



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS**

DESARROLLO DE METODOLOGÍA ANALÍTICA PARA LA DETERMINACIÓN DE  
ATRAZINA Y SIMAZINA EN TORTILLA DE MAÍZ

**TESIS**

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS**

PRESENTA

Q.A. CARLOS MARTÍNEZ RODRÍGUEZ

TUTORA DRA. MARTHA PATRICIA GARCÍA CAMACHO

Facultad de Química, Departamento de Química Analítica

CIUDAD DE MÉXICO, 17 de enero de 2023



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.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS  
QUÍMICAS**

**DESARROLLO DE METODOLOGÍA ANALÍTICA PARA LA DETERMINACIÓN  
DE ATRAZINA Y SIMAZINA EN TORTILLAS DE MAÍZ**

**T E S I S  
PARA OPTAR POR EL GRADO DE**

**MAESTRO EN CIENCIAS**

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

**Q.A. CARLOS MARTÍNEZ RODRÍGUEZ**



Ciudad de México, 17 de enero de 2023

## **JURADO ASIGANDO**

PRESIDENTE: Dr. Alberto Tecante Coronel  
VOCAL: Dra. Araceli Patricia Peña Álvarez  
VOCAL: Dra. Alma Luisa Revilla Vázquez  
VOCAL: Dr. Roeb García Arrazola  
SECRETARIO: Dra. Olivia Zamora Martínez

## **SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

Facultad de Química, UNAM, Edificio F, laboratorio 227 Análisis de trazas. Circuito exterior S/N, Coyoacán, Cd. Universitaria, 04510, Ciudad de México, México.

## **ASESOR DEL TEMA:**

---

Dra. Martha Patricia García Camacho

## **SUSTENTANTE:**

---

Q.A. Carlos Martínez Rodríguez

Parte de este trabajo se presentó en el Congreso Internacional de la Sociedad Química de México “*Una química muchas voces*” celebrado en la Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, México en agosto del 2022.

# AGRADECIMIENTOS

A la **Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)**, en donde cursé mi licenciatura y ahora estoy concluyendo mi posgrado, por todas las oportunidades que me ofreció, los apoyos otorgados y las experiencias que he vivido en sus instalaciones.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)**, por la beca otorgada a Carlos Martínez Rodríguez (No. de beca 786607).

A la **Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-UNAM)** por el apoyo presupuestal del proyecto PAPIIT IN207723.

Se agradece al **Programa de Apoyo a la Investigación y al Posgrado (PAIP)**, de la Facultad de Química, UNAM por el apoyo presupuestal otorgado al proyecto PAIP 5000-9034.

A la Coordinación General de Estudios de Posgrado (CGEP) por el apoyo económico otorgado a través del Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP).

A la Dra. Martha Patricia García Camacho por sus valiosos consejos, atención y tutoría ofrecida desde el momento de mi ingreso a este programa. Por facilitarme el ingreso a su grupo de trabajo y por la inversión de tiempo en este proyecto.

A la Mta. Ma. del Rosario Covarrubias por sus consejos y enseñanza en el manejo de equipos e instrumentos de laboratorio.

Al jurado evaluador, por los comentarios y aportaciones hechas a este trabajo, por enriquecer este proyecto.

A mis compañeros de laboratorio Dr. Manuel Méndez García, Mto. Eduardo Becerril Mercado, Elena Lara Ruiz y Uriel Sevilla Agustin por su apoyo, amistad y consejos brindados durante mi estancia en el laboratorio de investigación 227.

A mi familia y amigos que me han apoyado no sólo durante esta etapa de mi carrera profesional, sino que han estado ahí siempre. Por el tiempo que hemos compartido juntos.



# INDICE

1.	RESUMEN .....	1
2.	INTRODUCCIÓN .....	3
3.	HIPÓTESIS .....	6
4.	OBJETIVOS .....	7
	4.1. Objetivo general .....	7
	4.1.1. Objetivos específicos .....	7
5.	MARCO TEÓRICO .....	8
	5.1. Los pesticidas .....	8
	5.2. Herbicidas triazínicos .....	9
	5.2.1. Propiedades fisicoquímicas de las triazinas.....	10
	5.2.1.1. Propiedades fisicoquímicas de la atrazina .....	11
	5.2.1.2. Propiedades fisicoquímicas de la simazina.....	16
	5.2.2. Toxicología.....	19
	5.2.3. Normatividad .....	23
	5.2.4. Contaminación de alimentos con herbicidas .....	28
	5.3. Tortillas de maíz.....	30
	5.4. Metodologías analíticas para determinación de atrazina en muestras de maíz y otros alimentos .....	35
	5.5. Preparación de muestra.....	39
	5.5.1. Extracción Asistida por Ultrasonido (EAU).....	39
	5.5.2. Extracción en fase sólida (EFS).....	42
	5.5.3. Extracción en fase sólida dispersiva (EFS-D) .....	47
6.	METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....	52
	6.1. Equipos y materiales.....	52
	6.1.1. Materiales .....	52
	6.1.2. Solventes y adsorbentes.....	52
	6.1.3. Estándares y soluciones estándar .....	52
	6.1.4. Equipos .....	53
	6.1.5. Muestras .....	54
	6.1.6. Programas computacionales.....	55



6.2. Desarrollo experimental .....	55
6.2.1. Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) .....	57
6.2.1.1 Selección de herbicidas triazínicos .....	57
6.2.2.2. Selección de longitud de onda en detección ultravioleta.....	58
6.2.2.3. Optimización de la separación cromatográfica .....	58
6.2.2.4. Validación instrumental .....	60
6.2.2. Homogenización y fortificación de la muestra .....	62
6.2.3. Extracción en fase sólida (EFS) .....	63
6.2.3.1. Optimización del solvente de carga .....	65
6.2.3.2. Optimización de la elución de los analitos .....	66
6.2.3.3. Optimización de la eliminación de interferentes.....	67
6.2.3.4. Evaluación de interferentes.....	68
6.2.4. Extracción asistida por ultrasonido (EAU).....	69
6.2.4.1. Optimización de la amplitud en la EAU .....	70
6.2.4.2. Optimización del tiempo en la EAU.....	71
6.2.5. Extracción en fase sólida dispersiva (EFS-D) .....	72
6.2.5.1. Optimización de la retención.....	73
6.2.5.2. Optimización de la cantidad y tipo de adsorbente.....	74
6.2.5.3. Optimización del volumen y naturaleza del disolvente de desorción ..	75
6.2.5.4. Evaluación del efecto de la temperatura en la desorción.....	76
6.2.5.5. Optimización del tiempo de agitación vortex en la adsorción.....	77
6.2.5.6. Evaluación de interferentes.....	78
6.2.6. Validación de la metodología desarrollada EAU-EFS-EFS-D .....	78
6.2.7. Aplicación de la metodología al análisis de muestras reales .....	81
7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	82
7.1. Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) .....	82
7.1.1. Selección de longitud de onda en detección ultravioleta.....	82
7.1.2. Optimización de la separación cromatográfica .....	84
7.1.3. Validación instrumental .....	87
7.2. Extracción en fase sólida (EFS).....	89
7.2.1. Optimización del solvente de carga .....	89
7.2.2. Optimización de la elución de los analitos .....	91
7.2.3. Optimización de la eliminación de interferentes.....	94
7.2.4. Evaluación de interferentes.....	97

7.3. Extracción asistida por ultrasonido (EAU).....	100
7.3.1. Optimización de la amplitud en EAU.....	100
7.3.2. Optimización del tiempo en EAU.....	101
7.4. Extracción en fase sólida dispersiva (EFS-D).....	102
7.4.1. Optimización de la retención.....	102
7.4.2. Optimización de la cantidad y tipo de adsorbente.....	105
7.4.3. Optimización del volumen y naturaleza del disolvente de desorción ...	108
7.4.4. Evaluación del efecto de la temperatura en la desorción.....	110
7.4.5. Optimización del tiempo de agitación vortex.....	111
7.4.6. Evaluación de interferentes.....	112
7.5. Validación de la metodología desarrollada EAU-EFS-EFS-D.....	113
7.6. Aplicación de la metodología al análisis de muestras reales .....	118
8. CONCLUSIONES .....	123
9. ANEXOS .....	124
10. BIBLIOGRAFÍA .....	127

## ABREVIATURAS

<b>ACN</b>	Acetonitrilo
<b>ANVISA</b>	Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria
<b>ATSDR</b>	Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades (en inglés <i>Agency for Toxic Substances and Disease Registry</i> )
<b>C18</b>	Fase octadecilsilano
<b>CG</b>	Cromatografía de Gases
<b>CIAFA</b>	Cámara de la Industria Argentina de Fertilizantes y Agroquímicos
<b>CICOPLAFET</b>	Comisión Intersecretarial para el Control del Proceso y uso de Plaguicidas y Sustancias Tóxicas
<b>COFEPRIS</b>	Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios
<b>DAD</b>	Detector de Arreglo de Diodos
<b>DSR</b>	Desviación Estándar Relativa
<b>EAU</b>	Extracción Asistida por Ultrasonido
<b>EFS</b>	Extracción en Fase Sólida
<b>EFSA</b>	Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (en inglés <i>European Food Safety Authority</i> )
<b>EFS-D</b>	Extracción en Fase Sólida Dispersiva
<b>EPA</b>	Agencia de Protección Ambiental (en inglés <i>European Food Safety Authority</i> )
<b>EUA</b>	Estados Unidos de América
<b>FAO</b>	Organización para la Agricultura y la Alimentación (en inglés <i>Food and Agriculture Organization</i> )
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Agua
<b>HPLC</b>	Cromatografía de Líquidos de Alto Rendimiento (en inglés <i>High Performance Liquid Chromatography</i> )
<b>IARC</b>	Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (en inglés <i>International Agency for Research on Cancer</i> )
<b>IDA</b>	Ingesta Diaria Admisible
<b>JFCRF</b>	Fundación Japonesa de Investigación de Química de Alimentos (en inglés <i>Japan Food Chemical Research Foundation</i> )

<b><i>k</i></b>	Factor de capacidad
<b>Kow</b>	Coeficiente de partición octanol agua
<b>LC</b>	Límite de cuantificación
<b>LD</b>	Límite de detección
<b>LMR</b>	Límite Máximo Residual
<b>Log P</b>	Logaritmo del Coeficiente de Partición octanol agua
<b>MeOH</b>	Metanol
<b>mPFC</b>	Filtración Múltiple en Columna de Limpieza (en inglés <i>multi-Plug-Filtration Cleanup</i> )
<b>NIOSH</b>	Instituto Nacional para la Seguridad y Salud Ocupacional (en inglés <i>National Institute for Occupational Safety and Health</i> )
<b>NOM</b>	Norma Oficial Mexicana
<b>PCPA</b>	Alianza Farmacéutica pan-Canadiense (en inglés <i>pan-Canadian Pharmaceutical Alliance</i> )
<b>pH</b>	Potencial de hidrógeno
<b>pKa</b>	Menos logaritmo de la Constante de acidez
<b>PM</b>	Masa molecular
<b>PS-DVB</b>	Fase Poliestireno Divinil Benceno
<b>r<sup>2</sup></b>	Coeficiente de determinación
<b>Rs</b>	Resolución cromatográfica
<b>SN<sub>2</sub></b>	Sustitución Nucleofílica bimolecular
<b>t<sub>1/2</sub></b>	Tiempo de vida media
<b>tM</b>	Tiempo muerto
<b>tR</b>	Tiempo de retención
<b>UHPLC</b>	Cromatografía de Líquidos de Ultra Alto Rendimiento (en inglés <i>Ultra-High-Performance Liquid Chromatography</i> )
<b>USDA</b>	Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (en inglés <i>United States Department of Agriculture</i> )
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>ZMVM</b>	Zona Metropolitana del Valle de México
<b>α</b>	Factor de selectividad
<b>λ<sub>max</sub></b>	Longitud de onda de máxima absorción

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 5.2.1.1.</b> Estructura química de la atrazina .....	12
<b>Figura 5.2.1.1.1.</b> Equilibrio ácido base de la atrazina .....	13
<b>Figura 5.2.1.1.2.</b> Espectro de absorción ultravioleta de la atrazina y la simazina.	15
<b>Figura 5.2.1.2.</b> Estructura química de la simazina.....	16
<b>Figura 5.2.1.2.1.</b> Equilibrio ácido base de la simazina.....	17
<b>Figura 5.3.</b> Proceso de elaboración de tortillas tradicional. ....	32
<b>Figura 5.3.1.</b> Tortillas hechas con maíz de diferente color .....	33
<b>Figura 5.5.1.</b> Esquema de la cavitación sónica .....	41
<b>Figura 5.5.2.</b> Procedimiento general de EFS.....	43
<b>Figura 5.5.2.1.</b> Curva de rompimiento y parámetros en la EFS.....	45
<b>Figura 5.5.3.</b> Procedimiento general de la extracción en fase sólida dispersiva...48	
<b>Figura 6.2.</b> Esquema general de las etapas experimentales para el desarrollo de la metodología.....	56
<b>Figura 6.2.2.</b> Proceso de homogenización de la muestra.....	62
<b>Figura 6.2.2.1.</b> Proceso de fortificación de la muestra.....	63
<b>Figura 6.2.3.</b> Procedimiento general de EFS.....	64
<b>Figura 6.2.4.</b> Esquema de la extracción asistida por ultrasonido.....	70
<b>Figura 6.2.5.</b> Esquema general de la extracción en fase sólida dispersiva. ....	73
<b>Figura 7.1.1.</b> Espectros de absorción ultravioleta de la simazina. ....	82
<b>Figura 7.1.1.1.</b> Espectros de absorción ultravioleta de la atrazina. ....	83
<b>Figura 7.1.2.</b> Comportamiento cromatográfico de las triazinas al trabajar con fase móvil MeOH: H <sub>2</sub> O a diferente composición.....	84
<b>Figura 7.2.1.</b> Estructura química de la atrazina y simazina. ....	90
<b>Figura 7.2.4.</b> Perfil cromatográfico obtenido de extractos EAU-EFS. Clean up y elución con MeOH.....	98

<b>Figura 7.2.4.1.</b> Perfil cromatográfico comparativo de los diferentes extractos UAE-EFS usando dos disolventes orgánicos en la limpieza de interferentes por EFS..	99
<b>Figura 7.4.2.</b> Estructura química de los adsorbentes. ....	107
<b>Figura 7.4.6.</b> Cromatogramas de una muestra fortificada (2 µg/g) y sin fortificar a las que se les aplicó la metodología desarrollada UAE-EFS-EFS-D.....	112
<b>Figura 7.4.6.1.</b> Cromatogramas EAU-EFS vs AUE-EFS-EFS-D. ....	113
<b>Figura 7.5.</b> Esquema general de la metodología optimizada y validada.....	117
<b>Figura 7.6.1.</b> Cromatogramas de muestra 13: tortilla azul de Cuautitlán, Estado de México fortificada (0.1 µg/g) y sin fortificar a las que se les aplicó la metodología desarrollada UAE-EFS-EFS-D. ....	120
<b>Figura 7.6.2.</b> Cromatogramas de muestra 14: tortilla amarilla de Naucalpan de Juárez, Estado de México fortificada (0.1 µg/g) y sin fortificar a las que se les aplicó la metodología desarrollada UAE-EFS-EFS-D. ....	120
<b>Figura 7.6.3.</b> Cromatogramas de muestra 19: tortilla amarilla de Guanajuato, Guanajuato fortificada (0.1 µg/g) y sin fortificar a las que se les aplicó la metodología desarrollada UAE-EFS-EFS-D.....	121
<b>Figura 7.6.4.</b> Cromatogramas de muestra 4: tortilla rosa de Benito Juárez, Ciudad de México fortificada (0.1 µg/g) y sin fortificar a las que se les aplicó la metodología desarrollada UAE-EFS-EFS-D.....	121

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 5.2.</b> Clasificación de los herbicidas triazínicos. ....	9
<b>Tabla 5.2.1.</b> Estructura química de las s-triazinas. ....	11
<b>Tabla 5.2.1.1.</b> Solubilidad de la atrazina en diferentes disolventes.....	14
<b>Tabla 5.2.1.1.1.</b> Propiedades fisicoquímicas de la atrazina. ....	14
<b>Tabla 5.2.1.2.</b> Solubilidad de la simazina en diferentes disolventes. ....	18
<b>Tabla 5.2.1.2.1.</b> Propiedades fisicoquímicas de la simazina.....	18
<b>Tabla 5.2.3.</b> Límites máximos de residuos (LMR) internacionales en maíz para la atrazina.....	24
<b>Tabla 5.2.3.1.</b> Límites máximos de residuos (LMR) internacionales en maíz para la simazina.....	24
<b>Tabla 5.2.3.2.</b> Valores de IDA para la atrazina y la simazina.....	25
<b>Tabla 5.2.3.3.</b> Cultivos en los que se emplea simazina y la atrazina en México...	27
<b>Tabla 5.2.3.4.</b> Normas mexicanas en las que se establece límites de residuos máximos para la atrazina en diferentes matrices. ....	28
<b>Tabla 5.2.3.5.</b> Normas mexicanas en las que se establece límites de residuos máximos para la simazina en diferentes matrices.....	28
<b>Tabla 5.4.</b> Metodologías recientemente desarrolladas para la determinación de atrazina y simazina en maíz, derivados de maíz y otros cereales.....	37
<b>Tabla 6.15.</b> Lista de muestras analizadas.....	54
<b>Tabla 6.2.1.1.</b> Herbicidas triazínicos empleados en cultivos de maíz mexicano...	57
<b>Tabla 7.1.1.</b> Máximos de absorción de la atrazina y la simazina. ....	82
<b>Tabla 7.1.2.</b> Parámetros cromatográficos con diferentes fases móviles. ....	85
<b>Tabla 7.1.2.1.</b> Parámetros físicos al trabajar con diferente fase móvil.....	85
<b>Tabla 7.1.3.</b> Límites de detección y cuantificación instrumentales.....	88
<b>Tabla 7.1.3.1.</b> Precisión al trabajar con estándares en un mismo día.....	88

<b>Tabla 7.5.1.</b> Recobro de los analitos a diferente nivel de fortificación. ....	115
<b>Tabla 7.6.</b> Resultados del análisis de muestras reales .....	118
<b>Tabla 7.6.1.</b> Recobros de la fortificación de muestras. ....	119



## INDICE DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 5.3.</b> Uso de maíz en México. ....	31
<b>Gráfico 7.1.2.</b> Curvas del factor de capacidad de los estándares de atrazina y simazina en función del porcentaje de metanol en la fase móvil.....	86
<b>Gráfico 7.1.3.</b> Curva de calibración instrumental para la atrazina y la simazina...	87
<b>Gráfico 7.2.1.</b> Recobro en función del porcentaje de metanol en la carga EFS...	89
<b>Gráfico 7.2.2.</b> Recobro en función del porcentaje de metanol en la elución EFS. Volumen de elución de 1 mL.....	91
<b>Gráfico 7.2.2.1.</b> Recobro en función del porcentaje de acetonitrilo en la elución EFS. Volumen de elución de 1 mL.....	92
<b>Gráfico 7.2.2.2.</b> Recobro de analitos en función del volumen de elución (MeOH 75%).....	93
<b>Gráfico 7.2.2.3.</b> Recobro de analitos en función del volumen de elución (ACN 50%).....	94
<b>Gráfico 7.2.3.</b> Recobro de los analitos en función del %MeOH en la limpieza de interferentes.....	95
<b>Gráfico 7.2.3.1.</b> Recobro de los analitos en función del volumen de MeOH 20% en la limpieza de interferentes.....	95
<b>Gráfico 7.2.3.2.</b> Recobro de los analitos en función del %ACN en clean up en la limpieza de interferentes. ....	96
<b>Gráfico 7.2.3.3.</b> Recobro de los analitos en función del porcentaje de ACN en la limpieza de interferentes. ....	97
<b>Gráfico 7.3.1.</b> Recobro de los analitos en función de la amplitud de ultrasonido. 100	
<b>Gráfico 7.3.2.</b> Recobro de analitos en función del tiempo de extracción EAU. Amplitud 40% .....	101
<b>Gráfico 7.4.1.</b> Recobro y residuo de los analitos en función del % MeOH en la muestra en EFS-D.....	103

<b>Gráfico 7.4.1.1.</b> Recobro y residuo de los analitos en función del %ACN en EFS-D.....	104
<b>Gráfico 7.4.2.1.</b> Recobro de los analitos en función de la cantidad de adsorbente C18 en EFS-D .....	105
<b>Gráfico 7.4.2.2</b> Recobro de los analitos en función de la cantidad de adsorbente PS-DVB en EFS-D .....	106
<b>Gráfico 7.4.3.</b> Recobro de triazinas en función del volumen de desorción (ACN y MeOH a temperatura ambiente) en EFS-D. ....	108
<b>Gráfico 7.4.3.1.</b> Recobro de las triazinas en función del volumen de ACN .....	109
<b>Gráfico 7.4.4.</b> Recobro de los analitos al realizar la desorción a diferente temperatura.....	110
<b>Gráfico 7.4.4.1.</b> Recobro en diferentes adsorbentes y temperaturas en EFS-D.	
<b>¡Error! Marcador no definido.</b>	
<b>Gráfico 7.4.5.</b> Recobro de los analitos en función del tiempo de agitación vortex.....	111
<b>Gráfico 7.5.</b> Curvas de calibración. A) Curva de calibración de atrazina, B) Curva de calibración de simazina. ....	114
<b>Gráfico 7.5.1.</b> Recobro global para las triazinas.....	116

# 1. RESUMEN

La atrazina y la simazina son herbicidas triazínicos que se emplean en el control de las plagas de múltiples cultivos alrededor del mundo. En México estos herbicidas se usan principalmente en maíz, donde la legislación establece un Límite Máximo Residual (LMR) de 250 ng/g. La contaminación de tortillas de maíz con herbicidas triazínicos es un tema poco estudiado y una buena área de oportunidad para la investigación, siendo que con anterioridad se ha probado la contaminación de maíz con estos herbicidas, así como la posible toxicidad de éstos en humanos.

En este trabajo se desarrolló una metodología analítica para la extracción y determinación simultánea de atrazina y simazina de tortillas de maíz. Para ello, se utilizó la Extracción Asistida por Ultrasonido (EAU) usando como extractante una mezcla de MeOH: H<sub>2</sub>O, la Extracción en Fase Sólida (EFS) empleando como fase octadecilsilano (C18) para limpieza de interferentes y concentración, lo que fue complementado por la Extracción en Fase Sólida Dispersiva (EFS-D) usando como fase Poliestireno-Divinilbenceno. Los extractos se analizaron por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución con detección ultravioleta. (HPLC-UV, por sus siglas en inglés).

La metodología propuesta fue validada de acuerdo con lo establecido por el Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria para la identificación y/o cuantificación de residuos de plaguicidas en México, los límites de detección y cuantificación obtenidos por la metodología fueron de 20-50 ng/g para atrazina y 20-60 ng/g para simazina. Los recobros globales obtenidos fueron de un 71 % para simazina y 76 % para atrazina. Los resultados obtenidos fueron satisfactorios y la metodología permitió extraer y cuantificar a los herbicidas en muestras fortificadas a diferentes niveles de concentración, por lo que se procedió a realizar un análisis de diferentes muestras obtenidas en la República Mexicana y en Zona Metropolitana del Valle de México (ZMVM).

El resultado de este trabajo representa un avance en el desarrollo de metodologías para el análisis de herbicidas triazínicos en muestras a base de maíz como la tortilla, el método propuesto es novedoso y permite monitorear las concentraciones de atrazina y simazina en tortillas a niveles traza y el control de calidad de este alimento, tomando como referencia el Límite Máximo Residual que establece la legislación mexicana para la atrazina y simazina en el cultivo de maíz (250 ng/g).

## 2. INTRODUCCIÓN

En la actualidad el uso de plaguicidas es una práctica necesaria para sostener la producción de alimentos y piensos a nivel mundial. Los plaguicidas reducen los daños y pérdidas en cultivos causadas por insectos, hongos, malas hierbas y roedores, por lo que su uso mejora considerablemente los rendimientos de producción (Barra Caracciolo & Grenni, 2022; Mahmood et al., 2016). La atrazina y la simazina son dos de los plaguicidas más empleados en México y el mundo y se usan principalmente en el cultivo de cereales como trigo, soya y maíz, así como alfalfa, sorgo y frutos cítricos (Maggi et al., 2019; LeBaron et al., 2008).

En el caso de México, la producción de maíz está ligada a la producción de tortillas, un alimento base en la dieta de su población. Del total de maíz producido en el país (27.5 millones de toneladas) el 81 % se destina al consumo humano, el 61 % en forma de tortillas y el 20 % restante en forma de otros alimentos derivados de maíz (Méndez, 2019). Al ser un producto derivado de maíz, las tortillas son susceptibles a contaminación por agroquímicos como herbicidas triazínicos. La contaminación de maíz por herbicidas triazínicos ya ha sido planteada y probada con anterioridad (Zhao et al., 2015). Sin embargo, hasta el momento no existen estudios enfocados en la contaminación de tortillas con herbicidas triazínicos; tampoco metodologías para su determinación en este tipo de muestras.

Por otra parte, los estudios más recientes han demostrado que los herbicidas triazínicos como la atrazina y las simazina son capaces de causar daños a especies no objetivo como anfibios, reptiles, algas, peces, tortugas, ratones, etc. Ambos herbicidas presentan un alta persistencia en suelos y agua, además de llegar a biomagnificarse a través de la cadena trófica (Tyohemba et al., 2021). Su toxicidad en humanos sigue siendo controversial y aunque actualmente son clasificados como no cancerígenos para humanos, los últimos estudios parecen

indicar que estos herbicidas podrían modificar mecanismos de expresión genética que resultan perjudiciales para la salud humana.

En México el marco normativo establece límites máximos residuales para la atrazina y simazina en los cultivos de maíz, no obstante, no existen LMR para estos plaguicidas en tortillas de maíz. Aunado a ello, a nivel mundial el consumo de tortillas de maíz y maíz ha aumentado (Guzmán-Soria et al., 2019; Rooney & Serna-Saldivar, 2016). Es por esto por lo que los estudios enfocados al desarrollo de nuevas metodologías para la determinación de contaminantes en tortillas resultan de gran importancia.

Si bien en la actualidad existen numerosas metodologías para la determinación de herbicidas en muestras alimenticias, la complejidad y variabilidad intrínseca en cada una de las muestras, convierte a cada caso en un problema de análisis particular. La EAU, EFS y EFS-D son sólo ejemplos de técnicas que facilitan la preparación de muestras previo análisis instrumental. En concreto, la EAU ha encontrado aplicaciones en múltiples campos de la química moderna como alternativa a otras técnicas de extracción convencionales. La EAU presenta la principal ventaja de disminuir los tiempos de extracción, la energía y los disolventes requeridos en la preparación de muestras alimenticias y productos naturales (Chemat et al., 2017). Por otra parte, la extracción en fase sólida moderna ha sido usada desde el año de 1960 y se encuentra bien consolidada como una técnica con la que se obtienen buenos recobros, requiere bajo consumo de disolventes y materiales, además de lograr concentrar y limpiar la muestra en una sola etapa (Moldoveanu & David, 2021). La extracción en fase sólida dispersiva es una técnica que desde su desarrollo ganó gran popularidad, y en la actualidad se ha incorporado al desarrollo de metodologías para la determinación de plaguicidas en muestras alimenticias (Anastassiades et al., 2003). De esta técnica destaca: la facilidad con la que se miniaturiza, su bajo consumo de disolventes, así como los buenos recobros que se logran.

En este trabajo se desarrolló una metodología que permite la determinación de atrazina y simazina en tortillas mediante las técnicas de extracción: Extracción Asistida por Ultrasonido, Extracción en Fase Sólida y Extracción en Fase Sólida Dispersiva, los extractos se analizaron por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución con detección ultravioleta. La metodología fue validada y aplicada al análisis de muestras de tortillas provenientes de diferentes puntos de la Zona Metropolitana del Valle de México, así como de diferentes estados de la República Mexicana. Los resultados obtenidos permitieron obtener una metodología confiable con la que es posible monitorear atrazina y simazina en tortillas de maíz tomando como referencia el LMR que establece la legislación mexicana para el cultivo de maíz.

### **3. HIPÓTESIS**

El empleo de las técnicas de EAU, EFS y EFS-D permitirá el desarrollo de una metodología para la extracción selectiva de atrazina y simazina en tortilla de maíz. La separación y cuantificación de los herbicidas podrá llevarse a cabo mediante HPLC-UV con límites de detección que permitan realizar un monitoreo de los herbicidas en muestras provenientes de la Ciudad de México y Área Metropolitana.



## **4. OBJETIVOS**

### **4.1. Objetivo general**

Desarrollar y validar un nuevo procedimiento analítico para la determinación de atrazina y simazina en tortillas de maíz, empleando las técnicas de extracción asistida por ultrasonido, extracción en fase sólida, extracción en fase sólida dispersiva y cromatografía líquida de alta resolución con detección ultravioleta. Con el fin de mejorar la calidad y seguridad alimentaria y contribuir al desarrollo de métodos para la detección de plaguicidas en alimentos.

#### **4.1.1. Objetivos específicos**

Desarrollar y optimizar la extracción selectiva de atrazina y simazina proveniente de tortillas de maíz, empleando técnicas de extracción asistida por ultrasonido, extracción en fase sólida y extracción en fase sólida dispersiva. A fin de separar los compuestos de interés selectiva y cuantitativamente.

Optimizar el análisis cuantitativo de los extractos por cromatografía de líquidos de alta resolución en fase reversa con detección ultravioleta. Con el fin de asegurar la eficacia y eficiencia de la técnica.

Validar la metodología desarrollada para la determinación de atrazina y simazina en tortillas de maíz, con la finalidad de demostrar que el método es apto para su uso.

Aplicar la metodología desarrollada al análisis de muestras reales provenientes de la Ciudad de México y área metropolitana, así como de diferentes estados de la República Mexicana. Con la intención de probar la capacidad de la metodología frente a diferentes muestras y condiciones prácticas.

## 5. MARCO TEÓRICO

### 5.1. Los plaguicidas

Los plaguicidas son sustancias químicas o mezclas de estas, que se emplean para controlar y eliminar plagas como insectos, hierbas, roedores y hongos que ocasionan daños a cultivos, ganado y/o a nuestra salud. (Mahmood et al., 2016). Existen diversas clasificaciones para los plaguicidas, una de la más empleadas se basa en la agrupación por organismo objetivo (plaga), bajo este criterio los plaguicidas se suelen clasificar como insecticidas, herbicidas, rodenticidas, fungicidas, acaricidas, etc. (EPA, 2022a).

Se denomina como herbicida a todas aquellas sustancias cuyo organismo objetivo es una maleza o hierba con un crecimiento perjudicial para los cultivos. Los herbicidas se clasifican a su vez en familias en función de su estructura química, algunas de estas familias son los carbamatos, triazinas, fenoxiacéticos, sulfonilureas, dinitroanilinas, midazolinonas y ciclohexanodionas.

Los herbicidas han funcionado como una herramienta para controlar los daños por plagas y satisfacer la demanda mundial de alimentos, adicionalmente han logrado reducir los costos y tiempos de cultivo, reducir prácticas de labranza que promueven la erosión del suelo e incrementar el rendimiento de algunos cultivos hasta en un 320 % (Barra Caracciolo & Grenni, 2022). En contra parte, el uso de herbicidas ha resultado en daños a especies no objetivo como plantas, insectos, anfibios, aves y mamíferos, contaminación de mantos acuíferos, desbalance de la diversidad microbiana de suelos y sistemas acuáticos, así como en el incremento a la exposición que tenemos hacia estos compuestos y sus metabolitos de degradación.

Particularmente, los herbicidas triazínicos se han empleado desde 1950 en todo el mundo. En la actualidad más de 100 países emplean herbicidas triazínicos para el control de malezas. En los países industrializados el 85 a 100 % de los terrenos cultivados emplean algún tipo de herbicida (LeBaron et al., 2008).

## 5.2. Herbicidas triazínicos

Los herbicidas triazínicos son una familia de compuestos que comparten un anillo aromático triazínico en común. Se les clasifica en cuatro grupos las clorotriazinas, metiltiotriazinas, metoxitriazinas y triazinonas. Los primeros tres grupos tienen un anillo simétrico en común (*s*-triazinas) mientras que el anillo de las triazinonas es asimétrico (*as*-triazinas). El nombre de cada uno de los compuestos depende de los sustituyentes del anillo, las clorotriazinas se nombran con la terminación *-zina*, las metiltiotriazinas con la terminación *-trina* y las metoxitriazinas con la terminación *-on* (LeBaron et al., 2008). En la tabla 5.2. Se muestran los compuestos pertenecientes a cada grupo.

**Tabla 5.2.** Clasificación de los herbicidas triazínicos. Modificada de (LeBaron et al., 2008).

Grupo	Tipo de anillo	Triazina (nombre común)
Clorotriazinas		Atrazina, Simazina, Cianazina, Propazina, Terbutilazina, Trietazina, Secbutilazina.
Metiltiotriazinas	Anillo triazínico simétrico ( <i>s</i> -triazinas)	Ametrina, Aziprotina, Desmetrina, Dimetametrina, Dipropetrina, Metoprotrina, Prometrina, Simetrina y Terbutrina.
Metoxitriazinas		Atraton, Prometon, Secbumeton y Terbumeton.
Triazinonas	Anillo triazínico asimétrico ( <i>as</i> -triazinas)	Hexazinona, Metamitron, Metribuzina.

Existen otros compuestos como la cyromazina y la anilazina que a pesar de ser compuestos triazinicos quedan fuera de esta clasificación ya que carecen de

actividad herbicida (la cyromazina es un insecticida y la anilazina un fungicida) (P. Zhang et al., 2018 & Ali et al., 2021).

Los herbicidas triazínicos se emplean en el control de malezas de hoja ancha y gramíneas en más de cincuenta cultivos de relevancia mundial como lo son el maíz, soya, trigo, sorgo, caña de azúcar, alfalfa y cítricos (LeBaron et al., 2008). Estos herbicidas suelen usarse solos o en combinación con otros ingredientes activos lo que aumenta el espectro de control de maleza, además pueden aplicarse preemergencia o post-emergencia (antes o después de la germinación) (Giannetto et al., 2014).

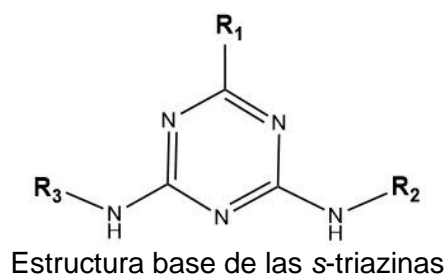
De los 23 plaguicidas triazínicos que se reportan en la tabla 5.2, sólo 15 siguen empleándose actualmente y entre estos la atrazina y la simazina son los más usados. La atrazina es el octavo herbicida más empleado a nivel mundial, mientras que la simazina figura en el lugar 37 de una lista de alrededor de 500 plaguicidas de mayor uso (Maggi et al., 2019).

### **5.2.1. Propiedades fisicoquímicas de las triazinas**

Las propiedades fisicoquímicas de las triazinas dependen de los sustituyentes presentes en el anillo triazínico de cada una. Así, por ejemplo, la tendencia general para la acidez es Clorotriazinas > Metiltiotriazinas > Metoxitriazinas y está dada por el sustituyente de la posición R1 (Elbashir, 2014). La estructura general de los compuestos s-triazínicos puede observarse en la tabla 5.2.1.

La solubilidad de las triazinas es mayor en condiciones ácidas. Las s-triazinas que tienen en R1 un grupo -SCH<sub>3</sub> son más polares que las que contienen al grupo -Cl según el coeficiente de reparto n-octanol / agua, Kow (log P) (Elbashir, 2014).

**Tabla 5.2.1.** Estructura química de las s-triazinas.<sup>a</sup> Modificado de (LeBaron et al., 2008)



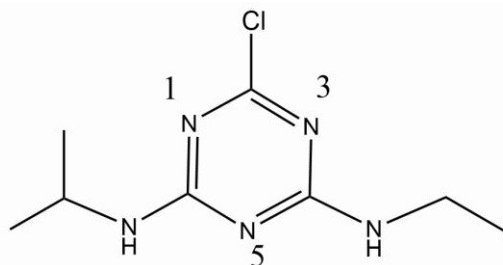
Compuesto	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	pKa	Log P <sup>b</sup>	PM <sup>c</sup> (g/mol)	Solubilidad en H <sub>2</sub> O <sup>d</sup> (mg/L)
Atrazina	Cl	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	1.7	2.5	215.7	33
Simazina	Cl	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	1.6	2.1	201.7	6.2
Cianazina	Cl	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	C(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CN	5.1	2.1	240.7	171
Terbutilazina	Cl	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	2.0	3.0	229.7	8.5
Propazina	Cl	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	1.7	2.9	229.7	8.6
Ametrina	SCH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	4.0	2.6	227.3	200
Simetrina	SCH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	4.0	2.6	213.3	400
Terbutrina	SCH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	4.3	3.7	241.4	25
Prometrina	SCH <sub>3</sub>	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	4.1	3.1	241.4	33
Desmetrina	SCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	4.0	2.7	213.3	580
Dimetametrina	SCH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (2)	4.1	3.8	255.4	50
Prometon	OCH <sub>3</sub>	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	4.3	2.7	225.3	750
Terbumeton	OCH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	4.6	3.0	225.3	130

a: Se incluyen sólo las s-triazinas que continúan en uso, b: Medido a 20 °C, c: PM: Masa molecular, d: Solubilidad a 20 °C y pH 7.

### 5.2.1.1. Propiedades fisicoquímicas de la atrazina

#### Estructura química

La estructura química de la atrazina (2-cloro-4-etilamino-6-isopropilamino-1,3,5-triazina) se presenta en la Figura 5.2.1.1. La atrazina presenta un anillo heterocíclico formado por seis átomos, tres átomos de nitrógeno en la posición 1, 3 y 5, y tres átomos de carbono en la posición 2, 4 y 6.



2-cloro-4-etilamino-6-isopropilamino-1,3,5-triazina

**Figura 5.2.1.1.** Estructura química de la atrazina (Elaboración propia).

La estructura presenta además un átomo de cloro en la posición 2, así como sustituyentes N-alquilados en las posiciones 4 y 6. Físicamente este compuesto es un sólido blanco, cristalino e incoloro (ATSDR, 2021).

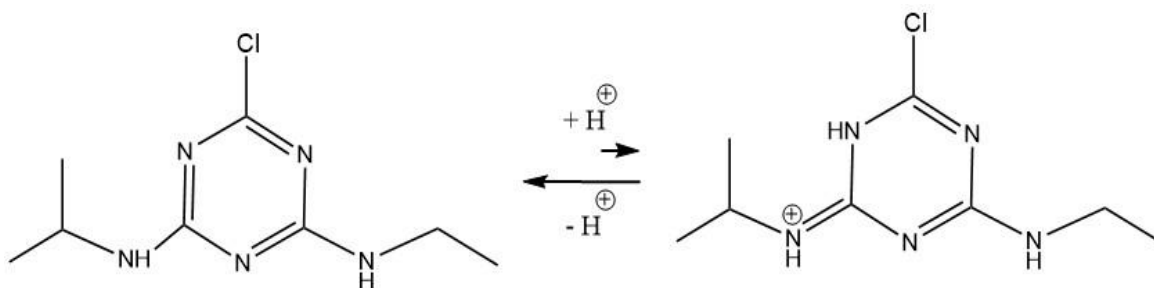
### **Estabilidad y reactividad**

La atrazina por si sola es estable a temperatura ambiente y su almacenamiento se reporta por 5 años (Merck, 2022a). En medio acuoso y sin oxígeno la vida media ( $t_{1/2}$ ) de la atrazina es de 578 días, cuando se encuentra en agua (pH = 7) y expuesta a la luz solar su vida media se reduce a 168 días (EPA et al., 2018). El valor  $t_{1/2}$  en suelos depende de diversos factores, tales como, el tipo de suelo, la cantidad de materia orgánica, la temperatura, el contenido de humedad y la composición microbiana del suelo (Mueller et al., 2017; Chowdhury et al., 2021). Existen reportes en diferentes suelos en los que el valor  $t_{1/2}$  va desde 2.3 días hasta 1 año (Wang et al., 2018). En el aire se ha detectado hasta 8 meses después de su aplicación (Yera & Vasconcellos, 2021).

La aromaticidad y disposición simétrica del anillo 1,3,5-triazínico confiere a la atrazina una mayor estabilidad comparada con las *as*-triazinas (1,2,4-triazinas) en las que la disposición asimétrica del anillo favorece su reactividad y ruptura (Kushwaha & Sharma, 2020).

La atrazina es susceptible a dechloración y reacciones de hidroxilación en la posición 2 del anillo. Diversas estrategias de remediación ambiental se han desarrollado bajo este esquema en donde el átomo de cloro en la posición 2 reacciona con un nucleófilo mediante una reacción de Sustitución Nucleofílica Bimolecular ( $SN_2$ ) y posteriormente se da lugar a una reacción de hidrólisis (Mu et al., 2019). La atrazina es resistente a la hidrólisis abiótica a un pH neutro (Poonia et al., 2022), sin embargo, reacciona rápidamente y forma derivados hidroxil frente a álcalis y ácidos fuertes, a pH 1 el tiempo de vida media es de 9.5 días, a pH 13 de 5.0 días y a pH 5 de 86 días (NIH, 2018a).

Este herbicida es una base muy débil ( $pK_a$  1.7) y puede establecer un equilibrio ácido-base. Cuando se trabaja en medio acuoso y a pH mayor al  $pK_a$  la especie sin carga es la predominante, cuando el pH es menor la especie predominante es la especie con carga (especie protonada) (Alberti et al., 2022). Este equilibrio puede observarse en la Figura 5.2.1.1.1.



**Figura 5.2.1.1.1.** Equilibrio ácido base de la atrazina (Elaboración propia).

En el medio ambiente la atrazina sufre al menos 17 reacciones de descomposición entre las que se encuentran: la dechloración, desalquilación y desaminación, por mencionar algunas. Por medio del estudio de estas reacciones se ha relacionado a la atrazina con 15 compuestos de descomposición algunos de ellos son la desetilatrizona, 2-hidroxiatrizona y desisopropilatrizona (Wang et al., 2018; KEGG, 2021).

## Solubilidad

La atrazina es poco soluble en agua (33 mg/L). La solubilidad de esta especie en disolventes orgánicos como el metanol y acetato de etilo facilitan su manejo y determinación en técnicas como la cromatografía de líquidos y de gases (tabla 5.2.1.1).

**Tabla 5.2.1.1.** Solubilidad de la atrazina en diferentes disolventes (NIH, 2018a).

Disolvente	Solubilidad <sup>a</sup> (g/L)
Agua	0.033
Pentano	0.36
Éter etílico	12
Metanol	18
Acetato de etilo	28
Cloroformo	52
Dimetilsulfóxido	183

<sup>a</sup> Solubilidad a 20 °C

## Propiedades fisicoquímicas de la atrazina

Otras propiedades fisicoquímicas de interés se presentan en la tabla 5.2.1.1.1. En esta tabla puede observarse que el valor Log P de la atrazina es mayor a 1 y por tanto este compuesto presenta un carácter hidrofóbico y una mayor afinidad hacia los disolventes orgánicos. Adicionalmente, la atrazina es estable a calentamiento, siendo su temperatura de fusión de 173 °C.

