



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“Determinación simultánea de hidroxiatrazina, desetilatrazina y atrazina por medio de CLAR-UV-DAD en muestras de agua de las Lagunas de Montebello”**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA**

**Victor Cortés Hernández**

**DIRECTOR DE TESIS**

**Dra. Olivia Zamora Martínez**



**Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2016**



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:** Profesora: Olivia Zamora Martínez

**1er. SUPLENTE:** Profesor: Minerva Monroy Barreto

**2° SUPLENTE:** Profesor: Selena Gutiérrez Flores

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

**LABORATORIO DE CROMATOGRFÍA, DEPARTAMENTO DE EDAFOLOGÍA, INSTITUTO DE GEOLOGÍA, UNAM.**

**LABORATORIO NACIONAL DE GEOQUÍMICA Y MINERALOGÍA-LANGEM, UNAM.**

**ASESOR DEL TEMA:**

---

**Dra. Olivia Zamora Martínez**

**SUSTENTANTE:**

---

**Victor Cortés Hernández**

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Dirección General de Asuntos del personal Académico (DGAPA) a través del proyecto PE101316 del Programa de Apoyo a Proyectos de Innovación y Mejoramiento de la Enseñanza (PAPIME): “Diseño y desarrollo de materiales para el fortalecimiento de la enseñanza de técnicas de análisis ambiental de los estudiantes de las Ciencias de la Tierra”.

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) a través del proyecto PE102113 del Programa de Apoyo a Proyectos de Innovación y Mejoramiento de la Enseñanza (PAPIME): “Aprendizaje de procesos de interacción geosférica a través de experiencias en campo”.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología a través de proyecto CONACyT Ciencia básica 221789: “Alteración de las comunidades microbianas edáficas por el cambio de uso de suelo y sus implicaciones en los procesos biogeoquímicos”.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología a través del proyecto CONACyT CB-2013-220489.

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) a través del proyecto IN105715 del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT): “Transporte de atrazina en suelos tipo Pheozem con diferente tiempo bajo riego con agua residual cruda”.

---

---

## ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE	PÁG
<b>1. Resumen</b>	<b>1</b>
<b>2. Introducción</b>	<b>2</b>
<b>3. Objetivo</b>	<b>4</b>
<b>4. Antecedentes</b>	<b>5</b>
<b>4.1 Cromatografía</b>	<b>5</b>
<b>4.2. Principio de funcionamiento de la cromatografía de líquidos</b>	<b>6</b>
<b>4.3 Aplicación de la cromatografía de líquidos para el análisis de pesticidas</b>	<b>12</b>
<b>4.4 Herbicidas</b>	<b>12</b>
<b>4.5 Lagunas de Montebello</b>	<b>20</b>
<b>4.6 Validación de métodos analíticos</b>	<b>22</b>
<b>5. Metodología</b>	<b>28</b>
<b>5.1 Instrumentación</b>	<b>28</b>
<b>5.2 Desarrollo del método cromatográfico</b>	<b>29</b>
<b>5.3 Validación del método</b>	<b>30</b>
<b>6. Resultados y discusión</b>	<b>33</b>
<b>6.1 Desarrollo del método</b>	<b>33</b>
<b>6.2 Validación del método.</b>	<b>37</b>
<b>7. Conclusiones</b>	<b>47</b>
<b>8. Perspectivas</b>	<b>49</b>
<b>9. Bibliografía</b>	<b>50</b>

---

---

---

---

## ÍNDICE DE TABLAS

TABLA	PÁG.
Tabla 4.1. Propiedades fisicoquímicas de la atrazina.	14
Tabla 4.2. Propiedades fisicoquímicas de 2-hidroxiatrazina y desetilatrazina.	17
Tabla 4.3. Países y su normatividad en cuanto al empleo de la atrazina	19
Tabla 4.4. Límite de atrazina en agua de uso humano.	20
Tabla 6.1. Tiempos de retención de la atrazina y sus metabolitos DEA y 2-HA con diferentes fases móviles evaluadas.	33
Tabla 6.2. Valores de absorbancia de 2-HA, DEA y ATZ a diferentes valores de longitud de onda.	35
Tabla 6.3. Condiciones cromatográficas para la determinación de la atrazina y sus metabolitos DEA y 2-HA.	35
Tabla 6.4. Parámetros cromatográficos de 2-HA, DEA y ATZ.	37
Tabla 6.5. Parámetros estadísticos para la determinación de 2-hidroxiatrazina, desetilatrazina y atrazina.	39
Tabla 6.6. Coeficientes de variación del área de pico para una concentración de 0.5 y 10 mg L <sup>-1</sup> de 2-HA, DEA y ATZ (n=3).	40
Tabla 6.7. Determinación del grado de exactitud del sistema de análisis para atrazina, 2-HA y DEA para un nivel de confianza del 95% (n=3).	41
Tabla 6.8. Límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) instrumentales para el análisis de 2-HA, DEA y ATZ (n=7).	42
Tabla 6.9. Concentraciones determinadas de 2-HA, DEA y ATZ mediante la metodología de análisis propuesta.	44
Tabla 6.10. Recobros obtenidos para 2-HA, DEA y ATZ en muestras de las Lagunas de Montebello (n=3).	45

---

---

---

---

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA	PÁG.
Figura 4.1. Estructura química de la atrazina.	14
Figura 4.2. Ubicación de las Lagunas de Montebello, Chiapas.	21
Figura 6.1. Cromatograma obtenido con las condiciones óptimas de trabajo para una concentración de 10 ppm de 2-HA, DEA y ATZ.	36
Figura 6.2. Curvas de calibración obtenidas para la cuantificación de 2-hidroxiatrazina, desetilatrazina y atrazina en muestras acuosas ( $\lambda=220$ nm).	38
Figura 6.3. Cromatograma obtenido al analizar una muestra de agua de las Lagunas de Montebello.	43

---

---

---

---

## 1. RESUMEN

En el presente trabajo se desarrolló un método para la cuantificación simultánea de 2-hidroxiatrazina, desetilatrazina y atrazina por medio de CLAR-UV-DAD (cromatografía de líquidos de alta resolución con detector de ultravioleta con arreglo de diodos). Para lo anterior se determinaron las condiciones cromatográficas que contribuyeran a tener un sistema eficiente y debido a la naturaleza de los analitos se decidió trabajar con cromatografía de fase reversa utilizando una columna spherisorb ODS2, como fase móvil una disolución que contiene una relación de AcCN:buffer fosfatos 0.005 M de pH 7.2 40:60 v/v, en modo isocrático con detección UV a 220 nm.

Posteriormente se realizó la validación de la metodología, se evaluaron los parámetros típicos como son linealidad, precisión, exactitud y recobros, estos últimos en muestras de agua provenientes de las Lagunas de Montebello, Chiapas. Los resultados obtenidos cumplieron con las especificaciones de calidad necesarias para su aplicabilidad en muestras acuosas de este tipo, por lo que la metodología desarrollada se considera adecuada para la cuantificación simultánea de 2-hidroxiatrazina, desetilatrazina y atrazina en intervalos de concentración comprendidos entre 0.049-40, 0.100-40 y 0.050-40 mg/L respectivamente.

Finalmente se utilizó el método desarrollado para determinar la presencia de atrazina y sus metabolitos en 13 muestras de agua provenientes de las Lagunas de Montebello, Chiapas. El análisis cromatográfico no mostró señales de los compuestos en los niveles de concentración evaluados; sin embargo, no fue posible descartar su presencia por debajo de esas concentraciones. Por lo anterior y considerando que el método desarrollado no es lo suficientemente sensible para determinar si los niveles de atrazina en cuerpos de agua cumplen con las regulaciones existentes en México, se recomienda acoplar el método de análisis desarrollado junto con un método apropiado de preparación de muestras con el cual se logre realizar la preconcentración cuantitativa de los analitos de interés.

---

---

## 2. INTRODUCCIÓN

La contaminación es uno de los problemas más graves a los que se enfrenta el ser humano en la actualidad. La enorme actividad industrial destinada a satisfacer las necesidades de la creciente población mundial trae como consecuencia el uso o la generación de grandes cantidades de compuestos que contaminan agua, suelo y aire. Lo anterior, además de afectar a las especies animales y vegetales que habitan estos compartimentos, pueden afectar a los seres humanos de distintas maneras.

Aunque la mayoría de los procesos industriales usan o generan sustancias tóxicas, difícilmente se puede pensar en eliminar estas actividades, pues dependemos de ellas para cubrir los requerimientos de la población. Por lo anterior, surge la necesidad de diseñar procesos más eficientes donde el uso de estos compuestos se sustituyan por otros que sean inocuos para el ambiente o se cuente con procesos para tratar los residuos generados para inactivarlos antes de ser liberados al ambiente. Sin embargo, existirán algunos casos donde la sustancia sea irremplazable y no se pueda tratar o aún se desconozca el impacto que tiene en el ambiente y en el ser humano.

Los pesticidas son un ejemplo de sustancias de las cuales se desconocía su efecto dañino. Estos compuestos utilizados en la industria alimenticia para erradicar plagas animales o vegetales de los campos de cultivo solían ser utilizados sin saber que afectaban al ambiente y al ser humano. Sin embargo, al ser estos compuestos vitales para la industria alimenticia, las investigaciones realizadas buscan conocer el comportamiento exacto de estos compuestos en los compartimentos donde se encontrarán para así evaluar si podrá tener impacto en los mismos o en el ser humano.

Los análisis realizados para conocer el efecto potencial de una sustancia deben considerar la distribución del compuesto en el ambiente, los procesos de degradación que puede sufrir y los metabolitos que generaría, además de estudios

---

---

de toxicología para determinar la concentración a la que es dañina para el ser humano y las especies con las que esté en contacto.

Para llevar a cabo estos análisis es necesario contar con técnicas especializadas para determinar, por ejemplo, la cantidad de un compuesto en cierto compartimento ambiental. En la actualidad existen numerosas técnicas que permiten llevar a cabo estos análisis como la cromatografía de líquidos, la cual es una técnica confiable para determinar elementos traza en una muestra ambiental.

La elección del método a utilizar dependerá de cada compuesto; sin embargo, debemos asegurar que los resultados obtenidos sean fidedignos y repetibles, lo cual se logra mediante la validación del método. Este procedimiento adquiere una gran importancia debido a que nos da la confianza de saber que nuestro método es confiable para el fin que se pretende y tener así la certeza de que contamos con los resultados verdaderos para evaluar si el compuesto en cuestión puede o no ser un factor de peligro para el ambiente y el ser humano.

Es por esto que la validación de un método analítico es un paso indispensable en cualquier investigación. En el presente trabajo se propone un método de análisis para la determinación de atrazina y dos de sus principales metabolitos en muestras de agua de las Lagunas de Montebello, Chiapas.

---

---

### **3. Objetivo**

Desarrollar y validar una metodología confiable destinada para la determinación simultánea de 2-hidroxiatrazina, desetilatrazina y atrazina por medio de CLAR-UV-DAD en muestras de agua de las Lagunas de Montebello, Chiapas.

