



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UNA METODOLOGÍA
PARA LA PRECONCENTRACIÓN DE ATRAZINA EN
MUESTRAS ACUOSAS, MEDIANTE EXTRACCIÓN POR
SORCIÓN EN BARRA DE AGITACIÓN (SBSE)**

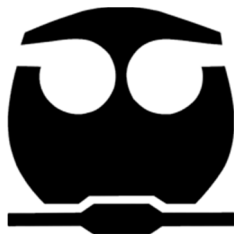
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO

P R E S E N T A

JOSÉ MAURICIO YÁÑEZ CAMPUZANO



CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX

2018



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 CIRO ELISEO MÁRQUEZ HERRERA
VOCAL: PROFESOR RICARDO FLORES HERNÁNDEZ
SECRETARIO: PROFESOR LUIS ANTONIO GARCÍA VILLANUEVA
1^{ER} SUPLENTE: PROFESORA SELENA GUTIÉRREZ FLORES
2^{DO} SUPLENTE: PROFESORA OLIVIA ZAMORA MARTÍNEZ

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO DE CROMATOGRFÍA, DEPARTAMENTO DE EDAFOLOGÍA, PRIMER PISO,
INSTITUTO DE GEOLOGÍA, LABORATORIO NACIONAL DE GEOQUÍMICA Y MINERALOGÍA &
FACULTAD DE INGENIERÍA, DEPARTAMENTO DE SANITARIA Y AMBIENTAL, DIVISIÓN DE
INGENIERÍAS CIVIL Y GEOMÁTICA, UNAM.

ASESOR DEL TEMA:

DR. LUIS ANTONIO GARCÍA VILLANUEVA

FIRMA

SUPERVISORA TÉCNICA:

DRA. OLIVIA ZAMORA MARTÍNEZ

FIRMA

SUSTENTANTE:

C. JOSÉ MAURICIO YÁÑEZ CAMPUZANO

FIRMA

AGRADECIMIENTOS

A mi *alma mater*, la **Universidad Nacional Autónoma de México** y mi querida **Facultad de Química**, por haberme formado no sólo de manera profesional, sino humanamente, de manera íntegra. Gracias por insertar en mí un profundo sentido de pertenencia y por enseñarme el preciado tesoro del conocimiento.

A la **Dirección General de Asuntos del Personal Académico** (DGAPA) a través del proyecto IA108117 del **Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica** (PAPIIT), titulado *Optimización del método “extracción por sorción con barras magnéticas (SBSE)” acoplado a cromatografía (HPLC) para la determinación de atrazina en agua, para su posterior análisis en muestras acuosas del Sistema Lagunar Montebello Chiapas, México.*

Al director de esta tesis, el **Dr. Luis Antonio García Villanueva**, por su apoyo y entusiasmo para la realización de este estudio. Asimismo, al **Departamento de Sanitaria y Ambiental** de la Facultad de Ingeniería, por los servicios otorgados.

Un agradecimiento muy especial para la **Dra. Olivia Zamora Martínez**, por brindarme su tiempo desinteresadamente, por guiarme y dirigirme, ya que sin ella no hubiese sido posible el desarrollo experimental; así como para mi compañera Romina Soto Pérez por su ayuda brindada en el trabajo de laboratorio.

Al **Laboratorio de Cromatografía**, del Departamento de Edafología del **Instituto de Geología** y al **Laboratorio Nacional de Geoquímica y Mineralogía-LANGEM** de la UNAM, por el uso de sus instalaciones, equipos y materiales para llevar a cabo el desarrollo de la parte experimental de la presente investigación.

A mis sinodales, el **Dr. Ciro Márquez Herrera** y el **Q. Ricardo Flores Hernández** por sus comentarios y recomendaciones para el perfeccionamiento de este trabajo.

A mis padres, a **todos mis profesores**, al **H. Jurado**; a todos mis amigos y compañeros. A todas las personas que de alguna manera contribuyeron a la realización de esta tesis.

A todos: ¡GRACIAS!

Los resultados de este proyecto fueron presentados bajo la modalidad de trabajo oral, con el título: *“Preconcentración de atrazina en muestras acuosas, mediante Extracción por Sorción en Barra de Agitación (SBSE)”*, en el **XXXI Congreso Nacional de Química Analítica y XXI Simposio Estudiantil-AMQA 2018**, llevado a cabo del 11 al 15 de junio de 2018, con sede en la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo (UAEH), Pachuca de Soto, Hidalgo, México.

ACRÓNIMOS & SIMBOLOGÍA

°C	grado(s) Celsius; unidad termométrica (históricamente conocido como centígrado)
&	signo alternativo gráfico de la conjunción copulativa latina <i>et</i> , de la que deriva la conjunción española «y», que es lo que significa
¹ H-NMR	espectroscopia de resonancia magnética nuclear (del inglés: <i>nuclear magnetic resonance</i>) de hidrógeno-1 (¹ H, también llamado <i>protio</i>)
2-HA	2-hidroxiatrazina
α	riesgo; probabilidad de que ocurra el error estadístico
Å	Ångström(s); unidad de longitud, equivalente a 10 ⁻¹⁰ metros
AcCN	acetonitrilo; compuesto químico con fórmula molecular: CH ₃ CN
ATZ	atrazina
[ATZ]	concentración de atrazina
<i>b</i>	ordenada al origen de la ecuación de la recta
CL	límites críticos (del inglés: <i>critical limits</i>)
cm	centímetro(s); unidad de longitud, equivalente a 10 ⁻² metros
cm ²	centímetro(s) cuadrado(s); unidad de superficie, equivalente a 10 ⁻² metros cuadrados
CV	coeficiente de variabilidad
DAD	detector de arreglo de diodos (del inglés: <i>diode array detector</i>)
DEA	desetilatrazina
d.i.	diámetro interno
EG	etilenglicol
<i>e.g.</i>	<i>exempli gratia</i> ; locución latina que significa literalmente «dado como ejemplo»
<i>et al.</i>	<i>et alli</i> ; locución latina que significa literalmente «y otros»
FAO	siglas en inglés para <i>Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (Food and Agriculture Organization)</i>
g	gramo(s); unidad de masa, equivalente a 10 ⁻³ kilogramos
g/mol	gramo(s) por mol; unidad de medida para la masa molar

GC	cromatografía de gases (del inglés: <i>gas chromatography</i>)
H₀	hipótesis nula
H₁	hipótesis alterna o alternativa
ha	hectárea; unidad de superficie, equivalente a 10 ⁴ metros cuadrados
HPLC	cromatografía líquida de alta eficacia (del inglés: <i>high performance liquid chromatography</i>)
IR	infrarrojo o radiación infrarroja; región del espectro electromagnético comprendido entre 800 × 10 ⁻⁹ metros y 10 ⁻⁶ metros; también puede referirse a la espectrofotometría infrarroja
ISO	siglas en inglés para <i>Organización Internacional de Normalización (International Organization for Standardization)</i>
IUPAC	siglas en inglés para <i>Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (International Union of Pure and Applied Chemistry)</i>
kg	kilogramo(s); unidad de masa del Sistema Internacional de Unidades
k_H	constante de Henry
km	kilómetro(s); unidad de longitud, equivalente a 10 ³ metros
km²	kilómetro(s) cuadrado(s); unidad de superficie, equivalente a 10 ³ metros cuadrados
K_{ow}	coeficiente de reparto/partición <i>n</i> -octanol-agua; también simbolizado: <i>K_{OW}</i> , o bien, <i>P_{ow}</i>
L	litro; unidad de volumen
LC	cromatografía de líquidos (del inglés: <i>liquid chromatography</i>)
LLE	extracción líquido-líquido (del inglés: <i>liquid-liquid extraction</i>)
Log K_{ow}	logaritmo del coeficiente de partición <i>n</i> -octanol-agua
LOD	límite de detección (del inglés: <i>limit of detection</i>)
LOQ	límite de cuantificación (del inglés: <i>limit of quantification</i>)
µg	microgramo(s); unidad de masa, equivalente a 10 ⁻⁶ gramos o a 10 ⁻⁹ kilogramos
µL	microlitro(s); unidad de volumen, equivalente a 10 ⁻⁶ litros
µm	micrómetros(s); unidad de longitud, equivalente a 10 ⁻⁶ metros
M	unidad de concentración molar (pronunciada <i>molar</i>), equivalente a 1 mol por cada litro (mol/L)
m	metro; unidad de longitud del Sistema Internacional de Unidades

m s.n.m.	metros sobre el nivel del mar; unidad de referencia de altitud geográfica
m	pendiente de la ecuación de la recta, también llamado <i>coeficiente angular</i>
MΩ	megaohm(s); unidad de resistencia eléctrica, equivalente a 10^6 ohms
MeOH	metanol; compuesto químico con fórmula molecular: CH ₃ OH
mg	miligramo(s); unidad de masa, equivalente a 10^{-3} gramos
mg/L	miligramo(s) por cada litro; unidad de concentración
min	minuto; unidad de tiempo, equivalente a 60 segundos
mL	mililitro(s); unidad de volumen, equivalente a 10^{-3} litros
mm	milímetro(s); unidad de longitud, equivalente a 10^{-3} metros
mmHg	milímetro(s) de mercurio (Hg); unidad de presión manométrica
mol	unidad de cantidad de sustancia, equivalente a 6.022×10^{23} unidades o partículas elementales
mPa	milipascal(es); unidad de presión, equivalente a 10^{-3} pascales
MS	espectrometría de masas (del inglés: <i>mass spectrometry</i>); también puede referirse al espectrómetro de masas
mV	milivolt(s); unidad de potencial eléctrico, equivalente a 10^{-3} volts
n	número de datos, repeticiones o determinaciones
NP	fase normal (del inglés: <i>normal-phase</i>)
PDMS	polidimetilsiloxano, también llamado <i>dimeticona</i>
pH	coeficiente que indica el grado de acidez o basicidad de una disolución
pK_a	coeficiente igual al logaritmo negativo de la constante de disociación de un ácido débil ($pK_a = -\log K_a$)
ppb	parte(s) por billón; unidad de concentración, es igual a la cantidad de unidades de una sustancia que hay por cada billón del conjunto (referida al <i>billion</i> anglosajón, equivalente a mil millones)
ppm	parte(s) por millón; unidad de concentración, es igual a la cantidad de unidades de una sustancia que hay por cada millón del conjunto
ppt	parte(s) por trillón; unidad de concentración, es igual a la cantidad de unidades de una sustancia que hay por cada trillón del conjunto (referida al <i>trillion</i> anglosajón, equivalente a un millón de millones)
r	coeficiente de correlación

R²	coeficiente de determinación
R.A.	reactivo grado analítico
RMe₂SiCl	<i>clorodimetilsilil</i> ; grupo funcional con fórmula: $-\text{[(CH}_3\text{)}_2\text{-Si-Cl]}$
RP	fase reversa o inversa (del inglés: <i>reversed-phase</i>)
rpm	revoluciones por cada minuto
s	segundo; unidad de tiempo del Sistema Internacional de Unidades
S_B	desviación estándar
SBSE	extracción por sorción en barra de agitación (del inglés: <i>stir bar sorptive extraction</i>)
SFC	cromatografía de fluidos supercríticos (del inglés: <i>supercritical fluid chromatography</i>)
SI	Sistema Internacional de Unidades
SiO₂	óxido de silicio (IV), comúnmente llamado <i>sílice</i>
SPE	extracción en fase sólida (del inglés: <i>solid-phase extraction</i>)
SPME	microextracción en fase sólida (del inglés: <i>solid-phase microextraction</i>)
t_{1/2}	tiempo de vida media
t_RATZ	tiempo de retención de atrazina
UV	ultravioleta; región del espectro electromagnético comprendido entre 400×10^{-9} metros y 15×10^{-9} metros
UV-Vis	región del espectro electromagnético denominado <i>ultravioleta-visible</i> ; también puede referirse a la espectrofotometría ultravioleta-visible
v/v	concentración volumen/volumen

CONTENIDO

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
JUSTIFICACIÓN	5
OBJETIVOS	8
ALCANCES & LIMITACIONES	8
HIPÓTESIS	9
1. MARCO TEÓRICO	10
1.1 CONTAMINACIÓN AMBIENTAL.....	10
1.1.1 Contaminantes emergentes.....	11
1.2 EL AGUA.....	12
1.2.1 Contaminación del agua.....	12
1.3 PLAGUICIDAS.....	13
1.3.1 Plaguicidas organoclorados.....	16
1.4 HERBICIDAS.....	17
1.5 TRIAZINAS.....	18
1.6 ATRAZINA.....	19
1.6.1 Propiedades generales de la atrazina	19
1.6.2 Contaminación por atrazina	20
1.6.3 Procesos de degradación de la atrazina.....	21
1.6.4 Metabolitos de la atrazina.....	23
1.6.5 Estudios toxicológicos	25
1.6.6 Marco legal de la atrazina.....	26
1.6.7 Métodos de determinación de atrazina.....	28
1.7 MÉTODOS INSTRUMENTALES DE ANÁLISIS	30
1.7.1 Métodos electroquímicos.....	31
1.7.2 Métodos espectrométricos.....	32
1.7.3 Métodos cromatográficos	33
1.8 CROMATOGRAFÍA.....	34

1.8.1	Origen y definición de cromatografía	34
1.8.2	Fundamento de la cromatografía.....	34
1.8.3	Clasificaciones de la cromatografía	35
1.9	GENERALIDADES DE LA CROMATOGRAFÍA.....	38
1.9.1	Definiciones	38
1.9.2	Aspectos teóricos	42
1.9.3	Parámetros y calidad cromatográfica	45
1.9.4	Análisis cuantitativo en cromatografía	58
1.10	CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICACIA.....	63
1.10.1	Instrumentación general	64
1.10.2	Partes fundamentales de un equipo de HPLC.....	65
1.10.3	Tipos de elución.....	69
1.10.4	Fases móviles.....	69
1.10.5	Características de la fase estacionaria	70
1.10.6	Cromatografía de reparto	72
1.10.7	Detectores usados en HPLC	72
1.11	MÉTODOS DE PREPARACIÓN DE MUESTRA.....	77
1.11.1	Extracción Líquido-Líquido (LLE).....	77
1.11.2	Extracción en Fase Sólida (SPE).....	78
1.11.3	Técnicas de Microextracción	80
1.11.4	Microextracción en Fase Sólida (SPME)	81
1.12	STIR BAR SORPTIVE EXTRACTION (SBSE).....	82
1.12.1	Tipos de fases poliméricas	84
1.12.2	Fundamentos y aspectos teóricos	85
1.12.3	Factores que afectan a la extracción	88
1.12.4	Factores que afectan a la desorción.....	89
1.12.5	Ventajas y limitaciones	90
1.12.6	Parámetros de la SBSE	90
1.13	VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS.....	93
1.13.1	Definición de Validación	93
1.13.2	Métodos normalizados y No normalizados	94

1.13.3	Cuándo validar un método.....	95
1.13.4	Parámetros de desempeño y definiciones.....	95
1.13.5	Criterios de aceptación.....	101
1.13.6	Calibración.....	103
1.13.7	Muestreo.....	104
1.14	PROBLEMAS EN EL ANÁLISIS CUANTITATIVO.....	105
1.14.1	Efecto matriz.....	105
1.15	DESCRIPCIÓN DE LA ZONA DE ESTUDIO.....	106
2.	DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	108
2.1	INSTRUMENTACIÓN.....	108
2.2	REACTIVOS & DISOLVENTES.....	109
2.3	PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES.....	109
2.4	ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO.....	110
2.5	PARÁMETROS DE OPTIMIZACIÓN DE LA SBSE.....	110
2.6	VALIDACIÓN DE LA METODOLOGÍA.....	112
3.	RESULTADOS & DISCUSIÓN.....	114
3.1	Optimización de las etapas de la SBSE.....	114
3.1.1	Evaluación de la sorción de atrazina.....	115
3.2	Efecto del tiempo de contacto para la desorción cuantitativa de analito.....	118
3.3	Influencia de la cantidad del disolvente de extracción.....	119
3.4	Efecto de la concentración presente de analito sobre su retención.....	120
3.5	Selección del intervalo lineal.....	121
3.6	Límites de detección y cuantificación.....	123
3.7	Evaluación del efecto de la matriz de estudio.....	123
3.8	Reproducibilidad.....	127
3.9	Recobros.....	128
4.	CONCLUSIONES.....	130
5.	PERSPECTIVAS.....	132
	ANEXOS.....	133
	REFERENCIAS.....	138

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1.1. Estructura química de los tres isómeros de la triazina.....	18
Fig. 1.2. Estructura química de la atrazina.....	19
Fig. 1.3. Estructuras químicas de la 2-hidroxiatrazina y la desetilatrazina.....	23
Fig. 1.4. Ruta degradativa de la atrazina y su mineralización.....	24
Fig. 1.5. El espectro electromagnético.....	33
Fig. 1.6. Ejemplo de un cromatograma de una mezcla de multicomponentes.....	38
Fig. 1.7. Ejemplo de un pico cromatográfico debido a una sola sustancia y un par de picos cromatográficos sin resolver.....	39
Fig. 1.8. Equilibrio de reparto del analito entre las fases estacionaria y móvil.....	42
Fig. 1.9. Separación de una mezcla de dos componentes A y B.....	43
Fig. 1.10. Migración de analitos a través de la columna.....	44
Fig. 1.11. Parámetros cromatográficos.....	46
Fig. 1.12. Determinación del factor de asimetría.....	48
Fig. 1.13. Dos picos cromatográficos que presentan cierto traslape.....	53
Fig. 1.14. Diferentes valores de resolución y su efecto en la separación de dos picos cromatográficos adyacentes.....	54
Fig. 1.15. Curvas de van Deemter.....	57
Fig. 1.16. Diagrama esquemático de un cromatógrafo de líquidos.....	64
Fig. 1.17. Equipo de HPLC.....	64
Fig. 1.18. Esquema de un detector de arreglo de diodos.....	76
Fig. 1.19. Esquema general de la extracción en fase sólida.....	79
Fig. 1.20. Clasificación de las técnicas de microextracción.....	80
Fig. 1.21. Diagrama de un análisis por SPME.....	81
Fig. 1.22. Descripción gráfica de una barra SBSE.....	82
Fig. 1.23. Modos de extracción en SBSE.....	82

Fig. 1.24. Tipos de fases adsorbentes disponibles comercialmente.....	84
Fig. 1.25. Recobro teórico porcentual vs. $\log K_{PDMS,W}$	87
Fig. 1.26. Gráfico que se realiza para determinar el volumen de fuga.....	91
Fig. 1.27. Localización de los Lagos de Montebello, Chiapas.....	107
Fig. 3.1. Cantidad de ATZ adsorbida vs. concentración inicial de estándar presente en disolución.....	121
Fig. 3.2. Cantidad de ATZ adsorbida vs. concentración inicial presente en disolución de las muestras a. Balamtetic y b. Bosque Azul.....	124
Fig. 3.3. Cantidad de ATZ adsorbida vs. concentración inicial presente en disolución de las muestras c. San Lorenzo y d. Vuelta el Agua.....	125
Fig. 3.4. Cantidad de ATZ adsorbida vs. concentración inicial presente en disolución de la muestra e. Yalmus.....	126
Fig. A1. Cromatograma obtenido, en las condiciones óptimas de trabajo encontradas, para estándares de 10 ppm de 2-HA, ATZ y DEA.....	135
Fig. A2. Cromatograma obtenido, para el desarrollo de la metodología de preconcentración y en las condiciones óptimas de trabajo, para un estándar de ATZ de 10 ppm.....	135
Fig. A3. Cromatograma obtenido, para el desarrollo de la metodología de preconcentración y en las condiciones óptimas de trabajo, para un estándar de ATZ de 0.05 ppm.....	136
Fig. A4. Cromatograma obtenido al analizar una muestra de agua, sin adiciones de ATZ, de los Lagos de Montebello para evaluar el efecto matriz.....	136
Fig. A5. Evaluación del efecto matriz mediante la graficación de la cantidad de analito adsorbido para una muestra de lago vs. la cantidad adsorbida en agua desionizada.....	137
Fig. A6. Software <i>Empower 2 Build 2154</i>	137

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.1. Clasificación de plaguicidas.....	15
Tabla 1.2. Clasificación de herbicidas.....	17
Tabla 1.3. Propiedades fisicoquímicas de la atrazina.....	20
Tabla 1.4. Propiedades fisicoquímicas de 2-HA y DEA.....	23
Tabla 1.5. Clasificación de los métodos cromatográficos en columna.....	36
Tabla 1.6. Criterios de aceptación para diversos parámetros.....	102
Tabla 1.7. Criterio de aceptación del parámetro de recuperación para residuos y contaminantes en alimentos y agua.....	103
Tabla 1.8. Criterios de aceptación de repetibilidad y reproducibilidad para residuos y contaminantes en alimentos y agua.....	103
Tabla 2.1. Selección del volumen, concentración y tiempo de contacto de la disolución acuosa de atrazina en la etapa de carga.....	111
Tabla 2.2. Selección del tiempo de contacto, tipo y volumen del disolvente empleado para la extracción cuantitativa de atrazina adsorbida.....	111
Tabla 3.1. Valores de concentración de atrazina determinados, antes y después de la sorción para un tiempo de contacto de 60 min.....	115
Tabla 3.2. Evaluación de la sorción de la atrazina en presencia de sus dos principales metabolitos.....	116
Tabla 3.3. Efecto del tiempo de contacto sobre la sorción de atrazina.....	117
Tabla 3.4. Efecto del tiempo de contacto del disolvente extractante sobre la desorción de ATZ.....	118
Tabla 3.5. Efecto del volumen de MeOH sobre la desorción de ATZ.....	119
Tabla 3.6. Efecto de la concentración de analito sobre su retención en la barra de sorción.....	120
Tabla 3.7. Parámetros estadísticos típicos de regresión para la curva de calibración (nivel de confianza al 95 %).....	122
Tabla 3.8. Límites de detección y de cuantificación de la metodología.....	123

Tabla 3.9. Parámetros de regresión lineal para cada una de las muestras de las Lagunas de Montebello.....	127
Tabla 3.10. Porcentajes de recobro en función de la concentración de analito para la matriz de agua desionizada.....	128
Tabla 3.11. Porcentajes de recobro en función de la concentración de analito para para cada muestra de los Lagos de Montebello.....	128
Tabla 3.12. Recobros evaluados por comparación de las pendientes de cada muestra fortificada con la de agua desionizada.....	129
Tabla A1. Resultados de la prueba no paramétrica de rachas.....	133
Tabla A2. Prueba de hipótesis sobre la pendiente de la curva de calibración de agua desionizada evaluar el efecto matriz (al 95 % de confianza)....	133
Tabla A3. Prueba de hipótesis sobre la pendiente de la curva de calibración de Balamtetic para evaluar el efecto matriz (al 95 % de confianza).....	133
Tabla A4. Prueba de hipótesis sobre la pendiente de la curva de calibración de Bosque Azul para evaluar el efecto matriz (al 95 % de confianza)..	134
Tabla A5. Prueba de hipótesis sobre la pendiente de la curva de calibración de San Lorenzo evaluar el efecto matriz (al 95 % de confianza).....	134
Tabla A6. Prueba de hipótesis sobre la pendiente de la curva de calibración de Vuelta el Agua evaluar el efecto matriz (al 95 % de confianza).....	134
Tabla A7. Prueba de hipótesis sobre la pendiente de la curva de calibración de Yalmus evaluar el efecto matriz (al 95 % de confianza).....	134

RESUMEN

La finalidad de este trabajo fue el abordar un problema de carácter ambiental en México, el cual es un país agrícola, donde la atrazina es frecuentemente utilizada como plaguicida para el control de malezas y actualmente no existe una ley que prohíba su uso, a pesar de ser considerado como alterador endocrino en algunos mamíferos y dañino para el consumo humano.

Dado que muy a menudo es difícil lograr de manera directa, la adecuada cuantificación de diversos compuestos incluidos los herbicidas, debido a que presentan una baja concentración en matrices ambientales complejas, en el presente trabajo se llevó a cabo el desarrollo, la optimización y la validación de un procedimiento de preconcentración de muestra que permite la cuantificación de atrazina en cuerpos de agua, el cual, combinado con un método de análisis anteriormente optimizado y validado para la cuantificación simultánea de atrazina y dos de sus principales metabolitos mediante Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC-UV-DAD), permite determinar concentraciones del orden de las partes por billón de atrazina, sin la presencia de interferencias en muestras de agua provenientes de las Lagunas de Montebello.

La metodología de preconcentración utilizada fue la de “Extracción por Sorción en Barra de Agitación” (SBSE), la cual será utilizada posteriormente en muestras reales del Sistema Lagunar Montebello, Chiapas, México, donde se tiene el conocimiento de la aplicación de dicho herbicida.

La optimización de la técnica de preconcentración se llevó a cabo considerando diversos factores que involucran la naturaleza y la cantidad de los disolventes que se utilizan en cada una de las etapas que la conforman, el tiempo de contacto necesario para la retención y la extracción cuantitativa del analito, así como el efecto de la concentración del analito sobre su retención en la barra. Se determinó que la presencia de los metabolitos 2-HA y DEA no afecta a la sorción de atrazina sobre la barra de sorción empleada.

Se observó un evidente comportamiento lineal al efectuar el análisis estadístico de los datos, obteniéndose valores aceptables de los coeficientes de determinación y correlación; además de evaluarse los diversos parámetros de desempeño, tales como precisión, exactitud y robustez, así como los límites de cuantificación y de detección, de manera satisfactoria.

La metodología analítica desarrollada en el presente trabajo puede ser considerada como un método eficaz de preconcentración de atrazina para su posterior cuantificación vía HPLC-UV-DAD en el intervalo de 0.03 a 0.25 mg/L y en ausencia de interferencias de matriz; sus límites de detección y cuantificación son respectivamente 0.0014 mg/L y 0.0016 mg/L.

Dado que se observó la nula retención de los principales metabolitos de la descomposición de la atrazina, la 2-hidroxiatrazina (2-HA) y la desetilatrazina (DEA), en la barra de sorción, se propone también, el desarrollo de una metodología análoga, empleando otro agente adsorbente en el cual sí se observe dicha retención, para así poder preconcentrar cuantitativamente estos metabolitos.

INTRODUCCIÓN

La agricultura es la ciencia que se ocupa de cultivar la tierra para la obtención de materias primas y además, incluye el financiamiento, producción, venta y distribución de productos agrícolas. Los avances existentes en la agricultura han tenido una evolución muy importante. Las principales razones que han llevado a la producción extensiva agrícola ha sido la intención de querer solucionar el problema de hambre mundial mediante el uso extensivo de prácticas agrícolas [Carmona, 2004].

México se ha caracterizado por ser un país agrícola y entre sus principales productos se encuentran la de caña de azúcar, el maíz y el sorgo. Durante su cultivo se ha encontrado que la atrazina ha sido utilizada como plaguicida para el control de las malezas. Estudios a nivel mundial consideran a la atrazina como un alterador endocrino, causante de desequilibrio hormonal y es catalogada como una sustancia carcinógena, también representa diversos riesgos para el medio acuático y su propagación en él, por lo que ha sido prohibida en algunos países [IARC, 2014; CICOPLAFEST, 2005].

Existen estudios donde se detectan plaguicidas residuales en muestras de suelo, agua, alimentos, fluidos biológicos y tejidos. En alimentos se han encontrado diferentes plaguicidas en granos de cereales, nopal, camarón, aceites vegetales, tomate, uva, entre otros [Aldana *et al.* y Alsayeda *et al.*, 2008; Ahmed *et al.*, 2009]. Es de aquí que nace el interés por estudiar la persistencia de los plaguicidas en el ambiente.

La atrazina es uno de los plaguicidas más ampliamente usados en el mundo y México es el segundo país donde se emplea en mayor cantidad, donde, actualmente no existe ley que prohíba o regule su uso, aunque en algunas normas mexicanas se proporcionan límites máximos permisibles de manera preventiva, principalmente las referidas a agua potable, descargas de agua residual y alimentos [González-Márquez & Hansen, 2009; FAO, 2016].

Chiapas es uno de los principales productores de maíz en México, y el segundo en el uso de atrazina para su cultivo. Un caso en específico donde se aplica el herbicida y existe la escasez de información de su uso, estabilidad y degradación, es el Parque Lagunar de Montebello, en donde se reporta una gran actividad agrícola cercana a una serie de lagunas que conforman dicho sistema, como son Balamtetic, Bosque Azul, San Lorenzo, Vuelta el Agua y Yalmus, principalmente [Olea, 2015; Bello, 2016].

La NMX-AA-071-1981 describe el método para la determinación de compuestos organoclorados en agua, sin embargo, la técnica de preconcentración que se emplea es la extracción líquido-líquido, la cual requiere del uso de un gran volumen de disolventes, generándose, por consiguiente, grandes volúmenes de residuos peligrosos que deben ser tratados adecuadamente, ya que representan un riesgo potencial de contaminación ambiental. Debido a ello, resulta necesario contar con una metodología alterna que minimice estos inconvenientes y permita lograr la adecuada preparación de muestra para cuantificar atrazina en cuerpos de agua de manera suficientemente sensible.

JUSTIFICACIÓN

En México la superficie agrícola varía entre 20 y 25 millones de hectáreas [CONAGUA, 2016], donde el uso de plaguicidas constituidos por sustancias o mezclas de sustancias se destinan a controlar plagas, incluidos los vectores de enfermedades humanas y de animales, así como las especies no deseadas que causan perjuicio o que interfieren con la producción agropecuaria y forestal [USEPA, 2010].

De acuerdo con la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, por sus siglas en inglés), tan sólo en México se usaron en promedio 4.55 toneladas de plaguicidas (fungicidas, herbicidas e insecticidas) por cada 1,000 hectáreas entre el año 2009 y 2010, y solo en 2013 se emplearon 37,455 toneladas de insecticidas, 31,195 toneladas de herbicidas y 42,223 toneladas de fungicidas [FAO, 2016].

Sin embargo, debido a la falta de regulación y monitoreo en el país, no se tiene información detallada sobre el uso de estas sustancias y de cuáles se tratan. De hecho, únicamente se cuenta con el catálogo oficial de plaguicidas [CICOPLAFEST, 2005] que no ha sido actualizado en más de una década, y excluye información sobre las últimas investigaciones realizadas sobre los efectos en el riesgo a la salud y al ambiente de estos materiales tóxicos.

La atrazina es un herbicida selectivo que se aplica al suelo, que se absorbe por las raíces o las hojas de las hierbas y que se aplica antes o después de que germine la maleza. Este herbicida controla la aparición de malezas en cultivos, principalmente de maíz, sorgo, caña de azúcar, trigo y varios tipos de pastos y pertenece al grupo de los herbicidas triazínicos organoclorados [Hansen *et al.*, 2013].

La atrazina ha sido prohibida en varios países de Europa, tales como Alemania, Austria, Croacia, Dinamarca, España, Finlandia, Francia, Grecia, Italia, Países Bajos, Portugal, Reino Unido, Rumania y Suecia [OJEU, 2004]. Esto debido a que

se considera como un alterador endocrino, el cual causa un desequilibrio hormonal y está clasificada como cancerígeno por la Convención para la Protección del Medio Ambiente Marino del Atlántico del Noreste (OSPAR) en la categoría 3 [IARC, 2014]. Además, de acuerdo con la Directiva Marco del Agua, la atrazina es una de las sustancias prioritarias de vigilancia por los riesgos que representa para el medio acuático y su propagación en él [CICOPLAFEST, 2005].

En México, la atrazina aún no ha sido incluida en las guías ambientales y de salud, por lo tanto, no se incluye en los programas de monitoreo de agua ni en los métodos analíticos rutinarios, por lo que se desconoce el destino ambiental de este herbicida [González-Márquez & Hansen, 2009].

La Norma Mexicana NMX-AA-71-1981, *Análisis de agua.- Determinación de plaguicidas organoclorados. - método de cromatografía de gases*, describe el método para la determinación de plaguicidas organoclorados por cromatografía de gases en aguas naturales y residuales, el cual consiste en la extracción de los plaguicidas presentes en el agua por precipitación con disolventes orgánicos, y su posterior separación y purificación por cromatografía en columna, para finalmente efectuar su cualificación y cuantificación vía cromatografía de gases, empleando un detector de captura de electrones [DOF, 1992].

Sin embargo, este método implica el uso de un gran número de estándares de plaguicidas con pureza comprendida entre 98 y 100 %, así como de disolventes de grado cromatográfico, donde la preparación de la muestra representa un riesgo a la salud, requiriendo el uso de equipo especial, ya que, al contacto con la piel, ingestión o inhalación de éstos, puede causar trastornos graves e inclusive la muerte. Además de que implica la generación de grandes volúmenes de residuos peligrosos [DOF, 1992].

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 generarían, además de estudios de toxicología para determinar la concentración a la que es dañina para el ser humano y las especies con las que estén 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 por ejemplo la cromatografía de líquidos, la cual es una técnica confiable para determinar elementos traza en una muestra ambiental. Desafortunadamente debido a la elevada toxicidad de varios compuestos, la cantidad máxima permitida de éstos en matrices ambientales es muy baja y a menudo es muy difícil lograr de manera directa su adecuada cuantificación. Para ello es necesario combinar su determinación con un método de preparación que disminuya e incluso elimine las interferencias de la matriz que contiene al analito de estudio y su preconcentración que permita disminuir sus límites de detección y, de ser posible, la reducción del volumen de disolventes usados. Ambas etapas, la preparación de la muestra y la determinación del analito de estudio deben de ser optimizadas y validadas para garantizar su eficacia [Stöppler, 1997].

Actualmente en el grupo de trabajo se cuenta con un método optimizado y validado para la cuantificación simultánea de atrazina y dos de sus principales metabolitos, 2-hidroxiatrazina y desetilatrazina, mediante HPLC-UV-DAD, con el cual es posible determinar concentraciones del orden de las ppm de los tres compuestos, sin la presencia de interferencias en muestras de agua provenientes de las Lagunas de Montebello [Cortés, 2016]. Por lo que para poder potencializar dicho método de cuantificación se decidió combinar al mismo con una técnica de preconcentración conocida como “Extracción por Sorción en Barra de Agitación (SBSE)” para la cual se han reportado resultados eficientes al trabajar con compuestos químicos similares [Huertas *et al.*, 2007; León *et al.*, 2003; Neng *et al.*, 2011; Portugal *et al.*, 2010 y Qin *et al.*, 2008].

Se pretende, además, que la metodología empleada sea precisa, exacta y sensible para la extracción del analito y que proporcione resultados confiables para la posterior toma de decisiones destinadas a poblaciones que se encuentran en un potencial riesgo.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Desarrollar una metodología para la preconcentración de la atrazina presente en matrices acuosas ambientales mediante la técnica de *extracción por sorción en barra de agitación* (SBSE) y llevar a cabo la subsecuente optimización y validación.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Encontrar las condiciones óptimas de trabajo para el método de preconcentración de la atrazina, que involucran parámetros de tiempo de contacto, naturaleza y cantidad de disolvente, para cada una de las etapas que conforman al protocolo de SBSE, así como los alcances y limitaciones de dicho procedimiento por medio de pruebas de ‘ensayo y error’.

- Determinar las figuras típicas de la validación de un método no normalizado como son: exactitud, precisión, límites de detección y de cuantificación, intervalo de trabajo y recobros, de acuerdo con el manual de la Secretaría de Salud.

- Evaluar los resultados obtenidos para cada parámetro de validación, considerando si cumplen con los criterios de aceptabilidad establecidos en el manual de la Secretaría de Salud (presentes en el apartado 5.13.5 de este documento) para que el método sea aceptado.

ALCANCES & LIMITACIONES

La presente investigación y su experimentación, así como los resultados obtenidos, se limitan al trabajo de muestras sintéticas de estándares de atrazina y la posterior evaluación del procedimiento en muestras reales provenientes del sistema Lagunar Montebello, Chiapas.

HIPÓTESIS

Al determinarse la validación del método de extracción por sorción en barra de agitación (SBSE), como pretratamiento de muestras de agua con atrazina presente, se obtendrán límites críticos (CL), límites de detección (LOD) y límites de cuantificación (LOQ) que permitirán ampliar los niveles de detección de atrazina en cuerpos de agua.

Se podrán conocer las concentraciones que permitan comparar con los límites máximos permisibles internacionales si el posterior análisis de atrazina, con la técnica propuesta, resulta positivo.

Si el método de preconcentración propuesto amplía los niveles de detección para la determinación de atrazina en cuerpos de agua, entonces el método podrá ser utilizado como una alternativa para la detección no sólo de atrazina sino de cualquier otro herbicida organoclorado afín al adsorbente de la barra de trabajo, lo que permitirá que se proponga una regulación en México.

Por medio del uso de las barras de sorción SBSE (Twister®), será posible efectuar la preconcentración de atrazina presente en matrices acuosas y su consiguiente desorción líquida para la cuantificación vía HPLC-UV-DAD.

Al aplicar la técnica de preparación de muestra *stir bar sorptive extraction* (SBSE), se incrementará la sensibilidad en la cuantificación de atrazina en comparación con el método de inyección directa.

1. MARCO TEÓRICO

1.1 CONTAMINACIÓN AMBIENTAL

La contaminación es uno de los problemas ambientales más importantes que afectan al mundo. Surge cuando se produce un desequilibrio como resultado de la adición de cualquier sustancia al medio ambiente, en cantidad tal que sobrepasa los niveles aceptables en la naturaleza causando efectos adversos en los seres vivos. La contaminación puede generarse a partir de ciertas manifestaciones de la naturaleza (fuentes naturales) o bien, debido a los diferentes procesos productivos del hombre (fuentes antropogénicas) que conforman las actividades de la vida diaria. Más de mil productos químicos son introducidos anualmente en los sistemas hídricos, entre los que se encuentran los plaguicidas, detergentes, metales pesados, residuos farmacéuticos, polímeros y muchos más. La contaminación es uno de los principales problemas que enfrentan los acuíferos en México [Jiménez, 2005].

“La contaminación es una actividad del hombre por medio de la adición al agua, aire o suelo, de algún tipo de materia o energía, que directa o indirectamente, tiene un efecto perjudicial sobre organismos o estructuras vivas que se desean preservar; o bien, que reduce la calidad del agua, aire y suelo para un uso posterior” [Rusell, 1974].

Debido a la creciente toma de conciencia ambiental por parte de la comunidad científica y en general de la sociedad, desde hace más de treinta años, las Naciones Unidas han abordado diferentes temáticas ambientales, como el calentamiento global, el acceso al agua, la protección de los océanos, etc. Asimismo, numerosos organismos internacionales se han interesado en la supervisión y la regulación, a nivel global, de un número relativamente pequeño de compuestos químicos llamados contaminantes prioritarios. Estos contaminantes son compuestos persistentes, tóxicos, carcinógenos, teratógenos o mutagénicos [Jiménez, 2005]; ejemplos de ellos son los plaguicidas.

En los últimos años, el desarrollo de nuevos y más sensibles métodos de análisis ha permitido alertar sobre la presencia de otros contaminantes, potencialmente peligrosos, denominados globalmente como emergentes [Jiménez, 2005].

Los contaminantes emergentes son compuestos de los que se sabe relativamente poco o nada acerca de su presencia e impacto en los distintos compartimentos ambientales. Es quizá por esta razón que no han sido regulados, lo que a su vez trae como consecuencia el poco interés y escaso conocimiento que se tiene de ellos, además de la nula o limitada disponibilidad de métodos para su análisis en matrices ambientales. Otra particularidad de estos compuestos es que, debido a su elevada producción y consumo, y por ende su continua introducción en el medio ambiente, no necesitan ser persistentes para ocasionar efectos negativos [Jiménez, 2005; Salazar, 2008].

1.1.1 CONTAMINANTES EMERGENTES

Los contaminantes emergentes son compuestos que no están cubiertos por reglamentos de calidad, ya que no se han estudiado antes o bien, no se han podido determinar debido a las bajas concentraciones que exhiben en el medio ambiente; aunado a esto se consideran como amenazantes para los ecosistemas y para el ser humano [La Farré *et al.*, 2008; Kostopoulou & Nicolaou, 2008].

La principal fuente de entrada de estos compuestos en el medio acuático son las aguas residuales, aunque también cabe destacar el papel de la agricultura y ganadería como fuentes de contaminación difusa de plaguicidas y antibióticos, respectivamente. En la mayoría de los casos su eliminación en las estaciones depuradoras de agua residual convencionales no es completa [Barceló & Postigo, 2014].

El grupo de los contaminantes emergentes comprenden un gran número de compuestos como son: fármacos, drogas de abuso, productos de cuidado personal, surfactantes, agentes y aditivos industriales [La Farré *et al.*, 2008].

1.2 EL AGUA

El agua es un recurso natural escaso, indispensable para la vida y el sostenimiento del medio ambiente. Sin embargo, por el uso inadecuado que se ha hecho de ella como medio de eliminación de desechos industriales y urbanos, ha sufrido un alarmante deterioro [Jiménez, 2005].

En la clasificación mundial, México está considerado como un país con baja disponibilidad de agua. Siendo la disponibilidad de este líquido uno de los problemas que más preocupa a la humanidad, se vuelve imperativo contar con los medios apropiados para su purificación y reúso [CONAGUA, 2016].

El desarrollo de métodos analíticos para medir el tipo y cantidad de sustancias disueltas en agua ha avanzado paralelamente a los adelantos en la química analítica. Aunque actualmente se dispone de métodos oficiales bien establecidos para la determinación de diversas familias de contaminantes, las regulaciones existentes tienden a volverse más estrictas y se emiten nuevas regulaciones para sustancias antes no consideradas, por lo que la demanda de nuevas y mejores metodologías analíticas es una constante. Hoy en día, no sólo se consideran los parámetros de precisión, exactitud, sensibilidad y costos, al seleccionar los métodos analíticos empleados en los laboratorios dedicados al análisis de agua, sino que también se han vuelto importantes la rapidez de respuesta, la versatilidad, la sencillez en la preparación de muestra y la reducción de desechos [Ramalho, 1991].

1.2.1 CONTAMINACIÓN DEL AGUA

La calidad del agua ha sido un factor sumamente importante para el bienestar de la humanidad. La contaminación de fuentes naturales de agua potable sigue ocasionando estragos importantes sobre la población, particularmente en los países en vías de desarrollo. Actualmente, la mayor preocupación sobre la seguridad y calidad del agua es la potencial presencia de contaminantes químicos (productos orgánicos, inorgánicos y metales pesados), procedentes de fuentes industriales, agrícolas y urbanas, los cuales pueden ocasionar daños severos a los seres vivos [Daughton, 2001; David *et al.*, 2000; Manahan, 2007; Murray *et al.*, 2010].

1.3 PLAGUICIDAS

De acuerdo con la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, por sus siglas en inglés), un plaguicida es “ cualquier sustancia destinada a prevenir, destruir, atraer, repeler o combatir cualquier plaga, incluyendo los vectores de organismos causantes de enfermedades humanas o de los animales, las especies no deseadas de plantas o animales que causan perjuicio o que interfieren de alguna manera en la producción, elaboración, almacenamiento, transporte o comercialización de alimentos, productos agrícolas, madera, productos de ésta o alimentos para animales o que pueden administrarse a los animales para combatir insectos, arácnidos u otras plagas en o sobre sus cuerpos”. El término *plaguicida* no incluye normalmente los fertilizantes, nutrientes de origen vegetal o animal, aditivos alimentarios ni medicamentos para animales [ATSDR, 2002; FAO/OMS, 2015; FAO, 2016].

La SEMARNAT, a su vez, define a los plaguicidas como toda 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 [SEMARNAT, 1993; CICOPLAFEST, 2002].

Debido a la gran explosión demográfica a nivel mundial durante los últimos 70 años, la agricultura intensiva ha tomado un papel preponderante para alcanzar la demanda alimentaria cotidiana. La creciente producción agrícola, cuyo incremento se ha logrado principalmente con el aumento del rendimiento por superficie, (dándose una mayor cantidad de cosechas por cada hectárea cultivada) ha ido desarrollando la difusión de nuevas prácticas que utilizan grandes cantidades de fertilizantes y plaguicidas [García, 2014].

Entre los factores que limitan la producción agrícola y la calidad de las cosechas están las enfermedades y las plagas, las cuales pueden atacar a los cultivos desde que las plantas inician su crecimiento, hasta en su cosecha y almacenamiento. Por

otra parte, las enfermedades transmitidas por vectores son un problema importante de salud pública en el país. Los plaguicidas permiten controlar la proliferación de plagas y enfermedades de los cultivos y del ganado, así como reducir o evitar las pérdidas en la producción de alimentos y contribuir al control de los vectores de diversas enfermedades [CICOPLAFEST, 2002].