**Tabla 5.2.1.1.1.** Propiedades fisicoquímicas de la atrazina. Modificado de (Fan, 2014)

Propiedad	Valor
Masa molecular	215.7 g/mol
Punto de fusión	173 °C
pKa	1.7 (20 °C)
Log P (octanol/agua)	2.5 (20 °C)
Momento dipolar <sup>a</sup>	2.46 D
Presión de vapor	2.89x10 <sup>-7</sup> mm Hg (25 °C)
Constante de Ley de Henry	2.36x10 <sup>-9</sup> atm·m <sup>3</sup> ·mol <sup>-1</sup> (25 °C)
Constante de reacción OH atmosférico	2.73x10 <sup>-11</sup> cm <sup>3</sup> ·moléculas·s <sup>-1</sup> (25 °C)

<sup>a</sup> Medido en Dioxano a 20 °C

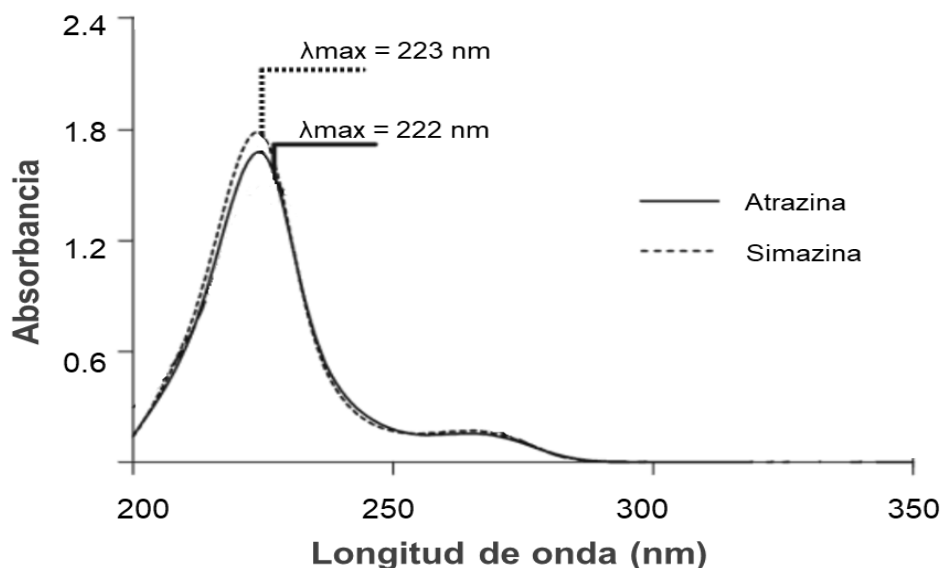


Tomando como referencia el valor Log P de la tabla anterior, este plaguicida presenta una movilidad moderada en suelos, por lo que puede contaminar los mismos, así como ser arrastrado por los efluentes y llegar a los sistemas de aguas subterráneos (Kharitonova et al., 2015; Wang et al., 2020).

Cuando la atrazina se encuentra disuelta en agua presenta una baja presión de vapor ( $2.89 \times 10^{-7}$  mm Hg) y un valor bajo para la constante de Henry ( $2.36 \times 10^{-9}$  atm·m<sup>3</sup>·mol<sup>-1</sup>) lo que explica su escasa volatilidad de las superficies de agua (Almasi et al., 2020). A pesar de ello, este herbicida se ha detectado a cientos de kilómetros de distancia de sus sitios de aplicación siendo que su distribución espacial se ve favorecida por factores como la temperatura, velocidad y dirección del viento y precipitaciones (Yera & Vasconcellos, 2021).

### Espectro de absorción molecular

El espectro UV de la atrazina y el de la simazina presentan un máximo de absorción a una longitud de onda de 222 y 223 nm, respectivamente; y otro más pequeño en 265 nm (Figura 5.2.1.1.2).

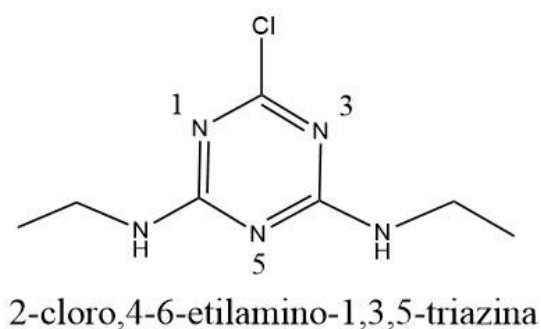


**Figura 5.2.1.1.2.** Espectro de absorción ultravioleta de la atrazina y la simazina. Modificado de (González et al., 2007)

## 5.2.1.2. Propiedades fisicoquímicas de la simazina

### Estructura química

La estructura de la simazina (Figura 5.2.1.2) y de la atrazina difieren sólo en el sustituyente 6 del anillo triazínico, la simazina presenta un sustituyente N-etilamino y la atrazina un N-isopropilamino. La simazina es el herbicida triazínico con menor masa molecular entre todos los herbicidas triazínicos.



**Figura 5.2.1.2.** Estructura química de la simazina (Elaboración propia).

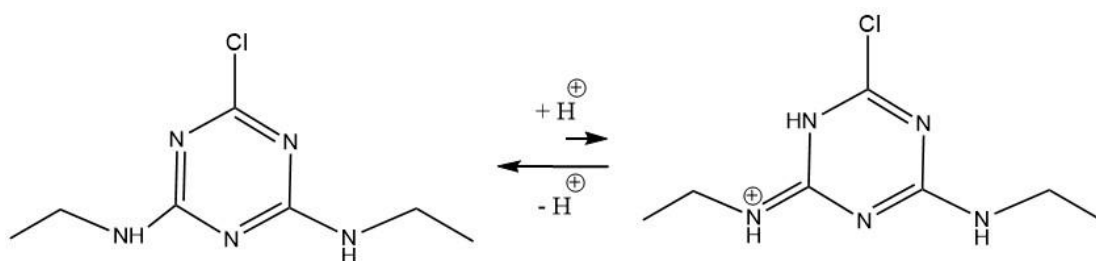
En su forma pura la simazina es un sólido blanco y cristalino (Gunasekara et al., 2007).

### Estabilidad y reactividad

La simazina es menos estable que la atrazina. En almacenamiento y refrigeración los estándares tienen una expiración de hasta 3 años (Merck, 2022b). El valor de  $t_{1/2}$  en agua sin exposición a la luz es de 30 días, cuando hay exposición a la luz  $t_{1/2}$  es de 1 día. En el suelo los valores de  $t_{1/2}$  reportados son 8 - 365 días y como ocurre con múltiples herbicidas, el valor de  $t_{1/2}$  en suelo se ve afectado por parámetros como la humedad, composición del suelo, nivel de exposición solar y composición microbiana (EPA, 2022b; Turner et al., 2003).

La simazina es estable a hidrólisis en medio acuoso con pH 5, 7 y 9 hasta por 28 días (EPA, 2022b). Al igual que todas las s-triazinas la simazina contiene un anillo aromático estabilizado por deslocalización de la densidad electrónica en el sistema de enlaces  $\pi$  conjugado (Balawejder et al., 2016).

Todas las triazinas presentan un carácter débilmente básico y particular la simazina es la especie con menor basicidad ( $pK_a$  1.6) entre los herbicidas triazínicos. En la figura 5.2.1.2.1 se presenta el equilibrio ácido-base de este herbicida (Kushwaha & Sharma, 2020).



**Figura 5.2.1.2.1.** Equilibrio ácido base de la simazina (Elaboración propia).

La N-desalquilación y la hidroxilación en la posición 2-cloro son las principales rutas de degradación que sigue la simazina al encontrarse en el ambiente (Turner et al., 2003).

La simazina, así como otros herbicidas triazínicos comparten productos de descomposición que entrelazan sus rutas de degradación, así, por ejemplo, la desisopropilatrazina es un producto de degradación común para la simazina y la atrazina, este compuesto a su vez se degrada en diaminoclorotriazina que también es un compuesto de degradación común para la propazina (KEGG, 2021).

## Solubilidad

La solubilidad de la simazina en agua es la más baja entre todos los herbicidas triazínicos (6.2 mg/L) e incluso se le llega a reportar como una especie insoluble en

agua a 20 °C (NIH, 2018b). Con el aumento de la temperatura la solubilidad de la simazina puede aumentar hasta 17 mg/L (50 °C) (EPA, 2021). La simazina se disuelve en mayor medida en disolventes orgánicos como la acetona, metanol y etanol de acuerdo con los datos presentados en la tabla 5.2.1.2.

**Tabla 5.2.1.2.** Solubilidad de la simazina en diferentes disolventes (NIH, 2018b).

Disolvente	Solubilidad <sup>a</sup> (mg/L)
Agua	0.0062
Pentano	3.0
n-hexano	3.1
Tolueno	130
Metanol	400
Etanol	570
Acetona	1500

<sup>a</sup> Solubilidad a 20 °C

### Propiedades fisicoquímicas de la simazina

En la tabla 5.2.1.2.1 se presentan las propiedades fisicoquímicas de la simazina. El valor Log P permite que tenga una movilidad moderada y ligeramente mayor que la de atrazina en los suelos, por lo que ha podido llegar a ser detectada en los mantos acuíferos (EPA, 2022b). Los reportes indican que la simazina en estado sólido es estable al calentamiento y temperaturas de hasta 150 °C, siendo su punto de fusión de 226 °C (Gunasekara et al., 2007).

**Tabla 5.2.1.2.1.** Propiedades fisicoquímicas de la simazina. Modificado de (Fan, 2014).

Propiedad física	Valor
Masa molecular	201.7
Punto de fusión	226 °C
pKa	1.6 (20 °C)
Log P (octanol/agua)	2.1 (20 °C)
Momento dipolar <sup>a</sup>	2.99 D
Presión de vapor	2.21x10 <sup>-8</sup> mm Hg (25 °C)
Constante de Ley de Henry	9.42x10 <sup>-10</sup> atm·m <sup>3</sup> ·mol <sup>-1</sup> (25 °C)
Constante de reacción atmosférico	OH 1.10x10 <sup>-11</sup> cm <sup>3</sup> ·moléculas·s <sup>-1</sup> (25 °C)

<sup>a</sup> Medido en Dioxano a 20 °C.

Al disiparse en la atmósfera el herbicida reacciona con los radicales OH presentes en la aire y alcanza una vida media de 2.8 h (EPA, 2010).

### **Espectro de absorción**

La simazina presenta un máximo de absorción a una longitud de onda de 223 nm, tal y como se observa en la Figura 5.2.1.1.2. El espectro de absorción de la simazina, así como el de la atrazina y otras triazinas como la sec-butilazina, ter-butilazina y cianazina se caracterizan por presentar una banda máxima de absorción cercana a los 220 nm debida al grupo cromóforo que comparten en común, formado por un anillo triazínico y un átomo de cloro (Liu et al., 2019).

## **5.2.2. Toxicología**

### **Toxicidad de las triazinas**

El mecanismo de acción de los plaguicidas triazínicos se basa en la inhibición de la cadena de electrones con el consecuente paro de la fotosíntesis; de aquí el carácter herbicida de las triazinas que ocasiona la muerte de plantas susceptibles (Pitty, 2018).

Los herbicidas pueden llegar al cuerpo humano a través de ingestión, inhalación o absorción cutánea por exposición directa, ocasionando un efecto tóxico agudo como: la irritación ocular, problemas dérmicos, dolor de cabeza y náuseas (Mnyandu & Mahlambi, 2021). Sin embargo, la gran mayoría de las veces los herbicidas se ingieren a través de alimentos contaminados y su toxicidad llega a ser variable y dependiente de la naturaleza de la sustancia y de la población afectada, siendo los niños y ancianos la población más vulnerable, mientras que los efectos tóxicos pueden pasar de ser agudos a crónicos.

## **Toxicidad de la atrazina**

Aunque existe controversia sobre la posible carcinogenicidad de la atrazina en humanos, los estudios actuales parecen indicar que la atrazina afecta en mayor medida a especies no objetivo como organismos acuáticos, roedores, abejas y algas. Hasta el momento la carcinogenicidad de la atrazina en humanos no ha sido demostrada por ningún estudio y en la década anterior se le relacionó con: restricción del crecimiento fetal durante la gestación (Chevrier et al., 2011), reducción en la calidad del semen de hombres fértiles (Swan, 2006), desarrollo de gastroquiasis fetal (Waller et al., 2010), cáncer de estómago (Van Leeuwen et al., 1999) y partos prematuros (Rinsky et al., 2012).

Actualmente la atrazina es “no clasificable en cuanto a su carcinogenicidad en humanos” (Grupo 3) de acuerdo con la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC, por sus siglas en inglés), siendo que los estudios mecanísticos de carcinogenicidad de la atrazina no resultan de relevancia en humanos (IARC, 2020). De acuerdo con la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA, por sus siglas en inglés) la atrazina “no es un probable cancerígeno para humanos” (EPA et al., 2018). El instituto Nacional para la Seguridad y Salud Ocupacional (NIOSH, por sus siglas en inglés) ha designado a la atrazina como no cancerígeno en humanos, teniendo en cuenta la insuficiencia de datos y estudios que lo muestren (NIOSH, 2019). Finalmente la Agencia para Sustancias Tóxicas y Registro de Enfermedades (ATSDR, por sus siglas en inglés) ha establecido que no existe información y estudios suficientes para determinar si la atrazina puede causar cáncer en humanos (ATSDR, 2021).

La atrazina resulta perjudicial para otros organismos “no objetivo”, como lo son plantas, animales y microorganismos. En el reino de las plantas este herbicida tiene un efecto perjudicial en especies como las algas y microalgas, pudiendo llegar a ser mortal para el pasto marino (Singh et al., 2018). La atrazina afecta considerablemente a los ecosistemas acuáticos, entre las especies perjudicadas se

encuentran: mejillones, ranas, sapos, bagres, truchas y tortugas, por mencionar algunos (Fatima & Rasool, 2022; Singh et al., 2018; Gao et al., 2022; Barra Caracciolo & Grenni, 2022). En animales como las ratas puede causar daños hepáticos, endocrinos, alteraciones en el tejido cerebral y glándula sublingual (Rashad et al., 2022; Giannetto et al., 2014; Ahmed et al., 2022). En insectos como las abejas melíferas puede causar intoxicación sinérgica (Fellows et al., 2022). En los suelos altera el crecimiento y composición de la población microbiana (Abdullahi et al., 2022).

Retomando la toxicidad de esta herbicida en humanos; los estudios in vitro más recientes sugieren la posibilidad de que la atrazina ocasione toxicidad epigenética crónica (Sánchez et al., 2020), expresión de especies tóxicas para la mitocondria (Sagarkar et al., 2016), alteración en la expresión de mi-RNA (Wirbisky et al., 2016), alteración de la expresión de genes involucrados en procesos neuronales (Wirbisky et al., 2016), modificación de la expresión de proteínas involucradas en la transcripción (Zhu et al., 2022) y alteraciones epigenéticas relacionadas con la enfermedad de Parkinson (Xie et al., 2021). En resumen, los estudios más recientes sugieren que la atrazina puede modificar los mecanismos de la expresión genética, pudiendo resultar perjudicial para la salud en humanos.

Recientemente también se ha relacionado a la atrazina con la formación de compuestos N-nitroso (familia de alta carcinogenicidad), formados a partir de la ingesta de agua contaminada con atrazina en el aparato digestivo humano, sin embargo, la toxicidad de estos compuestos en humanos no ha sido probada (Sweeney, 2022).

### **Toxicidad de la simazina**

La simazina es un herbicida que ha mostrado una toxicidad similar a la de la atrazina, sin embargo, la simazina ha sido menos estudiada, por lo que algunas entidades gubernamentales utilizan la base de datos de la atrazina para

complementar los datos de la simazina y bajo este esquema realizar los criterios de valoración de toxicidad (Silva & Iyer, 2014).

En la actualidad no existe evidencia científica sobre la carcinogenicidad de la simazina en humanos, la simazina parece afectar en mayor medida a otras especies “no objetivo”. Los estudios en ratones han mostrado que perjudica el desarrollo de sus crías (Park et al., 2014), como sustancia externa, la simazina es capaz de modificar microambientes y niveles tróficos que terminan por afectar el desarrollo de reptiles, plantas acuáticas y diatomeas (Wang et al., 2021; Vervliet-Scheebaum et al., 2010; Sahraoui et al., 2022), está demostrado que este herbicida es un alguicida (Onduka et al., 2022) y la EPA ha identificado riesgos potenciales para otras especies como peces de agua dulce, aves y anfibios (EPA, 2020). Los resultados de estos y otros estudios han mostrado una notable similitud respecto a la toxicidad de la atrazina y simazina; esta es la principal razón por la que estos dos herbicidas sumados a la propazina y algunos de sus metabolitos se han agrupado y estudiado bajo un mecanismo de toxicidad en común (Silva & Iyer, 2014).

De manera análoga, la EPA ha establecido que la simazina “no es un probable cancerígeno para humanos”, como resultado de la evaluación del riesgo de la exposición dietética en humanos y la revisión de 93 publicaciones realizadas entre 1990 y 2017 (EPA, 2020), a su vez la IARC ha clasificado a la simazina dentro del Grupo 3 “no clasificable en cuanto a su carcinogenicidad en humanos” (IARC, 2022).

Los estudios en animales más recientes han relacionado a la simazina con lesiones neuronales que modifican la actividad dopaminérgica (Li et al., 2020), inmunotoxicidad en células del bazo de ratones (Ren et al., 2013), modificación de la expresión genética que conducen a cambios fenotípicos en ranas macho (Sai et al., 2015), modificación del desarrollo y actividad reproductiva en ratones (Park & Bae, 2012), neurotoxicidad en células de ratones (Jia Yu et al., 2016) y disminución



de la tasa de supervivencia de ratas por exposición durante el periodo gestacional y de lactancia (XueTing et al., 2017), sólo por mencionar los estudios toxicológicos más recientes.

La simazina al igual que la atrazina ha sido relacionada con la formación de compuestos nitroso y aunque el potencial carcinogénico de estos no ha sido probado por falta de estudios, se considera que el riesgo real de la simazina y atrazina en humanos no está resuelto (Sweeney, 2022; ATSDR, 2009). Con lo expuesto en esta sección se resalta la importancia y necesidad de realizar un mayor número de investigaciones en relación con el potencial toxicológico que pueda tener la simazina y la atrazina en humanos.

### **5.2.3. Normatividad**

La seguridad alimentaria es una parte fundamental de los programas de salud en todos los países y por tal razón las diferentes entidades gubernamentales han establecido límites máximos residuales para sustancias como los plaguicidas empleados en productos de origen animal y/o vegetales destinados al consumo humano. A su vez, los hábitos de consumo y alimentación son distintos en las diferentes regiones del mundo, consecuentemente, existen diferentes normas, reglamentos o estatutos en las que se publican diferentes valores LMR, aunque en todos los casos se persigue un mismo fin; el de garantizar la salud de la población.

El LMR es el nivel más alto de residuos de un plaguicida que puede ser tolerado legalmente en un alimento o pienso cuando el plaguicida es aplicado correctamente, de acuerdo con las Buenas Prácticas Agrícolas (FAO, 2021). Esta sección se enfoca principalmente en los LMR establecidos para el maíz.

## Normatividad internacional

A nivel internacional diferentes agencias regulan el uso de atrazina y simazina en maíz, algunas de estas entidades son el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA), la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) y la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS) en México, las tablas 5.2.3 y 5.2.3.1 se muestran los valores LMR permitidos por estas y otras agencias.

**Tabla 5.2.3.** Límites máximos de residuos (LMR) internacionales en maíz para la atrazina (Elaboración propia).

	EUA	Argentina	Brasil	Unión Europea	Canadá	Japón	México
<b>LMR (ng/g)</b>	200 <sup>1</sup>	250	250	50	200	200	250
<b>Matriz</b>	Grano de maíz	Grano de maíz	Maíz	Maíz	Mazorca* o granos de maíz	Maíz	Maíz
<b>Agencia</b>	USDA	CIAFA	ANVISA	EFSA	PCPA	JFCRF	COFEPRIS

1. El LMR para Estados Unidos de América (EUA) está expresado para la atrazina, sus metabolitos y sus productos de degradación.

CIAFA. Cámara de la Industria Argentina de Fertilizantes y Agroquímicos

ANVISA. Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria.

JFCRF. Fundación Japonesa de Investigación Química de Alimentos

PCPA. Alianza farmacéutica pan-canadiense. \*Con grano y sin cáscara

**Tabla 5.2.3.1.** Límites máximos de residuos (LMR) internacionales en maíz para la simazina (Elaboración propia).

	USA	Argentina	Brasil	Unión Europea	Canadá	Japón	México
<b>LMR (ng/g)</b>	200	500	20	100	N.R.	300	250
<b>Matriz</b>	Grano de maíz	Grano de maíz	Maíz	Maíz	Maíz	Maíz	Maíz
<b>Agencia</b>	USDA	CIAFA	ANVISA	EFSA	PCPA	JFCRF	COFEPRIS

N.R. No reportado

Además de ser un componente crítico en la seguridad alimentaria, en la actualidad los LMR funcionan como un elemento clave en la legislación de exportaciones e importaciones, siendo que al día de hoy cada vez más acuerdos comerciales buscan homologar o cumplir con los LMR de las partes involucradas sin dejar de asegurar la inocuidad de los alimentos (Ambrus & Yang, 2016).

El maíz no es el único cultivo en el que se emplean estos herbicidas, existen un mayor número de alimentos a través de los cuales puede darse la ingesta de atrazina y simazina, por tal motivo los valores de LMR se determinan con base en la Ingesta diaria admisible (IDA), que ofrece un valor sobre la cantidad de sustancia que puede estar presente en los alimentos y consumirse diariamente durante toda la vida sin que se aprecie un riesgo sobre la salud (EFSA, 2022). La tabla 5.2.3.2 ofrece un listado de los valores de IDA para la atrazina y la simazina, de acuerdo con diferentes agencias internacionales.

**Tabla 5.2.3.2.** Valores de IDA para la atrazina y la simazina. Modificada de (Abass et al., 2021).

	IDA (mg/kg pc/ día)			
	ATSDR	EFSA	EPA	Codex
Atrazina	0.01	0.02	0.035	-
Simazina	-	-	0.005	-

### Normatividad nacional

Los herbicidas triazínicos son uno de los grupos de plaguicidas más usados en México (Rosas, Saldarriaga, Chávez, Vergara, & Murillo, 2022) y su uso, comercialización y fabricación está regulado y controlado por las autoridades federales del país. Los instrumentos jurídicos oficiales que rigen estas actividades son la Ley General de Salud (Diario Oficial de la Federación, 2021), la Ley Federal de Sanidad Vegetal y Animal (Diario Oficial de la Federación, 2018) y la Ley General del Equilibrio Ecológico y Protección al Ambiente (Diario Oficial de la

Federación, 2021), que a su vez dan lugar a las Normas Oficiales Mexicanas con un alcance para todo el territorio nacional. Asimismo, existe el reglamento de la Comisión Intersecretarial para el Control del Proceso y Uso de Plaguicidas y Sustancias Tóxicas (CICOPLAFEST), que establece las bases para un adecuado manejo de estos compuestos y sus formulaciones (Diario Oficial de la Federación, 2014).

El uso de atrazina y simazina en territorio mexicano está autorizado a partir de lo declarado en la NOM-032-FITO-1995. Normatividad en la que se establecen los requisitos y especificaciones fitosanitarios para la realización de estudios de efectividad biológica de plaguicidas agrícolas y su dictamen técnico. En lo particular la atrazina y simazina aparecen en el Anexo Técnico II. Plaguicidas autorizados para su uso en México por un periodo de 20 años o más (Anexo presente en la misma norma). Adicionalmente ambos plaguicidas aparecen en la lista de ingredientes activos de la NOM-232-SSA1-2006, que establece los requisitos del envase, embalaje y etiquetado de productos para uso agrícola, forestal, pecuario, jardinería, urbano, industrial y doméstico. Por lo que su regulación también está sujeta a esta norma.

La norma NOM-247-SSA1-2008 establece que el productor de grano, el comercializador del mismo y el industrial, cada uno en el ámbito de su responsabilidad, deben observar que los plaguicidas que se empleen en el tratamiento de granos y semillas almacenados, en medios de transporte, en áreas de almacenamiento, espacios vacíos y para el control de roedores, así como para la desinfestación y protección de granos almacenados a granel o en costales, cumplan con los límites de uso y no excedan los niveles máximos residuales establecidos en el catálogo de Plaguicidas de la CICOPLAFEST (Diario Oficial de la Federación, 2008).

En México el uso de atrazina está permitido en 14 cultivos, aunque el maíz es el cultivo en el que en el que se emplea en mayor medida. La tabla 5.2.3.3 muestra

un listado de los cultivos en los que se emplea este herbicida y el LMR permitido en cada uno. Por otra parte, la simazina se emplea en 19 cultivos en México, siendo los cultivos de frutas cítricas aquellos en los que se emplea en mayor medida, la tabla 5.2.3.3 enlista los LMR de la totalidad de los cultivos en los que se emplea este herbicida.

**Tabla 5.2.3.3.** Cultivos en los que se emplea simazina y la atrazina en México.

<b>Simazina</b>		<b>Atrazina</b>	
<b>Cultivo</b>	<b>LMR (ng/g)</b>	<b>Cultivo</b>	<b>LMR (ng/g)</b>
Plátano	10	Caña De Azúcar	250
Ciruelo	100	Maíz	250
Nogal	200	Sorgo	250
Aguacatero	250	Agave	Exento
Almendro	250	Pastizales	Exento
Caña de azúcar	250	Piña	50
Durazno	250	Potreros	4 000
Fresa	250	Avena	100
Limonero	250	Cebada	100
Maíz	250	Centeno	100
Manzano	250	Trigo	100
Naranja	250	Triticale	100
Peral	250	Arroz	100
Toronjo	250	Manzano	50
Vid	250		
Esparrago	10 000		
Alfalfa	15 000		
Arboles forestales	Exento		
Áreas no cultivadas	Exento		

Elaboración propia. Datos tomados de (COFEPRIS, 2019)

La regulación y monitoreo de atrazina y simazina en México se extiende a diferentes cuerpos de agua, así como al agua para el consumo; potable o embotellada. Las Tabla 5.2.3.4 y 5.2.3.5 proporcionan la información sobre los límites máximos establecidos para los residuos de atrazina y simazina en agua, de acuerdo con lo establecido por la normatividad mexicana.

**Tabla 5.2.3.4.** Normas mexicanas en las que se establece límites de residuos máximos para la atrazina en diferentes matrices (Elaboración propia).

Normativa	Matriz	Límite establecido
NOM-127-SSA1-2017	Agua para consumo humano	0.1 mg/L
NOM-014-CONAGUA-2003	Agua residual para la recarga artificial de acuíferos	0.002 mg/L
NOM-201-SSA1-2015	Agua y hielo para consumo humano envasados a granel	0.5 µg/L (como grupo Compuestos orgánicos halogenados adsorbibles fijos)

**Tabla 5.2.3.5.** Normas mexicanas en las que se establece límites de residuos máximos para la simazina en diferentes matrices (Elaboración propia).

Normativa	Matriz	Límite establecido
NOM-127-SSA1-2017	Agua para consumo humano	0.002 mg/L
NOM-014-CONAGUA-2003	Agua residual para la recarga artificial de acuíferos	0.004 mg/L
NOM-201-SSA1-2015	Agua y hielo para consumo humano envasados a granel	0.5 µg/L (como grupo Compuestos orgánicos halogenados adsorbibles fijos)

## 5.2.4. Contaminación de alimentos con herbicidas

La aplicación de atrazina y simazina puede realizarse pre o postemergencia (antes o después de que emerjan las malezas) (Jialin Yu & McCullough, 2016), cuando la se realiza preemergencia una parte de los herbicidas persiste en el suelo y puede ser absorbido por las raíces de los cultivos cuando estos germinan, cuando la aplicación se realiza postemergencia y previa cosecha, el cultivo puede absorber el herbicida vía foliar y/o vía radicular (a través de la raíz) (Dehghani, y otros, 2022).

La absorción y distribución de los herbicidas en los tejidos de las plantas depende principalmente de las características fisicoquímicas de la sustancia, como la ionización y lipoficidad (Pérez et al., 2022). Cuando las especies químicas son

neutras como en el caso de las triazinas la absorción depende en mayor medida del valor Log P, cuando estos valores son menores a 1 la absorción se ve limitada, cuando se encuentran entre 1 a 3 (caso de las atrazina y simazina) la absorción tiende a aumentar y para valores mayores a 4 la absorción nuevamente disminuye. La distribución de especies neutras por los diferentes tejidos se da por difusión simple, mientras que la translocación y difusión en especies ionizables depende del Log Kow, pKa y pH (Limmer & Burken, 2014). Además de las características físicoquímicas, otros factores como las características biológicas de la planta y el tiempo de exposición afectan la absorción tanto de especies neutras como ionizables (Pérez et al., 2022).

Está demostrado que la contaminación de frutas y verduras con triazinas puede darse por contacto directo con el herbicida o a través de la absorción vía radicular y/o vía foliar de la planta, en cuyo caso el herbicida se transloca a través de los estomas y el floema hasta finalmente llegar a las frutas o verduras. Por otra parte, cuando la contaminación es por contacto directo los herbicidas se translocan del epicarpio al mesocarpio (Mnyandu & Mahlambi, 2021).

La contaminación de frutas y verduras por atrazina y simazina parece ser un evento frecuente, de acuerdo con estudios como el de Mnyandu & Mahlambi en donde la totalidad de muestras analizadas (papas, tomates, zanahorias, manzanas y peras) se encontraron contaminadas con atrazina y/o simazina (Mnyandu & Mahlambi, 2021).

Además de la contaminación por aplicación directa de herbicidas recientemente se ha estudiado la contaminación proveniente por el riego de aguas residuales, en donde los plaguicidas presentes en el agua contaminada terminan por translocarse a diferentes partes de la planta, incluyendo los frutos (Murrell et al., 2021). Esta clase de estudios ha demostrado que la persistencia de herbicidas como la atrazina y simazina en el medio ambiente puede transformar recursos como el agua en nuevas fuentes de contaminación.

La contaminación con herbicidas se extiende también a alimentos de origen animal como los peces en donde de la atrazina y la simazina se bioacumulan y biomagnifican a través de la cadena trófica. Sólo por mencionar un ejemplo, el reporte de peces contaminados con atrazina ha alcanzado una escala mundial, abarcando regiones como China, Polonia, América del sur y África, existiendo casos como el de Sudáfrica en los que se ha detectado contaminación de peces hasta por 11 herbicidas entre los que destaca la atrazina y la simazina por su frecuencia de detección. La bioacumulación de herbicidas en este caso es atribuida a la contaminación producto de las actividades agrícolas en la zona (Tyohemba et al., 2021).

En general, el uso de herbicidas triazínicos han conducido a la bioacumulación a través de la cadena alimentaria, por lo que estos compuestos pueden eventualmente representar un riesgo para los animales y los seres humanos (Mou et al., 2011).

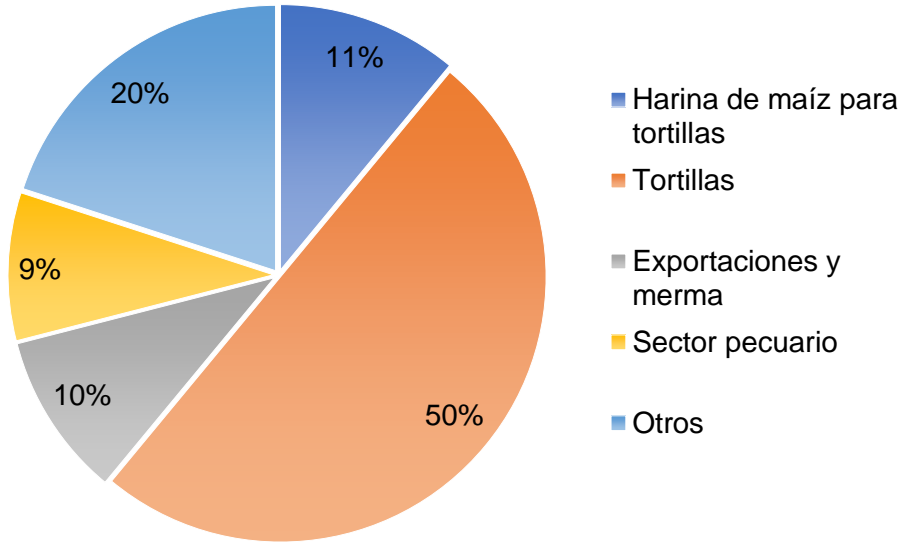
### **5.3. Tortillas de maíz**

La tortilla es un producto derivado de la nixtamalización y cocción del maíz con forma circular aplanada y diámetros que suelen ir desde los 80 a los 270 mm y espesores de 2 a 6 mm (Liaqat et al., 2022). La tortilla se elabora con la masa de maíz cocida que se obtiene del proceso de nixtamalización.

En México la mayor parte del maíz producido en territorio nacional (81 %) se destina al autoconsumo y la producción de harinas y masas, alrededor de un 9 % se aprovecha para el sector pecuario y el 10 % restante se divide entre exportaciones y merma (Espejel et al., 2016). Del total del maíz producido en México (27.5 millones de toneladas) cerca de un 50 % se destina exclusivamente a la elaboración de tortillas (Méndez, 2019), siendo el maíz blanco el más



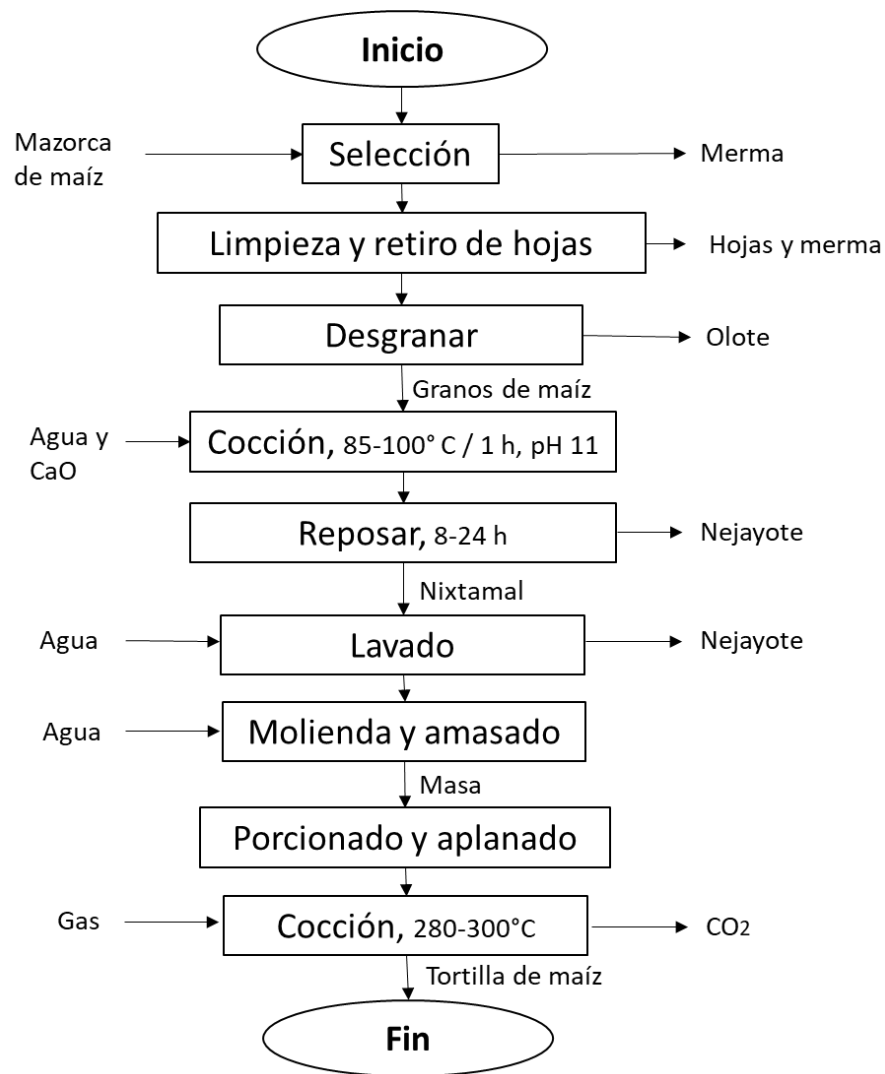
empleado en la elaboración de este alimento (Torres, 2018). En el gráfico 5.3 muestra los usos del maíz en México.



**Gráfico 5.3.** Uso de maíz en México. Datos tomados de (Guzmán-Soria et al., 2019; Espejel et al., 2016)

### Elaboración

La elaboración de las tortillas de maíz conlleva una serie de pasos que comienzan con la selección de la materia prima: la mazorca de maíz. En un segundo paso la mazorca se limpia y despoja de las hojas que la recubren, posteriormente se desgrana y se realiza el proceso de nixtamalización. En el proceso de nixtamalización los granos se hierven en presencia de cal (óxido de calcio grado alimenticio) y se dejan en remojo durante toda una noche, acto seguido se descarta el líquido de remojo (conocido como nejayote) y se retira el nejayote restante con agua. Los granos nixtamalizados también conocidos como nixtamal son molidos y amasados con agua hasta obtener una mezcla uniforme (masa). Por último, la masa es porcionada y aplanada para finalmente pasar por un proceso de cocción que da lugar a las tortillas de maíz (Schaarschmidt & Fauhl-Hassek, 2019). La figura 5.3, muestra las condiciones del proceso para cada una de estas etapas.



**Figura 5.3.** Proceso de elaboración de tortillas tradicional (Elaboración propia). Condiciones tomadas de (Guzmán-Soria et al., 2019; Santiago-Ramos et al., 2017).

En el territorio mexicano predomina la elaboración de tortillas realizadas a partir de maíz blanco seguido del maíz amarillo y posteriormente el azul (Espejel et al., 2016), no obstante, las tortillas elaboradas de variedades de maíz negro, rojo, rosa y morado han comenzado a ser producidas y comercializadas en áreas urbanas, ya que anteriormente se consumían en mayor medida en áreas rurales (Jiménez et al., 2012). En la imagen 5.3.1 se muestran cinco diferentes tipos de tortillas, elaboradas con maíz de distintos colores.



De izquierda a derecha: Tortilla de maíz azul, rojo, rosa, amarillo y blanco.

**Figura 5.3.1.** Tortillas hechas con maíz de diferente color (Fotografía propia).

Actualmente, la mayor parte de la elaboración y venta de tortillas se realiza en locales comerciales conocidos como “tortillerías”, la producción manual de tortillas sigue realizándose aún, aunque en menor medida (Espejel et al., 2016).

### **Consumo y demanda**

Además de México la tortilla se produce y consume en otros países de Centroamérica como Honduras, El salvador, Guatemala y Nicaragua, en donde es un alimento básico y la fuente principal de calorías de una buena parte de la población (de la Parra et al., 2007; Páramo-Calderón et al., 2019). En México la tortilla es un alimento de la canasta básica y su consumo es distinto en la zona urbana y rural, en la zona urbana el consumo diario por persona es de 139.9 g de tortilla (aproximadamente 5 tortillas por día), mientras que en la zona rural el consumo es de 220.8 g de tortilla (aproximadamente 8 tortillas diarias), considerando el peso promedio de una tortilla de 27 g (CONEVAL, 2019).

En los últimos años y gracias al impulso de diversas cadenas de comida rápida la tortilla se ha convertido en un producto global (Calleja & Basilia, 2016) con una demanda creciente en Norteamérica, particularmente en los Estados Unidos de América donde en el año 2017 la demanda de tortillas concentró un 59.06 % del mercado mundial (Guzmán-Soria et al., 2019). Cabe resaltar que en mercados

emergentes como el de Estados Unidos, la tortillas se fríen y consumen como *snack*, tostadas u otros bocadillos (Rooney & Serna-Saldivar, 2016). A nivel mundial México es el país con mayor producción de tortillas; 42 % de la producción mundial, le sigue Estados Unidos con un 36 % y Centroamérica con un 9 % (Rooney & Serna-Saldivar, 2016).

### **Contaminación con herbicidas**

El maíz es susceptible a contaminación por plaguicidas y eventualmente esta contaminación puede ingresar a la cadena de producción de tortillas, resultado en la contaminación final del producto. La contaminación de maíz por herbicidas ya ha sido probado por diversos estudios y la presencia de estas sustancias en productos como la tortilla es un tema de investigación reciente (Zondo & Mahlambi, 2022; Guzmán-Soria et al., 2019).

La producción de maíz conlleva etapas como la preparación del terreno, siembra, fertilización, control de plagas y cosecha, entre ellas el control de plagas o fumigación destaca por el riesgo que implica su uso en la contaminación del cereal. En este cultivo, el control de plagas como hierbas e insectos se realiza principalmente mediante la aplicación de malatión, cipermetrina, glifosato y atrazina. El malatión se emplea para el control de insectos *caelíferos* (chapulines y saltamontes) y la cipermetrina para el control de *Helicoverpa armígera* (gusano cogollero). La atrazina y la simazina, por otra parte, se emplean en el control de malezas preemergencia, mientras que el glifosato es empleado en malezas postemergencia (Guzmán-Soria et al., 2019).

La presencia de plaguicidas en productos derivados del maíz ha sido confirmada por estudios como los realizados en Ruvuma Tanzania África en donde se detectaron altas concentraciones de plaguicidas en harina de maíz procesada (Mahugija et al., 2017). En México los estudios de plaguicidas en productos derivados del maíz son escasos; a pesar de que ser éste el alimento con mayor

consumo a nivel nacional (SAGARPA, 2021), los esfuerzos de investigación en se han enfocado mayormente al estudio de la ecotoxicidad relacionada a los cultivos de maíz genéticamente modificado (Guzmán-Soria et al., 2019). En consecuencia, existe una gran área de oportunidad relacionada con el desarrollo de metodologías analíticas para la determinación de plaguicidas en productos derivados del maíz y particularmente en alimentos como las tortillas, que forman parte de la canasta alimentaria. Actualmente no existen investigaciones que detallen el desarrollo de metodologías para la determinación de herbicidas triazínicos en tortillas, con anterioridad se realizó la determinación de otro grupo de plaguicidas en matrices derivadas de maíz (Guzmán-Soria et al., 2019). Sin embargo, los detalles del procedimientos empleados no han sido estudiados a profundidad debido a que estas investigaciones han persiguido un objetivo distinto al aquí planteado. De este modo, el desarrollo de nuevas metodologías para la determinación de herbicidas en tortillas resulta ser un área de investigación poco estudiada con potencial relevancia e interés para los programas de salud pública, ambiental y reglamentaria.