---

---

## 4. Antecedentes

### 4.1 Cromatografía

La cromatografía es una técnica de separación de amplio uso debido a que permite el análisis de un gran número de compuestos con rapidez y exactitud. La separación de una mezcla ocurre en un sistema constituido por dos fases no miscibles: una fase móvil (líquida o gaseosa) y una fase estacionaria (sólida o líquida) que se encuentra impregnada sobre un soporte. La fase móvil actúa como un acarreador de los compuestos por la fase estacionaria, donde debido a un equilibrio de distribución entre estas dos fases, logran separarse. <sup>1</sup>

Las técnicas cromatográficas pueden clasificarse de acuerdo a la fase móvil que se utiliza. Cuando la fase móvil es un gas, se llama cromatografía de gases, si es líquida se denomina cromatografía de líquidos. Mientras que la cromatografía de gases se emplea para separar mezclas que contienen compuestos orgánicos volátiles y de peso molecular bajo, la cromatografía de líquidos no está limitada por estos factores. Por lo anterior, la cromatografía de líquidos se utiliza con mayor frecuencia. <sup>1, 2, 3</sup>

La cromatografía de líquidos de alta resolución, de alta presión o de alto desempeño, (HPLC, por sus siglas en inglés) presenta otras ventajas como la posibilidad de obtener los compuestos separados sin alterar su actividad biológica y la capacidad de analizar la presencia de residuos de diferentes sustancias en concentraciones del orden de los  $\mu\text{g/L}$ . Además, con esta técnica pueden estudiarse especies iónicas, macromoleculares, polímeros, productos lábiles naturales y compuestos polifuncionales de pesos moleculares entre  $10^2$  y  $10^4$  daltones. <sup>1, 4</sup>

Después de que los componentes son separados, pueden ser sometidos a otros equipos para obtener datos adicionales; por ejemplo, un equipo de electroforesis, un equipo de espectroscopia de masas o un colector de fracciones donde los compuestos pueden ser recolectados para obtener desde microgramos hasta kilogramos de una sustancia pura. <sup>1, 5</sup>

---

---

## **4.2. Principio de funcionamiento de la cromatografía de líquidos**

El principio de separación de los componentes en la cromatografía de líquidos consiste en el equilibrio de distribución de los componentes entre la fase estacionaria y la fase móvil, el cual determinará la rapidez con la cual cada componente migra a través del sistema. Por lo anterior, para que se realice una separación adecuada se necesita que los componentes tengan diferentes coeficientes de distribución, así su velocidad de migración será distinta y saldrán del sistema a tiempos diferentes. <sup>1, 4</sup>

La distribución de un soluto entre dos fases es el resultado del balance de fuerzas (de atracción o repulsión) entre las moléculas del soluto y las moléculas de cada fase. Por lo anterior, la retención de un compuesto en la columna depende directamente de la polaridad de la muestra y la fase estacionaria. Los compuestos polares se adsorberán a una superficie polar en mayor grado que los compuestos menos polares y por lo tanto quedarán retenidos por más tiempo en la columna que los compuestos menos polares. <sup>1</sup>

Un factor adicional que influye en la distribución de los compuestos es la temperatura. Al aumentar, disminuye la viscosidad de la fase móvil por lo que aumenta la transferencia de masa y la solubilidad de la muestra, lo cual favorece la distribución del soluto. Cuando las condiciones de separación son las apropiadas, los componentes de la muestra se separan y emergen de la columna en orden creciente de interacción con la fase estacionaria. Por último, los compuestos llegan hasta un sistema de detección, que a su vez envía la información a un registrador o computadora para el posterior manejo de la información. <sup>1, 3, 4</sup>

### **4.2.1 Eficiencia de la separación**

La eficiencia de la separación de una mezcla de compuestos depende del número de platos teóricos (N) que contiene la columna cromatográfica, es decir, el número de ocasiones en que la fase móvil y los solutos se ponen en equilibrio con la fase estacionaria. El número de platos teóricos depende también de la longitud de la

---

---

columna (L), por lo que se emplea otro parámetro que se llama altura del plato teórico (H) el cual mide la eficiencia por unidad de longitud.

Después de pasar por el detector, los componentes se representan gráficamente por medio de un cromatograma, en donde cada componente se muestra mediante un pico gaussiano. A medida que aumentan los platos teóricos, los picos son más estrechos y por lo tanto la columna es más eficiente, obteniendo así una mejor separación.

La eficiencia de una columna puede aumentar en los siguientes casos:

- a) Baja velocidad de flujo en la fase móvil.
- b) Diámetro pequeño de partícula en la fase estacionaria (granulometría fina), con lo que se tienen columnas más cortas.
- b) Aumento en la temperatura de separación.

Al controlar estos parámetros podremos tener una columna más eficiente. Lo anterior, permite tener un tiempo de análisis más corto y con una buena resolución, es decir, un buen grado de separación de las bandas de un cromatograma, las cuales representan a los compuestos separados. <sup>1, 4</sup>

#### **4.2.2 Instrumentación en la cromatografía de líquidos**

Los componentes fundamentales de un sistema cromatográfico son:

- a) Recipiente para la fase móvil. Los cromatógrafos de líquidos están equipados con uno o más recipientes (generalmente de vidrio) para el suministro de la fase móvil. En las mangueras de entrada de la fase móvil se instalan filtros para evitar el paso de partículas al sistema cromatográfico. <sup>1, 4</sup>
- b) Degasificador. Se utilizan con el objetivo de remover el aire y otros gases disueltos en la fase móvil que pueden interferir en el funcionamiento de las bombas, la columna o el detector. Este proceso de degasificación puede

---

---

efectuarse mediante vacío, ultrasonido o haciendo pasar una corriente de gas inerte a través de la fase móvil. <sup>1</sup>

c) Bombas. Generalmente son de acero inoxidable o aleaciones de titanio que alcanzan presiones superiores a los 340 bares. Es conveniente que no haya pulsaciones porque se manifiesta como ruido en el detector por lo que se utilizan amortiguadores de pulsaciones para controlar este efecto. La calidad de una bomba está determinada por el grado de estabilidad y reproducibilidad del flujo que genera. <sup>1</sup>

c) Válvulas de inyección. Se utilizan para introducir la muestra al sistema cromatográfico. Generalmente se les integra un loop intercambiable de volumen fijo que permite inyectar siempre el mismo volumen de muestra. Estas válvulas tienen dos posiciones:

1. Posición de carga: ocurre el llenado del loop con la muestra a presión atmosférica.

2. Posición de inyección: ocurre la colocación del loop con la muestra en la corriente de la fase móvil, con la subsecuente inyección en la parte superior de la columna, sin interrupción significativa del flujo.

d) Columna: es la parte más importante de un cromatógrafo por ser el lugar donde se realiza la separación de los componentes. Están construidas con una pared gruesa de acero inoxidable para resistir las altas presiones y la acción química de la fase móvil. Su interior es liso, de calibre uniforme y el relleno se retiene mediante filtros de acero poroso. Generalmente a la entrada de la columna hay un manómetro que registra la presión y cuando se requiere trabajar en condiciones isotérmicas, se puede realizar con circulación de aire o cámaras calentadas eléctricamente.

La columna contiene el empaque necesario para que se realice la separación siempre y cuando la elección sea la adecuada. La fase estacionaria puede ser de sílice en el caso de cromatografía 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. <sup>2</sup>

La mayoría de las columnas son de 10 a 30 cm, aunque hay más cortas, entre 3 y 8 cm de longitud las cuales permiten obtener menores tiempos de análisis y disminuir el consumo de disolventes. También es conveniente usar precolumnas, antes de las columnas analíticas pues permiten retirar las impurezas del disolvente y capturar los componentes de la muestra fuertemente retenidos, impidiendo así la contaminación gradual de las columnas analíticas. <sup>2, 3</sup>

e) Detectores: son dispositivos que detectan a los compuestos separados en la columna debido a que son sensible a diferentes propiedades físico-químicas de los compuestos; por ejemplo, absorbancia, índice de refracción, conductividad, fluorescencia, entre otros.

El detector determina una muestra diluida en relación a la inyectada que varía de 5 a 350 veces y que depende de la longitud y del diámetro interno de la columna, el volumen de la muestra, el número de platos y el volumen de retención. <sup>1, 4</sup>

Uno de los detectores más utilizados son los fotómetros y espectrofotómetros de ultravioleta-visible que pueden ser de longitud de onda fija como 254 nm, de longitud variable o de barrido de longitud de onda. Estos últimos emplean diodos de estado sólido, los cuales permiten la determinación espectral continua en un intervalo amplio de longitud de onda. Sus ventajas son inobjtables pues se evitan los corrimientos dados por desajustes del sistema óptico y ofrecen mucha más información. <sup>1, 2, 3, 4</sup>

Estos dispositivos exigen una estabilidad térmica en la celda de flujo del orden de 0,01 °C y alta eficiencia en sus sistemas ópticos y electrónicos. Los disolventes de la fase móvil empleados deben de tener una absorbancia muy baja o nula.

---

---

### 4.2.3 Cromatografía de fase reversa

La elección del método en la cromatografía de líquidos depende de las características de los compuestos a analizar. Algunas veces se necesita combinar varios métodos para lograr una separación adecuada. Una de las técnicas más utilizada es la cromatografía de fase reversa, la cual se emplea en un 75% de las separaciones que se realizan. <sup>2, 3</sup>

La cromatografía de fase reversa emplea un empaque enlazado hidrofóbico de diferentes longitudes de cadena de 2, 8 ó 18 átomos de carbono como fase estacionaria y una fase móvil polar constituida por mezclas de agua con algún disolvente orgánico. Como aditivos se utilizan amortiguadores o sales. <sup>1, 4</sup>

Las ventajas que proporciona esta técnica se resumen de la siguiente 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.

La retención de los solutos en este tipo de sistemas puede explicarse con el modelo de Hovarth, según el cual las superficies hidrocarbonadas de las moléculas de soluto y de la fase estacionaria experimentan un efecto de repulsión hacia el eluyente polar. Por lo anterior, 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. <sup>1</sup>

---

---

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.
- Polaridad de la mezcla que constituye la fase móvil.

Los disolventes que se emplean frecuentemente en fase reversa, además del agua y el metanol, son el acetonitrilo y el tetrahidrofurano. La elección del disolvente o la combinación de los mismos modifican la selectividad, que también se ve afectada por el pH, los aditivos y por el modificador. Cuando se utiliza un único disolvente (o una mezcla de disolventes de composición fija) al proceso de elución se le denomina isocrático; sin embargo, si un disolvente no permite una elución suficientemente rápida de todos los componentes, se puede usar una elución con gradiente. <sup>1, 3</sup>

Para la elución en modo de gradiente se utilizan dos o tres sistemas de disolventes con una polaridad significativamente distinta. Una vez que se comienza la elución, se varía la relación de los disolventes de forma programada, a veces continuamente y a veces mediante una serie de etapas escalonadas, dando como resultado un aumento gradual en la fuerza eluyente. Los equipos que se utilizan para la elución en gradiente permiten introducir los disolventes desde dos o más recipientes en una cámara de mezclado a una velocidad que varía continuamente y la relación de volumen de los disolventes se puede modificar lineal o exponencialmente con el tiempo. Con esta técnica se puede acortar el tiempo de separación sin sacrificar la resolución. <sup>2</sup>

La cromatografía de fase reversa es empleada en sistemas que no tienen grupos que establezcan puentes de hidrógeno, en compuestos aromáticos o alifáticos y en series de diferente longitud de cadena. Algunos compuestos analizados por fase reversa con las características mencionadas son analgésicos,

---

---

anticonvulsivos, corticoesteroides, hormonas, vitaminas y pesticidas organofosforados u organoclorados. <sup>1</sup>

### **4.3 Aplicación de la cromatografía de líquidos para el análisis de pesticidas**

Un buen ejemplo de aplicación de la cromatografía de líquidos es el estudio de los pesticidas. La importancia de estos compuestos radica en el uso que se les da en la agricultura para el control de plagas de animales y vegetales; sin embargo, debido a sus características físico-químicas y a su uso desmedido, ahora representan una fuente de toxicidad potencial al entorno donde son utilizados. Por lo anterior, es necesario contar con un método confiable para el análisis de muestras que contienen estos compuestos, y es donde la cromatografía de líquidos ha demostrado ser una técnica muy valiosa. <sup>6</sup>

Los pesticidas existentes pueden ser clasificados en varios grupos de acuerdo a su acción o a sus propiedades físicoquímicas. Según su estado físico se clasifican en: gases o gases licuados, aerosoles, polvos, cebos y tabletas, entre otros, mientras que por su composición química se clasifican en: arsenicales, carbamatos, organoclorados, organofosforados, organometálicos, triazinas, entre otros. Además se pueden clasificar según su acción específica, es decir, por el tipo de organismos que atacan, por ejemplo: insecticidas, acaricidas, fungicidas, nematocidas, desinfectantes, molusquicidas y herbicidas. <sup>7</sup>

Los pesticidas pueden existir de manera inorgánica u orgánica, siendo más común los pesticidas orgánicos, ya que su potencial toxicológico es mucho menor en comparación con los inorgánicos. <sup>7</sup>

### **4.4 Herbicidas**

Dentro de los pesticidas de mayor uso en la agricultura se encuentran los herbicidas. Un herbicida es una sustancia capaz de afectar a especies vegetales con la finalidad de controlar su crecimiento o erradicarlas de un sitio específico. Por lo anterior, estos compuestos son usados para eliminar a las plantas consideradas como plagas en los cultivos.

