

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



**IMPLEMENTACIÓN DE UN SISTEMA LAB-ON-VALVE CON EXTRACCIÓN
POR MICROONDAS PARA LA DETERMINACIÓN DE LOS HERBICIDAS
ATRAZINA Y 2,4-D EN GRANO DE MAÍZ**

Por

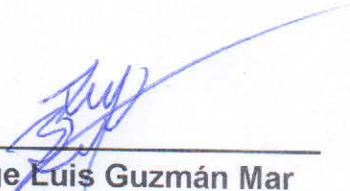
I. Q. ANA SUSANA SANTOS HERNÁNDEZ

Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRÍA EN CIENCIAS con orientación en
QUÍMICA ANALÍTICA AMBIENTAL

JULIO, 2015

IMPLEMENTACIÓN DE UN SISTEMA LAB-ON-VALVE CON EXTRACCIÓN POR
MICROONDAS PARA LA DETERMINACIÓN DE LOS HERBICIDAS ATRAZINA Y
2,4-D EN GRANO DE MAÍZ

Aprobación de la tesis:



Dr. Jorge Luis Guzmán Mar
Presidente

Dra. María Guadalupe Sánchez Anguiano
Secretaria

Dr. Eugenio Hernández Fernández
Vocal 1

Dr. Ulrico Javier López Chuken
Vocal 2

Dra. Ma. Araceli Hernández Ramírez
Subdirectora de Estudios de Posgrado

IMPLEMENTACIÓN DE UN SISTEMA LAB-ON-VALVE CON EXTRACCIÓN POR
MICROONDAS PARA LA DETERMINACIÓN DE LOS HERBICIDAS ATRAZINA Y
2,4-D EN GRANO DE MAÍZ

Comité Tutorial:



Dr. Jorge Luis Guzmán Mar
Director

Dra. Isabel del Carmen Sáenz Tavera
Co-Directora

Dra. María Guadalupe Sánchez Anguiano
Tutora 1

Dr. Eugenio Hernández Fernández
Tutor 2

Dr. Ulrico Javier López-Chuken
Tutor 3

RESUMEN

Ana Susana Santos Hernández

Fecha de graduación: Julio de 2015

Universidad Autónoma de Nuevo León - Facultad de Ciencias Químicas

Título de tesis: IMPLEMENTACIÓN DE UN SISTEMA LAB-ON-VALVE CON EXTRACCIÓN POR MICROONDAS PARA LA DETERMINACIÓN DE LOS HERBICIDAS ATRAZINA Y 2,4-D EN GRANO DE MAÍZ.

Número de páginas: 117.

Candidato para el Grado de Maestro en Ciencias con Orientación en Química Analítica Ambiental.

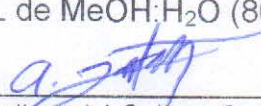
Área de estudio: Química Analítica Ambiental

Propósito y método de estudio: La presente investigación consistió en implementar un método automatizado para la determinación de atrazina y 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) en grano de maíz. Se basa en la uso de un sistema Lab On Valve utilizando la extracción asistida por microondas y una fase sólida Strata-X acoplado a una bomba de HPLC para preconcentrar a los analitos y detectarlos a baja concentración permitiendo el análisis en línea. En la actualidad estos herbicidas se usan comúnmente en este tipo de cultivo y es importante monitorizar si existe presencia de ellos, debido a que si se usa de manera indiscriminada pudieran afectar a los productos alimenticios.

La separación se realizó en una columna monolítica C18 (25 x 4.6 mm) con una fase móvil que consiste en $\text{CH}_3\text{CN}:\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONa}$ (20:80 v/v) (pH 4) a un flujo de 2 mL/min y los analitos fueron detectados a las longitudes de onda de 223 y 230 nm para la atrazina y 2,4-D, respectivamente.

Se evaluaron los factores que influyen en la extracción de los herbicidas por microondas en el grano de maíz, mediante un diseño experimental para establecer las mejores condiciones de extracción los cuales fueron tiempo, temperatura y relación de agente extractante y para la etapa de preconcentración se evaluaron diferentes factores tales como cantidad de fase sólida y eluyente.

Contribuciones y conclusiones: Se implementó el sistema automatizado para la monitorización de los herbicidas atrazina y 2,4-D en el grano de maíz. Los mejores resultados se obtuvieron utilizando como agente de extracción una mezcla de MeOH:agua (30:70 v/v) a 50 °C, un tiempo de extracción de 20 min y para la preconcentración se cargó un volumen de 10 mL de muestra eluyéndose con 0.5 mL de MeOH:H₂O (80:20 v/v) a 1 mL/min.


(estudiante) I.Q. Ana Susana Santos Hernández


(asesor) Dr. Jorge Luis Guzmán Mar

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para la realización de mis estudios de Maestría.

A la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, por todas las facilidades para la realización del presente proyecto de investigación.

A Ciencia Básica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económicos al proyecto con número de registro 177990.

Agradezco a mis revisores la Dra. Guadalupe Sánchez Anguiano, Dr. Eugenio Hernández Fernández y al Dr. Ulrico Javier López Chuken por sus valiosas observaciones y sugerencias para el enriquecimiento de este manuscrito.

De manera muy especial agradezco a mi Asesor el Dr. Jorge Luis Guzmán Mar y a mi codirectora la Dra. Isabel del Carmen Sáenz Tavera por todo su apoyo para la realización de este trabajo por compartir sus experiencias y su tiempo.

Al Dr. Víctor Cerdá y a la Dra. Sabrina Clavijo del Grupo de Química Analítica, Automatización y Ambiental de la Universidad de las Islas Baleares, España, por las facilidades otorgadas durante mi estancia de investigación.

A mis compañeros de generación por su amistad por hacer que mi estadía durante estos dos años fuera muy agradable.

También agradezco a mis padres Daniel Santos Santiago, Virginia Hernández Cruz, y a mis hermanas Elizabeth y Antonia por todo su apoyo y por estar en cada momento de mi vida.

Le doy gracias a Dios por todo sus bendiciones y por darme la fuerza para seguir adelante en los momentos difíciles.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
CAPÍTULO 1	
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Hipótesis	4
1.2 Objetivo general	5
1.3 Objetivos específicos	5
CAPÍTULO 2	
2. MARCO TEÓRICO	6
2.1 PRODUCCIÓN DE MAÍZ	6
2.2 HERBICIDAS	8
2.2.1 Ácido 2,4-diclorofenoxiacético(2,4-D)	9
2.2.2 2-cloro-4-etilamino-6-isopropilamino-1,3,5-triazina (atrazina)	10
2.3 SISTEMA LAB ON VALVE	11
2.4 EXTRACCIÓN ASISTIDA POR MICROONDAS	12
2.4.1 Factores que afectan al proceso de extracción	13
2.4.1.1 Disolvente	13
2.4.1.2 Potencia de microondas y temperatura de extracción	15
2.4.1.3 Tiempo de extracción	16
2.5 EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA (SPE)	16
2.5.1 Factores que afectan al proceso SPE	17
2.5.1.1 Tipo de adsorbente	17
2.5.1.2 Disolvente de elución	18
2.5.1.3 Proporción entre el adsorbente y la muestra	18
2.6. ANTECEDENTES	18
2.6.1 Extracción asistida por microondas (MAE)	19
2.6.2 Sistema Lab-On-Valve (LOV)	21
CAPITULO 3	
3. MATERIALES Y MÉTODOS	25
3.1 MATERIALES Y EQUIPOS	25
3.1.1 Reactivos	25

3.1.2	Equipo	26
3.2.	METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	27
3.2.1	Estudio espectrofotométrico de los herbicidas atrazina y 2,4-D	27
3.2.2	Separación cromatográfica	28
3.2.2.1	Curvas de calibración y parámetros analíticos	31
3.2.3	Extracción asistida por microondas	32
3.2.4	Preconcentración	35
3.2.5	Disposición de residuos	40
CAPÍTULO 4		
4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
4.1	ESTUDIO ESPECTROFOTOMÉTRICO DE LOS HERBICIDAS ATRAZINA Y 2,4-D	41
4.2	SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA MULTIJERINGA-HPLC	46
4.3	EXTRACCIÓN ASISTIDA POR MICROONDAS (MAE)	50
4.4	PRECONCENTRACIÓN DE LOS HERBICIDAS	57
CAPÍTULO 5		
5.	CONCLUSIONES	63
CAPÍTULO 6		
6.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
CAPÍTULO 7		
7.	APÉNDICE	70
7.1	ANEXOS	102

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1.-	Movilidad de los herbicidas en el medio ambiente.	2
2.-	Estructura química de 2,4-D.	10
3.-	Estructura química de atrazina.	10
4.-	Sistema automatizado del tipo Lab-On-Valve (LOV).	12
5.-	Esquema del sistema desarrollado para la separación cromatográfica de los herbicidas en estudio.	30
6.-	Equipo de microondas usado para la extracción de los herbicidas en el grano de maíz.	32
7.-	Esquema de preconcentración usando una mini columna para la extracción en fase sólida.	39
8.-	Fuente de luz de deuterio y espectrómetro USB2000 CCD.	40
9.-	Espectro de absorción de una disolución de herbicidas en estudio a una concentración de 10 mg/L, tanto para atrazina como para el 2,4-D.	41
10.-	Efecto del pH en la absorbancia 2,4-D y atrazina.	42
11.-	Estudio de la cantidad de buffer a pH 2 y 4 para a) atrazina y b) 2,4-D.	43
12.-	Monitorización de la estabilidad de los herbicidas en estudio en un tiempo de 60 min.	44
13.-	Curvas de calibración de a) 2,4-D y b) atrazina obtenidas mediante espectrofotometría UV-Vis.	45
14.-	Efecto del pH de la fase móvil en la separación cromatográfica de atrazina y 2,4-D utilizando para el ajuste de pH a) HCl 1 M y b) ácido acético 0.1 M.	46
15.-	Efecto de la variación de la concentración del acetato de sodio en la separación cromatográfica.	47
16.-	Cromatograma de atrazina y 2,4-D a una concentración de 8 y	48

16 mg/L respectivamente.

- | | | |
|-------------|--|-----------|
| 17.- | Función de deseabilidad para evaluar las condiciones de extracción a través del diseño de experimentos tipo Box-Behnken. | 52 |
| 18.- | Diagrama de pareto para 2,4-D de la influencia de las variables correspondientes a la optimización de la extracción por microondas. | 55 |
| 19.- | Diagrama de pareto para atrazina de la influencia de las variables correspondientes a la optimización de la extracción por microondas. | 55 |
| 20.- | Condiciones óptimas de extracción para los herbicidas en el grano de maíz. | 56 |
| 21.- | Porcentaje de metanol para la desorción de los herbicidas strata-X, utilizando una concentración de 1 mg/L y volumen de muestra de 3 mL. | 58 |
| 22.- | Efecto del volumen de eluente y la cantidad en mg de fase sólida strata-X utilizada para preconcentrar. | 59 |
| 23.- | Efecto de la carga muestra durante la etapa de preconcentración con 30 mg de fase sólida, 0.5 mL de eluente y caudal de 1 mL/min. | 60 |

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1.-	Producción de maíz en grano en el estado de Nuevo León en el año 2013.	6
2.-	Tipos de plaguicidas.	7
3.-	Constantes físicas y factores de disipación de algunos solventes.	15
4.-	Etapas del método para la separación cromatográfica de los herbicidas atrazina y 2,4-D.	29
5.-	Diseño de experimentos tipo Box Behnken y Factorial 3 ² para obtener condiciones óptimas de extracción.	34
6.-	Procedimiento para el acondicionamiento de la fase estacionaria strata-X con ayuda del software Autoanalysis v5.0.	37
7.-	Procedimiento de las etapas de preconcentración y separación de los herbicidas en muestra fortificada de maíz con ayuda del software Autoanalysis v5.0.	38
8.-	Parámetros analíticos del método de separación cromatográfica propuesto utilizando el software Autoanalysis v5.0.	49
9.-	Porcentajes de recuperación de los herbicidas en estudio de acuerdo al diseño Box-Behnken.	51
10.-	Resultados obtenidos del diseño factorial 3 ² .	54
11.-	Porcentajes de recuperación de 2,4-D y atrazina.	57
12.-	Parámetros analíticos de la etapa de preconcentración.	61
13.-	Porcentajes de recuperación dentro del sistema implementado para la determinación los herbicidas en el grano de maíz.	62

NOMENCLATURA

Atrazina	2-cloro-4-etilamino-6-isopropilamino-1,3,5-triazina.
2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético.
EPA	Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos.
Load	Carga.
USDA	Departamento de Agricultura de Estados Unidos.
MAE	Extracción asistida por microondas.
SPE	Extracción en fase sólida.
Inject	Inyección.
J2	Jeringa 2.
LOV	Lab-On-Valve.
LOQ	Límite de cuantificación.
LOD	Límite de detección.
LMR	Límite máximo de residuo o tolerancia.
L/ha	Litros por hectárea.
λ	Longitud de onda.
Mm	Micrómetros.
M	Molaridad.
Nm	Nanómetros.
PVC	Policloruro de vinilo.
PEEK	Poliéter éter cetona.
PMMA	Polimetilmetacrilato (Perspex).
Rpm	Revoluciones por minuto.
SAGARPA	Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación.
t_R	Tiempo de retención
EU	Unión Europea.
IV	Válvula de inyección.
VS	Válvula de selección.
V2	Válvula solenoide 2.
W	Watts.

CAPÍTULO 1

1. INTRODUCCIÓN

El abasto continuo y suficiente de productos debido al constante crecimiento de la población implica una mayor inversión y mejorar el rendimiento de las cosechas. La agricultura juega un rol importante en el mundo debido a que se requieren altas producciones en los cultivos para compensar la demanda de la sociedad, para ello se requiere impulsar el incremento y efectividad del cultivo. Para hacer frente a estos requisitos se utilizan compuestos químicos conocidos como herbicidas para eliminar y/o controlar las malezas que pueden afectar a la cosecha y de esta forma garantizar una máxima producción[1].

Los herbicidas son sustancias químicas usadas en la agricultura para eliminar las hierbas nocivas que crecen en las zonas de cultivo. La aplicación de estos productos requiere cuidados para que no se vean afectadas las plantas. La mayoría de los herbicidas son derivados de compuestos orgánicos heterocíclicos, lo que eleva su poder tóxico, incluso en dosis bajas[2].

La utilización de herbicidas puede provocar cambios en el suelo, provocando su degradación, erosión y disminución en la capacidad de retención del agua, además pueden alterar la cubierta vegetal y los microorganismos del suelo dejándolo pobre y estéril, haciendo muy difícil su recuperación[3]. La aplicación de los herbicidas con diferentes composiciones químicas, rociadas con diversos equipos terrestres y aéreos, aportan una alta eficiencia pero también una elevada

capacidad de dispersión y contaminación del medio ambiente[4]. El comportamiento ambiental de un herbicida está regido por procesos que pueden disminuir la cantidad original aplicada (Figura 1). Antes de que el herbicida alcance el suelo, puede degradarse por fotodescomposición, por volatilización y puede ser adsorbido o absorbido por las hojas del vegetal o en la superficie. Una vez que ingresa al suelo, el herbicida se reparte en las fases sólida, gaseosa y líquida, y es en esta última en la cual ocurre la degradación química y microbiana, que es el proceso más importante para la mayoría de los herbicidas. En la fase sólida se adsorben con diferente fuerza en lugares de enlace de los coloides orgánicos e inorgánicos del suelo (materia orgánica y arcillas)[5].

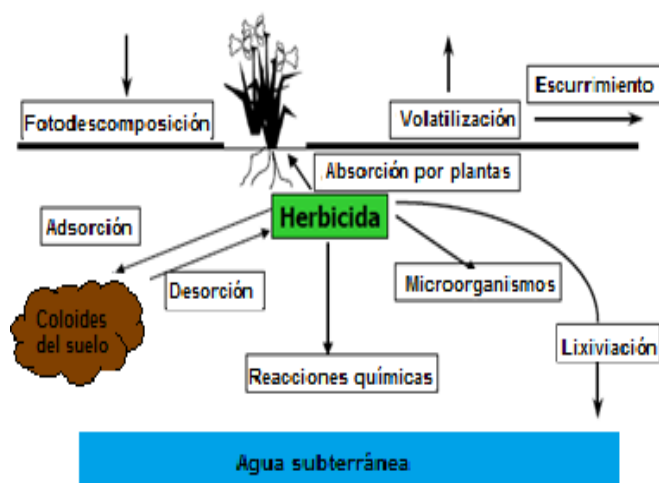


Figura 1. Movilidad de los herbicidas en el medio ambiente.

Uno de los cultivos más importantes que recurre al uso de herbicidas es el maíz debido que es esencial protegerlo del ataque de plagas y enfermedades para

evitar fuertes pérdidas en la calidad del grano, proporcionando una solución a los problemas de las malas hierbas y plagas.

El maíz es uno de los principales granos que se producen a nivel mundial además de trigo, arroz, cebada, sorgo y avena. El maíz tiene la mayor producción con un 39%, le sigue el trigo con 30%, y el arroz con 21%. Estos tres granos concentraron el 90% de la producción mundial en el ciclo 2010-2011[6].

El Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA) estimó que la producción mundial de maíz en el ciclo 2013-2014 fue 973.9 millones de toneladas. México es el octavo productor mundial de maíz y se estima que su producción fue de 21 millones de toneladas[7].

Cabe destacar la importancia que tiene este grano en México tanto en el ámbito agrícola como en el económico, es importante para el consumo humano, ya que se utiliza en la elaboración de tortillas de maíz, frituras, cereales, y como alimento para animales (ganado, aves, etc.), entre muchos otros usos. Por su alto contenido de almidón y bajo contenido de fibra hace que sea una fuente alta de energía[8].

Debido a lo anterior, la aplicación intensiva de herbicidas ha dado lugar a la contaminación del agua, suelo, productos agrícolas (trigo, maíz, vegetales) en consecuencia la contaminación directa o indirecta de los alimentos y productos alimenticios[9].

Es importante conocer el grado de contaminación que presenta el grano de maíz por el uso de diferentes herbicidas como el 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) y atrazina (2-cloro-4-etilamino-6-isopropilamino-1,3,5-triazina). En literatura se menciona que este tipo de herbicidas son los que comúnmente se utilizan para controlar las malezas en los cultivos de maíz, por lo que pudiera existir rastros de ellos en el grano. Por todo esto, existe la necesidad de contar con procedimientos analíticos lo suficientemente sensibles, selectivos y económicos para tener un control de los herbicidas y realizar evaluaciones periódicas del contenido de residuos de los mismos.

En el presente proyecto de investigación, se propone la implementación de un sistema de análisis Lab-On-Valve (LOV), el cual es un sistema de tercera generación desarrollado por Ruzicka et.al en 2000 basado en la reducción del consumo de reactivos[10] combinado con extracción asistida por microondas para la determinación de los herbicidas 2,4-D y atrazina en grano de maíz, con la finalidad de desarrollar una nueva metodología para determinar a nivel de trazas dichos herbicidas, además de contribuir al uso de tecnologías automatizadas, facilitando el manejo de la muestra y reactivos.

1.1 Hipótesis

El sistema de análisis LOV combinado con la extracción asistida por microondas permite la determinación a nivel de trazas de los herbicidas 2,4-D y atrazina, en grano de maíz.

1.2 Objetivo general

Implementar el sistema de análisis LOV combinado con la extracción asistida por microondas para la determinación a niveles traza de los herbicidas 2,4-D y atrazina, en grano de maíz.

1.3 Objetivos específicos

- a) Implementar el sistema LOV que incluye las etapas de preconcentración, separación y detección de 2,4-D y atrazina.
- b) Establecer las condiciones de extracción asistida por microondas más favorables considerando: tipos de solvente, cantidad de muestra, volumen de solvente, tiempo y temperatura de extracción en las muestras de grano de maíz.
- c) Determinar la concentración de residuo de los plaguicidas 2,4-D y atrazina en muestras de grano de maíz, mediante la extracción asistida por microondas y el sistema LOV.

CAPÍTULO 2

2. MARCO TEÓRICO

2.1 PRODUCCIÓN DE MAÍZ

El maíz es uno de los granos alimenticios más antiguos que se conocen y debido a sus grandes bondades y variedad de usos se ha convertido en el cultivo más importante entre los cereales a nivel mundial.

Con respecto al estado de Nuevo León, en los municipios con la producción agrícola más importante en cuanto al cultivo de maíz de acuerdo a los datos obtenidos de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) del año 2013, se reporta un total de 94,149.94 toneladas (Tabla 1)[11].

Tabla 1. Producción de maíz en grano en el estado de Nuevo León en el año 2013.

Municipio	Toneladas de maíz/Año
General Zaragoza	2,100.00
Anáhuac	5,798.94
Mier y Noriega	9,000.00
Aramberri	5,040.00
Doctor Arroyo	34,260.00
Galeana	37,951.00
Total	94,149.94

A pesar de su gran volumen de producción, el maíz es un cultivo propenso al ataque de plagas y enfermedades. Es por ello que requiere del uso de herbicidas para evitar pérdidas en la calidad del grano.

Los pesticidas se clasifican de acuerdo a diferentes criterios: los organismos en el que actúan, su toxicidad aguda (capacidad de producir un daño agudo a la salud a través de una o múltiples exposiciones en un periodo de tiempo), su vida media de efectividad (permanentes, persistentes, moderadamente persistentes y no persistentes), su estructura química (derivados de triazinas, derivados de ácido fenoxiacético, etc.) y su uso (agricultura, hogar, industria, etc.)[12], en la Tabla 2 se muestra una clasificación de acuerdo al tipo de organismo en el que se realiza su acción[13].

Tabla 2. Tipos de plaguicidas.

Tipo de pesticida	Organismos sobre el cual actúan
Fungicidas	Hongos
Insecticidas	Insectos
Herbicidas	Malezas (malas hierbas)
Acaricidas	Ácaros que se alimentan de plantas y animales
Rodenticidas	Ratones
Avicidas	Aves

2.2 HERBICIDAS

La producción agrícola depende considerablemente del uso de los herbicidas para controlar las malezas. Estos se clasifican de acuerdo a su estructura química como son benzonitrilos, fenoxiacidos, triazinas, amidas, sulfonilureas, cloroacetanilidas, fenilcarbamatos, etc.

En este manuscrito nos enfocamos en el 2,4-D y la atrazina clasificado en la familia de los fenoxiacidos y a las triazinas respectivamente.

De los cuales son productos químicos con la capacidad de eliminar plantas selectivamente, se utilizan en diferentes etapas del crecimiento del cultivo. Algunos efectos que los herbicidas tienen sobre las plantas no deseadas es la inhibición de la germinación de semillas, amarillamiento o deformación de las hojas, etc.[1], son usados extensivamente en la agricultura, en la industria y en zonas urbanas, debido a que si son utilizados adecuadamente proporcionan un control eficiente de maleza a un bajo costo. No obstante, si no son aplicados correctamente los herbicidas pueden causar daños a las plantas cultivadas, al medio ambiente, e incluso a las personas que los aplican[14]. Por lo que es necesario conocer el manejo de estos productos químicos sobre los cultivos, puesto que la forma en que sean aplicados influye considerablemente en la presencia de residuos en el medioambiente.

Es frecuente detectar herbicidas en el agua o suelo de zonas agrícolas o sus alrededores en donde han sido aplicados, en parte por la persistencia del

compuesto, aunado a la sobreaplicación de estos productos. Esto puede ocasionar que el agua que consumimos tenga rastros de herbicidas[1].

2.2.1 Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D)

El 2,4-D está clasificado como posible carcinógeno para el ser humano[15-17]. Este herbicida es un regulador de crecimiento, selectivo en gramíneas como sorgo, maíz y trigo en etapas vegetativas. Este se absorbe por hojas y raíces, y se transportan por el floema y xilema[14].