#### **5.4. Metodologías analíticas para determinación de atrazina en muestras de maíz y otros alimentos**

El análisis de plaguicidas en alimentos a nivel trazas conlleva una complejidad inherente, debida a la naturaleza de las muestras, lo que hace necesario el desarrollo de metodologías para la extracción de analitos, eliminación de interferentes y concentración previo análisis. Este procedimiento es conocido como preparación de muestra. Al abordar los estudios de atrazina y simazina en muestras alimenticias; la extracción líquido-sólido, extracción asistida por ultrasonido, extracción asistida por microondas y extracción con líquidos presurizados han sido reportadas como las técnicas de preparación de muestra más empleadas para este fin (Zao, 2015). En general estas técnicas de extracción suelen ser exhaustivas y coextraer además de los compuestos de interés una gran

cantidad de componentes de la matriz. Esto hace necesario, que en la mayoría de los casos se incorpore un paso más a la metodología, cuyo fin es retirar la mayor cantidad de estos interferentes, este paso se conoce comúnmente como “*clean-up*” o eliminación de interferentes. Algunas de las técnicas empleadas para este fin suelen ser EFS, EFS-D, extracción con líquidos convencionales o filtración múltiple en columna de limpieza (mPFC, por sus siglas en inglés). Así mismo, la síntesis y funcionalización de materiales y adsorbentes, suele incorporarse a este paso con la finalidad de aumentar la selectividad de las técnicas por los analitos. La cromatografía de gases y líquidos acopladas a diferentes detectores son las técnicas más empleadas en la separación, detección y cuantificación de plaguicidas triazínicos provenientes de frutas, verduras y cereales (Milhome et al., 2019; Singh et al., 2018). Particularmente, la cromatografía de líquidos con detección ultravioleta es una técnica que cuentan con una alta sensibilidad y especificidad, y en la actualidad es reconocida por su alta simplicidad y bajo costo (Milhome et al., 2019; Santos-Hernández et al., 2018)

En conjunto, las técnicas de extracción / *clean up* y las técnicas cromatográficas, han permitido el desarrollo de numerosas metodologías para la determinación de triazinas en alimentos. La tabla 5.4 ofrece un resumen de las metodologías desarrolladas en los últimos años para matrices como el maíz, derivados de maíz y otros cereales. Como puede observarse, estas metodologías suelen requerir una cantidad de muestra de 125 mg - 10 g e incluir el desarrollo de un material o adsorbente con alta selectividad en el paso *clean up*. Los métodos instrumentales empleados van desde HPLC, cromatografía de gases o sus variantes acopladas a espectrometría de masas (CG y CG-MS), así como cromatografía de ultra alto rendimiento (UHPLC), colorimetría o análisis voltamperométrico con inmunosensores. Sólo uno de los estudios que incluye esta tabla reporta la presencia de atrazina en el análisis de muestras reales y en su mayor parte se realiza un análisis multiresiduo que suele incluir a compuestos de una misma familia con características fisicoquímicas similares.

**Tabla 5.4.** Metodologías recientemente desarrolladas para la determinación de atrazina y simazina en maíz, derivados de maíz y otros cereales (Elaboración propia).

Referencia	Matriz	Cantidad de muestra	Analito	Técnica de extracción y <i>clean up</i>	Técnica de separación - detección	LD <sup>1</sup> (ng/g)	LC <sup>1</sup> (ng/g)	Recobro (%)	Muestras reales (ng/g)
(Wang et al., 2020)	Arroz	1 g	Atrazina, ametrina, terbutina y terbutilazina	Extracción ultrasónica (n-hexano), Limpieza por EFS magnética (MWCNT@Au)	HPLC-UV	1.05	3.51	99-105	ND
(Omena et al., 2019)	Arroz	125 mg	Atrazina, simazina, carbofurano, molinato y tebuconazol	Microextracción en fase sólida con discos giratorios (DVB / Car / PDMS)	CG-MS	0.57	1.9	82-101	ND
(Milhome et al., 2019)	Harina de maíz brasileño comercial	5 g	Atrazina y 19 plaguicidas más	Extracción Líquido-sólido (ACN: H <sub>2</sub> O), Limpieza por EFS dispersiva (PSA + MgSO <sub>4</sub> )	CG-MS	-	3.3	95 -119	ND
(Liang et al., 2018)	Arroz	1 g	Atrazina y 6 plaguicidas más	Extracción n-hexano ultrasonido y EFS magnética (Óxido de grafeno/sílice mesoporosa/MOF)	HPLC- UV	0.040	0.14	91-95	ND
(Santos-Hernández et al., 2018)	Maíz	0.5 g	Atrazina y 2,4-D	Extracción con microondas (MeOH: H <sub>2</sub> O, 60 °C), Limpieza por EFS (Strata X)	HPLC-UV	20	100	82-98	ND
(Trevisan et al., 2017)	Hojas de café	1g	Atrazina y 51 plaguicidas más	Extracción Líquido-sólido (ACN), Limpieza con EFS-D (C18, PSA, Z-Sep y Carb)	UHPLC-MS	0.075	0.225	76-98	ND
(Andrade et al., 2016)	Maíz	1 g	Atrazina, Simazina, Ametrina, Terbutrina	Extracción ultrasónica (ACN), limpieza con extracción en fase sólida de impresión molecular (MISPE)	HPLC-MS	1.6-3.3	5-10	80, 110	ND

Referencia	Matriz	Cantidad de muestra	Analito	Técnica de extracción y <i>clean up</i>	Técnica de separación - detección	LD <sup>1</sup> (ng/g)	LC <sup>1</sup> (ng/g)	Recobro (%)	Muestras reales (ng/g)
(Liu et al., 2016)	Arroz	10 g	Atrazina	Extracción liquid-sólido (ACN), limpieza con EFS dispersiva (PSA) y EFS (Oasis HLB)	Espectrofotometría	-	16.5	83-91	-
(Zhao et al., 2015)	Maíz	1 g	Atrazina, Simazina, Ametrina, Desmetrina, Propazina y Prometrina	Extracción líquido-sólido (ACN), limpieza con EFS (Microesferas huecas de impresión molecular)	HPLC-MS/MS	0.14	0.46	90-98	7.6 (Atrazina)
in et al., 2015)	Trigo	10 g	Atrazina y 24 plaguicidas más	Extracción líquido-sólido (ACN), Limpieza mPFC (nanotubos de carbono)	HPLC-MS/MS	3	5	87-97	ND
(Giannetto et al., 2014)	Hojuelas de maíz, piensos	5 g	Atrazina	Extracción ultrasónica (MeOH)	Voltamperometría cíclica (Inmunosensor)	1.2	5	109-114	ND
(Zhao et al., 2013)	Papa	10 g	Atrazina y 39 plaguicidas más	Extracción líquido-sólido (ACN), limpieza mPFC (nanotubos de carbono de paredes múltiples)	HPLC-MS/MS	1	3	97, 103	ND
(Mou et al., 2011)	Arroz	10 g	Atrazina, simazina y 8 plaguicidas más	Extracción líquido-sólido (ACN), limpieza EFS (florisil)	HPLC-MS	9	11	82-87	ND
(Romero-González et al., 2011)	Trigo	5 g	Atrazina y 39 compuestos más	Extracción Líquido-sólido (ACN) acidificada y filtración	UHPLC-MS/MS	-	3	110	ND
(Wigfield & Grant, 1993)	Harina de maíz	1 g	Atrazina, Simazina y cianazina	Extracción Líquido-sólido (H <sub>2</sub> O: MeOH), Kit comercial inmunoensayo	Espectrofotometría	10	-	101-117	-

<sup>1</sup> Los LD Y LC mostrados son para atrazina. ND: No detectado



## **5.5. Preparación de muestra**

La preparación de la muestra es un paso crítico en el desarrollo de metodologías analíticas, cualquier error cometido en la preparación de muestra repercute directamente en toda la metodología, independientemente del potencial de la técnica de detección en uso (Olariu et al., 2010; Andrade-Eiroa et al., 2016).

El objetivo principal es hacer que las muestras complejas sean adecuadas para el análisis instrumental, ya que de lo contrario tienden a dañar o reducir el rendimiento y vida media de los equipos, sean estos cromatográficos o de cualquier otro tipo. La preparación de muestra logra además, eliminar interferencias de la matriz y concentrar los analitos, lo que se traduce en reducción de los tiempos de análisis, incremento en la sensibilidad y mejora en la detección e identificación de los analitos (Olariu et al., 2010).

En general, la preparación de muestra es la etapa de un proceso analítico en la que se invierte la mayor cantidad de tiempo, diversos autores han llegado a señalar un tiempo requerido para esta etapa de 61 % hasta 80 % del total del proceso analítico (Płotka-Wasyłka et al., 2015; Andrade-Eiroa et al., 2016).

### **5.5.1. Extracción Asistida por Ultrasonido (EAU)**

La extracción asistida por ultrasonido es un tipo de extracción por disolventes en la que una fuente de ultrasonidos proporciona energía al medio para facilitar la extracción. El ultrasonido es una frecuencia de las ondas mecánicas que se propagan por arriba de la frecuencia audible para los humanos (> 20 kHz) (Kumar et al., 2021). Los sistemas de EUA se encuentran disponibles en formato de baño y sonda. Las sondas generalmente aumentan aún más la eficiencia de extracción, ya que producen más energía y en las sondas la muestra está en contacto directo con el transductor generador de ondas (Lee & Yoon, 2021).

## **Parámetros de la EAU**

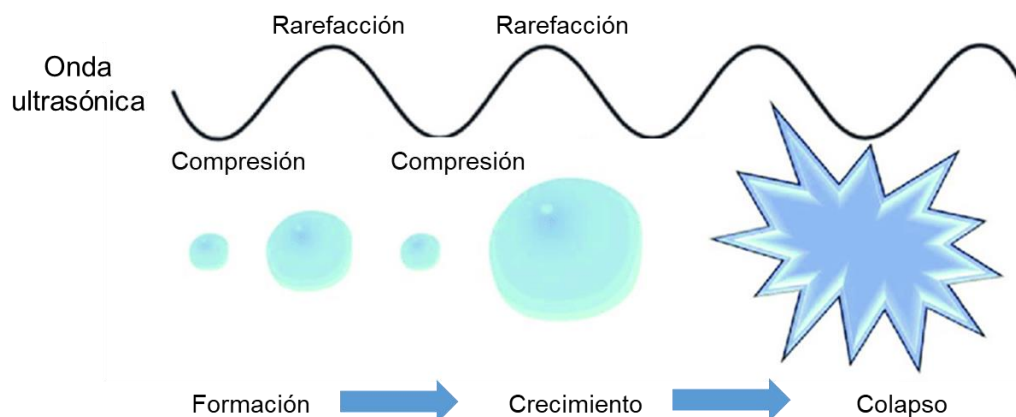
Entre los factores que afectan a la EAU se encuentran: la temperatura, el tiempo de extracción, el porcentaje de amplitud, el tipo de disolvente de extracción y la relación sólido:disolvente.

El aumento en la temperatura durante la extracción disminuye la viscosidad de los disolventes lo que mejora su difusividad en la matriz y con ello aumenta la desorción y extracción de los solutos no volátiles (Kumar et al., 2021). En algunos casos, por el contrario, el aumento en la temperatura puede reducir los porcentajes de recobro, en especial cuando los analitos son volátiles o no son estables a la temperatura (Raza et al., 2017). De manera similar, se ha observado que el incremento en el tiempo de extracción aumenta inicialmente los recobros y posteriormente reduce los porcentajes de recuperación. El tipo de disolvente de extracción y su afinidad por los solutos, juega un papel crucial en los rendimientos. Por lo general se usa una mezcla de 2 o más disolventes, siendo agua uno de estos la mayor parte de las veces. El incremento del disolvente en la relación sólido:disolvente, favorece la difusividad y penetración del líquido durante el proceso de extracción, aunque comúnmente se busca emplear la mínima cantidad con la finalidad de optimizar su uso. La amplitud representa un valor en porcentaje de la potencia nominal entregada por el equipo de ultrasonido. El aumento en la amplitud también conduce al incremento del rendimiento de la extracción, hasta llegar a un máximo después del cuál los solutos comienzan a degradarse y el efecto de la cavitación sónica disminuye (Kumar et al., 2021)..

## **Principio**

El principio de la EAU se basa en la cavitación sónica en el que una serie de ondas de compresión y rarefacción superiores a los 20 kHz son inducidas en el medio de extracción lo que ocasiona la generación y colapso de burbujas, con el consecuente aumento de la temperatura y presión local (Syahir et al., 2020). La

EAU es capaz de fragmentar, formar poros, erosionar y aumentar el índice de hinchamiento de la materia orgánica, lo que facilita la penetración de los disolventes y el aumento de la eficiencia de extracción (Zahari et al., 2020; Kumar et al., 2021). El proceso de cavitación sónica se encuentra ilustrado en la Figura 5.5.1.



**Figura 5.5.1.** Esquema de la cavitación sónica. Modificada de (Lopes de Mello et al., 2021)

Recientemente la EAU ha sido aplicada en numerosos desarrollos como la extracción de compuestos fenólicos con interés farmacéutico provenientes de frutas (Dzah et al., 2020; Lee & Yoon, 2021), la modificación de las propiedades físicas y estructurales de las proteínas (Rahman & Lamsal, 2021), la extracción de aceites de diferentes semillas (Mohammadpour et al., 2019; Jalili et al., 2018) y la extracción de otros compuestos bioactivos como: flavonoides, saponinas, timol y proteínas de una gran variedad provenientes de vegetales (Yusoff et al., 2022).

### Ventajas y desventajas

La EAU ha sido adoptada como un proceso extracción verde con múltiples ventajas frente a las técnicas de extracción con disolventes convencionales, como la extracción Soxhlet. Algunas de sus ventajas y desventajas se enlistan a continuación.

## **Ventajas**

- Los equipos son más económicos en comparación de otras técnicas de extracción como la extracción con fluidos supercríticos.
- Reduce el consumo de disolventes y energía requerida.
- Reduce el tiempo de extracción.
- Puede acoplarse a otras técnicas.
- Es considerada como una técnica verde.

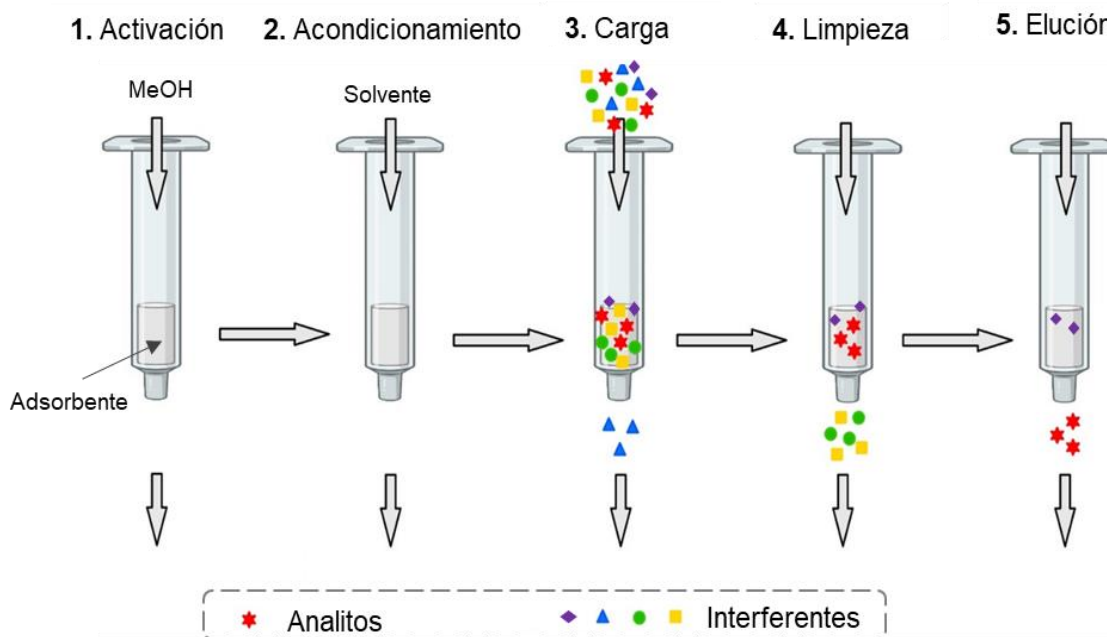
## **Desventajas**

- No puede aplicarse a muestras gaseosas.
- El extracto obtenido requiere de filtración y *clean up* posterior.
- Las muestras deben ser termoestables o debe controlarse la temperatura durante el proceso de extracción.

### **5.5.2. Extracción en fase sólida (EFS)**

La extracción en fase sólida es una técnica que se emplea en la preparación de muestras, la cual se basa en el reparto de los analitos de un extracto o muestra líquida hacia una fase sólida, en este caso la fase sólida se encuentra empacada en un cartucho a través del cual se hace pasar el líquido. Esta técnica comenzó a ser desarrollada alrededor de 1960 y guarda varias similitudes con la cromatografía de líquidos (Moldoveanu & David, 2021). La EFS moderna se realiza en cartuchos con diferentes formatos y capacidad, en su interior el adsorbente se encuentra empacado con ayuda de filtros de polipropileno, material del que usualmente también están hechos los cartuchos. En la actualidad existe una gran variedad de adsorbentes con múltiples aplicaciones, selectividad y afinidad, entre ellos se encuentran fases polares, fases no polares, intercambiadores de iones, inmunoabsorbentes y polímeros de impresión molecular.

El procedimiento general de la EFS se compone de cinco pasos secuenciales: activación, acondicionamiento, carga, limpieza y elución. En la activación se hace pasar un disolvente a través del adsorbente; logrando la solvatación del adsorbente y con ello que la totalidad de la superficie esté disponible para establecer interacciones (Dawadi et al., 2021). En el segundo paso; acondicionamiento, se hace pasar un disolvente con una composición similar a la de la muestra, lo que prepara al adsorbente para recibirla y facilita la interacción soluto-adsorbente. Durante la carga, la muestra se aplica a través del cartucho cuidando la velocidad de flujo y apoyándose de vacío o aumentando la presión en la parte superior con ayuda de adaptadores y jeringas, al finalizar la carga los analitos y otros componentes de la matriz pueden ser retenidos, por lo que se procede a hacer una limpieza en la que un disolvente previamente elegido se hace pasar a una concentración y volumen determinado. Por último, los analitos se eluyen con un segundo disolvente de una naturaleza distinta al empleado en el paso anterior. El procedimiento o secuencia generales de elución, se esquematiza en la Figura 5.5.2.



**Figura 5.5.2.** Procedimiento general de EFS.  
Modificada de (Dawadi et al., 2021).

En la actualidad la incorporación de nuevos adsorbentes como los polímeros de impresión molecular, inmunoadsorbentes, nano partículas y nanomateriales a base de carbono, siguen impulsando las aplicaciones de esta técnica en diferentes áreas como: el análisis de drogas anfetamínicas en orina y agua residual (Xiong et al., 2023), análisis de herbicidas y compuestos perfluorados en agua (Prukjareonchook et al., 2022; Folorunsho et al., 2023), enriquecimiento de aductos de ADN (Wu & Cai, 2022) y determinación de compuestos fenólicos en leche (Palacios Colón et al., 2023), sólo por mencionar los desarrollos más recientes.

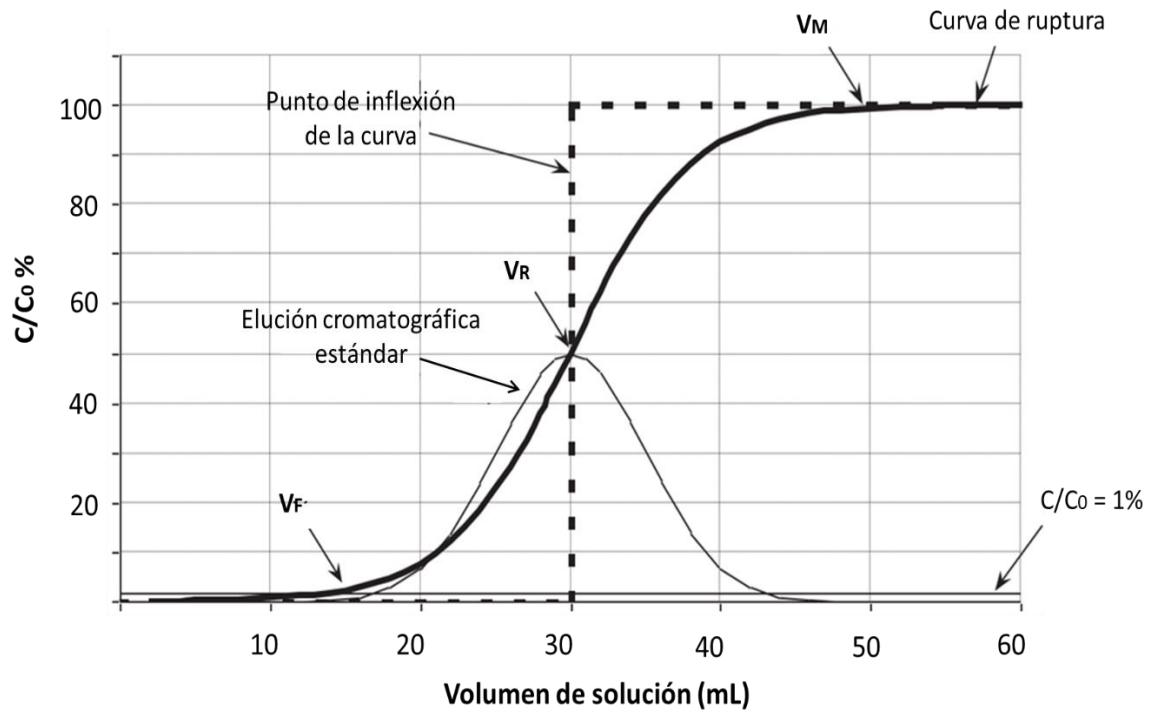
### **Parámetros de la EFS**

En un caso ideal es posible analizar la EFS como un proceso similar al proceso cromatográfico, teniendo en cuenta que en el primer caso la muestra no suele fluir continuamente por el cartucho como ocurriría en cromatografía de líquidos convencional, en el caso de la EFS el flujo es intermitente.

En la práctica, el volumen de fuga es un parámetro crítico en la optimización de la EFS, en especial cuando se busca una buena reproducibilidad y retención de los analitos al adsorbente, de ser el caso, el volumen de carga de la muestra debe encontrarse por debajo del volumen de fuga.

La relación de los parámetros involucrados en el proceso de EFS se deduce al considerar una muestra con concentración de analitos ( $C_0$ ) y volumen máximo ( $V_M$ ) que es cargada al cartucho, después del cuál el analito ya no es retenido en el adsorbente. Al aplicar la muestra, inicialmente los analitos se mantienen retenidos dentro del cartucho, por lo que la concentración de analitos en el efluente ( $C/C_0$ ) es cero. En medida que se carga un mayor volumen de muestra la misma comienza a actuar como fase móvil, por lo que los analitos comienzan a migrar y si estos llegan a ser detectados en el efluente ( $C/C_0 = 1 \%$ ) se dice que el volumen de carga ha alcanzado el volumen de fuga ( $V_F$ ). Si se continúa con la carga después de este

punto la concentración en efluente colectado comienza a aumentar ( $C/C_0 > 1\%$ ) pudiendo llegar al punto en que la concentración de analitos en el efluente es la misma que en la carga (Volumen de retención o  $V_R$ ), después de este punto la concentración de los analitos en el efluente tiende a un máximo valor de concentración ( $C/C_0 = 100\%$ ), que corresponde al volumen de elución o Volumen máximo ( $V_M$ ). Esta variación de la concentración de los analitos en el efluente ( $C/C_0$ ) en función del volumen de disolución se puede apreciar en la figura 5.5.2.1 como “curva de rompimiento”, adicionalmente se muestra el pico cromatográfico correspondiente al pico del estándar de una inyección con una misma concentración  $C_0$  aplicada en cromatografía de elución convencional.



**Figura 5.5.2.1.** Curva de rompimiento y parámetros en la EFS. Modificada de (Moldoveanu & David, 2021)

Cabe destacar que la variación de la retención de los analitos depende de sus características fisicoquímicas, de la naturaleza y cantidad del adsorbente, así como de la composición y flujo del disolvente usado en el proceso. A su vez, la falta de retención de un compuesto puede estar relacionada con la carga excesiva de

muestra al cartucho, que termina por exceder su capacidad, así como a la velocidad de carga de la muestra. Cuando la velocidad de carga es elevada no se da tiempo suficiente para alcanzar el equilibrio de retención (Dawadi et al., 2021).

### **Ventajas y desventajas**

En los últimos años, la extracción en fase sólida continua ganando popularidad en debido a diversas ventajas que facilitan el desarrollo de nuevas aplicaciones (Płotka-Wasyłka et al., 2015). Las principales ventajas de esta técnica se enlistan a continuación.

#### **Ventajas:**

- Logra buenos recobros.
- Se automatiza y miniaturiza con facilidad.
- Es altamente compatible con desarrollo de métodos en línea.
- En muchos casos se logra realizar la limpieza y concentración en una sola etapa.
- Permite realizar cambio de disolventes.
- Se cuenta con una gran variedad de adsorbentes de amplia selectividad.
- Existen kits comerciales para múltiples aplicaciones.
- Requiere de un bajo consumo de disolventes en comparación con técnicas tradicionales.

Sin embargo, a pesar de su alto desarrollo y de las ventajas que ofrece, aún existen desventajas a resaltar en la misma:

- No puede aplicarse directamente a muestras sólidas o gaseosas (existen otras técnicas cuyo desarrollo se ha basado en la EFS para este fin).
- Normalmente requiere de 5 pasos, lo que puede traducirse en un aumento del tiempo de análisis cuando el número de muestras es elevado.



-El analista requiere de entrenamiento previo para su ejecución en caso de no estar automatizada.

Las limitaciones teóricas en el desarrollo de metodologías basadas en EFS, así como en otras técnicas de preparación de muestras han conducido a que la mayoría de estos procedimientos se optimicen bajo un proceso de prueba y error en los que pocas veces se involucran los procesos físicos con antelación (Andrade-Eiroa et al., 2016).

### **5.5.3. Extracción en fase sólida dispersiva (EFS-D)**

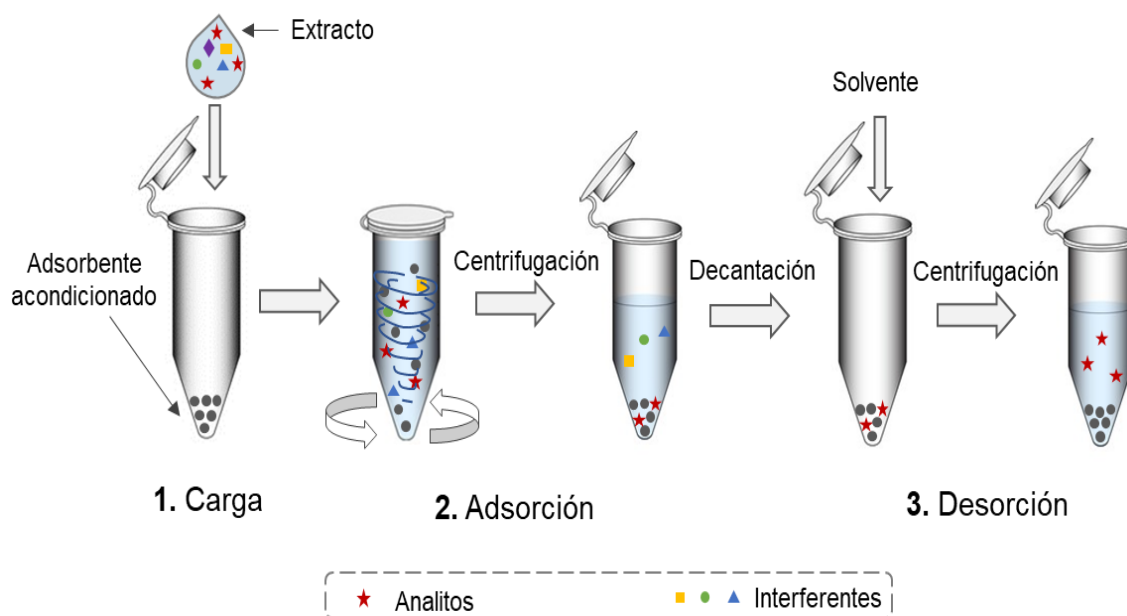
La extracción en fase sólida dispersiva es una técnica para la preparación de muestras que surgió en el año 2003 como una variación a la extracción en fase sólida convencional (EFS) (Anastassiades et al., 2003), a diferencia de esta segunda, la EFS-D realiza una extracción en la que el adsorbente se dispersa en una muestra o extracto líquido, los analitos se retienen en el adsorbente y posteriormente éste se separa del medio líquido por medios físicos para finalmente desorber a los analitos mediante un segundo disolvente.

El mecanismo de la EFS-D se basa en la dispersión de un adsorbente con una elevada área superficial en la totalidad de una muestra o extracto líquido, el contacto es directo y promovido por la agitación lo que facilita alcanzar rápidamente el equilibrio de la extracción (Ścigalski & Kosobucki, 2020).

En la actualidad el potencial de la EFS-D recién comienza a ser explotado por múltiples áreas de la química analítica con fines como: el análisis de parabenos en orina (Moscoso-Ruiz et al., 2022), análisis de hormonas en vegetales (Qin et al., 2022), determinación de insecticidas en algodón y soya (Goon et al., 2022), determinación de micotoxinas en aceite vegetal comestible (Ming Yang et al., 2022) y determinación de hidrocarburos aromáticos policíclicos en lechuga (Q. Zhang

et al., 2022), sólo por mencionar los desarrollos más recientes. Al igual que la EFS, esta técnica también ha adoptado el desarrollo de nuevos adsorbentes, con alta selectividad como lo son estructuras metalorgánicas (Qin et al., 2022; Yang et al., 2022).

El procedimiento general de la EFS-D incluye tres pasos principales: carga, adsorción y desorción. En la carga, se coloca la totalidad de la muestra o extracto líquido en un tubo de centrifugación que contiene al adsorbente o mezcla de adsorbentes de trabajo, seguidamente el adsorbente se dispersa en el medio líquido apoyándose para ello de un equipo vórtex o mediante agitación manual, resultado de esta agitación tiene lugar el proceso de adsorción, en el que se puede retener y separar a los analitos o a los interferentes. En el primero de los casos los analitos son adsorbidos, el adsorbente se separa por centrifugación y el medio líquido se decanta para finalmente desorber a los analitos con un segundo eluyente. En el segundo caso los interferentes son retenidos en el adsorbente, el adsorbente se separa por centrifugación y el extracto líquido con los analitos se recupera por decantación. El procedimiento general se muestra en la Figura 5.5.3.



**Figura 5.5.3.** Procedimiento general de la extracción en fase sólida dispersiva (Elaboración propia).

## Fundamentos

Los fundamentos de la EFS-D no han sido estudiados a profundidad, sin embargo, al tratarse de una técnica que surgió como una variación de la EFS, comparte algunos principios con la misma, en particular algunos parámetros como la capacidad de carga, fuerza del disolvente y cantidad de muestra se conservan de una técnica a otra. En contraste, en el caso de la EFS-D no puede definirse una fase móvil y una fase estacionaria, a su vez el adsorbente en este caso no se encuentra confinado y la dinámica por la que el adsorbente y la muestra entran en contacto es completamente distinta al proceso de elución de la EFS. En la EFS la velocidad de flujo en la elución es parámetro crítico para obtener una buena interacción soluto-adsorbente, en la EFS-D la velocidad de agitación favorece estas interacciones.

Los principales parámetros que afectan al desempeño de EFS-D son: la cantidad y naturaleza del disolvente en el proceso de dispersión y desorción, el área superficial del adsorbente y la capacidad adsorbente.

La cantidad y naturaleza del disolvente en el proceso de dispersión modifican la retención de los analitos. Cuando las interacciones analito-adsorbente son mayores que las analito-disolvente el proceso de adsorción se favorece, en el caso contrario, el proceso de desorción es dominante y los analitos permanecen en el disolvente. Durante el proceso de desorción la polaridad del disolvente o mezclas de disolventes de desorción debe ser similar a la polaridad de los analitos (Büyüktiryaki et al., 2020).

De forma general también se ha observado que la eficiencia de la absorción se ve favorecida por una mayor área superficial que tiende a ser mayor en los nanomateriales. De la misma forma se ha encontrado que la relación superficie/volumen también juega un papel importante en este proceso, cuando la

relación superficie/volumen es elevada, la capacidad del adsorbente también lo es, como en el caso de los nanomateriales (Büyüktiryaki et al., 2020).

La capacidad adsorbente puede definirse como la cantidad de adsorbato adsorbido por unidad de adsorbente (ecuación 1).

$$C_A = \frac{(C_0 - C_{eq}) V}{m} \quad (\text{ecuación 1})$$

Donde  $C_A$  es la capacidad adsorbente,  $C_0$  la concentración inicial de los adsorbatos en la fase líquida y  $C_{eq}$  la concentración de los adsorbatos en la fase líquida al equilibrio,  $V$  el volumen de la disolución y  $m$  la masa del adsorbente. La capacidad a su vez se ve afectada por las propiedades del adsorbente como lo son: el área superficial, el tamaño de partícula y la estructura de los poros. Otros factores que afectan a la capacidad adsorbente son el tipo de disolvente, la presencia de sales, la tensión superficial, el pH, temperatura, estructura de los adsorbatos y la presencia de otros adsorbatos en el medio (Büyüktiryaki et al., 2020).

La termodinámica del proceso está dominada por la disminución de la entropía ( $\Delta S$ ) debida a la acumulación de los adsorbatos en la superficie del adsorbente, por lo tanto, cuando el proceso es espontáneo el cambio en la energía de Gibbs ( $\Delta G$ ) es menor a cero y la entalpia del sistema disminuye liberando energía  $\Delta H < 0$ , la relación de estas funciones de estado está dada en la ecuación 2 (Büyüktiryaki et al., 2020).

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (\text{ecuación 2})$$

$\Delta G$  es el cambio en la energía libre de Gibbs que describe la espontaneidad de un proceso,  $\Delta H$  es el cambio en la entalpia relacionado con el intercambio de calor del sistema y  $\Delta S$  es el cambio de entropía del sistema.

El mecanismo de adsorción en la EFS-D, así como en la EFS es un proceso de superficie en el que los analitos y componentes de la matriz (adsorbatos) se

acumulan sobre el adsorbente de forma reversible. En este proceso la adsorción tiene lugar en una interfaz sólido-líquido de forma rápida reversible y usualmente exotérmica (Büyüktiryaki et al., 2020).

Esta técnica presenta numerosas bondades y ventajas, las principales se mencionan a continuación.

### **Ventajas**

- Muy bajo consumo de adsorbentes y disolventes que se reflejan en un bajo costo.
- Es una técnica rápida que logra buenos recobros.
- Se miniaturiza con mucha facilidad.
- Logra limpiar y concentrar los extractos en una sola etapa.
- Permite realizar cambio de disolventes.
- Se cuenta con una amplia variedad de adsorbentes de selectividad variada.
- Se cuenta con kits comerciales con amplia gama de aplicaciones.
- Alta compatibilidad con métodos de extracción líquido-líquido miniaturizados.

### **Desventajas**

- Resulta difícil de automatizar.
- Muy baja compatibilidad con métodos en línea.
- El analista requiere de entrenamiento previo para su ejecución.
- No puede aplicarse directamente a muestras sólidas o gaseosas.

## **6. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL**

### **6.1. Equipos y materiales**

#### **6.1.1. Materiales**

Vasos de precipitado de 50, 100 y 250 mL, probetas de 100 mL, naves de pesaje de vidrio, matraz Kitasato de 250 mL, embudos Büchner, pipetas volumétricas de 2.0 y 8.0 mL, viales de vidrio de 20, 15 y 1.5 mL, matraces aforados de 1.0, 25.0 y 50.0 mL, micropipetas de 20, 100 y 1000  $\mu$ L, tubos de centrifuga de polipropileno de 15 mL, gradilla de plástico, cartuchos de polipropileno para extracción en fase sólida de 1.0 mL, filtros de polipropileno, jeringa de 20 mL con adaptador para cartuchos, tubos Eppendorf de polipropileno de 0.5 mL y 1.5 mL, pipetas Pasteur, tijeras, espátulas, piseta, papel Parafilm, cronómetro, perilla de succión, papel Whatman No 1 y filtros Titan de Nylon (0.45  $\mu$ m).

#### **6.1.2. Disolventes y adsorbentes**

Se empleó metanol y acetonitrilo grado cromatográfico adquirido de J.T. Barker, USA (pureza de 99.9 %). El agua se obtuvo de un sistema de purificación Symplicity UV (Merck Millipore, USA) con una resistividad de 18 M $\Omega$ cm.

Los adsorbentes empleados fueron Supelclean LC-18 EFS de 45  $\mu$ m y 60 Å (Sigma-Aldrich, USA) y Bondesil ENV de 25  $\mu$ m y 450 Å (Agilent, USA).

#### **6.1.3. Estándares y disoluciones estándar**

Los estándares de atrazina y simazina de pureza respectiva 98.0 y 99.5 %, fueron adquiridos de Chem Service, USA.

De los estándares se prepararon disoluciones stock de 100 µg/mL en metanol grado cromatográfico, éstas se almacenaron en refrigeración a 4 °C. Las disoluciones estándar a diferentes concentraciones fueron preparadas en metanol a partir de las disoluciones stock.

#### **6.1.4. Equipos**

Los análisis cromatográficos fueron realizados en un sistema de HPLC Knauer, Alemania con bombas Smartline 1000, detector ultravioleta de arreglo de diodos (DAD, por sus siglas en inglés) Smartline 2600 e inyector Knauer D-14163 con “loop” de 20 µL.

Las condiciones cromatográficas fueron: columna C18 ODS Hypersil (Thermo electron, USA) de dimensiones 150 x 4.6 mm D.I., 5 µm y precolumna Nucleosil 100-5 C18 (Macherey-Nagel, Alemania) de dimensiones 20 x 2.0 mm D.I., 5 µm, longitud de onda de detección 230 nm, la fase móvil usada fue MeOH: H<sub>2</sub>O 50:50 a un flujo isocrático de 1 mL/min y el software empleado para el análisis de datos fue EuroChrom Basic Edition V. 3.05.

Para la preparación de la muestra se empleó una balanza analítica Discovery DV215CD (Ohaus, USA), un homogeneizador biohomogenizer M133/1281-0 (Biospec, USA), una sonda ultrasónica CP505 de 500 Watts / 20 kHz (Cole-Parmer, USA) con punta de 3/16", una centrifuga modelo 225 (Fisher Scientific, USA), una mini centrifuga MiniSpin plus 5452 (Eppendorf, USA), un agitador con control de temperatura HCM100-Pro (DLAB, China), un equipo de agitación Vórtex SI-P236 (Scientific Industries, USA), un baño ultrasónico modelo 08895-14 (Cole-Parmer, USA) y un espectrofotómetro Genesys 10S UV-Vis (Thermo Scientific, USA).

### 6.1.5. Muestras

Las muestras de tortillas de maíz fueron obtenidas de diferentes puntos de la Zona Metropolitana de la Ciudad de México, así como de diferentes estados de la República Mexicana. El muestreo se realizó en tortillerías, supermercados y tiendas de abarrotes. Las muestras fueron almacenadas en ultracongelación a -25 °C hasta su análisis. La lista de muestras, zonas de colecta y color de las tortillas aparece en la tabla 6.15.

**Tabla 6.15.** Lista de muestras analizadas.

Muestra	Color de tortilla	Procedencia			
		Zona	Estado	Delegación / Municipio	
1	Azul	Zona Metropolitana del Valle de México (ZMVM)	Ciudad de México	Iztapalapa	
2	Amarilla			Coyoacán	
3	Azul			Coyoacán	
4	Rosa			Benito Juárez	
5	Blanca			Cuauhtémoc	
6	Blanca			Tlalpan	
7	Amarilla			Xochimilco	
8	Blanca			Álvaro Obregón	
9	Roja			Benito Juárez	
10	Amarilla			Iztapalapa	
11	Azul			Benito Juárez	
12	Amarilla			Azcapotzalco	
13	Azul			Cuautitlán	
14	Amarilla			Naucalpan de Juárez	
15	Blanca			Estado de México	Texcoco
16	Blanca			Ecatepec	
17	Blanca			Tultitlán	
18	Azul			Ecatepec	
19	Amarilla	Fuera de ZMVM	Guanajuato	Guanajuato	
20	Blanca		Hidalgo	Tula de Allende	
21	Amarilla		Nuevo León	Monterrey	
22	Blanca		Oaxaca	Oaxaca de Juárez	
23	Amarilla		Puebla	San Pedro Cholula	
24	Blanca		Veracruz	Tantoyuca	
25	Amarilla		Yucatán	Mérida	



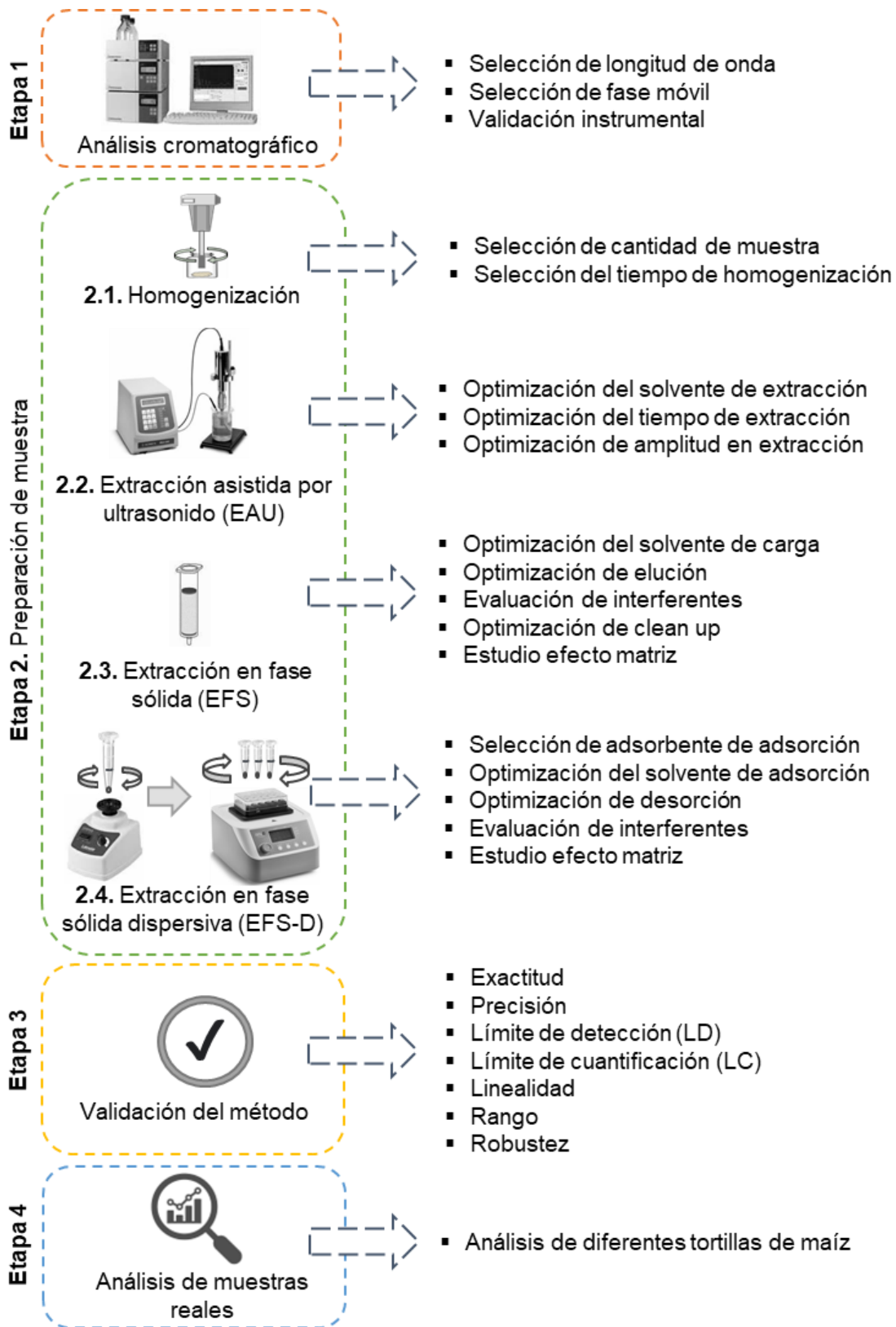
### **6.1.6. Programas computacionales**

Para el manejo de datos del cromatógrafo se empleó el “software” EuroChrom ® Basic Edition V. 3.05. Para los cálculos estadísticos se usó la hoja de cálculo Microsoft Excel 2016 ® y para la generación y edición de figuras se usó la herramienta de dibujo ChemDraw 2017 ® y el programa PowerPoint 2016 ®.