No obstante la importancia económica de estos productos, es necesario destacar que su aplicación indiscriminada y sin control puede ocasionar daños al ambiente; por ejemplo, el deterioro de la flora y la fauna silvestres, la contaminación de suelo, de mantos freáticos y aguas continentales y costeras; así como la generación de plagas resistentes [Klaassen & Watkins, 2005].

Los usos principales de los plaguicidas se dan en la salud pública y en la agricultura, en especial en los sistemas que requieren alta tecnología y un elevado uso de insumos. El uso de los plaguicidas en la agricultura usualmente está justificado por el elevado número y variedad de plagas que pueden afectar a los cultivos o, inclusive, a los productos ya cosechados. Casi la mitad del consumo mundial de plaguicidas se emplea en trigo, cebada, maíz, algodón y arroz [Albert, 1997].

El uso y manejo incorrecto de los plaguicidas es peligroso para el hombre, lo cual se puede manifestar por intoxicaciones de grado diverso y por efectos nocivos que pueden presentarse a mediano o largo plazo, tales como carcinogénesis, teratogénesis, esterilidad, mutagénesis y otros [Klaassen & Watkins, 2005]. De acuerdo con el Convenio de Estocolmo (*Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants*), firmado en mayo de 2001, nueve de los doce más peligrosos y persistentes contaminantes orgánicos son plaguicidas [COPARMEX, 2004].

Conforme a las cifras registradas en la base de datos estadísticos de la FAO, en el período comprendido del año 2004 al 2009, a nivel mundial se consumieron 764,000 toneladas de plaguicidas, de los cuales aproximadamente 16 % (123,000 toneladas) fueron consumidas en México [FAOSTAT, 2011]; así, los plaguicidas constituyen el grupo de productos químicos industriales más utilizados actualmente.

En México, durante el año 2016, la producción de agroquímicos y fertilizantes presentó un decremento al pasar de 1.75 millones de toneladas en el 2015 a un total de 1.66 millones de toneladas (-5 %). Asimismo, el consumo nacional aparente de plaguicidas aumentó 11.1 %, lo que representó 511, 652 toneladas más que en el año 2015 [ANIQ, 2017].

Los plaguicidas se pueden clasificar de diversas formas; debido a su origen (naturales o sintéticos), conforme al tipo de plaga que atacan, según su persistencia en el ambiente, debido a su toxicidad, por su nivel de peligrosidad y por la familia química a la que pertenecen [Albert, 1997].

Se pueden clasificar a los plaguicidas con base en tres criterios [Calva, 1998]:

- 1) por su naturaleza química
- 2) por su mecanismo de acción
- 3) por el tipo de organismos que afectan

A continuación (Tabla 1.1) se presenta una clasificación adecuada y representativa de los plaguicidas [CICOPLAFEST, 2002].

Tabla 1.1. Clasificación de plaguicidas.

Clasificación	Tipo de plaguicidas
Naturaleza	Naturales o sintéticos
Organismos que combaten	Herbicidas, insecticidas, fungicidas, ovidas, acaricidas, rodenticidas, nematicidas, molusquicidas, bactericidas y defoliantes
Presentación comercial	Polvo, líquido, gas y comprimidos
Persistencia ambiental	No persistentes: 0 a 12 semanas Moderadamente persistentes: 1 a 18 meses Persistentes: menos de 20 años Permanentes: más de 20 años
Toxicidad	Corto plazo: toxicidad aguda Mediano plazo: toxicidad media Largo plazo: toxicidad crónica
Estructura química	Carbamatos, <u>organoclorados</u> , organofosforados, organosulfurados, piretroides, <u>triazinas</u> , dinitrofenoles, clorofenóxidos, etc.

[Fuente: CICOPLAFEST, 2002]

En el documento llamado *Iniciativa Norteamericana: Un Informe del grupo técnico de trabajo sobre plaguicidas del Tratado de Libre Comercio (TLC) de América del Norte*, se resumen los aspectos más relevantes en materia de política y acciones de cooperación respecto a la gestión de los plaguicidas [COPARMEX, 2004].

1.3.1 PLAGUICIDAS ORGANOCOLORADOS

La utilización durante aproximadamente 40 años, de los plaguicidas organoclorados para el control de vectores transmisores de enfermedades humanas y para el desarrollo de la agricultura, ha ocasionado serios problemas de contaminación ambiental, con efectos adversos para la salud [Arias, 1990].

Los plaguicidas organoclorados se encuentran ampliamente distribuidos en el ambiente terrestre y acuático como resultado de que durante varias décadas fueron utilizados para combatir plagas en la industria, la agricultura y en campañas de salud para contrarrestar enfermedades como la malaria. Sus propiedades fisicoquímicas los hacen muy resistentes a la degradación biológica, por lo que son altamente persistentes [Iwata *et al.*, 1994].

Muchos derivados clorados son controvertidos debido a los efectos de estos compuestos en el ambiente, así como en la salud humana y animal, siendo en general dañinos para los organismos y potencialmente cancerígenos [Arias, 1990].

A los plaguicidas organoclorados se les considera como persistentes y ubicuos contaminantes ambientales. Su naturaleza lipofílica, la resistencia a los procesos de biodegradación y lento metabolismo permiten su concentración sucesiva en el tejido adiposo de animales, humanos y todos los elementos de la cadena alimenticia. Este fenómeno llama la atención sobre el potencial de contaminación y exposición humana [Wong *et al.*, 2008].

Generalmente, los plaguicidas organoclorados se utilizaron como insecticidas, acaricidas, herbicidas y fungicidas en cultivos de algodón, trigo, maíz, frijol, arroz, soya, sorgo y cártamo; en frutas como naranja, mango, melón, sandía y piña, así como en plantíos de café, caña de azúcar y henequén [Hernández-Antonio & Hansen, 2011].

1.4 HERBICIDAS

Un herbicida es un producto o mezcla de productos que es utilizado para prevenir o evitar el crecimiento de hierbas no deseables [Mendoza, 2011]. Los herbicidas son los plaguicidas más utilizados a nivel mundial. El uso agrícola de los herbicidas ha reemplazado el desbrozado humano y mecánico en países desarrollados, y ha reducido fuertemente el número de personas empleadas en la agricultura. Son sustancias que tienen como función frenar el desarrollo de plantas herbáceas o leñosas no deseadas (malezas) en tierras agrícolas [FAO, 1996].

Los herbicidas a menudo se emplean para eliminar la maleza sin causar pérdidas en la vegetación [Baird, 2001]. Para que la acción del herbicida tenga lugar, deberá haber suficiente cantidad de ingrediente activo del compuesto en cuestión, para que éste penetre en la maleza y pueda ser transportado hasta el sitio activo adecuado [FAO, 2016]. Los herbicidas pueden pasar a las aguas tanto superficiales como subterráneas, mediante arrastre por lluvias, lixiviación, lavado de las plantas por riego, precipitaciones y otros procesos [Marín, 2003]. También han sido utilizados para eliminar plantas en las orillas de carreteras, vías del tren y en los trazados de líneas de alta tensión [Baird, 2001].

Al igual que los plaguicidas, los herbicidas pueden ser clasificados según sus características toxicológicas y químicas, según su modo de actuación y el tipo de tratamiento, entre otros criterios (ver Tabla 1.2) [Carod-Benedico, 2002].

Tabla 1.2. Clasificación de herbicidas.

Clasificación	Tipo de herbicidas
Toxicología	Baja peligrosidad, nocivos, tóxicos y muy tóxicos
Selectividad	Selectivos y no selectivos
Forma de aplicación	Vía foliar o en suelos
Modo de acción	Por contacto o traslocación y acción bioquímica
Época de aplicación	Pre-siembra, pre-emergencia y post-emergencia
Superficie tratada	Aplicaciones totales, en bandas y dirigidas
Estructura química	Carbamatos, <u>triazinas</u> , fenoles, amidas, etc.

[Fuente: Carod-Benedico, 2002]

1.5 TRIAZINAS

La estructura de las triazinas es la de un anillo heterocíclico, análogo al anillo de benceno, pero con tres átomos de carbono reemplazados por átomos de nitrógeno [Jiménez-Ballesta, 2017]. Los tres isómeros de la triazina (Fig. 1.1) se distinguen entre sí por la posición de sus átomos de nitrógeno. Otros anillos heterocíclicos aromáticos con nitrógeno son la piridina (con un átomo de nitrógeno), las diazinas (con dos átomos de nitrógeno) y las tetrazinas (que tienen cuatro). Las triazinas son bases más débiles que la piridina [Rapoport & Smolin, 2009].

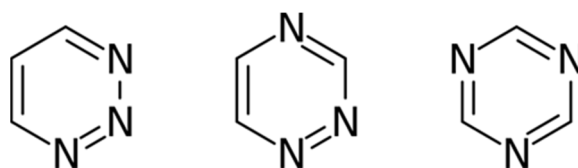


Figura 1.1. Estructura de los tres isómeros de la triazina [LeBaron et al., 2008].

El primer compuesto triazínico fue descubierto en 1952 por investigadores de la compañía J.R. Geigy, Ltd., en Basilea, Suiza. Esto condujo a importantes avances en prácticas agrícolas, investigación básica, pruebas de seguridad y manejo ambiental. Debido al crecimiento de algunas plantas, las propiedades y selectividad de estos compuestos fueron estudiadas por primera vez en 1955 y se introdujeron al mercado hace 50 años. [LeBaron et al., 2008]. En 1954 fueron registradas las primeras patentes [Noblet *et al.*, 1996].

Las triazinas simétricas pueden ser divididas en tres grupos: cloro-, metoxi- y metiltio-triazinas; estos compuestos representan el mayor grupo de plaguicidas utilizados en áreas de cultivos [LeBaron *et al.*, 2008; Montaña, 2013]. Estos compuestos son sólidos, con una baja presión de vapor a temperatura ambiente y su solubilidad en agua está entre 5 a 750 ppm. La solubilidad en agua de cada compuesto depende del sustituyente en la posición -2 [Bernal, 2008].

Una de las razones por las que las triazinas son tan importantes mundialmente para su aplicación en cultivos es su flexibilidad de aplicación y su capacidad de mezclarse con otros herbicidas, para el control de malezas de amplio espectro. La atrazina es, por mucho, la triazina más ampliamente utilizada en el mundo [LeBaron *et al.*, 2008].

1.6 ATRAZINA

La atrazina, ATZ (Nombre IUPAC: 6-cloro-*N*²-etil-*N*⁴-(prop-2-il)-1,3,5-triazina-2,4-diamina) es un herbicida no iónico, selectivo, sistémico y residual, que se aplica al suelo, absorbiéndose a través de las raíces o las hojas de las hierbas; se puede aplicar antes y después de la siembra para controlar las malezas de hoja ancha y hierbas. Este herbicida controla la aparición de malezas en cultivos, principalmente de maíz, sorgo, caña de azúcar, trigo y varios tipos de pastos y pertenece al grupo de los herbicidas triazínicos organoclorados [Hansen *et al.*, 2013].

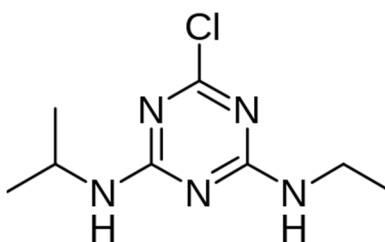


Figura 1.2. Estructura química de la atrazina [NCBI, 2010].

La atrazina actúa por vía radical y se acumula en las hojas, impidiendo el proceso fotosintético de las plantas [Müller *et al.*, 2012]. También se puede administrar mediante el follaje, de esta manera su mecanismo de acción es el de un herbicida de contacto [Del Vecchio, 2013]. Su persistencia es de seis meses o más.

La atrazina es un herbicida ampliamente utilizado en zonas agrícolas de México, donde se comenzó a emplear a partir del año de 1975 [Hansen, *et al.*, 2013]; se aplica en dosis que van de 0.1 a 4 kg-ha/año en 59 % de los Distritos de Riego [Jaramillo *et al.*, 2011].

1.6.1 PROPIEDADES GENERALES DE LA ATRAZINA

La atrazina se sintetiza a partir de cloruro cianúrico, tratándolo sucesivamente con etilamina y diisopropilamina [Appleby *et al.*, 2002]. La atrazina se presenta en forma de cristales incoloros, se descompone cuando se calienta intensamente, produciendo humos tóxicos, incluyendo cloruro de hidrógeno y óxidos de nitrógeno [INSHT, 2009]. En la Figura 1.2 se presenta la estructura química de este compuesto.

El grado de toxicidad de una sustancia puede inferirse de acuerdo con las propiedades fisicoquímicas cuantificables, como lo son la solubilidad, presión de vapor, constante de Henry, el coeficiente de partición *n*-octanol-agua, la solubilidad, entre otras [PPDB, 2015]. Dado que la atrazina posee una baja presión de vapor (Tabla 1.3) y una baja constante de Henry (k_H), tiene una alta afinidad por el suelo o el agua, por lo que su capacidad de volatilizarse es poca, teniendo a su vez una alta capacidad de encontrarse en lixiviados [FAO, 2015].

Se sabe que los herbicidas con baja presión de vapor tienden a dispersarse lentamente y aquellos con coeficientes de reparto relativamente elevados o con baja solubilidad en agua, tienden a adsorberse en suelos y poseen una gran capacidad bioacumulativa [Isern, 2002].

Tabla 1.3. Propiedades fisicoquímicas de la atrazina.

Propiedad	Valor
Fórmula molecular	$C_8H_{14}N_5Cl$
Masa molar (g/mol)	215.69
Punto de fusión (°C)	175.8
Punto de ebullición (°C)	200 (descompone)
Solubilidad (mg/L _{H₂O})	35 (a 20 °C)
Presión de vapor (mPa)	0.039 (a 25 °C)
k_H	1.2×10^{-7} (a 20 °C)
pK _a	1.68
Log K _{OW}	2.20 (a pH= 7 y 20 °C)
$t_{1/2}$	130 días

[Fuentes: [Ciba-Geigy, 1994; FAO, 2015; LeBaron *et al.*, 2008; NCBI, 2010; PPDB, 2015]

1.6.2 CONTAMINACIÓN POR ATRAZINA

La principal fuente de contaminación por atrazina es el agua, por lo que es importante que haya un control sobre la misma en pozos y ríos, puesto que de estos últimos se obtiene el agua que posteriormente es utilizada para consumo humano. La atrazina es el plaguicida contaminante más comúnmente detectado en aguas subterráneas, aguas superficiales y precipitaciones [Hayes *et al.*, 2011].

La contaminación del agua por atrazina no se limita solamente a zonas donde se ha aplicado; se sabe que la atrazina se libera al ambiente principalmente en su uso en suelos agrícolas, sin embargo, una fracción de entre 2.4 % y 14 % se volatiliza y viaja por la atmósfera a través de corrientes de aire hacia lugares lejanos y puede depositarse a través de la lluvia. Una vez en el suelo, puede ser transportada por el agua residual o la lluvia, alcanzando ríos, lagos, mares y puede traspasar hasta los mantos freáticos; ello bajo los fenómenos de lixiviación, adsorción, absorción, arrastre superficial y degradación [González-Márquez & Hansen, 2014; INECC, 2015; Moorman *et al.*, 2001 y Thurman & Cromwell, 2000].

La capacidad de retención de agua en el suelo influye en la migración de la atrazina [Müller *et al.*, 2012], ya que, como mencionan Hansen *et al.* [2013]; “en suelos arenosos la infiltración del agua es más rápida, en suelos arcillosos la infiltración ocurre lentamente, lo que influye en la velocidad de transporte de la atrazina al agua subterránea”.

La persistencia de atrazina en lagos puede ser por arriba de los 10 años [Thurman & Cromwell, 2000] y se calcula que la degradación de la atrazina es de alrededor del 1% por año [Stamer & Wieczorek, 1996]; otros estudios mencionan que la pérdida de atrazina ocurre por dilución [Müller *et al.*, 2002]. La vida media de atrazina en sedimentos de agua subterránea es de 6 años [Gaus, 2000]. Se ha determinado, por otra parte, que el metabolito desetilatrazina producto de degradación puede persistir hasta 25 años [Denver & Sandström, 1991].

1.6.3 PROCESOS DE DEGRADACIÓN DE LA ATRAZINA

La atrazina se degrada en el suelo principalmente por acción microbiana. En el suelo tiene una vida media de 13 a 261 días [USEPA, 2006], por lo cual se le considera como moderadamente persistente [Botello *et al.*, 2005]. La degradación de la atrazina depende de las condiciones del suelo, en ese sentido; si un suelo tiene un alto contenido orgánico, la degradación microbiológica se encargará de los residuos de dicho plaguicida, sin embargo, si las condiciones de pH no oscilan entre 6.5 y 7.5, las bacterias encargadas de su degradación no pueden sobrevivir, lo cual hace

que la atrazina siga en el suelo. Por otro lado, las condiciones del suelo en cuanto a humedad y contenido de materia orgánica, afectan igualmente el crecimiento bacteriano impidiendo la degradación de la atrazina [Da Cunha *et al.*, 2012].

Con respecto a la degradación química, las condiciones de pH, materia orgánica y humedad, también juegan un papel importante, sobre todo la humedad, ya que el proceso más frecuente mediante el cual se degrada la atrazina, es la hidrólisis, esto va de la mano junto con las condiciones de temperatura, debido a que la degradación química en general no corresponde solamente a un tipo de reacción, sino a un conjunto de reacciones secuenciales de tipo hidrolíticas y que, además están asociadas directamente con los procesos bioquímicos de las bacterias y las plantas [Lerch *et al.*, 1999].

La degradación química de la atrazina se produce también por fotólisis. Sin embargo, estudios realizados en laboratorio han determinado que esta sustancia es estable a la fotólisis con pequeños cambios en su concentración [Comber, 1999; Curran *et al.*, 1992; Durand *et al.*, 1994; Pelizzetti *et al.*, 1990; Spare, 1998].

Estudios realizados bajo luz solar natural indican que la fotodegradación de la atrazina ocurre de manera directa, la cual aumenta en presencia de algunos fotosensibilizadores como ácidos húmicos, nitratos, carbono orgánico disuelto y sales de hierro [Comber, 1999; Durand *et al.*, 1994].

La degradación biológica es el principal proceso de mayor importancia por el cual se transforma este herbicida, el cual ocurre a través de la actividad de microorganismos que cambian su actividad de acuerdo con la profundidad y ubicación del cuerpo de agua, debido a los procesos biológicos que varían entre aerobios y anaerobios [Behki *et al.*, 1993; Cervantes, 2014; Da Cunha *et al.*, 2013; Cecilia & Maggi, 2016].

Durante la biodegradación de la atrazina, los microorganismos la utilizan como fuente de energía y de nutrientes. Sin embargo, la presencia de otras fuentes de nutrientes nitrogenados puede inhibir la degradación de este herbicida [Hansen *et al.*, 2013].

1.6.4 METABOLITOS DE LA ATRAZINA

El resultado de la degradación química de la atrazina es principalmente la 2-hidroxiatrazina, 2-HA (Nombre IUPAC: 6-hidroxi-*N*²-etil-*N*⁴-(prop-2-il)-1,3,5-triazina-2,4-diamina); mientras que el resultado de la degradación microbiológica es principalmente la desetilatrazina, DEA (Nombre IUPAC: 6-cloro-*N*⁴-(prop-2-il)-1,3,5-triazina-2,4-diamina) [USEPA, 2016].

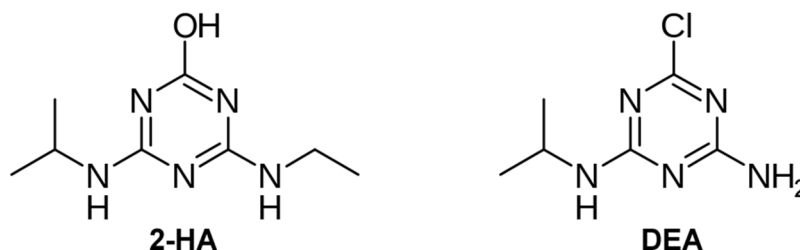


Figura 1.3. Estructuras de 2-hidroxiatrazina y desetilatrazina [NCBI, 2017; NCBI, 2018].

Los metabolitos 2-HA y DEA (Fig. 1.3) son el resultado de la degradación de la atrazina debido a su interacción con el medio; son sustancias con un potencial toxicológico igual, similar o totalmente diferente al de la sustancia original, lo que representa un problema a nivel normativo, ya que no sólo se debe estudiar el comportamiento del herbicida en el ambiente, sino el comportamiento y la naturaleza de las interacciones que establezcan los metabolitos resultantes de la degradación de la sustancia original. Estos metabolitos han sido encontrados en aguas superficiales, aguas subterráneas y aguas residuales, la 2-hidroxiatrazina se encuentra con mayor frecuencia en suelos [FAO, 2016].

Tabla 1.4. Propiedades fisicoquímicas de 2-HA y DEA.

Propiedad	2-HA	DEA
Fórmula molecular	C ₈ H ₁₅ N ₅ O	C ₆ H ₁₀ N ₅ Cl
Masa molar (g/mol)	197.2	187.6
Punto de fusión (°C)	> 310	132-134
Solubilidad (mg/L _{H₂O})	5.9 (a 25 °C)	2700 (a 25 °C)
Presión de vapor (mmHg)	1.13 × 10 ⁻³ (a 25 °C)	1.24 × 10 ⁻² (a 25 °C)
Log K _{OW}	2.09	1.51
pK _a	5.15	1.65

[Fuentes: NCBI, 2017; NCBI, 2018; USEPA, 2006]

La atrazina y sus principales metabolitos se pueden encontrar distribuidos en el ambiente en el suelo, agua y aire, debido a propiedades como su baja volatilidad, baja afinidad por los componentes del suelo, su relativa alta solubilidad y su elevada persistencia ambiental (ver Tabla 1.4) [Abdelhafid *et al.*, 2000]. En la Figura 1.4 se muestra un esquema de la ruta degradativa de la atrazina, indicándose su conversión a 2-HA y DEA, seguida de ácido cianúrico, hasta su mineralización.

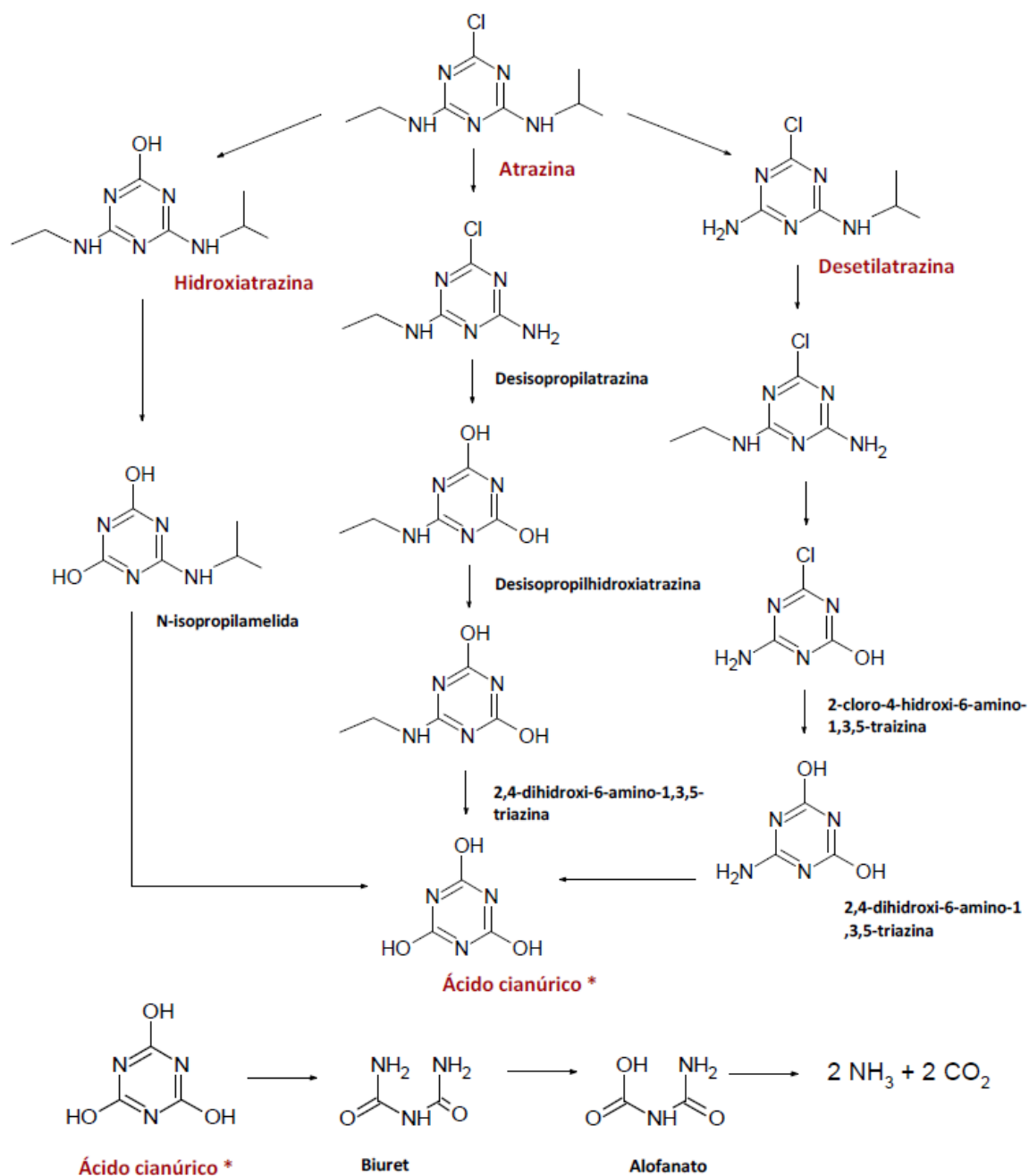


Figura 1.4. Ruta degradativa de la atrazina y su mineralización [Hansen *et al.*, 2013].

1.6.5 ESTUDIOS TOXICOLÓGICOS

A la atrazina se le considera como un alterador endocrino, el cual causa un desequilibrio hormonal y está clasificada en la categoría 3 por la Convención para la Protección del Medio Ambiente Marino del Atlántico del Noreste (OSPAR, por sus siglas en inglés) como cancerígeno [IARC, 2014].

Existe evidencia que demuestra que la exposición a la atrazina puede ocasionar daños a la salud tanto en animales como en seres humanos, se ha asociado con cáncer en pulmón, vejiga, colon, ovario, leucemia, en los seres humanos [Rusiecki *et al.*, 2004; IARC, 2014].

La información acerca de los efectos tóxicos de la atrazina en humanos es limitada, sin embargo, los efectos conocidos están relacionados principalmente a daños reproductivos y consecuencias en el desarrollo fetal [INECC, 2015].

La atrazina ha sido asociada también a problemas reproductivos en roedores machos y hembras, así como a una mala calidad en el esperma, tanto en seres humanos como en roedores [Kniewald *et al.*, 2000; Swan *et al.*, 2003].

La atrazina es un disruptor endocrino que, entre otros efectos, altera los tejidos reproductivos masculinos cuando los animales están expuestos durante el desarrollo; desmasculiniza y feminiza las gónadas de los vertebrados varones, produciendo lesiones testiculares asociadas con un número reducido de células germinales en peces teleósteos, anfibios, reptiles y mamíferos, e induce la feminización parcial y/o completa en peces, anfibios y reptiles [Hayes *et al.*, 2011].

De acuerdo con la Directiva Marco del Agua, la atrazina es una de las sustancias prioritarias de vigilancia por los riesgos que representa para el medio acuático y su propagación en él [CICOPLAFEST, 2005].

1.6.5.1 Disruptores endócrinos

Los compuestos de interrupción endócrina (EDC, por sus siglas en inglés), son sustancias químicas, exógenas al organismo que tienen la capacidad de alterar la síntesis, secreción, transporte, metabolismo, actividad de unión o eliminación de

hormonas naturales que están presentes en el organismo y son responsables de la homeostasis del sistema endocrino, el reproductivo, y procesos de desarrollo, tanto del ser humano como el de los animales [Diamanti-Kandarakis *et al.*, 2009; USEPA, 2015].

1.6.6 MARCO LEGAL DE LA ATRAZINA

La atrazina ha sido prohibida en varios países de Europa, tales como Alemania, Austria, Croacia, Dinamarca, España, Finlandia, Francia, Grecia, Italia, Países Bajos, Portugal, Reino Unido, Rumania y Suecia [IARC, 2014; OJEU, 2004], además de haber sido regulada en Australia [NRA, 2002] y EUA [USEPA, 2006]. De acuerdo con la Directiva Marco del Agua, la atrazina es una de las sustancias prioritarias de vigilancia por los riesgos que representa para el medio acuático y su propagación en él [CICOPLAFEST, 2005].

En México, más del 45 % de los plaguicidas comercializados son herbicidas de los cuales uno de los más empleados es la atrazina, la cual aún no ha sido incluida en las guías ambientales y de salud en este país y por lo tanto, no se incluye en los programas de monitoreo de agua ni en los métodos analíticos rutinarios, por lo que se desconoce el destino ambiental de esta sustancia [González-Márquez & Hansen, 2009].

Varios países establecen no sólo límites para el agua de consumo y uso humano, sino que además cuentan con guías sobre las concentraciones del herbicida en agua subterránea, suelos de uso agrícola y suelos de uso residencial [Hansen *et al.*, 2013]. En EUA se ha establecido el límite de atrazina en agua para consumo humano en 3 µg/L [USEPA, 2006], mientras que la Comunidad Europea fijó el límite de 0.1 µg/L para el mismo fin. La Organización Mundial de la Salud establece, por otra parte, límites de 100 µg/L para atrazina y sus metabolitos [EFSA, 2015]. Sin embargo, no existen leyes mexicanas que prohíban o regulen el uso de la atrazina, aunque en algunas normas mexicanas se proporcionan límites máximos permisibles de manera preventiva, principalmente las referidas a agua potable, descargas de agua residual y alimentos [González-Márquez & Hansen, 2009; FAO, 2016].

Actualmente existe la Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-1994, la cual hace referencia al agua para uso y consumo humano, considerando los límites permisibles de calidad y tratamientos a los que debe someterse para su potabilización; no obstante, en ésta no se incluye a la atrazina [DOF, 1995; DOF, 2000]. Asimismo, se cuenta con la NOM-014-CONAGUA-2003, la cual describe los requisitos para la recarga artificial de acuíferos con agua residual tratada e incluye los niveles máximos permisibles de contaminantes en cuerpos de agua no regulados por norma, estableciendo un valor de 0.002 mg/L para atrazina [DOF, 2009-a].

Por otra parte, la Norma Oficial Mexicana NOM-047-SSA1-2011 describe el procedimiento para evaluar la exposición de los trabajadores a sustancias químicas, incluyendo disruptores endocrinos como lo es la atrazina. En ella se señala que no existe ningún límite de exposición “seguro” y se deben tomar todas las medidas preventivas razonables con el objeto de reducir el riesgo al mínimo posible, además de que el monitoreo biológico de la exposición debe ser anual [DOF, 2012].

Finalmente, para el personal ocupacionalmente expuesto al herbicida, la Norma Oficial Mexicana NOM-010-STPS-1999, la cual trata sobre las condiciones de seguridad e higiene en los centros de trabajo donde se manejen, transporten, procesen o almacenen sustancias químicas capaces de generar contaminación en el ambiente laboral, establece el límite máximo permisible de exposición a atrazina, calculados para condiciones normales de temperatura y presión (20 °C y 1 atm), y para una jornada laboral de 8 horas diarias y 40 horas semanales, en un valor de 10 mg/m³ [DOF, 2014].

Es importante señalar que se requiere realizar el seguimiento de la atrazina en cuerpos de agua, así como estudios sobre su atenuación natural en sedimentos y suelos de zonas agrícolas de México [Hansen *et al.*, 2013]. También son necesarios estudios adecuados sobre toxicidad, estimaciones de riesgo y de costo-beneficio, con el fin de conocer el impacto de la prohibición o de la restricción de esta sustancia, así como el reemplazo por otros herbicidas menos tóxicos y similarmente efectivos [Ackerman, 2007].

1.6.7 MÉTODOS DE DETERMINACIÓN DE ATRAZINA

Actualmente existen una amplia gama de técnicas analíticas que permiten detectar sustancias tóxicas en cualquier tipo de matriz. La cromatografía de gases es el método de separación y cuantificación más empleado para el análisis multiresidual de plaguicidas en diversas matrices, dada su elevada sensibilidad y selectividad en este tipo de compuestos [Ravelo, 2009].

Para la detección y cuantificación de atrazina, las técnicas cromatográficas son las más utilizadas. Los métodos de separación más adecuados para determinar y cuantificar triazinas en cantidades de trazas son la cromatografía de gases (GC) y la cromatografía de líquidos de alta eficacia (HPLC) [Trajkovska *et al.*, 2001].

En México, el actual proyecto de norma para la regulación de atrazina en matrices acuosas, denominado; *Agua para uso y consumo humano. Límites máximos permisibles de la calidad del agua, control y vigilancia de los sistemas de abastecimiento* [ANEAS, 2007], recomienda la técnica de cromatografía de gases de alta resolución con detector de captura de electrones para cuantificar atrazina en cuerpos de agua con un límite de detección de 0.002 mg/L.

La Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC), como ya se mencionó, es también un método de separación altamente eficiente para este tipo de sustancias fitosanitarias (plaguicidas). El HPLC ha sido la metodología más empleada para la separación y la determinación de la atrazina y sus metabolitos intermedios. Una de las ventajas más significativas que tiene un análisis de atrazina y sus metabolitos por medio de HPLC frente a la Cromatografía de Gases o a los sistemas acoplados GC-MS, es que en HPLC no es necesario derivatizar (llevar a cabo una reacción química entre el analito y una sustancia, tal que esta reacción genere un producto que permita realizar la determinación analítica, esta reacción es previa al análisis), aunque la sensibilidad que presentan GC y GC-MS para la cuantificación es mejor. Por otro lado, el sistema acoplado HPLC-MS traería mejores resultados que todos los mencionados anteriormente, aunque su uso se limita a solo algunos laboratorios debido al alto costo en el mercado del detector de masas [Da Cunha *et al.*, 2012].

El uso de la cromatografía de líquidos de alta eficacia ha ido aumentando, al grado de ser una buena alternativa para el análisis de plaguicidas [Lough & Wainer, 1995].

En un estudio [Roehrs *et al.*, 2009] se utilizó la cromatografía de líquidos con arreglo de diodos (HPLC-DAD) para determinar la concentración en agua para consumo, de seis herbicidas. Se obtuvieron buenos resultados, alcanzándose límites de detección y cuantificación muy bajos, además de obtenerse coeficientes de correlación cercanos a uno, lo cual indica que este método es excelente para determinar plaguicidas de diversas polaridades en agua en cantidades de trazas. Se concluyó que este método se podría ampliar hacia diversos plaguicidas y diversas matrices, siempre y cuando se realicen las verificaciones pertinentes que incluyan los parámetros característicos que demuestran la confiabilidad del método.

Existen otros métodos de determinación de la atrazina, ya sea usando otras clases instrumentos u otros tipos de detectores de UV-Vis. Por ejemplo, en el trabajo de Bodalbhai *et al.* [1998] se usa cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS), al igual que en el de Hartenbach *et al.* [2008], donde también se usó espectrofotometría UV-Vis para contrastar la cuantificación, obteniéndose resultados igualmente confiables en ambos casos.

Otro método comúnmente usado para determinar metabolitos de atrazina es la microextracción en fase sólida (la cual es una técnica de preparación de muestra) seguida de cromatografía de gases con espectrometría de masas de relaciones Isotópicas (SPME-GC/C/IRMS). Mouvet *et al.* [1996] probaron validar una técnica alternativa a la cromatografía, a través de la espectroscopia de interferencia por reflexión (RIFS).

Hay algunos autores que proponen como alternativa a las técnicas cromatográficas el uso de la espectrofotometría UV-Visible. Guevara, *et al.* [2010] llevaron a cabo la determinación y cuantificación simultánea de los herbicidas 2,4-D, atrazina y dicamba, mediante espectrofotometría UV-Visible auxiliada por tratamiento quimiométrico, obteniendo buenos resultados al no presentar diferencias significativas entre las concentraciones obtenidas por este método comparándolo con los resultados obtenidos por HPLC para las mismas muestras.

1.7 MÉTODOS INSTRUMENTALES DE ANÁLISIS

La Química analítica se ocupa de describir y estudiar a los métodos de determinación de la composición química de la materia; estas metodologías pueden ser cualitativas o cuantitativas. Un método cualitativo informa sobre la identidad de las especies atómicas o moleculares de la muestra, o de los grupos funcionales que hay en ella; por otra parte, un método cuantitativo aporta información numérica de la cantidad relativa que hay de uno o varios de estos componentes. Los métodos de análisis químico se suelen clasificar en contexto histórico [Skoog *et al.*, 2008]:

- Métodos clásicos:
 - análisis volumétrico
 - análisis gravimétrico
- Métodos fisicoquímicos o instrumentales:
 - métodos electroquímicos
 - métodos espectrométricos
 - métodos cromatográficos

Del gran arsenal de técnicas analíticas que se utilizan para realizar el análisis de una muestra, los químicos han desarrollado metodologías con el fin de incrementar la capacidad de analizar concentraciones cada vez más bajas y en matrices más complejas. Sin embargo, las técnicas analíticas instrumentales generalmente sufren de una baja selectividad, por esta razón, muchos de los procedimientos necesitan lograr una separación entre el analito de interés y las posibles sustancias que actúan como interferentes; algunos de estos métodos son: enmascaramiento, precipitación química o electrolítica, destilación, extracción con disolventes, intercambio iónico, electroforesis y cromatografía [Christian, 2009].

Con el paso del tiempo, en la separación de mezclas complejas, técnicas cromatográficas y electroforéticas muy eficaces comenzaron a reemplazar a los métodos clásicos (destilación, extracción y precipitación) como etapa previa a su determinación cualitativa o cuantitativa. A estos métodos más modernos para la separación y determinación de especies químicas se les conoce, en conjunto, como *métodos instrumentales de análisis* [Skoog *et al.*, 2008].

1.7.1 MÉTODOS ELECTROQUÍMICOS

La química electroanalítica abarca un grupo de métodos analíticos cuantitativos basados en las propiedades eléctricas de una disolución de analito cuando forma parte de una celda electroquímica. Las técnicas electroanalíticas son capaces de proporcionar límites de detección excepcionalmente bajos y una abundante información de caracterización que describe los sistemas que son tratados de forma electroquímica [Skoog *et al.*, 2008].

Los métodos electroanalíticos miden el potencial eléctrico y/o la corriente eléctrica en una celda electroquímica que contiene al analito. Estos métodos se pueden clasificar según los parámetros de la celda que se controlan y los que se miden, las tres categorías principales son [Bard & Faulkner, 2000; Skoog *et al.*, 2008]:

- Potenciometría
- Coulombimetría
- Voltamperometría

La voltamperometría se clasifica, a su vez, en:

- Polarografía
- Amperometría

Las técnicas electroanalíticas estudian las propiedades eléctricas de una disolución. Estas técnicas se caracterizan por una alta sensibilidad, su gran selectividad y elevada precisión; el límite de detección obtenido suele ser menor de 10^{-10} M [Gómez-Biedma *et al.*, 2002].

Los métodos electroanalíticos tienen ciertas ventajas de carácter general sobre otros tipos de procedimientos: En primer lugar, las medidas electroquímicas son a menudo específicas para un estado de oxidación particular de un elemento. Una segunda ventaja importante es que la instrumentación es relativamente económica. Una tercera característica de ciertos métodos electroquímicos es que proporcionan información sobre las actividades en vez de las concentraciones de las especies químicas, lo cual puede ser una ventaja o una desventaja, dependiendo del caso [Skoog *et al.*, 2008].

1.7.2 MÉTODOS ESPECTROMÉTRICOS

Los métodos espectrométricos son un amplio grupo de métodos analíticos que se basan en las espectroscopias atómica y molecular. La espectroscopia es una ciencia que trata las distintas interacciones de la radiación electromagnética con la materia, aunque esta definición actualmente se ha ampliado para incluir las interacciones entre la materia y otras formas de energía. La espectrometría y los métodos espectrométricos hacen referencia a la medida de la intensidad de la radiación absorbida, mediante un detector fotoeléctrico u otro tipo de dispositivo electrónico [Skoog *et al.*, 2008].

Las técnicas espectrométricas más ampliamente utilizadas son las relacionadas con la radiación electromagnética, que es un tipo de energía que toma varias formas, de las cuales, las más fácilmente reconocibles son la luz (visible) y el calor radiante (o Infrarrojo, IR). Sus manifestaciones más difícilmente reconocibles incluyen a los rayos gamma, los rayos X, así como a las radiaciones ultravioleta (UV), de microondas y de radiofrecuencia [Skoog *et al.*, 2008].

A lo largo de la historia, el color ha sido de gran ayuda para poder identificar especies químicas. Con el paso del tiempo, el principal detector de color, el ojo humano, tuvo que ser reemplazado por equipo de mayor calidad para poder realizar mediciones de manera más exacta y poder hacer determinaciones más allá de la región visible dentro del espectro electromagnético [Day & Underwood, 1989].

El espectro electromagnético (EM) es el rango de todos los tipos de radiación electromagnética. La radiación es la energía que viaja y se extiende a medida que se esparce. Los tipos de radiación que componen el espectro electromagnético son la luz visible (Vis), las ondas de radio o radiofrecuencia (RF), las microondas (mw), la luz infrarroja (IR), la luz ultravioleta (UV), los rayos X y los rayos gamma (γ) [Skoog *et al.*, 2014].

El espectro electromagnético (Fig. 1.5) se encuentra dividido en diferentes intervalos de longitud de onda y/o frecuencia [Hewitt, 2004].

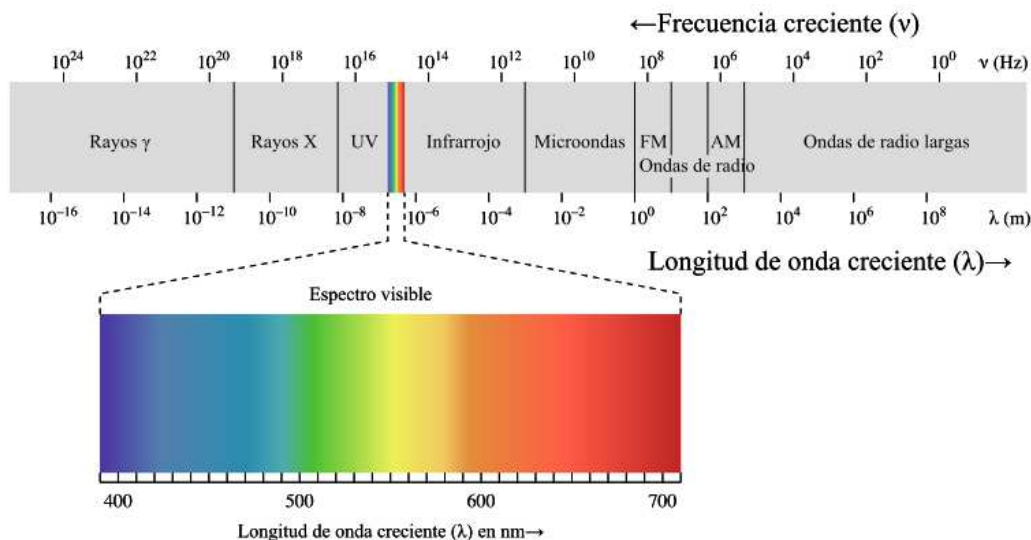


Figura 1.5. El espectro electromagnético [Atkins & de Paula, 2008].

La espectrofotometría es una de las técnicas analíticas más utilizadas dentro del análisis cuantitativo para la determinación de especies químicas dentro de las regiones ultravioleta y visible. Con respecto a la zona ultravioleta, las regiones de mayor interés en la práctica son el ultravioleta cercano, que abarca las longitudes de entre 200 nm y 400 nm, y la zona del ultravioleta lejano o de vacío, cuyas longitudes de onda van de los 10 nm a los 200 nm [Hernández & González, 2002].

