetro de masas.</i>	HP 5890 SERIE II Plus acoplado a un detector selectivo de masas Agilent 5973 Network.
<i>Gas Acarreador</i>	Helio (0.5 mL min ⁻¹)
<i>Temperatura del inyector</i>	280 °C
<i>Tipo de inyección</i>	Splitless (2 min)
<i>Columna</i>	Capilar de sílice fundida de SLB™-5ms de 20 m (0.18 mm D.I., 0.18 µm grosor de película)
<i>Programa de temperatura</i>	50 °C (1 min), 12.5 °C min ⁻¹ hasta 300 °C, 300 °C (4 min). Tiempo total de análisis: 25 min
<i>Temperatura de la línea de transferencia</i>	280 °C
<i>Temperatura de la fuente de ionización</i>	230 °C
<i>Temperatura del cuadrupolo</i>	150 °C
<i>Retardo del disolvente</i>	5 min
<i>Barrido total de iones (SCAN)</i>	50-500 uma
<i>Iones fragmento característicos (SIM)</i>	200 y 215 m/z

5.6. Muestra de agua residual

La muestra de agua residual se obtuvo de la planta de tratamiento de Ciudad Universitaria, UNAM, Ciudad de México (19°20'00.7"N, 99°10'41.5"O).

500 mL de agua residual se filtraron con membrana de nylon (0.45 µm) y se le adicionaron 100 µL de cloroformo como conservador.

5.7. Identificación de la atrazina por GC-MS

Para la identificación del analito se preparó una disolución estándar de atrazina a 14 ppm en metanol. De la disolución anterior se inyectó 1 µL al cromatógrafo de gases.

5.8. Temperatura del inyector para la identificación de la atrazina

En un cromatógrafo de gases, la temperatura del inyector debe ser suficientemente elevada para que la muestra se volatilice sin descomponerse.

La respuesta analítica de la atrazina se evaluó modificando la temperatura del inyector. Para ello, se inyectó 1 µL de la disolución estándar de atrazina, a dos temperaturas del inyector: 180 y 280 °C.

5.9. Diseño experimental factorial 2³ para la SPME de atrazina en agua

Las variables que afectan a la SPME se estudiaron mediante un diseño experimental lineal 2³. Las variables estudiadas fueron pH del medio de extracción, el porcentaje de cloruro de sodio (% NaCl) y la temperatura de extracción. Cada variable se estudió a 2 niveles de magnitud; la *Tabla 1* muestra el diseño experimental y los niveles estudiados para cada variable de la SPME.

Tabla 1. Diseño experimental factorial lineal 2³ para la SPME de atrazina en agua.

Experimento	pH	% NaCl	Temperatura (°C)
1	Sin ajustar	0	25
2	Sin ajustar	0	40
3	Sin ajustar	30	25
4	Sin ajustar	30	40
5	3	0	25
6	3	0	40
7	3	30	25
8	3	30	40

Para el diseño experimental se mantuvieron constantes las variables: tiempo de extracción (30 min), agitación (1200 rpm), volumen de muestra (10 mL) y porcentaje de metanol en la disolución (2%).

La disolución estándar de atrazina para el diseño experimental, se preparó a 50 ppb en agua:metanol 98:2 % v/v.

5.10. Ajuste de pH, % NaCl y temperatura de extracción

El ajuste de pH se realizó con ácido clorhídrico 2 N, efectuando las diluciones correspondientes hasta un pH final de 3.

La disolución al 30 % de NaCl se preparó adicionando aproximadamente 1 g de sal por cada 10 mL de disolución.

Para el control de la temperatura de extracción, se utilizó un cristizador con agua desionizada, el cual se calentó con una parrilla de agitación magnética.

5.11. Optimización del porcentaje de NaCl

La adición de una sal inerte puede favorecer la extracción de los analitos en la SPME [15]; el efecto de la adición de NaCl se estudió a 30, 45, 60, 75 y 90 % sobre la saturación en agua pura (36 g de NaCl/100 mL).

5.12. Temperatura del medio de extracción

La temperatura del medio de extracción puede afectar la cinética de la extracción y la transferencia de masa hacia la fase extractora de la SPME [15]. Con base en lo anterior, el efecto de la temperatura de extracción se evaluó a 25, 40 y 60 °C.

5.13. Porcentaje de metanol

El uso de disolventes orgánicos, puede afectar la solubilidad y la transferencia de los analitos hacia la fase extractora [15]. Por este motivo, se estudió el efecto del porcentaje de metanol a 1, 3 y 5 % V/V.

5.14. Tiempo de extracción

El tiempo de extracción se elige con base en una necesidad metodológica específica, aunque estrictamente corresponde al tiempo que tardan en equilibrarse las velocidades de transferencia de masa del analito entre la fase extractora y la muestra [15]. En este trabajo se estudiaron los tiempos de extracción a 30, 60 y 90 min.

5.15. Condiciones seleccionadas para el análisis de atrazina en agua desionizada fortificada

A una alícuota de 10 mL de agua se le adicionan 100 µL de MeOH y 3.3 g de NaCl (sin ajustar pH); la mezcla se agita a 1200 rpm y se analiza por SPME de inmersión a 40 °C durante 30 min. La desorción del analito se realiza en el inyector del cromatógrafo a 280 °C durante 2 min.

5.16. Análisis de atrazina en agua por SPME-GC-MS: Validación del método

5.16.1. Límite de detección y límite de cuantificación

Los límites de detección y cuantificación se determinaron con una disolución estándar de atrazina, cuya respuesta analítica correspondiera a 3 y 10 veces la relación señal/ruido de la línea base respectivamente.

5.16.2. Curva estándar de atrazina

A partir de una disolución madre de 5 ppb, se preparó una curva estándar de 6 puntos (n = 3) en un intervalo de 0.3 a 3 ppb. El punto inicial de la curva correspondió al límite de cuantificación de la atrazina (0.3 ppb).

Las disoluciones estándar preparadas se muestran en la *Tabla 2*.

Tabla 2. Estándares para la curva de calibración de atrazina.

<i>Estándar</i>	<i>Disolución Madre (mL)</i>	<i>Volumen aforo (mL)</i>	<i>Concentración (ppb)</i>
1	3.0	50	0.30
2	8.4	50	0.84
3	13.8	50	1.38
4	19.2	50	1.92
5	24.6	50	2.46
6	30.0	50	3.00

5.16.3. Gráfico de residuales

Con las áreas cromatográficas de las curvas de calibración, se construyó un gráfico de residuales en función de la concentración de atrazina. El cálculo de los residuales se realizó de la siguiente manera:

$$e = y - y^*$$

Donde:

e = residual

y = área cromatográfica experimental (observado)

y^* = área cromatográfica calculada con la regresión lineal (predicho)

5.16.4. Precisión

La precisión se evaluó a 0.7, 1.7 y 2.7 ppb. Para cada concentración se calculó el coeficiente de variación. Los niveles evaluados se eligieron dentro del intervalo de la curva de calibración.

5.16.5. Porcentaje de recobro

El porcentaje de recobro se evaluó en los mismos niveles de concentración que la precisión (0.7, 1.7 y 2.7 ppb). Para cada concentración se calculó el coeficiente de variación.

5.17. Análisis de agua residual de la planta de tratamiento de Ciudad Universitaria, UNAM

5.17.1. Blanco de reactivos

Previo al análisis de agua residual, se realizaron los blancos de agua desionizada y agua desionizada con NaCl para evaluar la selectividad de la determinación y corroborar la ausencia del analito.

5.17.2. Blanco de agua residual

30 mL de agua residual se transfirieron a un matraz volumétrico de 100 mL, el cual se llevó al aforo con agua desionizada. De esta disolución se tomó una alícuota de 10 mL y se analizó en las condiciones descritas en el apartado 5.14.

5.17.3. Comparación del análisis de atrazina en agua desionizada y agua residual

Los análisis de agua desionizada y agua residual fortificadas con atrazina (1 ppb), se compararon para estudiar el efecto de matriz en la determinación (n=3).

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Identificación de atrazina por cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS)

El cromatograma por corriente total de los iones (TIC) es el gráfico que representa la suma de las abundancias de los iones detectados en función del tiempo. El pico cromatográfico de la atrazina se identificó a un tiempo de retención de 13.15 min; no se identificaron interferencias en la disolución estándar.

La *Figura 8* muestra el cromatograma por SCAN de la disolución estándar de atrazina a 14 ppm.

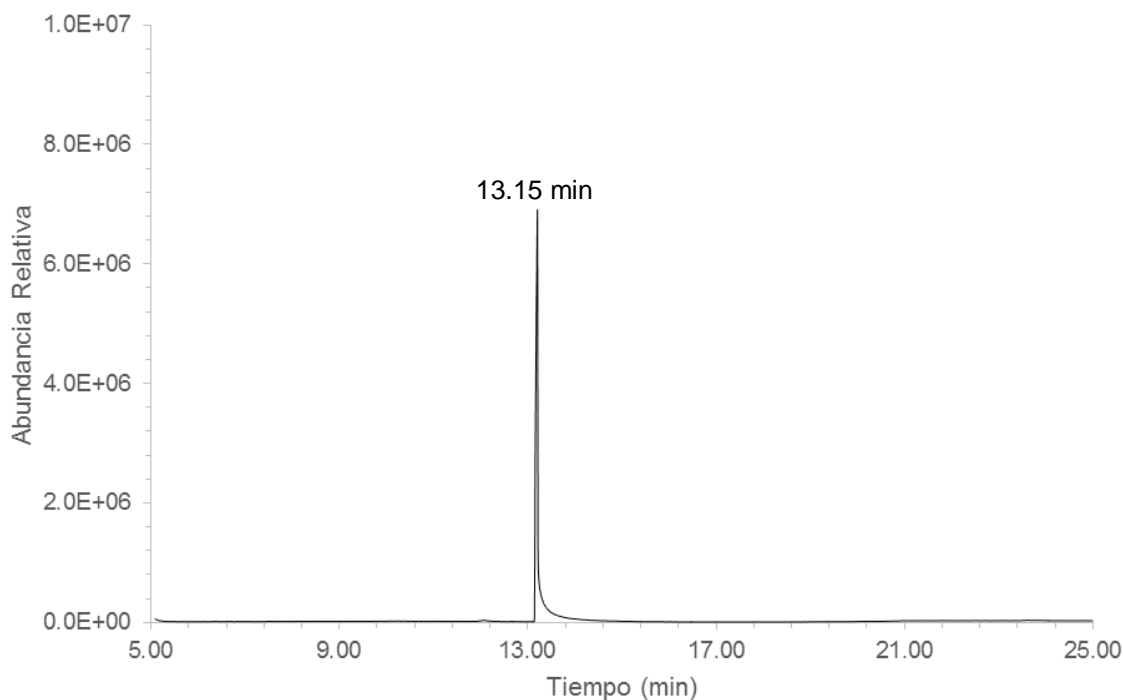


Figura 8. Cromatograma por corriente total de los iones (TIC) del análisis de la disolución estándar de atrazina a 14 ppm.

A partir del pico cromatográfico, se obtuvo el espectro de masas de la atrazina y se identificaron los fragmento característicos.

Los iones con mayor abundancia fueron las relaciones de masa/carga (m/z): 58, 173, 200, 202 y 215. El ion molecular $[M^+]$ y el pico base fueron las m/z 215 y 200 respectivamente.

Debido a que la molécula de atrazina presenta un cloro en su estructura se observó la isotopía de ^{35}Cl (m/z 200, 215) y ^{37}Cl (m/z 202, 217).

Por otro lado, la estructura del analito presenta 5 átomos de nitrógeno por lo que el ión molecular $[M^+]$ tuvo un valor impar (m/z 215). En la *Figura 9* se muestra el espectro de masas de la atrazina obtenido por electroionización (EI).

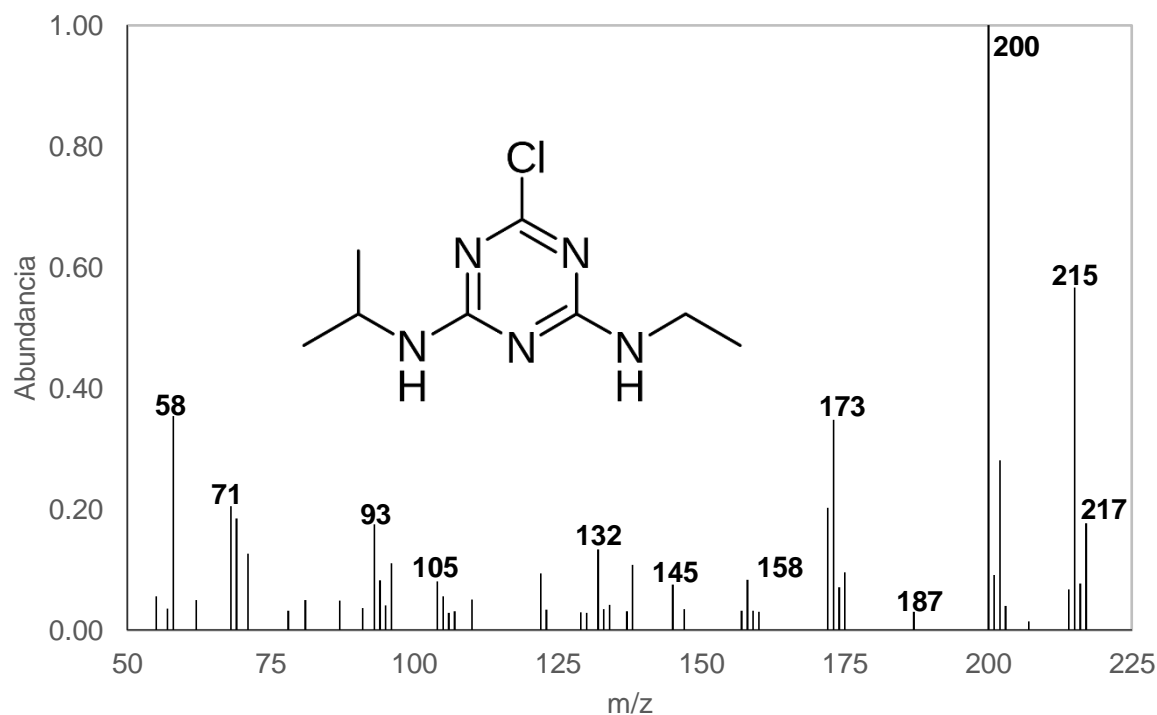


Figura 9. Espectro de masas de la atrazina (EI) a 70 eV.

Para el análisis por monitoreo selectivo de iones (SIM), se seleccionaron los iones de m/z 200 y 215.

6.2. Temperatura del inyector para la detección de la atrazina y temperatura de desorción para la SPME.

Comúnmente los compuestos clorados son susceptibles de descomponerse a altas temperaturas, por ello, se evaluó el efecto de la temperatura del inyector.

La inyección del estándar de atrazina se evaluó a 2 temperaturas del inyector (180 y 280 °C). Dichas temperaturas se eligieron con base en el punto de ebullición de la atrazina (200 °C) y la temperatura de desorción de la fibra de poliacrilato (PA).