### **6.2. Desarrollo experimental**

La figura 6.2 muestra un esquema general del procedimiento que se siguió para el desarrollo de la metodología, el esquema se compone de 4 etapas principales: Etapa 1. Análisis cromatográfico, Etapa 2. Preparación de la muestra, Etapa 3. Validación y Etapa 4. Aplicación a muestras reales. Como puede observarse, la etapa 2. está compuesta a su vez de 3 subetapas más: 2.1. Homogeneización de la muestra, 2.2 Extracción Asistida por Ultrasonido, 2.3. Extracción en Fase Sólida y 2.4 Extracción en Fase Sólida Dispersiva.

Todos los ensayos que se describen en esta sección fueron probados por triplicado, a menos que se indique lo contrario. La optimización de la metodología se realizó con tortilla amarilla, muestra 2 en tabla 6.15.



**Figura 6.2.** Esquema general de las etapas experimentales para el desarrollo de la metodología (Elaboración propia).

## 6.2.1. Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)

### 6.2.1.1 Selección de herbicidas triazínicos

Los herbicidas de este estudio atrazina y simazina fueron seleccionados de la legislación mexicana considerando su uso permitido en cultivos de maíz.

En México, hasta noviembre del 2022 la legislación establece el uso permitido de los siguientes plaguicidas triazínicos en diferentes cultivos, en específico esta investigación se centró en los herbicidas triazínicos empleados en el cultivo de maíz (Tabla 6.2.1.1).

**Tabla 6.2.1.1.** Herbicidas triazínicos empleados en cultivos de maíz mexicano.

<b>Herbicida triazínico</b>	<b>Cultivo</b>	<b>LMR<sup>1</sup> (ng/g)</b>
Atrazina	Maíz	250
Simazina	Maíz	250
Prometrina	Maíz	250
Ametrina	Maíz	250
Cianazina	Maíz	200
Metribuzina	Maíz	50
Terbutrina	Otro	-
Terbutilazina	Otro	-
Hexazinona	Otro	-

<sup>1</sup> Límite máximo residual reportado en el Registro Sanitario de Plaguicidas coordinado por COFEPRIS en México

Otros cultivos en los que se emplean los herbicidas de la tabla 6.2.1.1 se presentan en el Anexo 1.

La selección de la atrazina y la simazina para desarrollar el trabajo experimental se realizó teniendo en cuenta que son los dos herbicidas triazínicos que se emplean en mayor medida a nivel mundial (Maggi et al., 2019) y en México la atrazina es el herbicida más empleado en cultivos de maíz (Hansen et al., 2013).

A continuación, se procederá a describir la optimización de la separación cromatográfica de los dos analitos, trabajando con estándares.

#### **6.2.2.2. Selección de longitud de onda en detección ultravioleta**

Para establecer las condiciones de detección, se investigaron los máximos de absorción ( $\lambda_{\text{máx}}$ ) de la atrazina y simazina en el rango ultravioleta.

Con este fin, se obtuvieron los espectros de absorción experimentales de cada uno de los estándares, para ello se prepararon disoluciones estándar 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de cada triazina por separado. Se colocaron 2 mL de estas disoluciones estándar en celdas de cuarzo y se realizó una medición espectrofotométrica con un barrido de 200 a 350 nm en intervalos de 0.5 nm. Para la medición del blanco se utilizó metanol.

El análisis de los espectros y bandas con máximos de absorción permitió realizar la selección de la longitud de onda para la detección UV empleada en el análisis cromatográfico.

#### **6.2.2.3. Optimización de la separación cromatográfica**

Al realizar la optimización de la separación cromatográfica se trabajó a un flujo de 1 mL/min con la columna C18 y longitud de onda de 230 nm.

Como parte de la optimización de la separación cromatográfica se determinó la variación de los tiempos de retención de los estándares con fases móviles a diferente composición MeOH: H<sub>2</sub>O. Las composiciones MeOH: H<sub>2</sub>O fueron: 45:55, 50:50, 60:40, 70:30 y 80:20, en estos ensayos los compuestos se trabajaron por separado.

A partir de los tiempos de retención se determinaron las curvas de factor de capacidad ( $k$ ) de ambas especies, para ello se graficó  $k'$  en función del porcentaje de metanol en la fase móvil.  $k'$  se calculó mediante la ecuación 3:

$$k = \frac{tR - tM}{tM} \quad (\text{Ecuación 3})$$

Siendo  $tR$  el tiempo de retención y  $tM$  el tiempo muerto determinado del pico del disolvente.

El cálculo del factor de selectividad ( $\alpha$ ) se realizó con la ecuación 4

$$\alpha = \frac{tR_B - tM}{tR_A - tM} \quad (\text{Ecuación 4})$$

El tiempo de retención de la atrazina se tomó como  $tR_B$  y el tiempo de retención de la simazina como  $tR_A$ .

La resolución cromatográfica ( $Rs$ ) se calculó con la siguiente ecuación:

$$Rs = \frac{2 (tR_B - tR_A)}{W_A + W_B} \quad (\text{Ecuación 5})$$

Siendo  $W_A$  el ancho a la base del pico de la simazina y  $W_B$  el ancho a la base del pico de la atrazina.

Por último, con base en los resultados se seleccionó la fase móvil que se empleó para el análisis.

#### 6.2.2.4. Validación instrumental

Una vez que se determinaron las condiciones del análisis cromatográfico se evaluó la linealidad de la respuesta del instrumento, los límites de detección y cuantificación, así como, la repetibilidad intradía de los ensayos.

Para evaluar la linealidad se trabajó con 5 diferentes disoluciones con concentraciones: 1, 2, 4, 5 y 10 µg/mL, cada disolución se preparó e inyectó por triplicado. De la integración de los picos cromatográficos se registró el área correspondiente a cada pico (mAU·min), las áreas se graficaron en función de la concentración y se realizó un análisis de regresión lineal por mínimos cuadrados. Con base en los resultados del análisis se evaluó la linealidad ( $r^2$ ) y la sensibilidad ( $m$ ). La ecuación 6 fue empleada para este propósito.

$$y = mx + b \quad (\text{Ecuación 6})$$

$y$  : Área registrada (unidades: mAU·min)

$m$  : Pendiente de la curva (unidades: mAU·min· µg/mL<sup>-1</sup>)

$x$  : Concentración de analito (unidades: µg/mL)

$b$  : Ordenada al origen (unidades: mAU·min)

Los límites de detección (LD) y cuantificación (LC) se determinaron de dos formas: 1. Mediante la pendiente de la curva de calibración y la desviación estándar del blanco y 2. Del análisis de la relación señal/ruido, de acuerdo con lo establecido en la Guía Q2(R1). Validación de procedimientos analíticos (FDA et al., 2021).

Para determinación de LD y LC mediante la pendiente de la curva y la desviación estándar del blanco (Método 1) se usaron las ecuaciones 6, 7 y 8.

$$LD = \frac{3.3 S_B}{m} \quad (\text{Ecuación 7})$$

$$LC = \frac{10 S_B}{m} \quad (\text{Ecuación 8})$$

$LD$  : Límite de detección

$LC$  : Límite de cuantificación

$S_B$  : Desviación estándar de la respuesta del blanco

$m$  : pendiente de la curva

La desviación estándar de la respuesta del blanco se calculó de la inyección y análisis de un triplicado del blanco.

Para la aproximación de  $LC$  y  $LD$  mediante la relación señal/ruido (Método 2) se realizó la inyección secuencial de disoluciones de baja concentración: 0.05, 0.03, 0.02 y 0.01  $\mu\text{g/mL}$ , iniciado por la concentración más baja y lavando el bucle entre cada inyección, se analizó la relación señal/ruido de la línea base y se tomó la relación 3/1 como aceptable para establecer el límite de detección y la relación 10/1 como la relación aceptable para el límite de cuantificación, de acuerdo con lo establecido en la Guía Q2(R1). Validación de procedimientos analíticos (FDA et al., 2021).

La repetibilidad de los ensayos se probó inyectando un triplicado de las disoluciones a diferente concentración (1-10  $\mu\text{g/mL}$ ), posteriormente de las áreas obtenidas y la ecuación 9, se calculó la desviación estándar relativa ( $DSR$ ).

$$DSR = \frac{\sigma}{\bar{x}} \cdot 100 \quad (\text{Ecuación 9})$$

$DSR$  : Desviación estándar relativa.

$\sigma$  : Desviación estándar.

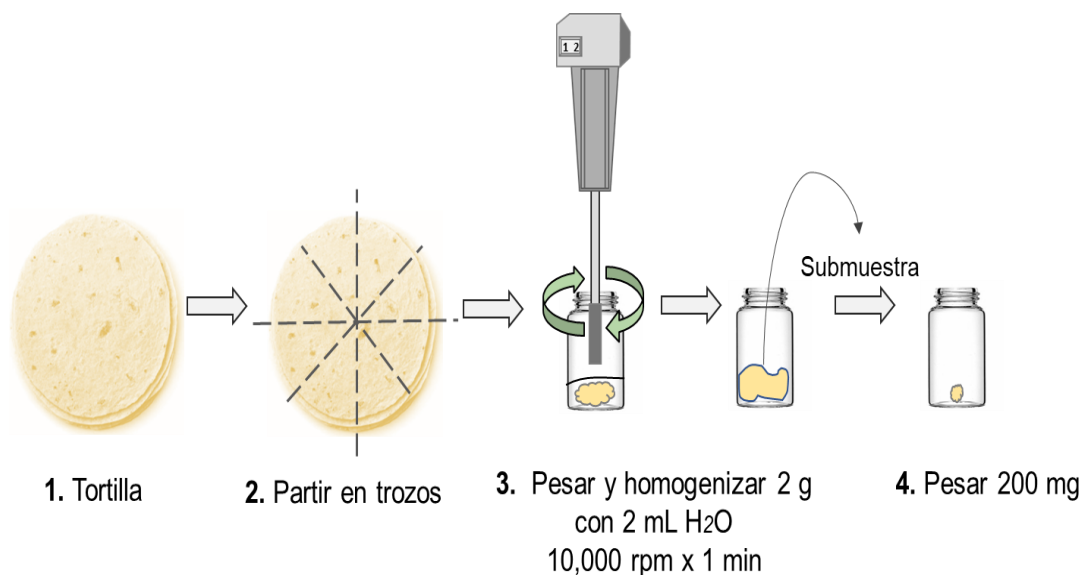
$\bar{x}$  : valor promedio.

Los criterios de aceptación para la validación fueron tomados del documento: Criterios para el funcionamiento, aplicación e interpretación de los resultados y los métodos analíticos para la identificación y/o cuantificación de residuos de plaguicidas (SENASICA, 2022).

## 6.2.2. Homogenización y fortificación de la muestra

### Homogenización de la muestra

La homogenización de la muestra se realizó a partir de 1 tortilla, la tortilla se partió en trozos con ayuda de tijeras, de estos trozos se pesaron 2.0 g dentro de un vial de 20.0 mL, se agregaron 2.0 mL de agua al vial y con ayuda del equipo Biospec se homogenizó la muestra a 10,000 rpm durante 1 min; tiempo necesario para obtener una pasta homogénea. Después de este primer homogeneizado se tomó una submuestra de 200 mg que se colocó en un segundo vial de 15 mL. El proceso de homogenización se ilustra en la figura 6.2.2. Durante el proceso de optimización se trabajó con tortilla amarilla.



**Figura 6.2.2.** Proceso de homogenización de la muestra (Elaboración propia).



## Fortificación de la muestra

Para la fortificación de la muestra a una concentración de  $2 \mu\text{g/g}$  se preparó una disolución estándar de  $10 \mu\text{g/mL}$  a partir de la disolución stock de  $100 \mu\text{g/mL}$ , de la disolución  $10 \mu\text{g/mL}$  se tomó una alícuota de  $40 \mu\text{L}$  ( $0.4 \mu\text{g}$ ) que se colocó en la parte superior de la submuestra de  $200 \text{ mg}$ . Se dejaron transcurrir  $30 \text{ min}$  como el tiempo necesario para que la alícuota fuera absorbida por la muestra (Figura 6.2.2.1).



**Figura 6.2.2.1.** Proceso de fortificación de la muestra (Elaboración propia).

## 6.2.3. Extracción en fase sólida (EFS)

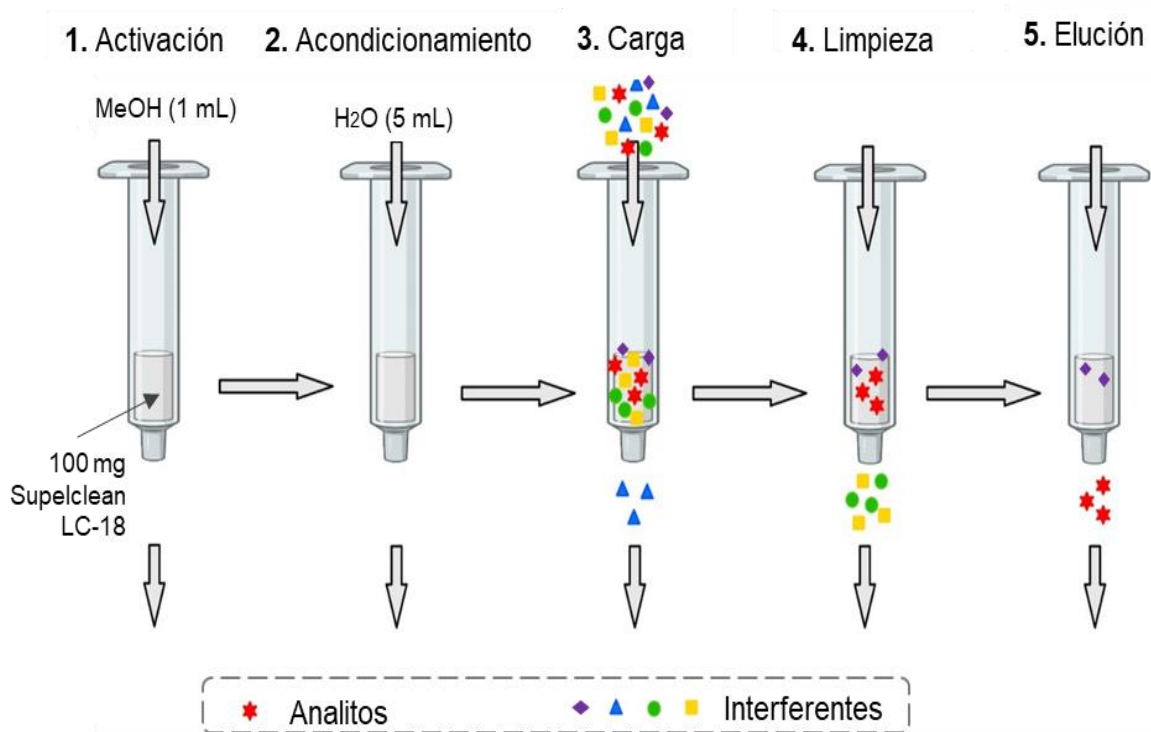
### Condiciones generales

Para la EFS se usó Supelclean LC-18 (C18) como adsorbente. El adsorbente fue lavado y secado un día antes de su uso; para ello se colocó  $1 \text{ g}$  en un cartucho de

6 mL con un filtro en el fondo, posteriormente el adsorbente se lavó por gravedad con MeOH 100 % (3.5 mL/g adsorbente) y se dejó secar por toda la noche.

En todos los ensayos de EFS se trabajó con 100 mg de adsorbente C18 empacados en cartuchos de polipropileno de 1 mL, la cantidad de adsorbente se mantuvo sin cambios durante todo el procedimiento de optimización, de acuerdo con las condiciones anteriormente probadas por nuestro equipo de investigación (Alvarado, 2003).

La activación del adsorbente se realizó por gravedad con 1 mL de MeOH 100 %, el acondicionamiento se hizo con 5 mL de H<sub>2</sub>O a un flujo aproximado de 2 mL/min evitando que los cartuchos se secaran. El procedimiento general de EFS se muestra en la figura 6.2.3, donde se indican las condiciones de activación y acondicionamiento. Las pruebas realizadas para la optimización de las etapas 3, 4 y 5 se describen a continuación.



**Figura 6.2.3.** Procedimiento general de EFS. Modificada de (Dawadi et al., 2021).

### 6.2.3.1. Optimización del disolvente de carga

Para optimizar el disolvente de carga en la EFS se probaron disoluciones de MeOH: H<sub>2</sub>O a diferentes porcentajes de MeOH que contenían estándares de las dos triazinas. Estas disoluciones pretendieron simular el contenido de MeOH: H<sub>2</sub>O del extracto UAE. Todas las disoluciones se prepararon con material volumétrico a un volumen total de 10.0 mL, la fortificación se realizó a partir de una disolución de 10 µg/mL, preparada a partir de la disolución stock (100 µg/mL) que contenía a ambos analitos. La concentración final de los analitos en las disoluciones de 10.0 mL fue 0.04 µg/mL y los porcentajes de metanol de cada disolución fueron 10, 20, 23 y 30 %.

Las disoluciones fueron cargadas en cartuchos independientes previamente activados y acondicionados, la carga se realizó a un flujo aproximado de 2 mL/min con ayuda de vacío. Posteriormente, los analitos fueron eluidos de los cartuchos con 1.0 mL de MeOH 100 %, estos eluatos o extractos se colectaron en viales de 1.5 mL y finalmente se analizaron por cromatografía de líquidos bajo las condiciones anteriormente optimizadas.

De los cromatogramas resultantes se determinaron las áreas y el porcentaje de recobro para cada uno de los analitos en los diferentes ensayos, para ello se usó la ecuación 10.

$$\text{Recobro (\%)} = \frac{\text{Área del extracto}}{\text{Área de estándar}} \cdot 100 \quad (\text{Ecuación 10})$$

Con base en los recobros obtenidos se determinó el porcentaje de MeOH óptimo para realizar la carga del disolvente en la extracción en fase sólida.

### **6.2.3.2. Optimización de la elución de los analitos**

Una vez se encontraron las condiciones de carga óptimas se realizó un estudio para determinar las condiciones de elución óptimas de los analitos, la cuales incluyeron la naturaleza, porcentaje y volumen del disolvente de elución.

Para ello se trabajó con dos diferentes disolventes orgánicos de elución; metanol y acetonitrilo (ACN). En la primera parte del estudio se determinó la naturaleza y porcentaje de disolvente orgánico en agua para la elución, probando porcentajes de MeOH de 50, 75 y 100 %, y de manera independiente porcentajes de ACN de 40, 45 y 50 %. En ambos casos el volumen final de elución fue de 1000  $\mu$ L.

#### **Naturaleza y porcentaje del disolvente en agua**

En esta primera parte del estudio se realizó la extracción en fase sólida cargando 10.0 mL de la disolución MeOH: H<sub>2</sub>O 20:80 (condición de carga óptima) con estándar a 0.04  $\mu$ g/mL a un flujo aproximado de 2 mL/min a través del cartucho previamente activado y acondicionado. Posteriormente, los analitos fueron eluidos de los cartuchos con 1000  $\mu$ L de MeOH o ACN en agua a los diferentes porcentajes probados. Los eluatos o extractos se colectaron en viales de 1.5 mL y se analizaron por cromatografía de líquidos bajo las condiciones anteriormente optimizadas.

Los recobros obtenidos de esta primera parte del estudio permitieron determinar el porcentaje del disolvente óptimo para la elución. La selección del disolvente se determinó a partir de los estudios de interferentes.

#### **Volumen del disolvente**

En la segunda parte del estudio se determinó el volumen óptimo de elución, probando volúmenes de 500, 1000 y 1500  $\mu$ L para ambos disolventes a la

concentración anteriormente optimizada. Para ello se realizó un segundo ensayo de EFS cargando 10.0 mL de la disolución MeOH: H<sub>2</sub>O 20:80 con estándar a 0.04 µg/mL a un flujo aproximado de 2 mL/min (cartucho previamente activado y acondicionado), posteriormente, los analitos fueron eluidos de manera independiente con 500, 1000 y 1500 µL de MeOH al 75 % o ACN al 50 %. Los porcentajes de MeOH y ACN empleados en este ensayo fueron determinados en la primera parte de este estudio.

Los recobros obtenidos de esta segunda parte del estudio permitieron determinar el volumen de disolvente óptimo para la elución.

### **6.2.3.3. Optimización de la eliminación de interferentes**

La presencia de interferentes en los cromatogramas condujo a plantear dos condiciones de eliminación de interferentes o *clean up* en la extracción en fase sólida, mismos que se desarrollaron bajo el siguiente esquema.

#### **Eliminación de interferentes con metanol**

La eliminación de interferentes con metanol fue probada con porcentajes de 10, 15 y 20 %. En la primera parte del estudio se probaron disoluciones con los porcentajes de MeOH mencionados, manteniendo un volumen de 1.0 mL. El procedimiento que se siguió fue: cargar 10.0 mL de la disolución MeOH: H<sub>2</sub>O 20:80 con 0.04 µg/mL de estándar a un flujo aproximado de 2 mL/min (cartucho previamente activado y acondicionado). Posteriormente, se aplicaron 2 mL de H<sub>2</sub>O 100 % (flujo aproximado de 2 mL/min), al que siguieron volúmenes de 1 mL de disoluciones 10,15 y 20 % de metanol, probados de manera independiente a un flujo aproximado de 2 mL/min. Por último, los analitos se eluyeron bajo las condiciones de elución óptimas establecidas con anterioridad (1.0 mL de MeOH al 75 % en agua).

En la segunda parte del experimento nuevamente se cargaron 10.0 mL de la disolución MeOH: H<sub>2</sub>O 20:80 con 0.04 µg/mL de estándar a un flujo aproximado de 2 mL/min (cartucho previamente activado y acondicionado). Posteriormente, se aplicaron 2 mL de H<sub>2</sub>O 100 % (flujo aproximado de 2 mL/min) y después una disolución de MeOH al porcentaje óptimo previamente seleccionado (20 %). Los volúmenes probados para el *clean up* fueron 1, 2 y 3 mL, de manera independiente, a un flujo aproximado de 2 mL/min. Por último, los analitos de interés se eluyeron bajo las condiciones de elución óptimas establecidas con anterioridad (1.0 mL de MeOH al 75 % en agua).

### **Eliminación de interferentes con acetonitrilo**

En cuanto a la eliminación de interferentes con acetonitrilo, se probaron disoluciones con porcentajes de 5, 10 y 15 % en agua, y volúmenes de 0.5, 1.0, 2.0 y 3.0 mL. En la primera parte de este estudio se siguió el mismo procedimiento que en la optimización con metanol, con la única diferencia de que los porcentajes probados correspondieron a mezclas acetonitrilo/agua, y la elución de los analitos de interés se realizó con 0.5 mL de ACN al 50 %.

#### **6.2.3.4. Evaluación de interferentes**

Con el fin de determinar la ausencia o presencia de interferentes en los tiempos de retención de los analitos en los cromatogramas, se realizó un ensayo EAU-EFS en el que se utilizó tortilla de maíz amarilla.

Para este estudio se trabajó con dos muestras de 200 mg homogenizadas. Una de las muestras fue fortificada con 0.4 µg (2 µg/g) de los analitos durante 30 min; la otra se analizó sin fortificar. Después de la fortificación, se agregaron al homogenizado 10 mL de MeOH al 20 %, se agitó manualmente por 15 s y se llevó

a EAU bajo las condiciones de amplitud y tiempo optimizadas. Posteriormente, se realizó filtración (Whatman no. 1) y centrifugación a 4,750 rpm durante 20 min.

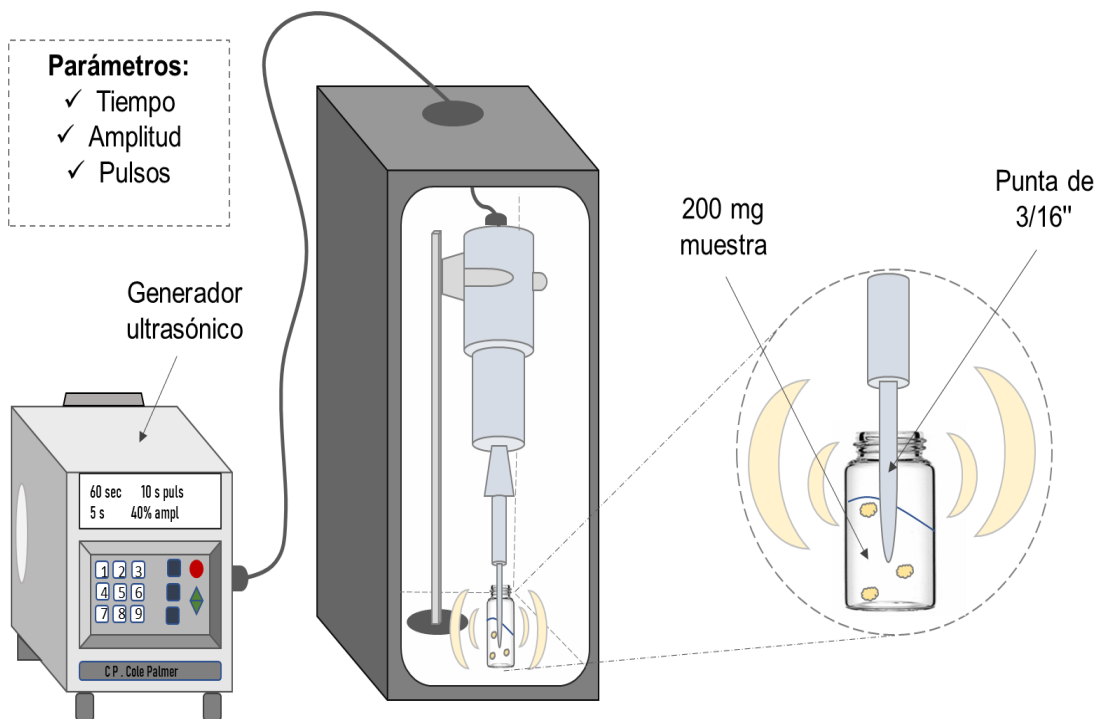
Los sobrenadantes de la centrifugación se cargaron en cartuchos independientes de EFS. Un par de cartuchos siguió la secuencia de elución con metanol, el otro par siguió la secuencia de elución con acetonitrilo. Al final, los eluatos finales con los analitos se analizaron por cromatografía de líquidos y los perfiles cromatográficos obtenidos permitieron realizar un análisis de la ausencia/presencia de interferentes.

#### **6.2.4. Extracción asistida por ultrasonido (EAU)**

##### **Condiciones generales**

Al optimizar la EAU se trabajó con una sonda con punta de 3/16" y muestras previamente procesadas como se menciona a continuación.

El procesamiento de la muestra previa a la EAU se realizó pesando 2.0 g de tortilla amarilla en trozos dentro de un vial de 20.0 mL, se agregaron 2.0 mL de agua al vial y con ayuda del equipo Biospec se homogenizó la muestra a 10,000 rpm durante 1 min; tiempo necesario para obtener una pasta homogénea. De este primer homogeneizado se tomó una submuestra de 200 mg que se colocó en un segundo vial de 15 mL para la ultra sonicación. El esquema de la extracción asistida por ultrasonido se muestra en la figura 6.2.4.



**Figura 6.2.4.** Esquema de la extracción asistida por ultrasonido (Elaboración propia).

### 6.2.4.1. Optimización de la amplitud en la EAU

Para optimizar la amplitud requerida en la extracción ultrasónica se probaron valores de 20, 40 y 60 % a un tiempo constante de 2 min por muestra.

En este ensayo se trabajó con 200 mg de muestra previamente homogenizada (cómo se describió anteriormente). Las muestras en cada vial fueron fortificadas por 30 min con 0.4 µg de los estándares a partir de una disolución estándar de 10 µg/mL. Posteriormente, se agregó un volumen de 10.0 mL de la disolución MeOH: H<sub>2</sub>O 20:80 previamente optimizada. El vial con la mezcla de extracción se agitó manualmente durante 15 s y se llevó al equipo de extracción ultrasónica.

El extracto ultrasónico se filtró a vacío con papel Whatman no 1, se colectó en tubos de 15 mL y se centrifugó a 4,750 rpm durante 20 min. Posteriormente, el



sobrenadante se cargó en los cartuchos de extracción en fase sólida bajo las condiciones anteriormente establecidas.

La inyección de los extractos EFS al equipo HPLC permitió obtener los cromatogramas de los cuales se determinó el porcentaje de recobro para cada uno de los analitos. Con base en estos datos se seleccionó la amplitud óptima para realizar la EAU.

#### **6.2.4.2. Optimización del tiempo en la EAU**

Al optimizar el tiempo de extracción requerido para maximizar el recobro de los analitos se trabajó bajo la amplitud de 40 % (anteriormente seleccionada).

En el estudio se trabajó con 200 mg de muestras de tortilla amarilla homogenizada, las muestras en cada vial fueron fortificadas por 30 min con 0.4 µg de los estándares (2 µg/g) a partir de una disolución estándar de 10 µg/mL. Posteriormente, se agregó un volumen de 10.0 mL de la mezcla MeOH: H<sub>2</sub>O 20:80 previamente optimizada. El vial con la mezcla de extracción se agitó manualmente durante 15 s y se llevó al equipo de extracción ultrasónica. En el equipo se probaron tiempos de extracción de 1, 2 y 3 min a una amplitud fija de 40 %.

Los extractos EAU fueron filtrados (Whatman No. 1) y colectados en tubos para su centrifugación a 4,750 rpm durante 20 min, posteriormente el sobrenadante se cargó a cartuchos EFS en los que se aplicó la secuencia de elución previamente establecida.

Los extractos EAU-EFS fueron inyectados al cromatógrafo de líquidos y se calcularon los porcentajes de recobro para cada una de las condiciones. Con base en estos resultados se seleccionó el mejor tiempo de extracción para la preparación de la muestra.

## 6.2.5. Extracción en fase sólida dispersiva (EFS-D)

### Condiciones generales

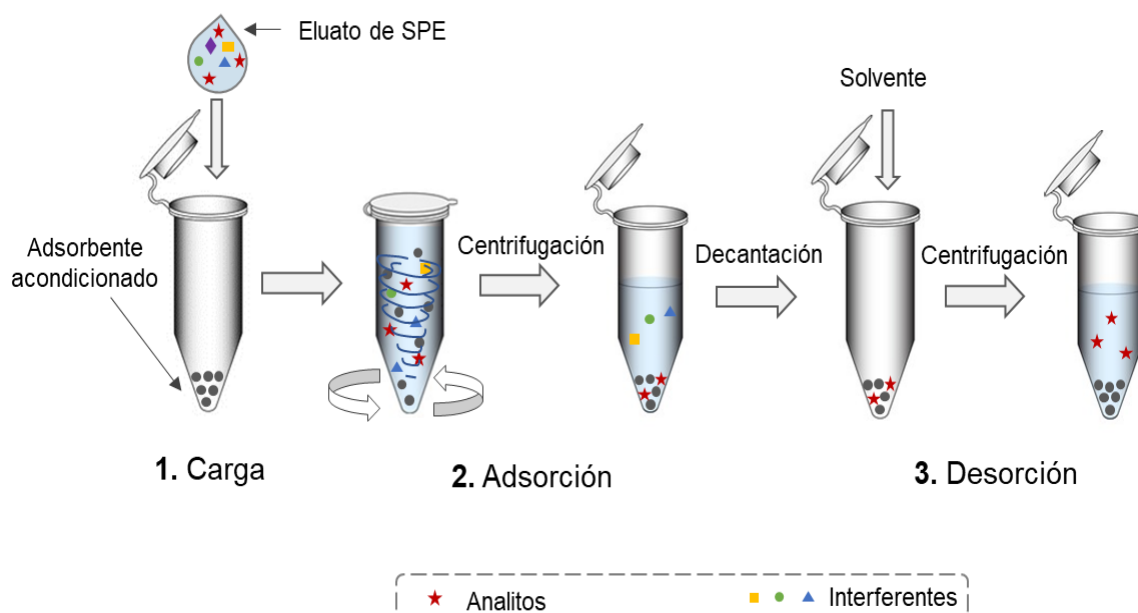
Para realizar la EFS-D se emplearon tubos de polipropileno eppendorf de 1.5 mL y 0.5 mL, adsorbentes Supelclean LC-18 y Bondesil ENV (PS-DVB), así como acetonitrilo y metanol.

Los tubos eppendorf fueron lavados previamente con ACN 100 % en 3 ciclos de 30 min c/u, los lavados se realizaron en baño ultrasónico. Por su parte, los adsorbentes C18 y PS-DVB fueron lavados con MeOH y ACN previo uso.

En todos los ensayos se trabajó bajo la velocidad máxima de agitación del equipo vórtex (3,000 rpm) y DLAB HCM100-Pro (1,600 rpm) con finalidad de favorecer la transferencia de masa en los procesos de adsorción y desorción.

El lavado y activación del C18 se realizó como se describió anteriormente en la sección 6.2.3. Para el lavado y activación de PS-DVB se colocó 1 g del adsorbente en un cartucho de 6 mL con un filtro en el fondo y se aplicaron por gravedad 3.5 mL de ACN 100 % al cartucho empacado. Finalmente, el adsorbente se dejó secar toda la noche un día antes de su uso. Adicionalmente el PS-DVB se acondicionó poniendo el adsorbente en contacto con 200  $\mu$ L de ACN 100 %, posteriormente este ACN se descartó con ayuda de una micropipeta y se dejó secar durante 3 horas antes de su uso.

El esquema general de EFS-D se muestra en la figura 6.2.5. La optimización de los pasos se detalla más adelante.



**Figura 6.2.5.** Esquema general de la extracción en fase sólida dispersiva (Elaboración propia).

### 6.2.5.1. Optimización de la retención

Para lograr retener a los analitos en la tercera etapa del procedimiento de preparación de muestra realizada por EFS-D, fue necesario diluir en agua para ajustar el porcentaje de disolvente orgánico del eluato obtenido de EFS. En esta etapa de la experimentación se probaron los porcentajes del disolvente orgánico resultantes de este ajuste. Al trabajar con C18 el disolvente empleado en la EFS-D fue MeOH y al trabajar con PS-DVB el disolvente usado en la EFS-D fue ACN.

Al trabajar con C18 se probaron mezclas de disolvente orgánico en agua con porcentajes de MeOH de 12, 25, 33, 50 y 75 % a un volumen total de 1.5 mL. Para ello se colocaron 30 mg de C18 en tubos eppendorf de 1.5 mL, después a cada tubo se agregaron 1.5 mL de los disolventes a diferente porcentaje (de forma independiente), se adicionaron 0.4 µg de los analitos y se agitó en el equipo vórtex a máxima velocidad (3,000 rpm) durante 3 min, los tubos se centrifugaron a 10,000 rpm durante 15 min, se colectó el sobrenadante con el fin de analizar los

analitos residuales y después los analitos adsorbidos se desorbieron con 200  $\mu$ L de MeOH al 100 % empleando agitación vórtex a 3,000 rpm por 3 min.

Al trabajar con PS-DVB y ACN se probaron porcentajes de ACN de 12, 25, 33 y 50 % a un volumen total de 1.5 mL. En cada tubo se colocaron de 5 mg de PS-DVB y 1.5 mL del disolvente a diferente porcentaje de acetonitrilo, posteriormente se adicionaron 0.4  $\mu$ g de los analitos, se agitaron los tubos a 3,000 rpm en vórtex durante 3 min, se centrifugaron a 10,000 rpm durante 15 min, se colectó el sobrenadante (residuo) y los analitos se desorbieron con 100  $\mu$ L de ACN al 100 % empleando agitación vórtex a 3,000 rpm por 3 min.

Los extractos conteniendo a los analitos y los sobrenadantes (residuos) fueron filtrados usando filtros de jeringa de 0.45  $\mu$ m (Nylon, Titan), se analizaron por cromatografía y se calcularon los recobros. El análisis de estos resultados permitió obtener las condiciones más adecuadas para la adsorción (retención) de los analitos en EFS-D.

#### **6.2.5.2. Optimización de la cantidad y tipo de adsorbente**

El efecto de la cantidad de adsorbente se evaluó con 10, 20, 30 y 40 mg de C18, así como con 5, 10 y 30 mg de PS-DVB. Al trabajar con C18 el disolvente empleado para simular la carga del extracto EFS en la adsorción fue MeOH y al trabajar con PS-DVB el disolvente fue ACN.

La optimización con C18 se realizó probando las diferentes cantidades de adsorbente en diferentes tubos; en cada tubo se colocaron además 1.5 mL de MeOH al 33 % y 0.4  $\mu$ g de los analitos. Los tubos se agitaron a 3,000 rpm en vórtex durante 3 min, se centrifugaron a 10,000 rpm por 15 min, se descartó el sobrenadante y posteriormente los analitos de interés se desorbieron con 200  $\mu$ L de MeOH al 100 % empleando agitación vórtex a 3,000 rpm por 3 min.

La optimización con PS-DVB se realizó probando las diferentes cantidades de adsorbente en diferentes tubos; en cada tubo se agregaron 1.5 mL de ACN al 17 % y 0.4 µg de los analitos. Los tubos se agitaron a 3,000 rpm en vórtex durante 3 min, se centrifugaron a 10,000 rpm por 15 min, se descartó el sobrenadante y finalmente se recuperaron los analitos con 100 µL de ACN al 100 % empleado agitación vórtex a 3,000 rpm por 3 min.

En esta etapa de la optimización los sobrenadantes fueron descartados ya que la concentración de los analitos residuo en éstos fue previamente estudiada en la sección 6.2.5.1. Los extractos finales desorbidos fueron filtrados (0.45 µm) y analizados por HPLC, y se calcularon los recobros. Con los valores de los recobros se determinó la cantidad y tipo de adsorbente óptimo para la extracción.

### **6.2.5.3. Optimización del volumen y naturaleza del disolvente de desorción**

Con el propósito de seleccionar el mejor disolvente y volumen de desorción, se probaron volúmenes de 100, 200 y 300 µL. La selección de estos volúmenes tuvo en cuenta el efecto del incremento del volumen sobre el decremento en el factor de concentración. El estudio se realizó con C18 y PS-DVB. En el caso del C18 se trabajó con ACN y MeOH, en el caso del PS-DVB sólo se trabajó con ACN.

#### **Adsorbente C18**

Para el C18 se probaron los tres volúmenes de desorción, así como los dos disolventes. Para ello se pesaron tubos eppendorf con 30 mg de C18 a la que se agregaron 1.5 mL de MeOH al 33 % y 0.4 µg de analitos, se agitaron los tubos a 3,000 rpm en vórtex por 3 min, se centrifugaron a 10,000 rpm por 15 min, se descartó el sobrenadante y cada uno de los tubos se desorbió con un volumen de 100, 200 y 300 µL con MeOH y ACN de forma independiente.

## **Adsorbente PS-DVB**

En el caso del PS-DVB se probaron los tres volúmenes de desorción sólo con ACN. En este ensayo se pesaron tubos eppendorf con 5 mg de PS-DVB, se agregaron 1.5 mL de ACN al 17 % y 0.4 µg de analitos, se agitaron a 3,000 rpm en vórtex por 3 min, se centrifugaron a 10,000 rpm por 15 min, se descartó el sobrenadante y cada tubo se desorbió con 100, 200 y 300 µL de ACN al 100 % empleado agitación vórtex para 3,000 rpm por 3 min.

Todos los extractos finales se filtraron (0.45 µm) y se inyectaron al sistema HPLC, de estos resultados se calcularon los porcentajes de recobro y con base en estos se determinó el volumen y disolvente más adecuado para la desorción.

### **6.2.5.4. Evaluación del efecto de la temperatura en la desorción**

El estudio del efecto de la temperatura sobre la desorción de los analitos se llevó a cabo comparando los recobros obtenidos de la desorción con agitación orbital a temperatura ambiente, frente a la desorción con agitación orbital a 45 °C. Así mismo, los resultados de la agitación orbital a 1,600 rpm por 10 min (45 °C) obtenidos en esta sección se compararon con los obtenidos en la sección anterior para la agitación vórtex a 3,000 rpm por 3 min (temperatura ambiente). Para esto, se trabajó con el equipo DLAB HCM100-Pro con control de agitación y temperatura, estableciendo la velocidad máxima de agitación del equipo, como la velocidad de trabajo durante la desorción: 1,600 rpm. El tiempo de agitación en la desorción fue de 10 min.

En el procedimiento experimental se trabajó con 5 mg PS-DVB, empleando 100 µL de ACN 100 % para la desorción. El procedimiento fue el siguiente: a los tubos con 5 mg de PS-DVB se les agregaron 1.5 mL de ACN al 17 % y 0.4 µg de los analitos simulando el extracto diluido de EFS, los tubos se agitaron a 3,000 rpm

durante 3 min en el equipo vórtex durante la adsorción, se centrifugaron a 10,000 rpm por 15 min, se descartó el sobrenadante y se recuperaron los analitos desorbiendo con agitación orbital a 1,600 rpm por 10 min (temperatura ambiente), así como a 1,600 rpm por 10 min (45 °C).

Los extractos finales se filtraron y analizaron por cromatografía de líquidos, los resultados se graficaron, compararon y finalmente se seleccionaron las condiciones óptimas para realizar la desorción.

#### **6.2.5.5. Optimización del tiempo de agitación vórtex en la adsorción**

El tiempo de agitación vórtex en la adsorción se optimizó probando tiempos de 1, 2 y 3 min en la etapa de adsorción de los analitos al adsorbente. Para ello se realizó un ensayo en el que se pesaron 5 mg de PS-DVB en diferentes tubos, a cada tubo se agregó un volumen de 1.5 mL de ACN al 17 % y 0.4 µg de analitos, los tubos se agitaron a 3,000 rpm (vórtex) a los tres diferentes tiempos antes establecidos, posteriormente se centrifugaron a 10,000 rpm por 15 min, se descartó el sobrenadante, y se recuperaron los analitos con agitación orbital de 1,600 rpm por 10 min y 45 °C. El volumen de desorción fue de 100 µL de ACN 100 %.

Los extractos finales se filtraron (0.45 µm) y analizaron por cromatografía de líquidos, se calcularon los porcentajes de recobro y posteriormente se seleccionaron las condiciones óptimas de agitación vórtex.

### **6.2.5.6. Evaluación de interferentes**

El estudio de interferentes se realizó acoplando las etapas EAU y EFS a la EFS-D (bajo los parámetros previamente optimizados).

Se partió de dos muestras homogenizadas de tortilla amarilla de 200 mg; una muestra se fortificó con 0.4 µg de los analitos y la otra muestra no se fortificó. A ambas muestras se les realizó extracción asistida por ultrasonido bajo las condiciones previamente optimizadas (volumen de extracción de 10.0 mL de MeOH 20 %, amplitud de 40 %, tiempo de 1 min), posteriormente los extractos se cargaron en cartuchos C18 de extracción en fase sólida a los que se realizó la siguiente secuencia de elución: 2 mL de H<sub>2</sub>O 100 %, 0.5 mL de ACN 10 % y 0.5 mL ACN 50 %. Los eluatos de los cartuchos se colectaron en tubos eppendorf que contenían 5 mg de PS-DVB. Posteriormente, se aplicó la metodología EFS-D optimizada.

Los eluatos se analizaron por cromatografía de líquidos de alta resolución y se evaluó el perfil cromatográfico de ambos ensayos.