1.7.3 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

En general, los métodos para el análisis químico son, en el mejor de los casos, selectivos; pocos, si es que los hay, son verdaderamente específicos. En consecuencia, la separación del analito de las posibles interferencias es a menudo una etapa de vital importancia en los procedimientos analíticos. Hasta mediados del siglo XX, las separaciones analíticas se llevaban a cabo en su mayor parte por métodos clásicos. Ahora, sin embargo, las separaciones analíticas se realizan, en la mayoría de los casos, por cromatografía y electroforesis, especialmente en las mezclas de multicomponentes [Skoog *et al.*, 2008].

La cromatografía es un método de separación para la caracterización de mezclas complejas; es un conjunto de técnicas basadas en el principio de retención selectiva, cuyo objetivo es separar los distintos componentes de una mezcla, permitiendo identificar y determinar las cantidades de dichos componentes [Sharapin, 2000].

1.8 CROMATOGRAFÍA

La cromatografía agrupa un conjunto importante y diverso de métodos, que permite a los científicos separar componentes estrechamente relacionados en mezclas complejas, lo que en muchas ocasiones resulta imposible mediante otros métodos [Skoog *et al.*, 2008].

1.8.1 ORIGEN Y DEFINICIÓN DE CROMATOGRAFÍA

La Unión Internacional de Química Pura y Aplicada, (IUPAC, por sus siglas en inglés) define a la cromatografía como “método físico de separación en el que los componentes a separar se distribuyen entre dos fases, una de las cuales permanece en reposo, denominada *fase estacionaria*; mientras que la otra, denominada *fase móvil*, se mueve en una dirección definida” [Ettre, 1993].

La cromatografía es un poderoso método de separación que tiene aplicación en todas las ramas de la ciencia. La cromatografía en columna fue denominada así por el botánico ruso Mikhail Tsvet. Él empleó la técnica para separar varios pigmentos vegetales, haciendo pasar disoluciones de estos compuestos a través de una columna de vidrio rellena con carbonato de calcio finamente dividido [Skoog *et al.*, 2008]. La separación dio como resultado un conjunto de bandas coloreadas, hecho por el que Tsvet nombró a la técnica cromatografía, del griego *chromatos* «color» y *graphos* «escritura» [Harris, 2010]. Aunque existen trabajos anteriores que utilizan esta técnica, se le considera a Tsvet como el fundador de la cromatografía por haber sido el primero en nombrarla y describirla científicamente [McNair & Miller, 1998].

1.8.2 FUNDAMENTO DE LA CROMATOGRAFÍA

La cromatografía puede cumplir dos funciones básicas que no se excluyen mutuamente [Sharapin, 2000]:

1. Separar los componentes de la mezcla, para obtenerlos más puros y que puedan ser usados posteriormente; es la etapa final de muchas síntesis.
2. Medir la proporción de los componentes de la mezcla, es decir, con finalidad analítica. En este caso, las cantidades de material empleadas suelen ser muy pequeñas.

El principio básico de la cromatografía es la retención selectiva, la cual a su vez está basada en el equilibrio de reparto o de distribución de concentraciones, entre dos fases inmiscibles entre sí. En todas las separaciones cromatográficas, la muestra se desplaza con una *fase móvil*, que puede ser un gas, un líquido o un fluido supercrítico. La fase móvil se hace pasar a través de una *fase estacionaria* con la que es inmiscible, y que se fija a una columna o a una superficie sólida. Las dos fases se eligen de modo que los componentes de la mezcla se distribuyen diferentemente entre las fases móvil y estacionaria [Skoog *et al.*, 2008].

Aquellos componentes que son fuertemente “retenidos” por la fase estacionaria se mueven lentamente con el flujo de la fase móvil; por el contrario, los componentes que se unen débilmente a la fase estacionaria, se mueven con rapidez. Como consecuencia de la distinta movilidad, los componentes de la muestra se separan en *bandas* o *zonas* discretas que pueden analizarse de manera cualitativa o cuantitativamente [Skoog *et al.*, 2008].

La separación de las sustancias puede explicarse de la siguiente manera: Considerando que las moléculas de interés son acarreadas por la fase móvil, tanto las moléculas como la fase móvil tienen la misma velocidad media hasta que las moléculas entran en contacto con la fase estacionaria, esto provoca un decremento en la velocidad media de las moléculas, separándolas así de la fase móvil. El cambio en las velocidades es provocado por las diferentes afinidades de un analito por alguna de las dos fases, por lo cual, para los componentes de una mezcla, la velocidad media será diferente dentro del sistema [Harvey, 2000].

1.8.3 CLASIFICACIONES DE LA CROMATOGRAFÍA

Las técnicas cromatográficas se pueden clasificar de diferentes modos. El primero de ellos se basa en la forma en la que las fases estacionaria y móvil se ponen en contacto [Skoog *et al.*, 2008]; Los métodos cromatográficos fundamentalmente se clasifican según éste primer modo:

- Cromatografía en columna
- Cromatografía plana (también llamada cromatografía en plano)

En la cromatografía en columna, la fase estacionaria se mantiene dentro de un tubo angosto y la fase móvil se hace pasar a través de él por gravedad o aplicando presión. En cambio, en la cromatografía en plano, la fase estacionaria está sujeta por una placa “plana” o en los poros de un papel y la fase móvil pasa a través de la fase estacionaria por gravedad o bien por efecto de capilaridad [Harvey, 2000].

Resulta importante señalar que los equilibrios en los que se basan los dos tipos de cromatografía son idénticos, y la teoría desarrollada para la cromatografía en columna se adapta fácilmente también a la cromatografía plana [Skoog *et al.*, 2008].

Dentro de los métodos cromatográficos en columna, se tiene una clasificación hecha en función del tipo de la fase móvil [Skoog *et al.*, 2008; Skoog *et al.*, 2014]:

- Cromatografía de líquidos (LC)
- Cromatografía de gases (GC)
- Cromatografía de fluidos supercríticos (SFC)

Esta clasificación presenta, a su vez, subdivisiones que dependen de la naturaleza de la fase estacionaria y del soporte sobre el que se encuentra la misma, además de basarse en la clase de equilibrios implicados en la transferencia de solutos entre las fases [Skoog *et al.*, 2008]. La tabla 1.5 detalla la clasificación de los métodos cromatográficos en columna.

Tabla 1.5. Clasificación de los métodos cromatográficos en columna.

Clasificación general	Método específico	Fase estacionaria	Tipo de equilibrio
1. Cromatografía de gases (CG)	a) Cromatografía gas-líquido (CGL)	Líquido adsorbido o unido a una superficie sólida	Distribución entre un gas y un líquido
	b) Gas-sólido	Sólido	Adsorción
2. Cromatografía de líquidos (CL)	a) Líquido-líquido, o reparto	Líquido adsorbido o unido a una superficie sólida	Distribución entre líquidos inmiscibles
	b) Líquido-sólido, o adsorción	Sólido	Adsorción
	c) Intercambio de iones	Resina de intercambio iónico	Intercambio iónico
	d) Exclusión por tamaño	Líquido en los intersticios de un sólido polimérico	Distribución-exclusión
	e) Afinidad	Grupo de líquidos específicos unido a una superficie sólida	Distribución entre el líquido de la superficie y el líquido móvil
3. Cromatografía de fluidos supercríticos (CFS; fase móvil: fluido supercrítico)		Especies orgánicas enlazadas a una superficie sólida	Distribución entre el fluido supercrítico y la superficie enlazada

[Fuente: Skoog *et al.*, 2008]

Destacablemente, la cromatografía de líquidos puede llevarse a cabo tanto en columna, como sobre superficies planas; en tanto que las cromatografías de gases y de fluidos supercríticos están restringidas a los procedimientos en columna, de tal forma que las paredes de esta contienen a la fase móvil [Skoog *et al.*, 2008].

Adicionalmente, de acuerdo con la manera en la que se lleva a cabo el proceso cromatográfico, se tiene la siguiente clasificación [Dabrio *et al.*, 2000]:

- Cromatografía frontal
- Cromatografía de desplazamiento
- Cromatografía de elución

De acuerdo con ésta clasificación, se tiene a la cromatografía frontal, en la cual se introduce la muestra de forma continua en el sistema cromatográfico, siendo ella misma la fase móvil. Por otra parte, la cromatografía de desplazamiento se caracteriza por tener en la fase móvil un componente que es más afín a la fase estacionaria, capaz de desplazar a los componentes de la muestra. Finalmente, en la cromatografía de elución, la muestra se introduce en un momento determinado y la fase móvil circula continuamente; los componentes de la muestra salen de la columna como zonas (bandas o picos cromatográficos), que en el caso ideal presentan una distribución gaussiana de concentración y están separadas unas de otras [Dabrio *et al.*, 2000].

Un último criterio que se tiene para clasificar a la cromatografía (sólo para LC) es la relación de polaridad entre la fase móvil y la fase estacionaria [Dabrio *et al.*, 2000]:

- Cromatografía en fase normal (NP)
- Cromatografía en fase inversa o reversa (RP)

Cuando la fase móvil es menos polar que la fase estacionaria se le denomina cromatografía *en fase normal*, mientras que en la cromatografía *en fase reversa* o *inversa*, la fase móvil es más polar que la fase estacionaria [Dabrio *et al.*, 2000, Harvey, 2000; Skoog *et al.*, 2008]. La cromatografía en fase reversa es la más comúnmente usada en HPLC [Harvey, 2000] y, como clase, incluye a cualquier método que emplee una fase estacionaria hidrofóbica [IUPAC, 2014].

1.9 GENERALIDADES DE LA CROMATOGRAFÍA

1.9.1 DEFINICIONES

A continuación se enuncian algunos términos importantes empleados en la cromatografía:

Analito

El analito es el componente específico de una muestra que se va a separar durante la cromatografía para su posterior caracterización o cuantificación [Torres, 1994].

Cromatógrafo

El cromatógrafo es el equipo que permite efectuar una separación cromatográfica sofisticada. Puede ser un cromatógrafo de gases o un cromatógrafo de líquidos, según el caso [Torres, 1994].

Cromatograma

Un cromatograma (Fig. 1.6) es un gráfico que representa la respuesta del detector en función del tiempo de elución o del volumen de fase móvil añadido. Es decir, si un detector se coloca en el extremo de la columna y éste responde a la propiedad de interés del analito, la señal obtenida lleva a una gráfica en la cual se obtienen una serie de picos simétricos, dando como resultado lo que se conoce como cromatograma [Harris, 2010; Skoog *et al.*, 2014].

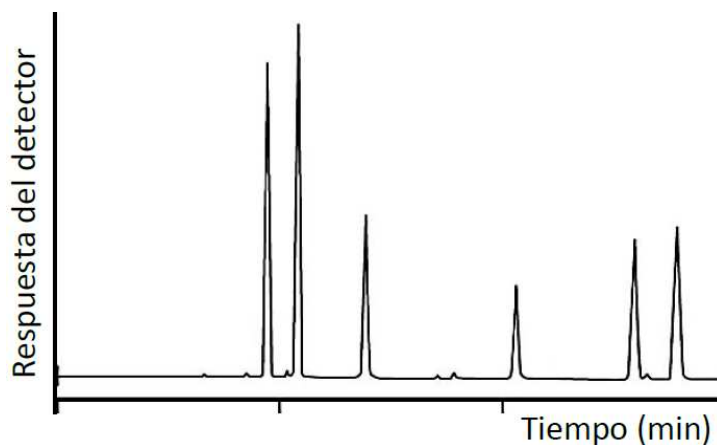


Figura 1.6. Ejemplo de un cromatograma obtenido de una mezcla de multicomponentes [Harris, 2010].

En el eje de las coordenadas (eje x) se representa el tiempo de retención, y en el eje de las ordenadas (eje y) la señal obtenida (por ejemplo, a partir de un espectrofotómetro, un espectrómetro de masas, o cualquier otro de los diversos detectores) correspondiente a la respuesta creada por los diferentes analitos existentes en la muestra [Torres, 1994].

Un cromatograma es útil para un análisis cualitativo y cuantitativo, de modo que la posición de los picos en el eje del tiempo puede servir para identificar los componentes de la muestra y el área bajo los picos es una medida de la cantidad de cada componente [Skoog *et al.*, 2008]. En el caso de un sistema óptimo, la señal es proporcional a la concentración del analito específico separado [Torres, 1994].

Pico cromatográfico

El *pico* cromatográfico es la porción del cromatograma que se genera a partir de la respuesta del detector cuando un solo componente es eluido de la columna. Es decir que, en una separación óptima, los diferentes *picos* o *manchas* del cromatograma corresponden a los componentes de la mezcla separada. Sin embargo, si la separación es incompleta, dos o más componentes pueden eluir como un pico sin resolver (ver Fig. 1.7), es decir dos picos traslapados [USP, 2017].

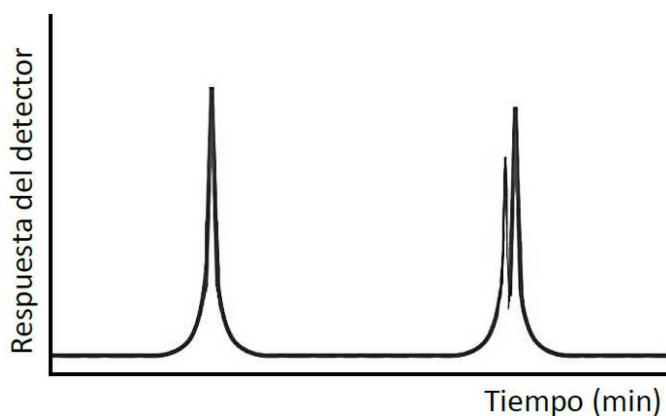


Figura 1.7. Ejemplo de un pico cromatográfico debido a una sola sustancia y un par de picos cromatográficos sin resolver [Harris, 2010].

Fase estacionaria

La fase estacionaria es la sustancia que está fija durante la cromatografía, dentro de una columna o sobre una superficie plana [Skoog *et al.*, 2014].

Fase móvil

La fase móvil es aquella que se mueve en una dirección definida. Puede ser una sustancia o una mezcla, en estado líquido (LC), gas (GC) o fluido supercrítico (SFC). La muestra se inyecta en la fase móvil, la cual se mueve sobre la fase estacionaria o a través de esta, acarreado con ella la mezcla de analitos [Skoog *et al.*, 2014].

Elución

La elución es el proceso de extraer un material de otro por medio de lavados con disolvente [IUPAC, 2014].

Eluyente

El eluyente es la fase móvil que atraviesa la columna cromatográfica [Torres, 1994].

Poder de elución

Se denomina *fuerza eluyente* o *poder de elución* a la capacidad de una fase móvil para eluir un cierto analito, desde una fase estacionaria determinada [Dabrio *et al.*, 2000]. La fuerza de elución depende de la constante dieléctrica [Harris, 2010].

Empaquetamiento

El empaquetamiento se refiere al grado de compactación de las partículas de material del que se compone la fase estacionaria [IUPAC, 2014].

Flujo

El flujo o caudal es la velocidad a la que se mueve la fase móvil en el sistema, es decir, el volumen de disolvente que pasa por la columna por unidad de tiempo, comúnmente expresado en mL/min [Snyder *et al.*, 2010]. Generalmente permanece constante a lo largo de una determinación y depende de la viscosidad del disolvente; esta velocidad incide en el avance de los analitos en la columna, así como en su dispersión y por tanto, en la calidad del análisis [Prado & Covarrubias, 1996].

Capacidad de carga

La capacidad de carga es la cantidad máxima de muestra que puede ser separada en una sola *carga* o *inyección* cromatográfica [Torres, 1994].

Capacidad de fraccionamiento

La capacidad de fraccionamiento se refiere al número máximo de componentes que pueden ser separados en una sola operación cromatográfica [Torres, 1994].

Muestra

La muestra es la porción de materia que va a ser analizada en la cromatografía. Puede consistir en un simple componente o una mezcla de varios. Cuando la mezcla es tratada en el curso del análisis, la fase o fases que contienen los analitos de interés es llamada igualmente muestra [Torres, 1994].

Residuo

Los residuos son el resto de sustancias cuya separación cromatográfica no resulta de interés [Torres, 1994].

Retención

La retención es un concepto que brinda noción del tiempo en el que un analito permanece en una determinada fase, en relación al tiempo en el que permanece en otra, debido a fenómenos de adsorción o absorción. La retención del analito en la fase estacionaria depende de la afinidad y de los factores que puedan afectar a la misma [Willard *et al.*, 1974].

Eficiencia

La eficiencia es la capacidad de poder discriminar y distinguir entre dos componentes en un cromatograma [Torres, 1994].

Selectividad

La selectividad es una medida de la habilidad de una columna cromatográfica para separar dos componentes eficientemente. Es un concepto ligado a la granulometría (tamaño de partícula) y al flujo, correspondiente al nivel cinético de la cromatografía por elución en columna [Prado & Covarrubias, 1996; Snyder *et al.*, 2010].

1.9.2 ASPECTOS TEÓRICOS

1.9.2.1 Equilibrio de distribución y coeficiente de reparto

En la cromatografía de líquidos, las separaciones se realizan con base en la diferente distribución de los solutos de una mezcla, entre la fase estacionaria y la fase móvil; esta distribución está representada por un equilibrio al que se asocia una constante, llamada *coeficiente de distribución* o *coeficiente de reparto* [Prado & Covarrubias, 1996].

El coeficiente de reparto es la relación de las concentraciones de soluto entre las móvil y estacionaria, dado el equilibrio de distribución (Fig. 1.8) [Snyder *et al.*, 2010]:

$$S_m \rightleftharpoons S_e \quad K = \frac{[S]_e}{[S]_m} \quad \dots(\text{Ec. 1})$$

- ❖ Donde S_m es el soluto en la fase móvil, S_e es el soluto en la fase estacionaria, K es el coeficiente de reparto, $[S]_e$ es la concentración del soluto en la fase estacionaria y $[S]_m$ es la concentración del soluto en la fase móvil. Las medias flechas representan la movilidad del soluto de una fase a otra, estableciéndose un equilibrio. Cuando $K = 1$, el analito se encuentra igualmente distribuido entre las dos fases.

El coeficiente de reparto determina la velocidad promedio de cada zona de analito, más específicamente, del centro de la zona de analito conforme la fase móvil avanza a lo largo de la columna [Snyder *et al.*, 2010].

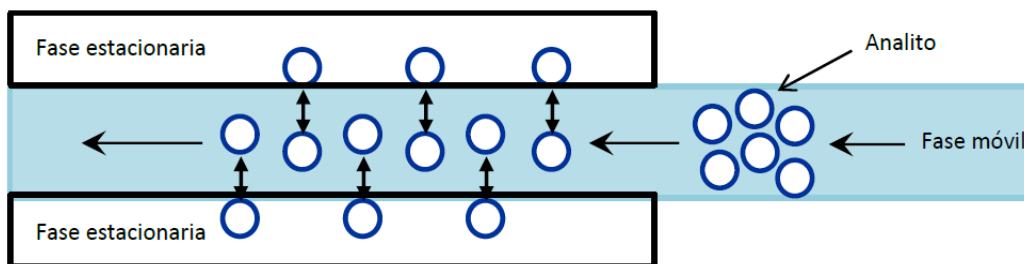


Figura 1.8. Equilibrio de distribución del analito entre las fases estacionaria y móvil [Harris, 2010].

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 [Skoog *et al.*, 2008].

A las condiciones en que se trabaja la cromatografía con fines analíticos, los coeficientes de reparto de los diversos componentes son constantes y los solutos migran en forma de bandas simétricas que se representan por picos gaussianos. Los coeficientes de reparto dependen de las propiedades fisicoquímicas y termodinámicas del soluto en las dos fases [Skoog *et al.*, 2008]. Para hablar en términos de afinidad, resulta conveniente mencionar los cuatro tipos de interacciones [Prado & Covarrubias, 1996] que existen entre las moléculas de disolvente y las de soluto:

- iónica: 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.

1.9.2.2 Separación cromatográfica

En una cromatografía por elución en columna, la señal de salida del detector se va registrando a medida que los componentes se separan (Fig 1.9) [Skoog *et al.*, 2008].

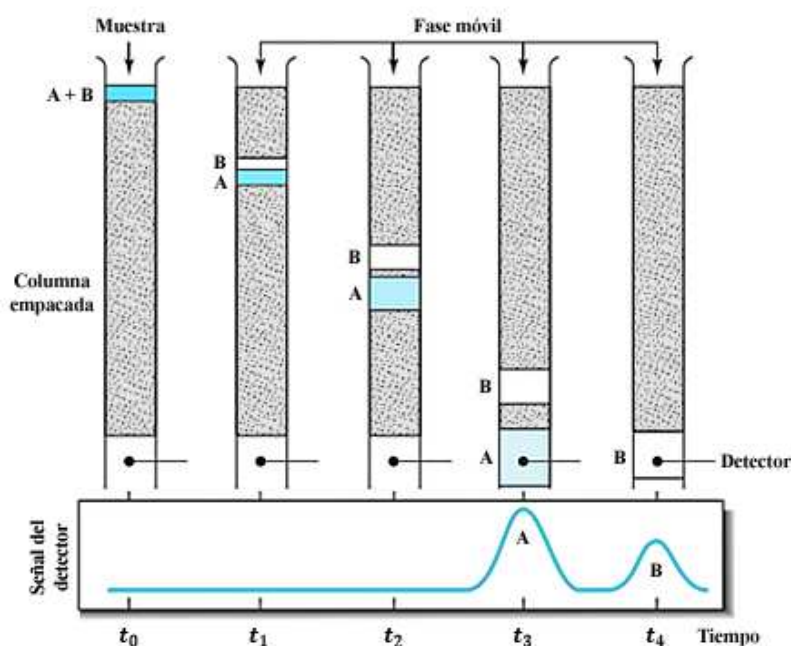


Figura 1.9. Separación de una mezcla de dos componentes A y B con su respectiva señal de salida del detector en las distintas etapas de elución [Skoog *et al.*, 2008].

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 un *pico* distinto [Prado & Covarrubias, 1996 y Skoog *et al.*, 2008].

1.9.2.3 Eficiencia de la separación cromatográfica

En la Figura 1.10 se ilustra la manera en la que uno o dos analitos se desplazan a lo largo de la columna cromatográfica después de ser inyectados.

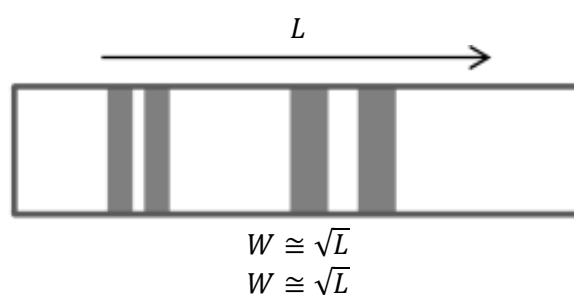


Figura 1.10. Representación gráfica de la migración de analitos a través de la columna [Neue, 1997].

Cuando se inyecta una pequeña cantidad de analito en una columna, se forma una banda estrecha en la parte superior de la misma. A medida que el analito migra a través de la columna, la banda se vuelve más amplia. En un lecho uniforme, la anchura del pico (W) aumenta proporcionalmente con la raíz cuadrada de la longitud (\sqrt{L}) que la banda ha recorrido [Neue, 1997].

Por otra parte, al inyectarse una mezcla que contiene dos analitos, se formará una banda estrecha. Si las afinidades de los analitos por la columna son ligeramente diferentes, también lo serán sus velocidades de migración hacia el final de la misma. A medida que continúan migrando, la distancia entre los centros de las dos bandas (ΔL) aumenta en una relación directamente proporcional a la longitud (L) recorrida entre las bandas. No obstante de estas relaciones, las bandas mencionadas en algún momento estarán completamente separadas; es decir que, cuanto más lejos migran, mejor separación tendrán [Neue, 1997].

1.9.3 PARÁMETROS Y CALIDAD CROMATOGRÁFICA

En cromatografía por elución en columna, los términos que describen a un cromatograma son llamados *parámetros cromatográficos*, los cuales son de vital importancia. Estos parámetros se enuncian a continuación:

Tiempo muerto (t_M)

El tiempo muerto es el tiempo requerido para eluir un soluto que no puede ser retenido en la fase estacionaria [Rouessac & Rouessac, 2007; Snyder *et al.*, 2010].

Tiempo de retención (t_R)

El tiempo de retención es el tiempo característico que tarda un analito particular en pasar a través del sistema (desde la columna de entrada hasta el detector) bajo las condiciones de operación fijadas [Torres, 1994].

Es el tiempo transcurrido desde que se realiza la inyección de la muestra hasta la elución del máximo del pico, es decir, es el tiempo que pasa cada analito en la columna. El valor de este parámetro es usado para establecer la identidad de un compuesto [Rouessac & Rouessac, 2007; Snyder *et al.*, 2010].

Los tiempos de retención son característicos de los compuestos que representan, pero no son únicos. Los tiempos de retención que coincidan entre una muestra y una sustancia de referencia pueden ser utilizados para elaborar un perfil característico, sin embargo este no siempre es suficiente para lograr la identificación [Harris, 2010; USP, 2017].

Tiempo de retención ajustado o corregido (t'_R)

El tiempo de retención corregido mide el tiempo que un componente permanece en la fase estacionaria [Snyder *et al.*, 2010]. Se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$t'_R = t_R - t_M \quad \dots(\text{Ec. 2})$$

Donde t'_R y t_R son, respectivamente, el tiempo de retención corregido y el tiempo de retención (sin corregir) y están definidos para un mismo compuesto; t_M es el tiempo muerto.

Ancho de la base (W_b)

El ancho de la base es la porción de la línea base intersectada por las tangentes trazadas en las porciones de mayor pendiente de la curva. Para un pico gaussiano, se define como cuatro veces la desviación estándar del pico (4σ). Este parámetro ha sido tradicionalmente usado para el cálculo de la eficiencia del sistema [Harris, 2010; Snyder *et al.*, 2010].

Ancho a la mitad de la altura del pico ($W_{h/2}$)

El ancho a la mitad de la altura es el ancho del pico, medida a una altura igual a la mitad del mismo ($\frac{1}{2}h$). Este parámetro es una medida más reproducible, adecuada para evaluar manualmente la eficiencia del sistema (platos teóricos) [Harris, 2010; Snyder *et al.*, 2010].

En la Figura 1.11 se presenta un cromatograma en el que se describen gráficamente algunos parámetros cromatográficos, como lo son el tiempo muerto, el tiempo de retención, el tiempo de retención corregido, la altura del pico, el ancho de la base, entre otros.

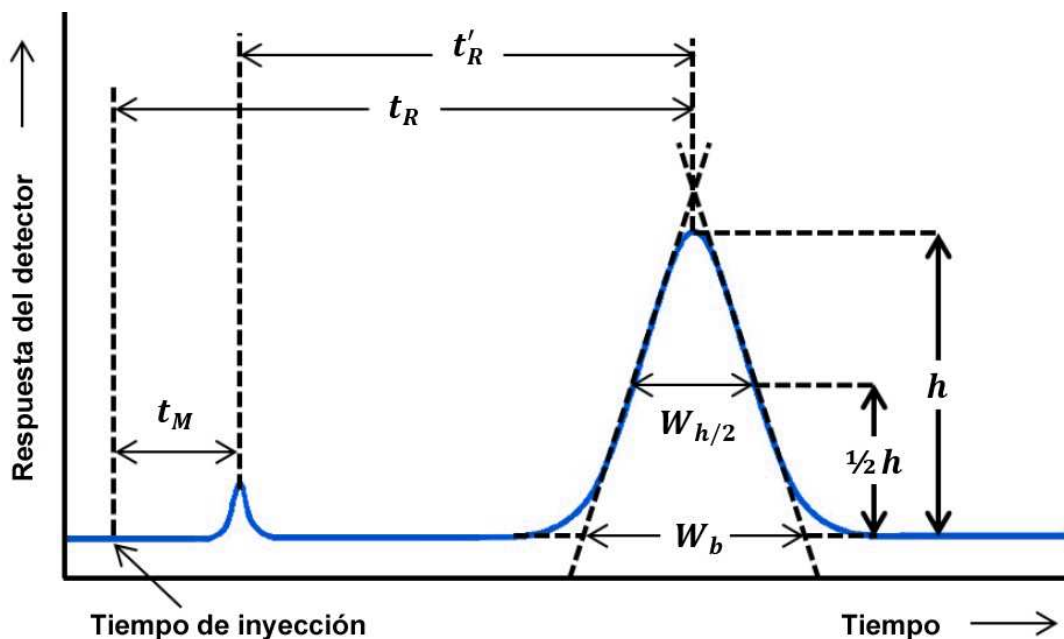


Figura 1.11. Descripción gráfica de algunos parámetros cromatográficos [Harris, 2010].

Volumen muerto (V_M)

El volumen muerto es la cantidad de volumen de fase móvil que se requiere para eluir un analito que no es retenido por la fase estacionaria [USP, 2017]. Se puede calcular a partir del tiempo muerto y de la velocidad de flujo (volumen de disolvente que pasa por la columna por unidad de tiempo) [Rouessac & Rouessac, 2007]:

$$V_M = t_M \cdot F \quad \dots(\text{Ec. 3})$$

❖ Donde V_M es el volumen muerto, t_M es el tiempo muerto y F es el flujo.

Volumen de retención (V_R) y volumen de retención ajustado (V'_R)

El volumen de retención es la cantidad de volumen de fase móvil necesaria para eluir un analito determinado, desde el punto de inyección, pasando por la columna hasta el detector. Se puede calcular a partir del tiempo de retención correspondiente y de la velocidad de flujo [Willard *et al.*, 1974; Rouessac & Rouessac, 2007]:

$$V_R = t_R \cdot F \quad \dots(\text{Ec. 4})$$

❖ Donde: V_R es el volumen de retención, t_R es el tiempo de retención del analito correspondiente y F es el flujo.

El volumen de retención ajustado representa el volumen gastado en el tiempo en que el analito permanece en la fase estacionaria y se calcula mediante la siguiente ecuación [Willard *et al.*, 1974; Rouessac & Rouessac, 2007]:

$$V'_R = V_R - V_M \quad \dots(\text{Ec. 5})$$

❖ Donde V'_R y V_R son, respectivamente, el volumen de retención corregido y el volumen de retención (sin corregir) y están definidos para un mismo compuesto; V_M es el volumen muerto.

Asimetría del pico cromatográfico (A_S)

La asimetría del pico es una medida de la calidad de la columna. Con la edad de la columna, la simetría de pico generalmente se deteriora; por lo tanto se observan picos con “coleo”. Esto es indeseable, ya que afecta la calidad de la integración de un pico cromatográfico, especialmente cuando la relación señal-ruido es baja o cuando los picos se resuelven sólo parcialmente [Neue, 1997].

Existen varias formas de medir el “coleo” de pico. Una muy común es la relación de la anchura de la cola del pico a la anchura de la parte frontal del pico a 5 o 10 % de la altura del pico [Neue, 1997]. Una manera de calcularlo es con la ecuación:

$$A_s = \frac{t_P}{f_P}$$

...(Ec. 6)

- ❖ Donde f_P representa el ancho de pico, desde la parte frontal hasta su máximo y t_P representa el ancho de pico, desde el máximo hasta su cola, medidas a una altura apropiada (Fig. 1.12).

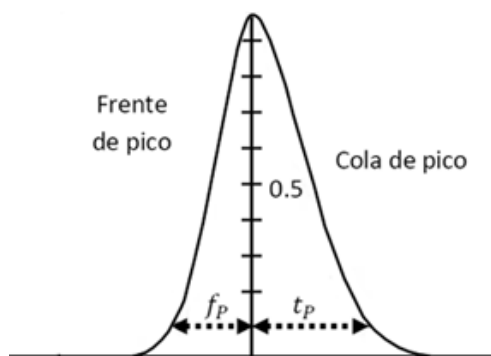


Figura 1.12. Determinación del factor de asimetría, al 10 % de altura [Neue, 1997].

Número de platos teóricos (N)

La eficiencia de la columna está relacionada con el ensanchamiento de la banda que se encuentra en la columna y se expresa como un número de platos teóricos. Las columnas cromatográficas consisten de un número de zonas adyacentes en cada una de las cuales hay suficiente espacio para que un analito esté en equilibrio entre las fases estacionaria y móvil [FQ, 2007]. Cada una de estas zonas se conoce como plato teórico (de los que hay N en cada columna).

El origen de los términos “altura de plato” y “cantidad de platos teóricos” proviene de uno de los primeros estudios teóricos realizados por Martin y Synge, en el que trataron a una columna cromatográfica como si fuera similar a una columna de destilación que estuviera constituida por numerosas capas angostas, o platos, distintos pero contiguos, a las que denominaron *platos teóricos*. Es decir que el número de platos teóricos representa la cantidad de pseudoequilibrios que posee una columna cromatográfica [Skoog *et al.*, 2008].

Cada plato teórico representa un equilibrio teórico de distribución del analito entre las fases. El número total de platos teóricos representa el poder de separación de la columna cromatográfica. Una buena columna tiene un número alto de platos teóricos [Romero, 2002].

Para picos gaussianos, el número de platos teóricos se puede calcular mediante cualquiera de las siguientes ecuaciones [Snyder *et al.*, 2010]:

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{W_b} \right)^2 \quad \dots(\text{Ec. 7})$$

$$N = 5.545 \left(\frac{t_R}{W_{h/2}} \right)^2 \quad \dots(\text{Ec. 8})$$

- ❖ Donde, para un mismo analito: N es el número de platos teóricos, t_R es el tiempo de retención; W_b y $W_{h/2}$ son el ancho de la base y el ancho a la mitad de la altura, respectivamente, del pico cromatográfico atribuido al analito (ver Fig. 1.11).

El valor de N es diferente para cada analito, por lo que depende del analito en estudio, así como de las condiciones de funcionamiento, tales como la velocidad de flujo y la temperatura de la fase móvil, la calidad y uniformidad del empaquetamiento dentro de la columna, el diámetro interno y la longitud de la columna [USP, 2017]. Debido a esto, es importante que las comparaciones sean hechas bajo condiciones idénticas. Además, sólo se puede determinar el valor de N en cromatogramas isocráticos y no en cromatogramas de gradiente, ya que el procedimiento es diferente [Neue, 1997].

En general, el número de platos teóricos es una contribución cinética y corresponde a la medida de cómo está empacada la columna [Prado & Covarrubias, 1996].

Eficiencia de la columna cromatográfica

La calidad de una columna se juzga por el bajo grado de ensanchamiento de los picos o bandas cromatográficas, pues esto es un índice de la posibilidad de lograr una buena separación; mientras más pequeño sea ese ensanchamiento, la columna cromatográfica es más eficiente [Prado & Covarrubias, 1996].

Esta eficiencia cromatográfica está vinculada con el número de platos teóricos (N), por esta razón se considera al 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 [Prado & Covarrubias, 1996]. En este pico gaussiano, el número de platos se puede relacionar con la desviación estándar [Skoog *et al*, 2008]:

$$N = \left(\frac{t_R}{\sigma} \right)^2 \quad \dots(\text{Ec. 9})$$

- ❖ Donde: N es el número de platos teóricos, t_R es el tiempo de retención del soluto y σ es la desviación estándar de la longitud del pico cromatográfico.

A medida que aumenta N , los picos son más estrechos y por lo tanto la columna será más eficiente. Sin embargo, dado que N también depende de la longitud de la columna, se usa otro parámetro, llamado altura del plato teórico [Skoog *et al.*, 2008].

Altura equivalente a un plato teórico (H)

La altura equivalente a un plato teórico, es la distancia que se mueve el analito para lograr un equilibrio de reparto y depende del diseño del sistema. La altura del plato está relacionada con la anchura del pico (cuanta más pequeña es la altura del plato, más estrecha es la banda) del analito y la distancia que recorre dentro de la columna [Rouessac & Rouessac, 2007]:

$$H = \frac{L}{N} \quad \dots(\text{Ec. 10})$$

- ❖ Donde: H es la altura del plato teórico, L es la longitud de la columna cromatográfica y N es el número de platos teóricos.

La altura de plato mide la eficiencia de la columna por unidad de longitud. Mientras menor sea la altura de un plato teórico, mayor será la cantidad de equilibrios que un analito puede alcanzar, dando lugar a un pico mejor definido y una mayor eficiencia [Skoog *et al.*, 2008; Snyder *et al.*, 2010].

La altura equivalente de plato puede relacionarse directamente a las condiciones experimentales y los parámetros de operación [Harris, 2010].

En la medida en que la distribución del analito dentro de la banda es gaussiana, la altura de los platos está dada por la varianza dividida entre la longitud de la columna del empacado [Skoog *et al.*, 2008]:

$$H = \frac{\sigma^2}{L} \quad \dots(\text{Ec. 11})$$

- ❖ Donde: H es la altura del plato teórico, L es la longitud de la columna cromatográfica y σ^2 es la varianza de la longitud.

Como ya se mencionó, 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 [Prado & Covarrubias, 1996]:

- 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.
- c) Con moléculas pequeñas de soluto.

Factor de capacidad o de retención (k')

El factor de retención o de capacidad es una medida del tiempo transcurrido en el que el analito permanece en la fase estacionaria en relación con el tiempo que permanece en la fase móvil, al equilibrio; es decir, es una medida de la retención del analito por la columna [Willard *et al.*, 1974; Rouessac & Rouessac, 2007]:

$$k' = \frac{t_e}{t_m} = \frac{t'_R}{t_M} = \frac{t_R - t_M}{t_M} \quad \dots(\text{Ec. 12})$$

- ❖ Donde k' es el factor de capacidad, t_e es el tiempo que el analito pasa en la fase estacionaria, t_m es el tiempo que pasa en la fase móvil, t'_R es el tiempo de retención corregido, t_R es el tiempo de retención sin corregir del analito y t_M es el tiempo muerto.

Asimismo, el factor de retención se define como el cociente de los moles de un analito en la fase estacionaria entre los moles en la fase móvil. Además, dado el cociente conocido como relación de fases, el factor de capacidad relaciona al equilibrio de distribución de la muestra dentro de la columna, con las propiedades termodinámicas de la columna y con la temperatura [Romero, 2002]:

$$\beta = \frac{V_m}{V_e} \quad \dots(\text{Ec. 13})$$

$$k' = \frac{n_e}{n_m} = \frac{C_e V_e}{C_m V_m} = K \frac{V_e}{V_m} = \frac{K}{\beta} \quad \dots(\text{Ec. 14})$$

- ❖ Donde: β es la relación de fases, V_m es el volumen de la fase móvil, V_e es el volumen de la fase estacionaria, k' es el factor de capacidad, n_e es la cantidad de moles del analito en la fase estacionaria, n_m es la cantidad de moles del analito en la fase móvil, C_e es la concentración del analito en la fase estacionaria, C_m es la concentración del analito en la fase móvil y K es la constante de reparto o de distribución.

La retención del analito en la fase estacionaria depende de la afinidad y de los factores que puedan afectar a la misma [Dabrio *et al.*, 2000].

Factor de selectividad o retención relativa (α)

El factor de selectividad es una medida de la habilidad de una columna para separar dos componentes [Willard *et al.*, 1974]. Se define como la diferencia entre los equilibrios de distribución de dos analitos [Snyder *et al.*, 2010].

En un cromatograma, el primer pico suele ser atribuido a la sustancia que eluye más rápido [Skoog *et al.*, 2008]. Si en una muestra existen dos componentes, '1' y '2' (donde 1 eluye antes que 2), la retención relativa se puede expresar como:

$$\alpha = \frac{t'_{R_2}}{t'_{R_1}} = \frac{V'_{R_2}}{V'_{R_1}} = \frac{K_2}{K_1} = \frac{k'_2}{k'_1} \quad \dots(\text{Ec. 15})$$

- ❖ Donde α es el factor de selectividad. Para los analitos 1 y 2, respectivamente: t'_{R_1} y t'_{R_2} son los tiempos de retención corregidos, V'_{R_1} y V'_{R_2} son los volúmenes de retención corregidos, K_1 y K_2 son las constantes de reparto; k'_2 y k'_1 son los factores de capacidad.

Los valores que puede tomar α dependen de la temperatura de operación de la columna y de la composición química de las fases estacionaria y móvil [Dabrio *et al.*, 2000]. De manera general, cuanto mayor es el factor de selectividad, mayor es la separación entre los dos componentes [Willard *et al.*, 1974]. Se puede afirmar, entonces, que para lograr una buena separación, se deberá tener $\alpha > 1$ (en cuyo caso $t'_{R_2} > t'_{R_1}$).

La retención relativa mide, además, cuán tan afín es un analito, con respecto a otro, a cierta fase estacionaria; esta afinidad depende de la polaridad de los analitos en cuestión y de la naturaleza de la columna [Skoog *et al.*, 2008].

Resolución (R_s)

La resolución mide el grado de separación entre dos picos cromatográficos adyacentes y se define como la distancia entre los centros de dichos picos, dividida entre el promedio del ancho de los mismos [Neue, 1997]. Si la retención y el ancho de pico se miden en unidades de tiempo (Fig. 1.13), la resolución está dada por:

$$R_s = \frac{2(t_{R_2} - t_{R_1})}{W_{b_1} + W_{b_2}}$$

...(Ec. 16)

- ❖ Donde R_s es la resolución. Para los analitos 1 y 2, respectivamente: t_{R_1} y t_{R_2} son los tiempos de retención; W_{b_1} y W_{b_2} son las medidas del ancho de base de los respectivos picos cromatográficos.

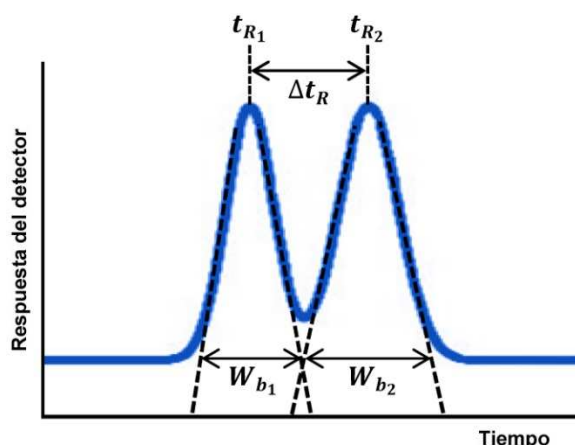


Figura 1.13. Ejemplo de dos picos cromatográficos que presentan cierto traslape entre sí [Harris, 2010].

Como criterio de calidad se tiene que la resolución mínima aceptable para mezclas sencillas es de 1.0, mientras que, para picos de tamaño similar, un valor de 1.5 representa tener una separación a nivel de la línea base (Fig. 1.14) [Rouessac & Rouessac, 2007]. Además, cuando la resolución es igual a 1, se tiene un 95.4 % de separación entre dos picos cromatográficos adyacentes [Neue, 1997]. El hecho de tener una buena separación hace que se puedan medir los tamaños de pico apropiadamente, por lo que se obtiene una cuantificación fiable [Romero, 2002].

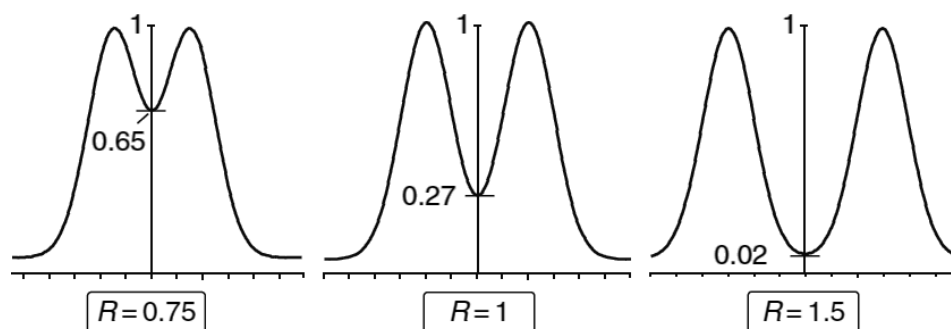


Figura 1.14. Diferentes valores de resolución y su efecto en la separación de dos picos cromatográficos adyacentes [Rouessac & Rouessac, 2007].

La resolución está en función de la selectividad, la eficiencia y la capacidad del sistema cromatográfico, dado que son los tres parámetros más importantes en una columna cromatográfica, su expresión analítica es [Rouessac & Rouessac, 2007]:

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{k'_2}{1 + k'_2} \right)$$

...(Ec. 17)

- ❖ Donde: R_s es la resolución, N es el número de platos teóricos, k'_2 es el factor de capacidad del componente que presenta mayor retención (eluye después) y α es la retención relativa.