Los resultados mostraron que la respuesta analítica de la atrazina disminuyó conforme aumentó la temperatura del inyector, corroborando una posible descomposición del analito cuando la temperatura fue mayor a 180 °C.

Los coeficientes de variación (C.V.) de la inyección directa a 180 y 280 °C fueron de 4.2 y 2.8 % respectivamente, sin embargo, al utilizar SPME y efectuar la desorción térmica a 180 °C, la desorción del analito fue incompleta. Por lo que se decidió aumentar la temperatura del inyector a 280 °C.

El incremento de temperatura del inyector favoreció la desorción y detección de la atrazina en un tiempo de 2 min y no se observó la descomposición del analito. Este hecho podría explicarse considerando que la fase extractora evita la descomposición del analito en condiciones de alta temperatura. Por lo anterior, la temperatura de desorción para la SPME fue a 280 °C.

La *Figura 10* muestra el estudio de la temperatura del inyector para la identificación de atrazina.

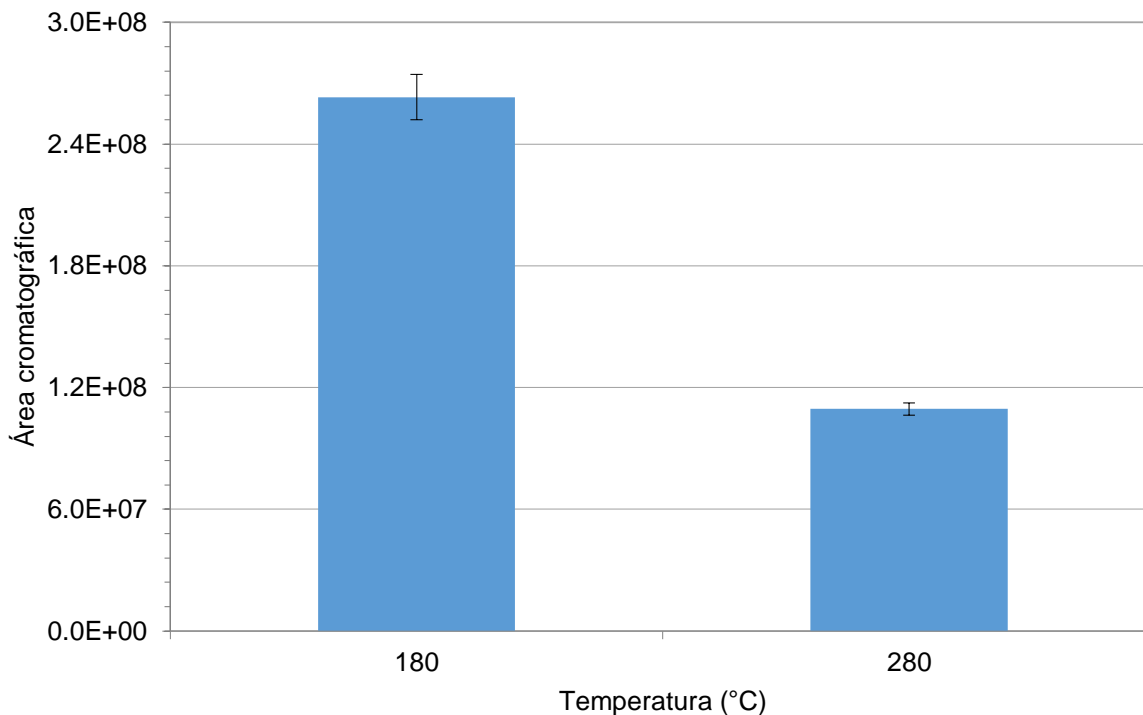


Figura 10. Estudio de la temperatura del inyector, por inyección directa, para la identificación de atrazina.

6.3. Diseño experimental 2³ y diagrama de Pareto

El diagrama de Pareto del diseño experimental (*Figura 11*) mostró que las tres variables estudiadas (% NaCl, temperatura de extracción y pH) influyeron de manera significativa en la SPME de la atrazina. El % de NaCl y la temperatura de extracción tuvieron el mayor impacto en la respuesta del analito. En la *Figura 11*, las barras que sobrepasan el valor del error estándar (línea roja) representan un efecto significativo en la extracción del analito. La coloración azul implica un efecto positivo (aumenta la respuesta analítica), mientras que la coloración naranja representa un efecto negativo (disminuye la respuesta analítica).

También se observó que todas las variables interaccionan en segundo y tercer orden. Las barras “BC, AC y AB” muestran el efecto sinérgico de segundo orden y la barra “ABC” el efecto de tercer orden. Para dichos efectos, el incremento de las variables afecta de manera positiva la extracción.

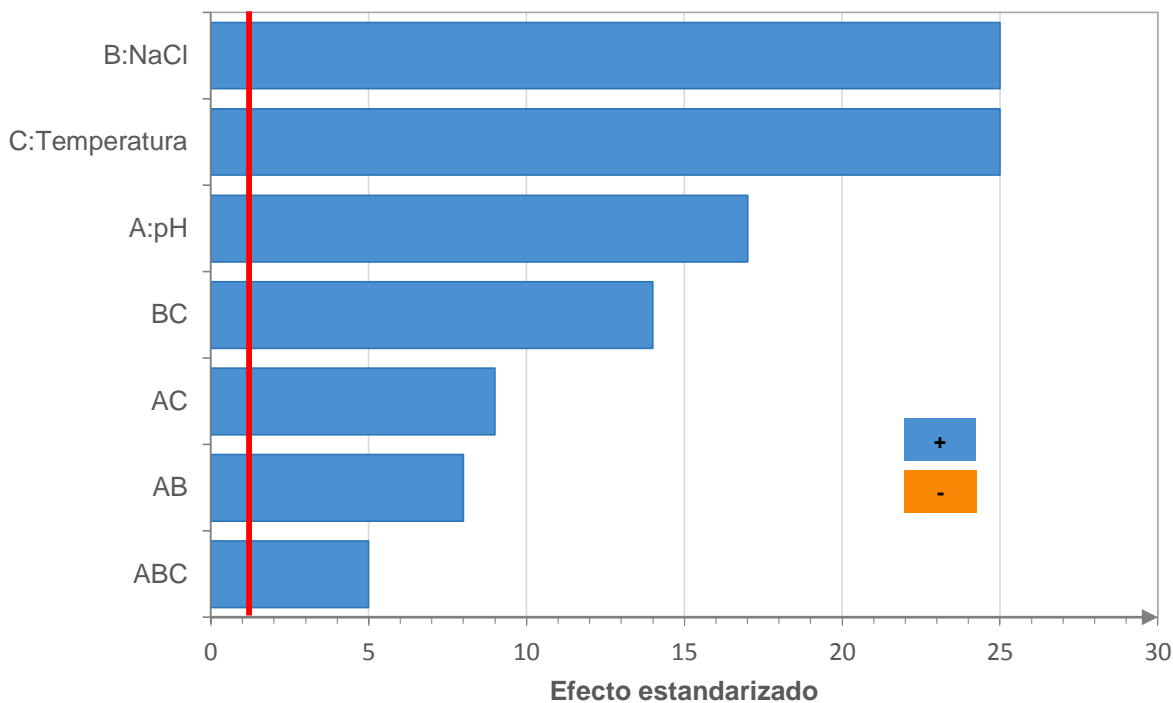


Figura 11. Diagrama de Pareto del diseño experimental factorial 2^3 .

6.4. Superficie de respuesta para la SPME de la atrazina

Con el análisis estadístico del diseño experimental, se calculó la superficie de respuesta para la SPME de atrazina, en la cual se corroboró el efecto sinérgico entre el % de NaCl y la temperatura de extracción. En el diagrama 2D, se observó que la mayor área cromatográfica se obtuvo a un % de NaCl de 30 % y una temperatura de extracción de 40 °C (sin ajustar el pH). El diagrama 3D mostró la tendencia de la respuesta analítica al variar el % de NaCl y la temperatura de extracción.

La ecuación que describe el comportamiento de la superficie se muestra a continuación:

$$\begin{aligned} \text{Área Cromatográfica} = & - 4630.58 - 3979.75 \cdot \text{pH} + 90.5931 \cdot \text{NaCl} + 294.033 \cdot \text{Temperatura} \\ & - 549.24 \cdot \text{pH} \cdot \text{NaCl} + 278.6 \cdot \text{pH} \cdot \text{Temperatura} + 9.93528 \cdot \text{NaCl} \cdot \text{Temperatura} \\ & + 26.0086 \cdot \text{pH} \cdot \text{NaCl} \cdot \text{Temperatura} \end{aligned}$$

La Figura 12 muestra el diagrama de superficie en 2D y 3D obtenido para la extracción de la atrazina.

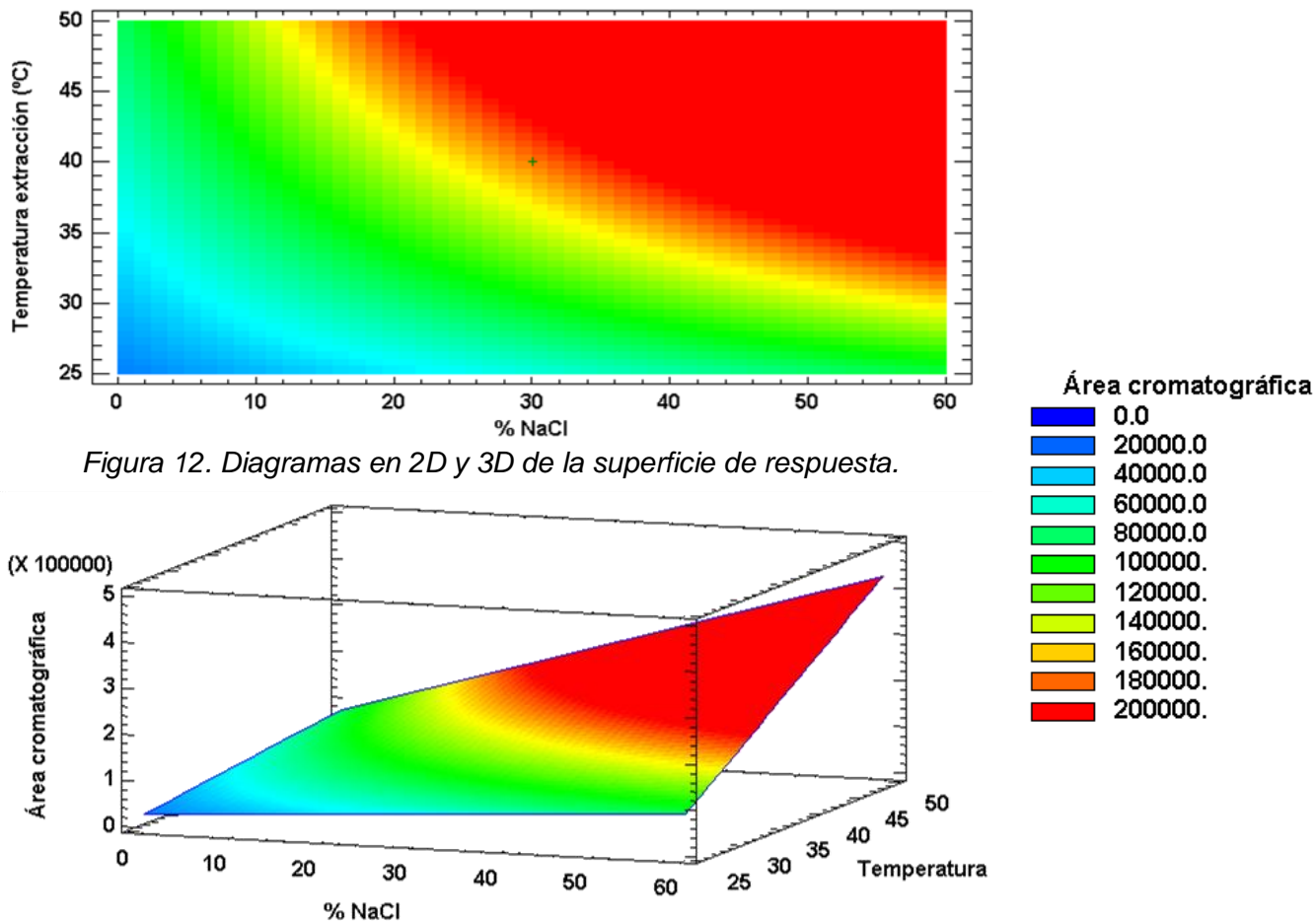


Figura 12. Diagramas en 2D y 3D de la superficie de respuesta.

6.5. Optimización del porcentaje de NaCl para la SPME

El porcentaje de NaCl se estudió a 5 niveles (30, 45, 60, 75 y 90 %) y se construyó el gráfico de área cromatográfica en función del % de NaCl (*Figura 13.a*). Se observó que al adicionar una mayor cantidad de NaCl, el área cromatográfica aumento de manera significativa. La tendencia de respuesta se ajustó a una regresión exponencial, obteniendo una $R = 0.9915$ (*Figura 13.b*).

El área cromatográfica no se evaluó a un % de NaCl mayor al 90 %, ya que la solubilidad del NaCl fue incompleta, dificultando el análisis de la disolución.

En la SPME, la adición de una sal inerte favorece la extracción de los analitos por efecto de “salting out”. Este efecto disminuye la solubilidad de los analitos en el disolvente y promueve su distribución hacia la fase extractora. Por lo anterior, se utilizó un % de NaCl de 90 % para la extracción de analito.

La SPME de atrazina en una disolución al 90 % de NaCl tuvo un coeficiente de variación (C.V.) menor al 7%.

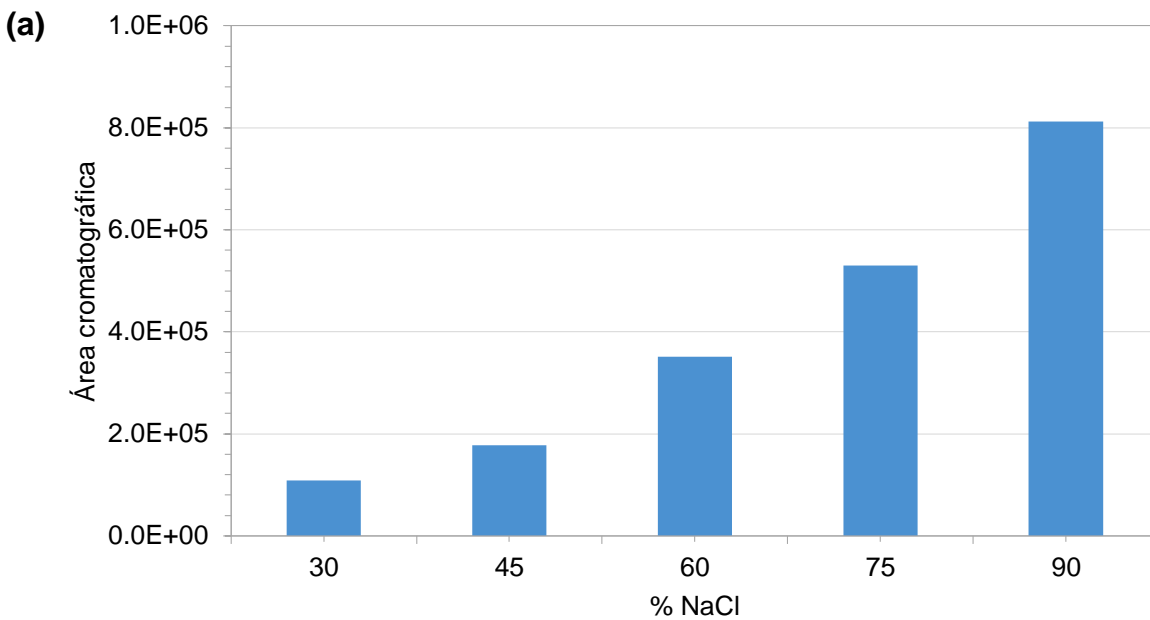


Figura 13. (a) Grafico de barras de la extracción de atrazina al adicionar NaCl.