### **6.2.6. Validación de la metodología desarrollada EAU-EFS-EFS-D**

La validación de la metodología desarrollada consideró la exactitud, precisión, límites de detección y cuantificación, linealidad, rango lineal y robustez. Durante la validación se trabajó con 5 niveles de concentración y cada uno de ellos se evaluó por triplicado, adicionalmente se incluyó un blanco que también se preparó por triplicado.

La linealidad de método se evaluó fortificando a 5 diferentes concentraciones la muestra: 50, 100, 150, 200 y 250 ng/g, posteriormente se aplicó la metodología desarrollada (EAU-EFS-EFS-D) a cada una de las muestras y se inyectó el



triplicado de cada una al cromatógrafo de líquidos. Se analizaron las áreas y se realizó un análisis de regresión lineal por mínimos cuadrados (ecuación 6).

De este análisis de regresión lineal se evaluó el intervalo lineal a las concentraciones probadas, así como la sensibilidad.

Los límites de detección (LD) y cuantificación (LC) se determinaron de tres formas distintas: 1. Mediante la pendiente de la curva y la desviación estándar del blanco, 2. Mediante la pendiente de la curva y la desviación estándar de la intersección “y” de la recta y 3. Del análisis de la relación señal/ruido, de acuerdo con lo establecido en la Guía Q2(R1), Validación de procedimientos analíticos (FDA et al., 2021).

Para determinación de LD y LC mediante la pendiente de la curva y la desviación estándar del blanco (Método 1) se usaron las ecuaciones 6, 7 y 8. Las concentraciones evaluadas se encontraron en el intervalo de: 50- 250 ng/g.

Para la determinación mediante la pendiente de la curva y la desviación estándar de la intersección “y” de la recta (Método 2) se emplearon las ecuaciones 6, 11 y 12 el Software Microsoft Excel ® para calcular la desviación estándar de la intersección de la recta a través de la función “Análisis de datos” y “Análisis de regresión”. Las concentraciones evaluadas se encontraron en el intervalo de: 50- 250 ng/g.

$$LD = \frac{3.3 S_i}{m} \quad (\text{Ecuación 11})$$

$$LC = \frac{10 S_i}{m} \quad (\text{Ecuación 12})$$

*LD* : Límite de detección

*LC* : Límite de cuantificación

*S<sub>i</sub>* : Desviación estándar de la intersección “y” de la recta

*m* : pendiente de la curva

La aproximación de LD y LC a través del análisis de la relación señal ruido (Método 3) se realizó inyectando extractos de muestras fortificadas a baja concentración: 10, 20, 30, 50 y 60 ng/g (concentraciones seleccionadas con base en los resultados obtenidos en los métodos anteriores). De los cromatogramas obtenidos se analizó la relación señal/ruido de la línea base y la altura de los picos cromatográfico de los analitos de interés y se consideró la relación 3/1 como aceptable para el límite de detección y la relación 10/1 como aceptable para el límite de cuantificación, de acuerdo con la Guía Q2(R1) (FDA et al., 2021).

A partir del análisis de la desviación estándar de las 5 concentraciones evaluadas por triplicado (50-250 ng/g) se evaluó la precisión intradía. La precisión interdía se evaluó en 3 días distintos en los que se ensayó por triplicado el mismo intervalo de concentraciones y de estos resultados se calculó la desviación estándar relativa.

Para evaluar la exactitud se determinaron los porcentajes de recobro en cada uno de los intervalos de concentración, para ello se emplearon las ecuaciones 9 y 10.

La robustez por otra parte se determinó mediante el análisis de una matriz distinta (tortilla azul) a la empleada para el desarrollo de la metodología (tortilla amarilla). Se aplicó la metodología desarrollada a un ensayo por triplicado de tortillas azules con y sin fortificar. Finalmente se evaluaron los recobros, así como la desviación estándar relativa de cada uno de ellos, por último, estos resultados se compararon con los obtenidos para la tortilla amarilla realizando una prueba estadística t-student ( $\alpha = 0.05$ ).

### **6.2.7. Aplicación de la metodología al análisis de muestras reales**

Una vez que se validó la metodología, se procedió al análisis de muestras obtenidas de diferentes puntos de la Zona Metropolitana del Valle de México, así como de diferentes estados de la República Mexicana (Tabla 6.15). Las muestras fueron obtenidas de tortillerías, tiendas y supermercados y fueron almacenadas por un máximo de 7 días a -25 °C hasta su análisis.

Cada una de las muestras fortificadas y sin fortificar se analizó por duplicado. Las muestras fueron descongeladas y homogenizadas como se describe en la sección 6.2.2 (Homogenización y fortificación de la muestra), se fortificó a 100 ng/g un duplicado de cada muestra y otro duplicado de cada muestra se mantuvo sin fortificación, se aplicó la metodología desarrollada a cada grupo EAU-EFS-EFS-D y los extractos finales fueron inyectados al equipo de HPLC-UV.

De los resultados obtenidos se analizaron los porcentajes de recobro mediante la ecuación 10, así como las concentraciones de atrazina y simazina presentes (de ser el caso) en las tortillas.

## 7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1. Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)

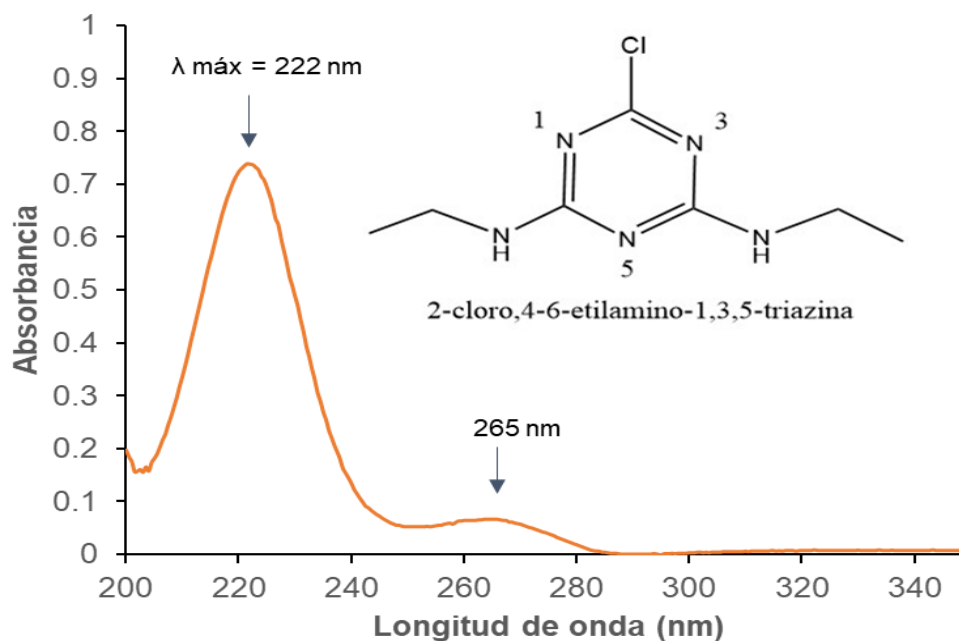
#### 7.1.1. Selección de longitud de onda en detección ultravioleta

De los espectros de absorción ultravioleta obtenidos experimentalmente, se encontraron dos máximos de absorción en 222 nm y 264-265 nm, los valores se presentan en la tabla 7.1.1.

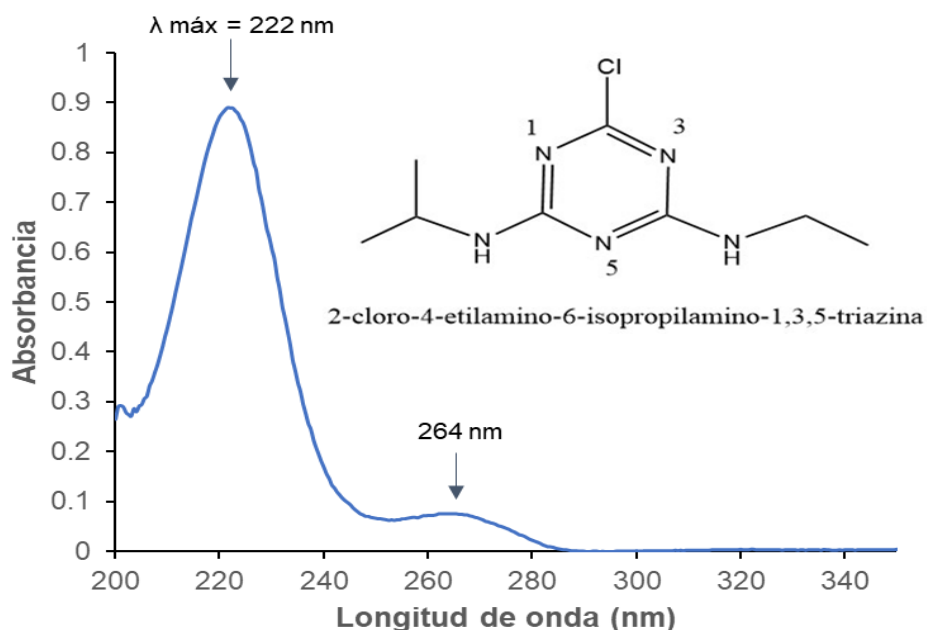
**Tabla 7.1.1.** Máximos de absorción de la atrazina y la simazina.

Triazina	Disolvente	$\lambda_{\text{máx}}$	$\lambda_{\text{máx2}}$
Atrazina	Metanol	222 nm	264 nm
Simazina	Metanol	222 nm	265 nm

Estos máximos de absorción se observan en los espectros de absorción experimentales obtenidos para cada uno de los herbicidas (Figura 7.1.1 y 7.1.1.1).



**Figura 7.1.1.** Espectros de absorción ultravioleta de la simazina.



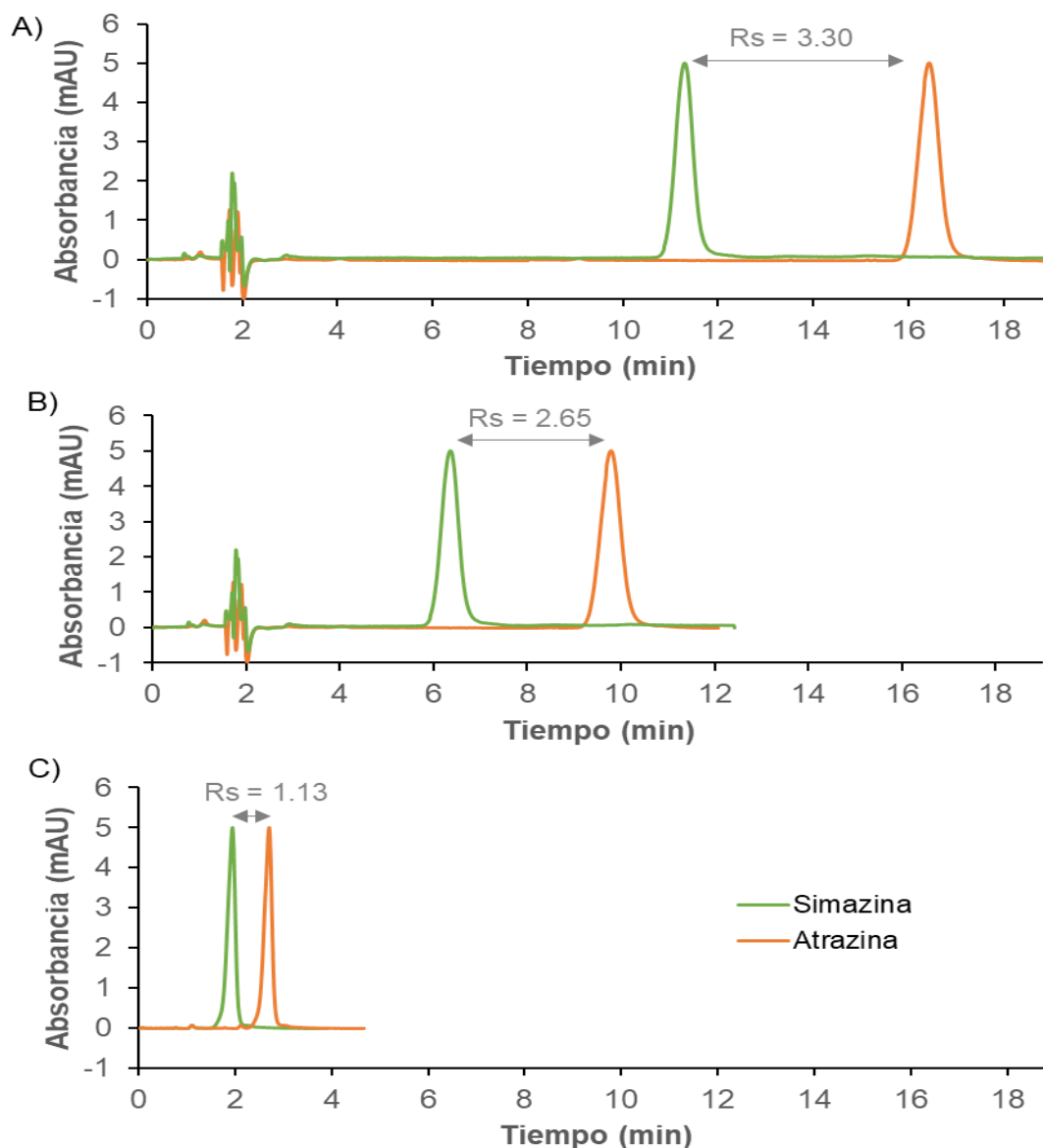
**Figura 7.1.1.1.** Espectros de absorción ultravioleta de la atrazina.

En estas figuras destaca la similitud entre las bandas de absorción correspondientes a 222 nm y 264-265 nm de ambas triazinas.

La baja absorptividad que tiene la señal a 265 nm ha causado que múltiples investigaciones hayan realizado la detección de estos compuestos a longitudes de onda más bajas de 220-223 nm (Hejabri kandeh et al., 2022; Haeri & Abbasi, 2016; Santos-Hernández et al., 2018). En su mayor parte, las metodologías reportadas en la literatura cuentan con una preparación de muestra en donde se eliminan gran parte de las interferencias, con lo que se resuelven los problemas que conllevan las lecturas cercanas al intervalo de 170-220 nm, donde numerosos cromóforos de compuestos orgánicos absorben con intensidad: enlaces C-N, C-O, C-S, C=O, C=N, N=O, C=O  $\alpha$  y  $\beta$  insaturados, etc. (Pretsch et al., 2000). Tomando estas referencias como partida, así como el intervalo de trabajo del detector: 230-510 nm, la longitud de onda seleccionada para el trabajo fue 230 nm.

## 7.1.2. Optimización de la separación cromatográfica

Al ensayar las diferentes composiciones de la fase móvil en HPLC, la relación MeOH:H<sub>2</sub>O 50:50 fue la más idónea para separar satisfactoriamente a las dos triazinas (Figura 7.1.2).



**Figura 7.1.2.** Comportamiento cromatográfico de las disoluciones estándar 0.4 µg / mL al trabajar con una fase móvil MeOH: H<sub>2</sub>O a diferente composición. A) Fase móvil 45:55 MeOH: H<sub>2</sub>O, B) Fase móvil 50:50 MeOH: H<sub>2</sub>O y C) Fase móvil 20:80 MeOH: H<sub>2</sub>O.

La resolución cromatográfica  $R_s = 2.65$  obtenida con la fase móvil MeOH: H<sub>2</sub>O 50:50 se consideró como la más adecuada, contemplando también la posibilidad de separar a los solutos interferentes que aparezcan en un tiempo cercano al tiempo muerto y los que presenten una polaridad cercana a la de los analitos al trabajar con muestras reales. Los parámetros cromatográficos de todas las fases móviles probadas se compilan en la tabla 7.1.2.

**Tabla 7.1.2.** Parámetros cromatográficos con diferentes fases móviles.

MeOH:H <sub>2</sub> O	Simazina			Atrazina			$\alpha$	Rs
	$t_R$ (min)	W (min)	k	$t_R$ (min)	W (min)	k		
*45: 55	11.2	1.40	5.1	16.3	1.69	7.7	1.5	3.30
<b>*50: 50</b>	<b>6.3</b>	1.21	<b>2.4</b>	<b>9.7</b>	1.35	<b>4.0</b>	<b>1.8</b>	<b>2.65</b>
55: 45	4.5	1.18	1.4	7.7	1.27	3.2	2.2	2.61
60: 40	2.2	1.16	0.2	5.3	1.29	1.9	9.9	2.53
70: 30	1.8	1.09	0.0	3.7	1.11	1.0	-	1.73
*80: 20	1.8	0.78	0.0	2.7	0.81	0.5	-	1.13

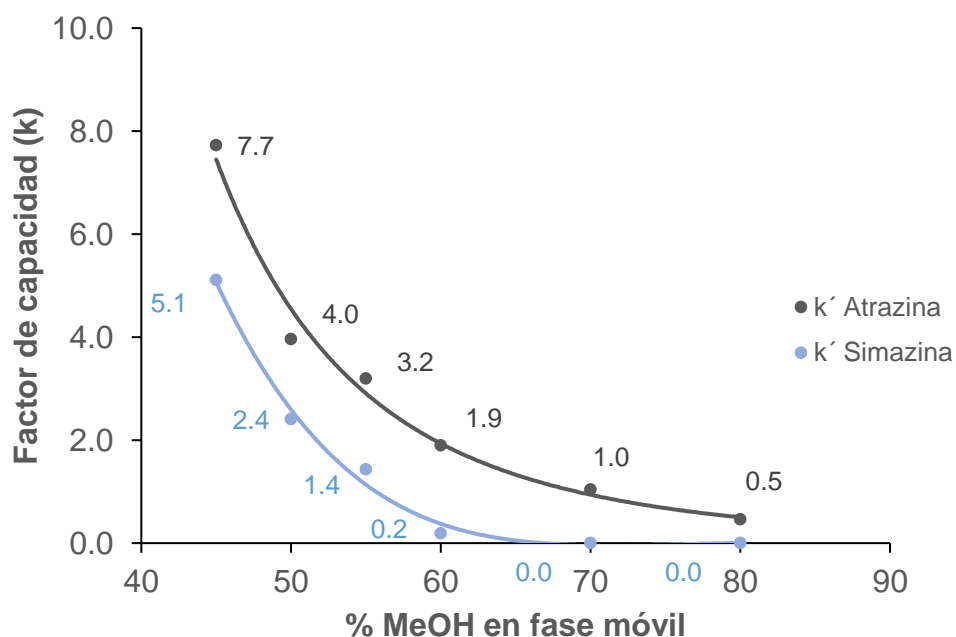
\*Fases móviles de la Figura 7.1.2. En negritas la fase móvil seleccionada.  $t_M = 1.85$  min

La fase móvil MeOH: H<sub>2</sub>O 50:50 permitió obtener una resolución ( $R_s$ ) mayor a 2 (separación entre picos de más de un 99.99 %), suficiente para realizar una cuantificación adecuada de los analitos. El factor de selectividad  $\alpha$  logrado con esta fase móvil fue 1.8 y la presión del equipo cromatográfico bajo estas condiciones fue de 17 MPa (presión máxima de trabajo 25 MPa) con un tiempo de ensayo de 12 min (Tabla 7.1.2.1).

**Tabla 7.1.2.1.** Parámetros físicos al trabajar con diferente fase móvil.

MeOH:H <sub>2</sub> O	Presión (MPa)	Tiempo de ensayo (min)
45: 55	17.6	19
50: 50	17.0	12
55: 45	16.8	10
60: 40	16.1	7
70: 30	15.0	6
80: 20	14.8	4

La tabla 7.1.2. permitió descartar rápidamente fases móviles con elevados porcentajes de MeOH (80 % y 70 %), ya que en estas fases móviles la simazina no logró retenerse en la columna. Por otra parte, la fase móvil con un porcentaje de MeOH de 45 %, incrementó el tiempo de ensayo considerablemente, además de ensanchar los picos y aumentar el factor de capacidad de ambas triazinas. El comportamiento del factor de capacidad ( $k$ ) para la atrazina y simazina en las fases móviles probadas se muestra en el gráfico 7.1.2.



**Gráfico 7.1.2.** Curvas del factor de capacidad de atrazina y simazina en función del porcentaje de metanol en la fase móvil.

Los valores de factor de capacidad están relacionados con la retención de los analitos en la columna, los factores de capacidad de interés para el análisis cromatográfico suelen encontrarse entre 2 y 10, los valores por debajo de 2, como los obtenidos en las fases móviles 55 % y 60 % MeOH resultan de una baja interacción de los analitos con la columna, mientras que los valores por arriba de 10 están relacionados con una alta retención en la columna (Soyseven & Sezgin, 2021). Considerando lo anterior, al trabajar con la fase MeOH: H<sub>2</sub>O 50:50 los valores de  $k'$  para la atrazina y la simazina fueron 4.0 y 2.4, respectivamente, por



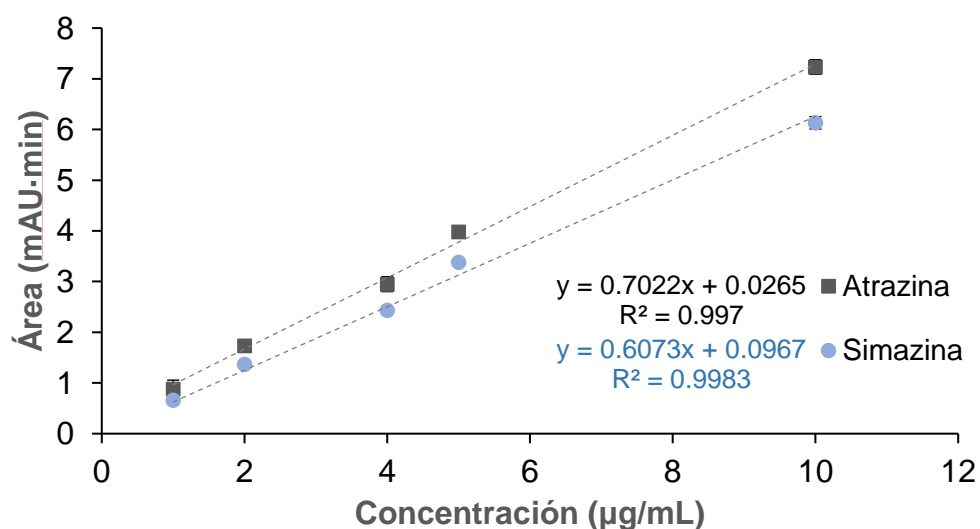
lo que la retención de los analitos en la columna fue adecuada con un tiempo de ensayo de 12 min.

Con base en estos resultados se reitera que la fase móvil MeOH: H<sub>2</sub>O 50:50 fue la más adecuada y la seleccionada para separar y cuantificar a la atrazina y simazina durante el desarrollo de la metodología.

### 7.1.3. Validación instrumental

Los resultados de la validación instrumental permitieron evaluar satisfactoriamente la linealidad del sistema en el intervalo de las concentraciones trabajadas (1-10 µg/mL), así como la precisión de los ensayos y los límites de detección y cuantificación con estándares.

La linealidad del sistema cumplió con los criterios de aceptación de referencia (SENASICA, 2022), siendo que los coeficientes de determinación ( $r^2$ ) fueron mayores a 0.99 en cada una de las regresiones lineales dentro del intervalo de concentración ensayado (Gráfico 7.1.3).



**Gráfico 7.1.3.** Curva de calibración instrumental para la atrazina y la simazina.

Los resultados obtenidos para los límites de detección y cuantificación se muestran en la tabla 7.1.3.

**Tabla 7.1.3.** Límites de detección y cuantificación instrumentales.

Método	Atrazina		Simazina	
	LD (ng/mL)	LC (ng/mL)	LD (ng/mL)	LC (ng/mL)
Método 1	10	30	10	30
Método 2	8	24	9	27

Método 1: Basado en la curva de calibración y desviación estándar del blanco

Método 2: Basado en el análisis de la relación señal / ruido

En la tabla 7.1.3 se aprecia una similitud entre los valores que arrojan cada uno de los métodos. El límite de detección más bajo se obtuvo del método basado en el análisis de la relación señal/ruido y puede considerarse como el valor con mayor veracidad al tratarse de un método empírico.

En cuanto a la precisión; la desviación estándar relativa de los ensayos se mantuvo entre 1.4 % y 5.1 %. Que son valores admisibles al trabajar con estándares (SENASICA, 2022). Los resultados para los ensayos de precisión se muestran en la tabla 7.1.3.1.

**Tabla 7.1.3.1.** Precisión al trabajar con estándares en un mismo día.

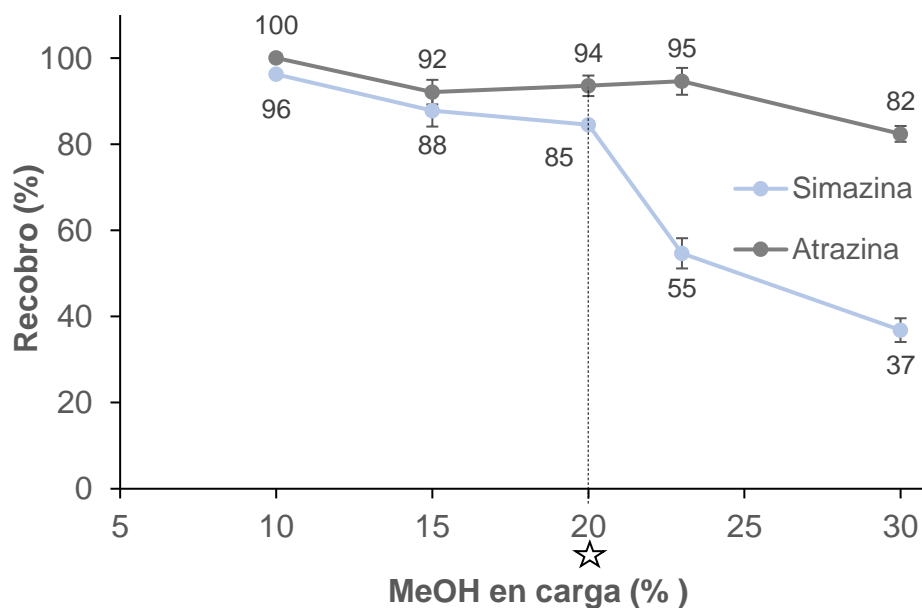
Concentración estándar (µg/mL)	DSR atrazina (%)	DSR simazina (%)
1	1.4	3.3
2	3.1	5.1
4	2.3	4.4
5	4.5	2.5
10	3.4	3.2

## 7.2. Extracción en fase sólida (EFS)

### 7.2.1. Optimización del disolvente de carga

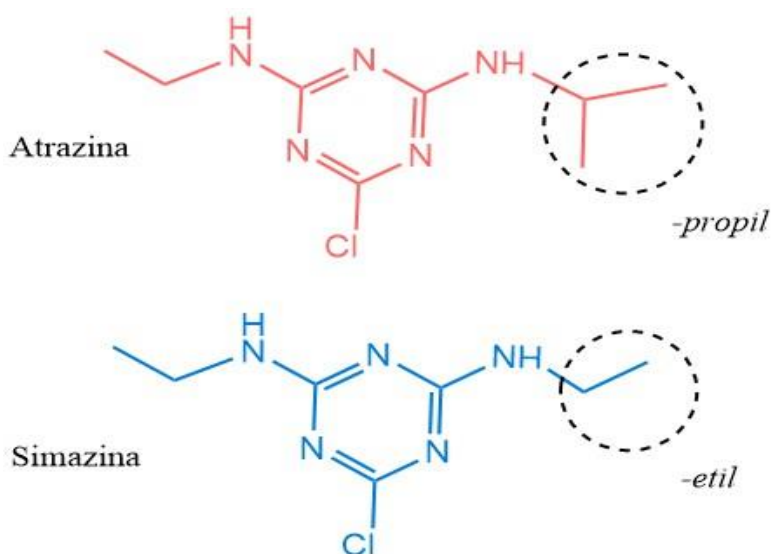
Después de considerar la diferencia de solubilidad de los analitos en metanol y agua, así como el recobro de estos al trabajar con el adsorbente C18, el MeOH al 20 % (MeOH: H<sub>2</sub>O 20:80) resultó ser el disolvente de carga más adecuado para realizar la extracción en fase sólida.

En el Gráfico 7.2.1 se muestra la influencia del porcentaje de metanol al cargar diferentes disoluciones de los estándares al cartucho de EFS. Puede observarse que por arriba del 20 % de metanol, el recobro de la simazina disminuye drásticamente. La pérdida de simazina ya es de un 45 % cuando el porcentaje de metanol en la carga es de 23 %. Por su parte, el recobro de la atrazina se mantiene por arriba del 80 %, aun cuando el porcentaje de metanol en la carga es del 30 %.



**Gráfico 7.2.1.** Recobro en función del porcentaje de metanol en la carga EFS. Volumen de carga de 10 mL. Cartucho empacado con 100 mg C18.  
☆ Condición seleccionada.

La diferencia en el recobro de ambas especies puede asociarse a la estructura química de los compuestos y su interacción hidrofóbica con los grupos octadecilo del adsorbente C18. En este sentido, la atrazina podría haber presentado una mayor interacción con el adsorbente a través del grupo propil que la que presentaría la simazina a través del grupo etil de un carácter menos hidrofóbico. Lo anterior, explicaría que la simazina se fugara a un cierto porcentaje de metanol cuando fue cargada al cartucho de EFS, mientras que, al mismo porcentaje, la atrazina no fugó (Figura 7.2.1.).



**Figura 7.2.1.** Estructura química de la atrazina y simazina (Elaboración propia).

El porcentaje de MeOH para realizar la EFS, y bajo el cual se observó un recobro aceptable para los analitos (recobro  $\geq 85$  %) fue de 20 % en un volumen total de 10.0 mL. Por lo que, estas fueron las condiciones elegidas para realizar la carga en la extracción en fase sólida. Cabe destacar que este porcentaje de metanol es el que tendría el extracto proveniente de la EAU.

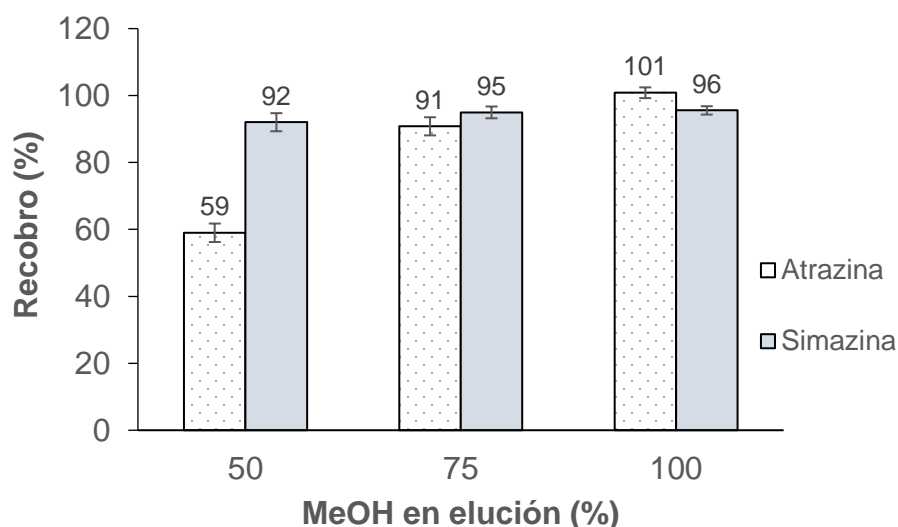
## 7.2.2. Optimización de la elución de los analitos

Las condiciones de elución óptimas de los analitos de interés se encontraron al trabajar por un lado con 500  $\mu$ L de acetonitrilo al 50 % en agua, y por otro lado con 1 mL de MeOH al 75 % en agua, ya que permitieron obtener un recobro superior al 85 % para ambas triazinas. La elección del ACN sobre el MeOH se determinó posteriormente al realizar el estudio de interferentes.

### Naturaleza y concentración del disolvente

#### Elución con metanol

Los porcentajes de recobro obtenidos para las eluciones a diferentes porcentajes de metanol se observan en el gráfico 7.2.2.



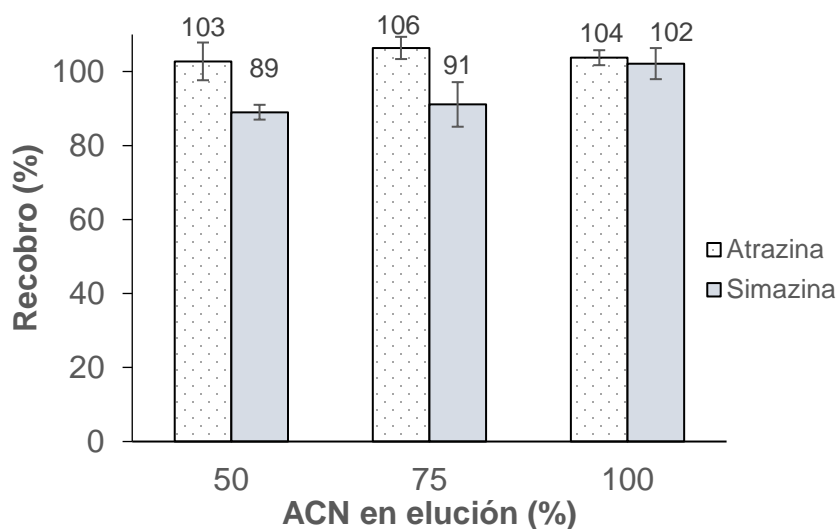
**Gráfico 7.2.2.** Recobro en función del porcentaje de metanol en la elución EFS. Volumen de elución de 1 mL. Cartucho empacado con 100 mg de C18.

En el gráfico anterior puede apreciarse que la elución con 75 % de MeOH permitió obtener mayores recobros que la elución con 50 % MeOH, mientras que al pasar a 100 % MeOH no se observó un aumento importante del recobro. A su vez, el poder de elución de MeOH 100 % resultaba inconveniente, debido a que se eluían

una mayor cantidad de interferencias con tiempo de retención cercano al  $t_R$  de la simazina, razón por la cual se descartó como condición de elución de los analitos de interés.

### Elución con acetonitrilo

El porcentaje de acetonitrilo que permitió obtener un recobro satisfactorio fue de 1 mL de la disolución al 50 %. A diferencia de la elución con metanol, la elución con acetonitrilo permitió obtener un mayor porcentaje de recobro para la simazina con un menor porcentaje de disolvente orgánico, tal como se observa en el Gráfico 7.2.2.1.



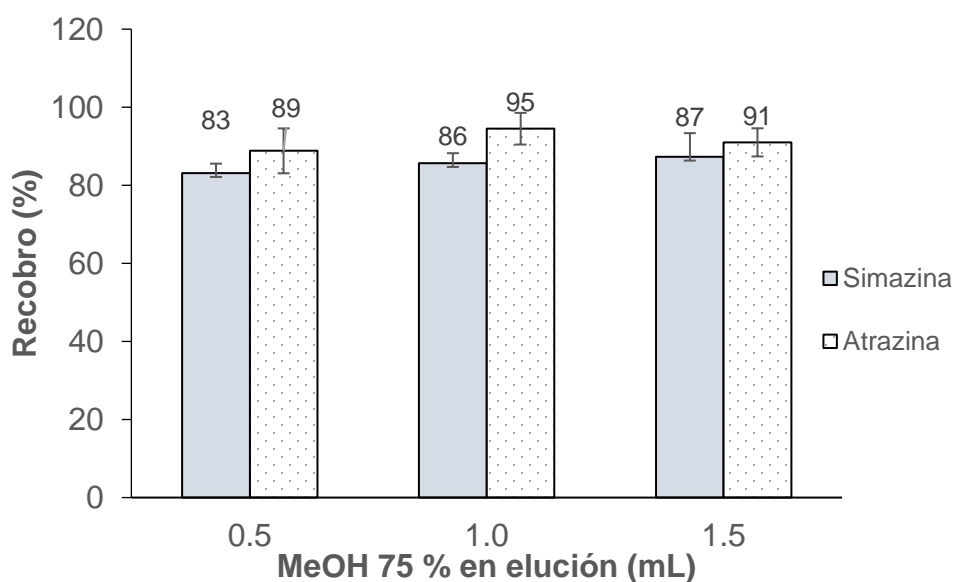
**Gráfico 7.2.2.1.** Recobro en función del porcentaje de acetonitrilo en la elución EFS. Volumen de elución de 1 mL. Cartucho empacado con 100 mg de C18

El acetonitrilo presenta una fuerza de elución mayor a la del metanol y este efecto se aprecia al comparar los porcentajes de recobro de la atrazina al ser eluida con 50 % ACN (Gráfico 7.2.2.1) y 50 % MeOH (Gráfico 7.2.2), en el primer caso el porcentaje de recobro fue mayor a pesar de que el disolvente se encontraba en la misma proporción que en el segundo caso, donde el porcentaje de recobro fue de 59 % para la simazina.

## Volumen de elución

### Disolvente metanol

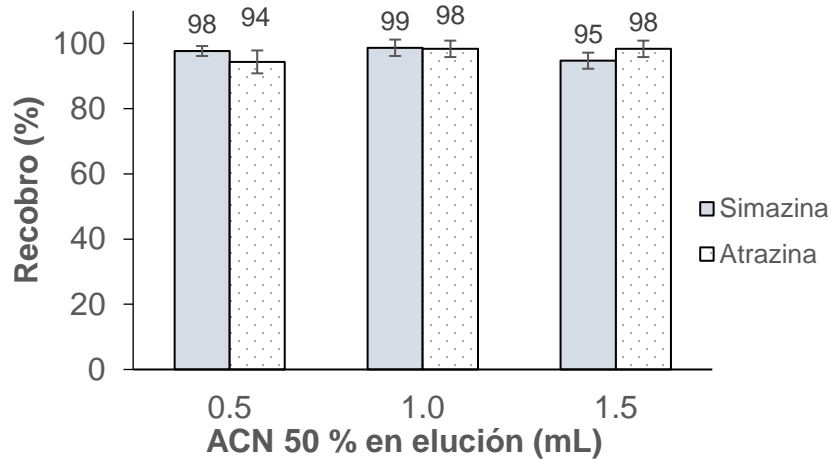
Como se observa en el Gráfico 7.2.2.2 el volumen óptimo al realizar la elución con MeOH fue de 1.0 mL. Este volumen se seleccionó dado que no se observó un aumento significativo en el recobro al pasar de 1.0 a 1.5 mL, pero sí un aumento en el recobro al pasar de 0.5 a 1.0 mL.



**Gráfico 7.2.2.2.** Recobro de analitos en función del volumen de elución (MeOH 75 %). Cartucho empacado con 100 mg de C18.

### Disolvente acetonitrilo

El volumen de acetonitrilo requerido para obtener un buen recobro de los analitos ( $\geq 85\%$ ) fue menor que en el caso del metanol. Para la elución de los analitos con el acetonitrilo fueron sólo necesarios 0.5 mL al 50 %, considerando que no se observó un aumento en el recobro al incrementar el volumen de elución a 1.0 y 1.5 mL (Gráfico 7.2.2.3).



**Gráfico 7.2.2.3.** Recobro de analitos en función del volumen de elución (ACN 50 %). Cartucho empacado con 100 mg de C18.

### 7.2.3. Optimización de la eliminación de interferentes

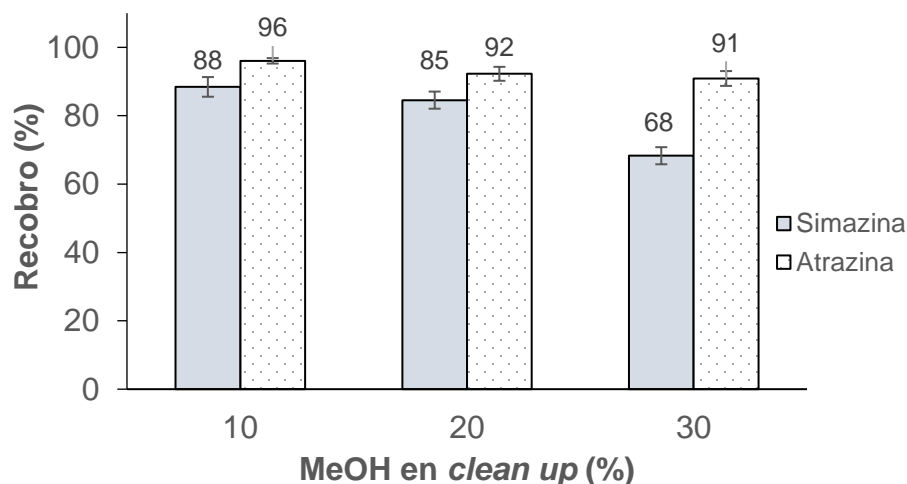
Los resultados de la eliminación de interferentes incluyeron las pruebas con metanol y acetonitrilo a diferentes volúmenes y porcentajes en agua, de forma similar a los resultados mostrados para la elución de los analitos de interés.

#### Eliminación de interferentes con metanol

El gráfico 7.2.3. muestra el efecto que tiene el porcentaje de disolvente orgánico en la eliminación de interferentes sobre el recobro. La simazina fue el herbicida cuyo recobro se vio mayormente afectado por el incremento de MeOH en la disolución de limpieza de interferentes constituida por la mezcla MeOH: H<sub>2</sub>O. Así, al aplicar 10 % de MeOH, no se observó que el recobro de la simazina se viera afectado respecto a los recobros en donde no se aplicó la disolución para realizar el *clean up* (Gráfico 7.2.2.2). Por otra parte, la aplicación de 20 % MeOH disminuyó ligeramente el porcentaje de recobro, sin embargo, este siguió siendo aceptable ( $\geq 85$  %), y con 30 % MeOH ya se produjo un descenso del recobro importante, que fue de 17 %. Por el contrario, las interacciones hidrofóbicas de la atrazina permitieron que la misma se recuperara hasta en un 91 %, aun cuando se

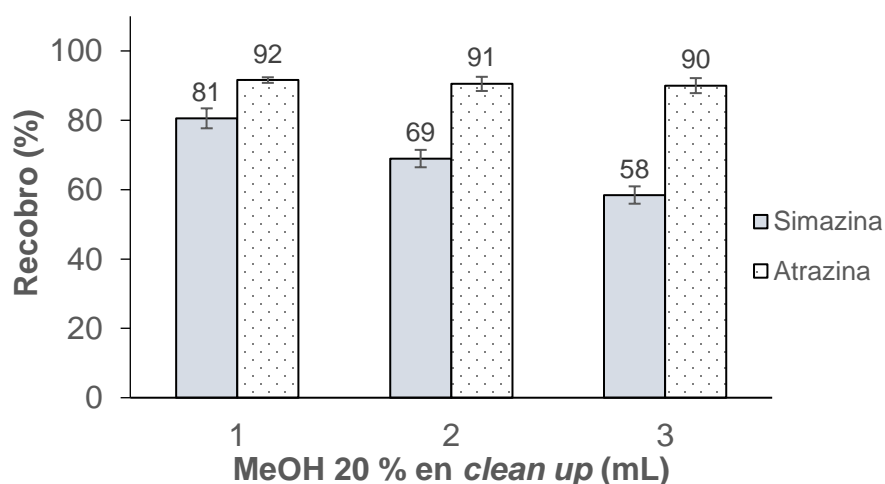


probaron disoluciones de *clean up* con 30 % MeOH. Tomando como base estas observaciones se eligió MeOH al 20 % como el más adecuado para realizar la eliminación de interferentes.



**Gráfico 7.2.3.** Recobro de los analitos en función del % MeOH en la limpieza de interferentes. Volumen aplicado = 1 mL. Elución de los analitos con 1 mL MeOH: H<sub>2</sub>O 75:25. Cartucho empacado con 100 mg de C18.

