



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

Desarrollo y validación de una metodología para la determinación y cuantificación simultánea de 2,4-D y 2,4-DCP por medio de CLAR-UV-DAD con aplicación en experimentos de sorción en suelos.

TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA

PRESENTA
Laura García García



MÉXICO, D.F.

2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor: María del Rosario Covarrubias Herrera**

VOCAL: **Profesor: Georgina Artemisa Duarte Lisci**

SECRETARIO: **Profesor: Olivia Zamora Martínez**

1er. SUPLENTE: **Profesor: Carolina Flores Ávila**

2° SUPLENTE: **Profesor: Mariano Sánchez Castellanos**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

INSTITUTO DE GEOLOGÍA, UNAM

ASESOR DEL TEMA:

Dra. Olivia Zamora Martínez

SUSTENTANTE:

Laura García García

Índice

	página
1. Resumen.....	13
2. Objetivos.....	14
3. Antecedentes.....	15
3.1. Plaguicidas.....	15
3.1.1. Generalidades.....	15
3.1.2. Definición de plaguicida.....	16
3.1.3. Impacto ambiental.....	16
3.1.4. Clasificación de plaguicidas.....	18
3.2. Herbicidas.....	21
3.2.1. Historia.....	21
3.2.2. Definición de herbicida.....	22
3.2.3. Clasificación de herbicidas.....	22
3.2.4. Uso de herbicidas.....	25
3.3. Ácido 2,4-diclorofenoxiacético.....	26
3.3.1. Historia.....	26
3.3.2. Características del 2,4-D.....	26
3.3.3. Impacto ambiental del 2,4-D.....	28
3.3.4. Toxicidad.....	31
3.4. Cromatografía de líquidos de alta resolución.....	32
3.4.1. Generalidades.....	33
3.4.2. Fase estacionaria.....	34
3.4.3. Fase móvil.....	34
3.4.4. Aspectos teóricos.....	35
3.4.5. Parámetros cromatográficos.....	37
3.4.6. Instrumentación general.....	42
3.4.7. Diferentes métodos de la cromatografía de líquidos.....	51
3.5. Validación de métodos analíticos.....	58
3.5.1. Definiciones de validación.....	58
3.5.2. ¿Cuándo deben validarse los métodos?	59
3.5.3. Parámetros de desempeño a evaluar en un método de análisis.....	59

3.6.	Sorción.....	64
3.6.1.	Adsorción.....	64
3.6.2.	Isotermas de adsorción.....	64
3.6.3.	Modelos de isotermas.....	66
3.7.	Zonas de estudio.....	67
3.7.1.	Sitio de estudio No 1.....	69
3.7.2.	Sitio de estudio No 2.....	70
4.	Parte experimental.....	72
4.1.	Instrumentación.....	72
4.1.1.	Equipo y materiales.....	72
4.1.2.	Reactivos y disolventes.....	72
4.2.	Desarrollo del método cromatográfico.....	72
4.2.1	Condiciones cromatográficas para la determinación simultánea del 2,4-D y del 2,4-DCP.....	72
4.2.2.	Preparación de la fase móvil.....	73
4.2.3.	Preparación de las disoluciones estándar para las curvas de calibración.....	73
4.3.	Validación del método.....	74
4.3.1.	Intervalo lineal y de trabajo.....	74
4.3.2.	Precisión.....	74
4.3.3.	Exactitud.....	74
4.3.4.	Límite de detección experimental.	74
4.3.5.	Límite de cuantificación experimental.	75
4.3.6.	Recobros.....	75
4.3.6.1.	Muestras de origen ambiental.....	75
4.3.6.2.	Preparación de los extractos de suelo.....	75
4.3.6.3.	Análisis de extractos sin fortificar.....	75
4.3.6.4.	Análisis de extractos fortificados con 2,4-D y 2,4-DCP.....	76
4.4.	Aplicación del método cromatográfico.....	76
4.4.1.	Características de las muestras de suelo.....	76
4.4.2.	Preparación y caracterización de las muestras	76
4.4.3.	Experimentos de sorción: ensayos batch.....	76
4.4.4.	Cuantificación de los compuestos de interés.....	77
4.4.5.	Trazo de las isotermas de sorción.....	77
5.	Resultados y discusión.....	78

5.1.	Desarrollo del método.....	78
5.1.1.	Selección de la longitud de onda de trabajo.....	78
5.1.2.	Selección de las fases estacionaria y móvil.....	79
5.1.3.	Parámetros cromatográficos del sistema.....	81
5.2.	Validación del método.....	82
5.2.1.	Linealidad.....	82
5.2.2.	Limite de detección experimental.....	85
5.2.3	Limite de cuantificación experimental.....	87
5.2.4.	Precisión.....	88
5.2.5	Exactitud.....	90
5.3.	Análisis de muestras fortificadas con 2,4-D y 2,4-DCP.....	92
5.3.1.	Recobros de 2,4-D y 2-4DCP en CaCl ₂ 8mM.....	92
5.3.2	Evaluación de interferencias en extractos de suelo en CaCl ₂ 8mM en ausencia de 2,4-D y 2,4-DCP.....	94
5.3.2.1.	Sitio de estudio #1.....	94
5.3.2.2.	Sitio de estudio #2.....	94
5.3.3.	Evaluación del recobro de 2,4-D y 2,4DCP en extractos de suelo.....	95
5.4.	Aplicación del método desarrollado.....	105
5.4.1.	Isotermas de sorción.....	106
6.	Conclusiones.....	111
7.	Referencias.....	113

Índice de tablas

N° de tabla		Pág
3.1	Clasificación de los pesticidas según su campo de acción.....	18
3.2	Clasificación de plaguicidas con base a su toxicidad.....	19
3.3	Clasificación de plaguicidas con base a distintos criterios.....	20
3.4	Clasificación de plaguicidas con base a su persistencia.....	21
3.5	Características físicas y químicas del 2,4-D y 2,4-DCP.....	28
3.6	Longitudes de onda mínimas de trabajo en la zona del UV para disolventes en CLAR.....	47
3.7	Reactivos fluorescentes y sus reactivantes.....	49
3.8	Parámetros recomendados a evaluar según el tipo de método de análisis a utilizar.....	60
3.9	Modelos de isotermas más usados en química de suelos.....	67
3.10	Zonas con mayor uso de plaguicidas en México, 2000.....	69
3.11	Características fisicoquímicas del sitio de muestreo 1.....	70
3.12	Características fisicoquímicas del sitio de muestreo 2.....	71
5.1	Características de la columna cromatográfica.....	79
5.2	Tiempos de retención obtenidos para 2,4-D y 2,4-DCP al evaluar tres composiciones de fase móvil.....	80
5.3	Condiciones de trabajo del método desarrollado.....	81
5.4	Parámetros cromatográficos del método desarrollado.....	81
5.5	Parámetros estadísticos de la validación del método de cuantificación de 2,4-D.....	83
5.6	Parámetros estadísticos de la validación del método de cuantificación de 2,4-DCP.....	85
5.7	Parámetros estadísticos de la curva de calibración para la determinación del LOD para 2,4-D y 2,4-DCP.....	86

5.8	Limite de detección del método desarrollado para el análisis de 2,4-D.....	86
5.9	Limite de detección del método desarrollado para el análisis de 2,4-DCP.....	86
5.10	Límite de cuantificación del método desarrollado para el análisis de 2,4-D.....	87
5.11	Límite de cuantificación del método desarrollado para el análisis de 2,4-DCP.....	87
5.12	Coeficiente de variabilidad del área de pico para una concentración de 0.5 y 5.0 ppm de 2,4-D y 2,4-DCP.....	89
5.13	Criterios de precisión en términos de repetibilidad y reproducibilidad	90
5.14	Parámetros estadísticos de la curva de calibración para la determinación de las concentraciones experimentales para 2,4-D y 2,4-DCP.....	91
5.15	Determinación del grado de exactitud del sistema de análisis para 2,4-D y 2,4-DCP.....	91
5.16	Resultados obtenidos al fortificar una disolución de CaCl ₂ 8mM con 2,4-D.....	93
5.17	Resultados obtenidos al fortificar una disolución de CaCl ₂ 8mM con 2,4-DCP.....	93
5.18	Resultados de los extractos ambientales sin fortificar del sitio de estudio #1.....	94
5.19	Resultados de los extractos ambientales sin fortificar del sitio de estudio #2.....	95
5.20	Resultados de los extractos fortificados del sitio de estudio #1 con una concentración equivalente a 0.5 ppm de 2,4-D.....	97
5.21	Resultados de los extractos fortificados del sitio de estudio #1 con una concentración equivalente a 0.5 ppm de 2,4-DCP.....	98
5.22	Resultados de los extractos fortificados del sitio de estudio #2 con una concentración equivalente a 0.5 ppm de 2,4-D.....	99
5.23	Resultados de los extractos fortificados del sitio de estudio #2 con	

	una concentración equivalente a 0.5 ppm de 2,4-DCP.....	100
5.24	Resultados de los extractos fortificados del sitio de estudio #1 con una concentración equivalente a 5 ppm de 2,4-D.....	101
5.25	Resultados de los extractos fortificados del sitio de estudio #1 con una concentración equivalente a 5 ppm de 2,4-DCP.....	102
5.26	Resultados de los extractos fortificados del sitio de estudio #2 con una concentración equivalente a 5 ppm de 2,4-D.....	103
5.27	Resultados de los extractos fortificados del sitio de estudio #2 con una concentración equivalente a 5 ppm de 2,4-DCP.....	104
5.28	Criterios de aceptación en cuanto a los valores de recobro obtenidos con respecto al nivel de concentración de trabajo.....	105
5.29	Valores de n y K_f obtenidos para cada uno de los suelos evaluados al utilizarse 2,4-D y 2,4-DCP como analitos de estudio.....	108

Índice de figuras

N° de figura		Página
3.1	Procesos que afectan a los plaguicidas en el medio ambiente....	17
3.2	Estructura del 2,4-D.....	27
3.3.	Estructura de la hormona auxina.....	27
3.4	Principales metabolitos del 2,4-D.....	30
3.5	Representación que muestra algunos parámetros cromatográficos.....	38
3.6	Ejemplos de resolución entre dos picos cromatográficos.....	40
3.7	Cromatografo de líquidos de alta resolución del laboratorio de agua del Instituto de Geología, UNAM.....	42
3.8	Columna estándar y precolumna para HPLC. Visión exterior y diferentes elementos separados y ensamblados de una columna ZORBAX®.....	45
3.9	Principio del detector de fila de diodos.....	48
3.10	Guía para la selección de diferentes técnicas cromatográficas que utilizan una fase móvil líquida.....	51
3.11	Tipos de isothermas de adsorción.....	65
3.12	Municipio Centro, Tabasco.....	70
3.13	Municipio Teapa, Tabasco.....	71
5.1	Espectro de absorción en el ultravioleta de 2,4-D.....	78
5.2	Espectro de absorción en el ultravioleta de 2,4-DCP.....	79
5.3	Cromatograma obtenido con las condiciones óptimas de trabajo para una concentración de 10 ppm de 2,4-D y 2,4-DCP.....	81
5.4	Curva de calibración obtenida para la cuantificación de 2,4-D en muestras acuosas ($\lambda=225$ nm).....	82
5.5	Curva de calibración obtenida para la cuantificación de 2,4-DCP en muestras acuosas ($\lambda=225$ nm).....	84

5.6	Cromatograma obtenido para una misma muestra de extracto de suelo tratada con diferentes niveles de concentración de 2,4-D y 2,4-DCP.....	96
5.7	Isotermas de sorción de 2,4-D y 2,4-DCP para el modelo lineal.....	106
5.8	Isotermas de sorción de 2,4-D y 2,4-DCP para el modelo de Freundlich.....	107
5.9	Isotermas de sorción de 2,4-D y 2,4-DCP para el modelo de Langmuir.....	107





1. RESUMEN

En la actualidad una de las principales preocupaciones ambientales es la preservación de la buena calidad de los recursos naturales. Como consecuencia de la necesidad de evaluar y posiblemente prevenir la contaminación de suelos y aguas subterráneas. En el presente trabajo se propone una metodología analítica para la determinación y cuantificación simultánea del ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), pesticida ampliamente utilizado en México, y del 2,4-diclorofenol (2,4-DCP), su principal metabolito, mediante la técnica de cromatografía de líquidos de alta resolución con detección ultravioleta con arreglo de diodos (CLAR-UV-DAD), con la cual fue posible determinar las concentraciones remanentes de estos dos compuestos en experimentos de sorción tipo batch con dos tipos de suelo (vertisol y fluvisol), para finalmente trazar las isotermas de sorción correspondientes. Los resultados del proceso de validación muestran que el método desarrollado es adecuado para los fines previstos ya que cumple con los criterios de aceptación determinados. Los resultados obtenidos muestran que las isotermas de ambos compuestos se ajustan al modelo de Freundlich, pues se obtienen coeficientes de correlación cercanos a la unidad, sin embargo, la retención de los analitos es diferente ya que el parámetro K_f para el 2,4-DCP es mayor respecto al 2,4-D, siendo este último el que presenta un mayor riesgo de contaminación a aguas subterráneas, ya que presenta una mayor movilidad con respecto al 2,4-DCP por tener una constante de afinidad por los suelos mucho más baja.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

- Desarrollar y validar una metodología que permita la determinación y cuantificación simultánea del ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y de su principal producto de degradación el 2,4-diclorofenol (2,4 DCP).

2.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Encontrar las condiciones óptimas para el análisis cromatográfico de estos dos compuestos como son: el tipo de fase estacionaria, la composición de la fase móvil y longitud de onda de trabajo.
- Determinar los parámetros que caracterizan el sistema cromatográfico de estudio como son: retención, selectividad y eficiencia.
- Determinar los parámetros de validación típicos como son: intervalo lineal y de trabajo, precisión, exactitud, límite de detección y de cuantificación.
- Demostrar que el método propuesto es el adecuado para la cuantificación de estos dos compuestos en extractos de suelos.
- Utilizar esta metodología para evaluar la interacción de estos dos compuestos en suelos tipo fluvisol y vertisol.

3. ANTECEDENTES

3.1 Plaguicidas

3.1.1 Generalidades

Desde 1950 la producción agrícola se ha ido incrementando continuamente a un ritmo que ha superado con creces el tan importante aumento de la población. Este incremento se ha logrado principalmente, con el aumento del rendimiento por superficie, es decir, consiguiendo una mayor producción por cada hectárea cultivada. Dicho incremento de la productividad se ha desarrollado con la difusión de nuevas prácticas agrícolas que utilizan grandes cantidades de fertilizantes y plaguicidas. Los beneficios alcanzados por esta mejora agrícola son indiscutibles, pero han surgido diversos problemas entre los que destacan los daños al medio ambiente.

La mayor parte de los plaguicidas son producidos por el hombre y son extraños a los ciclos biológicos; esto explica que un número importante de ellos no sean biodegradados y sólo puedan ser parcialmente eliminados por los organismos vivos, luego de ser incorporados por distintas vías a su proceso metabólico, determinando de esta manera, su acumulación a lo largo de la cadena trófica alimentaria.¹

La utilización de plaguicidas ofrece ventajas importantes para el rendimiento de los cultivos, lo que hace que sea muy difícil prescindir de éstos en la práctica agrícola, no obstante, se debe tener en cuenta que se trata de sustancias que se deben utilizar con las adecuadas medidas de seguridad para evitar la toxicidad directa en los manipuladores de estos productos, como también su difusión en el medio ambiente y su posible llegada a los consumidores de alimentos contaminados, con sus potenciales efectos tóxicos en humanos y animales.²

Los informes de las Naciones Unidas estiman que de todos los plaguicidas usados en la agricultura, menos del 1% alcanza los cultivos, mientras que el resto termina contaminando el suelo, el aire y, principalmente, el agua.³

3.1.2 Definición de Plaguicida

La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (*FAO* por sus siglas en inglés) define como plaguicida a “cualquier sustancia destinada a prevenir, destruir, atraer, repeler o combatir cualquier plaga, incluidas las especies indeseadas de plantas o animales, durante la producción, almacenamiento, transporte, distribución y elaboración de alimentos, productos agrícolas o alimentos para animales, o que pueda administrarse a los animales para combatir ectoparásitos”. El término incluye las sustancias destinadas a utilizarse como reguladores del crecimiento de las plantas, defoliantes, desecantes, agentes para reducir la densidad de fruta o inhibidores de la germinación, y las sustancias aplicadas a los cultivos antes o después de la cosecha para proteger el producto contra el deterioro durante el almacenamiento y transporte. El término no incluye normalmente los fertilizantes, nutrientes de origen vegetal o animal, aditivos alimentarios ni medicamentos para animales.⁴

Por otro lado, en la NOM-045-SSA1-1993, se define plaguicida como “cualquier sustancia o mezcla de sustancias que se destinan a controlar cualquier plaga, incluidos los vectores de enfermedades humanas y de animales, así como las especies no deseadas que causen perjuicio o que interfieran con la producción agropecuaria y forestal, por ejemplo, las que causan daño durante el almacenamiento o transporte de los alimentos u otros bienes materiales, así como las que interfieran con el bienestar del hombre y de los animales. Se incluyen en esta definición las sustancias defoliantes, las desecantes y los coadyuvantes”.⁵

3.1.3 Impacto ambiental

El uso irracional de los plaguicidas puede causar la intoxicación de trabajadores, la presencia de niveles elevados de plaguicidas en tejidos de especies animales, la contaminación de suelos y de cuerpos de agua. En lugares donde se han aplicado plaguicidas, éstos pueden llegar a cuerpos de agua por escurrimiento, infiltración y erosión de los suelos. También pueden movilizarse por transporte tanto atmosférico como por escurrimiento durante lluvias o riego agrícola y, de esta manera, transportarse

hacia cuerpos de agua, tanto superficiales como subterráneos, hasta contaminar agua y sedimentos. En el suelo, el comportamiento de los plaguicidas depende directamente de las propiedades de éste y de las propiedades físico-químicas de los compuestos.^{6,7} La vulnerabilidad de los acuíferos a un gran número de plaguicidas o a sus productos de degradación, ha sido detectada desde la década de los 80s; este tipo de contaminación es a largo plazo y complejo, afectado por procesos de física del suelo, (bio) química, propiedades hidrogeológicas, condiciones climáticas y prácticas agrícolas (Figura 3.1).⁸

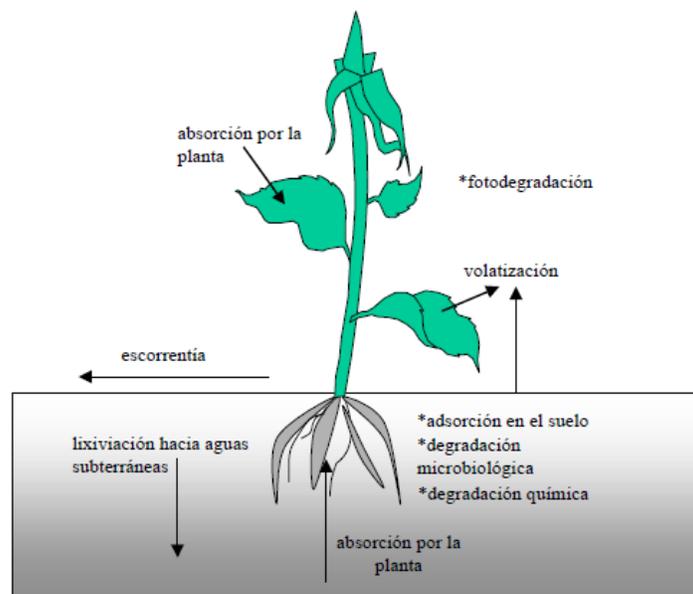


Figura 3.1. Procesos que afectan a los plaguicidas en el medio ambiente.

Para entender cómo se comporta un plaguicida en el ambiente, se deben conocer sus propiedades físicas y químicas además del mecanismo de transporte. Para ello es importante tener en cuenta su presión de vapor, que determina su volatilidad, su solubilidad en agua, que influye en su infiltración en el suelo hacia los mantos acuíferos, su coeficiente de reparto octanol/agua, que permite conocer su capacidad de penetrar a través de las membranas biológicas y de acumularse en el tejido adiposo, así como su persistencia, que indica cual es la vida media de las sustancias en el ambiente conservando sus propiedades tóxicas. Otros factores a considerar, son las características medio ambientales y la geografía del lugar en el que se le encuentra.⁹

3.1.4 Clasificación de plaguicidas

Actualmente, la clasificación de los pesticidas se puede hacer en función de diferentes criterios como su campo de acción, grado de penetración, estabilidad, toxicidad, semejanza química, etc. Una clasificación bastante extendida en su uso diario es la generada atendiendo al objetivo o campo de acción al que están destinados. Siguiendo este criterio, la EPA (Agencia de Protección Ambiental), entre otros, clasifica a los plaguicidas como se describe en la Tabla 3.1.¹

Tabla 3.1. Clasificación de los pesticidas según su campo de acción.

Tipo de plaguicida	Organismo objeto
Acaricidas	Ácaros
Antibióticos	Microorganismos
Alguicidas	Algas
Avicidas	Aves
Bactericidas	Bacterias
Defoliantes	Hojas de plantas
Desinfectantes	Microorganismos
Fumigantes	Plagas en edificios, suelos, etc.
Fungicidas	Hongos
Herbicidas	Plantas
Insecticidas	Insectos
Larvicidas	Larvas de insectos
Molusquicidas	Moluscos
Nematocidas	Nemátodos
Ovicidas	Huevos de insecto
Pisticidas	Peces
Repelentes	Insectos, aves
Rodenticidas	Roedores

La OMS (Organización Mundial de la Salud), por su parte, recomienda clasificar a los pesticidas en función de su toxicidad (The WHO recommended classification of

pesticides by hazard, 2004), atendiendo a dos posibles vías de contacto (oral y tópica) y a la formulación del producto (sólido o líquido), tal como muestra la Tabla 3.2.¹⁰

Tabla 3.2. Clasificación de plaguicidas con base a su toxicidad (OMS).

Clasificación	DL ₅₀ en ratas (mg/kg de peso de animal)			
	Vía Oral		Vía tópica	
	Sólidos	Líquidos	Sólidos	Líquidos
Extremadamente tóxicos	≤ 5	≤ 20	≤ 10	≤ 40
Altamente tóxicos	5-50	20- 200	10- 100	40-400
Moderadamente tóxicos	50-500	200- 2000	100- 1000	400-4000
Ligeramente tóxicos	>500	>2000	>1000	>4000

Esta clasificación toxicológica de los plaguicidas se realiza atendiendo básicamente a su toxicidad aguda, expresada en DL₅₀ (dosis letal al 50 por 100) por vía oral o tópica en rata.

Por su parte la Secretaría de Marina y Recursos Naturales hace una clasificación de los plaguicidas con base en distintos criterios.¹¹

Tabla 3.3. Clasificación de plaguicidas con base en distintos criterios (SEMARNAT).

Criterios para la clasificación de plaguicidas	Concentración	a) Ingrediente activo	Compuesto químico que ejerce la acción plaguicida.
		b) Plaguicida técnico	La máxima concentración del ingrediente activo obtenida como resultado final de su fabricación, de la cual se parte para preparar un plaguicida formulado.
		c) Plaguicida formulado	Mezcla de uno o más plaguicidas técnicos, con uno o más ingredientes conocidos como "inertes", cuyo objeto es dar estabilidad al ingrediente activo o hacerlo eficaz.
	Organismos que controlan	Insecticidas, bactericidas, acaricidas, molusquicidas, rodenticidas, avicidas, fungicidas, herbicidas, nematocidas, ovicidas.	
	Modos de acción	De contacto, de ingestión, sistémicos, fumigantes, repelentes, defoliantes, entre otros.	
	Composición química	Organoclorados, carbamatos, dinitrofenoles, piretroides, carboxamidas, triazinas, organoazufrados, ftalimidas, derivados de la urea, aceites minerales, organoestánicos, compuestos de cobre, clorofenoxi, bipiridilicos, guanidinas y naftoquinonas, derivados de los ácidos tricloroacético y tricloropicolínico.	
	Formulaciones comerciales	Sólidos (polvos y granulados), líquidos, gases.	
Uso al que se destinan	Agrícola, forestal, urbano, para jardinería, pecuario, doméstico, industrial, entre otros.		

Finalmente, según el tiempo de vida media del plaguicida, es decir, a su persistencia, se ha propuesto la siguiente clasificación.¹²

Tabla 3.4. Clasificación de plaguicidas con base en su persistencia.

Tipo	Tiempo	Ejemplos
No persistentes	0-2 semanas	Malation
Moderadamente persistentes	1-18 meses	Atrazina, 2,4-D
Persistentes	menos de 20 años	DDT
Permanentes	más de 20 años	Arsenicales y mercuriales

3.2 Herbicidas

3.2.1 Historia

Sales inorgánicas, tales como el sulfato de cobre, se usaron para el control de malezas de hoja ancha en cereales hacia fines del siglo XIX, pero el primer herbicida orgánico, el DNOC (dinitro-ortocresol), no fue introducido sino hasta 1932. El uso extensivo de herbicidas de dosis relativamente bajas comenzó en 1945 con el lanzamiento de los herbicidas reguladores de crecimiento, dentro de los que destacan el 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) y el MCPA (ácido 2-metil-4-cloro fenoxiacético). El éxito de éstos condujo a una intensificación de la investigación y las inversiones, lo cual, a su vez, produjo nuevos grupos de herbicidas y compuestos en desarrollo.

Los herbicidas destruyen las malezas interfiriendo los procesos bioquímicos, como la fotosíntesis, que tiene lugar en el simplasto o sistema vivo de la planta. Para que la acción del herbicida tenga lugar deberá haber suficiente cantidad de ingrediente activo del compuesto para que éste entre en la maleza y sea transportado hacia el lugar de acción adecuado.¹³

3.2.2 Definición de herbicida

Etimológicamente la palabra herbicida proviene del latín y se compone de dos vocablos; “herbi” que significa hierba y “cida”, que significa matar. En general, los herbicidas son un tipo de plaguicida, que se definen como compuestos químicos utilizados por el hombre para luchar contra la maleza o las “malas hierbas” o bien, como una sustancia o mezcla de sustancias utilizadas para matar o inhibir el crecimiento de plantas consideradas como indeseables.