La separación entre dos picos cromatográficos aumenta con la resolución. Asimismo, la separación entre los picos será mejor si estos son de igual tamaño, por lo que, para picos diferentes, se requiere una mayor resolución; de esta forma, la resolución que presentan dos picos adyacentes se puede mejorar aumentando la separación entre ellos o disminuyendo el ancho de los mismos [FQ, 2007].

De la ecuación 17, se pueden inferir las siguientes conclusiones [Rouessac & Rouessac, 2007; Harris, 2010]:

- 1) Cuando existe una mayor retención del analito por la fase estacionaria, se tendrá una mejor resolución. Para tener una buena separación cromatográfica, se deberá tener un factor de capacidad $k' > 2$; no obstante, el tener un valor de $k' > 6$, sólo aumentará el tiempo de análisis sin mejorar apreciablemente la separación. De manera general se recomienda: $2 < k' < 6$.
- 2) Cuando una columna tiene una buena capacidad de separar dos analitos (se tiene un factor de selectividad alto), la resolución aumenta notablemente. Generalmente se trabaja en la zona cercana a $\alpha = 1$, por lo que, cualquier aumento en la selectividad provocará que se mejore sustancialmente la separación cromatográfica.
- 3) Se desea que exista un mayor número de equilibrios de distribución posibles para mejorar una separación cromatográfica, esto se logra aumentando el número de platos teóricos (N). Se deben lograr cambios sustanciales de N para que esta mejora sea significativa, es decir, de varios órdenes de magnitud; aumentar ligeramente este valor no representará cambios apreciables. Asimismo se debe buscar aumentar el número de platos teóricos, diseñando sistemas más eficientes (con pequeños valores de H).

Por otra parte, tener un valor de resolución bajo se puede deber a que el tamaño de la muestra inyectada en la columna cromatográfica es muy grande o a que el método utilizado no es el apropiado, debido a su incapacidad de discriminar entre los solutos [FQ, 2007].

Finalmente, resulta importante mencionar que el aumento del número de platos teóricos también puede lograrse mediante el uso de columnas más largas; esto sólo deberá hacerse en casos especiales, ya que adicionalmente se provocará un incremento en los tiempos de análisis [Prado & Covarrubias, 1996].

Ecuación de van Deemter de altura de plato

La eficiencia de las columnas cromatográficas se puede conocer de manera aproximada pero muy satisfactoria mediante la siguiente expresión, llamada ecuación de van Deemter [Rouessac & Rouessac, 2007; Skoog *et al.*, 2008]:

$$H = A + \frac{B}{v} + C \cdot v$$

...(Ec. 18)

- ❖ Donde H es la altura de plato, A es el coeficiente de difusión en remolino, B es el coeficiente de difusión longitudinal, C es el coeficiente de transferencia de masa y v es la velocidad lineal de flujo.

De esta ecuación, las variables A , B y C son constantes, cuyos valores son particulares para una cierta columna y fase estacionaria dadas; es decir que dependen de las características del equipo [Harris, 2010]. A continuación se examinan con algún detalle estas variables [Neue, 1997; Harris, 2000]:

- En el primer término, la variable A , conocida como *coeficiente de difusión en remolino* describe los efectos de la trayectoria múltiple; este término es independiente de la velocidad lineal y está en función del tamaño y distribución de los canales entre partículas y otras uniformidades en el empaquetamiento de la columna.
- En el segundo, se tiene al *coeficiente de difusión longitudinal*, B , el cual es inversamente proporcional a la velocidad lineal y describe la difusión molecular a lo largo del eje de la columna.
- El *coeficiente de transferencia de masa*, C (también denominado *tiempo de equilibrado*), que se debe al tiempo finito requerido por el analito para alcanzar el equilibrio entre las fases estacionaria y móvil, está presente en el último término; es directamente proporcional a la velocidad lineal y en él están contenidos, a su vez, todos los términos relacionados con la transferencia de masa: la resistencia a la transferencia en la fase móvil y la resistencia a la transferencia en la fase estacionaria.

En el siguiente gráfico (Fig. 1.15) se ilustran las contribuciones, de cada uno de los términos de la ecuación de van Deemter, a la altura de plato, en función de la velocidad lineal de flujo [Willard *et al.*, 1974; Harris, 2010]:

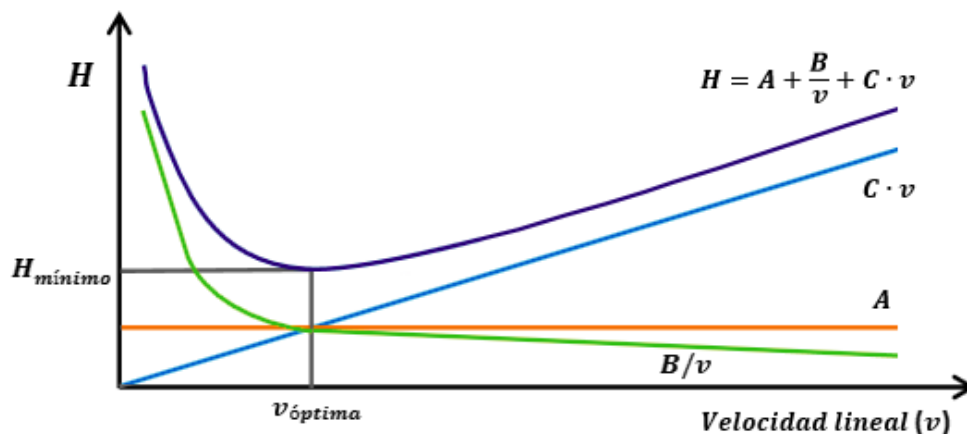


Figura 1.15. Curvas de van Deemter [Harris, 2010].

El análisis de la ecuación de van Deemter arroja una idea de cómo influyen la naturaleza de la columna cromatográfica y el flujo o caudal en la altura del plato teórico [Rouessac & Rouessac, 2007]. Se ha demostrado experimentalmente que esta ecuación permite explicar, con mucha precisión, la eficiencia de una columna cromatográfica [Skoog *et al.*, 2008].

La ecuación de van Deemter indica que existen diferentes mecanismos de ensanchamiento de banda; estos pueden ser, en relación a la velocidad de flujo: linealmente proporcionales, inversamente proporcionales o independientes [Skoog *et al.*, 2008]. Todos estos términos contribuyen al ensanchamiento de banda cuando se usan columnas empaquetadas; es decir, se cumple que A, B y $C \neq 0$ [Harris, 2010].

El gráfico de la Figura 1.15 recibe su nombre gracias al físico Jan van Deemter, quien planteó la teoría de la que deriva la ecuación formulada por un grupo de ingenieros químicos holandeses en los años 50; esta ecuación fue también rebautizada posteriormente en su honor [Skoog *et al.*, 2008].

1.9.4 ANÁLISIS CUANTITATIVO EN CROMATOGRAFÍA

Existen cinco métodos generales para realizar cálculos cuantitativos en un análisis cromatográfico, estos son: normalización de áreas, factores de respuesta, curva de calibración por estándar externo, curva de calibración por estándar interno y el método de las adiciones patrón [Rojas, 2016].

Normalización de áreas

Este método se refiere al cálculo de la composición porcentual de cierto analito, con respecto al resto de los componentes, en una muestra [Harvey, 2000].

$$\% a = \left(\frac{A_a}{\sum_i^N A_i} \right) \cdot 100$$

...(Ec. 19)

- ❖ Donde, % a es el porcentaje del analito ' a ', A_a es el área del pico cromatográfico atribuido al analito ' a ' y $(\sum_i^N A_i)$ es la suma de las áreas de todos los demás componentes (del i -ésimo hasta el componente N).

El método de la normalización de las áreas evita las incertidumbres asociadas con la inyección de la muestra; para su correcta utilización, es necesario que se produzca la elución completa y detección de todos los componentes de la muestra; estos componentes deben tener la misma sensibilidad. En éste procedimiento, se determinan las áreas de todos los picos eluidos; tras corregir dichas áreas, respecto a las diferencias en la respuesta del detector a los distintos tipos de compuestos, se calcula la concentración del analito a partir de la relación de su área con el área total de todos los picos [Skoog *et al.*, 2008].

Este método sólo es válido si la respuesta del detector es la misma para todos los componentes de la muestra; de no ser así, las áreas deberán ser corregidas por un factor de respuesta [Gomis, 2008].

Normalización por factor de respuesta

Los factores de respuesta se utilizan cuando los analitos en una muestra presentan diferentes respuestas frente al detector, es decir, las áreas de los analitos no son directamente proporcionales a la composición [Gomis, 2008].

El factor de respuesta (Fr) se define como el área del pico cromatográfico, atribuido al analito, dividido entre su respectiva concentración [Rojas, 2016]:

$$Fr = \frac{A}{C}$$

...(Ec. 20)

- ❖ Donde, para un cierto analito: Fr es su factor de respuesta, A es el área de su respectivo pico cromatográfico y C es su concentración.

Generalmente, cada componente tiene un factor de respuesta característico. Una vez determinados los factores de respuesta, estos se emplean para calcular la composición porcentual [Navarro *et al.*, 2015]. El área de cada compuesto se multiplica o divide con respecto al factor de respuesta, y se realiza el mismo procedimiento matemático que en el método de normalización [Chavarría, 2010].

Para la correcta aplicación de esta metodología, se requiere la disponibilidad de los respectivos estándares de todos los analitos, además de que, como en el caso anterior, todas las sustancias deben eluir completamente [Rojas, 2016].

Estándar externo o calibración absoluta

Cuando el volumen de la muestra es conocido, con frecuencia se emplea el método del estándar externo; en este método, se preparan disoluciones estándar de los componentes de interés, a diferentes concentraciones conocidas, y se inyectan en el cromatógrafo. Para cada analito, se obtiene el gráfico del área del pico en función de la concentración, al cual, se le conoce como *curva de calibración por estándar externo* [Gomis, 2008].

Éste gráfico deberá abarcar un intervalo de concentraciones, en el que se espera encontrar la concentración del analito por interpolación; es deseable que ésta concentración caiga en la zona centro de dicho intervalo [Chavarría, 2010].

La curva de calibración debe ser lineal y pasar por el origen; al conocer la ecuación de la recta, por medio del método de los mínimos cuadrados, se extrae el valor de la pendiente, el cual, en cromatografía, es el valor del factor de respuesta (Fr) [Harris, 2010].

La concentración del analito se calcula despejando C , de la ecuación de la recta:

$$A = Fr \cdot C \quad \dots(\text{Ec. 21})$$

- ❖ Donde, para un cierto analito: A es el área de su pico cromatográfico, Fr es su factor de respuesta, y C es su concentración.

Para la correcta aplicación de esta metodología, se requiere que el volumen de inyección de muestra permanezca constante y sea repetible [Rojas, 2016]. Los estándares necesarios deben analizarse bajo las mismas condiciones de operación que la muestra. Éste método tiene la ventaja de que sólo se necesita medir las áreas de los picos de interés [Gomis, 2008].

La verificación del comportamiento de un analito mediante una curva de calibración requiere un mínimo de cinco puntos, para un intervalo al 95 % de confianza, y de ocho puntos para uno al 99 % [Dosal & Villanueva, 2008].

Estándar interno o calibración relativa

Este método es muy parecido al de estandarización externa; de igual forma, se preparan estándares que contienen los componentes de la muestra a analizar, sin embargo, ahora, a cada punto de la curva de calibración (cada disolución de diferente concentración) y a la muestra, se les adiciona la misma cantidad de una sustancia llamada *estándar interno*, la cual cuenta con propiedades fisicoquímicas muy parecidas a las del analito; esto se hace con el fin de corregir la inyección y mantener constante la relación de áreas [Gomis, 2008]. A este método también se le llama *curva de calibración relativa*, debido a que se obtienen factores de respuesta relativos y también sigue un modelo lineal. El método del estándar interno se utiliza para mejorar la precisión del sistema de introducción de muestra en cromatografía [Chavarría, 2010].

El método del patrón interno permite que varíen las condiciones de operación entre muestra y muestra y no requiere de repetibilidad en las inyecciones. El patrón interno debe ser un compuesto que pueda resolverse completamente de los picos adyacentes y no debe estar presente en la muestra problema, ni producir ningún efecto interferente [Rojas, 2016].

Para construir la curva de calibración por estándar interno, se grafica el área relativa (Área del analito/Área del estándar interno) en función de la concentración relativa (Conc. del analito/Conc. del est. interno). El comportamiento de éste gráfico debe ser lineal y pasar por el origen; al conocer la ecuación de la recta, por medio del método de los mínimos cuadrados, se extrae el valor de la pendiente, el cual, ahora corresponde al valor del factor de respuesta relativo (Frr) [Harris, 2010].

$$\frac{A_a}{A_{std_{in}}} = Frr \frac{C_a}{C_{std_{in}}} \quad \dots(\text{Ec. 22})$$

- ❖ Donde, A_a y C_a son, respectivamente, el área y la concentración, del analito 'a'; $A_{std_{in}}$ y $C_{std_{in}}$ son, respectivamente, el área y la concentración, del estándar interno y Frr es el factor de respuesta relativo.

El factor de respuesta relativo está definido como [Harris, 2010]:

$$Frr = \frac{A_{rel}}{C_{rel}} = \frac{Fr_a}{Fr_{std_{in}}} \quad \dots(\text{Ec. 23})$$

- ❖ Donde, Frr es el factor de respuesta relativo, A_{rel} es el área relativa, C_{rel} es la concentración relativa; Fr_a y $Fr_{std_{in}}$ son los factores de respuesta del analito 'a' y del estándar interno, respectivamente.

Al igual que en el método de calibración por estándar externo, la concentración del analito se obtiene por interpolación dentro de la curva de calibración, a partir del valor del área de la muestra problema obtenida en el análisis cromatográfico; como la cantidad de patrón interno añadida a la muestra problema es conocida, puede calcularse la cantidad desconocida de componente. Cualquier variación en el tamaño de la muestra se evidenciará al comparar el área de pico del patrón interno en cromatogramas diferentes, pero no afectará al resultado [Gomis, 2008].

Método de las adiciones patrón

El método de las *adiciones estándar* o *adiciones patrón* consiste en la construcción de una curva de calibración, donde se añade una cantidad constante de la muestra a las disoluciones de los estándares y a un blanco [Chavarría, 2010].

Esta metodología se suele realizar para evaluar si existen fenómenos de matriz o cuando se trabaja en el límite de cuantificación del instrumento [Chavarría, 2010].

Este procedimiento se aplica cuando el analito se encuentra en concentraciones bajas y/o cuando el pico cromatográfico no es simétrico. La concentración se determina por extrapolación en la curva de calibración [Rojas, 2016].

En éste método, se adicionan concentraciones conocidas de estándar a la muestra, en orden creciente, y posteriormente se grafican las áreas, obtenidas de los picos cromatográficos, contra la concentración adicionada [Harris, 2010]. Por el método de adiciones estándar, se obtiene una recta (de la forma $y = mx + b$), tal que:

$$A = mC + b \quad \dots(\text{Ec. 24})$$

- ❖ Donde, A es el área del pico cromatográfico, m es la pendiente, C es la concentración adicionada de estándar, y b es la ordenada al origen.

En el método de las adiciones estándar, no se tiene lo que se conoce como estándar cero o muestra sin estándar, como en otros métodos, donde sería el primer punto de la recta, el cual representaría el valor de la ordenada al origen. En este modelo se asume la respuesta como cero, donde el punto de corte de abscisas en vertiente negativa es la concentración del analito en la muestra; es decir: cuando $A = 0$, C representa la concentración del analito, dado que $0 = b + mC$ [Bueno, 2012]. De acuerdo a la curva de calibración por adiciones patrón, se tiene una pendiente negativa ($-m$); despejando C , se tiene:

$$C = \frac{-b}{-m} \quad \dots(\text{Ec. 25})$$

- ❖ Donde, b y m son la ordenada al origen y la pendiente, respectivamente, de la ecuación de la recta; C es la concentración del analito en la muestra.

En éste método, resulta importante la adecuada preparación de los estándares, ya que el modelo matemático empleado asume que el error asociado a ello, es despreciable frente al error de la señal instrumental [Bueno, 2012].

1.10 CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICACIA

La Cromatografía de Líquidos de Alta Eficacia (HPLC, por sus siglas en inglés), es una de las técnicas cromatográficas que tiene un amplio campo de aplicación, ya que realiza purificaciones y separaciones eficientes, las cuales permiten detectar y cuantificar una vasta cantidad de muestras de tipo orgánicas, inorgánicas y biológicas, en matrices que pueden tener un alto grado de complejidad [Rouessac & Rouessac, 2007].

La cromatografía de líquidos de alta resolución (antiguamente referida como alta presión), es una técnica particularmente utilizada en analitos termolábiles de gran polaridad, o bien, con elevada masa molar [Snyder *et al.*, 2010]; esta técnica requiere el uso de presiones elevadas para forzar el paso de disolvente por una columna que contiene partículas muy finas, lo cual produce separaciones de gran resolución [Harris, 2010]. 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, aprovechando al máximo las interacciones disolución/fase móvil/fase estacionaria [Rouessac & Rouessac, 2007], además de que la mayoría de los compuestos no son lo suficientemente volátiles como para poder ser analizados por GC [Harris, 2010]

El efecto de la presión en el sistema cromatográfico HPLC, así como la posibilidad de combinación de disolventes de diferentes polaridades, han favorecido la separación de una gran cantidad de compuestos, de modo que, la cromatografía de líquidos de alta eficacia es un recurso instrumental que completa las aplicaciones de la cromatografía de gases [Prado & Covarrubias, 1996]. La eficiencia de las columnas en HPLC es menor que en GC; sin embargo, la utilización de fases quirales o de nuevas fases estacionarias, así como las técnicas de intercambio de iones o las de interacción hidrófoba, aumentan aún más las posibilidades de la cromatografía de líquidos de alta eficacia [Rouessac & Rouessac, 2007].

La cromatografía en fase reversa es la más comúnmente usada en HPLC [Harvey, 2000]; la cromatografía en fase normal (NP-HPLC) cayó en desuso a los años 1970 debido a su falta de reproductibilidad en los tiempos de retención [Casares, 2010].

1.10.1 INSTRUMENTACIÓN GENERAL

Un equipo de HPLC consta de varios componentes (Fig. 1.16), los cuales tienen funciones específicas y suelen estar integrados en una única unidad (Fig. 1.17), aunque pueden presentarse en módulos separados [Rouessac & Rouessac, 2007].

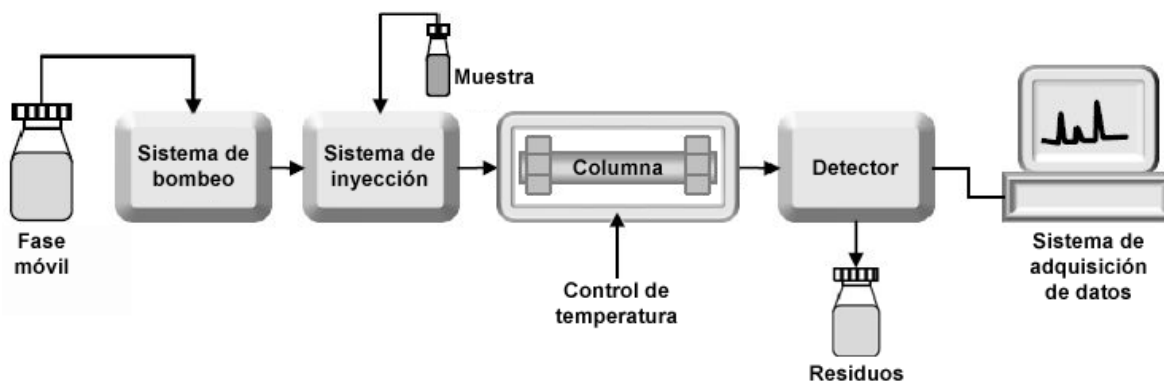


Figura 1.16. Diagrama esquemático de un cromatógrafo de líquidos [Czaplicki, 2013].

Los componentes fundamentales de un cromatógrafo de líquidos son los siguientes:

1. Sistema de suministro de fase móvil
2. Sistema de bombeo
3. Sistema de inyección de muestra
4. Columna cromatográfica
5. Sistema de control de temperatura
6. Sistema de detección
7. Sistema de adquisición de datos



Figura 1.17. Equipo de HPLC (LC-4000).

Además de los dispositivos que se mencionan anteriormente, se pueden incorporar en el sistema otros dispositivos que pueden simplificar el trabajo o mejorar la eficiencia de la técnica cromatográfica [Prado & Covarrubias, 1996]; tales como:

- dispositivo de mezclado de eluyentes
- desgasificadores
- precolumnas
- inyectoros automáticos o automuestreadores
- colectores de fracción de eluatos

1.10.2 PARTES FUNDAMENTALES DE UN EQUIPO DE HPLC

Sistema de suministro de fase móvil

El sistema de suministro de fase móvil está dispuesto por recipientes hechos de un material inerte a la(s) sustancia(s) que conforma(n) la fase móvil; suelen estar hechos, en su mayoría, de vidrio [Dabrio *et al.*, 2000]. Estos recipientes están equipados con mangueras que sirven para introducir los disolventes al cromatógrafo, y, tienen instalados filtros que evitan el paso de partículas al sistema cromatográfico [Rouessac & Rouessac, 2007].

Antes de instalarse el sistema, las fases móviles deben ser desgasificadas para remover el aire y otros gases disueltos que puedan 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 [Prado & Covarrubias, 1996].

Sistema de bombeo

El sistema de bombeo se encarga de la regulación del caudal y presión de la fase móvil. Para conocer la calidad de una bomba HPLC, es necesario saber si el flujo es constante, reproducible y controlado. Al existir fluctuaciones en el flujo, se produce un incremento de ruido en la señal del detector, por lo que resulta más complicado observar señales débiles. Con el fin de mantener el caudal sin pulsos, a menudo se utilizan bombas de alta presión constituidas por varios pistones [Rouessac & Rouessac, 2007].

Las bombas usadas en HPLC deben estar construidas de un material inerte a la fase móvil, para poder trabajar a presiones elevadas y suministrar flujos adecuados al diámetro de la columna empleada y libres de pulsaciones [Dabrio *et al.*, 2000].

Sistema de inyección de muestra

La válvula de inyección es el dispositivo que permite introducir la muestra en el sistema cromatográfico [Dabrio *et al.*, 2000]; se compone de un tubo de acero inoxidable de volumen fijo, con una especie de rizo llamado *loop* [Skoog *et al.*, 2008].

La inyección de un volumen preciso de muestra en la columna debe ser realizada lo más rápido posible, con el fin de disminuir la perturbación causada por la corriente de circulación de la fase móvil [Rouessac & Rouessac, 2007]. Las válvulas tienen dos posiciones [Skoog *et al.*, 2008]:

- 1) *Posición de carga*, donde se llena el *loop* con la muestra, a presión atmosférica; el exceso de muestra va al desagüe.
- 2) *Posición de inyección*, en la que 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.

Columna cromatográfica

La columna es la parte esencial de un cromatógrafo, ya que es ahí donde ocurre la separación. En HPLC, las columnas suelen ser tubos rectos construidos de diversos materiales (*e.g.* metal, vidrio, sílice fundida, polímeros, etc.), de una longitud que puede oscilar entre varios centímetros y más de un centenar de metros, cuyo diámetro interno varía entre varios micrómetros y centímetros. Generalmente, las columnas están recubiertas, en el interior por un material inerte, y en su capa más interna por una fase estacionaria de estructura química variable [Dabrio *et al.*, 2000].

Las columnas pueden ser empaquetadas (también llamadas *empacadas*) o de tubo abierto. Una columna empaquetada se llena con partículas que contienen la fase estacionaria; la columna de tubo abierto se compone de un capilar hueco estrecho, cuyas paredes interiores están cubiertas con la fase estacionaria. En las columnas empaquetadas, el soporte debe ser un sólido poroso con gran área superficial, inerte y con una buena resistencia mecánica [Harris, 2010]; este material inerte mantiene a la fase estacionaria en su superficie [Skoog *et al.*, 2008].

Para seleccionar una columna cromatográfica se deben tomar en cuenta los siguientes aspectos: a) el empaquetamiento de la columna debe tener la estructura química adecuada para realizar la separación y b) las propiedades físicas de la columna, especialmente el tamaño de partícula y las dimensiones de la columna, es decir, su longitud y diámetro [Dabrio *et al.*, 2000; Snyder *et al.*, 2010].

La longitud de columna más común es de 25 cm, la cual cuenta con 40,000 a 60,000 platos teóricos por metro, aproximadamente. No obstante, existen columnas con una longitud que va de 3 a 7.5 cm, pero con un tamaño de partícula menor que el utilizado para las columnas convencionales, cuyo número de platos teóricos es de aproximadamente 100,000 por metro; esto indica una mayor eficiencia en la separación de los analitos de interés, con una reducción importante del tiempo de análisis, sin embargo, necesitan bombas de ultra alta presión [Skoog *et al.*, 2008].

Precolumnas

En muchas ocasiones resulta muy conveniente el uso de *precolumnas*, las cuales son columnas de corta longitud (comúnmente de 0.4 a 1 cm) y se insertan en la entrada de las columnas analíticas; suelen presentar un empaque químicamente similar y un 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 y por ende, aumentar su tiempo de vida útil [Rouessac & Rouessac, 2007; Harris, 2010].

Sistema de control de temperatura

El sistema de control de temperatura es un dispositivo termostatzado que controla la temperatura de la columna [Dabrio *et al.*, 2000]. Cuando se eleva la temperatura dentro de la columna, se disminuye la viscosidad del disolvente, reduciéndose, así, la presión y provocando un mayor caudal. Si se incrementa la temperatura, los tiempos de retención se acortan y se mejora la resolución, ya que se aumenta la velocidad de difusión de los analitos; sin embargo, al aumentar la temperatura se puede degradar la fase estacionaria y a su vez reducir la vida útil de la columna [Harris, 2010]. Muchos operadores consideran que el control de la temperatura es esencial para lograr reproducibilidad en los análisis [Rouessac & Rouessac, 2007].

En cromatografía de líquidos es frecuente trabajar a temperatura ambiente, en cuyo caso se prescinde de este componente [Skoog *et al.*, 2008]. Hay ocasiones en que deben evitarse cambios de temperatura y entonces las columnas funcionan en condiciones isotérmicas con circulación de aire o en cámaras eléctricamente calentadas [Dabrio *et al.*, 2000].

Sistema de detección

El detector es el dispositivo que mide y transforma una propiedad de la fase móvil en una señal eléctrica, dicha propiedad se altera por la presencia de los analitos en la fase móvil [Dabrio *et al.*, 2000].

El detector, independientemente de su naturaleza, debe cumplir las siguientes características básicas: debe tener una respuesta que sea proporcional al flujo de masa instantáneo, ser sensible, preferentemente debe determinar una cantidad mínima detectable, ser capaz de filtrar la mayor parte del ruido de fondo y ser estable a lo largo del tiempo. Asimismo, debe ser muy poco sensible frente a variaciones de flujo, presión, temperatura y corriente eléctrica [Rouessac & Rouessac, 2007].

El detector ideal para cromatografía de líquidos tiene las siguientes características: sensibilidad adecuada, buena estabilidad y reproducibilidad, respuesta lineal amplia, tiempo de respuesta corto e independiente de la velocidad de flujo, alta confiabilidad, sencilla manipulación, respuesta semejante para todos los solutos o altamente selectiva y predecible, y no debe destruir la muestra. Además, un detector de HPLC debe tener un volumen interno mínimo, para reducir el ensanchamiento de banda y debe ser compatible con el flujo de líquidos [Skoog *et al.*, 2008].

Existe una amplia variedad de detectores, los cuales son utilizados dependiendo de las propiedades químicas que los analitos poseen. Los detectores más utilizados en cromatografía de líquidos son: índice de refracción (RID), fluorescencia (FD), absorción atómica (AA), ultravioleta-visible (UV-Vis) y en sistema acoplado a espectrometría de masas (MS) [Rouessac & Rouessac, 2007].

Sistema de adquisición de datos

El sistema de adquisición de datos o de adquisición de señales, es un dispositivo que permite amplificar y convertir al conjunto de señales físicas (de carácter analógico) obtenidas en el detector, en digitales, para su posterior procesamiento de manera electrónica [Dabrio *et al.*, 2000].

1.10.3 TIPOS DE ELUCIÓN

En cromatografía de líquidos, existen dos estrategias generales para llevar a cabo una separación [Dabrio *et al.*, 2000]:

- a. *Elución isocrática*. Todas las condiciones y configuraciones de la separación permanecen constantes; la fuerza eluyente de la fase móvil permanece constante durante el análisis. Se emplea generalmente cuando los componentes de la muestra presentan factores de retención semejantes, por lo que casi siempre es posible encontrar una composición de fase móvil en la que todos los analitos se eluyen con un intervalo de retenciones razonable y con una resolución óptima.
- b. *Elución en gradiente*. En este tipo de elución, uno o más parámetros cambian de forma continua, en la mayoría de los casos sólo se varía un parámetro. Por ejemplo, se modifica el poder de elución de la fase móvil a lo largo del análisis; generalmente se utilizan dos o más disolventes con diferentes polaridades, programándose cambios en la composición de la fase móvil que entra en la columna. También se puede usar un gradiente de temperatura o un gradiente de flujo. La elución por gradiente se emplea en la separación de mezclas complejas, formadas por analitos de distinta naturaleza y que poseen un amplio intervalo de factores de retención.

1.10.4 FASES MÓVILES

La fase móvil tiene un papel primordial en el proceso de cromatografía de líquidos, en lo que respecta a las interacciones con el analito. En HPLC, la naturaleza de la fase móvil se puede cambiar de manera casi ilimitada, de tal forma que su modificación permite variar ampliamente la selectividad y controlar la separación de los componentes de la muestra, aun cuando se cuente con un número limitado de fases estacionarias. Al variar las relaciones de fase móvil y fase estacionaria, así como otros parámetros de operación, se puede afectar el grado de retención, desde obtener la retención total hasta una migración libre [Dabrio *et al.*, 2000].

En cromatografía de fase reversa, se suelen utilizar mezclas acuosas/disolventes orgánicos/buffer de pH para eluir los analitos de la columna. El pH de la fase móvil puede tener un papel importante en la retención y selectividad de ciertos analitos [Mehta, 2012]. Los disolventes orgánicos más utilizados en HPLC son acetonitrilo, metanol y tetrahidrofurano (THF); se pueden usar otros disolventes, como etanol o alcohol isopropílico [Harris, 2010].

1.10.5 CARACTERÍSTICAS DE LA FASE ESTACIONARIA

La fase estacionaria es frecuentemente un líquido que recubre el interior de un tubo capilar o la superficie de partículas sólidas empaquetadas dentro de la columna. Alternativamente, las mismas partículas sólidas pueden ser la fase estacionaria [Harris, 2010]. La fase móvil ocupa los espacios abiertos entre las partículas del material de empaquetamiento [Skoog *et al.*, 2008].

La eficacia de una columna empaquetada aumenta al disminuir el tamaño de las partículas de la fase estacionaria. Al usar partículas pequeñas se obtiene mejor resolución; esto se debe a que entre más pequeñas sean las partículas, menor es la distancia en la que se debe difundir el analito en la fase móvil, además de que permiten que haya un flujo más uniforme a través de la columna. Por el contrario, la desventaja que se presenta con las partículas pequeñas es que oponen resistencia al flujo del disolvente [Harris, 2010].

Los compuestos empleados para empaquetamiento varían, entre los cuales podemos encontrar: tierra de diatomeas (más empleado en GC), alúminas, resinas de intercambio iónico o compuestos de sílice (*e.g.* SiO₂ amorfo), sin embargo, éste debe de someterse a un tratamiento para hacerlo aún más inerte y que pueda ser empleado sin problemas. Es característico que el tamaño de las partículas y de los poros deben ser lo más uniforme posible [FQ, 2007].

En HPLC, los materiales más comunes de la fase estacionaria en una columna empaquetada son las partículas microporosas de forma esférica, de sílice de alta pureza, que son permeables al disolvente y tienen un área superficial de varios centenares de metros cuadrados por gramo [Harris, 2010].

La sílice se disuelve en agua a un pH superior a 8, por lo que se recomienda que no se use por arriba de este valor. Dependiendo de la calidad de la sílice, se puede obtener estabilidad hasta valores de pH de 9 o 10; cuando se analizan compuestos con pH básico, entre 8 y 12, se pueden usar soportes poliméricos, como el poliestireno [Harris, 2010].

Las fases estacionarias más frecuentemente usadas en cromatografía de fase reversa (RP-HPLC) son las llamadas *columnas de fase enlazada* (del inglés *bonded phase*) o *de fase químicamente unida*, las cuales se componen de sílice tratada con RMe_2SiCl , donde R es una cadena alquílica, tales como $C_{18}H_{37}$ (C18) o C_8H_{17} (C8).

Cualquier sustancia inerte no polar que logre un empaque suficiente puede usarse para cromatografía de fase inversa [Casares, 2010]. Estas fases, enlazadas covalentemente, cuya polaridad se puede ajustar fácilmente, pueden ser de dos tipos, monoméricas o poliméricas [Rouessac & Rouessac, 2007].

1.10.5.1 Columnas C18

La columna más usada en RP-HPLC es la de *sílice enlazada a C18* (en inglés *C18-bonded silica phase* y comúnmente referida simplemente como *C18*); está compuesta de sílice químicamente unido a una cadena de carbono octadecil, de donde recibe su nombre. A esta, le siguen la sílice enlazada a C8, la sílice pura, la sílice-ciano y la sílice enlazada a fenilo [USP, 2007]. También existen la sílice enlazada a C4 (con una cadena alquílica de cuatro carbonos) y la de sílice enlazada a dvinilbencilo [Mehta, 2012].

No todas las columnas C18 tienen propiedades de retención idénticas. Si bien el mecanismo de retención general sigue siendo el mismo, diferencias sutiles en la química de la superficie de diferentes fases estacionarias, conducirán a cambios en la selectividad [USP, 2007].

Las columnas C18 son muy flexibles para el desarrollo de métodos y la optimización debido a su amplio rango de condiciones de uso; proporcionan buena retención y resolución en muchas muestras [Mehta, 2012].

1.10.6 CROMATOGRAFÍA DE REPARTO

El tipo de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) más ampliamente utilizado es la cromatografía de reparto, en la cual la fase estacionaria es un segundo líquido que es inmisible con la fase líquida móvil. En el pasado, la mayoría de las aplicaciones se refería a compuestos polares, no iónicos, de baja a moderada masa molar. Sin embargo, recientemente se han desarrollado algunos métodos (derivación y formación de pares iónicos) que han ampliado las separaciones de reparto a los compuestos iónicos. Al principio, en la cromatografía de reparto se utilizaban columnas del tipo líquido-líquido; en la actualidad éstas han sido reemplazadas por columnas de fase líquida químicamente unida, las cuales son compatibles con las técnicas de elución por gradiente [Skoog *et al.*, 2008].

1.10.7 DETECTORES USADOS EN HPLC

Los detectores en cromatografía de líquidos son de dos tipos básicos: Los detectores basados en una propiedad de la solución son sensibles a una propiedad de la fase móvil; en cambio, los detectores basados en una propiedad del soluto responden a alguna de las propiedades de este último [Skoog *et al.*, 2008].

Los sistemas de detección pueden ser sensibles a diferentes propiedades; por ejemplo, la absorbancia, el índice de refracción, la radiactividad, intensidad de corriente, conductividad, fluorescencia, entre otras. [Prado & Covarrubias, 1996].

Los detectores más ampliamente usados en HPLC, se basan en la absorción de radiación UV o visible (ver Fig. 1.5). Los detectores de fluorescencia, índice de refracción y electroquímicos también son muy utilizados. Los detectores de espectrometría de masas tienen gran aceptación en la actualidad; sistemas como los de cromatografía de líquidos-espectrometría de masas representan una gran ayuda para identificar los analitos que salen de una columna [Skoog *et al.*, 2008].

Generalmente se intenta utilizar detectores selectivos para eliminar o disminuir el *clean-up* (limpieza) necesario, disminuyendo el tiempo de análisis y el costo de disolventes, pero se corre el riesgo de aumentar las interferencias y contaminar el sistema [Isern, 2002].

Al detector de índice de refracción (RID) se le considera como universal, ya que la mayoría de las sustancias poseen un índice de refracción característico; no obstante, su principal desventaja radica en su falta de selectividad, además de no poderse utilizar en modo gradiente [Skoog *et al.*, 2008]. Este detector es el más usado en cromatografía de exclusión por tamaño [Rouessac & Rouessac, 2007].

Existen detectores electroquímicos de varios tipos. Aunque los procedimientos electroanalíticos no se han explotado todavía tanto como los detectores ópticos, en muchos casos, parecen ofrecer las ventajas de una elevada sensibilidad, sencillez y una extensa aplicabilidad; sin embargo, la principal limitación de los detectores electroquímicos es que no son compatibles con la elución por gradiente [Skoog *et al.*, 2008].

El detector de conductividad electrolítica (ELCD) es selectivo a iones (electrolitos), generalmente en disolución. Los detectores de conductividad son los más habitualmente utilizados en cromatografía de iones [Rouessac & Rouessac, 2007].

Los detectores espectrofotométricos son selectivos; para los compuestos que no poseen un espectro de absorción significativo, es posible realizar la derivatización de los analitos antes de la detección [Rouessac & Rouessac, 2007]. La derivatización es una técnica que consiste en transformar un compuesto en un producto que posee una estructura química similar [Skoog *et al.*, 2008].

El detector de fluorescencia (FD) es selectivo, ya que se basa en el fenómeno de fluorescencia (absorción de energía electromagnética para su posterior emisión parcial de la misma, con longitud de onda diferente), característico de cierto tipo de analitos. Este detector puede presentar un sistema para derivatización post-columna [Skoog *et al.*, 2008]. Este sistema es empleado frecuentemente en la determinación de plaguicidas como son los carbamatos y glifosatos [Isern, 2002].

El acoplamiento de la cromatografía de líquidos con un espectrómetro de resonancia magnética nuclear protónica (HPLC/¹H-NMR) facilita el estudio de mezclas complejas, compuestas de sustancias desconocidas [Rouessac & Rouessac, 2007].

Un sistema de cromatografía de líquidos acoplado a un espectrómetro de masas en tándem (HPLC-MS) es también muy útil para identificar mezclas de sustancias conocidas cuando se dispone de una base de datos de compuestos bajo investigación [Rouessac & Rouessac, 2007]. Un sistema HPLC-MS brinda una óptima confirmación de resultados debido a la información sobre tiempo de retención y espectro de masa; se han alcanzado valores de 0.01 ppm para algunos plaguicidas [Isern, 2002].

Los detectores comúnmente utilizados para los análisis de triazinas son el tradicional UV-Visible y el de arreglo de diodos (UV-DAD), aunque últimamente se ha visto que la eficiencia del análisis se mejora con los sistemas acoplados [LeBaron *et al.*, 2008].

Ley de Beer-Lambert-Bouguer

La ley de Beer-Lambert-Bouguer establece que la absorbancia de una disolución es directamente proporcional a la concentración del analito presente en ella [Castro de Esparza *et al.*, 2009].

$$A = \epsilon l C$$

...(Ec. 26)

- ❖ Donde, A es la absorbancia, ϵ es el coeficiente de absortividad molar que es característico para cada sustancia, l es la longitud del camino óptico y C es la concentración de la sustancia absorbente.

1.10.7.1 Detector Ultravioleta-Visible (UV-Vis)

Dentro de los detectores utilizados en cromatografía de líquidos, los detectores espectrofotométricos de UV-Visible son de los más utilizados. El principio de funcionamiento de los detectores UV-Vis está fundamentado en la interacción que existe entre la materia y la radiación electromagnética de alta energía. Las moléculas cromóforas y/o que contienen conjugación de enlaces pueden presentar transiciones electrónicas entre los orbitales atómicos o moleculares, a partir de los cuales se puede obtener espectros que son proporcionales a la concentración del analito de interés [Castro de Esparza *et al.*, 2009].

Existen detectores de longitud de onda fija, de longitud de onda variable y de barrido de longitud de onda. Los detectores de barrido de longitud de onda emplean un arreglo de diodos en serie, el cual permite la determinación de un intervalo amplio de longitudes de onda [Lough & Wainer, 1995].

Los detectores de UV-Visible son específicos, ya que detectan analitos con estructuras químicas conjugadas e insaturadas, además de compuestos que absorben radiación electromagnética en el visible y que por lo general tienen un cambio de coloración. Este tipo de detector generalmente tiene buena sensibilidad e intervalo lineal, además puede emplearse en modalidad de gradiente y es poco sensible a los cambios en el caudal y la temperatura [Harvey, 2000].

La detección se basa en la Ley de Lambert-Beer (Ec. 26); la absorbancia de la fase móvil se mide en la salida de la columna, en una o varias longitudes de onda en el espectro UV o visible. La intensidad de la absorción depende del coeficiente de absorptividad molar 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. Es esencial que la fase móvil sea transparente o que tenga una absorbancia muy baja o nula [Rouessac & Rouessac, 2007].

Algunos ejemplos donde se suele aplicar el detector UV-Vis para la determinación de plaguicidas son: herbicidas (*e.g.* 2,4-D, cletodín, atrazina), piretrinas, hormonas (*e.g.* IPC, hidrazida maléica) y fungicidas (benomyl, carbendazín), etc. [Isern, 2002].

1.10.7.2 Detector de Arreglo de Diodos (DAD)

Este tipo de detector emplea diodos de estado sólido, los cuales permiten la determinación espectral continua, realizando barridos en la totalidad del espectro ultravioleta [Lough & Wainer, 1995; Skoog *et al.*, 2008].

El mecanismo de funcionamiento del detector de arreglo de diodos (Fig. 1.18) es el siguiente: La fuente de radiación electromagnética es enfocada y pasa a través del obturador, instrumento que regula el paso de luz, después éste incide sobre la muestra y es reenfocada al policromador, el cual dispersa la luz hacia el arreglo de diodos, donde se determina el intervalo de longitudes de onda [Choi, 2005].

El espectrómetro de arreglo de diodos proporciona un cromatograma que muestra la absorbancia en función de la longitud de onda, en pequeños intervalos de tiempo. Por otra parte, la estabilidad de los fotodiodos en el equipo lo hacen más robusto, ya que este detector posee una resolución de entre 0.5 y 1.5 nm. Es por ello que sus ventajas son inobjetables y radican principalmente en su rapidez, además de poderse evitar corrimientos dados por desajustes del sistema óptico y la capacidad de ofrecer abundante información [Harvey, 2000; Harris, 2010; Skoog *et al.*, 2008].

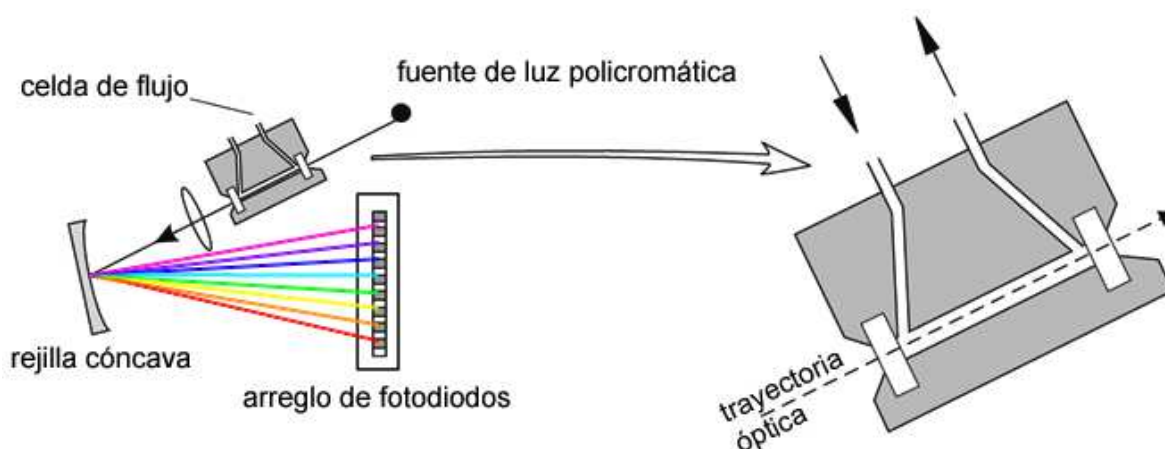


Figura 1.18. Esquema de un detector de arreglo de diodos [Rouessac & Rouessac, 2007].