El 2,4-D se formula como ésteres o sales de aminas (Figura 2). Los ésteres son volátiles y pueden causar daño a cultivos sensibles por el acarreo de vapores, y las aminas tienen baja volatilidad; la dosis de 2,4-D es 0.8-1.2 L/ha cuando las malezas hayan emergido y cuando el maíz haya alcanzado una altura de 10-15 cm[12]. Su límite máximo de residuo o tolerancia (LMR) es 0.05 mg/kg en el grano de maíz[18].

El suelo y los cuerpos de agua son sus medios receptores directos, pero se dispersa en todos los compartimentos del ambiente. En el aire persiste por horas y puede ser eliminado por precipitación junto con la lluvia. En agua y suelo es degradado en poco tiempo (vida media menor de 7 días) por hidrólisis y por la acción de los microorganismos. Su movilidad en suelo varía de baja a moderada, por ello puede lixiviarse hasta las aguas subterráneas. La biodegradación de este

compuesto generalmente dura varios meses dependiendo de las condiciones físicas, químicas y de la aplicación previa de plaguicidas.

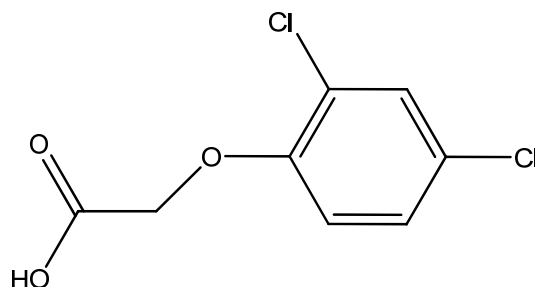


Figura 2. Estructura química de 2,4-D.

2.2.2 2-cloro-4-etilamino-6-isopropilamino-1,3,5-triazina (atrazina)

La atrazina pertenece a la familia de las triazinas (Figura 3), se clasifica en el grupo de los inhibidores de la fotosíntesis que se utilizan para el control de la maleza de hoja ancha, se aplican al suelo y se transportan en las plantas por el xilema, requieren de irrigación para su movilidad. La afinidad de atrazina para ser adsorbida por los coloides del suelo es de moderada a alta, por lo que la dosis se debe ajustar según el tipo de suelo. Su uso se extiende a más de 7 millones de hectáreas de maíz a nivel mundial anualmente[19], la dosis va de 1 a 2 L/ha[20].

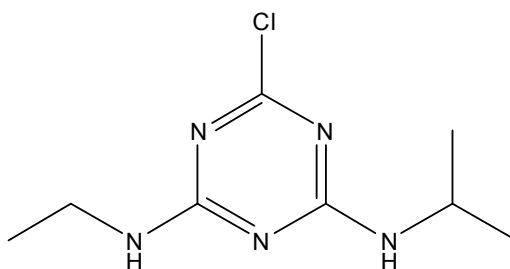


Figura 3. Estructura química de atrazina.

La atrazina se ha utilizado desde los años 50's, es el herbicida que más se utiliza en todo el mundo, se ha demostrado que puede ser tóxico a niveles altos, por lo que la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA) tiene como tolerancia máxima 0.25 mg/kg en el grano de maíz, y la Unión Europea (EU) 0.01 mg/kg para cereal[21].

2.3 SISTEMA LAB ON VALVE

El laboratorio en una válvula (Lab-On-Valve, LOV) se basa en la conexión en secuencia de micro canales, consta de una válvula de inyección multicanal estándar acoplada a un módulo multijeringa que permite tomar volúmenes bajos de muestras o reactivos con gran repetibilidad y además añadir reactivos en puntos adecuados del sistema, así como llevar a cabo los procesos de preconcentración utilizando materiales adsorbentes particulados[22].

El sistema consta de canales con diámetros de 0.5 a 2 mm, es una estructura monolítica hecha de Polimetilmetacrilato, policloruro de vinilo (PVC) o Poliéter éter cetona (PEEK), todo ello para mejorar la resistencia química y ampliar el rango de uso de los solventes orgánicos; está montado encima de una válvula de selección de seis, ocho o diez puertos, según sea necesario. Está diseñado para incorporar todas las medidas necesarias para una variedad de análisis químicos de fase homogénea y heterogénea, es apto para operar con los dispositivos periféricos de tamaño convencional, incluyendo una amplia variedad de técnicas de detección ópticas, por ejemplo, espectrometría de absorción atómica, espectroscopia de emisión atómica, espectrometría de masas, etc.[23]. En la (Figura 4) se muestra

un sistema de inyección LOV acoplado a un sistema de columna para separación, usando varios modos en la interfase.

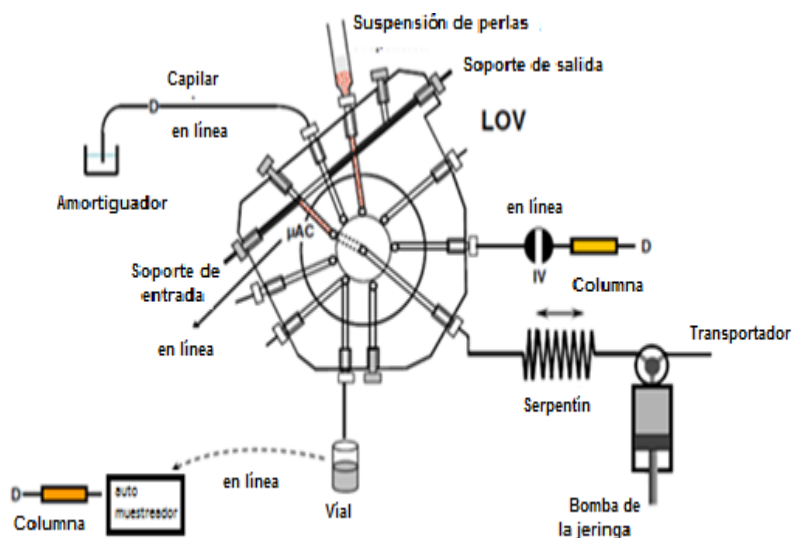


Figura 4. Sistema automatizado del tipo Lab-On-Valve (LOV).

2.4 EXTRACCIÓN ASISTIDA POR MICROONDAS

Utilizar la técnica de extracción asistida por microondas (MAE por sus siglas en inglés), para la extracción de los herbicidas en el grano de maíz, es una herramienta rápida, presenta tiempo de extracción entre tres y diez minutos, requiere pequeña cantidad de muestra (de 0.5 a 2 g) y disolventes (entre 1 y 15 mL), permite el control de parámetros que afectan a la eficacia de extracción (naturaleza del disolvente y de la matriz, temperatura, potencia y tiempo de extracción) para conseguir que el compuesto o compuestos de interés pasen de la muestra al disolvente adecuado[24]. Algunas de las desventajas son que depende

de la naturaleza de la muestra y esto limita el uso de algunos disolventes, el extracto queda en contacto con la muestra al acabar la extracción y se necesita su posterior filtración o separación[25].

La transferencia de energía es la principal característica del calentamiento por microondas. En la MAE la energía de microondas se pasa directamente a los materiales a través de interacciones moleculares con el campo electromagnético convirtiendo la energía electromagnética en energía térmica[26].

El principio de calentamiento utilizando la energía de microondas se basa en el efecto directo de las microondas en las moléculas por dos mecanismos la conducción iónica y la rotación de dipolos. La conducción iónica es la migración electroforética de iones cuando se aplica un campo electromagnético. La resistencia de la disolución a este flujo de iones da lugar a la fricción y, por lo tanto, se calienta la disolución. La rotación de dipolos significa realineación de dipolos con el campo aplicado. Una frecuencia de 2,450 MHz es utilizada en sistemas comerciales, los dipolos se alinean y aleatorizan 49,310 veces por segundo y de este movimiento molecular resulta el calentamiento[27].

2.4.1 Factores que afectan al proceso de extracción

2.4.1.1 Disolvente

El primer factor que se debe considerar es el disolvente a utilizar, debido a que una selección apropiada de disolvente proporcionará un proceso de extracción

más eficiente. La selección del disolvente depende de la solubilidad de los compuestos de interés, es importante seleccionar un disolvente con alto poder de extracción y fuerte interacción con la matriz y el analito. Dado que la absorción de microondas ocurre por la reorientación de dipolos en un campo eléctrico, la cantidad de energía absorbida será dependiente de las propiedades dieléctricas de las moléculas presentes en el proceso: constante dieléctrica del disolvente utilizado como extractante (ϵ'), factor de pérdida dieléctrica (ϵ'') y factor de disipación ($\tan \delta = \epsilon''/\epsilon'$). Valores grandes de este parámetro indican una buena susceptibilidad a la energía de microondas. Cuanto mayor sea la constante dieléctrica, más energía térmica será liberada y más rápidamente se alcanzaran temperaturas a las cuales el paso de los analitos de la matriz al disolvente se ve favorecido siendo la responsable de la eficiencia del calentamiento por microondas[13].

Los disolventes polares, tales como etanol, metanol, y agua pueden ser calentados por la energía de microondas. El grado de absorción de microondas generalmente aumenta con la constante dieléctrica, en la Tabla 3 se muestran algunos parámetros de algunos disolventes utilizados en el 90% de las aplicaciones de MAE[22, 28].

Tabla 3. Constantes físicas y factores de disipación de algunos solventes[26, 28].

Solventes	Constante Dieléctrica ϵ' a 20°C	Factor de disipación $\tan \delta$ (10^{-4})	Punto de ebullición °C a 101.4kPa	Temperatura en vaso cerrado °C
Acetona	20.7	5,555	56	164
Acetonitrilo	37.5		82	194
Etanol	24.3	2,500	78	164
Hexano	1.89		69	-
Metanol	32.6	6,400	65	151
Agua	78.3	1,570	100	-

2.4.1.2 Potencia de microondas y temperatura de extracción

La potencia de microondas proporciona un calentamiento localizado en la muestra que actúa como una fuerza impulsora para destruir la matriz de modo que el analito puede difundirse y disolverse en el disolvente. Por lo tanto el aumento de la potencia mejora el rendimiento de la extracción dando lugar a un menor tiempo de extracción.

La temperatura ayuda a aumentar la difusividad de los analitos desde la matriz al disolvente, la elección de la temperatura de extracción depende de la estabilidad y el rendimiento de la extracción del compuesto deseado. Un aumento de la temperatura hace que el poder del disolvente aumente debido a una descenso de la viscosidad y la tensión superficial, facilitando que el disolvente solubilice los solutos, y mejore la humectación y penetración de la matriz[26, 29].

2.4.1.3 Tiempo de extracción

El tiempo de extracción también es estudiado, debido a que tiempo excesivamente largo podría causar la degradación de compuestos termolábiles.

Después de realizar la extracción se requiere una etapa de limpieza para evitar interferencia en la detección de los herbicidas de interés, en especial cuando se trabaja con muestras complejas.

2.5 EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA (SPE)

La extracción en fase sólida es una técnica ampliamente utilizada para el pre-tratamiento de muestras, y consiste en pasar un volumen conocido de muestra a través de un adsorbente sólido (cartucho, columna o disco), bajo condiciones controladas que favorecen la absorción preferencial del analito sobre los componentes de la matriz. El analito retenido es eluído con un pequeño volumen de una mezcla de solventes apropiada, proporcionando extractos altamente concentrados[30].

La SPE consta de cuatro pasos (i) acondicionamiento del sorbente, (ii) aplicación de la muestra, (iii) enjuague y limpieza de la muestra, y (iv) la desorción y la recuperación de los analitos en la etapa de separación[31].

2.5.1 Factores que afectan al proceso SPE

Los parámetros que influyen en la SPE son la selección del tipo y cantidad de sorbente, la determinación del volumen de muestra que se puede aplicar sin pérdida de recuperación, la composición y el volumen del lavado que se puede aplicar sin pérdida de analitos y, finalmente, la composición y el volumen de la disolución de elución o de desorción[31].

2.5.1.1 Tipo de adsorbente

La selección de un material de SPE adecuado es muy importante debido que en él se da la retención selectiva de analitos, y este dependerá de las características fisicoquímicas del herbicida y de los componentes que acompañen a la matriz[32].

Para asegurar la absorción suficiente de analitos, diversos tipos de adsorbentes se han desarrollado para la preconcentración y limpieza de residuos de plaguicidas en los alimentos[33].

Se clasifican en tres tipos: Los empaquetados con base de silica, los poliméricos y el carbón activado. Todos ellos pueden modificarse de distintas formas para cambiar sus propiedades como extractante. Los materiales más comunes son cartuchos de sílice, alúmina o florisil para la SPE en fase normal y, C8 y C18 de fase reversa[13].

2.5.1.2 Disolvente de elución

Además del adsorbente, el disolvente de elución apropiado o mezcla de solventes de elución juega un papel importante para incrementar en la eficiencia de limpieza, ya que los disolventes pueden interrumpir la interacción entre los analitos y el adsorbente mediante la elución de los analitos del mismo[33].

2.5.1.3 Proporción entre el adsorbente y la muestra

La cantidad normal que se utiliza esta entre 1 a 10 g o más, en función del volumen de muestra. En matrices algo concentradas, o cuando se cargan en el cartucho volúmenes grandes de muestra, llega un momento en el que se interrumpe la retención debido a que el dispositivo de SPE ha llegado a su capacidad máxima de adsorción[13].

2.6. ANTECEDENTES

Actualmente ha aumentado el interés por encontrar técnicas más eficientes para analizar muestras complejas como lo es el maíz que pudiera estar contaminado por herbicidas. A continuación se describen algunos estudios en donde usa la extracción asistida por microondas con buenos resultados analizando diferentes matrices y por otra parte el sistema LOV para preconcentrar diferentes analitos haciendo sensibles dichos análisis.

2.6.1 Extracción asistida por microondas (MAE):

Wang et al.[21], en 2012, determinaron cinco triazinas (ametrina, propazina, atrazina, desmetrina, simazina) en cereales, entre ellos el maíz, combinando la extracción dinámica asistida por microondas (DMAE) y HPLC con detector UV. Encontraron en el maíz de tres de las triazinas estudiadas, las muestras fueron fortificadas y su recuperación fue 80 a 102%. Los límites de detección fueron 1.1 a 1.5 ng/g.

Otro estudio donde utilizan la MAE fue el realizado por **Setyaningsih et al.**[34] en el que evaluaron mediante MAE la extracción de melatonina en muestras de arroz. Las condiciones para la extracción fueron: temperatura 195°C, potencia 1000 W, tiempo de extracción 20 min y como agente extractante metanol.

Por otra parte, una investigación para cuatro triazinas (metribuzina, atrazina, ametrina, terbutrina), pero en muestras de suelo colectadas en un campo de maíz, fue realizada por **Shah et al.**[35]; utilizando para tal fin la extracción asistida por microondas con HPLC-UV. En dicho estudio, solo se detectó la atrazina. Las muestras estudiadas fueron fortificadas con los analitos y se obtuvieron recuperaciones del 83 a 96%.

El-Saeid et al., en 2010[36], utilizando MAE y análisis por cromatografía de gases con detección por espectrometría de masas (GC-MS), realizaron la determinación de 12 pesticidas en suelo. En este trabajo, se comparó esta técnica con la extracción Soxhlet y se encontró que en 11 de los 12 residuos de pesticidas fueron detectados en el límite máximo de residuo (0.1 mg/kg), y al fortificar las muestras,

obtuvieron mejores rendimientos cuando utilizaron MAE (del 98 a 102%) que con Soxhlet (de 93 a 97%). Los autores resaltan que el uso de MAE permitió la extracción simultánea de varias muestras, con un menor tiempo de extracción y bajo consumo de disolvente.

Un trabajo distinto fue el realizado por **Yang y Zhai** en 2010[37], en el que utilizaron un diseño de experimentos tipo Box-Behnken para obtener las condiciones óptimas de extracción de antocianinas en mazorcas de maíz morado utilizando MAE como técnica de extracción y comparándola con la técnica de extracción convencional, empleando como técnica de análisis HPLC-MS. Con la ecuación del diseño de experimentos, se obtuvo la respuesta de la función polinomial y el contenido total de antocianinas fue 185.1 mg/100g. Cuando utilizaron MAE, el contenido fue 184.8 mg/100 g (el 99.8%) en 19 minutos, mientras que en la extracción convencional, en 60 min fue 158.2 (el 85.6%). Se detectaron e identificaron 6 tipos de antocianinas como cianidina-3-glucósido, perganidin-3-glucósido, peonidin-3-glucósido y sus respectivos homólogos cianidina-3-malonato, perganidin-3-malonato, peronidin-3-malonato.

You et al.[38] determinaron los herbicidas atrazina, simazina y prometrina en muestras a base de cereales para infantes, utilizando PMAE-HPLC-EIS/MS. Las condiciones óptimas correspondieron al uso de 20 mL metanol como agente extractante, con un tiempo de extracción de 10 min, temperatura de 105°C y una potencia de 600 W. Las recuperaciones de los analitos bajo estas condiciones se encontraron en el rango de 66.2 a 88.6%.

La mayoría de los trabajos de investigación mencionados utilizan como tratamiento de muestra la técnica de extracción asistida por microondas para extraer moléculas orgánicas en suelo y en cereales, obteniendo mejor eficiencia de extracción, reducción en el tiempo de extracción, el consumo de disolvente y de muestra, por lo que MAE surge como una alternativa viable para el proceso de extracción de herbicidas presentes en el grano de maíz.

2.6.2 Sistema Lab-On-Valve (LOV):

Boonjob et al., en 2011[39], evaluaron residuos de atrazina, simazina, propazina y degradación de isopropil atrazina (DIA) y dietilatrazina (DEA), utilizando nanofibras de carbono en muestras de agua y suelo. Estudiaron el efecto de tipo y cantidad de nanopartículas (nanofibras de carbono (CNFs), nanotubos de carbono de pared múltiple (MWCNTs) y nanotubos de carbono oxidados (MWCNT-COOH), volumen de muestra y volumen de eluyente. Los mejores resultados se obtuvieron con 10 mg de CNFs, utilizando metanol como eluyente, y un volumen de muestra 10 mL. Las recuperaciones de agua y suelo oscilaron entre 94-104% y 84-105%, respectivamente.

Boonjob et al., en 2010[40] determinaron atrazina, simazina, propazina y productos de degradación de DIA y DEA, en muestras de agua y suelo, usando N-vinilpirrolidona/divinilbenceno (oasis HLB), para la preconcentración de las clorotriazinas y un polímero impreso molecularmente terbutilazina para una limpieza de muestra, evaluaron el volumen y flujo de eluyente, y volumen de

muestra. Las condiciones óptimas correspondieron a un volumen de preconcentración de 10 mL en el caso del agua y 1 mL en las muestras de suelo, metanol como eluyente y un flujo de 0.5 mL/min. Las recuperaciones obtenidas oscilaron entre 88 y 104% para el caso del agua y 89 y 111% para las muestras de suelo.

Oliveira et al., en 2010[41] utilizaron un sistema MSFI-BI-LOV-LC para la determinación de productos de protección solar benzofenona-3, (BP3), butilmetoxidibenzoilmetano, (BMDBM), metoxicinamato de etilhexilo, (EHMC) y homosalato (HMS) en muestras de agua salada y dulce. Para las muestras de agua dulce las concentraciones fueron < LOD 0.45-3.2 µg/L excepto HMS 104-107% y para agua salada fue 104%.

En ese mismo año, **Vidigal et al.**[42] desarrollaron una metodología para la determinación espectrofotométrica de la actividad de la peroxidasa de extractos vegetales, utilizando un sistema de inyección secuencial (SI-LOV). El procedimiento SI-LOV se realizó en dos etapas: primero se aspiraron los reactivos y la muestra al espiral de retención (bomba de inyección en el orden 1000 µL del portador, 50 µL de 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico (ABTS), 15 µL de H₂O₂, 15 µL de la enzima y 100 µL de ABTS), después se invirtió el flujo y se propulsó la mezcla hacia la detección (30 segundos), seguido de un lavado final del sistema. Los autores reportaron que el LOV es una herramienta útil para la determinación de peroxidasa en los vegetales, ya que el método reportado posee resultados similares comparado con un método propuesto por Sigma, con un

menor consumo de muestra y reactivos, además de que era posible alcanzar un intervalo lineal de hasta 2 mg/L de la enzima peroxidasa de rábano (HRP).

Un procedimiento para extraer y cuantificar riboflavina en diferentes productos alimenticios fue reportado por **Oliveira et al.**[43] en 2010, utilizando un método automático para realizar la extracción en fase sólida impresa molecularmente (MISPE), acoplándolo a un sistema BI-LOV-HPLC con detector UV. Se aplicó esta metodología a un material de referencia certificado de leche para lactantes mostrando una recuperación de 95.4%. En el caso del hígado de cerdo se reportó una recuperación del 96.16%.

En un trabajo que realizaron **Quintana et al.**[44] en 2009, utilizaron la extracción en fase sólida para la determinación de bifenilospoliclorados (PCB's). El sorbente utilizado fue introducido en un sistema LOV acoplado a un cromatógrafo de gases con detector de captura de electrones (BI-LOV-GC). El método implica la incorporación del sorbente en el microconducto del LOV, sirviendo como una microcolumna empacada para la preconcentración de las especies orgánicas, después los analitos cargados en el sorbente se eluyen, la fase sólida se desecha y se procede a la separación por GC para la determinación automática de PCB's. Se analizaron dos muestras, una de lixiviados de residuos sólidos y otra de sitios de disposición de equipo electrónico. No se detectaron PCBs, por lo que ambas muestras fueron fortificadas a concentraciones de 10 y 50 ng/L, se obtuvieron porcentajes de recuperación mayores al 81%, los límites de cuantificación estaban en un intervalo de 0.5 a 6.1 ng/L.

De acuerdo a lo revisado, el sistema LOV, puede ser considerado como una interesante herramienta para las etapas de preparación de muestra, resultando atractivo debido a su versatilidad, ya que permite realizar el análisis de manera automatizada, lo cual facilita la preconcentración de los analitos, con una posterior separación cromatográfica y detección de los compuestos de interés. Además de ofrecer un ahorro en tiempo de análisis y menos consumo de disolventes, eliminación de interferencias, etc.

No se ha reportado la extracción y determinación de herbicidas como atrazina y 2,4-D en granos de maíz, así como tampoco el empleo del sistema LOV combinado con la extracción asistida por microondas. En este trabajo se aplicarán dichas técnicas como medio para determinar si existen residuos de herbicidas en los granos de maíz.

CAPÍTULO 3

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MATERIALES Y EQUIPOS

3.1.1 Reactivos

- Atrazina 98.8%, Fluka Analytical.
- Ácido 2,4-diclorofenoxiacético 98%, Spectrum.
- Metanol 99.8%, J.T. Baker grado HPLC.
- Ácido acético glacial 99%, J. T. Baker grado HPLC.
- Acetonitrilo grado HPLC 99.5%, TEDIA high purity solvents.
- Acetato de sodio polvo 99%.
- Acetona 99.96%, CTR scientific.
- Agua nanopura(18 MΩ-cm).
- Agua desionizada.
- Na₂CO₃ 99.5%, Sigma-Aldrich.
- NaHCO₃ 99.7%, Sigma-Aldrich.
- Na₂HPO₄ H₂O 99%, Sigma-Aldrich.
- NaH₂PO₄·2H₂O 98% Sigma-Aldrich.
- H₃PO₄ 85%, J.T. Baker.
- Strata X Fase Reversa, Phenomenex.
- Sulfato de cobre anhidro. J.T. Baker

3.1.2 Equipo

- Espectrofotómetro UV-Vis, Cary 50, Varian.
- Balanza Analítica Digital, marca Ohaus.
- Medidor de pH, marca Corning.
- Sistema Lab-On-Valve de Sciware.
- Columna monolítica Phenomenex C18 (25x4.6 mm).
- Celda de flujo común de Hellman (cuarzo).
- Software Autoanalysis v5.0 de Sciware.
- PC para el control, almacenamiento y procesamiento de datos.
- Fuente de luz UV-Vis Modelo DT 1000 CE, Analytical Instrument Systems, Inc.
- Detector espectrofotométrico UV-Vis de Ocean Optics USB2000.
- Microondas CEM Mar 6.
- Malla de acero inoxidable 200MM.
- Rotavapor Yamato RE500.
- Centrífuga Thermo scientific Sorvall ST16.
- Molino de granos del rey.
- Agitador magnético con calentamiento, Modelo CIMAREC, marca Barnstead Thermolyne.
- Multi-Burette 4S de Crison.
- Bomba de HPLC YL9200 Single Pump.
- Vortex mixer (Mini Vortorex), marca Fisher Scientific.