3.2.3 Clasificación de herbicidas¹⁴

Los herbicidas pueden ser clasificados según sus características toxicológicas y químicas, según su modo de acción y el tipo de tratamiento a realizar. Un mismo compuesto químico puede ser empleado con distintos fines variando el momento de aplicación y la dosis, o asociándolo a otros compuestos, por lo cual existen diversas clasificaciones con base en distintos criterios:

a) Selectividad

Con base en esta propiedad se pueden clasificar en selectivos y no selectivos.

Los *herbicidas no selectivos* se utilizan cuando es necesario un control total durante un largo período de tiempo, como es el caso de la eliminación de plantas en los bordes de carreteras, vías del tren y corredores de líneas de alta tensión, donde no se necesita un herbicida que distinga entre tipos de plantas. Por el contrario, los *herbicidas selectivos* destruyen las malas hierbas sin afectar a las plantas cultivadas.

b) Forma de aplicación

Atendiendo a la dirección o destino del herbicida aplicado se clasifican en:

- Herbicidas aplicados por vía foliar. En este tratamiento, la acción herbicida depende de la cantidad de producto retenido por las plantas, y por tanto, de la superficie de las hojas.
- Herbicidas aplicados al suelo. La eficacia de los herbicidas aplicados al suelo depende de su grado de adsorción a las partículas coloidales de éste, puesto que la adsorción limita el acceso a las raíces y a las semillas de las hierbas. El

factor de mayor importancia en la adsorción de herbicidas retenidos por el suelo es el contenido de materia orgánica en éste.

c) Modo de acción

En función de su modo de acción se clasifican en:

- Herbicidas que actúan por contacto. Los herbicidas de contacto destruyen los tejidos de las plantas por una fitotoxicidad o causticidad directa. Se utilizan cuando se puede rociar únicamente la mala hierba, puesto que hay que evitar que entre en contacto con la planta de la cosecha.
- Herbicidas que actúan por traslocación y acción bioquímica. Una vez que penetran en la planta, estos herbicidas se trasladan a través del floema o xilema, sistemas vasculares de las plantas, a los cuales concierne el transporte de compuestos a largas distancias, hasta aquellos lugares críticos más o menos distantes de la zona de aplicación donde se produce su acción tóxica. Se absorben por las hojas o por las raíces y producen reacciones biológicas y trastornos fisiológicos y/o morfológicos.

d) Época de aplicación

Tomando como referencia el estado del desarrollo del cultivo y su época de aplicación, se pueden clasificar en herbicidas de:

- Presiembra, que se aplican antes de la siembra del cultivo, normalmente mediante métodos mecánicos. Estas sustancias poseen la actividad en suelo denominada comúnmente como “*soil-acting*” y sirven para esterilizar el suelo de todo tipo de plantas.
- Pre-emergencia, la aplicación se realiza después del sembrado de la cosecha pero antes de su germinación. En este caso, el herbicida se ha de elegir cuidadosamente para evitar dañar también la cosecha.
- Post-emergencia, se utilizan tras la germinación del cultivo. A su vez se puede distinguir entre post-emergencia temprana, si se aplica en las primeras fases del desarrollo del cultivo, post-emergencia tardía y pre-recolección, cuya finalidad en muchos casos es el control de malas hierbas perenes.

f) Superficie tratada

En función de cómo se aplica el herbicida en la superficie tratada se puede distinguir entre:

- Aplicaciones totales, si el herbicida se aplica uniformemente en toda el área de cultivo.
- Aplicaciones en bandas, cuando el herbicida se aplica solamente en las bandas en que se siembra el cultivo.
- Aplicaciones dirigidas, se aplican a las hierbas o al suelo en zonas muy localizadas pero de forma que no alcancen a las plantas cultivadas.

g) Estructura química

Con base en la estructura química, los herbicidas pueden ser clasificados en los siguientes grupos:

- compuestos inorgánicos
- fenoxiácidos y derivados
- cloroacetamidas
- fenoles y cresoles
- carbamatos
- diazinas y triazinas
- amidas
- derivados de la urea
- derivados de la glicina
- derivados del amonio cuaternario
- halogenados de ácidos grasos
- benzonitrilos
- dicamba y
- asociaciones de varios de los compuestos anteriores, etc.

3.2.4 Uso de herbicidas

En los países industrializados los herbicidas se aplican entre el 85 y 100% de todos los cultivos principales. En países menos desarrollados, el precio relativamente bajo obtenido por los productos agrícolas en los mercados mundiales y el bajo costo de la mano de obra reducen los beneficios económicos del uso de herbicidas.

Principalmente la utilización de herbicidas se debe al elevado costo que implica el crecimiento de la maleza sobre los cultivos ya que compiten entre ellos por el agua, los nutrientes y la luz, propiciando de esta manera enfermedades y el desarrollo de insectos perjudiciales para las plantas de cultivo. Como resultado se observa una reducción del rendimiento del cultivo y la ganadería así como en sus respectivos productos.¹⁵

La tendencia hacia el empleo de herbicidas se intensifica en todo el mundo, incluyendo los países en desarrollo. En México por ejemplo, aunque la producción de plaguicidas ha disminuido gradualmente, el consumo aparente de estos compuestos excedió las 6,700 toneladas en 2009. Hoy en día, los herbicidas entre los que se encuentran el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), el 3,6-dicloro-2-ácidometoxibenzoico (dicamba) y el 2-cloro-4-etilamino-6-isopropilamino-1,3,5-triazina (atrazina) se utilizan en una amplia variedad de cultivos para la eliminación selectiva de hierbas y otras plantas indeseables.

Los herbicidas anteriormente descritos pueden causar daños en el sistema nervioso central de los seres humanos en altas concentraciones. La contaminación del agua por la utilización de herbicidas ha provocado que en las últimas décadas se haya generalizado la preocupación por los posibles efectos negativos en la salud humana y en la ecología.¹⁶

3.3 Ácido 2,4-diclorofenoxiacético

3.3.1 Historia

El ácido 2,4-diclorofenoxiacético, conocido como 2,4-D, fue lanzado comercialmente en 1945 por la compañía Dow. Fue desarrollado originalmente para aumentar el crecimiento de las plantas, sin embargo, pronto se descubrió que tenía un rol aún más útil en la agricultura, ya que era capaz de controlar el crecimiento de las malezas, y rápidamente se transformó en el herbicida más usado del mundo. Su descubrimiento representó un logro para la ciencia de la agricultura ya que dio paso a la creación de herbicidas selectivos, siendo de gran ayuda para el control o eliminación de malezas en cultivos, así como también en jardinería e instalaciones deportivas.¹⁷

Después de 50 años de uso, el 2,4-D continúa siendo uno de los herbicidas más utilizados en Estados Unidos y Canadá, y uno de los de mayor uso en el mundo. En México es el herbicida más usado debido a su permanencia en el mercado de plaguicidas, ya que a diferencia de otros países que lo consideran tóxico y que han prohibido su comercialización, continúa en el mercado.

El 2,4-D está liberado de patente desde hace bastantes años y hay muchas empresas que lo fabrican y venden en todo el mundo; Dow Agro Sciences es el mayor productor.¹⁸

3.3.2 Características del 2,4-D

Al ácido 2,4-diclorofenoxiacético (Figura 3.2), se le clasifica dentro del grupo de los herbicidas fenoxi o fenoxiacéticos o clorofenoxi o fenoxiácidos. Es un regulador del crecimiento de las plantas y un herbicida sintético utilizado principalmente en la agricultura para controlar las malezas en campos de trigo y maíz y en los huertos para evitar que la fruta caiga prematuramente. Además, el 2,4-D tiene muchos usos no agrícolas, se utiliza para controlar las malezas en los bosques, pastizales o praderas, parques, campos deportivos, estanques y lagos, y para limpiar la tierra de las carreteras y vías férreas.^{8, 19}

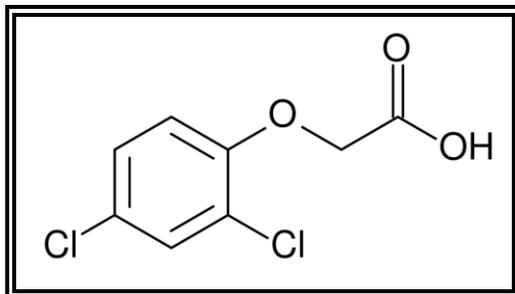


Figura 3.2. Estructura del 2,4-D.

El 2,4-D es un herbicida sistémico debido a que se absorbe por las hojas o la raíz y se transporta por la savia a todo el cuerpo alcanzando los tejidos internos y partes no rociadas. Se acumula en las regiones de crecimiento e induce malformaciones que matan a la planta.

Es considerado uno de los primeros herbicidas “selectivos” pues afecta más a las plantas de hoja ancha y causa poco daño a los de hoja angosta; su mecanismo de acción afecta solamente a plantas de tipo dicotiledóneas, dejando a las monocotiledóneas sin ningún daño.

Por su modo de acción, al 2,4-D se le incluye dentro de los “herbicidas hormonales” ya que actúa de modo parecido a la hormona natural auxina o ácido indol-3-acético (AIA) (Figura 3.3). Las plantas de manera natural producen hormonas -que son sustancias químicas que actúan de manera precisa y en cantidades muy pequeñas- y su concentración es regulada por la propia planta; en el caso de la auxina es una hormona que regula el sano crecimiento y desarrollo vegetal, pero en su forma sintética y a una concentración mucho mayor provoca la muerte de la planta ya que no encuentra un mecanismo de control interno.^{17, 19, 20, 21}

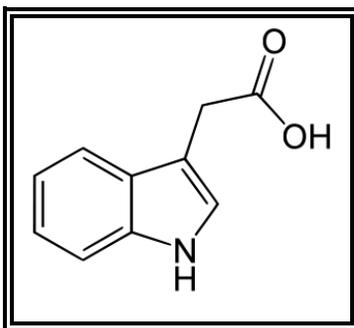


Figura 3.3. Estructura de la hormona auxina.

El 2,4-D se produce de diversas formas, incluyendo su forma como ácido, pero al ser ésta muy volátil y corrosiva los productos comerciales se formulan como sales aminas o ésteres del ácido, existiendo ésteres de baja y alta volatilidad. Las formulaciones en que se encuentra el 2,4-D, incluyen líquidos (disoluciones acuosas, emulsiones), polvos solubles en agua, polvos, granulados y pellets de 2,4-D solo o en mezclas con otros herbicidas.¹⁷

Tabla 3.5. Características físicas y químicas del 2,4-D y 2,4-DCP.²²

Propiedad	2,4-D	2,4-DCP
Número CAS	94-75-7	120-83-2
Apariencia y estado físico	Sólido cristalino de color blanco a marrón	Sólido cristalino color marrón claro
Presión de vapor ^a	1.9x10 ⁻⁵ Pa 1.4x10 ⁻⁷ mmHg	0.1 hPa 0.1 mmHg
Masa molecular	221	163
Solubilidad en agua	682 mg/l (25°C)	0.45 g/100 g
Log K _{ow} a 20 °C	2,53-2,58	3,23
pKa	2.64	7,8

^aPresión de vapor medida a 25°C.

3.3.3 Impacto ambiental del 2,4-D

Los residuos y productos de degradación y/o transformación de los herbicidas fenoxiácidos, clase a la cual pertenece el 2,4-D, son relativamente móviles en el medio ambiente y causan la contaminación de suelo, aire, agua superficial y subterránea. De esta forma, constituyen un riesgo potencial para la salud humana a través de la exposición directa o mediante los residuos presentes en alimentos y agua potable. Además, son relativamente persistentes debido a la estabilidad que le confiere el anillo aromático de su estructura, aunque se degradan fácilmente por la luz o el calor y la presencia de grupos polares carboxi e hidroxilo, que tienden a facilitar su degradación biológica. Su persistencia en el medio ambiente depende de cómo se encuentran formulados, pero normalmente suele estar comprendida entre 5 y 25 semanas.²³

En el caso del 2,4-D, distintas cantidades de productos a base de éste son aplicados en un área establecida como blanco y pueden distribuirse en el medio ambiente en el curso de unas pocas horas o días, debido a los movimientos del aire, el agua o el suelo, especialmente en épocas de lluvia, vientos fuertes o alta temperatura. La movilidad de este herbicida se puede dar en diferentes medios:

- **Aire**

El 2,4-D tiene la posibilidad de desplazarse más allá del lugar designado como blanco. Puede producirse un desplazamiento localizado inmediato y también nubes de 2,4-D volatilizado.

- **Suelo**

El 2,4-D tiene una vida media relativamente corta y dependiendo del tipo de suelo y de su contenido de materia orgánica con el cual interactúe, puede permanecer inmóvil, ser tomado por las plantas objetivo de la aplicación o lixivarse.

La materia orgánica, el pH del suelo y el aluminio intercambiable son los principales determinantes del porcentaje de 2,4-D adsorbido. Es probable que el 2,4-D se una fuertemente a suelos con un alto contenido de materia orgánica que a aquellos con un contenido bajo. En suelos con elevada acidez o en suelos de regiones frías o áridas, la degradación del 2,4-D es aparentemente lenta. Mientras que la mineralización del 2,4-D en suelos arcillosos es más alta que en suelos de textura franca arcillosa bajo condiciones anaeróbicas. Se ha observado que la degradación avanza con mayor lentitud en el suelo que se encuentra bajo los árboles.

El tiempo de vida media del 2,4-D en suelos se ha estimado, a una temperatura de 20°C y en condiciones de humedad del 60%, entre 7 y 10 días. El 2,4-D es degradado fácilmente por los microorganismos del suelo a través de reacciones de hidrólisis, metilación y apertura de anillo aromático. Los metabolitos principales que se forman en el suelo son el 4-clorofenol, el 2,4-diclorofenol (2,4-DCP), el 2,4,5-triclorofenol (2,4,5-

DCP) y finalmente, formas inocuas. El tiempo de vida media de degradación de estos metabolitos se ha estimado entre 12 y 59 días.^{17, 23}

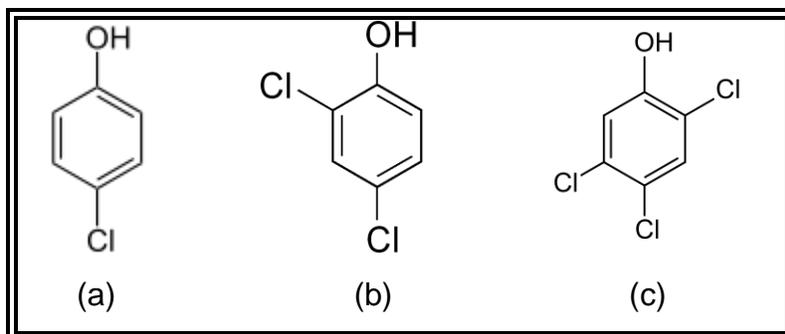


Figura 3.4. Principales metabolitos del 2,4-D: (a) 4-clorofenol, (b) 2,4-diclorofenol y (c) 2,4,5-triclorofenol.

El 2,4-diclorofenol, es el principal producto de degradación del 2,4-D y es uno de los compuestos fenólicos clasificados por la EPA dentro de las 275 sustancias más peligrosas en lo que a toxicidad se refiere.²⁴

- **Agua**

El 2,4-D tiene el potencial de contaminar cuerpos de agua subterránea. En el agua se descompone para formar 2,4-DCP, que puede causar problemas a los mamíferos. El uso de 2,4-D para controlar las malezas acuáticas contamina las fuentes de riego y de agua potable. También contamina las aguas marinas.

Según el tipo de suelo y debido a una solubilidad en agua relativamente alta, el 2,4-D puede ser débilmente adsorbido por las partículas del suelo y puede tener un potencial de lixiviación alto, por lo que se visualiza como una amenaza de contaminación de cuerpos de agua superficiales así como de agua subterránea.

La vida media del 2,4-D en el agua varía entre los 10 y 50 días. Los ésteres de 2,4-D se degradan con mayor rapidez en condiciones básicas y pueden persistir por más tiempo en aguas pobres en nutrientes.^{17, 25}

3.3.4 Toxicidad

El 2,4-D y sus derivados pueden ser absorbidos por vía oral, cutánea o por inhalación durante su fabricación, formulación o aplicación.

En la clasificación recomendada por la Organización Mundial de la Salud (OMS), el 2,4-D se ubica en la clase II: “moderadamente peligroso”; esto lo coloca en la misma clase que el endosulfán, el paraquat y el toxafeno.

En la clasificación de toxicidad de la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (USEPA) ocupa un rango que va desde la Clase I hasta la Clase III (en una escala de I a IV, en la que I corresponde a la mayor toxicidad). La sal dietilamina es la más tóxica de todas las formas del 2,4-D. El 2,4-D se considera ligeramente tóxico en forma oral (toxicidad clase III) y altamente tóxico en el caso de exposición de los ojos (toxicidad clase I). Aunque la LD₅₀ del 2,4-D sugiere que sólo es moderadamente tóxico, está etiquetado como altamente tóxico debido a incidentes relacionados con una grave irritación de la piel y de los ojos entre trabajadores agrícolas. El producto lleva la palabra PELIGRO en la etiqueta, para indicar que es altamente tóxico. La USEPA lo considera un contaminante marino. La Agencia Internacional de la Investigación sobre el Cáncer (que forma parte de la OMS) coloca a todos los herbicidas clorofenoxi, incluido el 2,4-D, dentro del Grupo 2B: posiblemente carcinogénico para los seres humanos.

El herbicida 2,4-D tiene efectos adversos en los procesos biológicos de los animales, alterando la producción de energía y agotando las moléculas de ATP. También inhibe enzimas de la mitocondria, del metabolismo de lípidos y de la síntesis de proteínas y aumenta la actividad de algunas enzimas de las células del músculo que se encargan del transporte de iones a través de las membranas.

Además, produce daños genéticos, disminuye la capacidad de la sangre para transportar oxígeno, altera la función normal del sistema hormonal, del sistema endócrino y del sistema nervioso, puesto que al enlazarse a la acetilcolina e inhibir la acetilcolinesterasa aumenta los niveles de serotonina.

En plantas y suelos, puede dañar hongos beneficiosos que promueven el crecimiento de determinadas especies de plantas, que aumentan su capacidad para tomar agua y nutrientes y que las previenen de enfermedades. El 2,4-D inhibe además el crecimiento y la capacidad de fijar nitrógeno de las bacterias *Rizobium* que se encuentran en las raíces de leguminosas.

El 2,4-D es neurotóxico. Se absorbe con facilidad a través de la piel o por inhalación y puede causar daños al hígado, a los riñones, a los músculos y al tejido cerebral.^{17, 21}

En México, la NOM-052-SEMARNAT-1993, establece que el 2,4-D se considera peligroso por su toxicidad al ambiente cuando se somete a la prueba de extracción para toxicidad conforme a la NOM-053-SEMARNAT-1993, y el lixiviado de la muestra representativa que contenga dicho herbicida tenga concentraciones mayores a 10 mg/l.²⁶

Mientras que la NOM-127-SSA1-1994, establece una concentración de 50 mg/l como límite permisible de calidad y tratamiento de potabilización del agua para uso y consumo humano.²⁷

3.4 Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución²⁸

La cromatografía es una técnica de separación, de amplio uso por las premisas en que se basa, por el gran desarrollo que ha tenido y por los beneficios en valorar un gran número de sustancias con exactitud, rapidez y alta resolución.

Un sistema cromatográfico está constituido por dos fases no miscibles, una estacionaria (sólido o líquido impregnado sobre un soporte) y una móvil (líquido, gas o fluido supercrítico). La fase estacionaria se encuentra empacada en una columna a través de la cual se hace fluir, en forma continua, la fase móvil; los componentes de la muestra presentan un equilibrio de distribución entre estas dos fases, y este equilibrio determina la velocidad con la cual cada componente migra a través del sistema.

Los métodos cromatográficos tienen varias modalidades de acuerdo a ciertos parámetros como son la fase móvil, la fase estacionaria, el propio fenómeno que ocurre en la columna y la cantidad de muestra aplicada. Cuando la fase móvil es un gas, se

llama cromatografía de gases; si es líquida se llama cromatografía de líquidos, en ésta última la fase móvil es el parámetro que gobierna la separación.

3.4.1 Generalidades^{28, 29, 30}

La cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR), utiliza una presión elevada para forzar el paso del disolvente por una columna que contiene partículas muy finas, consiguiendo así separaciones de gran resolución.

La combinación de disolventes de diferentes polaridades y el efecto de la presión en el sistema cromatográfico en la CLAR, han favorecido la separación de una gran cantidad de compuestos, de modo que ahora es un recurso instrumental que completa las aplicaciones de la cromatografía de gases.

Su campo de aplicación cubre una gran parte del ámbito de la cromatografía de gases a la que se le añade el correspondiente análisis de compuestos termosensibles o de aquellos con masas moleculares muy grandes o incluso polares. Su éxito se debe a la posibilidad de actuar de forma muy precisa sobre la selectividad entre los compuestos a través de la selección de la columna y de la composición del eluyente, es decir, el sacar partido de las interacciones disolución/fase móvil/fase estacionaria. La eficiencia de las columnas es menor que en cromatografía de gases, pero la utilización de fases quirales o de nuevas fases estacionarias que actúan siguiendo varios mecanismos, las técnicas de intercambio de iones o las de interacción hidrófoba, aumentan aún más las posibilidades de la CLAR. Por último la miniaturización de la técnica (nanocromatografía) ha facilitado su asociación con la espectrometría de masas.

En esta técnica cromatográfica, la fase móvil y el soluto compiten por los sitios de adsorción en la fase estacionaria, por lo tanto los componentes más fuertemente adsorbidos son retenidos por más tiempo que los que se adsorben débilmente. Los compuestos más polares se adsorben a una superficie polar en mayor grado que los compuestos menos polares, por lo tanto, la retención en una columna está en relación directa con la polaridad de la muestra y de la fase estacionaria utilizada.

3.4.2 Fase estacionaria^{28, 30}

La fase estacionaria consiste en partículas, generalmente sólidas, pequeñas y con una superficie microporosa; las hay de compuestos hidratados de sílica, de partículas de alúmina, de polímeros de silanos combinados con cadenas de C₈, C₁₀, C₁₈, etc. El tamaño de la partícula, puede ser de 3, 5 ó 10 µm.

Las partículas más finas se utilizan generalmente en las columnas más cortas y se necesitan presiones más altas para mover la fase móvil a través de la columna. El tamaño óptimo de partícula está en razón de la longitud de la columna, del número de platos, de la presión, de la viscosidad del eluyente y de la velocidad a la que se trabaja. Entre los diferentes tipos de materiales orgánicos e inorgánicos que sirven para el relleno de las columnas de CLAR, el gel de sílice, un sólido amorfo y rígido cuya fórmula es SiO₂(H₂O)_n (con n muy próximo a cero), se utiliza, convenientemente transformado en el 80% de las aplicaciones. Este material básico, es completamente diferente a la sílice natural cristalina (SiO₂), pero puede servir de materia prima para su síntesis, se prepara en forma de microesferas (porosas o no) con un diámetro muy regular de unos 2 a 5 µm. Estas partículas esféricas de dimensión homogénea aseguran un relleno compacto de las columnas, lo que evita la aparición de caminos preferenciales para la fase móvil.

El gel de sílice es un material muy polar que tiene una disposición de red tridimensional. No tiene la estructura ordenada de la sílice cristalina, aunque si adopta una disposición espacial tetraédrica alrededor de los cuatro enlaces del átomo de silicio. Es un polímero inorgánico reticulado que conlleva agrupaciones silanoles, de número variable, que han resistido a la fase de cocción. Estas agrupaciones son las responsables de las propiedades catalíticas ácidas de este material ya que el Si-OH tiene un pKa de 10.

3.4.3 Fase móvil^{28, 30}

La fase móvil está formada por disolventes de baja viscosidad y con baja absortividad. La interacción más o menos fuerte entre la fase estacionaria (normal o de polaridad inversa) y la fase móvil influye sobre los tiempos de retención de los solutos. La polaridad de la fase estacionaria permite distinguir dos situaciones iniciales:

-Si la fase estacionaria es polar, la cromatografía se denomina fase normal. En este caso se utilizará una fase móvil poco polar.

- Si la fase estacionaria es muy poco polar, la cromatografía se denomina en fase inversa, o cromatografía hidrófoba, y se utilizará una fase móvil polar (lo más utilizado son las mezclas de metanol o acetonitrilo con agua). Al modificar la polaridad de la fase móvil se actúa directamente sobre el coeficiente de distribución K (C_S/C_M), es decir, sobre el factor de retención k de los compuestos. Es el cromatografista el que debe hacer la buena elección en función de los compuestos que hay que separar. La formación de enlaces en las sílices modificadas conduce a una pérdida importante de polaridad. Con un eluyente polar, un compuesto polar migra más rápido que un compuesto apolar. En estas condiciones se retienen más los hidrocarburos. Se realizan gradientes de elución para disminuir la polaridad del eluyente durante la separación (por ejemplo, mezclas de agua/acetonitrilo) cuya concentración de acetonitrilo crece durante la elución), si la modalidad es fase reversa.

Hay cuatro tipos de interacciones entre las moléculas de disolvente y de soluto:

-iónico cuando el soluto y el disolvente tienen ambos momentos dipolares.

-de dispersión debida a la atracción entre sí de las moléculas vecinas.

-dieléctricas que favorecen la disolución de los solutos iónicos en los disolventes polares.

-por enlace de hidrógeno, cuando coinciden un soluto y un disolvente en forma que uno de ellos es donador y el otro aceptor de protones.

3.4.4 Aspectos teóricos²⁸

En la cromatografía de líquidos las separaciones se realizan en base a la diferente distribución de los solutos de una mezcla entre las fases estacionaria y móvil.

Esta distribución está representada por un equilibrio al que se asocia una constante que se llama *coeficiente de distribución*, que es la relación de equilibrio de distribución del soluto entre las dos fases:

$$S_m \rightleftharpoons S_{st} \quad K = \frac{[S]_{st}}{[S]_m} \quad (\text{Ec. 3.1})$$

Sm = Solute en la fase móvil

Sst = Solute en la fase estacionaria

K = Constante de equilibrio

[S]m = Concentración del soluto en la fase móvil

[S]st = Concentración del soluto en la fase estacionaria

Si los componentes de la mezcla tienen coeficientes de distribución diferentes, su velocidad de migración será distinta y podrán ser separados. Si un soluto tiene mayor afinidad por la fase estacionaria, su interacción será mayor, su coeficiente de distribución será mayor y viajará más lentamente. Los solutos con más afinidad por la fase móvil, migrarán más rápidamente, eluyendo primero.