Los detectores más potentes de ultravioleta, son los de diodos en serie (DAD), tal es así, que generan espectros en unos pocos segundos y además pueden presentar los datos cromatográficos en tercera dimensión si así se desea [Skoog *et al.*, 2008].

Tanto el detector UV-Vis, como el DAD son fáciles de operar o interpretar. Sin embargo, el detector de arreglo de diodos puede escanear una región completa del espectro UV (190-800 nm), a diferencia del UV-Vis, el cual puede escanear una sola longitud de onda. Además, en el desarrollo de métodos, DAD es una mejor opción porque el detector UV-Vis consume mucho tiempo [Choi, 2005; Es'haghi, 2011].

Para la determinación de triazinas se suele elegir a este detector por sobre de otros; e.g. el detector de fluorescencia, el cual no es selectivo. El detector de masas (MS), a pesar de tener alta selectividad y sensibilidad (al igual que el detector DAD) y de ser el que arroja mejores resultados, es a menudo poco accesible debido a su elevado costo [Skoog *et al.*, 2008].

1.11 MÉTODOS DE PREPARACIÓN DE MUESTRA

Hay muchas técnicas de preparación que se pueden utilizar individualmente o de forma secuencial de acuerdo con la complejidad de la muestra, la naturaleza de la matriz, los analitos y las técnicas instrumentales disponibles [Berrueta *et al.*, 1995]. La extracción de compuestos semi-volátiles, particularmente orgánicos de líquidos, implica dos técnicas tradicionales principales: la extracción líquido-líquido (LLE) y la extracción en fase sólida (SPE) [Rouessac & Rouessac, 2007].

Los objetivos principales de la preparación de muestra son: aumentar la concentración del analito (y por lo tanto la sensibilidad del método), eliminar los interferentes en el análisis y, en caso de ser necesario, transformar el analito a una forma más apropiada para el análisis [Smith, 2003].

La preparación de la muestra, ya sea del tipo ambiental, biomédico o farmacéutico, requiere de mucho tiempo en su puesta a punto para su análisis y de esto depende que se tenga una mayor precisión y exactitud para la cuantificación del analito de interés. La limpieza de la muestra puede consumir aproximadamente el 80 % del tiempo de análisis total, e incluye la dilución, precipitación, filtración y procesos de centrifugación [Berrueta *et al.*, 1995].

La pre-concentración de los analitos es importante (especialmente en el análisis de trazas), puesto que permite tanto su almacenamiento, con lo que se asegura que no se degrade, como su transporte; incluso esto permite la realización de un análisis adecuado del mismo [Buszewski & Szultka, 2012].

1.11.1 EXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO (LLE)

La extracción líquido-líquido (LLE, *liquid-liquid extraction*) es una técnica empleada habitualmente para la preparación de muestras acuosas. Se basa en la transferencia de los analitos, entre dos fases líquidas inmiscibles entre sí; la transferencia se da desde la fase polar (generalmente acuosa) hacia la menos polar (generalmente un disolvente orgánico inmiscible en agua), en función de la afinidad relativa que presenten los analitos por dichas fases. Esa afinidad relativa está determinada por su coeficiente de reparto (Ec. 1) [Peña, 2010].

La extracción líquido-líquido ha sido, sin duda, una de las más empleadas. A continuación se enlista algunas de sus ventajas [Berrueta *et al.*, 1995]:

- Separación de analitos sensibles al calor sin necesidad de realizar una destilación a vacío o presión reducida.
- Extracción selectiva de los analitos al seleccionar un buen disolvente.
- Extracción de analitos líquidos, como aceites y grasas.
- Fácil eliminación del disolvente a emplear para una buena purificación del analito.

La LLE, en su forma tradicional, presenta varios inconvenientes, ya que se trata de una técnica lenta y laboriosa, con elevado consumo de disolventes y con problemas adicionales, como la formación de emulsiones y/o la necesidad de etapas adicionales de evaporación de disolvente, lo que la convierte en una técnica poco amigable con el ambiente [Berrueta *et al.*, 1995; Peña, 2010].

1.11.2 EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA (SPE)

La extracción en fase sólida (SPE, *solid-phase extraction*) fue introducida en la década de 1970 y reduce las desventajas de la extracción líquido-líquido. La SPE se logra mediante la interacción de tres componentes: el adsorbente, el analito y el disolvente. El principio de este método es similar a la LLE, que implica una partición de compuestos entre dos fases; los analitos al ser extraídos se reparten entre un sólido y un líquido (a diferencia de entre dos líquidos inmiscibles) y estos analitos deben tener una mayor afinidad por la fase sólida que por la matriz de la muestra (retención o etapa de adsorción). Los compuestos retenidos en la fase sólida se pueden eliminar en una etapa posterior mediante la elución con un disolvente que tenga mayor afinidad por los analitos (elución o etapa de desorción). Los adsorbentes utilizados en SPE son porosos y los analitos siguen la ruta de difusión a través de los poros hasta que alcanzan la superficie y reaccionan por un mecanismo específico. El mejor mecanismo y los procedimientos de extracción en fase sólida se definen por las características del analito en la muestra [Berrueta *et al.*, 1995; Buszewski & Szultka, 2012].

La extracción en fase sólida hace referencia a una técnica de no equilibrio. Puede cumplir dos roles: retener los componentes no deseados de una muestra y permitir la purificación del analito de interés, o bien, retener en el adsorbente el analito de interés y eluir los componentes no deseados [Ridgway *et al.*, 2007].

El proceso de extracción en SPE consta de cuatro pasos fundamentales (Fig. 1.19): acondicionamiento de la columna, carga de la muestra, lavado de la columna y elución de la muestra [Buszewski & Szultka, 2012].

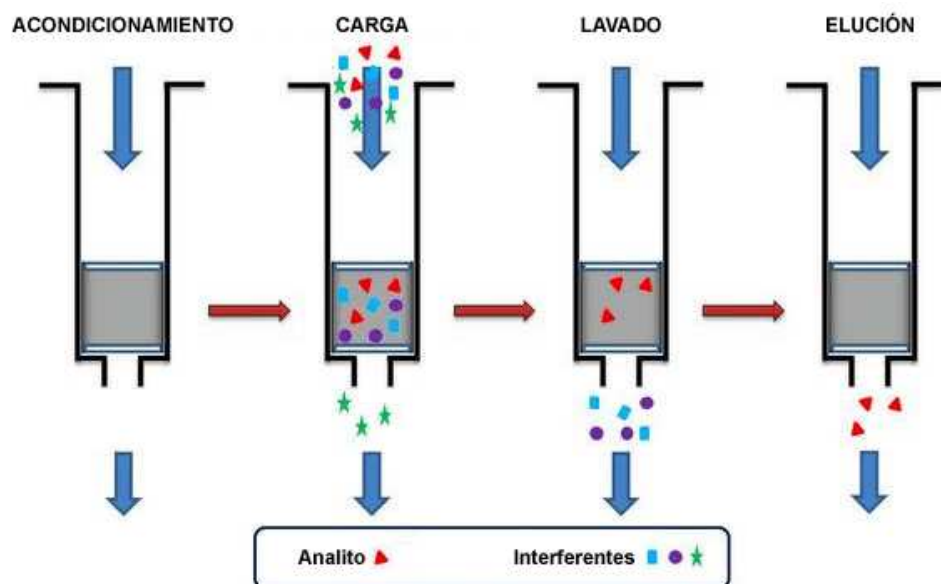


Figura 1.19. Esquema general de la extracción en fase sólida [Alkarawi, 2016].

Algunas de las ventajas de la extracción en fase sólida en comparación con la extracción líquido-líquido involucran la reducción de costos, la reducción de la exposición y consumo de disolventes orgánicos, el hecho de que se evita la formación de emulsiones, la posibilidad de fraccionamiento y muestreo en campo, el almacenamiento seguro de los analitos para su análisis y la posibilidad de automatización en línea con los sistemas cromatográficos [Švarc-Gajić, 2012].

Están disponibles tres tipos de cartuchos SPE comerciales: en forma de jeringas, discos y placas. Además, existe una amplia gama de adsorbentes con diferentes mecanismos de sorción, aprovechando las diferentes interacciones existentes, como las polares, los puentes de hidrógeno y el intercambio iónico; algunos son selectivos para compuestos específicos [Smith, 2003; Ridgway *et al.*, 2007].

1.11.3 TÉCNICAS DE MICROEXTRACCIÓN

A pesar de que aún se utilizan varios métodos de preparación de muestra tradicionales, en los últimos años se diseñaron nuevos métodos que se caracterizan por ser menos dañinos para la ecología del planeta. Estas técnicas novedosas comparten la tendencia de miniaturizar el volumen de la muestra, aumentar la especificidad y selectividad de la extracción, aumentar la automatización y el análisis en línea y utilizar pequeños volúmenes de disolventes [Smith, 2003].

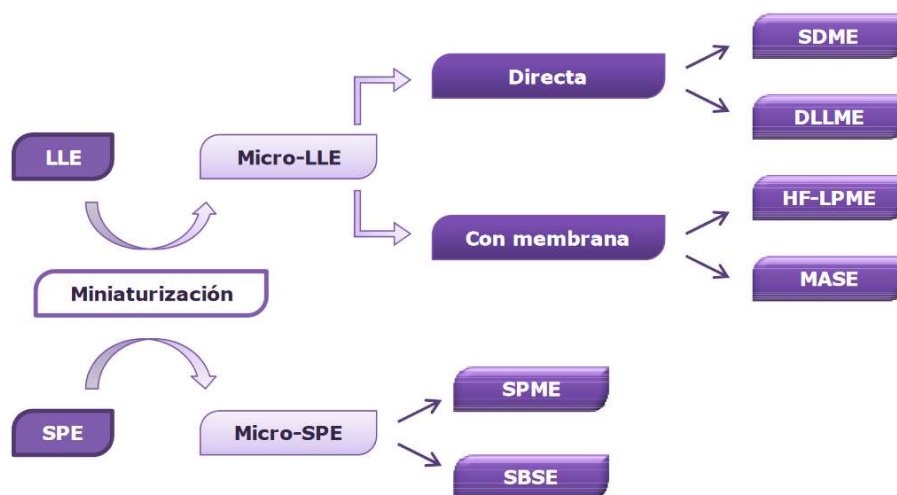


Figura 1.20. Esquema clasificatorio de las técnicas de microextracción [Peña, 2010].

Las técnicas de microextracción se dividen en dos grupos principales (ver Fig. 1.20), aquellas basadas en la extracción líquido-líquido (LLE) y las basadas en la extracción en fase sólida (SPE). Dentro del primer grupo se incluyen: la microextracción de gota simple (SDME, *single-drop microextraction*), la microextracción de flujo continuo (CFME, *continuous-flow microextraction*), la microextracción dispersiva líquido-líquido (DLLME, *dispersive liquid-liquid microextraction*), la microextracción de gota directamente suspendida (DSDME, *directly-suspended droplet microextraction*), la microextracción de disolventes asistidos por membrana (MASE, *membrane assisted solvent extraction*) y la microextracción en fase líquida de fibra hueca (HF-LPME, *hollow-fiber liquid-phase microextraction*). En el segundo grupo, las técnicas principales son la microextracción en fase sólida (SPME) y la *stir bar sorptive extraction* (SBSE) [Leong & Huang, 2008; Sarafraz-Yazdi & Amiri, 2010; Rodríguez *et al.*, 2013].

1.11.4 MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA (SPME)

Con el desarrollo de la microextracción en fase sólida (SPME, *solid-phase microextraction*) ya no es necesario extraer la muestra del cartucho antes de poder inyectarla en un método de separación, como se debe hacer en SPE. La SPME se basa en el equilibrio de distribución; la cantidad extraída depende del coeficiente de partición. La superficie de adsorbente es pequeña, por lo que el analito a menudo no se extrae completamente; sin embargo, se obtiene una muestra representativa que puede compararse con la extracción de una disolución estándar; el rendimiento puede ser susceptible a efectos de matriz. Se puede trabajar en condiciones de no equilibrio siempre y cuando éstas sean reproducibles [Smith, 2003].

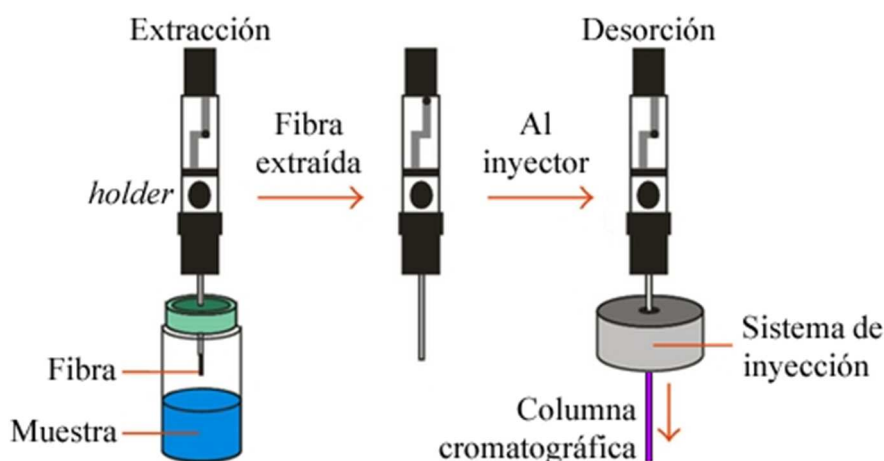
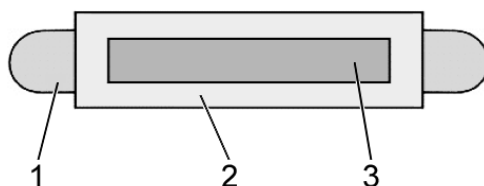


Figura 1.21. Diagrama de un análisis por SPME [Schmidt & Podmore, 2015].

La principal ventaja de la SPME es que no se requiere de disolvente para eluir la muestra (ver Fig. 1.21); hay una transferencia directa desde la disolución de la muestra al método de separación. A menos que la matriz sea muy compleja o no volátil, el adsorbente puede reutilizarse varias veces. Las desventajas son: la extracción puede ser relativamente lenta porque se necesita de suficiente difusión para llevar a los analitos a los sitios de adsorción, el adsorbente puede dañarse por acumulación de materiales no volátiles y una buena reproducibilidad requiere que se establezca un equilibrio. El método ha sido automatizado y existen sistemas comerciales que extraen, agitan e inyectan a la muestra en un sistema GC. También se puede emplear en el análisis por HPLC, donde la muestra se extrae directamente en la corriente de eluyente, en lugar de desorberse térmicamente [Smith, 2003].

1.12 STIR BAR SORPTIVE EXTRACTION (SBSE)

La extracción por sorción en barra de agitación (SBSE, *stir bar sorptive extraction*) fue introducida por el grupo del Dr. Pat Sandra en 1999 [Baltussen *et al.*, 1999] para la determinación de micro-contaminantes orgánicos en disoluciones acuosas [Rykowska & Wasiak, 2013] y con la finalidad de superar algunas de las limitantes de la SPME [Camino-Sánchez *et al.*, 2014]. No obstante, las primeras aplicaciones de la SBSE [Popp *et al.*, 2001] fueron publicadas en el año 2001.



1. Tubo de vidrio 2. Recubrimiento polimérico 3. Barra magnética

Figura 1.22. Descripción gráfica de una barra SBSE [Sandra *et al.*, 2015].

La SBSE es una técnica de preparación de muestra que consiste en una barra de agitación magnética (Fig. 1.22) recubierta de un adsorbente polimérico, en la cual se extraen analitos de matrices líquidas, ya sean acuosas o de otros disolventes [Sandra *et al.*, 2015].

La técnica de preparación de muestra denominada SBSE consta de dos pasos principales: la extracción y la desorción. Existen dos modalidades de extracción: inmersión y *headspace* (Fig. 1.23) [Prieto *et al.*, 2010].

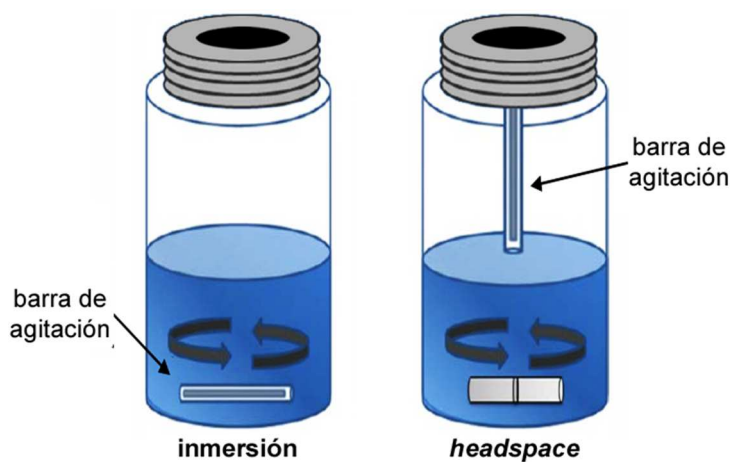


Figura 1.23. Modos de extracción en SBSE [Prieto *et al.*, 2010].

En el modo de inmersión, la barra magnética se introduce en un vial que contiene la muestra líquida y se agita bajo condiciones físicas y químicas controladas (e.g. temperatura y pH). Después de la extracción, la barra magnética se retira y se limpia con agua destilada y desionizada, para eliminar componentes de la muestra y posteriormente se seca con un paño limpio (libre de pelusa) para someterlo a desorción [Prieto *et al.*, 2010]. La etapa de lavado no origina pérdida de los analitos, ya que se encuentran adsorbidos a la fase polimérica [Telgheder *et al.*, 2018].

El uso de la técnica SBSE en fase vapor se conoce como “espacio de cabeza” (HSSE, *headspace sorptive extraction*). En HSSE, la extracción se realiza suspendiendo la barra magnética en un vial, dejando un espacio entre la barra de sorción y la matriz líquida o sólida; para favorecer la volatilización de los analitos, se agita la disolución con una barra de agitación adicional recubierta de teflón [Prieto *et al.*, 2010]. Se sabe que el modo *headspace* incrementa la vida útil de la barra de sorción [Lanças *et al.*, 2009].

En ambos casos, el tiempo de extracción se controla cinéticamente, y está determinado por el volumen de muestra, la velocidad de agitación, la temperatura y las dimensiones de la barra de sorción, y debe optimizarse para cada aplicación [Kataoka, 2010; Telgheder *et al.*, 2018].

Después de la etapa de extracción se realiza la desorción térmica o líquida de los analitos para la posterior realización del análisis cromatográfico o electroforético [Baltussen *et al.*, 1999].

La mayoría de las aplicaciones de SBSE implican el uso de desorción térmica seguida por GC, para recuperar los analitos concentrados de la barra de sorción. La desorción se realiza a temperaturas entre 150-300 °C y tiempos entre 10-15 min; este tipo de desorción evita el uso de disolventes orgánicos y permite la introducción completa de los analitos extraídos, en el sistema cromatográfico [Baltussen *et al.*, 2002]. Para poder realizar la desorción térmica se debe contar con una unidad de desorción térmica (TDU) que consiste en un vaporizador de temperatura programable (PTV), en el que se introduce y calienta la barra extractante para desorber los analitos [Telgheder *et al.*, 2018].

Las desventajas de la desorción térmica radican en su limitación para analitos termoestables y volátiles o semivolátiles, además de la poca accesibilidad de la TDU debido a su elevado costo [Lanças *et al.*, 2009].

La desorción líquida es una alternativa cuando se analizan solutos térmicamente lábiles, cuando las separaciones se llevan a cabo utilizando cromatografía líquida, electroforesis capilar, o bien, si no se dispone del dispositivo de desorción térmica en GC. La barra agitadora se introduce en un disolvente o mezcla de disolventes para la desorción química de los analitos extraídos. El volumen mínimo de disolvente debe garantizar la inmersión completa de la barra recubierta [Baltussen *et al.*, 2002]. Los disolventes utilizados este fin deben ser compatibles con el polímero; los más frecuentes son: MeOH, AcCN y mezclas de éstos, o bien, mezclas acuosas y/o disoluciones amortiguadoras. La desorción puede acelerarse por agitación mecánica o magnética, aumento de temperatura o por sonicación. La desorción líquida del analito dependerá de su constante de reparto entre el polímero extractante y el disolvente de desorción [Telgheder *et al.*, 2018].

1.12.1 TIPOS DE FASES POLIMÉRICAS

Las barras SBSE son comercializadas mediante el nombre *Twister*[®] (Gerstel GmbH & Co. KG, Mülheim an der Ruhr, Alemania) [Rykowska & Wasiak, 2013; Camino-Sánchez *et al.*, 2014; Sandra, *et al.*, 2015]. El Twister es una barra de agitación magnética encapsulada en vidrio y recubierta con un polímero que actúa como adsorbente [Baltussen *et al.*, 1999].

Existen dos presentaciones comerciales de la barra Twister (Fig. 1.24): una barra magnética con polidimetilsiloxano (PDMS) como fase polimérica, para analitos no polares (con $\text{Log } K_{ow} > 4$) y una barra magnética de metal inerte recubierta de etilenglicol/PDMS (*EG/Silicona*), para analitos con polaridad media-alta [Rykowska & Wasiak, 2013; GERSTEL, 2014].



Figura 1.24. Tipos de fases adsorbentes disponibles comercialmente [GERSTEL, 2014].

Las barras de agitación de PDMS están disponibles en diferentes dimensiones: con 0.5 mm o 1 mm de fase polimérica y con longitudes de 10 o 20 mm. Las barras con un recubrimiento más extenso y con un menor grosor de película de PDMS presentan mayor eficiencia de extracción y por lo tanto son adecuadas para análisis con un menor valor de K_{ow} [Sandra *et al.*, 2015].

El material más frecuentemente utilizado como polímero extractante en SBSE es el polidimetilsiloxano (PDMS) debido a que su estabilidad térmica permite que se trabaje en un amplio intervalo de temperaturas (220-320 °C) [Smith, 2003]. Se ha demostrado que las barras de sorción de PDMS son muy efectivas para concentrar componentes que se encuentran a nivel de trazas [Bicchi *et al.*, 2003].

Otros autores [Camino-Sánchez *et al.*, 2014; He *et al.*, 2014] han propuesto la utilización de novedosas fases poliméricas: Neng *et al.* [2011] usaron polvos de carbón activado como material adsorbente para monitorear herbicidas triazínicos en muestras acuosas ambientales. También, el mismo Neng [2007] y co. desarrollaron espumas de poliuretano que a la postre Portugal *et al.* [2010] usaron para analizar metabolitos triazínicos en matrices acuosas a nivel de trazas.

1.12.2 FUNDAMENTOS Y ASPECTOS TEÓRICOS

En la extracción por sorción en barra de agitación, los componentes de una muestra líquida se distribuyen mediante equilibrios de sorción entre la fase polimérica y la fase líquida [Sandra *et al.*, 2015; Telgheder *et al.*, 2018].

La adsorción es un fenómeno en el cual una sustancia se adhiere a una superficie mediante interacciones físicas. En la absorción, las sustancias no sólo interactúan con la superficie de un material, sino que también se introducen a éste. A los fenómenos de absorción y adsorción en conjunto se les conoce como *sorción* [IUPAC, 2014].

La eficiencia de la extracción depende de la naturaleza química de los analitos y de las condiciones hidrodinámicas. Este proceso es cinético y varía hasta alcanzar un estado de equilibrio [Prieto *et al.*, 2010]. La eficiencia de la extracción se rige por el coeficiente de partición entre ambas fases [Rykowska & Wasiak, 2013].

El equilibrio de reparto del analito, entre la matriz estudiada y el material polimérico, puede describirse matemáticamente de la siguiente manera [Prieto *et al.*, 2010]:

$$a_l \rightleftharpoons a_p \quad K = \frac{C_p}{C_l} \quad \dots(\text{Ec. 27})$$

- ❖ Donde, K es la constante de distribución del analito 'a', C_p es la concentración de analito en la fase polimérica y C_l es la concentración de analito en la fase líquida.

Por otra parte, se tienen las siguientes definiciones de la masa total (m_{tot}) y de la relación de fases (β) [Baltussen *et al.*, 2002]:

$$\beta = \frac{V_l}{V_p} \quad \dots(\text{Ec. 28})$$

$$m_{\text{tot}} = m_p + m_l \quad \dots(\text{Ec. 29})$$

Otra forma de expresar la ecuación 27, sustituyendo la definición de β , es la siguiente [Prieto *et al.*, 2010]:

$$K = \frac{m_p}{m_l} \cdot \frac{V_l}{V_p} = \frac{m_p}{m_l} \beta \quad \dots(\text{Ec. 30})$$

- ❖ Donde, K es la constante de distribución del analito, m_p es la masa del analito en la fase polimérica, m_l es la masa del analito en la fase líquida, V_l es el volumen del analito en la fase líquida, V_p es el volumen del analito en la fase polimérica y β es la relación de volúmenes de ambas fases.

Cuando se alcanza el equilibrio, el rendimiento de la extracción se puede estimar a partir del balance de masas y el coeficiente de distribución; combinando las ecuaciones 29 y 30, se tendrá entonces el recobro teórico (R) [Prieto *et al.*, 2010]:

$$R = \frac{m_p}{m_l} = \frac{K}{K + \beta} \quad \dots(\text{Ec. 31})$$

A partir de la ecuación anterior se puede observar que existen dos parámetros determinantes en la extracción mediante SBSE: la afinidad del analito a cada fase y la razón del volumen de las fases (β). Cuanto mayor sea el valor de K y menor el de β , mayor será el recobro del analito (ver Fig. 1.25).

Al trabajar con polidimetilsiloxano como fase polimérica, Sandra y co. [Baltussen *et al.*, 2002] desarrollaron una aproximación que considera que el coeficiente de reparto entre PDMS y agua ($K_{PDMS,W}$) de un analito, es muy similar a su coeficiente de partición octanol-agua (K_{OW}) [Bicchi *et al.*, 2003]; de ella, obtuvieron la ecuación que permite calcular el rendimiento teórico de una forma práctica [Popp *et al.*, 2001]:

$$R \approx \frac{m_{SBSE}}{m_0} = \frac{K_{OW}/\beta}{1 + K_{OW}/\beta} \quad \dots(\text{Ec. 32})$$

- ❖ Donde, R es el recobro teórico, m_{SBSE} es la masa de analito presente en la fase polimérica de PDMS, m_0 es la masa total de analito originalmente presente en la muestra, K_{OW} es el coeficiente de partición n -octanol-agua y β es la relación de fases.

La eficiencia de extracción en *stir bar* es mucho mayor que la que se obtiene por medio de microextracción en fase sólida. Esto se debe principalmente a la relación de fases; el volumen de fase adsorbente en SBSE es, aproximadamente, de cientos a miles de veces mayor al usado en SPME [Camino-Sánchez *et al.*, 2014]. Lo mencionado anteriormente se observa al analizar la Figura 1.25: el volumen de la fibra de SPME es generalmente de 0.5 μL y el de la barra magnética es de 24 μL (la más pequeña); comúnmente se emplea un volumen de extracción de 10 mL, esto significa una relación de fases que oscila entre 400 para SBSE y 20,000 para SPME [Prieto *et al.*, 2010].

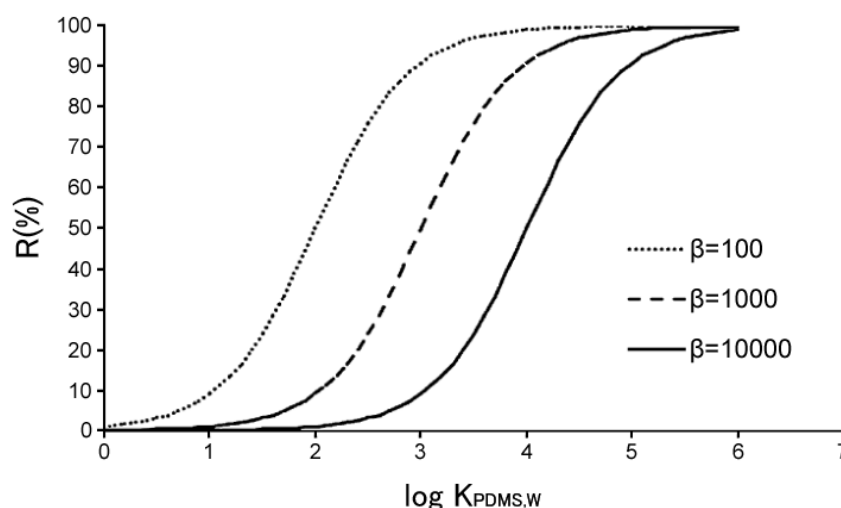


Figura 1.25. Recobro teórico porcentual vs. $\log K_{PDMS,W}$ para una fase polimérica de 24 μL de PDMS y una concentración inicial de analito acuoso de 1 ng/mL [Prieto *et al.*, 2010].

1.12.3 FACTORES QUE AFECTAN A LA EXTRACCIÓN

En cuanto a la etapa de extracción, las variables más estudiadas son: tiempo de extracción, pH, fuerza iónica, adición de un modificador orgánico, la velocidad de agitación, la temperatura de extracción y el volumen de la muestra. Algunas de estas variables, como el pH o la fuerza iónica, modifican las características de los analitos y afectan el equilibrio; otro grupo de variables aceleran el proceso de extracción, afectando la cinética [Prieto *et al.*, 2010].

El rendimiento de extracción también puede ser modificado al variar condiciones tales como el tiempo y temperatura, tanto de extracción como de desorción, el pH de extracción, la velocidad de agitación magnética y la modificación de la fuerza iónica mediante la adición de sales inertes (*salting out*) [Prieto *et al.*, 2010].

Los principales factores que afectan a la extracción en SBSE se describen a continuación, según lo reportado por Baltussen *et al.* [1999] y Prieto *et al.* [2010]:

Fuerza iónica

Para analitos no polares, la adición de sal provoca un "efecto aceite" que promueve el movimiento de compuestos no polares a la superficie del disolvente, minimizando la interacción con el PDMS de la barra de sorción. Esto puede deberse a un aumento en la viscosidad del medio de extracción, el cual disminuye la cinética de extracción de los compuestos; o bien, debido a la ocupación del área superficial del PDMS con los iones de sal, disminuyendo la disponibilidad de sitios para interaccionar con los analitos.

En el caso de analitos polares, la adición de una sal inerte reduce las interacciones de solvatación entre las moléculas de disolvente del medio de extracción y las de los analitos, permitiendo la migración de éstos hacia el PDMS de la barra magnética.

Modificadores orgánicos

La adición de modificadores orgánicos tiene como objetivo disminuir la pérdida de analitos por las paredes del vidrio del material empleado; también puede aumentar la solubilidad de los compuestos en la fase líquida, disminuyendo la eficiencia de la extracción.

pH

El pH de la muestra es una variable importante durante la extracción por SBSE para analitos con propiedades ácido-base. El pH se ajusta con el fin de obtener analitos parcial o totalmente en forma molecular y así asegurar la migración de los mismos hacia la fase polimérica de la barra y maximizar la eficiencia de extracción. Para evitar la degradación del PDMS, es preferible trabajar en un rango de pH de 2 a 9.

Temperatura de extracción

El equilibrio en la extracción con barra magnética es exotérmico, un aumento en la temperatura de extracción favorece el equilibrio de desorción, disminuyendo la eficiencia de la extracción. Se ha reportado un incremento en la vida útil del PDMS cuando se trabaja con temperaturas de extracción menores a 40 °C.

Tiempo de extracción

El tiempo de extracción es relativo, esta técnica no es exhaustiva y no se requiere llegar al equilibrio. El tiempo de extracción se selecciona de acuerdo al nivel de preconcentración deseado.

Velocidad de agitación

La velocidad de agitación aumenta la eficiencia de la extracción, ya que se aumenta la difusión de las moléculas de analito hacia la fase polimérica de la barra de sorción. Sin embargo, el aumento de la velocidad de agitación puede causar un daño físico al polímero que recubre a la barra, debido al contacto directo de la misma con la parte inferior del vial que contiene al medio de extracción; para ello, se recomienda trabajar a velocidades de agitación menores a 1200 rpm.

1.12.4 FACTORES QUE AFECTAN A LA DESORCIÓN

Los factores que afectan la desorción térmica son la temperatura y el tiempo. El equilibrio de desorción es endotérmico, el incremento de la temperatura de desorción aumenta la eficiencia de la extracción. La temperatura de desorción empleada normalmente oscila entre 150-300 °C; este intervalo de temperatura incrementa la vida útil del PDMS en la barra magnética [Prieto *et al.*, 2010].

El tiempo y la temperatura de desorción deben garantizar la migración completa de los analitos que se encuentran en la fase polimérica de la barra hacia el medio de desorción. El volumen de desorción debe cubrir la barra magnética para garantizar el contacto entre los analitos estudiados y la fase polimérica de la barra magnética. Además del tiempo y temperatura, la desorción líquida también se ve afectada por la naturaleza del disolvente empleado para ello [Prieto *et al.*, 2010].

1.12.5 VENTAJAS Y LIMITACIONES

Aunque la SBSE se ha aplicado ampliamente en todos los campos analíticos, como la alimentación, el ambiente, y análisis biomédicos, tiene también algunas limitaciones, como la fuerte presencia de efectos de matriz y la necesidad de controlar cuidadosamente las condiciones de extracción [Camino-Sánchez *et al.*, 2014].

Otro de los inconvenientes está relacionado con el hecho de que la barra de agitación recubierta no puede ser desorbida directamente en el cromatógrafo de gases, se necesita adicionalmente una TDU, o en caso contrario, se adicionan pasos a la metodología si se realiza desorción líquida, aumentando el error. La automatización de estos pasos es posible, pero incrementa el costo de la extracción [Baltussen *et al.*, 2002].

Se ha demostrado que la SBSE ofrece recobros muy altos y una capacidad de concentración al nivel de las ppt [Bicchi *et al.*, 2003]. Una de las principales desventajas de la SBSE es la escasa variedad de fases poliméricas comercialmente disponibles y la pobre selectividad de las mismas, así como su limitado espectro de polaridades [He *et al.*, 2014].

1.12.6 PARÁMETROS DE LA SBSE

Con base en las propiedades fisicoquímicas del analito y la naturaleza de la matriz y de acuerdo a la meta deseada de extracción, se selecciona el adsorbente adecuado que recubra a las barras de sorción. Posteriormente se debe efectuar la optimización de los siguientes parámetros: a. acondicionamiento, b. carga, c. lavado, d. elución y e. regeneración [Nickerson & Colón, 2011; Švarc-Gajić, 2012].

Acondicionamiento del adsorbente

El adsorbente de las barras de agitación debe estar limpio antes de su uso para prevenir el falseo del análisis por cromatografía [Isern, 2002]. Durante esta etapa se sumerge a la barra en un disolvente que sea compatible con la fase polimérica, con el fin de eliminar las impurezas de la película de recubrimiento de las barras y garantizar que el adsorbente tenga disponibles los sitios, que interaccionan con las moléculas del analito, y así, se produzca su retención satisfactoriamente [Nickerson & Colón, 2011].

Carga de la muestra

En la carga, se pone en contacto a la muestra líquida con la barra de sorción, con el objetivo de retener al analito(s) de interés. Durante esta etapa, a la que se le llama etapa de adsorción, es muy común que otros componentes indeseables (interferentes), presentes en la matriz, también sean retenidos en el adsorbente, lo cual se procura evitar o minimizar al máximo [Nickerson & Colón, 2011].

Volumen de fuga

El volumen de fuga representa al volumen máximo de muestra que puede ponerse en contacto con la superficie del adsorbente de la barra de sorción, obteniéndose un recobro teórico del 100 % (cantidad de analito recuperada en la etapa de elución). La fuga ocurre cuando el analito de interés no es suficientemente retenido por el adsorbente o cuando la capacidad del adsorbente ha sido saturada (sobrecarga). El volumen de fuga puede determinarse por medio de una curva de ruptura (Fig. 1.26); la no adecuada determinación del mismo puede provocar errores críticos en la cuantificación del analito de interés [Nickerson & Colón, 2011].

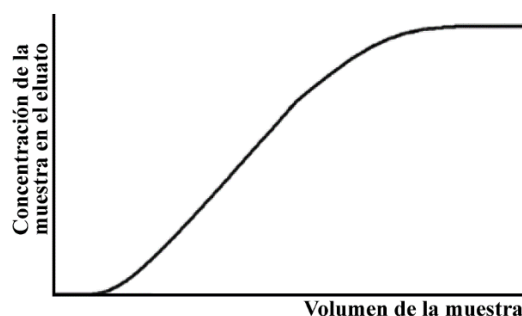


Figura 1.26. Ejemplo de una curva de ruptura [Nickerson & Colón, 2011].

Lavado o limpieza del adsorbente

La limpieza o *clean-up* es el proceso de purificación de los extractos a fin de permitir una identificación definitiva del residuo en los límites de cuantificación requeridos y minimizar la contaminación en el sistema cromatográfico [Isern, 2002].

Ya que es muy común que durante la etapa de carga de la muestra se queden retenidas especies indeseables en el adsorbente que recubre a las barras de sorción, es necesario efectuar su extracción empleando un disolvente que tenga la capacidad de eluirlas selectivamente, sin la remoción del(los) analito(s) de interés. La etapa de limpieza es extremadamente importante cuando los analitos son desorbidos térmicamente, a fin de evitar la formación de material no volátil que pueda obstruir el sistema de desorción (TDU) [Prieto *et al.*, 2010].

Elución o recuperación del analito

En esta etapa se eluye el analito de interés del adsorbente utilizando un disolvente o disolución adecuados, cuyo volumen sea menor que el volumen inicial empleado durante la etapa de carga de la muestra, que permita realizar la preconcentración del analito para su posterior determinación o cuantificación [Švarc-Gajić, 2012].

Regeneración

Con la finalidad de asegurar la eficacia en la posterior reutilización de las barras de sorción, se debe limpiar la superficie del adsorbente de las mismas, por medio de la extracción de todas las especies químicas que quedaron retenidas después de la etapa de elución, de manera análoga al acondicionamiento [Švarc-Gajić, 2012].

Almacenamiento

Para asegurar la conservación de las muestras, estas deben ser almacenadas bajo congelación/refrigeración. Se debe tener en cuenta la estabilidad de los compuestos en disolución. Además, las muestras deberán ser re-homogeneizadas una vez que son retiradas de su almacenamiento. Los extractos y las disoluciones de ensayos finales no deben ser expuestos al calor ni a la luz solar. Se debe asegurar que las disoluciones estándar no se descompongan o se concentren debido a la evaporación del disolvente [Isern, 2002].

1.13 VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

En la práctica del análisis químico existen innumerables razones para realizar pruebas, mediciones y exámenes en laboratorios a nivel mundial, por ejemplo, controlar la calidad del agua potable y de riego, en alimentos, análisis médicos, productos de alto valor agregado entre muchas otras más, las cuales requieren una gran confiabilidad ya que las decisiones importantes dependen de los resultados que estas mediciones produzcan [Eurolab, 2016].

Es por ello necesario que los métodos de análisis, así como los resultados analíticos sean sometidos a algún criterio de aceptación que les permita documentar su calidad y verificar que los procedimientos experimentales cumplan con los criterios de calidad solicitados por el cliente y sean adecuados al uso específico por el cual fueron desarrollados. Ese procedimiento es conocido como *validación de método* y es aplicado por un innumerable grupo de laboratorios alrededor del mundo y ampliamente recomendado por diversos organismos como la EPA (U.S. Environmental Protection Agency), FDA (U.S. Food and Drug Administration), EURACHEM (Analytical Chemistry in Europe), ISO (International Organization for Standardization), así como la EMA (Entidad Mexicana de Acreditación) y el CENAM (Centro Nacional de Metrología) en México [CDER, 1994].

Para demostrar que un método es válido para un analito específico, en una matriz particular, se debe disponer como mínimo de un blanco de reactivos y un blanco de productos, en ausencia de interferencias; así como la evaluación de la recuperación del analito agregado a una muestra libre de interferentes, con un nivel cercano a la tolerancia y, finalmente, fijar los límites de detección y cuantificación [Isern, 2002].

1.13.1 DEFINICIÓN DE VALIDACIÓN

La validación es definida por la norma ISO 8402:1994 como “la confirmación, a través de la aportación de evidencia objetiva, de que se han cumplido los requisitos particulares para un uso o aplicación específico previsto”. También se define como “la confirmación, a través de examen y aportación de evidencia objetiva, de que se cumplen los requisitos particulares para un uso específico previsto” [ISO 17025].

La validación es “una adaptación específica de una técnica analítica, para un propósito de medición seleccionado, es un procedimiento para establecer por medio de estudios de laboratorios, una base de datos que demuestren científicamente que un método analítico tiene las características de desempeño adecuadas para cumplir los requerimientos de las aplicaciones analíticas pretendidas” [CENAM-EMA, 2008].

En otras palabras, la validación se define como: “el proceso de establecer las características de desempeño y las limitaciones de un método y la identificación de las influencias que pueden cambiar esas características, y en qué medida” [CENAM, 2005; CENAM-EMA, 2012; Lazos & Hernández, 2004].

1.13.1.1 Validación parcial (confirmación del método)

La validación parcial es la evidencia objetiva para demostrar que al aplicar un método normalizado, se cumple con las especificaciones del mismo y se cuenta con la competencia técnica para realizarlo adecuadamente tomando en consideración sus propias instalaciones, equipo y personal [COFEPRIS, 2011].

1.13.2 MÉTODOS NORMALIZADOS Y NO NORMALIZADOS

Un método normalizado es un proceso de medición robusto en el que no se deben producir grandes variaciones en los resultados si se realizan pequeñas variaciones en el procedimiento. Los métodos validados son a menudo publicados por organismos reconocidos como lo son la Entidad Mexicana de Acreditación (EMA), el Centro Nacional de Metrología (CENAM) y el Diario Oficial de la Federación (DOF), donde se publican íntegramente las Normas Oficiales Mexicanas (NOM), entre otros [Eurolab, 2016].

Un método no normalizado es un método alternativo al método normalizado que demuestra o estima el mismo analito, mediante un método no reportado oficialmente y puede ser [Eurolab, 2016]:

- a) Desarrollado por el propio laboratorio.
- b) Obtenido de publicaciones científicas.
- c) Un método normalizado modificado, ampliado o usado fuera de su alcance.

1.13.3 CUÁNDO VALIDAR UN MÉTODO

Un método debe ser validado cuando sea necesario demostrar que sus características de desempeño son adecuadas para un uso previsto. Es decir, se debe validar cuando se presentan los siguientes casos [Eurolab, 2016]:

- Cuando se tiene un método no normalizado
- Se pretende obtener una acreditación (EMA, ISO/IEC 17025) o una certificación (ISO 9000)
- El método ha sido diseñado/desarrollado por el laboratorio
- Cuando se cuenta con métodos normalizados, utilizados fuera de su ámbito de aplicación, o bien, se tienen diferentes analistas o instrumentos
- Se tienen ampliaciones o modificaciones de métodos normalizados
- Si el control de calidad indica que un método está cambiando con respecto al tiempo
- Para demostrar la equivalencia entre dos métodos, por ejemplo, entre un método nuevo y uno de referencia

El alcance de la validación depende de la aplicación, su naturaleza y las circunstancias en las que se utilizará [Peters *et al.*, 2007] y deberá ser tan amplio como sea necesario para cumplir los requisitos en relación con su aplicación [Eurolab, 2016].

1.13.4 PARÁMETROS DE DESEMPEÑO Y DEFINICIONES

Para establecer el alcance de la validación, es necesario establecer el grado apropiado de parámetros de desempeño que deben aplicarse en función de las necesidades del método. El laboratorio será el encargado de decidir las características de desempeño que deben ser investigadas para validar el método, asimismo deben tomarse en cuenta las limitaciones impuestas, los requisitos legales y de los clientes, así como las experiencias y las herramientas de trabajo disponibles [Eurolab, 2016].

Las definiciones de los términos utilizados en la validación se enuncian a continuación, de acuerdo a lo descrito por COFEPRIS [2011] y Eurolab [2016]:

Analito

El analito es el componente específico de una muestra a medir en un análisis.

Blancos

En la idealidad, un blanco es una muestra que contiene todos los componentes de la matriz excepto el analito. El uso de diversos tipos de blancos permite evaluar qué tanto de la señal medida es atribuible al analito y qué tanto se debe a otras causas.