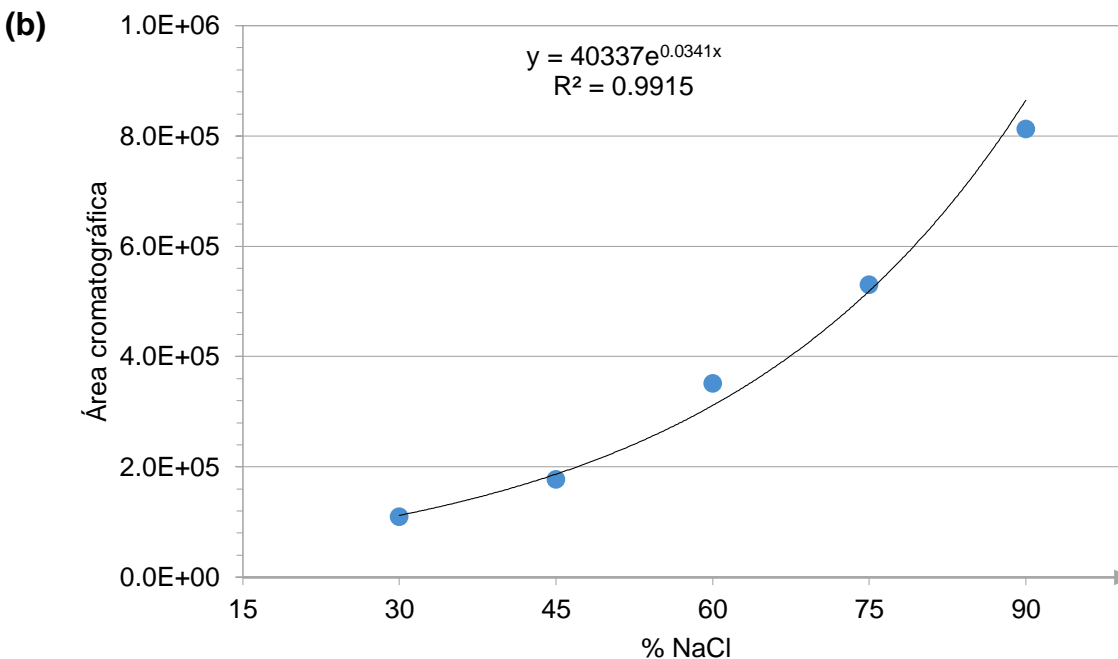


Figura 13. (b) Tendencia exponencial de la extracción de atrazina al adicionar NaCl.

6.6. Interacción del % de NaCl y temperatura de extracción

Como se mencionó, la temperatura de extracción tuvo un efecto sinérgico con el % de NaCl. Por este motivo, la SPME se estudió variando la temperatura de extracción (25, 40 y 60 °C) en una disolución de atrazina al 90 % de NaCl.

El área cromatográfica de la SPME a 40 y 60 °C aumentó en un 43 y 94 % con respecto a la extracción a 25 °C (*Figura 14*). No obstante, mantener la temperatura a 60 °C afecta las propiedades de la disolución, produciendo burbujas y la formación de vapor en el vial, dicho efecto influyó y disminuyó la precisión en la determinación.

Otro aspecto importante, es que la parrilla de agitación debe sobrecalentarse a 95 °C para mantener la temperatura de extracción a 60 °C, por lo que mantener el control de temperatura a dicha condición implicó mayor imprecisión en la determinación y un mayor gasto energético. Con base en lo anterior, se seleccionó como temperatura de extracción 40 °C.

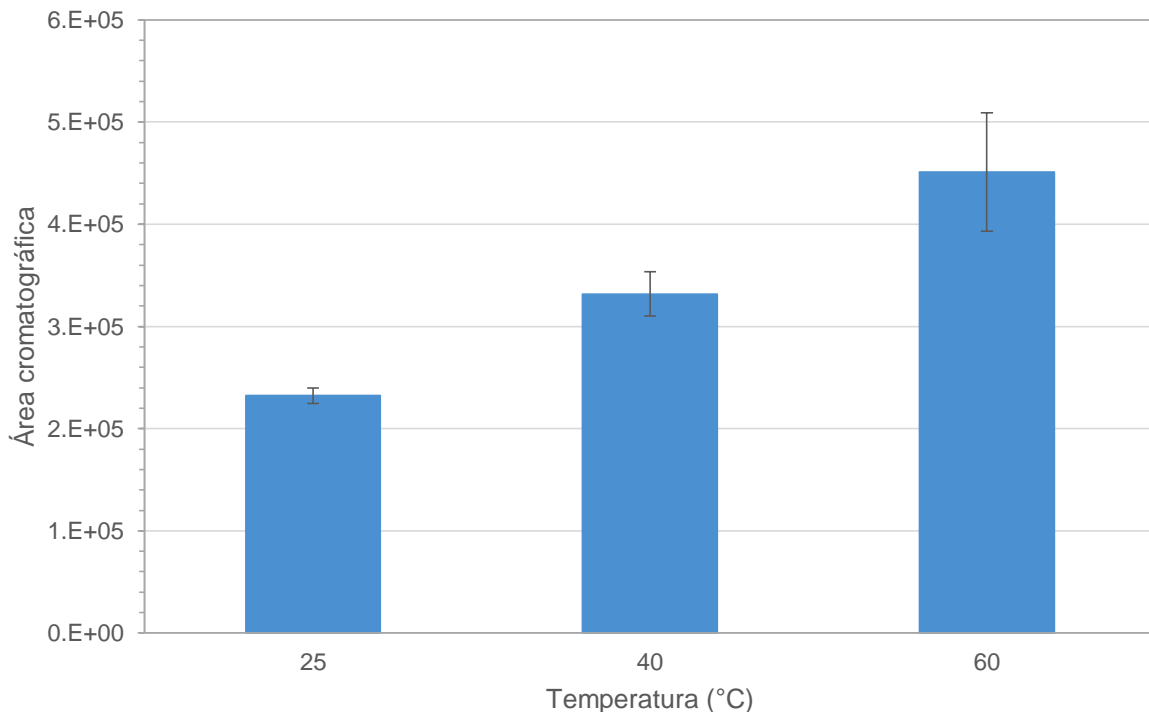


Figura 14. Estudio de la temperatura de extracción para la SPME de atrazina.

6.7. Tiempo de extracción

La SPME a 60 y 90 min aumentó el área cromatográfica en un 48 y 115 % más con respecto a la SPME a 30 min. En la gráfica (*Figura 15*), se observó que el aumento de respuesta entre 30, 60 y 90 min puede ajustarse a un incremento de respuesta lineal.

Se eligió como tiempo de extracción 30 min, ya que la respuesta analítica fue aceptable a dicho tiempo, sin embargo, es posible aumentar el tiempo de extracción para una aplicación específica en la que se requiera una mayor sensibilidad en la determinación.

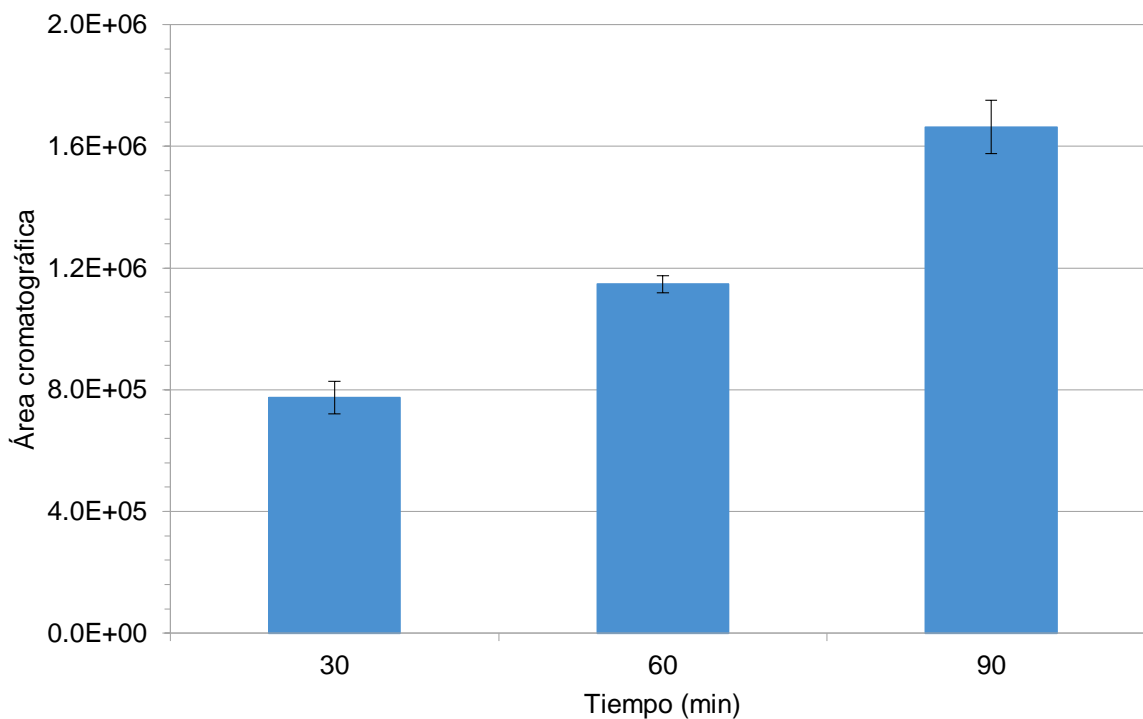


Figura 15. Estudio del tiempo de extracción para la SPME de la atrazina.

6.8. Porcentaje de metanol

El incremento del % de MeOH disminuyó la respuesta cromatográfica. Cuando dicho porcentaje fue mayor al 1 % (3 y 5 %), el área cromatográfica disminuyó en 12 y 24 % respectivamente. Por lo anterior, la SPME se llevó a cabo con el menor porcentaje de metanol (1 %).

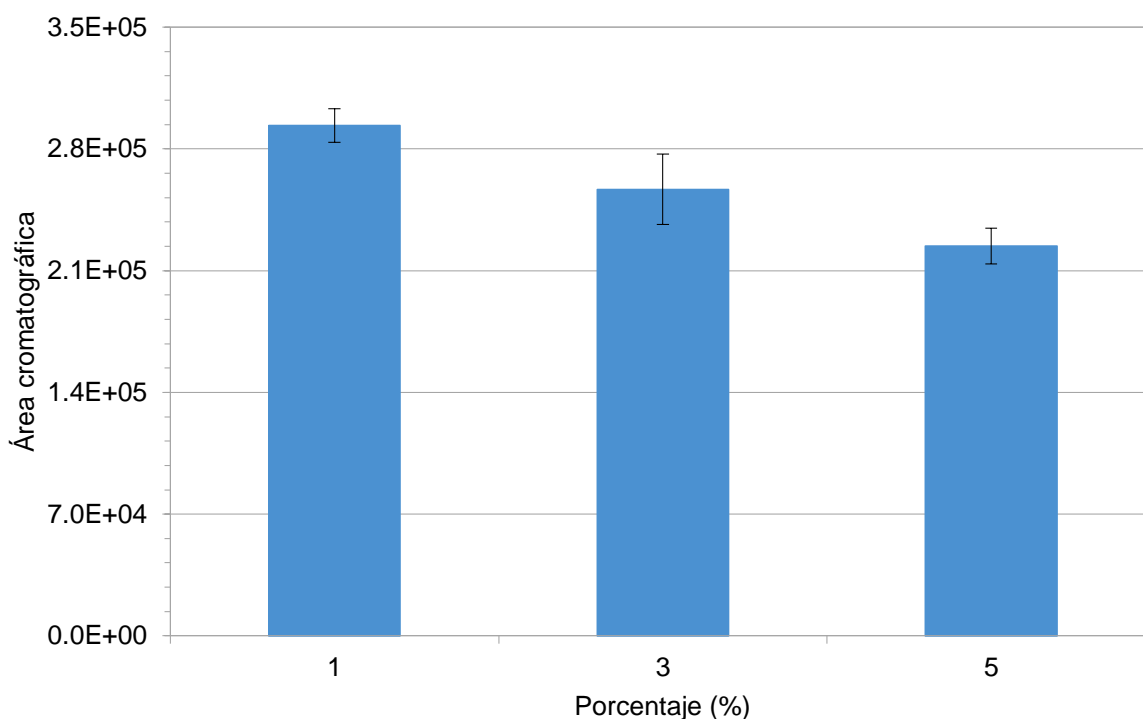


Figura 16. Evaluación de la respuesta de atrazina en función del porcentaje de MeOH.

6.9. Condiciones seleccionadas para el análisis de atrazina en agua desionizada

Con base en los resultados de las variables estudiadas, la *Tabla 3* muestra el resumen de las condiciones experimentales seleccionadas para el análisis de atrazina.

Tabla 3. Condiciones de la SPME en agua desionizada.

Parámetro	Valores
<i>Tipo de fibra</i>	Poliacrilato, 85 µm
<i>% de MeOH</i>	1 %
<i>Volumen de muestra</i>	10 mL
<i>% de NaCl</i>	90 % (3.3 g NaCl)
<i>Temperatura de extracción</i>	40 °C
<i>Tiempo de extracción</i>	30 min

6.10. Análisis de atrazina en agua por SPME-GC-MS: Validación del método

6.10.1. Límite de detección y límite de cuantificación

Los límites de detección (LD) y cuantificación (LC) se determinaron de manera experimental, considerando proporción de respuesta analítica igual a 3 y 10 veces la relación señal/ruido respectivamente. El límite de detección y límite de cuantificación fue de 100 y 300 ppt, respectivamente.

El cromatograma por monitoreo selectivo de iones (SIM) del límite de detección se muestra en el Anexo 7.1. (*Figura 24*).

6.10.2. Curva estándar de atrazina

Como se mencionó en la sección 5.16.2., se preparó una curva de calibración de 6 puntos en un intervalo de 0.3 a 3 ppb.