A las condiciones en que se trabaja la cromatografía con fines analíticos, los coeficientes de distribución de los diferentes componentes son constantes y los solutos migran en forma de bandas simétricas que se representan por picos gaussianos; a esta representación gráfica se le llama cromatograma.

Al inyectar una muestra en una fase estacionaria, los solutos que constituyen dicha muestra están completamente mezclados. En la medida que la fase móvil va fluyendo, los componentes de la mezcla viajan en el sistema a diferentes velocidades y se van alejando unos de otros, de modo que cada componente constituye una banda distinta.

La calidad de una columna se juzga por el bajo grado de ensanchamiento de las bandas, pues esto es un índice de la posibilidad de lograr una buena separación; mientras más pequeño sea ese ensanchamiento la columna es más eficiente.

Esa eficiencia está vinculada con el número de platos teóricos (N), por esta razón se considera el movimiento de la fase móvil como una serie de pasos sucesivos y no como un desplazamiento continuo, lo cual permite calcular el perfil de distribución de cada especie en cada paso y en cada plato. Después de un cierto recorrido de la fase móvil por la columna, ese perfil tiene la forma de una curva de Gauss.

En este pico gaussiano, la anchura en varios niveles de su altura, se puede relacionar con la desviación estándar σ :

$$N = \left(\frac{t_r}{\sigma}\right)^2 \quad \text{(Ec. 3.2)}$$

En donde:

t_r = tiempo de retención

N= número de platos teóricos

σ = desviación estándar

En general, el número de platos teóricos es una contribución cinética y corresponde a la medida como está empacada la columna.

A medida que aumenta N, los picos son más estrechos y por lo tanto la columna será más eficiente. Pero como N también depende de la longitud de la columna (L), se emplea otro parámetro que se llama altura del plato teórico (H), que es la distancia que el soluto se mueve mientras se lleva a cabo un reparto y mide la eficiencia de la columna por unidad de longitud:

$$H = \frac{L}{N} \quad (\text{Ec. 3.3})$$

Entre más pequeño es el valor de H es más eficiente la columna; en general se tiene que H es más pequeño en los siguientes casos:

- a) Baja velocidad de flujo en la fase móvil y diámetro pequeño de partícula en la fase estacionaria,
- b) Baja viscosidad en la fase móvil y aumento en la temperatura de separación y
- c) Con moléculas pequeñas de soluto.

3.4.5. Parámetros cromatográficos^{28, 31}

Tiempo de retención (t_r). Es el tiempo transcurrido desde la introducción de la muestra hasta que el detector detecta el máximo del pico, o bien, el tiempo que un soluto permanece en la columna. Se mide desde el momento de la inyección hasta la elución del máximo del pico y es característico de un soluto dado, siempre y cuando se conserven las mismas condiciones de operación (**Fig. 3.5**).

Tiempo muerto (t_0). Es el tiempo requerido para eluir un soluto que no se retiene en la fase estacionaria (**Fig. 3.5**).

Tiempo de retención ajustado o corregido (t'_r). Mide el tiempo que el componente permanece en fase estacionaria (**Fig. 3.5**) y se calcula con la siguiente ecuación:

$$t'_r = t_r - t_0 \quad (\text{Ec. 3.4})$$

Ancho a la base (w_b). Es la porción de la línea base intersectada por las tangentes al pico. Para un pico gaussiano es igual a 4σ . Ha sido tradicionalmente usado en el cálculo de la eficiencia del sistema (**Fig. 3.5**).

Ancho a la mitad de la altura ($w_{1/2}$ o $w_{0.5}$). Es una medida más reproducible, adecuada para evaluar manualmente la eficiencia del sistema (platos teóricos) (**Fig. 3.5**).

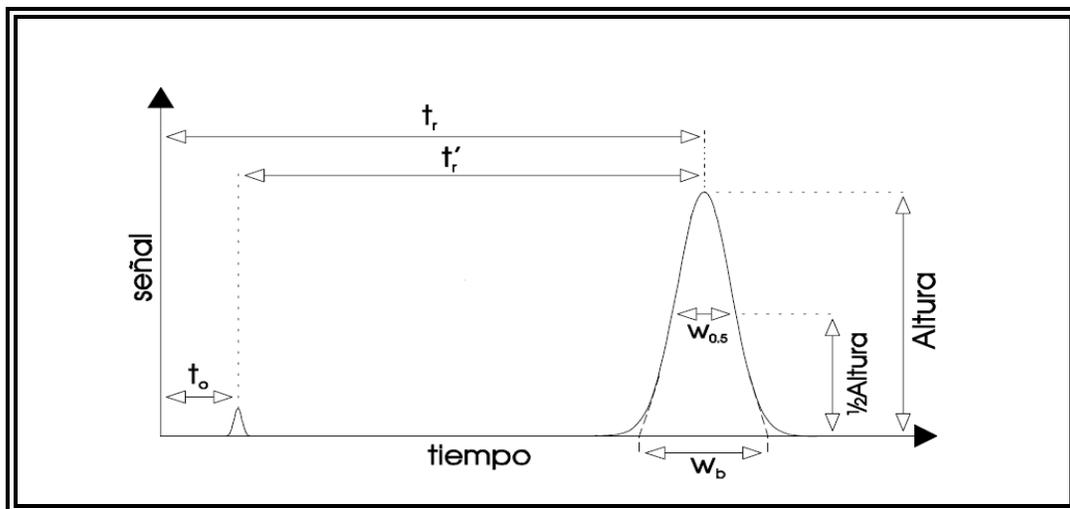


Figura 3.5. Representación que muestra algunos parámetros cromatográficos.

Número de platos teóricos (N). Cada plato teórico representa un equilibrio teórico de distribución del soluto entre las fases. El número total de platos teóricos de una columna representa el poder de separación de la columna. Una buena columna tiene un número alto de platos teóricos. Se calcula con cualquiera de las ecuaciones:

$$N = 5,545 \left(\frac{t_r}{w_{1/2}} \right)^2 = 16 \left(\frac{t_r}{w_b} \right)^2 = 2\pi \left(\frac{t_r}{\frac{\text{área}}{\text{altura}}} \right)^2 \quad (\text{Ec. 3.5})$$

Altura equivalente a un plato teórico (H, AEPT, HETP). Segmento de columna que representa un plato teórico. Es la medida inversa de la eficiencia del sistema, entre menor sea H el sistema es más eficiente (se tienen más platos teóricos en la misma longitud de columna).

Factor de retención o de capacidad (k'). Se define como la razón de la cantidad de soluto en fase estacionaria entre la cantidad en fase móvil al equilibrio, es decir, relaciona la cantidad del soluto en las dos fases. Es igual a la relación del tiempo que el soluto permanece en fase estacionaria respecto al tiempo en fase móvil:

$$k' = \frac{t_r - t_0}{t_0} \quad (\text{Ec. 3.6})$$

Donde t_r y t_0 son el tiempo de retención y el tiempo muerto respectivamente.

Factor de selectividad (α). Expresa la diferencia en los equilibrios de distribución entre dos solutos, es decir, mide las diferencias relativas entre la interacción de dos solutos con la fase estacionaria. Un valor mayor de α significa una columna más selectiva y una mejor separación entre solutos. Se calcula como el tiempo de retención corregido del soluto más retenido entre el menos retenido:

$$\alpha = \frac{k'_{r2}}{k'_{r1}} \quad (\text{Ec. 3.7})$$

Resolución (Rs). Es el grado de separación de dos bandas. Es la distancia entre los picos de las bandas divididas entre el ancho promedio de las bandas, o bien, es la medida cuantitativa del grado de separación entre dos solutos.

La resolución es una función de tres factores: la selectividad del sistema cromatográfico, la velocidad de la migración que varía con k' y la eficiencia; los primeros dos conceptos son termodinámicos, el último es cinético. Se puede entonces controlar la resolución al variar α , N o k' .

La selectividad de la separación (α) se puede modificar cambiando la composición de la fase móvil y/o estacionaria. La eficiencia de la separación (N) se puede controlar con la longitud de la columna o la velocidad de la fase móvil. El factor de capacidad (k') cambia con la fuerza de la fase móvil.

La resolución de los solutos se da cuando hay una separación clara entre dos picos adyacentes. Se puede expresar como:

$$R_s = \frac{2(t_{r,2} - t_{r,1})}{w_{b,2} + w_{b,1}} \quad (\text{Ec. 3.8})$$

Donde los tiempos de retención y los anchos se expresan en las mismas unidades. La resolución mínima aceptable en mezclas sencillas es 1.0, una resolución de 1.5 representa separación a la línea base (Fig 3.6).

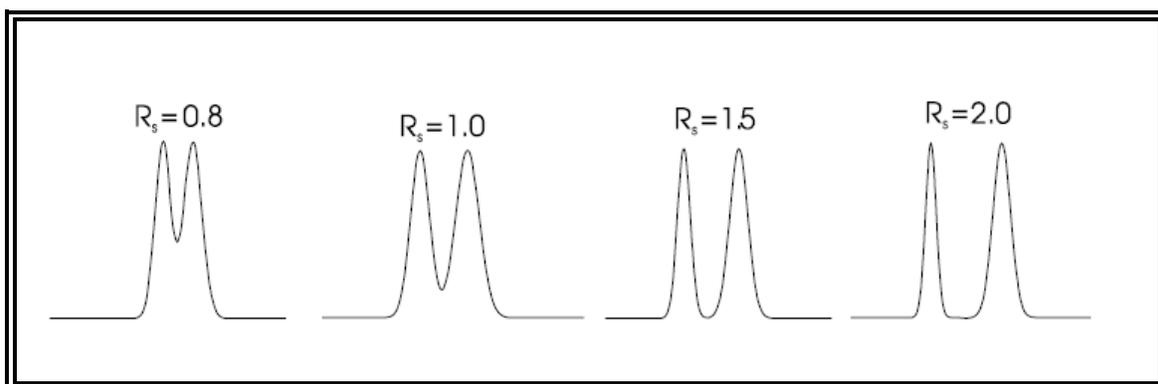


Figura 3.6. Ejemplos de resolución entre dos picos cromatográficos.

La separación efectiva entre dos componentes depende de dos factores fundamentales:

1. La separación entre los máximos de los picos, relacionada con sus constantes de distribución diferentes.
2. El ensanchamiento de las bandas que migran en la fase móvil a través de la columna.

La resolución está ligada con tres factores: la eficiencia (N), la retención (k') y la selectividad (α); por eso para optimizar una separación puede actuarse sobre cualquiera de esos factores. La ecuación general de la resolución muestra esta relación:

$$R_s = \frac{1}{4} \sqrt{N} \left(\frac{\alpha-1}{\alpha} \right) \left(\frac{k'_2}{1+k'_2} \right) = \frac{\sqrt{L/H}}{4} \left(\frac{k'}{1+k'} \right) \left(\frac{\alpha-1}{\alpha} \right) \quad (\text{Ec. 3.9})$$

Las tres conclusiones que se obtienen son:

1. A mayor retención (k'), mejor resolución. Para tener buenas separaciones se necesita un factor de capacidad $k' > 2$. En mezclas sencillas un k' mayor de seis solo aumenta el tiempo de análisis sin mejorar apreciablemente la separación.
2. A mayor selectividad mayor resolución. No se necesitan selectividades muy grandes. Generalmente se trabaja en la zona cercana a $\alpha=1$, por lo que cualquier aumento en la selectividad mejora sustancialmente la separación.
3. Entre mayor sea el número de platos teóricos, mejores separaciones. Se deben de buscar cambios sustanciales (de varios órdenes de magnitud) para que esta mejora sea importante. El aumentar ligeramente este valor no representa cambios apreciables. Se debe de buscar mejorar N con sistemas más eficientes (valores de H pequeños) y solo en casos especiales con columnas más largas (análisis más lentos).

Los aspectos teóricos de la cromatografía están orientados a tener cromatogramas donde la separación se lleve a cabo en el menor tiempo posible.

Eficiencia. Es un concepto ligado a la granulometría y al flujo, lo que corresponde al nivel cinético de la CLAR, y la retención está ligada a los coeficientes de distribución que dependen de las propiedades fisicoquímicas y termodinámicas del soluto en las dos fases.

Flujo (F). Es la velocidad a la que se mueve la fase móvil en el sistema. Es un valor que generalmente permanece constante a lo largo de una determinación y está en razón de la viscosidad del disolvente.

En las diferentes expresiones que caracterizan las separaciones, no se ha tenido en cuenta la velocidad de la fase móvil en la columna. Evidentemente, esta velocidad debe tener una incidencia en el avance de los analitos en la columna, así como en su dispersión y, por tanto, también en la calidad del análisis en curso.

3.4.6. Instrumentación general^{28, 30}

Un equipo de CLAR se compone de varios módulos con funciones definidas, que están integrados en la misma carcasa para los modelos estándar o para que ocupen menos sitio, o bien, se presentan en bloques diferentes unidos entre ellos.



Figura 3.7. Cromatografo de líquidos de alta resolución del laboratorio de agua del Instituto de Geología, UNAM.

Los componentes fundamentales de un sistema cromatográfico son:

A) Recipiente (s) para la fase móvil

Los cromatógrafos de líquidos están equipados con uno o más recipientes, generalmente de vidrio para el suministro de la(s) fases(s) móvil(es). En las mangueras de entrada de la fase móvil se instala un filtro para evitar el paso de partículas al sistema cromatográfico.

Antes de instalarse el sistema, las fases móviles deben ser desgasificadas para remover el aire y otros gases disueltos que pueden interferir en el funcionamiento de la bomba, la columna y el detector. Este proceso puede efectuarse mediante vacío, ultrasonido o haciendo pasar una corriente de gas inerte a través de la fase móvil.

B) Bomba

Todos los equipos de HPLC incluyen al menos una bomba para forzar el paso de fase móvil a través de la columna cuyo relleno, muy compacto, es responsable de una sobrepresión muy importante a nivel del inyector. Esta presión puede alcanzar los 20,000 kPa (200 bares) según el caudal de la fase móvil, su viscosidad y el tamaño de las partículas de la fase móvil.

Es conveniente que no haya pulsaciones porque se manifestarían como ruido en el detector. Las bombas son de acero inoxidable o aleaciones de titanio que resisten la corrosión y el desgaste, algunas partes son de zafiro o de rubí.

La calidad de una bomba está determinada por el grado de estabilidad y reproducibilidad del flujo que genera.

Se utilizan bombas de alta presión diseñadas para mantener un caudal sin pulsos y estable, incluso cuando la composición de la fase móvil varía. Estas bombas pueden ser de un solo pistón o bien llevar dos pistones que funcionan en oposición y situados en serie para evitar las interrupciones de caudal que resultan de la fase de relleno del cilindro. Para regular el caudal, el desplazamiento de los pistones se controla por un motor de pasos asociado a una leva de forma particular.

La(s) bomba(s) permite(n) liberar un eluyente de composición fija (modo isocrático), o al contrario, de composición variable para hacer un gradiente de elución. El sistema debe tener en cuenta, en este segundo caso, las diferencias de compresibilidad de los

disolventes a fin de que la composición de la mezcla no se modifique por acción de la presión necesaria para el proceso cromatográfico.

La elución de la muestra puede efectuarse de dos maneras:

1. Isocrática, cuando no se modifica la composición de la fase móvil durante el análisis y,
2. Con gradiente, cuando la composición de la fase móvil varía durante una corrida. En este caso se utilizan dos o más disolventes de diferente polaridad y se programa con cambios en su proporción, en forma continua o escalonada, según la naturaleza de la muestra.

C) Inyector

Las válvulas de inyección son los dispositivos más utilizados para la introducción de la muestra al sistema cromatográfico. Se les puede integrar un *loop* intercambiable que consiste en un tubo de acero inoxidable de diámetro interno pequeño y de volumen fijo y conocido, lo que permite inyectar siempre el mismo volumen de muestra. Estas válvulas tienen dos posiciones:

1. Posición de carga, donde se llena el *loop* con la muestra a la presión atmosférica.
2. Posición de inyección donde se coloca al *loop* lleno de muestra en la corriente de la fase móvil, con la subsecuente inyección en la parte superior de la columna, sin interrupción significativa del flujo.

La inyección de un volumen preciso de muestra debe hacerse a la entrada de la columna en un corto período de tiempo para perturbar lo menos posible el régimen de circulación establecido en la columna y en el detector. Para ello se utiliza una válvula de alta presión de varias vías, de tipo manual o automatizada en los casos de los inyectores automáticos, situada justo antes de la columna. Se trata de una pieza de precisión que debe resistir a presiones que puedan sobrepasar los 30,000 kPa.

D) Columna cromatográfica

La columna es un tubo recto, calibrado, de acero (a veces forrado de un material inerte de vidrio o en PEEK®) que mide entre 3 y 25 cm de longitud. Tradicionalmente se utiliza un diámetro interno de 4,6 mm que exige un flujo de fase móvil de 0,5 a 2 mL/min. La fase estacionaria se mantiene entre dos discos porosos situados en sus extremidades cuyos volúmenes muertos deben ser lo más pequeños posibles. Actualmente existe una amplia gama de columnas más estrechas: *narrow-bore* (2-4 mm), *micro-bore* (1-2 mm), capilares rellenas (<1 mm) para las que el máximo caudal admisible desciende a unos cuantos $\mu\text{L}/\text{min}$, lo que requiere una adaptación de las bombas y del detector. Estas columnas estrechas tienen la ventaja, aparte de un consumo muy reducido del eluyente, ya que unas pocas gotas bastan para eluir todos los compuestos, de producir una mejor resolución debido a una difusión menor. Además muestran una mayor sensibilidad y facilitan el acoplamiento CLAR/EM.

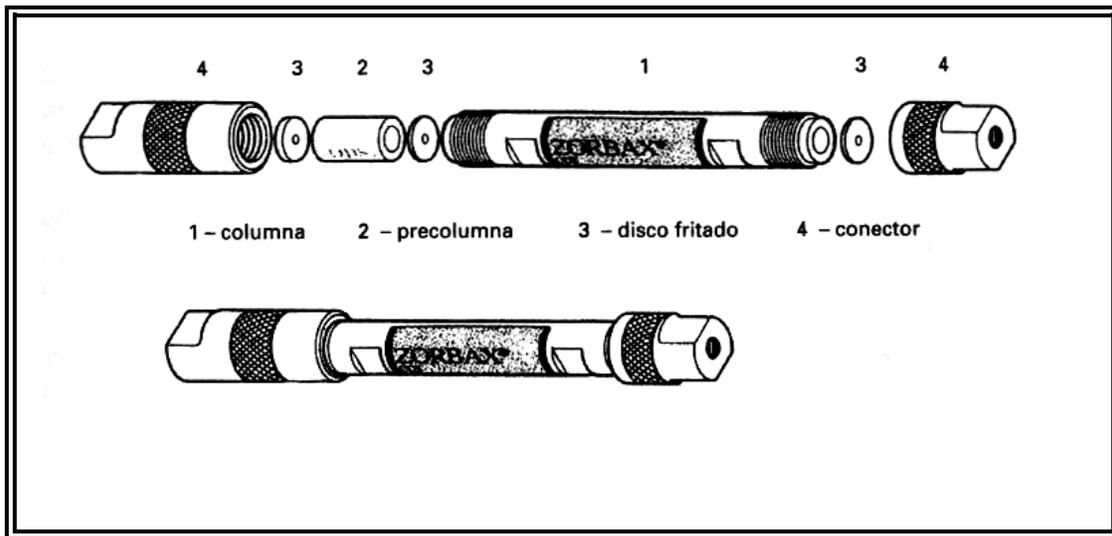


Figura 3.8. Columna estándar y precolumna para CLAR. Visión exterior y diferentes elementos separados y ensamblados de una columna ZORBAX®.

La columna es el centro efectivo de un cromatógrafo, por tanto, es fundamental optimizar su eficiencia y tener los cuidados para protegerla de contaminantes y alargar su utilidad. Generalmente a la entrada de la columna hay un manómetro que registra la presión. La columna contiene el empaque necesario para la separación deseada

siempre y cuando la elección sea la adecuada. La fase puede ser sílice en caso de adsorción, fases enlazadas para cromatografía líquido-líquido, grupos funcionales de intercambio iónico, geles de porosidad específica para cromatografía de exclusión o algún otro empaque particular.

Están construidas por una pared gruesa de acero inoxidable para resistir altas presiones y la acción química de la fase móvil.

Es muy conveniente usar precolumnas (0,4 a 1 cm), antes de las columnas analíticas con un empaque químicamente similar y mayor tamaño de partícula. La finalidad de estas precolumnas es retirar las impurezas del disolvente y capturar los componentes de la muestra fuertemente retenidos, impidiendo así la contaminación gradual de las columnas analíticas.

Hay ocasiones en que deben evitarse cambios de temperatura y entonces las columnas funcionan en condiciones isotérmicas con circulación de aire o cámaras calentadas eléctricamente.

E) Detectores

Deben reunir un cierto número de cualidades: dar a cada compuesto detectado una respuesta proporcional a su concentración instantánea, ser sensibles y tener poco ruido de fondo, así como mantener una respuesta estable en el tiempo.

Los compuestos separados en la columna y arrastrados a diferentes tiempos por la fase móvil, llegan al detector que recibe cantidades puntuales de material a un flujo constante. Los detectores son sensibles a diferentes propiedades; por ejemplo, absorbancia, índice de refracción, radioactividad, conductividad, fluorescencia, amperaje, etc., en un tiempo de respuesta unas diez veces menor que el ancho del pico del soluto, dado en unidades de tiempo.

El tubo que conecta la columna con el detector debe ser el mínimo y su diámetro es el aspecto más crítico, por tanto debe ser muy delgado, con un diámetro interno no menor de 0,25 mm y no mayor de 200 mm de longitud; sus uniones han de tener un volumen vacío de cero.

Los detectores más frecuentes son:

- **Fotómetros y espectrofotómetros de ultravioleta-visible.**

La detección se basa en la Ley de Lambert-Beer ($A = \epsilon_{\lambda} \cdot l \cdot c$): la absorbancia, A, de la fase móvil se mide a la salida de la columna, a una o varias longitudes de onda λ en el UV o en el visible. La intensidad de la absorción depende del coeficiente de absorptividad molar ϵ_{λ} característico, lo que hace posible el cálculo de las concentraciones de cada una de las especies detectadas por medida directa de las áreas de los picos. Son los más frecuentes, los hay de longitud de onda fija como 254 nm, los de longitud de onda variable y los de barrido de longitud de onda.

Los disolventes de la fase móvil empleados, por razón natural, deberán tener una absorbancia muy baja o nula. La siguiente tabla muestra las longitudes de onda mínima de trabajo para los disolventes más utilizados en CLAR.

Tabla 3.6. Longitudes de onda mínimas de trabajo en la zona del UV para disolventes en CLAR.

Disolvente	Longitud de onda (nm)
Éter de petróleo	210
CCl ₄	265
Benceno	230
CHCl ₃	245
THF	220
Acetona	330
Acetato de etilo	260
Acetonitrilo	210
Metanol	210
Agua	190

Los detectores de barrido emplean diodos de estado sólido. Este sistema permite la determinación espectral continua en un rango amplio de longitudes de onda; los hay de 190 a 600 nm, con una resolución menor a 1 nm por diodo en un tiempo de 0,01 s. sus ventajas son inobjctables pues se evitan los corrimientos dados por desajustes del sistema óptico y ofrecen mucha más información.

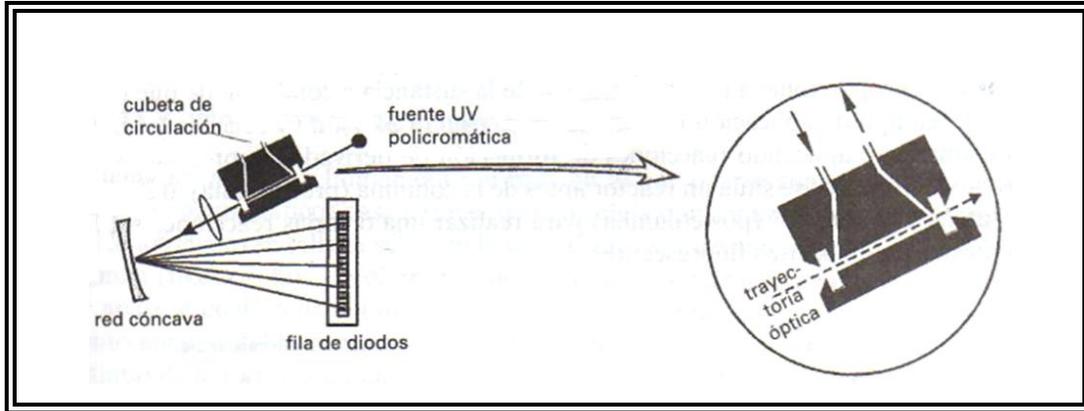


Figura 3.9. Principio del detector de fila de diodos.

Existen otros detectores que detectan simultáneamente hasta nueve señales independientes y así en muestras complejas se obtiene información de multicomponentes con la posibilidad de integrarse.

- **Detector fluorométrico**

Mide la fluorescencia de un soluto que tenga esta propiedad o de fase móviles que lo sean, revelándose los solutos como picos negativos. O después de la columna puede hacerse una reacción con un reactivo fluorescente para tener el (los) soluto (s) con esta propiedad, a lo que se llama derivatización post-columna.

Es un método que aumenta la selectividad y la sensibilidad, esta última hasta 1000 veces más que la absorbancia y puede usarse en eluciones isocráticas o de gradiente.

Las sustancias fluorescentes típicas son compuestos aromáticos polinucleares, esteroides, pigmentos vegetales, vitaminas, alcaloides, catecolaminas, aflatoxinas. Su sensibilidad llega a ser de 1 ng/ml.

La siguiente tabla señala algunos reactivos fluorescentes y los sustratos sobre los que actúan. La longitud de onda de excitación es particular para cada compuesto como la longitud de onda de emisión, siempre de menor contenido energético que la primera.

Tabla 3.7. Reactivos fluorescentes y sus reactantes.