Blancos reactivos

Los blancos reactivos son todos aquellos reactivos usados durante el proceso analítico, incluyendo los disolventes usados para la extracción y la disolución. Se analizan por separado con el fin de evaluar su contribución a la señal de medición; si éstos contribuyen a la señal, la misma podrá ser corregida de forma adecuada.

Blancos de muestra

Los blancos de muestra son básicamente matrices sin analito, son difíciles de obtener, pero brindan la oportunidad de estimar de forma realista las interferencias que pueden encontrarse en el análisis de muestras de prueba.

Incertidumbre

La incertidumbre es la estimación que caracteriza al rango de valores, dentro del cual se encuentra el valor convencionalmente verdadero de la magnitud medida.

Intervalo lineal

El intervalo lineal se define como el intervalo de concentraciones del analito, sobre el cual, el método proporciona resultados de pruebas proporcionales a la concentración del analito.

Intervalo de trabajo

El intervalo de trabajo es el rango o intervalo comprendido entre las concentraciones superior e inferior (incluyendo a las mismas), para las que se ha demostrado que el analito es cuantificado con un nivel satisfactorio de repetibilidad, recuperación y linealidad. Este rango no necesariamente debe abarcar todo el intervalo lineal.

Límite de detección (LOD)

El límite de detección es la concentración más baja a la cual puede detectarse el analito, pero no necesariamente cuantificarse bajo las condiciones experimentales establecidas. La ISO lo define como “el valor mínimo detectable de la variable de estado definida” [ISO/IEC 17025].

De manera general, el límite de detección puede ser descrito como aquella concentración que proporciona una señal en el instrumento significativamente diferente a la señal del blanco o el ruido de fondo [CDER, 1994].

El límite de detección está matemáticamente definido como la concentración de analito que proporciona una señal igual a la del blanco (X_B) más tres veces la desviación estándar del blanco (S_B).

$$\text{LOD} = \frac{X_B + 3 \cdot S_B}{m_B} \quad \dots(\text{Ec. 33})$$

❖ Donde m_B es la pendiente de la curva de calibración.

Límite de cuantificación (LOQ)

El límite de cuantificación está definido como la concentración más baja de analito que puede ser determinada con un nivel aceptable de precisión, repetibilidad y veracidad. Éstos son característicos del desempeño que marcan la habilidad de un proceso de medición con el fin de cuantificar adecuadamente un analito [CDER, 1994]. Esto se traduce matemáticamente como la concentración de analito que proporciona una señal igual a la del blanco (X_B) más diez veces la desviación estándar del mismo (S_B).

$$\text{LOQ} = \frac{X_B + 10 \cdot S_B}{m_B} \quad \dots(\text{Ec. 34})$$

❖ Donde m_B es la pendiente de la curva de calibración.

Linealidad

La linealidad es la medida de la capacidad de un método analítico para dar resultados que son directamente proporcionales a la concentración de analito dentro de un intervalo dado.

Material de referencia

Un material de referencia es una sustancia de la cual uno o más valores de sus propiedades son suficientemente homogéneos y bien definidos. Cuando éste va acompañado de un certificado es denominado material de referencia certificado (MRC), en él, uno o más valores de sus propiedades están certificados por un procedimiento que establece trazabilidad a una realización exacta de la unidad en la cual se expresan los valores de la propiedad; va acompañado de la incertidumbre con un nivel de confianza determinado.

Matriz o placebo

La matriz es la suma de todos los componentes de un producto que contiene cierta muestra, a excepción del analito.

Muestra adicionada o fortificada

Una muestra fortificada o enriquecida es una porción representativa del material a evaluar a la que se le adicionan cantidades conocidas del analito de interés.

Precisión

La ISO define a la precisión como “la proximidad de concordancia entre los resultados de pruebas independientes obtenidos bajo condiciones estipuladas” [ISO/IEC 17025]. La precisión se evalúa por medio del cálculo del coeficiente de variabilidad (% CV). Las medidas más comunes de este parámetro son la repetibilidad y la reproducibilidad [Miller & Miller, 2002].

$$\% CV = \frac{S_B}{X} \cdot 100 \quad \dots(\text{Ec. 35})$$

- ❖ Donde S_B es la desviación estándar y X es la media aritmética para un conjunto de mediciones.

La desviación estándar, a su vez, se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$S_B = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - X)^2}{n-1}} \quad \dots(\text{Ec. 36})$$

- ❖ Donde X_i es el valor de la i -ésima medición y n es el número de mediciones realizadas.

Exactitud

La exactitud expresa la proximidad de un único resultado a un valor de referencia. Es el grado de concordancia entre el resultado de una medición y un valor verdadero (o real) de una medida. La exactitud se evalúa mediante el porcentaje de error:

$$\% \text{ error} = \frac{C_{\text{calc}} - C_{\text{real}}}{C_{\text{real}}} \cdot 100 \quad \dots(\text{Ec. 37})$$

- ❖ Donde C_{real} es la concentración teórica no determinada por el método y C_{calc} es la concentración calculada, obtenida experimentalmente usando la ecuación de regresión.

Recuperación o recobro

El recobro consiste en la adición de una fracción de analito a una muestra de prueba (muestra fortificada) previa al análisis, que es determinada efectivamente por el método y permite evaluar la eficiencia de la extracción.

El porcentaje de recuperación se determina por medio de la siguiente ecuación:

$$\% R = \left[\frac{C_F - C_U}{C_A} \right] \cdot 100 \quad \dots(\text{Ec. 38})$$

- ❖ Donde C_F es la concentración de analito medida en la muestra fortificada, C_U es la concentración de analito medida en la muestra sin fortificar y C_A es la concentración de analito adicionado en la muestra fortificada.

Por otra parte, para determinar si hay o no diferencia significativa entre la exactitud de los métodos comparados, se debe llevar a cabo un análisis de varianza del porcentaje de recuperación o del error relativo en porcentaje; se puede efectuar por medio de un placebo o con muestra:

- a) Con placebo: Se utiliza una mezcla preparada en el laboratorio de todos los componentes de la matriz de la muestra sin el principio activo a determinar, luego el placebo se enriquece con un estándar (fortificación).
- b) Con muestra: Cuando no es posible contar con un placebo, se determina por replicado el contenido promedio de analito en la muestra con el método a validar; una vez conocido el contenido promedio, se procede a enriquecer las muestras con estándar. Al preparar las disoluciones, en este caso se mantiene constante la cantidad de muestra tomada y se agregan cantidades variables del estándar.

En ambos casos, tanto con muestra o con placebo, se preparan disoluciones de placebo o de muestras fortificadas a tres niveles de concentración diferentes; los valores sugeridos en la literatura son 80, 100 y 120 % de la concentración normal de trabajo del método.

La Conferencia Internacional sobre la Armonización (ICH, por sus siglas en inglés) recomienda preparar muestras independientes por triplicado a cada nivel de concentración [Shabir, 2003]. En el caso en que se trabaje con muestra enriquecida, para llevar a cabo el cálculo del porcentaje de recuperación, se requiere contar con los datos de contenido del analito en la muestra antes de la adición de un estándar.

Repetibilidad

La repetibilidad representa el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el proceso se aplica repetidamente a diferentes porciones de una muestra homogénea, por un solo analista y utilizando los mismos instrumentos y el mismo método, en intervalos cortos de tiempo.

Reproducibilidad

La reproducibilidad es el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el proceso se aplica repetidamente a diferentes porciones de una muestra homogénea, por dos analistas o instrumentos diferentes, utilizando el mismo método en diferentes días.

Respuesta analítica

La respuesta analítica es la lectura del detector obtenida al aplicar un método analítico; por ejemplo: el área o altura del pico en un cromatograma, una lectura de absorbancia, iones en un espectro de masas, potencial en una voltamperometría, mililitros gastados en una volumetría, diferencia de peso en gravimetría, entre otros.

Robustez

La robustez es la medida de la capacidad del método analítico de permanecer inalterado por pequeñas, pero deliberadas variaciones en los parámetros del mismo, proporcionando un índice de su confiabilidad durante su uso normal.

Selectividad

La selectividad es la capacidad de un método para determinar exacta y específicamente el analito de interés en presencia de otros componentes en una matriz de muestra, bajo las condiciones de prueba establecidas.

Sensibilidad

La sensibilidad es el cambio en la respuesta del instrumento que corresponde a un cambio en la concentración de analito. Cuanto mayor sea la pendiente del intervalo de trabajo, mayor será la sensibilidad del método.

Sesgo

El sesgo es la diferencia entre el valor promedio obtenido de los resultados de prueba con respecto a un valor de referencia aceptado o conocido.

Veracidad

La veracidad es la proximidad de concordancia entre el valor promedio obtenido de una serie grande de resultados de prueba y un valor de referencia aceptado. La medida de la veracidad se expresa por lo general en términos de sesgo. Se puede evaluar por medio de las tres formas siguientes:

- Uso de materiales de referencia
- Uso de métodos de referencia
- Realización de experimentos de recobro

1.13.5 CRITERIOS DE ACEPTACIÓN

La validación de un método es un requisito importante en la práctica del análisis químico. Diferentes organismos europeos y americanos, relacionados con las buenas prácticas de laboratorio, recomiendan que los datos analíticos obtenidos sean sometidos a algún criterio de aceptación, con el objetivo de garantizar que estos datos son los que habría que esperar [COFEPRIS, 2011].

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 [Colín, 2017].

En las tablas 1.6, 1.7 y 1.8, se citan los criterios de aceptación descritos en el manual de la Secretaría de Salud titulado *CCAyAC-P-058: "Criterios para la validación de métodos fisicoquímicos"*.

Tabla 1.6. Criterios de aceptación para diversos parámetros.

Parámetro	Criterio de aceptación
Intervalo lineal	a) Comportamiento lineal en la gráfica de concentración vs. respuesta analítica
	b) Datos aleatorios en el gráfico de residuales
Intervalo de trabajo	a) Pendiente (m): valor cercano a 1
	b) Coeficiente de correlación: <ul style="list-style-type: none"> ○ $r \geq 0.98$ para cuantificación de residuos e impurezas ○ $r \geq 0.99$ para cuantificación de contenido e ingrediente activo
Límite de cuantificación práctico	Nivel inferior estimado en el intervalo de trabajo
Límite de cuantificación estimado	Menor o igual al nivel inferior estimado en el intervalo de trabajo
Límite de detección	Los establecidos en la referencia original del método. Si no se dispone de estos datos, usar como guía las tablas 1.7 o 1.8.
Recuperación o recobro	
Repetibilidad	
Reproducibilidad	
Robustez	Si al variarse cada uno de los factores que puedan tener un efecto significativo en el desempeño del método no se influye en el resultado, el método es robusto.

[Fuente: COFEPRIS, 2011]

Los criterios de aceptación para el parámetro de recuperación o recobro se presentan en la tabla 1.7.

1.13.5.1 Aceptación de Recuperación o Recobro

Tabla 1.7. Criterio de aceptación de recobro para residuos y contaminantes en alimentos y agua.

Concentración del analito	Porcentaje de recobro
< 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	70-110 %
100 a 1000 mg/L	85-110 %

[Fuente: COFEPRIS, 2011]

Para que sea aceptado un cierto valor de los parámetros de desempeño, obtenido durante la validación, este tendrá que caer dentro del intervalo establecido en los criterios citados en las tablas 1.6, 1.7 y 1.8.

1.13.5.2 Aceptación de Repetibilidad y Reproducibilidad

Tabla 1.8. Criterios de aceptación de repetibilidad y reproducibilidad para residuos y contaminantes en alimentos y agua.

Concentración del analito	Repetibilidad (r)	Reproducibilidad (R)
< 1 µg/L	$CV_r \leq 35 \%$	$CV_R \leq 53 \%$
1 a 10 µg/L	$CV_r \leq 30 \%$	$CV_R \leq 45 \%$
10 a 100 µg/L	$CV_r \leq 20 \%$	$CV_R \leq 32 \%$
0.1 a 100 mg/L	$CV_r \leq 15 \%$	$CV_R \leq 23 \%$
100 a 1000 mg/L	$CV_r \leq 10 \%$	$CV_R \leq 16 \%$

[Fuente: COFEPRIS, 2011]

1.13.6 CALIBRACIÓN

Dado que la determinación de la exactitud de un método es parte de su validación, 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 lograr esto es mediante la calibración [Miller & Miller, 2002]. La calibración es el proceso de comparar los valores obtenidos por un instrumento de medición con la medida correspondiente de un patrón de referencia o estándar [BIPM, 2008].

Mediante la calibración se relaciona a la señal analítica medida con la concentración del analito. 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 [Skoog *et al.*, 2008].

1.13.6.1 Curvas de calibración

Para realizar el método de las curvas de calibrado, se introducen en el instrumento varios patrones que contienen concentraciones exactamente conocidas del analito y se registra la señal instrumental; normalmente esta señal se corrige con la correspondiente señal obtenida con el blanco. Con los datos obtenidos, se obtiene un gráfico de la señal corregida del instrumento frente a la concentración de analito y por medio del método de los mínimos cuadrados se obtiene la ecuación de la curva de calibración, la cual permite calcular la concentración de las muestras [Skoog *et al.*, 2008].

El éxito del método de la curva de calibrado depende, en gran medida, de la exactitud que tenga la concentración de los patrones y de la similitud entre la matriz de los patrones a la de las muestras a analizar. Lamentablemente, reproducir la matriz de muestras complejas suele resultar difícil, y sus efectos dan lugar a errores por interferencias; para minimizarlas, a menudo, es necesario separar al analito del interferente antes de medir la señal del instrumento [Skoog *et al.*, 2008].

1.13.7 MUESTREO

Se conoce como muestreo a la técnica para la selección de una muestra a partir de una población estadística. Al elegir una muestra aleatoria se espera conseguir que sus propiedades sean extrapolables a la población [UNISON, 2001].

Para que una muestra sea representativa, y por lo tanto útil, debe de reflejar las similitudes y diferencias encontradas en la población. La función básica del muestreo es, por lo tanto, determinar cuál parte de una población debe examinarse, con la finalidad de hacer inferencias sobre la misma. Esta metodología permite obtener resultados similares a los que se alcanzarían si se realizase un estudio de toda la población, pudiéndose ahorrar recursos en el proceso [CHUA, 2001].

1.14 PROBLEMAS EN EL ANÁLISIS CUANTITATIVO

Los problemas analíticos más relevantes y que surgen más frecuentemente son el alcanzar la sensibilidad requerida para los niveles de tolerancia en el orden de las ppm o las ppb, y la detección de residuos en matrices complejas [Isern, 2002]. Para evitar o minimizar estos problemas, se recomienda: a) eliminar interferencias; b) evitar la contaminación, ya que se pueden producir falsos positivos y/o pérdida de sensibilidad, lo que a su vez puede impedir la detección; c) evitar pérdidas, ya que el recobro de analito es generalmente una medida de la eficiencia del método.

1.14.1 EFECTO MATRIZ

El efecto matriz es ocasionado por la forma química que presenta el analito en la muestra, así como su entorno fisicoquímico (presencia de componentes en la muestra que interaccionan con el analito); puede tener efectos selectivos sobre el analito o bien efectos generales. Dicho efecto se ve reflejado en el cambio de la pendiente en una curva de calibración, es decir, un cambio en la sensibilidad del método producida por la matriz [Miller & Miller, 2002].

La matriz puede contar con interferencias que traen como resultado sesgo en la medición analítica, provocada por diferencias significativas entre los estándares y la muestra tratada o por una diferencia en la especiación entre el analito existente en la muestra problema y el analito en los estándares. El efecto matriz puede afectar el análisis de recobros del analito o la calibración del método, el cual es un problema importante. Dependiendo de la técnica instrumental que se use, será importante eliminar dicho efecto, ya que el analito puede verse afectado por medio de posibles reacciones de derivatización o degradación, antes de que se realice la determinación; para ello, se emplea el análisis de recobros o el método de calibración interna (adición de estándares). El análisis de recobros consiste en la elaboración de una curva de calibración que incluya seis niveles a lo largo del intervalo lineal, empleando a la matriz como si fuera una disolución estándar y comparando la concentración obtenida por medio de la determinación con la concentración adicionada teóricamente; el valor de la pendiente deberá ser prácticamente igual a la unidad [Thompson & Ellison, 2004].

1.15 DESCRIPCIÓN DE LA ZONA DE ESTUDIO

El sistema lagunar Montebello, se encuentra localizado al sureste del estado de Chiapas, muy cerca de la frontera con Guatemala entre 16°5' y 16°10' de latitud y entre 91°38' y 91°47' de longitud. El área natural protegida con carácter de Parque Nacional *Lagunas de Montebello*, decretado el 16 de diciembre de 1959, cuenta con una extensión de 63.96 km², con una altitud entre 1,200 y 1,800 m s.n.m. y se encuentra a 61 km de la ciudad de Comitán. Es considerada una Región Terrestre prioritaria para la conservación [CONANP-SEMARNAT, 2007].

El clima de la región de la cuenca del Río Grande de Comitán-Lagos de Montebello varía de templado a cálido con lluvias todo el año con una precipitación anual de 1,800 mm y una temperatura anual media de 17 °C [Durán *et al.*, 2014].

El Río Grande de Comitán recorre zonas urbanas y agrícolas, hasta desembocar en el sistema Lagos de Montebello (Fig. 1.27), constituido por más de cincuenta lagos de origen kárstico; es decir que este sistema se encuentra interconectado hidráulicamente [CONANP-SEMARNAT, 2007; Mora *et al.*, 2017].

La principal producción de las zonas agrícolas que rodean al Sistema Lagunar Montebello es el maíz, el cual es un claro indicador de los efectos de la atrazina, ya que a fechas actuales, la actividad agrícola manifestada a las orillas y regiones circundantes a las lagunas: Balamtetic, Bosque Azul, San Lorenzo, Vuelta el Agua y Yalmus, muestran, a través de estudios previos, evidencia de concentraciones del herbicida atrazina y otros plaguicidas organoclorados importantes en la zona [Olea, 2015; Durán *et al.*, 2014; Bello, 2016].

Desde su establecimiento, la principal actividad económica de las comunidades de la zona de Montebello ha sido la agricultura, realizada con la técnica tradicional de roza- tumba-quema y un franco carácter de autoconsumo, realizado con base en la mano de obra familiar que se practica en espacios reducidos y se ciñe a la temporalidad de los cultivos. Los principales cultivos son: maíz, frijol, calabaza, chilacayote, tomate y chile. Aunado al crecimiento de la comunidad Tzisco, se avanzó en la frontera agrícola [CONANP-SEMARNAT, 2007; DOF, 2009-b].

En Montebello, las áreas de explotación agrícola están ubicadas en la Subzona de Recuperación, compuesta en la parte norte y noroeste del área, por los ejidos Miguel Hidalgo y Ojo de Agua y en la parte sur, por el ejido Tzisco. Los cultivos básicos de maíz, frijol, café, tomate y hortalizas sustentan una producción de autoconsumo y un mercado limitado, con la excepción del café orgánico producido en Tzisco que compete en el mercado de exportación [DOF, 2009-b; Durán *et al.*, 2014].

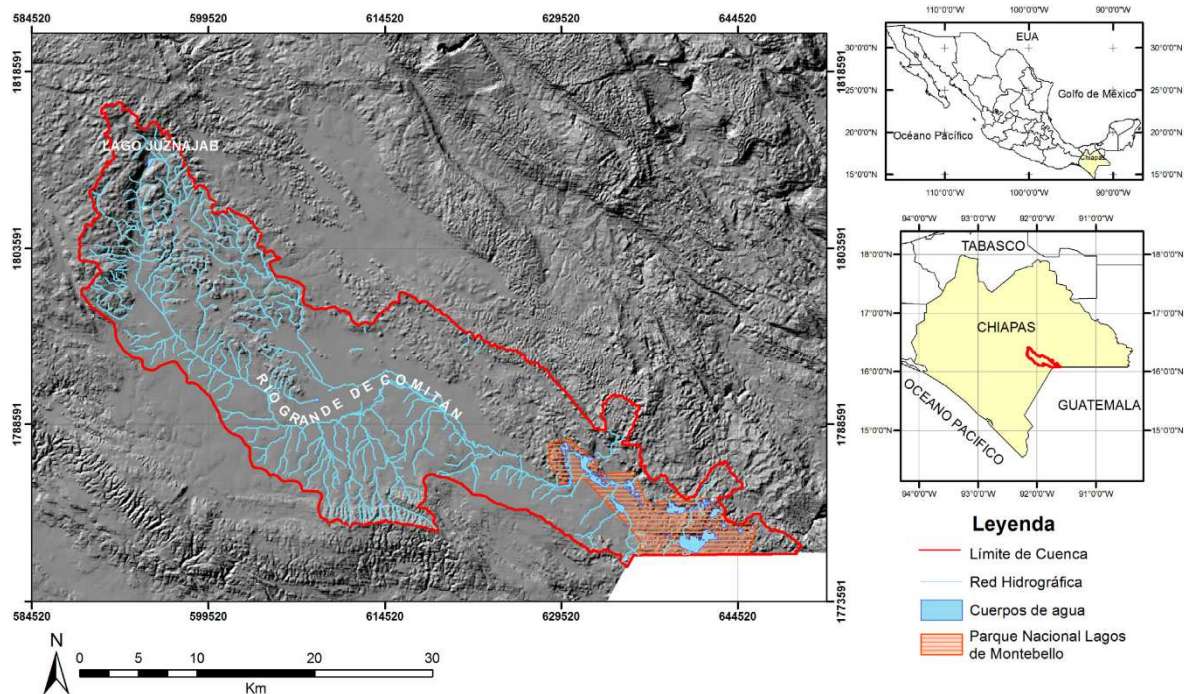


Figura 1.27. Localización de la cuenca del Río Grande de Comitán-Lagos de Montebello [Mora *et al.*, 2016].

Desde el año 2003, los lagos han sufrido la decoloración de sus aguas, así como la saturación de olores fétidos, los cuales han sido provocados por varios factores, entre los que destacan las descargas de aguas residuales, principalmente provenientes de la ciudad de Comitán, así como del abuso de agroquímicos de alta toxicidad por parte de los campesinos de la región [Change.org, 2006].

La descarga de aguas residuales urbanas sin tratamiento adecuado, el drenaje proveniente de zonas agrícolas que aportan nutrientes al agua superficial, la infiltración de líquidos contaminados por la agricultura intensiva de bajo riego, y la infiltración en fosas sépticas y letrinas de los poblados, aportan contaminantes al agua subterránea [CONAGUA, 2016].

2. DESARROLLO EXPERIMENTAL

2.1 INSTRUMENTACIÓN

2.1.1 EQUIPOS

- Sistema cromatográfico de líquidos constituido por dos bombas binarias de alta presión modelo 1525, un automuestreador modelo 717 plus y un detector de arreglo de diodos UV-DAD modelo 2998, todos ellos de la marca Waters, controlados por el software de adquisición de datos *Empower 2™ (Build 2154) Enterprise* (Fig. A6), también de Waters Co.
- Balanza analítica con capacidad de 210.0 g y precisión de 1.0 mg, marca Ohaus, modelo Explorer.
- Filtros de jeringa Ministart®, de 25 mm de diámetro y 0.45 µm, de Nylon (PA), 4.8 cm², 0.15 mL, Sartorius.
- Parrilla de agitación magnética de cuatro posiciones, sin calentamiento, modelo MS-01 de ELMI Ltd.
- Parrilla de agitación magnética modelo *Speedsafe™* de HANNA Instruments.
- Purificador y desionizador de agua Milli-Q® plus, modelo 185, Merck-Millipore.

2.1.2 MATERIALES

- Barras de agitación magnética Twister® de vidrio con dimensiones de 10 mm de largo x 3.2 mm de diámetro, un recubrimiento de 0.5 mm y un volumen de PDMS de 24 µL, película de tipo no polar, de GERSTEL GmbH & Co. KG.
- Columna cromatográfica C18 Spherisorb ODS2, 80 Å, (4.0 mm x 250 mm d.i.), 5 µm de tamaño de partícula, de Waters Co.
- Filtros de membrana de nitrato de celulosa, 47 mm de diámetro, 0.45 µm de tamaño de poro, marca Sartorius.
- Viales cromatográficos de vidrio ámbar, certificados, marca Waters, con dimensiones de 8 x 40 mm, 1 mL de volumen.
- Viales *Headspace®* de vidrio ámbar, fondo redondo, tapón espiral, de 20 mL.

2.2 REACTIVOS & DISOLVENTES

- Acetonitrilo, grado HPLC ($\geq 99.93\%$), Honeywell.
- Agua ultra pura, resistividad $18.2\text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$, a $25\text{ }^\circ\text{C}$.
- Atrazina, estándar analítico (99%), ampolla de 100 mg , Sigma-Aldrich.
- Atrazina-2-hidroxi, estándar analítico (99%), PESTANAL[®], Sigma-Aldrich.
- Atrazina-desetil, estándar analítico (99%), PESTANAL[®], Sigma-Aldrich.
- Buffer de fosfatos $\text{pH} = 7.2$, grado R.A. (98.9%), Sigma-Aldrich.
- Metanol, grado HPLC ($\geq 99.9\%$), Honeywell.

2.3 PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES

2.3.1 DISOLUCIONES PATRÓN Y ESTÁNDARES

Para llevar a cabo el desarrollo de la metodología de preconcentración, todas las disoluciones fueron preparadas con disolventes grado cromatográfico, reactivos grado analítico, y agua desionizada. Para el analito de interés, así como para sus metabolitos potencialmente interferentes, se prepararon disoluciones patrón (*Stock*) de $\sim 500\text{ mg/L}$ en metanol, y cada una de ellas fue trasvasada a un frasco de vidrio ámbar, para evitar su degradación fotoquímica, y conservada bajo refrigeración. Todos los estándares empleados para el desarrollo del método fueron preparados mediante la dilución con agua desionizada de las diferentes disoluciones patrón.

2.3.2 BUFFER DE FOSFATOS 0.005 M

Se preparó una disolución amortiguadora (o tampón) de fosfatos 0.005 M , de la siguiente manera: Se pesaron aproximadamente 0.72 g del *buffer* de fosfatos (R.A.) $\text{pH} = 7.2$, para después llevarse a un volumen total de 1 L , con agua desionizada. Posteriormente se hizo pasar a la disolución resultante por un sistema de filtración Millipore, empleando filtros de membranas de $0.45\text{ }\mu\text{m}$ de tamaño de poro.

2.3.3 FASE MÓVIL

Se prepararon periódicamente 250 mL aproximadamente de fase móvil AcCN-*buffer* de fosfatos 0.005 M , $\text{pH} = 7.2$, en una proporción $40:60\text{ (v/v)}$, de acuerdo con lo descrito por Cortés [2016].

2.4 ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO

Todas las muestras cromatográficas generadas fueron analizadas por medio de HPLC-UV-DAD de acuerdo con lo reportado por Cortés [2016]:

- Una fase móvil AcCN-*buffer* de fosfatos 0.005 M, pH=7.2, en una proporción 40:60 (v/v).
- Un flujo de bombeo de 1 mL/min en modo isocrático.
- Un volumen de inyección de 10 μ L.
- Los tres analitos (2-HA, ATZ y DEA) se monitorearon en las siguientes longitudes de onda: 210, 220 y 230 nm.

2.5 PARÁMETROS DE OPTIMIZACIÓN DE LA SBSE

La optimización de las condiciones de trabajo involucró los siguientes apartados:

1. Acondicionamiento: Selección del tipo, cantidad y tiempo de contacto del disolvente de trabajo para lograr el acondicionamiento de las barras de sorción.
2. Carga: Selección del volumen, concentración y tiempo de contacto de la disolución acuosa de atrazina utilizada para realizar los experimentos de sorción (ver Tabla 2.1).
3. Lavado: Extracción de posibles interferentes de la barra de sorción, dejando en ella al analito retenido.
4. Extracción: Selección del tipo, volumen y tiempo de contacto del disolvente empleado para lograr la extracción cuantitativa de la atrazina adsorbida en la barra de sorción de trabajo (ver Tabla 2.2).
5. Regeneración: Extracción de todo lo que no fue posible eluir (lo que quedó retenido después de la elución) de las barras de sorción para limpiarlas totalmente y asegurar la eficacia en su posterior reutilización.

Tabla 2.1. Selección del volumen, concentración y tiempo de contacto de la disolución acuosa de atrazina utilizada para realizar los experimentos de sorción en la etapa de carga.

Analito	Tiempo de contacto (min)	Volumen disolución (mL)	Concentración de la disolución de ATZ (mg/L)
ATZ	15 y 30	5.0 y 10.0	0.005, 0.01, 0.03, 0.05, 0.08, 0.10, 0.15, 0.20, 0.25, 0.50, 0.75, 1.0, 2.5 y 5.0

Todos los experimentos consistieron en poner en contacto la barra de sorción, acondicionada previamente, con un volumen definido de una disolución acuosa de atrazina de concentración conocida. Después de cierto tiempo de contacto, la barra se retiraba de la disolución (denominada carga), se lavaba con agua destilada y se secaba con un paño limpio y aire, para su subsecuente desorción líquida que consistía en poner a la barra en contacto con un volumen definido de un disolvente (extractante) durante un tiempo de agitación conocido. La disolución resultante de esta etapa se identificó con el término de eluato; la desorción se efectuó empleando volúmenes de extractante mucho menores con relación al volumen de muestra acuosa, sin considerar efectos de matriz que pudiesen afectar su posterior cuantificación. Transcurrido el tiempo de desorción, la barra de trabajo era nuevamente retirada y colocada en otro vial para llevar a cabo repetidos pasos de lavado con volúmenes definidos del disolvente de extracción para asegurar su regeneración y, en posteriores análisis, su re-acondicionamiento.

Las etapas de contacto de carga (sorción) y extracción (desorción) se llevaron a cabo a temperatura ambiente y manteniendo agitación constante de 750 rpm.

Tabla 2.2. Selección del tiempo de contacto, tipo y volumen del disolvente empleado para lograr la extracción cuantitativa de la atrazina retenida en la barra de sorción.

Disolvente	Tiempo de contacto (min)	Volumen de disolvente (mL)
MeOH	10, 15, 30, 60 y 120	0.5, 0.8, 1.0, 1.5 y 2.0

Las disoluciones de carga antes y después de estar en contacto con la barra, así como los eluatos generados de todos los experimentos, fueron analizados por medio de HPLC-UV-DAD de acuerdo con lo reportado por Cortés [2016] utilizando curvas de calibración externa.

2.6 VALIDACIÓN DE LA METODOLOGÍA

Una vez seleccionadas las condiciones de trabajo, previamente optimizadas, se procedió con la obtención de los parámetros típicos de una validación analítica, los cuales son: intervalo lineal y de trabajo, precisión, exactitud, límites de detección y cuantificación, así como la evaluación del efecto de la matriz de estudio y recobros.

2.6.1 INTERVALO LINEAL Y DE TRABAJO

Con el fin de la selección del intervalo de trabajo se prepararon disoluciones de estándares de concentración de atrazina comprendidos entre 0.005 y 5.0 mg/L a partir de una disolución Stock de ~ 500 mg/L, mediante la dilución de la misma en agua desionizada. Cada curva de calibración fue preparada por triplicado y para su correcta evaluación fue necesario contar con al menos siete niveles de concentración.

2.6.2 PRECISIÓN Y EXACTITUD

Para la evaluación de este parámetro se seleccionaron siete niveles de concentración (0.03 y 0.25 mg/L). Cada nivel de concentración fue preparado por triplicado de manera independiente. El análisis de datos se realizó según lo establecido por Miller & Miller [2002] mediante el cálculo del porcentaje del coeficiente de variabilidad (% CV) (Ec. 35).

2.6.3 MATRIZ DE ESTUDIO

La evaluación del efecto de la matriz fue realizada con cinco muestras de agua superficial de las Lagunas de Montebello, Chiapas, las cuales fueron muestreadas en agosto de 2014. Dichas muestras provienen de las lagunas: Balamtetic, Bosque Azul, San Lorenzo, Vuelta el Agua y Yalmus.

Para cada muestra se tomaron 2 L de agua superficial, a 1 m de profundidad. A las muestras se les realizaron mediciones experimentales en campo, tales como pH y conductividad eléctrica con un medidor multiparamétrico, modelo 9812 de HANNA Instruments. Las muestras fueron transportadas dentro de una hielera y posteriormente fueron conservadas bajo refrigeración a 4 °C, almacenadas en frascos de polipropileno con tapa; previo al trabajo con ellas, se les dio un tratamiento medio de un sistema de filtración, empleando membranas de nitrocelulosa de 0.45 µm de tamaño de poro.

Para la evaluación de los posibles interferentes, a estas muestras de agua se les aplicó el método de las adiciones patrón.

2.6.3.1 Fortificación de las muestras

Las cinco muestras de agua provenientes de las Lagunas de Montebello fueron fortificadas por duplicado con atrazina, en cinco niveles de concentración comprendidos entre 0.03 y 0.30 µg/mL. Las fortificaciones se efectuaron partiendo de los estándares de ATZ preparados previamente y diluyendo con agua de las cinco muestras, para cada nivel correspondiente.

3. RESULTADOS & DISCUSIÓN

3.1 OPTIMIZACIÓN DE LAS ETAPAS DE LA EXTRACCIÓN POR SORCIÓN EN BARRA DE AGITACIÓN (SBSE)

Debido a que las barras de sorción utilizadas para realizar la SBSE se encuentran recubiertas con una película de polidimetilsiloxano (PDMS), que actúa como adsorbente de carácter no polar, se decidió utilizar un volumen de 5.0 mL de metanol, el cual era suficiente para cubrir en su totalidad la barra de trabajo.

La selección del disolvente adecuado se hizo con base en el poder de elución y en la afinidad del mismo por la atrazina, para así asegurar una extracción eficiente. Además, el uso de metanol es recomendado por el fabricante, ya que, con él, se garantiza que la película que recubre la barra tendrá expuestos los sitios que interaccionan con las moléculas del analito que se desea retener, y por lo tanto, llevar a cabo de manera satisfactoria su sorción.

La velocidad de agitación se seleccionó con base en las recomendaciones brindadas por el fabricante [GERSTEL, 2014; Sandra *et al.*, 2015], además de lo mencionado por los desarrolladores de la metodología de SBSE [Baltussen *et al.*, 1999] y en trabajos de autores como León *et al.* [2003], Neng *et al.* [2007], Popp *et al.* [2001] y Prieto *et al.* [2010]. Estas velocidades oscilan en el intervalo de 500 a 1200 rpm, por lo que se decidió trabajar a un valor medio, de 750 rpm (tanto para la etapa de carga, como la de desorción), para evitar la degradación de la barra de trabajo, y dadas las especificaciones y limitaciones del equipo usado para este fin.

Con respecto al tiempo de contacto se decidió emplear 15 minutos y aunque, de acuerdo con lo descrito por el fabricante, la activación de la película tarda unos cuantos minutos, se decidió utilizar este tiempo para garantizar la completa disposición de los sitios de sorción y, por lo tanto, la mayor retención de atrazina una vez que la barra se pusiera en contacto con la disolución que contiene al analito de trabajo. Finalmente, las barras de sorción eran lavadas con agua desionizada.

3.1.1 EVALUACIÓN DE LA SORCIÓN DE ATRAZINA

3.1.1.1 Afinidad de la atrazina por la barra de sorción

Era necesario conocer si la atrazina podría retenerse sobre la barra de sorción de trabajo, por lo que en esta etapa se decidió trabajar en primera instancia con una disolución acuosa de atrazina de muy baja concentración, la cual pudiera ser cuantificada mediante HPLC, se decidió utilizar un volumen de 5.0 mL de una disolución que contenía aproximadamente 0.5 mg/L de atrazina. Este experimento se realizó por quintuplicado, y tanto la disolución de atrazina sin haber estado en contacto con la barra, identificada como [ATZ]_{inicial}, como la resultante de ponerla en contacto con la barra, indicada como [ATZ]_{después de sorción}, fueron analizadas por medio de HPLC-UV-DAD, para por medio del uso de una curva de calibración externa se determinasen sus valores numéricos. En la tabla 3.1 se resumen las condiciones y los valores determinados.

Tabla 3.1. Valores de concentración de atrazina determinados, antes y después de la sorción para un tiempo de contacto de 60 min (n=5).

Tiempo de contacto (min)	Volumen disolución de ATZ (mL)	[ATZ] _{inicial} (mg/L)	[ATZ] _{después sorción} (mg/L)	$\frac{[\text{ATZ}]_{\text{después sorción}}}{[\text{ATZ}]_{\text{inicial}}}$
60	5.0	0.56	0.41	0.73

Los resultados indican que cierta cantidad de las moléculas de atrazina presentes en la disolución inicial, se quedaron retenidas sobre la película del polímero de la barra de sorción, ya que los valores de concentración, antes y después del experimento no fueron iguales, siendo menor, la concentración de atrazina determinada en la disolución que estuvo en contacto con la barra de PDMS. La relación de la concentración después de la sorción frente a la concentración inicial de atrazina fue de 0.73, que equivale a un 73 % de atrazina que no fue retenida, lo que, a su vez, indica que el 27 % restante corresponde a la cantidad de atrazina retenida sobre la barra bajo estas condiciones de trabajo.

3.1.1.2 Evaluación de la presencia de 2-hidroxiatrazina y desetilatrazina sobre la retención de atrazina

Debido a que una vez que la atrazina (ATZ) es aplicada en los campos de cultivo, ésta puede sufrir degradación tanto química como microbiológica, siendo sus principales metabolitos de descomposición la 2-hidroxiatrazina (2-HA) y la desetilatrazina (DEA), se decidió evaluar la presencia de concentraciones conocidas de estos dos compuestos, sobre la retención de la ATZ en la barra de sorción. Al igual que en el caso anterior los valores de concentración de los tres analitos se determinaron con el uso de curvas de calibración externa. Las condiciones de trabajo y los resultados numéricos se resumen en la tabla 3.2.

Tabla 3.2. Evaluación de la sorción de la atrazina en presencia de sus dos principales metabolitos (n=5).

Analito	Tiempo de contacto (min)	Volumen disolución (mL)	[analito] _{inicial} (mg/L)	[ATZ] _{después sorción} (mg/L)	$\frac{[\text{ATZ}]_{\text{después sorción}}}{[\text{ATZ}]_{\text{inicial}}}$
2-HA	60	5.0	0.44	0.45	1.02
DEA			0.45	0.45	1.00
ATZ			0.48	0.35	0.73

Los resultados obtenidos indican que la presencia de 2-HA y DEA no afecta a la sorción de atrazina, ya que se retiene la misma cantidad de moléculas de ATZ en disolución después de la sorción, que las determinadas en los experimentos de sorción realizados en ausencia de los dos metabolitos, obteniéndose nuevamente un porcentaje de atrazina retenida de 27 %, con una cantidad no retenida del 73 %. Bajo estas condiciones de trabajo, no se observó la retención de 2-HA y DEA sobre la barra, ya que sus concentraciones fueron las mismas antes y después de la sorción, por lo que la relación de concentraciones de ambas especies fue de prácticamente la unidad. La no retención de 2-HA y DEA, puede atribuirse a que dichas sustancias presentan un carácter más polar que la ATZ, por lo que exhiben una mayor afinidad por el agua utilizada como disolvente, inhibiendo con ello su sorción sobre la fase polimérica de tipo no polar (PDMS) de la barra de trabajo.

3.1.1.3 Efecto del tiempo de contacto sobre la retención de atrazina en la superficie de la barra de sorción

Debido a que el tiempo de contacto influye de manera drástica sobre la retención de los analitos en experimentos de sorción, fue obligatorio determinar el tiempo de contacto mínimo necesario para alcanzar el equilibrio sobre el proceso de retención de la atrazina. Para ello se utilizó un volumen de 5.0 mL de una disolución de atrazina de concentración aproximada a 0.5 mg/L, variando los tiempos de contacto de trabajo. En la siguiente tabla (3.3) se presentan los resultados obtenidos de la concentración de atrazina que queda en disolución después de haberse llevado a cabo el experimento de sorción para cada uno de los tiempos de contacto, así como la respectiva cantidad de atrazina retenida sobre la barra de polidimetilsiloxano.

Tabla 3.3. Efecto del tiempo de contacto sobre la sorción de ATZ. La concentración inicial de atrazina es de 0.46 mg/L, que equivale a 2.28 µg de ATZ (n=5).

Volumen disolución ATZ (mL)	Tiempo de contacto (min)	[ATZ] después sorción (mg/L)	Masa en disolución después de sorción (µg)	Masa de ATZ retenida (µg)
5.0	15	0.44	2.19	0.09
	30	0.43	2.15	0.13
	60	0.40	2.01	0.27
	120	0.41	2.03	0.25

La tabla 3.3 muestra que, al incrementarse el tiempo de contacto, la cantidad de ATZ en disolución va disminuyendo, lo cual indica que se ha depositado sobre la superficie de la barra de sorción, una mayor cantidad de este compuesto (sorción más eficiente), es posible verificar que después de 60 minutos la sorción se mantiene constante, es decir alcanza el equilibrio, por lo que se seleccionó este tiempo de contacto para realizar los siguientes experimentos.

3.2 EFECTO DEL TIEMPO DE CONTACTO PARA LA DESORCIÓN CUANTITATIVA DE ANALITO

Considerando la naturaleza de la atrazina, se buscó un disolvente por el cual este compuesto presentara una buena afinidad. Se seleccionó metanol ya que la atrazina es altamente soluble en este disolvente, además de que dicho disolvente actúa como un eluyente fuerte cuando se trabaja con fases de tipo reversa, como la utilizada como recubrimiento de la barra de sorción de trabajo. Para esta etapa se utilizó 1.0 mL de metanol (MeOH) grado HPLC ($\geq 99.9\%$) como disolvente extractante y debido a que la desorción depende del tiempo de contacto, se buscó el mínimo tiempo necesario para lograr la mayor extracción de la atrazina retenida sobre la barra. Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 3.4.

Tabla 3.4. Efecto del tiempo de contacto del disolvente extractante (MeOH) sobre la desorción de ATZ (n=3).

Volumen MeOH (mL)	Tiempo de contacto (min)	Masa de ATZ en disolución después de desorción (μg)
1.0	10	0.23
1.0	30	0.25
1.0	60	0.25
1.0	120	0.25

Como puede observarse, en los tiempos de contacto evaluados, prácticamente no se presentó una mayor cantidad de ATZ en disolución al incrementarse el tiempo de contacto entre el metanol y la barra de agitación, por lo que, con el objetivo de incrementar la productividad de la metodología, se decidió utilizar el menor tiempo de contacto de estudio (10 minutos), para llevar a cabo la desorción del analito.

3.3 INFLUENCIA DE LA CANTIDAD DEL DISOLVENTE DE EXTRACCIÓN

Para verificar si el volumen del extractante, en este caso metanol (grado HPLC), influye sobre el proceso de desorción de la atrazina, se decidió evaluar cinco diferentes volúmenes de este disolvente, con $n=3$; a continuación, en la tabla 3.5 se presentan los resultados obtenidos.

Tabla 3.5. Efecto del volumen de MeOH sobre la desorción de ATZ ($n=3$).

Volumen MeOH (mL)	Tiempo de contacto (min)	Concentración de desorción determinada ($\mu\text{g/mL}$)	Masa de ATZ en disolución después de desorción (μg)
0.5	10	0.66	0.33
0.8	10	0.34	0.28
1.0	10	0.33	0.33
1.5	10	0.18	0.27
2.0	10	0.13	0.25

Si bien la concentración de atrazina desorbida disminuye al incrementarse el volumen del metanol utilizado para su desorción, el parámetro que indica directamente el efecto de esta variable sobre la extracción de la ATZ no es la concentración determinada, sino la cantidad de atrazina en disolución después de la desorción, ya que esta involucra el efecto de dilución que sufre el analito al exponerse a diferentes volúmenes de extractante.

Los resultados de la tabla 3.5 indican que la cantidad extraída de atrazina es prácticamente la misma para todos los volúmenes de estudio de metanol, por lo que se decidió realizar la extracción de ATZ de la barra con el volumen más pequeño de MeOH (1.0 mL), el cual garantiza el menor efecto de dilución sobre la concentración de la atrazina una vez que ésta se encuentra en disolución, para su adecuada posterior cuantificación vía HPLC-UV-DAD. El factor de preconcentración resultante (5.0 mL carga / 1.0 mL elución) es de 5x, lo que indica que la metodología permite concentrar la muestra cinco veces.