3.2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

3.2.1 Estudio espectrofotométrico de los herbicidas atrazina y 2,4-D

Se prepararon disoluciones madre de los herbicidas atrazina y 2,4-D con concentraciones de 30 y 100 mg/L respectivamente, pesando 0.003 g de atrazina y 0.01 g de 2,4-D diluyendo con metanol 4% a la atrazina, aforando a 100 mL. Se guardaron bajo refrigeración a 4°C.

Se obtuvieron los espectros de absorción para identificar la longitud de onda máxima de cada analito, en un espectrofotómetro UV-Vis a una concentración de 10 mg/L de cada herbicida.

Disoluciones de trabajo: Se prepararon diferentes soluciones buffer utilizando los siguientes reactivos Na_2CO_3 , NaHCO_3 , $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, CH_3COONa , CH_3COOH y ácido fosfórico.

Para tener una perspectiva del comportamiento de los herbicidas y observar si hay un efecto al utilizar diferentes condiciones de análisis, se realizaron experimentos de efecto de pH, volumen y estabilidad tomando como concentración máxima 8 y 30 mg/L de atrazina y 2,4-D, respectivamente, los ensayo se hicieron por triplicado.

Para realizar el ensayo de efecto del pH y la variación de volumen se tomaron de estas disoluciones amortiguadoras 1 mL, agregando 2.66 mL y 3 mL de la solución madre de atrazina y 2,4-D aforando a 10 mL con agua desionizada para obtener concentraciones de 8 y 30 mg/L, respectivamente.

Por último se realizaron pruebas de estabilidad a pH 4, haciendo mediciones cada 10 min por una hora.

Se prepararon disoluciones de 0.4-30 mg/L para 2,4-D y para atrazina de 0.1-8 mg/L, para construir la curva de calibración de cada herbicida, para ello se tomaron diferentes volúmenes de cada disolución madre aforados a un volumen de 10 mL con agua nanopura.

3.2.2 Separación cromatográfica

Para realizar los experimentos de la separación cromatográfica, se creó un procedimiento automatizado usando el sistema de válvula multicanal y de inyección acoplado a una bomba de HPLC, un módulo multijeringa equipado por una jeringa de 5 mL, un guarda columna C18, una columna monolítica C18 (25x4.6mm), un detector espectrofotométrico UV-Vis de Ocean Optics conectado a una celda de cuarzo (Hellma 178.711-QS) y el Software Autoanalysis v5.0 para la adquisición y procesamiento de los datos, los cuales fueron guardados y se procesaron usando el software Origin v6.1. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

Se estableció un procedimiento para la ejecución del sistema cromatográfico multijeringa, el cual consistió en utilizar una jeringa de 5 mL que se usaba para dispensar o cargar muestra según sea el caso, el rango del espectro de absorbancia fue de 200-300 nm, y la longitud de onda de medición 223 y 230 nm.

A continuación se describen las etapas de que consta la separación cromatográfica usando el software Autoanalysis (Tabla 4 y Figura 5), así como un esquema de separación y cuantificación de los herbicidas atrazina y 2,4-D (anexo A).

Tabla 4. Etapas del método para la separación cromatográfica de los herbicidas atrazina y 2,4-D.

Etapas	Operación	V2	VS	IV	Descripción
1	Dispensar 0.5 mL a 5 mL/min	off	off	off	Ajuste de la posición de los pistones
2	Aspirar 0.5 mL a 5 mL/min	on	4	inyección	Aspiración de la muestra al bucle de carga
3	Dispensar 0.4 mL a 2 mL/min	on	1	carga	Separación de los analitos por 300 seg
4	Dispensar 0.5mL a 2ml/min	on	1	inyección	Para limpiar tubería
5	Aspirar 0.9 mL a 5 mL/min	off	off	off	Llenado de jeringas y el sistema esta listo para comenzar etapa 1

Nota: V2: Válvula solenoide VS: Posición de válvula de selección, IV: Válvula de inyección, los valores indicados de caudal y volumen se refieren a la jeringa J2, OFF (válvula desconectada) y ON (válvula activa).

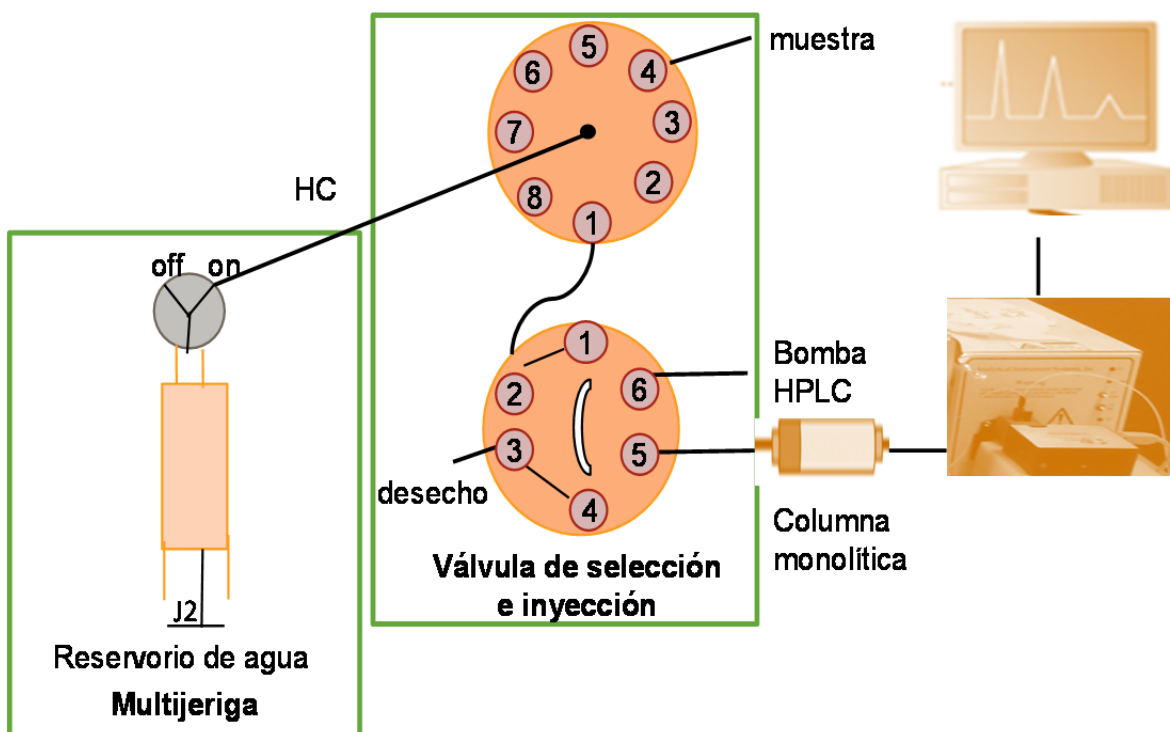


Figura 5. Esquema del sistema desarrollado para la separación cromatográfica de los herbicidas en estudio.

Se hicieron disoluciones amortiguadoras de pH 4 a diferente concentración de CH_3COONa 0.01, 0.05 y 0.1 M ajustado con ácido acético de 0.1M, se pesó y se diluyeron con agua nanopura en vasos de precipitados hasta disolverse totalmente y se ajustó a pH 4 y fueron aforadas hasta 100 mL.

3.2.2.1 Curvas de calibración y parámetros analíticos

De los resultados obtenidos experimentalmente de la separación cromatografía se construyeron las curvas de calibración y se determinaron los parámetros analíticos utilizando las siguientes ecuaciones.

La desviación estándar se calculó a través de la siguiente fórmula:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n - 1}} \quad (1)$$

Así mismo la desviación estándar relativa:

$$\% d. s. r. = \frac{S}{\bar{X}} * 100 \quad (2)$$

La desviación típica de la media:

$$S_m = \frac{S}{\sqrt{n}} \quad (3)$$

El porcentaje de error (%E)

$$\% E = \frac{(100)(t)(S_m)}{\bar{X}} \quad (4)$$

Finalmente, los límites de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ)[45] se calculan con las siguientes formulas.

$$L_d = \frac{3S}{m} \quad L_q = \frac{10S}{m} \quad (5)$$

Donde: S = desviación estándar, \bar{X} = valor promedio, n = número de réplicas, m = pendiente de la curva de calibración, t = es la t de Student valores tabulados al 95%.

Para calcular la eficiencia y la resolución de la separación cromatográfica se utilizaron las siguientes ecuaciones:

$$N = 16\left(\frac{t_{R1}}{w_1}\right)^2 \quad (6)$$

$$R = \frac{2(t_{R2} - t_{R1})}{w_1 + w_2} \quad (7)$$

Donde:

t_{R1} y t_{R2} = tiempo de retención de 2,4-D y atrazina respectivamente.

w_1 y w_2 = anchura del pico base 2,4-D y atrazina respectivamente.

3.2.3 Extracción asistida por microondas

Para la realización de extracción de los herbicidas en el grano de maíz se utilizó un equipo de microondas CEM Mars 6, que contiene 8 vasos de teflón Express.



Figura 6. Equipo de microondas usado para la extracción de los herbicidas en el grano de maíz.

Se realizó un pretratamiento de la muestra: el cual consta de tres etapas. En la primera, una cantidad de maíz fue triturada en un molino de granos (molino de granos del Rey) y tamizada para que este tenga un tamaño homogéneo quedando polvo (malla de acero inoxidable 200 μ m). En la segunda etapa se pesó cierta cantidad maíz (polvo) el cual fue fortificado con los herbicidas a un nivel de concentración de 6 y 12 mg/L para atrazina y 2,4-D, respectivamente. Por último fue humedecido con acetona durante 90 minutos usando un rotavapor para su homogeneización y evaporación del disolvente (rotavapor Yamato RE500), para posteriormente iniciar con los procesos de extracción.

Para ello se aplicó en una primera instancia un diseño de experimentos Box Behnken que consideró 15 experimentos y un posterior diseño de tipo factorial 3^2 que consta de 11 experimentos, estos diseños se aplicaron para evaluar el efecto de los factores y sus interacciones para poder determinar las condiciones óptimas del proceso de extracción asistida por microondas. Los factores evaluados fueron temperatura (60, 90 y 120°C), tiempo (5, 15 y 25 min), y agente extractante (metanol: agua (50:50), metanol (100%) y acetonitrilo (100%)), estos solventes son los más reportados en métodos de extracción convencional para este tipo de herbicidas[46-48], para el caso el diseño factorial se evaluó el extractante metanol: agua en diversas relaciones 30:70, 50:50 y 70:30 v/v y temperaturas de 50, 70 y 90°C (Tabla 5), manejando como condición fija la cantidad de muestra 0.5 g, volumen de solvente de 20 mL y una potencia de 600 W en cada experimento. El extracto fue centrifugado a 4000 rpm x 10 min (centrífuga Thermo Scientific Sorvall ST16) y filtrado usando filtros Whatman de 0.45 μ m y se analizó utilizando el

procedimiento de cromatografía multijeringa implementado con ayuda del software Autoanalysis v5.0, utilizando una columna de fase reversa del tipo monolítica C18 phenomenex (25x4.6 mm), una fase móvil constituida por CH₃CN:CH₃COOH/CH₃COONa 0.01 M a pH 4 (20:80), con un caudal de 2 mL/min.

La variable respuesta evaluada fue el porcentaje de recuperación. Los resultados obtenidos fueron analizados utilizando el programa estadístico STATISTICA v7.0.

Tabla 5: Diseño de experimentos tipo Box Behnken (a) y Factorial 3² (b) para obtener condiciones óptimas de extracción.

(a)				(b)		
Exp	Temperatura	Tiempo	Solvente	Exp	Solvente	Temperatura
1	-1	-1	0	1	-1	-1
2	1	-1	0	2	0	-1
3	-1	1	0	3	1	-1
4	1	1	0	4	-1	0
5	-1	0	-1	5	0	0
6	1	0	-1	6	1	0
7	-1	0	1	7	-1	1
8	1	0	1	8	0	1
9	0	-1	-1	9	1	1
10	0	1	-1	10	0	0
11	0	-1	1	11	0	0
12	0	1	1			
13	0	0	0			
14	0	0	0			
15	0	0	0			

Teniendo las condiciones óptimas de extracción se procedió a evaluar las condiciones que serían favorables para la preconcentración de los analitos.

3.2.4 Preconcentración

La plataforma del LOV se ha convertido en los últimos años en un sistema miniaturizado ideal para la automatización del tratamiento de muestra en el análisis de trazas de contaminantes ambientales, debido a que permite la manipulación automática de muestras y su pretratamiento en línea previa a su separación. En dicho sistema se pueden empaquetar fases sólidas que sirven para preconcentrar los contaminantes orgánicos y eliminar interferentes de la matriz de la muestra.

En este trabajo se realizaron diferentes ensayos para la preconcentración con el adsorbente de fase reversa (strata-X), tamaño de partícula 33 μm y diámetro de poro 85 Å. Una torunda de algodón se puso al final de la salida de la mini-columna SPE para la retención de la fase sólida en su interior. Al final de cada análisis se limpiaba dicha columna para ser empacaba con sólido nuevo.

Se evaluó la selección de la cantidad de adsorbente probando diferentes cantidades (15, 30, 45 y 60 mg). La relación entre los disolventes es muy importante debido que permite una adecuada desorción del analito del adsorbente, por lo que se utilizaron diversas composiciones de metanol:agua (40:60, 60:40 y 80:20 v/v). Otros factores que se analizaron fueron el volumen de muestra a

preconcentrar y volumen del disolvente para su elución cuando ya se había seleccionado una cantidad de sorbente y la relación de eluente.

Al realizar dichas pruebas se llevó a cabo una etapa de activación del adsorbente con metanol y agua.

Para realizar los experimentos y obtener los datos experimentales de dichas pruebas se generaron procedimientos de acondicionamiento de fase sólida para su activación y otro procedimiento para realizar la preconcentración de la muestra, lavado y elución-separación de los analitos. En la Tabla 6 se detallan los ocho pasos de que consta la activación de la fase sólida strata-X para posteriormente usarla para preconcentrar el extracto obtenido en la extracción asistida por microondas, y en la Tabla 7 los pasos para la preconcentración y separación de los herbicidas el cual consta de tres etapas: carga de muestra, lavado y separación y detección (anexo B).

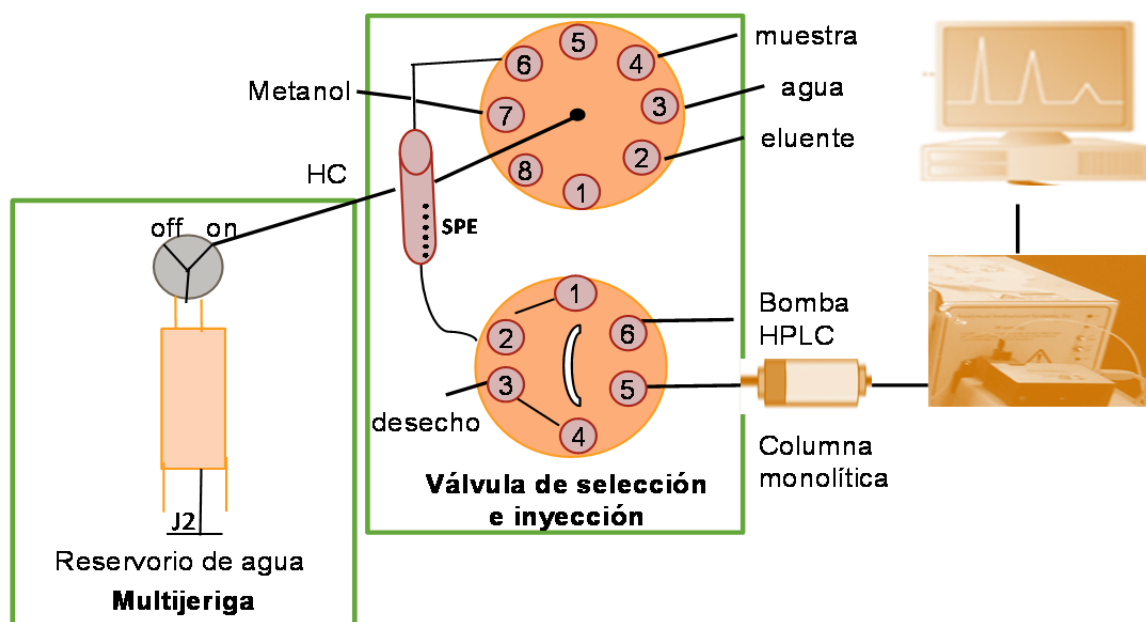
Tabla 6. Procedimiento para el acondicionamiento de la fase estacionaria strata-X con ayuda del software Autoanalysis v5.0.

Etapas	Operación	V2	VS	IV	Descripción
1	Dispensar 1 mL a 5 mL/min	off	off	off	Ajuste de la posición de los pistones
2	Aspirar 1 mL a 5 mL/min	on	7	no mover	Aspiración de metanol al bucle de carga
3	Dispensar 2 mL a 1 mL/min	on	6	inyección	Dispensado metanol y agua
4	Aspirar 2 mL a 5 mL/min	off	off	off	Ajuste de posición de pistón
5	Dispensar 0.8 mL a 5 mL/min	off	off	off	Vaciado de jeringa
6	Aspirar 0.8 mL a 5 mL/min	on	1	inyección	Cargando aire
7	Dispensar 0.8 mL a 5 mL/min	on	6	inyección	Dispensando aire al absorbente
8	Aspirar 0.8 mL a 5 mL/min	off	off	off	Posición de ajuste de los pistones y listo para realizar la etapa 1

Tabla 7. Procedimiento de las etapas de preconcentración y separación de los herbicidas en muestra fortificada de maíz con ayuda del software Autoanalysis v5.0.

Etapas	Operación	V2	VS	IV	Descripción
1	Dispensar 2 mL a 5 mL/min	off	off	off	Ajuste de la posición de los pistones
2	Aspirar 2 mL a 5 mL/min	on	4	no mover	Aspiración de extracto al bucle de carga
3	Dispensar 2 mL a 1 mL/min	on	6	inyección	Dispensado el extracto
4	Dispensar 0.5 mL a 5 mL/min	off	off	off	Ajuste de posición de pistón
5	Aspirar 0.5mL a 5 mL/min	on	1	inyección	Cargando aire
6	Dispensar 0.5 mL a 5 mL/min	on	6	inyección	Se mando el aire a la fase sólida
7	Aspirar 2.5 mL a 5 mL/min	off	off	off	Se rellena la jeringa
8	Se repite el paso 1 al 7, 5 veces para tener 10 mL de carga de muestra				
9	Dispensar 1.5 mL a 6mL/min	off	off	off	Etapas de lavado
10	Aspirar 1.5 mL a 5 mL/min	on	3	no mover	Cargando agua
11	Dispensar 1.5 mL a 1 mL/min	on	6	inyección	Dispensando el agua a la fase sólida
12	Dispensar 0.8 mL a 6 mL/min	off	off	off	Dispensando agua al reservorio
13	Aspirar 0.8 mL a 5 mL/min	on	3	inyección	Aspirar aire
14	Dispensar 0.8 mL a 5 mL/min	on	6	inyección	Dispensar aire a la fase solida
15	Aspirar 2.3 mL a 6 mL/min	off	off	off	Se rellena la jeringa
16	Dispensar 1 mL a 5 mL/min	off	off	off	Etapas de elución de analitos
17	Aspirar 1 mL a 5 mL/min	on	2	inyección	Carga de metanol
18	Dispensar 0.5 mL a 1 mL/min	on	6	inyección	Dispensado a la fase solida
19	Dispensar 0.5 mL a 1 mL/min	on	1	carga	Etapas de separación 300 segundos
20	Dispensar 0.5 mL a 1 mL/min	on	6	inyección	Enviar resto de metanol al desecho
21	Dispensar 0.5 mL a 5 mL/min	off	off	off	Enviar agua al contenedor
22	Aspirar 0.5 mL a 5 mL/min	on	1	inyección	Aspirar aire
23	Dispensar 0.5 mL a 5 mL/min	on	6	Inyección	Dispensado a la fase sólida
24	Aspirar 1.5 mL a 5 mL/min	off	off	off	Se rellena la jeringa
25	Se regresa la válvula a la etapa 2				El sistema esta listo para comenzar el proceso

En la (Figura 7), se muestra la configuración que tiene el sistema para la preconcentración y determinación de los herbicidas en el grano de maíz.



HC: bucle de carga
SPE: minicolumna para preconcentración

Figura 7. Esquema de preconcentración usando una mini columna para la extracción en fase sólida.

El sistema de detección consta de una fuente de luz de Deuterio DT-1000CE (Analytical Instrument System, Inc.) y un espectrofotómetro USB2000 CCD (Ocean Optics) (Figura 8). La primera etapa consiste en espera de 30 s para que se estabilice el sistema de detección, después se selecciona el Ocean Optics para que se obtenga un espectro de corriente de luz oscura (Get dark current spectrum) y este se espera por 30 s, enseguida se da clic para encender la fuente de luz esperando 30 s.



Figura 8. Fuente de luz de deuterio y espectrómetro USB2000 CCD.

3.2.5 Disposición de residuos

Los residuos generados durante la realización del proyecto de investigación se dispusieron y clasificaron de acuerdo a las características de los mismos. Para tal fin se utilizaron los recipientes proporcionados por el Departamento de Manejo y Control de Residuos de Laboratorio de la Facultad de Ciencias Químicas, mismo que llevó a cabo las labores pertinentes de almacenaje previas a la disposición final de los residuos.

CAPÍTULO 4

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 ESTUDIO ESPECTROFOTOMÉTRICO DE LOS HERBICIDAS ATRAZINA Y 2,4-D

Se registró el espectro de absorción UV de una mezcla de los herbicidas atrazina y 2,4-D de una concentración de 10 mg/L, obteniendo una longitud de onda de máxima absorción de 223 nm para atrazina y 230 nm para 2,4-D (Figura 9).

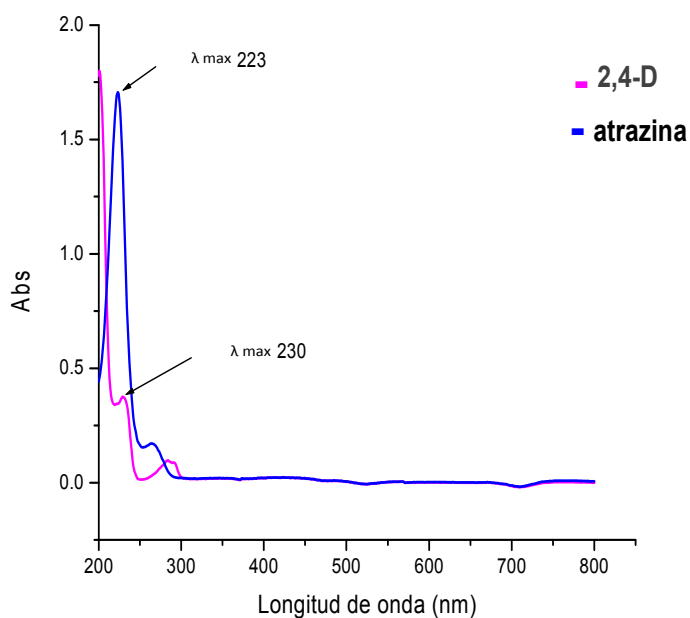


Figura 9. Espectro de absorción de una disolución de herbicidas en estudio a una concentración de 10 mg/L, tanto para atrazina como para el 2,4-D.