---

---

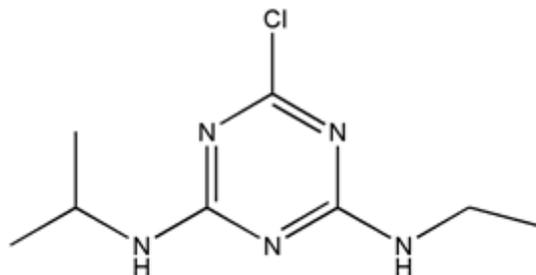
Desde 1932 cuando fue introducido el primer herbicida orgánico (dinitro ortocresol) comenzó a aumentar de manera considerable la investigación y producción de estos compuestos. Por lo anterior, para la década de los 50's la producción del maíz aumentó hasta un 811%, pues los herbicidas se convirtieron en herramientas fundamentales para la agricultura. El ejemplo más representativo de los herbicidas es la familia de las triazinas, las cuales han sido la clase más importante de químicos utilizados en la agricultura. <sup>8</sup>

Las triazinas han ayudado a controlar las plagas vegetales en más de 50 tipos de cultivos alrededor del mundo desde su descubrimiento en 1950 en un laboratorio de Suiza. Estos compuestos son altamente selectivos con las plagas, ya que afectan directamente el sistema bioquímico de las plantas pues son inhibidores del fotosistema 2, el cual está presente en el proceso de fotosíntesis. Respecto a la toxicidad presentan efectos dañinos en concentraciones mayores a las partes por billón (ppb); sin embargo, no se encuentran concentraciones mayores a las partes por millón (ppm) en los productos obtenidos de los cultivos.

Dentro de los herbicidas triazínicos existen tres estructuras principales que se diferencian por el sustituyente unido a la triazina, el cual puede ser cloro, un grupo metoxi o un grupo metiltio. Dentro de los triazínicos clorados el compuesto más representativo es la atrazina (6-cloro-N-etil-N-isopropil-1,3,5-triazina-2,4-diamina) que es utilizada para el control de malezas en cultivos de maíz, piña, sorgo, entre otros. <sup>9</sup>

#### **4.4.1 Atrazina**

El uso de la atrazina fue registrado por primera vez en 1958 y desde entonces ha sido ampliamente utilizada para controlar o evitar el crecimiento de malezas en distintos cultivos, especialmente el de piña. Este compuesto ha sido el herbicida más utilizado en EE. UU., para controlar el crecimiento de pasto y plantas de hoja ancha, además de que se ha utilizado para prevenir el crecimiento de hierbas a lo largo de carreteras y líneas ferroviarias. A continuación se muestra su estructura molecular. <sup>8</sup>



**Figura 4.1. Estructura química de la atrazina.**

En el medio ambiente la atrazina puede sufrir alteraciones en su estructura tanto por procesos bióticos como abióticos. Estos procesos de transformación dependen del compartimento ambiental en el cual el compuesto es dispersado y transportado. La atrazina puede permanecer en cualquiera de los tres compartimientos: aire, suelo y agua, y su distribución depende de sus propiedades fisicoquímicas las cuales se resumen en la siguiente tabla. <sup>10</sup>

**Tabla 4.1. Propiedades fisicoquímicas de la atrazina.**

<b>Parámetro</b>	<b>Característica</b>
<b>Fórmula Molecular</b>	C <sub>8</sub> H <sub>14</sub> N <sub>5</sub> Cl
<b>Peso Molecular</b>	215.7 g/mol
<b>Punto de fusión</b>	175-177 °C
<b>pKa</b>	1.7
<b>Solubilidad en agua</b>	33 mg L <sup>-1</sup> a 25 °C
<b>Presión de vapor</b>	2.89 x 10 <sup>-7</sup> mm Hg a 25 °C
<b>Constante de Ley de Henry</b>	2.48 x 10 <sup>-9</sup> atm m <sup>3</sup> mol <sup>-1</sup>
<b>Coefficiente de partición octanol/agua (log K<sub>ow</sub>)</b>	2.68
<b>Coefficiente de adsorción (K<sub>d</sub>)</b>	0.19-2.46
<b>Coefficiente de partición en carbono orgánico (K<sub>oc</sub>)</b>	25-155

---

---

#### 4.4.2 Distribución de la atrazina

Solo una fracción de la atrazina (entre el 2.4% y el 14%) que se acumula en suelos, se volatiliza y viaja por la atmósfera hasta caer en distintas zonas junto con las precipitaciones. <sup>13</sup> Lo anterior se observa en el valor de su constante de Henry, la cual para los pesticidas si es menor a  $1 \times 10^{-5}$  su potencial de volatilización es bajo. <sup>11,12</sup>

Por otro lado, la atrazina puede distribuirse hacia cuerpos de agua al ser transportada por la lluvia o el agua residual alcanzando ríos, lagos, mares y puede traspasar hasta mantos freáticos, esto bajo los fenómenos de lixiviación, adsorción, absorción, arrastre superficial y degradación. Una de las características fisicoquímicas de este compuesto que favorece este movimiento es su baja constante de adsorción, la cual indica que el compuesto se distribuye en mayor proporción en el agua con respecto al suelo (materia orgánica). <sup>11, 13</sup>

En cualquiera de los tres compartimentos la atrazina puede sufrir procesos de degradación. Aunque este compuesto es relativamente estable debido a que presenta un tiempo de vida media de meses (tanto en suelo como en agua), en suelos agrícolas este compuesto bajo ciertas condiciones tiende a degradarse. Como se mencionó anteriormente, la atrazina es un compuesto altamente móvil en suelos y a una profundidad de 25 cm generalmente, se empieza a acumular y a degradar por vía química o por acción microbiana dependiendo de factores como son el contenido de materia orgánica, el pH, la temperatura, la humedad y el tipo de suelo. <sup>13</sup>

El proceso de degradación microbiana se ve favorecido en suelos con alto contenido de materia orgánica en una relación 1:4 ó 1:5 (materia orgánica/suelo), con un pH prácticamente neutro (pH 6.5-7.5), con una temperatura mayor de 25 °C y con un contenido de humedad entre un 50 y 60%. Estas condiciones son ideales para el desarrollo de bacterias del tipo *Pseudomona sp.*, las cuales son las encargadas de realizar la degradación. Por lo anterior, sin estas condiciones las

---

---

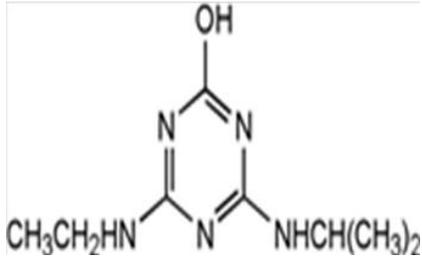
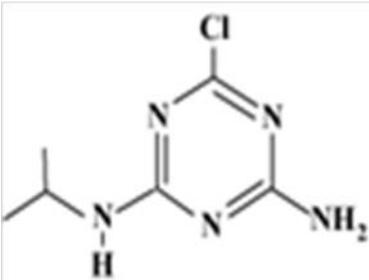
bacterias son incapaces de sobrevivir y por lo tanto la atrazina no se degrada por esa vía. <sup>12, 14</sup>

Por otro lado, la degradación por vía química se ve favorecida en suelos donde la humedad es muy alta, debido a que el proceso más frecuente por el que se degrada la atrazina es la hidrólisis. Además, la temperatura también es un parámetro a considerar en este proceso, pues la degradación por vía química no corresponde solamente a un tipo de reacción, sino a un conjunto de reacciones secuenciales de tipo hidrolíticas que están asociadas directamente con los procesos bioquímicos de las bacterias y plantas. <sup>15</sup>

En general las condiciones para una buena degradación química son contenidos altos de agua en los suelos (humedad mayor al 50%), una temperatura ambiente mayor a 25 °C y pH ligeramente ácido. <sup>9</sup>

La diferencia entre una degradación por vía química y una por vía microbiana radica en el metabolito que se genera. La degradación química de la atrazina produce principalmente el metabolito 2-hidroxiatrazina (2-hidroxi-4-etil-6-isopropil, 1, 3, 5-triazina), mientras que por medio de una degradación microbiológica se obtiene la desetilatrazina (2-amino-4-cloro-6-isopropilamino-1,3,5-triazina). Además de los compuestos anteriores, se reportan metabolitos secundarios como el ácido cianúrico, desetildesisopropil (DIA), desetildesisopropil atrazina (DEDIA), entre otros. A continuación se presentan las propiedades fisicoquímicas de la 2-hidroxiatrazina y de la desetilatrazina. <sup>10</sup>

**Tabla 4.2. Propiedades fisicoquímicas de 2-hidroxiatrazina y desetilatrazina.**

Parámetro	2-hidroxiatrazina	desetilatrazina
<b>Fórmula Molecular</b>	C <sub>8</sub> H <sub>15</sub> N <sub>5</sub> O	C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> ClN <sub>5</sub>
<b>Estructura Química</b>		
<b>Peso Molecular</b>	197.2 g/mol	187.6 g/mol
<b>Punto de fusión</b>	>310 °C	132-134 °C
<b>pKa</b>	5.15	1.65
<b>Coeficiente de partición octanol/agua (log K<sub>ow</sub>)</b>	2.09	1.51

En cuerpos de agua la atrazina tiende a degradarse por vía química. Lo anterior se debe a que la persistencia de atrazina en el agua está influida por el anillo triazínico, lo cual hace que este herbicida sea resistente al ataque microbiano. Es por esto que la biodegradación en el agua puede ser menos importante que la degradación química en este compartimento ambiental; sin embargo, la ruta principal por la cual se degrada es la fotodegradación. <sup>16</sup>

La fotodegradación es la transformación fotoquímica de una molécula causada por la absorción de radiación ultravioleta (UV), visible (VIS) o infrarroja (IR). La reacción química que se produce bajo la influencia de la luz, puede darse en la atmósfera, en la superficie del suelo y el agua, y puede ocurrir de manera directa o indirecta. <sup>17, 18</sup>

---

---

La fotodegradación directa, es la fototransformación que comprende la absorción directa de la luz por el plaguicida en el agua y que puede sufrir transformación. Por otro lado, la fotodegradación indirecta es un proceso donde la energía de la luz es absorbida por otros constituyentes del agua y es transmitida al plaguicida para dar lugar a la fototransformación. <sup>19</sup>

Los estudios realizados bajo la luz solar natural mencionan que la fotodegradación ocurre de manera directa. Además, se sabe que este proceso aumenta en presencia de fotosensibilizadores como ácidos húmicos, nitratos, carbono orgánico disuelto y sales de hierro. En cuanto a los metabolitos que se generan, se han encontrado los mismos que se producen en la degradación biótica y por reacciones de hidrólisis. <sup>16, 18</sup>

#### **4.4.3 Toxicidad y legislación de la atrazina**

La atrazina y los metabolitos que genera por su degradación, tienen un potencial toxicológico diferente, por lo que se tienen que estudiar los efectos e interacciones que tienen estos compuestos con el medio ambiente y el ser humano. <sup>10</sup>