Reactivos	Reactantes
4-Bromometil-7-metoxicumarina	Ácidos carboxílicos
7-Cloro-4-nitrobencil-2-oxa-1,3 diazol	Aminas primarias y secundarias y tioles
Cloruro de 1-dimetilaminonaftaleno-5-sulfonilo	Aminas primarias y fenoles
Hidrazida del 1-dimetilaminonaftaleno-5-sulfonilo	Carbonilos

- **Detectores electroquímicos**

Estos detectores son simples y extremadamente sensibles a aquellos analitos que pueden detectar. Para emplearlos, las moléculas de soluto han de tener una característica voltamperométrica en una fase móvil acuosa o acuosa-orgánica. Comúnmente utilizan un sistema de tres electrodos, en el cual el potencial del electrodo de trabajo se mantiene en un valor elegido con respecto al electrodo de referencia y se mide la corriente entre el electrodo de trabajo y un electrodo auxiliar. Este método se emplea con fases móviles polares.

Hay detectores que miden conductividad eléctrica, fuerzas coulómbicas, o emplean reacciones redox. Cuando se pueden aplicar se tienen sensibilidades de picomoles o aún menores, con la facilidad de utilizarse en eluciones isocráticas o con gradientes.

- **Detectores de índice de refracción**

Son refractómetros diferenciales que marcan una diferencia entre el índice de refracción de la fase móvil y el eluyente de la columna.

Los hay de diferente tipo:

- a). deflector que tienen un intervalo amplio de linealidad,
- b). reflexivo de intervalo más limitado y
- c). los que miden el efecto Christiansen.

La sensibilidad de estos detectores es menor que los otros; su detección está en el orden de los micromoles y las modificaciones de temperatura alteran el índice de refracción por lo que requiere un control de 0,001 °C. No es útil para las eluciones en gradiente. El principal atractivo de este detector radica en su respuesta casi universal a todos los solutos como carbohidratos y polímeros alifáticos con baja absorción en el ultravioleta.

Esquemáticamente, su fundamento se basa en lo que ocurre cuando un haz luminoso (mono- o policromático) pasa a través de una célula que contiene dos compartimientos, uno de los cuales se rellena sólo con la fase móvil y el otro con eluyente a la salida de la columna. La diferencia de los índices de refracción entre los dos líquidos que aparece cuando un soluto se mezcla con el eluyente, se traduce por un desplazamiento angular del haz refractado. En la práctica, la señal corresponde a la medida en continuo de la retroalimentación que hay que proporcionar a un elemento óptico para compensar el haz reflejado.

Este detector se considera casi universal. Presenta el inconveniente de ser mucho menos sensible que el detector UV, y de ser demasiado sensible a las variaciones de temperatura.

F). Integrador

Generalmente el detector se conecta a un registrador o integrador, un sistema que cambia la señal analógica del detector a una digital. Estos equipos son imprescindibles, en ésta como en otras metodologías, ajustando las variables y dando las opciones para obtener datos con alguna condición diferente.

Al terminar la elución, el aparato ha informado de los picos sus tiempos de retención, altura o áreas bajo el pico, anchura del pico, altura o área total y porcentaje de cada pico. De esta manera la información puede almacenarse o reconfigurarse según las necesidades del analista y el integrador puede estar a su vez en serie a una computadora con *software* variado que dan mucha más flexibilidad a la información obtenida, la posibilidad de cruzarla u organizarla.

En los modelos modulares puede incorporarse equipo diverso como son: horno, desgasificador, colector de fracciones u otros.

3.4.7. Diferentes métodos de la cromatografía de líquidos^{28, 30}

Existe un buen número de métodos cromatográficos de líquidos que son utilizados en el análisis de moléculas con propiedades determinadas; algunas veces se combinan varios métodos para lograr una separación adecuada y con la del objetivo de aumentar la selectividad y aumentar el rendimiento de la columna.

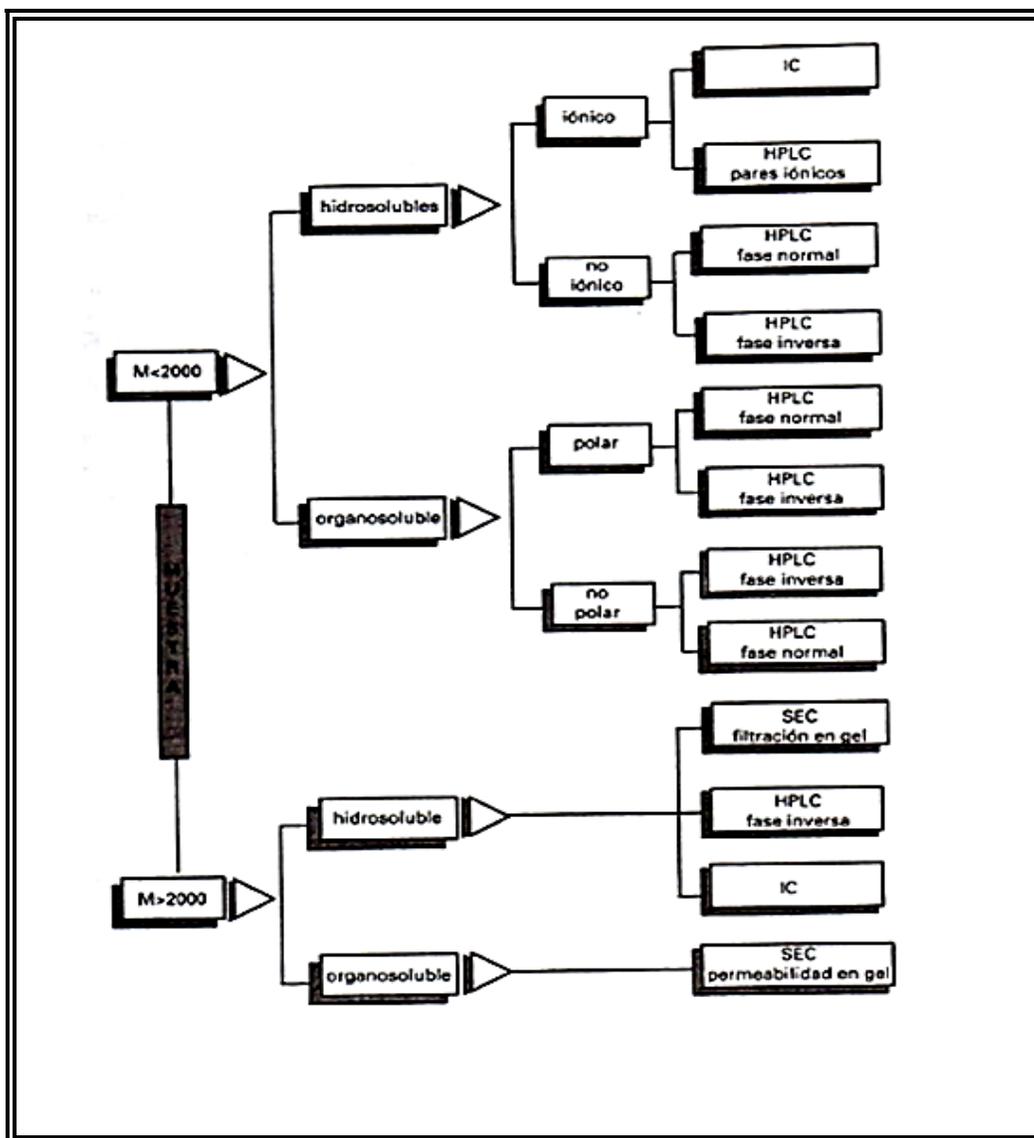


Figura 3.10. Guía para la selección de diferentes técnicas cromatográficas que utilizan una fase móvil líquida.

- **Cromatografía de adsorción**

En este tipo de cromatografía se establece una competencia entre las moléculas de soluto y la fase móvil por la fase estacionaria. La separación es óptima cuando los grupos funcionales del soluto se sobreponen exactamente a esos sitios de adsorción.

Los empaques son sílice, alúmina o carbón. Las sílices son más ácidas y se emplean en la separación de bases. Las alúminas son más básicas y su uso se orienta a los ácidos.

Para la sílice que es el adsorbente más común, la adsorción se da por los grupos hidroxilo del gel de sílice con el grupo funcional polar del soluto o disolvente.

Para modificar o controlar la acción del adsorbente se adiciona, para bloquear o cubrir los sitios más activos en la superficie, una pequeña cantidad de agua o algún modificador polar a la fase móvil no polar, permitiendo una población más homogénea de sitios débiles que son los que retienen la muestra; a veces se adiciona acetonitrilo o metanol. Cuando se adiciona de 1-2 % de tetrahidrofurano al acetonitrilo o metanol, los picos se agudizan por reducción del coeio.

Algunas aplicaciones de la cromatografía de adsorción son la separación de la vitamina D₃ y de sus metabolitos, vitaminas A, D y E, LSD, antidepresivos tricíclicos, bloqueadores β , aceites naturales, esencias vegetales, pigmentos tipo carotenoides, porfirinas, aflatoxinas, triglicéridos, series de hidrocarburos aromáticos polinucleares, entre otros.

- **Cromatografía con fase enlazada**

La cromatografía de fase enlazada se caracteriza porque la fase estacionaria se una de forma covalente a las partículas de soporte o a las paredes internas de la columna. Las partículas de sílica gel sufren modificaciones para reemplazar sus grupos silanoles, activos polares, por grupos funcionales determinados: octadecilsilano (ODC o C₁₈), fenilo, ciano, amino, diol, nitro, etc.

Este tipo de cromatografía se ha desarrollado con evidentes logros en la resolución, reproducibilidad y rapidez.

El material de la fase estacionaria consiste en partículas de sílica gel o de polímeros que tienen una morfología, un tamaño, cierta porosidad y determinada estructura

química que amplían el espectro de beneficios a las necesidades de separación, teniendo cuidado en controlar rigurosamente la humedad de los disolventes.

Este método se ha aplicado para separar vitaminas liposolubles, nitrofenoles y aceites esenciales entre otras sustancias.

- **Cromatografía de fase reversa**

Esta técnica es la más empleada, el 75% de las separaciones que se hacen emplean cromatografía de fase reversa.

La cromatografía de fase reversa emplea un empaque enlazado hidrofóbico de diferentes longitudes de cadena, 2, 8 ó 18 átomos de carbono como fase estacionaria y una fase móvil polar constituida por mezclas de agua con algún disolvente orgánico y puede también adicionarse amortiguadores o sales.

La retención de los solutos en este tipo de sistemas puede explicarse con el método de Horváth, según el cual, la superficie hidrocarbonada de la molécula del soluto, así como las moléculas hidrocarbonadas de la fase estacionaria, experimentan un efecto de repulsión hacia el eluyente polar, de modo que para disminuir la superficie hidrocarbonada en contacto con la fase móvil, se produce una asociación entre el soluto y las cadenas de la fase estacionaria. De esta manera la retención no es debida a una atracción entre el soluto y la fase estacionaria, sino a la repulsión que ambas experimentan hacia el eluyente y que las conduce a asociarse. Se tiene entonces que la retención depende fundamentalmente de las siguientes variables:

- concentración y longitud de las cadenas hidrocarbonadas en la fase estacionaria,
- superficie hidrocarbonada en el soluto y,
- polaridad de la mezcla que constituye la fase móvil.

Cuando se preparan gradientes, éstos se generan con una disminución constante de la polaridad del eluyente, es decir, se aumenta la proporción del solvente orgánico logrando así un incremento continuo en la fuerza de la fase móvil.

En estas condiciones por fase reversa se pueden concentrar sustancias traza, empleando disolventes de inyección con gran proporción de agua, que en este caso es débil a la elución; después se eluyen de la columna generalmente por el empleo de un gradiente.

Las ventajas de esta modalidad cromatográfica se resumen de esta manera:

- Los compuestos no iónicos e ionizables se pueden separar en la misma columna y con la misma fase móvil.
- La adsorción irreversible casi no ocurre.
- La fuerza de atracción entre la superficie no polar y el soluto es débil.
- La utilidad del agua como fase móvil.
- Un modificador orgánico muy frecuente es el metanol.
- Se puede predecir el orden de elución en función de la hidrofobicidad del analito.
- El sistema requiere poco tiempo para llegar al equilibrio, al hacer un cambio de fase móvil.

Este método es muy empleado en diversos sistemas sobre todo cuando no tienen grupos que establezcan puentes de hidrógeno y sean aromáticos o alifáticos o series de diferente longitud de cadena.

Las fases estacionarias de copolímeros de estireno-divinilbenceno funcionan en todo rango de pH, lo que los hace muy versátiles y funcionan como los de fase reversa.

Esta modalidad cromatográfica se aplica en la separación de ácidos carboxílicos, aminas, aflatoxinas, micotoxinas, alcaloides, analgésicos, anticonvulsionantes, barbituratos, benzodiazepinas, carbamatos, carbohidratos, corticosteroides, diuréticos, glicósidos cardíacos, pesticidas organofosforados y organoclorados, conservadores, hormonas, sulfonamidas y vitaminas.

- **Cromatografía de pares de iones**

Este método es una subespecialidad de la cromatografía de fase reversa. Surgió como una alternativa al intercambio iónico en resinas y se utiliza en la separación de muestras iónicas o ionizables o múltiplemente cargadas. En este sistema la fase móvil está constituida por mezclas agua-metanol o agua-acetonitrilo, en la que se disuelven sales, buffers y un ion de carga contraria a la de los solutos, cuya función es actuar como un agente formador de pares de iones. Este ion recibe el nombre de contraión y puede ser de naturaleza inorgánica u orgánica.

Se ha propuesto que el fenómeno se da así:

-
- a) La molécula del soluto forma un par iónico con el contraión de la fase móvil, y este par, ya neutro se reparte en la fase estacionaria hidrofóbica.
 - b) El contraión se adsorbe en la fase estacionaria y se asocia a cualquier ion presente en el medio; en un segundo paso la fase estacionaria ya convertida en un intercambiador de iones dinámico, puede retener a los solutos iónicos.

Con este método se pueden separar tanto compuestos no iónicos como iónicos, por ejemplo, las vitaminas del complejo B mediante dos pasos: el primero para separar el compuesto no iónico y luego con la adición del contraión, para separar los iónicos.

- **Cromatografía de intercambio iónico**

Es un método muy frecuente y muy útil pues se emplea para separar macromoléculas cargadas. Se emplean empaques de columnas con grupos funcionales cargados que están unidos a una matriz polimérica. Esta fase estacionaria contiene grupos funcionales iónicos que retienen al soluto de carga opuesta, intercambiándolo, mediante un proceso reversible con iones de la fase móvil.

El proceso se llama de intercambio aniónico si el analito tiene carga negativa ($-\text{SO}_3\text{H}$, $-\text{COOH}$, $-\text{PO}_3\text{H}_2$) y catiónico si el analito tiene carga positiva ($-\text{NR}_3^+$, $-\text{NH}_3^+$).

- **Cromatografía de iones**

Es el método de separar iones disueltos por intercambio iónico con el empleo de fases estacionarias de resinas poliméricas neutras. Estas partículas de resina de aproximadamente $10\ \mu\text{m}$ de diámetro se sulfonan o se aminan ligeramente y las esferitas quedan recubiertas de una película. Luego se introduce en un lecho de esferas poliméricas de $100\text{-}300\ \mu\text{m}$ que se unen electrostáticamente sobre la superficie del núcleo polimérico inicial.

Los eluyentes que se emplean son de dos categorías, los aniónicos (salicilato, bicarbonato, p-cianofenato, borato, glicina, tirosina) y los catiónicos (ácido clorhídrico, histidina-HCl, hidroxilamina-HCl, lisina-HCl, trietanolamina-HCl, ácido nítrico).

Los detectores utilizados son fundamentalmente los de conductividad.

Entre las aplicaciones de este método destacan el análisis de agua de estanques, agua de desechos, de calderas, procesos industriales, baños de plateado, extractos de suelo,

salmuera, orina, alimentos, etc. Los iones más frecuentemente analizados son: F^- , Cl^- , PO_4^{3-} , NO_3^- , Na^+ , K^+ , NH_4^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , metales de transición, ácidos orgánicos, aminoácidos, péptidos, diferencias entre Fe^{2+} y Fe^{3+} , distingue aniones polivalentes como pirofosfato, trimetafosfato y tetrapolifosfato, carbohidratos, entre otras entidades moleculares.

- **Cromatografía de exclusión o de permeación en gel**

Este método cromatográfico no es interactivo, sino que se basa en el paso diferencial de moléculas de soluto que permean entre los soportes de diferentes tamaños y estructuras de poro; esta exclusión se da por el tamaño y la forma de los solutos.

Las moléculas grandes no caben entre los poros de una matriz y viajan por los espacios exteriores al empaque eluyendo en el volumen vacío de la columna. Las moléculas de tamaño intermedio pueden penetrar algunos poros y otros no, eluyendo en tiempos intermedios y las moléculas pequeñas penetran los poros y tardan más tiempo en eluir. Los empaques pueden ser arreglos poliméricos semirrígidos, vidrios o sílice.

Este método sólo requiere de un disolvente en el que la muestra se disuelva y posteriormente se separe. Si la fase móvil es acuosa, el nombre del método es filtración en gel; si la fase es orgánica se llama permeación en gel. Es importante seleccionar adecuadamente esta fase, de acuerdo al pH.

Una columna cromatográfica de exclusión debe calibrarse para conocer el volumen muerto, el de la fase estacionaria, y el coeficiente de distribución de las fases monodispersas, así como los pesos moleculares promedio de especies polidispersas mediante el empleo de estándares que son muy variados según el caso; se grafican los pesos moleculares contra el volumen de elución.

Los detectores más empleados son los espectrofotométricos de ultravioleta (UV) o de infrarrojo (IR) y los refractométricos.

Las aplicaciones de este método son en macromoléculas de uso industrial.

- **Cromatografía de afinidad**

Está basada en la unión covalente entre un compuesto llamado ligando de afinidad a un soporte sólido. Al hacer pasar una muestra por una columna, sólo se retienen aquellos solutos altamente específicos que se ligan al complementario, eluyéndose los restantes. A su vez esos solutos retenidos se pueden separar cambiando las condiciones de la fase móvil.

Los soportes de estas columnas pueden ser geles orgánicos como la agarosa, celulosa, poliacrilamida, dextrano, etc; estas matrices han de ser hidrofílicas y estables a otros disolventes orgánicos compatibles con el agua eliminando reacciones no específicas.

Los ligandos de afinidad pueden ser inhibidores enzimáticos, anticuerpos, todos ellos moléculas que se unen reversible y específicamente a las moléculas del analito complementario de la muestra.

- **Cromatografía quiral**

En una columna cuya fase estacionaria es quiral, un compuesto con un centro de asimetría y en el que los dos enantiómeros R y S están presentes, dará lugar a dos picos cuyas áreas son proporcionales a la abundancia de cada una de las formas. Existen varios tipos de columnas quirales. Las columnas de Pirkle contienen un soporte sílice recubierto de un grupo enlazado de aminopropilo, que además sirve para fijar un derivado de la D-fenilglicina. Al ser estas fases poco estables, es preferible utilizar resinas ópticamente activas o geles de sílice en los que se han enlazado ciclodextrinas (cadenas cíclicas de 5 a 7 moléculas de glucosa) unidas mediante un “puente” de algunos átomos de carbono. Estas moléculas de forma cilíndrica presentan una cavidad hidrófoba mientras que la pared externa es hidrófila. Estas fases tienen la particularidad de permitir la inclusión selectiva de gran variedad de compuestos que forman, en la superficie de la fase quiral, complejos diastereoisoméricos reversibles.

- **Cromatografía de interacción hidrófoba.**

La Cromatografía de interacción hidrófoba (HIC, por sus siglas en inglés) permite mejorar la separación de compuestos bioinorgánicos como las proteínas solubles en el agua. Se utiliza una columna apolar y se comienza la elución con una fase móvil muy salina. En estas condiciones las proteínas se fijan por su región hidrófoba sobre la fase

estacionaria. A continuación, se disminuye progresivamente la concentración salina para que las proteínas vuelvan a pasar a la fase móvil. De este modo son eluidas en orden decreciente de su carácter hidrófilo.

En esta operación se recuerda una técnica experimental conocida en química orgánica: cuando en un embudo de decantación se quiere extraer con éter un compuesto orgánico en el seno de una fase acuosa, se le añade salmuera para hacer disminuir la solubilidad de un compuesto orgánico en el agua, es decir, facilitar su extracción por éter, efecto conocido como “salt-in-out”.

3.5 Validación de métodos analíticos.

La validación de un método es un requisito importante en la práctica del análisis químico. Diferentes organismos europeos y americanos como la FDA, (Food and Drug Administration) y la EPA (Environmental Protection Agency), relacionados con las buenas prácticas de laboratorio (GLP) recomiendan que los datos analíticos sean sometidos a algún criterio de aceptación con el objetivo de garantizar que estos datos son los que cabría esperar. Para que un resultado analítico concuerde con el propósito requerido, debe ser lo suficientemente confiable para que cualquier decisión basada en éste pueda tomarse con confianza. Como consecuencia, los métodos analíticos deben ser sometidos a un proceso de validación.

Así, el desempeño del método debe validarse y debe estimarse la incertidumbre del resultado a un nivel de confianza dado. ^{32, 33, 34}

3.5.1 Definiciones de validación.

El término validación se puede definir como:

-Es el proceso establecido para la obtención de pruebas documentadas y demostrativas de que un método de análisis es lo suficientemente fiable y reproducible para producir el resultado previsto dentro de intervalos o parámetros definidos y para el propósito requerido (CONACyT 2010).³³

-Es una adaptación específica de una técnica analítica para un propósito de medición seleccionado, es un procedimiento para establecer por medio de estudios de laboratorio una base de datos que demuestre científicamente que un método analítico tiene las

características de desempeño que son adecuadas para cumplir los requerimientos de las aplicaciones analíticas pretendidas (EMA, CENAM, 2008).³⁵

-Es el proceso de verificación de que un método es adecuado a su propósito, o sea, para resolver un problema analítico particular (EURACHEM, 2005).³⁴

3.5.2 ¿Cuándo deben validarse los métodos?

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

- Si se pretende una acreditación (EMA, ISO/CIEC 17025) o certificación (ISO 9000);
- Un nuevo método es desarrollado para un problema específico;
- Un método ya establecido revisado para incorporar mejoras o extenderlo a un nuevo problema;
- Cuando el control de calidad indica que un método ya establecido está cambiando con el tiempo;
- Un método establecido usado en un laboratorio diferente o con diferentes analistas o con diferente instrumentación;
- Para demostrar la equivalencia entre dos métodos, por ejemplo, entre un método nuevo y uno de referencia.

El alcance de la validación o la revalidación requerida dependerá de la naturaleza de los cambios hechos al aplicar un método a diferentes laboratorios, instrumentación, operadores y circunstancias en las cuales el método va a ser utilizado. Siempre es apropiado algún grado de validación, aun cuando se usan métodos aparentemente bien caracterizados ya sean de referencia o publicados.^{33, 34}

3.5.3 Parámetros de desempeño a evaluar en un método de análisis

En el proceso de validación del método está implícito que los estudios para determinar los parámetros de desempeño se realizan usando equipos dentro de especificaciones, que están trabajando correctamente y que están calibrados adecuadamente. Asimismo,

el operador que realiza los estudios debe ser técnicamente competente en el campo de trabajo bajo estudio y debe poseer suficiente conocimiento sobre el trabajo a realizar con el fin de que sea capaz de tomar decisiones apropiadas a partir de las observaciones hechas mientras avanza el estudio.³⁴

El laboratorio tiene que decidir cuáles de los parámetros de desempeño del método necesitan caracterizarse con el fin de validar el método. La caracterización del desempeño del método es un proceso costoso pero puede restringirse inevitablemente por consideraciones de tiempo y costo. Las exigencias de validación de estos métodos, a efectos del cumplimiento de normas, incluyen estudios de exactitud, precisión, linealidad, selectividad, sensibilidad, intervalo lineal y de trabajo, límite de detección, límite de cuantificación y robustez.³⁶ Con base en el tipo de método a utilizar se recomienda evaluar determinados parámetros para la validación (Tabla 3.8).³⁷

Tabla 3.8. Parámetros recomendados a evaluar según el tipo de método de análisis a utilizar.

Parámetro de desempeño	Tipo de prueba					
	Espectrofotométrica	Cromatográfica	Potenciométrica	Volumétrica	Gravimétrica	Física
Intervalo lineal y de trabajo	Si	Si	Si	Si	Si	No
Límite de detección	Si ^a	Si ^a	No	No	No	Si ^b
Límite de cuantificación	Si ^a	Si ^a	Si ^a	Si ^a	Si ^a	No
Recuperación	Si	Si	No	Si	Si	No
Sesgo	Si	Si	Si	Si	Si	No
Repetibilidad	Si	Si	Si	Si	Si	Si ^c
Reproducibilidad	Si	Si	Si	Si	Si	Si ^c
Incertidumbre	Si	Si	Si	Si	Si	Si ^c
Sensibilidad	Si ^d	Si ^d	Si ^{d,e}	Si ^e	Si ^d	No
Selectividad	Si ^d	Si ^d	Si ^{d,e}	Si	Si	Si ^b
Robustez	Si ^d	Si ^d	Si ^d	Si ^d	Si ^d	Si ^d

^a Sólo para análisis a nivel de trazas (ppm, ppb, ppt).

-
- ^b Sólo métodos cualitativos.
 - ^c Sólo métodos cuantitativos.
 - ^d Sólo aplica para métodos no normalizados.
 - ^e Sólo para el análisis de aniones y cationes por ion selectivo.

a) Linealidad

Define la habilidad del método para obtener resultados de la prueba proporcionales a la concentración del analito.

b) Intervalo de trabajo e intervalo lineal³⁵

Para cualquier método cuantitativo es necesario determinar el intervalo de concentraciones del analito o los valores de la propiedad relacionada, sobre los cuales el método puede aplicarse.

Se infiere que el intervalo lineal es el intervalo de concentraciones del analito sobre las cuales el método proporciona resultados de pruebas proporcionales a la concentración del analito.

c) Límite de detección³⁸

La ISO utiliza como un término general “valor mínimo detectable de la variable de estado definida” el cual en química se traduce como la “concentración neta mínima detectable”. La IUPAC es cautelosa en el uso de “límite de detección” prefiriendo “valor (verdadero) mínimo detectable”. La menor concentración del analito en una muestra que puede detectarse, pero no necesariamente cuantificarse bajo las condiciones establecidas de la prueba.