El analizar el efecto que ejercen los cambios de pH en una solución en la absorción de los compuestos orgánicos es importante, ya que en ciertas

condiciones pueden estar ionizados, neutros y se puede afectar en la recuperación de una determinada extracción, por tal motivo se estudió el efecto del pH (2 a 10) para atrazina y 2,4-D, se usó una concentración de 8 y 30 mg/L respectivamente. En la (Figura 10), se observa que el pH no tiene un efecto significativo en la absorción. La atrazina tiene una ligera caída en la absorción a pH 2, esto pudiera deberse a que en esta condición la molécula se encuentra protonada, y que a un pH superior de 4 la molécula esta neutra favoreciendo una mejor absorción. Caso contrario al 2,4-D debido a por encima de pH 4 la molécula se encuentra ionizada y eso hace que absorba más porque están más disponibles sus pares de electrones. Se elige el pH 4 para las siguientes pruebas debido a que a pH mayores no se observa un aumento en la absorbancia.

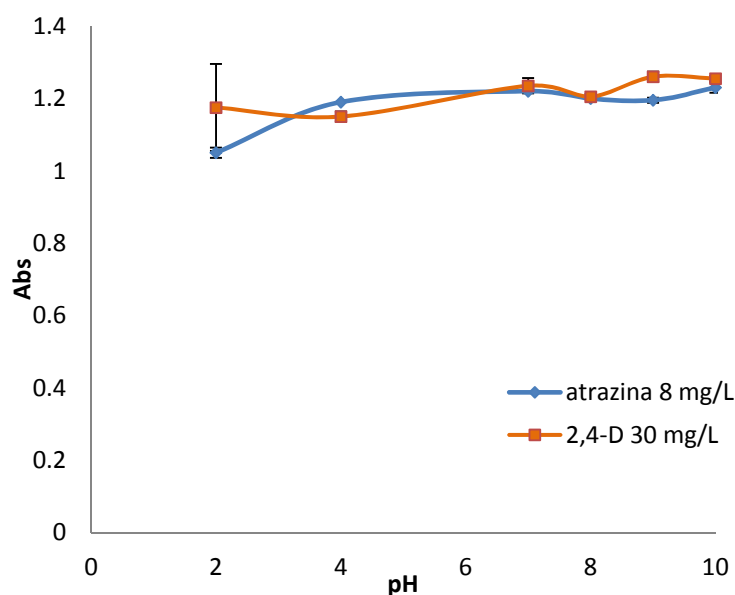


Figura 10. Efecto del pH en la absorbancia de 2,4-D y atrazina.

Por otra parte se hizo la prueba a pH 4 variando la cantidad de buffer (Figura 11) como se puede observar, no tiene ningún efecto significativo en la absorción la variación del volumen de buffer en cada analito estudiado. Se elige el tomar 1 mL de buffer para futuras pruebas.

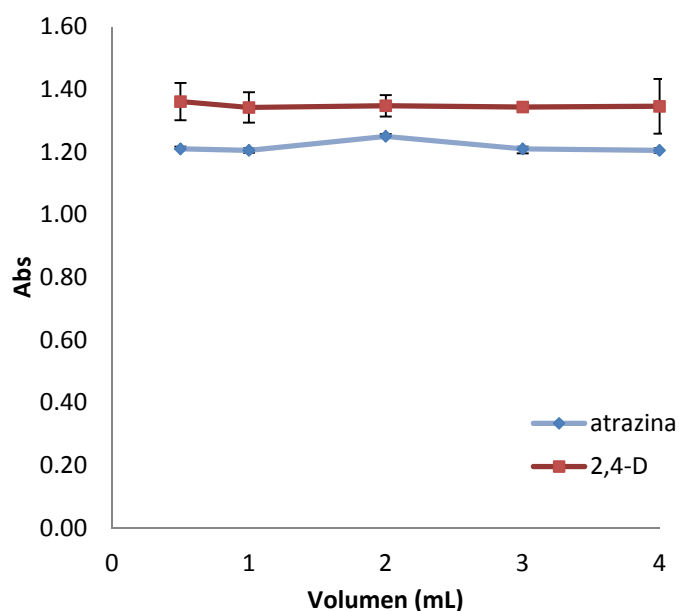


Figura 11. Estudio de la cantidad de buffer a pH 4 para atrazina y 2,4-D.

Por último, utilizando el buffer de pH 4 (ácido acético:acetato de sodio), se monitorizaron estos herbicidas por una hora, se observó que son estables con el tiempo, ver Figura 12.

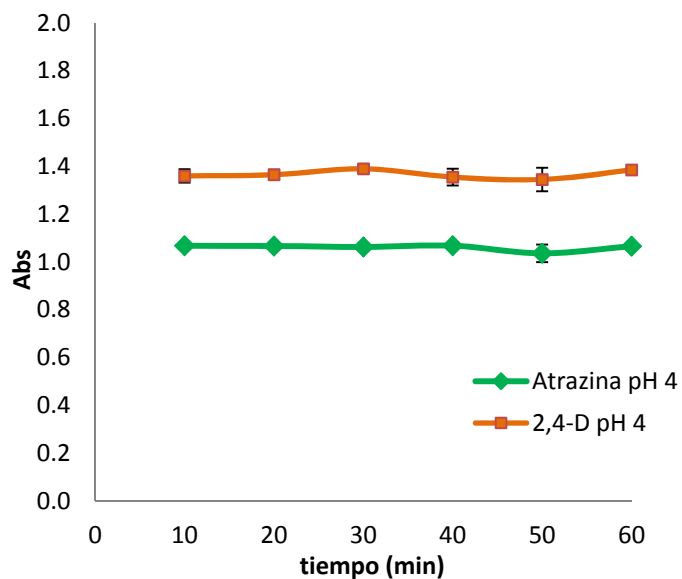


Figura 12. Monitorización de la estabilidad de los herbicidas en estudio en un tiempo de 60 min.

Se realizaron las curvas de calibración (Figura 13) correspondientes para cada herbicida utilizando longitudes de absorción máxima de cada uno, a partir de una serie de estándares de 0.4 a 30 mg/L para 2,4-D y de 0.1 a 8 mg/L para la atrazina.

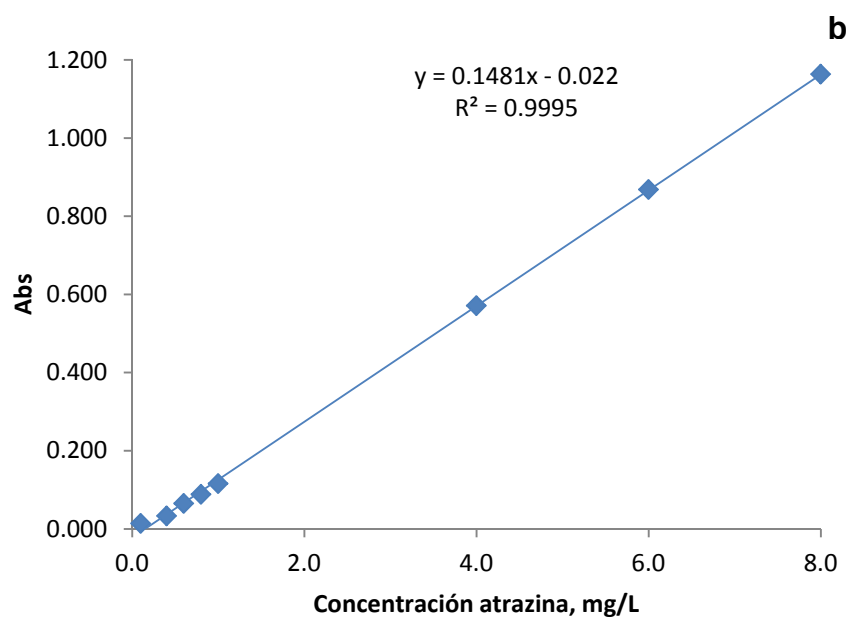
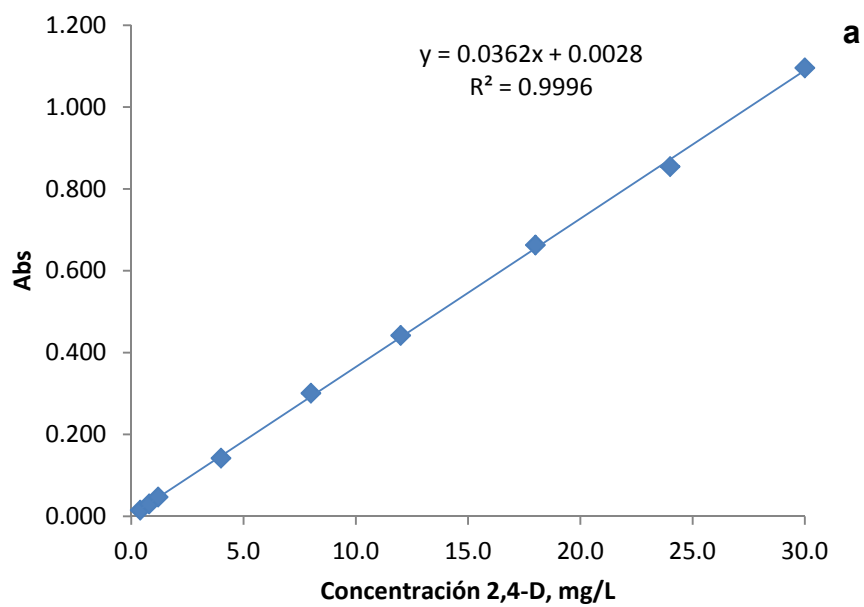


Figura 13. Curvas de calibración de a) 2,4-D y b) atrazina obtenidas mediante espectrofotometría UV-Vis.

4.2 SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA MULTIJERINGA-HPLC

Se optimizaron las condiciones cromatográficas para la separación de los herbicidas. Inicialmente se hicieron pruebas de pH ajustando la fase móvil con HCl 1 M a pH 2, 3 y 4, y por otro lado con ácido acético 0.1 M para pH 3 y 4, usando el procedimiento de Tabla 4 a concentraciones de 10 mg/L para atrazina y 2,4-D, una relación de fase móvil CH₃CN:agua (20:80), elución isocrática a un caudal de 2 mL/min. En la (Figura 14) se presentan los resultados.

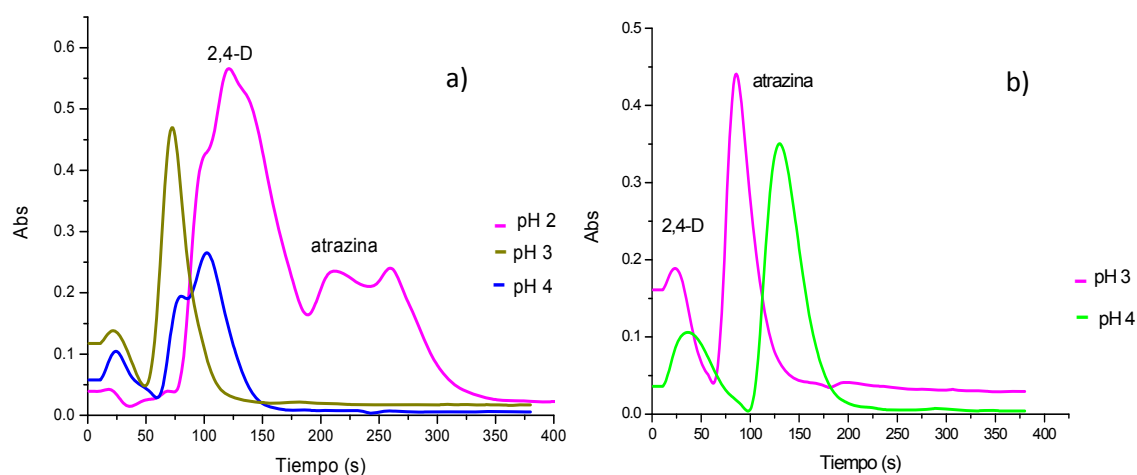


Figura 14. Efecto del pH de la fase móvil en la separación cromatográfica de atrazina y 2,4-D utilizando para el ajuste de pH a) HCl 1 M y b) ácido acético 0.1 M.

La separación del herbicida 2,4-D a pH 2 se ve más favorecido, debido a que se disminuye su ionización favoreciendo su retención en la columna debido a que será menos polar, sin embargo se observa una coelución con la atrazina por lo que su separación no es factible a esta condición debido a que no se tiene una

buena resolución, sin embargo cuando se usa ácido acético a pH 4 se ve una mejor separación cromatográfica de los analitos, presentando menor tiempo de retención, lo que significa que los dos analitos tienen más afinidad a la fase móvil eluyéndose un más rápido.

Se realizó una prueba con un amortiguador de ácido acético/acetato de sodio pH 4, variando la concentración de la base, para ver si existe un efecto en la separación cromatográfica. En la (Figura 15) se aprecia que cuando se tiene una concentración de 0.01 M de acetato se tiene una mayor sensibilidad y separación de los analitos que cuando está en mayor concentración (0.05 y 0.1 M), esto pudiera deberse a que existe una competencia por los sitios activos en la columna disminuyendo su absorción, además que se tiene un ligero corrimiento en el t_R que cuando el acetato de sodio está más diluido, por lo que se decide utilizar el amortiguador de ácido acético/acetato de sodio 0.01 M a pH 4 para regular el pH de la fase móvil durante la separación cromatográfica de los analitos de estudio.

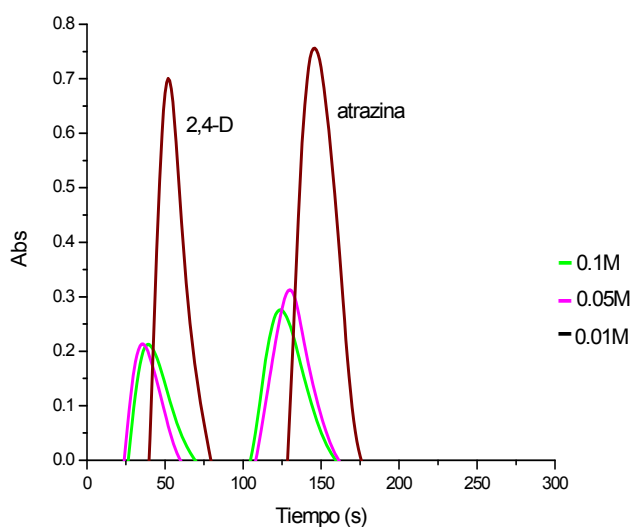


Figura 15. Efecto de la variación de la concentración del acetato de sodio en la separación cromatográfica.

Las mejores condiciones fueron: $\text{CH}_3\text{CN}:\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONa}$ 0.01 M (20/80) pH 4.0, caudal 2 mL/min, $\lambda_{\text{máx}}$ 223 y 230 nm, columna monolítica C18 (25x4.6 mm). En la Figura 16 se muestra la separación cromatográfica de atrazina y 2,4-D, la cual se llevó a cabo en menos de 4 min, presentando tiempos de retención y valores de eficiencia (N) para 2,4-D de $t_{R1} = 0.92$ min y 41.75, y para atrazina $t_{R2} = 2.69$ min y 121.24 y una resolución de 2.28. Por su menor polaridad, la atrazina interacciona más que el 2,4-D con la columna, lo que trae como consecuencia un tiempo de retención mayor y una mayor cantidad de platos teóricos.

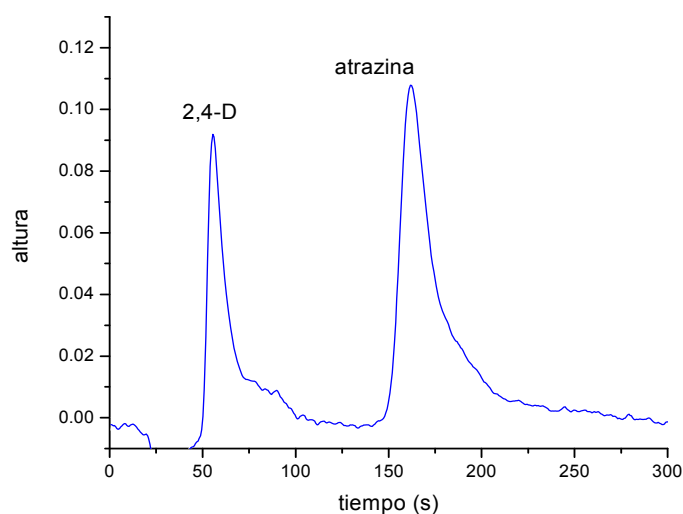


Figura 16. Cromatograma de atrazina y 2,4-D a una concentración de 8 y 16 mg/L respectivamente.

Después de obtener las mejores condiciones en la etapa de separación cromatográfica, se evaluaron los parámetros analíticos como son el porcentaje de error (% E) y la desviación estándar relativa (% d.s.r), los límites de detección

(LOD) y cuantificación (LOQ) de acuerdo con las ecuaciones 2, 4 y 5. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 8. Los porcentajes de error y la desviación estándar relativa oscilan entre 3.5 y 5.7 %, que son porcentajes aceptables cuando se trabaja con este nivel de concentración (mg/L).

Tabla 8. Parámetros analíticos del método de separación cromatográfica propuesto utilizando el software Autoanalysis v5.0[45].

Parámetro	2,4-D	atrazina
Ecuación Lineal	$Y = 0.0059x + 0.0028$	$Y = 0.0123x + 0.0012$
Coefficiente de correlación (r)	0.996	0.999
Rango de Trabajo (mg/L)	1-24	1-12
% d.s.r.	5.3 (1 mg/L)	5.7 (1 mg/L)
	4.6 (16 mg/L)	4.3 (8 mg/L)
% E	4.4 (1 mg/L)	4.7 (1 mg/L)
	3.8 (16 mg/L)	3.5 (8 mg/L)
* LOD (mg/L)	0.15	0.1
* LOQ (mg/L)	0.5	0.5

4.3 EXTRACCIÓN ASISTIDA POR MICROONDAS (MAE)

Se inició con un diseño Box-Behnken el cual resultó en 15 experimentos para determinar qué factor o factores presentan más influencia en la extracción asistida por microondas (MAE). Los factores analizados fueron tiempo (5, 15 y 25 min), temperatura (60, 90 y 120°C) y el tipo de agente extractante (1.- MEOH:H₂O (50:50 v/v), 2.- MEOH y 3.- CH₃CN), estos factores se eligieron porque de acuerdo a la literatura consultada son los parámetros que mayor influencia tienen para la eficiencia de la extracción, 0.5 g de muestra de maíz se usó para examinar las recuperaciones de estos dos herbicidas. En la Tabla 9 se presentan las recuperaciones obtenidas de cada uno de los experimentos del diseño Box-Behnken, y en (Figura 17) se presenta la función de deseabilidad.

Tabla 9. Porcentajes de recuperación de los herbicidas en estudio de acuerdo al diseño Box-Behnken.

Exp.	Temperatura	Tiempo	Solvente	Recuperación 2.4-D	Recuperación atrazina
1	60	5	2	18.48	45.21
2	120	5	2	17.52	46.33
3	60	25	2	14.49	46.17
4	120	25	2	12.10	37.14
5	60	15	1	60.69	56.29
6	120	15	1	49.33	68.75
7	60	15	3	0	27.20
8	120	15	3	0	29.28
9	90	5	1	32.93	69.45
10	90	25	1	38.80	83.89
11	90	5	3	0	40.73
12	90	25	3	0	43.28
13	90	15	2	17.49	49.44
14	90	15	2	16.76	46.65
15	90	15	2	15.15	48.55

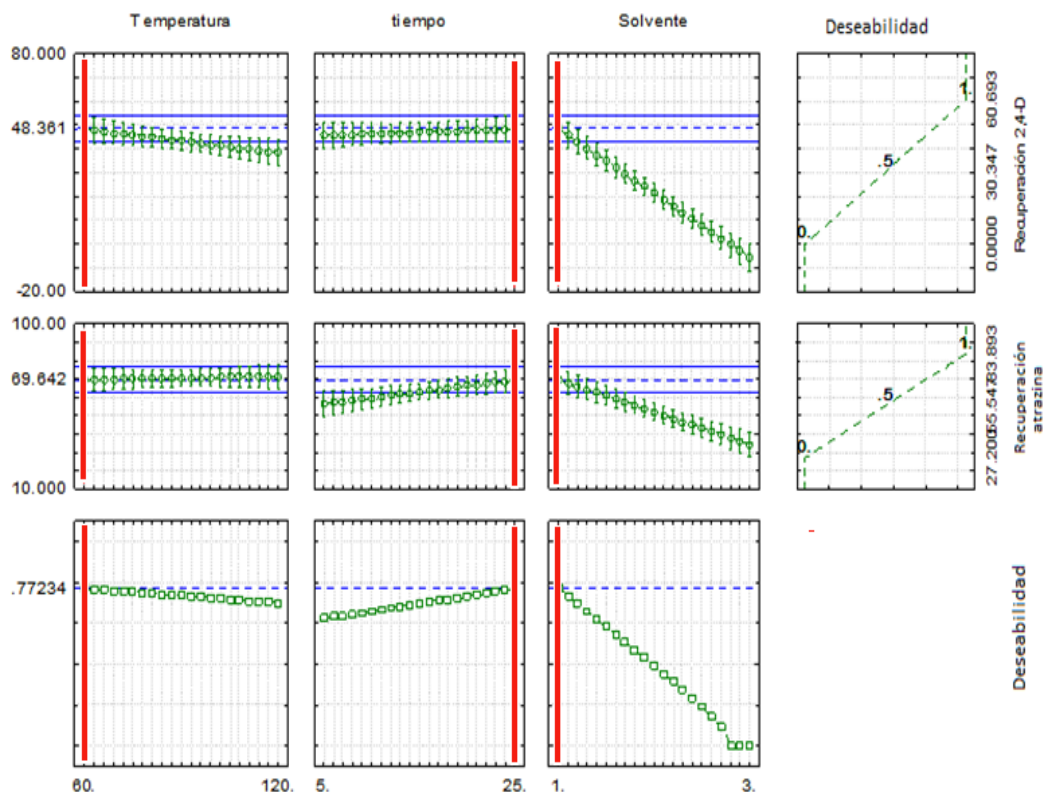


Figura 17. Función de deseabilidad para evaluar las condiciones de extracción a través del diseño de experimentos tipo Box-Behnken.

De acuerdo con lo observado en la función de deseabilidad, temperatura menor de 60°C es la más conveniente para extraer a los herbicidas. El tiempo no presentó un efecto significativo en la extracción del herbicida 2,4-D en todo el rango estudiado; un comportamiento diferente se ve para la atrazina, que en un tiempo superior de 15 min se obtienen mejores recuperaciones, lo que pudiera deberse al carácter apolar de la atrazina que requiere de más tiempo para que el solvente interaccione con ella. Una alta recuperación se obtuvo con agente extractante

MEOH:H₂O (50:50 v/v) como agente extractante, esto es debido a que el agua tiene una mayor constante dieléctrica y menor factor de disipación como se puede observar en la Tabla 3, lo que significa que el sistema absorbe más energía de microondas provocando que incremente la temperatura dentro de la muestra haciendo que la radiación sea más efectiva para desorción y extracción de los compuestos[26, 48]. A partir de este diseño de experimentos se logró establecer un tiempo de extracción de 20 min, agente extractante MEOH:H₂O (50:50 v/v) y temperatura menor a 60°C.

Se aplicó un segundo diseño de experimentos de tipo factorial 3² para obtener la mejor condición de extracción, en la Tabla 10 se muestran las recuperaciones. Los resultados indican que las dos variables estudiadas tienen un efecto significativo ($p=0.05$) en el caso 2,4-D como se puede observar en la (Figura 18). Un resultado negativo indica que el incrementar la relación de agente extractante y la temperatura disminuye el porcentaje de recuperación de este analito. Respecto a la recuperación de atrazina no tiene ninguna influencia el cambiar las relaciones de agente extractante ni la temperatura estudiada (Figura 19).

Tabla 10. Resultados obtenidos del diseño factorial 3².