La regresión lineal se efectuó con las áreas cromatográficas promedio para cada concentración. La *Figura 17* muestra la curva estándar con el promedio de los resultados y su desviación estándar. En el Anexo 7.3. (*Figura 28*) se presentan las 3 curvas estándar independientes con su respectiva regresión lineal.

La linealidad en el intervalo de concentración estudiado fue aceptable ($R = 0.9997$) y los C.V. de la calibración fueron menores al 16 %.

En el límite de cuantificación (0.3 ppb), la contribución de la ordenada al origen fue aproximadamente un 5 % de la respuesta analítica por lo que la determinación de atrazina en dicho nivel podría presentar baja incertidumbre. Sin embargo es necesario realizar una prueba estadística para verificar si la ordenada al origen es estadísticamente igual a 0. Por lo anterior, la calibración es aceptable y habilita la determinación del analito a nivel de trazas (ng L^{-1}).

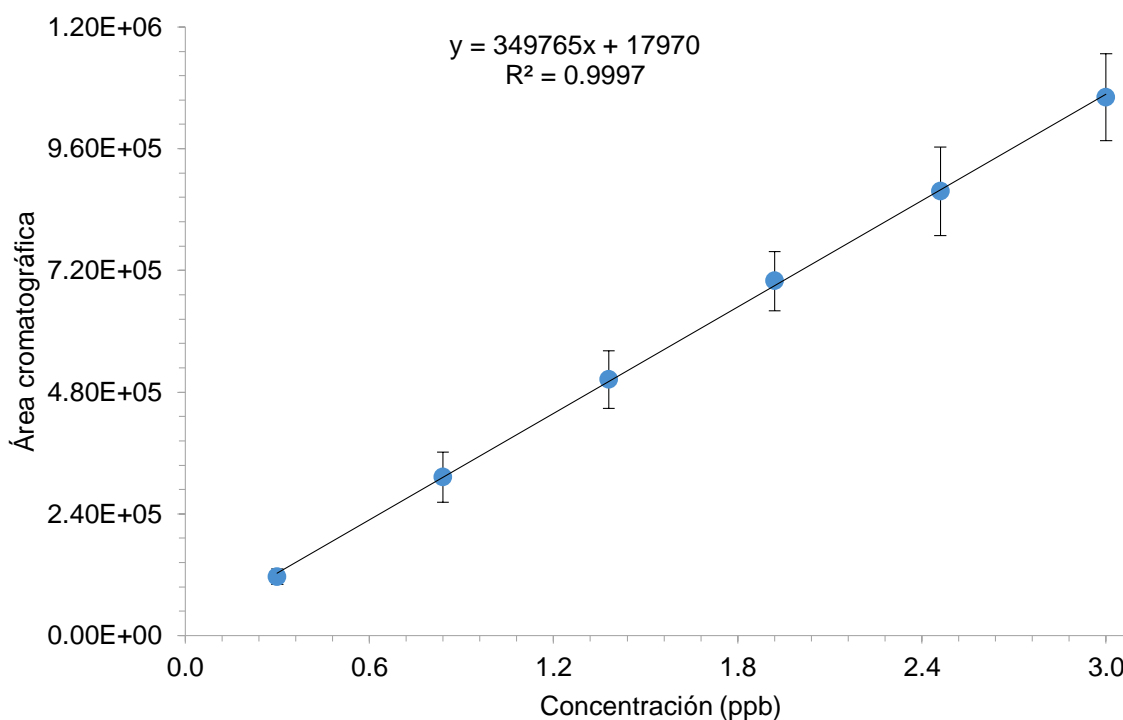


Figura 17. Curva estándar de atrazina en agua desionizada en el intervalo de concentración de 0.3 a 3 ppb.

6.10.3. Gráfico de residuales

Los datos de las curvas estándar se ajustaron a una regresión lineal y se calculó el residual para cada valor. Al graficar los residuales en función de la concentración (Anexo 7.4. *Figura 29*), se observó que la distribución de los residuales no fue aleatoria, evidenciando heterocedasticidad (mayor varianza en función de la concentración) en la curva de calibración.

Al aumentar la concentración de atrazina, los residuales tuvieron un valor absoluto mayor (valores positivos o negativos); el comportamiento heterocedástico podría deberse a la pérdida de eficiencia de la fibra de SPME, cuya capacidad de extracción disminuye conforme se utiliza. Dicho comportamiento se pudo observar en las barras de error de la curva de calibración promedio, sin embargo, el gráfico de residuales de cada curva de calibración (Anexo 7.4. *Figura 30*) muestra una distribución aleatoria, indicando que cada curva estándar tiene un error sistemático independiente.

6.10.4. Curva estándar con regresión ponderada

Debido al efecto heterocedástico observado en la curva estándar de atrazina, se propuso efectuar una regresión lineal ponderada. En dicha regresión, el ajuste ponderado nivela la importancia del error en los diferentes niveles de concentración (bajos y altos). El Anexo 7.5. (*Tabla 8*) muestra los valores ajustados de la curva estándar ponderada y un ejemplo de cálculo.

Los valores de la ordenada al origen y la pendiente de la curva estándar ponderada fueron similares a los calculados para la curva estándar inicial. Dicho comportamiento se debe a que el efecto heterocedástico observado es relativamente bajo, demostrando así que ambas curvas son válidas para la determinación de atrazina.

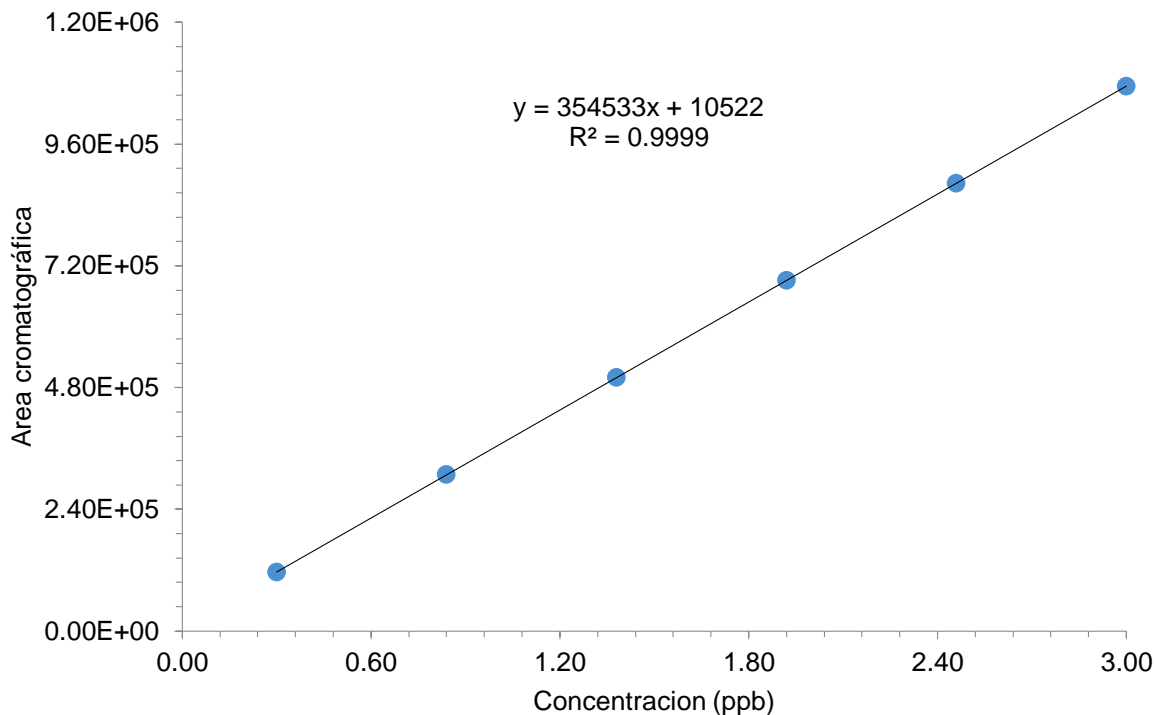


Figura 18. Curva estándar de atrazina con regresión ponderada.

6.10.5. Precisión

La precisión del método en los niveles estudiados tuvo C.V. menores al 7 %, demostrando que es factible determinar atrazina a niveles traza ($\mu\text{g L}^{-1}$) con alta precisión. La *Tabla 4* muestra los C.V. a los niveles de concentración estudiados.

6.10.6. Porcentaje de recobro

El recobro del método se evaluó a tres niveles de concentración por medición independiente (*Tabla 4*) y de manera gráfica (*Figura 19*). El recobro a 0.7, 1.7 y 2.7 ppb fue mayor al 80 %, lo cual se corroboró con el recobro global (correlación de concentración determinada vs concentración añadida), el cual fue de 80 % aproximadamente. En la *Figura 19* la pendiente de la gráfica, indica el recobro global en los 3 niveles estudiados, el cual fue del 80.4 % y el ajuste lineal de los datos tuvo un $R = 0.9954$.

El recobro a 2.7 ppb fue menor en comparación con el recobro a 0.7 y 1.7 ppb, lo cual podría deberse al efecto heterocedástico de la curva estándar. Por lo anterior, es

necesario evaluar la eficiencia de extracción de la fibra de SPME, para estimar el número de análisis que pueden efectuarse con la menor pérdida de eficiencia de la fibra.

Tabla 4. Promedio del porcentaje de recobro obtenido en las tres repeticiones.

Concentración (ppb)	C.V. (%)	Recobro Promedio (%)
0.7	2.6	92.3 ± 2.4
1.7	6.7	92.1 ± 6.2
2.7	5.2	83.5 ± 4.4

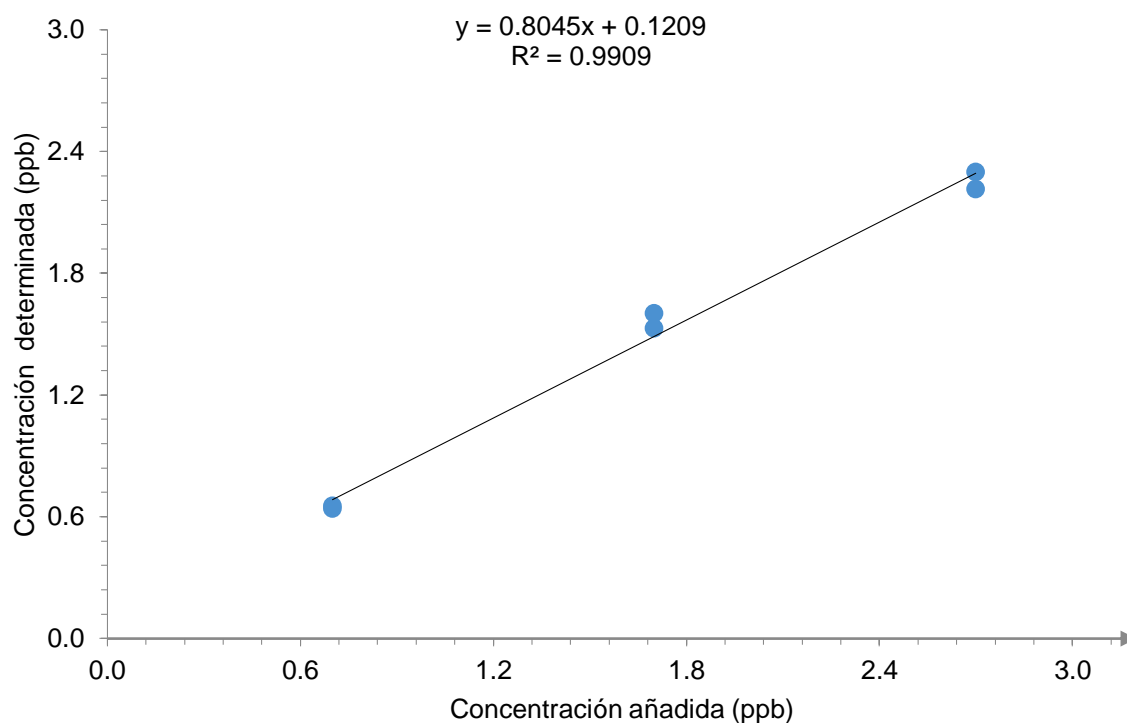


Figura 19. Recobro global de atrazina en agua desionizada.

6.11. Blanco de reactivos y agua residual

Previo a la determinación de atrazina por SPME-GC-MS, se realizaron los blancos reactivos y agua residual. En dichos análisis, no se observaron interferentes en el tiempo de retención de la atrazina.

6.12. Determinación de atrazina por SPME-GC-MS en muestras de agua residual fortificada

El agua residual fortificada se diluyó al 30 % en agua desionizada y se analizó en las condiciones descritas en el apartado 5.15. Dicho análisis se comparó con una disolución estándar de atrazina (1 ppb) en agua desionizada, observándose diferencias importantes en el resultado cuantitativo.

El área cromatográfica de la muestra de agua residual fortificada incrementó aproximadamente 31 % más en comparación con la muestra de agua desionizada (*Figura 20*). Este comportamiento podría indicar que la disolución de agua residual presenta un efecto de matriz positivo, el cual favorece la distribución del analito hacia la fase extractora.

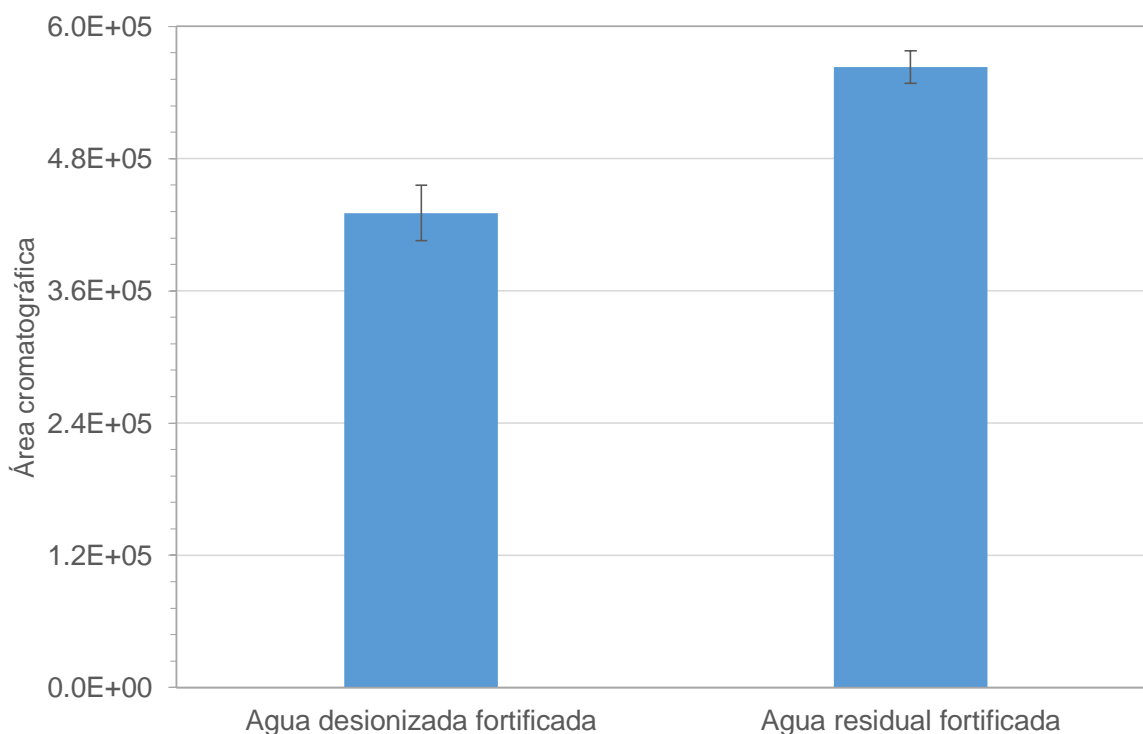


Figura 20. Comparación del análisis de agua desionizada y agua residual fortificadas con atrazina a 1 ppb.