La exposición humana a la atrazina puede darse en el ambiente laboral, cuando los trabajadores se exponen al herbicida durante las actividades de producción o aplicación. Esta exposición puede darse por vía inhalatoria o dérmica, y después de su aplicación, debido al consumo de agua contaminada. <sup>10, 20</sup>

Los efectos que produce una intoxicación aguda son irritación severa de ojos, piel (dermatitis), nariz y garganta. Por otro lado, los efectos crónicos que produce son alteraciones en las funciones del corazón, hígado y riñón, además de problemas en la reproducción debido a que altera los niveles de hormonas relacionadas con la ovulación. También provoca defectos de nacimiento en humanos; por ejemplo, piernas reducidas y otras malformaciones congénitas. <sup>20, 21</sup>

Los riesgos establecidos por el contacto con la atrazina pueden clasificarse según la fuente de exposición en:

- a) riesgos laborales,
- b) riesgos de exposición ambiental,
- c) riesgo en agua potable,
- d) riesgo en agua destinada a la agricultura,
- e) riesgo en alimentos y
- f) riesgo residencial

En cada uno de los riesgos estudiados se han definido los parámetros mínimos o límites permisibles de concentraciones de atrazina, sin embargo aquellos que están embebidos en el marco legal son los correspondientes al agua potable y de uso agrícola, así como al de los alimentos. <sup>10</sup>

En la tabla 4.3 se muestra un listado de países y su decisión jurídica en cuanto al uso del herbicida. <sup>22</sup>

**Tabla 4.3. Países y su normatividad en cuanto al empleo de la atrazina.**

<b>Región</b>	<b>País</b>	<b>Restricción</b>
<b>Norteamérica</b>	EUA	Restringido
	Canadá	Permitido
	México	Permitido
<b>Europa</b>	Italia, Alemania, Suecia.	Prohibido
	Bélgica, Irlanda, RU	Permitido
<b>Asia</b>	China, Indonesia, Pakistán	Permitido
<b>Oceanía</b>	Australia	Restringido
<b>América Latina</b>	Colombia, Cuba, Panamá, Venezuela, Jamaica	Permitido

Con respecto a los límites permisibles en México sólo está presente en la norma NOM-127-SSA-1994 que define los parámetros de calidad del agua potable y de uso y consumo humano, así mismo según la NOM-010-STPS-1999 se establecen los límites a los cuales deben estar expuestos los trabajadores de la industria química; cabe resaltar que mientras varios países establecen no solo límites para el agua de uso y consumo humano, también tienen guías sobre las

---

---

concentraciones del herbicida en agua subterránea, suelos de uso agrícola y suelos de uso residencial, sin embargo en México esas guías o normatividades no existen hasta el momento. <sup>22</sup>

En la tabla 4.4 se muestra un comparativo entre los límites establecidos en agua de uso humano con respecto a varios países.

**Tabla 4.4. Límite de atrazina en agua de uso humano.**

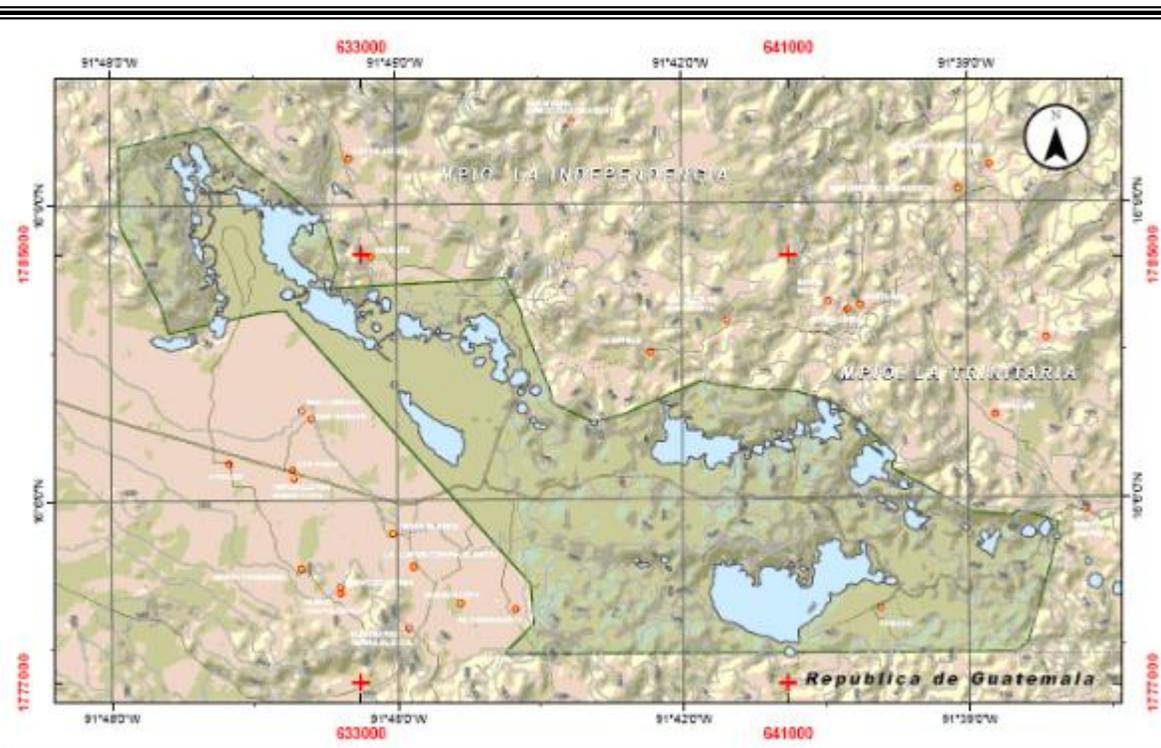
Límite	Concentración (µg/L)				
	Herbicida	UE	EUA	OMS	MÉXICO
NOM-127					NOM-010
Atrazina	0.1	3.0	5.0	2.0	10.0

UE: Unión Europea, EUA: Estados Unidos de Norteamérica y OMS: Organización Mundial de la Salud.

#### **4.5 Lagunas de Montebello**

Las Lagunas de Montebello se ubican en la región Sur-Sureste del estado de Chiapas en México junto a la frontera con Guatemala, abarcan una superficie de 6,425 ha y comprenden parte de los municipios: La Independencia y La Trinitaria, a este último pertenece el 95% de la superficie del parque al que pertenecen las lagunas. Sus coordenadas extremas son 16° 04' 40" y 16° 10' 20" Latitud Norte y 91° 37' 40" y 91° 47' 40" Longitud Oeste.

En la figura 4.2, se muestra el mapa de la localización de las Lagunas de Montebello. <sup>23</sup>



**Figura 4.2. Ubicación de las Lagunas de Montebello, Chiapas.**

El clima y las condiciones geológicas de la zona, permitieron que se inaugurara el parque de las Lagunas de Montebello en 1959, sin embargo a pesar de formar parte del sistema nacional de parques, la actividad agrícola continúa en los alrededores de la zona por los locatarios.

Debido a la agricultura se permitió el uso de pesticidas en la zona para el mejoramiento de los cultivos, dentro de los que se puede mencionar a la atrazina y el paraquat.

Debido a la hidrología de la zona, el uso de los pesticidas trae consigo una serie de fenómenos de concentración en los cuerpos acuáticos (lagunas), por lo que las consecuencias resultan de suma importancia, en el Diario Oficial de la Nación en 2009, se anunció un nuevo modelo de administración del parque en donde la SEMARNAT entró en vigor para atenuar estos problemas de contaminación. <sup>23</sup>

---

---

## 4.6 Validación de métodos analíticos

Un requisito sumamente importante para cada procedimiento analítico es que sea aceptable para el fin que se pretende. A esta demostración se le llama validación de un método analítico y sirve para asegurar que el método desarrollado para determinar una sustancia específica en una muestra produzca resultados comparables para la gran mayoría de los analistas. Con lo anterior, se logra obtener resultados coordinados y fidedignos entre diferentes análisis o laboratorios. <sup>5</sup>

En cada procedimiento existen fuentes de error que pueden afectar el resultado de nuestra determinación. Por lo anterior, un punto crucial cuando se pretende validar un método analítico es identificar dónde se producen los errores y cómo puede evaluarse su magnitud. <sup>3, 5</sup>

Una manera de identificar un error es aplicar el procedimiento a muestras repetidas o réplicas que se obtienen de la muestra original. En series de diferentes análisis, la media aritmética es un resultado numérico que podemos tomar como resultado final del análisis y se obtiene con la suma de todas las medidas dividida por el número de las mismas. <sup>2, 3, 5</sup>

La diferencia entre el “valor real” del analito y la media de los resultados analíticos obtenidos en una serie de análisis se denomina error absoluto. Este tipo de error tiene las mismas unidades que la medida realizada, incluyendo un signo (+ o -). Cuando el error absoluto se expresa como un porcentaje de un resultado real se denomina error relativo y no tiene unidades. <sup>3, 5, 24</sup>

El error absoluto entra dentro de la categoría de errores sistemáticos, los cuales se originan por una causa fija. Un error sistemático (o error determinado) en un análisis es o bien únicamente alto o bien únicamente bajo cada vez que se efectúe el análisis. El error sistemático total es denominado el sesgo de la medida. <sup>5, 24</sup>

Los errores sistemáticos provienen del método analítico; su presencia o ausencia y su magnitud determinan la exactitud de la medida analítica. La **exactitud** se define como el grado de concordancia entre el resultado de un ensayo y el valor

---

---

de referencia aceptado. Para decir que un resultado es exacto, el valor real y el valor medio determinado experimentalmente han de ser iguales dentro de unos límites especificados. Una baja o alta exactitud nos mostrará cómo el valor de la media difiere del valor real. 3, 5, 24

La determinación de la exactitud de un método es parte de su validación. Por lo anterior, los errores que causan inexactitud deben ser eliminados de la técnica experimental, o al menos han de ser mitigados mediante un análisis correctivo. Una manera de realizar lo anterior es mediante la calibración, que es un proceso que relaciona la señal analítica medida con la concentración del analito. 5, 26, 25

La calibración de un método se realiza cuando se ensayan muestras conocidas con diferentes concentraciones del analito, las cuales se denominan estándares. Si los resultados analíticos están en consonancia con los estándares, se confirmará la exactitud del método. Por lo anterior, cualquier análisis se debe llevar a cabo primeramente con muestras estándares antes de verificar resultados de muestras desconocidas. 24, 25

Además de los estándares, se necesita otro tipo de muestra para realizar la calibración de cualquier método: el análisis del blanco. El blanco contiene todos los componentes de la muestra excepto las sustancias objeto del análisis (analitos). La muestra blanco se somete a todos los pasos del procedimiento como si fuese una muestra normal y los resultados nos permitirán elucidar las posibles interferencias que afectan a la exactitud. 3, 5

Los tres métodos más frecuentemente utilizados para la calibración son; la realización y el uso de una curva de calibrado externa, el método de la adición de estándares y el método del patrón interno.

Además de los errores sistemáticos existen los errores aleatorios. Este tipo de errores se originan debido a causas arbitrarias o indeterminadas. En un análisis, este tipo de errores producen valores a veces altos o a veces bajos, los cuales tienden a distribuirse de una forma característica a ambos lados del valor medio.