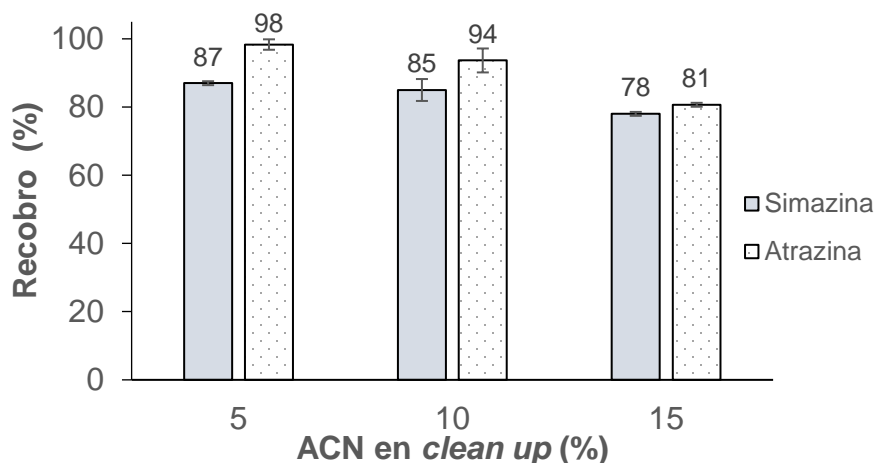
Los resultados para la prueba del volumen de la disolución de 20 % de MeOH para la eliminación de interferentes se aprecian en el gráfico 7.2.3.1, del que se deduce un volumen óptimo de 1 mL, dado que volúmenes mayores a 1 mL causan la pérdida (fuga) de la simazina, porque se afecta significativamente el recobro.



**Gráfico 7.2.3.1.** Recobro de los analitos en función del volumen de MeOH 20 % en la limpieza de interferentes. Elución de los analitos con 1 mL MeOH: H<sub>2</sub>O 75:25. Cartucho empacado con 100 mg de C18.

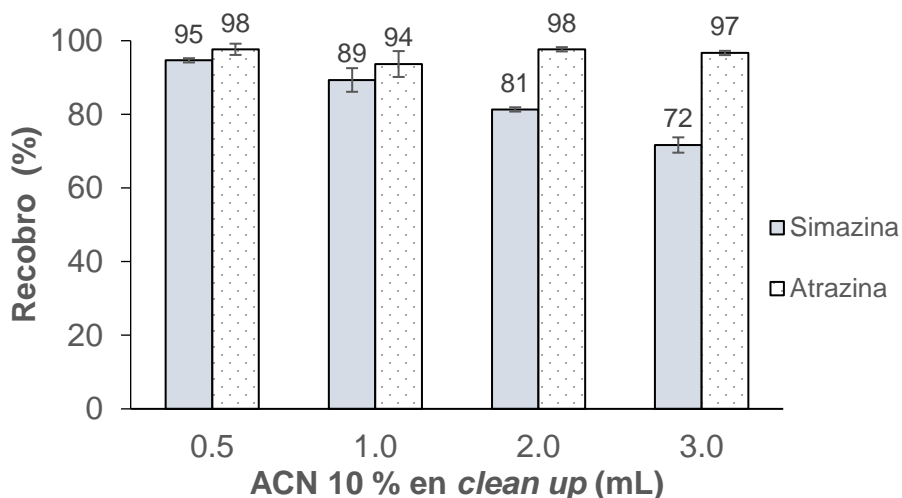
## Eliminación de interferentes con acetonitrilo

De forma similar a lo observado en el *clean up* con MeOH, el porcentaje de acetonitrilo en las disoluciones de limpieza de interferentes constituida por la mezcla ACN: H<sub>2</sub>O afectó mayormente a los recobros observados para la simazina, en donde el recobro cayó rápidamente al pasar de ACN 10 % a ACN 15 % y se mantuvo sin cambios significativos al pasar de ACN 5 % a ACN 10 % (Gráfico 7.2.3.2), razón la cual se seleccionó el porcentaje de 10 % como el más adecuado para realizar la eliminación de interferentes.



**Gráfico 7.2.3.2.** Recobro de los analitos en función del % ACN en *clean up* en la limpieza de interferentes. Volumen aplicado = 1 mL. Elución de los analitos con 0.5 mL ACN: H<sub>2</sub>O 50:50. Cartucho empacado con 100 mg de C18.

En lo que respecta a los volúmenes empleados para las disoluciones de eliminación de interferentes con el ACN, el gráfico 7.2.3.3 muestra la variación del recobro debida al aumento del volumen de la disolución aplicada al cartucho para ambas triazinas. En el caso de la atrazina, como en los casos anteriores, el recobro no se ve afectado dentro del intervalo de volúmenes probados, mientras que la simazina nuevamente disminuye su recobro al aumentar el volumen más allá de 1 mL, razón por la cual el valor de 1 mL fue el volumen óptimo para realizar el estudio de interferentes.



**Gráfico 7.2.3.3.** Recobro de los analitos en función del porcentaje de ACN en la limpieza de interferentes. Elución de los analitos con 0.5 mL ACN: H<sub>2</sub>O 50:50. Cartucho empacado con 100 mg de C18.

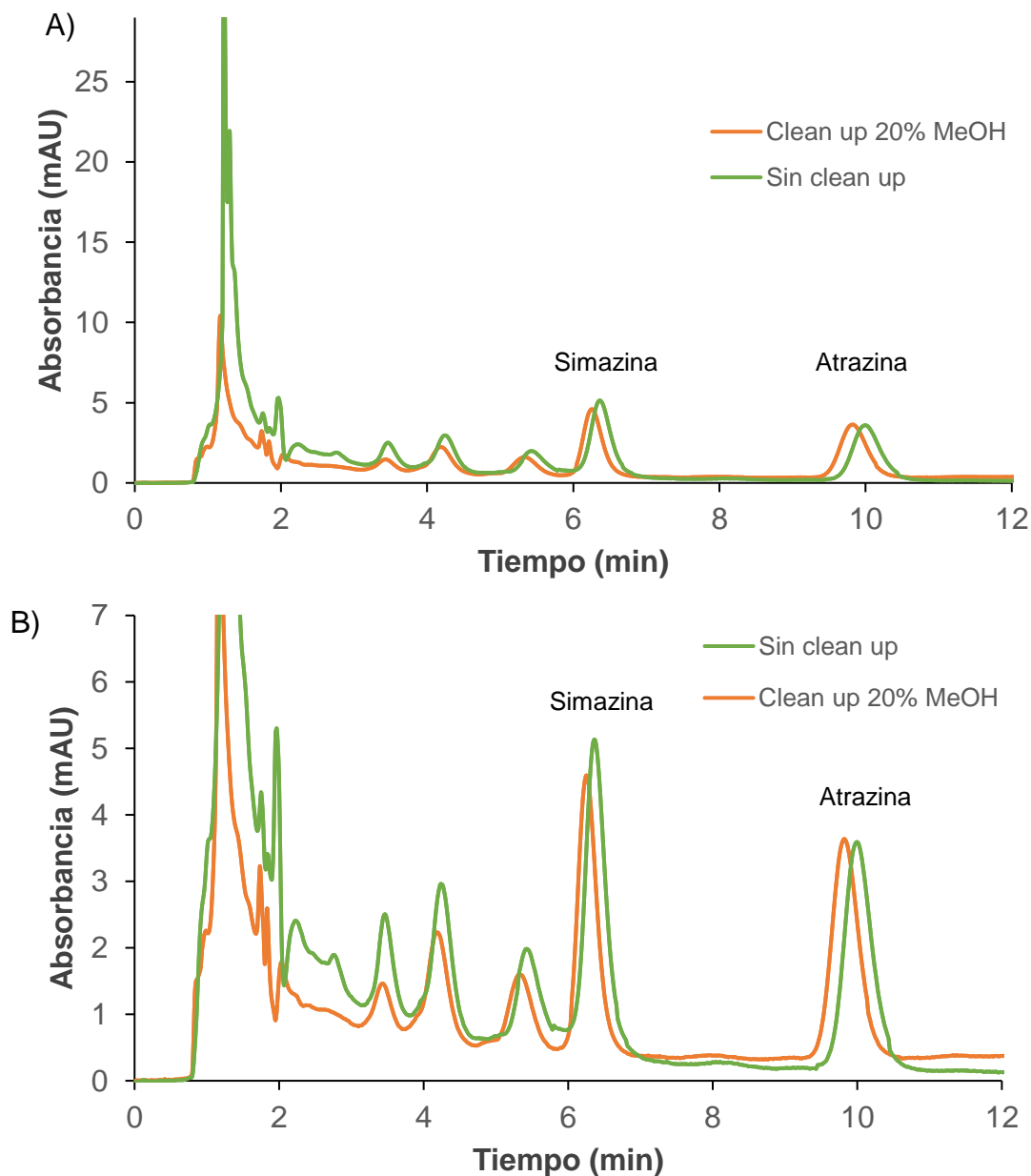
Hasta este punto se habían desarrollado dos procedimientos de extracción en fase sólida; en el primero de ellos se trabajó con metanol a diferentes porcentajes para *clean up* y la elución de los analitos, y en el segundo de ellos se trabajó con acetonitrilo a diferentes porcentajes. Ambos procedimientos permitieron obtener un buen recobro para los analitos ( $\geq 85\%$ ), sin embargo, se optó por el procedimiento con ACN debido a que permitía obtener extractos más limpios y libres de interferentes al trabajar con las muestras (véase sección evaluación de interferentes).

#### 7.2.4. Evaluación de interferentes

El estudio de interferentes se realizó trabajando con muestras de tortilla amarilla fortificada y sin fortificar a las que se les aplicó la metodología de EAU-EFS con la finalidad de evaluar el perfil cromatográfico en cada uno de los casos.

## Eliminación de interferentes con metanol

La metodología de EAU-EFS en la que se empleó en la EFS 1.0 mL de MeOH al 20 % para el *clean up* y 1.0 mL de MeOH al 75 % para la elución de los analitos de interés, presentó el perfil cromatográfico que se muestra en la figura 7.2.4.

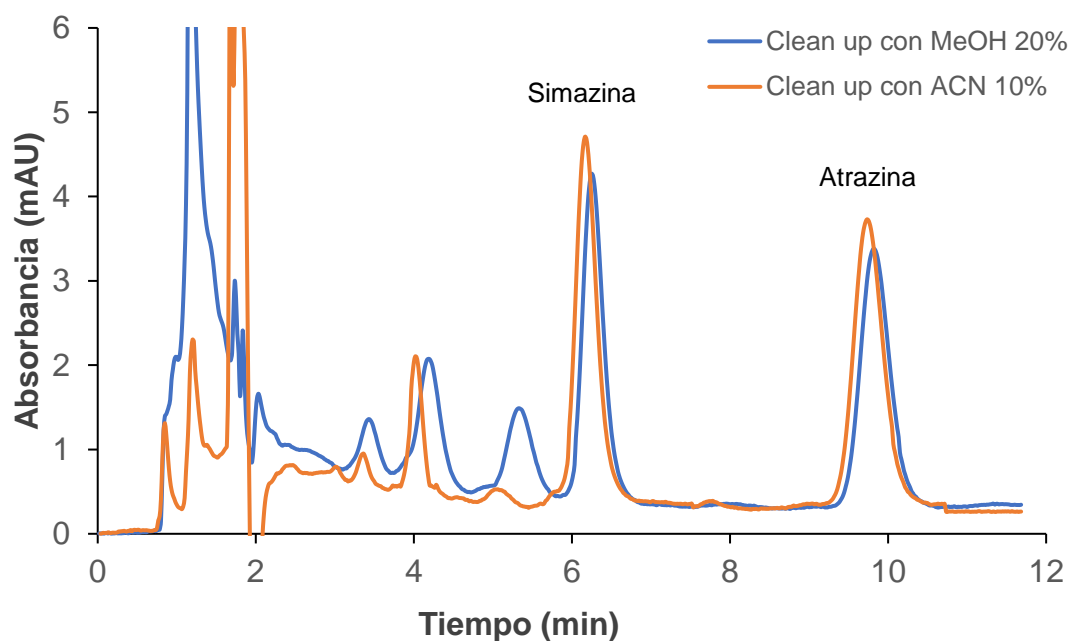


**Figura 7.2.4.** Perfil cromatográfico obtenido de extractos EAU-EFS. *Clean up* y elución con MeOH. A) Eje de ordenado muestra escala a 29 unidades, B) Eje ordenado muestra escala a 7 unidades.

En la figura 7.2.4. B se aprecia la ausencia de interferentes cercanos al tiempo de retención de la atrazina (9.7 min), así como el efecto que tuvo la disolución de *clean up* sobre la disminución de los picos cercanos al tiempo de elución de la simazina (6.3 min). Además, se redujo la intensidad de la señal de los solutos que eluían cerca del tiempo muerto (figura 7.2.4. A). En resumen, la metodología de EFS en la que se empleó MeOH en la secuencia de elución con eliminación de interferentes, eliminó en buena medida los solutos interferentes polares y en menor medida aquellos con un tiempo de retención cercano al de la simazina.

### Eliminación de interferentes con acetonitrilo

En este caso el efecto que tuvo el *clean up* con ACN fue mayor, siendo que el ACN al 10 % retiró una mayor cantidad de interferencias cercanas al tiempo de retención de la simazina que las retiradas por el MeOH al 20 %. La figura 7.2.4.1, permite comparar ambas propuestas *clean up* y apreciar con mayor detalle la eficiencia de cada uno.



**Figura 7.2.4.1.** Perfil cromatográfico comparativo de los diferentes extractos UAE-EFS usando dos disolventes orgánicos en la limpieza de interferentes por EFS.

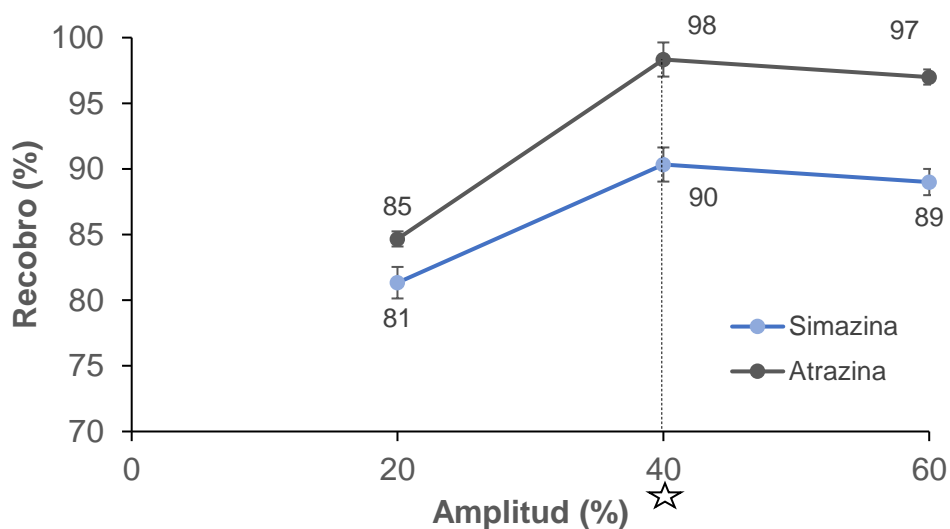
Comparativamente la secuencia de elución con ACN resultó tener una mayor eficiencia en la eliminación de interferentes que la de MeOH. Por consiguiente, en la secuencia de elución por EFS se emplearon 1.0 mL de ACN al 10 % seguido de 500  $\mu$ L de ACN al 50 %.

### 7.3. Extracción asistida por ultrasonido (EAU)

En la optimización de la metodología basada en la técnica de EAU se encontró que el aumento en la amplitud tuvo una influencia positiva sobre el recobro. Sin embargo, el aumento del tiempo de extracción no mostró un efecto sobre el recobro obtenido.

#### 7.3.1. Optimización de la amplitud en EAU

Los resultados de la amplitud del ultrasonido mostraron un efecto sobre el aumento en el recobro como el que se muestra en el gráfico 7.3.1.

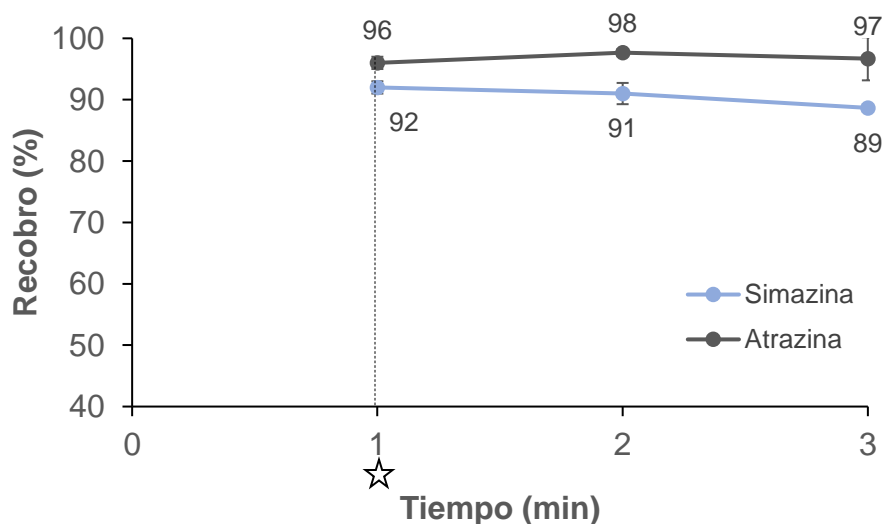


**Gráfico 7.3.1.** Recobro de los analitos en función de la amplitud de ultrasonido.  
☆ Condición seleccionada

En el gráfico anterior se observa un incremento en el recobro al pasar de 20 a 40 % de amplitud, mientras que el aumento de 40 a 60 % no tuvo un efecto apreciable en el recobro de los dos herbicidas. Esta tendencia sugiere que amplitudes superiores al 40 % no generan un incremento significativo en el recobro e inclusive pudieran llegar a causar pérdidas de los analitos por calentamiento y degradación. Por esta razón, se seleccionó la amplitud de 40 % como la más adecuada para realizar este paso de extracción.

### 7.3.2. Optimización del tiempo en EAU

Los resultados obtenidos para los tiempos de extracción ensayados se muestran en el gráfico 7.3.2.



**Gráfico 7.3.2.** Recobro de analitos en función del tiempo de extracción EAU. Amplitud 40 %. ☆ Condición seleccionada.

En este caso el aumento en el tiempo de extracción por arriba de 1 min no produjo un incremento en el recobro observado; al aumentar el tiempo de extracción. Por el contrario, se observa una ligera disminución para el recobro de la simazina y el recobro de la atrazina se mantiene constante. Por esta razón, se seleccionó el

tiempo de 1 min como el más adecuado para realizar este paso de extracción asistida por ultrasonido.

## **7.4. Extracción en fase sólida dispersiva (EFS-D)**

La EFS-D es una técnica miniaturizada que se utilizó con el fin de hacer más selectiva la extracción de los analitos de interés, así como incrementar el factor de concentración. A continuación, se describen los resultados de la optimización de los diferentes parámetros en el desarrollo del método.

### **7.4.1. Optimización de la retención**

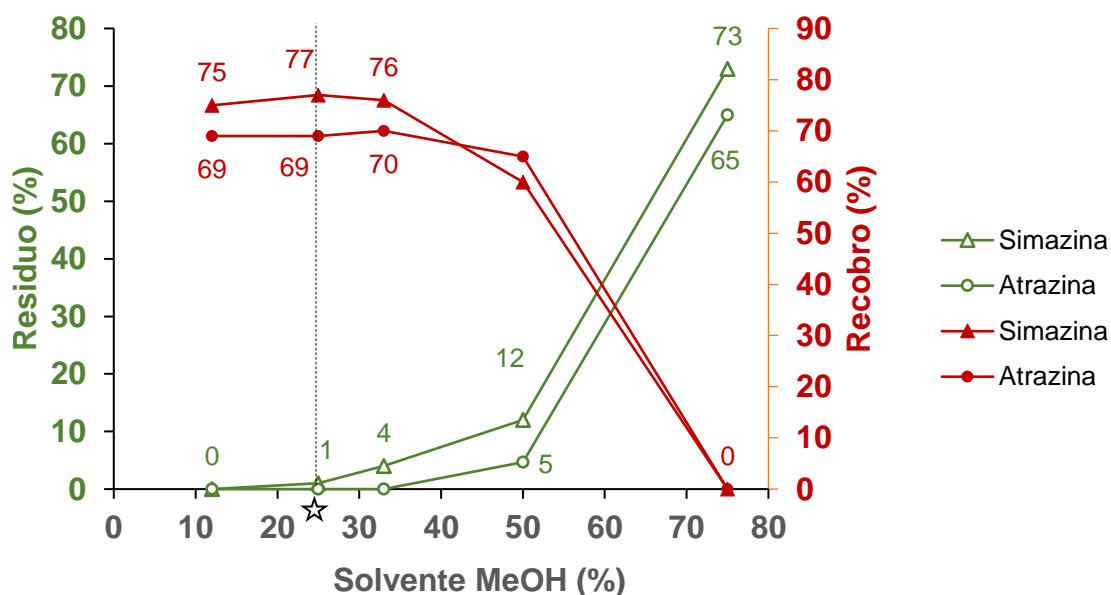
En forma general, los resultados de esta sección muestran que, al disminuir el porcentaje de disolvente orgánico mediante la adición de agua al extracto proveniente de la EFS, la retención de los analitos se vio favorecida, siendo los recobros mayores cuando se usó el adsorbente PS-DVB en comparación a los obtenidos con el adsorbente C18. Los resultados de cada una de las pruebas se muestran a continuación.

#### **Retención en C18 y MeOH en el extracto EFS**

El gráfico 7.4.1 muestra los resultados obtenidos al trabajar C18 y MeOH. Se observa en el eje derecho el “Recobro” (el porcentaje de analito recuperado del total adicionado) y en el eje izquierdo el “Residuo”, es decir el porcentaje de analito que no es adsorbido y se encuentra en el sobrenadante. El eje horizontal señala los porcentajes de metanol que se ajustaron al extracto EFS constituido por MeOH 75 % en agua.



De este gráfico se dedujo que bajo un intervalo de MeOH del 12-33 % se podía trabajar sin apreciar cambios significativos en el recobro. Por lo tanto, el valor seleccionado del porcentaje de metanol para realizar la carga del adsorbente en EFS-D fue de 25 %, por lo que el ajuste del metanol se realizó adicionando 500  $\mu$ L de agua a 1 mL de MeOH al 75 % en agua (extracto proveniente de la EFS). Bajo estas condiciones el recobro para la simazina fue de un 69 % y para la atrazina de un 77 % con 1 % residual. El porcentaje restante para completar el 100 % se encontró aún retenido en el adsorbente C18 y también existieron pérdidas por una mínima suspensión y, por lo tanto, pérdida del adsorbente al finalizar la centrifugación (previa desorción).

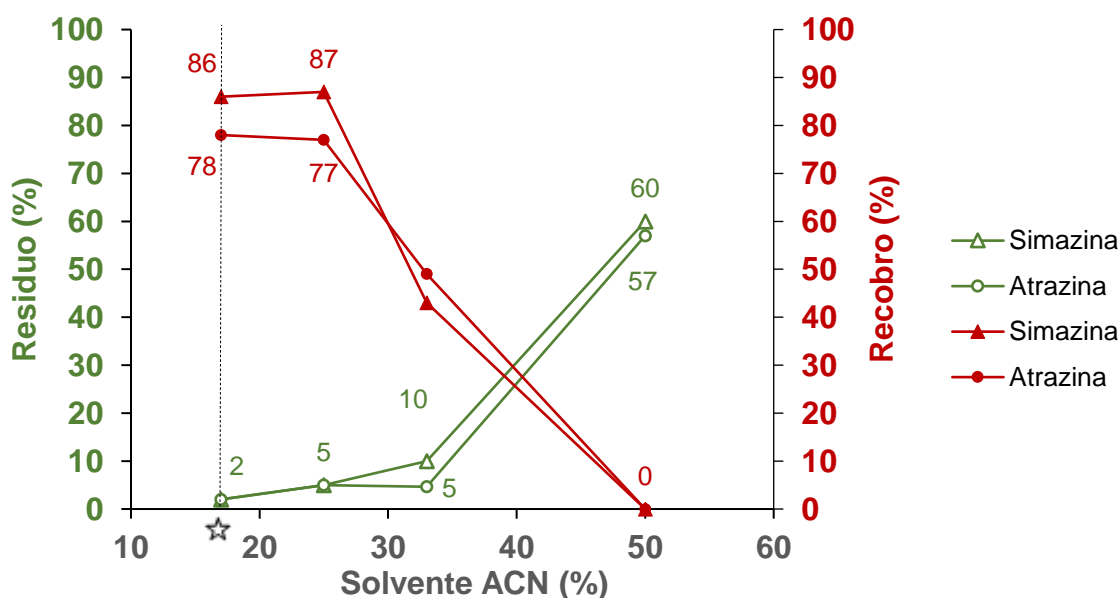


**Gráfico 7.4.1.** Recobro y residuo de los analitos en función del % de MeOH en la muestra en EFS-D. ★ Condición seleccionada.

### Retención en PS-DVB y ACN en el extracto de EFS

Por su parte, las curvas obtenidas de las condiciones probadas al trabajar con PS-DVB y ACN se muestran en el gráfico 7.4.1.1. Equiparable a lo discutido anteriormente; las condiciones probadas condujeron a un intervalo de ACN 12-25 % bajo el cual se podía trabajar obteniendo un buen recobro sin cambios

apreciables. Además, al comparar las curvas de los gráficos 7.4.1 y 7.4.1.1, el mayor poder de desorción del ACN se ve reflejado en el desplazamiento de las curvas de recobro hacia porcentajes más bajos de disolvente orgánico comparado con las gráficas con el metanol (Gráfico 7.4.1.1). Para este caso, el valor seleccionado para realizar el ajuste fue de 17 % de ACN, con lo que el ajuste se hizo adicionando 1000  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  a 500  $\mu\text{L}$  de ACN al 50 % (extracto proveniente de la EFS). Bajo estas condiciones nuevamente se observó un porcentaje restante para completar el 100 % de recobro, debido principalmente a los analitos remanentes en la fase bondesil ENV, aún después del proceso de desorción.



**Gráfico 7.4.1.1.** Recobro y residuo de los analitos en función del % ACN en EFS-D  
 ☆ Condición seleccionada.

Hasta este punto se contaba con dos procedimientos con distintos disolventes y adsorbentes, sin embargo, sólo el PS-DVB resultó ofrecer mejores resultados en relación con el recobro y la capacidad de retención, tal como se muestra en la siguiente sección.

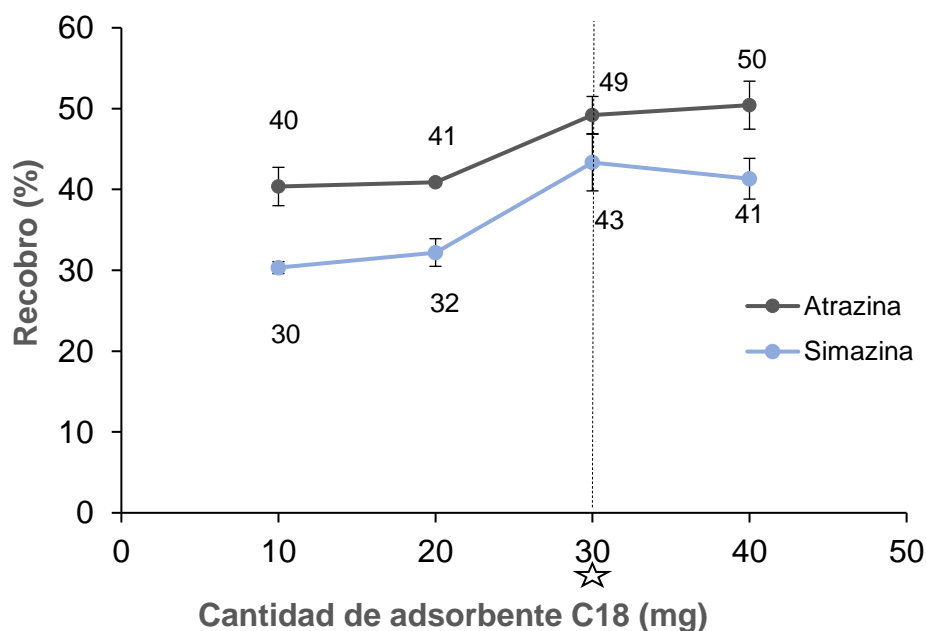
## 7.4.2. Optimización de la cantidad y tipo de adsorbente

Con respecto a la cantidad de adsorbente, los resultados obtenidos para C18 y PS-DVB se muestran a continuación.

### Adsorbente C18

El efecto de la cantidad de adsorbente C18 sobre el recobro observado se muestra en el gráfico 7.4.2.1. Todos los extractos de EFS-D obtenidos en este ensayo fueron desorbidos con 200  $\mu$ L de MeOH al 100 %.

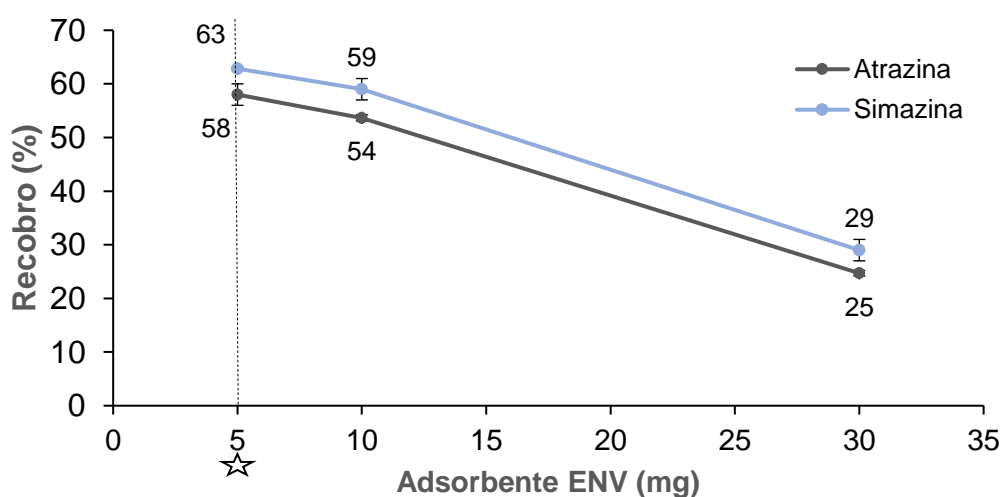
Como puede apreciarse en el gráfico 7.4.2.1 existe una tendencia entre 10 y 30 mg en la que el incremento en la cantidad de adsorbente proporciona un incremento del recobro para ambas triazinas, después de los 30 mg el recobro no presentó un aumento, razón por la cual 30 mg de C18 fue la cantidad óptima seleccionada para los ensayos comparativos frente a PS-DVB.



**Gráfico 7.4.2.1.** Recobro de los analitos en función de la cantidad de adsorbente C18 en EFS-D. ☆ Condición seleccionada.

## Adsorbente PS-DVB

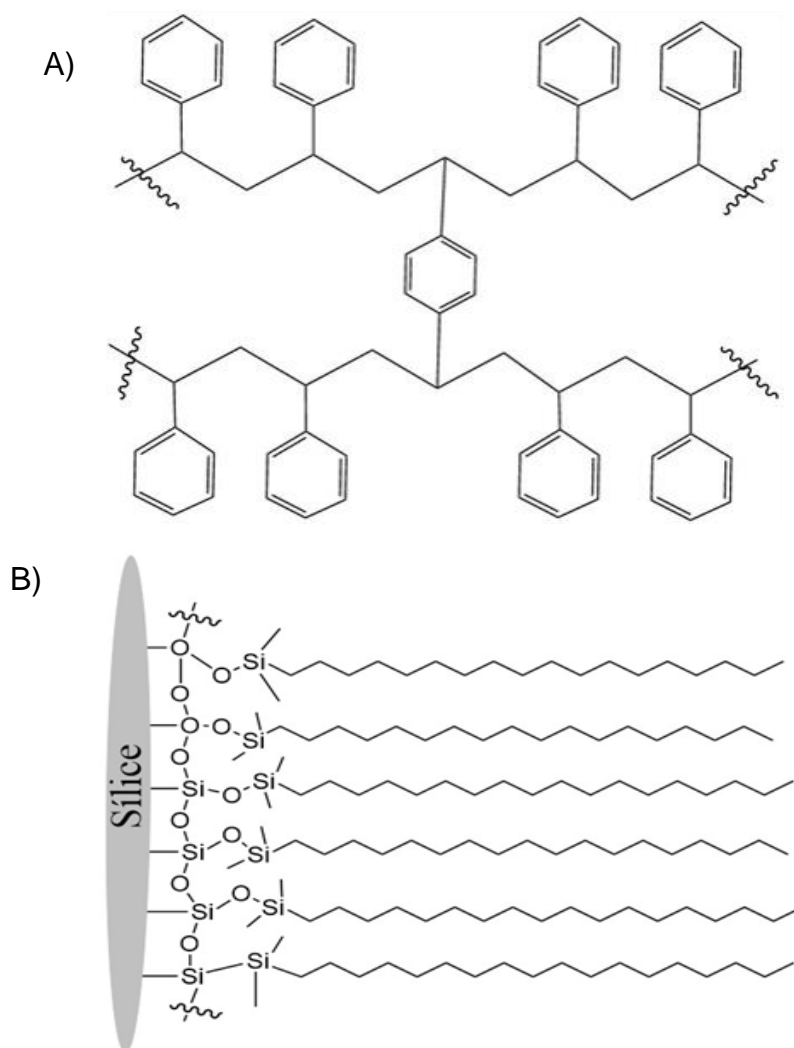
En su lugar, con el PS-DVB se logró obtener mayores recobros, aún con 5 mg, la cantidad más baja de adsorbente. En este caso en particular el recobro disminuyó al aumentar la cantidad de adsorbente (manteniendo fijo el volumen de desorción de los analitos) (Gráfico 7.4.2.2), razón por la cual 5 mg fue la cantidad seleccionada para los ensayos comparativos frente a C18. Todos los extractos de EFS-D obtenidos en este ensayo fueron desorbidos con 100  $\mu$ L de ACN al 100 %.



**Gráfico 7.4.2.2** Recobro de los analitos en función de la cantidad de adsorbente PS-DVB en EFS-D. ☆ Condición seleccionada.

La disminución del recobro al aumentar la cantidad de adsorbente puede atribuirse al incremento de las interacciones  $\pi$ - $\pi$  entre el ACN y el PS-DVB, que terminan por superar a las interacciones disolvente-analito. Este efecto ha sido estudiado y descrito con anterioridad en fases fenilo (Min Yang et al., 2005).

Los resultados obtenidos del gráfico 7.4.2.1 y el gráfico 7.4.2.2 nos permiten proponer que la capacidad de adsorción de PS-DVB es superior a la de C18 frente a los analitos y condiciones estudiadas. Como prueba, sólo 5 mg de PS-DVB lograron obtener un recobro mayor que el obtenido con 40 mg del C18. La estructura química de ambos adsorbentes se muestra en la figura 7.4.2.



**Figura 7.4.2.** Estructura química de los adsorbentes. (Elaboración propia).  
 A) Bondesil ENV. Copolímero de estireno-divinil benceno o PS-DVB (125  $\mu\text{m}$ , 450 $\text{\AA}$ ) B) C18 Supelclean. Sílice funcionalizada con octadecilo (45  $\mu\text{m}$ , 60  $\text{\AA}$ ).

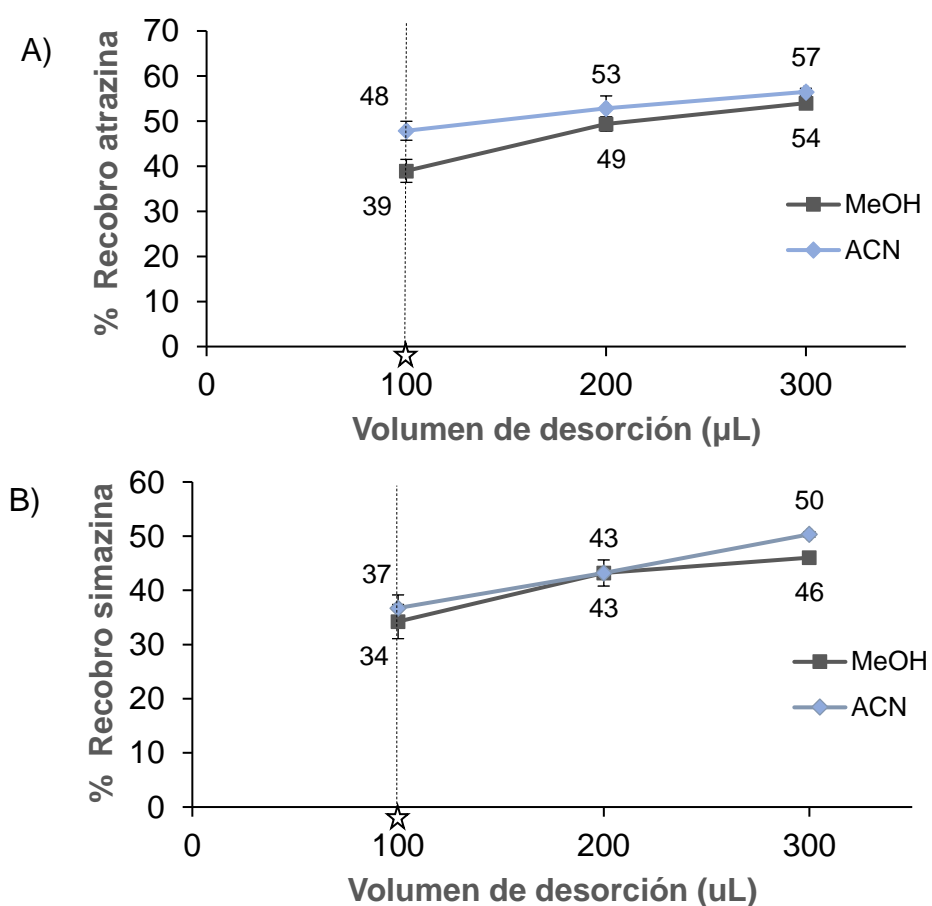
De la estructura del PS-DVB se puede plantear que los analitos se retienen a través de interacciones hidrofóbicas y del tipo  $\pi$ - $\pi$ , mientras que el C18 y los analitos (Figura 7.2.1) sólo pueden establecer interacciones del tipo hidrofóbicas. Esto también puede ayudar a explicar la mayor capacidad de retención del adsorbente polimérico por los analitos. La importancia de este tipo de interacciones en los procesos de adsorción de la atrazina ha sido ampliamente estudiada en otros campos como el de la biorremediación (Dhiman & Pant, 2022).

### 7.4.3. Optimización del volumen y naturaleza del disolvente de desorción

Por lo que refiere a los resultados del volumen y naturaleza del disolvente de desorción, los resultados se muestran a continuación.

#### Adsorbente C18

Al trabajar con C18 y los dos disolventes de desorción (metanol y acetonitrilo) se observó un aumento en el recobro al incrementar los volúmenes de estos disolventes (Gráfico 7.4.3). Este aumento fue apreciable para ambas especies, tanto al trabajar con acetonitrilo como con metanol.



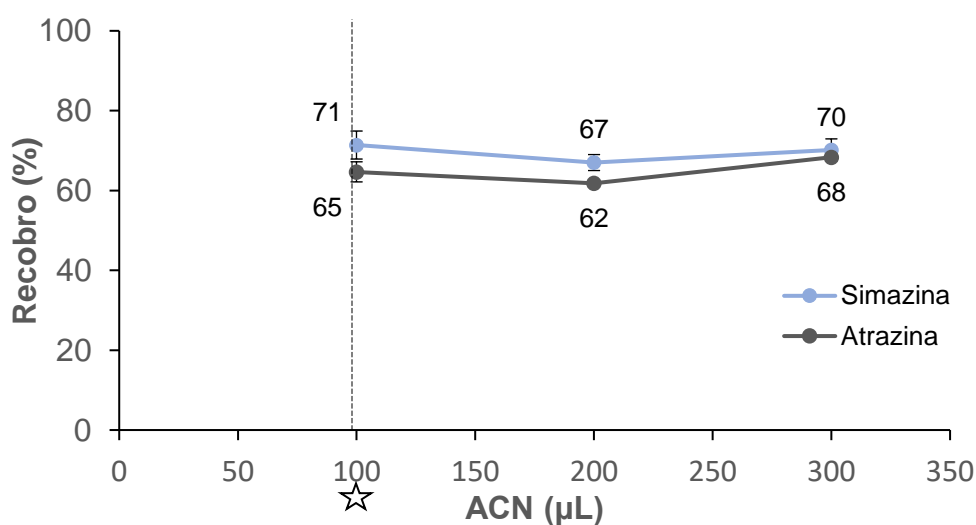
**Gráfico 7.4.3.** Recobro de triazinas en función del volumen de desorción (ACN y MeOH a temperatura ambiente) en EFS-D. A) Recobro de atrazina, B) Recobro de simazina. ☆ Condición seleccionada.

Si bien el recobro de las especies incrementaba al aumentar el volumen, y aunque la interacción entre analito-disolvente se incrementaba en la misma medida, el aumento del volumen disminuía proporcionalmente el factor de concentración final de los analitos.

Los resultados de este ensayo sentaron las bases para seleccionar al acetonitrilo como el disolvente con mayor poder de desorción, por consiguiente, el acetonitrilo fue el disolvente empleado en la segunda parte de este experimento en donde se probó el adsorbente PS-DVB.

### Adsorbente PS-DVB

En cuanto al PS-DVB y la desorción con acetonitrilo, se observó que el volumen no afectó en gran medida el recobro obtenido (gráfico 7.4.3.1). Además, en este caso los recobros obtenidos fueron mayores a los observados en el caso anterior, donde se utilizó C18. De los volúmenes probados se seleccionó el volumen de 100  $\mu\text{L}$  de ACN como el más adecuado para continuar con la optimización, teniendo en cuenta que el factor de concentración logrado al desorber a los analitos con este volumen es de 5, ya que de la muestra de 500  $\mu\text{l}$  se concentró en 100  $\mu\text{L}$ .