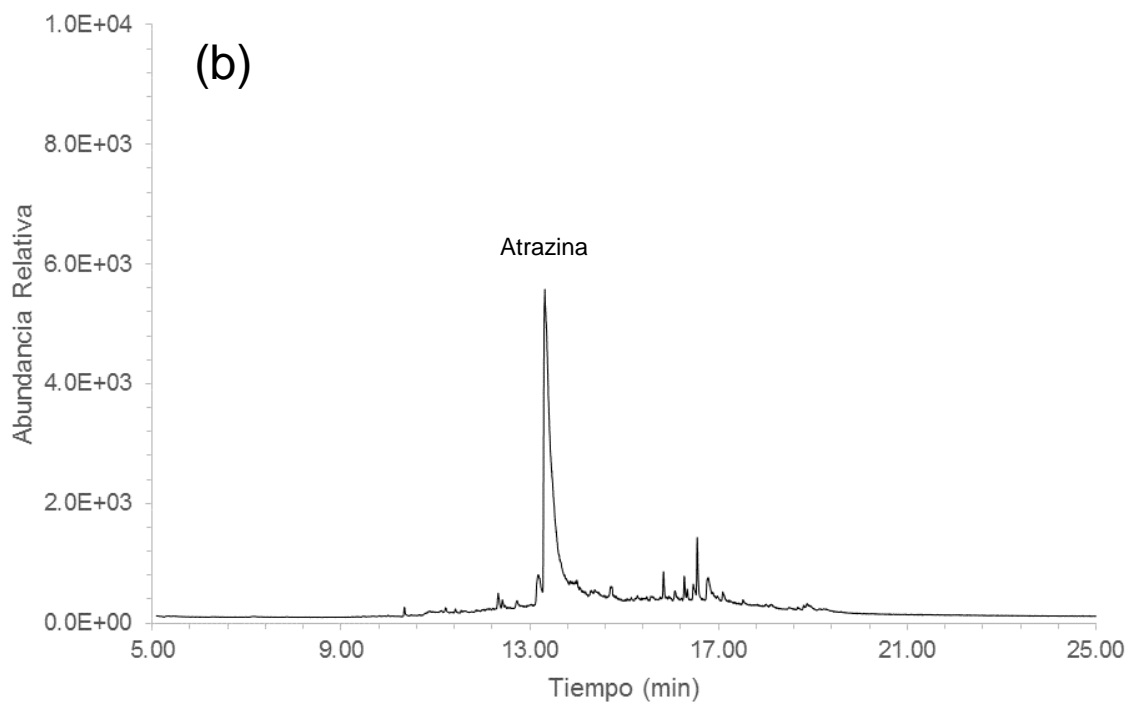
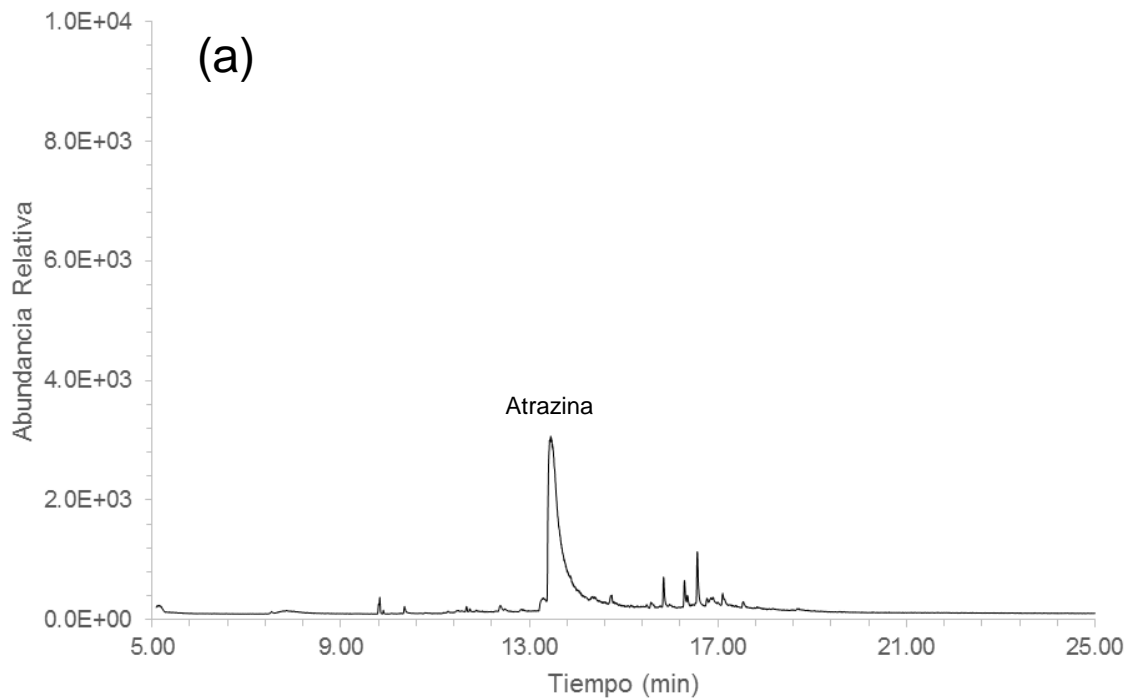
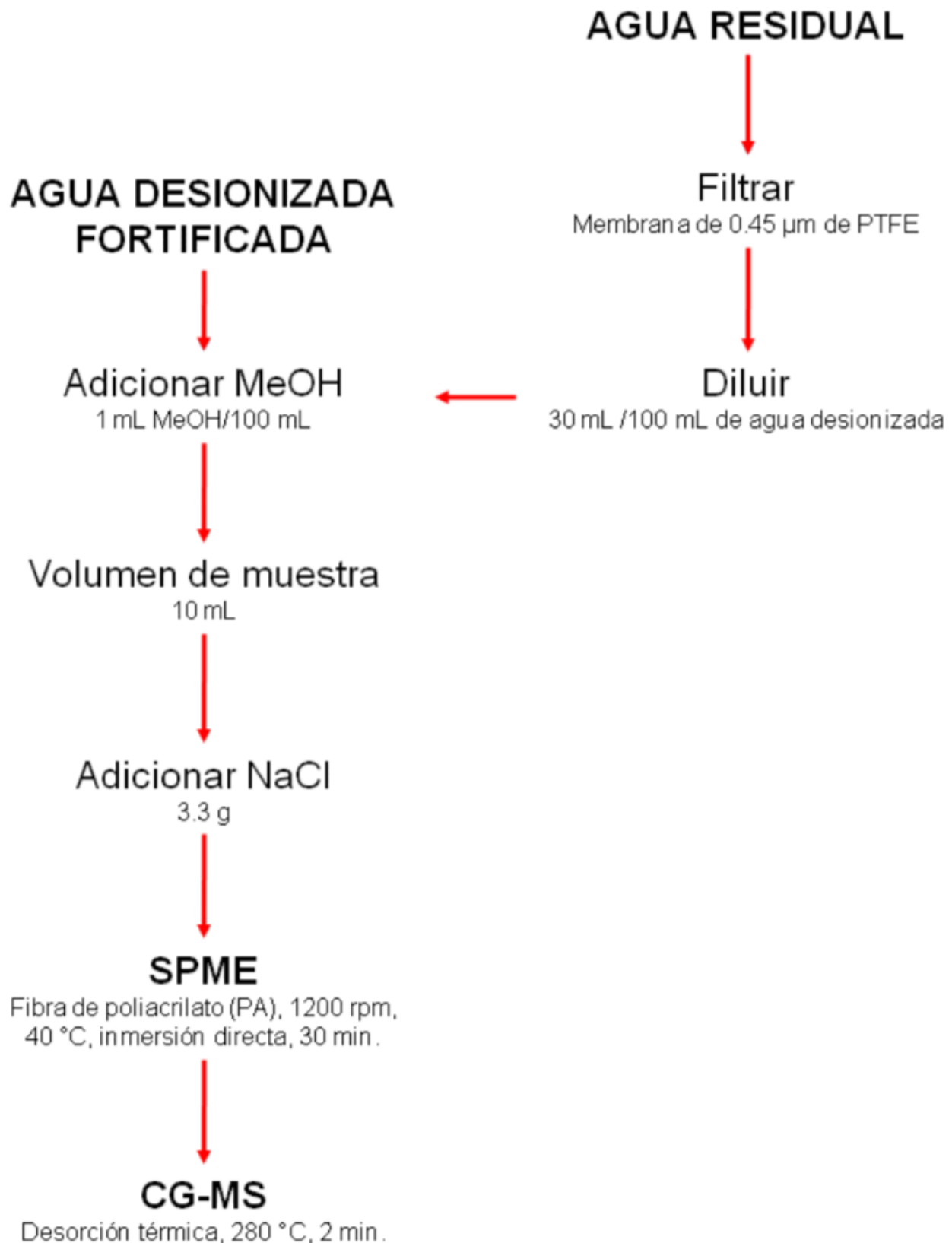


Figura 21. Cromatogramas por monitoreo selectivo de iones (SIM) del análisis de agua fortificada con atrazina a 1 ppb: (a) agua desionizada y (b) agua residual.

6.13. Esquema analítico para la determinación de atrazina



6.14. Discusión del método desarrollado

Tabla 5. Comparación de métodos para la determinación analítica de atrazina.

<i>Muestra</i>	<i>Volumen muestra (mL)</i>	<i>Preparación de muestra</i>	<i>Análisis</i>	<i>LD</i>	<i>Recobro (%)</i>	<i>Referencia</i>
<i>Agua residual</i>	10	SPME	GC-MS	0.1 $\mu\text{g L}^{-1}$	83 - 92	Nuestro método
<i>Agua superficial</i>	5	DPX	GC-MS	0.4 $\mu\text{g L}^{-1}$	96	[16]
<i>Agua de río</i>	15	CPE	HPLC-UV	0.3 $\mu\text{g L}^{-1}$	132	[17]
<i>Agua superficial</i>	5	SDME	HPLC-DAD	0.01 $\mu\text{g L}^{-1}$	81	[18]
<i>Agua superficial</i>	200	SPE	HPLC-UV	N/A $\mu\text{g L}^{-1}$	73-115	[19]
<i>Agua superficial</i>	10	SPE/SPME	HPLC-MS	0.001 $\mu\text{g L}^{-1}$	63 - 104	[20]
<i>Suelo</i>	4	SPME	GC-MS	0.7 $\mu\text{g kg}^{-1}$	90	[21]
<i>Suelo agrícola</i>	2	BID-SDME	GC-MS	0.013 ng mL^{-1}	97	[22]
<i>Suelo</i>	3	UAE/SPME	GC-MS y GC-ECD	30 $\mu\text{g kg}^{-1}$	74	[23]

La *Tabla 5* muestra algunos métodos descritos en la literatura para la determinación de atrazina en agua y suelo, los cuales se compararon con el método desarrollado en este trabajo.

En general, se observó que todos los métodos utilizan volúmenes de muestra bajos (≤ 15 mL), excepto el método propuesto por Binca y colaboradores, el cual utiliza un volumen de 200 mL [19]. En este contexto, es deseable la miniaturización de la cantidad o volumen de muestra; el método desarrollado utiliza 10 mL de muestra, el cual es comparable con los volúmenes que normalmente se utilizan. A pesar de que algunos métodos utilizan un menor volumen de muestra [16, 18], disminuir demasiado el volumen podría derivar en problemas de imprecisión y control de las condiciones experimentales, así como el aspecto representativo de la muestra.

Los métodos descritos utilizan técnicas de extracción miniaturizadas como BID-SDME, SPE, SPME, SDME, CPE y DPX [16 - 23], sin embargo, la SPME es una técnica semiautomática, lo que disminuye los errores por la manipulación de la muestra en la extracción. De manera adicional, disminuye el tiempo de análisis, ya que el dispositivo está diseñado para la inyección directa en un cromatógrafo de gases.

En este proyecto, se utilizó un equipo de GC-MS, cuya ventaja principal es la disminución de costos en comparación con la cromatografía líquida, ya que al utilizar disolventes de alta pureza (grado HPLC) implica un mayor costo por análisis. De manera adicional, es necesario utilizar una interface específica para la inyección por SPME.

El límite de detección del método desarrollado fue de 100 ppt, el cual es menor en comparación con otros métodos descritos [16, 17, 21 - 23]. Este hecho, habilita la determinación de atrazina a niveles de traza y ultratrazas ($\mu\text{g L}^{-1}$ y ng L^{-1}) en muestras acuosas.

El método desarrollado por Bonansea y colaboradores [20] presentó el límite de detección más bajo ($0.001 \mu\text{g L}^{-1}$), sin embargo, dicho método utiliza dos técnicas de preparación de muestra (SPE y SPME), lo cual justifica los niveles de sensibilidad elevados. Al utilizar dos técnicas de preparación de muestra es necesario controlar un mayor número de variables, lo que incrementa la complejidad del método. Esta característica puede ocasionar la pérdida de eficiencia analítica y una mayor probabilidad de error e imprecisión en la determinación.

El recobro del método tuvo valores entre el 83 y el 92 %, lo cual fue comparable con los valores descritos en la bibliografía (73 - 132 %). La disminución del recobro en la determinación podría estar únicamente asociada a la pérdida de eficiencia de la fibra de SPME, lo cual no condiciona la precisión del análisis.

El método por SPME-GC-MS se comparó con el método 619 de la USEPA (Determinación de pesticidas de triazina en agua residual municipal e industrial) y se identificó que el método 619 utiliza 120 mL de diclorometano para la extracción de los analitos y la preparación de muestra conlleva varias etapas. Además de esto, el límite de detección para la atrazina es de 50 ppb. Por lo anterior, el método por SPME-GC-MS presenta varias ventajas sobre el método de la USEPA, siendo libre de disolventes, la extracción y concentración del analito se lleva cabo en un solo paso, los límites de detección y cuantificación son más bajos (100 y 300 ppt respectivamente), el análisis cuantitativo puede efectuarse por estandarización externa, el % de recobro es mayor al 80 % y el tiempo de preparación de muestra es de 30 min.

Con base en la comparación de los métodos, el método por SPME-GC-MS presenta características deseables para una determinación analítica y lo convierten en una alternativa rápida, sencilla y sensible para el análisis de atrazina en muestras acuosas complejas.