Exp	Solvente	Temperatura	Recuperación 2.4-D	Recuperación atrazina
1	30	50	137.70	102.37
2	50	50	102.98	105.01
3	70	50	70.78	92.02
4	30	70	129.19	83.39
5	50	70	96.60	80.06
6	70	70	62.34	76.84
7	30	90	112.70	79.71
8	50	90	93.18	87.15
9	70	90	61.59	78.69
10	50	70	93.00	83.59
11	50	70	81.61	69.20

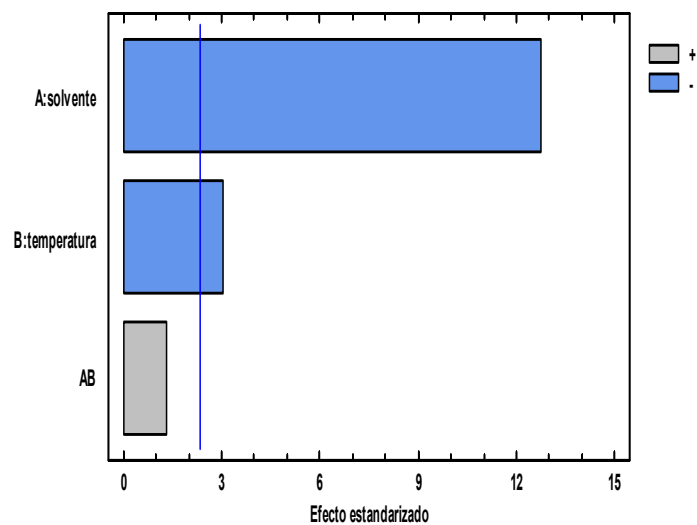


Figura 18. Diagrama de Pareto para 2,4-D de la influencia de las variables correspondientes a la optimización de la extracción por microondas.

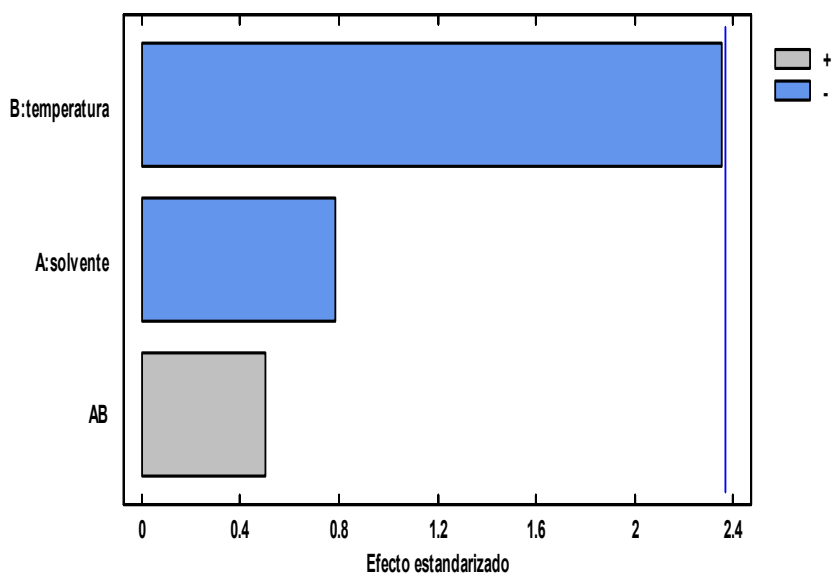


Figura 19. Diagrama de Pareto para atrazina de la influencia de las variables correspondientes a la optimización de la extracción por microondas.

En el gráfico de deseabilidad (Figura 20), se muestra la mejor condición de extracción de estos herbicidas que es una relación de agente extractante metanol: agua (30:70) y temperatura de 50°C.

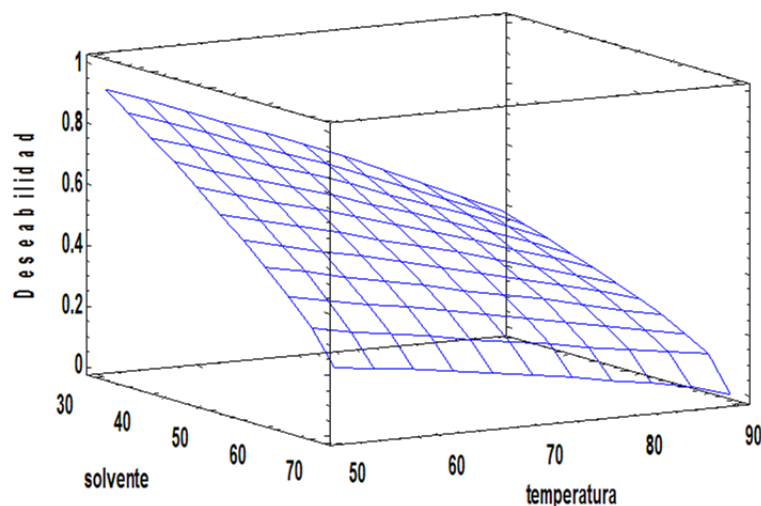


Figura 20. Condiciones óptimas de extracción para los herbicidas en el grano de maíz.

Se encontró que para extraer el 2,4-D y la atrazina eficientemente, es bajo las condiciones: 20 mL de agente extractante en relación MEOH:H₂O (30:70), un tiempo de 20 min y una temperatura de 50 °C y pesando cuidadosamente 0.5 g de maíz.

A continuación se presentan en la Tabla 11, los porcentajes de recuperación cuando se aplica el proceso de extracción óptimo y la separación cromatográfica implementada utilizando el software Autoanalysisv5.0 con la muestra fortificada a una concentración de 6 y 12 mg/L de atrazina y 2,4-D, respectivamente.

Tabla 11. Porcentajes de recuperación de 2,4-D y atrazina.

Herbicidas	R1	R2	R3	Recuperación (%) [*]
2,4-D	99.4	99.7	102.4	100.5±2.8
atrazina	98.7	99.7	102.2	100.2±3.1

* Nivel de confianza 95% y n = 3.

4.4 PRECONCENTRACIÓN DE LOS HERBICIDAS

Con la fase sólida strata-X se estudió la concentración de eluente que fuera más factible para la elución de los analitos. Se empaquetó 30 mg de strata-X, se preconcentró 3 mL de muestra, subsecuentemente los compuestos fueron retenidos en la fase sólida a 1 mL/min este caudal es bajo debido a que se maximiza la interacción entre fase sólida y el analito, después fueron eluidos con 1 mL de eluente a un caudal 1 mL/min. Los resultados se muestran en la (Figura 21), se observa por la altura del pico cromatográfico que el metanol al 80% tiene mayor fuerza para desorber los analitos de la fase estacionaria, esta concentración de eluente se estableció para el estudios de las siguientes condiciones.

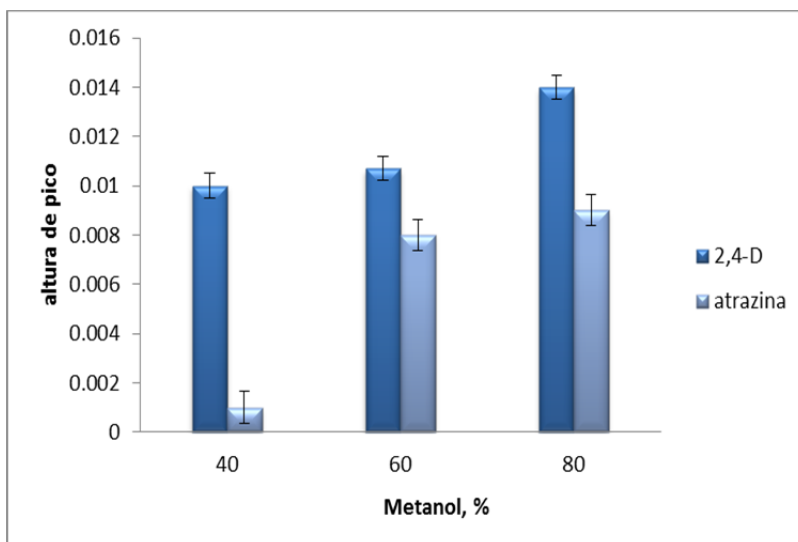


Figura 21. Porcentaje de metanol para la desorción de los herbicidas strata-X, utilizando una concentración de 1 mg/L y volumen de muestra de 3 mL.

Es muy importante estudiar el volumen del solvente de elución en la preconcentración debido a que un volumen menor maximiza el factor de enriquecimiento preconcentración [49]. Así mismo, se estudiaron las variables de volumen de eluyente y cantidad de fase sólida (Figura 22) se muestra los resultados.

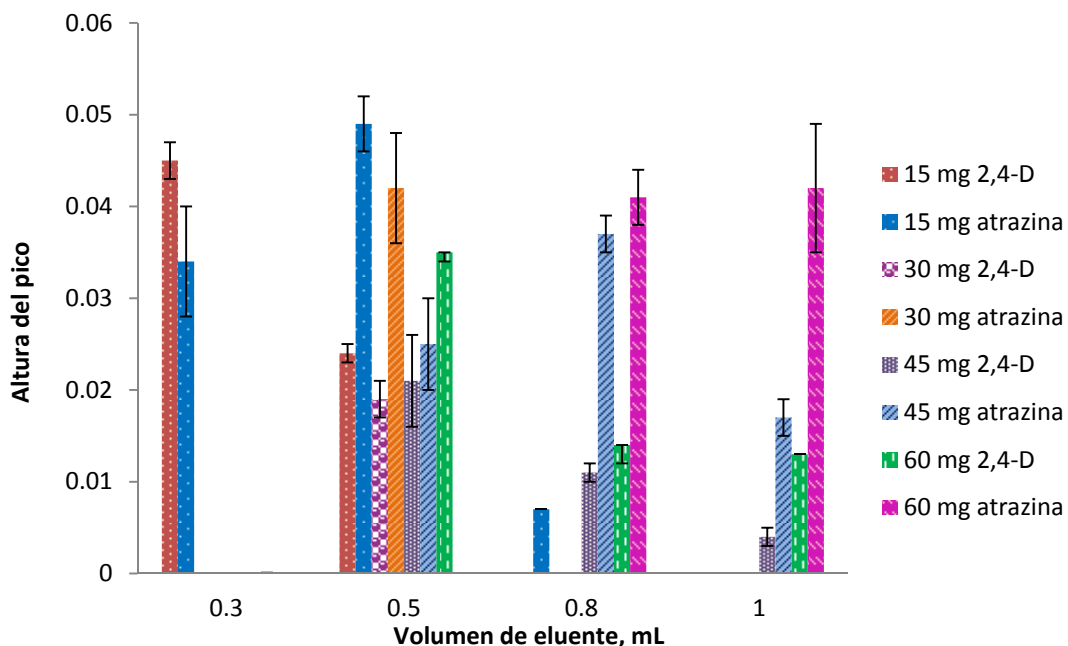


Figura 22. Efecto del volumen de eluyente y la cantidad en mg de fase sólida strata-X utilizada para preconcentrar.

Se encontró para la desorción de la atrazina y 2,4-D un volumen de metanol de 0.5 mL es suficiente cuando se usan 15 y 30 mg de fase sólida, ya que con un volumen mayor no se detecta debido a que la elución de estos herbicidas es rápida. Por otro lado, cuando se incrementa la cantidad de fase sólida de 45 a 60 mg se necesita mayor cantidad de eluyente para eluir a la atrazina debido es demasiada fase sólida que hace que interaccione más con esta, en el caso del 2,4-D no se ve este efecto debido a que su carácter polar y su pobre afinidad con la fase sólida se eluye rápidamente. En el caso de la atrazina, cuando se tienen 60 mg de fase sólida y se eluye con 1 mL de metanol, se obtiene una altura de pico

de 0.42, misma que se obtiene cuando se usan 30 mg con menos volumen. Por lo tanto, 30 mg de adsorbente y 0.5 mL de eluyente son la mejor condición para la etapa de preconcentración.

Se estudió el volumen de muestra que soporta la fase sólida para preconcentrar, en el que se observa que 10 mL de muestra es el volumen máximo debido a que la fase estacionaria ya no tiene capacidad para retener más cantidad de los analitos (Figura 23), ya que si se sigue incrementando el volumen los herbicidas ya no se retienen, lo que hace que disminuya la altura de pico cromatográfico.

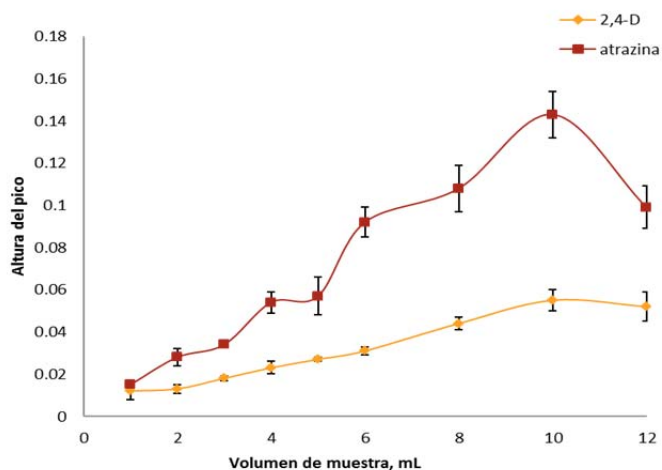


Figura 23. Efecto de la carga de muestra durante la etapa de preconcentración con 30 mg de fase sólida, 0.5 mL de eluyente y caudal de 1 mL/min.

Se obtuvieron como condiciones finales para la preconcentración 10 mL de muestra, con 30 mg de sólido y un volumen de 0.5 mL metanol al 80% (v/v) para desorción de los herbicidas de la fase sólida, obteniendo un factor de preconcentración de 20 debido a que 10 mL de muestra se preconcentraron en 0.5 mL.

Con las condiciones antes mencionadas se obtuvieron los siguientes parámetros analíticos (Tabla 12). Para la cuantificación de los herbicidas se obtuvo una curva de calibración con un rango de 70 a 700 µg/L obteniendo correlaciones de 0.9990, se obtuvieron los porcentajes de error (% E) y la desviación estándar relativa (% d.s.r.) los cuales oscilan de 3 a 7%, que son errores aceptables cuando se trabajan en concentraciones de partes por billón.

Tabla 12. Parámetros analíticos de la etapa de preconcentración.

Parámetro	2,4-D	atrazina
Ecuación Lineal	$y = 0.071x + 0.0098$	$y = 0.1647x + 0.0018$
Coeficiente de correlación (r)	0.993	0.999
Rango de Trabajo (mg/L)	0.07-0.7	0.07-0.7
% d.s.r.	5.7 (0.07 mg/L)	7.2 (0.07mg/L)
	6.0 (0.3 mg/L)	4.0 (0.3mg/L)
% E	4.7 (0.07 mg/L)	6.0 (0.07mg/L)
	4.9 (0.3 mg/L)	3.3 (0.3 mg/L)
LOD (mg/L)	0.03	0.02
LOQ (mg/L)	0.1	0.1

Se analizaron muestras de maíz fortificadas, procedentes de Galeana, Nuevo León, las recuperaciones se calcularon con la altura del pico cromatográfico, a los extractos se les agregó 0.1 mL de sulfato de cobre al 7% para la eliminación de interferencias como las proteínas, debido a que el endospermo de maíz se solubilizada en presencia de CuSO_4 [50]. En las dos muestras no se detectó la presencia de estos herbicidas.

Tabla 13. Porcentajes de recuperación dentro del sistema implementado para la determinación los herbicidas en el grano de maíz.

Muestra fortificada en (mg/L)	Compuesto	% Recuperación*
M1 (0.4)	atrazina	97±5.06
	2,4-D	75±5.39
M2 (0.5)	atrazina	98±5.80
	2,4-D	70±2.06
M1 (SFR)	atrazina	<LD
	2,4-D	<LD
M2 (SFR)	atrazina	<LD
	2,4-D	<LD

* 95% nivel de confianza y n = 3.

(SFR) = maíz sin fortificar.

<LD = por debajo del límite de detección.

CAPÍTULO 5

5. CONCLUSIONES

Se desarrolló un método que permite la determinación a nivel de trazas de atrazina y 2,4 D en muestras de maíz.

El sistema LOV implementado para el tratamiento de la muestra en línea permite preconcentrar y analizar una muestra en 20 min.

Las condiciones para la separación cromatográfica de los herbicidas en el sistema propuesto son: fase móvil $\text{CH}_3\text{CN}:\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONa}$ 0.01M (20:80) a pH 4, caudal 2 mL/min, carga de muestra 0.4 mL.

Se establecieron las condiciones de extracción asistida por microondas: agente extractante metanol/agua (30:70), temperatura 50°C y tiempo de extracción 20 min.

En la etapa de separación-MAE se obtuvieron porcentajes de recuperación para 2,4-D y atrazina en el grano de maíz del 100.5 y 100.2%, respectivamente.

El máximo factor de enriquecimiento fue de 20 cuando se usó 10 mL de muestra.

Con el sistema implementado la recuperación de atrazina y el 2,4-D está en el intervalo de 70-98%.

No se obtuvo presencia de 2,4-D y atrazina en el grano de maíz de las dos muestras analizadas procedentes de Galena, N. L.

CAPÍTULO 6

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Espinosa., E.C. *Los humedales y la contaminación por herbicidas*. Recuperado el 22 de noviembre de 2014 12:00am, de http://proyectos.inecol.edu.mx/conoceysobrevive/literatura/Humedales_contaminacion_por_herbicidas.pdf].
2. *Lección 18. Contaminación por plaguicidas y herbicidas*. Recuperado el 5 de noviembre de 2014 2:00pm, de http://datateca.unad.edu.co/contenidos/358013/ContenidoEnLinea/leccin_18_contaminacion_por_plaguicidas_y_herbicidas.html].
3. *Contaminación del suelo*. Recuperado el 7 de noviembre de 2014 3:00pm, de http://html.rincondelvago.com/contaminacion-del-suelo_2.html].
4. Portuguese, R.A. *Herbicidas asociados al caña de azúcar y su potencial de contaminación en el medio ambiente 2013*. Recuperado el 16 de febrero de 2015 10:51pm, de http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:Vdwa4OpC_7AJ:https://www.laica.co.cr/biblioteca/servlet/DownloadServlet%3Fc%3D443%26s%3D2884%26d%3D13658+&cd=2&hl=es&ct=clnk&gl=mx].
5. *Seminario de Actualización Técnica "Manejo de Malezas". Sitio Argentino de Protección Animal 2006*. Recuperado el 17 de Febrero de 2015 5:13pm, de http://www.produccion-animal.com.ar/produccion_y_manejo_pasturas/pasturas_combate_de_plagas_y_malezas/74-comportamiento_ambiental_herbicida.pdf].
6. *Secretaría de Economía Dirección General de Industrias Básicas abril 2012*. Recuperado el 08 de septiembre de 2013 5:23pm, de http://www.economia.gob.mx/files/comunidad_negocios/industria_comercio/informacionSectorial/20120411_analisis_cadena_valor_maiz-tortilla.pdf].
7. *AgroPanorama.com una forma diferente de ver el agro en América Latina*. Recuperado el 16 de octubre de 2013 7:00pm, de <http://www.agropanorama.com/news/Produccion-Mundial-de-Maiz.htm>].
8. Paliwal, R.L. *El maíz en los trópicos: Mejoramiento y producción: Usos del Maíz 2001*. Recuperado el 06 de septiembre de 2013 5:00pm, de <http://curlacavunah.files.wordpress.com/2010/04/el-maiz-en-los-tropicos.pdf>].
9. Cserhádi, T., Forgács, Esther., Deyl, Zdenek., Miksik, Ivan and Eckhardt, Adam., *Chromatographic determination of herbicide residues in various matrices*. Biomedical Chromatography, 2004. **18**(6): p. 350-359.
10. Vidigal, S.S.M.P., Tóth, Ildikó V., Rangel, António O. S. S., *Sequential injection lab-on-valve platform as a miniaturisation tool for solid phase extraction*. Anal. Methods, 2013. **5**(3): p. 585-597.
11. *Secretaría de Agricultura y Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA)*. Recuperado el 12 de septiembre de 2013 11:06pm, de http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_wrapper&view=wrapper&Itemid=351].
12. Ramírez, J.A., y Lacasaña, M. *Plaguicidas clasificación, uso, toxicología y medición de la exposición 2001*. Recuperado el 5 de octubre 2013 8:00pm, de <http://www.scsmt.cat/Upload/TextCompleto/2/1/216.pdf>].
13. Chao, M.G., *Desarrollo de nuevas metodologías analíticas basadas en la espectrometría de masas en tándem para la determinación de residuos de plaguicidas en productos de origen*

- animal y compartimentos medioambientales relacionados, Universidad de Santiago de Compostela 2010.*
14. Robles, E.R. *Clasificación y uso de los herbicidas por su modo de acción*. INIFAP-Campo Experimental Río Bravo, Tamaulipas. Recuperado 08 de septiembre del 2013 7:00pm, de <http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:pmKj7yL6NLgJ:www.senasica.gob.mx/includes/asp/download.asp%3FIdDocumento%3D19766%26IdUrl%3D31595+&cd=1&hl=es-419&ct=clnk>].
 15. Tema 5°. *Caracterización de los principales grupos de herbicidas*. Recuperado el 16 de octubre 2013 10:26pm, de https://www5.uva.es/guia_docente/uploads/2012/427/52040/1/Documento11.pdf].
 16. *Fichas Internacionales de Seguridad Química*. Recuperado el 16 de octubre del 2013 10:40pm, de <http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/FichasTecnicas/FISQ/Ficheros/Oa100/nspn0033.pdf>].
 17. Ediciones Agrotécnicas S.L. Terralia. Recuperado el 10 de septiembre de 2013 9:20pm, de http://www.terralia.com/agroquimicos_de_mexico/index.php?Proceso=registro&numero=6401].
 18. Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria de Argentina Límites permisibles. Recuperado el 10 de septiembre de 2013 9:33pm, de <http://www.senasa.gov.ar/Archivos/File/File4292-anexo-1.pdf>].
 19. Labrada, R., Caseley, R.C., Parker, C., *Manejo de maleza para países en desarrollo* 1-395 pág. 226 1996.
 20. Infoagro Systems, S.L. *El cultivo del maíz (1ª parte)*. Recuperado el 05 de septiembre de 2013 3:00pm, de <http://www.infoagro.com/herbaceos/cereales/maiz.htm>].
 21. Wang, H., Li, Guijie., Zhang, Yiqun., Chen, Haiyan., Zhao, Qi., Song, Weitao., Xu, Yang., Jin, Haiyan., Ding, Lan., *Determination of triazine herbicides in cereals using dynamic microwave-assisted extraction with solidification of floating organic drop followed by high-performance liquid chromatography*. Journal of Chromatography A, 2012. **1233**: p. 36-43.
 22. Pyrzynska, K., Pobozy, Ewa., Trojanowicz, Marek., *Chapter 20 Flow analysis in the protection of the environment. The Faculty of Chemistry of Warsaw University*. p. Recuperado el 13 de enero de 2014 3:33pm, de http://www.pg.gda.pl/chem/CEEAM/Dokumenty/CEEAM_ksiazka/Chapters/chapter20.pdf
 23. Miró, M., Oliveira, Hugo M., Segundo, Marcela A., *Analytical potential of mesofluidic lab-on-a-valve as a front end to column-separation systems*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2011. **30**(1): p. 153-164.
 24. Canosa, R.M.d.P., *Desarrollo de Metodología Analítica para determinación de triclosán y parabenes, aplicación al estudio de su distribución y transformación en muestras ambientales 2009, Universidad de Santiago de Compostela: Universidade. Servizo de Publicacións e Intercambio Científico, ISBN 978-84-9887-182-1.*
 25. Rodríguez, F.J.S. Tema 2. *La preparación de la muestra*. Recuperado el 23 de agosto del 2013 9:00pm, de http://www.uam.es/personal_pdi/ciencias/alimento/TemaJS-AISA.pdf].
 26. Veggi, P.C., Martinez, J., and Meireles, M. A. A., *Fundamentals of Microwave Extraction* 2012, p:15-52.
 27. Sparr Eskilsson, C., Björklund, Erland., *Analytical-scale microwave-assisted extraction*. Journal of Chromatography A, 2000(902): p. 227–250.
 28. Rence, B.W., *Microwave assisted extraction*. American Laboratory, 1994: p. 34-40.