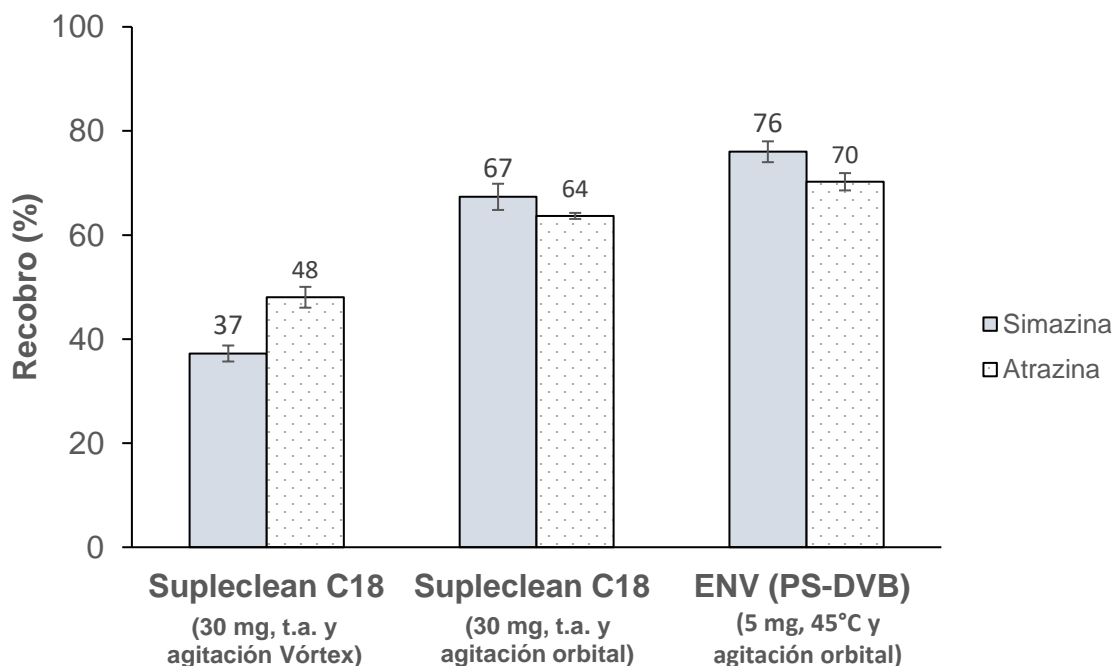


**Gráfico 7.4.3.1.** Recobro de las triazinas en función del volumen de ACN.  
☆ Condición seleccionada.

En resumen, los resultados obtenidos señalaron al acetonitrilo (100  $\mu$ L) y al PS-DVB como la mejor combinación para realizar la extracción en fase sólida dispersiva, razón por la cual se seleccionó a este par como el más adecuado para continuar con la optimización de la metodología

#### 7.4.4. Evaluación del efecto de la temperatura en la desorción

El estudio de la desorción de los analitos continuó con la evaluación del efecto de la temperatura, cuyos resultados se muestran a continuación. En el gráfico 7.4.4. se observa el aumento en el recobro para ambas especies debido al aumento en la temperatura.



Agitación vórtex: 3,000 rpm por 3 min y volumen de desorción de 100  $\mu$ L de ACN 100 %.  
Agitación orbital: 1,600 rpm por 10 min y volumen de desorción de 100  $\mu$ L de ACN 100 %.

**Gráfico 7.4.4.** Recobro de los analitos al realizar la desorción a diferente temperatura.

Con el incremento de la temperatura, el recobro de ambas especies aumentó debido a que la energía calorífica introducida favorece las interacciones

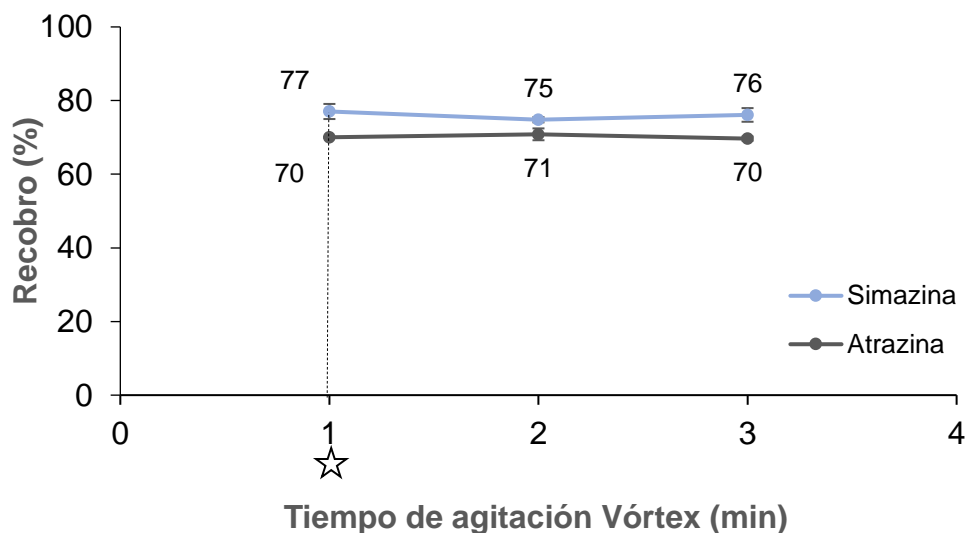


disolvente-analito, las cuales terminan por superar a las interacciones adsorbente-analito, favoreciendo la migración de los analitos hacia el disolvente. En el gráfico 7.4.4, también se aprecia la diferencia entre el método desarrollado en el equipo vórtex a temperatura ambiente y fase C18 frente al método desarrollado en el equipo DLAB HCM100-Pro con fase PS-DVB. En resumen, los recobros de la atrazina y simazina se incrementaron hasta en un 39 % y 22 %, respectivamente, al cambiar de un método a otro.

Considerando los resultados de este experimento se eligió al PS-DVB y la temperatura de desorción de 45 °C como las condiciones óptimas para realizar la EFS-D.

#### 7.4.5. Optimización del tiempo de agitación vórtex

En cuanto al tiempo de agitación vórtex, el gráfico 7.4.5 permitió deducir que el tiempo para llevar a cabo la adsorción de los analitos no provoca cambios significativos en el recobro. Por lo tanto, 1 min de agitación en vórtex fue suficiente para retener a los analitos en el adsorbente y desorberlos en la etapa final.



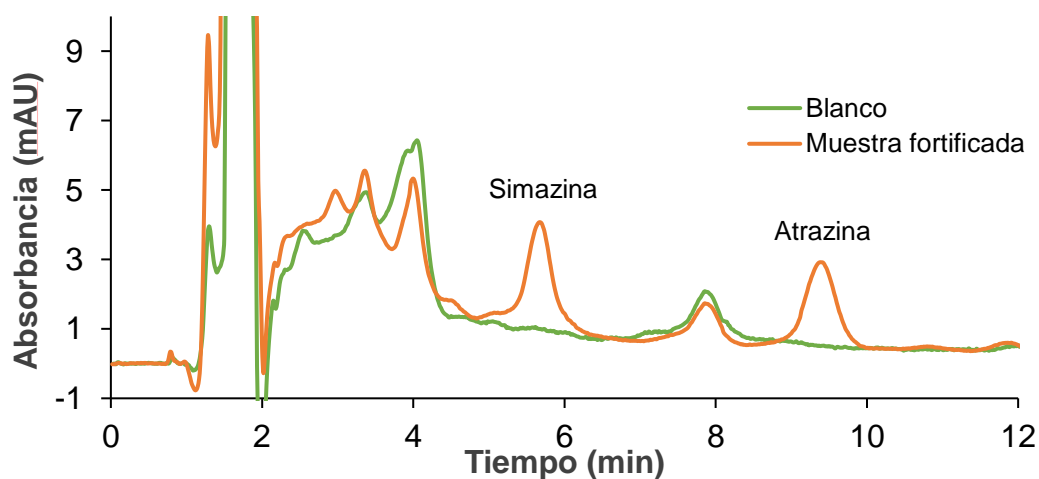
**Gráfico 7.4.5.** Recobro de los analitos en función del tiempo de agitación vórtex.  
☆ Condición seleccionada.

Al incrementar el tiempo de agitación no se observó un aumento en la cantidad de analitos recuperada, por consiguiente, pudo inferirse que el proceso de adsorción había alcanzado el estado de equilibrio una vez transcurrido 1 min de agitación.

En consecuencia, 1 min fue el tiempo óptimo de agitación vórtex empleado para el desarrollo de la metodología EFS-D.

#### 7.4.6. Evaluación de interferentes

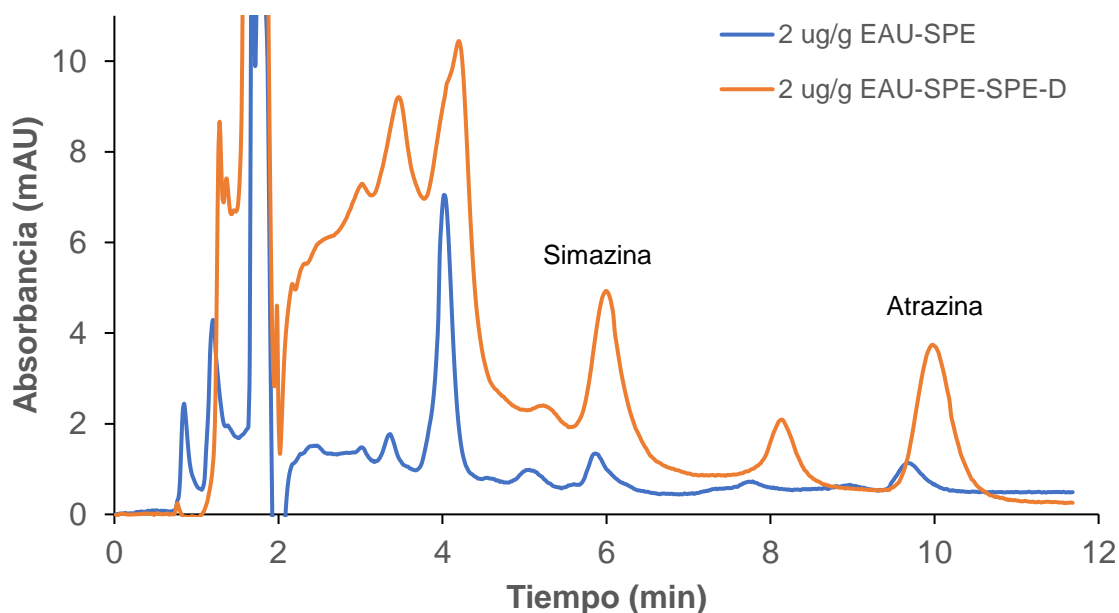
El perfil cromatográfico de los extractos EAU-EFS-EFS-D (Figura 7.4.6) mostró ausencia de picos interferentes en un tiempo cercano al tiempo de retención de los analitos (6.3 min para la simazina y 9.4 min para la atrazina).



**Figura 7.4.6.** Cromatogramas de una muestra fortificada (2 µg/g) y sin fortificar a las que se les aplicó la metodología desarrollada EAU-EFS-EFS-D.

Al comparar los tamaños de los picos, el factor de concentración de 100 obtenido después de la EFS-D puede apreciarse en la Figura 7.4.6.1, donde se muestran dos cromatogramas de muestras fortificadas con una misma cantidad (0.4 µg). En anaranjado se presenta el cromatograma de la muestra a la que se aplicó EAU-EFS, la cual tiene un factor de concentración de 20 al pasar de un volumen de 10

mL a 0.5 mL. En azul se presenta la muestra a la que se aplicó la metodología completa (EAU-EFS-EFS-D) con un factor de concentración de 100, al pasar de un volumen inicial de 10 mL a un volumen final de 100  $\mu$ L.

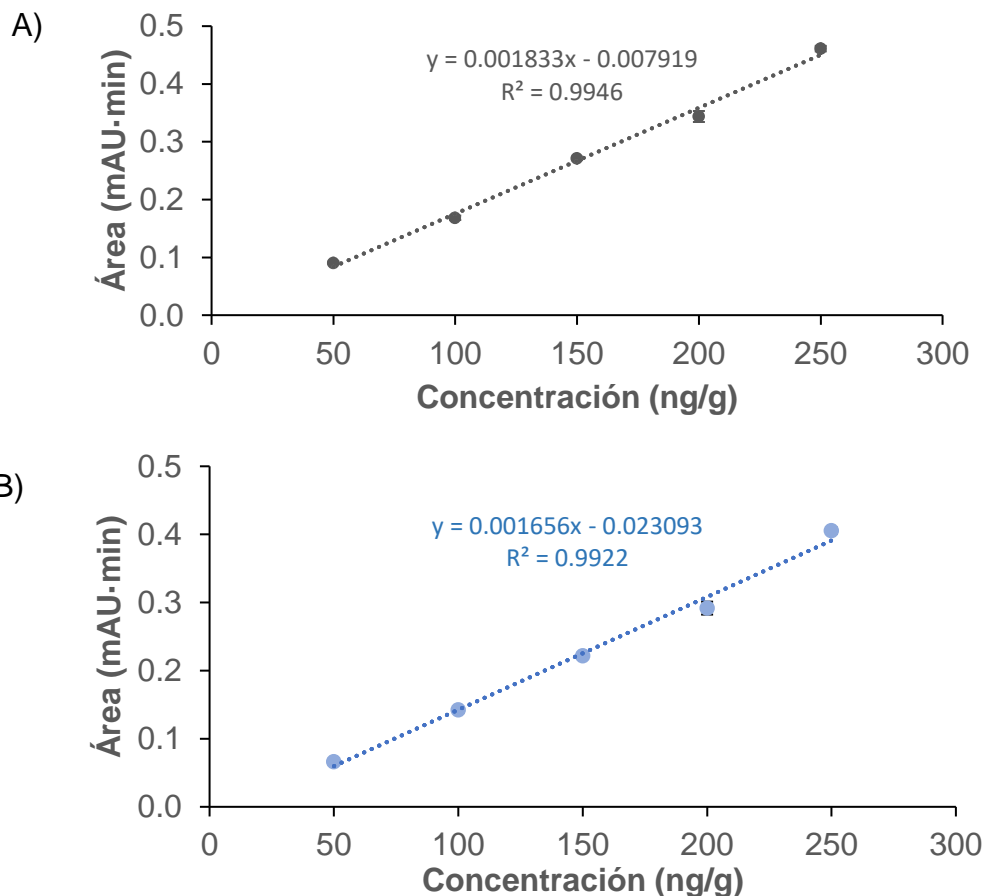


**Figura 7.4.6.1.** Cromatogramas EAU-EFS vs EAU-EFS-EFS-D.

## 7.5. Validación de la metodología desarrollada EAU-EFS-EFS-D

Los parámetros de desempeño de la validación permitieron evaluar con éxito la linealidad de la metodología desarrollada, su exactitud, precisión, robustez, así como el límite de detección y cuantificación de esta. Los parámetros encontrados fueron aceptables de acuerdo con el documento de interpretación de resultados de métodos analíticos para la identificación y cuantificación de residuos de plaguicidas usado como referencia (SENASICA, 2022).

La linealidad del método quedó probada en un intervalo de 50-250 ng/g con un coeficiente de determinación mayor a 0.99 (Gráfico 7.5), a su vez el valor de  $r^2$  cumplió con los criterios de aceptación de referencia.



**Gráfico 7.5.** Curvas de calibración. A) Curva de calibración de atrazina, B) Curva de calibración de simazina.

Los valores del LD y LC de cada una de las especies se muestran en la tabla 7.5.

**Tabla 7.5.** Límites de detección y cuantificación del método.

Método	Atrazina		Simazina	
	LD (ng/g)	LC (ng/g)	LD (ng/g)	LC (ng/g)
Método 1	19	56	21	63
Método 2	18	55	22	67
Método 3	20	50	20	60

Método 1: Basado en la curva de calibración y la desviación estándar del blanco

Método 2: Basado en la curva de calibración y la desviación de la intersección “*y*” de la recta”

Método 3: Basado en el análisis de la relación señal / ruido

La diferencia en los valores observada para cada uno de los métodos ha sido ya discutida en diversos artículos (Şengül, 2016), en los que se resuelve al método basado en el análisis señal/ruido (Método 3) como el método más adecuado para

la determinación de los límites de detección y cuantificación. En los resultados obtenidos en este estudio, los valores para los distintos métodos fueron cercanos entre sí, sin llegar a tener un porcentaje de desviación estándar mayor al 7 %.

Adicionalmente, es importante señalar que de realizarse de forma independiente el método señal/ruido éste emplea una mayor cantidad de trabajo y tiempo de análisis, al requerir de la evaluación empírica de una secuencia de muestras fortificadas a un nivel decreciente de concentración que conduzcan al límite de detección y cuantificación.

Los resultados de la precisión y exactitud se muestran en la tabla 7.5.1.

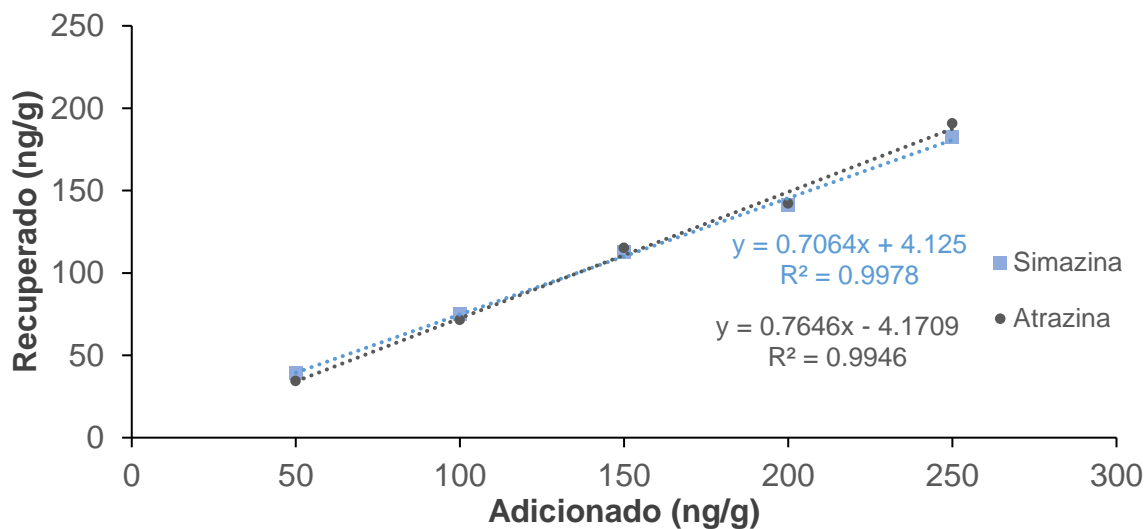
**Tabla 7.5.1.** Recobro de los analitos a diferente nivel de fortificación.

Nivel de fortificación (ng/g)	Simazina			Atrazina		
	% Recobro	% DSR Intradía	% DSR Interdía	% Recobro	% DSR Intradía	% DSR Interdía
50	78	3.7	7.5	69	3.0	5.6
100	75	2.7	6.2	71	3.3	6.4
150	75	5.3	5.0	77	4.2	6.3
200	71	3.3	5.7	71	2.8	6.0
250	73	1.2	7.5	76	3.1	5.4

La desviación estándar relativa se mantuvo entre 1.2 % y 5.3 % para los ensayos intradía, mientras que para los ensayos interdía fue de 5.0 % a 7.5 %.

Los recobros obtenidos por el método se encontraron entre 71-78 % para la simazina y entre 69-77 % para la atrazina para el intervalo de concentraciones probado.

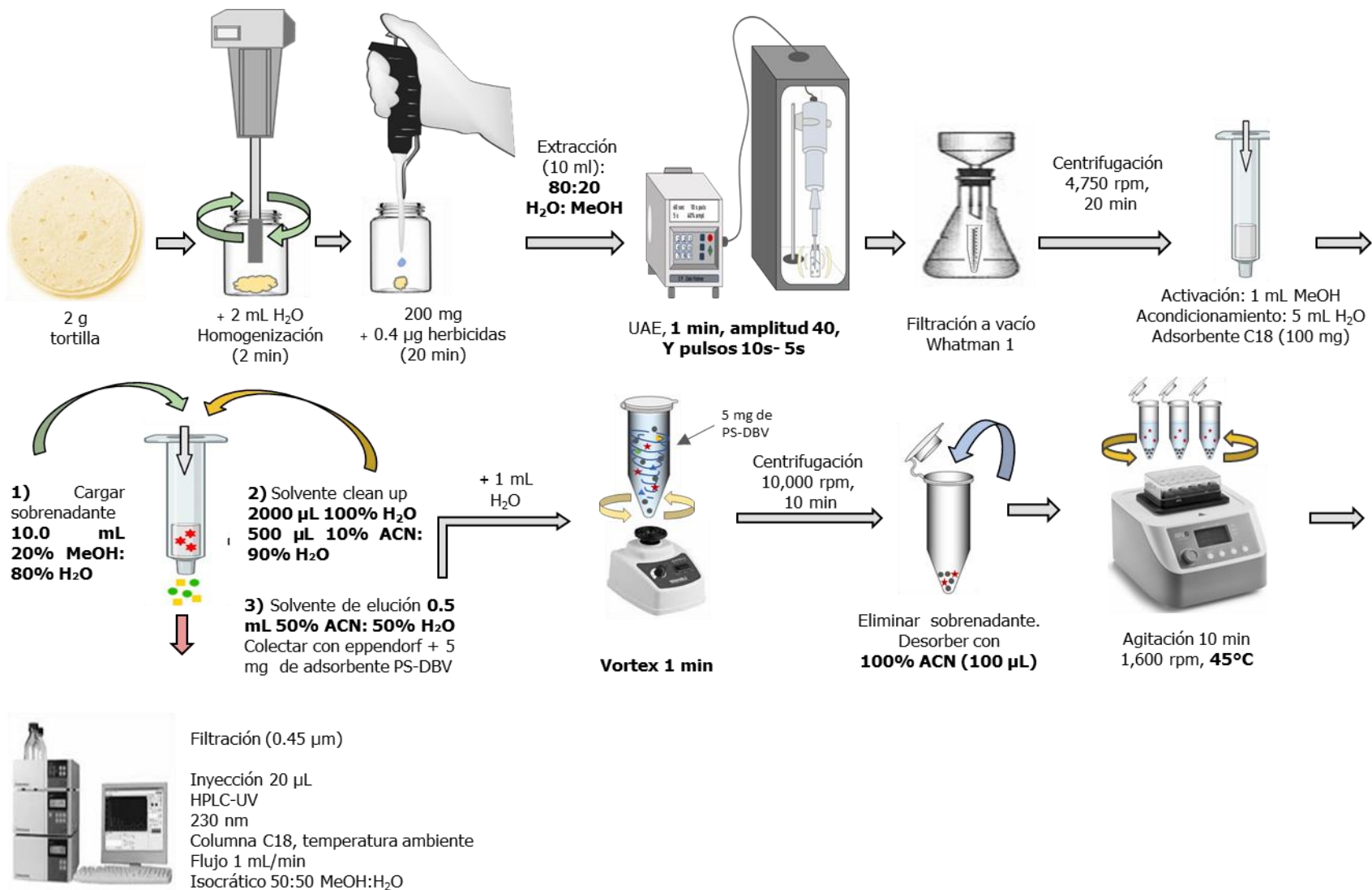
A partir de la tabla 7.5.1 se construyó el gráfico 7.5.1 en el que la pendiente (m) de las curvas representa el recobro global para cada uno de los analitos, así el recobro global para la simazina y atrazina fue de 71 y 76 % con una desviación estándar de 5 y 4 %, respectivamente.



**Gráfico 7.5.1.** Linealidad del método para las triazinas.

Para finalizar, la prueba estadística t Student no mostró diferencia significativa entre los recobros obtenidos en la tortilla azul frente a la amarilla a un nivel de significancia de  $\alpha = 0.05$ . Los recobros obtenidos para la tortilla azul se encontraron entre 70-75 % para la simazina y 68-74 % para la atrazina con una desviación estándar de entre 1.2 y 3.8 %.

La figura 7.5. muestra un esquema general de la metodología optimizada y validada. El tiempo de preparación de muestra es de 2 horas.



**Figura 7.5.** Esquema general de la metodología optimizada y validada (Elaboración propia).

## 7.6. Aplicación de la metodología al análisis de muestras reales

En el análisis de las muestras reales no se detectó atrazina o simazina en ninguna de las muestras. Los resultados se presentan en la tabla 7.6.

**Tabla 7.6.** Resultados del análisis de muestras reales (concentración de fortificación 100 ng).

Muestra	Color de tortilla	Procedencia		Herbicida	
		Estado	Delegación / Municipio	Atrazina	Simazina
1	Azul	Ciudad de México	Iztapalapa	N.D.	N.D.
2	Amarilla		Coyoacán	N.D.	N.D.
3	Azul		Coyoacán	N.D.	N.D.
4	Rosa		Benito Juárez	N.D.	N.D.
5	Blanca		Cuauhtémoc	N.D.	N.D.
6	Blanca		Tlalpan	N.D.	N.D.
7	Amarilla		Xochimilco	N.D.	N.D.
8	Blanca		Álvaro Obregón	N.D.	N.D.
9	Roja		Benito Juárez	N.D.	N.D.
10	Amarilla		Iztapalapa	N.D.	N.D.
11	Azul		Benito Juárez	N.D.	N.D.
12	Amarilla		Azcapotzalco	N.D.	N.D.
13	Azul	Estado de México	Cuautitlán	N.D.	N.D.
14	Amarilla		Naucalpan de Juárez	N.D.	N.D.
15	Blanca		Texcoco	N.D.	N.D.
16	Blanca		Ecatepec	N.D.	N.D.
17	Blanca		Tultitlán	N.D.	N.D.
18	Azul		Ecatepec	N.D.	N.D.
19	Amarilla	Guanajuato	Guanajuato	N.D.	N.D.
20	Blanca	Hidalgo	Tula de allende	N.D.	N.D.
21	Amarilla	Nuevo León	Monterrey	N.D.	N.D.
22	Blanca	Oaxaca	Oaxaca de Juárez	N.D.	N.D.
23	Amarilla	Puebla	San Pedro Cholula	N.D.	N.D.
24	Blanca	Veracruz	Tantoyuca	N.D.	N.D.
25	Amarilla	Yucatán	Mérida	N.D.	N.D.

N.D. No detectado (< LD)

Otros estudios en los que se ha analizado maíz (materia prima de la tortilla) han obtenido resultados en los que sí se ha detectado la presencia de herbicidas (Zondo & Mahlambi, 2022; Guzmán-Soria et al., 2019).



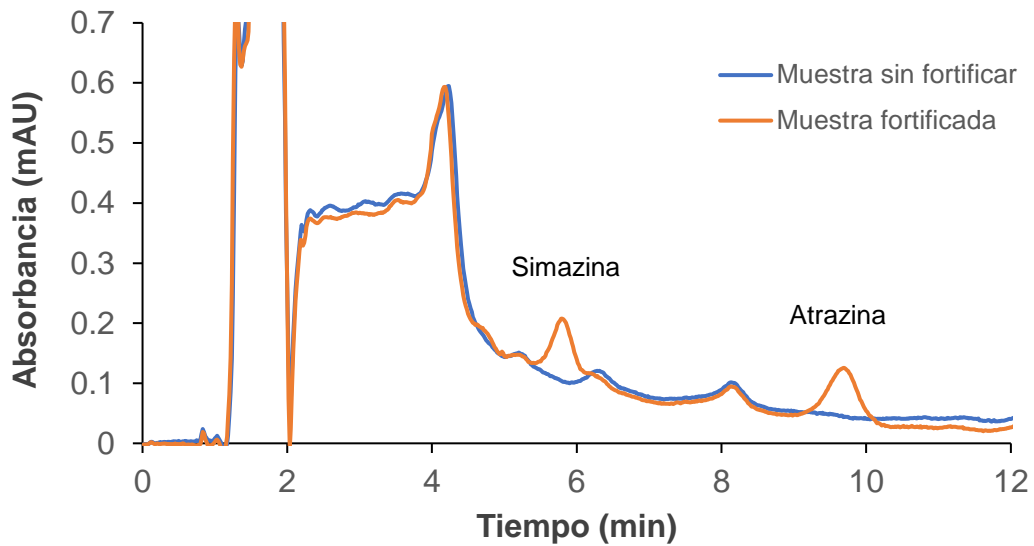
Los recobros obtenidos de la fortificación de cada una de las muestras se encuentran en la tabla 7.6.1.

**Tabla 7.6.1.** Recobros de la fortificación de muestras.

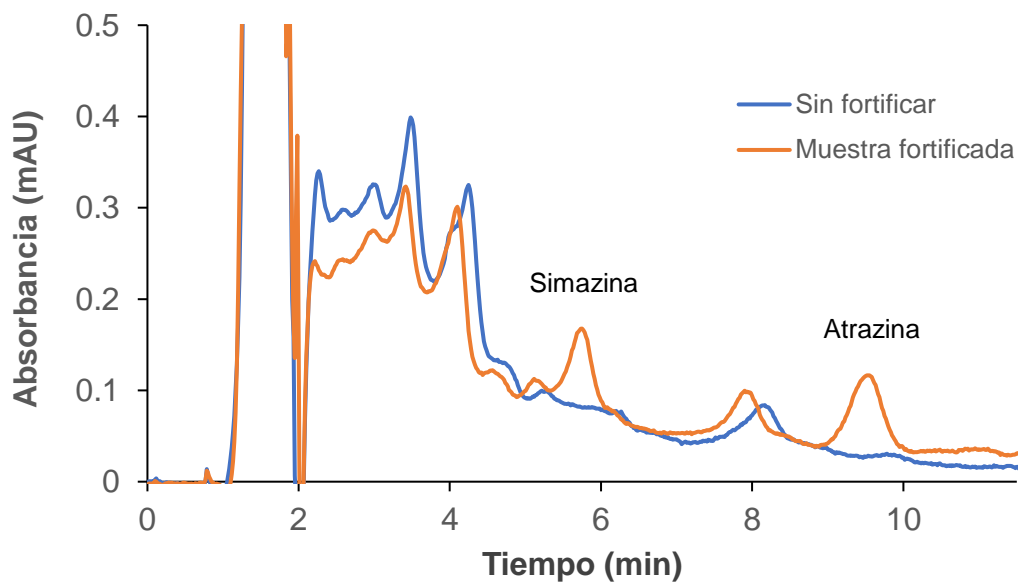
Muestra	Color de tortilla	Simazina		Atrazina	
		Recobro	% RSD	Recobro	% RSD
1	Azul	66	3.9	74	7.7
2	Amarilla	68	4.8	78	4.7
3	Azul	69	2.3	78	4.5
4	Rosa	69	6.9	75	2.4
5	Blanca	71	4.0	77	2.0
6	Blanca	68	3.4	69	5.9
7	Amarilla	75	3.2	76	7.6
8	Blanca	72	3.2	69	6.5
9	Roja	74	4.8	70	2.8
10	Amarilla	73	7.3	68	3.6
11	Azul	68	5.2	68	2.8
12	Amarilla	69	7.1	74	5.8
13	Azul	74	2.2	68	4.8
14	Amarilla	71	6.7	73	6.0
15	Blanca	72	5.5	77	3.2
16	Blanca	73	7.3	70	5.0
17	Blanca	66	5.8	77	4.1
18	Azul	67	5.6	76	7.6
19	Amarilla	70	2.3	75	3.6
20	Blanca	69	5.2	69	3.8
21	Amarilla	73	2.6	68	7.9
22	Blanca	75	7.7	67	6.2
23	Amarilla	68	7.9	74	6.2
24	Blanca	72	2.1	72	3.0
25	Amarilla	68	4.2	77	5.1

El recobro para la simazina se mantuvo entre 66 – 75 %, mientras que para la atrazina se encontró entre 67 -78 %.

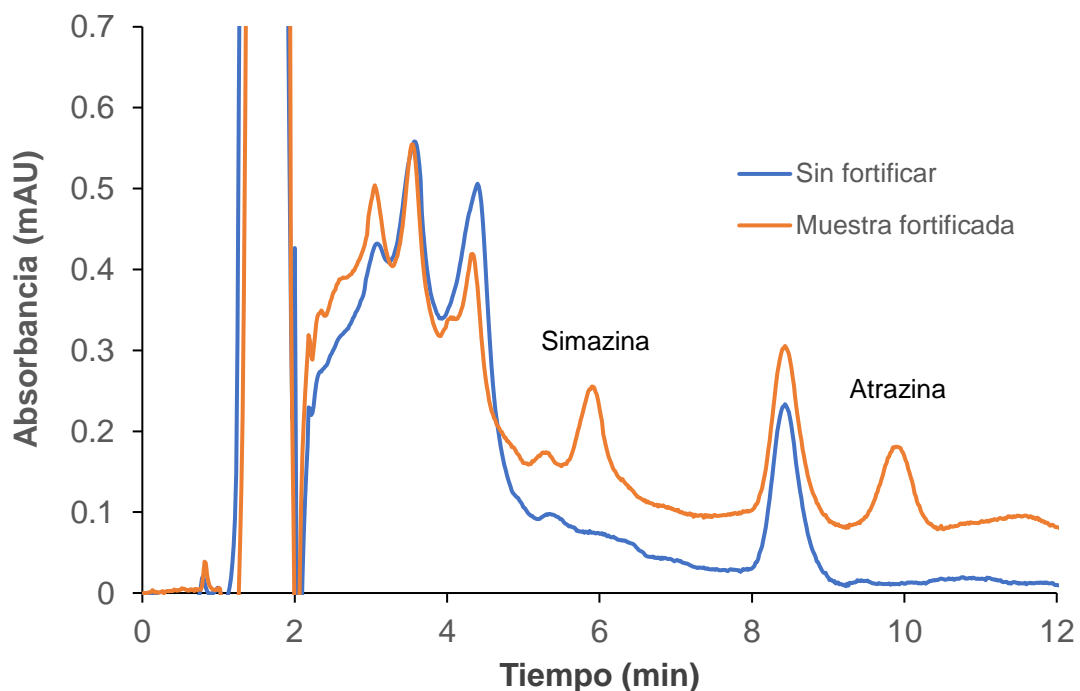
Los cromatogramas de cuatro de las muestras fortificadas tipo se muestran a continuación.



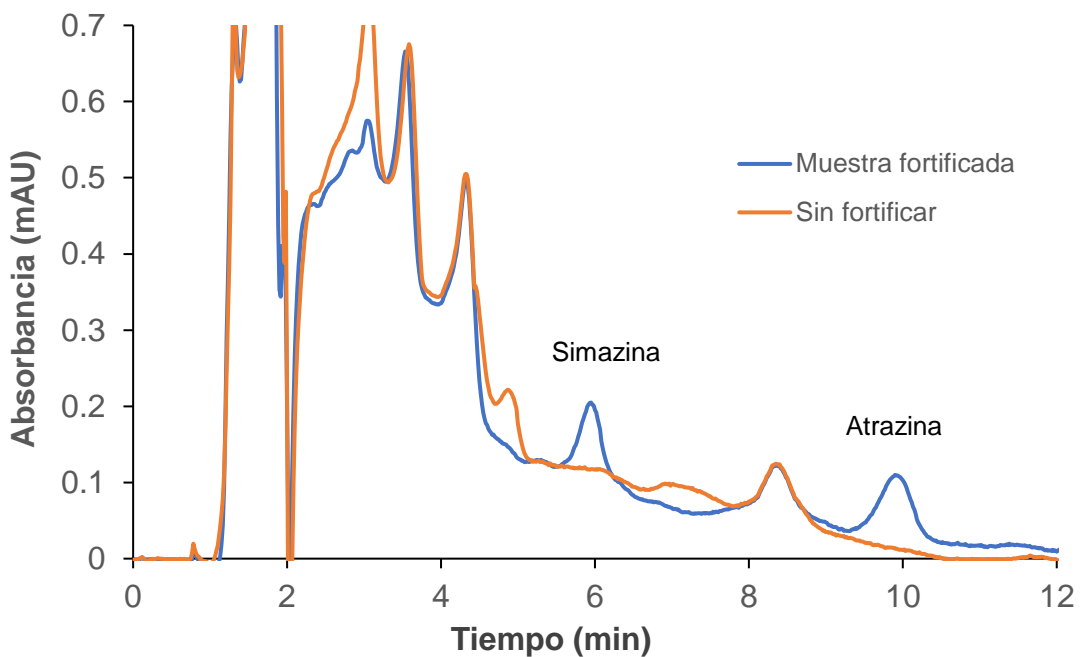
**Figura 7.6.1.** Cromatogramas de muestra 13: tortilla azul de Cuautitlán, Estado de México fortificada (100 ng/g) y sin fortificar a las que se les aplicó la metodología desarrollada UAE-EFS-EFS-D.



**Figura 7.6.2.** Cromatogramas de muestra 14: tortilla amarilla de Naucalpan de Juárez, Estado de México fortificada (100 ng/g) y sin fortificar a las que se les aplicó la metodología desarrollada UAE-EFS-EFS-D.



**Figura 7.6.3.** Cromatogramas de muestra 19: tortilla amarilla de Guanajuato, Guanajuato fortificada (100 ng/g) y sin fortificar a las que se les aplicó la metodología desarrollada UAE-EFS-EFS-D.



**Figura 7.6.4.** Cromatogramas de muestra 4: tortilla rosa de Benito Juárez, Ciudad de México fortificada (100 ng/g) y sin fortificar a las que se les aplicó la metodología desarrollada UAE-EFS-EFS-D.

Cabe resaltar que la ausencia de plaguicidas por arriba del límite de detección no es un criterio válido para descartar la presencia de estos contaminantes en las tortillas de maíz. Más aun, cuando otros estudios han logrado detectar herbicidas en el maíz, materia prima base en la elaboración de tortillas (Zondo & Mahlambi, 2022; Guzmán-Soria et al., 2019). El proceso de elaboración de las tortillas de maíz involucra etapas particulares como la nixtamalización (100°C, 1 h, pH 11) y cocción (300°C) en las que las condiciones podrían favorecer la degradación de la atrazina y simazina y dar lugar a sus metabolitos o compuestos de degradación.

La investigación de contaminantes triazínicos en tortillas de maíz requiere de un mayor número de estudios. La incorporación de otras herramientas como los adsorbentes de alta selectividad (Polímeros de Impresión molecular e Inmunoadsorbentes), el análisis HPLC-MS, CG-MS, el muestreo enfocado a áreas con alto uso de plaguicidas o la determinación de metabolitos de degradación, podría ofrecer información complementaria sobre los niveles de contaminación de las tortillas en México.

## 8. CONCLUSIONES

El presente trabajo representa un avance en el desarrollo de metodologías para el análisis de herbicidas triazínicos en muestras a base de maíz como la tortilla, el método propuesto EAU-EFS-EFS-D, permite monitorear las concentraciones de atrazina y simazina en tortillas tomando como referencia el LMR que establece la legislación mexicana para el maíz (250 ng/g). La metodología propuesta cumple además con los parámetros de desempeño de acuerdo con lo establecido por el Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria para la identificación y/o cuantificación de residuos de plaguicidas en México, los límites de detección y cuantificación logrados por la metodología fueron de 20-50 ng/g para la atrazina y 20-60 ng/g para la simazina. Así mismo, la metodología fue precisa, exacta y robusta con recobros de un 71 % para la simazina y de 76 % para la atrazina.

La metodología propuesta permitió separar y cuantificar exitosamente a los herbicidas de los extractos provenientes de tortillas de maíz fortificadas. Adicionalmente, el método desarrollado ofrece un enfoque miniaturizado que requiere solo de una pequeña cantidad de muestra (200 mg), así como de una baja cantidad de adsorbentes y disolventes, lo que ayuda a reducir los costos y la generación de residuos durante la preparación de la muestra. Estos resultados representan un avance en la optimización y validación de metodologías analíticas en matrices como la tortilla de maíz.

Finalmente, el análisis de muestras reales realizado en este estudio permitió obtener información sobre los niveles de contaminación de tortillas de maíz con herbicidas triazínicos provenientes de distintos puntos de la República mexicana, así como de la ZMVM. Concretamente, los resultados obtenidos indicaron la ausencia de herbicidas en las muestras por arriba del límite de detección.

## 9. ANEXO

### Cultivos en los que se emplean los herbicidas triazínicos regulados en México.

Tabla 1. Cultivos en los que se emplea atrazina.

<b>Cultivo</b>	<b>LMR (ng/g)</b>
Caña De Azúcar	250
Maíz	250
Sorgo	250
Agave	Exento
Pastizales	Exento
Piña	50
Potreros	4 000
Avena	100
Cebada	100
Centeno	100
Trigo	100
Triticale	100
Arroz	100
Manzano	50

Tabla 2. Cultivos en los que se emplea simazina.

<b>Cultivo</b>	<b>LMR (ng/g)</b>
Plátano	10
Ciruelo	100
Nogal	200
Aguacatero	250
Almendro	250
Caña de azúcar	250
Durazno	250
Fresa	250
Limonero	250
Maíz	250
Manzano	250
Naranja	250
Peral	250
Toronjo	250
Vid	250
Esparrago	10 000
Alfalfa	15 000
Arboles forestales	Exento
Áreas no cultivadas	Exento

Tabla 3. Cultivos en los que se emplea metribuzina.

<b>Cultivo</b>	<b>LMR (ng/g)</b>
Maíz	50
Caña de azúcar	100
Esparrago	100
Jitomate	100
Soya	300
Zanahoria	300
Papa	600
Cebada	750
Trigo	750
Piña	100
Tomate de cáscara	100

Tabla 4. Cultivos en los que se emplea ametrina.

<b>Cultivo</b>	<b>LMR (ng/g)</b>
Caña de azúcar	250
Maíz	250
Papa	250
Piña	250
Plátano	250

Tabla 5. Cultivos en los que se emplea prometrina.

<b>Cultivo</b>	<b>LMR (ng/g)</b>
Algodonero	250
Chícharo	250
Maíz	250
Apio	500

Tabla 6. Cultivos en los que se emplea hexazinona.

<b>Cultivo</b>	<b>LMR (ng/g)</b>
Caña de azúcar	600
Alfalfa	2 000
Potreros	10 000
Áreas no cultivadas	Exento
Agave	Exento

Tabla 7. Cultivos en los que se emplea terbutrina.

<b>Cultivo</b>	<b>LMR (ng/g)</b>
Sorgo	100

Tabla 8. Cultivos en los que se emplea cianazina.

<b>Cultivo</b>	<b>LMR (ng/g)</b>
Maíz	200

Tabla 9. Cultivos en los que se emplea terbutilazina.