CONCLUSIONES

1. Se desarrolló un método por SPME-GC-MS para la determinación de atrazina en muestras de agua desionizada y agua residual. El método desarrollado es rápido, ya que el análisis de atrazina se realiza en un tiempo menor a 60 min; es sencillo, porque al utilizar la SPME, el analito se extrae, concentra y se aísla de la muestra en una sola operación; es sensible, porque la determinación puede efectuarse en niveles de ng L^{-1} y $\mu\text{g L}^{-1}$, y es ecológico porque minimiza el uso de reactivos y disolventes orgánicos, así como el volumen de muestra (10 mL) que se requiere para la determinación.
2. Para la SPME de la atrazina, se estudió el tiempo, la temperatura y el pH de extracción, % NaCl y % MeOH; se seleccionaron las mejores condiciones para el análisis de atrazina en agua desionizada, las cuales fueron: 10 mL de muestra, pH sin ajustar, 1 % de MeOH, 90 % de NaCl (3.3 g), 40 °C y 30 min de tiempo de extracción.
3. El método se validó evaluando la precisión, la linealidad, % de recobro y el cálculo de los límites de detección y cuantificación. La precisión en los niveles estudiados tuvo coeficientes de variación menores al 6 %; la linealidad presentó un $R = 0.9997$ y el porcentaje de recobro global en los niveles estudiados fue mayor al 80 %. El límite de detección y el límite de cuantificación fue de 100 y 300 ng/L respectivamente.
4. Los análisis de agua desionizada y agua residual fortificadas, se compararon, observándose una mayor área cromatográfica en el análisis de agua residual; Este comportamiento evidenció un posible efecto de matriz positivo en la determinación de atrazina. Con base en lo anterior, se comprobó la efectividad del método para su aplicación en muestras de agua residual, lo cual podría significar que la metodología desarrollada es robusta.

5. La determinación de atrazina por SPME-GS-MS representa una alternativa analítica sensible, ya que el método puede ser utilizado para cuantificar atrazina en concentraciones menores a 1 ppb. Sin embargo, es importante evaluar y monitorear la eficiencia de extracción de las fibras de SPME, para evitar un efecto heterocedástico significativo que comprometa el análisis por estandarización externa.

PERSPECTIVAS

Con base en los resultados de este trabajo, se proponen algunas de las siguientes perspectivas.

1. En el análisis de agua residual, es necesario estudiar el efecto del porcentaje de dilución de la muestra y el impacto sobre el desempeño del método (robustez), ya que el efecto de matriz puede afectar la determinación de atrazina cuando se utiliza una calibración en agua desionizada como referencia.
2. Como una alternativa para mejorar la determinación precisa del analito, se recomienda el estudio del efecto de heterocedasticidad en la curva estándar.
3. Realizar pruebas interlaboratorio para formalizar la repetitividad y reproducibilidad del método.
4. Evaluar el desempeño del método en muestras de agua superficial y/o subterránea para investigar su posible aplicación en los análisis de calidad de agua.
5. Como una aplicación adicional, se propone analizar muestras de agua y lixiviados de suelo agrícola tratados con este herbicida para estudiar la movilidad de atrazina en los suelos.
6. Evaluar la eficiencia del método para la determinación de compuestos análogos y subproductos de la degradación de la atrazina.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario (2007). Secretaría de Salud a través de la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios. Consultado en: <https://agua.org.mx/>
- [2] Hansen A, Treviño L, Márquez H et al. Atrazina: un herbicida polémico. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. 2013;29:65-84.
- [3] LeBaron M, McFarland J, Burnside O. THE TRIAZINE HERBICIDES 50 Years Revolutionizing Agriculture. UK: Elsevier Science; 2008.
- [4] Flores S. Efectos de los herbicidas metribuzina y ametrina (triazinas) sin y con activación metabólica vegetal *in vivo* o sobre la cinética del índice mitótico en linfocitos humanos cultivo. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. 2000;16(3):127-137.
- [5] Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes (CASAFE). Modo de acción de los herbicidas. Consultado en: <https://www.casafe.org/modo-de-accion-de-los-herbicidas/>.
- [6] Doll J, Leonor C. Principios básicos sobre la selectividad de los herbicidas. Cali, Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT); 1981.
- [7] Giggings J, Anderson A, Hall L et al. Atrazine in North American Surface Waters: a Probabilistic Aquatic Ecological Risk Assessment. Raleigh, North California, USA: Setac Press; 2005.
- [8] epa.gov [Internet]. Estados Unidos: United States Environmental Protection Agency; 2003 [actualizado 10 julio 2018; citado 8 oct 2018]. Consultado en: <https://www.epa.gov/ingredients-used-pesticide-products/atrazine-background-and-updates>
- [9] Da Cunha J, Pinelli L, Bellini M et al. Determinación de atrazina e intermediarios de biodegradación en enriquecimientos bacterianos provenientes de cursos de agua superficial de Uruguay. *Revista del Laboratorio Tecnológico del Uruguay*. 2013;8:23-29.
- [10] epa.gov [Internet]. Estados Unidos: United States Environmental Protection Agency; 2003. Consultado en: <https://safewater.zendesk.com/hc/en-us/articles/212077787-4-What-are-EPA-s-drinking-water-regulations-for-atrazine>.

- [11] Gitanjali D. Atrazine: A Case Study in the Differences Between Regulations of Endocrine Disrupting Chemicals in the EU and the US. *Temple Journal of Science, Technology & Environmental Law*. 2006;173.
- [12] Skoog D, Holler F, Crouch S. *Principios de análisis instrumental*. 6ta edición. México, DF: Cengage Learning; 2007.
- [13] Harris D. *Análisis Químico Cuantitativo*. 5a edición. USA: Reverté; 2001.
- [14] Pawliszyn J. *Handbook of solid phase microextraction*. Ontario, Canada: Elsevier Inc; 2012.
- [15] Ríos Acevedo JJ. *Nuevos desarrollos metodológicos en SPME*. Tesis de doctorado. Madrid: Universidad Complutense de Madrid. 2017.
- [16] Guan S, Huang M, Li X, Cai Q. Determination of Atrazine, Simazine, Alachlor, and Metolachlor in Surface Water Using Dispersive Pipette Extraction and Gas Chromatography – Mass Spectrometry. *Analytical Letters*. 2018;51(4):613-625.
- [17] De Prá Urio R, Masini JC. Determination of Simazine and Atrazine in River Water by Cloud-Point Extraction and High-Performance Liquid Chromatography. *Analytical Letters*. 2017; 50;1065-1074.
- [18] Yohannes A, Tolesa T, Merdassa Y et al. Single Drop Microextraction Analytical Technique for Simultaneous Separation and Trace Enrichment of Atrazine and its Major Degradation Products from Environmental Waters Followed by Liquid Chromatographic Determination. *Analytical & Bioanalytical Techniques*. 2016; 7(5):330-338.
- [19] Binca A, Araujo J, Zamora P et al. Simultaneous determination of atrazine and metabolites (DIA and DEA) in natural water by multivariate electronic spectroscopy. *Microchemical Journal*. 2014; 117:262-267.
- [20] Bonansea I, Amé M, Wunderlin D. Determination of priority pesticides in water samples combining SPE and SPME coupled to GC-MS. A case study: Suquía River basin (Argentina). *Chemosphere*. 2013; 90(6):1860-1869.
- [21] Djurovic R, Gajic-Umiljendic J, Djordjevic T. Determination of atrazine, acetochlor, clomazone, pendimethalin and oxyfluorfen in soil by a solid phase microextraction method. *Institute of Pesticides and Environmental Protection*. 2015; 23:265-271.
- [22] Bradley D, Williams G, Marjanovic L et al. Rapid Detection of Atrazine and Metolachlor in Farm Soils: Gas Chromatography–Mass Spectrometry-Based Analysis

Using the Bubble-in-Drop Single Drop Microextraction Enrichment Method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2014; 62(31):7676-7681.

[23] Bouaid A, Ramos L, Gonzales MJ et al. Solid-phase microextraction method for the determination of atrazine and four organophosphorus pesticides in soil samples by gas chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2001; 939(1-2):13-21.

7. ANEXOS

7.1. Cromatogramas

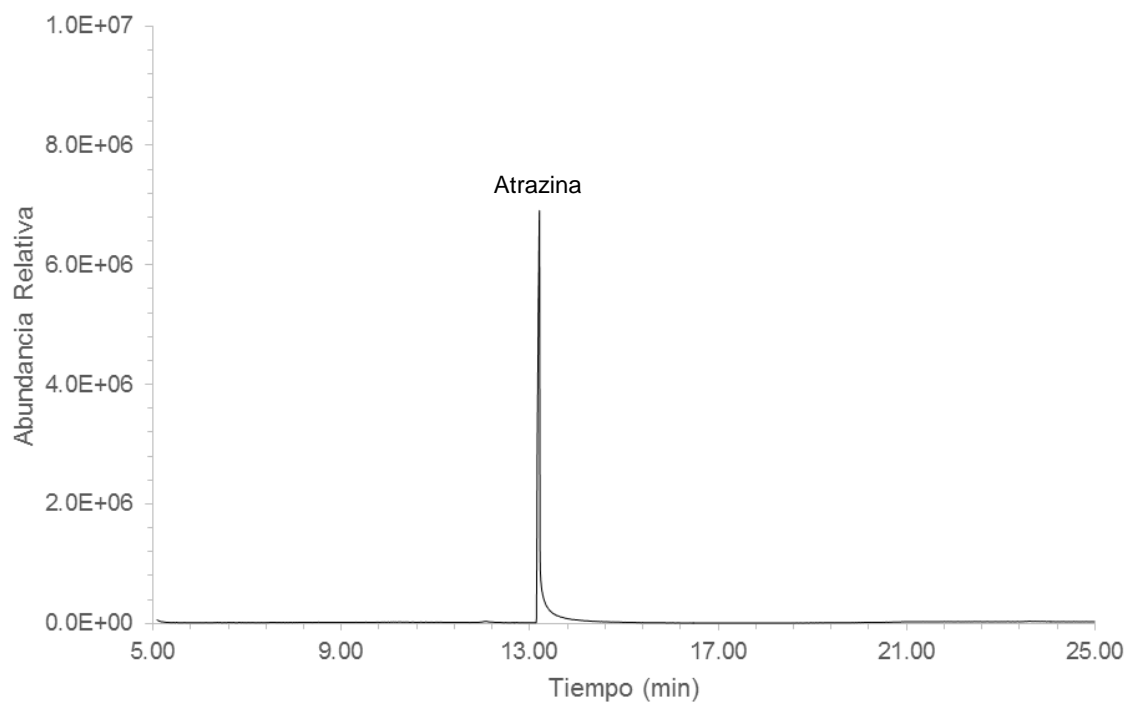


Figura 22. Cromatograma por barrido total de iones (SCAN) del análisis de una disolución estándar de atrazina (14 ppm) en metanol. Condiciones de inyección: directa (1 μ L), inyector a a 180 °C.

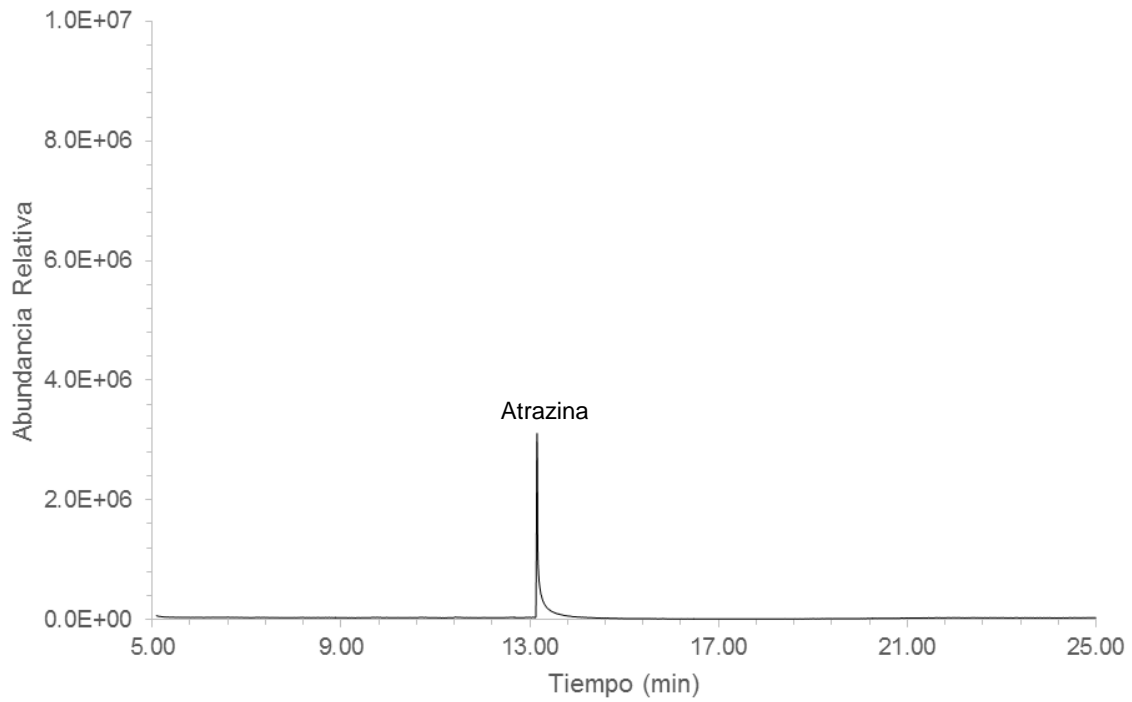


Figura 23. Cromatograma por barrido total de iones (SCAN) del análisis de una disolución estándar de atrazina (14 ppm) en metanol. Condiciones de inyección: directa (1 μ L), inyector a a 280 °C.