---

---

Lo anterior, se puede observar con una curva de error Gaussiana o curva de distribución normal, donde el valor medio se encuentra en el pico de la curva. <sup>5, 24</sup>

Los errores aleatorios afectan directamente la **precisión** reportada como repetibilidad o como reproducibilidad del experimento, la cual se define como el grado de concordancia mutua entre los datos que se han obtenido de una misma forma. Para evaluar la precisión de un método analítico se utiliza la desviación estándar que es una medida cuantitativa de la dispersión. Cuando la dispersión de los datos obtenidos experimentalmente es pequeña decimos que la precisión o reproducibilidad es alta. <sup>5, 26, 25</sup>

Otro parámetro que se utiliza para evaluar la precisión de un método analítico es el coeficiente de variación, el cual se obtiene al dividir la desviación estándar por la media. De ordinario, el coeficiente de variación se expresa como un porcentaje de la media y cuanto menor es, más precisa es la serie de medidas. <sup>24</sup>

Cada método analítico consta de numerosos pasos y cada paso lleva asociado algún tipo de error (aleatorio y/o sistemático). Por lo anterior, cuanto mayor es el número de pasos involucrados, más incierta llega a ser la medida real, pues cada uno de los errores contribuye con su parte final. Como cada uno de los errores se lleva hasta la medida final, a este proceso se le llama propagación de error, y a su tratamiento matemático se le llama propagación de la incertidumbre. <sup>5, 24</sup>

La propagación del error es un punto muy importante a la hora de conocer qué método de los posibles se ha de utilizar en el análisis. El error final puede depender más de una etapa del análisis que de otras. Por lo anterior, un análisis de propagación del error puede contribuir a planificar un método analítico para que sea más preciso.

Tanto los errores aleatorios como los sistemáticos, se propagan en los sucesivos pasos de un análisis. Sin embargo, aunque se debe saber cómo estimar y calcular los errores, el objetivo debe ser minimizarlos o eliminarlos: los errores sistemáticos mediante calibración, y los errores aleatorios mejorando la reproducibilidad; por ejemplo, mediante automatización. Por ejemplo, los automuestreadores de

---

---

cromatografía mejoran la precisión en un factor de 3 a 10 veces comparada con la que se obtiene manualmente. 3, 5, 24

Además de la precisión y la exactitud, la validación de un método analítico comprende estudios de linealidad, la elucidación de los límites de detección y de cuantificación, así como la evaluación de interferencias que pueden estar presentes en las muestras reales mediante la determinación de recobros. Estos factores se describen a continuación.

**Linealidad:** mide el grado en que la respuesta analítica respecto a la concentración (o cantidad) del analito, se ajusta a una función lineal. Por ejemplo, para conocer la concentración de un analito en una matriz, se evalúa la linealidad de la curva de calibración con al menos 5 disoluciones estándar que generalmente abarcan el intervalo de 0,5 a 1,5 veces la concentración esperada del analito. Cada patrón debe prepararse de manera independiente y analizarse 3 veces con este fin. Una medida superficial, pero frecuente, de linealidad es el coeficiente de correlación al cuadrado,  $R^2$  (conocido como coeficiente de determinación). Para un componente mayoritario de un problema, un valor de  $R^2$  por encima de 0,995 o quizá 0,999 se considera un buen ajuste para la mayoría de los fines. Otro criterio de linealidad es que la ordenada en el origen de la curva de calibrado debe ser próxima a 0. Un grado aceptable de proximidad a 0 podría ser un 2% de la respuesta del valor buscado de analito. En general, para que un método analítico sea útil, debe tener un intervalo lineal de, al menos, dos órdenes de magnitud. 3

Cuando se establece una franja de concentraciones dentro de las cuales son aceptables la linealidad, exactitud y precisión, se le conoce como intervalo de validez. Por ejemplo para una impureza, un intervalo de validez aceptable es la franja de concentraciones que da un coeficiente de correlación  $\geq 0.995$  (una medida de linealidad), una recuperación del  $100 \pm 2\%$  (una medida de exactitud) y una precisión de  $\pm 3\%$ . 3

**Límite de detección:** es aquella concentración que proporciona una señal en el instrumento (y) significativamente diferente a la señal del “blanco” o “ruido de

---

---

---

---

fondo”. Este parámetro se puede definir también como la concentración del analito que proporciona una señal igual a la señal del blanco ( $y_B$ ) más tres veces la desviación estándar del blanco ( $s_B$ ).

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

Por lo anterior, el límite de detección depende de la relación entre la magnitud de la señal analítica y el valor de las fluctuaciones estadísticas de la señal del blanco. Generalmente el límite de detección se confunde con la sensibilidad del método; sin embargo, la sensibilidad se define como la respuesta de un instrumento o un método a una cantidad dada de analito o como la pendiente de la recta de calibración y, siempre que la representación sea lineal, puede ser medida en cualquier punto de ella. Por el contrario, el límite de detección de un método se calcula con la ayuda prestada por la zona de la representación cercana al origen, y utilizando tanto la pendiente como la ordenada en el origen. <sup>5</sup>

**Límite de cuantificación:** es la mínima concentración que se puede medir con exactitud, a menudo considerada como la señal del blanco ( $y_B$ ) más diez veces la desviación estándar del blanco ( $s_B$ ).

$$\text{Límite de cuantificación (LOQ)} = y_B + 10s_B$$

Una muestra cuya concentración se encuentra en el límite de detección se puede distinguir de un blanco, pero la señal de la muestra tiene tanto ruido, que no se puede medir con mucha exactitud. El límite de cuantificación, indica que la señal es suficientemente intensa para medirse con más exactitud. Por lo anterior, se considera que una muestra entre los límites de detección y de cuantificación se encuentra en la región de detección, no de cuantificación. <sup>5</sup>

**Recobros:** este parámetro permite la evaluación de la presencia o ausencia de interferencias de la metodología desarrollada al someterla al análisis de muestras reales, consiste en la adición de concentraciones conocidas de los analitos de interés en las muestras de trabajo, con su posterior cuantificación y comparación con lo esperado.

---

---

Los parámetros descritos anteriormente indican si un determinado método instrumental es o no adecuado para resolver un problema establecido. 2, 3, 5, 24, 25

---

---

## 5. Metodología

### 5.1 Instrumentación

#### 5.1.1 Equipo y materiales

a) Para la cuantificación de 2- hidroxiatrazina, desetilatrazina y atrazina se utilizó un cromatógrafo de líquidos constituido por sistema de dos bombas binarias de alta presión modelo 1525, un automuestreador modelo 717 plus y un detector UV-DAD modelo 2998 todos ellos de la marca Waters. Como sistema de adquisición de datos se utilizó el software Empower 2 build 2154 de Waters Corporation.

b) Purificador y desionizador de agua, Milli-Q Modelo 185 de Millipore.

c) Balanza analítica con capacidad de 210 g y precisión de 1 mg, marca Ohaus modelo Explorer.

d) Columna analítica Spherisorb ODS2 (250 x 4.0 mm, d.i) de 5  $\mu$ m de tamaño de partícula, Waters, Milford, MA, USA.

e) Filtros de nylon para jeringa de tamaño de poro 0.45  $\mu$ m marca Sartorius.

#### 5.1.2 Reactivos y disolventes

- Atrazina, pureza 98.9%, Chem Service.
- Desetilatrazina (DEA), pureza 99.5%, Chem Service.
- 2-Hidroxiatrazina (2-HA), pureza 99.5%, Chem Service.
- Acetonitrilo (AcCN), grado CLAR (99.9%), Honeywell.
- Metanol (MeOH), grado CLAR (>99.8%), Honeywell.
- Buffer de fosfatos de pH= 7.2, reactivo analítico (98.9%). Sigma Aldrich.
- Agua ultra pura, resistividad 18,2 M $\Omega$ ·cm a 25°C.

---

---

## **5.2 Desarrollo del método cromatográfico**

### **5.2.1 Condiciones cromatográficas para la determinación simultánea de 2-hidroxiatrazina, desetilatrazina y atrazina**

Para este fin se utilizó como fase estacionaria una columna Spherisorb ODS2 de 250 mm de longitud por 4 mm de diámetro interno, empacada con partículas de tamaño de 5  $\mu\text{m}$  de la marca Waters, Milford, MA, USA. Para seleccionar la fase móvil se evaluaron las siguientes relaciones acetonitrilo-buffer de fosfatos 0.005 M de pH 7.2, 20:80, 30:70, 40:60; 50:50, 60:40, 70:30 y 80:20 v/v, a un flujo de 1 ml/min en modo isocrático. Los tres analitos se monitorearon en tres longitudes de onda: 210, 220 y 230 nm. El volumen de inyección fue de 10  $\mu\text{L}$ .

### **5.2.2 Preparación de la fase móvil**

a) Buffer de fosfatos 0.005 M. Pesar aproximadamente 0.72 g del reactivo analítico de buffer de fosfatos pH 7.2 y llevarlos a un volumen de 1000 mL con agua desionizada. Posteriormente pasar la disolución resultante por un sistema de filtración Millipore utilizando membranas de 0.45  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro.

b) Fase móvil (AcCN – Buffer de fosfatos 0.005 M). Dependiendo de la relación de trabajo se prepararon 250 mL de fase móvil considerando cada una de las proporciones anteriormente descritas.

### **5.2.3 Preparación de las disoluciones patrón de cada analito**

Para llevar a cabo el desarrollo del método analítico todas las disoluciones fueron preparadas con disolventes grado cromatográfico, reactivos de grado analítico y agua desionizada. Para cada uno de los analitos de interés se preparó un estándar de alrededor de 1500 mg/L en metanol (disolución patrón) y cada disolución fue transferida a un frasco ámbar y conservada en refrigeración para evitar su degradación. Finalmente todos los estándares utilizados para el

---

---

desarrollo del método, su validación y los controles de calibración fueron preparados mediante la dilución de los patrones disueltos en metanol con agua desionizada.

### **5.3 Validación del método**

Una vez seleccionadas las características cromatográficas de análisis, se procedió con la obtención de los parámetros analíticos de una validación analítica, los cuales son: linealidad, precisión, exactitud, límite de detección y límite de cuantificación, recobros.

#### **5.3.1 Intervalo lineal**

Para la determinación de la linealidad del instrumento se prepararon de manera independiente 3 curvas de calibración, que contenían atrazina y sus metabolitos en concentraciones en el intervalo comprendido entre 0.01 y 200 mg L<sup>-1</sup>, cada disolución fue analizada por triplicado. Cada curva se preparó en diferentes días.

#### **5.3.2 Precisión**

La precisión del instrumento se evaluó para dos niveles de concentración: 0.5 y 10 mg L<sup>-1</sup>, cada uno de ellos fue preparado por triplicado. Estas disoluciones se inyectaron por triplicado y el análisis de datos se realizó por medio del cálculo del porcentaje del coeficiente de variación (% CV).

#### **5.3.3 Exactitud**

La exactitud del instrumento se evaluó para dos niveles de concentración: 7,5 y 25 mg L<sup>-1</sup>, cada uno de ellos también fue preparado por triplicado. Estas disoluciones se inyectaron por triplicado y con los valores obtenidos se determinó la concentración de los estándares utilizando la ecuación de la recta obtenida de las curvas patrón. Al término, las concentraciones se compararon con los valores conocidos y mediante el porcentaje de error se evaluó la exactitud del sistema.

---

---

### **5.3.4 Límite de detección**

Para la determinación del límite de detección se analizaron disoluciones de atrazina y sus metabolitos en concentraciones comprendidas entre  $0.001 \text{ mg L}^{-1}$  y  $0.05 \text{ mg L}^{-1}$  con el objetivo de encontrar la mínima concentración que tuviera una señal significativamente diferenciable del ruido de fondo para los 3 analitos, esto debido a que la inyección de un blanco de reactivos no generó ninguna respuesta cromatográfica en los tiempos de retención de los analitos de estudio. La concentración seleccionada con este fin fue una de  $0.01 \text{ mg L}^{-1}$  para los tres analitos. Posteriormente se determinó la respuesta instrumental de 7 estándares preparados de manera independiente y con los valores de área determinados se calculó la media y el valor de desviación estándar. Por último, con la ecuación reportada por Miller y Miller se calculó el límite de detección en unidades de absorbancia y con la ecuación de la curva patrón comprendida entre 0.1 y 5 mg/L correspondiente para cada analito, se realizó la conversión a unidades de concentración. <sup>2</sup>

### **5.3.5 Límite de cuantificación**

Para el cálculo del límite de cuantificación se siguió la metodología descrita para el límite de detección, pero utilizando la ecuación para el límite de cuantificación establecida por Miller y Miller. <sup>2</sup>

### **5.3.6 Recobros**

#### **5.3.6.1 Muestras de origen ambiental**

El método de análisis desarrollado fue evaluado en 13 muestras de agua superficial de las Lagunas de Montebello, Chiapas, las cuales fueron muestreadas en Agosto del 2014. Las muestras fueron tomadas en 5 de las Lagunas de Montebello: Balantetic, San Lorenzo, Bosque Azul, Vuelta al Agua y Yalmus, y para cada muestra se tomaron 2 L de agua superficial, a 1 m de profundidad. A las muestras se les realizó mediciones en campo tales como: pH y conductividad eléctrica con un medidor multiparamétrico de Hanna Instruments 9812. Las

---

---

muestras fueron colocadas en una hielera durante el viaje y una vez en el laboratorio fueron conservadas en refrigeración a 4 °C.