<b>Cultivo</b>	<b>LMR (ng/g)</b>
Áreas no cultivadas	Exento

Datos tomados del Registro Sanitario de Plaguicidas y Nutrientes Vegetales (COFEPRIS, 2019)



## 10. BIBLIOGRAFÍA

- Abass, K., Pelkonen, O., & Rautio, A. (2021). Chloro-s-triazines-toxicokinetic, Toxicodynamic, Human Exposure, and Regulatory Considerations. *Current Drug Metabolism*, 22(8), 645–656. <https://doi.org/10.2174/1389200222666210701164945>
- Abdullahi, K., Saleh, K. J., & Mzungu, I. (2022). Effect of Atrazine, 2,4-D Amine, Glyphosate and Paraquat Herbicides on Soil Microbial Population. *Journal of Environmental Microbiology and Toxicology*, 10(1), 19–22. <https://doi.org/10.54987/jemat.v10i1.693>
- Ahmed, Y. H., AbuBakr, H. O., Ahmad, I. M., & Ahmed, Z. S. O. (2022). Histopathological, Immunohistochemical, And Molecular Alterations In Brain Tissue And Submandibular Salivary Gland Of Atrazine-Induced Toxicity In Male Rats. *Environmental Science and Pollution Research*, 29(20), 30697–30711. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-18399-x>
- Alberti, G., Zanoni, C., Spina, S., Magnaghi, L. R., & Biesuz, R. (2022). MIP-Based Screen-Printed Potentiometric Cell for Atrazine Sensing. *Chemosensors*, 10(8), 339. <https://doi.org/10.3390/CHEMOSENSORS10080339/S1>
- Ali, M., Cheng, J., & Sun, D. (2021). Effects of dielectric barrier discharge cold plasma treatments on degradation of anilazine fungicide and quality of tomato ( *Lycopersicon esculentum* Mill) juice. *International Journal of Food Science & Technology*, 56(1), 69–75. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14600>
- Almasi, H., Takdastan, A., Jaafarzadeh, N., Babaei, A. A., Tahmasebi Birgani, Y., Cheraghian, B., Saki, A., & Jorfi, S. (2020). Spatial distribution, ecological and health risk assessment and source identification of atrazine in Shadegan international wetland, Iran. *Marine Pollution Bulletin*, 160, 111569. <https://doi.org/10.1016/J.MARPOLBUL.2020.111569>
- Alvarado, M. (2003). *Influencia de la cantidad de adsorbente y el volumen de muestra en los parámetros de la extracción en fase solida de contaminantes orgánicos en agua*. Universidad Nacional Autónoma de México. CDMX, México. [https://tesionam.dgb.unam.mx/F/URLSG25E8UY673CIF9JS7FLCSNBM98SH TYGS2R9BJ11NXDIS6K-30881?func=full-set-set&set\\_number=456902&set\\_entry=000035&format=999](https://tesionam.dgb.unam.mx/F/URLSG25E8UY673CIF9JS7FLCSNBM98SH TYGS2R9BJ11NXDIS6K-30881?func=full-set-set&set_number=456902&set_entry=000035&format=999)
- Ambrus, Á., & Yang, Y. Z. (2016). Global Harmonization of Maximum Residue Limits for Pesticides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(1), 30–35. <https://doi.org/10.1021/jf505347z>
- Anastassiades, M., Lehotay, S. J., Štajnbaher, D., & Schenck, F. J. (2003). Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and “Dispersive Solid-Phase Extraction” for the Determination of Pesticide Residues in Produce. *Journal of AOAC INTERNATIONAL*, 86(2), 412–431. <https://doi.org/10.1093/jaoac/86.2.412>
- Andrade-Eiroa, A., Canle, M., Leroy-Cancellieri, V., & Cerdà, V. (2016). Solid-phase extraction of organic compounds: A critical review (Part I). *TrAC Trends*

- in Analytical Chemistry*, 80, 641–654.  
<https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.08.015>
- Andrade, F. N., Nazario, C. E. D., Santos-Neto, Á. J., & Lanças, F. M. (2016). Development of on-line molecularly imprinted solid phase extraction-liquid chromatography-mass spectrometry for triazine analysis in corn samples. *Analytical Methods*, 8(5), 1181–1186. <https://doi.org/10.1039/C5AY02986D>
- ATSDR. (2009). *Atrazine, Deethylatrazine, Diazinon, Nitrate, and Simazine*. Interaction profiles for toxic substances.  
<https://www.atsdr.cdc.gov/interactionprofiles/ip10.html>
- ATSDR. (2021). *Atrazine | Toxic Substances | Toxic Substance Portal | ATSDR*.  
<https://wwwn.cdc.gov/TSP/substances/ToxSubstance.aspx?toxid=59>
- Balawejder, M., Józefczyk, R., Antos, P., & Pieniek, M. (2016). A method for remediation of soil contaminated with simazine. *Archives of Environmental Protection*, 42(Vol. 42, 3), 41--46. <https://doi.org/10.1515/AEP-2016-0024>
- Barra Caracciolo, A., & Grenni, P. (2022). Bioremediation of Soil Ecosystems from Triazine Herbicides. *Handbook of Environmental Chemistry*, 113, 353–377. [https://doi.org/10.1007/698\\_2021\\_804/TABLES/2](https://doi.org/10.1007/698_2021_804/TABLES/2)
- Büyüktiryaki, S., Keçili, R., & Hussain, C. M. (2020). Functionalized nanomaterials in dispersive solid phase extraction: Advances & prospects. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 127, 115893.  
<https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.115893>
- Calleja, M., & Basilia, M. (2016). La tortilla como identidad culinaria y producto de consumo global. *Region y Sociedad*, 28(66), 161–194.
- Chemat, F., Rombaut, N., Sicaire, A.-G., Meullemiestre, A., Fabiano-Tixier, A.-S., & Abert-Vian, M. (2017). Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 34, 540–560.  
<https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.06.035>
- Chevrier, C., Limon, G., Monfort, C., Rouget, F., Garlantézec, R., Petit, C., Durand, G., & Cordier, S. (2011). Urinary Biomarkers of Prenatal Atrazine Exposure and Adverse Birth Outcomes in the PELAGIE Birth Cohort. *Environmental Health Perspectives*, 119(7), 1034–1041. <https://doi.org/10.1289/ehp.1002775>
- Chowdhury, I. F., Rohan, M., Stodart, B. J., Chen, C., Wu, H., & Doran, G. S. (2021). Persistence of atrazine and trifluralin in a clay loam soil undergoing different temperature and moisture conditions. *Environmental Pollution*, 276, 116687. <https://doi.org/10.1016/J.ENVPOL.2021.116687>
- COFEPRIS. (2019). *Registro Sanitario de Plaguicidas y Nutrientes Vegetales*. Acciones y Programas. Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios.  
<http://siipris03.cofepris.gob.mx/Resoluciones/Consultas/ConWebRegPlaguicida.asp>
- CONEVAL. (2019). Construcción de las Líneas de Pobreza por Ingresos. Documento metodológico. *Consejo Nacional de Evaluación de la Política de Desarrollo Social.*, 1, 1–35.  
[https://www.coneval.org.mx/InformesPublicaciones/InformesPublicaciones/Documents/Lineas\\_pobreza.pdf](https://www.coneval.org.mx/InformesPublicaciones/InformesPublicaciones/Documents/Lineas_pobreza.pdf)

- Dawadi, S., Thapa, R., Modi, B., Bhandari, S., Timilsina, A. P., Yadav, R. P., Aryal, B., Gautam, S., Sharma, P., Thapa, B. B., Aryal, N., Aryal, S., Regmi, B. P., & Parajuli, N. (2021). Technological Advancements for the Detection of Antibiotics in Food Products. *Processes*, 9(9), 1500. <https://doi.org/10.3390/pr9091500>
- de la Parra, C., Serna Saldivar, S. O., & Liu, R. H. (2007). Effect of Processing on the Phytochemical Profiles and Antioxidant Activity of Corn for Production of Masa, Tortillas, and Tortilla Chips. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(10), 4177–4183. <https://doi.org/10.1021/jf063487p>
- Dhiman, V., & Pant, D. (2022).  $\pi$ - $\pi$  Interaction: Defining the Role and Relevance in Environmental Detoxification of Heavy Metals from Soil (pp. 659–672). [https://doi.org/10.1007/978-3-031-09270-1\\_29](https://doi.org/10.1007/978-3-031-09270-1_29)
- Diario Oficial de la Federación. (2008). NORMA Oficial Mexicana NOM-247-SSA1-2008, Productos y servicios. Cereales y sus productos. Cereales, harinas de cereales, sémolas o semolinas. Alimentos a base de: cereales, semillas comestibles, de harinas, sémolas o semolinas o sus mezclas. Productos de. [https://dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=5100356&fecha=27/07/2009#gsc.tab=0](https://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5100356&fecha=27/07/2009#gsc.tab=0)
- Dzah, C. S., Duan, Y., Zhang, H., Wen, C., Zhang, J., Chen, G., & Ma, H. (2020). The effects of ultrasound assisted extraction on yield, antioxidant, anticancer and antimicrobial activity of polyphenol extracts: A review. *Food Bioscience*, 35, 100547. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100547>
- EFSA. (2022). *Glosary IDA*. Glosary .European Food Safety Authority. <https://www.efsa.europa.eu/en/glossary-taxonomy-terms>
- EPA. (2022a). *Información básica sobre pesticidas | US EPA*. <https://espanol.epa.gov/espanol/informacion-basica-sobre-pesticidas>
- EPA. (2022b). *RISKS FROM HUMAN EXPOSURE TO SIMAZINE RESIDUES IN GROUNDWATER*. [www.cdpr.ca.gov](http://www.cdpr.ca.gov)
- EPA, U. S. E. P. A. (2010). *Technical Factsheet on: SIMAZINE*. 1-4 <https://archive.epa.gov/water/archive/web/pdf/archived-technical-fact-sheet-on-simazine.pdf>
- EPA, U. S. E. P. A. (2020). *Simazine Interim Registration Review Decision Case Number 0070*. 2–43. [https://www.epa.gov/sites/default/files/209/documents/simazine\\_id\\_signed.pdf](https://www.epa.gov/sites/default/files/209/documents/simazine_id_signed.pdf)
- EPA, U. S. E. P. A. (2021). *Final National Level Listed Species Biological Evaluation for Simazine*. <https://www.epa.gov/endangered-species/final-national-level-listed-species-biological-evaluation-simazine#executive-summary>
- EPA, U. S. E. P. A., Office of Chemical Safety and Pollution Prevention, & U.S. Government Printing Office. (2018). *Draft Human Health Risk Assessment for Registration Review - Atrazine*. <https://www.regulations.gov/document/EPA-HQ-OPP-2013-0266-1159>
- Espejel, M., Mora, J., García, J., Pérez, S., & Roberto, G. (2016). Caracterización del consumidor de tortilla en el Estado de México. *Agricultura, Sociedad y Desarrollo*, 13(3), 371-384.
- Fan, A. M. (2014). Triazines. *Encyclopedia of Toxicology: Third Edition*, Elsevier

- 810–815. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386454-3.01066-6>
- FAO. (2021). *Maximum Residue Limits (MRLs)*. Codex Alimentarius. <https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/maximum-residue-limits/en/>
- Fatima, M., & Rasool, F. (2022). *Herbicides mixture with potent endocrine-disrupting properties in goldfish: As an early warning at environmentally relevant concentration*. <https://doi.org/10.21203/RS.3.RS-2141488/V1>
- FDA, Services, U. S. D. of H. and H., Research, C. for D. E. and, & Research, C. for B. E. and. (2021). *Q2(R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Guidance for Industry*. <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/guidance-compliance-regulatory-information-biologics/biologics-guidances>
- Fellows, C. J., Anderson, T. D., & Swale, D. R. (2022). Acute toxicity of atrazine, alachlor, and chlorpyrifos mixtures to honey bees. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 188, 105271. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2022.105271>
- Folorunsho, O., Bogush, A., & Kourtchev, I. (2023). A new on-line SPE LC-HRMS method for simultaneous analysis of selected emerging contaminants in surface waters. *Analytical Methods*. <https://doi.org/10.1039/D2AY01574A>
- Gao, M., Zhu, H., Guo, J., Lei, Y., Sun, W., & Lin, H. (2022). Tannic acid through ROS/TNF- $\alpha$ /TNFR 1 antagonizes atrazine induced apoptosis, programmed necrosis and immune dysfunction of grass carp hepatocytes. *Fish & Shellfish Immunology*, 131, 312–322. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2022.09.062>
- Giannetto, M., Umiltà, E., & Careri, M. (2014). New competitive dendrimer-based and highly selective immunosensor for determination of atrazine in environmental, feed and food samples: The importance of antibody selectivity for discrimination among related triazinic metabolites. *Analytica Chimica Acta*, 806, 197–203. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2013.11.002>
- Gonzales, G., Touraud, E., Spinelli, S., & Thomas, O. (2007). Organic Constituents. En O. Thomas & C. Burgess (Eds.), *UV visible spectrophotometry of water and wastewater* (First edit, p. 76). Elsevier.
- Goon, A., Kundu, C., & Ganguly, P. (2022). Development of a Modified QuEChERS Method Coupled with LC-MS/MS for Determination of Spinetoram Residue in Soybean (*Glycine max*) and Cotton (*Gossypium hirsutum*). *Journal of Xenobiotics*, 13(1), 2–15. <https://doi.org/10.3390/jox13010002>
- Gunasekara, A. S., Troiano, J., Goh, K. S., & Tjeerdema, R. S. (2007). Chemistry and fate of simazine. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 189, 1–23. [https://doi.org/10.1007/978-0-387-35368-5\\_1/COVER](https://doi.org/10.1007/978-0-387-35368-5_1/COVER)
- Guzmán-Soria, D., Taboada-González, P., Aguilar-Virgen, Q., Baltierra-Trejo, E., & Marquez-Benavides, L. (2019). Environmental impact of corn tortilla production: A case study. *Applied Sciences (Switzerland)*, 9(22). <https://doi.org/10.3390/app9224852>
- Haeri, S. A., & Abbasi, S. (2016). New strategy for the biosorption of atrazine after magnetic solid-phase extraction from water followed by high-performance liquid chromatography analysis. *Journal of Separation Science*, 39(14), 2839–2845. <https://doi.org/10.1002/jssc.201600351>
- Hansen, A., Treviño, L., Marquez, H., Villada, M., Gonzalez, L., Guillen, R., &

- Hernandez, A. (2013). ATRAZINA: UN HERBICIDA POLÉMICO. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 29, 65–84.
- Hejabri kandeh, S., Amini, S., & Ebrahimzadeh, H. (2022). PVA/Stevia/MIL-88A@AuNPs composite nanofibers as a novel sorbent for simultaneous extraction of eight agricultural pesticides in food and vegetable samples followed by HPLC-UV analysis. *Food Chemistry*, 386, 132734. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132734>
- IARC. (2020). *Monographs on the Identification of Carcinogenic Hazards to Humans. Report of the Advisory Group to Recommend Priorities for the IARC Monographs during 2020–2024*. [https://monographs.iarc.who.int/wp-content/uploads/2019/10/IARCMonographs-AGReport-Priorities\\_2020-2024.pdf](https://monographs.iarc.who.int/wp-content/uploads/2019/10/IARCMonographs-AGReport-Priorities_2020-2024.pdf)
- IARC. (2022). *List of Classifications. Agents classified by the IARC Monographs, Volumes 1–132*. Monographs on the Identification of carcinogenic hazards to humans. <https://monographs.iarc.who.int/list-of-classifications>
- Jalili, F., Jafari, S. M., Emam-Djomeh, Z., Malekjani, N., & Farzaneh, V. (2018). Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of Oil from Canola Seeds with the Use of Response Surface Methodology. *Food Analytical Methods*, 11(2), 598–612. <https://doi.org/10.1007/s12161-017-1030-z>
- Jiménez, J., Arambula, G., de la Cruz, E., & Aparicio, M. (2012). Característica del grano, masa y tortilla producida con diferentes genotipos de maíz del trópico mexicano. *Universidad y Ciencia*, 28(2).
- Kanehisa, L. KEGG. (2021). *PATHWAY: Atrazine degradation - Reference pathway*. <https://www.genome.jp/pathway/map00791>
- Kharitonova, N. A., Chelnokov, G. A., Bragin, I. V., Chudaev, O. V., Kharitonova, N. A., Chelnokov, G. A., Bragin, I. V., & Chudaev, O. V. (2015). Chemical and Isotopic Composition of Water and Gas Phases from Mukhen Spa (Far East of Russia). *Journal of Geoscience and Environment Protection*, 3(5), 6–13. <https://doi.org/10.4236/GEP.2015.35002>
- Kumar, K., Srivastav, S., & Sharanagat, V. S. (2021). Ultrasound assisted extraction (UAE) of bioactive compounds from fruit and vegetable processing by-products: A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 70, 105325. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2020.105325>
- Kushwaha, N., & Sharma, C. S. (2020). The Chemistry of Triazine Isomers: Structures, Reactions, Synthesis and Applications. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 20(20), 2104–2122. <https://doi.org/10.2174/1389557520666200729160720>
- LeBaron, H. M., McFarland, J. E., & Burnside, O. C. (2008). The Triazine Herbicides: A Milestone in the Development of Weed Control Technology. *The Triazine Herbicides*, 1–12. <https://doi.org/10.1016/B978-044451167-6.50004-0>
- Lee, J. J., & Yoon, K. Y. (2021). Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from bitter melon ( *Momordica charantia* ) using response surface methodology. *CyTA - Journal of Food*, 19(1), 721–728. <https://doi.org/10.1080/19476337.2021.1973110>
- Li, X., Li, J., Li, P., Jiang, Y., Wu, Y., & Li, B. (2020). Injury to dopaminergic

- neurons development via the Lmx1a/Wnt1 autoregulatory loop induced by simazine. *Toxicology Letters*, 333, 279–289.  
<https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2020.07.026>
- Liang, L., Wang, X., Sun, Y., Ma, P., Li, X., Piao, H., Jiang, Y., & Song, D. (2018). Magnetic solid-phase extraction of triazine herbicides from rice using metal-organic framework MIL-101(Cr) functionalized magnetic particles. *Talanta*, 179, 512–519. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.11.017>
- Liaqat, S., Ahmed, Z., Ali, Q., Akbar, A., & Khalid, N. (2022). Development, characterization, and principal component analysis of fish bone-based fortified refined wheat flour tortilla and its organoleptic attributes. *Journal of Food Processing and Preservation*, 46(11). <https://doi.org/10.1111/jfpp.17051>
- Limmer, M. A., & Burken, J. G. (2014). Plant Translocation of Organic Compounds: Molecular and Physicochemical Predictors. *Environmental Science & Technology Letters*, 1(2), 156–161. <https://doi.org/10.1021/ez400214q>
- Liu, G., Wang, S., Yang, X., Li, T., She, Y., Wang, J., Zou, P., Jin, F., Jin, M., & Shao, H. (2016). Colorimetric sensing of atrazine in rice samples using cysteamine functionalized gold nanoparticles after solid phase extraction. *Analytical Methods*, 8(1), 52–56. <https://doi.org/10.1039/C5AY02810H>
- Liu, Y., Zhu, K., Su, M., Zhu, H., Lu, J., Wang, Y., Dong, J., Qin, H., Wang, Y., & Zhang, Y. (2019). Influence of solution pH on degradation of atrazine during UV and UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxidation: kinetics, mechanism, and degradation pathways. *RSC Advances*, 9(61), 35847–35861.  
<https://doi.org/10.1039/C9RA05747A>
- Lopes de Mello, H., Anastacio Alves, L., Araujo Dias, E., de Sá Pereira Magalhães, S., Cotta-de-Almeida, V., & da Cunha Bisaggio, R. (2021). Sonodynamic and Photodynamics Used as a Combined Therapy in the Treatment of Malignant Neoplasms: Facts and Open Questions. En *Photodynamic Therapy - From Basic Science to Clinical Research*. IntechOpen.  
<https://doi.org/10.5772/intechopen.94600>
- Maggi, F., Tang, F. H. M., la Cecilia, D., & McBratney, A. (2019). PEST-CHEMGRIDS, global gridded maps of the top 20 crop-specific pesticide application rates from 2015 to 2025. *Scientific Data* 2019 6:1, 6(1), 1–20.  
<https://doi.org/10.1038/s41597-019-0169-4>
- Mahmood, I., Imadi, S. R., Shazadi, K., Gul, A., & Hakeem, K. R. (2016). Effects of pesticides on environment. *Plant, Soil and Microbes: Volume 1: Implications in Crop Science*, 253–269.  
[https://doi.org/10.1007/978-3-319-27455-3\\_13/FIGURES/2](https://doi.org/10.1007/978-3-319-27455-3_13/FIGURES/2)
- Mahugija, J. A. M., Kayombo, A., & Peter, R. (2017). Pesticide residues in raw and processed maize grains and flour from selected areas in Dar es Salaam and Ruvuma, Tanzania. *Chemosphere*, 185, 137–144.  
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.07.014>
- Méndez, C. (2019). *INICIATIVA CON PROYECTO DE DECRETO POR EL QUE SE DECLARA EL DÍA 24 DE NOVIEMBRE COMO EL DÍA NACIONAL DE LA TORTILLA*. INFOSEN Senado de la República.  
[https://infosen.senado.gob.mx/sgsp/gaceta/64/2/2019-09-25-1/assets/documentos/Inic\\_Morena\\_Sen\\_Casimiro\\_Dia\\_Tortilla.pdf](https://infosen.senado.gob.mx/sgsp/gaceta/64/2/2019-09-25-1/assets/documentos/Inic_Morena_Sen_Casimiro_Dia_Tortilla.pdf)

- Merck. (2022a). *Atrazine PESTANAL, analytical standard*.  
<https://www.sigmaaldrich.com/MX/es/product/sigma/45330>
- Merck. (2022b). *Simazine certified reference material*.  
<https://www.sigmaaldrich.com/MX/es/product/supelco/40662>
- Milhome, M. A. L., Vieira, S. K. V., Reges, B. M., Fernandes, D. R., Uchoa, M. L. P., Pinheiro, A. I., Castro, R. C., Silva, V. P. A., Nobre, C. A., Menezes, M. G. G., Silva, R. O., & do Nascimento, R. F. (2019). Multiresidue analysis and evaluation of the matrix effect on 20 pesticides in Brazilian maize (*Zea mays* L.) flour. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, *54*(11), 892–897. <https://doi.org/10.1080/03601234.2019.1640586>
- Mnyandu, H. M., & Mahlambi, P. N. (2021). Optimization and application of QuEChERS and SPE methods followed by LC-PDA for the determination of triazines residues in fruits and vegetables from Pietermaritzburg local supermarkets. *Food Chemistry*, *360*, 129818.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129818>
- Mohammadpour, H., Sadrameli, S. M., Eslami, F., & Asoodeh, A. (2019). Optimization of ultrasound-assisted extraction of Moringa peregrina oil with response surface methodology and comparison with Soxhlet method. *Industrial Crops and Products*, *131*, 106–116.  
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.01.030>
- Moldoveanu, S., & David, V. (2021). Solid-phase extraction. En *Modern Sample Preparation for Chromatography* (pp. 281–421). Elsevier.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821405-3.00003-4>
- Montiel-León, J. M., Muñoz, G., Vo Duy, S., Do, D. T., Vaudreuil, M.-A., Goeury, K., Guillemette, F., Amyot, M., & Sauv e, S. (2019). Widespread occurrence and spatial distribution of glyphosate, atrazine, and neonicotinoids pesticides in the St. Lawrence and tributary rivers. *Environmental Pollution*, *250*, 29–39.  
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.03.125>
- MoscOSO-Ruiz, I., Naval n, A., Rivas, A., & Zafra-G mez, A. (2022). Presence of parabens in children’s faeces. Optimization and validation of a new analytical method based on the use of ultrasound-assisted extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 115212. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2022.115212>
- Mou, R.-X., Chen, M.-X., Cao, Z.-Y., & Zhu, Z.-W. (2011). Simultaneous determination of triazine herbicides in rice by high-performance liquid chromatography coupled with high resolution and high mass accuracy hybrid linear ion trap-orbitrap mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, *706*(1), 149–156. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.08.030>
- Mu, Y., Zhan, G., Huang, C., Wang, X., Ai, Z., Zou, J., Luo, S., & Zhang, L. (2019). Dechlorination-Hydroxylation of Atrazine to Hydroxyatrazine with Thiosulfate: A Detoxification Strategy in Seconds. *Environmental Science and Technology*, *53*(6), 3208–3216.  
[https://doi.org/10.1021/ACS.EST.8B06351/ASSET/IMAGES/LARGE/ES-2018-06351Q\\_0005.JPEG](https://doi.org/10.1021/ACS.EST.8B06351/ASSET/IMAGES/LARGE/ES-2018-06351Q_0005.JPEG)
- Mueller, T. C., Parker, E. T., Steckel, L., Clay, S. A., Owen, M. D. K., Curran, W. S., Currie, R., Scott, R., Sprague, C., Stephenson, D. O., Miller, D. K., Prostko,

- E. P., Grichar, W. J., Martin, J., Kruz, L. J., Bradley, K., Bernards, M. L., Dotray, P., Knezevic, S., ... Klein, R. (2017). Enhanced atrazine degradation is widespread across the United States. *Pest Management Science*, 73(9), 1953–1961. <https://doi.org/10.1002/PS.4566>
- Murrell, K. A., Teehan, P. D., & Dorman, F. L. (2021). Determination of contaminants of emerging concern and their transformation products in treated-wastewater irrigated soil and corn. *Chemosphere*, 281, 130735. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.130735>
- NIH. (2018a). *Hazardous Substances Data Bank (HSDB). Atrazine*. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/source/hsdb/413>
- NIH. (2018b). *Hazardous Substances Data Bank (HSDB). Simazine*. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/source/hsdb/1765>
- NIOSH. (2019). *NIOSH skin notation profile: atrazine*. <https://doi.org/10.26616/NIOSH PUB2019117>
- Olariu, R.-I., Vione, D., Grinberg, N., & Arsene, C. (2010). SAMPLE PREPARATION FOR TRACE ANALYSIS BY CHROMATOGRAPHIC METHODS. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 33(9–12), 1174–1207. <https://doi.org/10.1080/10826076.2010.484371>
- Omena, E., Oenning, A. L., Merib, J., Richter, P., Rosero-Moreano, M., & Carasek, E. (2019). A green and simple sample preparation method to determine pesticides in rice using a combination of SPME and rotating disk sorption devices. *Analytica Chimica Acta*, 1069, 57–65. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.04.002>
- Onduka, T., Somiya, R., Yamagishi, T., Hano, T., & Yamamoto, H. (2022). *Development of a microplate-based novel toxicity bioassay using Chlorophyta and Phaeophyceae macroalgae*. <https://doi.org/10.21203/RS.3.RS-2367937/V1>
- Palacios Colón, L., Rascón, A. J., & Ballesteros, E. (2023). Simultaneous determination of phenolic pollutants in dairy products held in various types of packaging by gas chromatography–mass spectrometry. *Food Control*, 146, 109564. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2022.109564>
- Páramo-Calderón, D. E., Aparicio-Saguilán, A., Aguirre-Cruz, A., Carrillo-Ahumada, J., Hernández-Urbe, J. P., Acevedo-Tello, S., & Torruco-Uco, J. G. (2019). Tortilla added with Moringa oleífera flour: Physicochemical, texture properties and antioxidant capacity. *LWT*, 100, 409–415. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.10.078>
- Park, H.-O., & Bae, J. (2012). Disturbed Relaxin Signaling Pathway and Testicular Dysfunction in Mouse Offspring upon Maternal Exposure to Simazine. *PLoS ONE*, 7(9), e44856. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044856>
- Park, S., Kim, S., Jin, H., Lee, K., & Bae, J. (2014). Impaired development of female mouse offspring maternally exposed to simazine. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 38(3), 845–851. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2014.10.008>
- Pérez, D. J., Doucette, W. J., & Moore, M. T. (2022). Contaminants of emerging concern (CECs) in Zea mays: Uptake, translocation and distribution tissue patterns over the time and its relation with physicochemical properties and



- plant transpiration rate. *Chemosphere*, 288, 132480.  
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132480>
- Pitty, A. (2018). Modo de Acción y Resistencia de los Herbicidas que Interfieren en el Fotosistema II de la Fotosíntesis. *Ceiba*, 55(1), 45–59.  
<https://doi.org/10.5377/ceiba.v55i1.5453>
- Płotka-Wasyłka, J., Szczepańska, N., de la Guardia, M., & Namieśnik, J. (2015). Miniaturized solid-phase extraction techniques. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 73, 19–38. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.04.026>
- Poonia, K., Hasija, V., Singh, P., Parwaz Khan, A. A., Thakur, S., Thakur, V. K., Mukherjee, S., Ahamad, T., Alshehri, S. M., & Raizada, P. (2022). Photocatalytic degradation aspects of atrazine in water: Enhancement strategies and mechanistic insights. *Journal of Cleaner Production*, 367, 133087. <https://doi.org/10.1016/J.JCLEPRO.2022.133087>
- Pretsch, E., Bühlmann, P., & Affolter, C. (2000). UV/Vis Spectroscopy. En *Structure Determination of Organic Compounds* (pp. 385–404). Springer Berlin Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/978-3-662-04201-4\\_8](https://doi.org/10.1007/978-3-662-04201-4_8)
- Prukjareonchook, A., Alahmad, W., Kraiya, C., Kulsing, C., Chaisuwan, T., & Dubas, L. (2022). A selective and sensitive colorimetric method for semi-automated solid-phase extraction of atrazine in environmental water samples. *Microchemical Journal*, 108326. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2022.108326>
- Qin, P., Chen, D., Li, D., Li, M., Mu, M., Gao, Y., Zhu, S., & Lu, M. (2022). Synthesis of spindle-like amino-modified Zn/Fe bimetallic metal-organic frameworks as sorbents for dispersive solid-phase extraction and preconcentration of phytohormones in vegetable samples. *Food Chemistry*, 135272. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.135272>
- Qin, Y., Zhao, P., Fan, S., Han, Y., Li, Y., Zou, N., Song, S., Zhang, Y., Li, F., Li, X., & Pan, C. (2015). The comparison of dispersive solid phase extraction and multi-plug filtration cleanup method based on multi-walled carbon nanotubes for pesticides multi-residue analysis by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1385, 1–11.  
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.01.066>
- Rahman, M. M., & Lamsal, B. P. (2021). Ultrasound-assisted extraction and modification of plant-based proteins: Impact on physicochemical, functional, and nutritional properties. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 20(2), 1457–1480. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12709>
- Rashad, W. A., Saadawy, S. F., & Refaay, N. E. (2022). Mitigating effect of L-carnitine against atrazine-induced hepatotoxicity: histopathological and biochemical analyses in albino rats. *Environmental Science and Pollution Research*. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-23568-7>
- Raza, A., Li, F., Xu, X., & Tang, J. (2017). Optimization of ultrasonic-assisted extraction of antioxidant polysaccharides from the stem of *Trapa quadrispinosa* using response surface methodology. *International Journal of Biological Macromolecules*, 94, 335–344.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.10.033>
- Ren, R., Sun, D.-J., Yan, H., Wu, Y.-P., & Zhang, Y. (2013). Oral Exposure to the Herbicide Simazine Induces Mouse Spleen Immunotoxicity and Immune Cell

- Apoptosis. *Toxicologic Pathology*, 41(1), 63–72.  
<https://doi.org/10.1177/0192623312452488>
- Rinsky, J. L., Hopenhayn, C., Golla, V., Browning, S., & Bush, H. M. (2012). Atrazine Exposure in Public Drinking Water and Preterm Birth. *Public Health Reports*, 127(1), 72–80. <https://doi.org/10.1177/003335491212700108>
- Romero-González, R., Garrido Frenich, A., Martínez Vidal, J. L., Prestes, O. D., & Grió, S. L. (2011). Simultaneous determination of pesticides, biopesticides and mycotoxins in organic products applying a quick, easy, cheap, effective, rugged and safe extraction procedure and ultra-high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1218(11), 1477–1485. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.01.034>
- Rooney, L. W., & Serna-Saldivar, S. O. (2016). Tortillas. En *Reference Module in Food Science*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.00124-4>
- Sagarkar, S., Gandhi, D., Devi, Ss., Sakharkar, A., & Kapley, A. (2016). Atrazine exposure causes mitochondrial toxicity in liver and muscle cell lines. *Indian Journal of Pharmacology*, 48(2), 200.  
<https://doi.org/10.4103/0253-7613.178842>
- SAGARPA. (2021). *Panorama Agroalimentario 2021*. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera.  
[https://nube.siap.gob.mx/panorama\\_siap/pag/2021/Panorama-Agroalimentario-2021](https://nube.siap.gob.mx/panorama_siap/pag/2021/Panorama-Agroalimentario-2021)
- Sahraoui, I., Melliti Ben Garali, S., Chakroun, Z., Gonzalez, C., Pringault, O., & Sakka Hlaili, A. (2022). Monoculture and co-culture tests of the toxicity of four typical herbicides on growth, photosynthesis and oxidative stress responses of the marine diatoms *Pseudo-nitzschia mannii* and *Chaetoceros decipiens*. *Ecotoxicology*, 31(5), 700–713. <https://doi.org/10.1007/s10646-022-02535-5>
- Sai, L., Liu, Y., Qu, B., Yu, G., Guo, Q., Bo, C., Xie, L., Jia, Q., Li, Y., Li, X., Ng, J. C., & Peng, C. (2015). The Effects of Simazine, a Chlorotriazine Herbicide, on the Expression of Genes in Developing Male *Xenopus laevis*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 95(2), 157–163.  
<https://doi.org/10.1007/s00128-015-1483-y>
- Sánchez, O. F., Lin, L., Bryan, C. J., Xie, J., Freeman, J. L., & Yuan, C. (2020). Profiling epigenetic changes in human cell line induced by atrazine exposure. *Environmental Pollution*, 258, 113712.  
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113712>
- Santiago-Ramos, D., Figueroa-Cárdenas, J. de D., Véles-Medina, J. J., & Mariscal-Moreno, R. M. (2017). Changes in the thermal and structural properties of maize starch during nixtamalization and tortilla-making processes as affected by grain hardness. *Journal of Cereal Science*, 74, 72–78.  
<https://doi.org/10.1016/j.jcs.2017.01.018>
- Santos-Hernández, A. S., Hinojosa-Reyes, L., Sáenz-Tavera, I. del C., Hernández-Ramírez, A., & Guzmán-Mar, J. L. (2018). Atrazine and 2, 4-D determination in corn samples using microwave assisted extraction and on-line solid-phase extraction coupled to liquid chromatography. *Journal of the Mexican Chemical Society*, 62(2). <https://doi.org/10.29356/jmcs.v62i2.475>
- Schaarschmidt, S., & Fauhl-Hassek, C. (2019). Mycotoxins during the Processes

- of Nixtamalization and Tortilla Production. *Toxins*, 11(4), 227.  
<https://doi.org/10.3390/toxins11040227>
- Ścigalski, P., & Kosobucki, P. (2020). Recent Materials Developed for Dispersive Solid Phase Extraction. *Molecules*, 25(21), 4869.  
<https://doi.org/10.3390/molecules25214869>
- SENASICA. (2022). FUNCIONAMIENTO, APLICACIÓN E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS Y LOS MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA IDENTIFICACIÓN Y/O CUANTIFICACIÓN DE RESIDUOS DE PLAGUICIDAS. *Dirección General de Inocuidad Agroalimentaria, Acuicola y Pesquera*, Centro Nacional de Referencia de Plaguicidas y contaminantes. 13–15.
- Şengül, Ü. (2016). Comparing determination methods of detection and quantification limits for aflatoxin analysis in hazelnut. *Journal of Food and Drug Analysis*, 24(1), 56–62. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2015.04.009>
- Silva, M., & Iyer, P. (2014). Toxicity Endpoint Selections for a Simazine Risk Assessment. *Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology*, 101(4), 308–324. <https://doi.org/10.1002/bdrb.21114>
- Singh, S., Kumar, V., Chauhan, A., Datta, S., Wani, A. B., Singh, N., & Singh, J. (2018). Toxicity, degradation and analysis of the herbicide atrazine. *Environmental Chemistry Letters*, 16(1), 211–237.  
<https://doi.org/10.1007/s10311-017-0665-8>
- Soyseven, M., & Sezgin, B. (2021). THE EFFECT OF MOBILE PHASE pH ON CAPACITY FACTOR AND SELECTIVITY IN HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY. En R. Karapinar (Ed.), *MATHEMATICS AND NATURAL SCIENCES. Research and Theory*, Libre de Lyon, USA, 57–62.
- Swan, S. H. (2006). Semen quality in fertile US men in relation to geographical area and pesticide exposure. *International Journal of Andrology*, 29(1), 62–68.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2005.00620.x>
- Syahir, A., Sulaiman, S., Mel, M., Othman, M., & Zubaidah Sulaiman, S. (2020). An Overview: Analysis of ultrasonic-assisted extraction's parameters and its process. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 778(1), 012165. <https://doi.org/10.1088/1757-899X/778/1/012165>
- Torres, J. (2018). *La tortilla de maíz mexicana. Un símbolo milenario*. Biogenesis. <https://revistas.udea.edu.co/index.php/biogenesis/article/view/336224>
- Trevisan, M. T. S., Owen, R. W., Calatayud-Vernich, P., Breuer, A., & Picó, Y. (2017). Pesticide analysis in coffee leaves using a quick, easy, cheap, effective, rugged and safe approach and liquid chromatography tandem mass spectrometry: Optimization of the clean-up step. *Journal of Chromatography A*, 1512, 98–106. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.07.033>
- Turner, L., Field Branch, E., & Office of Pesticide Programs. (2003). *Simazine Analysis of Risks to Endangered and Threatened Salmon and Steelhead*.
- Tyohemba, R. L., Pillay, L., & Humphries, M. S. (2021). Bioaccumulation of current-use herbicides in fish from a global biodiversity hotspot: Lake St Lucia, South Africa. *Chemosphere*, 284, 131407.  
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131407>
- Van Leeuwen, J. A., Waltner-Toews, D., Abernathy, T., Smit, B., & Shoukri, M.

- (1999). Associations between stomach cancer incidence and drinking water contamination with atrazine and nitrate in Ontario (Canada) agroecosystems, 1987-1991. *International Journal of Epidemiology*, 28(5), 836–840. <https://doi.org/10.1093/ije/28.5.836>
- Vervliet-Scheebaum, M., Straus, A., Tremp, H., Hamer, M., Maund, S. J., Wagner, E., & Schulz, R. (2010). A microcosm system to evaluate the toxicity of the triazine herbicide simazine on aquatic macrophytes. *Environmental Pollution*, 158(2), 615–623. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2009.08.005>
- Waller, S. A., Paul, K., Peterson, S. E., & Hitti, J. E. (2010). Agricultural-related chemical exposures, season of conception, and risk of gastroschisis in Washington State. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 202(3), 241.e1-241.e6. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2010.01.023>
- Wang, A., Hu, X., Wan, Y., Mahai, G., Jiang, Y., Huo, W., Zhao, X., Liang, G., He, Z., Xia, W., & Xu, S. (2020). A nationwide study of the occurrence and distribution of atrazine and its degradates in tap water and groundwater in China: Assessment of human exposure potential. *Chemosphere*, 252, 126533. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2020.126533>
- Wang, H., Cao, X., Li, L., Fang, Z., & Li, X. (2018). Augmenting atrazine and hexachlorobenzene degradation under different soil redox conditions in a bioelectrochemistry system and an analysis of the relevant microorganisms. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 147, 735–741. <https://doi.org/10.1016/J.ECOENV.2017.09.033>
- Wang, Q., Wu, X., Zhang, Y., Hu, M., Chen, J., Gao, J., & Cheng, Y. (2020). Preparation of a Magnetic Multiwalled Carbon Nanotube-Gold Nanoparticle Hybrid Material for the Efficient Extraction of Triazine Herbicides from Rice. *Analytical Letters*, 53(11), 1740–1756. <https://doi.org/10.1080/00032719.2020.1718161>
- Wang, Z., Yu, S., Zhang, L., Liu, R., Deng, Y., Nie, Y., Zhou, Z., & Diao, J. (2021). Effects of simazine herbicide on a plant-arthropod-lizard tritrophic community in territorial indoor microcosms: Beyond the toxicity. *Science of The Total Environment*, 781, 146723. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146723>
- Wigfield, Y., & Grant, R. (1993). Analysis for Atrazine in Fortified Cornmeal and Corns Using a Commercially Available Enzyme Immunoassay Microtiter Plate. *Environmental Contamination and Toxicology*, 51, 171–177. <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/BF00198877.pdf>
- Wirbisky, S. E., Weber, G. J., Schlotman, K. E., Sepúlveda, M. S., & Freeman, J. L. (2016). Embryonic atrazine exposure alters zebrafish and human miRNAs associated with angiogenesis, cancer, and neurodevelopment. *Food and Chemical Toxicology*, 98, 25–33. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2016.03.027>
- Wu, J., & Cai, Z. (2022). Enrichment of Nucleobase Adducts from Genomic DNA in the Cytoplasm by Solid-phase Extraction. *Journal of Chromatography B*, 123574. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2022.123574>
- Xie, J., Lin, L., Sánchez, O. F., Bryan, C., Freeman, J. L., & Yuan, C. (2021). Pre-differentiation exposure to low-dose of atrazine results in persistent phenotypic changes in human neuronal cell lines. *Environmental Pollution*, 271, 116379. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.116379>

- Xiong, J., Wei, X., Shen, X., Zhu, W., Yi, S., & Huang, C. (2023). Synthesis of molecularly-imprinted polymers towards a group of amphetamine-type stimulants by reflux precipitation polymerization with a pseudo template. *Journal of Chromatography A*, 1688, 463738. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2022.463738>
- XueTing, L., Jia, Y., & BaiXiang, L. (2017). Reproductive toxicity to F1 offspring rats by simazine exposure during maternal gestation and gestation-and-lactation. *Journal of Environmental & Occupational Medicine*, 34(7), 598–603.
- Yang, Min, Fazio, S., Munch, D., & Drumm, P. (2005). Impact of methanol and acetonitrile on separations based on  $\pi$ - $\pi$  interactions with a reversed-phase phenyl column. *Journal of Chromatography A*, 1097(1–2), 124–129. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.08.028>
- Yang, Ming, Yi, J., Wei, C., Peng, X., Yang, Z., Zhao, L., Jiang, X., & Tu, F. (2022). Determination of fumonisins in edible vegetable oil by MIL-101(Cr)-based dispersive solid-phase extraction combined with high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Food Composition and Analysis*, 105099. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2022.105099>
- Yera, A. M. B., & Vasconcellos, P. C. (2021). Pesticides in the atmosphere of urban sites with different characteristics. *Process Safety and Environmental Protection*, 156, 559–567. <https://doi.org/10.1016/J.PSEP.2021.10.049>
- Yu, Jia, Li, X., Yang, J., Wu, Y., & Li, B. (2016). Effects of Simazine Exposure on Neuronal Development-Related Factors in MN9D Cells. *Medical Science Monitor*, 22, 2831–2838. <https://doi.org/10.12659/MSM.896460>
- Yu, Jialin, & McCullough, P. E. (2016). Efficacy and Fate of Atrazine and Simazine in Doveweed (*Murdannia nudiflora*). *Weed Science*, 64(3), 379–388. <https://doi.org/10.1614/WS-D-15-00180.1>
- Yusoff, I. M., Mat Taher, Z., Rahmat, Z., & Chua, L. S. (2022). A review of ultrasound-assisted extraction for plant bioactive compounds: Phenolics, flavonoids, thymols, saponins and proteins. *Food Research International*, 157, 111268. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111268>
- Zahari, N. A. A. R., Chong, G. H., Abdullah, L. C., & Chua, B. L. (2020). Ultrasonic-Assisted Extraction (UAE) Process on Thymol Concentration from *Plectranthus Amboinicus* Leaves: Kinetic Modeling and Optimization. *Processes*, 8(3), 322. <https://doi.org/10.3390/pr8030322>
- Zhang, P., Zhao, R., Zhang, C., Li, T., & Ren, B. (2018). Solubility determination and correlation of cyromazine in sixteen pure solvents and mixing properties of solutions. *Fluid Phase Equilibria*, 475, 77–88. <https://doi.org/10.1016/j.fluid.2018.07.024>
- Zhang, Q., Yu, X., Chen, H., Dang, X., & Liu, X. (2022). Preparation and application of bimetallic coordination cluster Cu<sub>7</sub>M for dispersive solid phase extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons in lettuce. *Journal of Food Composition and Analysis*, 105080. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2022.105080>
- Zhao, P., Fan, S., Yu, C., Zhang, J., & Pan, C. (2013). Multiplug filtration clean-up with multiwalled carbon nanotubes in the analysis of pesticide residues using LC-ESI-MS/MS. *Journal of Separation Science*, 36(20), 3379–3386. <https://doi.org/10.1002/jssc.201300411>

- Zhao, Q., Li, H., Xu, Y., Zhang, F., Zhao, J., Wang, L., Hou, J., Ding, H., Li, Y., Jin, H., & Ding, L. (2015). Determination triazine pesticides in cereal samples based on single-hole hollow molecularly imprinted microspheres. *Journal of Chromatography A*, 1376, 26–34.  
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.12.021>
- Zhu, S.-Y., Guo, J.-Y., Li, J.-Y., Dai, X.-Y., Li, X.-N., & Li, J.-L. (2022). Lycopene ameliorates atrazine-induced pyroptosis in spleen by suppressing the Ox-mtDNA/Nlrp3 inflammasome pathway. *Food & Function*, 13(6), 3551–3560.  
<https://doi.org/10.1039/D1FO02857J>
- Zondo, S. G., & Mahlambi, P. (2022). Assessment of Herbicides Uptake by Soil and Translocation in to Different Maize Segments. *Agriculture (Pol'nohospodárstvo)*, 68(2), 87–96.  
<https://doi.org/10.2478/agri-2022-0008>