En términos generales, el límite de detección (LOD) de un analito se puede describir como aquella concentración que proporciona una señal en el instrumento significativamente diferente de la señal del “blanco” o del “ruido de fondo”.

Se define el límite de detección como la concentración de analito que proporciona una señal igual a la señal del blanco, y_B , más tres veces la desviación estándar del blanco, s_B :

$$\text{Límite de detección (LOD)} = y_B + 3s_B \quad (\text{Ec. 3.10})$$

d) Límite de cuantificación³⁸

El límite de cuantificación (LOQ) estrictamente es la concentración más baja del analito que puede ser determinada con un nivel aceptable de precisión, de repetibilidad y veracidad. En general, los límites de cuantificación son característicos de desempeño que marcan la habilidad de un proceso de medición química para ‘cuantificar’ adecuadamente un analito. Se define como:

$$\text{Límite de cuantificación} = y_B + 10s_B \quad (\text{Ec. 3.11})$$

e) Exactitud³⁵

La Organización Internacional de Estándares (ISO) define la exactitud como “el grado de concordancia entre el resultado de un ensayo y el valor de referencia aceptado del analito”. Bajo esta definición, la exactitud de un resultado individual puede estar afectada por dos tipos de errores: aleatorios y sistemáticos.

La exactitud se reporta como porcentaje de error, y se calcula como:

$$\%error = \frac{\text{Concentración}_{teórica} - \text{Concentración}_{experimental}}{\text{Concentración}_{teórica}} \times 100 \quad (\text{Ec. 3.12})$$

f) Precisión³⁵

Es la proximidad de concordancia entre los resultados de pruebas independientes obtenidos bajo condiciones estipuladas. Las medidas de precisión más comunes son la “repetibilidad” y la “reproducibilidad”.

La precisión depende sólo de la distribución de los errores aleatorios y no se relaciona con el valor verdadero o valor especificado. La medida de la precisión generalmente se expresa en términos del coeficiente de variación (CV) y se calcula como:

$$\text{Coeficiente de variación (CV)} = \text{desviación estándar relativa (DR)} = 100 \frac{s}{\bar{x}} \quad (\text{Ec. 3.13})$$

g) Repetibilidad³⁵

Es la proximidad de concordancia entre los resultados de mediciones sucesivas del mismo mensurando realizadas bajo las mismas condiciones de medición.

Es la precisión en condiciones de repetibilidad, es decir, condiciones según las cuales los resultados independientes de una prueba se obtienen con el mismo método, sobre objetos de prueba idénticos, en el mismo laboratorio, por el mismo operador, usando el mismo equipo y dentro de intervalos de tiempo cortos.

h) Reproducibilidad³⁵

Es la precisión bajo condiciones de reproducibilidad, es decir, condiciones según las cuales los resultados de prueba se obtienen con el mismo método, sobre objetos de prueba idénticos, en diferentes laboratorios, por diferentes operadores, usando diferentes equipos.

i) Robustez

La robustez de un procedimiento analítico es una medida de su capacidad de permanecer inalterado por variaciones pequeñas pero deliberadas en los parámetros del método y proporciona una indicación de su confiabilidad durante su uso normal. Si el método involucra extracciones, es obligatorio evaluar el recobro, para lo cual se analizan muestras puras y enriquecidas a diferentes concentraciones. El recobro se calcula como:

$$\% \text{Recobro} = 100 - \frac{C_{\text{teórica}} - C_{\text{experimental}}}{C_{\text{teórica}}} \quad (\text{Ec. 3.14})$$

3.6 Sorción

3.6.1 Adsorción

Cuando una superficie sólida entra en contacto con un vapor o una sustancia disuelta, una parte de esta última se puede unir a la superficie en forma de una capa adsorbida. Al sólido generalmente se le llama adsorbente y a la sustancia que forma la capa adsorbato.³⁹

La adsorción es el mecanismo más común responsable de la retención de iones y moléculas en suelos, particularmente cationes de elementos traza (Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Pb^{2+} , Cd^{2+}), aniones (CrO_4^{2-} , SeO_3^{2-} , SeO_4^{2-} , AsO_3^{3-} , AsO_4^{3-} , MoO_4^{2-}), y compuestos orgánicos (pesticidas y disolventes industriales). Además de la adsorción, los compuestos orgánicos pueden absorberse dentro de la materia orgánica. Es difícil distinguir entre mecanismos de adsorción y absorción, por eso es común usar el término sorción para indicar que el mecanismo de retención es desconocido. La adsorción de pesticidas, herbicidas y sus productos de degradación en el suelo tiene una gran importancia, ya que hace variar su movilidad y, por consiguiente, sus efectos medioambientales.⁴⁰

3.6.2 Isotermas de sorción.⁴¹

La medida de la sorción de plaguicidas por suelos y sus componentes suele llevarse a cabo mediante la obtención de isotermas de sorción que se obtienen experimentalmente en el laboratorio haciendo interaccionar cantidades conocidas de adsorbente con disoluciones de diferentes concentraciones iniciales de plaguicida a una temperatura determinada. La representación gráfica de la cantidad sorbida por el suelo en relación a la concentración de la disolución en equilibrio se denomina isoterma de sorción.

Las isotermas de sorción de contaminantes se pueden clasificar en cuatro clases principales dependiendo de la pendiente del tramo inicial de la curva. La forma de la isoterma está relacionada con el mecanismo de sorción, la naturaleza de la molécula a sorber y de la superficie sorbente. En la Figura 3.11 se muestran las cuatro clases de isotermas de sorción.

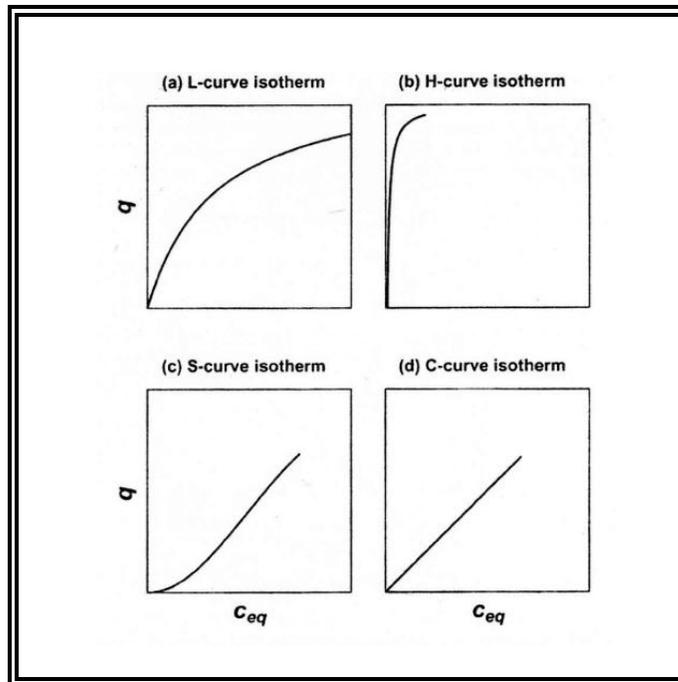


Figura 3.11. Tipos de isothermas de sorción.

-Isotherma tipo L. La curvatura inicial de la isoterma indica que a medida que transcurre la sorción aumenta la dificultad para que las moléculas de soluto encuentren sitios de adsorción vacantes. No suele haber fenómenos de competencia entre el soluto y el disolvente por los sitios de adsorción, por lo que a menudo se habla de sorción específica. Se caracteriza por una pendiente inicial que no aumenta con la concentración. El comportamiento sugiere una afinidad importante de las partículas del suelo por los iones, que disminuye a medida que las superficies de intercambio van siendo ocupadas por los iones. Es el tipo más común en química de suelos.

-Isotherma tipo S. La curvatura inicial de la isoterma indica que la sorción está facilitada a elevadas concentraciones de soluto. Suele darse cuando se presenta una interacción específica entre el soluto y el sorbente, cuando existe una moderada atracción entre las moléculas sorbidas o cuando las moléculas de soluto y las del disolvente compiten por los sitios de sorción del sorbente. Se tiene el conocimiento de que la sorción del herbicida 2,4-D a óxidos de hierro da lugar a isothermas tipo S, lo que se ha atribuido a interacciones entre los anillos aromáticos de las moléculas adsorbidas de 2,4-D. Se

caracteriza por una pendiente inicial débil que aumenta con la concentración, es decir, una afinidad débil al principio que aumenta a medida que el sistema se carga.

-Isoterma tipo H. Se considera un caso especial de las isothermas tipo L en las que el soluto tiene tan alta afinidad por el adsorbente, que para disoluciones diluidas la sorción es total. Es poco habitual y suele darse para sorbatos de elevado peso molecular como micelas iónicas o especies poliméricas. Es una versión extrema de la curva L. Este tipo de curva describe interacciones muy fuertes entre el suelo y el sorbato.

-Isoterma tipo C o de reparto constante. Se caracteriza por presentar una relación lineal entre la cantidad de soluto sorbido y la concentración del mismo en la disolución de equilibrio. La sorción de plaguicidas no iónicos a la materia orgánica del suelo, suelos orgánicos y sustancias húmicas purificadas ocurre a menudo con isothermas del tipo C.

3.6.3 Modelos de isothermas

Para representar numéricamente las isothermas de sorción de los plaguicidas, éstas suelen ajustarse a ecuaciones matemáticas o modelos de sorción, entre los cuales destacan las ecuaciones de Freundlich y de Langmuir.⁴¹

En química de suelos, los datos experimentales son ajustados a las expresiones matemáticas que describen la curva de sorción, con el objetivo de resumir el comportamiento en algunas variables que se usan para comparar el comportamiento de dos suelos. Los modelos más utilizados se resumen en la Tabla 3.9.

Tabla 3.9. Modelos de isotermas más usados en química de suelos.

Modelo de isoterma	Ecuación
Lineal	$C_S = K_D C_L$ (Ec. 3.15)
Freundlich	$C_S = K_F C_L^N$ (Ec. 3.16)
Langmuir	$C_S = \frac{C_{max} K C_L}{1 + K C_L}$ (Ec. 3.17)

En las ecuaciones de la Tabla 3.9, C_S representa la concentración sorbida, C_L la concentración en disolución al equilibrio, K_D el coeficiente de distribución, N y K_F son parámetros de la isoterma de Freundlich en función del tipo de suelo y de soluto, C_{max} es la capacidad de sorción máxima y K el coeficiente de Langmuir.

Cabe mencionar que el modelo de Langmuir fue desarrollado para describir la sorción de gases por sólidos, se utiliza en el estudio de suelos y considera que la superficie del sorbente contiene un número fijo de lugares de adsorción y cada uno puede sorber una sola molécula. Además se supone que no hay interacciones entre las moléculas sorbidas y que el calor de sorción es igual para todos los lugares independientemente de la fracción de superficie cubierta.

Mientras que el modelo de Freundlich es el que más se ajusta al comportamiento de la retención de un soluto en un suelo.³⁹

La ecuación 3.16 puede linearizarse de forma logarítmica:

$$\log C_{ret} = \log K_f + 1/n \log C_o \quad (\text{Ec. 3.18})$$

3.7 Zonas de estudio⁴²

El estado de Tabasco se encuentra en la región del sureste de la República de México, desde la planicie costera del Golfo de México, hasta las montañas del norte de Chiapas, puede delimitarse geográficamente entre los 17° 15' y 18° 39' de altitud norte y los 91°00' y 94°07' de longitud oeste. La ubicación del estado de Tabasco en la zona tropical, su escasa elevación con respecto al nivel del mar y su cercanía con el Golfo de

México, determinan el desarrollo de climas cálidos con influencia marítima, en los que la variación de temperatura es moderada.

La disponibilidad de agua del estado se constituye con los caudales del río Usumacinta y el río Grijalva. Se encuentra formado por llanuras bajas y húmedas de origen aluvial, la mayor parte del territorio es una planicie que se extiende a la vista, sin obstáculo alguno, hasta el horizonte. Existen al sur algunas elevaciones que forman parte de la meseta central de Chiapas.

Los tipos de suelos localizados en el estado son:

- Vertisol, que son suelos muy arcillosos, presentan problemas de agrietamientos en la época de sequía y tienen problemas de drenaje en épocas de lluvia.
- Regosoles, son suelos arenosos de bordes de playas.
- Solonchak son suelos salinos debido a las cercanías de las aguas del Golfo de México.
- Gleysoles son suelos generalmente de texturas francas que presentan problemas de exceso de humedad por deficiente drenaje.
- Cambisol y fluvisol, son aquellos ubicados en las márgenes de los ríos.
- Rendzinas, suelos ricos en materia orgánica y materiales calcáreos, generalmente están asociados a pendientes abruptas, se localizan en los límites con el estado de Chiapas
- Acrisoles, son suelos arenosos, ácidos y de baja fertilidad.

La actividad agrícola en la entidad se desarrolla principalmente bajo condiciones de temporal, ya que a diferencia de otras regiones del país, en Tabasco se presentan abundantes precipitaciones. Dicho estado destaca en el cultivo de maíz y frijol, además de cacao, coco, plátano y caña de azúcar, así como los pastos naturales e inducidos, que son pilar de la ganadería extensiva o de libre pastoreo.

Debido a la alta actividad agrícola del estado se requiere la utilización de plaguicidas. En México se estima que en el año 2001 el 36% del consumo total de plaguicidas usados en el sector agrícola correspondió a los herbicidas. El estado de Tabasco es una de las zonas con mayor consumo de plaguicidas, como se observa en la Tabla 3.10.

Tabla 3.10. Zonas con mayor uso de plaguicidas en México, 2000 (INEGI, 2002).

Lugar	Estado o zona
1	Sinaloa
2	Chiapas
3	Veracruz
4	Jalisco-Nayarit-Colima
5	Sonora-Baja California
6	Tamaulipas
7	Michoacán
8	Tabasco
9	Estado de México
10	Puebla-Oaxaca

Para evaluar la afectación en suelo y agua del herbicida 2,4-D y de su principal producto de degradación, se eligieron dos sitios diferentes de estudio ubicados en el estado de Tabasco: Centro y Teapa.

3.7.1 Sitio de estudio 1

Localización: Municipio Centro, Guineo 2ª sección. Tabasco.

El municipio Centro se localiza en la región centro del estado, presenta el aspecto de una vasta planicie cortada en trechos por lomeríos bajos de naturaleza arcillosa. Los principales recursos hidrológicos del municipio son las aguas del río Grijalva. Posee un clima cálido-húmedo con abundantes lluvias en verano, con una temperatura media anual de 33.6° C. Este municipio es uno de los principales productores de maíz.

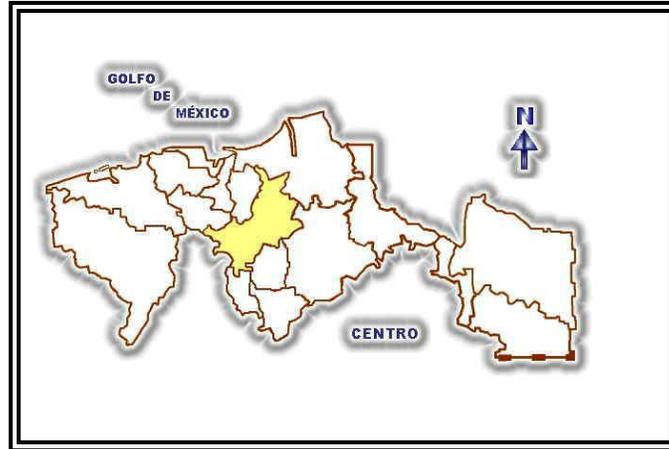


Figura 3.12. Municipio Centro, Tabasco.

En la siguiente tabla se resumen las características fisicoquímicas del suelo en el sitio de muestreo 1.

Tabla 3.11. Características fisicoquímicas del suelo en el sitio de muestreo 1.

Tipo de suelo	Manejo de suelo	pH (agua)	Materia orgánica	Nitrógeno	Fósforo	Arcilla	Limo	Arena	Clase textural	Humedad
			%	%	mg kg ⁻¹	%	%	%		
Fluvisol	Cultivo plátano y maíz	6.8	4.7	0.3	16.5	65	31	4	Arcilla	20.5

3.7.2 Sitio de estudio 2

Localización: Municipio Teapa, Tabasco.

El municipio de Teapa se localiza en la región de la sierra, se encuentra en una zona intermedia entre la planicie pluvial y la sierra de Tabasco. Se encuentra en la región hidrológica Grijalva-Usumacinta. El clima es cálido-húmedo con lluvias todo el año, tiene una temperatura media anual de 27.8° C. Es el principal productor de plátano en el estado.

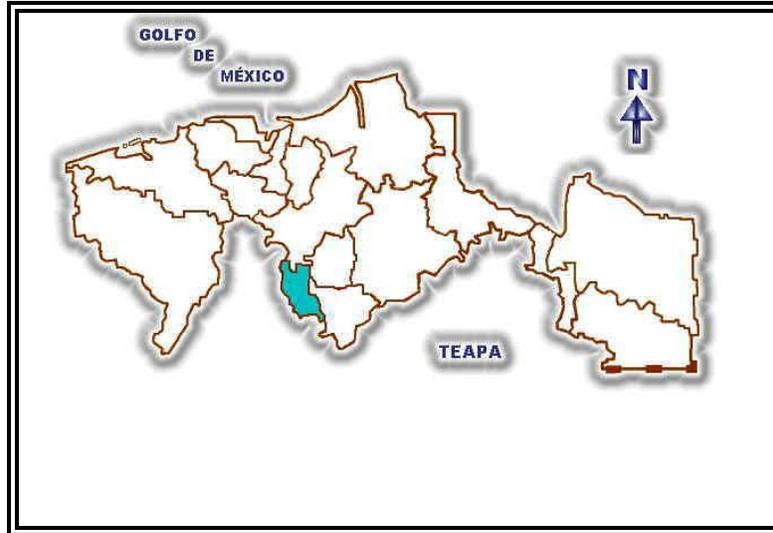


Figura 3.13. Municipio Teapa, Tabasco.

En la siguiente tabla se resumen las características fisicoquímicas del suelo en este sitio de estudio.

Tabla 3.12. Características fisicoquímicas del suelo en el sitio de muestreo 2.

Tipo de suelo	Manejo de suelo	pH (agua)	Materia orgánica	Nitrógeno	Fósforo	Arcilla	Limo	Arena	Clase textural	Humedad
										%
Vertisol	Pastizal	7.0	4.8	0.21	5.53	32	21	47	Migajón arcillo-arenoso	21.5

Las características de los suelos de estudio descritas en las tablas 3.11 y 3.12 fueron determinadas en el Colegio de la Frontera sur Unidad Villahermosa.

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Instrumentación

4.1.1 Equipo y materiales

- Para la cuantificación del ácido 2,4-diclorofenoxiacético y de su metabolito, el 2,4-diclorofenol, se utilizó un cromatógrafo de líquidos constituido de una bomba binaria de la marca Waters modelo 1525, un automuestreador marca Waters modelo 717 plus y un detector UV-DAD marca Waters modelo 2998.
- Purificador y desionizador de agua, Milli-Q Modelo 185 de Millipore.
- Balanza analítica con capacidad de 210 g y precisión de 0.1 mg, de la marca OHAUS modelo Explorer.
- Filtros de nylon para jeringa de tamaño de poro de 0.45 μm marca millipore.
- Agitador para tubos con rotor de la marca Glas-Col®. Modelo ARD4512.

4.1.2 Reactivos y disolventes

- Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) PESTANAL®, estándar analítico, Sigma-Aldrich.
- 2,4-diclorofenol (2,4-DCP) estándar analítico, Sigma-Aldrich.
- Acetonitrilo CHROMASOLV® Plus, grado CLAR ($\geq 99.9\%$), Sigma-Aldrich.
- Metanol CHROMASOLV® Plus, grado CLAR ($\geq 99.9\%$), Sigma-Aldrich.
- Ácido fosfórico, $\geq 85\%$ Sigma Aldrich.
- Fosfato de sodio monobásico grado reactivo analítico. J.T. Baker.
- Cloruro de calcio dihidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), Reagent Plus®, $\geq 99.5\%$, Sigma-Aldrich.
- Agua ultrapura, resistividad 18,2 $\text{M}\Omega \cdot \text{cm}$ a 25°C.

4.2 Desarrollo del método cromatográfico

4.2.1 Condiciones cromatográficas para la determinación simultánea del 2,4-D y del 2,4-DCP

Para este fin se utilizó como fase estacionaria una columna C_{18} de 100 mm de longitud x 4.6 mm de diámetro interno, empacada con partículas de tamaño de 3 μm de la marca

Grace Davison. La selección de la fase móvil fue realizada mediante la evaluación de tres relaciones de acetonitrilo-buffer de fosfatos 0.1 M de pH=2.1, 40-60, 50-50, 60-40 v/v, a un flujo de 1 ml/min, en modo isocrático. El monitoreo de los analitos se realizó a 225, 240, 260 y 280 nm.

4.2.2 Preparación de la fase móvil

1. Buffer de fosfatos de pH= 2.1 ($\text{H}_3\text{PO}_4/\text{H}_2\text{PO}_4^-$ 0.1M). Se pesaron aproximadamente 7,86 g de fosfato de sodio monobásico y se llevó a cabo su disolución con un poco de agua. Posteriormente se adicionaron 9.8 ml de ácido fosfórico y la mezcla final fue llevada a un volumen de 2000 ml con agua desionizada. El buffer obtenido fue pasado a través de un sistema de filtración Millipore, utilizándose membranas de 0.45 μm de tamaño de poro.
2. Fase móvil (acetonitrilo-buffer: 40-60, 50-50, 60-40 v/v). Con material volumétrico se tomó el volumen necesario de buffer y de acetonitrilo para preparar cada relación de estudio.

4.2.3 Preparación de las disoluciones estándar para las curvas de calibración

Para el desarrollo del método analítico propuesto se utilizaron varias disoluciones, las cuales se mencionan a continuación, así como la forma en que fueron preparadas. Todas las disoluciones se prepararon con disolventes grado cromatográfico, reactivos grado analítico y agua desionizada.

- Stock de 1000 ppm de 2,4-D. Se pesaron aproximadamente 100 mg de ácido 2,4-diclorofenoxiacético y se llevaron a 100 ml con metanol. La disolución se almacenó en un frasco ámbar bajo refrigeración para evitar la degradación del analito.
- Stock de 1000 ppm de 2,4-DCP. Se pesaron aproximadamente 100 mg de 2,4-diclorofenol y se llevaron a 100 ml con metanol. La disolución se almacenó en un frasco ámbar y se refrigeró para evitar la degradación del analito.
- Disolución de cloruro de calcio 8 mM. Se pesaron aproximadamente 0.5851 g de CaCl_2 y se llevaron a un aforo de 500 ml con agua desionizada.

-
- Todas las disoluciones de estándares para construir las curvas de calibración, así como los estándares de verificación, fueron preparados mediante la dilución de las disoluciones stock de 2,4 D y 2,4 DCP antes mencionadas.

4.3 Validación del método.

Una vez seleccionadas las características cromatográficas de análisis, se procedió con la obtención de los parámetros típicos de una validación analítica: intervalo lineal y de trabajo, exactitud, precisión, límites de detección y de cuantificación.

4.3.1 Intervalo lineal y de trabajo.

Con este fin se prepararon estándares de concentración de los dos analitos en la misma disolución de entre 0.05 y 200 ppm en CaCl_2 8 mM a partir de las disoluciones stock de metanol. Cada una de las curvas de calibración fue preparada por triplicado.

4.3.2 Precisión.

Para ello se seleccionaron dos niveles de concentración (0.5 y 5 ppm) de cada analito. Cada nivel de concentración fue preparado por triplicado de manera independiente y analizado también por triplicado. El análisis de datos se realizó mediante el cálculo del porcentaje del coeficiente de variabilidad (%CV).

4.3.3 Exactitud.

El parámetro de exactitud instrumental fue calculado a partir de la inyección de tres disoluciones independientes de 2,4-D y 2,4-DCP para dos niveles de concentración (0.5 y 5 ppm). Con los valores de área determinados y los parámetros de regresión calculados de las curvas de calibración, se determinó la concentración de cada estándar y se comparó con el valor conocido. La exactitud se evaluó mediante el porcentaje de error.

4.3.4 Límite de detección experimental.

Se realizaron siete inyecciones de una disolución de muy baja concentración de cada analito (0.01 ppm). Con los valores de área determinados se calcularon la media y su

desviación estándar. El límite de detección se calcula de acuerdo a lo establecido por Miller y Miller (Ec. 3.10). Posteriormente con la ecuación de la curva de regresión (Ec. 5.3 y 5.4) se obtuvo el límite de detección en unidades de concentración.

4.3.5 Límite de cuantificación experimental.

Se realizó el mismo procedimiento experimental que el reportado para el límite de detección. El límite de cuantificación se reporta de acuerdo a lo establecido por Miller y Miller (Ec. 3.11). Con la ecuación de la curva de regresión (Ec. 5.3 y 5.4) se obtuvo el límite de cuantificación en unidades de concentración.

4.3.6 Recobros

4.3.6.1 Muestras de origen ambiental

El sistema cromatográfico de análisis desarrollado fue utilizado para la determinación y cuantificación de 2,4-D y 2,4-DCP en extractos de suelos tipo vertisol y fluvisol del estado de Tabasco, para lo cual fueron seleccionadas 6 muestras de cada tipo de suelo, que fueron previamente tamizadas con una malla #10 con apertura de 2 mm.

4.3.6.2 Preparación de los extractos de suelo.

Se puso en contacto la muestra de suelo correspondiente con la disolución de CaCl_2 8mM ($4g_{\text{base seca}}-20$ ml), posteriormente fueron sometidos a un proceso de agitación a 150 rpm por 24 hrs a 25°C. El sobrenadante fue retirado y filtrado a través de membranas de tamaño de poro de 0.45 μm .

4.3.6.3 Análisis de extractos sin fortificar

Los extractos filtrados fueron analizados por triplicado con las condiciones cromatográficas optimizadas previamente establecidas, con el fin de determinar si los extractos contenían uno o ambos analitos.