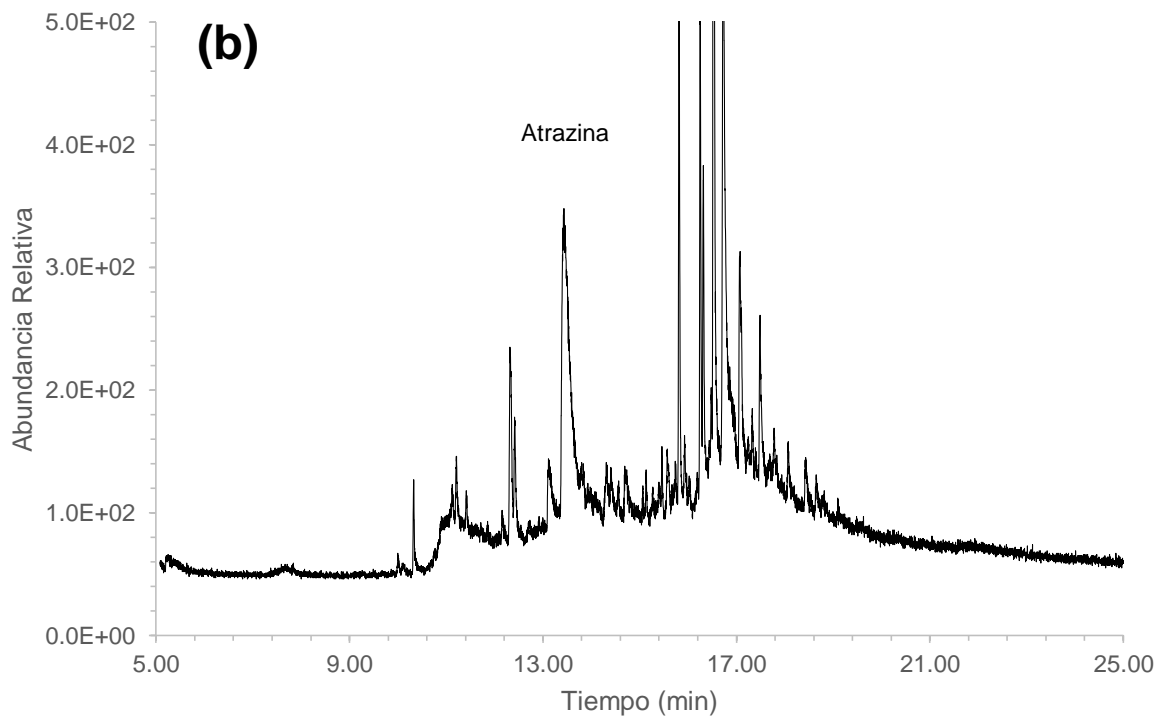
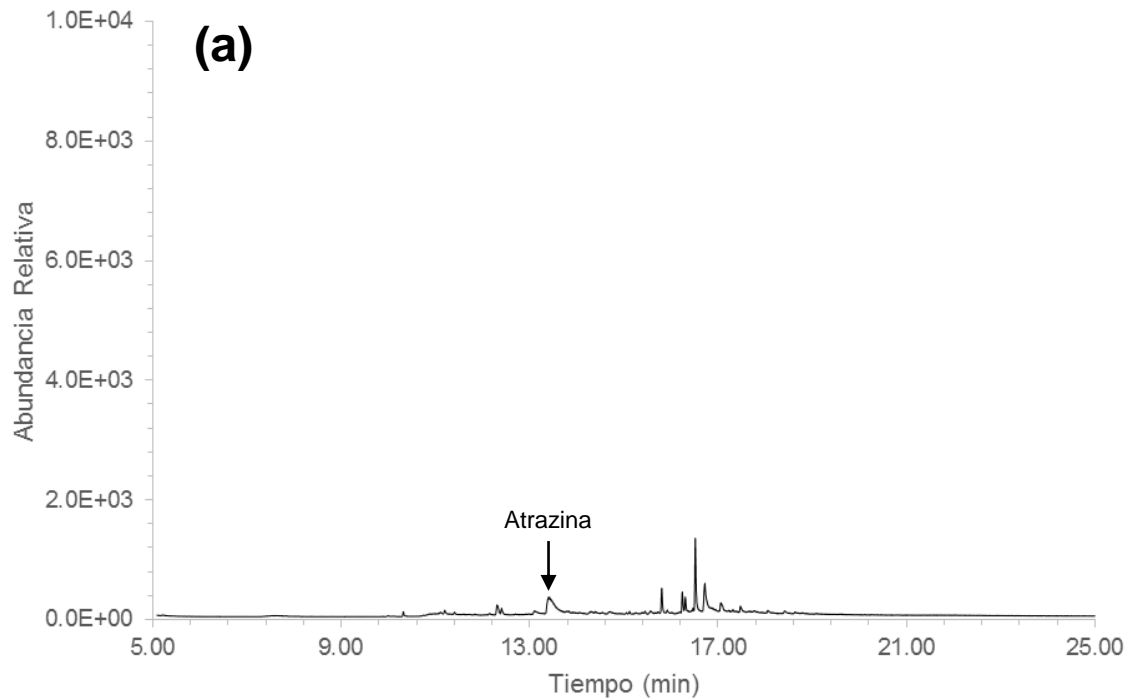


Figura 24. Cromatogramas por monitoreo selectivo de iones (SIM) de la determinación del límite de detección de la atrazina (100 ppt). (a) Escala completa y (b) amplificación de la escala

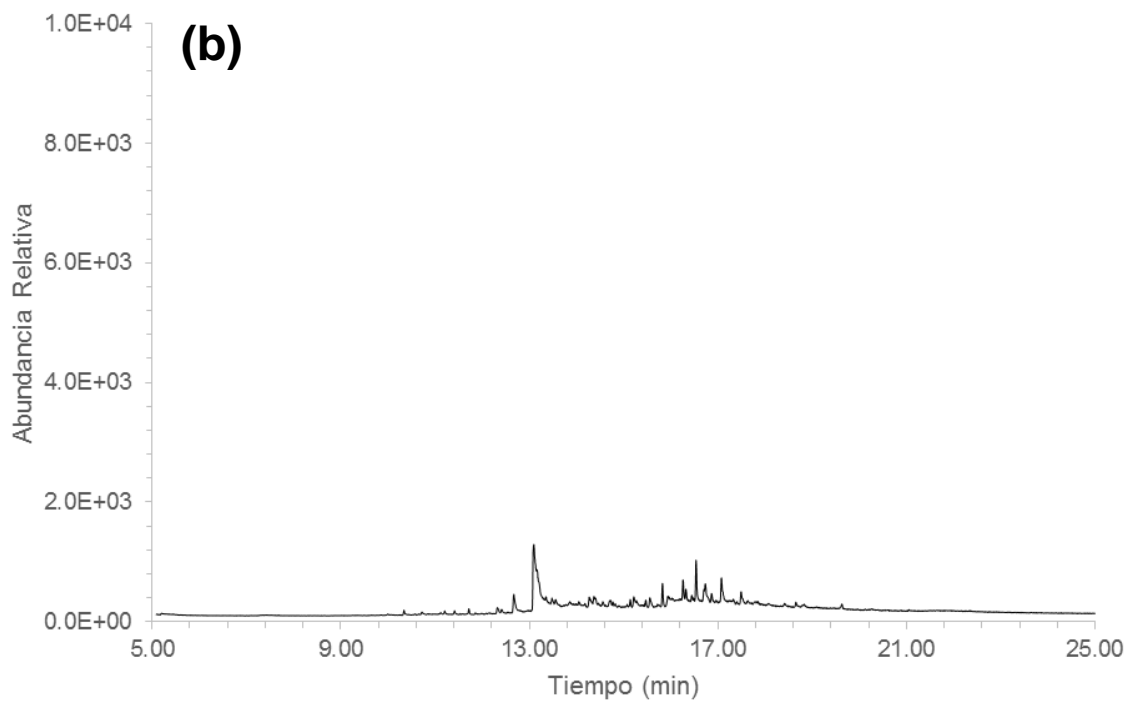
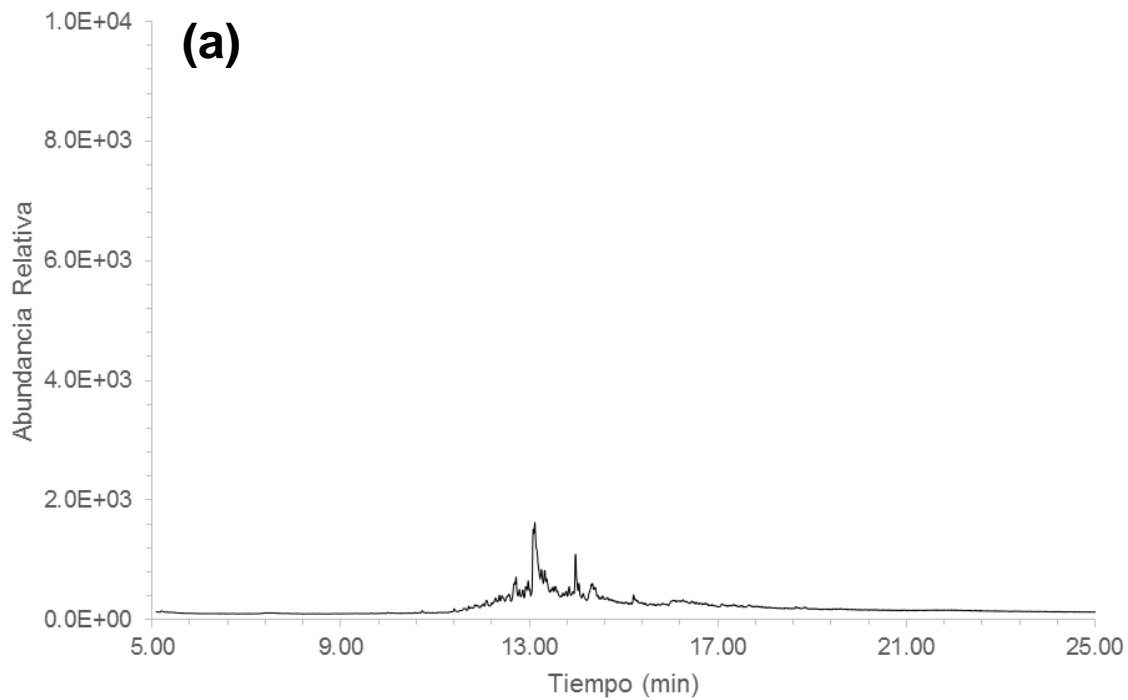


Figura 25. Cromatogramas SIM del análisis de los blancos (a) agua desionizada, (b) agua desionizada con 90 % de NaCl.

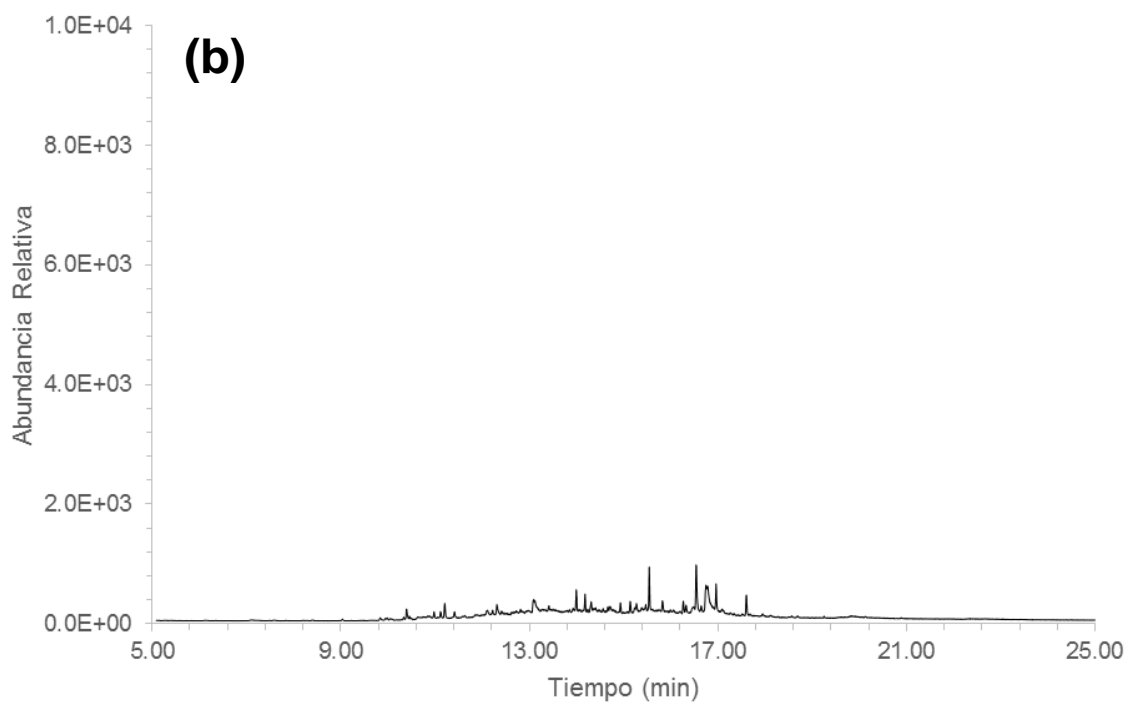
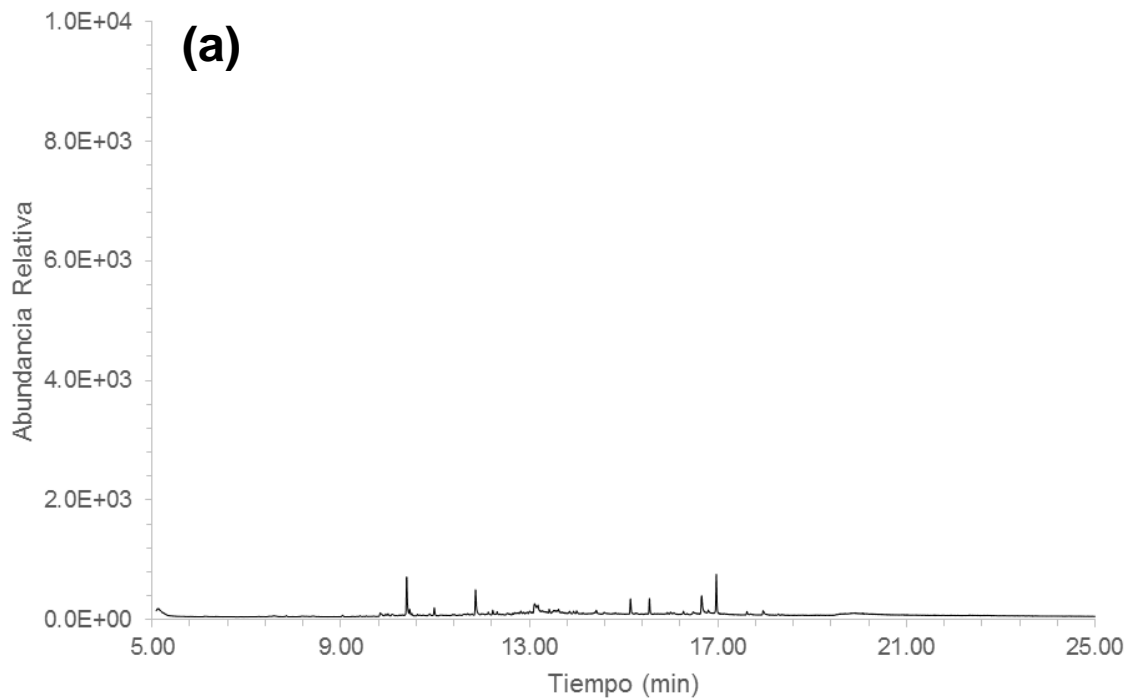


Figura 26. Cromatogramas SIM del análisis de los blancos (a) fibra de SPME, (b) dilución de agua residual al 30 % v/v.