Las muestras fueron previamente filtradas a través membranas de 0,45 µm de tamaño de poro, colocadas en frascos de polipropileno con tapa y conservadas bajo refrigeración a 4°C.

### **5.3.6.2 Análisis de muestras sin fortificar**

Las 13 muestras de agua superficial se analizaron por triplicado usando la metodología antes descrita mediante la inyección directa de un volumen de 10 µL.

### **5.3.5.3 Análisis de muestras fortificadas con atrazina, DEA y 2-HA**

Cada una de las muestras de trabajo se fortificaron en dos niveles de concentración (0.5 y 5 mg L<sup>-1</sup>) con los tres analitos de interés. La preparación de las muestras fortificadas se describe a continuación:

- muestra fortificada con una concentración de 0.5 mg/L de 2-HA, DEA y ATZ: 100 µL de un estándar de 10 mg/L de atrazina y sus metabolitos fueron diluidos a 2000 µL con la muestra de agua de la laguna. Lo anterior se realizó y analizó por triplicado para las 13 muestras de agua de estudio.
- muestra fortificada con una concentración de 5 mg/L de 2-HA, DEA y ATZ: 200 µL de un estándar de 50 mg/L de atrazina y sus metabolitos fueron diluidos a 2000 µL con la muestra de agua de la laguna. Lo anterior se realizó y analizó por triplicado para las 13 muestras de agua de estudio.

---

---

## 6. Resultados y discusión

### 6.1 Desarrollo del método

#### 6.1.1 Selección de fase estacionaria

Se eligió trabajar con cromatografía en modo de fase reversa debido a la naturaleza de los analitos de interés, siendo de los tres la atrazina el compuesto menos polar y la 2-hidroxiatrazina el más polar. La columna Spherisorb ODS2 de 250 mm de longitud X 4 mm de diámetro interno, empacada con partículas de tamaño de 5  $\mu\text{m}$ , permitió la retención de estos tres compuestos con su subsecuente elución en tiempos de corrida relativamente cortos.

#### 6.1.2 Selección de fase móvil

En la siguiente tabla se muestran los tiempos de retención de los analitos obtenidos con las diferentes mezclas AcCN-buffer fosfatos que se evaluaron como fase móvil.

**Tabla 6.1. Tiempos de retención de la atrazina y sus metabolitos DEA y 2-HA con diferentes fases móviles evaluadas.**

Relación AcCN:Buffer fosfatos 0.005 M pH 7.2	Analito	Tiempo de retención (min)
20:80	2-HA	8.64
	DEA	10
	atrazina	30
30:70	2-HA	3.54
	DEA	4.85
	atrazina	14.2
40:60	2-HA	2.70
	DEA	3.39
	atrazina	7.29

Relación AcCN:Buffer fosfatos 0.005 M pH 7.2	Analito	Tiempo de retención (min)
50:50	2-HA	2.38
	DEA	3.04
	atrazina	6.5
60:40	2-HA	2.22
	DEA	2.51
	atrazina	4.07
80:20	2-HA	1.9
	DEA	2.19
	atrazina	2.77

De acuerdo con los datos de la tabla 6.1 se observa que al aumentar el contenido del buffer de fosfatos en la fase móvil, los analitos se retienen más, es decir tardan más tiempo en salir de la columna ya que se ve disminuida la fuerza de la fase móvil, provocando una mayor afinidad de los analitos por la fase estacionaria. La composición de la fase móvil que se eligió fue la que contiene una relación de AcCN:buffer fosfatos 0.005 M pH 7.2 40:60 v/v, ya que con ésta, las señales cromatográficas de los 3 analitos se encuentran lo suficientemente separadas entre sí, para poder ser analizadas sin traslapamiento con un tiempo de análisis relativamente corto. Se seleccionó el valor de pH de 7.2 para garantizar que todos los compuestos de estudio estén presentes en su forma no ionizada y que estos puedan retenerse en la fase estacionaria de trabajo.

### 6.1.3 Selección de la longitud de onda de trabajo

Los experimentos de la evaluación de la composición de la fase móvil fueron monitoreados en tres valores de longitud de onda: 210, 220 y 230 nm, dichos valores se encuentran en la zona del ultravioleta donde los tres compuestos

presentan la mayor absorbancia. A continuación se presentan los resultados obtenidos.

**Tabla 6.2. Valores de absorbancia de 2-HA, DEA y ATZ a diferentes valores de longitud de onda.**

Longitud de onda (nm)	Absorbancia		
	2-HA	DEA	ATZ
210	629506	585543	423450
220	672462	544612	793432
230	608946	508968	759867

Como se puede observar en la tabla, a una longitud de onda de 230 nm se tiene la menor absorbancia por parte de los tres compuestos de estudio por lo que se descartó trabajar con esa condición. Por lo anterior, se decidió llevar a cabo el monitoreo en 220 nm donde se presenta la mayor absorción de luz para la 2-hidroxiatrazina y atrazina.. Si bien en el valor de 210 nm se presenta la mayor absorción de luz por la desetilatrazina, a esta longitud de onda se corre un mayor riesgo de que la matriz de estudio presente señales interferentes. En la siguiente tabla se muestran las condiciones óptimas de trabajo para la determinación simultánea de 2-hidroxiatrazina, desetilatrazina y atrazina.

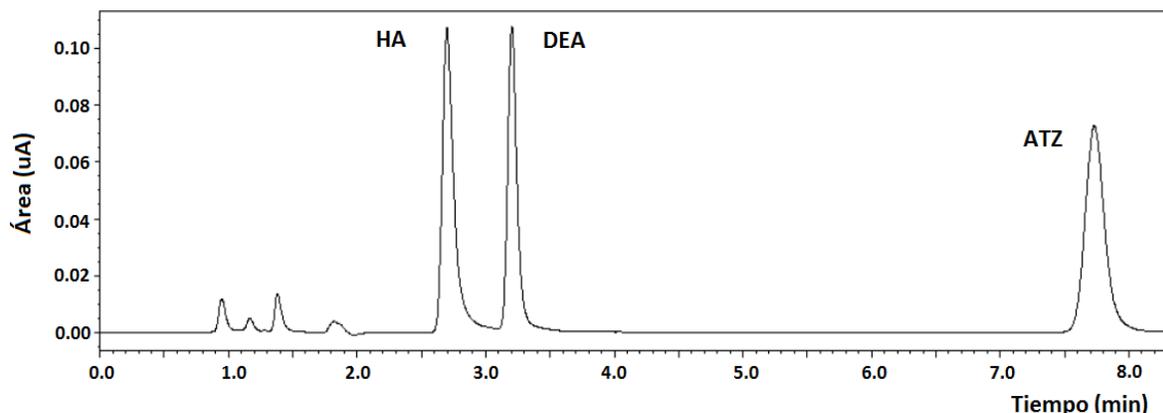
**Tabla 6.3. Condiciones cromatográficas para la determinación de la atrazina y sus metabolitos DEA y 2-HA.**

Columna	Fase móvil	$\lambda$ (nm)	Modo	Flujo
Spherisorb ODS2 (fase reversa) de 250 mm de longitud por 4 mm de diámetro interno	AcCN-buffer de fosfatos 0.005 M pH 7.2 40-60 (v/v)	220	Isocrático	1 ml min <sup>-1</sup>

---

---

En la siguiente figura se muestra el cromatograma obtenido para estos tres compuestos bajo las condiciones anteriormente descritas.



**Figura 6.1. Cromatograma obtenido con las condiciones óptimas de trabajo para una concentración de 10 ppm de 2-HA, DEA y ATZ.**

Mediante el cromatograma se obtuvieron los valores de tiempo de retención ( $t_r$ ) de los tres analitos y el tiempo muerto ( $t_0$ ). Estos valores se utilizaron para calcular el tiempo de retención corregido ( $t'_r$ ) mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Tiempo de retención corregido } (t'_r) = t_r - t_0$$

Posteriormente para evaluar la eficiencia de la separación entre la 2-hidroxiatrazina y desetilatrazina, analitos más comprometidos, se calculó el factor de selectividad y la resolución mediante las siguientes ecuaciones:

$$\text{Factor de selectividad } (\alpha) = \frac{t'_{r2}}{t'_{r1}}$$

$$\text{Resolución } (R_s) = \frac{2(t_{r2} - t_{r1})}{W_{b1} + W_{b2}}$$

Donde, el compuesto 1 es el primero que eluye (2-hidroxiatrazina), el compuesto 2 es el segundo en el proceso de elución (desetilatrazina),  $W_{b1}$  y  $W_{b2}$  corresponden al ancho de la base de cada uno de los picos cromatográficos involucrados y todos están expresados en minutos. En la siguiente tabla se muestra un resumen de los parámetros cromatográficos obtenidos para cada uno de los analitos de estudio.

---

---

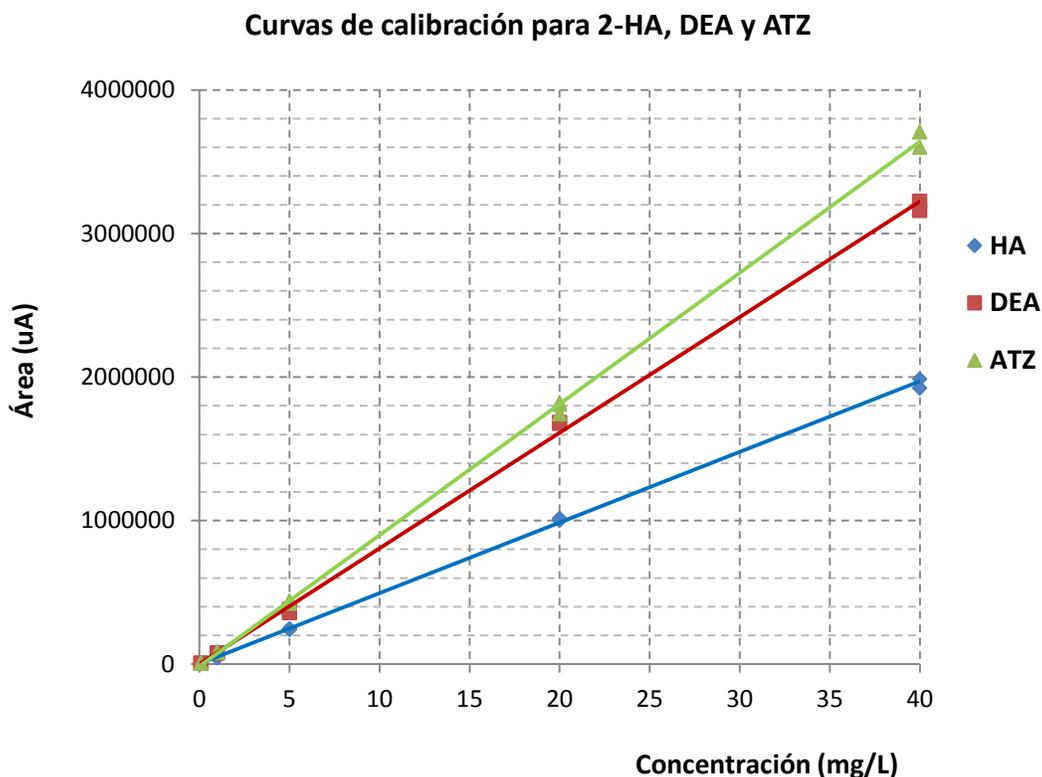
**Tabla 6.4. Parámetros cromatográficos de 2-HA, DEA y ATZ.**

<b>Analito</b>	<b>Tiempo de retención, <math>t_r</math> (min)</b>	<b>Tiempo muerto, <math>t_0</math> (min)</b>	<b>Tiempo de retención corregido, <math>t_r'</math> (min)</b>	<b>Selectividad (<math>\alpha</math>)</b>	<b>Resolución (<math>R_s</math>)</b>
<b>2-HA</b>	2.70	0.9	1.80	1.4	1.5
<b>DEA</b>	3.39	0.9	2.49		
<b>ATZ</b>	7.29	0.9	6.39		

## **6.2 Validación del método**

### **6.2.1 Linealidad**

Las curvas de calibración de los analitos de estudio se realizaron con disoluciones de concentración comprendidas en el intervalo entre 0.01 y 200 mg/L. Sin embargo al evaluar el comportamiento de la linealidad con respecto al valor del coeficiente de correlación ( $r$ ) y a la inspección visual de los gráficos obtenidos para los tres analitos, se encontró que existe un respuesta lineal de la absorbancia con respecto a la concentración en el intervalo comprendido entre 0.1 y 40 mg/L para los tres analitos. Cabe mencionar que para cada nivel de concentración el coeficiente de variación de los valores de área obtenidos de las tres réplicas fue menor al 5 %. En la siguiente figura se presentan las curvas de calibración para los tres analitos.