4.3.6.4 Análisis de extractos fortificados con 2,4-D y 2,4-DCP

Para evaluar la robustez del método, éste se probó en el análisis de los extractos de suelo anteriormente descritos, que fueron a dos niveles de concentración de 2,4-D y 2,4-DCP (0.5 y 5 ppm). Utilizando una curva de calibración externa para cada analito fueron determinadas las concentraciones de los extractos.

Cabe mencionar que cada extracto fue preparado por triplicado para poder realizar el análisis estadístico correspondiente, además de analizar por triplicado cada muestra.

Una vez obtenidos los resultados de las muestras fortificadas se evaluó el desempeño del método propuesto, por medio del porcentaje de recobro (Ec 3.14).

4.4 Aplicación del método cromatográfico

4.4.1 Características de las muestras de suelo

Los estudios de movilidad de este pesticida y su metabolito fueron realizados en 6 muestras de suelo de cada sitio de estudio, correspondientes a suelos de tipo fluvisol y vertisol.

4.4.2 Preparación y caracterización de las muestras

- Las muestras fueron tamizadas a humedad de campo, utilizando una malla del #10 (2 mm). Posteriormente fueron almacenadas a 4°C hasta su utilización.

4.4.3 Experimentos de sorción: ensayos batch

Los experimentos de sorción fueron realizados en formato batch con los dos compuestos de interés: 2,4 D y 2,4 DCP, siguiendo la metodología de Candela et al. (2003)⁵². Se puso en contacto la muestra de suelo correspondiente con la disolución de CaCl₂ 8mM ($4g_{base\ seca}^{-1} \cdot 15\ ml$), se adicionó el volumen correspondiente para obtener cada uno de los cinco niveles de concentración elegidos para cada compuesto en el intervalo de concentración comprendido entre 0.1 y 20 ppm (ver Anexo I) y se llevó a un volumen final de 20 ml, además del respectivo blanco, posteriormente fueron sometidos a un proceso de agitación a 150 rpm por 24 hrs a 25°C. El sobrenadante fue retirado y filtrado a través de membranas de tamaño de poro de 0.45 µm.

Cabe mencionar que cada disolución se preparó por triplicado en un medio de CaCl_2 de concentración 8 mM, con la finalidad de obtener una fuerza iónica similar a la que tiene la disolución del suelo.

4.4.4 Cuantificación de los compuestos de interés

Las concentraciones de 2,4 D y de 2,4 DCP fueron obtenidas en unidades de área por medio de la metodología propuesta en el presente trabajo, por medio de la ecuación de regresión correspondiente para cada compuesto (Ec. 5.1 y 5.2) se obtuvo en unidades de concentración.

4.4.5 Trazo de las isothermas de sorción

Las isothermas se elaboraron con los tres modelos descritos con anterioridad: Lineal, Freundlich y Langmuir.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Desarrollo del método

5.1.1 Selección de la longitud de onda de trabajo

Con el fin de seleccionar la longitud de onda de trabajo adecuada para monitorear al 2,4-D y al 2,4-DCP, se trazó el espectro de absorción en el ultravioleta para cada analito de una disolución acuosa de 10 mg/l. En la figura 5.1 se presenta el espectro de absorción del 2,4-D, donde se puede observar que la longitud de onda (λ) de 225 nm, presenta un valor alto de absorbancia y un valor de λ no tan bajo con lo que se minimizan interferencias de tipo espectral, por lo que se seleccionó esta longitud para el monitoreo de este analito.

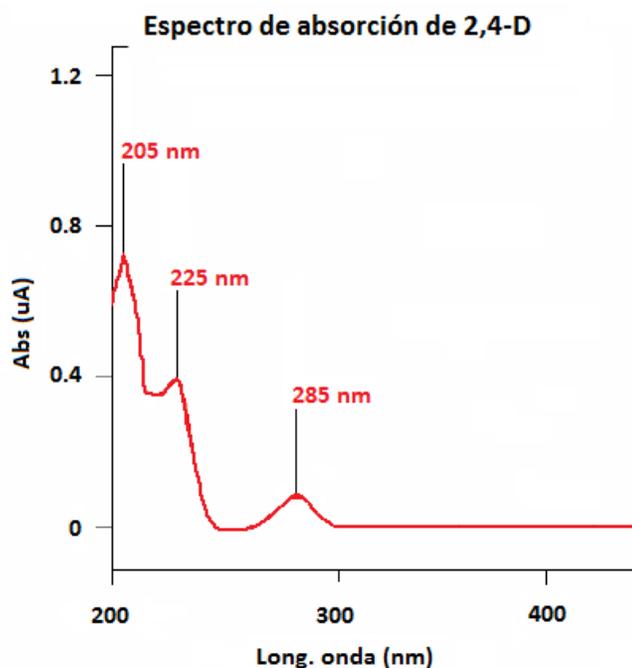


Figura 5.1. Espectro de absorción en el ultravioleta del 2,4-D.

En la siguiente figura se presenta el espectro de absorción en el ultravioleta del 2,4-DCP, el cual presenta una máxima de absorbancia en aproximadamente 280 nm. Sin embargo, como se seleccionó la longitud de onda de 225 para el monitoreo del 2,4-D,

se decidió trabajar con esta misma longitud de onda para llevar a cabo la cuantificación del metabolito del 2,4-D, ya que a este valor de λ , el 2,4-DCP absorbe todavía más. Por lo que trabajando a una longitud de onda de 225 nm se garantiza que se pueden leer concentraciones pequeñas de ambos compuestos, generando con ello bajos límites de cuantificación y de detección con pocas probabilidades de interferencias.

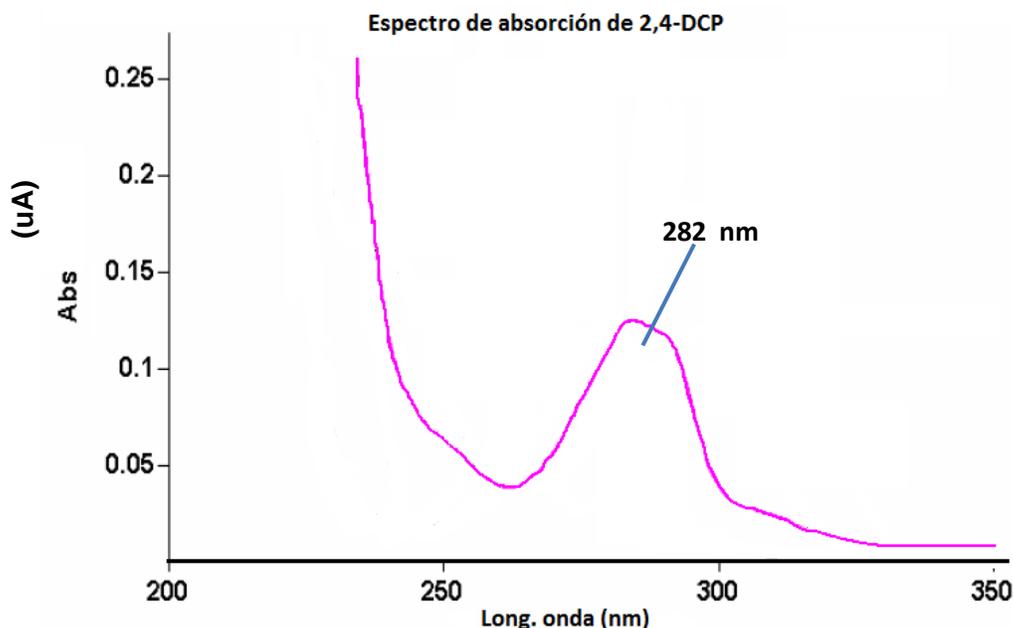


Figura 5.2. Espectro de absorción en el ultravioleta del 2,4-DCP.

5.1.2 Selección de las fases estacionaria y móvil

Con base en la polaridad de las moléculas de 2,4-D y 2,4-DCP se eligió trabajar la técnica de cromatografía en fase reversa utilizando una columna C₁₈, cuyas características se muestran en la tabla 5.1.

Tabla 5.1. Características de la columna cromatográfica.

Columna	Dimensiones	Tamaño de partícula
Denali C ₁₈	100x4.6 mm	3 μ m

La selección de la fase móvil se hizo en base a la polaridad y a la estabilidad de los analitos, un parámetro de suma importancia en el caso del ácido 2,4-diclorofenoxiacético es su valor de pKa, ya que esta especie debe estar en forma molecular para que pueda ser analizada por cromatografía en fase reversa, por lo que la fase móvil debe tener un pH menor que este valor de pKa para poder lograrlo. Considerando esto se encontró que la fase móvil adecuada para lograr la separación entre los analitos es una mezcla de $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{H}_2\text{PO}_4^-$ 0.1 M-acetonitrilo en una relación 60-40 v/v, a un flujo de 1 mL/min en modo isocrático. Esto se concluyó al observar los resultados arrojados en la Tabla 5.2, de los cuales se puede decir que a medida que aumenta el porcentaje de acetonitrilo, los analitos se retienen menos, por lo que es factible que utilizando las relaciones 40-60 y 50-50 v/v buffer-AcCN, existan interferencias con las impurezas presentes en la matriz, ya que ambos analitos tienen tiempos de retención cortos, mientras que la relación 60-40 v/v generó señales lo suficientemente alejadas del tiempo muerto, sin obtener un tiempo de análisis prolongado.

Tabla 5.2. Tiempos de retención obtenidos para 2,4-D y 2,4-DCP al evaluar tres composiciones de fase móvil.

AcCN-Buffer* (v/v)	Analito	tr (min)
40-60	2,4-D	5.2
50-50		3.2
60-40		2.1
40-60	2,4-DCP	6.8
50-50		3.9
60-40		2.5

*Buffer de fosfatos 0.1M ($\text{H}_3\text{PO}_4/\text{H}_2\text{PO}_4^-$) pH= 2,1

En la siguiente tabla se resumen los parámetros optimizados para el desarrollo del método.

Tabla 5.3. Condiciones de trabajo del método desarrollado.

Flujo (ml min ⁻¹)	Fase móvil	Columna	λ(nm)
1	Buffer H ₃ PO ₄ /H ₂ PO ₄ ⁻ (0.1M, pH=2.1)-AcCN 60:40 v/v	C ₁₈	225

Utilizando estas condiciones se encontró que el 2,4-D presenta un tiempo de retención de aproximadamente 5.8 minutos y el 2,4-DCP un tiempo de retención aproximado de 7.4 minutos, con un tiempo total de corrida de 10 minutos (ver fig. 5.3). Se toma como tiempo muerto 1.2 minutos.

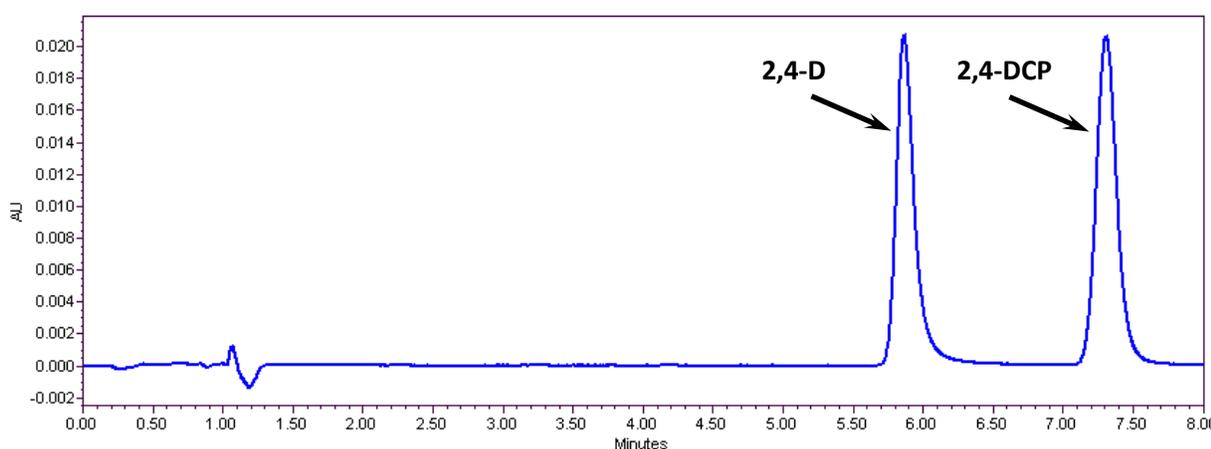


Figura 5.3. Cromatograma obtenido con las condiciones óptimas de trabajo para una concentración de 10 mg/l de 2,4-D y 2,4-DCP.

5.1.3 Parámetros cromatográficos del sistema

Con el fin de verificar que las condiciones previamente establecidas fueran adecuadas para la separación, se determinaron los parámetros cromatográficos del sistema. En la Tabla 5.4 se muestran los resultados correspondientes.

Tabla 5.4. Parámetros cromatográficos del método desarrollado.

Compuesto	Parámetros							
	tr (min)	tr' (min)	k'	A	w _b	Rs	N	H (mm)
2,4-D	5.8	4.6	3.8	1.4	0.44	3.5	2800	0.04
2,4-DCP	7.4	6.2	5.2		0.48		3800	0.03

Para cromatografía de líquidos de alta resolución, la guía “Validation of Chromatographic methods”⁴⁴, sugiere que para validar un método bajo esta técnica se debe tener un valor de factor de capacidad (k') mayor a dos, un coeficiente de selectividad (α) cercano a la unidad, un valor de resolución mayor a 2 y un número de platos teóricos mayor a 2000, con base en lo anterior, se puede aseverar que con el método propuesto se logrará una separación adecuada de los picos, ya que se cumple con los valores recomendados.

5.2 Validación del método

5.2.1 Linealidad

Con la finalidad de trazar las curvas de calibración de los dos analitos de estudio, se prepararon disoluciones de concentración conocida de ambos compuestos en 11 niveles de concentración en CaCl_2 , desde 0,05 ppm a 100 ppm. Cada uno de los puntos de la curva de calibración fue preparado por triplicado y su cuantificación también fue realizada por triplicado. En la siguiente figura se presenta la curva de calibración obtenida para el ácido 2,4 diclorofenoxiacético.

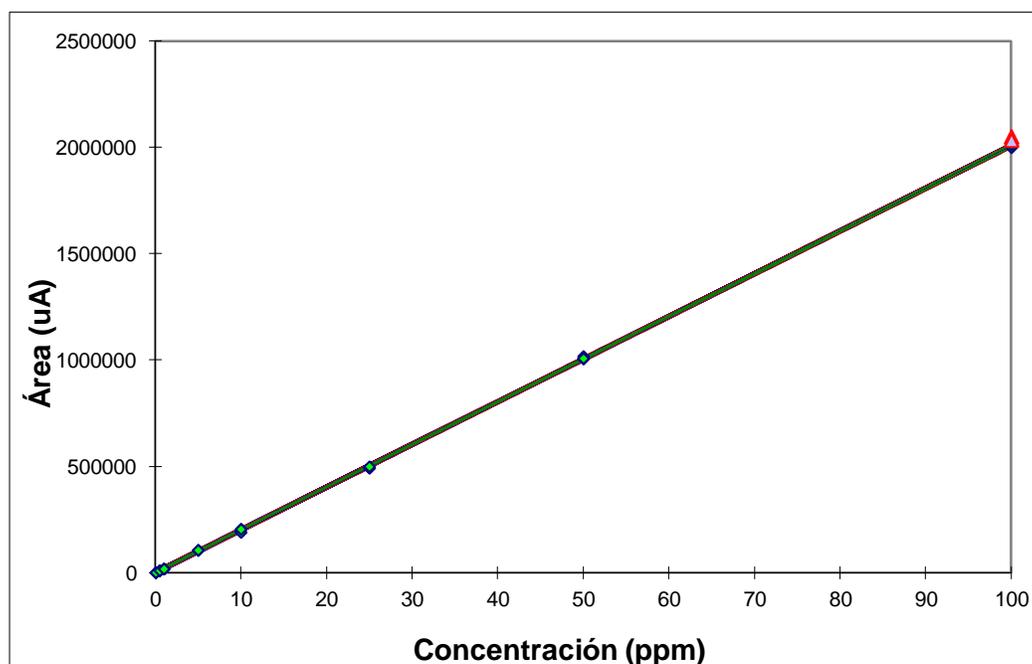


Figura 5.4. Curva de calibración obtenida para la cuantificación de 2,4-D en muestras acuosas ($\lambda=225$ nm).

De la regresión lineal de la curva de calibración del 2,4-D es posible determinar la ecuación que relaciona el área del pico cromatográfico de éste con su concentración, la cual es:

$$\text{Área} = 20077 \text{ Conc (ppm)} - 200$$

de donde se obtiene la ecuación para calcular la concentración del ácido 2,4-diclorofenoxiacético:

$$C(\text{ppm}) = \frac{\text{Área} + 200}{20077}$$

En la siguiente tabla se presentan los parámetros típicos del análisis de regresión, como son: la pendiente (m) y la ordenada al origen (b) reportados como intervalos de confianza, así como el factor de determinación, el intervalo lineal y el número de datos utilizados para este fin.

Tabla 5.5 Parámetros estadísticos de la validación del método de cuantificación del 2,4-D. (Nivel de confianza al 95 %).

Parámetro	Valor
Intervalo lineal	0.05-100 mg/l
n	33
Pendiente (m)	20077 ± 65
Ordenada al origen (b)	-200 ± 2700
Factor de determinación (R ²)	0.9999
Ecuación de regresión	y = 20077x - 200 (Ec. 5.1)

En la figura 5.5 se presenta la curva de calibración obtenida para la cuantificación del 2,4-DCP.

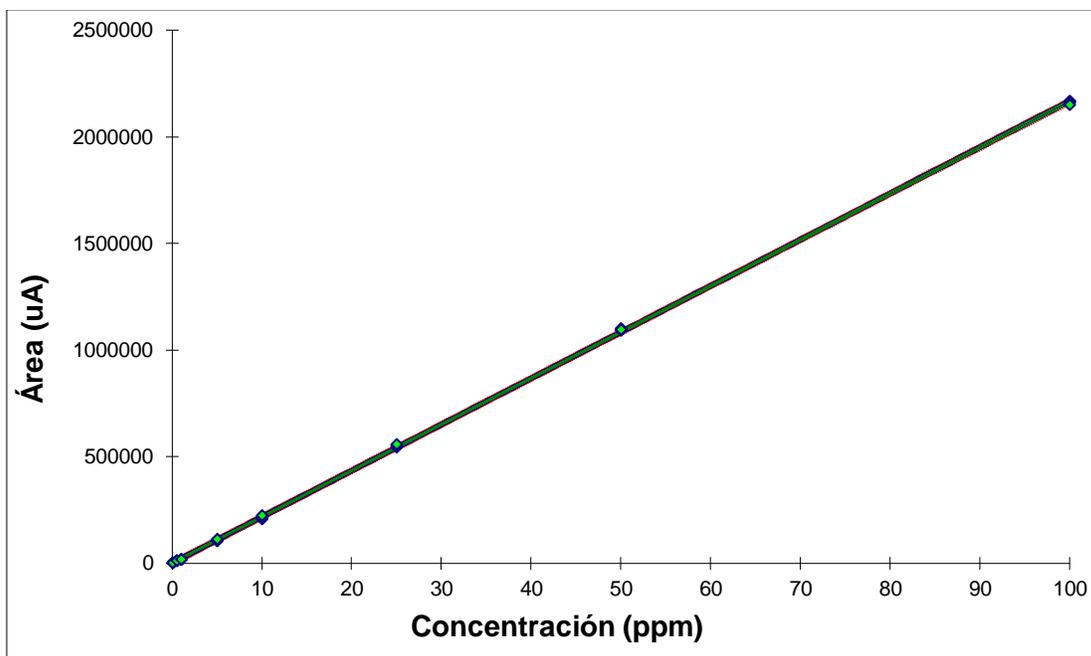


Figura 5.5. Curva de calibración obtenida para la cuantificación de 2,4-DCP en muestras acuosas ($\lambda=225$ nm).

La ecuación que relaciona el área del pico cromatográfico del 2,4-DCP con su concentración, está dada por:

$$\text{Área} = 21663 \text{ Conc (ppm)} + 600$$

de donde se obtiene que la ecuación para calcular la concentración del 2,4-diclorofenol:

$$C(\text{ppm}) = \frac{\text{Área} - 600}{21663}$$

En la siguiente tabla se presentan los parámetros típicos del análisis de regresión, como son: la pendiente (m) y la ordenada al origen (b) reportados como intervalos de confianza, así como el factor de determinación, el intervalo lineal y el número de datos utilizados para este fin.

Tabla 5.6 Parámetros estadísticos de la validación del método de cuantificación de 2,4-DCP. (Nivel de confianza al 95 %).

Parámetro	Valor
Intervalo lineal	0.05-100 mg/l
n	33
Pendiente (m)	21663 ± 83
Ordenada al origen (b)	600 ± 3400
Factor de determinación (R²)	0.9999
Ecuación de regresión	y= 21663x + 600 (Ec. 5. 2)

En ambos casos, el valor de la pendiente ($m \neq 0$), indica que el detector puede discriminar entre disoluciones cuya concentración de 2,4-D y 2,4-DCP se encuentre entre 0.05 y 100 mg/l. Como criterio de aceptación del intervalo lineal, se debe verificar que el coeficiente de correlación (r), obtenido de los datos de la recta de regresión, sea mayor que 0.999. Considerando esto es posible decir que para ambos compuestos existe una respuesta lineal del detector en el intervalo de concentraciones de 0.05 a 100 mg/l, lo que significa que el área del pico cromatográfico es directamente proporcional a la concentración del analito en cuestión; para la curva de calibración de ambos compuestos se obtuvo que los valores de concentraciones mayores a 100 mg/l no estaban dentro de los cinturones de confianza, por lo que fueron rechazados con un riesgo del 5%.

5.2.2 Límite de detección experimental

Para la estimación del límite de detección se realizó la medición de 7 disoluciones de concentración conocida (0,01 mg/l) de 2,4-D y 2,4-DCP de manera independiente. De la ecuación de regresión correspondiente para cada compuesto se obtiene el LOD en unidades de concentración.

Tabla 5.7. Parámetros estadísticos de la curva de calibración para la determinación del LOD para 2,4-D y 2,4-DCP, con un nivel de confianza del 95%

Parámetro	2,4-D	2,4-DCP
Ordenada al origen (b)	25±93	-90±340
Pendiente (m)	20540±260	22420±970
Factor de determinación (R ²)	0,9999	0,9999
Ecuación de regresión	y=20540x+25 (Ec. 5.3)	y=22420x-90 (Ec. 5.4)

Cabe mencionar que para determinar los valores de concentración a partir de la ecuación de regresión, no se utilizaron en su totalidad los datos del intervalo lineal de la curva de calibración, se consideraron cinco niveles de concentración comprendidos entre 0.05 y 5 mg/l, más el respectivo blanco.

Los resultados de LOD se muestran en las siguientes tablas en unidades de área y concentración.

Tabla 5.8. Límite de detección del método desarrollado para el análisis de 2,4-D.

Analito	Área	área promedio	S	LOD (área)	LOD (mg/l)
2,4-D	373.39	352.25	14.59	396.03	0.018±0.009
	370.22				
	356.48				
	341.98				
	343.67				
	337.62				
	342.38				

Tabla 5.9. Límite de detección del método desarrollado para el análisis de 2,4-DCP.

Analito	Área	área promedio	S	LOD (área)	LOD (mg/l)
2,4-DCP	361.39	351.99	11.29	385.85	0.021±0.031
	364.93				
	340.63				
	361.75				
	335.66				
	351.74				
	347.82				

Con base en los resultados obtenidos, es posible confirmar que el equipo es capaz de indicar la presencia de 2,4-D cuando su concentración es mayor o igual a 0.018 mg/l, y podrá detectar 2,4-DCP cuando su concentración sea mayor a 0.021 mg/l.

5.2.3 Límite de cuantificación experimental

En las tablas 5.10 y 5.11 se presenta los valores del límite de cuantificación experimental para el 2,4-D y el 2,4-DCP en unidades de área y de concentración. Se utilizaron los datos de la tabla 5.7 para la determinación del LOQ.

Tabla 5.10. Límite de cuantificación del método desarrollado para el análisis de 2,4-D.

Analito	Área	área promedio	S	LOQ (área)	LOQ (mg/l)
2,4-D	373.39	352.25	14.59	498.19	0.023±0.009
	370.22				
	356.48				
	341.98				
	343.67				
	337.62				
	342.38				

Tabla 5.11. Límite de cuantificación del método desarrollado para el análisis de 2,4-DCP.

Analito	Área	área promedio	S	LOQ (área)	LOQ (mg/l)
2,4-DCP	361.39	351.99	11.29	464.85	0.025±0.031
	364.93				
	340.63				
	361.75				
	335.66				
	351.74				
	347.82				

De acuerdo con esto, el equipo es capaz de determinar con certeza concentraciones de 2,4-D cuando su valor sea mayor o igual a 0.023 mg/l y concentraciones de 2,4-DCP cuando su concentración sea mayor o igual a 0.025 mg/l, como criterio de aceptación se debe cumplir que el límite de cuantificación debe ser menor o igual al nivel inferior estimado en el intervalo de trabajo, es decir, debe ser ≤ 0.05 mg/l.

5.2.4 Precisión

La precisión del sistema de cuantificación propuesto para ambos compuestos, fue evaluada en términos de repetibilidad en dos niveles de concentración, 0.5 y 5 mg/l, cada uno de ellos fue preparado por triplicado y también analizado por triplicado. En la Tabla 5.12 se presentan los valores de las áreas determinadas para 2,4-D y 2,4-DCP, así como los valores del coeficiente de variación (%CV) para cada compuesto y cada nivel de concentración. Como puede observarse en todos los casos, se tienen valores de CV menores al 5%, lo que indica un grado de precisión aceptable para la cuantificación de estos dos compuestos.

Tabla 5.12. Coeficiente de variabilidad del área de pico para una concentración de 0.5 y 5 mg/l de 2,4-D y 2,4-DCP.