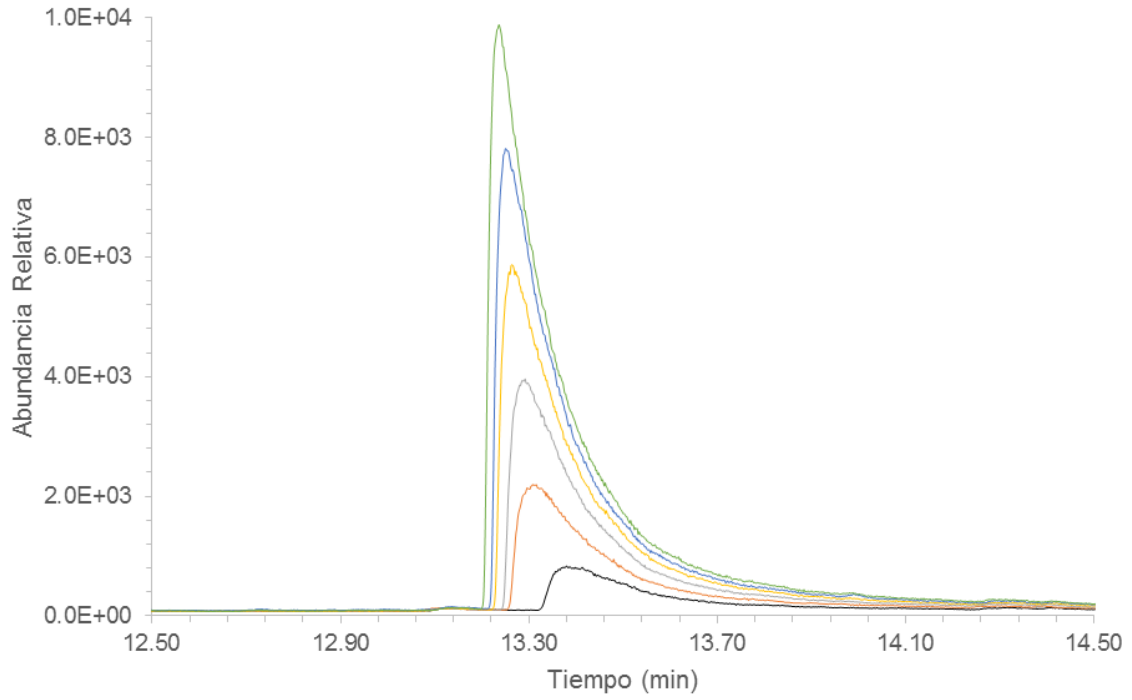


Figura 27. Cromatogramas por monitoreo selectivo de iones (SIM) de la curva estándar de atrazina de 0.3 a 3 ppb.

7.2. Condiciones experimentales seleccionadas

Tabla 6. Condiciones experimentales del método por SPME-GC-MS para la determinación de atrazina en muestras acuosas

Variable estudiada	Condición óptima
Temperatura del inyector	280 °C
pH	Sin ajustar
Metanol	1 % v/v
NaCl (%)	3.3 g (90 %)
Agitación	1,200 rpm
Temperatura de extracción	40 °C
Tiempo de extracción	30 min

7.3. Curva estándar de atrazina

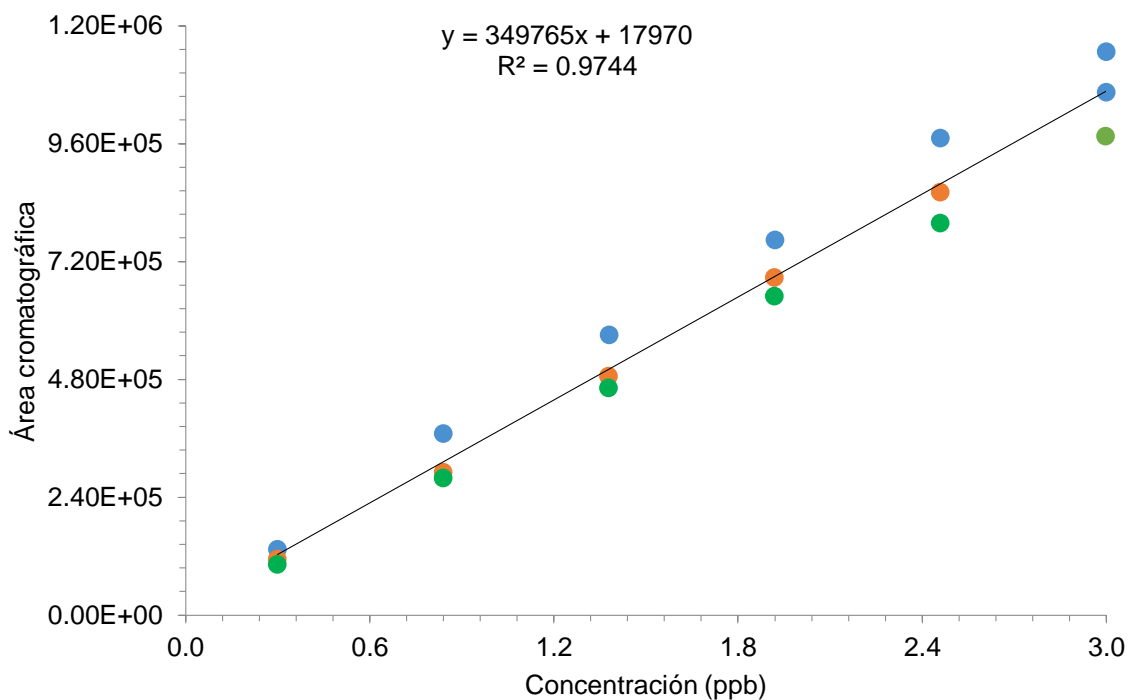


Figura 28. Curvas estándar de atrazina ($n=3$).

7.4. Gráficos de residuales

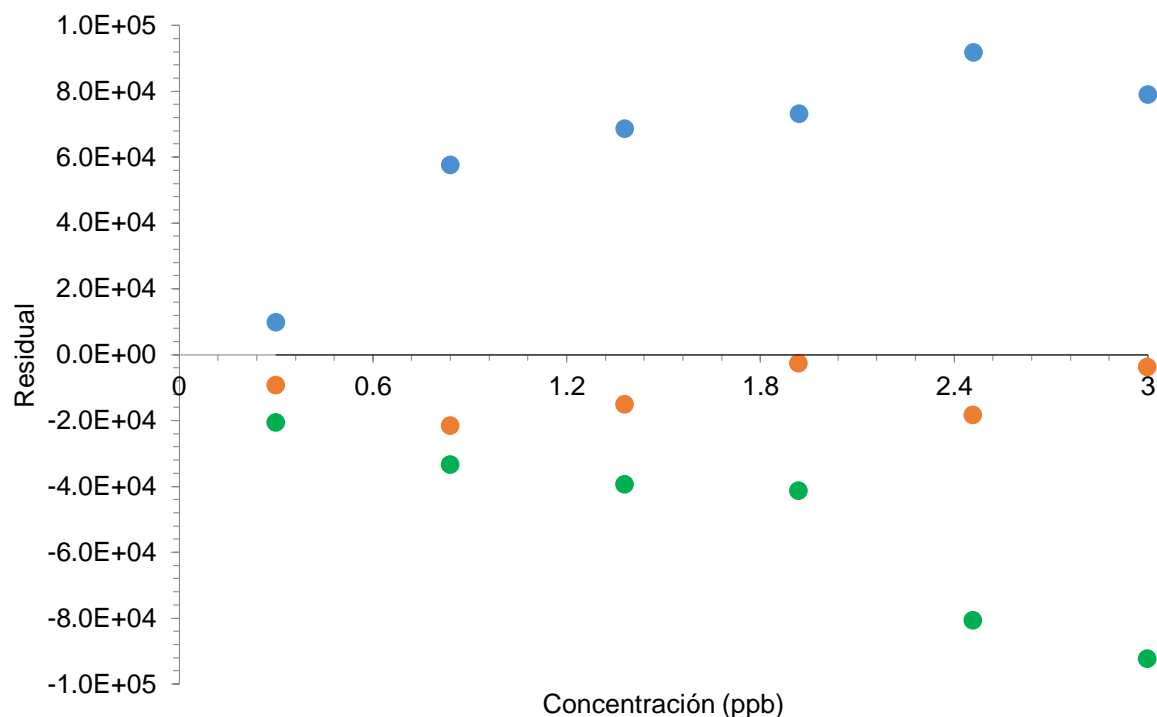
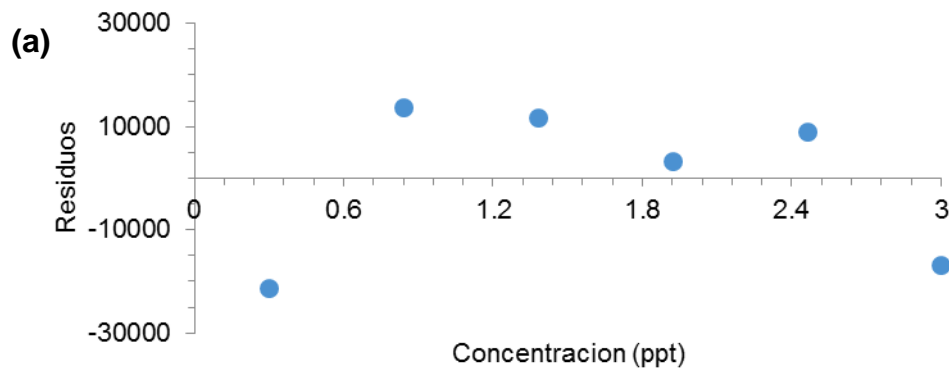


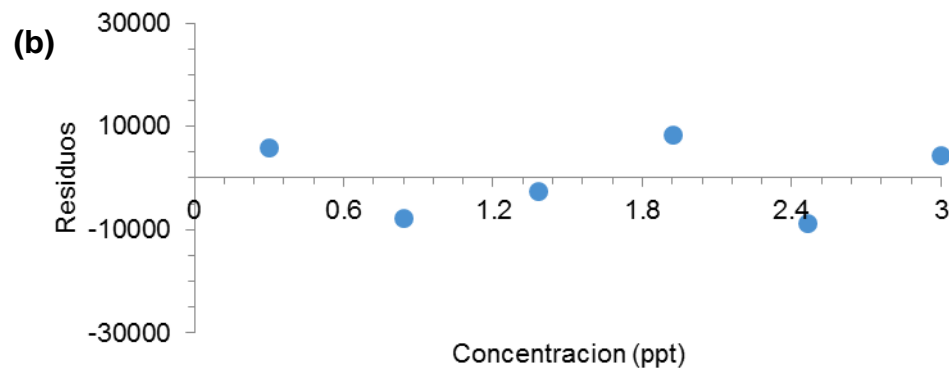
Figura 29. Gráfico de residuales de las curvas estándar de atrazina en función de la concentración.

Tabla 7. Valores de residuales para la curva estándar.

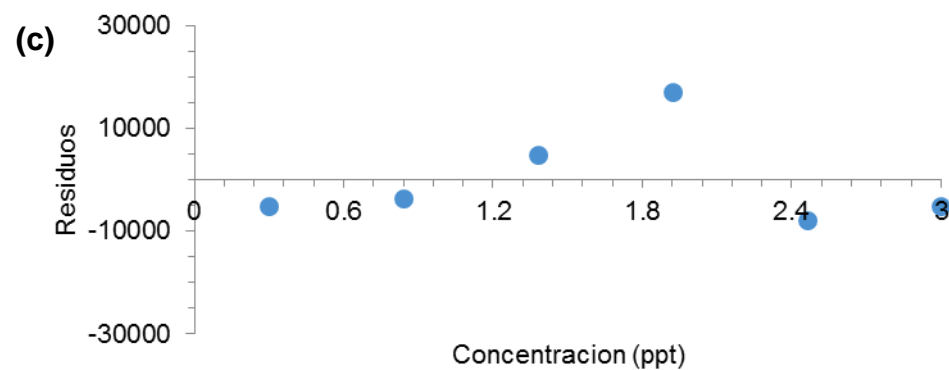
Concentración	Valor Verdadero	Residual Curva 1	Residual Curva 2	Residual Curva 3
0.30	122899.5	9822.5	-9361.5	-20785.5
0.84	311772.6	57559.4	-21615.6	-33562.6
1.38	500645.7	68663.3	-15173.7	-39540.7
1.92	689518.8	73155.2	-2770.8	-41460.8
2.46	878391.9	91717.1	-18457.9	-80827.9
3.00	1067265	78981	-3804	-92525



Concentración Real	Residual
0.30	-21154
0.84	13647
1.38	11815
1.92	3371
2.46	8997
3.00	-16675



Concentración Real	Residual
0.30	6050
0.84	-7623
1.38	-2600
1.92	8384
2.46	-8722
3.00	4513



Concentración Real	Residual
0.30	-5222
0.84	-3644
1.38	4732
1.92	17167
2.46	-7845
3.00	-5188

Figura 30. Gráficos de residuales de cada curva: (a) curva estándar 1, (b) curva estándar 2 y (c) curva estándar 3

7.5. Curva estándar con regresión ponderada

Tabla 8. Cálculos para la curva estándar ponderada.

X	Y	DE	DE ₂	W _i	W _i X _i	W _i Y _i	W _i X _i Y _i	W _i X _i ²	Y _{ponderada}
0.3	116125	15467	4.18E-09	4.5941	1.3782	533486	160046	0.4135	116881.84
0.84	312566	49522	4.08E-10	0.4481	0.3764	140074	117663	0.3162	308329.568
1.38	505295	56760	3.10E-10	0.3411	0.4708	172373	237874	0.6497	499777.296
1.92	699160	58307	2.94E-10	0.3233	0.6207	226019	433956	1.1917	691225.024
2.46	875869	87369	1.31E-10	0.1440	0.3542	126106	310221	0.8713	882672.752
3	1061482	85770	1.36E-10	0.1494	0.4482	158583	475748	1.3446	1074120.48
----	-----	Suma	5.46E-09	6	3.6485	1356640	1735508	4.7869	----

Ejemplo de cálculo con X₁, Y₁:

$$DE_2 = \frac{1}{DE^2} = \frac{1}{15467} = 4.18E - 09$$

$$W_i = \frac{DE_2}{(\sum_i DE_2)/n} = \frac{4.18E - 09}{5.46E - 09/6} = 4.5941$$

$$W_i Y_i = 4.5941 * 116125 = 533486$$

$$\bar{Y}_w = \frac{\sum_i W_i Y_i}{n} = \frac{1356640}{6} = 226106.73$$

$$W_i X_i = 4.5941 * 0.3 = 1.3782$$

$$\bar{X}_w = \frac{\sum_i W_i X_i}{n} = 0.6081$$

$$b_w = \frac{\sum_i W_i Y_i X_i - (n * \bar{X}_w * \bar{Y}_w)}{\sum_i W_i X_i^2 - (n * \bar{X}_w^2)}$$

$$= \frac{1735508 - (6 * 0.6081 * 226106.73)}{4.7869 - (6 * 0.6081^2)}$$

$$= 354532.83$$

$$a_w = \bar{Y}_w - (b_w * \bar{X}_w) = 226106.73 - (354532.83 * 0.6081)$$

$$= 10521.99$$

$$Y_{pomderada} = (X * b_w) + a_w = (0.3 * 354532.83) + 10522$$

$$= 116881.84$$