29. Chung-Hung, C., Rozita, Yusoff., Gek-Cheng, Ngoh., Fabian, Wai-Lee Kung., *Microwave-assisted extractions of active ingredients from plants*. Journal of Chromatography A, 2011(1218): p. 6213– 6225.
30. *Extracción en fase sólida*. Recuperado el 23 de diciembre de 2014 9:13am, de <http://extraccionenfasesolida.blogspot.mx/>.
31. Hennion, M.-C., *Solid-phase extraction method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography*. Journal of Chromatography A, 1999. **856**: p. 3-54.
32. Irina Coroi, G.J., *Chromatographic methods for determination of herbicide residue in various matrices*. Lucrari Stiintifice. **52**(seria Agronomie): p. 313-316.
33. Zhang, L., Liu, Shaowen., Cui, Xinyi., Pan, Canping., Zhang, Ailin., Chen, Fang, *A review of sample preparation methods for the pesticide residue analysis in foods*. Cent. Eur. J. Chem. , 2012. **10**(3): p. 900-925.
34. Setyaningsih, W., Palma, M., Barroso, C. G., *A new microwave-assisted extraction method for melatonin determination in rice grains*. Journal of Cereal Science, 2012. **56**(2): p. 340-346.
35. Shah, J., Rasul Jan, M., Ara, Behisht., Shehzad, Farhat-un-Nisa., *Quantification of triazine herbicides in soil by microwave-assisted extraction and high-performance liquid chromatography*. Environmental Monitoring and Assessment, 2010. **178**(1-4): p. 111-119.
36. El-Saeid, M.H., Al-Wabel, M. I. A., Nasser-Abdel, G., and Al-Turki, A. M., and Al-Ghamdi, A. G, *One-step extraction of multiresidue pesticides in soil by microwave-assisted extraction technique*. Journal of Applied Sciences, 2010. **10**(16): p. 1775-1780.
37. Zhendong Yang, W.Z., *Optimization of microwave-assisted extraction of anthocyanins from purple corn (Zea mays L.) cob and identification with HPLC–MS*. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2010. **11**(3): p. 470-476.
38. You, J., Zhang, Huarong., Zhang, Hanqi., Yu, Aimin., Xiao, Tingting., Wang, Yutang., Song, Daqian., *Determination of triazines in infant nutrient cereal-based foods by pressurized microwave-assisted extraction coupled with high-performance liquid chromatography–mass spectrometry*. Journal of Chromatography B, 2007. **856**(1-2): p. 278-284.
39. Boonjob, W., Miró, M., Segundo, M. A., Cerdá, V., *Flow-through dispersed carbon nanofiber-based microsolid-phase extraction coupled to liquid chromatography for automatic determination of trace levels of priority environmental pollutants*. Anal Chem, 2011. **83**(13): p. 5237-44.
40. Boonjob, W., Yu, Yongliang., Miró, Manuel., Segundo, Marcela A., Wang, Jianhua., and Cerdá, Víctor., *Online Hyphenation of Multimodal Microsolid Phase Extraction Involving Renewable Molecularly Imprinted and Reversed-Phase Sorbents to Liquid Chromatography for Automatic Multiresidue Assays*. Anal. Chem. 2010, 82, 3052–3060.
41. Oliveira, H.M., Segundo, Marcela. A., Lima, José. L. F. C., Miró, Manuel., Cerdá, Víctor., *On-line renewable solid-phase extraction hyphenated to liquid chromatography for the determination of UV filters using bead injection and multisyringe-lab-on-valve approach*. Journal of Chromatography A, 2010. **1217**(22): p. 3575-3582.
42. Vidigal, S.S.M.P., Tóth, Ildikó V., and Rangel, António O. S. S., *Sequential Injection Lab-on-Valve System for the Determination of the Activity of Peroxidase in Vegetables*. J Agric Food Chem, 2010. **58**(4): p. 2071-2075.
43. Oliveira, H.M., Segundo, Marcela A., Lima, José L. F. C., Miró, Manuel., Cerdá, Víctor., *Exploiting automatic on-line renewable molecularly imprinted solid-phase extraction in lab-on-valve format as front end to liquid chromatography: application to the*

- determination of riboflavin in foodstuffs. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2010. **397**(1): p. 77-86.
44. Quintana, J.B., Boonjob, Warunya., Miró, Manuel and Víctor, Cerdá., *Online Coupling of Bead Injection Lab-On-Valve Analysis to Gas Chromatography: Application to the Determination of Trace Levels of Polychlorinated Biphenyls in Solid Waste Leachates*. *Anal. Chem.* 2009, **81**, 4822–4830.
 45. Long, G.L., Winefordne, J. D. R., *Limit of Detection A Closer Look at the IUPAC Definition*. *Analytical Chemistry*, 1983. **55**(7): p. 712-724.
 46. Cesio, V., Pareja, Lucía., Niell, Silvina., Asteggiante, Lucia Geis., Bocking, Bernardo., García, Claudio., Fernández, Grisel., Fernández-Alba, Amadeo R., and Heinzen, Horacio., *6 Critical Revision and Development Perspectives of Herbicide Residues Analysis in Agro Ecosystems*. p. 126-156.
 47. Kuang, H., Wang, Libing., and Xu, Chuanlai., *13 Overview of Analytical Techniques for Herbicides in Food*. *Jiangnan University China*. 2011. p. 239-281.
 48. Xiong, G., Tang, Baoying., He, Xiaoqing., Zhao, Mingqiao., Zhang, Ziping., Zhang, Zhanxia., *Comparison of microwave-assisted extraction of triazines from soils using water and organic solvents*. *Talanta*, 1999(48): p. 333-339.
 49. Miró, M. and E.H. Hansen, *Recent advances and future prospects of mesofluidic Lab-on-a-Valve platforms in analytical sciences – A critical review*. *Analytica Chimica Acta*, 2012. **750**: p. 3-15.
 50. L.M. Medina, J.M., A.S, Bermúdez, *Obtención de almidón bajo en proteínas a partir de maíz desgerminado*. *Revista Colombiana de Química*, 1990. **19**(2): p. 7-14.
 51. Conrado, N.R., *Desarrollos Metodológicos en Cromatografía Líquida Capilar y Quiral: Aplicación a la determinación de herbicidas fenoxiácido en muestras complejas*. Universidad Complutense de Madrid, 2005.
 52. Raina, R., *Chemical Analysis of Pesticides Using GC/MS, GC/MS/MS, and LC/MS/MS*. 2011.
 53. Raepfel, C., Nief, Marie., Fabritius, Marie., Racault, Lucie., Appenzeller, Brice M., Millet, Maurice., *Simultaneous analysis of pesticides from different chemical classes by using a derivatisation step and gas chromatography–mass spectrometry*. *Journal of Chromatography A*, 2011. **1218**(44): p. 8123-8129.
 54. *GC Derivatization Reagents*. 2008. www.registech.com/gc.
 55. [sigma-aldrich.com/derivatization](http://www.sigmaaldrich.com/derivatization). *Derivatization Reagents For Selective Response and Detection in Complex Matrices*. Recuperado 9 de abril de 2015 a 3:00pm, de <http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/migrationresource4/Derivatization%20Rgts%20brochure.pdf>.
 56. Karl Blau, J.M.H., *Handbook of Derivatives for Chromatography, 2nd Edition*. Editorial Wiley Interscience 1993.
 57. Rodríguez Pereiro, I., González Irimia, R., Cano, E. Rubí., Cella Torrijos, R., *Optimisation of a gas chromatographic–mass spectrometric method for the determination of phenoxy acid herbicides in water samples as silyl derivatives*. *Analytica Chimica Acta*, 2004. **524**(1-2): p. 249-256.
 58. *Simplified Solid Phase Extraction Solutions. Keep it Clean with Strata-X*. Recuperado el 13 de abril 2015 4:07pm, de http://phx.phenomenex.com/lib/br75930712_w.pdf.
 59. Waters, t.s.o.w.s.p. *Oasis HLB Cartridges and 96-Well Plates*. Recuperado el 10 de abril de 2015 10:00am, de <http://www.waters.com/webassets/cms/support/docs/715000109.pdf>.

60. Caldas, S.S., Demoliner, Adriana., and Primel, Ednei G., *Validation of a Method using Solid Phase Extraction and Liquid Chromatography for the Determination of Pesticide Residues in Groundwaters*. J. Braz. Chem. Soc., 2009. **Vol. 20**(No. 1): p. 125-132.
61. Cunha, S.C., Fernandes, J. O., *Multipesticide residue analysis in maize combining acetonitrile-based extraction with dispersive liquid–liquid microextraction followed by gas chromatography–mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 2011. **1218**(43): p. 7748-7757.
62. Woo, K.-L., Kim, Jae-I., *New hydrolysis method for extremely small amount of lipids and capillary gas chromatographic analysis as N(O)-tert.-butyldimethylsilyl fatty acid derivatives compared with methyl ester derivatives*. Journal of Chromatography A, 1999(862): p. 199–208.

APÉNDICE 1

En este apartado se describe el trabajo que se desarrolló en colaboración con la Universidad de las Islas Baleares para la determinación de los herbicidas 2,4-D y atrazina en grano de maíz por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas, utilizando el sistema Lab-On-Valve (LOV) para realizar el tratamiento de muestra. En este caso la espectrometría de masas permite confirmar la presencia de los herbicidas estudiados, gracias a su identificación inequívoca a través del patrón de fraccionamiento de la molécula, contenido en el espectro de masas.

I. Introducción

El desarrollo de metodologías sensibles para la determinación de herbicidas en muestras de maíz, requiere de un pre tratamiento de la muestra para llevar a cabo su extracción y separación facilitando su determinación.

La cromatografía de gases (siglas en inglés GC) constituye en la actualidad una técnica versátil, muy sensible, selectiva y adecuada para el análisis de residuos de herbicidas en una amplia variedad de muestras medioambientales, debido a su elevado poder de resolución y número de detectores disponibles, utiliza como fase móvil gases inertes, lo que permite disminuir la contaminación ambiental. En la

actualidad, la espectrometría de masas se considera la técnica de detección más sensible y selectiva ya que proporciona información estructural, mediante la identificación de los compuestos a través de su patrón de fragmentación en el espectro de masas[51].

Dependiendo de su naturaleza química existen compuestos que pueden ser analizados directamente como la atrazina, o en cambio cuando los herbicidas son más polares como los phenoxiacidos y carbamatos requieren ser derivatizados. para hacerlos compatibles con GC en la cual se requiere que los compuestos sean volátiles o susceptibles a ser volatilizados[52].

Tal es el caso del herbicida 2,4-D su determinación mediante GC es un procedimiento complejo, puesto que su naturaleza polar hace que se adsorban a la fase estacionaria, ya que posee un enlace de hidrógeno del grupo carboxílico que impide su rápida volatilización. Por otro lado, su baja estabilidad térmica aumenta el riesgo de degradación a otros productos, dando origen a picos asimétricos e irreproducibles.

En las reacciones de derivatización, se reemplazan los hidrógenos ácidos por grupos no polares antes del análisis cromatográfico, mediante reacciones de sililación, alquilación y esterificación, formándose como derivados más comunes los trimetilsililéteres, metiléteres y metilésteres[51].

Uno de los reactivos frecuentemente utilizados para la derivatización de dicho herbicida es diazometano, sin embargo es toxico, y cancerígeno. Por esta razón,

otros reactivos como el trifluoruro de boro en metanol, cloroformato, trimetilsilildiazometano, MtBSTFA (N(t-butildimetilsilil)-N-metiltrifluoroacetamida) y BSTFA (N, O bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida) han sido reportados en la derivatización y determinación de este herbicida[47, 53].

En el caso del MtBSTFA y BSTFA, la reacción que ocurre consiste en una sililación, es decir en la sustitución de algún átomo de hidrógeno activo del analito por un grupo trialquilsilil (Figura A1), reduciendo de esta manera las interacciones moleculares de puente de hidrógeno y aumentando la volatilidad[54, 55].

En cuanto al mecanismo de reacción (Figura A1a) este ocurre con el desplazamiento de un protón activo en un grupo OH, NH y SH, y la posterior entrada de una molécula alquilsilil ($\text{Si}-(\text{R})_3$), en donde R generalmente es un grupo metilo para dar origen a los derivados trimetilsilados[56].

La reacción procede como un ataque nucleofílico $\text{S}_\text{N}2$ desde el heteroátomo más electronegativo al átomo de silicio del agente derivatizante, produciendo un estado de transición bimolecular (Figura 1Ab). El grupo saliente debe poseer mayor basicidad que el grupo atacante y una alta capacidad de estabilizar la carga negativa en el estado de transición a fin que la reacción pueda completarse, ya que es reversible[56].

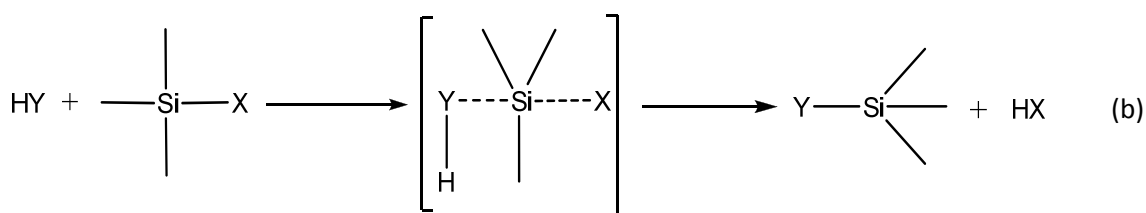


Figura A1. Esquema de la reacción de sililación (a) y (b) estado de transición de esta.

Como se expuso anteriormente en este manuscrito, numerosos métodos han sido publicados para cuantificar una amplia variedad de triazinas en diferentes matrices[21, 38]. Usualmente, los compuestos son extraídos por agitación mecánica y/o homogenización con solventes orgánicos. Posteriormente los extractos se pasan a columnas de SPE (silica, alúmina, florisil) utilizando para ello una amplia variedad de disolventes dependiendo de las propiedades fisicoquímicas de las triazinas como son: acetona, etanol, cloroformo, metanol, agua[47].

Teniendo en cuenta lo anterior y en vista del potencial que presenta la cromatografía de gases como técnica selectiva y sensible, en este trabajo se desarrolló un método alternativo para la determinación de los herbicidas 2,4-D y

atrazina en grano de maíz, utilizando el sistema Lab-On-Valve (LOV) acoplado GC-MS.

Para desarrollar esta procedimiento de preconcentración automática, separación y determinación de los herbicidas se plantearon los siguientes objetivos

Como objetivo general se planteó: Desarrollar una metodología para la determinación de atrazina y 2,4 D utilizando cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas y un sistema LOV para realizar el tratamiento de la muestra.

Entre los objetivos específicos se encuentran los siguientes:

- Establecer las condiciones de extracción en fase sólida de los analitos en el sistema LOV.
- Estudiar las condiciones de derivatización a fin de obtener el mayor rendimiento y por consiguiente la máxima sensibilidad.
- Aplicar las mejores condiciones de extracción y derivatización en el análisis de muestras de maíz en el sistema LOV/GC-MS.

1.2 Materiales y equipos

1.2.1 Reactivos

- Atrazina 98.8%, Fluka Analytical.

- Acido 2,4-diclorofenoxiacetico 98%, Spectrum.
- Metanol 99.7%, Scharlau grado HPLC.
- Acetonitrilo 99.9% grado HPLC Lichrosolv
- Sulfato de cobre II, reactivo analítico Probus. S. A.
- MtBSTFA(N (t-butyldimethylsilyl)-N-metiltrifluoroacetamida), 97%, Aldrich Chemistry
- BSTFA (N,O bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida) Supelco Solutions within
- MSTFA (N-Metil-N-trimetilsililtrifluoroacetamida) Sigma Aldrich
- Strata X Fase Reversa, Phenomenex.
- Oasis HLB, Waters.

1.2.2 Equipo

- Balanza Sartorius.
- Medidor de pH microPH 2002.
- Centrifuga CENCOM II.
- Vortex Heldoph REAX 2000.
- Cromatógrafo de gases masas, Varian Saturn 2100T.
- Columna capilar DB5 (methyl 5% phenyl polysiloxane 30m × 0.25mm i.d. × 0.25µm) Agilent.
- Sistema Lab-On-Valve de Sciware.
- Software Autoanalysis v5.0 de Sciware.
- PC para el control, almacenamiento y procesamiento de datos.

- Multi-Burette 4S de Crison.

1.3 Metodología experimental

1.3.1 Preparación de soluciones

Se preparó una solución patrón de 1000 mg/L de los herbicidas atrazina y 2,4-D para lo cual se pesó 0.01 g aforando a 10 mL con CH₃CN respectivamente.

Se preparó una solución de trabajo de 10 y 1.0 mg/L de atrazina y 2,4-D en CH₃CN para obtener los iones característicos de esta molécula.

Todas las soluciones fueron almacenadas bajo refrigeración a 4°C hasta el momento de su análisis.

Con respecto al pretratamiento de la muestra de maíz se siguió el procedimiento que se menciona en el (apartado 4.2.3) fortificado a una concentración de 0.5 mg/L.

1.3.2 Derivatización

Como se mencionó anteriormente, el 2,4-D, es un herbicida polar y por lo tanto no puede ser inyectado directamente en el GC-MS, requiriendo de una derivatización

como parte del tratamiento de muestra. En este sentido, se estudiaron algunos reactivos sililantes tales como BSTFA, MSTFA y M~~t~~BSTFA, con el fin de mejorar la volatilidad del analito. Las reacciones de sililación presentan beneficios importantes que permiten su posterior automatización, entre ellas una cinética rápida y el uso de reactivos poco agresivos. Además los productos de reacción poseen patrones de fragmentación específicos en el espectrómetro de masas, lo cual favorece su identificación[53, 57].

Para la realización de este estudio, se preparó una solución estándar de 10 mg/L, utilizando esta concentración para realizar los ensayos preliminares con los diferentes agentes derivatizantes y evaluar su efecto en la derivatización. Una vez elegido el reactivo derivatizante, se estudiaron tres formas de realizar la reacción, a saber: temperatura ambiente durante 15 min, calentamiento a 100°C en 30 min y finalmente baño de ultrasonidos por 5 min a temperatura ambiente, agregando a los diferentes viales 100 µL del 2,4-D y 100 µL de cada reactivo derivatizante y se agitó suavemente.

Se preparó una mix de 2,4-D y atrazina que correspondía a una concentración de 1 mg/L en CH₃CN.

1.3.3 Extracción mediante ultrasonido (EUA)

Para optimizar la extracción asistida por ultrasonidos (siglas en inglés EUA), se realizó la extracción tanto con microondas y como por ultrasonido con la finalidad

de evaluar si existe diferencia significativa entre el modo de extracción de los analitos en las muestras de maíz. Las ondas ultrasónicas se han utilizado para acelerar la extracción de compuestos orgánicos a partir de matrices complejas, donde las burbujas producidas por la cavitación acústica promueven la penetración de disolvente facilitando la liberación de los analitos y proporcionando un contacto más eficiente entre la muestra sólida y los disolventes de extracción.

Para realizar dicho estudio se utilizó la condición óptima de extracción obtenida por MAE ver apartado 5.3, (Figura 20) modificando el tiempo de extracción.

El baño de ultrasonido se llenó con agua desionizada, y se colocó la muestra en tubos de 25 mL con una relación de MEOH:H₂O que también fue evaluada posteriormente, estableciendo un tiempo de extracción de 15 min. Para cada extracción se realizaron tres réplicas. A los extractos obtenidos se les agregó CUSO₄, se centrifugó y filtró con (nylon de 0.45 µm. de diámetro), colectándose en tubos falcón de 25 mL, posteriormente fueron evaporados por corriente de nitrógeno a sequedad y se reconstituyeron en CH₃CN, a fin de facilitar su inyección dentro del sistema. Finalmente se mezcló con 0.1 mL de reactivo derivatizante y 0.1 mL de extracto redissuelto y se colocó en el automuestreador del GC-MS.

1.3.4 Preconcentración: Lab On Valve y extracción en fase sólida

Para la realización de la etapa de preconcentración se usó un módulo multijeringa (Multi-bureta 4S Crison) una jeringa de 10 mL y una válvula de selección Lab On Valve (LOV) que contiene 8 posiciones de los cuales, las posiciones 8 y 5 se usaron para la carga de fase sólida y retención de esta, respectivamente con un diámetro interno de 3 mm. Dicha válvula se conectó a un bucle de 3 mL con un diámetro interno de 1.5 mm, conectado a un puerto central. En la posición 7 se cargó la fase de acondicionamiento MeOH:H₂O (80:20 v/v), la carga de muestra en el puerto 6 y en el canal 1 CH₃CN como eluyente. En la Figura A2 se muestra el sistema implementado para la preconcentración de los herbicidas, así como en la Tabla A1 y A2 se muestran los procedimientos utilizando el software Autoanalysis v5.0 para la carga de la fase sólida y preconcentración respectivamente, en el anexo C se tiene una información detallada de estos procedimientos.

Tabla A1. Procedimiento de carga de fase sólida.

Etapas	Operación	V2	VS	Descripción
1	Aspirar 1 mL a 0.70 mL/min	on	8	Carga de fase sólida, humedecida en MeOH:H ₂ O (80:20v/v)
2	Dispensar 1 mL a 1 mL/min	on	5	Se vacía la fase sólida

Tabla A2 Procedimiento de preconcentración en el sistema LOV.

Etapas	Operación	V2	VS	Descripción
1	Wait Condicional (si o no)	off	off	E sta variable se uso para si requiere acondicionar la fase sólida si o no
2	Condicional			Inicia etapa de acondicionamiento
3	Aspirar 3 mL a 10 mL/min	off	1	Se carga agua a la jeringa del reservorio
4	Aspirar 1 mL a 1 mL/min	on	7	Carga de metanol :agua (80':20 v/v)
5	Dispensar 2 mL a 0.573 mL/min	off	5	Se dispensa el reactivo cargado y agua a la fase sólida para su activación
6	Condicional			Termina acondicionamiento
7	Aspira 1 ml a 1 mL /min	on	6	Carga de muestra
8	Dispensar 1 mL a 0.573 mL/min	off	5	Se dispensa a la fase sólida para su preconcentración
9	Aspirar 0.5 mL a 1 mL/min	on	1	Etapa de elución, se aspira acetonitrilo para eluir los analitos
10	Dispensar 0.5 mL a 0.573 mL/min	on	5	Se espera unos segundos y se colecta el eluido
11	Aspira 1 mL a 1 mL/min	on	1	Etapa de limpieza
12	Dispensar 1 mL a 0.573 mL/min	on	5	Se dispensa a la fase sólida
13	Aspira 1 mL a 1 mL/min	off	5	Se aspira agua del reservorio
14	Dispensar 1 mL a 0.573 mL/min	on	5	Se dispensa a la fase sólida
15	Dispensar a 10 mL/min	off		Se vacía la jeringa al reservorio listo para continuar el paso 1

Nota: V2: Válvula solenoide VS: Posición de válvula de selección, los valores indicados de caudal y volumen se refieren a la jeringa J2, OFF (válvula desconectada) y ON (válvula activa).

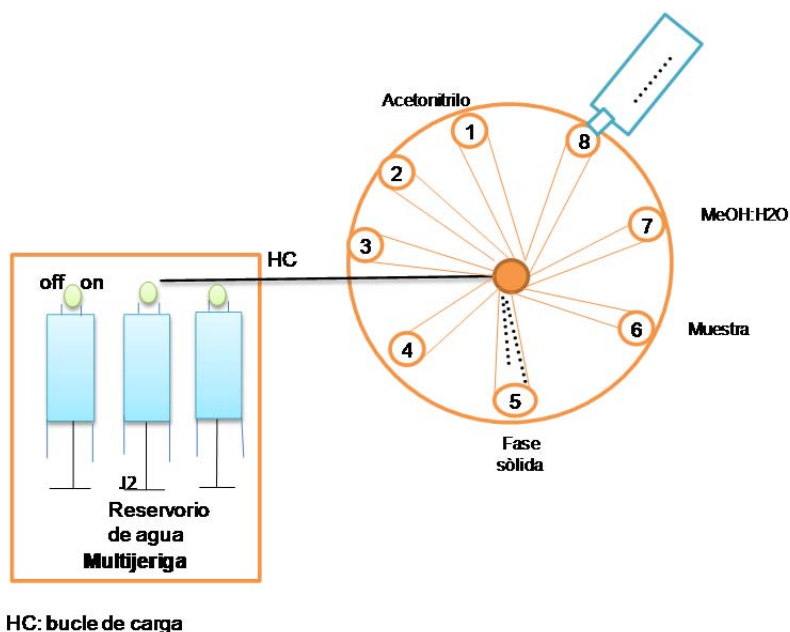


Figura A2. Sistema LOV para la preconcentración de los herbicidas en el grano de maíz.