Compuesto	Concentración (mg/l)	No de disolución	No de análisis			Promedio	%CV	Promedio global	%CV global
			1	2	3				
2,4-D	0.5	1	11398.72	10733.66	10695.88	10942.75	3.61	10831.84	3.70
		2	10941.32	10748.90	10380.34	10690.19	2.67		
		3	11460.85	10478.24	10648.68	10862.59	4.83		
	5	1	105803.38	101557.91	101368.33	102909.87	2.44	104106.61	2.41
		2	101143.59	101573.14	106735.62	103150.78	3.02		
		3	105487.00	104890.82	108399.68	106259.16	1.77		
2,4-DCP	0.5	1	12188.55	11839.08	11631.91	11886.51	2.37	11588.53	2.90
		2	11389.43	11988.13	11224.06	11533.87	3.49		
		3	11267.14	11069.64	11698.82	11345.20	2.84		
	5	1	107559.57	109436.38	113559.05	110185.00	2.79	114101.34	2.02
		2	117611.91	119765.63	119654.67	119010.74	1.02		
		3	113811.16	115228.23	110285.48	113108.29	2.25		

Cabe mencionar que la Comisión de Control Analítico y Ampliación de Cobertura, en el documento: Criterios para la validación de métodos fisicoquímicos⁴⁵, establece los criterios presentados en la siguiente tabla para aseverar si un método de análisis es o no preciso.

Tabla 5.13. Criterios de precisión en términos de repetibilidad y reproducibilidad.

Concentración del analito	Repetibilidad (r)	Reproducibilidad (R)
<1 µg/l	CV _r ≤35%	CV _R ≤53%
1 a 10 µg/l	CV _r ≤30%	CV _R ≤45%
10 a 100 µg/l	CV _r ≤20%	CV _R ≤32%
0.1 a 100 mg/l	CV _r ≤15%	CV _R ≤23%
100 a 1000 mg/l	CV _r ≤10%	CV _R ≤16%

Considerando los valores de concentración de las disoluciones que se utilizaron para este fin y consultado la tabla anteriormente descrita, se puede decir que la metodología propuesta es precisa para la cuantificación de 2,4-D y 2,4-DCP, ya que para ambos analitos, en los dos niveles de concentración, el CV es menor al 15%.

5.2.5 Exactitud

La exactitud del método desarrollado se evaluó mediante el uso de disoluciones de concentración conocida de los dos analitos, las concentraciones fueron determinadas por medio de la ecuación de regresión (Ec. 5.5 y 5.6). Finalmente este valor fue comparado con la concentración analítica (concentración teórica o real) y así calcular la exactitud de la medición. Al igual que para la precisión para la determinación de la exactitud se utilizaron dos niveles de concentración para los dos compuestos.

Tabla 5.14. Parámetros estadísticos de la curva de calibración para la determinación de las concentraciones experimentales para 2,4-D y 2,4-DCP con un nivel de confianza al 95 %.

Parámetro	2,4-D	2,4-DCP
Ordenada al origen (b)	-1060±930	-530±920
Pendiente (m)	21300±860	21700±360
Factor de determinación (R ²)	0,9999	0,9999
Ecuación de regresión	y=21300x-1060 (Ec. 5.5)	y=21700x-530 (Ec. 5.6)

Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 5.15.

Tabla 5.15. Determinación del grado de exactitud del sistema de análisis para 2,4-D y 2,4-DCP.

Compuesto	Concentración real (mg/l)	Respuesta (uA)	Concentración calculada* (mg/l)	**Error relativo	% Exactitud	% Exactitud global
2,4-D	0.50	10425.08	0.54±0.09	8.0	108	111
		11176.52	0.57±0.09	14.0	114	
		10765.63	0.56±0.09	12.0	112	
	5.00	101066.83	4.79±0.15	4.2	95.8	96.7
		102261.85	4.85±0.15	3.0	97.0	
		102736.70	4.87±0.15	2.6	97.4	
2,4-DCP	0.50	11503.41	0.55±0.09	10.0	110	110
		11382.96	0.55±0.09	10.0	110	
		11432.97	0.55±0.09	10.0	110	
	5.00	106034.44	4.91±0.15	1.8	98.2	100
		108586.77	5.03±0.15	0.6	100.6	
		109535.13	5.07±0.15	1.4	101.4	

*Nivel de confianza al 95 %.

**El porcentaje de error fue calculado de acuerdo a la ecuación 3.12.

Como puede observarse, para ambos compuestos en los dos niveles de concentración, los valores de exactitud son muy cercanos al 100% y dado que la exactitud es el grado de concordancia entre el valor obtenido y el valor real de una

muestra determinada, podemos decir que el método es aceptable. Cabe mencionar que para los dos compuestos se encontró una menor exactitud para la concentración de 0.5 mg/l con respecto a la de 5.0 mg/l, lo cual era de esperarse ya que a medida que disminuye este parámetro el grado de error en su determinación se incrementa.

5.3 Análisis de muestras fortificadas con 2,4-D y 2,4-DCP

La metodología desarrollada para la determinación de 2,4 D y su principal producto de degradación se aplicó en muestras ambientales: extractos salinos preparados a partir de dos tipos de suelo (ver sección 4.3.6.2). Se evaluó el método en: a) disoluciones en dos niveles de concentración de 2,4-D y 2,4-DCP en CaCl_2 8 mM, b) extractos de suelo en CaCl_2 8 mM sin adición de 2,4-D y 2,4-DCP, c) extractos de suelo en CaCl_2 8 mM adicionados con una concentración equivalente a 0.5 mg/l de 2,4-D y 2,4-DCP y d) extractos de suelo en CaCl_2 8 mM adicionados con una concentración equivalente a 5 mg/l de 2,4-D y 2,4-DCP. En cada caso se buscaron la señales cromatográficas que corresponden a los tiempos de retención de los analitos de estudio, se integraron sus áreas correspondientes y con ayuda de curvas de calibración externas se determinaron sus respectivas concentraciones.

Lo anterior fue hecho con la finalidad de calcular el porcentaje de recobro y así evaluar el efecto de la matriz sobre la cuantificación de los dos analitos de estudio.

5.3.1 Recobros de 2,4-D y 2,4-DCP en CaCl_2 8 mM

En las siguientes tablas se presentan los resultados obtenidos al fortificar la disolución de CaCl_2 8 mM con dos niveles de concentración de los dos analitos de estudio.

Tabla 5.16. Resultados obtenidos al fortificar una disolución de CaCl₂ 8 mM con 2,4-D.

Matriz	Concentración utilizada para fortificar (mg/l)	Concentración promedio determinada* (mg/l)	% Error	% Recobro	% Recobro global
CaCl ₂ 8 mM	0.5	0.38	24	76	78
		0.39	22	78	
		0.41	18	82	
	5	5.16	3.2	103.2	101
		5.00	0.0	100	
		5.03	0.6	100.6	

*Nivel de confianza al 95 %.

Tabla 5.17. Resultados obtenidos al fortificar una disolución de CaCl₂ 8 mM con 2,4-DCP.

Matriz	Concentración utilizada para fortificar (mg/l)	Concentración promedio determinada* (mg/l)	% Error	% Recobro	% Recobro global
CaCl ₂ 8 mM	0.5	0.38	24.0	76.0	79.3
		0.39	22.0	78.0	
		0.42	16.0	84.0	
	5	4.49	10.2	89.8	88.0
		4.34	13.2	86.8	
		4.37	12.6	87.4	

*Nivel de confianza al 95 %.

Para los dos analitos de estudio y los dos niveles de concentración, se observa que se tienen valores de recobro altos ($\geq 78\%$), los cuales son valores aceptables ya que método desarrollado está siendo evaluado en una matriz salina de características similares a un lixiviado de suelo, en un nivel de concentraciones del orden de la partes por millón. También se observa para ambos compuestos que la concentración más baja (0.5 ppm), es la que presenta el valor más bajo de recobro con respecto a la 5 ppm, lo cual era de esperarse ya que las interferencias de matriz son más notables a bajas concentraciones. Se puede concluir que los efectos que genera la matriz no afectan de manera significativa el resultado del análisis, obteniéndose resultados confiables.

5.3.2 Evaluación de interferencias en extractos de suelo en CaCl_2 8 mM en ausencia de 2,4-D y 2,4-DCP

5.3.2.1 Sitio de estudio #1

Con la metodología desarrollada, se analizaron los extractos de suelo preparados en CaCl_2 8mM (ver sección 4.3.6.1). En la siguiente tabla se presentan los resultados obtenidos para cada muestra.

Tabla 5.18. Resultados de los extractos ambientales sin fortificar sitio de estudio #1.

Muestra	Concentración de 2,4-D determinada*	Concentración de 2,4-DCP determinada*
1	ND	ND
2	ND	ND
3	ND	ND
4	ND	ND
5	ND	ND
6	ND	ND

ND. No se detectó señal.

*Los valores reportados corresponden al promedio de tres análisis independientes.

Como puede observarse, para todos los extractos de suelo de este sitio, no fue detectada señal alguna correspondiente al tiempo de retención de los analitos. Esto nos indica que la concentración de estos dos compuestos en las muestras del suelo analizadas es menor al límite de detección instrumental del método utilizado.

5.3.2.2 Sitio de estudio #2

Los resultados de los extractos correspondientes a las muestras de suelo del municipio Centro se presentan en la siguiente tabla, y al igual que para el sitio # 1 cada valor reportado corresponde al promedio de tres determinaciones independientes.

Tabla 5.19. Resultados de los extractos ambientales sin fortificar sitio de estudio #2.

Extracto	Concentración de 2,4-D determinada*	Concentración de 2,4-DCP determinada*
1	ND	ND
2	ND	ND
3	ND	ND
4	ND	ND
5	ND	ND
6	ND	ND

ND. No se detectó señal.

***Los valores reportados corresponden al promedio de tres análisis independientes.**

Al igual que para el sitio de estudio # 1, los valores de concentración de los dos compuestos estuvieron por debajo del límite de detección.

Es importante mencionar que tanto para el 2,4 D, como para el 2,4 DCP, en ambos sitios de estudios, la ausencia de señal en los tiempos de retención esperados para los dos compuestos, indica que el método propuesto es confiable para este tipo de suelos, ya que no presenta interferencias de especies que pudieran coeluir.

5.3.3 Evaluación del recobro de 2,4-D y 2,4-DCP en extractos de suelo

En la Figura 5.6 se presentan los cromatogramas obtenidos para la misma muestra y cada nivel de concentración.

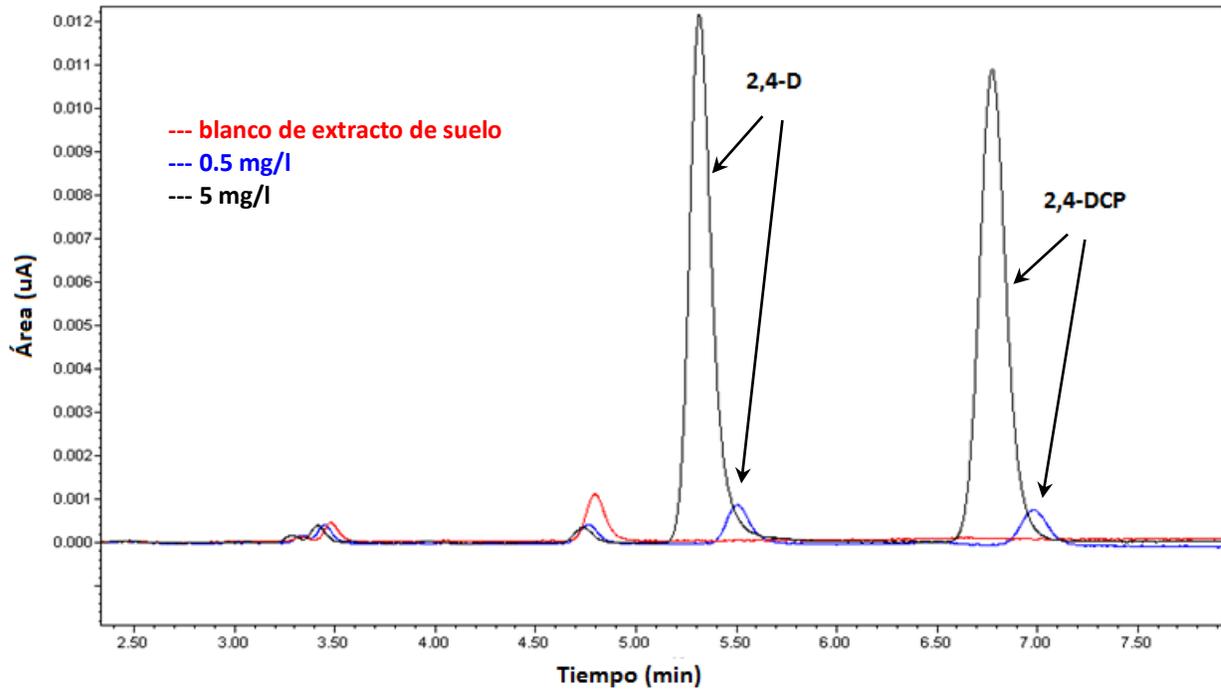


Figura 5.6. Cromatograma obtenido para una misma muestra de extracto de suelo en CaCl_2 8 mM tratada con diferentes niveles de concentración de 2,4-D y 2,4-DCP.

Como puede observarse el cromatograma presenta una señal en un tiempo de retención de aproximadamente 4.7 minutos, ésta no aparecía cuando se analizaron las disoluciones de los estándares, lo cual indica que se trata de un interferente de la matriz utilizada, sin embargo la presencia de esta señal no afecta la cuantificación con el método propuesto de los dos analitos de estudio, ya que se presenta a un tiempo de retención diferente.

Para evaluar el % de recobro se fortificaron los extractos de suelo a dos niveles de concentración, los resultados obtenidos para los dos sitios de estudio y el nivel de concentración de 0.5 mg/l se muestran en las siguientes tablas.

Tabla 5.20. Resultados de los extractos fortificados del sitio de estudio #1 con una concentración equivalente a 0.5 mg/l de 2,4-D.

Extracto	Concentración utilizada para fortificar (mg/l)	Concentración promedio determinada* (n= 3) (mg/l)	% Error	% Recobro	% Recobro global
1	0.5	0.44±0.09	12.0	88.0	92.0
		0.47±0.09	6.0	94.0	
		0.47±0.09	6.0	94.0	
2		0.43±0.09	14.0	86.0	78.0
		0.34±0.09	32.0	68.0	
		0.40±0.09	20.0	80.0	
3		0.41±0.09	18.0	82.0	78.0
		0.37±0.09	26.0	74.0	
		0.39±0.09	22.0	78.0	
4		0.41±0.09	18.0	82.0	79.3
		0.40±0.09	20.0	80.0	
		0.38±0.09	24.0	76.0	
5		0.35±0.09	30.0	70.0	74
		0.40±0.09	20.0	80.0	
		0.36±0.09	28.0	72.0	
6		0.32±0.09	36.0	64.0	71.3
		0.36±0.09	28.0	72.0	
		0.39±0.09	22.0	78.0	

*Nivel de confianza al 95 %.

Tabla 5.21. Resultados de los extractos fortificados del sitio de estudio #1 con una concentración equivalente a 0.5 mg/l de 2,4-DCP.

Extracto	Concentración utilizada para fortificar (mg/l)	Concentración promedio determinada* (n= 3) (mg/l)	% Error	% Recobro	% Recobro global
1	0.5	0.41±0.08	18.0	82.0	
		0.43±0.08	14.0	86.0	84.7
		0.43±0.08	14.0	86.0	
2		0.40±0.08	20.0	80.0	
		0.41±0.08	18.0	82.0	82.0
		0.42±0.08	16.0	84.0	
3		0.45±0.08	10.0	90.0	
		0.43±0.08	14.0	86.0	88.7
		0.45±0.08	10.0	90.0	
4		0.39±0.08	22.0	78.0	
		0.40±0.08	20.0	80.0	79.3
		0.40±0.08	20.0	80.0	
5		0.41±0.08	18.0	82.0	
		0.41±0.08	18.0	82.0	82.7
		0.42±0.08	16.0	84.0	
6		0.39±0.08	22.0	78.0	
		0.40±0.08	20.0	80.0	78.7
		0.39±0.08	22.0	78.0	

*Nivel de confianza al 95 %.

Tabla 5.22. Resultados de los extractos fortificados del sitio de estudio #2 con una concentración equivalente a 0.5 mg/l de 2,4-D.

Extracto	Concentración utilizada para fortificar (mg/l)	Concentración promedio determinada* (n= 3) (mg/l)	% Error	% Recobro	% Recobro global
1	0.5	0.40±0.09	20.0	80.0	77.3
		0.38±0.09	24.0	76.0	
		0.38±0.09	24.0	76.0	
2		0.40±0.09	20.0	80.0	79.3
		0.40±0.09	20.0	80.0	
		0.39±0.09	22.0	78.0	
3		0.39±0.09	22.0	78.0	79.3
		0.41±0.09	18.0	82.0	
		0.39±0.09	22.0	78.0	
4		0.41±0.09	18.0	82.0	80.7
		0.40±0.09	20.0	80.0	
		0.40±0.09	20.0	80.0	
5		0.40±0.09	20.0	80.0	79.3
		0.40±0.09	20.0	80.0	
		0.39±0.09	22.0	78.0	
6		0.38±0.09	24.0	76.0	77.3
		0.39±0.09	22.0	78.0	
		0.39±0.09	22.2	78.0	

*Nivel de confianza al 95 %.

Tabla 5.23. Resultados de los extractos fortificados del sitio de estudio #2 con una concentración equivalente a 0.5 mg/l de 2,4-DCP.

Extracto	Concentración utilizada para fortificar (mg/l)	Concentración promedio determinada* (n= 3) (mg/l)	% Error	% Recobro	% Recobro global
1	0.5	0.43±0.08	14.0	76.0	85.3
		0.44±0.08	12.0	88.0	
		0.46±0.08	8.0	92.0	
2		0.45±0.08	10.0	90.0	91.3
		0.45±0.08	10.0	90.0	
		0.47±0.08	6.0	94.0	
3		0.42±0.08	16.0	74.0	74.7
		0.43±0.08	14.0	76.0	
		0.42±0.08	16.0	74.0	
4		0.39±0.08	22.0	78.0	78.7
		0.39±0.08	22.0	78.0	
		0.40±0.08	20.0	80.0	
5		0.39±0.08	22.0	78.0	78.7
		0.40±0.08	20.0	80.0	
		0.39±0.08	22.0	78.0	
6		0.41±0.08	18.0	82.0	82.7
		0.42±0.08	16.0	84.0	
		0.41±0.08	18.0	82.0	

*Nivel de confianza al 95 %.

Tabla 5.24. Resultados de los extractos fortificados del sitio de estudio #1 con una concentración equivalente a 5 mg/l de 2,4-D.

Extracto	Concentración utilizada para fortificar (mg/l)	Concentración promedio determinada* (n= 3) (mg/l)	% Error	% Recobro	% Recobro global
1	5	5.10±0.15	2.0	102.0	102.5
		5.13±0.15	2.6	102.6	
		5.14±0.15	2.8	102.8	
2		5.16±0.15	3.2	103.2	103.6
		5.22±0.15	4.4	104.4	
		5.16±0.15	3.2	103.2	
3		5.11±0.15	2.2	102.2	100.7
		5.16±0.15	3.2	103.2	
		4.84±0.15	3.2	96.8	
4		5.19±0.15	3.8	103.8	101.9
		5.18±0.15	3.6	103.6	
		4.92±0.15	1.6	98.4	
5		5.10±0.15	2.0	102.0	101.0
		4.99±0.15	0.2	99.8	
		5.06±0.15	1.2	101.2	
6	5.05±0.15	1.0	101	101.9	
	4.99±0.15	0.20	99.8		
	5.25±0.15	5.0	105.0		

*Nivel de confianza al 95 %.

Tabla 5.25. Resultados de los extractos fortificados del sitio de estudio #1 con una concentración equivalente a 5 mg/l de 2,4-DCP.

Extracto	Concentración utilizada para fortificar (mg/l)	Concentración promedio determinada* (n= 3) (mg/l)	% Error	% Recobro	% Recobro global
1	5	4.88±0.15	2.4	97.6	97.7
		4.87±0.15	2.6	97.4	
		4.91±0.14	1.8	98.2	
2		4.93±0.14	1.4	98.6	99.2
		5.0±0.14	0.0	100.0	
		4.95±0.15	1.0	99.0	
3		4.86±0.15	2.8	97.2	95.9
		4.91±0.15	1.8	98.2	
		4.61±0.15	7.8	92.2	
4		4.85±0.15	3.0	97.0	95.2
		4.82±0.15	3.0	97.0	
		4.58±0.15	8.4	91.6	
5		4.77±0.15	4.6	95.4	91.2
		4.45±0.15	11.1	88.9	
		4.58±0.15	8.4	91.6	
6	4.64±0.15	7.2	92.8	93.7	
	4.58±0.15	8.4	91.6		
	4.83±0.15	3.4	96.6		

*Nivel de confianza al 95 %.

Tabla 5.26. Resultados de los extractos fortificados del sitio de estudio #2 con una concentración equivalente a 5 mg/l de 2,4-D.

Extracto	Concentración utilizada para fortificar (mg/l)	Concentración promedio determinada* (n= 3) (mg/l)	% Error	Recobro	% Recobro global
1	5	5.16±0.15	3.2	103.2	101.5
		5.15±0.15	3.0	103.0	
		4.91±0.15	1.8	98.2	
2		4.95±0.15	1.0	99.0	101.1
		5.08±0.15	1.6	101.6	
		5.14±0.15	2.8	102.8	
3		5.26±0.15	5.2	105.2	102.7
		5.05±0.15	1.0	101.0	
		5.09±0.15	1.8	101.8	
4		5.18±0.15	3.6	103.6	102.0
		4.94±0.15	1.2	98.8	
		5.18±0.15	3.6	103.6	
5		4.95±0.15	1.0	99.0	100.5
		5.08±0.15	1.6	101.6	
		5.05±0.15	1.0	101.0	
6		5.15±0.15	3.0	103.0	102.1
		5.04±0.15	0.8	100.8	
		5.13±0.15	2.6	102.6	

*Nivel de confianza al 95 %.

Tabla 5.27. Resultados de los extractos fortificados del sitio de estudio #2 con una concentración equivalente a 5 mg/l de 2,4-DCP.

Extracto	Concentración utilizada para fortificar (mg/l)	Concentración promedio determinada* (n= 3) (mg/l)	% Error	% Recobro	% Recobro global
1	5	4.56±0.15	8.8	91.2	89.5
		4.52±0.15	9.6	90.4	
		4.34±0.15	13.2	86.8	
2		4.54±0.15	9.2	90.8	92.9
		4.69±0.15	6.2	93.8	
		4.70±0.15	6.0	94.0	
3		4.81±0.15	3.8	96.2	92.5
		4.56±0.15	8.8	91.2	
		4.51±0.15	9.8	90.2	
4		4.68±0.15	6.4	93.6	92
		4.46±0.15	10.8	89.2	
		4.66±0.15	6.8	93.2	
5		4.38±0.15	12.4	87.6	88.9
		4.5±0.15	10.0	90.0	
		4.45±0.15	11.0	89.0	
6	4.44±0.15	11.2	88.8	89.5	
	4.5±0.15	10.0	90.0		
	4.49±0.15	10.2	89.8		

*Nivel de confianza al 95 %.

Como puede observarse, para ambos compuestos, en los dos niveles de concentración de trabajo, en los dos tipos de suelo, se tienen recobros entre el 70-

110%, obteniéndose los valores más bajos para la concentración de 0.5 ppm y los más altos para la concentración de 5 ppm, esto puede atribuirse a que al trabajar con una concentración 10 veces más pequeña en comparación con la otra, la capacidad del sistema de detección se ve limitada por la presencia del ruido instrumental, y aunque éste exista todo el tiempo, su efecto se ve potencializado cuando se trabaja con concentraciones más bajas. En la siguiente tabla se indica el criterio de aceptación para el parámetro de recobro.

Tabla. 5.28. Criterios de aceptación en cuanto a los valores de recobro obtenidos con respecto al nivel de concentración de trabajo.⁴⁵

Concentración del analito	Criterio de aceptación
<1 µg/l	50-120%
1 a 10 µg/l	60-120%
10 a 100 µg/l	70-120%
0.1 a 100 mg/l	70-120%
100 a 1000 mg/l	85-110%

De acuerdo a lo indicado anteriormente, tanto para el 2,4-D como para el 2,4-DCP, se cumple el criterio de aceptación, ya que se obtuvieron porcentajes de recobro entre el 70 y 120%, intervalo de aceptación de recobro para los valores de concentración utilizados.

De acuerdo con esto podemos concluir que el método se puede utilizar para la cuantificación del herbicida y su producto de degradación en extractos de estos dos tipos de suelo.

5.4. Aplicación del método desarrollado

Como ya se mencionó en la parte de generalidades del presente trabajo, existen diversos modelos que pueden describir los mecanismos de sorción entre un sorbente y un soluto dado. De acuerdo con los resultados experimentales, el

modelo que describe adecuadamente las isotermas obtenidas, para los dos compuestos de interés, es el de Freundlich.

5.4.1 Isotermas de sorción

Se trazaron las isotermas de sorción con los tres modelos para el 2,4-D y el 2,4-DCP, para ambos tipos de suelo. El modelo de Freundlich presenta los mejores coeficientes de determinación. Las isotermas de sorción para los dos compuestos se presentan en las figuras 5.7, 5.8 y 5.9.