**Figura 6.2. Curvas de calibración obtenidas para la cuantificación de 2-hidroxiatrazina, desetilatrazina y atrazina en muestras acuosas ( $\lambda = 220 \text{ nm}$ ).**

De acuerdo con el grado de inclinación de las curvas obtenida (pendiente) se puede afirmar que la sensibilidad del método presenta la siguiente tendencia:  $\text{ATZ} > \text{DEA} > \text{2-HA}$ . Es decir el método propuesto es ligeramente más sensible para la determinación de atrazina (mayor valor de pendiente).

Posteriormente, se realizó un análisis de regresión lineal con los datos anteriores para obtener la ecuación de la recta que relaciona el área del pico cromatográfico con la concentración de cada analito. Los parámetros típicos obtenidos por regresión lineal para los analitos se presentan en la siguiente tabla.

**Tabla 6.5. Parámetros estadísticos para la determinación de 2-hidroxiatrazina, desetilatrazina y atrazina.**

<b>Parámetro/Analito</b>	<b>2-HA</b>	<b>DEA</b>	<b>ATZ</b>
<b>Número de datos (n)</b>	15	15	15
<b>Intervalo lineal (mg L<sup>-1</sup>)</b>	0.049-40 ppm	0.100-40 ppm	0.050-40 ppm
<b>Pendiente (m)</b>	48600 ± 1400	78000 ± 3600	89410 ± 910
<b>Ordenada al origen (b)</b>	5000 ± 24000	19000 ± 77000	-5000 ± 18000
<b>Coefficiente de correlación (r)</b>	0.9990	0.9990	0.9999
<b>Ecuación de regresión</b>	Área = 48600 C + 5000	Área = 78000 C + 19000	Área = 89410 C - 5000

El criterio de aceptación de un intervalo lineal considera que se debe de tener un coeficiente de correlación  $\geq 0.999$ , por lo que para los tres analitos de estudio 2-hidroxiatrazina, desetilatrazina y atrazina el criterio de aceptación se cumple, se puede decir que existe una respuesta lineal del detector con la concentración para los tres analitos hasta un valor de 40 mg L<sup>-1</sup> y dependiendo del compuesto el valor de concentración más bajo donde existe dependencia lineal es 0.049, 0.100 y 0.050 mg L<sup>-1</sup> para 2-HA, DEA y ATZ respectivamente.

### **6.1.2 Precisión**

La precisión del sistema de cuantificación propuesto para la atrazina y sus metabolitos fue evaluada en términos de repetibilidad para los niveles de concentración de 0.5 y 10 mg L<sup>-1</sup>. Los valores del coeficiente de variación obtenido para los dos niveles de concentración se muestran en la siguiente tabla.

**Tabla 6.6. Coeficientes de variación del área de pico para una concentración de 0.5 y 10 mg L<sup>-1</sup> de 2-HA, DEA y ATZ (n=3).**

Concentración (mg/L)	% Coeficiente de variación (%CV)		
	2-HA	DEA	ATZ
0.5	0.6	3.8	1.6
10	1.8	0.1	0.7

En los dos niveles de concentración el coeficiente de variación es menor al 5% para los tres analitos de estudio, por lo que se considera un grado de precisión aceptable para la cuantificación de estos tres compuestos. Lo anterior cumple con lo descrito en la Farmacopea de los Estados Unidos de Norteamérica (USP), la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM) y la Sociedad Química de América (ACS) donde se indica que para un equipo cromatográfico el coeficiente de variación no debe exceder el 5% para concentraciones de trabajo del orden de las partes por millón (mg L<sup>-1</sup>). Por lo que se cuenta con un sistema de medición de 2-HA, DEA y ATZ preciso.<sup>26, 27, 28</sup>

### 6.1.3 Exactitud

La exactitud del método se realizó para las concentraciones de 7.5 y 25 mg/L y se obtuvo mediante la comparación de los valores de concentración determinados para cada estándar con ayuda de las curvas de calibración externa y los valores de fortificación utilizados. El porcentaje de exactitud se calculó mediante las siguientes ecuaciones:

$$\% \text{ error} = \frac{\text{Concentración}_{\text{determinada}} - \text{Concentración}_{\text{teórica}}}{\text{Concentración}_{\text{determinada}}}$$

$$\% \text{ Exactitud} = 100 + \% \text{ error}$$

---

---

Los valores obtenidos se muestran en la tabla 6.7.

**Tabla 6.7. Determinación del grado de exactitud del sistema de análisis para atrazina, 2-HA y DEA para un nivel de confianza del 95% (n=3).**

Analito	Concentración teórica (mg/L)	Concentración determinada (mg/L)	%Exactitud
2-HA	7.5	7.8	103.6
	25	26.0	104.0
DEA	7.5	7.8	104.0
	25	23.9	95.5
ATZ	7.5	7.8	103.5
	25	25.4	101.5

De acuerdo a las guías de validación internacionales, para los intervalos de trabajo determinados en el análisis de regresión lineal, la exactitud global deberá de estar en un rango de 90 a 110 %. Por lo anterior, los resultados obtenidos son aceptables. <sup>29, 30</sup>

#### **6.1.4 Límite de Detección y cuantificación**

El cálculo del límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ) se realizó utilizando 7 disoluciones con una concentración de 0.01 mg/L para los tres analitos. Con los datos obtenidos se calcularon el LOD y LOQ de acuerdo a lo reportado por Miller y Miller (ver pág. 26) y con la ecuación de regresión de las correspondientes curvas de calibración se obtuvieron en unidades de concentración. En la siguiente tabla se muestran los resultados obtenidos.<sup>2</sup>

---

---

**Tabla 6.8. Límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) instrumentales para el análisis de 2-HA, DEA y ATZ (n=7).**

Analito	Parámetro	mg/L	µg/L
2-HA	LOD	0.049	49
	LOQ	0.063	63
DEA	LOD	0.010	10
	LOQ	0.020	20
ATZ	LOD	0.050	50
	LOQ	0.070	70

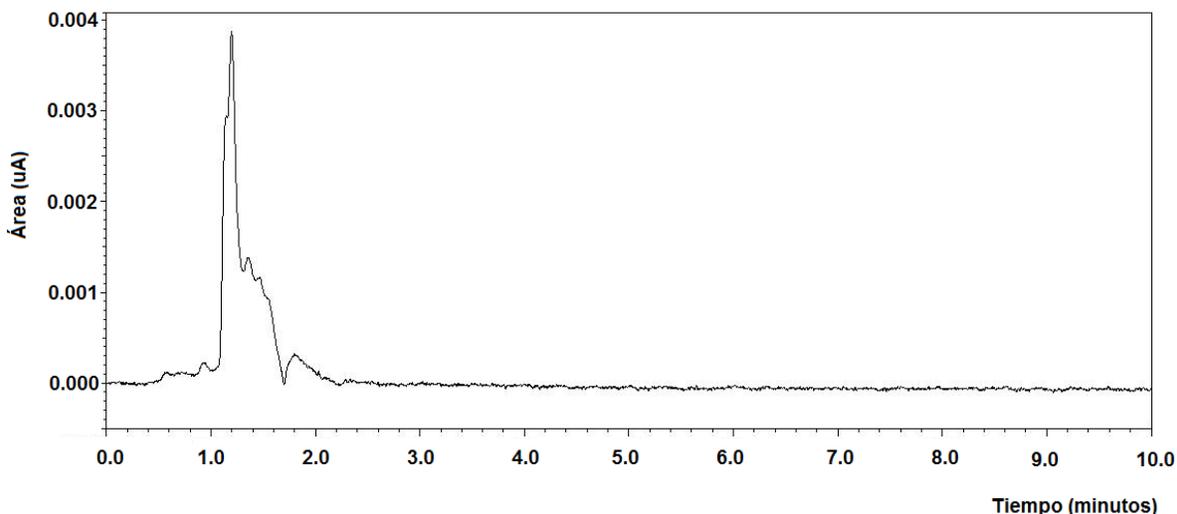
Para los tres analitos de estudio se obtuvieron valores de LOD y de LOQ del mismo orden de magnitud, siendo para la desetilatrazina los valores más bajos.

#### **6.1.5 Recobros**

Las muestras de estudio presentaron las siguientes características:

- Incoloras y transparentes.
- No presentaron sobrenadante.
- Los valores de pH medido en campo se encuentran en el intervalo de 8.8 a 9.3.
- Los valores de conductividad eléctrica medidos en campo se encuentran en el intervalo comprendido entre 520 y 743 µS.

En la figura 6.3 se presenta el cromatograma obtenido al realizar el análisis de una de las muestras de estudio mediante la metodología propuesta.



**Figura 6.3. Cromatograma obtenido al analizar una muestra de agua de las Lagunas de Montebello.**

Como se puede observar se tiene un cromatograma libre de señales en los tiempos de retención en los que se esperan las señales de la 2-HA, DEA y ATZ. Para todos los casos el comportamiento de los cromatogramas obtenidos fue similar. De acuerdo con estos resultados no se observa la presencia de señales que interfirieran para la determinación de los tres analitos de interés en ninguna de las muestras de estudio.

A continuación se presentan los resultados de los análisis obtenidos por inyección directa de las 13 muestras de agua provenientes de las Lagunas de Montebello, Chiapas mediante la metodología de análisis propuesta en el presente trabajo (tabla 6.8), en donde se muestra que no es detectable la presencia de los analitos de trabajo.

**Tabla 6.9. Concentraciones determinadas de 2-HA, DEA y ATZ mediante la metodología de análisis propuesta.**

Muestra	Analito		
	2-HA	DEA	ATZ
	Concentración determinada (mg/L)		
Muestra 1	ND	ND	ND
Muestra 2	ND	ND	ND
Muestra 3	ND	ND	ND
Muestra 4	ND	ND	ND
Muestra 5	ND	ND	ND
Muestra 6	ND	ND	ND
Muestra 7	ND	ND	ND
Muestra 8	ND	ND	ND
Muestra 9	ND	ND	ND
Muestra 10	ND	ND	ND
Muestra 11	ND	ND	ND
Muestra 12	ND	ND	ND
Muestra 13	ND	ND	ND

ND: no detectada.