3.4 EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN PRESENTE DE ANALITO SOBRE SU RETENCIÓN EN LA BARRA DE SORCIÓN

Debido a que la concentración en una muestra es por lo general totalmente incierta, fue necesario evaluar el comportamiento de la retención de atrazina en función de su concentración inicial en disolución. Las concentraciones utilizadas fueron seleccionadas con base en el límite de cuantificación de la metodología instrumental de HPLC-UV-DAD (concentración inicial más baja que pudiera ser cuantificada) y la concentración inicial de ATZ más alta que fuera totalmente retenida sobre la barra de sorción. En la tabla 3.6 se resumen los resultados de este experimento.

Tabla 3.6. Efecto de la concentración de analito sobre su retención en la barra de sorción (n=3).

Concentración carga ATZ (µg/mL)	Masa adsorbida (µg)			% CV
	1	2	3	
0.03	0.028	0.025	0.022	12.54
0.05	0.035	0.040	0.035	7.80
0.08	0.054	0.054	0.059	4.90
0.10	0.068	0.066	0.068	1.70
0.15	0.098	0.094	0.101	3.65
0.20	0.125	0.132	0.128	2.82
0.25	0.154	0.154	0.157	1.00

Cada experimento fue realizado por triplicado, por lo que en dicha tabla también se presentan los valores de porcentaje del coeficiente de variación (% CV), los cuales indican su grado de repetibilidad para cada uno de los niveles de concentración de trabajo. Como se puede observar, en todos los casos se presentan valores de CV aceptables, en conformidad con los criterios para la validación de métodos fisicoquímicos ($\leq 20\%$), establecidos en el documento CCAyAC-P-058 [COFEPRIS, 2011]. De esta manera, queda evaluada la precisión de la metodología desarrollada en términos de repetibilidad.

3.5 SELECCIÓN DEL INTERVALO LINEAL

La selección de este intervalo fue definido por medio del porcentaje del coeficiente de variabilidad (% CV) obtenido para cada punto.

Se observó que la linealidad comenzaba en una concentración de 0.03 mg/L y finalizaba en 0.25 mg/L. Además, en concentraciones por debajo de 0.03 mg/L, los valores de los coeficientes de variabilidad superaban el 20 % (de acuerdo con los criterios para la validación de métodos fisicoquímicos *CCAyAC-P-058*), por lo que la cuantificación ya no es repetible.

En el gráfico presente en la Figura 3.1 se muestra la correlación que existe entre la concentración inicial de atrazina presente en disolución y la cantidad del analito que es retenido sobre la barra de sorción empleada.

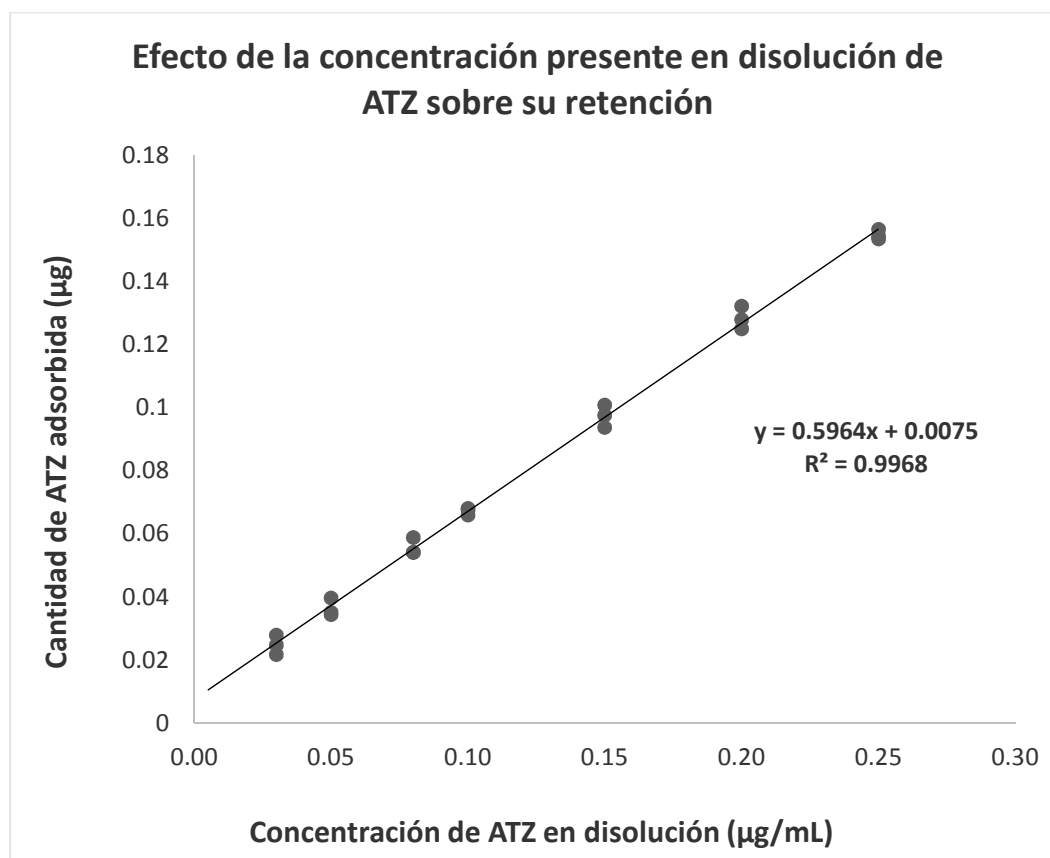


Figura 3.1. Dependencia de la cantidad de ATZ adsorbida en función de la concentración inicial presente en disolución (n=3).

El gráfico exhibe una clara dependencia lineal de la cantidad de atrazina retenida por la barra en función de la concentración inicial del analito disuelto ($R^2 = 0.9968$, $r = 0.9984$), la cual se confirma con el estudio de la prueba no paramétrica de rachas (ver Tabla A1), cuyos resultados indican que los residuos de las parejas de datos son aleatorios y por lo tanto éstos se ajustan a una recta.

En la tabla 3.7 se presentan los parámetros típicos de regresión, como son: la pendiente (m) y la ordenada al origen (b) reportados con intervalos de confianza, así como los factores de determinación y correlación, el intervalo lineal y el número de datos utilizados.

Tabla 3.7. Parámetros estadísticos típicos de regresión para la curva de calibración del gráfico de la Fig. 3.1 (nivel de confianza al 95 %).

Parámetro	Valor
Intervalo lineal	(0.03 – 0.25) mg/L
Riesgo (α)	5 %
Número de datos (n)	21
Pendiente (m)	0.5964 ± 0.0161
Ordenada al origen (b)	0.0075 ± 0.0023
Coeficiente de determinación (R^2)	0.9968
Coeficiente de correlación (r)	0.9984
Riesgo de que no sea recta	6.0185×10^{-30} %
Ecuación de regresión	$y = 0.5964x + 0.0075$ (Ec. 39)

El conocimiento de este comportamiento es de vital importancia en la utilización de la barra de sorción para la preparación de muestras reales, ya que la sorción de la atrazina está condicionada por la concentración presente en disolución y es necesario conocer los valores de los parámetros pendiente y ordenada al origen, para así poder determinar la concentración de atrazina en la muestra original.

3.6 LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN

La determinación de los valores de límite de detección y cuantificación se realizó llevando a cabo la medición de siete disoluciones de atrazina de concentración conocida (0.005 mg/L), de manera independiente. Se seleccionó esta concentración con base en la relación señal/ruido mínima diferenciable, del sistema cromatográfico de análisis.

En la tabla 3.8 se muestran los valores del límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ), que fueron calculados según lo establecido por Miller & Miller [2002] y, por medio de los parámetros de regresión de la curva de calibración externa (Ec. 39) se obtuvieron los mismos en unidades de concentración.

Tabla 3.8. Límites de detección y de cuantificación de la metodología desarrollada.

Parámetro	Valor (mg/L)
LOD	0.0014
LOQ	0.0016

Se lograron reducir significativamente estos parámetros en comparación con el método de análisis directo [Cortés, 2016], donde se reportan valores de LOD = 0.050 mg/L y LOQ = 0.070 mg/L y cuya metodología no emplea una técnica de preparación de muestra.

3.7 EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA MATRIZ DE ESTUDIO

Con el objetivo de evaluar la presencia de interferentes de la matriz de estudio, cinco muestras de agua provenientes de las Lagunas de Montebello fueron fortificadas por duplicado con atrazina, en cinco niveles de concentración comprendidos entre 0.03 y 0.30 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Las muestras utilizadas provienen de las lagunas: a. Balamtetic, b. Bosque Azul, c. San Lorenzo, d. Vuelta el Agua y e. Yalmus.

A continuación (Figuras 3.2, 3.3 y 3.4) se presentan los gráficos obtenidos de la cantidad de atrazina adsorbida, en función de la concentración de fortificación empleada, para cada uno de los puntos de muestreo.

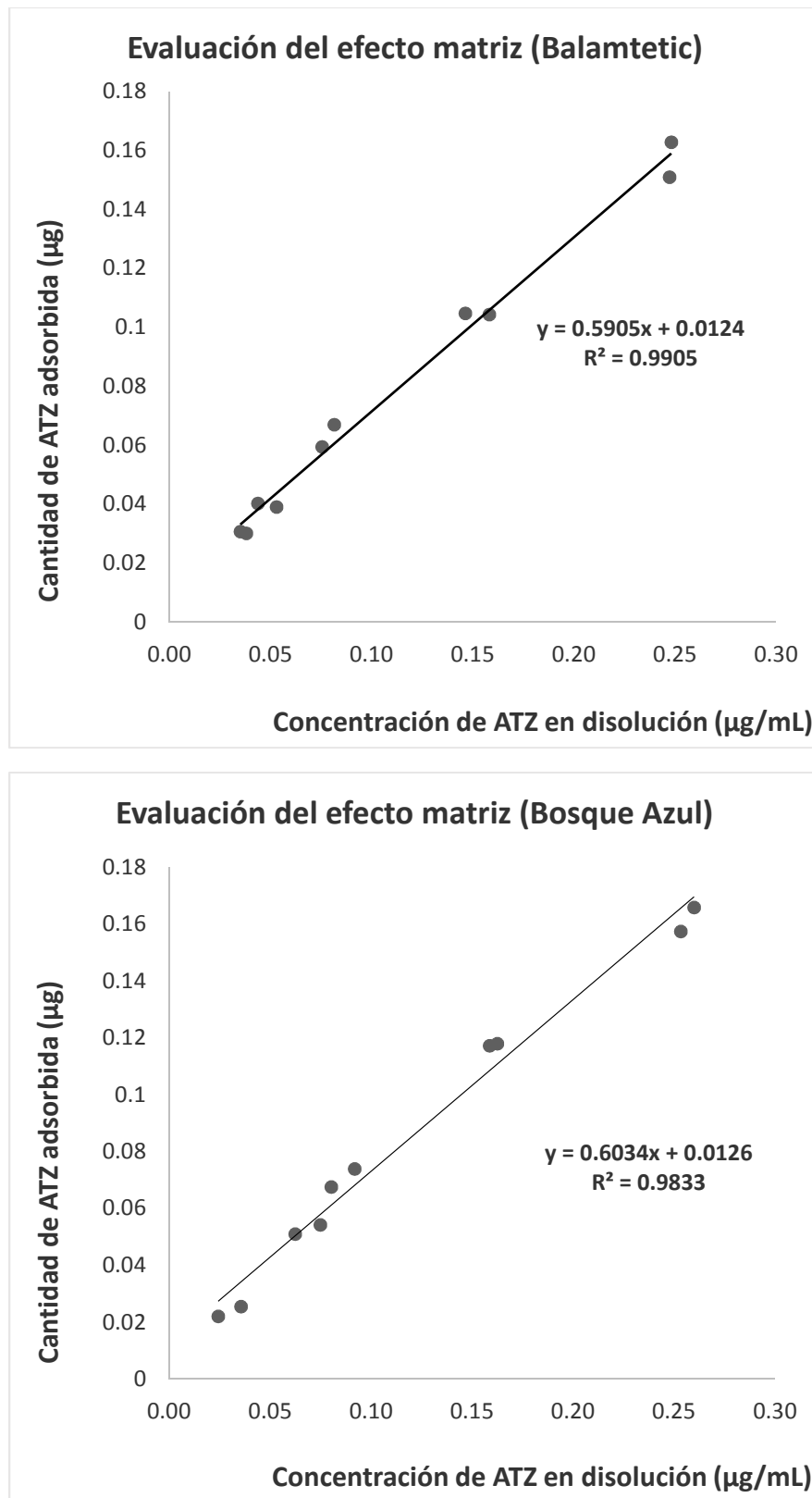


Figura 3.2. Dependencia de la cantidad de ATZ adsorbida en función de la concentración inicial presente en disolución de las muestras a. Balamtetic y b. Bosque Azul ($n=2$).

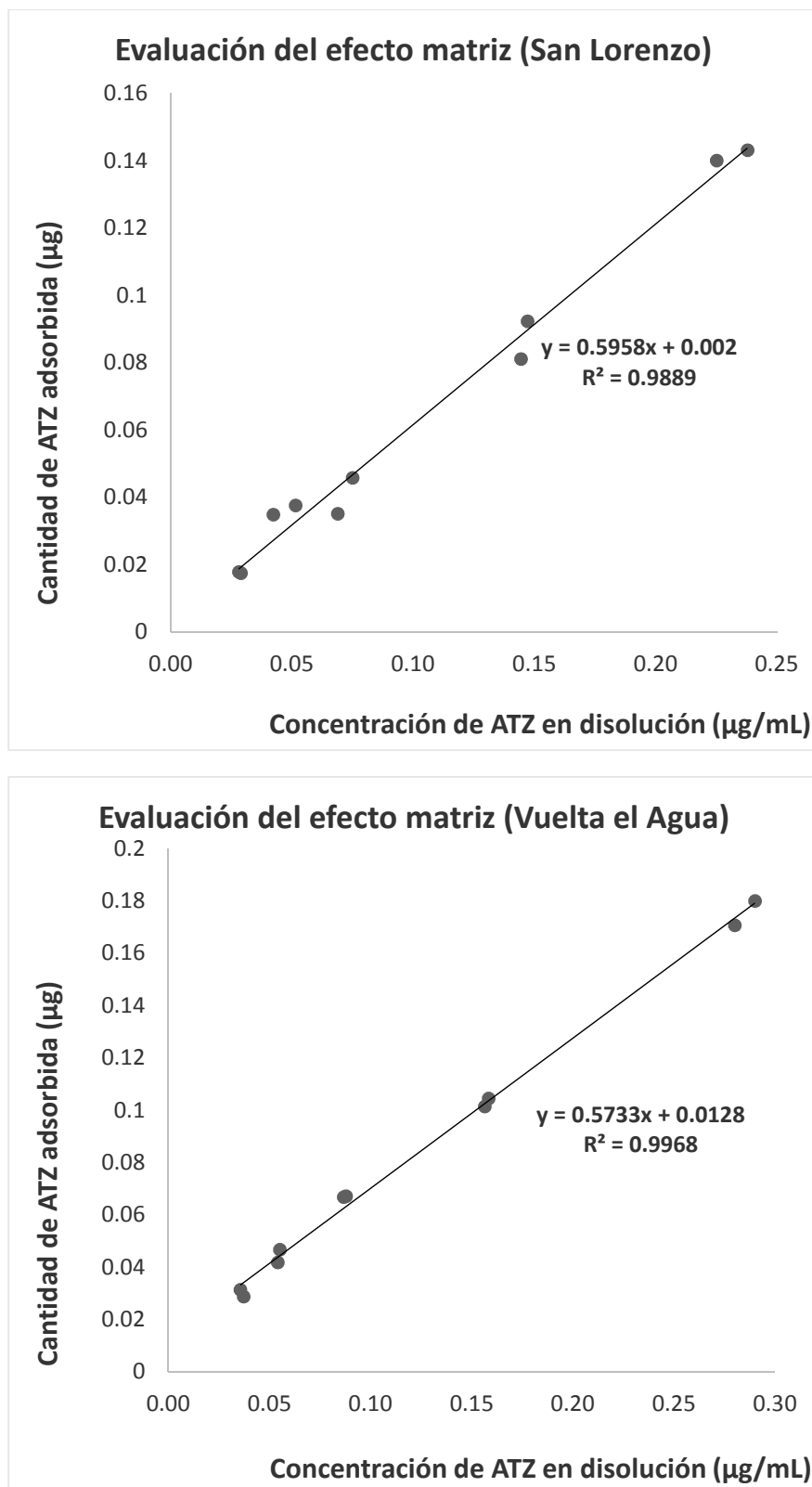


Figura 3.3. Dependencia de la cantidad de ATZ adsorbida en función de la concentración inicial presente en disolución de las muestras c. San Lorenzo y d. Vuelta el Agua ($n=2$).

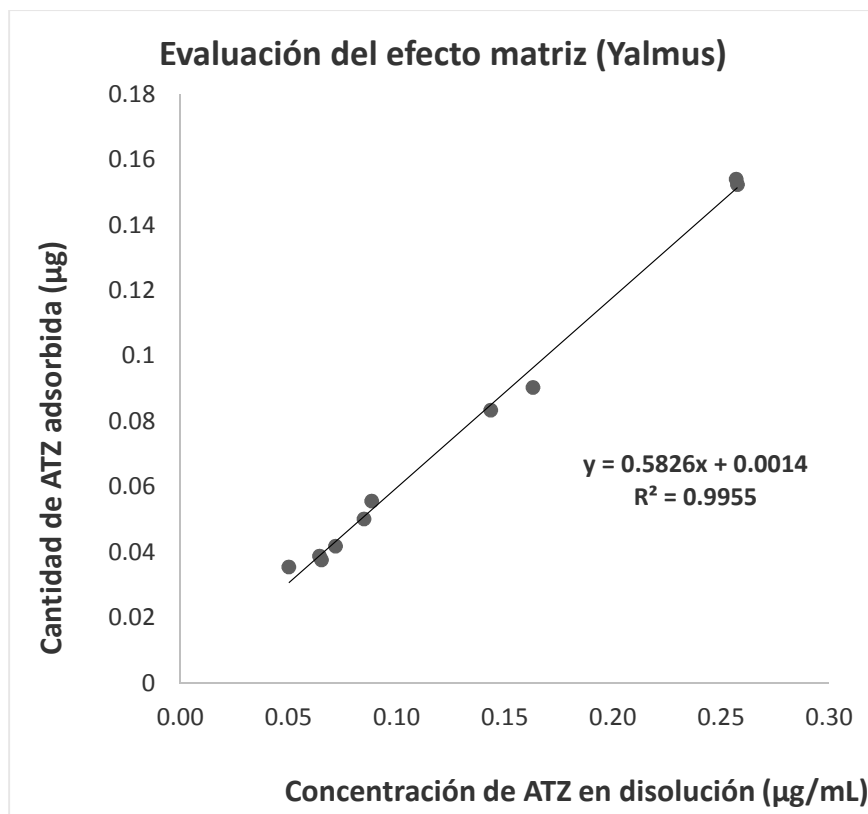


Figura 3.4. Dependencia de la cantidad de ATZ adsorbida en función de la concentración inicial presente en disolución de la muestra e. Yalmus (n=2).

Un ejemplo típico de los cromatogramas obtenidos al analizar directamente las muestras de agua provenientes de las Lagunas de Montebello, a manera de blanco (*background*), se puede encontrar en la Fig. A4, donde se observa la nula presencia de ATZ (cuyo tiempo de retención es de 7.8; ver cromatogramas de las Fig. A1 a A3); esto ocurrió para todos los casos. En consecuencia, los valores obtenidos de las pendientes para las cinco muestras de lago (ver Tabla 3.9) fueron los esperados, siendo muy parecidos entre sí, en comparación con el observado para el agua desionizada. Dado que los valores de pendiente son prácticamente iguales ($m \approx 0.6$), es claro que no existen interferencias que afecten la cuantificación de la atrazina.

Con respecto a la ordenada al origen (*b*), para todos los casos se obtuvieron valores muy cercanos a cero (ver Tabla 3.9), mientras que los coeficientes de correlación indican la existencia de un comportamiento lineal de la cantidad adsorbida de atrazina en función su concentración inicial en disolución.

Tabla 3.9. Parámetros de regresión lineal obtenidos para cada una de las muestras de trabajo (Balamtetic, Bosque Azul, San Lorenzo, Vuelta el Agua y Yalmus).

Matriz	Pendiente (<i>m</i>)	Ordenada (<i>b</i>)	Coefficiente de Determinación (R^2)	Coefficiente de Correlación (<i>r</i>)
Agua desionizada	0.5964	0.0075	0.9968	0.9984
Balamtetic	0.5905	0.0124	0.9905	0.9952
Bosque Azul	0.6034	0.0126	0.9833	0.9916
San Lorenzo	0.5958	0.0020	0.9889	0.9944
Vuelta el Agua	0.5733	0.0128	0.9968	0.9984
Yalmus	0.5826	0.0014	0.9955	0.9977

Por otra parte, para confirmar la semejanza entre los valores de las pendientes de las muestras de estudio y el del valor obtenido para la curva de calibración con agua desionizada, se efectuaron cinco pruebas de hipótesis (ver Tablas A2 a A7), donde se compara en cada una de ellas el valor de la pendiente de la muestra respectiva con el de la curva de calibración externa, mediante el uso del estadístico de distribución *t* de Student, al 95 % de confiabilidad ($\alpha = 0.05$).

Alternativamente, el efecto de la matriz fue evaluado de manera cualitativa mediante la graficación de la cantidad de analito adsorbido para cada muestra de lago vs. la cantidad adsorbida en agua desionizada, según lo descrito por Thompson & Ellison [2004]; para todos los casos, la pendiente obtenida fue prácticamente igual a la unidad. Una representación de estos gráficos se encuentra en la Figura A5 (anexo).

3.8 REPRODUCIBILIDAD

Los tiempos de retención para el analito atrazina, obtenidos en la presente metodología (ver cromatogramas de las Figuras A2 y A3), son muy similares a los obtenidos por la técnica de análisis directo desarrollada por Cortés [2016] (ver Fig. A1), es decir: $t_{R_{ATZ}} \approx 7.8$; es por ello que se puede afirmar que el método instrumental de análisis HPLC-UV-DAD es reproducible para dicha sustancia.

3.9 RECOBROS

Este parámetro se determinó al realizar el análisis directo de cinco muestras de agua provenientes de las Lagunas de Montebello, las cuales posteriormente fueron fortificadas con atrazina en cinco niveles de concentración, comprendidos entre 0.03 y 0.25 mg/mL. Con los valores de área determinados al realizar su análisis y con los parámetros de regresión calculados de las respectivas curvas de calibración externa, se determinaron las concentraciones correspondientes a los procesos de fortificación. Los procesos de fortificación fueron realizados por duplicado.

Tabla 3.10. Porcentajes de recobro en función de la concentración de analito para la matriz de agua desionizada.

Concentración carga ATZ (µg/mL)	Recobro (%)	Criterio de aceptación (%) [COFEPRIS, 2011]	Resultado
	Agua desionizada		
0.03	90.00	70 – 120	Sí cumple
0.05	102.27	70 – 120	Sí cumple
0.08	94.39	70 – 120	Sí cumple
0.10	105.14	70 – 120	Sí cumple
0.15	116.82	70 – 120	Sí cumple
0.20	115.58	70 – 120	Sí cumple
0.25	108.25	70 – 120	Sí cumple

Tabla 3.11. Porcentajes de recobro en función de la concentración de analito para para cada una de las cinco muestras de los Lagos de Montebello.

Concentración carga ATZ (µg/mL)	Recobro (%)					Resultado
	Balamtetic	Bosque Azul	San Lorenzo	Vuelta el Agua	Yalmus	
0.03	76.66	102.74	88.78	93.11	107.82	Sí cumple
0.05	73.66	87.91	119.87	119.16	95.19	Sí cumple
0.08	119.80	91.23	112.99	88.78	83.35	Sí cumple
0.20	84.86	72.76	120.80	114.80	105.69	Sí cumple
0.25	86.22	84.12	113.88	81.18	118.82	Sí cumple

Al observar los valores de los porcentajes de recobro para cada nivel de concentración, tanto para la matriz de agua desionizada (Tabla 3.10), como para cada una de las muestras fortificadas (Tabla 3.11), se puede concluir que estos cumplen con los criterios de aceptación para el parámetro de recuperación, establecidos en el en el manual de la Secretaría de Salud titulado *CCAyAC-P-058* (ver Secc. 1.13.5.1, Tabla 1.7).

Adicionalmente, se pueden evaluar los porcentajes de recobro mediante la comparación de las pendientes de las curvas de calibración externa de cada una de las muestras fortificadas (Balamtetic, Bosque Azul, San Lorenzo, Vuelta el Agua y Yalmus) con la de la matriz de agua desionizada (Tabla 3.12). Al analizar los valores de dichas pendientes, se puede determinar que los mismos son prácticamente iguales; por lo tanto, no hay diferencia significativa entre las matrices de trabajo.

Tabla 3.12. Porcentajes de recobro evaluados mediante la comparación de las pendientes de las curvas de calibración externa de cada una de las muestras fortificadas (Balamtetic, Bosque Azul, San Lorenzo, Vuelta el Agua y Yalmus) con la de la matriz de agua desionizada.

Matriz	Pendiente (<i>m</i>)	Recobro (%)
Agua desionizada	0.5964	100.00
Balamtetic	0.5905	99.01
Bosque Azul	0.6034	101.17
San Lorenzo	0.5958	99.90
Vuelta el Agua	0.5733	96.18
Yalmus	0.5826	97.69

Finalmente se puede afirmar, con base en lo mencionado anteriormente, que el método instrumental desarrollado en la presente metodología, una vez validado, es robusto con respecto a la matriz.

4. CONCLUSIONES

1. Se desarrolló una metodología para la preconcentración de atrazina y para la limpieza de muestras acuosas de la misma, provenientes del Sistema Lagunar Montebello, a partir de *extracción por sorción en barra de agitación* (SBSE).
 2. Los tiempos de retención para el analito atrazina, obtenidos en la presente metodología, son muy similares a los obtenidos por la técnica de análisis directo desarrollada por Cortés [2016]; es por ello que el método instrumental de análisis HPLC-UV-DAD es reproducible para dicha sustancia.
 3. Las condiciones optimizadas de preconcentración mediante SBSE son las siguientes:
 - ✓ Volumen de extracción (carga): 5.0 mL.
 - ✓ Velocidad de agitación: 750 rpm, para todos los casos (carga y elución).
 - ✓ Tiempo de contacto: 60 minutos.
 - ✓ Disolvente de desorción o eluyente: metanol (grado HPLC), con éste se logra la desorción cuantitativa de ATZ.
 - ✓ Volumen de eluyente: 1.0 mL, se garantiza el menor efecto de dilución.
 - ✓ Tiempo de desorción o elución: 10 minutos.
 4. La atrazina es retenida en un 27 % bajo las condiciones de trabajo (temperatura ambiente y 750 rpm). Sin embargo, se asegura la desorción cuantitativa del analito de la superficie de la barra de sorción.
 5. Debido a que no se obtuvo un porcentaje de retención cuantitativa sobre la barra de sorción (≥ 85 %), es necesario determinar el contenido de atrazina en el tipo de muestras de estudio, mediante el uso de curvas de calibración externa (preparadas en contacto con la barra, como la presentada en la Fig. 3.1).
 6. La presencia de 2-HA y DEA no afecta a la sorción de ATZ; no se observó la retención de 2-HA y DEA sobre la barra, por lo que la retención de atrazina es selectiva en la barra de agitación con recubrimiento de PDMS.
-

7. Los parámetros de desempeño encontrados en este método de análisis son adecuados para su propósito.
8. La metodología analítica desarrollada cumplió con los parámetros de linealidad, precisión y exactitud, por lo que puede ser considerada como un método eficaz de preconcentración de atrazina, para su posterior cuantificación en ausencia de interferencias de matriz, mediante cromatografía de líquidos de alta eficacia, empleando un detector de arreglo de fotodiodos (HPLC-UV-DAD), en el intervalo de 0.03 a 0.25 mg/L.
9. Los límites de detección y cuantificación para atrazina de esta metodología son 0.0014 mg/L y 0.0016 mg/L respectivamente. Se logró reducir significativamente estos parámetros, en comparación con el método de análisis directo [Cortés, 2016], donde se reportan valores de LOD = 0.050 mg/L y LOQ = 0.070 mg/L y cuya metodología no emplea una técnica de preconcentración o de preparación de muestra.
10. Se presentaron valores de recobro aceptables cuando se aplica el método instrumental validado en muestras ambientales acuosas del sitio de estudio, por lo que se puede afirmar que la metodología desarrollada es robusta con respecto a la matriz.

5. PERSPECTIVAS

Mediante la metodología desarrollada en el presente trabajo, no se detectaron interferentes que afectasen a la preconcentración de atrazina en la matriz de estudio, la cual se compone de las muestras de agua obtenidas del Sistema Lagunar Montebello, además, esta metodología resultó ser sensible únicamente a atrazina. Es por ello que se propone la aplicación de esta metodología de preconcentración, seguida de la cuantificación vía HPLC-UV-DAD, por el procedimiento descrito por Cortés [2016], empleando curvas de calibración externa para la evaluación cuantitativa de la presencia de atrazina únicamente, en dichos cuerpos de agua, la cual, si resulta ser positiva, puedan ser evaluados, a su vez, los efectos negativos sobre la salud de las personas y fauna que potencialmente puedan consumir esta agua.

Por otra parte, dado que se observó la nula retención de los principales metabolitos de la descomposición de la atrazina, la 2-hidroxiatrazina (2-HA) y la desetilatrazina (DEA), en la barra de sorción empleada en esta metodología (usando PDMS como adsorbente), se propone también, el desarrollo de una metodología análoga, empleando otro agente adsorbente en el cual sí se observe dicha retención, para así poder preconcentrar cuantitativamente estos metabolitos y por consiguiente poder evaluar también sus potenciales efectos negativos.

Adicionalmente, si se lograsen evaluar los efectos negativos de estas sustancias, se podría proponer la actualización en el marco normativo mexicano de los límites máximos permitidos para el plaguicida atrazina, regulando así su aplicación.

Finalmente se propone profundizar en el estudio de la sorción de atrazina mediante la evaluación del efecto salino o la variación del material adsorbente, para determinar si se pueden optimizar aún más las condiciones determinadas en este trabajo. Por ejemplo, Portugal *et al.* [2010] reportaron límites de detección para triazinas con valores de 0.4 a 1.31 $\mu\text{g/L}$ en matrices acuosas, empleando espumas de poliuretano como recubrimiento de la barra de agitación.

ANEXOS

Tabla A1. Resultados de la prueba no paramétrica de rachas.

Prueba no paramétrica de rachas			
mediana = -0.000502827			
n = 21		Datos	
n ₁ = 11		por debajo de la mediana	
n ₂ = 10		por encima de la mediana	
Rachas	Observadas	mínimo aceptable	máximo aceptable
	9	6	17
Los residuos son aleatorios, los datos sí se ajustan a una recta.			

Tabla A2. Prueba de hipótesis sobre la pendiente de la curva de calibración de agua desionizada para la evaluación del efecto matriz (al 95 % de confianza).

Hipótesis sobre la pendiente, $m = 0.5964$, riesgo $\alpha = 0.05$				
$H_0: m = 0$				
hipótesis alterna:	t de Student	t de tablas	Resultado	Decisión
$H_1: m \neq 0$	77.4805122	2.09302405	mayor	rechazar H_0

Tabla A3. Prueba de hipótesis sobre la pendiente de la curva de calibración de Balamtetic para la evaluación del efecto matriz (al 95 % de confianza).

Hipótesis sobre la pendiente, $m = 0.5905$, riesgo $\alpha = 0.05$				
$H_0: m = 0.5964$				
hipótesis alterna:	t de Student	t de tablas	Resultado	Decisión
$H_1: m \neq 0.5964$	-0.28556713	2.30600414	igual ($t_{cal} < t_{tablas}$)	aceptar H_0

Tabla A4. Prueba de hipótesis sobre la pendiente de la curva de calibración de Bosque Azul para la evaluación del efecto matriz (al 95 % de confianza).

Hipótesis sobre la pendiente, $m = 0.6034$, riesgo $\alpha = 0.05$				
$H_0: m = 0.5964$				
hipótesis alterna:	t de Student	t de tablas	Resultado	Decisión
$H_1: m \neq 0.5964$	0.25242656	2.30600414	igual ($t_{cal} < t_{tablas}$)	aceptar H_0

Tabla A5. Prueba de hipótesis sobre la pendiente de la curva de calibración de San Lorenzo para la evaluación del efecto matriz (al 95 % de confianza).

Hipótesis sobre la pendiente, $m = 0.5958$, riesgo $\alpha = 0.05$				
$H_0: m = 0.5964$				
hipótesis alterna:	t de Student	t de tablas	Resultado	Decisión
$H_1: m \neq 0.5964$	-0.27511343	2.30600414	igual ($t_{cal} < t_{tablas}$)	aceptar H_0

Tabla A6. Prueba de hipótesis sobre la pendiente de la curva de calibración de Vuelta el Agua para la evaluación del efecto matriz (al 95 % de confianza).

Hipótesis sobre la pendiente, $m = 0.5733$, riesgo $\alpha = 0.05$				
$H_0: m = 0.5964$				
hipótesis alterna:	t de Student	t de tablas	Resultado	Decisión
$H_1: m \neq 0.5964$	-1.99212343	2.30600414	igual ($t_{cal} < t_{tablas}$)	aceptar H_0

Tabla A7. Prueba de hipótesis sobre la pendiente de la curva de calibración de Yalmus para la evaluación del efecto matriz (al 95 % de confianza).

Hipótesis sobre la pendiente, $m = 0.5826$, riesgo $\alpha = 0.05$				
$H_0: m = 0.5964$				
hipótesis alterna:	t de Student	t de tablas	Resultado	Decisión
$H_1: m \neq 0.5964$	-0.99731962	2.30600414	igual ($t_{cal} < t_{tablas}$)	aceptar H_0

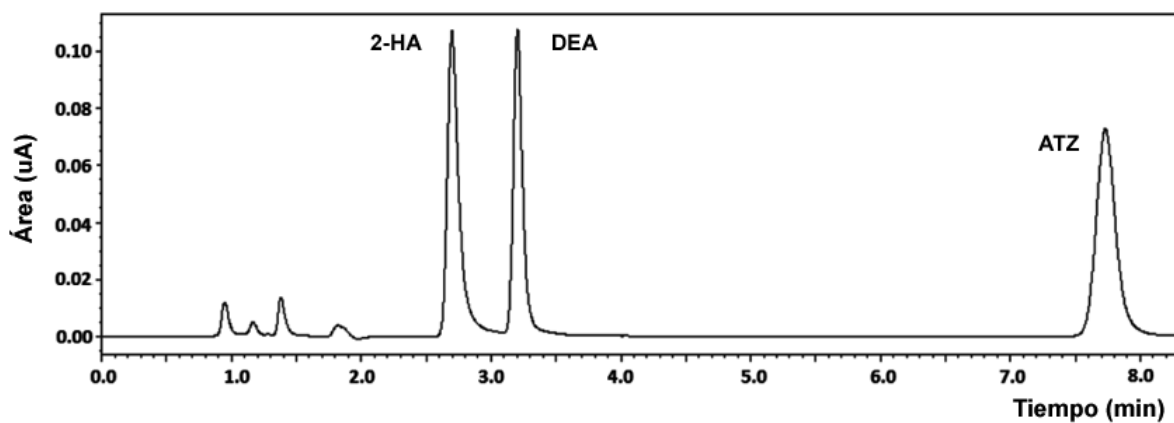


Figura A1. Cromatograma obtenido, en las condiciones óptimas de trabajo encontradas, para estándares de 2-HA, ATZ y DEA en una concentración de 10 ppm [Cortés, 2016].

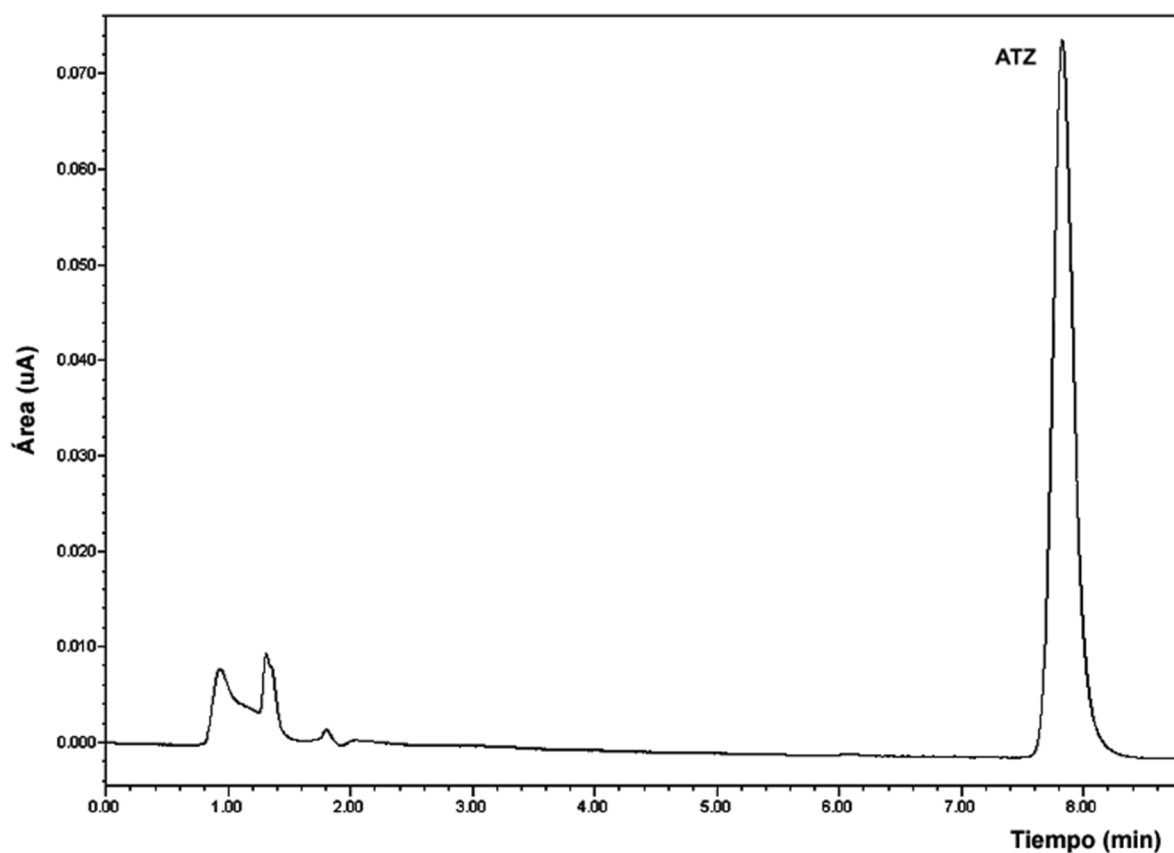


Figura A2. Cromatograma obtenido, durante el desarrollo de la presente metodología para la aplicación de la técnica de preconcentración y en las condiciones óptimas de trabajo, para un estándar de ATZ en una concentración de 10 ppm.

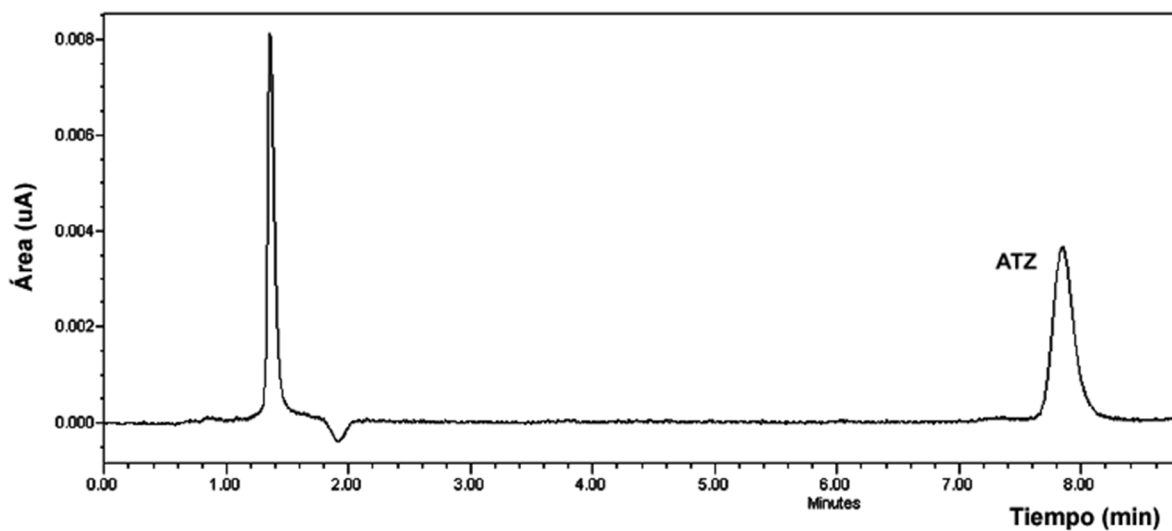


Figura A3. Cromatograma obtenido, durante el desarrollo de la presente metodología para la aplicación de la técnica de preconcentración y en las condiciones óptimas de trabajo, para un estándar de ATZ en una concentración de 0.05 ppm.

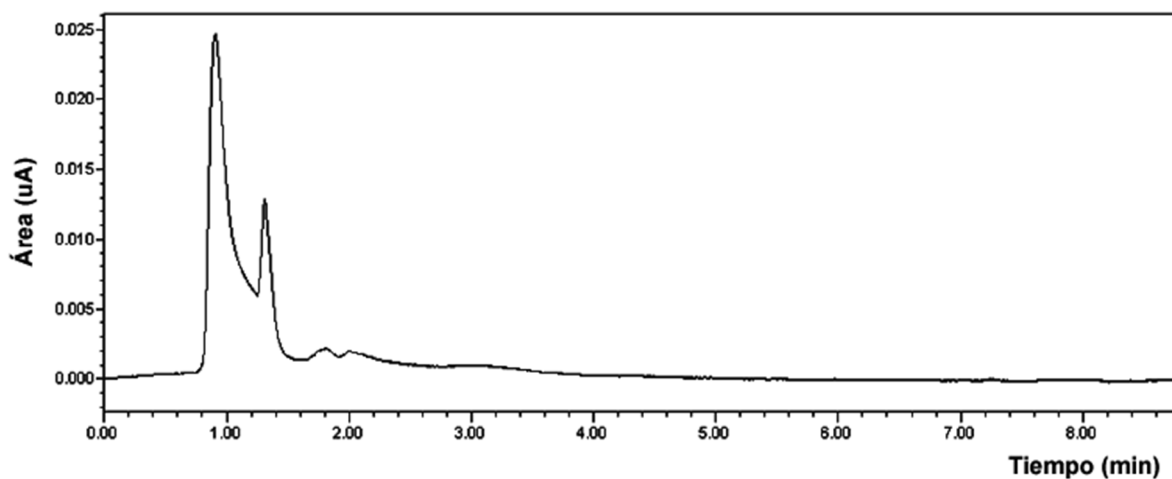


Figura A4. Cromatograma obtenido al analizar una muestra de agua, sin adiciones de estándar de ATZ, de las Lagunas de Montebello para la evaluación del efecto matriz.