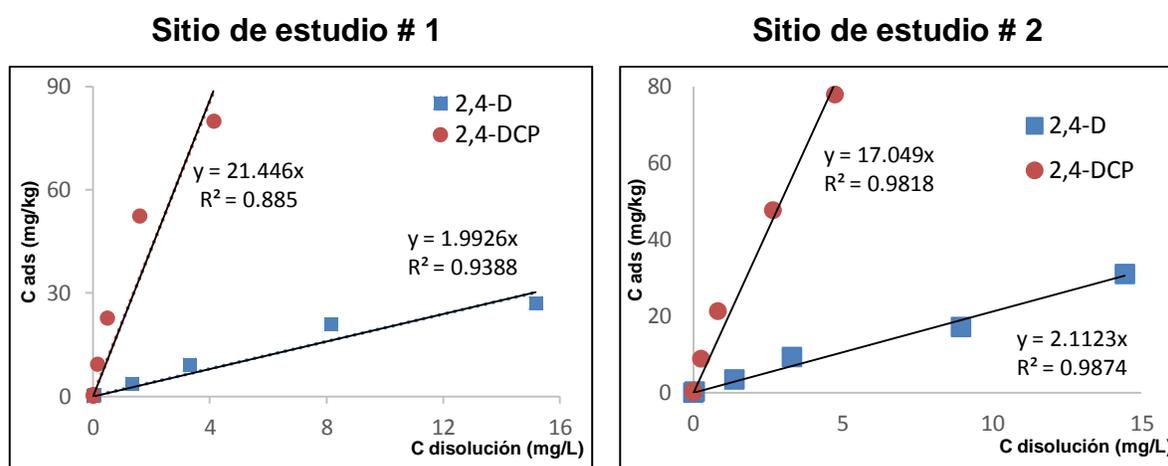
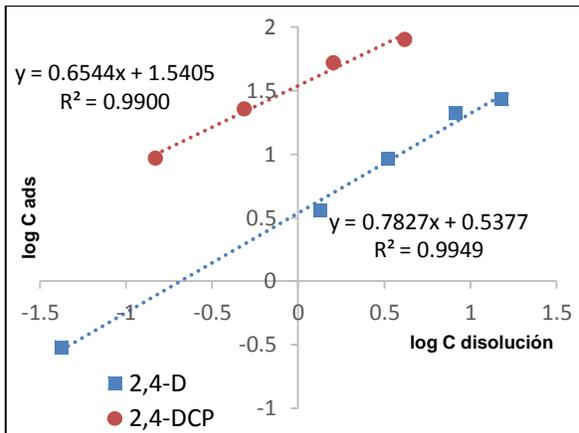


Figura 5.7. Isotermas de sorción de 2,4-D (cuadrados) y 2,4-DCP (círculos) para el modelo lineal.

Diferentes autores describen que la sorción del 2,4-D en suelos se ajusta al modelo lineal^{46, 51}, sin embargo, aunque este modelo presenta buenos coeficientes de determinación, con el modelo de Freundlich se obtienen mejores valores de éste, con base en lo anterior, es posible decir que en el intervalo de concentraciones evaluadas, la sorción de ambos compuestos ocurrió de forma lineal en los dos suelos estudiados.

Sitio de estudio # 1



Sitio de estudio # 2

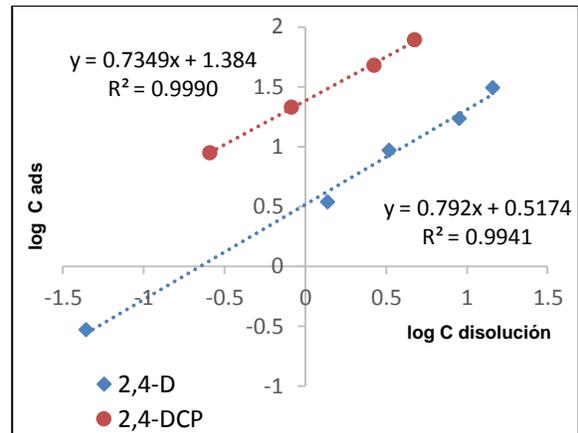
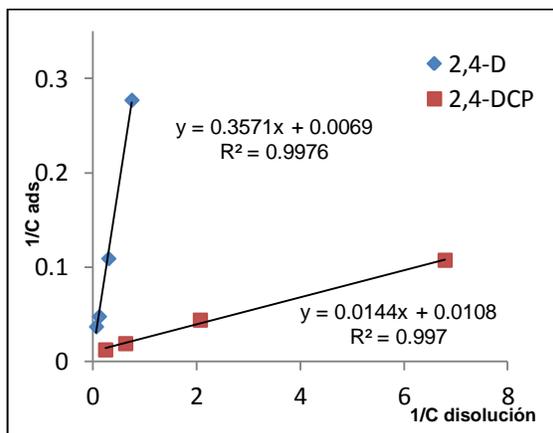


Figura 5.8. Isothermas de sorción de 2,4-D (cuadrados) y 2,4-DCP (círculos) para el modelo de Freundlich.

Con el modelo de Freundlich se obtuvieron coeficientes de determinación cercanos a la unidad, lo que indica que este modelo describe adecuadamente los datos experimentales adquiridos.

Sitio de estudio # 1



Sitio de estudio # 2

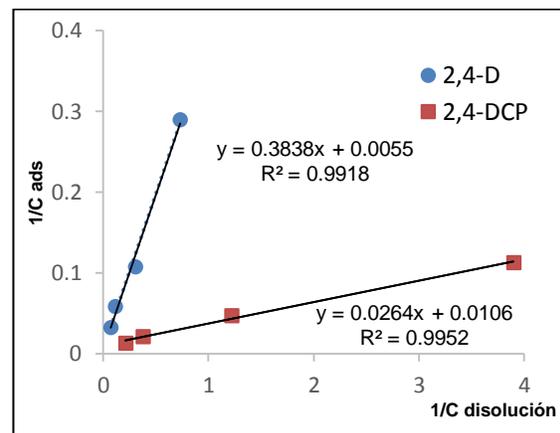


Figura 5.9. Isothermas de sorción de 2,4-D (cuadrados) y 2,4-DCP (círculos) para el modelo de Langmuir.

Los coeficientes de correlación para el modelo de Freundlich y Langmuir son prácticamente iguales, sin embargo los valores de pendiente son evidentemente más altos cuando se trabaja con el modelo de Freundlich lo que permite que se puedan diferenciar dos puntos cercanos.

Cabe mencionar que el modelo de Langmuir no se considera que describa el comportamiento de la sorción de los compuestos en cuestión en el suelo ya que considera que la superficie del sorbente contiene un número fijo de lugares de sorción y cada uno puede sorber una sola molécula.³⁹

Considerando que el modelo de Freundlich es el que describe mejor el mecanismo de sorción de ambos compuestos, en la tabla 5.29 se condensan los datos de K_f y n .

Tabla 5.29. Valores de n y K_f obtenidos para cada uno de los suelos evaluados al utilizarse 2,4-D y 2,4-DCP como analitos de estudio.

Compuesto	Suelo	N	K_f	%MO	%arcillas	pH
2,4-D	Sitio de estudio #1	1.3	3.1	4.7	65	6.8
	Sitio de estudio #2	1.28	3.0	4.8	32	7
2,4-DCP	Sitio de estudio #1	1.53	33.9	4.7	65	6.8
	Sitio de estudio #2	1.36	23.6	4.8	32	7

Si se comparan los valores de K_f y n para el 2,4-D, se observan valores prácticamente iguales, por lo que no existe una clara diferencia en el comportamiento de sorción entre los dos tipos de suelo evaluados al estar en contacto con este compuesto.

Estudios previos han mostrado una correlación positiva entre la sorción de pesticidas en el suelo y el contenido de materia orgánica (% MO) (Reddy et al, 1987; Bekbölet et al, 1998; Hiradate et al, 2007; Madrigal et al, 2008; Barriuso, 1992; Sameni et al, 2011); con lo anterior y comparando el contenido de materia orgánica en los dos suelos de estudio (Tablas 3.11 y 3.12) se puede apreciar la

influencia de ésta en la sorción de 2,4-D, pues se reportaron % MO prácticamente iguales.

En el caso del 2,4-DCP se obtuvieron altos valores de K_f , lo que indica que está fuertemente retenido en ambos suelos, sin embargo, el valor del coeficiente de distribución es mayor para el suelo del sitio de estudio #1 en 10 unidades respecto al suelo del sitio de estudio #2. Es concebido que después de una cierta cantidad de materia orgánica la retención de un compuesto puede estar esencialmente controlada por los constituyentes minerales, y en particular de las arcillas (Madrigal et al, 2008), lo que se ve reflejado en las propiedades de los suelos descritas en las tablas 3.11 y 3.12, ya que el suelo del sitio de estudio #1 tiene 65% de arcilla mientras que el suelo del sitio de estudio #2 de 32%, se indaga que en caso de la retención del 2,4-DCP el factor determinante es el contenido de arcilla.

El parámetro K_f se asocia a la capacidad de sorción de los suelos, mientras que el parámetro n está relacionado con la curvatura de las isotermas y constituye un indicador de la intensidad de sorción. Los resultados obtenidos indican que la capacidad de sorción entre los 2 tipos de suelo de estudio y el 2,4 D y su metabolito son diferentes (valores K_f distintos). Se observa que los dos tipos de suelo presentan una mayor afinidad por el 2,4 DCP que por el 2,4 D, ya que los valores de K_f determinados para el metabolito son significativamente mayores que los correspondientes al 2,4 D. Es decir, estos 2 tipos de suelo tienen la capacidad de retener una mayor cantidad de 2,4 DCP que de 2,4 D y una vez retenidas las moléculas del pesticida y de su metabolito, es más difícil que el suelo libere al 2,4 DCP con respecto al 2,4 D.

La retención de los pesticidas en los suelos depende de las características físico-químicas de las moléculas y de las propiedades del suelo (Madrigal et al, 2008; Reddy et al, 1987). El pH del suelo influye en el grado de sorción de los compuestos así como el grado de acidez de éstos, ya que el analito podría encontrarse en forma molecular o iónica; bajo las condiciones de estudio de

ambos suelos, valores de pH entre 6 y 7 en los suelos estudiados, (Tablas 3.11 y 3.12), la molécula de 2,4-D se encontraba en forma aniónica ($pK_a= 2,6$) y la molécula de 2,4-DCP mayormente en forma molecular ($pK_a= 7,8$), en consecuencia, la baja retención de 2,4-D en los suelos puede ser causada por su disociación en la forma aniónica, ya que en esta forma puede ser repelido por las partículas cargadas negativamente en el suelo como la materia orgánica y arcillas (Durán, 2013). Estudios previos han encontrado que la sorción del 2,4-D está correlacionada negativamente con el pH (Bekbölet et al, 1999; Sameni et al, 2011), es decir, que a valores de pH bajo incrementa la sorción de este compuesto.

La fuerte retención del 2,4-DCP puede estar relacionada también con su baja solubilidad en agua; puede tener afinidad por el suelo y acumularse en éste; por el contrario, la débil retención del 2,4-D en los suelos es consecuencia de su alta solubilidad en agua.

6. CONCLUSIONES

- Se logró desarrollar una metodología para la cuantificación simultánea de 2,4-D y 2,4-DCP en extractos de suelo por CLAR-UV-DAD, cuyas condiciones óptimas de trabajo fueron:
 1. Fase móvil: buffer fosfatos (pH 2,1)-acetonitrilo en una relación 60-40 v/v.
 2. Fase estacionaria: C₁₈.
 3. Longitud de onda de trabajo: 225 nm.
- La metodología es aplicable en un intervalo de concentraciones de 0,20 a 100 mg/l para cada uno de los analitos en extractos de dos tipos de suelo con CaCl₂ 8 mM, en donde no se presentan interferencias significativas de matriz de especies que pudiesen coeluir con los analitos de interés.
- Los parámetros de validación encontrados indican que el método es adecuado para su propósito, ya que presenta buenos resultados de precisión ($\geq 3.7\%$ para 2,4-D y $\geq 2.9\%$ para 2,4-DCP), exactitud ($\geq 89.9\%$ para 2,4-D y $\geq 90.4\%$ para 2,4-DCP), recobros ($\geq 70.1\%$ para 2,4-D y $\geq 74.7\%$ para 2,4-DCP) y límites de detección (0.02 ppm para 2,4-D y 0.06 ppm para 2,4-DCP) y de cuantificación (0.20 ppm para 2,4-D y 0.23 ppm para 2,4-DCP).
- Los resultados obtenidos al realizar los experimentos de sorción en ensayos tipo batch se ajustan al modelo de Freundlich. Además de que no se observaron diferencias significativas entre los dos tipos de suelo empleados para la retención del 2,4-D, por lo que se puede decir que en los dos tipos de suelo uno de los parámetros que influyen en la retención de los

dos compuestos es el contenido de materia orgánica. Por otro lado, el contenido de arcillas fue uno de los parámetros influyentes en la retención de 2,4-DCP.

- Ambos tipos de suelo presentaron mayor afinidad por el 2,4-DCP que por el 2,4-D.

7 . REFERENCIAS

1. Hernández Borges Javier. ***Nuevas metodologías de análisis de pesticidas por electroforesis capilar.*** Director Francisco García Montelongo. Tesis doctoral. Universidad de La Laguna. 2005. ISBN: 84-7756-695-X.
2. Goodman, L., Gilman, A. (1994). ***Las bases farmacológicas de la terapéutica.*** Médica Panamericana, México.
3. Asociación Nacional de la Industria Química. (1996). ***Anuario estadístico de la industria química mexicana.*** ANIQ, México.
4. FAO/OMS. (2011). ***Comisión del Codex Alimentarius: Manual de procedimiento.*** Secretaría del Programa Conjunto FAO/OMS sobre Normas Alimentarias Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, Roma.
5. **NOM-045-SSA1-1993. Plaguicidas, Productos para uso agrícola, forestal, pecuario, de jardinería, urbano e industrial. Etiquetado.**
6. Cortinas de Nava, C. (2000). ***Características de peligrosidad ambiental de plaguicidas.*** SEMARNAT.
7. Ongley, E. (1996). ***Control of water pollution from agriculture.*** FAO, Roma.
8. Candela, L., Mariño, M. (2004). ***Simulation of 2,4-D herbicide transport through the unsaturated zone using an analytical model.*** J. Environ. Anal. Chem., 84, 123-131.

-
9. <http://www2.ine.gob.mx/sistemas/plaguicidas/>
 10. Ramírez, J. A., Lacasaña, M. (2001). **Plaguicidas: clasificación, uso, toxicología y medición de la exposición**. Arch. Prev. Riesgos Labor. 4(2), 67-75.
 11. SAGAR, SSA, INE, SEMARNAP. (1996). **Lo que usted debe saber de los plaguicidas: Serie plaguicidas**, Vol 1.
 12. <http://tramites.semarnat.gob.mx/Doctos/DGGIMAR/Guia/07-015AD/clasificaciones.pdf>. Última revisión: Enero 2013
 13. <http://www.fao.org/docrep/T1147S/t1147s0e.htm>. Última revisión: Enero 2013
 14. Carod Benedico, E. (2002). **Herbicidas, ¿qué debemos saber los profesionales de Atención Primaria?**. SEMERGEN. 28(8), 424-428.
 15. http://www.catarina.udlap.mx/u_dl_a/tales/documentos/lic/.../capitulo1.pdf
 16. Guevara-Almaraz, E. (2010). **Determinación espectrofotométrica simultánea de los herbicidas 2,4-D, atrazina y dicamba en muestras de agua mediante tratamiento quimiométrico**. Salud Pública y Nutrición. 10
 17. Bejarano, F. Harikrishan, V. Usha, S. (2007). **2,4-D Razones para su prohibición mundial**. RAPAM.
 18. Volke, T., Velasco, J. (2002). **Tecnologías de restauración para suelos contaminados**. INE-SEMARNAT.

-
19. O.P. de Amarante, Jr., N. Brito, T.C.R. Dos Santos, G.S. Nunes, M.L. Ribeiro. (2003). ***Determination of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and its major transformation product in soil samples by liquid chromatographic analysis.*** Talanta. 60, 115-121.
20. James R. Troyer. (2001). ***In the beginning: the multiple discovery of the first hormone herbicides.*** Weed Science, 49, 290–297.
21. Aronzon CM, Sandoval MT, Herkovits J, Pérez-Coll CS. (2011) ***Stage-dependent toxicity of 2,4-dichlorophenoxyacetic on the embryonic development of a South American toad, Rhinella arenarum.*** Environ Toxicol. 26(4), 373-81.
22. <http://npic.orst.edu/factsheets/2,4-DTech.pdf>
23. Noelia Rosales Conrado. ***Desarrollos metodológicos en cromatografía líquida capilar y quiral: aplicación a la determinación de herbicidas fenoxiácido en muestras complejas.*** Universidad Complutense. Madrid, 2005.
24. Karla Rocío Padilla, et. Al. (2004). ***Degradación oxidativa del 2,4-diclorofenol por vía sonoelectroquímica.*** Ciencia UANL. VOL. VII, No. 1.
25. Jianfa Li, et. al. (2009). ***Addition of Modified Bentonites in Polymer Gel Formulation of 2,4-D for Its Controlled Release in Water and Soil.*** Agric. Food Chem. 57, 2868–2874.
26. NOM-052-SEMARNAT-1993. ***Que establece las características, el procedimiento de identificación, clasificación y los listados de los residuos peligrosos.***

-
27. NOM-127-SSA1-1994. **Salud ambiental. Agua para uso y consumo humano. Límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización.**
28. Prado Flores Ma. G., Covarrubias Herrera Ma. del R. (1996). **Introducción a la cromatografía de líquidos de alta resolución.** 1ª edición. UAM-X, México.
29. Harris, D. (2007). **Análisis químico cuantitativo.** 3ª edición. Editorial Reverté, España.
30. Rouessac, F., Rouessac, A. (2003). **Análisis químico. Métodos y Técnicas Instrumentales modernas.** Madrid, España. Mc Graw Hill.
31. Rojo Callejas Francisco. **Apuntes de cromatografía.**
32. Morante Zarcero, S. (2007) **Desarrollo de métodos analíticos para la separación quiral y su aplicación al estudio de procesos de síntesis asimétrica.** Madrid, España. Librería-Editorial Dykinson.
33. CONACyT. (2010). **Guías Técnicas: Validación de métodos analíticos.** 1ª edición. México
34. CENAM. (2005). **Guía EURACHEM. MÉTODOS ANALÍTICOS ADECUADOS A SU PROPÓSITO. Guía de Laboratorio para la Validación de Métodos y Temas Relacionados,** 2ª Edición. México
35. EMA, CENAM. (2008). **Guía para la validación y la verificación de los procedimientos de examen cuantitativos empleados para el laboratorio clínico.** 1ª edición. México.

-
36. Sierra Alonso, I. (2009). **Análisis Instrumental**, Vol. 1. Netbiblo, España.
37. CCAyAC. (2011). **Criterios para la validación de métodos fisicoquímicos**. 1ª edición. México.
38. Miller J., Miller J. (2002). **Estadística y Quimiometría para química analítica**. Prentice Hall, España.
39. Zamora Martínez Olivia. **Desarrollo de materiales selectivos para la recuperación y preconcentración de compuestos de interés ambiental a partir de matrices complejas**. Director de tesis: Dra. Luz Elena Vera A. Tesis doctoral. 2010
40. Essington M. (2003). **Soil and water chemistry**. CRC, EUA.
41. Cruz-Guzmán Alcalá, M (2007). **La Contaminación de Suelos y Aguas: Su Prevención con Nuevas Sustancias Naturales**. Universidad de Sevilla.
42. <http://www.e-local.gob.mx/work/templates/enciclo/tabasco/>. Última revisión: Enero 2013
43. Center for Drug Evaluation and Research, US Food and Drug Administration (1994). **Reviewer Guidance, Validation of Chromatographic Methods**.
44. G.A. Shabir (2003). **Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the**

International Conference on Harmonization. J. Chromatogr. A. 987, 57–66.

45. CCAYAC (2011). **Criterios para la validación de métodos fisicoquímicos.** Rev No 0
46. Reddy, K.S. and Gambrell, R.P. (1987). **Factors affecting the adsorption of 2,4-D and methyl parathion in soils and sediments.** Agriculture, ecosystems and environment. J. Agric. 18, pp: 231-241.
47. Bekbölet, M., Yenigün, O. and Yücel, I. (1998). **Sorption studies of 2,4-D on selected soils.** Water, air and soil pollution. 111: 75 – 78, 1999.
48. Hiradate, S., Furubayashi, A., Uchida, N. and Fujii, Y. (2007). **Adsorption of 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid by an Andosol.** Journal of Environmental Quality. Vol. 36 pp 101-109.
49. Madrigal, M. I. et al. (2008). **Caracterización de la sorción y desorción de herbicidas en suelos con diferentes tipos de ocupación.** Revista Ingeniería e Investigación. Vol 28 No 3 pp96-104.
50. Barriuso, E., Feller, Ch., Calvet, R., Cerri, C. (1992). **Sorption of atrazine, terbutryn and 2,4-D herbicides in two Brazilian Oxisols.** Geoderma Vol. 53 pp: 155-167
51. Sameni, M., Ismail, B.S., Halimah, M. (2011). **Sorption kinetics of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in selected agricultural soils of Malaysia.** Research Journal of Environmental Toxicology Vol 5 (1), pp: 39-48.
52. Candela, S., Fabregat, M., Solé, M., y Rodríguez Pacheco, R. (2003). **Estudios cinéticos de transporte del herbicida 2,4-D en columnas de laboratorio.** Estudios de la zona no saturada del suelo Vol. VI.

53. Durán, A. et al (2013). **Sorption, desorption and displacement of ibuprofen, estrone, and 17 β estradiol in wastewater irrigated and rainfed agricultural soils.** STOTEN-D-13-03208R1

Anexo I.

-Preparación de disoluciones estándar para el trazo de las isothermas de sorción.

Las isothermas de sorción se obtuvieron utilizando cinco concentraciones diferentes de 2,4-D y 2,4-DCP y el respectivo blanco. Estas disoluciones fueron preparadas a partir de las disoluciones stock de 1000 ppm de ambos compuestos. La concentración de la disolución stock para cada compuesto se muestra a continuación.

Tabla 1. Concentración de 2,4-D y 2,4-DCP de la disolución stock.

	peso (mg)	volumen final (L)	concentración (ppm)
2,4-D	103.2	0.1	1032
2,4-DCP	101.6	0.1	1016

Cada nivel de concentración para el trazo de las isothermas fue preparado en tubos de centrifuga, se pesaron los 4 g de suelo (base seca) y se adicionaron 15 ml de la disolución de CaCl_2 , finalmente se adicionó el volumen de disolución stock o estándar correspondiente previamente mezclado con 5 ml de disolución de CaCl_2 8mM. Se preparó un estándar de 100 ppm a partir de la disolución stock para la preparación del estándar de 20, 12 y 5 ppm, el estándar de 2 y 0.1 ppm se hizo a partir de los estándares de 20 y 2 ppm respectivamente.

Tabla 2. Concentraciones de disoluciones de los experimentos en batch.

Concentración teórica (ppm)	Volumen de stock (mL)	Volumen de CaCl_2 (mL)	Concentración real de 2,4-D (ppm)	Concentración real de 2,4-DCP (ppm)
0	0	20	0.00	0.00
0.1	1	19	0.10	0.10
2	2	18	2.06	2.03
5	1	19	5.16	5.08
12	2.4	17.6	12.38	12.19
20	4	16	20.64	20.32
100	2	18	103.2	101.6

-Trazo de isothermas de sorción.

Las isothermas de sorción se obtienen con la concentración de la disolución al equilibrio y la concentración adsorbida. A continuación se presenta un ejemplo de cálculo para la obtención de la isoterma de sorción para el 2,4-DCP en el sitio de estudio #2.

Tabla 3. Pesos de muestras de suelo del sitio # 2 y concentraciones obtenidas para 2,4-DCP.

2,4-DCP	Peso de muestra (g)			Peso base seca (g)			Conc. disolución al equilibrio (mg/l)			Conc. adsorbida (mg/kg)			
	Co (mg/l)	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
0.000	5.0911	5.0962	5.0944	4.047	4.051	4.050	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
0.102	5.0939	5.0961	5.0927	4.050	4.051	4.049	0.000	0.000	0.000	0.502	0.502	0.502	0.502
2.032	5.0920	5.0960	5.0984	4.048	4.051	4.053	0.171	0.166	0.105	9.194	9.212	9.508	9.508
5.080	5.0923	5.0945	5.0912	4.048	4.050	4.048	0.605	0.519	0.326	22.108	22.523	23.491	23.491
12.192	5.0916	5.0922	5.0964	4.048	4.048	4.052	1.545	1.526	1.703	52.606	52.694	51.777	51.777
20.320	5.0960	5.0980	5.0965	4.051	4.053	4.052	4.024	3.959	4.410	80.448	80.737	78.535	78.535

Los experimentos en batch se hicieron por triplicado. Considerando que la humedad del suelo en el sitio #2 es de 20.5%, el peso de la muestra en base seca se obtiene de la siguiente manera:

$$\text{peso de suelo en base seca} = 5,0911 \text{ g} \left(\frac{100 - 20.5}{100} \right) = 4.047 \text{ g}$$

La concentración de los analitos en la disolución al equilibrio se obtuvo mediante el análisis del extracto mediante la metodología propuesta. La concentración adsorbida en mg/kg, se obtuvo mediante la siguiente ecuación:

$$C_{ads} = \frac{(C_o - C_{eq})}{\text{peso base seca (kg)}} \times \text{volumen}$$

Donde C_o es la concentración inicial y C_{eq} es la concentración en disolución al equilibrio. A continuación se presente un ejemplo de cálculo para la concentración de 2 mg/l.

$$C_{ads} = \frac{\left(2.032 \frac{mg}{l} - 0.171 \frac{mg}{l}\right)}{4.048 g \left(\frac{1 kg}{1000 g}\right)} \times 0.02l = 9.194 \frac{mg}{kg}$$

Una vez calculada la concentración de la disolución al equilibrio, se obtiene el promedio de las tres mediciones (Tabla 4).

Tabla 4. Datos para el trazo de isotermas de sorción.

Modelo Lineal		Modelo Freundlich		Modelo Langmuir	
C_{eq} (mg/L)	C_{ads} (mg/Kg)	$\log C_{eq}$	$\log C_{ads}$	$1/C_{eq}$	$1/C_{ads}$
0	0	-	-	-	-
0	0.5017	-	-	-	-
0.1473	9.3049	-0.8317	0.9687	6.7873	0.1075
0.4833	22.7071	-0.3158	1.3562	2.0690	0.0440
1.5913	52.3588	0.2018	1.7190	0.6284	0.0191
4.1310	79.9065	0.6161	1.9026	0.2421	0.0125

La isoterma correspondiente al modelo lineal se obtuvo al graficar la concentración en disolución al equilibrio vs. la concentración adsorbida, siendo el valor de la pendiente de la recta el coeficiente de distribución.

La isoterma para el modelo de Freundlich se obtuvo al graficar el logaritmo la concentración en disolución al equilibrio vs. el logaritmo de la concentración adsorbida, donde el valor de la pendiente de la recta es igual a $1/n$ y el valor de la ordenada al origen corresponde a $\log K_f$.

La isoterma correspondiente al modelo de Langmuir resulta de graficar el inverso de la concentración en disolución al equilibrio vs. el inverso de la concentración adsorbida.