En este trabajo se evaluaron dos fases sólidas una strata-X y la Oasis HLB para la retención de los herbicidas. La strata-X es un absorbente de fase reversa que retiene a los analitos por interacción hidrofóbica. Además tiene capacidades de enlace de H y π - π que mejoran la retención de los analitos polares y aromáticos[58] y con un tamaño de partícula de 33 μ m. Por otra parte la Oasis HLB también es fase inversa y extrae compuestos ácidos, neutros y básicos gracias a las relaciones específicas de dos monómeros el hidrofílico N-vinilpirrolidona y el lipofílico divinilbenzeno. El tamaño de partícula utilizado fue de 60 μ m[59]. Estos sorbentes poseen las características que menciona Ruzicka[10] que deben ser esféricos y un tamaño de partícula de 20 a 150 μ m para que su manipulación dentro de la válvula y que sea reproducible[10, 40].

Se preparó una mezcla 0.5 mg/L de los herbicidas en fase acuosa para su preconcentración en LOV. También se fijó un carga fase sólida 30 mg y se colectaron diferentes fracciones del eluato para determinar el volumen necesario de eluyente para desorber los analitos de fase sólida (Tabla A1 y A2). Subsecuentemente a 0.1 mL extracto obtenido se le adicionó 0.1 mL del reactivo derivatizante y se inyectó en el cromatógrafo de gases.

1.3.5 Estudio del pH en la preconcentración de herbicidas

De acuerdo los estudios reportados en la literatura, es necesario ajustar el pH de una solución para que se favorezca la retención de los analitos en una determinada fase sólida modificando la forma química de los analitos[60].

En este sentido, se evaluaron diferentes pH 3, 4 y 5 con la finalidad de estudiar su influencia en la recuperación de los analitos. Para ello, se preparó una disolución de 2 mg/L que contenía a los dos herbicidas ajustando el pH de agua a 3, 4 y 5 con HCl, estos fueron aforados a un volumen de 20 mL. Los experimentos fueron realizados por triplicado.

1.3.6 Efecto de relación de metanol en la extracción en fase sólida

Este estudio se realizó, para evaluar diferentes relaciones del disolvente MeOH:H₂O y observar la influencia que posee el MeOH en la preconcentración de

los analitos usando la Oasis HLB. Las relaciones de MeOH:H₂O fueron 30:70, 20:80, 10:90 y 5:95 v/v ajustando el agua a pH 4 con HCl, trabajando con el mix de 2 mg/L de los herbicidas en estudio.

1.3.7 Instrumentación y análisis

Para el análisis de los herbicidas se usó el cromatógrafo de GC-MS Saturn2100T, el inyector fue conectado a una columna capilar DB-5 (95% polidimetilsiloxano y 5% Fenil), el gas de arrastre fue Helio a 1 mL/min, el puerto de inyección fue operado en modo splitless, con una temperatura de inyección de 250 °C y un volumen de 1 µL.

La temperatura programada en el horno fue inicialmente con 70 °C (se mantuvo por 1 min) a 15 °C/min a 250 °C manteniéndose por 1 min

El espectro de los herbicidas fue obtenido por ionización por impacto de electrones, realizando un monitoreo de ion selectivo (SIM) para cada analito, empleando aquellos iones con mayor abundancia en sus respectivos espectros de masa. Se obtuvieron los iones característicos para la atrazina 215, 200 y 173 y iones secundarios de 122 y 138 m/z utilizando una concentración de 10 mg/L[61].

1.4 Resultados

1.4.1 Derivatización

En la Tabla A3 se muestran las áreas del pico cromatográfico obtenidas al reaccionar el 2,4-D con los diferentes agentes derivatizantes utilizando una concentración de 10 mg/L.

Tabla A3. Efecto de diferentes condiciones de reacción con el agente derivatizante MtBSTFA.

Derivatizantes	BSTFA		MSTFA		MtBSTFA	
	t _R	área	t _R	área	t _R	área
T. Ambiente 10 min	10.5	68122	10.59	79249	12.27	56319
Estufa a 100 °C 30 min	10.6	93788	10.59	92390	12.27	57357
Ultrasonido 5 min	10.6	107567	10.6	95871	12.27	55261

Se utilizó un método de monitoreo de ion selectivo para evaluar a los analitos. Los iones evaluados fueron los siguientes 291, 256, 233, 200 y 73 y con el BSTFA son 291, 256, 233 y 73 y con MtBSTFA 277, 279 m/z.

Como se aprecia en la Tabla A3 con el reactivo BSTFA y MSTFA se tiene un área mayor utilizando la derivatización asistida con US y con el M β BSTFA, no se ve afectado por los tres factores estudiados. Sin embargo para automatizar es mejor una reacción a temperatura ambiente debido se puede hacer más fácil el montaje del sistema, además de que cuando se utilizan los dos primeros agentes derivatizantes se tiene un tiempo de retención del 2,4-D de 10.6 mismo que se obtiene con la atrazina sin derivatizar, es por ello que se selecciona el M β BSTFA debido a que con este se obtiene una separación de los herbicidas, asimismo se reporta que los derivados de ácidos carboxílicos son más estables, posee estabilidad térmica e hidrolítica dando mayor estabilidad a los derivados, además se tienen fragmentos específicos en el espectrómetro de masas (Figura A3)[47, 57, 62]. Por este motivo se decide utilizar el M β BSTFA a temperatura ambiente por 10 min para futuras pruebas.

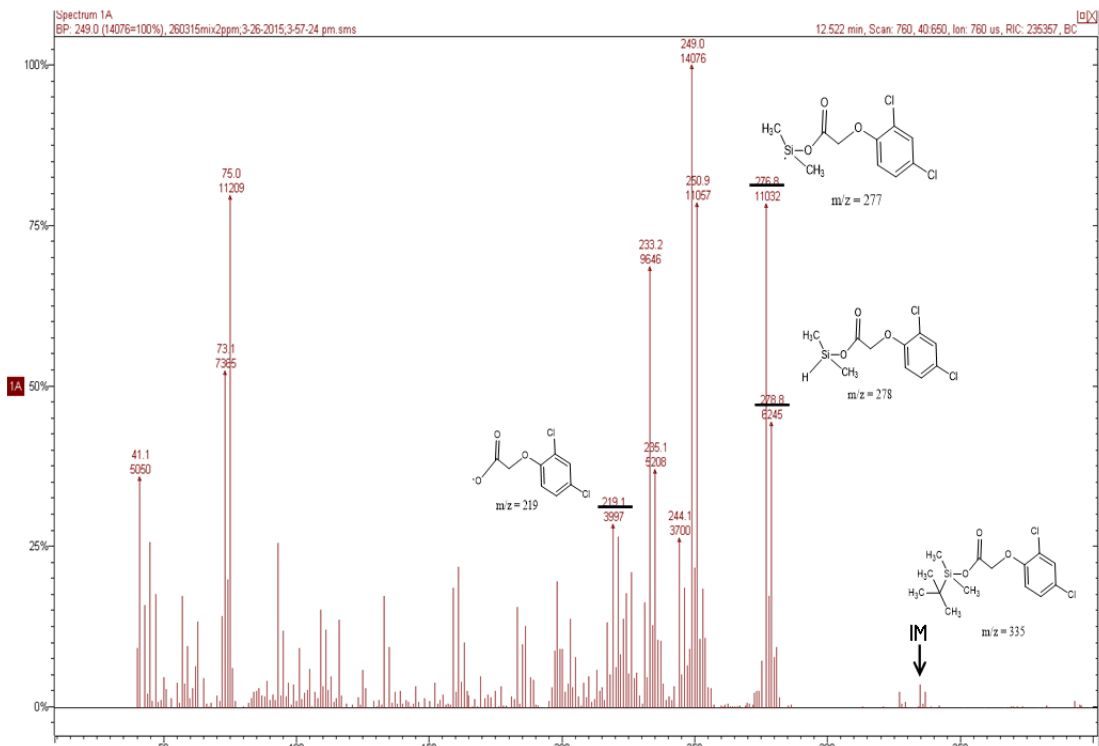


Figura A3. Espectro de masas del 2,4-D, derivatizado con MtbSTFA y sus fragmentos característicos.

Por otra parte se evaluó diferentes proporciones del 2,4-D:MtbSTFA 1:1,1:2,1:3, 1:4 y 1:5 respectivamente, para determinar la cantidad de reactivo necesario para alcanzar una completa reacción de derivatización, dejando la reacción a temperatura ambiente por 10 min monitoreando los iones de cada uno, atrazina: m/z 173, 200, 215 y para 2,4-D:m/z 277 y 279, estos compuestos se llevaron a una concentración final de 1 mg/L (Tabla A4).

Tabla A4. Variación de diferentes relaciones de reactivo derivatizante.

Proporciones 2,4D:MtBSTFA	2,4-D	
	t _R	área
1:1	12.28	17652
1:2	12.28	20047
1:3	12.28	20949
1:4	12.27	20339
1:5	12.27	17000

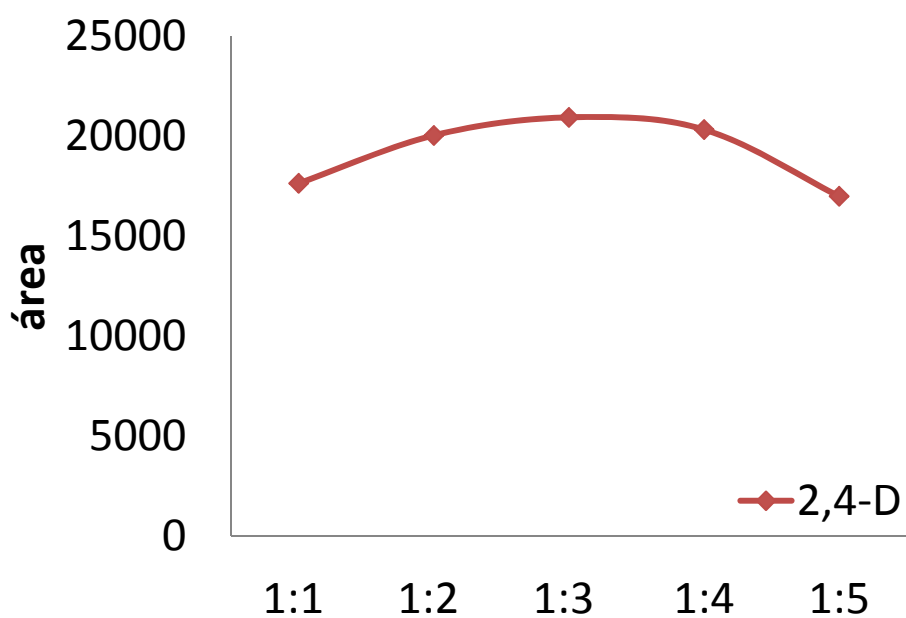


Figura A4. Variación de volumen de reactivo derivatizante con el analito 2,4-D de 1 mg/L.

Como se observa (Figura A4) no existe una diferencia de acuerdo a las áreas obtenidas del 2,4-D con el empleo de una mayor o menor volumen de reactivo derivatizante, esto se debe a la cinética rápida de la reacción que permite utilizar poco volumen de reactivo para que la reacción se complete y conforme se aumenta dicho reactivo las áreas no cambian ya que esta en exceso.

Por otra parte se evaluó la reactividad variando el tiempo de reacción mix: MtBSTFA con una relación 1:1, los tiempos fueron 1, 2, 3, 5 y 10 min obteniendo los siguientes resultados (Tabla A5 y Figura A5).

Tabla A5. Variación de tiempo de reacción con una concentración final 1 mg/L de los herbicidas.

Tiempo (min)	2,4-D	
	t_R	área
1	12.27	20239
2	12.29	18516
3	12.29	19146
5	12.29	18594
10	12.29	17799

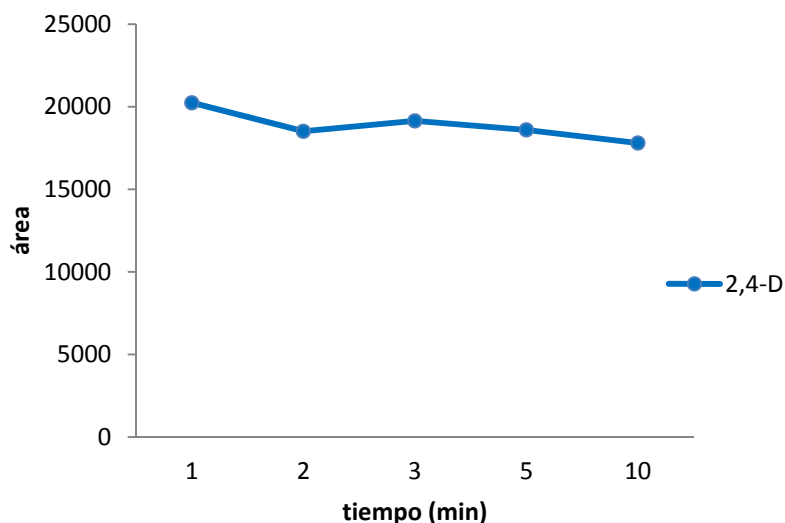


Figura A5. Efecto del tiempo en la reacción de derivatización.

Como se observa en la Figura A5, la derivatización se lleva a cabo a partir de un minuto, por lo tanto se fijó este tiempo de reacción para posteriores experimentos.

Finalmente debido a que el reactivo sililante es muy volátil, requiere mezclarse con otro disolvente que inhiba su rápida volatilización y así poderlo emplear fácilmente al automatizar el tratamiento de la muestra. Para optimizar dicho volumen de disolvente se estudiaron diferentes relaciones, utilizando CH_3CN como disolvente orgánico para tal fin, ya que no contiene átomos de hidrógeno activos, que pudiesen interferir posteriormente en la etapa de sililación, en la Figura A6 no se observa ningún efecto significativo que disminuya su reactividad, de tal manera que se elige la proporción MtBSTFA: CH_3CN 1:3 v/v para los futuros experimentos.

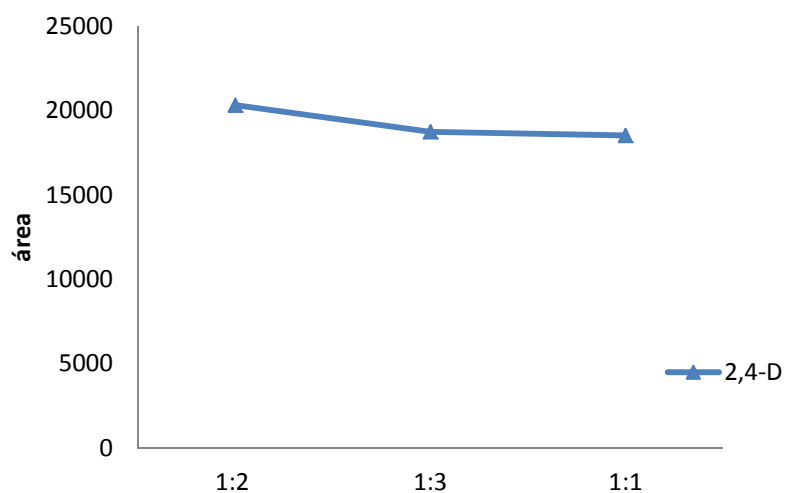


Figura A6. Diferentes relaciones de CH₃CN con el reactivo MtBSTFA.

Los resultados óptimos se lograron con una relación 1:3 de reactivo derivatizante: medio de reacción CH₃CN y un tiempo de 1 min para la reacción de derivatización a temperatura ambiente.

En la Figura A7 se muestran las curvas de calibración para los dos herbicidas en un rango de trabajo de 0.025-1 mg/L, obteniendo un coeficiente de correlación (r) 0.994 2,4-D y atrazina 0.999.

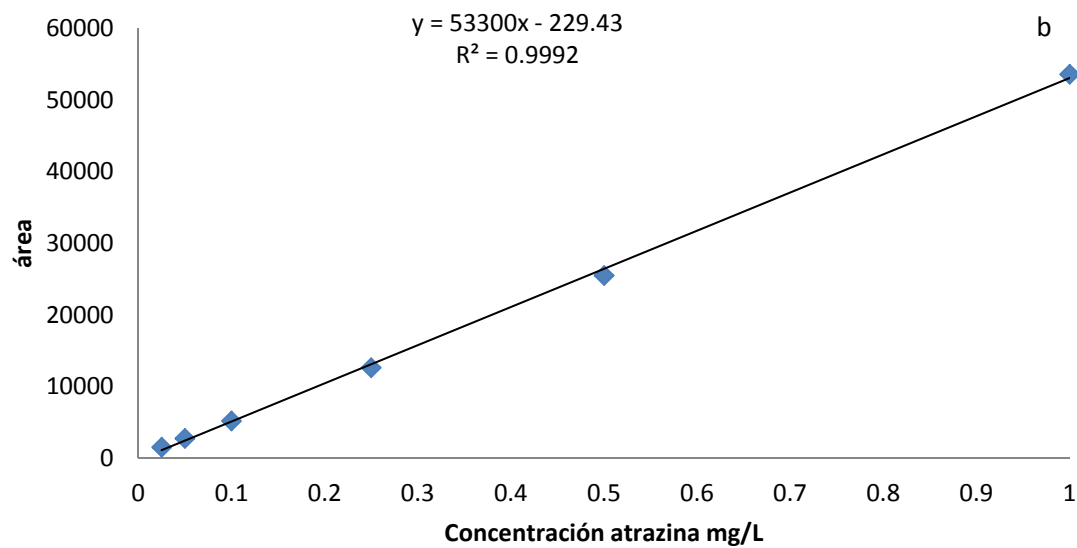
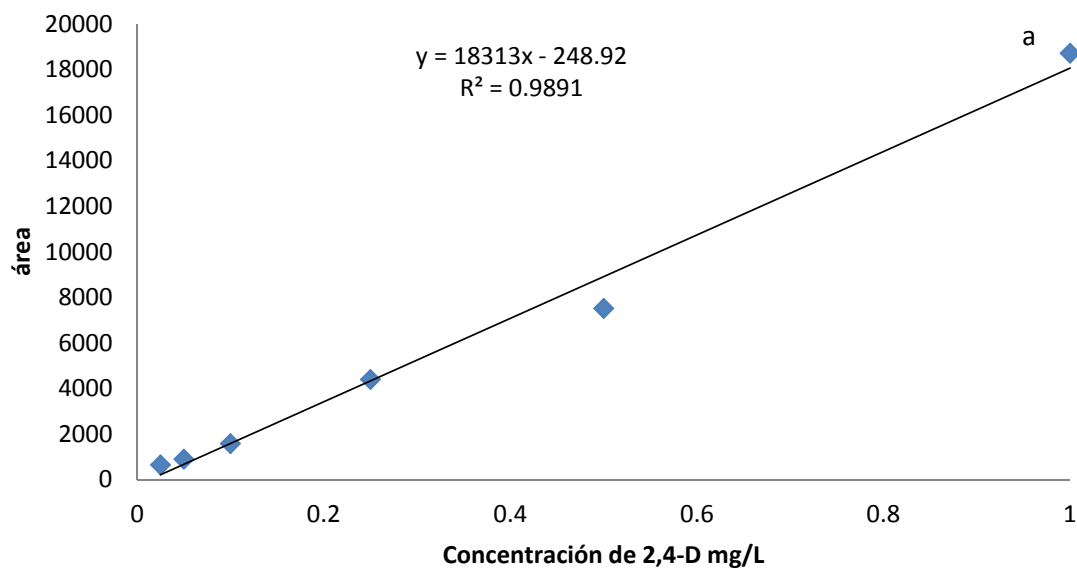


Figura A7. Curva de calibrado de los herbicidas de 0.025-1 mg/L, a 2,4-D y b atrazina.

1.4.2 Extracción por Ultrasonido

Tabla A6. Comparación de la EUA y MAE.

	atrazina		2,4-D	
	t _R	área	t _R	área
Ultrasonidos	10.67	34258	12.27	12319
MAE	10.66	38923	12.26	13582

Los resultados obtenidos para la extracción de los herbicidas en maíz, utilizando una muestra fortificada de 0.5 mg/L se presentan en la Tabla A6 utilizando tanto MAE y EUA. Se observó que no existen diferencias significativas en las áreas cuando se utilizan estas dos técnicas, de tal modo que se elige la EUA para hacer los experimentos debido a que esta es más económica, sencilla y disponible en laboratorios de análisis de rutina comparada con MAE, estableciendo como condición para la extracción una cantidad de muestra de 0.5 g maíz, con una relación de MeOH:H₂O (30:70 v/v) en tiempo de 15 min.

1.4.3 Preconcentración

Se realizaron pruebas preliminares para la preconcentración de los herbicidas en estudio, utilizando la fase sólida strata-X y la Oasis HLB para evaluar su capacidad de retención de los analitos.

Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla A7, utilizando un mix de estándares de 0.5 mg/L, preconcentrando 3 mL de muestra. En esta prueba se colectaron dos fracciones de eluido de 0.5 mL y una fracción completa de 1 mL, utilizando CH₃CN como agente extractante. Como se puede observar, los analitos se eluyen en la primera fracción, concluyendo que 0.5 mL de CH₃CN es suficiente para eluir a los analitos. Además no se observó una diferencia en el área entre las fases utilizadas debido a que estos dos sorbentes pueden retener a analitos polares como apolares[40, 59]. Sin embargo se observa una baja recuperación del 2,4 D probablemente debida al volumen muerto de la columna, que contribuye a la presencia de trazas de agua en el extracto, favoreciendo la hidrólisis del MtBSTFA e inhibiendo la reacción. En este sentido, se evaporó a sequedad el eluato preconcentrado, con una corriente de nitrógeno y se reconstituyó en 0.5 mL de CH₃CN (Figura A8) observándose un ligero aumento en el área.

Tabla A7. Efecto en la preconcentración de los herbicidas con el uso de los sorbentes strata-X y Oasis HLB.

Fase sólida	mL	atrazina		2,4-D	
		t _R	área	t _R	área
strata-X	0.5	10.655	15399	12.253	2578
	0.5	-----	-----	-----	-----
	1	10.659	9831	12.263	2961
Oasis HLB	0.5	10.664	19763	12.267	4882
	0.5	-----	-----	-----	-----
	1	10.654	14008	12.255	1701

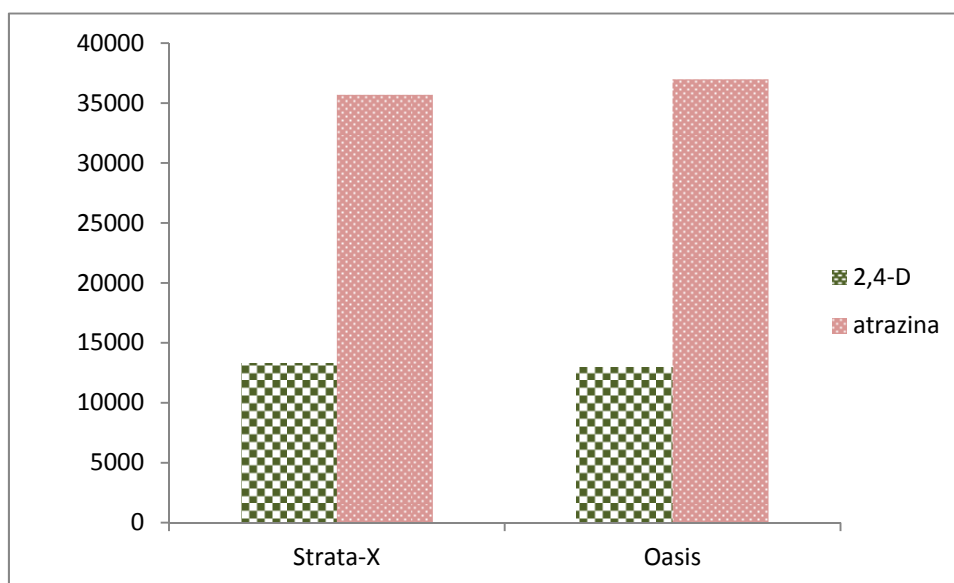


Figura A8. Preconcentración de los herbicidas 3 mL, 0.5 mg/L, evaporados con corriente de nitrógeno.