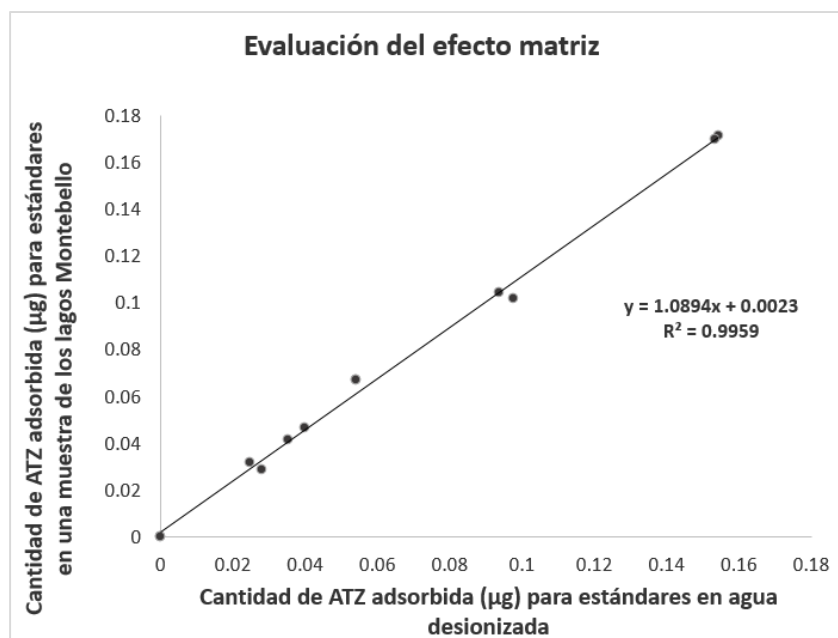


Figura A5. Evaluación del efecto matriz mediante la graficación de la cantidad de analito adsorbido para una muestra de lago vs. la cantidad adsorbida en agua desionizada.

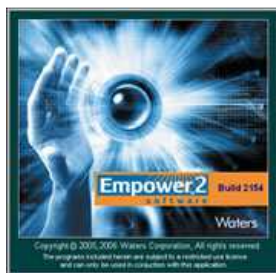


Figura A6. Software de adquisición de datos cromatográficos *Empower 2™: Build 2154*.

REFERENCIAS

- Abdelhafid, R., Houot, S. & Barriuso, E. (2000). "Dependence of atrazine degradation on C and N availability in adapted and non-adapted soils". Soil Biology and Biochemistry, 32(3), pp. 389–401.
- Ackerman, F. (2007). "The Economics of Atrazine". The International Journal of Occupational and Environmental Health, 13(4), pp. 441–449.
- Ahmed, A.R., Tarek, M.M., Rady, A.R. & Mohamed, Y.H. (2009). "Dissipation of profenofos, imidacloprid and penconazole in tomato fruits and products". Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 83(1), pp. 812–817.
- Albert, L.A. (1997). "Plaguicidas", [en línea]. Disponible en:
<http://www.bvsde.ops-oms.org/bvstox/fulltext/toxico/toxico-04a21.pdf>
- Aldana, M.L., Valdez, S, Vargas, N.D., Salazar, N.J., Silveira, M.I., Loarca, F.G., Rodríguez, G., Wong, F.J., Borboa, J. & Burgos, A. (2008). "Insecticide residues in stored grains in Sonora, Mexico: quantification and toxicity testing". Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 80(2), pp. 93–96.
- Alkarawi, D. (2016). "The Investigation of the electrical control of hemimicelles and admicelles on gold for analyte preconcentration". TopScholar, Western Kentucky University, USA, pp. 8.
- Alsayed, H., Pascal-Lorber, S., Nallanthigal, C., Debrauwer, L. & Laurent, F. (2008). "Transfer of the insecticide [14C] imidacloprid from soil to tomato plants". Environmental Chemistry Letters, 6(4), pp. 229–234.
- ANEAS (2007). "Agua para su uso y consumo humano. Límites máximos permisibles de la calidad del agua, control y vigilancia de los sistemas de abastecimiento (Proyecto de Norma Oficial Mexicana)". Asociación Nacional de Empresas de Agua y Saneamiento.
- ANIQ (2017). "Anuario estadístico 2017". Asociación Nacional de la Industria Química Mexicana, México, pp. 180–181.
- Appleby, A.P., Müller, F. & Carpyen, S. (2002). "Weed Control", Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry. Wiley-VCH, Weinheim.
- Arias, J.A. (1990). "Plaguicidas organoclorados". Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud, Organización Panamericana de la Salud, Estado de México.
- Atkins, P. & de Paula, J. (2006). "Química Física". Editorial Médica Panamericana, octava edición, Buenos Aires, Argentina, pp. 24.
-

- ATSDR (2002). *“Hazardous substances emergency events surveillance, annual report 2002”*. U.S. Department for Health and Human Services, Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Atlanta, Georgia.
- Baird, C. (2001). *“Química Ambiental”*. Editorial Reverté, 2ª edición, Barcelona, España, pp. 334.
- Baltussen, E., Sandra, P., David, F. & Cramers, C. (1999). *“Stir bar sorptive extraction (SBSE), a novel extraction technique for aqueous samples: Theory and principles”*. Journal of Microcolumn Separations, 11(10), pp. 737–747.
- Baltussen, E., Cramers, C.A. & Sandra, P.J.F. (2002). *“Sorptive sample preparation – A review”*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 373(1-2), pp. 3–22.
- Barceló, D. & Postigo, C. (2014). *“Los contaminantes Emergentes, Descripción y tratamientos”*. Madrid, España, iAgua Magazine, 4, pp. 32–33.
- Bard, A.J. & Faulkner, L.R. (2000) *“Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications”*. New York, John Wiley & Sons, 2nd Edition, pp. 1–4.
- Behki, R., Topp, E., Dick, W. & Germon, P. (1993). *“Metabolism of the herbicide atrazine by Rhodococcus strains”*. Applied and Environmental Microbiology, 59(6), pp.1955–1959.
- Bello, K. (2016). *“Determinación del plaguicida paraquat en muestras tomadas de las lagunas de Montebello, Chiapas”*. UNAM, Ciudad de México.
- Bernal, M. (2008). *“Desarrollo de un muestreador pasivo para carbamatos y triazinas en agua”*. UNAM, México, D.F.
- Berrueta, L.A., Gallo, B., & Vicente, F. (1995). *“A Review of Solid Phase Extraction: Basic Principles and New Developments”*. Chromatographia, 40(7-8), pp. 474–483.
- Bicchi, C., Cordero, C., Rubiolo, P. & Sandra, P. (2003). *“Stir bar sorptive extraction (SBSE) in simple preparation from heterogeneous matrices: determination of pesticide residues in pear pulp at ppb (ng/g) level”*. European Food Research and Technology, 216 (5), pp. 449–456.
- BIPM (2008). *“JCGM 200:2008, Vocabulario Internacional de Metrología - Conceptos fundamentales y generales, y términos asociados (VIM)”*. Oficina Internacional de Pesas y Medidas (BIPM), Francia, pp. 28.
- Bodalbhai, L., Yokley, R. & Cheung, M. (1998). *“Analytical Method for the Determination of Atrazine and Its Dealkylated Chlorotriazine Metabolites in Urine by Gas Chromatography/Mass Selective Detection”*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46(1), pp.161–167.
-

- Botello, A., Rendón von Osten, J., Gold-Bouchot, G. & Agraz-Hernández, C., (2005). *“Golfo de México Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnóstico y Tendencias”*. Editorial UACAM. Segunda edición. Universidad Autónoma de Campeche, México. pp. 157–175.
- Bueno, D. (2012). *“Método de adiciones estándar y recuperación”*, [en línea]. Disponible en:
<https://worlderlenmeyer.blogspot.com/2012/10/metodo-de-adiciones-estandar-y>
- Buszewski, B. & Szultka, M. (2012). *“Past, Present, and Future of Solid Phase Extraction”*. Critical Reviews in Analytical Chemistry, 42(3), pp. 198–213.
- Calva, L.A. (1998). *“Plaguicidas Organoclorados”*. UAM, México, pp. 35–36.
- Camino-Sánchez, F.J., Rodríguez-Gómez R., Zafra-Gómez A., Santos-Fandila A. & Vílchez, J.L. (2014). *“Stir bar sorptive extraction: Recent applications, limitations and future trends”*. Talanta, 130, pp. 388–399.
- Carmona, B. (2004). *“Las patentes de transgénicos como mecanismo de dominación de los países desarrollados. Análisis de la situación en México y Estados Unidos”*. Universidad de las Américas, Puebla, México.
- Carod-Benedico, E. (2002) *“Herbicidas, ¿qué debemos saber los profesionales de Atención Primaria?”*. SEMERGEN, 28(8), 424–428.
- Casares, A. (2010). *“Análisis de polifenoles en los vinos mediante técnicas de separación”*. Universitat Politècnica de Catalunya, España, pp. 49–51.
- Castro de Esparza, M.A., Litter, M. I., Wong, M. & Mori, V. (2009). *“Metodologías analíticas para la determinación y especiación de arsénico en aguas y suelos”*. Ed. Iberoarsen, Cap. 3: Métodos espectrofotométricos UV-Vis, pp. 43–62.
- CDER (1994). *“Validation of Chromatographic Methods, Reviewer guidance”*. Center for Drug Evaluation and Research, US Food and Drug Administration.
- Cecilia, D.L. & Maggi, F. (2016). *“Kinetics of atrazine, deisopropylatrazine, and deethylatrazine soil biodecomposers”*. Journal of Environmental Management, 183(3), pp. 673–686.
- CENAM (2005). *“Elaboración de cartas de trazabilidad en el CENAM”*, Recomendación GIT 3/2005, Centro Nacional de Metrología, México.
- CENAM-EMA (2008). *“Guía para la validación y verificación de los procedimientos de examen cuantitativos empleados para el laboratorio clínico”*. Centro Nacional de Metrología, 1ª edición, México; [en línea]. Disponible en:
http://consultaema.mx:75/pqtinformativo/GENERAL/Clinicos/Carpeta_2_Criterios_evaluacion/CLINICOS_Validacion-Verificacion.pdf
-

- CENAM-EMA (2012). *Guía técnica de trazabilidad metrológica e incertidumbre de medida en las mediciones analíticas que emplean las técnicas de Cromatografía de Gases (CG) y Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR)*. Centro Nacional de Metrología, México.
- Cervantes, W. (2014). *Caracterización molecular y evaluación de la capacidad degradativa de la atrazina por bacterias aisladas de suelos*. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.
- Change.org (2016). *Salvemos Montebello, Chiapas*, [en línea]. Disponible en: <http://www.change.org/p/salvemos-montebello-chiapas-velascom-gobdelestado>
- Chavarría J. (2010). *Validación del Cromatógrafo de Líquidos de Alta Eficiencia del Lab. 3F Para el Análisis de Vitamina D₃*. UNAM, México, D.F.
- Choi, H. (2005), *Advantages of Photodiode Array*. SCINCO Co., Ltd., Seoul, Korea, [en línea]. Disponible en: http://www.hwe.oita-u.ac.jp/kiki/ronnbunn/paper_choi.pdf
- Christian, D.G. (2009). *Química Analítica*. McGraw-Hill, sexta edición, México.
- CHUA (2001). *Muestreo*. Complejo Hospitalario Universitario de Albacete, Universidad de Castilla-La Mancha, España, [en línea]. Disponible en: <http://www.chospab.es/web/calidad/archivos/Metodos/Muestreo.pdf>
- Ciba-Geigy Corporation (1994). *Environmental Fate Data Source Book for Atrazine*. Greensboro, N.C, USA.
- CICOPLAFEST (2002). *Catálogo oficial de plaguicidas*. Comisión Intersecretarial para el Control del Proceso y Uso de Plaguicidas y Sustancias Tóxicas, COFEPRIS, Secretaria de Salud, México.
- CICOPLAFEST (2005). *Acuerdo que establece la clasificación y codificación de mercancías cuya importación está sujeta a regulación por parte de las dependencias que integran la Comisión Intersecretarial para el control del proceso y uso de plaguicidas, fertilizantes y sustancias tóxicas*. Comisión Intersecretarial para el Control del Proceso y Uso de Plaguicidas y Sustancias Tóxicas, Diario Oficial de la Federación, México.
- COFEPRIS (2011). CCAyAC-P-058: *Criterios para la validación de métodos fisicoquímicos*. Comisión de Control Analítico y Ampliación de Cobertura, Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios, Secretaria de Salud, México.
- Colín, A. (2017). *Desarrollo y validación de un método analítico para la preconcentración y cuantificación de paraquat en muestras de agua epicontinental*. UNAM, Ciudad de México.

- Comber, S.D.W. (1999). "Abiotic persistence of atrazine and simazine in water". *Pesticide Science*, 55(7), pp. 696–702.
- CONAGUA (2016). "Estadísticas del agua en México. Edición 2016". Comisión Nacional del Agua, Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, México.
- CONANP-SEMARNAT (2007). "Programa de Conservación y Manejo: Parque Nacional Lagunas de Montebello, México". Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas y Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales, México.
- COPARMEX (2004). "Situación en México de las Existencias de Plaguicidas Sujetos al Convenio de Estocolmo". Confederación Patronal de la República Mexicana.
- Cortés, V. (2016). "Determinación simultánea de hidroxiatrazina, desetilatrazina y atrazina por medio de CLAR-UV-DAD en muestras de agua de las lagunas de Montebello". UNAM, Ciudad de México.
- Curran, W.S., Loux, M.M., Liebl, R.A. & Simmons, F.W. (1992). "Photolysis of imidazolinone herbicides in aqueous solutions and on soil". *Weed Science*, 40(1), pp. 143–148.
- Czaplicki, S. (2013). "Chromatography in Bioactivity Analysis of Compounds". Column Chromatography, InTech, Chapter 4, pp. 100–122.
- Da Cunha, J., Bellini, M.I., Pinelli, L., Fernández, A. & Davyt, D. (2012). "Determinación de atrazina e intermediarios de biodegradación en un medio de cultivo líquido para el enriquecimiento de consorcios microbianos". Séptimo Congreso de Medio Ambiente, La Plata, Argentina.
- Da Cunha, J., Pinelli, L., Bellini, M.I., Davyt, D. & Fernández, A. (2013). "Determinación de atrazina e intermediarios de biodegradación en enriquecimientos bacterianos provenientes de cursos de agua superficial de Uruguay". *INNOTEC*, (8), pp. 23–29.
- Dabrio, M.V., Blanch, G.P., Cifuentes, A., Díez-Masa, J.C., Frutos, M., Herraiz, M., Martínez, I. & Sanz, J. (2000). "Cromatografía y electroforesis en columna". Editorial Springer-Verlag Ibérica, Barcelona, España.
- Daughton, C.G. (2001). "Emerging pollutants, and communicating the science of environmental chemistry and mass spectrometry: pharmaceuticals in the environment". *Journal of American Society for Mass Spectrometry*, 12(10), pp. 1067–1076.
- David, M.D., Campbell, S. & Li, Q.X. (2000). "Pressurized fluid extraction of nonpolar pesticides and polar herbicides using in situ derivatization". *Analytical Chemistry*, 72(15), pp. 3665–3670.
-

- Day, R. & Underwood, A. (1989). *“Química Analítica Cuantitativa”*. Editorial Pearson-Prentice Hall, quinta edición. Estados Unidos.
- Del Vecchio, C. (2013). *“Modo de Acción de los Herbicidas. J.C. Papa. INTA Oliveros”*, [en línea]. Disponible en:
http://www.agroprofesional.com.ar/index.php?option=com_content&view=article&id=86:modo-de-accion-de-los-herbicidas-jc-papa&catid=41:articulos-tecnicos&Itemid=65
- Denver, J.M. & Sandström, M.W. (1991). *“Distribution of dissolved atrazine and two metabolites in the unconfined aquifer, southeastern, Delaware”*. U.S. Geological Survey Water-Resources Invest Report 91-4034, California, USA, pp. 314–318.
- Diamanti-Kandarakis, E., Bourguignon, J.P., Giudice, L.C., Hauser, R., Prins, G.S., Soto, A.M., Zoeller, R.T. & Gore, A.C. (2009). *“Endocrine-disrupting chemicals: An Endocrine Society scientific statement”*. Endocrine Reviews, 30(4), pp. 293–342.
- Dosal, M.A. & Villanueva, M. (2008). *“Introducción a la metrología química: Curvas de calibración en los métodos analíticos”*. Facultad de Química, UNAM, México, D.F. [en línea]. Disponible en:
http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/CurvasDeCalibracion_23498.pdf
- Durán, I., Escolero, O., Muñoz, E., Castillo, M. & Silva, G. (2014). *“Cartografía Geomorfológica a escala 1: 50000 del Parque Nacional Lagunas de Montebello, Chiapas (México)”*. Boletín de la Soc. Geológica Mexicana, 66(2), pp. 263–277.
- Durand, G., Abad, J.L., Sánchez-Baeza, F., Messeguer, A. & Barceló, D. (1994). *“Unequivocal Identification of Compounds Formed in the Photodegradation of Fenitrothion in Water/Methanol and Proposal of Selected Transformation Pathways”*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 42(3), pp. 814–821.
- DOF (1992). Norma Mexicana NMX-AA-71-1981, *“Análisis de agua.- determinación de plaguicidas organoclorados. - método de cromatografía de gases”*. Diario Oficial de la Federación, México.
- DOF (1995). Norma Oficial Mexicana 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”*. Secretaría de Salud, Diario Oficial de la Federación, México.
- DOF (2000). *“MODIFICACIÓN a la Norma Oficial Mexicana 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”*. Secretaría de Salud, Diario Oficial de la Federación, México.
-

- DOF (2009-a). Norma Oficial Mexicana NOM-014-CONAGUA-2003, "*Requisitos para la recarga artificial de acuíferos con agua residual tratada*". Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales, Diario Oficial de la Federación, México.
- DOF (2009-b). "*AVISO por el que se informa al público en general que la Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas ha concluido la elaboración del Programa de Manejo del Parque Nacional Lagunas de Montebello, ubicado en los municipios de La Trinitaria e Independencia, en el Estado de Chiapas*". Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales, Diario Oficial de la Federación, México.
- DOF (2012). Norma Oficial Mexicana NOM-047-SSA1-2011, "*Salud ambiental- Índices biológicos de exposición para el personal ocupacionalmente expuesto a sustancias químicas*". Secretaría de Salud, Diario Oficial de la Federación, México.
- DOF (2014). Norma Oficial Mexicana NOM-010-STPS-2014, "*Agentes químicos contaminantes del ambiente laboral. Reconocimiento, evaluación y control*". Secretaría del Trabajo y Previsión Social, Diario Oficial de la Federación, México.
- EFSA (2015). "*Reasoned opinion on the setting of a new maximum residue level for atrazine in cereals*". European Food Safety Authority Journal, 13(6), pp. 4126–4131.
- Es'haghi, Z. (2011). "*Photodiode Array Detection in Clinical Applications; Quantitative Analyte Assay Advantages, Limitations and Disadvantages*". Photodiodes - Communications, Bio-Sensings, Measurements and High-Energy Physics, InTech Editor, Tehran, Iran.
- Ettre, L.S. (1993). "*Nomenclature for chromatography (IUPAC Recommendations 1993)*". Pure and Applied Chemistry, 65(4), pp. 819–872.
- Eurolab (2016). Guía Eurachem: "*La adecuación al uso de los métodos analíticos – Una Guía de laboratorio para la validación de métodos y temas relacionados*". P.P. Morillas y co., 1ª edición, España.
- FAO (1996). "*Manejo de malezas para países en desarrollo*". FAO Plant production and protection papers. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Roma, Cap. 10.
- FAO (2015). "*Atrazine*". Food and Agriculture Organization of the United Nations, [en línea]. Disponible en:
http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/JMPR/Report07/Atrazine.pdf
-

- FAO (2016). "Los plaguicidas en cuanto contaminantes del agua". Food and Agriculture Organization of the United Nations, [en línea]. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/W2598S/w2598s06.htm>
- FAOSTAT (2011). "Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura: Datos estadísticos 2011". Food and Agriculture Organization of the United Nations, [en línea]. Disponible en: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/EP>
- FAO/OMS (2015). "Comisión del Codex Alimentarius: Manual de procedimiento. Programa Conjunto FAO/OMS sobre Normas Alimentarias". Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación & Organización Mundial de la Salud. Vigésima tercera edición, Roma, Italia.
- FQ (2007). "Técnicas Cromatográficas". Facultad de Química, UNAM, México, D.F. [en línea]. Disponible en: http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/M.Cromatograficos_6700.pdf
- García, L. (2014). "Desarrollo y validación de una metodología para la determinación y cuantificación simultánea de 2,4-D y 2,4-DCP por medio de CLAR-UV-DAD con aplicación en experimentos de sorción en suelos". UNAM, México, D.F.
- Gaus, I. (2000). "Effects of water extraction in a vulnerable phreatic aquifer: Consequences for groundwater contamination by pesticides, Sint-Jansteen area, The Netherlands". *Hydrogeology Journal*, 8(2), pp. 218–229.
- GERSTEL (2014). "Twister / Stir Bar Sorptive Extraction SBSE", [en línea]. Disponible en: <http://www.gerstel.com/en/twister-stir-bar-sorptive-extraction.htm>
- Gómez-Biedma, S., Soria, E. & Vivó, M. (2002). "Análisis electroquímico". *Revista de Diagnóstico Biológico*, 51(1), pp. 28.
- Gomis, V. (2008). "Tema 2. Cromatografía: Principios generales". Repositorio Institucional de la Universidad de Alicante, [en línea]. Disponible en: <https://rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/8246/7/T2cromagraf.pdf>
- González-Márquez, L.C. & Hansen, A. (2009). "Adsorción y mineralización de atrazina y relación con parámetros de suelos del DR 063 Guasave, Sinaloa". *Revista Mexicana de Ciencias Geológicas*, 26(3), pp. 587–599.
- González-Márquez, L.C. & Hansen, A. (2014). "Efecto de la salinidad en la adsorción de un herbicida en suelos agrícolas". *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 30(2), pp. 191–199.
- Guevara, E. Chávez, C., Guzmán, J., Hinojosa, L., Hernández, A. & Peralta, J. (2010). "Determinación Espectrofotométrica Simultánea de los Herbicidas 2,4-D, Atrazina y Dicamba en Muestras de Agua Mediante Tratamiento Quimiométrico". UANL, Nuevo León, México.
-

- Hansen, A., Treviño-Quintanilla, L., Márquez-Pacheco, M., Villada-Canela, M., González-Márquez, L., Guillén-Garcés, L. & Hernández-Antonio, A. (2013). "Atrazina: un herbicida polémico". Revista Internacional de Contaminación Ambiental, 29, pp. 65–84.
- Harris, D. (2010). "Análisis Químico Cuantitativo". Editorial Reverté, 6ª edición, España, pp. 472–474, 607–631, 721–731.
- Hartenbach, A.E., Hofstetter, T.B., Tentscher, P.R., Canonica, S., Berg, M. & Schwarzenbach, R.P. (2008). "Carbon, hydrogen, and nitrogen isotope fractionation during light-induced transformations of atrazine". Environmental Science & Technology, 42(21), pp. 7751–7756.
- Harvey, D. (2000). "Modern Analytical Chemistry". 1st Ed., McGraw- Hill, USA, pp. 544–597.
- Hayes, T.B, Anderson, L., Beasley, V.R., de Solla, S.R., Iguchi, T. et al. (2011). "Demasculinization and feminization of male gonads by atrazine: Consistent effects across vertebrate classes". The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 127(1-2), pp. 64–73.
- He, M., Chen, B. & Hu, B. (2014). "Recent developments in stir bar sorptive extraction". Analytical and Bioanalytical Chemistry, 406(8), pp. 2001–2026.
- Hernández-Antonio, A. & Hansen, A. (2011). "Uso de plaguicidas en dos zonas agrícolas de México y evaluación de la contaminación de agua y sedimentos". Revista Internacional de Contaminación Ambiental, 27, pp. 115–127.
- Hernández, L. & González, C. (2002). "Introducción al análisis instrumental". Editorial Ariel, primera edición, Barcelona, España, pp. 45–86.
- Hewitt, P. (2004). "Física conceptual". Editorial Pearson Educación, novena edición, México, pp. 498–500.
- Huertas, C., Morillo, J., Usero, J. & Gracia-Manarillo, I. (2007). "Validation of stir bar sorptive extraction for the determination of 24 priority substances from the European Water Framework Directive in estuarine and sea water". Talanta, 72(3), pp. 1149–56.
- IARC (2014). "IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. International report 14/002". International Agency for Research on Cancer. Lyon, France.
- INECC (2015). "Los plaguicidas y su transporte en el ambiente". SEMARNAT, Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático.
- INSHT (2009). "Fichas Internacionales de Seguridad Química: Atrazina". Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo.
-

- Isern, M.D. (2002). *“La Química de los Pesticidas y su Metodología Analítica”*. Universidad del Centro Educativo Latinoamericano, Rosario, Argentina.
- ISO 8402:1994. *“Quality management and quality assurance – Vocabulary”*. International Organization for Standardization.
- ISO/IEC 17025:2005. *“General requirements for the competence of testing and calibration laboratories”*. International Organization for Standardization.
- IUPAC (2014). *“Compendium of Chemical Terminology. Gold Book”*, version 2.3.3. International Union of Pure and Applied Chemistry, [en línea]. Disponible en: <http://goldbook.iupac.org/pdf/goldbook.pdf>
- Iwata, H., Tanabe, S., Sakai, N., Nishimura, A. & Tatsukawa, R. (1994). *“Geographical distribution of persistent organochlorines in air, water and sediments from Asia and Oceania, and their implications for global redistribution from lower latitudes”*. Environmental Pollution, 85(1), pp. 15–33.
- Jaramillo, F., Rincón, A.R. & Rico, R. (2011). *“Toxicología Ambiental”*. Textos Universitarios, Ciencias Básicas, U. de G., México, pp. 178, 193–194.
- Jiménez, C., (2005). *“La Contaminación Ambiental en México. Causas, Efectos y tecnología apropiada”*. Limusa, pp. 29–50.
- Jiménez-Ballesta, R. (2017). *“Introducción a la contaminación de suelos”*. Editorial Mundi-Prensa Libros, Madrid, España.
- Kataoka, H. (2010). *“Recent developments and applications of microextraction techniques in drug analysis”*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 396(1), pp. 339–64.
- Klaassen, C.D. & Watkins III, J. B. (2005). *“Fundamentos de Toxicología de Casarett y Doull”*. McGraw-Hill-Interamericana, Madrid, España.
- Kniewald, J., Jakominić, M. & Tomjelnović, A. (2000). *“Disorders of male rat reproductive tract under the influence of atrazine”*. Journal of Applied Toxicology, 20(1), pp. 61–8.
- Kostopoulou, M. & Nicolaou, A. (2008). *“Analytical problems and the need for sample preparation in the determination of pharmaceuticals and their metabolites in aqueous environmental matrices”*. Trends in Analytical Chemistry, 27(11), pp. 1023–1035.
- La Farré, M., Pérez, S., Kantiani, L. & Barceló, D. (2008). *“Fate and toxicity of emerging pollutants, their metabolites and transformation products in the aquatic environment”*. Trends in Analytical Chemistry, 27(11), pp. 991–1007.

- Lanças, F.M., Queiroz, M.E., Grossi, P & Olivares, I.R. (2009). "Recent developments and applications of stir bar sorptive extraction". Journal of Separation Science, 32(5-6), pp. 813–24.
- Lazos, R.J. & Hernández, I. (2004). "Validación de métodos: un enfoque práctico". Centro Nacional de Metrología, Querétaro, México.
- LeBaron, M., McFarland, J. & Burnside, O. (2008). "The Triazine Herbicides: 50 Years Revolutionizing Agriculture". Elsevier Science, 1st Ed., Charon Tec Ltd.
- León, V.M., Álvarez, B., Cobollo, M.A., Muñoz, S. & Valor, I. (2003). "Analysis of 35 priority semivolatile compounds in water by stir bar sorptive extraction–thermal desorption–gas chromatography–mass spectrometry: I. Method optimisation". Journal of Chromatography A, 999(1-2), pp. 91–101.
- Leong, M.I. & Huang, S.D. (2008). "Dispersive liquid-liquid microextraction method based on solidification of floating organic drop combined with gas chromatography with electron-capture or mass spectrometry detection". Journal of Chromatography A, 1211(1-2), pp. 8–12.
- Lerch, R.N., Sadler, E.J., Sudduth, K.A., Baffaut, C. & Kitchen, N.R. (2011). "Herbicide transport in Goodwater Creek experimental watershed: I. Long-term research on atrazine". Journal of the American Water Resources Association, 47(2), pp. 209–223.
- Lough, W.J. & Wainer, I.J. (1995). "High Performance Liquid Chromatography: Fundamental Principles and Practice". Ed. Blackie Academic & Professional, pp. 120.
- Manahan, E.S. (2007). "Introducción a la Química Ambiental". Ed. Reverté, UNAM, Cap. 4, pp. 145–190.
- Marín, R. (2003). "Fisicoquímica y microbiología de los medios acuáticos", Tratamiento y calidad de aguas. Ed. Díaz de Santos. Madrid, España, pp. 64.
- McNair, H. & Miller, J. (1998). "Basic Gas Chromatography". Wiley & Sons Inc., 1st Ed., USA, Chapters 1, 2 & 10.
- Mehta, A. (2012). "Principle of Reversed-Phase Chromatography HPLC/UPLC", [en línea]. Disponible en: <https://pharmaxchange.info/2012/12/principle-of-reversed-phase-chromatography-hplc-uplc-with-animation>
- Mendoza, C. (2011). "Información General sobre los Herbicidas". Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático (INECC), [en línea]. Disponible en: http://www.inecc.gob.mx/descargas/bioseguridad/2011_simp_ogm_tolerancia_pres1.pdf

- Miller, J.N. & Miller, J.C. (2002). *“Estadística y Quimiometría para Química Analítica”*. 4ª edición, Pearson-Prentice Hall, Madrid, España.
- Montaño, J.M. (2013). *“Elucidación de los mecanismos de movilidad y retención de atrazina e hidroxiatrazina en los suelos por medio de CLAR-DAD”*. UNAM, México, D.F.
- Moorman, T.B., Jayachandran, K. & Reungsang, A. (2001). *“Adsorption and desorption of atrazine in soils and subsurface sediments”*. Soil Science, 166(12), pp. 921–929.
- Mora, L., Bonifaz, R. & López-Martínez, R. (2016). *“Unidades geomorfológicas de la cuenca del Río Grande de Comitán, Lagos de Montebello, Chiapas-México”*. Boletín de la Soc. Geológica Mexicana, 68(3), pp. 377–394.
- Mora, L., García, L.A., Ramos, Y.R., Bonifaz, R. & Escolero, O. (2017). *“Description of chemical changes in a large karstic system: Montebello, México”*. Procedia Earth and Planetary Science, 17, pp. 829–832.
- Mouvet, C., Amalric, L., Broussard, S., Lang, G., Brecht, A. & Gauglitz, G. (1996). *“Reflectometric Interference Spectroscopy for the Determination of Atrazine in Natural Water Samples”*. Environmental Science & Technology, 30(6), pp. 1846–1851.
- Müller, K., Duwig, C., Prado, B., Siebe, C., Hidalgo, C. & Etchevers, J. (2012). *“Impact of long-term wastewater irrigation on sorption and transport of atrazine in Mexican agricultural soils”*. Journal of Environmental Science and Health B, 47(1), pp. 30–41.
- Murray, E.K., Thomas, S.M. & Bodour, A.A. (2010). *“Prioritizing research for trace pollutants and emerging contaminants in the fresh water environment”*. Environmental Pollution, 158(12), pp. 3462–3471.
- Navarro, J.M., Flores, M.P., Jordán, M.J. & Hellín, M.P. (2015). *“Técnicas Instrumentales y recursos analíticos. Nivel básico”*. Escuela de Formación e Innovación, Región de Murcia, España.
- NCBI (2010). *“Atrazine”*. National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine, PubChem Open Chemistry Database; CID= 2256, [en línea]. Disponible en: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2256>
- NCBI (2017). *“Deethylatrazine”*. National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine, PubChem Open Chemistry Database; CID= 22563, [en línea]. Disponible en: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/22563>

- NCBI (2018). "2-Hydroxyatrazine". National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine, [PubChem Open Chemistry Database](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/16553); CID=16553, [en línea]. Disponible en: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/16553>
- Neng, N.R., Mestre, A.S., Carvalho, A.P. & Nogueira, J.M.F. (2011). "Powdered activated carbons as effective phases for bar adsorptive micro-extraction (BA μ E) to monitor levels of triazinic herbicides in environmental water matrices". *Talanta*, 83(5), pp. 1643–1649.
- Neng, N.R., Pinto, M.L., Pires, J., Marcos, P.M. & Nogueira, J.M.F. (2007). "Development, Optimisation and Application of Polyurethane Foams as New Polymeric Phases for Stir Bar Sorptive Extraction". *Journal of Chromatography A*, 1171(1-2), pp. 8–14.
- Neue, U.D. (1997). "HPLC Columns: Theory, Technology, and Practice". 1st Ed., WILEY-VCH, New York, USA.
- Nickerson, B. & Colón, I. (2011). "Sample Preparation of Pharmaceutical Dosage Forms: Challenges and Strategies for Sample Preparation and Extraction". Ed. Springer, USA, pp. 63–92.
- Noblet, J.A., Smith, L.A. & Suffet, I.H. (1996). "Influence of natural dissolved organic matter, temperature, and mixing on the abiotic hydrolysis of triazine and organophosphate pesticides". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(11), pp. 3685–3693.
- NRA (2002). "Final report review of atrazine. NRA Chemical Review Program". National Registration Authority for Agricultural and Veterinary Chemicals. Canberra, Australia, pp. 57.
- OJEU (2004). "Commission decision concerning the non-inclusion of atrazine in Annex I to Council Directive 91/414/EEC and the withdrawal of authorisations for plant protection products containing this active substance". *Official Journal of the European Union*, Brussels, Belgium, pp. 3.
- Olea, S. (2015). "Análisis del impacto de la actividad agrícola en el agua subterránea en la zona de la trinitaria, Chiapas". UNAM, México, D.F.
- Pelizzetti, E., Maurino, V., Minero, C., Carlin, V., Tosato, L.M., Pramauro, E., & Zerbinati, O. (1990). "Photocatalytic degradation of atrazine and other s-triazine herbicides". *Environmental Science & Technology*, 24(10), pp. 1559–1565.
- Peña, S.M. (2010). "Desarrollo de nuevas tecnologías de preparación de muestras para la determinación de hidrocarburos aromáticos policíclicos en matrices medioambientales alimentarias". Universidad de Santiago de Compostela, España.

- Peters, F., Drummer, O. & Musshoff, F. (2007). "Validation of New Methods". Forensic Science International, 165(2-3), pp. 216–224.
- Popp, P., Bauer, C. & Wennrich, L. (2001). "Application of stir bar sorptive extraction in combination with column liquid chromatography for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water samples". Analytica Chimica Acta, 436(1), pp. 1–9.
- Portugal, F.C., Pinto, M.L., Pires, J. & Nogueira, J.M.F. (2010). "Potentialities of polyurethane foams for trace level analysis of triazinic metabolites in water matrices by stir bar sorptive extraction". Journal of Chromatography A, 1217(23), pp. 3707–3710.
- PPDB (2015). "Atrazine". Pesticide Properties DataBase, [en línea]. Disponible en: <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/footprint/es/Reports/43.htm>
- Prado, M.G. & Covarrubias, M.R. (1996). "Introducción a la cromatografía de líquidos de alta resolución". 1ª edición, México, D.F., pp. 1–84.
- Prieto, A., Basauri, O., Usobiaga, A., Rodil, R., Fernández, L.A., Etxebarria, N. & Zuloaga, O. (2010). "Stir-bar sorptive extraction: A view on method optimisation, novel applications, limitations and potential solutions". Journal of Chromatography A, 1217(16), pp. 2642–2666.
- Qin, Z., Bragg, L., Ouyang, G., & Pawliszyn, J. (2008). "Comparison of thin-film microextraction and stir bar sorptive extraction for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in aqueous samples with controlled agitation conditions". Journal of Chromatography A. 1196-1197, pp. 89–95.
- Ramalho, R. (1991). "Tratamiento de Aguas Residuales". Ed. Reverté, Barcelona, España, pp. 5–30.
- Rapoport, L. & Smolin, E. (2009). "The Chemistry of Heterocyclic Compounds: s-Triazines and Derivatives, Volume 13". Ed. John Wiley & Sons, pp. 1–16.
- Ravelo, L. (2009). "Metodologías analíticas alternativas para la determinación de plaguicidas en aguas y productos alimentarios". Universidad de La Laguna, España, pp. 260.
- Ridgway, K., Lalljie, S.P.D., & Smith, R.M. (2007). "Sample preparation techniques for the determination of trace residues and contaminants in foods". Journal of Chromatography A, 1153(1-2), pp. 36–53.
- Rykowska, I. & Wasiak, W. (2013). "Advances in stir bar sorptive extraction coating: A review". Acta Chromatographica, 25(1), pp. 27–46.

- Rodríguez, J.A., Aguilar-Arteaga, K., Díez, C. & Barrado, E. (2013). "Recent Advances in the Extraction of Triazines from Water Samples, Herbicides - Advances in Research". Ed. Dr. Andrew Price, InTech, Chapter 13.
- Roehrs, R., Zanella, R., Pizzuti, L., Adaime, M.B., Pareja, L., Niell, S., Cesio, M.V. & Heinzen, H. (2009). "Liquid Chromatographic-Diode-Array Detection Multiresidue of Rice Herbicides in Drinking and Paddy-Field Water". Journal of AOAC International, 92(4), pp. 1190–1195.
- Rojas, E. (2016). "Cromatografía: Análisis Cuantitativo". Facultad de Química, UNAM, México, [en línea]. Disponible en:
http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/Cromatografia-Analisiscuantitativo_33258.pdf
- Romero, A.S. (2002). "Cromatografía: curso de métodos". Instituto de Biotecnología, UNAM, [en línea]. Disponible en:
<http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/Cromatografia.pdf>
- Rouessac, F. & Rouessac, A. (2007). "Chemical Analysis: Modern Instrumentation and Techniques". 2nd Ed., John Wiley & Sons Ltd, England.
- Rusell, V.S. (1974). "Pollution: Concept and definition". Biological Conservation, 6(3), pp. 157–161.
- Rusiecki, J.A., De Roos, A., Lee, W.J., Dosemeci, M., Lubin, J.H., Hoppin, J.A., Blair, A., & Alavanja, M.C. (2004). "Cancer incidence among pesticide applicators exposed to atrazine in the Agricultural Health Study". Journal of the National Cancer Institute, 96(18), pp. 1375–1382.
- Salazar, L. (2008). "Evaluación de la toxicidad de hidrocarburos poliaromáticos en un sistema acuático y su aplicación en la ponderación de evidencias". IPN, México, pp. 15–20.
- Sandra, P., Baltussen, E., David, F. & Hoffman, A. (2015). "App. Note 2/2000: Stir Bar Sorptive Extraction (SBSE) applied to Environmental Aqueous Samples". GERSTEL GmbH & Co. KG, [en línea]. Disponible en:
<http://www.gerstel.cn/pdf/p-gc-an-2000-02.pdf>
- Sarafraz-Yazdi, A. & Amiri, A. (2010) "Liquid-phase microextraction". TrAC Trends in Analytical Chemistry, 29(1), pp. 1–14.
- Schmidt, K. & Podmore, I. (2015) "Current Challenges in Volatile Organic Compounds Analysis as Potential Biomarkers of Cancer". Journal of Biomarkers, 981458, pp. 8.
- SEMARNAT (1993). "Clasificación de plaguicidas", [en línea]. Disponible en:
<https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/25247/clasificaciones.pdf>
-

- Shabir, G.A. (2003). "Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis: Understanding the differences and similarities between validation requirements of the U.S. FDA, the US Pharmacopeia and the ICH". *Journal of Chromatography A*, 987(1–2), pp. 57–66.
- Sharapin, N. (2000). "Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos". Ed. Convenio Andrés Bello, Capítulo: La cromatografía, pp. 159–190.
- Skoog, D., Holler, J. & Crouch, S. (2008). "Principios de Análisis Instrumental". Sexta edición, Cengage Learning México, pp. 1–3, 11–22, 22–23, 110–113, 131–133, 157–158, 283–290, 627–653, 761–788 y 816–855.
- Skoog, D., West, D., Holler, J. & Crouch, S. (2014). "Fundamentos de Química Analítica". Novena edición, Cengage Learning México, pp. 649–654 y 847–948.
- Smith, R.M. (2003). "Before the injection—modern methods of sample preparation for separation techniques". *Journal of Chromatography A*, 1000(1-2), pp. 3–27.
- Snyder, L.R., Kirkland, J.J. & Dolan, J.W. (2010). "Introduction to Modern Liquid Chromatography". 3rd Ed., John Wiley & Sons, New York, USA.
- Spare, W.C. (1988). "Aqueous photolysis of 14C-atrazine under natural sunlight. Agrisearch", Project No. 12112-A. Ciba-Geigy Co., NC, USA.
- SSA (1993). NOM-045-SSA1-1993. "Plaguicidas, productos para uso agrícola, forestal, pecuario, de jardinería, urbano e industrial. Etiquetado". Secretaría de Salud, pp. 160.
- Stamer, J.K. & Wiczorek, M.E. (1996). "Pesticide distributions in surface water". *Journal AWWA*, 88(11), pp. 79–87.
- Stöppler, M. (1997). "Sampling and sample preparation. Practical Guide for Analytical Chemists". Springer-Verlag, pp. 137–138.
- Švarc-Gajić, J. (2012). "Chemistry research and application. Sampling and sample preparation in analytical chemistry". Nova Science Pub., New York, pp. 277.
- Swan, S.H., Kruse, R.L., Liu, F., Barr, D.B., Drobnis, E.Z., Redmon, J.B., Wang, C. & Overstreet, J.W. (2003). "Semen quality in relation to biomarkers of pesticide exposure". *Environmental Health Perspectives*. 111(12), pp. 1478–1484.
- Telgheder, U., Bader, N. & Alshelmani, N. (2018). "Stir bar sorptive extraction as a sample preparation technique for chromatographic analysis: An overview". *Asian Journal of Nanosciences and Materials*, 1(2), pp. 54–60.
- Thompson, M. & Ellison, S.L. (2004). "A review of interference effects and their correction in chemical analysis with special reference to uncertainty". *Accreditation and Quality Assurance*, 10(3), pp. 82–97.
-

- Thurman, E.M. & Cromwell, A.E. (2000). *“Atmospheric transport, deposition, and fate of triazine herbicides and their metabolites at Isle Royale National Park”*. Environmental Science & Technology, 34(15), pp. 3079–3085.
- Torres, S. (1994). *“Introducción a la Cromatografía”*. Ediciones de la Universidad Nacional de Colombia, Capítulo: Glosario de los términos más usados en cromatografía, pp. 15.
- Trajkovska, V., Petrovska-Jovanović, S. & Cvetkovski, M. (2001). *“Development and optimization of a method for the determination of simazine, atrazine and propazine using solid-phase extraction and HPLC/GC”*. Journal of the Serbian Chemical Society, 66(3), pp. 199–204.
- UNISON (2001). *“Muestreo”*. Universidad de Sonora, [en línea]. Disponible en: <http://www.estadistica.mat.uson.mx/Material/elmuestreo.pdf>
- USEPA (2006). *“Decision Documents for Atrazine”*. United States Environmental Protection Agency, [en línea]. Disponible en: https://www3.epa.gov/pesticides/chem_search/reg_actions/reregistration/red_PC-080803_1-Apr-06.pdf
- USEPA (2010). *“Types of Pesticides”*. United States Environmental Protection Agency, [en línea]. Disponible en: <http://www.epa.gov/pesticides/about/types.htm>. 12/03/2010
- USEPA (2015). *“Endocrine Disruption”*. United States Environmental Protection Agency, [en línea]. Disponible en: <https://www.epa.gov/endocrine-disruption/what-endocrine-disruption>
- USEPA (2016). *“Atrazine Monitoring Program: Data File”*. United States Environmental Protection Agency, [en línea]. Disponible en: <https://www.regulations.gov/document?D=EPA-HQ-OPP-2003-0367-0317>
- USP (2007). *“USP Chromatographic Reagents 2007-2008: Used in USP-NF and Pharmacopeial Forum”*. United States Pharmacopeia.
- USP (2017). *“First Supplement to USP 40–NF 35: Physical Tests / Chapter <621> Chromatography”*. United States Pharmacopeial Convention.
- Willard, H.H., Merritt, L.L. & Dean, J A. (1974). *“Instrumental Methods of Analysis”*. 5th Ed., D. Van Nostrand Company, New York, USA.
- Wong, F., Alegria, H.A., Jantunen, L.M., Bidleman, T.F., Salvador-Figueroa, M., Gold-Bouchot, G., Ceja-Moreno, V., Waliszewski, S.M. & Inzanzón, R. (2008). *“Organochlorine pesticides in soils and air of Southern Mexico: Chemical profiles and potential for soil emissions”*. Atmospheric Environment, 42(33), pp. 7737–7745.
-