Al realizar las fortificaciones de las muestras para dos niveles de concentración (0.5 y 5 mg/L), se realizaron las determinaciones cromatográficas correspondientes y se calcularon los valores de recobro mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{Recobro} = \frac{(C_{\text{DETERMINADA}} - C_{\text{EN MUESTRA SIN FORTIFICAR}})}{C_{\text{FORTIFICADA}}} \times 100$$

Para todos los casos la concentración en la muestra sin fortificar resultó ser igual a cero debido a que no se detectó la presencia de ninguno de los tres analitos en las muestras originales. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 6.10.

**Tabla 6.10. Recobros obtenidos para 2-HA, DEA y ATZ en muestras de las Lagunas de Montebello (n=3).**

Muestra	Concentración fortificado (mg/L)	Analito					
		2-HA		DEA		ATZ	
		Concentración determinada (mg/L)	Recobro	Concentración determinada (mg/L)	Recobro	Concentración determinada (mg/L)	Recobro
Muestra 1	0,5	0,6	114.5	0,7	132.5	0,6	126,2
	5	5,0	99.4	4,2	83.5	5,3	105,1
Muestra 2	0,5	0,6	112.6	0,6	122.2	0,6	120,2
	5	4,9	97.3	4,0	80.5	5,1	101,8
Muestra 3	0,5	0,6	112.2	0,6	129.0	0,6	127,0
	5	5,0	99.8	4,1	82.3	5,2	104,2
Muestra 4	0,5	0,5	105.4	0,6	120.3	0,6	120,8
	5	4,9	98.4	4,1	81,8	5,1	102,1
Muestra 5	0,5	0,5	104.4	0,6	120,6	0,6	120,0
	5	4,9	97.6	4,1	81,6	5,1	102,9
Muestra 6	0,5	0,5	93.8	0,5	108,2	0,5	108,4
	5	4,9	97.2	4,1	81,9	5,2	103,3
Muestra 7	0,5	0,5	91.6	0,5	106,8	0,5	108,3
	5	4,9	97.3	4,1	81,4	5,1	102,1
Muestra 8	0,5	0,5	90.9	0,5	104,6	0,5	105,4
	5	4,8	96.3	4,1	81,3	5,1	101,8
Muestra 9	0,5	0,4	74.7	0,4	86,0	0,4	89,0
	5	5,0	99.4	4,1	82,8	5,2	103,7
Muestra 10	0,5	0,5	99.5	0,6	114,3	0,6	118,1
	5	4,9	98.8	4,1	82,8	5,2	104,8
Muestra 11	0,5	0,5	102.5	0,6	115,9	0,6	116,4
	5	4,9	98.5	4,1	82,8	5,2	104,3

Muestra	Concentración fortificado (mg/L)	Analito					
		2-HA		DEA		ATZ	
		Concentración determinada (mg/L)	Recobro	Concentración determinada (mg/L)	Recobro	Concentración determinada (mg/L)	Recobro
Muestra 12	0,5	0,5	91.3	0,5	96,5	0,5	103,6
	5	4,9	98.3	4,2	83,2	5,2	103,7
Muestra 13	0,5	0,4	89.5	0,5	103,6	0,6	113,5
	5	4,9	97.8	4,1	81,8	5,2	103,2

Para los tres analitos de estudio se observan mejores valores de recobro cuando la concentración de fortificación es de 5 mg/L, lo cual tiene sentido ya que al ser una concentración más alta es más fácil su determinación y preparación. De acuerdo con los resultados obtenidos, la metodología desarrollada presenta un buen desempeño para la determinación de 2-HA, DEA y ATZ en las muestras de agua de las Lagunas de Montebello, debido a que los valores de recobro en la mayoría de los casos, se encuentran entre un 80 y 120 %.

---

---

## 7. Conclusiones

**a)** El método analítico desarrollado para la cuantificación simultánea de 2-hidroxiatrazina, desetilatrazina y atrazina por medio de CLAR-UV-DAD cumplió con los parámetros de linealidad, precisión y exactitud, por lo que se considera un método de calidad para la cuantificación de estos analitos en los siguientes intervalos de trabajo.

- 2-hidroxiatrazina: 0.049-40 mg/L

- Desetilatrazina: 0.100-40 mg/L

- Atrazina: 0.050-40 mg/L

**b)** Las condiciones óptimas de trabajo para el método analítico desarrollado son:

- columna cromatográfica: Spherisorb ODS2 (fase reversa) de 250 mm de longitud por 4 mm de diámetro interno.

- fase móvil: AcCN-buffer de fosfatos 0.005 M pH 7.2 40-60 (v/v),

- longitud de onda: 220 nm,

- modo: isocrático y

-flujo: 1 mL min<sup>-1</sup>.

**c)** El método analítico desarrollado proporciona un tiempo de análisis relativamente corto y con buena resolución, siendo la atrazina el compuesto que cuenta con una mayor sensibilidad.

**d)** El método analítico desarrollado de acuerdo con los límites de cuantificación calculados permite medir concentraciones con exactitud a partir de 0.049, 0.100 y 0.050 mg/L para 2-hidroxiatrazina, desetilatrazina y atrazina respectivamente.

**e)** El análisis de las muestras de agua de las Lagunas de Montebello mediante el método analítico desarrollado no mostró señales de atrazina y sus metabolitos en los niveles de concentración que pudieron ser evaluados por el método.

---

---

f) El análisis de muestras fortificadas muestran valores de recobro dentro de especificación, demostrando que el método analítico desarrollado presenta un buen desempeño para la determinación de atrazina y sus metabolitos en las muestras de agua de las Lagunas de Montebello de trabajo.

---

---

## **8. Perspectivas**

El análisis de las muestras de agua obtenidas en las Lagunas de Montebello, Chiapas mediante la metodología desarrollada no mostró señales del herbicida atrazina y sus metabolitos. Lo anterior, no descarta la posibilidad de que en este cuerpo de agua existan zonas con presencia de estos compuestos, por lo que se recomienda ampliar el número de muestras de agua buscando cubrir una mayor zona de estudio para asegurarnos de que no hay presencia de atrazina y sus metabolitos en el agua.

Con la metodología desarrollada se cuenta con una herramienta muy útil, cuya confiabilidad se ha comprobado en el presente trabajo para la búsqueda de atrazina y sus metabolitos en cuerpos de agua siempre y cuando las concentraciones sean detectables por medio de la inyección directa. Sin embargo debido a las regulaciones existentes para cuerpos de agua potable en México el método establecido no es lo suficientemente sensible, por lo que en esos casos es necesario combinar la metodología de cuantificación propuesta con un método apropiado de preparación de las muestras con el cual se logre realizar la preconcentración cuantitativa de los analitos de interés. Por lo anterior, sería conveniente utilizar el método combinado (preconcentración-determinación) en otros tipos de cuerpos de agua, con la finalidad de estudiar la presencia de este herbicida y sus metabolitos, para que en el caso de encontrar resultados positivos se analice si pueden tener efectos negativos en la salud de las personas que pudieran consumir esta agua.

---

---

## 9. Bibliografía

1. Prado, G., Covarrubias, R., Introducción a la cromatografía de líquidos de alta resolución, Universidad Autónoma Metropolitana, México 1996, pp. 10-30.
2. Skoog, D., Holler, J., Nieman, T., Principios de Análisis Instrumental, McGRAW-HILL, España 2001, pp. 729-755, 785-800.
3. Harris, D., Análisis químico cuantitativo, Reverté, España 2007, pp. 607-631, 721-731.
4. Rojo, F., Cromatografía: documento de apoyo, UNAM, México 2005, pp. 1-7.
5. Miller, N., Miller, J., Estadística y quimiometría para química analítica, PEARSON EDUCACIÓN, Madrid 2002, pp. 3-7, 125-127.
6. Carabias, Gonzalo, y Herrero, Determination of herbicide and metabolites by solid-phase extraction and liquid chromatography: evaluation of pollution due to herbicides in surfaces and groundwaters, Journal of chromatography A, 950 (2002) 157-166.
7. LE BARON, McFarland, J., Burnside, O., The triazine herbicides: 50 years revolutionizing agricultura, Elsevier, Hungría 2008, Capítulo 1.
8. LE BARON, McFarland, J., Burnside, O., The triazine herbicides: 50 years revolutionizing agricultura, Elsevier, Hungría 2008, Capítulo 2.
9. Montaño., J.M., Elucidación de los mecanismos de movilidad y retención de atrazina e hidroxiatrazina en suelos por medio de CLAR-DAD, Tesis Que para obtener el título de Químico Farmacéutico Biólogo, UNAM, México 2013.
10. Environmental Protection Agency (EPA), Decisione documents for atrazine, EUA 2003.
11. Moorman, K., Jayachandran, y A. Reungsang, Adsorption and desorption of atrazine in soils and subsurface sediments, Soils science, 166 (2001), pp. 921-929.
12. Stamatiu. K., Tolerancia y biodegradación de plaguicidas con hongos filamentosos, Tesis que para obtener el grado en Doctora en Ciencias, CP, México, 2013.
13. RAYMUNDO, GAVRILOV, DUWING y PRADO, Transporte de atrazina en un andosol y en un vertisol de México, Interciencia 34 (2009), pp. 330-337.

- 
- 
14. Da Cunha, M. Bellinin, L. Pinelli, y F. S., Determinación de atrazina e intermediarios de biodegradación en un medio de cultivo líquido para el enriquecimiento de consorcios microbianos, 7mo congreso del medio ambiente, Argentina 2012, pp. 2-5
  15. Lerch, Thurman, y Blanchard, Hydroxyatrazine in soils and sediments, Environmental toxicology and chemistry, 18 (1999), pp. 2161-2168.
  16. Giddings. A. et. al. Atrazine in North American Surface Waters: A probabilistic Aquatic Ecological Risk Assessment, SETACPRESS, USA, 2005.
  17. Dabrowska D., Kot-Wasik A. y Namieśnik J. The importance of degradation in the fate of selected organic compounds in the environment. Part II. Photodegradation and biodegradation. Pol. J. Environ. Stud. 13 (2004), pp. 617-626.
  18. Larson R.A., y Berenbaum M.R. Environmental phototoxicity: solar ultraviolet radiation affects the toxicity of natural and man-made chemicals. Environ. Sci. Technol. 22 (1998), pp. 354-360.
  19. Burrows H.D., Canle L.M., Santaballa J.A. y Steeken S. Reaction pathways and mechanisms of photodegradation of pesticides. J. Photochem. Photobiol. B. 67 (2002), 71-108.
  20. Agencia para el registro de sustancias tóxicas y el registro de enfermedades (ATSDR), Boletín Atrazina, 2003.
  21. Organización Mundial de la Salud, Programa internacional de seguridad de las sustancias químicas, Atrazina (Química, Física y su manejo), México 2004.
  22. Hansen. A., Treviño L., Marques. H., Villada M., González. L., Guillen. R., Hernández. AR., Atrazina: un herbicida polémico, RICA, 29 (2013), pp. 65-84.
  23. ANEXO del DIARIO OFICIAL DE LA NACIÓN, Programa de Manejo del Parque Nacional de las Lagunas de Montebello, México 2009.
  24. Montgomery. D. y George. R., Probabilidad y estadística aplicadas a la ingeniería, 2ª. Edición, McGraw Hill, México, 2002.
  25. Castillo. B., Hernández. R., Protocolo de Validación de métodos analíticos para la cuantificación de fármacos, Revista Cubana de Farmacia, Vol. 30 No. 1 (1996).
- 
-

- 
- 
26. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, 11ava Edición, Vol. 1, México 2014.
  27. Farmacopea de los Estados Unidos de Norteamérica, 39a edición, USA 2015.
  28. Green, M. A practical guide to analytical method validation. *Analytical Chemistry*, ACS, 68 (9) (1996), 305a-309a
  29. Food and Drugs Administración, Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics Guidance for Industry, USA 2015.
  30. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Validation of analytical procededures: text and methodology Q2 R1. 1994. Recuperado de [http://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q2\\_R1/Step4/Q2\\_R1\\_\\_Guideline.pdf](http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1__Guideline.pdf)