Por lo tanto se considera para los estudios siguientes utilizar la Oasis HLB, 0.5 mL de CH_3CN como eluyente y una carga de fase estacionaria de 15 mg.

Para mejorar la retención del 2,4-D se evaluó el efecto del pH ajustando la disolución a pH 3, 4 y 5. Los resultados se muestran (Figura A9), en este experimento las condiciones experimentales utilizadas fueron 1 mL de muestra y 0.5 mL de CH_3CN como eluyente, agregando Na_2SO_4 para eliminar restos de agua. En este caso se indica que aun pH 3 es más favorable para su preconcentración, sin embargo estas condiciones pueden afectar la vida media de la columna cromatográfica, mientras que a 4 y 5 no se observa una diferencia en el área obtenida. Como compromiso, se decide fijar el pH 4 para futuras pruebas y así prolongar la vida de la columna. Por otra parte el extracto de maíz que se

obtiene por ultrasonido posee un pH 4 por lo que no se requeriría ajustarle el valor del pH del extracto obtenido.

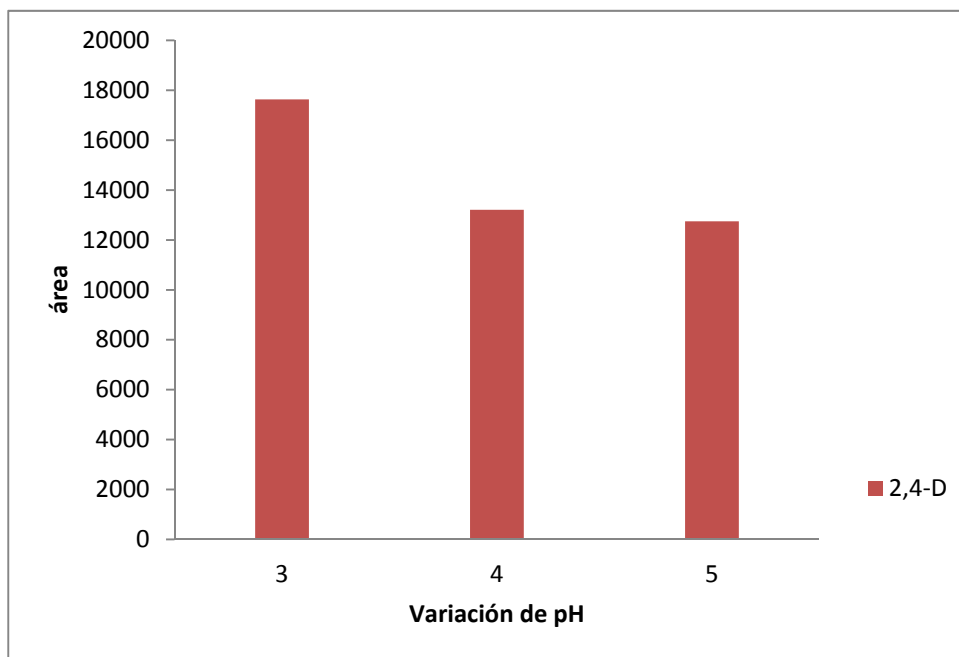


Figura A9. Efecto del pH, 2 mg/L del analito, eluyente 0.5 mL CH₃CN.

Se estudió el máximo factor volumen de preconcentración en la SPE. En este caso, el volumen de carga de muestra se fue incrementando, utilizando un mix de estándares de 2 mg/L en fase acuosa. Las velocidades de carga de muestra y elución de los analitos fueron de 1 y 0.573 mL/min respectivamente, agregando al eluido Na₂SO₄. Los resultados obtenidos para 15 mg de fase sólida se muestran (Figura A10), se observó que en el caso de la atrazina se tiene una máxima retención cuando se carga con 4 mL de muestra y en el caso del 2,4-D con 2 mL. Con la finalidad de establecer una situación de compromiso entre los analitos se tomó como condición máxima de carga de muestra de 2 mL.

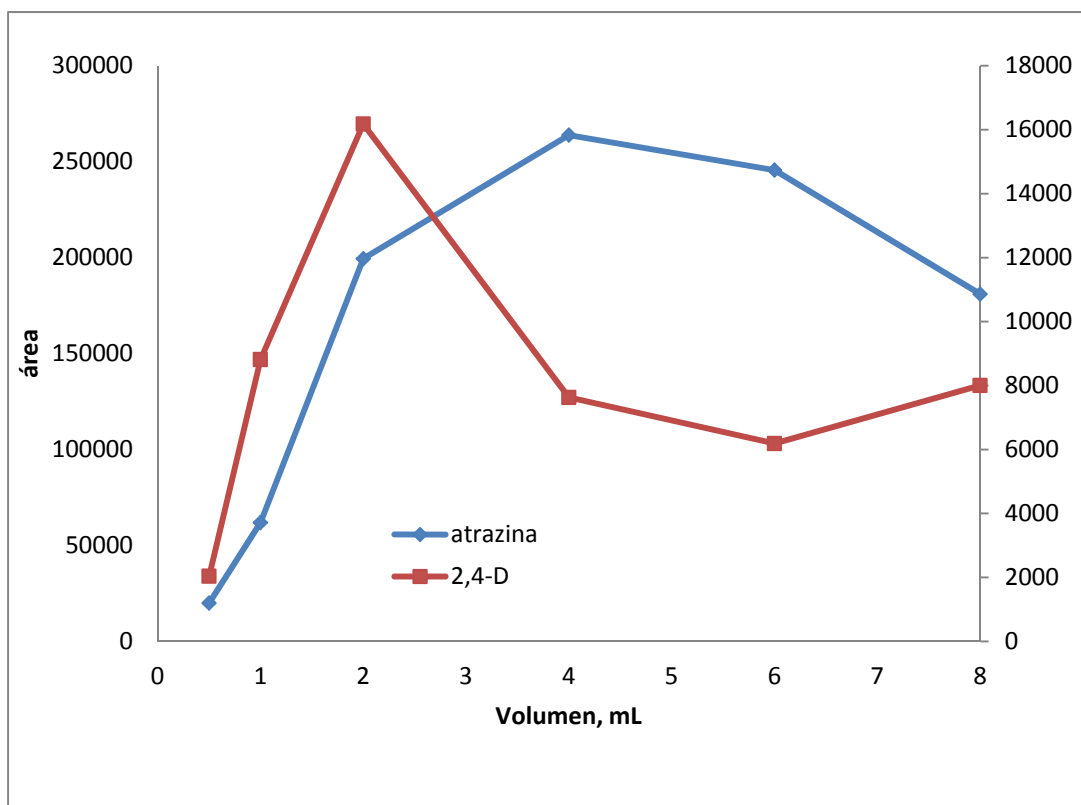


Figura A10. Estudio del volumen de carga de muestra (0.5, 1, 2, 4, 6 y 8 mL), para la preconcentración eluído con 0.5 mL de CH₃CN a 0.573 mL/min.

En la Figura A11 se presentan los resultados del efecto de la relación de MeOH:H₂O a pH 4 utilizando un mix de estándares de 2 mg/L en la preconcentración de los analitos en la Oasis HLB, con la finalidad de evaluar el efecto del disolvente orgánico en la limpieza de la matriz y elución de los analitos. El 2,4-D al ser un analito polar se puede ver afectado por la presencia de pequeñas cantidades de disolvente orgánico en la extracción en fase sólida, influyendo en su elución prematura junto con componentes de la matriz. Por ello el

estudio de este parámetro es crucial para establecer las condiciones óptimas de extracción.

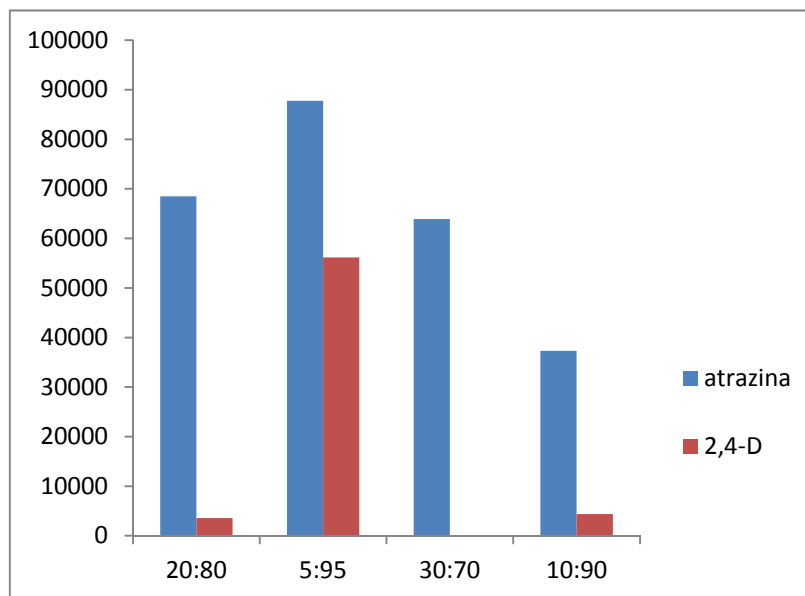


Figura A11. Variación de la relación MeOH:H₂O en la preconcentración de los analitos en mezcla a una concentración de 2 mg/L.

Como se puede observar (Figura A11) existe un efecto en el uso del solvente orgánico en la preconcentración, cuando se tiene una mayor relación de MeOH:H₂O 30:70 v/v el 2,4-D se eluye más rápido que cuando se tiene una relación 5:95 v/v. Esto se debe a que entre menos polar es la solución hay menor interacción con la fase sólida lográndose una menor retención, tomándose la relación de 5:95 v/v para realizar la extracción debido a que se tiene una mayor adsorción de los analitos en el sólido.

En la Figura A12 se muestra el resultado que se obtuvo cuando se realizó la extracción con el maíz fortificado de 0.5 mg/L con relaciones de 5:95 y 30:70

MEOH:H₂O en el que se observa que es mejor realizar la preconcentración utilizando menor cantidad de disolvente orgánico.

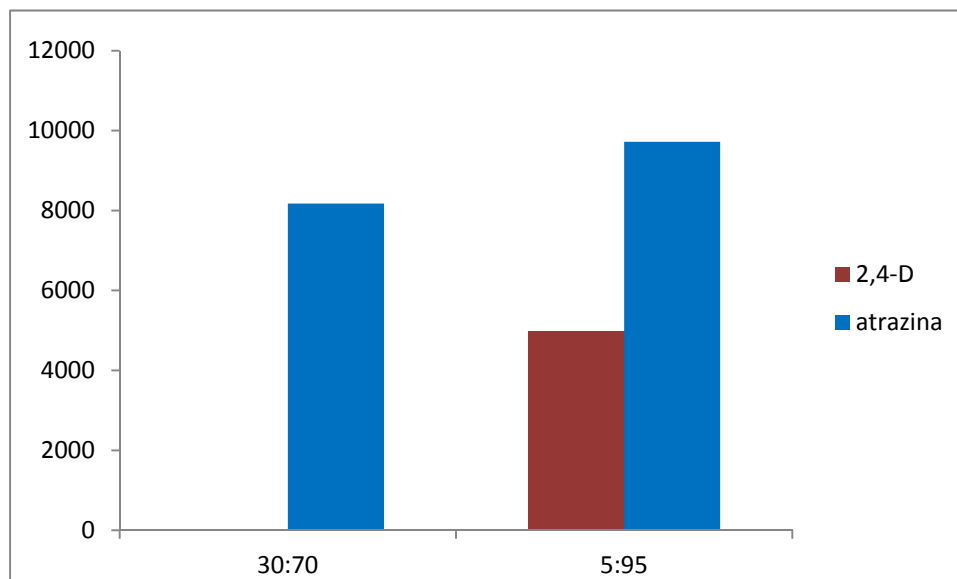


Figura A12. Extracción de maíz por ultrasonidos con una relación MEOH:H₂O 5:95 y 30:70 a pH 4.

Un resumen de las condiciones optimizadas del sistema cromatográfico se muestran en (Tabla A8 y Figura A13) se muestra un cromatograma cuando se trató por el procedimiento descrito la muestra de maíz fortificada 0.5 mg/L en el que se observa una buena resolución de los analitos en estudio. Se obtuvieron porcentajes de recuperación para atrazina del 60 y 114% para 2,4-D, una muestra no fortificada se analizó de igual manera y no se obtuvo presencia de estos analitos <LD.

Tabla A8. Condición final de la extracción-preconcentración off line GC-MS.

Condición de extracción-preconcentración		
Extracción Ultrasonido	0.5 gr maíz, MeOH:H ₂ O 5:95 pH 4, tiempo de extracción 15 min y 0.1 mL CUSO ₄ .	
Preconcentración LOV	Oasis HLB 15 mg, carga de muestra de 2 mL, 0.5 mL de CH ₃ CH, agregando Na ₂ SO ₄ .	
Cromatógrafo de GC-MS	Columna	DB-5 (95% polidimetilsiloxano y 5% Fenil)
	Gas de arrastre	Helio a 1 mL/min
	Temperatura de inyección	250°C
	Volumen de inyección	1 µL, Splitless
	Horno	70°C (1.0 min) a 250°C (1 min) a 15 °C/min
	Espectro de masas	Impacto electrónico (EI), en un rango de 40-650 m/z
	Iones (m/z)	atrazina 173, 200 y 215 2,4-D 277 y 279

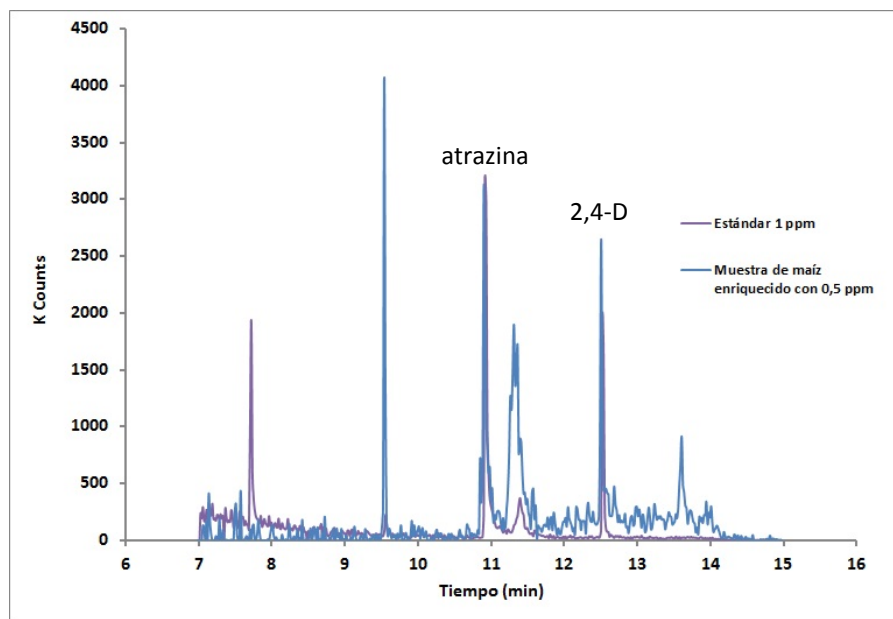


Figura A13. Separación cromatográfica GC-MS de los analitos en estudio.

1.4.4 Conclusiones preliminares

- En el presente trabajo se desarrolló un método sencillo, preciso que permite la determinación de atrazina y 2,4 D en muestras de maíz.
- El procedimiento propuesto que implica el uso de LOV para el tratamiento de muestra en línea demostró ser una excelente alternativa en comparación con aquéllos reportados que consumen tiempo y disminuyen la frecuencia de análisis.
- El uso del reactivo derivatizante M β STFA proporciona productos térmicamente más estables en la reacción con el 2,4-D.

La separación por CG y detección por MS se realizó en 15 min sin la presencia de interferentes.

- La condición de extracción- preconcentración se obtuvo con 0.5 gr de muestra, agente extractante MeOH:H₂O 5:95 v/v, tiempo de 15 min, agregando CuSO₄ para la precipitación de proteínas solubles provenientes del maíz.
- El método desarrollado es potencialmente automatizable, proponiéndose como estudio a futuro su acoplamiento en línea con GC-MS, lo cual permitiría reducir aún más el tiempo de análisis, reactivos y disolventes, así como también el costo del mismo.

Anexos

Anexo A

Etapas del método para la separación cromatográfica.

En estas etapas se describe la operación del sistema, en el paso 1 se dispensa agua por la posición OFF de la V2 al reservorio correspondiente, para liberar espacio y en el siguiente paso cargar muestra. Un volumen preciso de muestra es aspirado por la misma válvula en posición ON cuando la VS está en la posición 4 y la IV en modo de Inject paso 2, por el bucle de carga que tiene una capacidad de 2.5 mL, un diámetro interno de 1.8 mm, dicho bucle está conectado a un puerto central en la VS. Posteriormente, se activa la V2 en posición ON, con la VS en posición 1 y IV en modo Load, en donde la muestra se dispensa en el loop de carga con capacidad de 0.087 mL y empieza la detección y separación de los analitos paso 3. La separación que permanece por 300 s con un caudal de 2 mL/min impuesto con una bomba de HPLC, al término la válvula se coloca en posición 1 con la V2 en ON y se dispensa el exceso de muestra paso 4. Finalmente se llena la jeringa con agua paso 5 y el sistema está listo para comenzar el ciclo de análisis nuevamente.

Anexo B

Etapas de preconcentración.

Se desarrollaron dos procedimientos uno para la activación de fase sólida y el otro para preconcentrar el extracto y separación de los herbicidas.

En la etapa de activación de la fase sólida como se observa, el primer paso consiste en dispensar en la jeringa J2 un volumen de H₂O al reservorio con la V2 en modo OFF, para dejar un espacio y aspire por esta misma válvula en modo ON 1 mL de MeOH paso 2 cuando la VS está en la posición 7. Posteriormente se dispensa 1 mL MeOH y 1 mL de H₂O con la VS en la posición 6 y la V2 en ON y la IV en modo Inject paso 3, después se rellena la jeringa cargando 2 mL de H₂O en modo OFF paso 4, para dispensar 0.8 mL de H₂O en OFF paso 5, se aspira ese mismo volumen pero de aire con la V2 en ON, cuando la válvula está en la posición 1 paso 6 para eliminar restos de agua que no haya salido al desecho, estando la válvula en posición 6 ON y IV en modo Inject, finalmente en paso 7, la jeringa se llena y las válvulas se posicionan para iniciar con el paso 1 nuevamente.

El segundo procedimiento consta de una etapa de carga de muestra, una etapa de lavado y de una etapa de separación y detección. Para ejecutar dicho procedimiento el primer paso consistió en dispensar H₂O con la V2 en modo OFF al reservorio paso 1 para dejar un volumen libre y aspirar el extracto paso 2 cuando la VS está en la posición 4 y la V2 en modo ON, después la VS se mueve a la posición 6, estando la IV en modo Inject y V2 en ON para que se dispense el volumen del paso 2 a la fase sólida que retendrá los analitos paso 3,

posteriormente se vacía un volumen de agua al reservorio paso 4 para aspirar aire por la VS en 1, estando colocados la V2 y IV en ON e Inject respectivamente paso 5, después la VS se posiciona en 6, teniendo la V2 modo ON y IV en Inject para dispensar el aire paso 6, finalmente se llena la jeringa con un volumen mostrado en el paso 7, para que se repita cinco veces el paso 2-7; estos pasos que se mencionan corresponde a la etapa de carga de muestra. Cuando se termina este ciclo se procede a hacer la etapa de lavado para lo cual se dispensa un volumen paso 9 al reservorio de agua en modo OFF, entonces la VS se mueve a la posición 3 y V2 en modo ON, aspirando un volumen preciso paso 10, después se activa la válvula 6, en ON e Inject la V2 e IV, dispensando dicho volumen a la fase sólida para eliminar cualquier impureza que el extracto tenga paso 11; una vez suministrada se regresa un volumen de agua al reservorio en OFF paso 12, después la VS se dirige a la posición 3, en modo ON la V2 e IV Inject para aspirar un volumen de aire al bucle paso 13, este se mantiene por un momento y se activa la VS 6 en modo ON y en Inject la V2 y la IV, se dispensa a la fase sólida para que no haya restos de agua en el sólido paso 14, para terminar esta etapa la jeringa se llena con un volumen apropiado paso 15. Para finalizar con la etapa de elución de los analitos de la fase estacionaria y estos pasen a separarse a la columna monolítica C18 por un tiempo de 300 s, para realizarlo se dispensa un volumen adecuado de agua al reservorio en modo OFF paso 16, después se aspira un volumen de eluyente paso 17 cuando la VS está en la posición 2, en ON y modo Inject, luego la válvula se coloca en la posición 6 en ON e inyección y se dispensa la mitad del volumen que se aspiró en paso anterior paso 18 para que los analitos

se eluyan de sólido activándose la VS 1 y en modo de carga paso 19 para que pasen a separarse, cuando se termina la separación se activa la válvula 6 en modo ON e inyección y se dispensa el resto del volumen del paso 17 mandándose al desecho paso 20, entonces se procede a dispensar un volumen de agua al reservorio de agua por OFF paso 21, para dejar un espacio para la aspiración de aire paso 22 por la VS 1 en posición ON e inyección, después se dispensa ese aire cuando la válvula está en la posición 6 en ON e inyección paso 23, finalmente se rellena la jeringa en modo OFF para que el sistema esté listo para hacer nuevamente el paso 2.

Anexo C

Etapas de activación de fase sólida y preconcentración en el sistema Lab On Valve en la separación por GC-MS.

En la carga de la fase sólida se pesó 15 mg de fase, y se puso en la jeringa que estaba montada en el canal 8 suspendida en MeOH:H₂O (80:20 v/v), se aspiró con la V2 en modo ON hacia el bucle de carga, después la VS giro a la posición 5 teniendo la V2 en ON dispensando la fase, cabe mencionar que esta tenía una frita como medio de soporte.

Para realizar la preconcentración de los herbicidas se requieren de 3 etapas: acondicionamiento de la columna SPE, carga de muestra y elución de los analitos. Para realizar la etapa de acondicionamiento se realizó la carga de fase sólida antes mencionada, posteriormente se procedió a cargar cierta cantidad de agua a la jeringa con la V2 en OFF paso 3, se activó la VS en posición 7 y la V2 en ON cargándose MeOH:H₂O (80:20 v/v) para activar la fase paso 4, se dispensó en VS 5 y la V2 en ON paso 5. Para la carga de muestra se aspira un volumen conocido cuando la VS está en la posición 6 paso 7 y la V2 en modo ON, después se dispensa a la VS 5 paso 8 con la V2 en ON. Posteriormente se eluyen los analitos cuando se ha cargado un volumen de eluyente por VS en 1, con la V2 activada en ON paso 9, y se dispensa por VS 5 con V2 en modo ON. Finalmente se realizó una etapa de limpieza para evitar el efecto memoria y la contaminación cruzada entre muestras, en el cual se carga eluyente por VS 1 con la V2 en ON, dispensándose por VS 5 con la V2 activa en ON paso 11 y 12, seguido de carga

de agua por V2 en modo ON y dispensado por VS 5 con la V2 en ON paso 13 y 14.